
**Entwicklung multifunktional modifizierter
Silica-Nanopartikel und deren
Kompositmaterialien für Anwendungen in der
Nervenregeneration**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Sina Williams

geboren am 11.12.1984 in Uelzen

2013

Referent: Prof. Dr. Peter Behrens
Korreferentin: Prof. Dr. Cornelia Kasper
Tag der Promotion: 12.09.2013

Danksagung

Da diese Arbeit ohne die Hilfe vieler Menschen nicht im Entferntesten möglich gewesen wäre, möchte ich mich an dieser Stelle für die Hilfe bedanken.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Behrens bedanken, dass er mich in seinen Arbeitskreis aufgenommen hat, für das interessante Thema und für die gute Betreuung. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Ergebnisse auf diversen Tagungen präsentieren zu können.

Bei Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken sowie für die sehr gute Zusammenarbeit bezüglich der Untersuchungen meiner Proben. Herrn Prof. Dr. Franz Renz möchte ich für die Übernahme der Drittprüferschaft danken.

Ein großer Dank gilt allen Kooperationspartnern der PolySia-Forscherguppe für die gute Zusammenarbeit und ohne die eine Bearbeitung des Themas nicht möglich gewesen wäre. Danken möchte ich Friedrich Freiberger und David Schwarzer aus der Zellulären Chemie für viele wertvolle Tipps in Bezug auf den TBA- und Purpald[®]-Test sowie für den Endo-APC Test meiner Proben. Des Weiteren möchte ich mich bei Janett Schaper-Rinkel, Jennifer Metzen und Dr. Kirsten Haastert-Talini aus der Neuroanatomie bedanken, die zum einen diverse Fluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen angefertigt und zum anderen meine Silica-Nanopartikel kurzfristig *in vitro* getestet haben. Ein sehr großer Dank geht an Yi Su aus dem Institut für Organische Chemie für die Herstellung verschiedener Derivate der PolySia, die mir zur Nutzung bereitgestellt wurden. Darüber hinaus möchte ich mich bei Ismet Bice für die Bereitstellung der PolySia bedanken. Ein weiterer sehr großer Dank geht an Anne Neumann, Stefanie Böhm und Christine Strauß für zahlreiche Zellkulturexperimente meiner Proben sowie eine sehr gute Zusammenarbeit.

Für die rasterelektronischen Aufnahmen möchte ich mich bei Imke Bremer, Hendrik Fullriede und Gesa Wißmann bedanken. Außerdem auch bei Katharina Nolte sowie Christian Schröder für die thermogravimetrischen Messungen. Bei Natalja Wendt, Songül Noyun und Georg Platz möchte ich mich für Sorptionsmessungen sowie Diskussionen rund um die Sorption bedanken. Jann Lippke danke ich für die fotografischen Aufnahmen. Des Weiteren möchte ich mich bei Stella Kittel für die Atomabsorptionsmessungen bedanken.

Für die Herstellung zahlreicher Proben zur Charakterisierungen möchte ich mich bei meinen HiWis sowie Schwerpunktpraktikanten bedanken. Dabei sind Aniko Simon und Nanyi Wang zu erwähnen, die vor allem Proben hergestellt und funktionalisiert haben.

Bei allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreis Behrens (Katharina Nolte, Jann Lippke, Fabian Kempf, Georg Platz, Janosch Cravillon, Andreas Schaate, Imke Bremer, Florian Waltz, Hendrik Fullriede, Christian Schröder, Mark Kieke, Phillip Zerner, Hans-Christoph Schwarz, Philip Amshoff, Simon Dünen, Tamás Simon, Nina Ehlert, Sergej Springer, Gesa Wißmann, Natalja Wendt, Tammo Lüßenhop, Maria Schweinefuß, Tanja Heemeier, Janina Willkomm, Sebastian Lilienthal, Anne Christel, Sebastian Fessel, Britta Hering, Olga Kufelt, Stephanie Steinhaus, Reimar Münekhoff, Sven-Jare Lohmeier, Birgit Beiße, Songül Noyun, Andreas Schneider, Merle Feldt, Michael Wiebcke, Birgit Förster und Chef) möchte ich mich für eine der schönsten Zeiten in meinem Leben bedanken, denn es war für mich nicht nur ein Arbeitskreis sondern vielmehr ein Freundeskreis. Unvergesslich werden mir alle gemeinsamen Ausflüge, Boßeltouren, Videoabende, Kanufahrten, Grillfeste oder auch die Kaffeepausen bleiben. Dabei möchte ich mich besonders bei Katharina Nolte bedanken, dafür dass sie immer für mich da war. Des Weiteren möchte ich Fabian Kempf und Jann Lippke danken, dass sie stets ein offenes Ohr hatten während ich meine Arbeit zusammen geschrieben habe sowie für die gelegentlichen lustigen Ablenkungen zwischendurch. Ein weiterer Dank gilt Dr. Nina Ehlert für die Zeit, die sie zum Lesen dieser Arbeit aufgebracht hat.

Meinen Freunden und meiner Familie kommt ein sehr großes Dankeschön zu, das ich nicht wirklich in Worte fassen kann, denn ohne euch wäre ich niemals so weit gekommen. Daher möchte ich mich bei meinen Freunden Jani, Carl und Rolf dafür bedanken, dass ihr es immer wieder schafft mich aufzubauen und dass ihr mich immer von allem ablenken konntet. Für die Unterstützung in jeder Lebenslage bin ich meiner Familie bestehend aus meiner Mutter, Matze, meinem Bruder Chris und meinen Großeltern unendlich dankbar. Es ist schön zu wissen, dass immer jemand für einen da ist und dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Inhaltsübersicht

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anbindung von Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoffen (Alexa Fluor® 488-Azid, -Alkin und -Hydroxylamin) an verschiedene nanoporöse Silica-Nanopartikel sowie mit der Herstellung von Collagen-Kompositen solcher Nanopartikel, um deren Einsetzbarkeit als Biomaterial im Bereich der Nervenregeneration zu untersuchen. Die Polysialinsäure kommt im sich bildenden Nervensystem von Vertebraten vor und spielt eine Rolle beim Wachstum von Axonen. Des Weiteren stellt sie ein sehr gutes Medium für die Kultivierung von Schwann-Zellen dar, die essentiell für die Nervenregeneration sind.

Die Anbindung an die nanoporösen Silica-Nanopartikel erfolgte über zwei Funktionalisierungsstrategien, um deren Auswirkung auf die Biokompatibilität zu überprüfen. Die erste Strategie verwendete ein konventionelles Linker-System aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Bernsteinsäureanhydrid (BSA). Bei der zweiten Strategie wurde die Kupfer(I)-katalysierte „Click“-Reaktion nach HUISGEN zwischen einem terminalen Alkin und einem Azid für die Immobilisierung der beiden Substanzen genutzt. Des Weiteren wurden die Nanopartikel mit Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoffen multifunktionalisiert, indem die verschiedenen Funktionalisierungsstrategien miteinander kombiniert wurden. Die Herstellung der Collagen-Silica-Komposite erfolgte über eine Infiltrierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln in die kommerziell erhältliche Collagen-Membran MatriStypt®.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Nanopartikel sowohl über das Linker-System als auch über die „Click“-Chemie erfolgreich mit Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoff funktionalisiert werden konnten. Mit Hilfe von Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel bei der Funktionalisierung mit dem Linker-System nach jedem Schritt eine sehr gute Biokompatibilität aufweisen, während bei der „Click“-Chemie aufgrund von Rückständen des Kupfer-Katalysators eine akute Toxizität zu beobachten war. Außerdem konnten multifunktionell ausgestattete Nanopartikel synthetisiert werden, die bei der Verwendung des Linker-Systems ebenfalls eine hervorragende Biokompatibilität zeigen.

Collagen-Silica-Komposite konnten erfolgreich durch Infiltration der Nanopartikel in eine Collagen-Membran hergestellt werden, wobei sich herausstellte, dass auf eine anschließende Quervernetzung mit Glutaraldehyd verzichtet werden kann. Außerdem wiesen diese Materialien eine sehr gute Biokompatibilität auf. Des Weiteren konnten die Materialien in Röhrchen geformt werden, so dass diese als Nervenleitschienen eingesetzt werden können. Die Infiltrierung gelang auch mit Polysialinsäure beschichteten Nanopartikeln; ebenso war auch die Funktionalisierung der zuvor hergestellten Collagen-Silica-Komposite mit Polysialinsäure über das konventionelle Linker-System erfolgreich.

Stichworte: Polysialinsäure, nanoporöse Silica-Nanopartikel, Collagen, „Click“-Chemie, Funktionalisierungsstrategien

Abstract

The present work deals with the immobilization of polysialic acid and fluorophores (Alexa Fluor® 488 Azid, Alkin und Hydroxylamin) on different nanoporous silica nanoparticles as well as with the synthesis of collagen-silica composites to prove their applicability as biomaterial in nerve regeneration. Polysialic acid is found in the developing nervous system of vertebrates and plays a role for the growth of axons. Furthermore it provides a favourable medium for the cultivation of Schwann cells which are essential for nerve regeneration.

The immobilization on different nanoporous silica nanoparticles was performed by two functionalization strategies to prove their effects on biocompatibility. The first strategy used a conventional linker system of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and succinic anhydride (BSA). For the second approach the copper-catalyzed “click” reaction after HUISGEN between a terminal alkyne and an azide was carried out in order to immobilize polysialic acid on both substrates. Furthermore, the nanoparticles were multifunctionalized with polysialic acid and fluorophore by combining the different functionalization strategies. The collagen-silica composite materials were synthesized by infiltration of the nanoporous silica nanoparticles into the commercially available Collagen-Membrane, MatriStypt®.

The nanoparticles can be successfully functionalized with polysialic acid and fluorophores *via* the linker system and *via* “click” chemistry. With the support of cell culture experiments, it could be shown that the nanoparticles functionalized *via* the linker system show a very good biocompatibility after every functionalization step whereas the nanoparticles functionalized *via* “click” chemistry showed acute toxicity due to residues of the copper catalyst. In addition, multifunctionalized nanoparticles were synthesized which exhibited a good biocompatibility as well when only the linker system was used.

Collagen-silica composites were successfully prepared by infiltration of the nanoparticles into a collagen membrane. It could be demonstrated that cross-linking with glutaraldehyde is not necessary. Furthermore, these materials showed also a very good biocompatibility. In addition the materials were shaped into tubes so that they could be used as nerve guidance channels. Besides, the infiltration with nanoparticles which were prefunctionalized with polysialic acid as well as the posterior functionalization with polysialic acid of nanoparticles which had been infiltrated into the membrane was successful.

Keywords: polysialic acid, nanoporous silica nanoparticle, collagen, “click” chemistry, functionalization strategies

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeine Grundlagen.....	5
2.1 Nanoporöse Silica-Materialien als Implantatwerkstoff.....	5
2.1.1 Nanoporöse Silica-Filme.....	5
2.1.2 Nanoporöse Silica-Nanopartikel (NPSNPs).....	7
2.2 „Click“-Chemie	10
2.3 Fluoreszierende Nanopartikel	14
2.3.1 Fluoreszenz.....	15
2.3.2 Anwendung in der Biomedizin.....	16
2.4 Polysialinsäure	17
2.5 Collagen-Materialien.....	21
2.5.1 Collagen.....	21
2.5.2 Collagen-Silica-Komposite.....	26
3. Analytische Methoden.....	28
3.1 Röntgen-Pulverdiffraktometrie.....	28
3.2 Infrarot-Spektroskopie.....	28
3.3 Thermogravimetrie und Differentialthermoanalyse	29
3.4 Rasterelektronenmikroskopie	30
3.5 Dynamische Lichtstreuung	31
3.6 Sorptionsmessung	31
3.7 Thiobarbitursäure-Test.....	32
3.8 Purpald [®] -Test.....	33
3.9 Fluoreszenz-Spektroskopie.....	35
3.10 Fluoreszenz-Mikroskopie	35

3.11 Atomabsorptionsspektrometrie	36
3.12 Zellkulturexperimente	36
3.12.1 Zellviabilität (MTT-Test).....	38
3.12.2 Zelladhäsion (DAPI Färbung)	39
3.13 Färbung mit Endosialidase-Allophycocyanin (Endo-APC)	39
3.14 <i>In vitro</i>-Implantation von funktionalisierten Silica-Nanopartikeln	40
4. Experimenteller Teil	42
4.1 Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln	42
4.1.1 Synthese von nanoskaligen MCM-41-Nanopartikeln.....	42
4.1.2 Synthese von kolloidalen mesoporösen Silica-Nanopartikeln.....	43
4.2 Anbindung über ein Linker-System aus APTES und Bernsteinsäureanhydrid	43
4.2.1 Deacetylierung der Polysialinsäure.....	44
4.2.2 Tetrabutylammonium-Austausch	44
4.2.3 Anbindung von Polysialinsäure über das Linker-System	44
4.2.4 Reacetylierung der angebotenen Polysialinsäure.....	46
4.2.5 Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen über das Linker-System	47
4.3 Alkin- bzw. Azidfunktionalisierung von Silica-Nanopartikeln	47
4.4 Kupferkatalysierte „Click“-Reaktionen nach HUISGEN	48
4.4.1 Anbindung von Polysialinsäure über die „Click“-Chemie	49
4.4.2 Kupfer-freie Anbindung von Polysialinsäure über die „Click“-Chemie	50
4.4.3 Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen über die „Click“-Chemie	50
4.5 Multifunktionalisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Polysialinsäure	51
4.5.1 Multifunktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid und Propiolsäure.....	52
4.5.2 Anbindung über Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie	52
4.5.3 Anbindung ausschließlich über die „Click“-Chemie	54
4.5.4 Anbindung ausschließlich über das Linker-System	55
4.6 Collagen-Silica-Komposit-Materialien	56
4.6.1 Infiltrierung mit unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln	56
4.6.2 Quervernetzung mit Glutaraldehyd	57
4.6.3 Funktionalisierung der infiltrierten Collagen-Silica-Komposite	57
4.6.4 Infiltrierung von mit Polysialinsäure beschichteten CMS-Nanopartikeln.....	58

5. Ergebnisse und Diskussion.....	60
5.1 Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln	60
5.1.1 MCM-41	60
5.1.2 Kolloidale nanoporöse Silica-Nanopartikel	66
5.1.3 Vergleichende Diskussion.....	71
5.2 Einfluss der Hydrolyse auf den Thiobarbitursäure- und den Purpald[®]-Test.....	74
5.2.1 Thiobarbitursäure-Test	74
5.2.2 Purpald [®] -Test.....	76
5.2.3 Vergleichende Diskussion.....	77
5.3 Anbindung von Polysialinsäure über das Linker-System aus APTES und Bernsteinsäureanhydrid.....	78
5.3.1 MCM-41	78
5.3.2 Kolloidale mesoporöse Silica-Nanopartikel.....	90
5.3.3 Vergleichende Diskussion.....	98
5.4 Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffes über das Linker-System an CMS- Nanopartikel.....	101
5.5 „Click“-Reaktionen nach HUISGEN	104
5.5.1 Anbindung von Azid-modifizierter Polysialinsäure über „Click“-Chemie an MCM-41-Nanopartikel.....	104
5.5.2 Anbindung von Alkin-modifizierter Polysialinsäure über „Click“-Chemie an MCM-41-Nanopartikel.....	111
5.5.3 Anbindung von Polysialinsäure über eine Kupfer-freie „Click“-Reaktion an mit Azid-modifizierten CMS-Nanopartikeln.....	119
5.5.4 „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor [®] 488-Azid an MCM-41-Nanopartikel.....	120
5.5.5 „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor [®] 488-Alkin an MCM-41-Nanopartikel.....	124
5.5.6 Vergleichende Diskussion.....	128
5.6 Multifunktionalisierung von CMS-Nanopartikeln mit Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoff.....	130
5.6.1 Multifunktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid und Propiolsäure.....	130
5.6.2 Anbindung über Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie	133
5.6.3 Anbindung ausschließlich über „Click“-Chemie	154
5.6.4 Anbindung ausschließlich über das Linker-System.....	157
5.6.5 Vergleichende Diskussion.....	172
5.7 Collagen-Silica-Komposit-Materialien.....	176
5.7.1 Infiltrierung mit unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln in MatriStypt [®]	176
5.7.2 Funktionalisierung von infiltrierten Collagen-Silica-Kompositen	184

5.7.3	Infiltrierung von mit Polysialinsäure beschichteten CMS-Nanopartikeln in MatriStypt®	190
5.7.4	Vergleichende Diskussion	194
6.	Zusammenfassung und Ausblick	197
7.	Literaturverzeichnis	205
8.	Anhang	213

Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	Modified Eagle's Medium
Abb.	Abbildung
adMSC	adipose-derived mesenchymal stem cells
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATR	engl.: attenuated total reflection (abgeschwächte Total Reflexion)
as syn	as synthesized
BSA	Bernsteinsäureanhydrid
BMP2	bone morphogenetic protein 2
BUTMS	11-Bromoundecyltrimethoxysilan
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CMS	engl.: colloidal mesoporous silica
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DEA	Diethylamin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTA	Differenz-Thermo-Analyse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EISA	Evaporation-Induced Self-Assembly
endoNF	Endosialidase NF
et al.	lat.: et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FBS	foetal bovine serum
Gl.	Gleichung
HepG2	human hepatocellular carcinoma cell line
IR	Infrarot
ISC	immortalisierte Schwann-Zellen
K	Kelvin
KBr	Kaliumbromid
λ	Wellenlänge
LM	Lösungsmittel
μ L	Mikroliter

mL	Milliliter
mmol	Millimol
MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCAM	neuronaies Zell-Adhäsionsmolekül
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure
Neu5Gc	5- <i>N</i> -Glycol-Neuraminsäure
nm	Nanometer
NPSNPs	nanoporöse Silica-Nanopartikel
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PEG	Poly-(Ethylenglycol)
PolySia	Polysialinsäure
REM	Rasterelektronenmikroskop
s.	siehe
SDA	strukturdirigierendes Agens
SDS	sodium dodecyl sulphate
<i>T</i>	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBA	Tetrabutylammonium
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TBA-Test	Thiobarbitursäure-Test
TEA	Triethylamin
TG	Thermogravimetrie
TEOS	Tetraethoxysilan
XRD	engl.: X-ray diffraction
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Biomaterialien werden im großen Umfang in der Medizin benötigt, um diverse Krankheiten zu heilen und bestimmte Körperfunktionen zu ersetzen, wie zum Beispiel durch Knochenimplantate. Dabei können die Biomaterialien in der medizinischen, zahnmedizinischen, veterinären und pharmazeutischen Anwendung als Implantate eingesetzt werden, um Leben zu retten oder die Lebensqualität zu verbessern.^[1] Da diese Biomaterialien in direkten Kontakt mit dem Körpergewebe kommen und der Körper eindringende Fremdkörper abstößt, müssen sie einige Anforderungen erfüllen, die je nach Einsatzgebiet variieren, um optimal in der biologischen Umgebung zu funktionieren.^[2] Die wichtigste Anforderung ist dabei die Biokompatibilität der Materialien, wobei sie selbst sowie eventuelle Abbauprodukte keine toxischen Wirkungen auf den Organismus haben dürfen.^[1]

In den letzten Jahren haben Nanomaterialien aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften eine sehr große Bedeutung im Bereich der biomedizinischen Anwendungen gefunden. Insbesondere nanoporöse Materialien auf der Basis von amorphem Siliciumdioxid, sogenanntem Silica, haben ein großes Interesse in dieser Hinsicht geweckt, da sie sehr einfach synthetisiert werden können, in vielen Bereichen einsetzbar sind und einzigartige Eigenschaften aufweisen.^[3,4,5] Erst kürzlich wurde ein erster Versuch an Menschen mit Silica-Nanopartikeln von der FDA zugelassen.^[6]

Generell können nanoporöse Silica-Materialien entweder als nanoporöse Silica-Nanopartikel oder als nanoporöse Filme auf verschiedenen Substraten als Implantatwerkstoff genutzt werden.^[4,7-16] Ihre Vorteile im Hinblick auf die Nutzung als Biomaterial liegen vor allem in ihrer sehr guten Biokompatibilität, der sehr großen spezifischen Oberfläche, dem großen Porenvolumen sowie der hohen Reaktivität der Silanolgruppen an der Oberfläche.^[4,5,17,18] Während das Porensystem der nanoporösen Materialien generell als Drug Delivery-System genutzt werden kann, um Medikamente an bestimmte Orte zu transportieren und dort kontrolliert abzugeben, basiert die breite Einsetzbarkeit auf der reichen Oberflächenchemie.^[4,7,8,19,20] Über die Silanolgruppen können verschiedene funktionelle Gruppen an die Oberfläche eingeführt werden, so dass die Materialien im Hinblick auf ihre Anwendung spezifisch optimiert werden können. Eine Möglichkeit besteht zum Beispiel darin, die Nanopartikel durch das Einführen eines magnetischen Kerns im Körper über externe Magnetfelder lenken zu können oder durch die Immobilisierung von Fluoreszenzfarbstoffen eine optische Verfolgung der Nanopartikel im Organismus zu gewährleisten.^[5,21,22] Werden die fluoreszierenden und magnetischen Eigenschaften in einem Nanomaterial kombiniert, können einzigartige multifunktionelle Einheiten erhalten werden.^[5,21,23]

Durch eine geeignete Oberflächenmodifizierung der Silica-Materialien mit Biomolekülen oder Polymeren kann deren Aufenthaltsdauer im Körper erhöht werden.^[24-28] Dabei können zum Beispiel Bakterien imitiert werden, die eine Technik gefunden haben, das Immunsystem zu umgehen.^[24-28] Sie werden nicht als Fremdkörper erkannt und können sogar die Blut-Hirn-

Schranke passieren, indem sie sich mit Polysialinsäure (PolySia) umhüllen.^[24-28] Die PolySia kommt in Vertebraten vor, wodurch sie nicht als Fremdkörper erkannt wird und somit sehr gut biokompatibel ist.^[24,25,29,30] Es handelt sich dabei um ein homopolymeres Kohlenhydrat, das im embryonalen Zustand während der Ausbildung des Nervensystems eine Rolle spielt, dessen Vorkommen kurz nach der Geburt herunter reguliert wird und das beim Erwachsenen nur noch in bestimmten Regionen des Gehirns gefunden werden kann.^[25,29,31-33] Silica-Materialien, die mit Polysialinsäure umhüllt sind, könnten für verschiedene Anwendungen sehr interessant sein, da sich zum Beispiel die Aufenthaltsdauer der Nanopartikel erhöhen sollte. Da die PolySia bei der Nervenregeneration eine Rolle spielt und da sie ein gutes Kulturmedium für Schwann-Zellen darstellt, könnten Silica-Nanopartikel, die mit PolySia umhüllt sind, im Bereich der Nervenregeneration eingesetzt werden, zum Beispiel in dem zerstörte Nerven mit einem Silicon-Röhrchen überbrückt werden, in das eine Suspension dieser Nanopartikel injiziert wird.^[24,30,32,33] Auch könnten Röhrchen aus Kompositmaterialien hergestellt werden, die mit Polysialinsäure funktionalisiert sind, und die so als Nervenleitschienen helfen können, die Nervenlücke zu überbrücken. Eine schematische Darstellung einer Nervenleitschiene ist in Abb. 1-1 gezeigt.

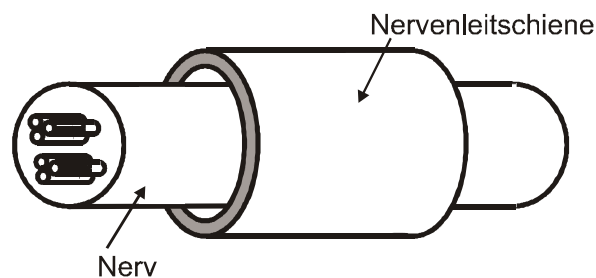


Abb. 1-1: Schematische Darstellung einer Nervenleitschiene.

Bei Collagen handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Biopolymer, dass in vielen Geweben von Tieren sowie Menschen zu finden ist.^[34-37] Da es selbst sehr gut biokompatibel ist und in biologischen Umgebungen abgebaut wird, wobei keine toxischen Substanzen hinterlassen werden, handelt es sich um ein ideal biokompatibles Material.^[34,37,38] Aufgrund seiner Bioresorbierbarkeit eignet es sich besonders für Applikationen, bei denen das Implantat nach einer gewissen Zeit abgebaut werden soll. Dabei sind die Einfachheit der Herstellung sowie das verbreitete Vorkommen in der Natur sehr von Vorteil.^[37,38] Des Weiteren bietet die faserartige Struktur des Collagens eine hervorragende Matrix, so dass Kompositmaterialien hergestellt werden können, die komplexe Strukturen aus organischen und anorganischen Komponenten der Natur imitieren.^[36,39] Ein Komposit aus Collagen und nanoporösen Silica-Nanopartikeln kann zum Beispiel in Form von Röhrchen hergestellt werden und durch weitere Funktionalisierung mit PolySia als Material in der Nervenregeneration eingesetzt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war, verschiedene Wege zur Immobilisierung von Polysialinsäure als vielversprechende Substanz zur positiven Beeinflussung der Nervenregeneration sowie von Fluoreszenzfarbstoffen mit dem Zweck der fluoreszenzmikroskopischen Verfolgung der

Nanopartikel an verschiedene nanoporöse Silica-Nanopartikel und an Collagen-Silica-Komposit-Materialien zu demonstrieren und diese im Hinblick auf die Verwendung als Biomaterial, insbesondere im Bereich der Nervenregeneration, zu untersuchen. Dabei wurden zwei verschiedene Anbindungsstrategien verfolgt. Die erste Methode zur Anbindung erfolgte über ein herkömmliches Linker-System aus 3-Aminopropyltriethoxysilan und Bernsteinsäureanhydrid, während bei der zweiten Methode die Kupfer(I)-katalysierte „Click“-Reaktion nach HUISGEN zwischen einem terminalen Alkin und einem Azid unter Bildung eines 1,2,3-Triazols zum Einsatz kam.^[40-42] Dabei hat die zweite Variante den Vorteil, dass unter den Reaktionsbedingungen andere funktionelle Gruppen in Biomolekülen weitgehend inert sind, so dass keine unerwünschten Nebenreaktionen ablaufen können und dass das Produkt stabil gegenüber Oxidation und Hydrolyse ist.^[41,43,44] Ein Nachteil dieser Variante ist jedoch die Notwendigkeit des Einsatzes von Kupfer als Katalysator, das auf Zellen und Gewebe toxisch wirken kann.^[42,43] Bei der Anwendung dieser Reaktion müssen zunächst Alkin- bzw. Azidgruppen auf der Oberfläche eingeführt werden, damit diese mit den komplementär modifizierten Molekülen reagieren können.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Nanopartikel simultan mit Polysialinsäure sowie einem Fluoreszenzfarbstoff auszustatten, um diese multifunktionellen Nanopartikel während der Nervenregeneration optisch verfolgen zu können. Dazu wurden verschiedene Kombinationen aus den vorher verwendeten Modifizierungsstrategien kombiniert, um einerseits eine möglichst hohe Menge an PolySia anbinden zu können, andererseits aber auch eine ausreichende Fluoreszenz der Nanopartikel zu generieren. Mit Hilfe solcher multifunktionellen Nanopartikel können die Eigenschaften der Nanopartikel für die jeweilige Verwendung als Biomaterial spezifisch angepasst werden. Dabei könnten prinzipiell noch weitere Modifikationen eingeführt werden, wie zum Beispiel ein magnetischer Kern zur Lenkung der Nanopartikel oder ein Drug Delivery-System, zur lokalen kontrollierten Medikamentenabgabe. Außerdem könnten verschiedene Biomoleküle an die Oberfläche gebunden werden, je nachdem für welchen biomedizinischen Zweck die Nanopartikel eingesetzt werden sollen. Die Abb. 1-2 fasst diese Möglichkeiten zusammen.

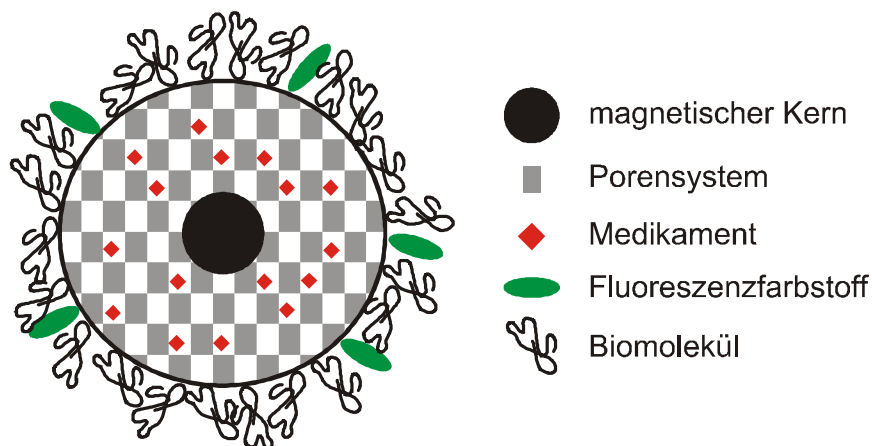


Abb. 1-2: Multifunktionell ausgestattete nanoporöse Silica-Nanopartikel.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Collagen-Silica-Kompositen, die PolySia enthalten, und in der Nervenregeneration eingesetzt werden können. In diesem Fall wurde nur die Funktionalisierungsstrategie mittels des Linker-Systems untersucht. Dabei sollten aus den Kompositen Röhren geformt werden, die in der Lage sind, Nervenlücken zu überbrücken.

2. Allgemeine Grundlagen

2.1 Nanoporöse Silica-Materialien als Implantatwerkstoff

Nanoporöse Silica-Materialien auf der Basis von amorphem Siliciumdioxid finden aufgrund ihrer Eigenschaften wie die geringe Toxizität, exzellente chemische Stabilität und der einfachen Oberflächenmodifizierbarkeit in vielen Bereichen Anwendung. Weitere Vorteile sind, dass sowohl die Porenform als auch die Porengröße variabel einstellbar sind, dass sie in definierten Größen hergestellt werden können, sie eine große Oberfläche besitzen, finanziell tragbar sowie gut biokompatibel sind und über die Silanolgruppen auf der Oberfläche funktionalisiert werden können.^[4,5,17,18] Daher werden sie bereits in verschiedenen biomedizinischen Bereichen als Implantatwerkstoff verwendet, wie zum Beispiel als Trägermaterial für Drug Delivery sowie einer kontrollierten Freigabe des Medikaments, zur Zellmarkierung, für Gene Delivery und als Trägermaterial für Enzyme.^[4,8,7,20,45,46] Von der United States Food and Drug Administration (FDA) wurden diese Materialien aufgrund ihrer Biokompatibilität als generell sicher eingestuft.^[3,5,47] Dabei können die Materialien als nanoporöse Filme auf verschiedenen Substraten abgeschieden werden, um beispielsweise Implantate oder Prothesen zu verbessern oder es können Nanopartikel hergestellt werden.^[4,7,48] Nanoporöse Silica-Materialien können durch Kondensation von amorphem Silica um geordnete Aggregate aus amphiphilen Molekülen hergestellt werden, wobei das Porensystem durch Calcination oder Extraktion zugänglich gemacht werden kann.^[4,47]

2.1.1 Nanoporöse Silica-Filme

Nanoporöse Silica-Filme als Beschichtung auf medizinischen Prothesen und Implantaten sind sehr vielversprechend, da sie gut biokompatibel sind und Wechselwirkungen mit Zellen und somit auch die biologische Interaktion des Implantats verbessern können.^[4,7,9,10] Ein mögliches Einsatzgebiet ist die Anwendung im Mittelohr. Hier soll der Heilungsprozess durch die nanoporöse Schicht und deren Modifizierungen beschleunigt sowie eine bessere Fixierung der Prothese erzielt werden.^[4,7,9] Als Substrate für die nanoporösen Silica-Filme wurden zum einen Glasplatten für Vorversuche und zum anderen das kommerziell erhältliche Bioverit[®] II, eine Glasglimmerkeramik, die bereits als Implantatmaterial genutzt wird, verwendet.^[4,7,11,12]

Die dünnen Filme können durch Dip- und Spin-Coating Prozesse auf verschiedene Substrate abgeschieden werden, wobei die Filmbildung über den EISA (Evaporation-Induced Self-Assembly) Prozess erfolgt.^[4,7] Beim Dip-Coaten wird das Substrat in eine verdünnte Lösung, bestehend aus Tetraethoxysilan, Ethanol, Wasser, Salzsäure und einem strukturdirigierenden Agens (SDA), getaucht.^[4] Die Konzentration der Komponenten erhöht sich beim Herausziehen der Substrate aus der Lösung, wodurch größere geordnete

Aggregate der SDAs und des Silicas gebildet werden bzw. diese einer Kondensation aufgrund der Verdampfung des Lösemittels an der Flüssig-Luft-Grenze unterliegen.^[4] Das Porensystem wird durch Calcination bei 415 °C zugänglich gemacht.^[4,7] Aufgrund der rauen Beschaffenheit der Oberfläche des Bioverits[®] II wurden bei diesen Substraten drei Schichten erzeugt, um eine vollständige Bedeckung der Oberfläche zu erreichen.^[4] Die Poren des nanoporösen Silica-Films sind ungeordnet, jedoch sind sie so angeordnet, dass die Öffnungen frei zugänglich sind.^[4] Dünne Silica-Filme sind nicht sehr stabil in Wasser, wobei die Struktur nach wenigen Stunden im Kulturmedium zusammenbricht, jedoch nimmt die Stabilität mit abnehmender Filmdicke zu, so dass die Filme bis zu 24 Stunden stabil sind.^[4] Eine Methode um die Wasserstabilität zu erhöhen, ist die Oberflächenmodifizierung des Films durch Silanisierung oder Anbindung von Proteinen, wodurch die Oberfläche geschützt wird.^[4] Außerdem zeigen die Filme auf Glasplatten sowie auf Bioverit[®] II eine sehr gute Biokompatibilität.^[4,7,10,12] Durch die Beschichtung des Bioverit[®] II mit einem Silica-Film konnte eine geringere Bioaktivität im Vergleich zum reinen Material beobachtet werden, was eine geringere Knochenbildung im Tierexperiment bei den beschichteten Implantaten zur Folge hatte.^[4,10] Des Weiteren konnte die Bildung einer Schleimhautschicht auf den Implantaten beobachtet werden, so dass die Implantate sich gut in den Körper integriert haben und es sich um ein sehr gutes Material für Mittelohrimplantationen handelt.^[4,10,49]

Zur Förderung der Fixierung des Implantats und des Heilungsprozesses im Mittelohr kann der Knochenwachstumsfaktor BMP2 (bone morphogenetic protein 2) lokal an einem Ende der Prothese an die nanoporösen Silica-Filme angebunden werden, so dass eine knöchrige Verbindung zwischen dem Implantat und den knöchernen Restbeständen des Mittelohrs entstehen kann.^[4,9,11] Als kostengünstigere Alternative wurde innerhalb dieser Untersuchungen zunächst das Protein alkalische Phosphatase (ALP) über einen Aminolinker an die Silanolgruppen an der Oberfläche angebunden.^[4,11] Da dessen Aktivität sehr einfach ermittelt werden kann, indem ein Enzymtest verwendet wird, diente dieses System als Modellsystem für die Entwicklung einer geeigneten Anbindungschemie.^[4,11] Dieser Mechanismus kann auf die Anbindung des BMP2 übertragen werden, wobei darauf geachtet werden muss, dass bei der Anbindung die Aktivität des Enzyms nicht reduziert wird, indem beispielsweise konformative Änderungen oder sterische Hinderungen durch die Immobilisierung auftreten.^[4,11] Bei der Anbindung von BMP2 konnte eine lokale biologische Aktivität bei Tierexperimenten beobachtet werden.^[4]

Eine weitere Möglichkeit mit nanoporösen Silica-Filmen beschichtete Implantate zu modifizieren, besteht darin, das Porensystem als Trägermaterial für eine lokale Medikamentenabgabe zu nutzen, um bakterielle Infektionen zu bekämpfen.^[4,7,9] Dazu kann zum Beispiel ein Antibiotikum wie Ciprofloxacin in das Porensystem eingelagert werden, wodurch eine örtliche Abgabe des Antibiotikums aus dem Implantat erzielt wird, so dass schädliche Nebeneffekte einer systematischen Verabreichung des Antibiotikums vermieden werden können.^[4] Des Weiteren können die Bakterien durch die lokale Abgabe des Antibiotikums direkt bekämpft werden, bevor sich ein Biofilm auf den Implantaten bildet.^[4] Dabei kommt es bei den reinen Silica-Filmen zu einem „Initial-Burst-Effekt“ bei der

Freisetzung des Medikaments, wobei nur geringe Mengen freigesetzt werden konnten.^[4,7] Durch das Immobilisieren von negativ geladenen Sulfonatgruppen im Porensystem können durch elektrostatische Wechselwirkungen höhere Mengen des bei pH 4 positiv geladenen Ciprofloxacins in die Poren eingelagert werden, wodurch der „Initial-Burst-Effekt“ jedoch nicht verringert wird.^[4,7] Um diesen zu verringern, können weitere Funktionen auf die Oberfläche eingeführt werden, wie eine hydrophobe Polymerschicht aus Bis-(trimethoxysilyl)hexan, die über einen schnellen Dip-Coating-Prozess auf die Oberfläche nach der Einlagerung des Ciprofloxacin abgeschieden wird.^[4,7] Dadurch stehen weitere Silanolgruppen für die Anbindung einer weiteren hydrophoben Schicht mit Tetramethyldioctyldisilan über eine Dampfphase zur Verfügung.^[4,7] Durch diese hydrophoben Schichten können wässrige Medien nicht mehr in die Poren eindringen.^[4,7] Dadurch wird die Freisetzung verlangsamt und das Medikament kann konstant abgegeben werden.^[4,7] Auch diese Oberflächenmodifizierungen zeigen sehr gute Biokompatibilitäten abgesehen von den Silanisierungsschritten, bei denen eine geringere Zelldichte zu erkennen ist, was jedoch nicht unbedingt auf eine Toxizität hinweist, sondern auf eine reduzierte Zelladhäsion und ein geringeres Wachstum aufgrund der Hydrophobizität der Oberfläche.^[4,7] Des Weiteren haben die Drug Delivery-Systeme im Tierversuch ihre Effizienz in der lokalen Abgabe von Medikamenten gezeigt, wobei die geringe Menge des Ciprofloxacins durch die lokale Anwendung effektiv eine Infektion behandeln kann.^[4,7]

2.1.2 Nanoporöse Silica-Nanopartikel (NPSNPs)

Nanoporöse Silica-Nanopartikel finden in vielen biomedizinischen Bereichen Anwendung, als Trägermaterial für Drug Delivery-Systeme, Antikrebsmedikamente, Enzyme und DNA.^[8,13-16] Gründe hierfür sind vor allem ihr geordnetes Porensystem, die große Oberflächen, das erhebliche Porenvolumen sowie die einstellbare Porengröße.^[8,13-16] Sie sind nicht toxisch, haben daher eine sehr gute Biokompatibilität und ihre Oberfläche kann sehr einfach über die vorhandenen Silanolgruppen funktionalisiert werden.^[3,15,50,51] Daher ist es möglich Enzyme, Proteine oder DNA an die Oberfläche der Silica-Nanopartikel zu binden, um eine einzigartige Biofunktionalität einzuführen, so dass die Nanopartikel für Anwendungen als Biosensoren und für Studien über Wechselwirkungen an Grenzflächen eingesetzt werden können.^[52] Erst kürzlich wurde ein erstes Experiment von der FDA genehmigt, indem Nanopartikel an Menschen getestet werden.^[6,41]

Nanoporöse Silica-Nanopartikel können mit Hilfe des Flüssigkristall-Templat-Mechanismus, wobei sich die Template selbst zu Mizellen organisieren, um die die Silica-Spezies kondensieren kann, über Kondensationschemie unter milden Bedingungen hergestellt werden.^[14,46,53-56] Dabei kann die Porengröße zwischen 2 und 50 nm sowie die Morphologie eingestellt werden, indem verschiedene Template eingesetzt werden.^[14,46,53-56] Die Entfernung des Templates kann über Calcination, Extraktion, Mikrowellenstrahlung und über UV-Licht erfolgen.^[54,57]

Die Oberflächenmodifizierung kann über zwei Wege erfolgen: dem Grafting nach der Synthese und der Co-Kondensation.^[57-59] Beim Grafting können verschiedene organische Funktionalitäten kovalent an die Oberfläche der Silica-Nanopartikel gebunden werden, indem eine Kondensationsreaktion zwischen den Silanolgruppen der Oberfläche und einem Alkoxysilan stattfindet, wobei die Morphologie sowie die Porenstruktur der Nanopartikel stabil sind.^[57,58] Allerdings wird nur eine inhomogene Abdeckung der Oberfläche erhalten, da die äußere Oberfläche besser zugänglich ist.^[57,58] Bei der zweiten Methode der Co-Kondensation wird das benötigte Alkoxysilan bereits während der Synthese an die Nanopartikel kondensiert, wodurch homogene Beschichtungen erhalten werden können.^[57,58] Des Weiteren kann mit dieser Variante der Grad der Funktionalisierung, die Nanopartikelgröße sowie die Morphologie kontrolliert werden.^[46,57,58] Der Einfluss der Alkoxysilane hängt dabei von der Fähigkeit der Silane ab, die Mizellen der Template entweder zu stabilisieren oder zu destabilisieren.^[57] Werden nicht-polare Gruppen verwendet, so wird die Bildung von langen individuellen zylindrischen Mizellen gefördert, woraus stäbchenförmige Nanopartikel resultieren, da die Silane die Mizellen durch Wechselwirkungen stabilisieren.^[57] Bei polaren Gruppen hingegen tritt keine Wechselwirkung zwischen den Mizellen und den Silanen auf, so dass keine langen Mizellen gebildet werden und eher sphärische Nanopartikel entstehen.^[57]

Im Vergleich zu den nicht-porösen Silica-Nanopartikeln zeigen die nanoporösen Materialien eine hämolytische Aktivität, wodurch sie für systematische Träger im Blutkreislauf geeignet sind.^[5,46] Die Nanopartikel lösen sich im Laufe der Zeit in wässrigen Medien sowie Körperflüssigkeiten auf, so dass sie sich nicht in einem Biosystem anreichern können, sondern nach einigen Wochen aus dem lebenden Organismus verschwinden.^[47]

Des Weiteren ist die Größe der Nanopartikel für die biomedizinische Anwendung entscheidend, da größere Nanopartikel mit einem Durchmesser um die 100 nm sehr schnell vom reticuloendotheliale System (RES) aufgenommen werden und sich in der Leber ansammeln, so dass zum Beispiel Medikamente nicht an den Bestimmungsort gelangen können.^[8,46] Diese Aufnahme ist bei kleineren Nanopartikeln mit einer Größe kleiner als 50 nm verringert, wodurch die Verweilzeit im Blut erhöht wird.^[8,46,55] Auch können kleinere Nanopartikel Zellmembranen besser durchdringen und Oberflächenmodifizierungen können helfen, die Nanopartikel an den Bestimmungsort zu transportieren bzw. die Zellaufnahme zu fördern.^[14,22,46,57] Zudem zeigen kleinere Nanopartikel eine geringere Toxizität.^[14,22,46,57]

Ein Nachteil der Nutzung der Nanopartikel in der Biomedizin liegt in der Tendenz der Nanopartikel Aggregate unter physiologischen Bedingungen zu bilden.^[8,60] Dadurch haben die Nanopartikel nur kurze Stabilität in biologischen Medien und ihre Bionutzbarkeit ist reduziert.^[13,47] Durch die Modifizierung der Oberfläche beispielsweise mit Poly(ethylenglycol) (PEG) kann die Stabilität erhöht werden.^[16,60,61]

Die Poren der Silica-Nanopartikel können dazu genutzt werden, um pharmazeutische Medikamente oder Biomoleküle einzulagern und kontrolliert wieder abzugeben, so dass Drug Delivery-Systeme entwickelt werden können.^[16,53] Dabei können die Silanolgruppen in den Poren dazu verwendet werden, um die Wirts-Gast-Wechselwirkungen zu erhöhen,

wodurch eine höhere Einlagerung erzielt werden kann.^[61] Jedoch ist meist ein „Initial-Burst-Effekt“ bei der Freisetzung der Medikamente zu beobachten.^[16] Daher können Gruppen an der Oberfläche eingeführt werden, die auf bestimmte stimulierende Effekte reagieren, wodurch diese als so genannte Kappen und Türöffner für in den Poren eingeschlossene Medikamente dienen können.^[5,15,57,61] Dadurch kann eine kontrollierte Freisetzung der Medikamente aus dem Porensystem erreicht werden, indem die Kappen durch äußere oder innere Einflüsse wie zum Beispiel eine Änderung des pH-Wertes, der Temperatur, durch Redoxpotentiale, Licht, magnetische Felder oder Enzymreaktionen sowie Antikörper, geöffnet werden.^[5,15]

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche nanoporöse Silica-Nanopartikel verwendet: nanoporöse Silica-Nanopartikel vom Typ MCM-41 und kolloidale mesoporöse Silica-Nanopartikel (CMS). Bei dem MCM-41 handelt es sich um nanoporöse Silica-Nanopartikel, die eine große Oberfläche von etwa $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, ein großes Porenvolumen von etwa $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, ein hexagonal angeordnetes nanoporöses Porensystem und eine einstellbare Porengröße zwischen 1.5 und 30 nm aufweisen.^[20,62,63] Die Morphologie der Nanopartikel kann durch die Syntheseparameter von wurmartig bis zu sphärisch kontrolliert werden.^[64] Sie können in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden, wie zum Beispiel zur Katalyse, Separation, in Drug Delivery-Systemen und deren kontrollierter Freisetzung von Medikamenten.^[20,63,65] Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Porensystem Ibuprofen und Aspirin eingelagert und wieder freigesetzt werden können, wobei die Freisetzung durch Oberflächenmodifizierungen mit Trimethylsilylgruppen für das Ibuprofen und mit Aminopropylgruppen für das Aspirin reduziert wird.^[56,57,66] Außerdem handelt es sich bei den Nanopartikeln um ein biokompatibles, nicht toxisches Material, das für biomedizinische Zwecke verwendet werden kann.^[20] Dies liegt auch daran, dass Nanopartikel eine höhere zelluläre Aufnahmeeffizienz zeigen, als Partikel, deren Größe im Mikrometerbereich liegen, wodurch eine verbesserte Abgabe in die Zellen gegeben ist.^[20] Dabei konnten bereits nanoporöse MCM-41-Nanopartikel hergestellt werden, die etwa eine Größe von 100 nm besitzen, wobei das Partikelwachstum durch verdünnte Lösungen kontrolliert wurde.^[53,67]

Eine weitere Gruppe von nanoporösen Silica-Nanopartikeln sind die kolloidalen mesoporösen Silica-Nanopartikel (CMS-Nanopartikel), die als Drug Delivery-Systeme sowie zur Krebszellenerkennung eingesetzt werden können, wobei sie eine sehr gute Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit zeigen.^[68] Sie haben eine Größe zwischen 15 und 100 nm, besitzen große Oberflächen von $1000\text{-}1300 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, haben ein Porenvolumen um $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ und besitzen einheitliche Poren mit einem Durchmesser zwischen 3 und 4 nm.^[61] Des Weiteren können die innere sowie die äußere Oberfläche modifiziert werden, um Moleküle im Porensystem einzulagern.^[61,68] Die Nanopartikel haben alle eine ähnliche wurmartige Porenstruktur sowie eine ähnliche ungeordnete Porenausrichtung.^[65] Dabei konnten BEIN et. al zeigen, dass durch den Einsatz von Triethanolamin als Zusatzstoff kolloidale Nanopartikel-Suspensionen hergestellt werden können, wobei die Größe der Nanopartikel zwischen 50 und 100 nm durch verschiedene Mengen an Triethanolamin eingestellt werden kann.^[53,64,65] Das Triethanolamin wirkt bei der Synthese als

Komplexbildner für die Silica-Spezies, wodurch die nanoporösen Nanopartikel eingelagert werden und das Wachstum sowie die Aggregation der Nanopartikel eingeschränkt wird.^[65] Weitere einheitliche, monodispersierbare und stabile nanoporöse CMS-Nanopartikel können unter milden Bedingungen hergestellt werden, indem die Nanopartikelgröße von 25 bis 200 nm durch die Variation von Reaktionsparametern und der Zugabe von verschiedenen Zusatzstoffen eingestellt werden.^[65] Dabei konnten Nanopartikel mit einer Größe von 30 nm erhalten werden, wenn Diethanolamin verwendet wurde, wobei die Hydrolyse und Kondensation der Silica-Bildung kontrolliert werden.^[65]

2.2 „Click“-Chemie

Der Begriff der „Click“-Chemie wurde von SHARPLESS et al. 2001 eingeführt und beschreibt Reaktionen, bei denen kleine Einheiten über Heteroatome zu Ringen zusammengesetzt wurden und die bestimmte Kriterien aufweisen mussten.^[40,42-44,69-71] Dabei sollten die Reaktionen sehr modular sowie umfangreich sein, sehr hohe Ausbeuten erzielen, sehr leicht durchzuführen sowie aufzuarbeiten sein, keine oder nur unschädliche Nebenprodukte generieren, die sehr einfach vom Produkt zu trennen sind, tolerant gegenüber Wasser und Sauerstoff sowie stereospezifisch und selektiv sein.^[40-44,69-74] Außerdem sollten die Reaktionen einfache Reaktionsbedingungen aufweisen sowie bereits erhältliche Ausgangsmaterialien für die Synthese benötigen und verschiedene Lösemittel tolerieren, die sich leicht vom Produkt entfernen lassen.^[40,43,72,73] Des Weiteren sollte das Endprodukt leicht isoliert werden können, so dass keine aufwendigen Reinigungsschritte notwendig sind und es sollte stabil unter physiologischen Bedingungen sein.^[40,73] Die aufgezählten Kriterien der „Click“-Reaktionen sollten durch eine hohe thermodynamische Triebkraft erhalten werden, die größer als $20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ist.^[40,42]

Eine „Click“-Reaktion, die diese Kriterien erfüllt und die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die irreversible Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition nach HUISGEN, bei der terminale Alkine mit Aziden zu 1,2,3-Triazole reagieren.^[40-42,70,71,75-79] Die Reaktion läuft durch das Kupfer(I) schneller und regioselektiv unter milden Reaktionsbedingungen ab.^[40-42,70,71,75-79] Dabei ist die Reaktion sehr spezifisch, gut reproduzierbar mit quantitativen Ausbeuten, sehr schnell und resistent gegenüber Nebenreaktionen.^[72,76,78,80,81] Außerdem werden sehr viele funktionelle Gruppen bei der Reaktion toleriert, so dass unter diesen Bedingungen keine weiteren Reaktionen ablaufen.^[41,43,44,69,78,81-84] Daher sind diese Reaktionen sehr gut geeignet für Biomoleküle, die sehr viele funktionelle Gruppen enthalten, jedoch meistens keine weiteren Azidfunktionen.^[41,43,44,69,78,81-84] Durch diese Inertheit gegenüber anderen funktionellen Gruppen kann auch auf Schutzgruppen verzichtet werden.^[44] Ein weiterer Vorteil ist die unkomplizierte Aufarbeitung der Endprodukte.^[41,81] Mittlerweile findet diese Reaktion bereits in vielen Bereichen Anwendung, wie zum Beispiel im Bereich der organischen Chemie, der Materialsynthese, in der chemischen Biologie sowie in der medizinischen Chemie.^[85]

Das entstehende 1,2,3-Triazol ist ein aromatischer Heterozyklus, der eine sehr hohe chemische Stabilität gegenüber Hydrolyse, Oxidation und Redoxreaktionen aufweist.^[44,81] Des Weiteren hat das Triazol besondere biologische Eigenschaften, wie zum Beispiel eine anti-HIV sowie anti-bakterielle Aktivität und eine antimikrobielle Aktivität als Inhibitor von menschlichen Leukozyten.^[69,75,79] Zudem kann es als Mittel für die Herstellung von anti-Tumor Alkaloiden und als Modifizierung von Nucleosiden als antivirales Agens eingesetzt werden.^[69,75,79]

Bevor die Katalyse dieser Reaktion durch Kupfer(I) bekannt wurde, wurden sehr hohe Temperaturen und sehr lange Reaktionszeiten benötigt, wobei die Reaktion nicht regiospezifisch war, da sowohl das 1,4- als auch das 1,5-Regioisomer gebildet wurde.^[43,42,69,71,75,78,79] Die Regioselektivität konnte jedoch teilweise kontrolliert werden.^[69,71] Dabei wurde bevorzugt das 1,4-Regioisomer gebildet, wenn elektronenziehende Gruppen am Alkin eingeführt wurden, während durch elektronenziehende Gruppen am Azid das 1,5-Regioisomer begünstigt gebildet wurde.^[71] Trotzdem wurden stets Gemische erhalten.^[71] Dass die Bildung des 1,2,3-Triazols durch die Katalyse von Kupfer(I) nicht nur schneller und bei niedrigeren Temperaturen abläuft, sondern auch regiospezifisch das 1,4-Regioisomer bildet, wurde von den Gruppen um SHARPLESS et al. und MELDAL et al. 2002 gleichzeitig publiziert.^[41-43,69,71,73,75-81,86] Eine Veranschaulichung der Bildung der Regioisomere bei der Alkin-Azid-Cycloaddition nach HUISGEN ist in Abb. 2-1 gezeigt.

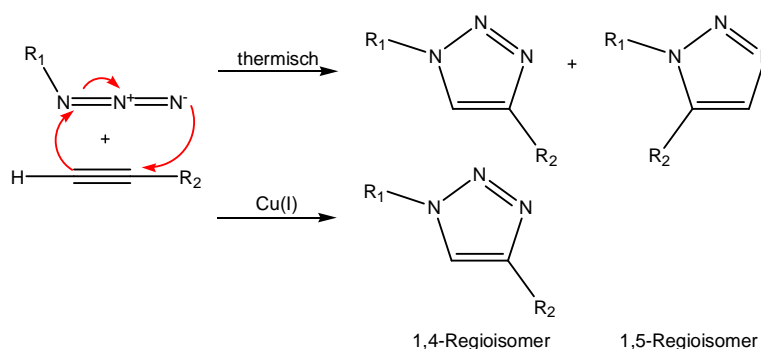


Abb. 2-1: Bildung der möglichen Regioisomere des 1,2,3-Triazols bei der Cycloaddition von terminalen Alkinen und Aziden nach HUISGEN.^[nach 71]

Da die Reaktion sehr tolerant gegenüber verschiedenen Lösemitteln ist, kann diese sowohl in organischen Lösemitteln als auch in Wasser oder wässrigen Medien durchgeführt werden.^[42,44,69,71,78] Findet die Reaktion in einem wässrigen Medium statt, so kann das Kupfer(I) *in situ* erzeugt werden, indem Kupfer(II) zu Kupfer(I) reduziert wird.^[71,77,78] Dafür wird meistens Kupfer(II)-sulfat verwendet, das durch Natriumascorbat bei Raumtemperatur reduziert wird.^[42,44,71,77] Unter diesen Bedingungen ist diese Oxidationsstufe des Kupfers stabil und wird nicht durch Sauerstoff oxidiert, da das Natriumascorbat auch alle Dioxygene reduziert.^[42,71] Ein weiterer Vorteil der Reaktion in Wasser ist, dass die 1,2,3-Triazol-Produkte oft nicht in diesem Medium löslich sind, so dass diese bei der Entstehung ausfallen und leicht abgetrennt werden können ohne weiter aufgearbeitet werden zu müssen.^[71] Die Reaktion verläuft unter diesen Bedingungen meist über Nacht, wobei die Reaktionszeit

durch leichte Erhöhung der Temperatur auch verkürzt werden kann.^[71,83] Allerdings ist dies für biologische Verbindungen nicht sinnvoll, da diese oft temperaturempfindlich sind.^[71,83] Außerdem kann im wässrigen Medium Kupfer(I) direkt als Kupfer(I)-iodid zur Lösung gegeben werden, so dass Natriumascorbat als Reduktionsmittel nicht benötigt wird.^[42,44,71,77] Jedoch müssen für diese Variante zum Beispiel Acetonitril als Zusatzlösemittel und eine Stickstoff-Base wie beispielsweise Triethylamin hinzugegeben werden, um das Kupfer(I) zu stabilisieren.^[44,71,77] Bei dieser Variante werden allerdings oft unerwünschte Nebenprodukte erhalten.^[44,71,77] Eine weitere Möglichkeit für den Erfolg dieser Variante ist der Ausschluss von Sauerstoff, so dass das Kupfer(I) nicht oxidiert werden kann.^[42,44] Restliches Kupfer kann nach der Reaktion durch Ammoniumhydroxid-Citrat-Puffer oder durch Waschschriffe mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) entfernt werden.^[71] Die Anwendung der „Click“-Reaktion im wässrigen Medium ist sehr vielversprechend, außer wenn es zu Problemen bei der Löslichkeit der Ausgangsstoffe kommt.^[71] Dann sollte die Reaktion in einem organischen Lösemittel ablaufen, wobei die Kupfer(I)-Spezies als Kupfer(I)-iodid direkt zur Lösung gegeben wird.^[44,71] Bei der direkten Zugabe von Kupfer(I)-Spezies muss eine Stickstoffbase wie *N,N*-diisopropylethylamin zugegeben werden, zum einen zur Stabilisierung des Kupfer(I) und zum anderen um die Löslichkeit zu erhöhen.^[44,71] Auch sollten als Lösemittel Acetonitril, Dichlormethan, Tetrahydrofuran, Toluol oder *N,N*-Dimethylformamid verwendet werden.^[71] Zur Veranschaulichung werden die beiden Varianten in Abb. 2-2 dargestellt.

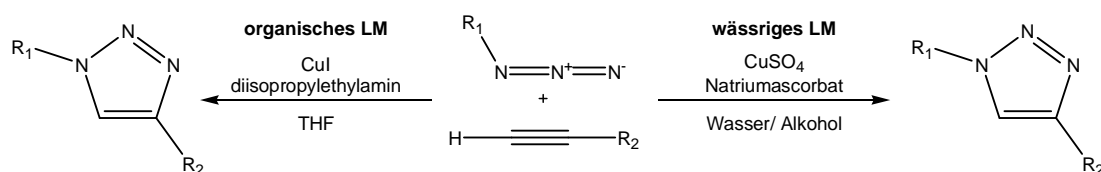


Abb. 2-2: Veranschaulichung der beiden möglichen Reaktionsbedingungen für die Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden nach HUISGEN.^[nach 71]

Die Reaktion zwischen einem Azid und einem Alkin hat den Vorteil, dass beide Gruppen sehr selektiv in ihrer Reaktivität, inert gegenüber den meisten chemischen Funktionen bei den milden Reaktionsbedingungen, stabil in vielen Lösungsmitteln sowie über einen großen Temperatur- und pH-Bereich als auch leicht zugänglich sind.^[42,69,70,79,81,82] Dabei sind die Azide sehr stabil gegenüber Dimerisierung, Sauerstoff und Hydrolyse und können sehr einfach als funktionelle Gruppe in Moleküle eingeführt werden.^[40,73,77] Des Weiteren bleiben sie „unsichtbar“ gegenüber vielen funktionellen Gruppen bis ein gutes Dipolarophil anwesend ist, so dass keine weiteren Reaktionen auftreten.^[40,44,73] Jedoch sollte darauf geachtet werden, dass es sich bei den Aziden auch um sehr energiereiche Verbindungen handelt, die besonders bei kleinen Molekulargewichten dazu neigen explosionsgefährlich zu sein.^[71] Außerdem ist die Toxizität von Natriumazid, welches oft für die Einführung des Azids über eine nucleophile Substitution von Halogenen an organische Moleküle verwendet wird, bekannt und vergleichbar mit der von Natriumcyanid, so dass bei der späteren Verwendung für biomedizinische Zwecke auf die Wahl des Azids geachtet werden sollte.^[71] Weiterhin ist zu beachten, dass für diese Reaktion nur terminale Alkine verwendet werden können, da die

Reaktion nicht mit internen Alkinen funktioniert, was aus der Notwendigkeit der Bildung eines Kupfer-Acetylid-Komplexes resultiert, der nur mit terminalen Alkinen gebildet wird.^[41,69,73]

Des Weiteren kann die Reaktion durch Poly-(1,2,3-Triazole) als Ligand verbessert werden, da das Triazol eine Affinität zum Kupfer(I) hat und dies stabilisiert, wodurch in einigen Fällen auch eine Selbstkatalyse auftreten kann.^[71] Nach der Reaktion werden oft farbige Produkte erhalten, was auf das Vorhandensein von Kupfer im Produkt hindeutet, wodurch toxische Effekte auftreten können.^{42,43]} Dies kann durch die Eigenschaft des Triazols Kupfer in einem Komplex zu binden erklärt werden.^[42,43] Daher werden Möglichkeiten für Kupfer-freie „Click“-Reaktionen gesucht. Dabei kann als Alternative die Ringspannung von zyklischen Alkinen ausgenutzt werden, die unter der Öffnung des Rings mit Aziden ohne Katalysator reagieren können.^[42,43,73,83,85] WITTIG et al. konnten 1961 zeigen, dass Cyclooctin (das kleinste stabile zyklische Alkin) mit Aziden unter der Bildung von einem einzigen Produkt, dem Triazol reagiert, wobei die Deformation des Bindungswinkels des Acetylens als Triebkraft für die Reaktion gilt, wodurch die Reaktion beschleunigt wird und unter physiologischen Bedingungen ablaufen kann.^[83] Jedoch ist die Herstellung dieser Cyclooctine sehr aufwendig, so dass diese nicht frei zugänglich sind.^[85] Des Weiteren leidet diese Variante der Kupfer-freien „Click“-Chemie darunter, dass es keine Regioselektivität gibt.^[85]

Der Mechanismus der „Click“-Reaktion nach HUISGEN ist noch nicht vollständig geklärt.^[42,69,71,73] Es wird jedoch davon ausgegangen, dass dieser nicht konzertiert, sondern schrittweise verläuft, was mit Ergebnissen kinetischer Untersuchungen übereinstimmt.^[69,71,82] Dabei wird ein Kupfer-Acetylen-Komplex als Zwischenstufe angenommen.^[69,71,78,82] Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass sowohl das Azid als auch das Alkin von dem Kupfer(I) aktiviert wird, vermutlich durch Koordination des Kupfer-Acetylid-Komplexes, wodurch sich auch die Regioselektivität erklären lässt.^[44,71] Im Schema 2-3 ist ein Vorschlag für den Reaktionsmechanismus gezeigt, der durch kinetische Messungen erstellt wurde.^[82]

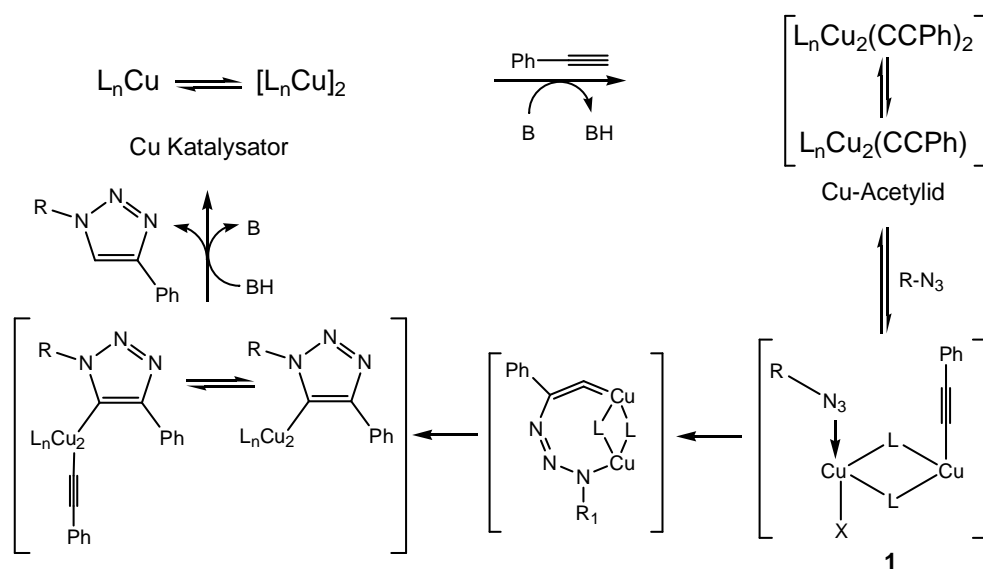


Abb. 2-3: Möglicher Reaktionsmechanismus für die Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition zwischen terminalen Alkinen und Aziden nach HUISGEN.^[nach 78,82]

Dabei wird zunächst ein Kupfer-Acetylid-Komplex gebildet, der das Azid anschließend koordiniert (1), wobei die gezeigte Struktur eine mögliche von vielen darstellt.^[42,82] Anschließend reagiert das nucleophile Kohlenstoffatom des Kupfer(I)-Acetylids mit dem elektrophilen terminalen Stickstoffatom des Azids nach einer Umformung von (1), wonach der entstandene Metallzyklus einer Ringkontraktion unterliegt, das Produkt gebildet und der Katalysator zurückgewonnen wird.^[42,69]

Für die Verwendung der „Click“-Chemie nach HUISGEN an Silica-Oberflächen, müssen zunächst entweder eine Alkin- oder eine Azidfunktion an die Oberfläche gebunden werden, so dass die Nanopartikel mit der entgegengesetzten Funktion in einer „Click“-Reaktion umgesetzt werden können, um eine milde und effiziente Strategie für Oberflächenmodifizierungen zu erhalten.^[71,74,81,84,87] Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen und der Inertheit dieser Reaktion, findet die Funktionalisierung von Silica-Oberflächen mit Biomolekülen mittels „Click“-Chemie Anwendung.^[84,88] Erste Versuche für die „Click“-Chemie an Silica-Oberflächen, an denen Azidgruppen über Alkylketten eingeführt wurden und die mit terminalen Alkinen reagiert haben, wurden von LUMMERSTORFER et al. 2004 gezeigt, wobei milde Reaktionsbedingungen sowie erhöhte Temperaturen ohne die Kupfer-Katalyse verwendet wurden.^[71,72] Des Weiteren konnten LIN et al. zeigen, dass Biomoleküle, per „Click“-Chemie an Oberflächen immobilisiert werden konnten, wobei festgestellt wurde, dass bessere Ergebnisse erzielt wurden, wenn das Azid an die Oberfläche gebunden wurde und nicht das terminale Alkin.^[71,80]

2.3 Fluoreszierende Nanopartikel

Fluoreszierende Nanopartikel finden eine Vielfalt von biomedizinischen Anwendungen zur Diagnose und als verfolgbare Drug Delivery-Systeme.^[89] Dabei können durch die Verwendung von fluoreszierenden Materialien viele biologische Prozesse visualisiert werden.^[22] Da die meisten Fluoreszenzmarker für die Biovisualisierung eine zu geringe Intensität der Fluoreszenz zeigen, eine geringe Fotostabilität haben und oft toxisch sowie biodegradierbar sind, sind diese Materialien in ihrer Nutzung eingeschränkt.^[22,89] Als Alternative können Silica-Nanopartikel mit Farbstoffen modifiziert werden.^[22] Da Silica-Nanopartikel keine Eigenfluoreszenz aufweisen, können die Nanopartikel durch verschiedene Methoden zum Fluoreszieren gebracht werden, zum Beispiel durch die Einlagerung von Farbstoffen in das Silica-Netzwerk oder durch Oberflächenmodifizierungen mit Fluoreszenzfarbstoffen, so dass die Nanopartikel visualisiert und ihre Position ermittelt werden kann.^[5,17,18,21,22] Potentielle Anwendungen von fluoreszierenden Silica-Nanopartikeln finden sich in vielen Bereichen der Nanotechnologie, wobei diese von biologischer bis erweiterter Technik reichen.^[18] Dabei wurden diese bereits für verschiedene Anwendungen eingesetzt, wie zum Beispiel in der Nanotechnologie sowie für biologische und medizinische Anwendungen im Bereich des Gene Delivery, Drug Delivery sowie zur Visualisierung und Diagnose.^[17,90]

2.3.1 Fluoreszenz

Die Fluoreszenz wird neben der Phosphoreszenz der Photolumineszenz zugeordnet. Es handelt sich dabei um eine spontane Emission von Licht, nachdem die Substanz zunächst mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wurde, wobei das emittierte Licht eine geringere Energie besitzt. Dies liegt daran, dass die Emission erst erfolgt, nachdem bereits ein Teil der Anregungsenergie an die Umgebung abgegeben wurde. Der Unterschied zwischen den beiden Photolumineszenzen besteht darin, dass die Fluoreszenz nur während der Bestrahlung der Substanz beobachtet werden kann, während die Phosphoreszenz noch bis zu Stunden nachleuchtet. Daraus folgt, dass es sich bei der Fluoreszenz um eine sofortige Umwandlung der Anregungsenergie in emittierte Strahlung handelt, während bei der Phosphoreszenz ein Speicherungsschritt der Energie vorhanden ist.^[91]

Durch die Absorption von einstrahlendem Licht wird das Molekül bei der Fluoreszenz in einen elektronisch höheren Zustand angeregt. Anschließend erfolgt eine Energieabgabe an die Umgebung, die sich so lange wiederholt bis der elektronische Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands erreicht ist, der strahlungslosen Deaktivierung. Die verbleibende Anregungsenergie des angeregten Zustands kann nun durch spontane Emission an die Umgebung abgegeben werden, wobei es sich um einen vertikalen Übergang handelt.^[91] Der Mechanismus der Fluoreszenz ist in Abb. 2-4 gezeigt.

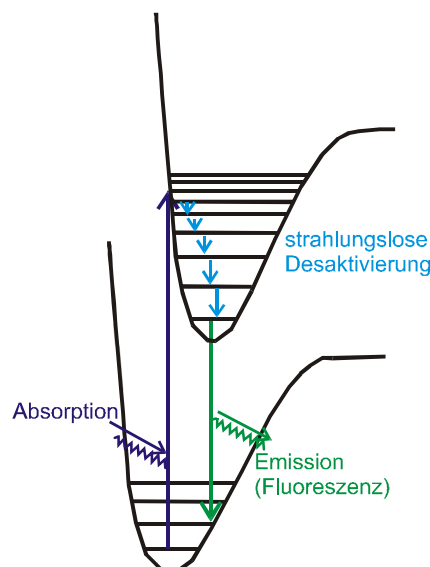


Abb. 2-4: Veranschaulichung der Vorgänge bei der Fluoreszenz. Durch einstrahlendes Licht wird Energie absorbiert, die anschließend als strahlungslose Desaktivierung an die Umgebung abgegeben wird. Durch spontane Emission wird die restliche Energie als Fluoreszenz abgegeben.^[nach 91]

Die Absorption und die Emission der Fluoreszenz liegen im Fluoreszenzspektrum nicht bei den gleichen Wellenlängen, da das Molekül unterschiedliche Wechselwirkungen mit der Umgebung bei den beiden Vorgängen eingeht. Dabei liegt die Absorption in einem Bereich, der charakteristisch für den elektronischen Grundzustand des Moleküls ist, während die Emission in einem Bereich liegt, der charakteristisch für den angeregten Zustand ist.^[91]

2.3.2 Anwendung in der Biomedizin

Die Fluoreszenz erlaubt eine qualitative sowie quantitative Bestimmung von zellulären Ereignissen auf molekularer Ebene.^[41] Dabei konnten bereits bioaktive Verbindungen mit organischen, fluoreszierenden Farbstoffen markiert und eingesetzt werden.^[41] Meist werden Fluoreszenzfarbstoffe für biologische Färbungen und Markierungen verwendet.^[21] Da die Nutzung von Quantendots (QD) und fluoreszierenden Nanopartikeln aus seltenen Erden für *in vivo* Visualisierungen aufgrund ihrer Toxizitäten, biologischer Abbaubarkeit, teilweise zu geringen Intensitäten und geringer Fotostabilität eingeschränkt ist, ist die Anwendung von fluoreszierenden Silica-Nanopartikeln, eine gute Alternative in der Biomedizin.^[22,89,92,93] Sie erreichen eine größere Intensität sowie Fotostabilität und besitzen eine gute Biokompatibilität.^[22,89,92,93] Kürzlich wurden die ersten fluoreszierenden Silica-Nanopartikel für einen ersten Einsatz zur Krebserkennung von der FDA freigegeben.^[5]

Um die Nanopartikel mit fluoreszierenden Eigenschaften auszustatten, gibt es zwei Möglichkeiten.^[5,17,21,22] Zum einen können verschiedene Farbstoff-Nanopartikel in Silica-Hüllen durch elektrostatische Wechselwirkungen eingelagert werden, wobei Core-Shell-Partikel entstehen, bei denen der fluoreszierende Kern durch die Silica-Hülle geschützt wird.^[5,17,21,22,89,92] Die Einlagerung sollte dabei während der Synthese der Nanopartikel erfolgen.^[22] Die Nanopartikel können dabei mehrere tausend Farbstoffmoleküle in ihrer Matrix einschließen, wobei eine stärkere Fluoreszenz zu beobachten ist als in einzelnen Farbstoffen, obwohl es bei den dicht gepackten Molekülen in der Matrix zum Quenching kommen kann.^[22,94,95] Daher bieten fluoreszierende Silica-Nanopartikel ein sehr starkes Fluoreszenzsignal für ultrasensitive Bioanalysen.^[94,95] Weiterhin können durch die Silica-Hülle potentielle toxische Effekte der reinen Fluoreszenznanopartikel reduziert werden, da die Kerne durch die Hülle abgeschirmt werden.^[21,92,95] Außerdem wird eine verbesserte Stabilität erhalten, da die Farbstoffe von der Umgebung und somit von molekularem Sauerstoff isoliert sind, so dass sie nicht abgebaut werden können.^[89,92,95] Des Weiteren kann eine größere Farbpalette erzielt werden, da verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingelagert werden können.^[89,92,95] Ein Nachteil dieser Methode ist, dass durch schwache elektrostatische Wechselwirkungen die Farbstoffe aus den Hüllen austreten.^[89] Dies könnte durch zusätzliche Verlinkung mit der Silica-Hülle oder durch hydrophilere Farbstoffe reduziert werden, so dass die fluoreszierenden Silica-Nanopartikel stabil sind.^[89] Eine weitere Möglichkeit stellt die Funktionalisierung der Silica-Oberfläche nach der Synthese dar, bei der die Fluoreszenzfarbstoffe über die Silanolgruppen angebunden werden können.^[5,17,21,22] Dabei können, durch eine vorherige Einführung von reaktiven Gruppen über die Anbindung von Silanen, verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe immobilisiert werden.^[21,22] Die Intensität der Fluoreszenz kann durch die Konzentration bei der Immobilisierung gesteuert werden, wobei bei zu hohen Konzentrationen Quenching auftreten kann.^[22] Durch diese Eigenschaften sind die resultierenden fluoreszierenden Silica-Nanopartikel vielversprechend für biologische Anwendungen.^[89] Dabei kann die Fluoreszenzfarbe der Nanopartikel verändert werden, da es eine Vielfalt an kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffen gibt.^[50,89] Des Weiteren kann die Porengröße sowie die Größe der

Nanopartikel kontrolliert werden und es kann eine stabile sowie beständige Fluoreszenz erhalten werden.^[89,95]

Silica-Nanopartikel, die mit Fluoreszenzfarbstoffen ausgestattet wurden, werden bereits als Substrate zur optischen Visualisierung verwendet, da sie hell leuchten, sehr klein, biokompatibel, hydrophil sowie chemisch inert sind.^[89,94] Weiterhin sind sie leicht durch Zentrifugation zu separieren und lassen keinen mikrobiellen Angriff zu.^[89,94] Sie wurden bereits für eine ultrasensitive DNA-Analyse eingesetzt.^[94] Außerdem konnten auch sensitive Zelldetektionen sowie einzelne Bakterienüberwachungen mit konventionellen Fluoreszenz-Spektroskopen und –Mikroskopen durchgeführt werden, da diese Nanopartikel sehr stark leuchten.^[21,94] Weitere mögliche Anwendungen finden fluoreszierende Nanopartikel in der biologischen Visualisierung und in der Zellverfolgung als effiziente und vielseitige Biosensoren.^[21,17,93] Sie wurden auch als Markierungsreagenzien für die Detektion von Pathogenen, Nukleinsäuren und Proteinen verwendet.^[95] ESTÉVEZ et al. konnten durch die Verwendung von farbstoffreichen Silica-Nanopartikeln eine neue Methode zur schnellen und sensitiven Detektion von Krebszellen entwickeln.^[94]

In dieser Arbeit wurde der kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 von INVITROGEN verwendet. Dieser Farbstoff kann mit verschiedenen reaktiven Gruppen für die Immobilisierung erhalten werden. Darunter ist er mit einer Amingruppe erhältlich, sowie mit einer Azid- bzw. Alkinfunktion, so dass auch „Click“-Reaktionen durchgeführt werden können. Er liegt unter Normalbedingungen dabei in fester Form vor, ist inert sowie stabil. Die grüne Fluoreszenz erfolgt bei einer Anregung von 495 nm und weist eine Absorption bei 520 nm auf. Durch die Anbindungen des Farbstoffs über die funktionellen Gruppen sollte keine Änderung der fluoreszierenden Eigenschaften auftreten.^[96]

2.4 Polysialinsäure

Aufgrund der sehr guten Biokompatibilität und Bioresorbierbarkeit der Polysialinsäure (PolySia), ist sie eine vielversprechende Substanz für biomedizinische Anwendungen.^[24,25,29] Da sie im menschlichen Körper vorkommt, weist sie eine gute Toleranz gegenüber dem Immunsystem auf und wird somit nicht als Fremdkörper erkannt.^[24,25,29] Des Weiteren hat PolySia im Organismus eine lange Überlebensdauer, weil sie nicht einfach abgebaut werden kann, da keine abbaufähigen Enzyme vorhanden sind, wodurch sie eine geeignete Trägersubstanz für Materialien darstellt.^[97-99] Dieses Polysaccharid kann nur durch das Enzym der Endosialidase (Endo-N), welches aus bestimmten Bakterien (*Escheria coli* K1) isoliert werden kann, spezifisch und kontrolliert abgebaut werden, wobei die Polymerkette durchtrennt wird.^[24,25,98,100] Die PolySia sowie deren Abbauprodukte, die bei der Umsetzung mit der Endo-N entstehen, zeigen ebenfalls keine schädlichen Wirkungen auf die Viabilität, die Ausbreitung sowie die Differenzierung von Neuronen des zentralen sowie peripheren Nervensystems.^[29,99,101] Da PolySia eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Nervensystems von Vertebraten spielt und ein sehr geeignetes Medium für die Kultivierung

von Schwann-Zellen darstellt, kann sie interessante Funktionen für den Einsatz in Nervenleitschienen zur Regeneration von peripheren Nerven haben.^[24,30]

Bei der PolySia handelt es sich um ein langes, lineares Homopolymer (Polymerisierungsgrad von 8 bis über 100), das zu der Klasse der anionischen Saccharide gehört.^[25,30,32,98,102] Dabei ist das einfache Makromolekül aus negativ-geladenen α -2,8-verknüpften Sialinsäuren, der 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac), aufgebaut und besitzt eine helikale Konformation.^[24,26,27,32,33,98,99,101-104] Das Neu5Ac ist eins von über 50 natürlich vorkommenden Derivaten der Sialinsäure, wobei es sich um einen 9-kettigen α -Keto-Zucker handelt, der neben der *N*-Glycol-Neuraminsäure (Neu5Gc) am häufigsten vorkommt.^[98,105,106] Durch die Polymerisierung dieses Moleküls zu PolySia wird ein nicht-reduziertes Ende (Abb. 2-5 links), ein linearer Aufbau des Homopolymers sowie ein reduziertes Ende erhalten (Abb. 2-5 rechts). Dabei kann das reduzierte Ende an Membranen anbinden und das Wachstum der Kette erfolgt durch Einführung von weiteren Neu5Ac am nicht-reduzierten Ende.^[27] Das Neu5Ac sowie die daraus aufgebaute PolySia sind in Abb. 2-5 zu sehen.

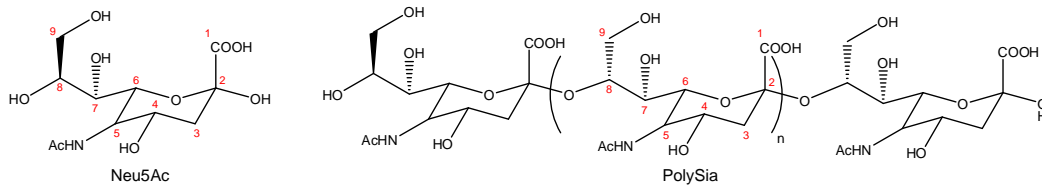


Abb. 2-5: Molekularer Aufbau des Neu5Ac (links) sowie der Polysialinsäure (rechts).^[nach 27,101]

Aufgrund der vorhandenen Carboxylgruppe ist die PolySia sehr hydrophil, wodurch sie ein sehr großes Volumen einnimmt und eine negative Ladung bei physiologischen pH-Werten aufweist.^[27,30,107]

Des Weiteren kann PolySia in der Natur auf bestimmten neuroinvasiven Bakterien wie den *Escheria Coli* K1 (E. Coli) sowie *Neisseria Meningitidis* gefunden werden, die sich mit einer PolySia-Kapsel umhüllen.^[24-28,98-100] Dadurch ergibt sich eine Resistenz gegenüber des Immunsystems, weil die PolySia aufgrund ihrer chemischen und immunologischen Identität mit der von Vertebraten nicht als Fremdkörper erkannt wird.^[24-28,98-100] Aufgrund der Nachahmung der PolySia sind diese Bakterien dazu in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wodurch invasive Krankheiten ausgelöst werden.^[27,28] Von den E. Coli Bakterien kann PolySia isoliert werden und ist kommerziell als Colominsäure erhältlich.^[99,105] In der Natur wird PolySia nur in Vertebraten sowie Bakterien gefunden, jedoch kommt sie nicht in Invertebraten sowie Pflanzen vor.^[30,27,98,102]

Bei der Ausbildung des Nervensystems sowie des Gehirns im embryonalen Zustand von Vertebraten wird PolySia in erhöhten Mengen gefunden, nach der Geburt herunter reguliert und ist bei Erwachsenen nur noch in bestimmten Bereichen des Gehirns zu finden, in denen physiologische Plastizität stattfindet.^[24,29,32,33,98,99,104,107] Dabei handelt es sich um Regionen im Hirn wie zum Beispiel dem Hippocampus und dem Bulbus Olfactorius, in denen Lern- und Erinnerungsprozesse stattfinden.^[27,30,32,99,103] Weiterhin ist PolySia an regenerativen Prozessen nach einem Trauma und synaptischer Plastizität beteiligt, woraus angenommen

werden kann, dass sie auch beim Aufbau des Gedächtnisses eine Rolle spielt.^[27,30,32,99,103] Als weiteren Hinweis hierauf wurde sie von FINNE 1982 bei der Entwicklung des Gehirn von Säugetieren gefunden.^[30,33]

Während der Bildung des Nervensystems bei Vertebraten ist die PolySia an der Ziel- und Wegfindung von Axonen, Zellmigrationen, der Synapsenbildung sowie bei einigen Aspekten der Muskelbildung beteiligt.^[32,33,98,102,107] Dabei ist die primäre Rolle die Förderung der funktionalen Plastizität, wodurch Veränderungen in der Struktur sowie der Funktion des Nervensystems unterstützt werden.^[33,102] Diese Wirkung erfolgt dabei über die kovalente Bindung an das neuronale Zell-Adhäsionsmolekül (NCAM), das im Gehirn und im Nervensystem vorhanden ist und Zell-Zell-Interaktionen kontrolliert.^[32,33,102] Dabei wirkt die PolySia als negativer Regulator auf die Zellinteraktionen des NCAM aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften und nicht wegen ihrer spezifischen Affinität für Rezeptoren.^[33,102] Aufgrund ihres sterischen Anspruchs sowie der negativen Ladung kommt es dabei zu einer anti-adhäsiven Wirkung, wobei die PolySia einen sterischen Platz beansprucht, so dass sich die Anordnung der Zellmembran ändert und Zell-Interaktionen verringert werden.^[30,33,102] Dabei gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, wie die PolySia auf Zell-Interaktionen einwirken kann: die *trans*-Variante, bei der Interaktionen zwischen Rezeptoren benachbarter Zellen stattfinden und die *cis*-Variante, die Interaktionen zwischen Rezeptoren gleicher Zellen darstellt.^[102] Bei der *trans*-Variante wirkt die an das NCAM gebundene PolySia aufgrund ihres sterischen Anspruchs als Hindernis für einen Kontakt zwischen Membranen, wodurch die Interaktionen von anderen Rezeptoren sowie vom NCAM mit benachbarten Zellen verhindert werden.^[33,102] Für diese Hinderung müssen zwei Voraussetzungen erfüllt werden: zum einen muss die PolySia genügend Platz einnehmen, um eine Auswirkung auf die Membran-Membran-Positionen zu haben und zum anderen muss sich der interzelluläre Raum nach der Entfernung der PolySia verändern.^[33,102] Durch die Entfernung der PolySia kann es dann zu Zell-Zell-Bindungen der Rezeptoren kommen, so dass die anti-adhäsive Wirkung der PolySia aufgehoben ist.^[102] Die hohe Oberflächendichte des NCAM sowie der große sterische Anspruch der PolySia stimmen mit diesem Modell überein, da nach der Entfernung der PolySia der Abstand zwischen zwei Zellen um 10 bis 15 nm sinken kann.^[33] Bei der *cis*-Variante ist die sterische Wirkung der PolySia eher lokal und sehr komplex, da Interaktionen der Rezeptoren gleicher Zellen beeinflusst werden, indem zum einen Wechselwirkungen des NCAMs mit sich selbst oder zum anderen Wechselwirkungen des NCAM mit Rezeptoren der gleichen Zelle beeinflusst werden.^[33,102] Dabei kann die *cis*-Variante sowohl intrazelluläre Signale, die Adhäsion als auch eine Änderung der Konformation bzw. der Aktivität des NCAM hervorrufen.^[33,102] In Abb. 2-6 sind die beiden Mechanismen der Hinderung der Zell-Zell-Interaktionen durch PolySia gezeigt.

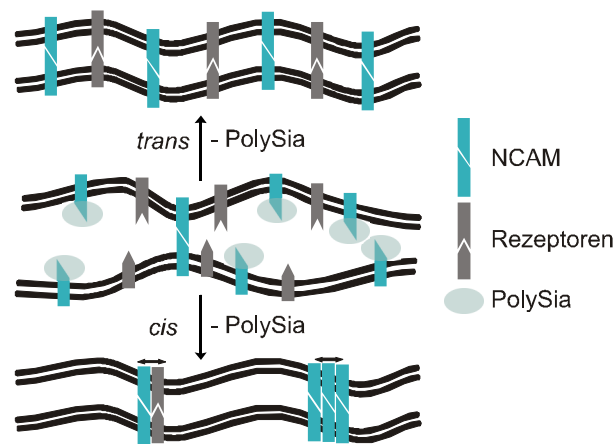


Abb. 2-6: Sterische Mechanismen der Zell-Zell-Interaktionen am NCAM, die durch PolySia beeinflusst werden können. ^[nach 33,102]

Die Bindung der PolySia an das NCAM erfolgt über zwei verschiedene Polysialyltransferasen: dem ST8SialI (STX) und dem ST8SialIV (PST), wobei diese sehr homogen sind und zu 59 % in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind. ^[27,30,32] Jedoch gibt es keine Verwandtschaft zu den bakteriellen PolySia Synthesen, bei denen *kps* und *cps* Genkomplexe eine Rolle spielen. ^[27,32]

Des Weiteren ist beim Aufbau des peripheren Nervensystems bei der Aussprossung der motoneuronen Axone, die sich zu muskelspezifischen Nervenfaserbündeln anordnen, die Konzentration der PolySia erhöht. ^[33] Dadurch kommt es zu einer Separation der Axone, die sich voneinander trennen und ungebündelt vorliegen und somit verschiedene intramuskuläre Nervenzweige ausbilden können, wodurch die Wegfindung gefördert wird. ^[30,33] Wird die PolySia während dieses Prozesses durch die Endosialidase abgebaut, so zeigt sich, dass diese Wegfindung der Axone erschwert ist und Fehler auftreten, so dass die Axone gebündelt vorliegen. ^[33] Eine Veranschaulichung dieser Wirkung ist in Abb. 2-7 gezeigt.

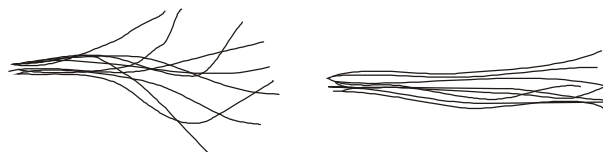


Abb. 2-7: Einfluss der PolySia auf die Aussprossung von Axonen in Hühner-Embryos. Dabei liegen die Axone in Anwesenheit von PolySia gewunden und ungebündelt vor (links), während nach der Entfernung der PolySia die Axone zusammengelagert sind (rechts). ^[nach 33,108]

Durch verschiedene Modifizierungen der PolySia, wie zum Beispiel die Einführung von Alkin- oder Azidfunktionen für die „Click“-Chemie, kann diese für verschiedene Reaktionen zugänglich gemacht werden und an unterschiedliche Oberflächen wie zum Beispiel Silica-Nanopartikel angebunden werden, um als Biomaterial in der Nervenregeneration eingesetzt zu werden. ^[97] Dadurch kann der von den Bakterien genutzte Effekt zur Täuschung des Immunsystems nachgeahmt werden, wodurch sich neuartige Verwendungen ergeben, da die Aufenthaltsdauer der Nanopartikel im Körper erhöht werden könnte und es eventuell möglich wäre, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.

2.5 Collagen-Materialien

Collagen, ein natürlich vorkommendes Biopolymer, hat sich als ein besonders geeignetes Biomaterial für biomedizinische Anwendungen erwiesen, das auch schon in diversen klinischen Versuchen Anwendung gefunden hat.^[34,37,38] In der Natur kommt es in verschiedenen Formen in unterschiedlichen Anwendungen vor.^[34,37,38,109-114] Dabei kann es als reines Polymer eingesetzt werden oder es werden Komposit-Materialien erzeugt, die natürlich vorkommende Materialien imitieren und aus einer organischen Matrix und anorganischen Bestandteilen bestehen.^[35,110,115] Dazu gehören zum Beispiel Komposite aus Collagen und Hydroxyapatit, die den strukturellen Aufbau von Knochen imitieren sowie Collagen-Silica-Komposite, die in der Natur in Kieselalgen vorkommen.^[35,38,39,116] Collagen stellt dabei wegen seiner faserartigen Struktur und seiner hydrophilen Eigenschaften, resultierend aus seinen Amino-, Hydroxy- sowie Carboxylgruppen, eine sehr gute Matrix dar.^[34,37,39,111,113,116-119] Es kann als Biomaterial für Augenoperationen, als Haut- und Knochenersatz, als Blutgefäß- und Herzklappenimplantat sowie zur Dialyse und als Trägermaterial für Drug Delivery-Systeme eingesetzt werden, wobei es möglicherweise zu einer Umstrukturierung des Gewebes kommen kann oder auch zu dessen Resorption.^[34,37,39,111,113,116-119]

2.5.1 Collagen

Bei Collagen handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Biopolymer, wobei es ein eher festes und hartes Protein ist.^[34,35,37,111,113,119,120] Es ist mit 25 % des gesamten Proteinhaushalts in Organismen von Vertebraten das bedeutendste Protein.^[37] Dabei ist es das Hauptstrukturmaterial für harte und weiche Materialien und bildet das Bindegewebe.^[34-37] Da es in biologischen Umgebungen gut degradiert wird, verschwindet es bei der Anwendung als Implantat letztendlich vollständig, wobei keine permanenten Fremdkörper hinterlassen werden.^[34,37-39,111,113,118,120] Ein weiterer Vorteil dieses Biopolymers ist die einfache Herstellung.^[34,37-39,113,117,118,121] Dabei weisen die verschiedenen Collagen-Gewebe kleine strukturelle Unterschiede auf.^[37,114] Collagen gehört zu den Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix und ist ein wesentlicher Bestandteil der Haut und der Sehnen, von Zähnen, Muskeln und Blutgefäßen, der Hornhaut, von Membran- und Knorpelgewebe sowie von Knochen.^[34,35,37,38,114,119,120,122-125] Aufgrund dessen kann Collagen implantiert werden, ohne immunologische Reaktionen hervorzurufen.^[37,119,120,122-125] Da Collagen eine hohe Bruchfestigkeit, eine hohe Affinität zu Wasser sowie eine niedrige Antigenität hat, hämostatische Eigenschaften aufweist, kontrolliert degradiert werden kann, keine zytotoxischen Eigenschaften zeigt und die Fähigkeit hat, zelluläre Verbindungen, Wachstum und Differenzierungen zu fördern, ist es ein sehr gutes Biomaterial.^[126]

Als Collagene werden alle faserartigen Proteine bezeichnet, die um die 33 % Glycin und 10-13 % Hydroxyprolin aufweisen.^[37] Collagen-Moleküle sind organisierte Gewebe, die in einer

genauen Weise angeordnet sind und über eine Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quarternärstruktur beschrieben werden können.^[37,127]

Bei der Primärstruktur, die die Aminosäuresequenz beschreibt, können die individuellen Polypeptid-Ketten aus zwei Spezies, als α_1 und α_2 bekannt, bestehen, wobei die Aminosäuresequenz mit einer geringen Homologie variiert.^[37,114,127,128] Dabei bestehen die meisten Collagene (Haut, Sehne, Knochen) aus zwei α_1 - und einer α_2 -Kette, wobei die charakteristische Struktur beider Ketten aus wiederholenden Einheiten von drei Aminosäuren, die als $(\text{Gly-X-Y})_n$ bezeichnet werden, aufgebaut ist.^[37,114,119,125,127,128] Bei X und Y handelt es sich oft um die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin.^[37,114,119,125,127,128] In der Abfolge können polare und apolare Aminosäuregruppen auf der Länge der Peptid-Kette beobachtet werden, so dass von gerichteten Ketten gesprochen werden kann, da die Ketten einen Kopf und einen Schwanz haben, die durch die gestaffelte Anordnung verbunden werden können.^[35,37,127] Die apolaren Regionen sind dabei sehr anfällig für einen proteolytischen Angriff von bakterieller Collagenase, während aus den polaren Regionen die typischen Bandmuster resultieren, die mittels der Elektronenmikroskopie beobachtet werden können.^[37,127] Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass Glycin aufgrund der dichten Packung der drei Ketten in Nähe der Achse jede dritte Position mit Ausnahme der Endregionen im Molekül besetzt.^[36,37,114,125,127-129] Durch Substitution der Glycin-Reste können Erkrankungen von Knochen, Knorpeln und Blutgefäßen ausgelöst werden.^[125] In Abb. 2-8 ist eine Veranschaulichung des Aufbaus der Aminosäuresequenz gezeigt.

Gly-X-Y-Gly-Pro-Y-Gly-X-Hyp-Gly-Pro-Hyp

Abb. 2-8: Aufbau der Primärstruktur des Collagens, die aus einer Sequenz von Aminosäuren besteht. Dabei steht Gly für Glycin, Pro für Prolin und Hyp für Hydroxyprolin. Bei X und Y handelt es sich um weitere Aminosäuren, die in der Sequenz auftreten können.^[nach 127]

Die Sekundärstruktur beschreibt die lokale Anordnung der individuellen Polypeptid-Ketten, die durch stereochemische Eigenschaften der Aminosäurereste hervorgerufen wird.^[127] Die einzelnen Ketten bilden dabei eine linksgewundene Helix mit einem Abstand von 0.87 nm aus, die auch α -Ketten genannt werden.^[35,37,109,125,127] Die Sekundärstruktur ist in Abb. 2-9 schematisch dargestellt.

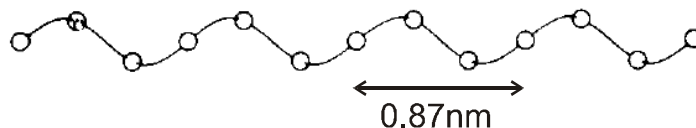


Abb. 2-9: Schematischer Aufbau der Sekundärstruktur des Collagens, bei dem die Aminosäuresequenzen eine linksgängige Helix (α -Kette) ausbilden.^[nach 127]

Die Tertiärstruktur beschreibt die Anordnung von drei linksgewundenen Helices (α -Ketten), die das Tropocollagen bilden; eine Vorstufe des Collagens.^[127] Diese linksgewundenen Helices umwinden sich gegenseitig um eine allgemeine Achse in einer rechtsgewundenen dreifach Superhelix.^[34,35,37,39,109,116,119,124,125,127] Die Tropocollagen-Moleküle haben eine

Länge von 280 nm, eine Breite von 1.5 nm und eine Periodizität von 8.6 nm, wodurch eine zylindrische Form entsteht.^[34,35,37,39,109,116,119,124,125,127] Dabei ist jedes Tropocollagen-Molekül über ein Viertel seiner Länge mit seinen Nachbarn gebündelt angeordnet, wobei durch die Periodizität kleine Lücken entstehen; Bereiche mit einer geringeren molekularen Dichte.^[35-37,116] Durch diese Art der Stapelung bekommt das Collagen-Gewebe seine Bruchfestigkeit und Elastizität.^[36,37] Des Weiteren konnte durch Studien mit polarisiertem Licht herausgefunden werden, dass Tropocollagen einen sehr hohen Anteil an helikalen Bereichen aufweist.^[37] Diese tertiäre Struktur wird durch Wasserstoffbrückenbindungen, meist zwischen –CO- und –NH-Gruppen der anliegenden Ketten, stabilisiert.^[34,37,109,125,127] Diese schwachen Wasserstoffbrückenbindungen können durch Erhitzen, schwach saure Lösungen oder durch Reagenzien wie Kaliumthiocyanat gebrochen werden, wodurch es zur Denaturierung des Moleküls kommt.^[37,109,127] Die entstehenden denaturierten Collagen-Polypeptide haben eine zufällig gewickelte Konfiguration und können als Gelatine bezeichnet werden.^[37,109,127] Handelt es sich bei der Konfiguration um eine einzelne Kette, wird vom α -Collagen gesprochen, sind zwei Ketten miteinander verknüpft, wobei diese auch aus zwei α -Ketten aufgebaut sein können, ist es β -Collagen und sind alle drei Ketten weiterhin verknüpft, handelt es sich um γ -Collagen.^[109,127] In Abb. 2-10 ist der Aufbau der dreifach Helix gezeigt.

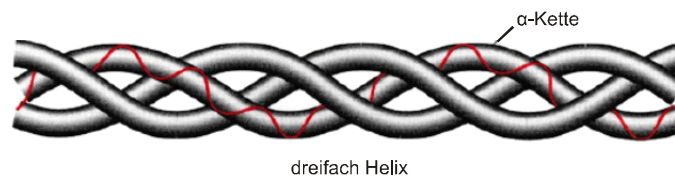


Abb. 2-10: Aufbau der dreifach-helikalen Struktur des Collagens aus drei Polypeptid-Ketten. Die rote Linie zeigt dabei die Primärstruktur der Aminosäuresequenz.^[35]

In der Quaternärstruktur des Collagens ordnen sich die Tropocollagen-Moleküle zu kleinen Aggregaten an, die Fibrille genannt werden.^[127] Diese haben einen Durchmesser von etwa 50 nm und sind an angrenzende Moleküle über intrafibrillare Bindungen geknüpft, woraus Collagen-Fasern entstehen.^[34,35,109] Dabei können verschiedene Netzwerke des Collagens erhalten werden, von ein- bis dreidimensional, die in unterschiedlichen Bereichen im Organismus vorkommen.^[35]

Bisher konnten etwa 27 Typen von Aminosäureanordnungen des Collagens, die leicht variieren, entdeckt werden, wobei die Anzahl weiterhin steigt.^[34-36,119] Collagen Typ I besitzt eine faserförmige Struktur und ist ein $(\alpha_1)_2\alpha_2$ -Heteroisomer.^[34,35,116,125] Bei Collagen II, X, etc. handelt es sich um weitere Typen des Collagens.^[34,35]

Der größte Anteil an Collagen ist unlöslich bzw. nur unter Denaturierung und Degradierung löslich, während nur 2-3 % des Collagens in schwach sauren Lösungen gelöst werden können.^[37,114,128] Dieses lösliche Collagen wurde in den meisten Studien zur Strukturaufklärung verwendet.^[37] Jedoch kann der unlösliche Anteil durch proteolytische Enzyme gelöst werden, wodurch das Collagen als Biomaterial einen kritischen Faktor erhält.^[37] Dabei ist die Fähigkeit Collagen zu lösen, ohne dass die elementare, steife

dreifach-helikale Struktur zerstört wird, grundlegend für die Anwendung des Collagens als Biomaterial.^[37] Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung von Tropocollagen mit proteolytischen Enzymen Peptide freigesetzt werden, wodurch die Eigenschaften des Collagens, jedoch nicht die dreifach-helikale Struktur, verändert wurden.^[37,114]

Bei Collagenasen handelt es sich um Enzyme, die Peptidbindungen unter physiologischen Bedingungen in der dreifach-helikalen Struktur brechen können.^[34,37,122,128] Dabei teilt die bakterielle Collagenase das Collagen durch einen Angriff auf die Haupt-Polypeptidkette an mehreren Stellen in mehrere kleine Peptidfragmente verschiedener Größen und Formen, während Säugetiercollagenase das Collagen an einem strategischen Punkt angreift und in zwei Teile spaltet, wobei die helikale Struktur beider Fragmente erhalten bleibt.^[34,37,122,128]

Auf quervernetzte Collagen-Membranen hat die Collagenase jedoch keinen Effekt.^[37]

Vollentwickelte Collagen-Fasern, die in der Natur gefunden werden, sind unlöslich, da es hier kovalente intermolekulare Quervernetzungen gibt, wodurch das Collagen in ein unbegrenztes, verbundenes Netzwerk der Monomereinheiten übergeht.^[36,37,110] Bei den Quervernetzungen kann es sich um Wasserstoffbrückenbindungen, kovalente Bindungen, VAN DER WAALS-Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen und Esterverknüpfungen handeln, wobei sich die physikalischen sowie funktionellen Eigenschaften des Materials in Abhängigkeit der Anzahl und Art der Quervernetzung verändern.^[109,128] Dabei sind diese Quervernetzungen sehr wichtig für die Benutzung von Collagen als Biomaterial, da sie das Material neu anordnen und stabilisieren können.^[37,110,112,127] Die Quervernetzung kann chemisch oder physikalisch erfolgen.^[34,37,110,112,130] Dabei gehören Trocknen, Altern, Heizen und Bestrahlen mit ultraviolettem Licht oder γ -Strahlen zu den physikalischen Methoden, während für die chemische Quervernetzung verschiedene Aldehyde und Chromsäuren verwendet werden können, wodurch stabile, kovalente Vernetzungen entstehen.^[34,37,110-112,130] Beim Bestrahlen des Collagens werden zum einen zufällige Quervernetzungen erzeugt und zum anderen können Bindungen des Tropocollagen-Moleküls gebrochen werden.^[37,110] Des Weiteren kann ein Verlust der optischen Rotation erfolgen, wenn die Collagen-Helices gebrochen werden.^[37] Wird die Methode in Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt, so kann die Quervernetzung erhöht und die Degradierbarkeit gehemmt werden.^[37] Eine weitere Folge dieser Behandlung sind eine Verringerung der Faserbildung und der Antigenität.^[37,121] Ein Vorteil der Bestrahlung ist, dass keine potentiell toxischen Reste entstehen, so dass diese Materialien für biomedizinische Zwecke sehr gut geeignet sind.^[37] Eine neuere Methode ist die Quervernetzung durch die Bestrahlung mit blauem sichtbarem Licht, wobei ein Ruthenium(II)-Komplex und Persulfat verwendet werden.^[110] Dabei erfolgt die stabile Quervernetzung innerhalb einer Minute und es können keine toxischen Effekte beobachtet werden, da die Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien unterhalb des toxischen Spiegels liegen.^[110] Beim Trocknen des Collagens kann es zum Kollabieren und Verdichten der Struktur kommen, wenn die Feuchtigkeit unter 0.2 % sinkt, wodurch Quervernetzungen in Form von Amidbindungen aufgrund einer exzessiven Dehydratation des Proteins resultieren.^[37,121,127] Durch Rehydratation kann die Struktur jedoch wieder vollständig

regeneriert werden.^[127] Bei der chemischen Quervernetzung mit Aldehyden wird die hohe Reaktivität dieser Gruppen mit Proteinen ausgenutzt.^[37] Es konnte gezeigt werden, dass durch Glutaraldehyd eine größere Quervernetzung erzielt werden konnte als beispielsweise mit Formaldehyd und dass diese Quervernetzung außergewöhnlich stabil ist, so dass daraus eine annehmbare Langlebigkeit resultiert und das Collagen jedoch weiterhin eine ausreichende mechanische Flexibilität zeigt.^[37,110] Ein Nachteil der Quervernetzung mit Glutaraldehyd ist, dass die Materialien aufgrund der Toxizität des Glutaraldehyds biokompatibel werden.^[121] Diese Zytotoxizität könnte durch Reduktion bzw. Oxidation der Aldehydgruppe oder durch geringere Konzentrationen an eingesetztem Glutaraldehyd minimiert werden.^[121] Um die toxischen Eigenschaften der Materialien zu entfernen, können auch andere Quervernetzungsreagenzien verwendet werden.^[121]

Für spezielle biomedizinische Anwendungen kann gelöstes Collagen über die vorhandenen Amin- sowie Säuregruppen funktionalisiert werden.^[37,111] Dabei kann eine nahezu vollständige Acetylierung der Aminogruppen durch eine Mischung aus Essigsäureanhydrid und Essigsäure bzw. durch Essigsäureanhydrid in milder alkalischer Lösung erzielt werden.^[37,131] Außerdem kann Bernsteinsäureanhydrid ebenfalls mit Collagen reagieren, wobei die Aminogruppen mit dem Bernsteinsäureanhydrid unter Ringöffnung reagieren und Carboxylgruppen entstehen.^[37] Des Weiteren können die Carboxylgruppen quantitativ verestert werden.^[131] Durch diese Modifizierungen kann das Collagen entweder stark geladen oder neutral sein, indem Amino- sowie Carboxylgruppen blockiert werden.^[37]

Zeta-Potential-Messungen von Collagenen, die durch Säure oder Pepsin gelöst werden können, zeigen, dass Collagen in einem pH-Bereich zwischen 2 und 5 positiv geladen ist, während bei pH-Werten zwischen 6 und 9 eine negative Ladung zu beobachten ist.^[132] Der isoelektrische Punkt liegt etwa bei einem pH-Wert von 5.^[132]

Die Präparation von Collagen zur Verwendung als Biomaterial kann in zwei Verfahren unterteilt werden: zum einen können weitere Substanzen wie Mineralien aus biologischen Strukturen entfernt werden, so dass das überbleibende Collagen stabilisiert wird, wobei die Struktur sowie Quervernetzungen erhalten bleiben und zum anderen kann Collagen zunächst gelöst und gereinigt werden, um anschließend in der eigentlichen Form zurückgewonnen zu werden.^[37] Der Vorteil der ersten Variante liegt in der Ausnutzung der normalen, biologischen dreifach-helikalen Struktur des Collagens, jedoch ist der Aufbau des Materials nicht flexibel und vorbestimmt.^[37] In der Biomedizin wird dieses Material bereits als Heterotransplantat wie zum Beispiel als Arterienersatz eingesetzt.^[34,37] Bei der zweiten Variante treten Probleme bei der Rekonstruktion des Collagens auf, jedoch gibt es für diese Materialien sehr breite potentielle Anwendungen, da sie gereinigt werden können und in vielen biomedizinischen Baueinheiten hergestellt werden können.^[37] Sie werden bereits als gepresste Collagen-Fasern, Collagen-Membranen, Collagen-Gele sowie -Hydrogele und als Collagen-Schwämme eingesetzt.^[34,37,119,120,126] Dabei werden diese Materialien für freigelegte Hautbereiche bei Brandwunden und in der Wundheilung, in chirurgischen Verfahren, als Röhrchen in der Nervenregeneration, für die Blutdialyse, bei Knochendefekten, als Drug Delivery-Systeme und als Zusatzmaterial für künstliche Nieren eingesetzt.^[34,37,113,120,126]

Die Vorteile der Verwendung von Collagen als Biomaterial beinhalten die Reichhaltigkeit sowie die einfache Reinigung von Collagen aus lebenden Organismen, dass es keine antigene Wirkung zeigt, die Biodegradierbarkeit sowie die Bioresorbierbarkeit, wobei die Biodegradierbarkeit durch Quervernetzungen reguliert werden kann, die Biokompatibilität, die einfache Modifizierung der funktionellen Gruppen zur Produktion gewünschter Materialien und die hämostatische Wirkung, durch die die Blutgerinnung gefördert wird.^[34] Nachteilig sind die hohen Kosten von reinem Collagen vom Typ I und die Hydrophilie, wodurch die Collagen-Materialien anschwellen und schneller abgebaut werden.^[34,127]

2.5.2 Collagen-Silica-Komposite

Biologische Organismen haben die Fähigkeit, komplexe Komposite aus organischen und anorganischen (Minerale) Komponenten zu bilden, die im nano-, mikro- und meso-Bereich hierarchisch organisiert und aufgebaut sowie oft multifunktionell sind.^[35,36,115,133,134] Die Eigenschaften dieser Biominerale hängen eng mit der Natur des Minerals, der Größe seiner Partikel und ihrer Verteilung in der bioorganischen Phase zusammen.^[39] Amorphes Silica findet sich als anorganische Komponente in den Nadeln von Schwämmen und in Kieselalgen, Collagen als organische Komponente findet sich ebenfalls in den Schwämmen sowie in Wirbeltieren vor allem in den Knochen und in den Zähnen.^[35] Dabei erhalten die Biominerale von den Mineralien ihre Festigkeit und ihre Dehnbarkeit und Flexibilität von der organischen Komponente.^[35] Collagen-Silica-Komposit-Materialien, wie sie in Nadeln von bestimmten Seeschwämmen vorkommen, haben dabei wegen ihrer verbesserten mechanischen Eigenschaften ein gutes Potential für biomedizinische Anwendungen wie zum Beispiel als Knochenersatzmaterial oder als biologische Verbände.^[126,135-138] Jedoch müssen die Wechselwirkungen zwischen den beiden Spezies verstanden werden, um die Strukturen und Eigenschaften der Komposite zu kontrollieren.^[126,135-138]

Ein Collagen-Silica-Netzwerk kommt in der Natur bei dem Seeschwamm *Hyalonema sieboldi* in Form von Nadeln vor, welche sehr groß (bis zu 1 m), langlebig und flexibel sind.^[35,36] Diese Nadeln bestehen aus einem komplizierten Collagen-Netzwerk, das eine „twisted plywood“ Struktur aufweist.^[35] Dabei wirkt das Collagen als Medium für die Nukleation und das Wachstum von amorphem Silica, wodurch sich die einzigartige mechanische Flexibilität ergibt.^[35,36] Da die Seeschwämme in tiefem und kaltem Wasser vorkommen, ist die Collagen-basierte Silifizierung eine einmalige Form der Biomineralisation bei geringen Temperaturen.^[36] Des Weiteren sind bei hornartigen Schwämmen (*Demospongiae*) die Silica-Nadeln durch einen collagenartigen Gips, der aus Mikrofibrillen besteht, aneinander „geklebt“ und Collagen-Fibrillen kommen in älteren Glasschwämmen (*Hexactinellidae*) als Template für die Biosilifizierung vor.^[36,119,123]

Für die Synthese von Collagen-Silica-Kompositen wurden in den meisten Fällen Siliciumalkoxid-Lösungen oder -Dämpfe oder Natriumsilicat als Siliciumquelle verwendet.^[115,138,139] In den ersten beiden Fällen wird die Silicium-Spezies zu verschiedenen Zeitpunkten zu einer Lösung gegeben, in der eine Selbstorganisation des Collagens

stattfindet, wodurch mineralisierte Collagen-Fasern entstehen und die Selbstorganisation des Collagens abgebrochen wird.^[115] Auch bei der Zugabe von Natriumsilicat ergeben sich Collagen-Fasern, die mit Silica beschichtet sind.^[115] EGLIN et al. konnten zeigen, dass die Collagen-Silica-Wechselwirkungen stark von der Silica-Quelle abhängig sind.^[115] Dabei wird die Selbstorganisation des Collagens bevorzugt, wenn Silicate in kleinen Konzentrationen zugegeben werden, da angenommen wird, dass die gebildete Orthokieselsäure die Struktur des Wassers in der Umgebung der dreifach Helix des Collagens modifiziert.^[115] Werden die Silicate in höheren Konzentrationen zugegeben, werden Polykieselsäuren lokal an die Proteinketten adsorbiert, wodurch die Selbstorganisation erschwert ist.^[115] Ein ähnlicher Effekt kann auch für Silica-Nanopartikel mit einer Größe von 12 nm beobachtet werden, da die Nanopartikel an der dreifach Helix aggregieren, so dass diese nur in geringen Mengen zur Collagen-Lösung gegeben werden können.^[115,138] Durch die Verwendung verschiedener Massenverhältnisse an Collagen und Silica können unterschiedliche Morphologien erhalten werden.^[39,135]

DESIMONE et al. haben versucht Collagen-Silica-Hydrogele herzustellen, indem kalte verdünnte Collagen-Lösungen in Kulturmedium mit angesäuerten verdünnten Natriumsilicat-Lösungen vermischt werden.^[139,140] Durch die gleichzeitig ablaufende Selbstorganisation des Collagens und Kondensation des Silicas konnten Hydrogele mit einem Durchmesser von 3.4 cm und 2 mm Dicke erhalten werden.^[36,136,139,140] Außerdem konnte die Gruppe zeigen, dass durch den Zusatz von Silica-Nanopartikeln Nanokomposit-Materialien hergestellt werden können, wobei die Nanopartikel in der Proteinmatrix dispergiert werden.^[136,1340-142] Durch die Verwendung von verschiedenen Silica-Spezies konnten sie darstellen, dass es möglich ist, unterschiedliche homogene Collagen-Silica-Materialien herzustellen, die eine erhöhte thermische und mechanische Stabilität aufweisen.^[140]

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Collagen-Silica-Komposit-Materialien ist die Nutzung des Collagens beispielsweise als organisches Templat bei der Silica-Synthese.^[123,133] Dabei können die positiv geladenen Aminogruppen des Collagens bei einem neutralen pH-Wert als bevorzugte Anlagerungsorte für negativ geladene Silica-Spezies dienen, wobei durch die elektrostatische Anziehung eine verkieselte Collagen-Matrix entsteht.^[123,126,134] Durch die Zugabe von TEOS zu einer gepufferten Salzlösung, die Collagen-Fasern enthält, konnte die Bildung von Silica-Fasern beobachtet werden, wobei eine raue Struktur mit einer Periodizität von 60-80 nm entstanden ist, die auch in den Collagen-Fasern zu finden ist.^[134] Außerdem konnten bei dieser Variante Kompositstrukturen im Mikroskop beobachtet werden, die den Glasfasern von einigen Meeresschwämmen ähneln.^[123] Des Weiteren konnten die mechanischen Eigenschaften durch die Änderung des Massenverhältnisses variiert werden.^[123]

Durch verschiedene Methoden konnten bereits viele unterschiedliche Collagen-Silica-Hybrid-Materialien hergestellt werden.^[36] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Materialien sehr gut biokompatibel sind und die mechanischen Eigenschaften der Collagen-Matrix verbessern.^[36,126,135]

3. Analytische Methoden

3.1 Röntgen-Pulverdiffraktometrie

Bei der Röntgen-Pulverdiffraktometrie handelt es sich um ein Analyseverfahren zur Aufklärung von Strukturen kristalliner Festkörper. Dabei werden Beugungsphänomene von Röntgenstrahlen gemessen, die als eine Reflexion der Netzebenenscharen verstanden werden können. Besitzen die Netzebenenscharen die richtige Ausrichtung, so dass die BRAGG'sche Gleichung (1) erfüllt wird, kann von konstruktiver Interferenz gesprochen werden. Die interatomaren Abstände der Atome können aus den Millerschen Indizes (hkl) der Reflexe ermittelt werden.

$$\sin\theta_{\text{hkl}} = \frac{n \cdot \lambda}{2 \cdot d_{\text{hkl}}} \quad (1)$$

θ : Beugungswinkel n: Ordnung der Reflexe λ : Wellenlänge d_{hkl} : Netzebenenabstand

Die in dieser Arbeit synthetisierten Proben wurden in θ -2 θ -Transmissionsgeometrie an einem StadiP Diffraktometer der Firma STOE vermessen, wobei ein $\text{CuK}\alpha_1$ -Strahl verwendet wurde, der an einem Germanium(111)-Einkristall monochromatisiert wurde. Als Detektor diente ein PSD (positional sensitive detector). Die Proben wurden für die Messungen fein gemörsert und zwischen zwei röntgenamorphen Folien in einen Träger eingespannt. Für die Auswertung der Daten wurde die Software WinXPow 1.08 der Firma STOE verwendet.

3.2 Infrarot-Spektroskopie

Bei der Infrarot-Spektroskopie (IR-Spektroskopie) handelt es sich um ein quantitatives Analyseverfahren, das zur Aufklärung von Strukturen genutzt werden kann. Dabei werden Atome in Molekülen oder Festkörpern zu Schwingungen angeregt, indem sie mit infrarotem Licht bestrahlt werden, wobei die absorbierte Frequenz charakteristisch für die jeweilige Schwingung ist, die dann im Spektrum als Absorptionsbande dargestellt wird und einer funktionellen Gruppe zugeordnet werden kann. Eine Verbindung ist dann IR-aktiv, wenn sie ein veränderbares, permanentes oder induziertes Dipolmoment während der Schwingung aufweist. Daraus folgt, dass alle asymmetrischen Schwingungen IR-aktiv und die symmetrischen Schwingungen IR-verboden sind. Da IR- und Raman-Spektroskopie ergänzend sind, sind Moleküle, die IR-inaktiv sind, Raman-aktiv.

Die IR-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um die Oberflächenfunktionalisierung nach den einzelnen Reaktionsschritten zu untersuchen. Für die Untersuchung der Silica-Nanopartikel wurden diese mit trockenem Kaliumbromid (KBr) vermengt, gut durchmischt und mit einer hydraulischen Presse zu einer KBr-Tablette gepresst, die in den Probenhalter eingespannt wurde. Die Messungen erfolgten in

Transmission, wobei vor den Messungen ein Hintergrundspektrum mit einem reinen KBr-Pressling aufgenommen wurde. Die Collagen-Materialien wurden mit Hilfe der ATR-Einheit (attenuated total reflection) vermessen, indem die Proben mit einer speziellen Halterung auf die Oberfläche eines Lichtwellenleiters (Diamant) angepresst wurden. Die Hintergrundmessung erfolgte hierbei ohne Probe vom sauberen Lichtwellenleiter. Alle durchgeführten Messungen wurden an einem FOURIER-Transformations-Spektrometer vom Typ Tensor 27 der Firma BRUKER aufgenommen. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software Opus 5.0 der Firma BRUKER. Dabei betrug die Auflösung aller Messungen 4 cm^{-1} und es wurden jeweils 100 Scans aufgenommen. Alle Spektren wurden auf die signifikante Valenzschwingung des Silicagerüsts bei etwa 1090 cm^{-1} normiert. Die typische Bande der asymmetrischen Valenzschwingung des Kohlenstoffdioxid-Moleküls bei etwa 2300 cm^{-1} wurde aus den Spektren entfernt.

3.3 Thermogravimetrie und Differentialthermoanalyse

Bei dem Analyseverfahren der Thermogravimetrie (TG) wird die Änderung der Masse einer Substanz in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen, wobei die Temperatur konstant erhöht wird. Dabei kann es zu einer Massenänderung kommen, die durch Verdampfung, Sublimation oder Reaktion hervorgerufen wird. Über den Verlauf der Massenänderung kann auf die Zusammensetzung der Probe geschlossen werden.

Neben der Thermogravimetrie wurde noch eine Differentialthermoanalyse (DTA) durchgeführt. Bei dem Verfahren wird die gemessene Temperatur der Probe mit der Temperatur einer Referenzprobe verglichen, wobei bei der Referenzprobe keine Phasenübergänge im zu untersuchenden Bereich vorliegen. Daher wird die Temperaturdifferenz detektiert, die gemessen wird, wenn kein Phasenübergang in der Probenkammer zu beobachten ist. Wird die Temperaturdifferenz in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen, kann ermittelt werden, ob ein endothermer oder exothermer Prozess stattfindet.

Thermogravimetrische Daten der hergestellten Proben wurden in dieser Arbeit aufgenommen, um Erkenntnis über mögliche qualitative und quantitative Änderungen in der Zusammensetzung der Materialien zu erhalten. Die Messungen wurden von KATHARINA NOLTE und CHRISTIAN SCHRÖDER an einem Simultaneous Thermal Analyzer 429 der Firma NETZSCH durchgeführt. Dabei wurde in einem Temperaturbereich von Raumtemperatur bis 1000 °C gemessen, wobei die Aufheizrate 5 °C pro Minute betrug. Die Messdaten wurden mit der Software Proteus Thermal Analysis 4.3.1 der Firma NETZSCH ausgewertet.

3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) handelt es sich um ein Analyseverfahren, bei dem Oberflächen von Substanzen vergrößert dargestellt werden können. Bei dem Verfahren wird die Oberfläche der Substanz mit einem feinen Elektronenstrahl abgetastet. Aufgrund der geringeren Wellenlänge der Elektronen im Gegensatz zum Licht können Abbildungen im Nanometerbereich aufgenommen werden (de-BROGLIE). Durch eine Wolframhaarnadelkathode werden die Elektronen im REM erzeugt und mittels einer angelegten Spannung zur Anode hin beschleunigt. Durch Wechselwirkungen der Primärelektronen mit der Oberfläche der Probe, werden Sekundärelektronen erzeugt, die eine geringere Energie aufweisen. Der EVERHART-THORNLEY-Teilchendetektor lässt die Sekundärelektronen auf einen Szintillator treffen, wobei Photonen erzeugt werden. Diese werden dann mittels eines Photomultipliers vermehrt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches zur Bilderzeugung genutzt wird.

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Größe und die Morphologien der Proben darzustellen. Die Messungen wurden an zwei verschiedenen Rasterelektronenmikroskopen durchgeführt. Die Aufnahmen aller Silica-Nanopartikel, einiger Collagen-Silica-Komposit-Materialien sowie der Nervenschnitte wurden von IMKE BREMER und GESA WISSMANN an einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop der Marke JSM-6700F der Firma JOEL durchgeführt, dass im folgenden als REM-PCI bezeichnet wird. Dazu wurden die zu untersuchenden Silica-Nanopartikel in Ethanol dispergiert, im Ultraschallbad behandelt und dann auf einen Graphitblock aufgetragen. Die Collagen-Silica-Komposit-Materialien sowie die Nervenschnitte wurden auf einen Messingprobenträger mittels eines Graphit-Klebebands aufgeklebt. Alle Proben wurden vor der Messung im Vakuum getrocknet. Für geringere Vergrößerungen wurde ein LEI-Detektor (lower electron image) verwendet, wobei der Arbeitsabstand 6 bis 15 mm betrug. Höhere Vergrößerungen wurden mit einem SEI-Detektor (secondary electron image) aufgenommen. Hier betrug der Arbeitsabstand etwa 3 mm. Die Beschleunigungsspannung der Kathode betrug 1.2 bis 2 kV.

Des Weiteren wurden Aufnahmen von HENDRIK FULLRIEDE an einem Rasterelektronenmikroskop vom Typ JSM-6610LV der Firma JOEL gemacht, im Folgenden als REM-ACI bezeichnet. Mit diesem Gerät wurden zum einen einige Collagen-Silica-Komposit-Materialien vermessen, die mit einem leitfähigen Kohlenstoff-Klebeband auf einen Aluminiumprobenträger aufgeklebt und anschließend mit Gold für 60 Sekunden bedampft wurden. Es wurde ein SEI-Detektor verwendet und die Beschleunigungsspannung lag zwischen 5 – 10 kV. Zum anderen wurden Nervenquerschnitte mit einem low-vacuum Modus vermessen, wobei ein Vakuum zwischen 40 und 65 Pa eingestellt wurde. Dazu wurden die Nervenschnitte auf einen Aluminiumprobenträger mittels des Einbettmediums Tissue-Tek® (SAKURA) aufgetragen und bis zur Messung im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Messungen erfolgten mit einem BES-Detektor (backscattered electron detector) und einer Beschleunigungsspannung von 10 – 20 kV.

3.5 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird der hydrodynamische Radius einer kolloidalen Probe ermittelt, indem der Tyndall-Effekt, der nicht bei echten Lösungen auftritt, ausgenutzt wird. Dabei wird durch diesen Effekt das eingestrahelte Licht eines Lasers durch die kolloidale Lösung gestreut und in einem Winkel von 173° detektiert. Die zeitliche Änderung der Intensität der Streustrahlung ändert sich dabei aufgrund der BROWNSchen Molekularbewegung, da deren Geschwindigkeit abhängig von der Teilchengröße ist. Mit Hilfe der STOKESSchen Gleichung (2) kann der Radius ermittelt werden, da der Diffusionskoeffizient abhängig von der Teilchengröße ist.

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2)$$

D: Diffusionskoeffizient

k: BOLTZMANN-Konstante

T: Temperatur

η : Viskosität

r: hydrodynamische Radius

Alle Messungen wurden an einem Zetasizer Nano ZS der Firma MALVERN Instruments durchgeführt. Für die Messungen wurden die Proben in Ethanol unter Verwendung von Ultraschall dispergiert und anschließend vermessen. Die Messungen wurden dabei dreimal wiederholt und erfolgten stets bei 25°C .

3.6 Sorptionsmessung

Die Sorption ist ein Analyseverfahren, bei dem ein Adsorptiv wie zum Beispiel Stickstoff genutzt wird, um die spezifische Oberfläche, die Porenweitenverteilung und das Porenvolumen von porösen Materialien zu bestimmen. Die Porenweitenverteilung kann mit der BJH-Methode (BARRET, JOYNER und HALENDA) aus der Desorptionskurve ermittelt werden, während die spezifische Oberfläche mit Hilfe der BET-Isotherme (BRUNAUER, EMMET und TELLER) bestimmt wird.^[143,144] Nach IUPAC werden die Adsorptionskurven in verschiedene Klassen unterteilt, die anhand des Verlaufs zugewiesen werden. Durch den Effekt der Kapillarkondensation werden bei mesoporösen Materialien Sorptionshysteresen zwischen Adsorptions- und Desorptionskurve hervorgerufen.

Die Sorptionsmessungen wurden von NATALJA WENDT und SONGÜL NOYUN an einem Gassorptionssystem Autosorb-3 der Firma QUANTACHROME durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die Software Autosorb-1 der Firma QUANTACHROME verwendet. Die unfunktionalisierten Proben wurden bei 200°C für 24 h im Feinvakuum ausgeheizt, während funktionalisierte Proben bei 80°C für 48 h im Feinvakuum ausgeheizt wurden. Alle Messungen wurden mit Stickstoff als Adsorptiv durchgeführt.

3.7 Thiobarbitursäure-Test

Aufgrund seiner Empfindlich- und Genauigkeit wurde der Thiobarbitursäure-Test (TBA-Test) nach WARREN durchgeführt, um die Menge an angebundener Polysialinsäure (PolySia) an den Materialien zu ermitteln.^[145,146] Um PolySia nachzuweisen, wird diese innerhalb dieses Verfahrens zunächst durch saure Hydrolyse in die einzelnen Sialinsäuremoleküle gespalten, deren freies reduzierendes Ende anschließend zur β -Formylpyruvinsäure oxidiert wird. Dieses entstehende Chromogen kann dann mit Thiobarbitursäure einen rosafarbenen Methinfarbstoff bilden, der bei 549 nm detektiert werden kann.

PAERELS et al. haben den Mechanismus des TBA-Tests erstmals beschrieben und fanden heraus, dass die Sialinsäuremoleküle nach der sauren Hydrolyse nicht sofort zum Chromogen der β -Formylpyruvinsäure oxidiert werden, sondern zunächst ein Pre-Chromogen bilden.^[146]

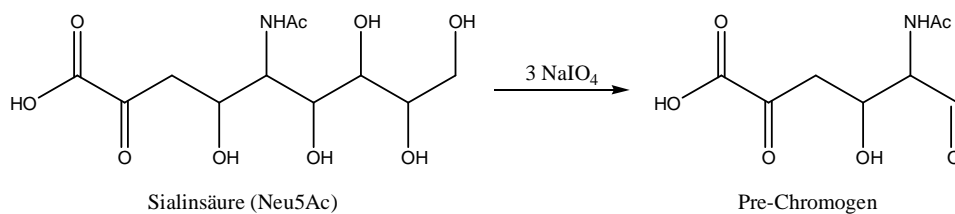


Abb. 3-1: Bildung des Pre-Chromogens durch saure Oxidation der Sialinsäure mit Periodat.^[146]

Unter sauren Bedingungen entsteht das Chromogen β -Formylpyruvinsäure durch eine Aldolspaltung zwischen dem vierten und fünften Kohlenstoffatom des Pre-Chromogens.^[146]

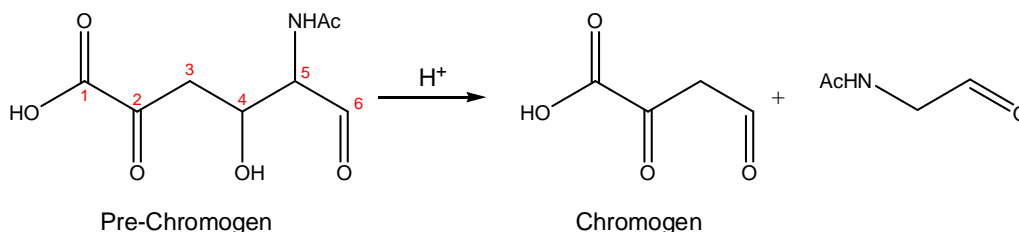


Abb. 3-2: Entstehung des Chromogens β -Formylpyruvinsäure durch Aldolspaltung zwischen dem vierten und fünften Kohlenstoffatom des Pre-Chromogens unter sauren Bedingungen.^[146]

In einer anschließenden Reaktion des Chromogens mit zwei Molekülen der Thiobarbitursäure wird der messbare Methinfarbstoff gebildet.^[146]

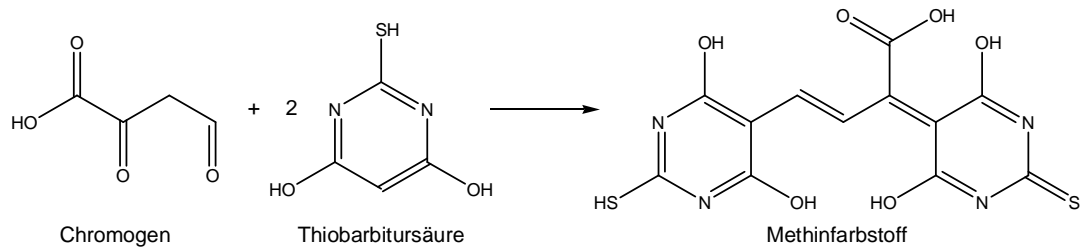


Abb. 3-3: Reaktion des Chromogens β -Formylpyruvinsäure mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure zum Methinfarbstoff, der bei 549 nm detektiert werden kann.^[146]

Zur Bestimmung der angebondenen Menge an PolySia auf den Materialien wurden die Proben in 400 μL Wasser und 40 μL Phosphorsäure (0.1 M) für 18 Stunden bei 70 °C hydrolysiert. Wenn Suspensionen vorlagen, wurden diese zunächst zentrifugiert. Anschließend wurden 250 μL der Probe entnommen und mit 100 μL Natronlauge (0.025 M) neutralisiert. Dann wurden 100 μL einer Oxidationslösung, die aus 0.12 g Periodsäure, 2.47 mL Wasser und 133 μL Phosphorsäure (1 M) hergestellt wurde, zugegeben und die Proben für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 μL einer Reduktionslösung (0.65 g Natrium(meta)arsenit, 0.92 g Natriumsulfat, 12.74 mL Wasser und 260 μL konzentrierter Schwefelsäure) zu der Lösung gegeben. Nach Entstehung einer gelblich-braunen Lösung wurden diese so lang geschüttelt, bis sich die Lösungen wieder entfärbt hatten. Danach wurden 500 μL TBA-Lösung, bestehend aus 0.39 g Thiobarbitursäure, 12.61 mL Wasser und 389 μL Natronlauge (10 M), zugegeben, die Lösungen für 13 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend für 5 Minuten im Wasser-Bad gekühlt. 400 μL der pinkfarbenen Lösung wurden mit 700 μL Cyclohexanon vermischt, kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert.^[24,147] Die Messung der Absorption der organischen Phase erfolgte bei 549 nm an einem Multiscan Spectrum der Firma THERMO LABSYSTEM.

Zur Überprüfung, ob die Hydrolyse der mit PolySia funktionalisierten Materialien notwendig ist, wurde der Test vergleichend auch ohne den Hydrolyseschritt durchgeführt. In dem Fall wurden die Materialien in 250 μL Wasser dispergiert und es wurde gleich die Oxidationslösung zugegeben. Die nachfolgenden Schritte wurden identisch zum Test mit Hydrolyse ausgeführt. Der Gehalt an Polysialinsäure der Proben, die zur Überprüfung des Einflusses der Hydrolyse verwendet wurden, wurde jeweils mit und ohne Hydrolyse bestimmt und verglichen.

3.8 Purpald[®]-Test

Der Purpald[®]-Test nach AVIGAD ist ein alternatives Analyseverfahren, um die Menge an PolySia zu bestimmen, indem Formaldehyd, das bei der Oxidation von PolySia durch Periodat entsteht, detektiert wird.^[148] Dabei reagiert das Formaldehyd mit dem Purpald[®]-Reagenz zu einem lilafarbenen Farbstoff, der bei 550 nm detektiert werden kann.^[148] Dabei ist das Reagenz spezifisch für Aldehyde, denn unter den Reaktionsbedingungen wird kein

lilafarbener Farbstoff mit Ketonen, Estern, Amiden, Hydrazinen, Hydroxylaminen, Chinonen, Aminophenolen oder Ameisensäure gebildet.^[149]

DICKINSON et al. haben den Test sowie dessen Mechanismus für die qualitative Bestimmung von Aldehyden beschrieben.^[149] Dabei reagieren Aldehyde zunächst mit dem Purpald[®]-Reagenz zu einem instabilen Intermediat, das zu dem lilafarbenen, konjugierten, bicyklischen Ringsystem oxidiert wird.^[149,150]

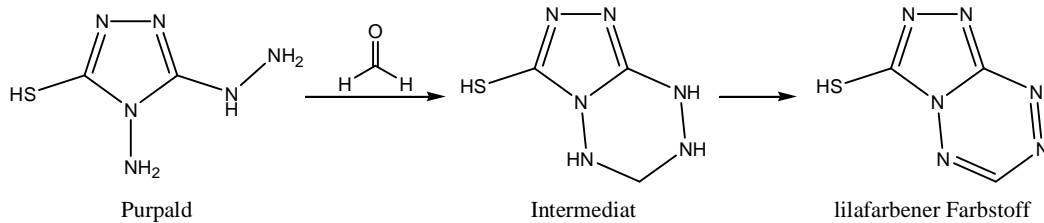


Abb. 3-4: Reaktion des Purpald[®]-Reagenz mit Formaldehyd, wobei zunächst ein instabiles Intermediat gebildet wird, das anschließend zu einem lilafarbenen Farbstoff oxidiert wird, der bei 550 nm detektiert werden kann.^[149,150]

Werden Ketone unter den Reaktionsbedingungen eingesetzt, reagieren diese auch mit dem Purpald[®]-Reagenz zu einem Intermediat, welches jedoch nicht weiter zu einem Farbstoff oxidiert werden kann.^[150]

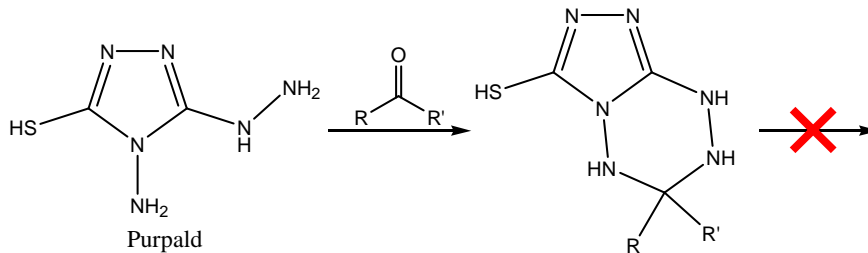


Abb. 3-5: Reaktion des Purpald[®]-Reagenz mit einem Keton, wobei ein Intermediat gebildet wird, das unter den Reaktionsbedingungen nicht zu einem Farbstoff weiter oxidiert werden kann.^[150]

Wie bei dem Thiobarbitursäure-Test wurden die Materialien in 400 µL Wasser und 40 µL Phosphorsäure (0.1 M) für 18 Stunden bei 70 °C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurden die Lösungen zentrifugiert, 250 µL Probe entnommen und anschließend mit 100 µL Natronlauge (0.025 M) neutralisiert. Dann wurden 250 µL einer Periodat-Lösung (5 mM) zugegeben und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 µL einer 1 % (w/v) Purpald[®]-Lösung (112 mg Purpald[®], 5.6 mL Wasser und 5.6 mL Natronlauge (1 N)) zur Lösung gegeben und diese für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei sich die Lösung lila färbte. Die Messung der Absorption erfolgte bei 549 nm an einem Multiscan Spectrum der Firma THERMO LABSYSTEM.

Auch bei diesem Test wurde der Einfluss der Hydrolyse auf die Ergebnisse untersucht, indem der Hydrolyseschritt weggelassen wurde. In dem Fall wurden die Materialien direkt in 250 µL Wasser gelöst und anschließend mit der Periodat-Lösung versetzt. Vor der Messung wurden diese Lösungen zentrifugiert. Auch bei dem Purpald[®]-Test wurden die Mengen an Polysialinsäure der Proben sowohl mit Hydrolyse als auch ohne vergleichend bestimmt.

3.9 Fluoreszenz-Spektroskopie

Bei der Fluoreszenz-Spektroskopie wird ausgenutzt, dass Proben, die mit Licht bestrahlt werden, von einem elektronischen Grundzustand in einen angeregten Zustand übergehen, wobei Energie absorbiert und ein angeregter Schwingungszustand erreicht wird. Anschließend wird zunächst der Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands erreicht, wobei Energie abgegeben wird. Durch Emittierung von Strahlung wird der elektronische Grundzustand erreicht. Die emittierte Strahlung hat dabei eine geringere Frequenz als die absorbierte. Bei dieser spontanen Emission handelt es sich um die Fluoreszenz.

Alle Proben wurden an einem Fluoreszenzspektrometer LSB-50 der Firma PERKIN ELMER bei Raumtemperatur gemessen. Dazu wurden die Proben auf einen Quarzglasträger aufgetragen und mit einem Stempel auf diesem befestigt. Die Messungen erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und es wurde ein 515 nm-cut-off-Filter verwendet, um unerwünschte Streustrahlung zu vermeiden. Zur Vergleichbarkeit der Proben wurde eine Schlitzbreite von 10 vor der Probe und 7 nach der Probe eingestellt, so dass die Intensität aller Proben im messbaren Bereich lag und vergleichbar war. Eine Xenonhochdrucklampe erzeugte dabei die angeregte Strahlung, die durch eine Lichtbogenentladung auf die Probe geworfen wurde. Die emittierte Strahlung wurde mit einem Photomultiplier detektiert und als Funktion der Intensität aufgetragen. Zur Aufnahme und Auswertung der Daten wurde die Software FL Winlab 4.00.03 verwendet.

3.10 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Mikroskopie ist eine Variante der Lichtmikroskopie, bei der eine Substanz mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und Licht emittiert, das eine größere Wellenlänge als das einstrahlende Licht aufweist. Bei den meisten Fluoreszenz-Mikroskopen wird die Probe durch das Objektiv beleuchtet. Diese Mikroskope werden Auflichtmikroskope genannt und können mit Hilfe von Anregungsfiltern die benötigte Wellenlänge einstellen, wodurch die Substanz anfängt zu fluoreszieren. Die emittierte Strahlung wird dann durch das Objektiv gesammelt, durch einen Farbteiler von dem anregenden Licht getrennt und auf einen Photomultiplier geworfen. Um gute Abbildungen zu erhalten, ist die Trennung des fluoreszierenden vom anregenden Licht notwendig.

Die Abbildungen wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) von JANETT SCHAPER-RINKEL und Dr. KIRSTEN HAASPERT-TALINI aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. KIRSTEN HAASPERT-TALINI (Prof. Dr. C. GROTHE) an einem Olympus IX-70 der Firma OLYMPUS OPTICAL Co. GmbH aufgenommen. Für die Messungen wurden sämtliche Proben in fester Form auf einen Träger aufgetragen und unter das Mikroskop gelegt. Es wurde ein Olympus Filter UMN-B als optischer Filter verwendet. Dieser Filter besitzt ein Anregungsspektrum zwischen 470 bis 490 nm und einen Sperrfilter von über 515 nm. Die Abbildungen wurden mit der Software analySIS aufgenommen.

3.11 Atomabsorptionsspektrometrie

Die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ist ein Analyseverfahren, bei dem viele Elemente qualitativ und quantitativ aus Lösungen und Feststoffen analysiert werden können. Das Verfahren basiert dabei auf einem Intensitätsverlust durch Absorption von Photonen ($\Delta I \sim$ Konzentration), wobei jedes Element ein charakteristisches Linienspektrum aufweist. Als Strahlungsquelle dient eine Hohlkathodenlampe (HKL), die aus dem zu untersuchenden Element besteht. Dabei werden Atome durch Füllgas-Ionen aus der Kathode geschlagen und zur Emission spezifischer Strahlung angeregt. Diese wird in eine Atomisierungseinrichtung geleitet, in der die Bestandteile der zu untersuchenden Probe atomisiert werden und die eintretende Strahlung abschwächen. Die Atomisierung erfolgt dabei entweder durch eine Gasflamme (Flammen-AAS) oder starkes Erhitzen in einem Graphitrohr (Graphitrohrtechnik). Die Intensität des abgeschwächten Lichtstrahls wird nach der Atomisierungskammer durch einen Monochromator geleitet und anschließend detektiert. Der Monochromator zerlegt dabei die Strahlung in Analysenlinien des jeweiligen Spektrums, die auf einen Photomultiplier im Detektor zur Verstärkung des Signals geworfen und detektiert werden. Dabei wird detektiert wie viel des eingestrahnten Lichts von der Probe absorbiert wurde.

Die Methode der AAS wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um den Kupfergehalt der Proben zu bestimmen, die mittels der „Click“-Chemie hergestellt worden sind. Dazu wurden die Silica-Nanopartikel zunächst mit einem Totalaufschluss für Böden aufgelöst, indem 20 mg der Nanopartikel in 3 mL Salpetersäure (68 %), 2 mL Salzsäure (36 %) und 0.5 mL Flusssäure (50 %) suspendiert wurden. Die Suspension wurde dann in einem Mikrowellensystem des Typs MicroPREP 1500 (Terminal 640) der Firma MICROWAVE LABORATORY SYSTEMS (MLS) GmbH für sechs Minuten bei 1000 Watt auf 160 °C erhitzt. Anschließend wurde für vier Minuten bei 1000 Watt auf 210 °C erhitzt. Danach wurde die Suspension für 20 Minuten bei 210 °C und 700 Watt behandelt und zum Schluss für 25 Minuten belüftet. Die Steuerung der Mikrowelle erfolgte mit der Steuersoftware easyControl (ATC-CE-400 Automatische Temperaturkontrolle). Die erhaltenden Lösungen wurden auf 15 mL mit Wasser aufgefüllt. Von diesen verdünnten Lösungen wurden 220 μ L entnommen und wiederum auf 30 mL mit Wasser aufgefüllt und anschließend mit einem Graphitrohr-AAS des Typs Solaar MkII MQZ der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC von STELLA KITTEL vermessen. Zur Auswertung wurde eine Kalibrationsreihe mit folgenden Kupfer-Konzentrationen angesetzt und vermessen: 0.15 ppm, 0.125 ppm, 0.1 ppm, 0.075 ppm, 0.05 ppm und 0.025 ppm.

3.12 Zellkulturexperimente

Die Zellkulturexperimente dieser Arbeit wurden an der Universität für Bodenkultur in Wien von ANNE NEUMANN und CHRISTINE STRAUß aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. KASPER und am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover von STEFANIE BÖHM

aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. SCHEPER durchgeführt. Dabei wurden an den Nanopartikeln nur statische Kultivierungen vorgenommen, während die Silica-Collagen-Komposit-Materialien sowohl statisch als auch dynamisch kultiviert wurden. Bei den statischen Kultivierungen der Silica-Nanopartikel wurde die Toxizität der Materialien gegenüber HepG2-Zellen, PC-12-Zellen und immortalisierte Schwann-Zellen (ISC) getestet, während die Collagen-Materialien gegenüber HepG2-Zellen, NIH 3T3-Zellen und adMSC-Zellen getestet wurden. Dafür wurde das experimentelle Zubehör zunächst entweder durch autoklavieren oder durch Isopropanol (70 %) sterilisiert. Die Kultivierungsmedien wurden ebenfalls autoklaviert oder steril gefiltert. Von den Silica-Nanopartikeln wurden zunächst Stocklösungen hergestellt, die für zwei Stunden im Ultraschallbad behandelt worden sind. Die Lösungen wurden 15 Minuten stehen gelassen, um aggregierte Nanopartikel absetzen zu lassen. Vom Überstand wurde 1 mL entnommen und für die Zellkultur als Stocklösung verwendet. Die Konzentration der Nanopartikel variierte bei den Stocklösungen zwischen 81 mg und 163 mg pro 1.5 mL Wasser für die Nanopartikel vom Typ MCM-41 und zwischen 47 mg und 99 mg in 1 mL PBS für die CMS-Nanopartikel. Eine genaue Konzentration der jeweiligen Nanopartikelsuspensionen kann dem Anhang entnommen werden. Die Stocklösungen wurden für eine Stunde unter UV-Licht sterilisiert und für die Kultivierung auf 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm und 10 ppm verdünnt. Die Silica-Collagen-Komposit-Materialien wurden ebenfalls für eine Stunde unter UV-Licht sterilisiert und für die Kultivierung in eine 96-Well-Platte mit 10 mm Durchmesser gestanzt. Die verschiedenen Zellen (HepG2, PC-12, ISC, NIH 3T3, adMSC) wurden in α -MEM (Modified Eagle's Medium) mit 10 % FBS (foetal bovine serum) und 1 % Penicillin/Streptomycin angereichert. Anschließend wurden die HepG2 sowie PC-12-Zellen in 96-Well-Platten für die Kultivierungen mit den Silica-Nanopartikeln mit einer Zelldichte von 10000 Zellen in 200 μ L Medium pro Well und für die ISC mit einer Zelldichte von 3000 Zellen in 50 μ L Medium pro Well ausplattiert und für drei Tage kultiviert. Bei den Collagen-Materialien wurden für die statischen Kultivierungen die HepG2-Zellen mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen pro mL und die NIH 3T3 sowie adMSC-Zellen mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen pro mL ausplattiert und für drei Tage kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt und die Mediapartikelsuspensionen der oben aufgeführten Konzentrationen bzw. die Collagen-Materialien zugegeben. Dabei wurden für jede Kultivierung sechs parallele Experimente durchgeführt. Als Referenz wurden Zellen in Kulturmedium ohne Zusatz von Materialien getestet.

Für die dynamischen Zellkulturexperimente der Collagen-Materialien wurden diese ebenfalls unter UV-Licht für eine Stunde sterilisiert und mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt. Die verschiedenen Zellen wurden wie bereits beschrieben behandelt und in den gleichen Zelldichten wie bei den statischen Experimenten ausplattiert und für drei Tage kultiviert. Nach dieser Kultivierung wurden die Zellen in eine Durchflusskammer überführt. Des Weiteren wurden 5 mL des Mediums in den Kanal gegeben sowie 35 mL ins Mediumreservoir. Die Proben wurden in 10 mL der Zelllösungen bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert. Nach einer Stunde wurde Zellkulturmedium hinzugefügt und die

Proben über Nacht unter statischen Bedingungen kultiviert, um eine Zellanlagerung zu erreichen. Anschließend wurde die dynamische Kultivierung über zwei Tage in einem Durchflussbioreaktor mit 40 mL Medium für vier Proben durchgeführt.

3.12.1 Zellviabilität (MTT-Test)

Der MTT-Test, mit dem die Aktivität und somit die Viabilität von Zellen bestimmt werden kann, wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um die Materialien auf eine mögliche Toxizität gegenüber verschiedenen Zellen zu testen. Der Test basiert dabei auf der Reduktion des wasserlöslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch Mitochondrien lebender Eukaryotenzellen in einen wasserunlöslichen, blauen Formazankomplex.^[151,152] Dieser Prozess findet nur durch aktive und somit lebende Zellen statt, also nicht durch abgestorbene. Dabei hängt das erhaltende Signal von der Aktivität der Zellen ab und gibt daher Auskunft über die Viabilität der Zellen und somit der Zellverträglichkeit gegenüber den getesteten Materialien.^[151] Das MTT dringt dabei in die Zellen ein, wo der Tetrazoliumring aufgebrochen und in das Formazan umgewandelt wird (s. Abb. 3-6).^[151-153]

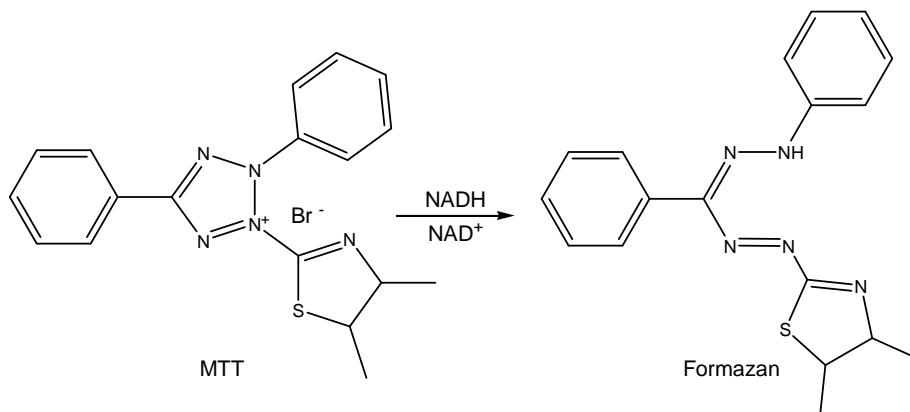


Abb. 3-6: Reduktion des gelblichen MTT durch mitochondriale Dehydrogenase aktiver Zellen in das Wasser unlösliche blaue Formazan, das bei 570 nm detektiert werden kann.^[151,152]

Aufgrund der Wasserunlöslichkeit des Formazans, bilden sich Formazan-Kristalle in den Zellen, die durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) in Lösung gehen. Die Konzentration des blauen Formazans kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm detektiert werden.^[151,152]

Die Viabilität der HepG2 sowie der PC-12-Zellen bei der Kultivierung der Silica-Nanopartikel wurde 5 Tage nach Zugabe der Materialien getestet. Bei den ISC-Zellen erfolgten die Kultivierungen bis zu zwei Wochen, wobei an verschiedenen Tagen die Viabilität der Zellen bestimmt wurde. Bei den dynamischen Zellkulturexperimenten mit den Collagen-Materialien wurde die Viabilität der Zellen nach zwei Tagen Kultivierung bestimmt. Zur Bestimmung der Viabilität wurde nach der Inkubation das Medium entfernt, anschließend 110 µL einer MTT-Lösung (50 mg/mL in H₂O) zugegeben und für vier Stunden bei 37 °C und 5 %

Kohlenstoffdioxid inkubiert. Dann wurden 90 μL einer SDS (sodium dodecyl sulphate) Lösung (5 % (w/v) in 0.01 M Salzsäure) zugegeben und für weitere 14 Stunden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert. Die Absorption des Formazans wurde mit einem Microplate-reader der Firma BIORAD LABORATORIES GmbH bei einer Wellenlänge von 570 nm ausgelesen.

3.12.2 Zelladhäsion (DAPI Färbung)

Die Zelladhäsion ist eine Methode, um Zellkerne durch fluoreszierende Farbstoffe sichtbar zu machen, wobei es zu einer Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes im Zellkern kommt. In dieser Arbeit wurde die DAPI-Färbung verwendet. Bei DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol) handelt es sich um ein Fluoreszenzmolekül, das an DNA von Zellen bindet und als DNA-DAPI-Komplex blaues Licht emittiert, wenn es mit ultraviolettem Licht bestrahlt wird.^[154,155] Dadurch kann der Zellkern sichtbar gemacht werden.

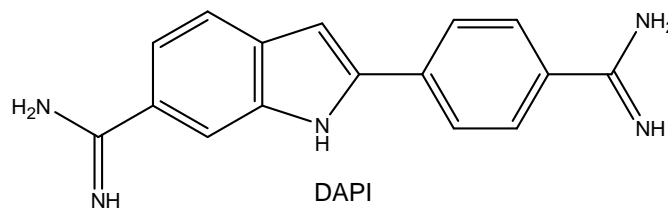


Abb. 3-7: Molekülstruktur von DAPI.

Um die fixierten Zellen mit DAPI anzufärben, wurden diese zunächst mit 1 mL PBS gewaschen. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss mit einer DAPI-Färbelösung (2 μL Stammlösung pro 1 mL Färbepuffer) inkubiert und die Zellen zweimal mit 2 mL PBS gewaschen, damit der Hintergrund entfärbt wird. Die Auswertung der Zellen erfolgte unter einem Mikroskop bei einer Wellenlänge von 460 nm.

3.13 Färbung mit Endosialidase-Allophycocyanin (Endo-APC)

Zur weiteren Überprüfung, ob Polysialinsäure an die Oberfläche von Silica-Nanopartikel angebunden wurde, wurden mit PolySia-funktionalisierte Nanopartikel mit dem inaktiven Endo-Allophycocyanin (Endo-APC) am Institut für Zelluläre Chemie von Dr. FRIEDRICH FREIBERGER aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. GERARDY-SCHAHN umgesetzt. Die Endo-APC bindet spezifisch an PolySia, wobei diese nicht zerstört wird. Die Nanopartikel können bei erfolgreicher Anbindung von PolySia unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Zur Testung wurden mit PolySia beschichtete Silica-Nanopartikel vom Typ MCM-41 (extrahiert und calciniert) verwendet. Als Negativkontrolle wurden unfunktionalisierte MCM-41-Nanopartikel getestet. Dazu wurden 10 mg der Nanopartikel in 100 μL PBS suspendiert, gevortext und für 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die

Suspension für 15 Minuten stehen gelassen, so dass aggregierte Partikel absinken konnten. Danach wurden 50 μL vom trüben Überstand abgenommen und mit 830 μL PBS verdünnt. Zu dieser Suspension wurden 15 μL bovines Serumalbumin ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) und 5 μL Endo-APC ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) gegeben. Anschließend wurde im Dunkeln für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 μL der Probe entnommen, der Rest für eine Minute zentrifugiert und von dem Überstand ebenfalls 10 μL Probe entnommen. Die abzentrifugierten Nanopartikel wurden wieder in 1 mL PBS resuspendiert und davon wurden ebenfalls 10 μL entnommen. Die Proben wurden anschließend mit einem Axiovert 200M Mikroskop der Firma ZEISS untersucht. Dazu wurde ein Cy5 Filter verwendet. Die Extinktion lag bei 640 nm und die Emission bei 690 nm.

3.14 *In vitro*-Implantation von funktionalisierten Silica-Nanopartikeln

Die *in vitro*-Experimente wurden von JENNIFER METZEN aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. KIRSTEN HAASERT-TALINI am Institut für Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. C. GROTHE) durchgeführt. Es wurden kolloidale mesoporöse Silica-Nanopartikel (CMS), die zum einen nur mit Polysialinsäure unter Standardbedingungen und zum anderen mit Polysialinsäure und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin (angebunden über das Linker-System unter Standardbedingungen) funktionalisiert sind, getestet. Dafür wurden die Nanopartikel in physiologischer Kochsalzlösung dispergiert (mit einer Konzentration von 10.000 ppm) und für 30 Minuten unter UV-Licht sterilisiert. Diese Suspensionen wurden in den *N. ischiadicus* Nerven (rechts und links) zweier adulter Ratten injiziert, an denen zuvor im proximalen sowie distalen Abschnitt ein sogenannter „Crush“ durchgeführt wurde, wobei der Nerv mit einer Pinzette für ein paar Sekunden gequetscht wird. An der Stelle des gequetschten Nerven wurde die äußere Hülle, das Epineurium, mit einer Mikroschere gefenstert. Die Suspensionen wurden anschließend mit einer HAMILTON-Spritze in den Nerven injiziert (siehe Abb. 3-8), das entstehende Loch im Epineurium mit einem nicht resorbierbaren Polyamid-Faden (Stärke 9-0) genäht und jeder Nerv in zwei Stücke geschnitten (distal und proximal). Zur Kultivierung wurden die Nerven in ein mit Prädegenerationsmedium gefülltes Well gegeben und für sieben Tage bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid kultiviert.

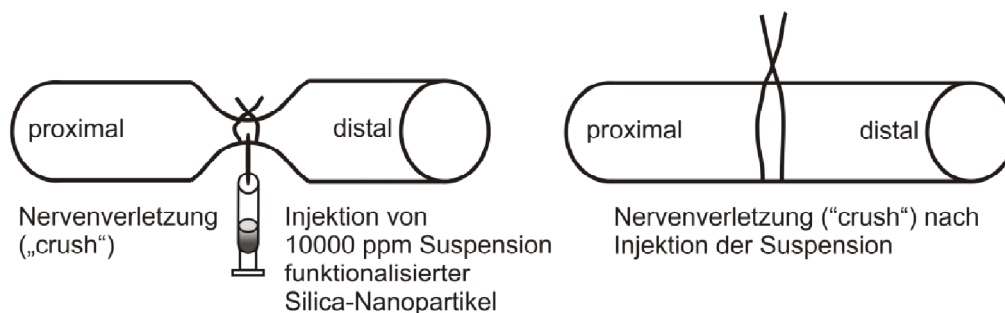


Abb. 3-8: Schematische Darstellung der *in vitro*-Nervenimplantation von funktionalisierten Silica-Nanopartikeln in einem Nerven, bei dem zuvor ein „Crush“ durchgeführt wurde.^[nach 156]

Zur Vorbereitung der Nerven für den Cryostat-Schnitt wurden diese nach dem Entnehmen aus dem Kultivierungsmedium in ein autoklaviertes Gefäß ohne Medium überführt und nativ in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zum Einbetten wurde das Einbettmedium Tissue-Tek[®] (SAKURA) in ein Aluminiumförmchen gegeben und mit flüssigem Stickstoff auf einen Bleiblock angefroren. Dann wurde das Nervenstück darauf gegeben, mit Tissue-Tek[®] bedeckt und durchgefroren. Anschließend wurden die eingebetteten Nerven für mindestens eine Nacht bei -80 °C gelagert.

Vor dem Schneiden der Nerven werden diese zunächst für zwei bis drei Stunden in einem Gefrierfach bei -20 °C gelagert, da sonst das Einbettmedium zu spröde ist. Anschließend wurden mit einem Cryostaten Leica CM 3050 S jeweils Quer- und Längsschnitte in einer Dicke von 12 Mikrometern angefertigt.

Von der Probe, in der die multifunktionalen Nanopartikel injiziert wurden, wurden Fluoreszenz-Aufnahmen unter einem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX60 der Firma OLYMPUS OPTICAL Co. GmbH mit der Kamera ColorView aufgenommen. Dazu wurden die Nervenschnitte zum einen mit EndosialidaseN-APC (EndoN-APC) und zum anderen mit PolySia-Antikörpern angefärbt. Als Filter wurden ein Cy5 (grüne Fluoreszenz) für die Eigenfluoreszenz der Endo-APC und ein Cy2 (rote Fluoreszenz) für die Fluoreszenz des Alexa 555, das als Sekundär-Antikörper bei der PolySia-Antikörper-Färbung verwendet wurde, eingesetzt. Des Weiteren wurden Überlagerungen der beiden Fluoreszenzen aufgenommen.

4. Experimenteller Teil

Im folgenden Teil dieser Arbeit werden zunächst die Synthesen verschiedener nanoporöser Silica-Nanopartikel (NPSNPs) vorgestellt. Anschließend wird auf die Anbindung von Polysialinsäure (PolySia) sowie von Fluoreszenzfarbstoffen mittels eines Linker-Systems bestehend aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Bernsteinsäureanhydrid (BSA) eingegangen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die von ISMET BICE (aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. SCHEPER), vom Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, hergestellte PolySia verwendet.^[157] Auch wird die Oberflächenfunktionalisierung mit einer Azid- bzw. Alkingruppe beschrieben, um die Nanopartikel „click“-fähig zu machen. Des Weiteren wird die Anbindung von „click“-fähiger PolySia sowie „click“-fähigen Fluoreszenzfarbstoffen mittels der „Click“-Reaktion nach HUISGEN beschrieben. Die dazu notwendige „click“-fähige PolySia wurde von Yi Su im Rahmen der Forschergruppe PolySia am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover (aus der Arbeitsgruppe von Dr. G. DRÄGER bei Prof. Dr. A. KIRSCHNING) synthetisiert.^[97] Außerdem werden verschiedene Wege zur Multifunktionalisierung der Nanopartikel mit Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoffen aufgezeigt. Im letzten Teil wird die Synthese von Collagen-Silica-Komposit-Materialien beschrieben sowie deren Ausstattung mit PolySia. Eine Übersicht der verwendeten Chemikalien ist dem Anhang zu entnehmen.

4.1 Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Im folgenden Abschnitt werden die Synthesen verschiedener nanoporöser Silica-Nanopartikel (NPSNPs) beschrieben, die im Verlauf dieser Arbeit synthetisiert und für weitere Umsetzungen verwendet wurden.

4.1.1 Synthese von nanoskaligen MCM-41-Nanopartikeln

In dieser Arbeit wurden nanoskalige Silica-Nanopartikel vom Typ MCM-41 nach einer Synthesevorschrift von CAI et al. synthetisiert.^[67]

Dazu werden 800 mg Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) in 384 mL Wasser und 2.8 mL Natronlauge (2 M) gelöst. Anschließend werden 4 mL Tetraethoxysilan (TEOS) zur Lösung zugegeben und diese in einem geschlossenen Gefäß für zwei Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wird der entstandene, weiße Feststoff durch Filtration abgetrennt, mit Wasser neutral gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

Zum Entfernen des struktur-dirigierenden Agens (SDA) werden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen wird das SDA durch Calcination bei 550 °C über vier Stunden entfernt. Dabei wird eine Aufheizrate von 1 °C pro Minute eingestellt. Die zweite

Variante ist die Entfernung des SDA durch Extraktion. Dafür werden 500 mg der hergestellten Nanopartikel in einer Lösung aus 22.5 mL Ethanol und 2.5 mL konzentrierter Salzsäure für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird zentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

Einige der extrahierten Nanopartikel werden zusätzlich mit N,N-Dimethylformamid (DMF) gewaschen. Dazu werden 300 mg der Nanopartikel in 20 mL DMF dispergiert. Die Dispersion wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird zentrifugiert, die Nanopartikel dreimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

4.1.2 Synthese von kolloidalen mesoporösen Silica-Nanopartikeln

Die Synthese von kolloidalen mesoporösen Silica-Nanopartikeln (CMS) wurde nach einer Vorschrift von QIAO et al. durchgeführt.^[65]

Dazu werden zunächst 1.35 g CTAB in 32 mL Wasser, 5.7 mL Ethanol und 0.1 g Diethylamin (DEA) (oder 2.3 g Triethylamin (TEA)) gelöst. Die Lösung wird für 30 Minuten auf 60 °C oder 40 °C erhitzt. Anschließend werden 3.65 mL TEOS innerhalb von zwei Minuten zur Lösung zugetropft und diese für weitere zwei Stunden bei der entsprechenden Temperatur (60° oder 40 °C) gerührt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird zentrifugiert, die Nanopartikel mit Wasser und Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Die Entfernung des SDA erfolgt analog zu den beiden Verfahren, die beim MCM-41 verwendet wurden.

4.2 Anbindung über ein Linker-System aus APTES und Bernsteinsäureanhydrid

Zur Anbindung von Polysialinsäure (PolySia) und Fluoreszenzfarbstoffen an die Oberfläche von nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs) wurde ein Linker-System aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Bernsteinsäureanhydrid (BSA) verwendet. Die so funktionalisierten Nanopartikel wurden für weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf biomedizinische Applikationen im Bereich der Nervenregeneration untersucht. Auch wurde, durch Waschen der mit PolySia versehenen NPSNPs mit Wasser über definierte Zeiträume, die Stabilität der Anbindung der PolySia getestet. Um die PolySia über diese Anbindungsvariante an die Nanopartikel binden zu können, wurde zunächst eine reaktive Gruppe, wie zum Beispiel eine Aminfunktion, benötigt, die durch eine Deacetylierung eingeführt wurde. Des Weiteren wurde nach der Deacetylierung das Natriumsalz der PolySia gegen das Tetrabutylammonium-Ion (TBA-Ion) ausgetauscht, um die Löslichkeit der PolySia in organischen Lösemitteln wie Dichlormethan (DCM) zu erhöhen und somit die Anbindung über das Linker-System zu optimieren.

4.2.1 Deacetylierung der Polysialinsäure

Für die Deacetylierung der von ISMET BICE hergestellten PolySia, werden 4.8 g Natriumhydroxid in 7.8 mL Wasser gelöst und 120 mL Ethanol zugegeben. Anschließend werden 2 g PolySia zur Lösung gegeben und diese über Nacht auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird tropfenweise konzentrierte Salzsäure zugegeben bis ein pH-Wert zwischen 8 und 9 erreicht wird, bevor die Lösung am Rotationsverdampfer stark eingengt wird. Dann wird die Lösung filtriert, für einen Tag gegen pH 9 dialysiert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.^[97,158] Bis zur weiteren Verwendung wird die deacetylierte PolySia im Gefrierfach aufbewahrt. Der Syntheseweg ist in Abb. 4-1 dargestellt.

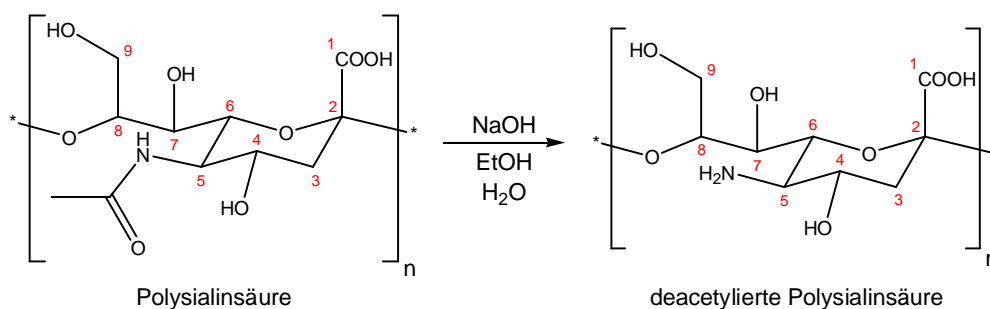


Abb. 4-1: Deacetylierung der von ISMET BICE hergestellten PolySia.^[97,158]

4.2.2 Tetrabutylammonium-Austausch

Um das Natriumsalz der PolySia gegen das Tetrabutylammonium-Ion auszutauschen, wurde die deacetylierte PolySia mit Tetrabutylammoniumbromid umgesetzt.^[97]

Dazu wird 1 g der deacetylierten Polysialinsäure in 100 mL einer 0.25 molaren Tetrabutylammoniumbromid-Lösung (TBABr) gelöst und für 24 Stunden gegen eine TBABr-Lösung (0.25 M) dialysiert. Anschließend wird für weitere 48 Stunden gegen Wasser dialysiert, das mittels Tetrabutylammoniumhydroxid auf einen pH-Wert zwischen 9 und 10 eingestellt wird. Die Lösung wird dann am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und bis zur weiteren Verwendung im Gefrierfach gelagert.

4.2.3 Anbindung von Polysialinsäure über das Linker-System

Die Anbindung der PolySia über ein Linker-System bestehend aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Bernsteinsäureanhydrid (BSA) erfolgt über drei Reaktionsschritte.

Für die Anbindung von APTES im ersten Schritt werden 500 mg der entsprechenden Nanopartikel in 20 mL Toluol dispergiert. Zu dieser Dispersion werden 125 μ L APTES (0.54 mmol) und 75 μ L 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) zugegeben und für zwei Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Dispersion wird zentrifugiert, die Nanopartikel

dreimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.^[159] Der Syntheseweg ist in Abb. 4-2 dargestellt.

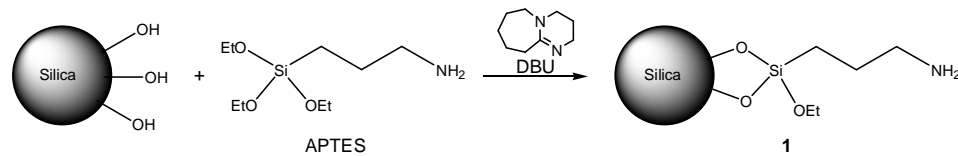


Abb. 4-2: Reaktion von APTES mit den Silanolgruppen an der Oberfläche von Silica-Nanopartikeln.

Im nachfolgenden Schritt wird Bernsteinsäureanhydrid (BSA) über die immobilisierte Aminofunktion des APTES an die Nanopartikel angebunden. Dafür werden 400 mg der mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel in 20 mL DMF dispergiert und 2 g BSA zugegeben. Die Dispersion wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird zentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.^[52] Der Syntheseweg ist in Abb. 4-3 aufgezeigt.

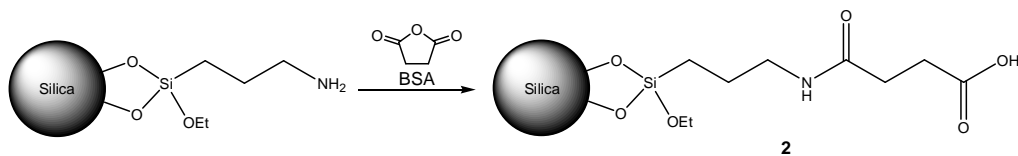


Abb. 4-3: Anbindung von Bernsteinsäureanhydrid über die Aminofunktion der mit APTES funktionalisierten Silica-Nanopartikel.

Im letzten Schritt der Reaktionssequenz wird das Tetrabutylammonium-Salz (TBA) der deacetylierten Polysialinsäure über die freien Carboxylgruppen des gebundenen BSA unter Bildung einer Amidbindung an die Silica-Nanopartikel gebunden. Dafür werden 250 mg der mit APTES und BSA-funktionalisierten Nanopartikel in 20 mL Dichlormethan (DCM) dispergiert. Dann werden 0.25 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zur Dispersion gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 182 mg TBA-PolySia zur Dispersion gegeben und für weitere 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 4-4). Die Nanopartikel werden zentrifugiert, mit Ethanol sowie Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

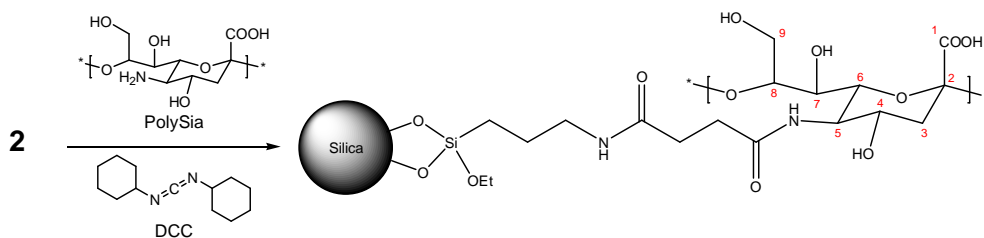


Abb. 4-4: Anbindung von TBA-PolySia über ein Linker-System aus APTES und BSA durch Bildung einer Amidbindung.

Für die Untersuchung des Einflusses der Hydrolyse auf die Ergebnisse des TBA- bzw. Purpald®-Tests wurden die eingesetzten Mengen an APTES im ersten Reaktionsschritt variiert, um unterschiedliche Mengen von PolySia an die Oberfläche zu binden und deren Auswirkung auf das Test-Ergebnis zu erhalten.^[147] Dazu wurden APTES-Mengen von 0 mmol (0 μL), 0.43 mmol (100 μL) und 0.54 mmol (125 μL) verwendet.

Des Weiteren wurden Nanopartikel, die mit Polysialinsäure funktionalisiert worden sind, auf ihre Stabilität gegenüber wässrigen Lösungen getestet. Dazu werden etwa 120 mg der mit PolySia beschichteten Nanopartikel in Lösungen aus entweder 2 mL Wasser, gesättigter Natriumchlorid-Lösung oder PBS dispergiert und für bestimmte Zeiten (1, 2, 3 und 5 h sowie 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 14 d) geschüttelt. Nach Ablauf der Zeiten werden die Nanopartikel zentrifugiert, im Vakuum getrocknet und mittels des TBA-Tests auf die immobilisierten Mengen an PolySia untersucht.

4.2.4 Reacetylierung der angebundenen Polysialinsäure

Nach der Anbindung der PolySia an die Silica-Nanopartikel, sollen die Aminogruppen, die nicht mit den freien Carboxylgruppen des Linker-Systems an der Oberfläche der Nanopartikel reagiert haben, mit Essigsäureanhydrid reacetyliert werden. Da in dieser Reaktion auch die Alkoholgruppen der PolySia angegriffen werden, müssen diese anschließend in einer weiteren Reaktion wieder hergestellt werden.

Für die Reacetylierung werden 300 mg der mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel in 20 mL DCM dispergiert. Zu dieser Dispersion werden 500 μL Essigsäureanhydrid (Et_2O) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.^[97] Anschließend wird zentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Eine schematische Darstellung der Reacetylierung ist in Abb. 4-5 aufgezeigt.

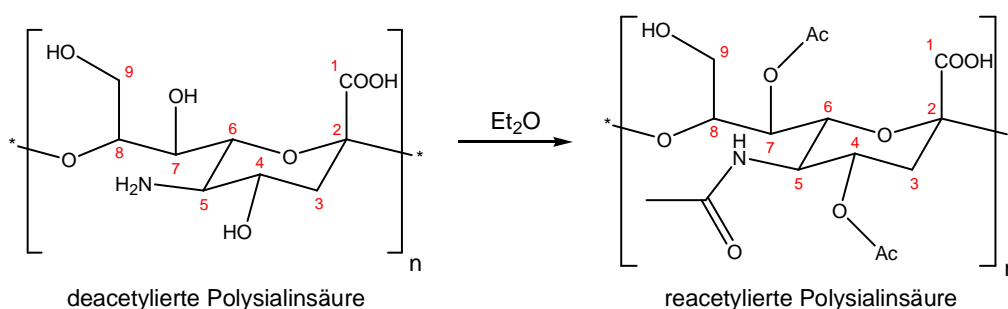


Abb. 4-5: Reacetylierung der restlichen Aminogruppen der PolySia, die nicht mit den freien Carboxylgruppen des Linker-Systems reagiert haben, mit Essigsäureanhydrid.

Im zweiten Schritt werden 100 mg der reacetylierten Nanopartikel in 10 mL Wasser dispergiert und 200 μL Natronlauge (1 M) hinzugegeben (Abb. 4-6). Die Dispersion wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die Nanopartikel abzentrifugiert, mit Ethanol sowie Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.^[97]

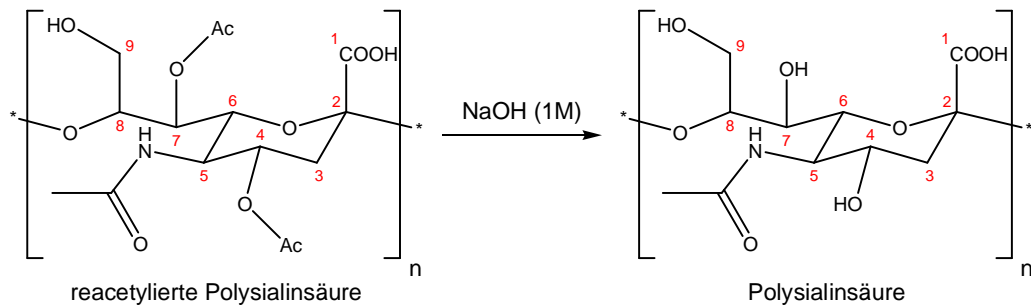


Abb. 4-6: Entfernung der Esterbindungen, zur Wiederherstellung der Polysialinsäure.

4.2.5 Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen über das Linker-System

Für die Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffes über das Linker-System wurde das kommerziell erhältliche Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin (s. Abb. 4-7) verwendet, das über eine Aminogruppe an die freien Carboxylgruppen des BSA gebunden werden kann.

Für die Umsetzung werden 50 mg der mit APTES und BSA-funktionalisierten Nanopartikel in 10 mL DCM dispergiert. Zu dieser Dispersion werden 0.05 g DCC und 100 μL Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin (mit einer Konzentration von $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die Nanopartikel abzentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

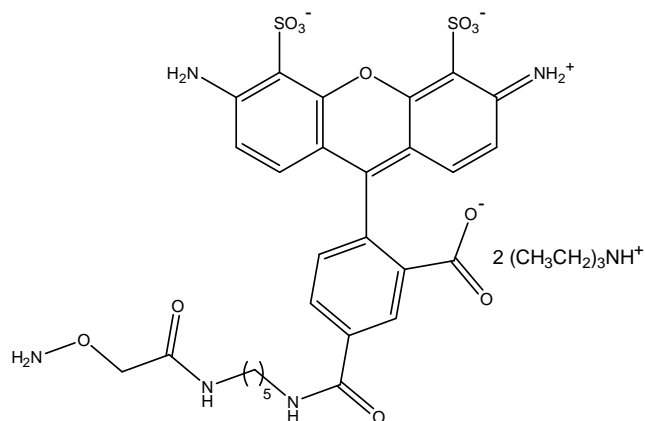


Abb. 4-7: Molekülstruktur des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin.

4.3 Alkin- bzw. Azidfunktionalisierung von Silica-Nanopartikeln

Um die Silica-Nanopartikel für die kupferkatalysierte „Click“-Reaktion nach HUISGEN „click“-fähig zu machen, müssen diese zunächst entweder mit einer Alkin- oder einer Azidgruppe funktionalisiert werden. Beide Funktionalisierungen erfolgen über zwei Reaktionsschritte, wobei für die Alkinfunktionalisierung die mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel aus dem Abschnitt 4.2.3 verwendet werden.

Für die Alkinfunktionalisierung der Nanopartikel werden 250 mg der mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel in 12 mL DCM dispergiert. Zu dieser Dispersion werden

0.55 g DCC und 164 μL Propiolsäure gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.^[160] Die gelblichen Nanopartikel werden zentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Der Syntheseweg ist in Abb. 4-8 abgebildet.

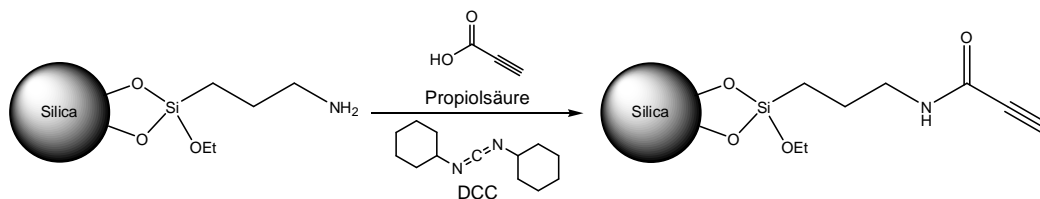


Abb. 4-8: Umsetzung der mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel mit Propiolsäure, um die Oberfläche mit einer Alkinfunktion für die „Click“-Reaktion auszustatten.

Für die Azid-Immobilisierung wird im ersten Schritt 11-Bromoundecyltrimethoxysilan (BUTMS) über die Silanolgruppen an die Oberfläche gebunden. Hierfür werden 500 mg der entsprechenden Silica-Nanopartikel in 20 mL Toluol dispergiert. Zu der Dispersion werden 125 μL BUTMS und 75 μL DBU gegeben. Es wird für zwei Stunden bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird zentrifugiert, die Nanopartikel dreimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.^[72] In Abb. 4-9 ist die Synthese veranschaulicht dargestellt.

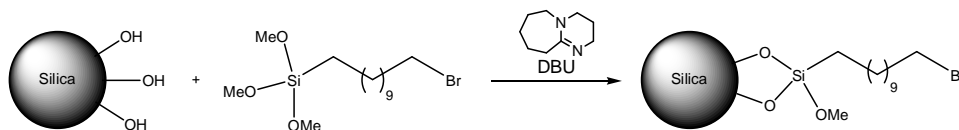


Abb. 4-9: Anbindung von BUTMS über die Silanolgruppen der Silica-Nanopartikel.

Im zweiten Schritt werden 250 mg der mit BUTMS-funktionalisierten Nanopartikel in 10 mL einer mit Natriumazid gesättigten DMF-Lösung dispergiert und für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Nanopartikel werden mittels Zentrifugation abgetrennt, dreimal mit Wasser gewaschen und bei 60 °C getrocknet.^[72]

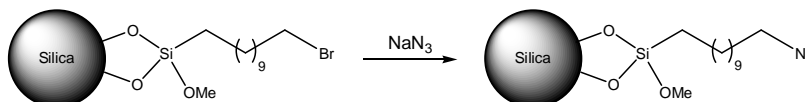


Abb. 4-10: Azidfunktionalisierung über den BUTMS-Linker.

4.4 Kupferkatalysierte „Click“-Reaktionen nach HUISGEN

Als alternative Anbindungsvariante zum Linker-System, wurden die Polysialinsäure bzw. die Fluoreszenzfarbstoffe in dieser Arbeit über die „Click“-Reaktion nach HUISGEN an die Oberfläche der Nanopartikel angebonden, um weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf die Verwendung als Biomaterial durchzuführen und Unterschiede in der Anbindungsart

aufzuzeigen. Dazu wurde von Yi Su aus dem Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover (aus der Arbeitsgruppe von Dr. G. DRÄGER bei Prof. Dr. A. KIRSCHNING) „click“-fähige PolySia synthetisiert, die in dieser Arbeit zur Anbindung an die Oberfläche verwendet wurde.^[97] Des Weiteren wurde versucht, auf den Einsatz von Kupfer als Katalysator zu verzichten, indem an die PolySia eine funktionelle Gruppe von Yi Su eingeführt wurde, die in der Lage ist ohne Kupfer über eine Ringöffnungsreaktion an die Azidgruppen zu binden.^[97] Eine Veranschaulichung der „Click“-Reaktion ist in Abb. 4-11 dargestellt.

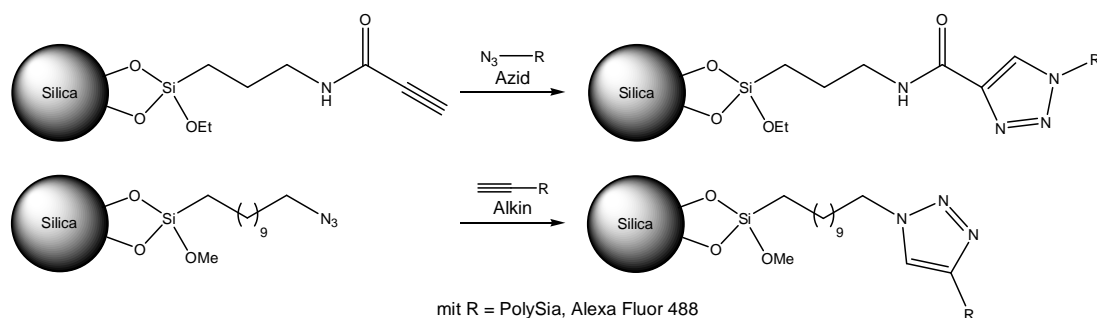


Abb. 4-11: „Click“-Reaktionen mit Alkin- bzw. Azidfunktionalisierten Nanopartikeln, die mit der entgegengesetzten Gruppe unter Bildung eines 1,2,3-Triazols reagieren. Als Reste können PolySia oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.

4.4.1 Anbindung von Polysialinsäure über die „Click“-Chemie

Für die Anbindung der Polysialinsäure mittels „Click“-Chemie wurde diese von Yi Su am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover (aus der Arbeitsgruppe von Dr. G. DRÄGER bei Prof. Dr. A. KIRSCHNING) „click“-fähig gemacht. Das heißt, dass die PolySia mit einer Alkin- oder Azidgruppe versehen wurde.^[97] Die Molekülstrukturen, der so modifizierten PolySia, sind in Abb. 4-12 dargestellt.

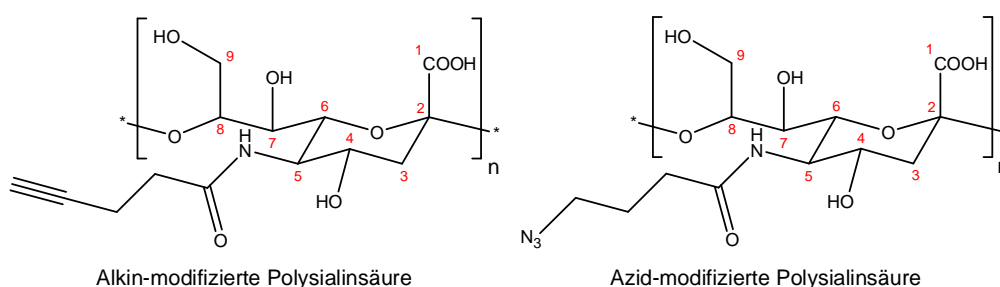


Abb. 4-12: Molekülstrukturen der mit Alkin-modifizierten PolySia (links, DG: 80%) und der mit Azid-modifizierten PolySia (rechts, DG: 80%), die in der „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.

Für die „Click“-Reaktionen werden 300 mg der mit Alkin- bzw. Azid-funktionalisierten Nanopartikel in 20 mL Ethanol dispergiert. Zu dieser Dispersion wird 30 mg der entgegengesetzt modifizierten PolySia (Alkin: 0.086 mmol; Azid: 0.081 mmol) gegeben. Des Weiteren werden 12 mg Kupfersulfat-Pentahydrat und 18 mg Natriumascorbat in je 2 mL

Wasser gelöst und zur Dispersion gegeben. Die Lösung wird in einem dicht geschlossenen Gefäß für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltenen bläulich, grünlich oder gelblich gefärbten Nanopartikel werden mittels Zentrifugation von der Lösung getrennt, anschließend dreimal mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.^[161]

4.4.2 Kupfer-freie Anbindung von Polysialinsäure über die „Click“-Chemie

Bei der Kupfer-freien „Click“-Reaktion wurde ein alkynyl-analoges Derivat der PolySia verwendet, dass von Yi SU am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover (aus der Arbeitsgruppe von Dr. G. DRÄGER bei Prof. Dr. A. KIRSCHNING) synthetisiert wurde und das ohne den Zusatz von Kupfer unter Öffnung des Rings mit einer Azidfunktion reagieren kann.^[97] In Abb. 4-13 sind die modifizierten und in dieser Arbeit verwendeten alkynyl-analogen Polysialinsäuren dargestellt.

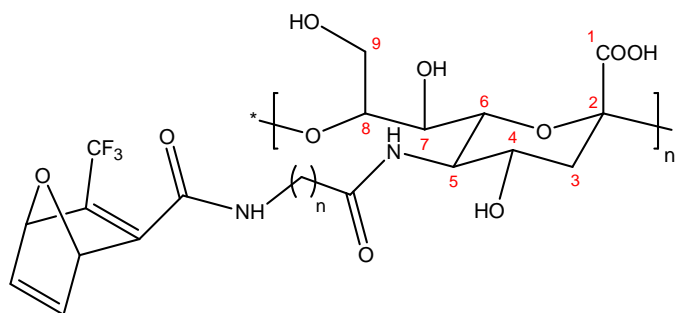


Abb. 4-13: Molekülstruktur der alkynyl-analogen PolySia, die in einer Kupfer-freien „Click“-Reaktion eingesetzt werden kann, wobei in dieser Arbeit Derivate mit $n = 3$ und $n = 5$ verwendet wurden.

Für die Reaktion werden 200 mg der mit Azid-funktionalisierten Silica-Nanopartikel in 20 mL Wasser dispergiert und 50 mg (für $n = 5$, 0.1 mmol) bzw. 60 mg (für $n = 3$, 0.12 mmol) der alkynyl-analogen PolySia hinzugegeben. Die Dispersionen werden für 48 Stunden bei Raumtemperatur in einem dicht geschlossenen Gefäß gerührt. Die erhaltenen farblosen Nanopartikel werden zentrifugiert, mit Ethanol und Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4.4.3 Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen über die „Click“-Chemie

Für die „Click“-Reaktionen nach HUISGEN mit Fluoreszenzfarbstoffen, wurde der kommerziell erhältliche Farbstoff Alexa Fluor[®] 488 mit einer Alkin- bzw. Azidgruppe verwendet, der in Abb. 4-14 dargestellt ist.

Für die Immobilisierung werden 200 mg der mit Azid- bzw. Alkinfunktionalisierten Nanopartikel in 40 mL Ethanol dispergiert. Zu dieser Dispersion werden 400 μL Alexa Fluor[®] 488-Alkin mit einer Konzentration von $1.45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. -Azid mit einer Konzentration von $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gegeben. Des Weiteren werden 8 mg Kupfersulfat-Pentahydrat und 12 mg

Natriumascorbat in je 2 mL Wasser gelöst und zur Dispersion gegeben, die anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einem fest geschlossenen Gefäß gerührt wird. Die so erhaltenen farbigen Nanopartikel werden zentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

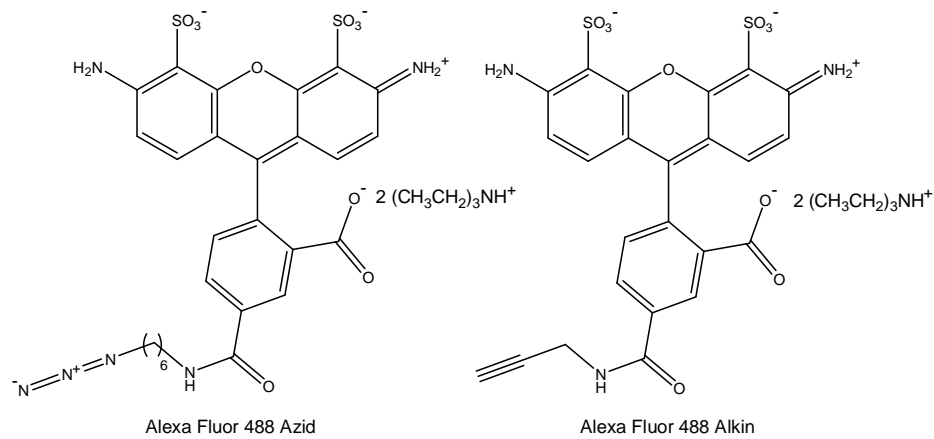


Abb. 4-14: Molekülstrukturen von Alexa Fluor[®] 488-Azid (links) und -Alkin (rechts).

4.5 Multifunktionalisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Polysialinsäure

Des Weiteren wurde versucht, Wege aufzuzeigen, wie Silica-Nanopartikel mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert werden können. Dazu wurden die verschiedenen bereits beschriebenen Anbindungsvarianten verwendet und miteinander kombiniert. Zum einen wurden die Nanopartikel mit einer Kombination aus dem Linker-System (APTES und BSA) und der „Click“-Reaktion multifunktionalisiert, wobei die PolySia über das Linker-System und die Fluoreszenzfarbstoffe über die „Click“-Chemie angebunden worden sind. Für diese Variante wurden die Nanopartikel bereits im zweiten Reaktionsschritt mit BSA und Propiolsäure multifunktionell ausgestattet. Zum anderen wurde ausschließlich die „Click“-Chemie sowie ausschließlich das Linker-System verwendet, so dass die Multifunktionalisierung erst im dritten Reaktionsschritt erfolgte. Für die Synthesen mit der „Click“-Chemie wurden die „click“-fähigen Polysialinsäuren sowie Alexa Fluor[®] 488 mit einer Azid- oder Alkingruppe verwendet. Für die Anbindung *via* des Linker-Systems wurde die deacetylierte TBA-PolySia sowie Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin genutzt. Die Anbindungen wurden des Weiteren optimiert, so dass eine möglichst große Menge an PolySia angebunden werden kann und die Fluoreszenz gerade so intensiv ist, dass sie beobachtet werden kann, ohne dass Quentsching auftritt.

4.5.1 Multifunktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid und Propiolsäure

Um die Nanopartikel mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff in einer Kombination aus der „Click“-Chemie und dem Linker-System zu funktionalisieren, müssen zunächst BSA und Propiolsäure an die Nanopartikel angebunden und diese Anbindung optimiert werden. Dazu werden die aus Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Nanopartikel verwendet, die mit APTES funktionalisiert wurden.

400 mg der mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel werden in 20 mL DCM dispergiert. Zu dieser Dispersion werden 0.17 g DCC, 50 μ L Propiolsäure und 2 g BSA zugegeben. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Nanopartikel werden abzentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Der Syntheseweg ist in Abb. 4-15 dargestellt.

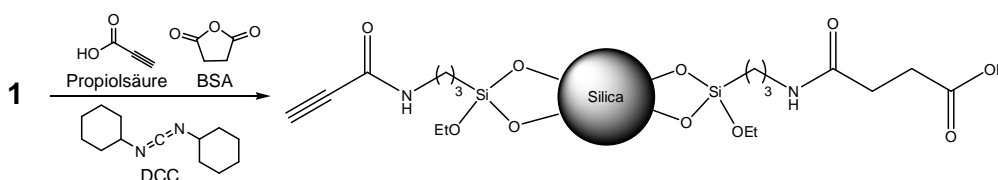


Abb. 4-15: Multifunktionalisierung der Silica-Nanopartikel mit BSA und Propiolsäure zur weiteren Verwendung in einer Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie.

Um die Anbindung der Multifunktionalisierung von BSA und Propiolsäure zu optimieren, wurde zum einen das Lösemittel variiert, da die beiden Chemikalien in einzelnen Reaktionen mit verschiedenen Lösemitteln an die Oberfläche angebunden werden. Daher wurde an Stelle von DCM auch 20 mL DMF sowie ein Lösemittel-Gemisch aus 10 mL DCM und 10 mL DMF verwendet, um die Auswirkung auf die Anbindung zu testen. Des Weiteren wurden die Zeiten der Zugabe verändert. Dabei wurde einmal zuerst die Propiolsäure an die Nanopartikel wie in Abschnitt 4.3 beschrieben an die Oberfläche gebunden (0.17 g DCC und 50 μ L Propiolsäure in 20 mL DCM) und diese in einem zweiten Schritt dann mit BSA (2 g BSA in 20 mL DMF) umgesetzt. Zum anderen wurde die Variation der Zugabe umgekehrt durchgeführt, wobei die Nanopartikel zunächst mit BSA (2 g BSA in 20 mL DMF) und anschließend in einer zweiten Reaktion mit Propiolsäure (50 μ L Propiolsäure und 0.17 g DCC in 20 mL DCM) funktionalisiert wurden.

4.5.2 Anbindung über Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie

Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoff wurden multifunktionell an die Oberfläche von Silica-Nanopartikeln angebunden, indem eine Kombination aus dem Linker-System und der „Click“-Chemie verwendet wurde. Dabei wurde die deacetylierte TBA-PolySia über das Linker-System gebunden, während der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 488-Azid über die „Click“-Reaktion angebunden wurde.

Für die Multifunktionalisierung werden 250 mg der mit BSA und Propiolsäure-funktionalisierten Nanopartikel in 20 mL DCM dispergiert und 0.25 g DCC zugegeben. Die Dispersion wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 182 mg TBA-PolySia zur Dispersion gegeben und diese für weitere 24 Stunden gerührt. Dann werden 500 μL Alexa Fluor[®] 488-Azid mit einer Konzentration von $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sowie 10 mg Kupfersulfat-Pentahydrat und 15 mg Natriumascorbat gelöst in je 2 mL Wasser zur Dispersion gegeben. Es wird für weitere 24 Stunden gerührt (im folgenden Variante A genannt). Dann wird zentrifugiert, die Nanopartikel mit Wasser und Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Diese angegebenen Werte stellen die Standardbedingungen dar, da versucht wurde die Synthese durch Änderung verschiedener Parameter zu optimieren.

Zur Optimierung der Anbindung wurden folgende Parameter variiert: die Reihenfolge der Zugabe, die Menge an APTES, BSA, Propiolsäure, PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff, das Lösemittel und die Zugabe von Kupfer.

Um die optimalen Bedingungen für die Reihenfolge der Zugabe der Chemikalien zu finden, wurde diese zunächst variiert, während alle anderen Bedingungen konstant gehalten wurden. Dabei wurden vier weitere Möglichkeiten ausgetestet. Zum einen wurde der Fluoreszenzfarbstoff als erstes zur Dispersion gegeben und nach 24 Stunden rühren bei Raumtemperatur die PolySia. Anschließend wurde für weitere 48 Stunden gerührt (Variante B). Zum anderen wurden PolySia und Fluoreszenzfarbstoff gleichzeitig zur Dispersion gegeben und diese für 48 Stunden gerührt (Variante C). Eine weitere Variante war, dass zunächst die PolySia in einer ersten Reaktion wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben an die Nanopartikel angebunden und erst nach dem Trocknen eine zweite Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt wurde (Variante D). Diese Variante wurde dann nochmals in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt, das heißt, dass zuerst die Nanopartikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff funktionalisiert wurden und nach dem Trocknen in einer zweiten Reaktion mit PolySia (Variante E). Bei diesen Synthesevarianten wurden nur bei den Methoden, bei denen die Nanopartikel zwischen den Reaktionen getrocknet wurden, farbige Nanopartikel erhalten.

Des Weiteren wurde im ersten Schritt die Menge an zugegebenem APTES variiert, um zu untersuchen, ob die Silanmenge sich auf die Multifunktionalisierung auswirkt. Dazu wurden APTES-Mengen von 0 mmol (0 μL), 0.22 mmol (50 μL), 0.43 mmol (100 μL) und 0.54 mmol (125 μL) eingesetzt, da bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass eine geringere Menge an APTES die angebundene Menge an PolySia erhöht.^[147]

Im zweiten Schritt wurde zum einen die Menge an Bernsteinsäureanhydrid und zum anderen die Menge an Propiolsäure variiert. Dabei wurden 5 mmol (0.5 g), 10 mmol (1 g), 15 mmol (1.5 g), 20 mmol (2 g), 25 mmol (2.5 g) und 30 mmol (3 g) BSA verwendet. Bei der Variation der Propiolsäure wurden 0 mmol (0 μL), 0.16 mmol (10 μL), 0.32 mmol (20 μL), 0.49 mmol (30 μL), 0.65 mmol (40 μL) und 0.81 mmol (50 μL) Propiolsäure eingesetzt, um zu sehen, ob dadurch eine höhere Menge an PolySia gebunden werden kann und ob die Nanopartikel trotzdem noch fluoreszierend sind.

Im letzten Schritt der Reaktionssequenz wurden die eingesetzten Mengen an PolySia und Fluoreszenzfarbstoff variiert. Dabei wurden 0.38 mmol (182 mg) und 0.52 mmol (250 mg) TBA-PolySia eingesetzt, um zu untersuchen, ob die angebundene Menge durch eine erhöhte Zugabe vergrößert werden kann. Des Weiteren wurden $0.93 \cdot 10^{-7}$ mmol (50 μL), $1.87 \cdot 10^{-7}$ mmol (100 μL), $2.34 \cdot 10^{-7}$ mmol (125 μL), $4.68 \cdot 10^{-7}$ mmol (250 μL) und $9.33 \cdot 10^{-7}$ mmol (500 μL) Alexa Fluor[®] 488-Azid eingesetzt, um zu überprüfen, ob durch eine geringere Menge an Fluoreszenzfarbstoff zum einen die Menge an immobilisierter PolySia erhöht werden kann und zum anderen, ob die Nanopartikel bei einem geringeren Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs noch fluoreszierend sind.

Da bei beiden Synthese-Varianten einzeln durchgeführt verschiedene Lösemittel verwendet werden, wurden bei der Kombination beider Varianten zum einen DCM und zum anderen Ethanol als Lösemittel eingesetzt, um zu untersuchen, ob sich die Lösemiteleigenschaften auf die Anbindung auswirken.

Als letztes wurde die Synthese ohne Kupfer durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Einsatz von Kupfer vermieden werden kann, so dass die Nanopartikel trotzdem mit dem Fluoreszenzfarbstoff ausgestattet sind. Eine Übersicht über die verschiedenen Optimierungen ist Abb. 4-16 zu entnehmen.

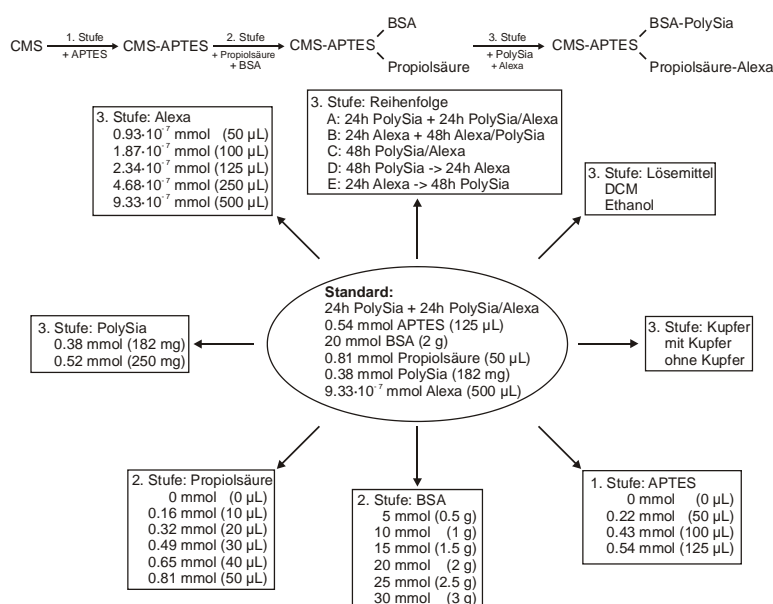


Abb. 4-16: Zusammenfassung der Optimierungsschritte bei der Multifunktionalisierung über eine Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie.

4.5.3 Anbindung ausschließlich über die „Click“-Chemie

Für die Multifunktionalisierung ausschließlich über die „Click“-Reaktion wurden Alkin-modifizierte PolySia sowie Alexa Fluor[®] 488-Alkin eingesetzt.

Hierfür werden 250 mg der mit Azid-funktionalisierten Nanopartikel in 20 mL Ethanol dispergiert. Zu der Dispersion werden 25 mg Alkin-modifizierte Polysialinsäure (0.072 mmol)

sowie 500 μL Alexa Fluor[®] 488-Alkin mit einer Konzentration von $1.45 \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gegeben. Des Weiteren werden 10 mg Kupfersulfat-Pentahydrat und 15 mg Natriumascorbat in je 2 mL Wasser gelöst und zur Dispersion gegeben, die anschließend für 24 Stunden gerührt wird. Die hellgrünen Nanopartikel werden zentrifugiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4.5.4 Anbindung ausschließlich über das Linker-System

Bei der Multifunktionalisierung ausschließlich über das Linker-System wurden die deacetylierte TBA-PolySia und das Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin verwendet.

Dafür werden 250 mg der mit Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten Nanopartikel in 20 mL DCM dispergiert, 0.25 g DCC zur Dispersion gegeben und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 182 mg TBA-PolySia hinzugegeben und es wird für weitere 24 Stunden gerührt. Dann werden 250 μL Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin mit einer Konzentration von $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zur Dispersion gegeben und diese wieder für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (im folgenden Variante A genannt). Anschließend wird zentrifugiert, die Nanopartikel mit Wasser und Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die hier aufgeführten Werte stellen die Standardbedingungen dieser Multifunktionalisierungsvariante dar.

Zur Optimierung der Multifunktionalisierung wurden folgende Parameter variiert: die Reihenfolge der Zugabe der PolySia und des Fluoreszenzfarbstoffes und die Mengen an APTES, BSA, PolySia sowie des Fluoreszenzfarbstoffs.

Um die optimalen Bedingungen für die Zugabe von PolySia und Fluoreszenzfarbstoff unter den Bedingungen des Linker-Systems zu finden, wurden neben der oben erwähnten Reihenfolge der Zugabe noch zwei weitere getestet. Zum einen wurde der Fluoreszenzfarbstoff als erstes zur Dispersion gegeben, diese 24 Stunden gerührt, dann wurde die PolySia zugegeben und für weitere 48 Stunden gerührt (Variante B). Zum anderen wurden PolySia und Fluoreszenzfarbstoff gleichzeitig zur Dispersion gegeben, die dann für 48 Stunden gerührt wurde (Variation C). Die Variation der Reihenfolge sollte zeigen, unter welchen Bedingungen eine große Menge an PolySia gebunden werden kann und unter welchen Bedingungen die Nanopartikel noch so stark fluoreszieren, dass diese noch detektiert werden kann.

Im ersten Schritt der Reaktionssequenz wurde auch bei dieser Variante die eingesetzte Menge an APTES variiert, wobei folgende Mengen verwendet wurden: 0 mmol (0 μL), 0.22 mmol (50 μL), 0.43 mmol (100 μL), 0.54 mmol (125 μL) und 1.07 mmol (250 μL).

Des Weiteren wurde die Menge an Bernsteinsäureanhydrid im zweiten Reaktionsschritt variiert. Dabei wurden 5 mmol (0.5 g), 10 mmol (1 g), 15 mmol (1.5 g), 20 mmol (2 g), 25 mmol (2.5 g) und 30 mmol (3 g) BSA verwendet.

Im letzten Schritt der Sequenz wurde dann noch die Menge an Polysialinsäure sowie an Fluoreszenzfarbstoff geändert. Dabei wurden 0.38 mmol (182 mg), 0.52 mmol (250 mg), 0.62 mmol (300 mg) und 0.73 mmol (350 mg) TBA-PolySia eingesetzt, um zu überprüfen, ob

die angebundene Menge durch den Einsatz einer größeren Menge erhöht werden kann. Des Weiteren wurden $0.84 \cdot 10^{-7}$ mmol (50 μ L), $1.68 \cdot 10^{-7}$ mmol (100 μ L), $2.09 \cdot 10^{-7}$ mmol (125 μ L), $4.19 \cdot 10^{-7}$ mmol (250 μ L) und $8.38 \cdot 10^{-7}$ mmol (500 μ L) Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin verwendet. Eine Übersicht über die verschiedenen Optimierungen ist Abb. 4–17 zu entnehmen.

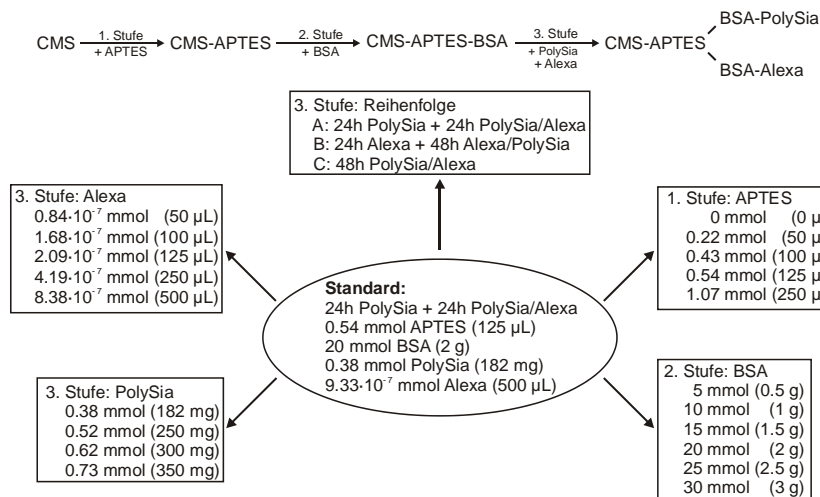


Abb. 4-17: Zusammenfassung der Optimierungsschritte bei der Multifunktionalisierung ausschließlich über das Linker-System.

4.6 Collagen-Silica-Komposit-Materialien

Für die Anbindung von PolySia zur Anwendung in der Nervenregeneration wurden Collagen-Silica-Komposit-Materialien hergestellt, die später mit immobilisierter PolySia als Nervenleitschienen eingesetzt werden sollen. Dazu wurde das kommerziell erhältliche MatriStypt[®] (gereinigtes Collagen I der Rinderepidermis, 2 mm Dicke) als Collagen-Membran verwendet, in die zunächst unfunktionalisierte kolloidale mesoporöse Silica-Nanopartikel (CMS) eingelagert wurden. Um diese Einlagerung zu stabilisieren, wurden die Membranen nach der Infiltrierung mit den Silica-Nanopartikeln unter Verwendung von Glutaraldehyd quervernetzt. Da PolySia für die Nervenregeneration festphasengebunden sein sollte, wurden Wege aufgeführt, wie diese an die Collagen-Silica-Komposit-Materialien angebonden werden kann. Dazu wurden zum einen mit PolySia-funktionalisierte Silica-Nanopartikel in das MatriStypt[®] infiltriert und zum anderen wurden Collagen-Silica-Komposit-Materialien, die aus MatriStypt[®] und unfunktionalisierten Silica-Nanopartikeln hergestellt wurden, mit Hilfe des Linker-Systems nach der Infiltrierung funktionalisiert.

4.6.1 Infiltrierung mit unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln

Für die Infiltrierung von unfunktionalisierten Silica-Nanopartikeln in die Collagen-Membran, wurden MatriStypt[®] als Collagen-Quelle sowie calcinierte CMS-Nanopartikel verwendet, um Collagen-Silica-Komposit-Materialien herzustellen.

Dazu werden 400 mg calcinierte CMS-Nanopartikel in 20 mL Wasser dispergiert. Zu dieser Dispersion wird MatriStypt[®] gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Collagen-Membran aus der Dispersion entnommen, mit viel Wasser abgespült und im Vakuum getrocknet.

Um die Auswirkung des Lösemittels auf die Infiltrierung zu testen, wird an Stelle von Wasser auch Ethanol als Lösemittel verwendet. Dabei ist zu beobachten, dass bei der Benutzung von Wasser das Collagen auf der Oberfläche schwimmt, während es bei der Verwendung von Ethanol untertaucht. Bei beiden Lösemitteln ist nach der Infiltrierung keine Verformung des Collagen zu erkennen.

Des Weiteren wurden die infiltrierten Collagen-Membranen auf ihre Stabilität gegenüber Wasser getestet, indem sie zum einen für eine halbe Stunde in einem Wasserbad mit Ultraschall behandelt und zum anderen für bestimmte Zeiten in Wasser eingetaucht und gerührt wurden. Die untersuchten Zeiten für die Lagerung in Wasser betragen dabei 24, 48 und 72 Stunden.

4.6.2 Quervernetzung mit Glutaraldehyd

Die infiltrierten Collagen-Materialien wurden anschließend mit Glutaraldehyd quervernetzt, um die Collagen-Silica-Komposit-Materialien zu stabilisieren, so dass die Nanopartikel mit dem Collagen quervernetzt sind.

Hierfür wird das mit Silica-Nanopartikeln infiltrierte Collagen in 20 mL Ethanol eingetaucht und 2 mL Glutaraldehyd hinzugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die Collagen-Membran aus der Lösung entnommen, mit viel Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4.6.3 Funktionalisierung der infiltrierten Collagen-Silica-Komposite

Um die Collagen-Silica-Komposit-Materialien mit PolySia auszustatten, wurde das Linker-System aus APTES und BSA (s. Abschnitt 4.2.3) verwendet, so dass die deacetylierte TBA-PolySia an die Oberfläche von bereits mit unfunktionalisierten Silica-Nanopartikeln infiltrierte Collagen-Membranen binden kann. Zur vorherigen Überprüfung, ob die Materialien mit Silanen funktionalisiert werden können, wurden diese zunächst mit BUTMS, aufgrund der höheren Anzahl an CH₂-Gruppen, funktionalisiert.

Für die Funktionalisierung mit BUTMS werden die Membranen in 10 mL Toluol getaucht. Zu dieser Lösung werden 100 µL BUTMS und 60 µL DBU gegeben. Es wird für zwei Stunden bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wird die Membran aus der Lösung entnommen, mit Ethanol gespült und im Vakuum getrocknet. Hierbei wurden Membranen getestet, die zum einen nur mit Silica-Nanopartikeln infiltrierte wurden und zum anderen welche, die zusätzlich quervernetzt wurden.

Im ersten Schritt der Reaktionssequenz des Linker-Systems wird die infiltrierte Collagen-Membran in 10 mL Toluol getaucht. Zu dieser Lösung werden 30 μL APTES und 38 μL DBU gegeben. Anschließend wird für zwei Stunden bei 80 °C gerührt. Die Collagen-Membran wird nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur aus der Lösung entnommen, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Für die Reaktionssequenz des Linker-Systems wurden ausschließlich infiltrierte Collagen-Membranen verwendet, die nicht quervernetzt wurden.

Im zweiten Schritt wird die mit APTES-funktionalisierte Membran in 10 mL DMF getaucht und 1 g BSA hinzugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Membran aus der Lösung entnommen, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Für den letzten Schritt der Reaktionssequenz wird die mit APTES und BSA-funktionalisierte Membran in 10 mL DCM getaucht. Zu dieser Lösung werden 0.13 g DCC gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 91 mg TBA-PolySia zur Lösung gegeben und diese für weitere 48 Stunden gerührt. Die Membran wird aus der Lösung entnommen, mit Wasser und Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Zur Optimierung der Reaktionssequenz wurden die Mengen an APTES, Bernsteinsäureanhydrid sowie Polysialinsäure variiert, um eine größt mögliche Menge an Polysialinsäure an die Collagen-Silica-Komposit-Materialien zu binden. Dabei wurden im ersten Reaktionsschritt folgende Mengen an APTES eingesetzt: 0 mmol (0 μL), 0.13 mmol (30 μL), 0.18 mmol (40 μL), 0.22 mmol (50 μL), 0.26 mmol (60 μL), 0.31 mmol (70 μL), 0.35 mmol (80 μL) und 0.4 mmol (90 μL).

Für die Variation des BSA wurden 2.5 mmol (0.25 g), 5 mmol (0.5 g), 7.5 mmol (0.75 g), 10 mmol (1 g), 12.5 mmol (1.25 g) und 15 mmol (1.5 g) verwendet.

Im letzten Schritt wurde die Auswirkung folgender eingesetzter Mengen an PolySia getestet: 0.19 mmol (91 μg), 0.21 mmol (100 μg), 0.26 mmol (125 μg) und 0.32 mmol (150 μg).

4.6.4 Infiltrierung von mit Polysialinsäure beschichteten CMS-Nanopartikeln

Eine weitere Variante PolySia an Collagen-Silica-Komposit-Materialien zu binden, war, bereits vorher mit PolySia-funktionalisierte Silica-Nanopartikel in MatriStypt[®] zu infiltrieren. Dazu wurden die CMS-Nanopartikel zunächst wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben mit Polysialinsäure funktionalisiert und anschließend in Collagen infiltriert.

Dafür werden 20 mg der mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel in 5 mL Ethanol dispergiert und in diese Dispersion MatriStypt[®] eingetaucht. Es wird über Nacht (etwa 15 Stunden) bei Raumtemperatur gerührt. Die infiltrierte Membran wird dann aus der Lösung entnommen, mit Wasser und Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Um die Auswirkung des Lösemittels auf die Herstellung der Komposite zu testen, wurde an Stelle von Ethanol auch Wasser verwendet. Des Weiteren wurde die Reaktionszeit variiert, um zu überprüfen, ob bei längerer oder kürzerer Reaktionsdauer mehr Nanopartikel eingelagert werden können. Dabei wurden Reaktionszeiten von einer, fünf und 24 Stunden

getestet. Als letztes wurde die Menge an dispergierten mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel variiert. Dabei wurden 2 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg und 30 mg Nanopartikel dispergiert.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Im ersten Abschnitt erfolgt zunächst eine Charakterisierung der nanoporösen Silica-Nanopartikel (NPSNPs), die in dieser Arbeit für weitere Oberflächenmodifikationen sowie für weitere Untersuchungen im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen im Bereich der Nervenregeneration verwendet wurden. Die Daten für die ebenfalls synthetisierten Nanopartikel der kolloidalen mesoporösen Silica-Nanopartikel (CMS) sind dem Anhang zu entnehmen.

5.1.1 MCM-41

Nach der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Synthese nach Cai et al. konnte in mehreren Ansätzen ein weißer Feststoff erhalten werden.^[67] Dabei wurde das struktur-dirigierende Agens (SDA) entweder durch Calcination oder durch Extraktion mit Ethanol und Salzsäure aus den Poren entfernt, um zu untersuchen, ob sich dadurch Unterschiede zwischen den Nanopartikeln ergeben. Da es sich bei den Silica-Nanopartikeln vom Typ MCM-41 um geordnete nanoporöse Strukturen handelt, wurden Röntgenpulverdaten von einer as synthesized (as syn), einer extrahierten und einer calcinierten Probe aufgenommen, die in Abb. 5-1 dargestellt sind. Die Reflexe der Diffraktogramme wurden hexagonal indiziert und die aus der Indizierung berechneten Gitterkonstanten sind Tab. 5-1 zu entnehmen.

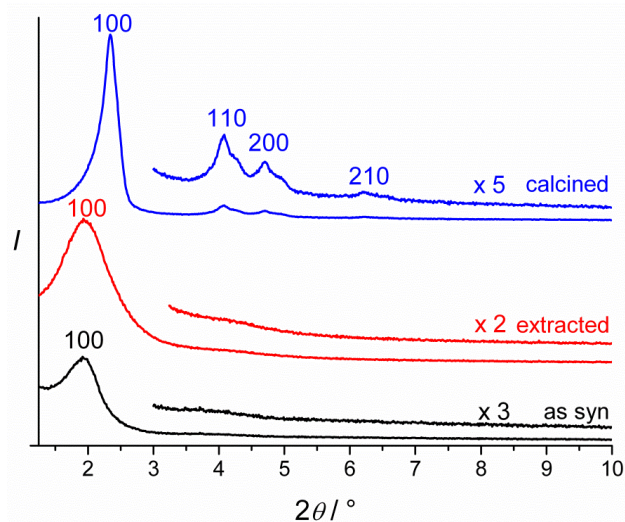


Abb. 5-1: Diffraktogramme von einer as syn (schwarz), einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) Probe von Silica-Nanopartikeln des Typs MCM-41 mit Indizierung der Reflexe.

Bei allen drei Diffraktogrammen ist der 100-Reflex bei einem Wert von etwa $2^\circ 2\theta$ zu beobachten. Jedoch sind ausschließlich beim calcinierten MCM-41 weitere Reflexe zu erkennen, die auf ein hexagonal angeordnetes Porensystem hinweisen. Das Fehlen der

weiteren Reflexe der as syn MCM-41-Probe kann darauf zurückgeführt werden, dass sich bei dieser Probe restliches SDA in den Poren befindet, wodurch die Intensität der Reflexe aufgrund eines geringeren Elektronendichtekontrasts verkleinert wird, so dass die Reflexe nicht mehr detektiert werden. Bei den extrahierten MCM-41-Nanopartikeln kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um ein ungeordnetes Porensystem handelt, da angenommen werden kann, dass in diesem Fall das SDA nahezu vollständig aus den Poren entfernt worden sein müsste.^[147] Des Weiteren ist nach dem Calcinieren der Probe eine Verschiebung der Reflexe zu höheren 2θ -Werten zu beobachten. Dies kann auf Kondensationsreaktionen zurückgeführt werden, die während der Calcination ablaufen und somit eine geringfügige Verkleinerung der Struktur zur Folge haben.

Die Gitterkonstante bleibt nach der Extraktion des MCM-41 gleich mit der Gitterkonstante der as syn Probe, woraus folgt, dass sich noch eine geringe Menge an restlichem SDA in den Poren befindet und keine Verkleinerung der Struktur mit dieser Methode einhergeht (s. Tab. 5-1). Jedoch ist nach der Calcination der Nanopartikel eine Verkleinerung der Gitterkonstante zu beobachten, die auf eintretende Kondensationsreaktionen während der Calcination zurückzuführen ist. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass nach der Calcination kein SDA in den Poren vorhanden ist.

Tab. 5-1: Berechnung der Gitterkonstante der as syn, extrahierten und calcinierten Probe des MCM-41 aus den Röntgenpulverdaten.

Probe	a / Å
as syn	52.9
extrahiert	52.8
calciniert	43.4

Zur Überprüfung, inwieweit das SDA aus den Poren entfernt werden konnte, wurden IR-Spektren der as syn, extrahierten und calcinierten MCM-41-Nanopartikel aufgenommen. Die Spektren sind in Abb. 5-2 dargestellt.

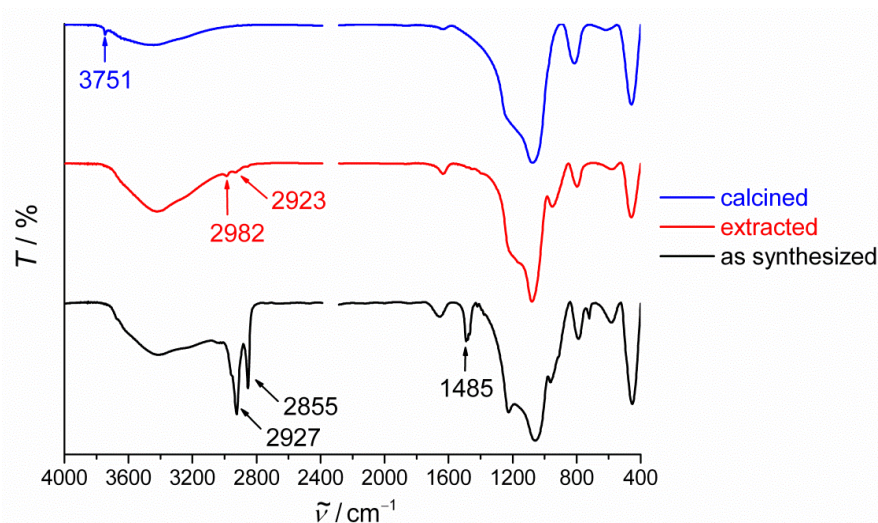


Abb. 5-2: IR-Spektren von as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41.

In der as synthesized Probe sind zwei starke Banden zwischen 2930 und 2850 cm^{-1} sowie eine Bande bei 1485 cm^{-1} zu erkennen, die auf Schwingungen des in den Poren vorhandenen SDAs (CTAB) zurückzuführen sind. Nach der Extraktion der Nanopartikel sind nur noch sehr schwache Banden zwischen 3000 und 2900 cm^{-1} zu beobachten, woraus folgt, dass das SDA nahezu vollständig aus den Poren entfernt werden konnte, sich aber noch geringe Mengen an CTAB in den Poren befindet. Nach der Calcination sind dagegen keine Banden in diesem Bereich zu beobachten, die dem SDA zugeordnet werden könnten. Daraus folgt, dass bei einer Calcination das CTAB vollständig aus den Poren entfernt werden konnte. Des Weiteren ist ausschließlich bei den calcinierten Nanopartikeln eine Bande bei 3751 cm^{-1} zu beobachten, die auf ungebundene Silanolgruppen hinweist, während die breite Bande zwischen 3200 und 3700 cm^{-1} bei allen drei Spektren auf Silanolgruppen, die über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind, hindeutet. Eine vergleichende Zuordnung der Banden ist Tab. 5-2 zu entnehmen.

Tab. 5-2: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-2 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

as syn	extrahiert	calciniert	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
–	–	3751	(Si–OH)-Valenzschwingung	Silica	[162]
3200-3700	3200-3700	3200-3700	(O–H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2927	2982	–	(C–H)-Valenzschwingung	CTAB	[163]
2855	2923	–	(C–H)-Valenzschwingung	CTAB	[163]
1654	1639	1632	(O–H)-Deformationsschwingung	Wasser	[163]
1485	–	–	(C–H)-Deformationsschwingung	CTAB	[163]
1230	1212	1239	(Si–O–Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1061	1083	1083	(Si–O–Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
959	952	–	(Si–OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
799	799	822	(Si–O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
582	–	–	(C–Br)-Gerüstschwingung	CTAB	[163]
451	458	458	(O–Si–O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Eine weitere Methode, um eine Aussage über die Entfernung des SDAs zu treffen, sind thermogravimetrische Messungen. Eine Zusammenfassung der Massenverluste sowie der Restmassen ist tabellarisch in Tab. 5-3 dargestellt. Die dazugehörigen Thermogramme sind dem Anhang zu entnehmen. Bei allen drei Proben ist der erste Massenverlust der bis etwa 150 °C erfolgt, dem Verlust von Wasser zuzuordnen, wobei dieser in der Menge variiert, was aus verschiedenen Trocknungszeiten herrühren kann. Des Weiteren ist bei allen drei Proben ein Massenverlust bei Temperaturen über 500 °C zu beobachten, der einer Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zugeschrieben werden kann. Bei der as synthesized Probe sind noch zwei weitere Stufen zwischen 150 und 500 °C zu erkennen, deren Gesamt-Massenverlust etwa 36.8 % beträgt. Diese können der schrittweisen Verbrennung des in den Poren enthaltenen CTAB zugeordnet werden. Nach der Extraktion der Nanopartikel ist ebenfalls ein zweistufiger Massenverlust zwischen 150 und 500 °C zu beobachten, der in diesem Fall mit insgesamt 6.5 % wesentlich geringer ist, als bei der as synthesized Probe. Daraus folgt, dass nach der Extraktion ein großer Anteil an CTAB aus den Poren entfernt werden konnte, jedoch restliches CTAB noch in den Poren vorhanden ist. Nach der

Calcination ist keine Stufe zu erkennen, die einem Massenverlust von CTAB zuzuordnen wäre, woraus folgt, dass hier kein CTAB mehr in den Poren vorhanden ist.

Tab. 5-3: Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

as syn	extrahiert	calciniert	Zuordnung	im Temperaturbereich
6.4 %	13.2 %	19.8 %	adsorbiertes Wasser	25–150 °C
26.3 %	3.7 %	–	Verbrennung des CTAB	150–300 °C
10.5 %	2.8 %	–	Verbrennung des CTAB	300–500 °C
5.6 %	1.5 %	2.6 %	Dehydroxylierung des Silica	500–1000 °C
51.2 %	78.8 %	77.6 %	Restmasse	–

Des Weiteren wurden REM-Bilder aufgenommen, um die Größe sowie die Morphologie der Nanopartikel zu bestimmen. Die Aufnahmen sind in Abb. 5-3 abgebildet. Auf den Bildern ist zu erkennen, dass es sich um sphärische Nanopartikel handelt, die etwa eine Größe zwischen 50 und 80 nm aufweisen und die keine strukturellen Unterschiede nach dem Extrahieren bzw. Calcinieren zeigen. Außerdem ist zu erkennen, dass die Nanopartikel bei allen Proben stark zur Agglomeration neigen, da sich die Nanopartikel stark zusammenlagern.

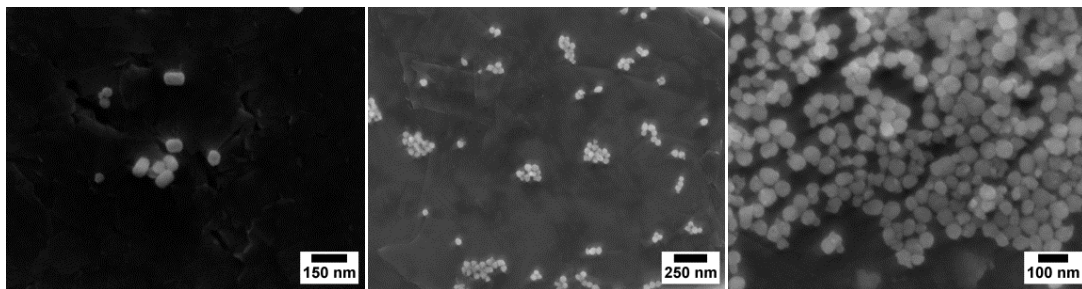


Abb. 5-3: REM-Aufnahmen einer as syn (links), einer extrahierten (Mitte) und einer calcinierten (rechts) Probe der MCM-41 Silica-Nanopartikel (REM-PCI).

Eine Agglomeration der Nanopartikel kann schon beim Dispergieren beobachtet werden. Ein Teil der Nanopartikel lässt sich nicht stabil in Ethanol oder Wasser dispergieren und setzt sich nach einer gewissen Zeit am Boden ab. Aus diesem Grund wurden weitere REM-Aufnahmen angefertigt. Dabei wurden zum einen die Nanopartikel untersucht, die sich stabil in Ethanol dispergieren ließen und zum anderen die Nanopartikel, die sich als Bodensatz abgesetzt hatten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 5-4 zu sehen. Aus den Aufnahmen ist zu entnehmen, dass die Nanopartikel, die sich am Boden abgesetzt haben, sich ausschließlich zu größeren Aggregaten zusammenlagern (Abb. 5-4 unten links). Durch Vergrößerung der Aufnahme ist zu erkennen, dass die einzelnen Nanopartikel weiterhin eine Größe von 80 nm besitzen (Abb. 5-4 unten rechts). Es liegen allerdings keine einzeln verteilten Nanopartikel vor. Bei den Aufnahmen der Nanopartikel, die stabil in Ethanol dispergiert werden konnten, ist zu erkennen, dass sich die Nanopartikel zum Teil ebenfalls zu großen Agglomeraten zusammenlagern. Jedoch ist auch zu sehen, dass es Bereiche gibt, in denen die Nanopartikel nicht so stark zusammengelagert sind, jedoch

unterschiedliche Größen zwischen etwa 50 und 200 nm zeigen. Daraus folgt, dass die Nanopartikel des MCM-41 mit der hier verwendeten Methode nicht dafür geeignet sind stabile Suspensionen monodisperser Nanopartikel herzustellen, da die Nanopartikel innerhalb der Suspension zur Agglomeration neigen.

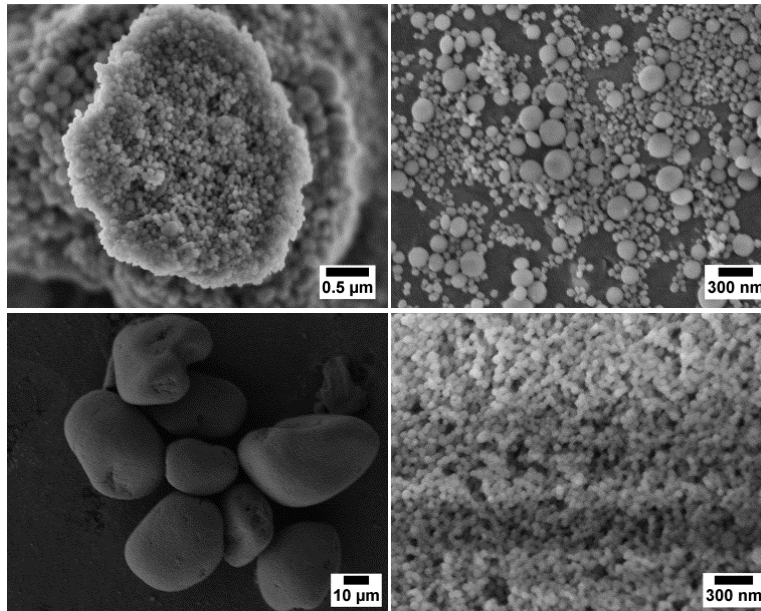


Abb. 5-4: REM-Aufnahmen von der stabilen Suspension (oben) einer MCM-41-Probe und den sich am Boden abgesetzten Nanopartikeln (unten, REM-PCI).

Zur weiteren Analyse der Suspensionen der Nanopartikel wurden DLS-Messungen an in Ethanol dispergierten Proben durchgeführt, die auch in diesem Fall wieder stark zur Agglomeration neigten. Die Ergebnisse dieser Messungen sind vergleichend in Abb. 5-5 dargestellt.

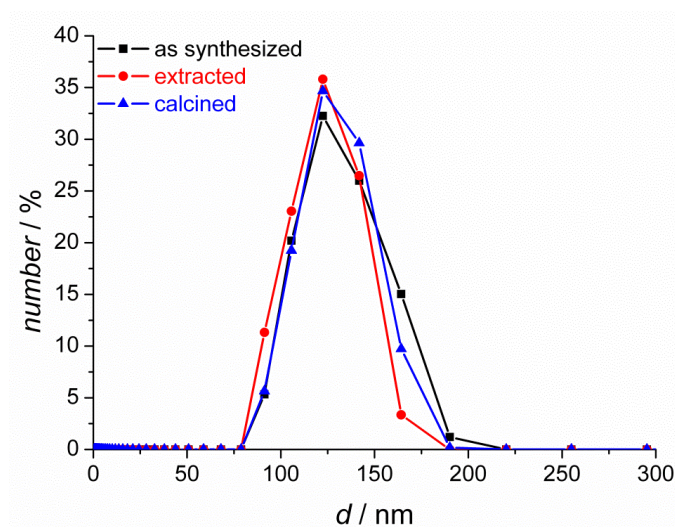


Abb. 5-5: Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) Silica-Nanopartikel vom Typ MCM-41.

Die DLS-Messungen zeigen größere Partikeldurchmesser der Nanopartikel als auf den REM-Aufnahmen zu sehen waren, entsprechend der hydrodynamischen Radien der Nanopartikel. Die Nanopartikel haben hier etwa die Größe von 125 nm bei allen drei Proben und zeigen eine weite Größenverteilung, die zwischen 80 und 170 nm liegt. Diese ist auf die Neigung der Nanopartikel zur Agglomeration zurückzuführen.

Zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche sowie des Porenvolumens wurden von den extrahierten sowie calcinierten Nanopartikeln Sorptionsmessungen mit Stickstoff bei 77 K durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 5-6 dargestellt sind. Beide Nanopartikel zeigen typische Isothermen des Typs IV, die eine Hysterese aufweisen. Die spezifische Oberfläche, die mit Hilfe der BET-Isotherme bestimmt wurde, beträgt beim extrahierten MCM-41 $1018 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ und beim calcinierten $1033 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Beide Nanopartikel haben eine Porengröße von 2.7 nm, welche mit der BJH-Methode bestimmt wurde.

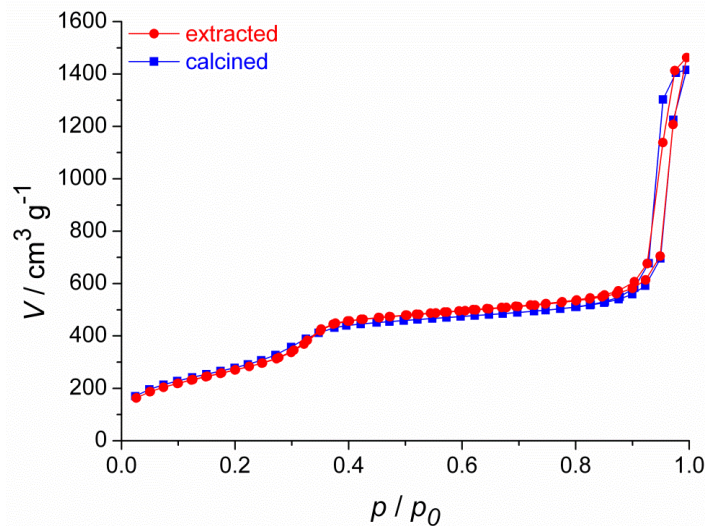


Abb. 5-6: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) MCM-41 Probe.

Außerdem wurden die unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikel auf ihre Biokompatibilität sowie mögliche toxische Effekte geprüft, indem MTT-Tests durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen sind in Abb. 5-7 gezeigt, während die Ergebnisse der Zellkulturexperimente mit PC-12-Zellen dem Anhang zu entnehmen sind. Für die Experimente wurden die entsprechenden Zellen zu verschiedenen Nanopartikelkonzentrationen gegeben und die Viabilität der Zellen nach 5 Tagen mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Beim as synthesized MCM-41 ist keine Viabilität der Zellen bei allen zugegebenen Konzentrationen zu beobachten, so dass angenommen werden kann, dass die Toxizität dieser Nanopartikel auf das SDA zurückzuführen ist, dass hier noch nicht aus den Poren entfernt worden ist. Die Zytotoxizität des verwendeten CTABs ist bereits bekannt.^[165] Nach der Extraktion der Nanopartikel ist für eine Konzentration von 10 ppm keine Toxizität zu beobachten, da die Viabilität vergleichbar mit der des reinen Mediums ist. Jedoch nimmt die Viabilität der Zellen mit steigender Konzentration stark ab, so dass die extrahierten Nanopartikel in Konzentrationen ab 100 ppm weiterhin toxisch für die HepG2-

Zellen sind. Dies liegt vermutlich daran, dass das SDA nicht vollständig aus dem Porensystem entfernt werden konnte, wie bereits mittels IR-Spektroskopie und TG-Messungen (s. Abb. 5-2 und Tab. 5-3) gezeigt werden konnte, so dass bei höheren Konzentrationen der Nanopartikel erhöhte Konzentrationen an CTAB vorhanden sind, die eine toxische Wirkung auf die Zellen haben. Des Weiteren wurde überprüft, ob durch einen weiteren Waschschritt der extrahierten Nanopartikel mit DMF das restliche CTAB aus den Poren entfernt werden kann. Aus Abb. 5-7 ist zu erkennen, dass nach dem Waschen die Viabilität der Zellen bei den extrahierten Nanopartikeln bei allen Konzentrationen stark ansteigt. Daraus folgt, dass das restliche CTAB zum großen Teil durch DMF aus dem Porensystem gewaschen werden kann. Da die Viabilität jedoch weiterhin mit steigender Konzentration leicht abnimmt, kann davon ausgegangen werden, dass sich immer noch eine sehr geringe Menge an CTAB in den Poren befindet, die sich jedoch nicht so stark auf die Viabilität der Zellen auswirkt. Die calcinierten Nanopartikel dagegen zeigen keinen toxischen Effekt, auch nicht bei höheren Konzentrationen. Daraus folgt, dass die calcinierten MCM-41-Nanopartikel, aus deren Porensystem das CTAB vollständig entfernt werden konnte, sehr gut biokompatibel sind.

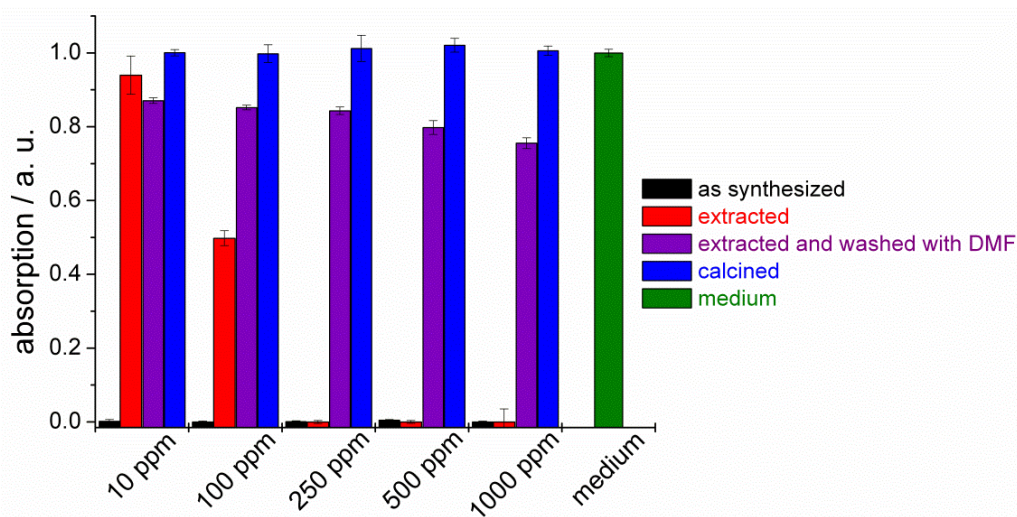


Abb. 5-7: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

5.1.2 Kolloidale nanoporöse Silica-Nanopartikel

Es konnte nach der in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Synthesevorschrift nach QIAO et al. ein weißer Feststoff unter allen Synthesebedingungen erhalten werden.^[65] Da für weitere Funktionalisierungen nur die calcinierten kolloidalen mesoporösen Silica-Nanopartikel (CMS), die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden, verwendet worden sind, erfolgt in diesem Abschnitt nur eine Charakterisierung dieser Nanopartikel. Die Daten für die weiteren hergestellten CMS-Nanopartikel sind dem Anhang zu entnehmen.

Zur Charakterisierung der Nanopartikel wurden Röntgenpulverdaten aufgenommen, die in Abb. 5-8 dargestellt sind. Dabei ist in allen drei Diffraktogrammen der intensive (100)-Reflex bei einem Wert von circa $2^\circ 2\theta$ zu beobachten. Nach der Calcination ist noch eine Andeutung eines weiteren Reflexes bei einem Wert von $4^\circ 2\theta$ sichtbar, der einem (110)-Reflex zugeordnet werden könnte. Da alle drei Proben nur den (100)-Reflex zeigen, ist davon auszugehen, dass diese Nanopartikel ein ungeordnetes Porensystem aufweisen, da nach der Calcination bzw. Extraktion das SDA nahezu vollständig aus den Poren entfernt sein müsste, wodurch die Intensitäten der Reflexe nicht mehr durch einen geringeren Elektronendichtekontrast verkleinert werden könnten. Des Weiteren ist bei der calcinierten Probe eine Verschiebung der Reflexe zu höheren Winkeln zu erkennen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass während der Calcination Kondensationsreaktionen auftreten, wodurch die Struktur geringfügig kleiner wird.

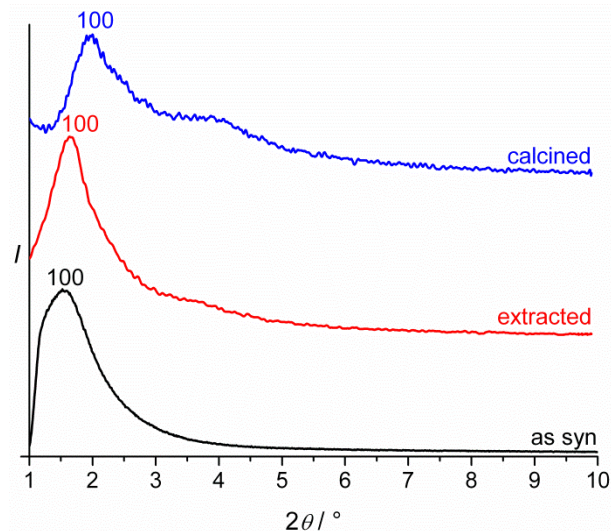


Abb. 5-8: Diffraktogramme von einer as syn (schwarz), einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) Probe der CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40°C synthetisiert wurden.

Um zu überprüfen, ob das SDA aus den Poren entfernt werden konnte, wurden IR-Spektren aufgenommen, die in Abb. 5-9 zu sehen sind. Bei der as synthesized Probe sind zwei intensive Banden bei 2931 und 2858 cm^{-1} sowie eine schwache Bande bei 1477 cm^{-1} zu erkennen, die dem als SDA verwendeten CTAB zugeordnet werden können, das sich noch in den Poren befindet. Nach der Calcination sowie Extraktion sind alle drei Banden nicht mehr sichtbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich kein CTAB mehr in den Poren befindet. Des Weiteren zeigen alle drei Proben eine breite Bande zwischen 3700 und 3000 cm^{-1} , die auf Silanolgruppen hinweist, die über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind. Ebenfalls ist in allen drei Spektren eine sehr schwache Bande bei etwa 3745 cm^{-1} zu beobachten, die auf ungebundene Silanolgruppen zurückgeführt werden kann. Eine vergleichende Zuordnung aller Banden ist Tab. 5-4 zu entnehmen.

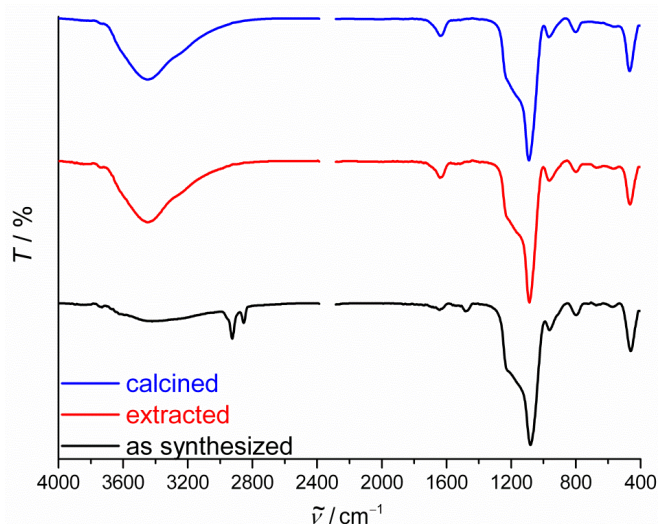


Abb. 5-9: IR-Spektren von as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C synthetisiert wurden.

Tab. 5-4: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-9 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

as syn	extrahiert	calciniert	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3753	3745	3745	(Si-OH)-Valenzschwingung	Silica	[162]
3000 - 3700	3000 - 3700	3000 - 3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2931	-	-	(C-H)-Valenzschwingung	CTAB	[163]
2858	-	-	(C-H)-Valenzschwingung	CTAB	[163]
1645	1637	1645	(O-H)-Deformationsschwingung	Wasser	[163]
1477	-	-	(C-H)-Deformationsschwingung	CTAB	[163]
1085	1093	1093	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
967	967	967	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
799	799	807	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
471	463	471	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Eine weitere Methode zur Überprüfung, ob das SDA vollständig aus dem Porensystem entfernt werden konnte, sind thermogravimetrische Messungen. Eine Zusammenfassung der Massenverluste sowie der Restmassen ist tabellarisch in Tab. 5-3 dargestellt. Die dazugehörigen Thermogramme sind dem Anhang zu entnehmen. Bei allen drei Proben kann eine unterschiedlich große Stufe bis zu einer Temperatur von 150 °C beobachtet werden, die dem Verlust von adsorbiertem Wasser zuzuschreiben ist, dessen unterschiedliche Menge durch unterschiedliche Trocknungszeiten zu Stande kommen kann. Des Weiteren ist bei allen Messungen eine etwa gleich große Stufe ab circa 500 °C zu erkennen, die der Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zugeordnet werden kann, die bei allen Silica-Nanopartikeln auftritt. Bei der as synthesized Probe sind zwei weitere Stufen, die einen Gesamt-Massenverlust von 27.6 % ausmachen, zu erkennen. Dieser Massenverlust kann auf eine stufenweise Verbrennung des als SDA genutzten CTABs zurückgeführt werden, dass sich noch in den Poren befindet. Diese stufenweise Verbrennung des CTABs ist auch bei den MCM-41-Nanopartikeln zu beobachten (s. Tab. 5-3). Nach der Calcination ist keine weitere Stufe zu erkennen, woraus folgt, dass das CTAB vollständig aus den Poren entfernt werden konnte. Bei den extrahierten Nanopartikeln ist jedoch eine Stufe von 5.4 % zwischen

150 und 500 °C zu beobachten, die auf restliches CTAB hinweist. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um sehr wenig CTAB handelt, da die Verbrennung hier nur noch in einem Schritt verläuft, so dass die normalerweise zweistufige Verbrennung nicht mehr detektiert wird.

Tab. 5-5: Massenverluste sowie Restmassen der thermogravimetrischen Messungen an unfunktionalisierten CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C synthetisiert wurden.

as syn	extrahiert	calciniert	Zuordnung	im Temperaturbereich
4.5 %	17.3 %	21.1 %	adsorbiertes Wasser	25–150 °C
17.2 %		–	Verbrennung des CTAB	150–300 °C
10.4 %	5.4 %	–	Verbrennung des CTAB	300–500 °C
2 %	2 %	3.4 %	Dehydroxylierung des Silica	500–1000 °C
65.9 %	75.3 %	75.5 %	Restmasse	–

Zudem wurden REM-Aufnahmen der Nanopartikel angefertigt, um eine Aussage über die Morphologie sowie die Größe der Nanopartikel zu erhalten. Die Aufnahmen sind in Abb. 5–10 gezeigt. Darauf ist zu erkennen, dass es sich um sphärische Nanopartikel handelt, die eine Größe von etwa 40 bis 60 nm besitzen. Die Nanopartikel neigen nicht so stark zur Agglomeration wie die Nanopartikel des MCM-41, da sie hier teilweise einzeln vorliegen und nicht so stark zusammengelagert sind. Des Weiteren konnte eine REM-Aufnahme aufgenommen werden, auf der die poröse Struktur auf der Oberfläche der Nanopartikel zu erkennen ist (Abb. 5-10 rechts).

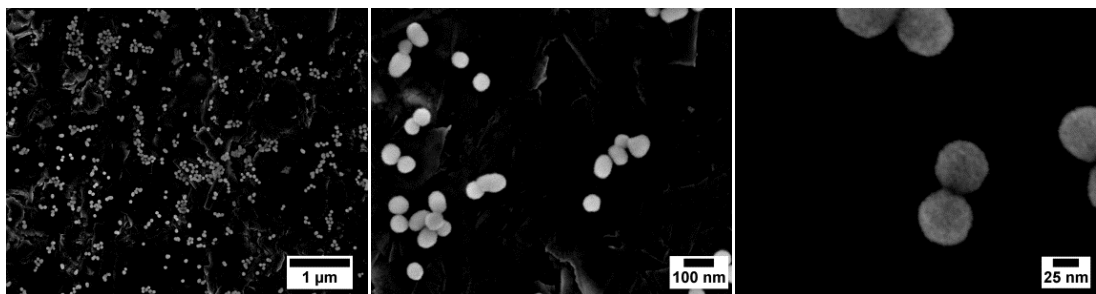


Abb. 5-10: REM-Aufnahmen von CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden (REM-PCI).

Zur weiteren Untersuchung der Größe der Nanopartikel wurden DLS-Messungen an in Ethanol dispergierten Nanopartikeln durchgeführt, die in Abb. 5-11 gezeigt sind. Die Messungen ergeben eine Nanopartikelgröße von etwa 80 nm für die as syn Probe, 95 nm für die calcinierten und 110 nm für die extrahierten Nanopartikel. Dabei ist zu erkennen, dass die Größe der Nanopartikel nach der Calcination sowie Extraktion leicht zunimmt, was auf eine stärkere Agglomeration zurückgeführt werden kann. Die weiten Größenverteilungen der Messungen liegen bei allen drei Proben etwa im gleichen Bereich und zeigen Partikelgrößen von 60 bis 170 nm.

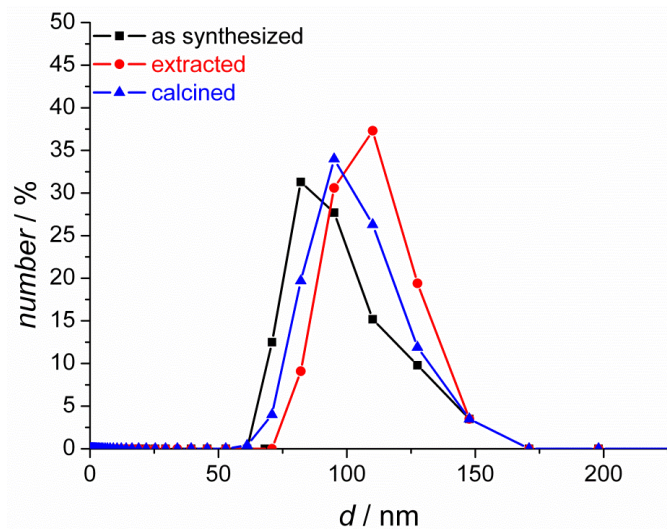


Abb. 5-11: Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C synthetisiert wurden.

Des Weiteren wurde die spezifische Oberfläche sowie das Porenvolumen der calcinierten sowie extrahierten Nanopartikel mittels Stickstoff-Sorption bei 77 K bestimmt. Die Ergebnisse der Sorptionsmessungen sind in Abb. 5-12 dargestellt. Beide Isothermen zeigen einen Verlauf der Typ IV Isotherme mit Andeutung einer Hysterese im Bereich großer p/p_0 Werte. Die spezifischen Oberflächen der Nanopartikel wurden mit der BET-Methode bestimmt und betragen $1188 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ für die calcinierten sowie $1110 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ für die extrahierten CMS-Nanopartikel. Die Porengröße beider Nanopartikel wurde mit der BJH-Methode bestimmt und beträgt für beide Proben 2.2 nm.

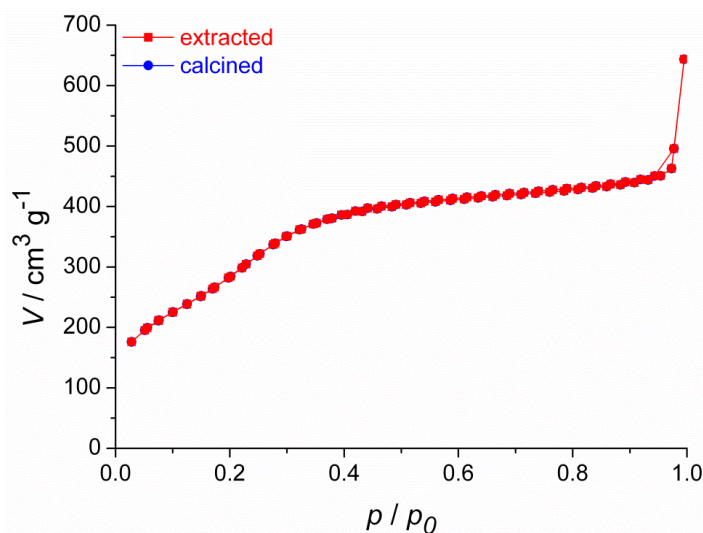


Abb. 5-12: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) CMS-Probe, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurde.

Zur Bestimmung der Toxizität der Nanopartikel, wurden MTT-Tests mit HepG2 und PC-12 Zellen über fünf Tage durchgeführt. Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen ist in Abb. 5-13 dargestellt, während die Ergebnisse der Experimente mit den PC-12-

Zellen dem Anhang zu entnehmen sind. An den Ergebnissen ist zu erkennen, dass die as synthesized CMS-Nanopartikel eine sehr hohe Toxizität aufweisen, da ab einer Konzentration von 100 ppm keine Viabilität der HepG2-Zellen mehr zu beobachten ist. Dies kann ebenso wie bei den MCM-41-Nanopartikeln auf das CTAB, das sich noch in den Poren befindet, zurückgeführt werden, da dessen toxische Wirkung bereits bekannt ist.^[165] Allerdings scheint das CTAB in diesen Nanopartikeln in einer geringeren Konzentration vorzuliegen als in den MCM-41-Nanopartikeln, da bei einer Konzentration von 10 ppm noch eine gute Viabilität beobachtet werden kann. Nach der Extraktion der Nanopartikel, bei der das CTAB nahezu vollständig aus den Poren entfernt werden konnte, nimmt die Viabilität bei sehr hohen Konzentrationen wieder ab, wobei sie im Allgemeinen jedoch bessere Werte als bei den MCM-41-Nanopartikeln zeigt. Daraus folgt, dass bei den CMS-Nanopartikeln das CTAB im größeren Maße aus dem Porensystem durch Extraktion entfernt werden konnte. Diese Annahme wurde bereits durch die IR-Spektren und TG-Messungen bestätigt (s. Abb. 5-9 und Tab. 5-5). Nach der Calcination der Nanopartikel zeigen die Zellen eine vergleichbare Viabilität zum reinen Medium bei allen getesteten Konzentrationen, da kein CTAB mehr in den Poren vorhanden ist. Daraus folgt, dass die calcinierten CMS-Nanopartikel sehr gut biokompatibel sind.

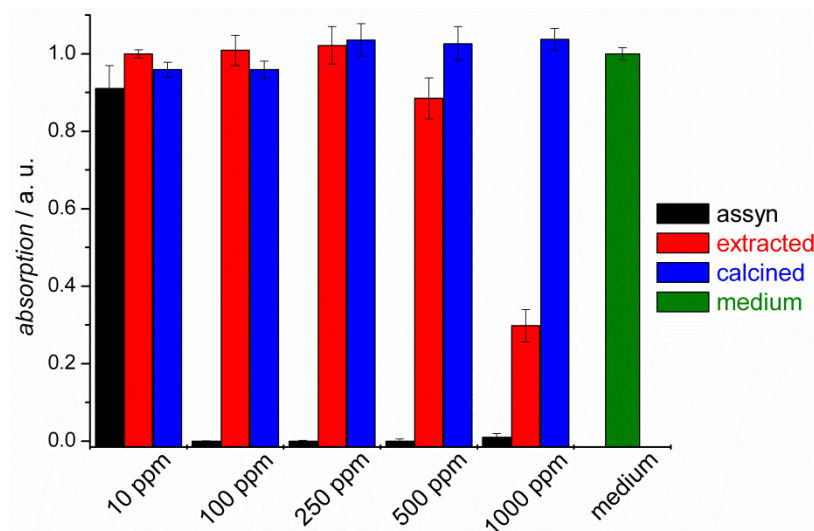


Abb. 5-13: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.

5.1.3 Vergleichende Diskussion

Es konnten in mehreren Ansätzen erfolgreich Nanopartikel vom Typ MCM-41 sowie kolloidale mesoporöse Silica-Nanopartikel (CMS) mit DEA bei 40 °C synthetisiert werden. Dabei haben beide Arten von Nanopartikeln eine sphärische Morphologie. Die MCM-41-Nanopartikel besitzen eine Größe zwischen 50 und 200 nm, während die CMS-Nanopartikel eine Größe zwischen 40 und 170 nm zeigen. Die Nanopartikelgrößen, die mittels REM-Aufnahmen sowie den DLS-Messungen bestimmt wurden, sind vergleichend in Tab. 5-6

zusammengefasst. Aus den REM-Aufnahmen sowie den DLS-Messungen ist zu erkennen, dass die MCM-41-Nanopartikel sehr stark zur Agglomeration neigen, die auch durch längere Ultraschallbehandlung nicht vollständig aufgehoben werden kann. Bei den CMS-Nanopartikeln zeigen die REM-Aufnahmen, dass die Nanopartikel sich zwar auch etwas zusammenlagern, aber nicht so stark. Sie liegen unter anderem auch vereinzelt vor. Dies zeigt sich auch beim leichteren Dispergieren dieser Nanopartikel. Allerdings ist aus den DLS-Messungen zu entnehmen, dass auch diese Nanopartikel noch zur Agglomeration neigen, aufgrund der breiten Größenverteilung. Aus beiden Messungen folgt, dass die CMS-Nanopartikel eine geringere Größe als die MCM-41-Nanopartikel aufweisen.

Tab. 5-6: Zusammenfassung und Vergleich der Nanopartikelgröße der synthetisierten MCM-41 und CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.

Nanopartikel	Partikelgröße nach DLS	Partikelgröße nach REM
MCM-41, as syn	80 – 190 nm	50 – 80 nm
MCM-41, extrahiert	80 – 190 nm	50 – 80 nm
MCM-41, calciniert	80 – 190 nm	50 – 80 nm
CMS, as syn	60 – 170 nm	40 – 60 nm
CMS, extrahiert	70 – 170 nm	40 – 60 nm
CMS, calciniert	60 – 170 nm	40 – 60 nm

Anhand von IR-Spektren und TG-Messungen konnte bei beiden Arten von Nanopartikeln gezeigt werden, dass das SDA bei der Calcination vollständig aus dem Porensystem entfernt werden konnte. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass bei der Extraktion der Nanopartikel das SDA zum Teil noch in den Poren vorhanden ist, wobei die Menge an CTAB beim MCM-41 größer zu sein scheint als bei den CMS-Nanopartikeln. Dies zeigt sich auch in den Zellkulturexperimenten mit HepG2-Zellen, wo bei den as synthesized Nanopartikeln alle Konzentrationen des MCM-41 keine Viabilität der Zellen zeigten, während bei den as synthesized CMS-Nanopartikeln bei einer sehr geringen Konzentration von 10 ppm noch eine gute Viabilität der Zellen zu beobachten ist. Des Weiteren zeigten die calcinierten Nanopartikel beider Synthesen eine sehr gute Viabilität der Zellen bei allen eingesetzten Konzentrationen, die vergleichbar mit der Viabilität der Zellen des reinen Mediums ist. Bei den extrahierten Nanopartikeln nahm die Viabilität beim MCM-41 bereits ab einer Konzentration von 100 ppm sehr stark ab, aufgrund von restlichem SDA in den Poren, während die extrahierten CMS-Nanopartikel erst ab einer Konzentration von 1000 ppm eine erhöhte Toxizität aufwiesen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei den CMS-Nanopartikeln nach der Extraktion weniger CTAB in den Poren verbleibt. Anhand der MCM-41-Nanopartikel konnte gezeigt werden, dass sich das restliche CTAB in dem Porensystem nach der Extraktion der Nanopartikel weiter aus den Poren entfernen lässt, indem die Nanopartikel über Nacht mit DMF gewaschen werden.

Trotz der Schwierigkeiten beim Redispergieren des MCM-41 wurden diese Nanopartikel für weitere Oberflächenmodifizierungen genutzt. Von den CMS-Nanopartikeln wurden nur die calcinierten Nanopartikel für weitere Oberflächenmodifizierungen verwendet, da diese kein

SDA mehr in den Poren aufweisen, so dass sie insgesamt besser biokompatibel für weitere biomedizinische Anwendungen sind.

5.2 Einfluss der Hydrolyse auf den Thiobarbitursäure- und den Purpald[®]-Test

Zur Bestimmung der Menge an immobilisierter Polysialinsäure (PolySia) an der Oberfläche der Silica-Nanopartikel werden der Thiobarbitursäure (TBA)- sowie der Purpald[®]-Test verwendet. Bei beiden Verfahren wird jeweils eine 18-stündige Hydrolyse zur Spaltung der PolySia in die einzelnen Sialinsäuremoleküle durchgeführt. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Verfahren durch den Verzicht auf die Hydrolyse verkürzt werden können, so dass die angebundene Menge an PolySia direkt an den Nanopartikeln bestimmt werden kann. Dafür wurden mehrere Ansätze über das Linker-System mit Polysialinsäure funktionalisiert, wobei die Menge an APTES im ersten Schritt variiert wurde. Diese mit PolySia-immobilisierten Nanopartikel wurden anschließend auf die angebundene Menge an PolySia mittels des TBA- bzw. Purpald[®]-Tests untersucht. Die Verfahren wurden pro Ansatz jeweils mit sowie ohne Hydrolyse durchgeführt, um eine Aussage über die Notwendigkeit der Hydrolyse zu bekommen.

5.2.1 Thiobarbitursäure-Test

Für die Überprüfung, ob die Hydrolyse bei der Durchführung des Thiobarbitursäure-Tests (TBA-Test) notwendig ist, wurden die Nanopartikel über das Linker-System unter Verwendung von 0 mmol, 0.43 mmol und 0.54 mmol APTES im ersten Schritt mit PolySia funktionalisiert. Diese Nanopartikel wurden jeweils mit sowie ohne vorherige Hydrolyse, auf die Menge an immobilisierter PolySia überprüft. Dabei wurden im Fall ohne eine vorherige Hydrolyse die Nanopartikel direkt für den TBA-Test verwendet, während mit vorheriger Hydrolyse der Überstand getestet wurde. Die Ergebnisse dieses ersten Tests sind in Abb. 5-14 vergleichend dargestellt. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass der Einsatz der Hydrolyse bei der Bestimmung von PolySia an der Oberfläche von Silica-Nanopartikeln nicht notwendig ist, da zum einen die Ergebnisse beim Einsatz von 0 mmol und 0.54 mmol APTES vergleichbar sind und zum anderen nur geringe Abweichungen innerhalb der Standardabweichungen auftreten. Bei der Verwendung von 0.43 mmol APTES wird mit ca. 2200 µg PolySia pro Gramm Silica ohne und ca. 1300 µg mit Hydrolyse eine höhere Menge an PolySia gefunden, allerdings weist dieser Wert auch eine hohe Standardabweichung auf. Es ist möglich, dass durch die direkte Verwendung der Nanopartikel ohne vorherige Hydrolyse eine größere Menge an PolySia detektiert wird, da noch an den Nanopartikeln haftende PolySia durch deren Abtrennung im Fall mit Hydrolyse verloren geht. Diese Beobachtung trifft allerdings nicht auf alle Messwerte zu, so dass auch eine unbekannte Störung des Tests auftreten kann. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine vorherige Hydrolyse bei der Durchführung des TBA-Tests nicht notwendig ist, wobei auf eine geringe Standardabweichung der Messwerte geachtet werden sollte, um verlässliche Ergebnisse zu ermitteln. Außerdem scheint eine direkte Verwendung der Nanopartikel den Test nicht zu stören.

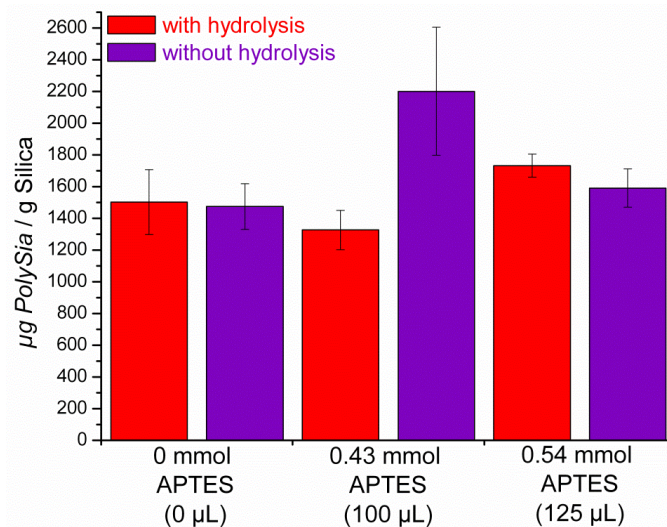


Abb. 5-14: Vergleich der Ergebnisse des TBA-Tests, wenn dieser mit bzw. ohne Hydrolyse vergleichend an Nanopartikeln durchgeführt wurde, die über das Linker-System mit variierender Menge an APTES mit PolySia funktionalisiert wurden.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde nochmals PolySia an die Oberfläche von Silica-Nanopartikeln unter den gleichen Bedingungen angebunden und die Menge an angebundener PolySia wieder mit und ohne Hydrolyse mittels des TBA-Tests bestimmt. Die Ergebnisse der Wiederholung des TBA-Tests sind dem Anhang zu entnehmen. Auch im zweiten Versuch können in zwei Fällen, beim Einsatz von 0.43 mmol und 0.54 mmol APTES, vergleichbare Mengen an immobilisierter PolySia detektiert werden, deren sehr geringe Abweichungen im Bereich der Standardabweichungen liegen. Bei Verwendung von 0 mmol APTES ist eine größere Abweichung zwischen dem TBA-Test mit Hydrolyse und dem, der direkt an den Nanopartikeln durchgeführt wurde, zu erkennen. Ähnlich dem Ergebnis des vorherigen Tests bei 0.43 mmol APTES, detektiert der TBA-Test ohne Hydrolyse eine größere Menge PolySia, ebenfalls mit einer hohen Standardabweichung. In diesem Fall liegt der Wert mit vorheriger Hydrolyse innerhalb der Standardabweichung des Wertes ohne Hydrolyse. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass der TBA-Test ohne Hydrolyse durchgeführt werden kann, da die Ergebnisse meist vergleichbar sind. Bei auftretenden Abweichungen wird eine höhere Menge an PolySia ohne Hydrolyse detektiert, woraus vermutet werden kann, dass bei der Variante ohne Hydrolyse die angebundene Menge an PolySia vollständiger bestimmt werden kann, da die Nanopartikel hier nicht vor dem Test abgetrennt werden, wie es bei der Variante mit der Hydrolyse der Fall ist. Des Weiteren lagen die Abweichungen meist im Bereich der Standardabweichungen, so dass angenommen werden kann, dass auch eventuelle Messfehler für den Unterschied in den Werten verantwortlich sein können, da der TBA-Test größeren Schwankungen unterliegt. Diese Schwankungen konnten bereits in vorherigen Studien beobachtet werden, wobei die Ursachen unbekannt sind.^[147,166] Deshalb sollte auf eine gute Übereinstimmung der Messwerte bzw. geringe Standardabweichungen geachtet werden. Auch scheinen die Nanopartikel den TBA-Test nicht zu stören, wenn die Menge an PolySia direkt an den Nanopartikeln bestimmt wird. Durch den Verzicht auf die Hydrolyse wird die Dauer des TBA-Tests deutlich verringert.

5.2.2 Purpald[®]-Test

Auch beim Purpald[®]-Test wurde der Einfluss der Hydrolyse auf die Ergebnisse überprüft, indem der Test an verschiedenen mit PolySia-modifizierten Silica-Nanopartikeln jeweils mit und ohne Hydrolyse durchgeführt wurde. Dafür wurde wieder das Linker-System zur Anbindung verwendet und die Menge an APTES variiert (0 mmol, 0.43 mmol und 0.54 mmol). Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 5-15 vergleichend dargestellt.

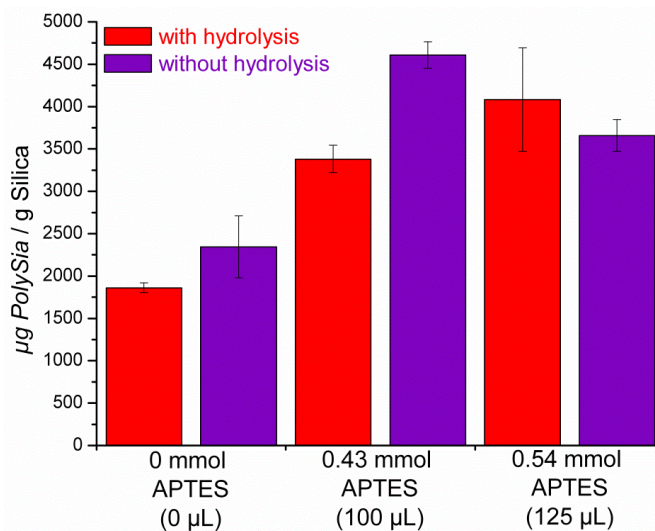


Abb. 5-15: Vergleich der Ergebnisse des Purpald[®]-Tests, wenn dieser mit bzw. ohne Hydrolyse vergleichend an Nanopartikeln durchgeführt wurde, die über das Linker-System mit variierender Menge an APTES mit PolySia funktionalisiert wurden.

Bei der Verwendung von 0 mmol und 0.43 mmol APTES kann jeweils eine höhere Menge an angebundener PolySia detektiert werden, wenn der Purpald[®]-Test ohne Hydrolyse durchgeführt wird, auch wenn die Abweichungen hier etwas größer sind. Werden 0 mmol APTES verwendet, liegt der Messwert, der mit Hydrolyse detektiert wurde, im Bereich der Standardabweichung des Wertes ohne Hydrolyse. Daraus folgt, dass eine direkte Verwendung der Nanopartikel den Purpald[®]-Test nicht stört. Außerdem kann vermutet werden, dass durch die direkte Verwendung der Nanopartikel ohne vorherige Hydrolyse eine höhere Menge an immobilisierter PolySia gefunden wird, da noch anhaftende PolySia an den Nanopartikeln durch deren Abtrennung im Fall mit Hydrolyse verloren gehen könnte. Auch bei diesem Test trifft diese Beobachtung nicht für alle Fälle zu, so dass diese Unterschiede auch durch unbekannte Störungen des Tests hervorgerufen werden könnten. Bei Verwendung von 0.54 mmol APTES wurde unter Verwendung der Hydrolyse eine größere Menge an PolySia detektiert, die jedoch eine größere Standardabweichung aufweist, die im Bereich der Menge an angebundener PolySia liegt, die ohne Hydrolyse bestimmt wurde. Daraus kann vermutet werden, dass die unterschiedliche Menge auch durch Fehler beim Ausführen des Tests entstanden sein könnte oder durch größere Schwankungen, die der Purpald[®]-Test manchmal aufweist. Diese Schwankungen konnten bereits in früheren Studien beobachtet werden.^[147] Wie beim TBA-Test ist auch aus diesen Ergebnissen zu entnehmen, dass die Hydrolyse für den Purpald[®]-Test nicht notwendig ist,

um die Menge an angebundener PolySia zu bestimmen. Allerdings sollte dabei darauf geachtet werden, dass die Standardabweichung der Messwerte möglichst gering ist, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

Auch beim Purpald[®]-Test wurde der Versuch wiederholt, um eventuelle Messfehler auszuschließen und die Annahme, dass auf die Hydrolyse verzichtet werden kann, zu bestätigen. Diese Ergebnisse sind im Anhang zu finden. Auch bei der zweiten Durchführung des Purpald[®]-Tests können bei Verwendung von 0 mmol APTES vergleichbare Mengen an PolySia mit und ohne Hydrolyse detektiert werden. Bei den beiden anderen Konzentrationen wird eine höhere Menge an PolySia ermittelt, wenn auf die Hydrolyse verzichtet wurde. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass der Purpald[®]-Test ebenfalls ohne Hydrolyse durchgeführt werden kann. Dabei kann auch hier vermutet werden, dass die Menge an immobilisierter PolySia im Fall des Tests ohne Hydrolyse vollständiger bestimmt werden kann, weil die Nanopartikel nicht vor dem Test abgetrennt werden. Da diese Beobachtung nicht auf alle Messungen zutrifft, können auch andere Störungen des Tests, die nicht bekannt sind, für die Abweichungen verantwortlich sein.

5.2.3 Vergleichende Diskussion

Für die Bestimmung der angebotenen Menge an PolySia wurde bislang bei beiden Verfahren eine 18-stündige Hydrolyse eingesetzt, um die PolySia zunächst in die einzelnen Sialinsäuremoleküle zu spalten und anschließend aus der überstehenden Lösung deren Gehalt zu bestimmen. Um diesen langen Schritt zu vermeiden, wurde getestet, ob der TBA- sowie der Purpald[®]-Test ohne Hydrolyse an den mit PolySia-immobilisierten Nanopartikeln durchführbar ist. Aus den vergleichenden Ergebnissen der Tests, die jeweils mit und ohne Hydrolyse durchgeführt wurden, ist zu erkennen, dass meist eine vergleichbare Menge an PolySia detektiert werden kann, sowohl beim TBA- als auch beim Purpald[®]-Test. Sind Abweichungen zu beobachten, konnte in nahezu allen Fällen eine größere Menge an PolySia detektiert werden, wenn auf die Hydrolyse verzichtet wurde. Es kann vermutet werden, dass bei der Hydrolyse die PolySia in manchen Versuchen eventuell nicht vollständig gespalten wird, so dass nach Abtrennung der Nanopartikel restliche PolySia in beiden Tests nicht detektiert werden kann. Da diese Beobachtungen nicht auf alle Ergebnisse zutreffen und die abweichenden Messwerte in den Bereichen der Standardabweichungen liegen, können die Abweichungen auch durch Messfehler bzw. aufgrund von typischen größeren Schwankungen der Tests herrühren, was durch die etwas größeren Standardabweichungen in einigen Messungen deutlich wird. Daher sollte bei den Ergebnissen auf eine geringe Standardabweichung geachtet werden, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Außerdem ist zu sagen, dass die Anwesenheit der Nanopartikel bei beiden Tests keinen negativen Einfluss auf die Testergebnisse zu haben scheint und den Ablauf somit nicht beeinflusst. Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl beim TBA- als auch beim Purpald[®]-Test auf die Hydrolyse verzichtet werden kann und die Tests direkt an den Nanopartikeln durchführbar sind.

5.3 Anbindung von Polysialinsäure über das Linker-System aus APTES und Bernsteinsäureanhydrid

In dieser Arbeit wurde PolySia über das Linker-System aus APTES und Bernsteinsäureanhydrid an calcinierte sowie extrahierte MCM-41-Nanopartikel sowie an calcinierte CMS-Nanopartikel angebunden. An diesen Nanopartikeln wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt, wie zum Beispiel eine Untersuchung der modifizierten Nanopartikel nach den verschiedenen Reaktionsschritten auf ihre Toxizität im Hinblick auf eine weitere Verwendung in der Nervenregeneration. Des Weiteren wurde anhand der MCM-41-Nanopartikel überprüft, inwiefern die Immobilisierung der PolySia stabil gegenüber Wasser, gesättigte Natriumchlorid-Lösung und PBS ist. Auch wurde eine Reacetylierung der angebundenen PolySia an den CMS-Nanopartikeln vorgenommen, um ihre ursprüngliche Molekülstruktur wieder zu erhalten.

5.3.1 MCM-41

Für die Immobilisierung der Nanopartikel mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA wurden die Nanopartikel wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben zunächst mit APTES funktionalisiert, so dass eine Aminofunktion auf die Oberfläche der Silica-Nanopartikel eingeführt wird. Anschließend kann das BSA mit dieser Aminofunktion reagieren, indem zum einen eine Amidbindung entsteht und zum anderen freie Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Silica-Nanopartikel vorhanden sind, die im letzten Reaktionsschritt mit der Aminogruppe des Tetrabutylammonium-Salzes der deacetylierten PolySia reagieren können, wobei eine weitere Amidbindung entsteht.

Um den Erfolg dieser Reaktionssequenz zu überprüfen, wurden IR-Spektren nach allen Funktionalisierungsschritten aufgenommen. Diese sind für die calcinierten Nanopartikel in Abb. 5-16 dargestellt und für die extrahierten Nanopartikel dem Anhang zu entnehmen. Nach dem ersten Reaktionsschritt mit APTES können sehr schwache Banden zwischen 3000 und 2800 cm^{-1} beobachtet werden, die auf eine Valenzschwingung der Alkylkette des APTES zurückgeführt werden kann. Außerdem ist zu erkennen, dass nach der Funktionalisierung mit APTES die Bande bei 3751 cm^{-1} , die auf freie Silanolgruppen hingewiesen hat, vollständig verschwindet, so dass angenommen werden kann, dass diese mit dem Silan reagiert haben. Daraus folgt, dass APTES erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden konnte. Nach der Umsetzung mit BSA sind drei weitere Banden im IR-Spektrum zu erkennen. Dabei sind die Banden bei 1650 und 1560 cm^{-1} typische Banden, die auf eine Amidbindung hinweisen, die in dieser Reaktion entstanden sein sollte. Die dritte neue Bande bei 1720 cm^{-1} deutet auf freie Carboxylgruppen an der Oberfläche der MCM-41-Nanopartikel hin, die für eine weitere Reaktion mit der PolySia benötigt werden. Aus diesen drei neuen Banden kann geschlossen werden, dass auch die zweite Reaktion mit dem BSA erfolgreich an der Oberfläche der MCM-41-Nanopartikel abgelaufen ist. Werden die Nanopartikel nun mit PolySia funktionalisiert, sind keine neuen Banden im Spektrum zu

erkennen, auch keine die der PolySia zugeordnet werden könnten. Trotzdem gibt es Hinweise auf einen Erfolg der Anbindung, da die Intensität der Bande bei 1720 cm^{-1} , die der Schwingung der freien Carboxylgruppen zugewiesen werden kann und die für die Anbindung der PolySia notwendig ist, stark abgenommen hat. Des Weiteren ist eine Zunahme der Intensität der Banden bei 1650 und 1560 cm^{-1} zu beobachten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine neue Amidbindung durch die Reaktion der Aminogruppen der deacetylierten PolySia mit den freien Carboxylgruppen an der Oberfläche gebildet wurde. Eine vergleichende Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-7 zu entnehmen.

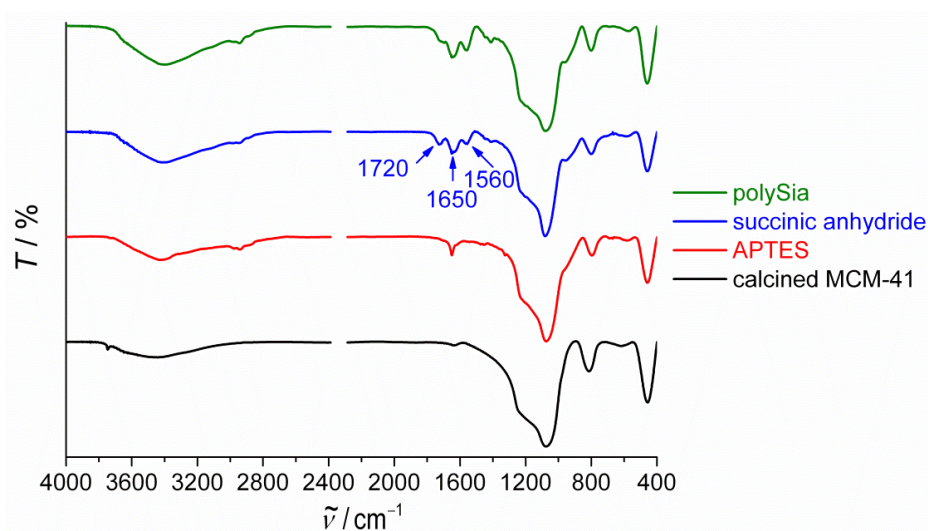


Abb. 5-16: IR-Spektren der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, nach den einzelnen Reaktionsschritten des Linker-Systems.

Tab. 5-7: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-16 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

APTES	BSA	PolySia	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2940	2940	2940	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2874	2878	2870	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	1720	-	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1658	1650	1643	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
-	1560	1558	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
-	1426	1410	(C-H)-Deformationsschwingung	APTES, BSA	[163]
1232	1239	1239	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1077	1084	1084	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
-	952	944	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
797	805	805	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
455	463	463	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um die Funktionalisierungen weiter zu untersuchen, wurden TG-Messungen nach jedem Reaktionsschritt der Sequenz des Linker-Systems an den calcinierten MCM-41-Nanopartikeln durchgeführt. Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der thermogravimetrischen Messungen ist Tabelle 5-8 zu entnehmen, während die Thermogramme im Anhang zu finden sind. Dabei sind die anfänglichen Massenverluste von

9.6 % bei den mit APTES-funktionalisierten, von 6.6 % bei den mit BSA-modifizierten und von 1 % bei den mit PolySia-immobilisierten Nanopartikeln bis zu einer Temperatur von etwa 150 °C auf einen Verlust von adsorbiertem Wasser zurückzuführen. Die unterschiedlichen Mengen können aus unterschiedlichen Trocknungszeiten sowie Trocknungsverfahren resultieren. Die zweite Stufe von 10 % bei der Funktionalisierung mit APTES, die zwischen 150 und 550 °C auftritt, kann der Verbrennung von organischen Bestandteilen des angebondenen Silans zugeordnet werden, während bei den Nanopartikeln, die zusätzlich mit BSA funktionalisiert wurden, ein zweistufiger Massenverlust von 3.4 % und 14.8 % in diesem Temperaturbereich beobachtet werden kann. Dieser ist durch eine schrittweise Verbrennung der Organik des APTES und des BSA zu erklären. Dabei ist der Massenverlust insgesamt größer als bei den Nanopartikeln, die nur mit APTES modifiziert wurden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das BSA erfolgreich mit dem APTES reagiert hat. Nach weiterer Umsetzung der Nanopartikel mit PolySia ist im gleichen Temperaturbereich ein zweistufiger Massenverlust von 4.6 % und 17.8 % zu beobachten. Diese Massenverluste können einer schrittweisen Verbrennung der Organik zugeordnet werden und sind im Vergleich zu den zwei Stufen im Thermogramm der mit APTES und BSA-funktionalisierten Nanopartikel größer. Daraus folgt, dass auch in diesem Fall mehr Organik an den Nanopartikeln gebunden sein müsste. Der Dehydroxyierungsschritt der Silica-Oberfläche, der oberhalb von Temperaturen von 550 °C auftritt, kann in allen drei Thermogrammen beobachtet werden und beträgt bei den mit APTES-modifizierten Nanopartikeln 1.6 %, nach weiterer Funktionalisierung mit BSA 1 % und nach der Anbindung von PolySia 1.4 %.

Tab. 5-8: Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.

APTES	BSA	PolySia	Zuordnung	im Temperaturbereich
9.6 %	6.6 %	1 %	adsorbiertes Wasser	25–150 °C
10 %	3.4 %	4.6 %	Verbrennung der Organik	150–300 °C
	14.8 %	17.8 %	Verbrennung der Organik	300–550 °C
1.6 %	1 %	1.4 %	Dehydroxylierung des Silica	550–1000 °C
78.8 %	74.2 %	75.2 %	Restmasse	–

Des Weiteren wurden nach allen Funktionalisierungsschritten DLS-Messungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Modifizierungen einen Einfluss auf die Größe bzw. die Größenverteilungen haben. Die Ergebnisse der Messungen der calcinierten Nanopartikel, die in Ethanol dispergiert wurden, sind in Abb. 5-17 zu sehen, während die Ergebnisse der Messungen der extrahierten Nanopartikel dem Anhang zu entnehmen sind. Auch nach der Funktionalisierung traten Probleme beim Dispergieren der Nanopartikel auf, die weiterhin keine stabilen Suspensionen in Ethanol oder Wasser bilden und als Agglomerate vorliegen. Dies ist auch anhand der DLS-Messungen zu erkennen, da nach allen Funktionalisierungen zum einen größere Partikel detektiert werden und zum anderen die Größenverteilungen wesentlich breiter sind. Nach der Anbindung von APTES beträgt die Größe der Partikel etwa 200 nm, wobei die Größenverteilung zwischen 120 und 460 nm liegt. Nach einer weiteren

Umsetzung mit BSA ist die Primärgröße der Partikel im Vergleich zu den mit APTES-funktionalisierten Nanopartikeln gleich geblieben, während die Größenverteilung zwischen 100 und 400 nm liegt. Die größten Partikel mit etwa 300 nm wurden nach der Immobilisierung der PolySia detektiert, wobei die Größenverteilung zwischen 160 und 460 nm liegt. Daraus folgt, dass durch die Funktionalisierungsschritte keine Verbesserung der Suspendierbarkeit, durch eventuelle elektrostatische Ladungen, auftritt, sondern dass die Agglomeration noch verstärkt zu sein scheint, da sich die Nanopartikel in Lösung anscheinend stärker zusammenlagern, so dass in den DLS-Messungen eher größere Agglomerate gemessen wurden, was sich in den breiten Größenverteilungen zeigt.

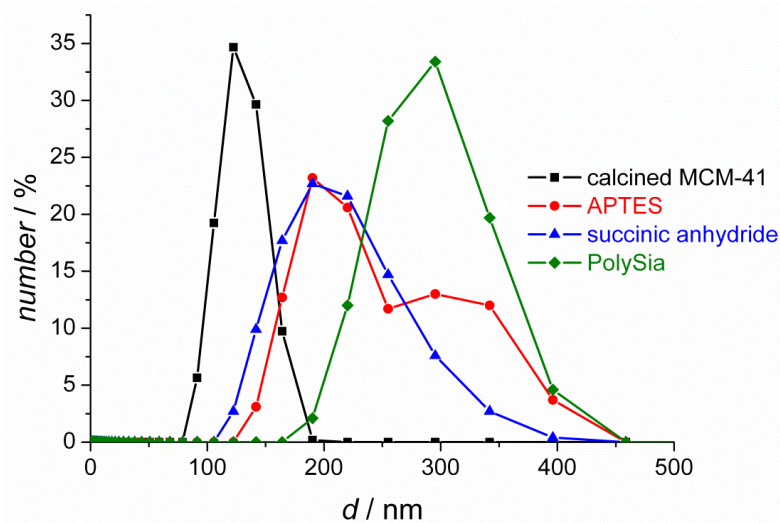


Abb. 5-17: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mittels des Linker-Systems mit Polysialinsäure funktionalisiert wurden, nach jedem Reaktionsschritt.

Um eine genaue Aussage über die Morphologie und die Größe der Nanopartikel zu treffen, die mit PolySia über das Linker-System funktionalisiert wurden, wurden REM-Aufnahmen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel nach der Umsetzung mit PolySia aufgenommen, die in Abb. 5-18 gezeigt sind.

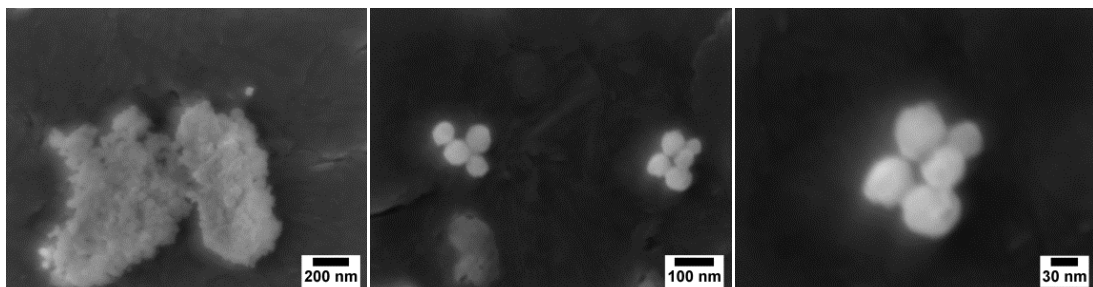


Abb. 5-18: REM-Aufnahmen von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Polysialinsäure über das Linker-System aus APTES und BSA funktionalisiert worden sind (REM-PCI).

Auf diesen Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich die sphärische Form sowie die Größe der Primärpartikel der unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikel von 50 bis 80 nm nach der Immobilisierung von PolySia mittels des Linker-Systems nicht geändert hat. Des Weiteren

zeigen die Nanopartikel auch nach der Funktionalisierung mit PolySia eine Tendenz sich zusammenzulagern, so dass die breiten Größenverteilungen aus den DLS-Messungen durch den Trend der Nanopartikel zur Agglomeration erklärt werden können.

Weiterhin wurden Stickstoff-Sorptionsmessungen an den calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden, nach jedem Reaktionsschritt durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Porensystem ebenfalls funktionalisiert wird oder ob dieses frei für weitere Anwendungen, wie zum Beispiel für ein Drug Delivery-System, bleibt. Die Sorptionsisothermen dieser Messungen sind im Anhang zu finden, während eine vergleichende Darstellung der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode ermittelt wurden, in Abb. 5-19 gezeigt ist. Daraus ist zu erkennen, dass nach der Anbindung von APTES das Porenvolumen sehr stark abnimmt und sich die Porengröße auf 2.1 nm verringert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Silan nicht nur an die Oberfläche der Nanopartikel bindet, sondern auch an die Silanolgruppen im Porensystem, so dass dieses mit dem Silan ausgefüllt wird. Nach einer weiteren Umsetzung mit BSA nimmt das Porenvolumen noch weiter ab, so dass keine Mesoporen mehr vorhanden sind. Da nach der Umsetzung mit BSA die Poren vollständig besetzt sind, kann angenommen werden, dass die PolySia nur mit den freien Carboxylgruppen des an der Oberfläche angebondenen BSA reagiert.

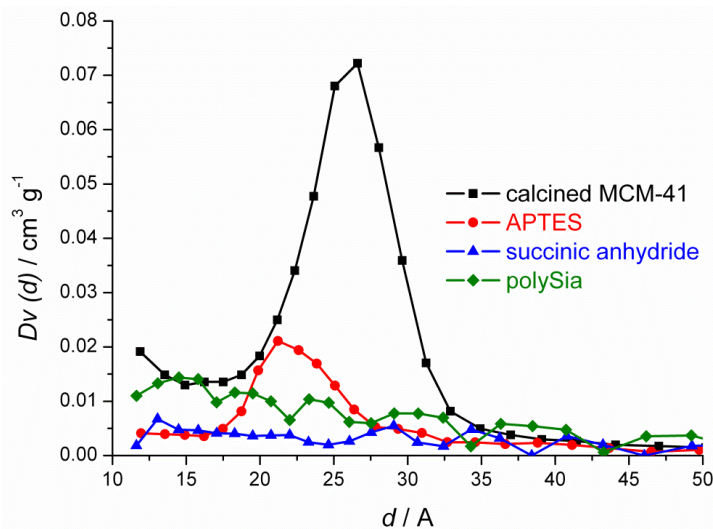


Abb. 5-19: Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die über das Linker-System mit Polysialinsäure modifiziert wurden. Die Sorptionsmessungen wurden nach jedem Schritt durchgeführt.

Um die Menge an immobilisierter PolySia an der Oberfläche der MCM-41-Nanopartikel zu bestimmen, wurde der Thiobarbitursäure-Test (TBA-Test) an den mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikeln sowie an denen, die mit APTES und BSA funktionalisiert wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse des TBA-Tests sind in Abb. 5-20 dargestellt. Sowohl die calcinierten als auch die extrahierten MCM-41-Nanopartikel zeigen nach der Umsetzung mit PolySia eine deutlich größere Menge an angebundener PolySia als die Nanopartikel, die nur mit BSA umgesetzt worden sind. Für die extrahierten Nanopartikel konnte eine Menge

von 5600 μg PolySia pro Gramm MCM-41 detektiert werden, während bei den calcinierten Nanopartikeln 4800 μg PolySia pro Gramm MCM-41 gemessen worden sind. Daraus folgt, dass sowohl an den calcinierten als auch an den extrahierten MCM-41-Nanopartikeln die Polysialinsäure mittels eines Linker-Systems aus APTES und BSA an die Oberfläche angebunden werden kann. Des Weiteren kann aus den Ergebnissen entnommen werden, dass eine größere Menge an PolySia an die extrahierten Nanopartikel gebunden werden kann. Dies liegt vermutlich daran, dass mit der Calcination Kondensationsreaktionen einhergehen, wodurch die Anzahl an Silanolgruppen an der Oberfläche sinkt, die somit nicht mehr für Oberflächenmodifizierungen zur Verfügung stehen. Diese Kondensationsreaktionen sollten beim Extrahieren der Nanopartikel nicht auftreten, sodass hier keine Verringerung der Silanolgruppen stattfindet. Dieses Ergebnis korreliert mit vorherigen Studien.^[147]

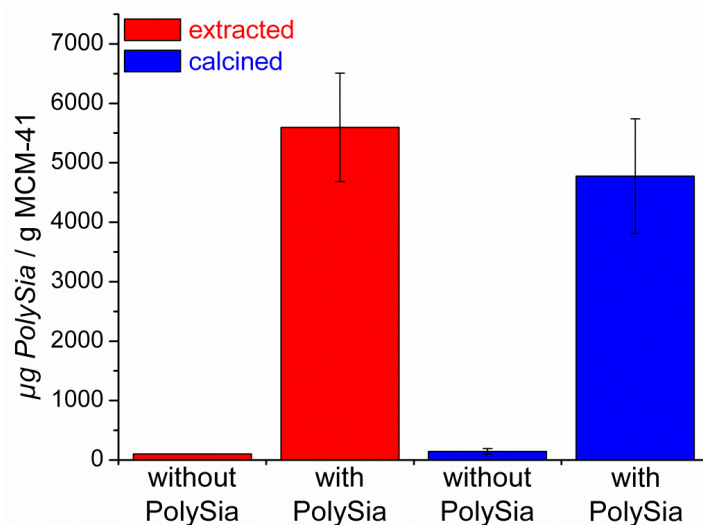


Abb. 5-20: Ergebnisse des TBA-Tests an extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden (rechte Spalten) und an Nanopartikeln, die nur mit APTES und BSA modifiziert sind (linke Spalten).

Um die Stabilität der Bindung der PolySia an die Oberfläche der MCM-41-Nanopartikel über das Linker-System zu testen, wurden die calcinierten mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel mit verschiedenen Lösemitteln über verschiedene Zeiträume gewaschen und anschließend mit dem TBA-Test auf die restliche angebundene Menge an PolySia untersucht. Die Ergebnisse des TBA-Tests, bei dem die Nanopartikel mit Wasser gewaschen wurden, sind in Abb. 5-21 gezeigt. Die Ergebnisse des TBA-Tests der Nanopartikel, die mit PBS gewaschen wurden, sind dem Anhang zu entnehmen. Aus Abb. 5-21 ist ersichtlich, dass etwa die Hälfte der angebundene Menge an PolySia bereits nach einer Stunde durch Wasser abgewaschen wurde. Anschließend ist die Menge an detektierte PolySia an den Nanopartikeln bis zu zwei Wochen konstant, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die noch vorhandene Menge an gebundener PolySia entweder kovalent über Amidbindungen bzw. über sehr starke ionische Bindungen an die Oberfläche über die freien Carboxylgruppen des BSA gebunden ist und sich durch Wasser über zwei Wochen nicht weiter abwaschen lässt. Die Menge an angebundener PolySia, die

durch Wasser abgewaschen wurde, kann der Polysialinsäure, die nur auf der Oberfläche abgelagert wurde, zugeordnet werden.

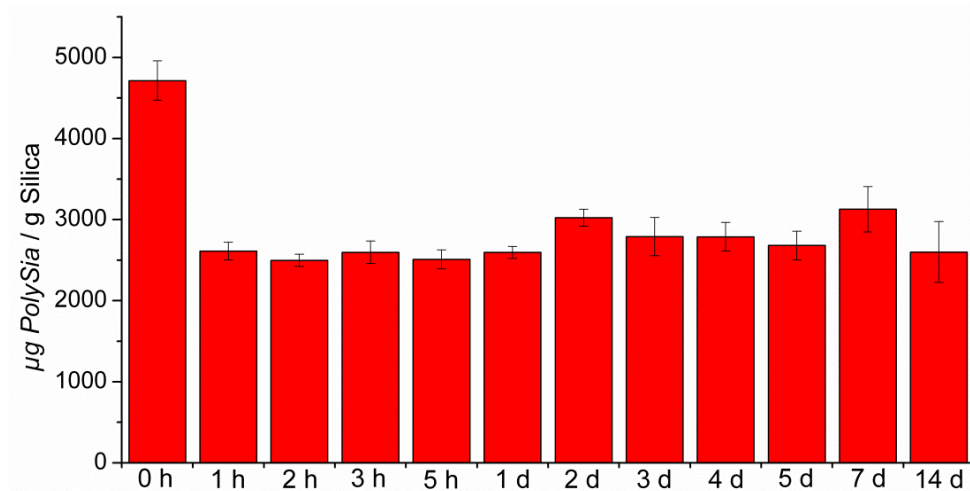


Abb. 5-21: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert und anschließend über verschiedene Zeiträume mit Wasser gewaschen wurden.

Da Wasser nicht in der Lage ist, eine eventuell vorhandene ionische Bindung zwischen dem BSA und der PolySia zu brechen, wurde eine weitere Waschreihe mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung durchgeführt, da hiermit die ionische Bindung gebrochen werden kann. Die Ergebnisse des TBA-Tests dieser Waschreihe sind in Abb. 5-22 dargestellt.

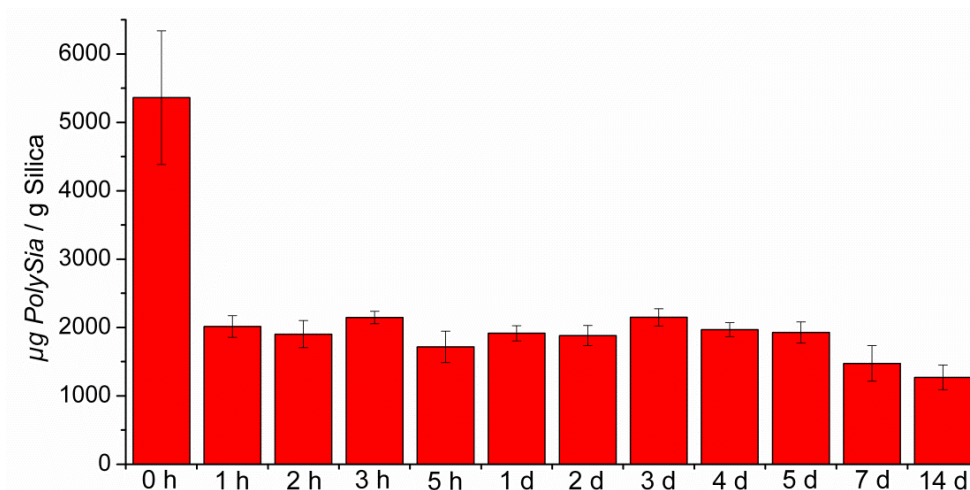


Abb. 5-22: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert und anschließend über verschiedene Zeiträume mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurden.

Bei dieser Waschreihe konnte bereits nach einer Stunde über die Hälfte der immobilisierten Menge an PolySia abgewaschen werden. Allerdings ist die detektierte Menge an PolySia anschließend bis zu zwei Wochen konstant, wobei die leichten Unterschiede auf die typischen Schwankungen des TBA-Tests zurückgeführt werden können. Da bei dem Waschen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung bereits nach einer Stunde eine etwas

größere Menge an PolySia abgespült werden konnte, ist davon auszugehen, dass diese ionisch an den Nanopartikeln gebunden war, so dass diese Bindung durch die Natriumchlorid-Lösung gebrochen werden konnte. Daher wurde nicht nur PolySia, die sich an der Oberfläche abgelagert hat, abgewaschen. Da sich die immobilisierte Menge an PolySia über einen Zeitraum von zwei Wochen nicht geändert hat, kann angenommen werden, dass dieser Teil kovalent an die freien Carboxylgruppen gebunden ist.

Zur weiteren Überprüfung, ob PolySia an die Nanopartikel angebunden werden konnte, wurden calcinierte und extrahierte MCM-41-Nanopartikel, die mit PolySia mittels des Linker-Systems funktionalisiert wurden, sowie unfunktionalisierte MCM-41-Nanopartikel als Negativkontrolle mit dem inaktiven Endo-Allophycocyanin (Endo-APC) umgesetzt, das spezifisch an PolySia bindet, diese jedoch nicht zerstört. Dadurch wird diese unter dem Mikroskop sichtbar. Die Aufnahmen dieser Untersuchung sind in Abb. 5-23 zu sehen. Darauf ist zu erkennen, dass die Negativkontrolle mit den unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln klar negativ ist, während die calcinierten sowie extrahierten Nanopartikel, die mit PolySia funktionalisiert wurden, positiv mit der Endo-APC reagieren. Dies zeigt sich dadurch, dass die mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikeln im Weißlicht als dunkle Punkte und bei 690 nm als weiß leuchtende Punkte zu erkennen sind, während bei den unfunktionalisierten Nanopartikeln nichts auf den Bildern zu beobachten ist. Daraus folgt, dass PolySia erfolgreich an die Oberfläche der MCM-41-Nanopartikel gebunden werden konnte. Des Weiteren ist zu beobachten, dass im Weißlicht die calcinierten und extrahierten Proben vergleichbar aussehen, wobei auffällt, dass die Größe der calcinierten Nanopartikel etwas kleiner und homogener ist. Die Fluoreszenzmarkierung bei 690 nm ergab bessere Ergebnisse bei den extrahierten Nanopartikeln, was auch durch die inhomogenere Größenverteilung hervorgerufen werden kann.

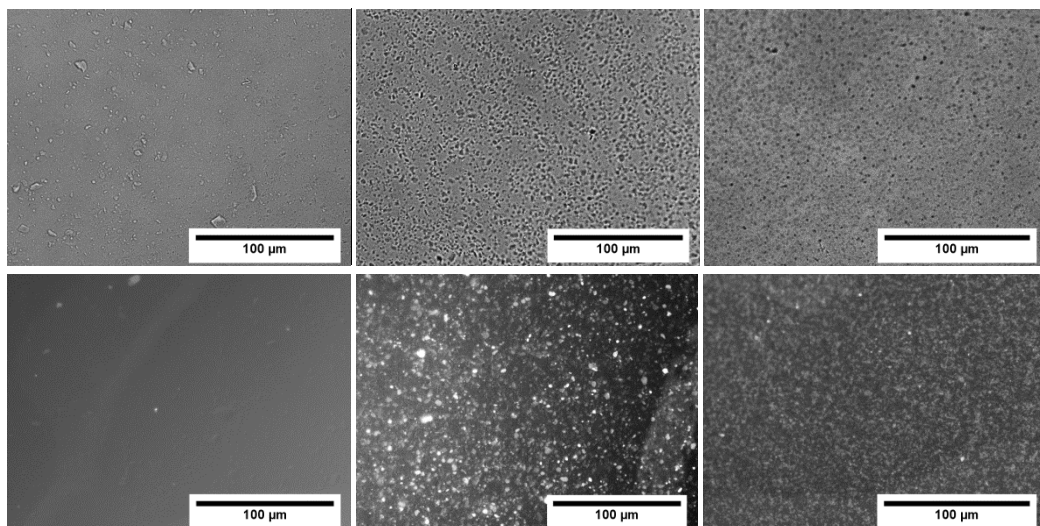


Abb. 5-23: Ergebnisse der Umsetzung von unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln (linke Spalte), von extrahierten mit PolySia-beschichteten MCM-41-Nanopartikeln (mittlere Spalte) und von calcinierten mit PolySia-modifizierten MCM-41-Nanopartikeln (rechte Spalte) mit Endo-APC. In der oberen Reihe sind die Aufnahmen unter Weißlicht zu sehen, während in der unteren Reihe die Aufnahmen bei 690 nm abgebildet sind.

Um eine Aussage über die Toxizität der funktionalisierten MCM-41-Nanopartikel treffen zu können, wurden nach jedem Funktionalisierungsschritt des Linker-Systems MTT-Tests durchgeführt. Alle Ergebnisse der Experimente mit PC-12-Zellen sind im Anhang zu finden. Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen von den mit APTES-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln sind in Abb. 5-24 gezeigt. Wie schon bei den unfunktionalisierten Nanopartikeln, zeigen die extrahierten Nanopartikel eine sehr hohe Toxizität, während die calcinierten Nanopartikel auch in diesem Fall wieder gut biokompatibel gegenüber HepG2-Zellen sind. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die toxische Wirkung der extrahierten Nanopartikel nicht von dem angebundenen APTES kommt, sondern vom restlichen CTAB im Porensystem. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden auch extrahierte Nanopartikel, die anschließend mit DMF gewaschen wurden, mit APTES funktionalisiert und in Zellkulturexperimenten untersucht (s. Abb. 5-24). Dabei zeigt sich, dass die Viabilität der Zellen bei den extrahierten Nanopartikeln stark ansteigt und mit der Viabilität der Zellen bei den calcinierten Nanopartikeln vergleichbar ist, so dass bestätigt wird, dass das CTAB mit Hilfe von DMF aus den Poren gewaschen werden kann und dass APTES als Oberflächenmodifizierung nicht toxisch für HepG2-Zellen ist.

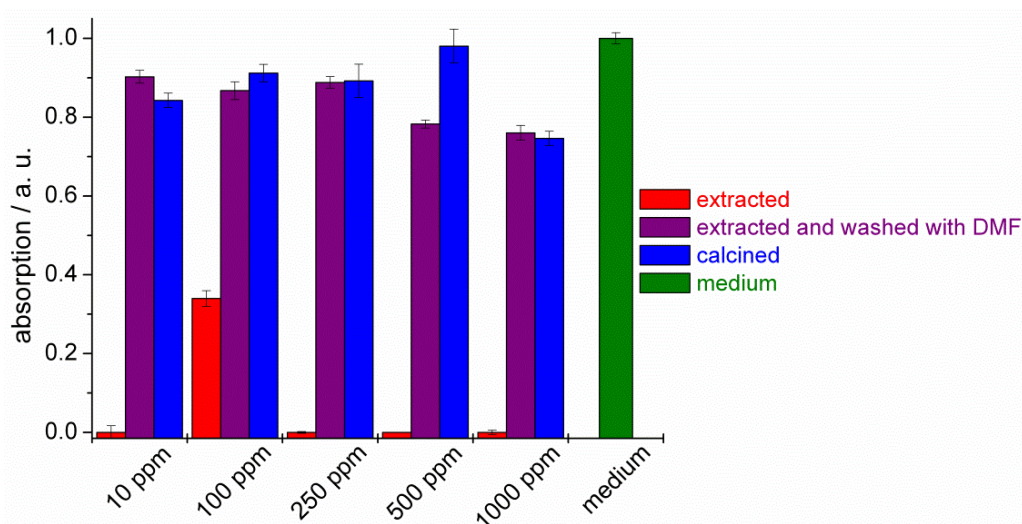


Abb. 5-24: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

Die Ergebnisse des MTT-Tests mit Nanopartikeln, die mit APTES und BSA funktionalisiert wurden, sind in Abb. 5-25 abgebildet. Aus diesen Messungen ist ersichtlich, dass sowohl die calcinierten als auch die extrahierten Nanopartikel eine gute Biokompatibilität zeigen, wobei die Viabilität der Zellen bei den calcinierten Nanopartikeln leicht größer ist. Daraus folgt, dass die Oberflächenmodifizierung mit APTES und BSA keine toxischen Effekte gegenüber HepG2-Zellen zeigt. Da die Reaktion mit BSA an den extrahierten mit APTES-funktionalisierten Nanopartikeln in DMF durchgeführt wird, konnte aus diesen Ergebnissen angenommen werden, dass das SDA aus dem Porensystem bei der Anbindung von BSA gewaschen wird, so dass die Viabilität der Zellen bei extrahierten Nanopartikeln nun besser ist als nach der Immobilisierung von APTES. Diese Hypothese wurde daher an den

unfunktionalisierten extrahierten Nanopartikeln sowie an extrahierten mit APTES-modifizierten Nanopartikeln getestet, indem die extrahierten Nanopartikel mit DMF gewaschen wurden. Diese Ergebnisse wurden bereits in vorherigen Kapiteln besprochen (s. Abb. 5-7 und 5-24). Die kleinen Unterschiede in der Viabilität der Zellen zwischen den extrahierten und calcinierten Nanopartikeln, kann dadurch erklärt werden, dass noch sehr geringe Mengen an CTAB in den Poren vorhanden ist, auch nach dem Waschen mit DMF. Jedoch ist die Viabilität der Zellen bei den extrahierten Nanopartikeln so gut, dass das CTAB keine toxischen Auswirkungen mehr zeigt.

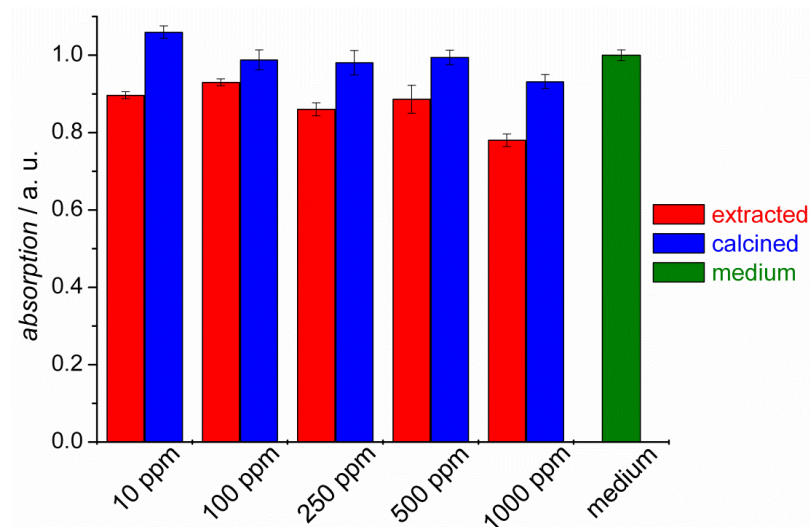


Abb. 5-25: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES und BSA-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

In Abb. 5-26 sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente mit MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System funktionalisiert wurden, gezeigt.

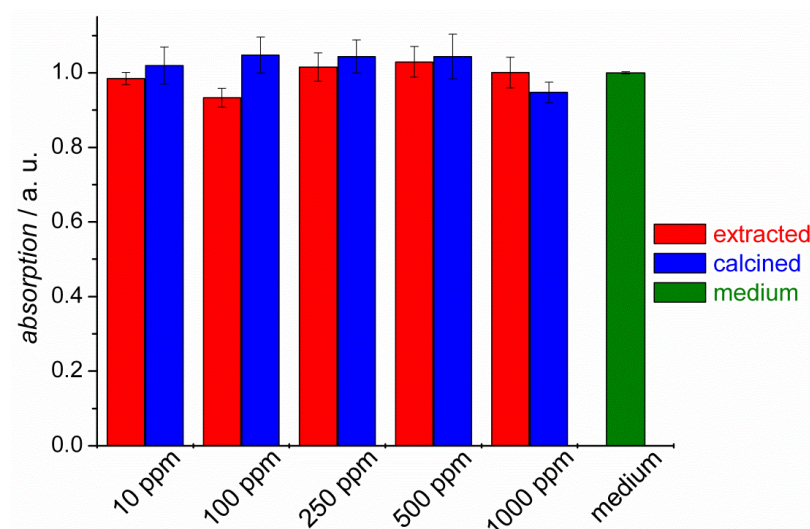


Abb. 5-26: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

In diesem Fall zeigen beide Nanopartikel eine sehr gute Biokompatibilität gegenüber HepG2-Zellen, wobei nur noch sehr geringe Unterschiede zwischen den calcinierten und extrahierten Nanopartikeln ausgemacht werden können. Daraus folgt, dass die mit PolySia über das Linker-System funktionalisierten Nanopartikel keine toxischen Effekte gegenüber HepG2-Zellen innerhalb von 5 Tagen zeigen.

Da die mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel in der Nervenregeneration angewendet werden sollen, wurden diese Nanopartikel zusätzlich mit immortalisierten Schwann-Zellen (ISC) mittels des MTT-Tests untersucht, da die ISC essentiell für die Nervenregeneration sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchung über zwei Wochen sind in Abb. 5-27 dargestellt, die Ergebnisse der Untersuchung über sieben Tage sind im Anhang zu finden.

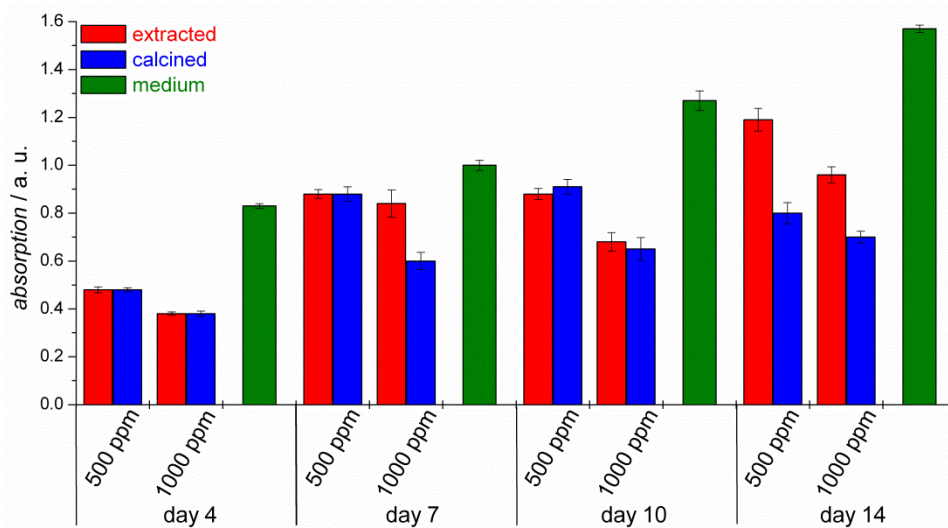


Abb. 5-27: Ergebnisse des MTT-Tests mit immortalisierten Schwann-Zellen (ISC) nach zwei Wochen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

In dem Zellkultorexperiment, das über zwei Wochen lief, wurden nur die beiden höchsten Konzentrationen an Nanopartikeln getestet. Dabei ist ein stetiger Anstieg der Viabilität der Zellen über den gesamten Kultivierungszeitraum zu beobachten, wenn nur Medium zu den Zellen gegeben wird. Bei der Zugabe von Nanopartikeln ist die Viabilität der ISC-Zellen stets geringer als die Viabilität der Zellen im reinen Medium, wobei der Unterschied an Tag 7 sehr gering ist. Außerdem ist zu erkennen, dass die Viabilität der Zellen bei den Nanopartikeln bis zu einer Woche ansteigt. Anschließend sinkt die Viabilität bei den extrahierten Nanopartikeln im Fall der höheren Konzentration leicht, während sie bei der kleineren Konzentration sowie bei beiden Konzentrationen der calcinierten Nanopartikel in etwa gleich bleibt. An Tag 14 kann bei den extrahierten Nanopartikeln nochmals eine Zunahme der Viabilität beobachtet werden, während die Viabilität der Zellen bei den calcinierten Nanopartikeln in etwa konstant bleibt. Bei diesem MTT-Test zeigt die kleinere Konzentration zu jedem Zeitpunkt eine höhere Viabilität der Zellen. Des Weiteren ist kein signifikanter Unterschied zwischen den calcinierten und extrahierten Nanopartikeln zu beobachten, mit Ausnahme von Tag 14, an dem die extrahierten Nanopartikel eine höhere Viabilität aufweisen. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Nanopartikel für ISC-Zellen nicht toxisch sind, da stets eine gute Viabilität der

Zellen beobachtet werden konnte, auch wenn diese nicht der des reinen Mediums entspricht. Auch scheinen die ISC-Zellen ein langsames Wachstum auf den Nanopartikeln zu haben, wodurch erst ab dem siebten Tag eine sehr gute Viabilität beobachtet werden kann.

Zu diesen Zellkulturexperimenten wurden DAPI Färbungen am vierten, siebten und vierzehnten Tag angefertigt, um vorhandene Zellkerne durch blaues fluoreszieren sichtbar zu machen. Die Färbungen von den Nanopartikeln, die in einer Konzentration von 500 ppm kultiviert wurden, sind in Abb. 5-28 zu sehen, während die Färbungen mit einer Konzentration von 1000 ppm dem Anhang zu entnehmen sind.

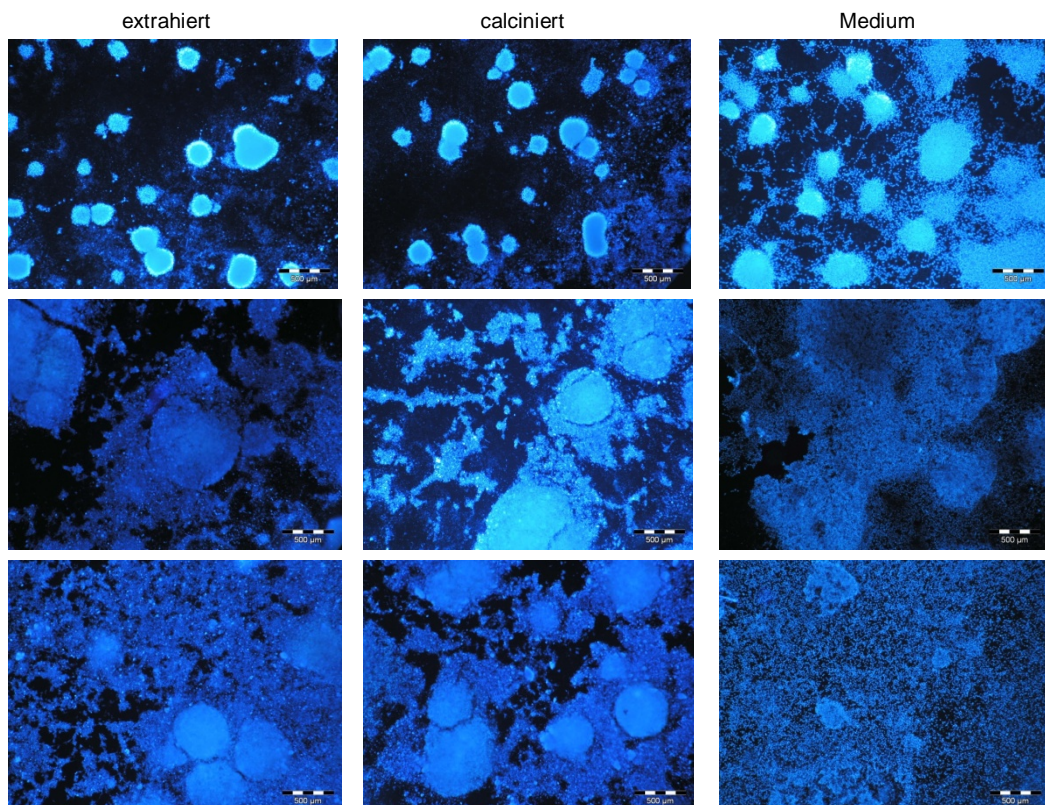


Abb. 5-28: DAPI Färbungen der Zellkulturexperimente mit ISC-Zellen von reinem Medium (rechts) sowie extrahierten (links) und calcinierten (Mitte) MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System funktionalisiert wurden. Diese wurden mit einer Konzentration von 500 ppm an Tag 4 (oben), Tag 7 (Mitte) und Tag 14 (unten) getestet.

Auf allen Bildern kann ein blaues Fluoreszieren beobachtet werden. Werden die Zellen in reinem Medium kultiviert, können einzelne sehr kleine Punkte beobachtet werden, die den Zellkernen zugeordnet werden können. Sind Nanopartikel bei der Kultivierung vorhanden, können größere Aggregate beobachtet werden, die zum Teil blau fluoreszieren. Anhand der Bilder, die von den Kultivierungen mit Nanopartikeln gemacht wurden, ist erneut die Tendenz der Nanopartikel sich zu großen Agglomeraten zusammenzulagern zu erkennen, da sich die Nanopartikel bereits am vierten Tag der Kultivierung abgesetzt haben. Sie konnten auch beim Waschen der Zellen nicht abgespült werden, wodurch ein Nanopartikelfilm auf den Zellen entstand. Durch diesen Nanopartikelfilm sind die Zellen bzw. die Zellkerne nicht mehr

deutlich sichtbar und die DAPI Färbungen nicht aussagekräftig im Bezug auf die Färbung der Zellen, da teilweise sehr große Aggregate, die blau fluoreszieren, zu erkennen sind. Diese Agglomeration könnte auch ein Grund für das schlechtere Wachstum der Zellen in Gegenwart der Nanopartikel sein.

5.3.2 Kolloidale mesoporöse Silica-Nanopartikel

Der Erfolg der Anbindung von PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA an calcinierten kolloidalen mesoporösen Silica-Nanopartikeln (CMS) wurde mit der IR-Spektroskopie untersucht. Die IR-Spektren nach jedem Schritt sind in Abb. 5-29 gezeigt.

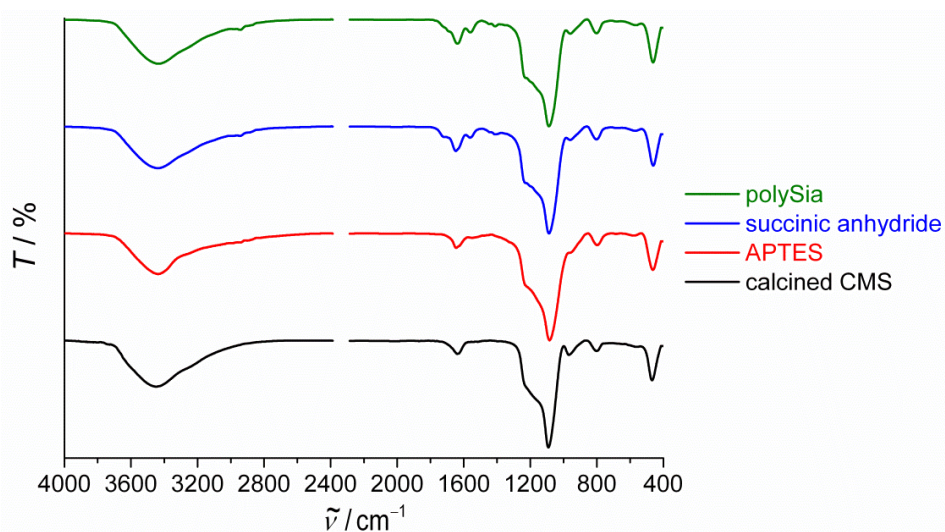


Abb. 5-29: IR-Spektren der calcinierten CMS-Nanopartikel, nach den einzelnen Reaktionsschritten des Linker-Systems.

Bei diesen Nanopartikeln können nach der Immobilisierung von APTES zwei sehr schwache Banden bei 2937 und 2885 cm^{-1} beobachtet werden, die den Alkylgruppen des Silans zugeordnet werden können. Nach einer weiteren Umsetzung mit BSA sind bei diesen Nanopartikeln ebenfalls drei neue Banden zu erkennen. Dabei können die Banden bei 1645 und 1564 cm^{-1} auf die Schwingung der neu gebildeten Amidbindung zurückgeführt werden, während die Bande bei 1734 cm^{-1} auf freie Carboxylgruppen hindeutet, die für eine Reaktion mit der deacetylierten PolySia notwendig sind. Nach der Funktionalisierung mit PolySia nimmt die Intensität der Bande der Carboxylgruppe ab, was auf eine erfolgreiche Anbindung der PolySia hindeutet. Außerdem kann eine Zunahme der Intensität der Amidbanden beobachtet werden, woraus auf eine neu gebildete Amidbindung geschlossen werden kann. Die Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-9 zu entnehmen.

Tab. 5-9: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-29 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

APTES	BSA	PolySia	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2937	2946	2931	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2885	2879	2872	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	1734	-	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1645	1645	1637	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
-	1564	1549	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
-	1408	1423	(C-H)-Deformationsschwingung	APTES, BSA	[163]
1091	1097	1083	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
950	957	950	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
809	802	802	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
469	462	462	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Des Weiteren wurden thermogravimetrische Messungen nach jedem Funktionalisierungsschritt durchgeführt. Eine tabellarische Zusammenfassung der TG-Messungen ist in Tabelle 5-10 gezeigt. Die dazugehörigen Thermogramme sind im Anhang dargestellt.

Tab. 5-10: Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen der calcinierten CMS-Nanopartikel, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.

APTES	BSA	PolySia	Zuordnung	im Temperaturbereich
4.6 %	3.3 %	12.6 %	adsorbiertes Wasser	25–150 °C
14 %	7.2 %	9.8 %	Verbrennung der Organik	150–300 °C
0.5 %	14.6 %	12.4 %	Verbrennung der Organik	300–600 °C
0.5 %	1.9 %	1.3 %	Dehydroxylierung des Silica	600–1000 °C
80.9 %	73 %	63.9 %	Restmasse	-

Die zu beobachtenden Massenverluste von 4.5 % für die mit APTES-funktionalisierten, 3.3 % bei den mit BSA-modifizierten und von 12.6 % bei den mit PolySia-immobilisierten Nanopartikeln, bis zu einer Temperatur von etwa 150 °C, sind dem Verlust von Wasser zuzuordnen. Dabei kann der sehr große Massenverlust bei den Nanopartikeln, die mit PolySia funktionalisiert wurden, auf die sehr gute Hydrophilie der PolySia zurückgeführt werden, wodurch mehr Wasser an die Oberfläche adsorbiert. Bei der Anbindung von APTES ist ein einstufiger Massenverlust von 14 % zwischen 150 und 650 °C zu erkennen, der auf eine Verbrennung der Organik des Silans zurückgeführt werden kann. Nach der Umsetzung mit BSA tritt ein Massenverlust über zwei Stufen von 7.2 % und 14.6 % auf, der durch die Verbrennung der Organik entsteht. Daher kann dieser der Verbrennung von APTES und BSA zugeordnet werden. Da dieser insgesamt größer ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Anbindung von BSA erfolgreich war. Nach weiterer Umsetzung mit PolySia ist ebenfalls ein zweistufiger Massenverlust im Temperaturbereich zwischen 150 °C und 550 °C zu beobachten, der der schrittweisen Verbrennung der Organik zugeordnet werden kann. Im Vergleich zu dem Thermogramm der Nanopartikel, die mit BSA modifiziert wurden, ist die erste Stufe mit 9.8 % größer, während die zweite Stufe von 12.4 % einen etwas kleineren

Massenverlust zeigt. Insgesamt ist die Verbrennung der Organik geringfügig größer als bei den mit BSA-funktionalisierten Nanopartikeln. Der letzte Massenverlust geht bei allen drei Thermogrammen auf die Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zurück.

Von den funktionalisierten CMS-Nanopartikeln wurden DLS-Messungen aufgenommen, um die Größe und das Agglomerationsverhalten zu beobachten. Die Daten sind in Abb. 5-30 dargestellt.

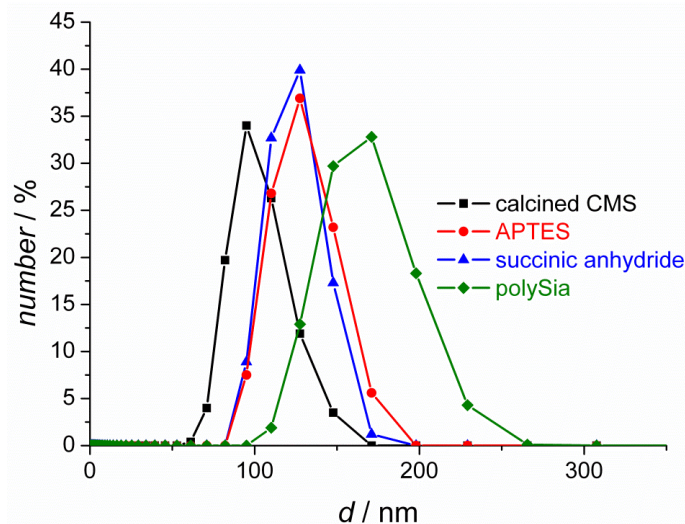


Abb. 5-30: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten CMS-Nanopartikel, die mittels des Linker-Systems mit Polysialinsäure funktionalisiert wurden.

Daraus ist zu entnehmen, dass mit der APTES-Funktionalisierung der CMS-Nanopartikel eine Zunahme der Größe der Primärpartikel von 95 nm auf 126 nm einhergeht, die bei weiterer Umsetzung mit BSA konstant bleibt. Die Größenweitenverteilung bleibt im Vergleich konstant und liegt nach beiden Funktionalisierungsschritten etwa zwischen 80 und 200 nm. Diese Vergrößerung deutet darauf hin, dass die Funktionalisierungsschicht auf der Oberfläche der Nanopartikel zu dieser Vergrößerung beiträgt und die weiten Größenverteilungen zeigen auch bei diesen Nanopartikeln, dass sich Aggregate ausbilden. Nach der Immobilisierung der PolySia kann eine weitere Zunahme der Primärpartikelgröße auf 170 nm beobachtet werden, während die Größenverteilung breiter wird und zwischen 90 und 260 nm liegt. Daher kann angenommen werden, dass die Polysialinsäure, die vermutlich als Knäuel an der Oberfläche vorliegt und somit viel Platz beansprucht, bei den DLS-Messungen mit detektiert wird, wodurch sich die größere Primärpartikelgröße erklären ließe. Des Weiteren ist zu sagen, dass auch nach der Funktionalisierung die Tendenz zur Agglomeratbildung weiterhin vorliegt, was sich in den breiten Größenverteilungen zeigt.

Um zu überprüfen, ob die Immobilisierungen nur an der Oberfläche oder auch im Porensystem erfolgen, wurden Stickstoff-Sorptionsmessungen an den funktionalisierten Nanopartikeln durchgeführt. Ein Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode ermittelt wurden, ist in Abb. 5-31 dargestellt. Die Sorptionsisothermen sind dem Anhang zu entnehmen. Anhand der Porenvolumen ist zu erkennen, dass nach jedem Funktionalisierungsschritt das Porenvolumen abnimmt und sich die Größe der Poren

verkleinert, außer nach der Anbindung von PolySia, bei der die Größe der Poren etwa gleich bleibt und nur das Porenvolumen sinkt. Dabei zeigen die mit APTES-funktionalisierten CMS-Nanopartikel eine Porengröße von 1.9 nm, die mit BSA- sowie die mit PolySia-modifizierten Nanopartikel eine Größe von circa 1.7 nm.

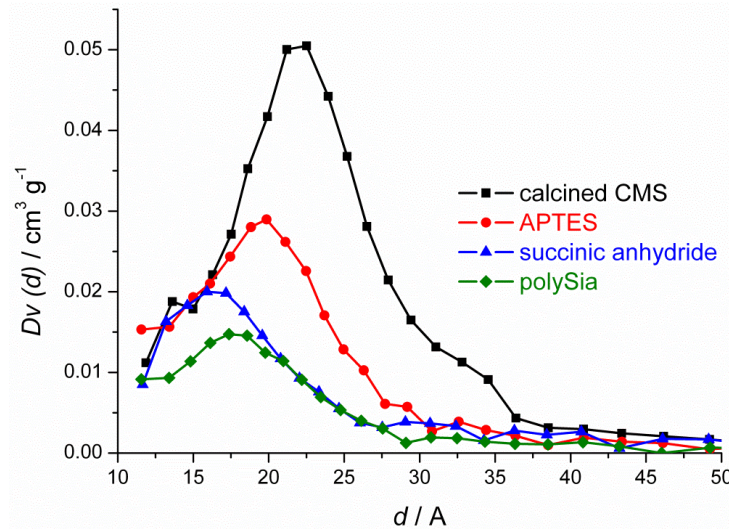


Abb. 5-31: Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten CMS-Nanopartikel, die über das Linker-System mit Polysialinsäure modifiziert wurden.

Für die Bestimmung der immobilisierten Menge an PolySia wurde der TBA-Test an den mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikeln sowie an Nanopartikeln, an denen noch keine PolySia gebunden wurde, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-32 gezeigt.

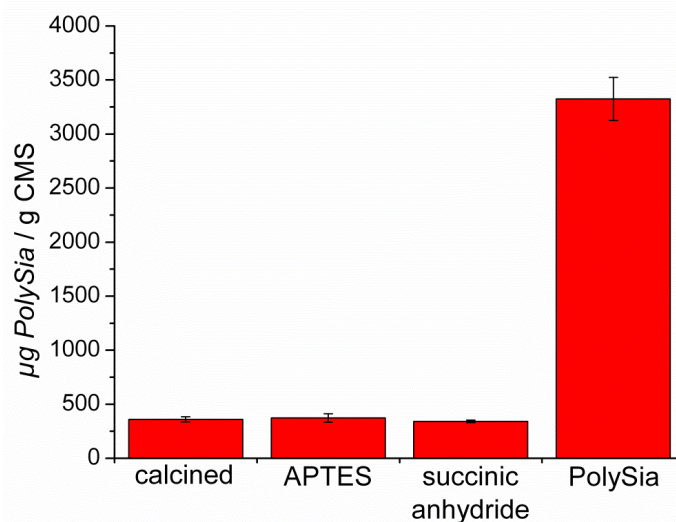


Abb. 5-32: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden. Dabei wurde nach jedem Funktionalisierungsschritt ein TBA-Test durchgeführt.

Aus den Messungen ist ersichtlich, dass die Anbindung von PolySia an calcinierte CMS-Nanopartikel erfolgreich war, da abzüglich des Blindwertes von etwa 400 µg eine Menge von etwa 2900 µg PolySia pro Gramm Nanopartikel gebunden werden konnte. Da bei allen

Nanopartikeln, an denen noch keine PolySia immobilisiert wurde, die gleiche Menge von etwa 400 µg detektiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass an diesen Nanopartikeln keine PolySia angebonden ist und es sich bei diesen Werten um Blindwerte handelt.

Um eine Aussage über die Biokompatibilität der calcinierten CMS-Nanopartikel, die mit PolySia funktionalisiert wurden, zu erhalten, wurden diese mittels des MTT-Tests untersucht. Die Ergebnisse der Experimente mit den HepG2-Zellen sind in Abb. 5-33 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, dass die Viabilität der Zellen bei diesen Nanopartikeln vergleichbar mit der Viabilität der Zellen des reinen Mediums ist, auch wenn die Viabilität bei höheren Konzentrationen leicht abnimmt. Daraus folgt, dass die CMS-Nanopartikel gut biokompatibel gegenüber HepG2-Zellen sind.

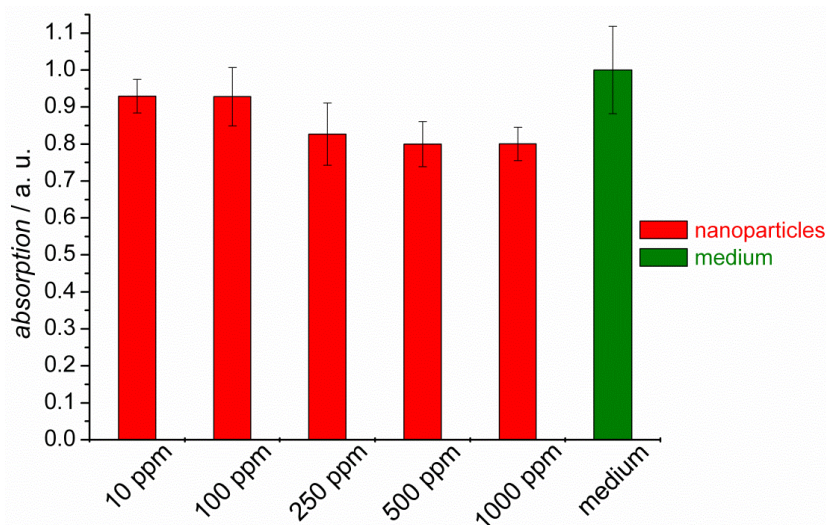


Abb. 5-33: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA funktionalisiert wurden.

Des Weiteren wurden die Nanopartikel mit ISC-Zellen getestet. Diese Ergebnisse sind in Abb. 5-34 gezeigt. In diesem Test ist eine sehr gute Biokompatibilität bei Konzentrationen von 10 und 100 ppm zu beobachten, die mit weiterer Zunahme der Konzentration stark abnimmt. Vergleicht man dieses Ergebnis nach fünf Tagen Kultivierung mit den Ergebnissen der Kultivierung der MCM-41-Nanopartikel, die über zwei Wochen erfolgte (s. Abb. 5-27), kann angenommen werden, dass die Kultivierungsdauer nicht ausreichend war, da bei den MCM-41-Nanopartikel die Viabilität der Zellen bei den beiden höchsten Konzentrationen am vierten Tag etwa vergleichbar ist mit denen aus dem Test mit den CMS-Nanopartikeln, so dass angenommen werden kann, dass die Viabilität bei weiterer Kultivierung vermutlich ansteigt. Bei den MCM-41-Nanopartikeln konnte eine gute Viabilität der Zellen für Konzentrationen von 500 und 1000 ppm erst ab dem siebten Tag beobachtet werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die ISC-Zellen auf den Nanopartikeln langsamer wachsen und erst mit einer höheren Kultivierungsdauer höhere Viabilitäten der Zellen zeigen.

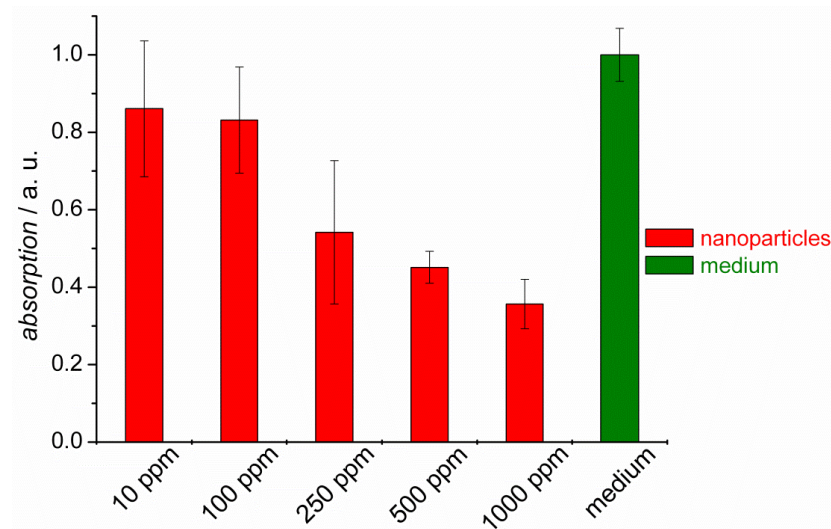


Abb. 5-34: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

Die mit PolySia-immobilisierten CMS-Nanopartikel wurden in einem *in vitro*-Test in gequetschte *N. ischiadicus* Nerven von adulten Ratten injiziert und anschließend kultiviert, um deren Auswirkung auf den Nerven über sieben Tage zu überprüfen. Da nach sieben Tagen bei beiden Färbeprotokollen keine eindeutigen Aussagen über den Aufenthalt der Nanopartikel gemacht werden konnte, sind keine Ergebnisse der Färbungen dargestellt. Außerdem wurden REM-Aufnahmen von Längsschnitten angefertigt, zunächst mit einem „low vacuum-Modus“, um den Nerven nicht zu beschädigen. Diese Aufnahmen sind in Abb. 5-35 abgebildet.

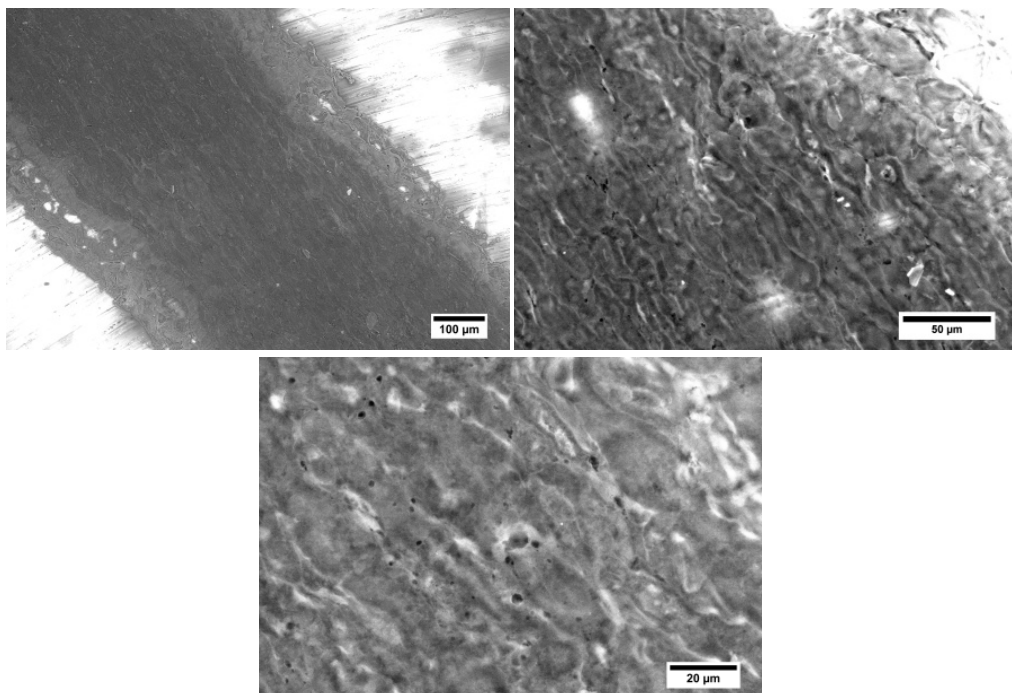


Abb. 5-35: REM-Aufnahmen im „low vacuum-Modus“ von Nervenlängsschnitten, in denen calcinierte mit PolySia-immobilisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-ACI).

Dabei ist deutlich der Längsschnitt des Nerven zu erkennen und bei höherer Vergrößerung wird auch die Struktur des Nerven sichtbar, jedoch sind keine Nanopartikel auszumachen. Dies liegt eventuell daran, dass mit dem REM-ACI nicht höher aufgelöst werden konnte. Die Nanopartikel sind jedoch nur 40 nm groß, so dass diese auf den Aufnahmen nicht zu erkennen sind. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Nanopartikel während der Kultivierung aus dem Nerven wegdiffundiert sind oder sich aufgelöst haben.

Da die Aufnahmen am REM-ACI keinen Aufschluss auf die Nanopartikel gegeben hat, wurden Querschnitte der Nerven nochmals unter dem REM-PCI im Hochvakuum angeschaut. Die Aufnahmen der Nerven sind in Abb. 5-36 gezeigt. Darauf sind an verschiedenen Stellen der Nerven kleine sphärische Punkte zu erkennen. Diese können nicht eindeutig den Nanopartikeln zugeordnet werden, liegen jedoch etwa in deren Größenbereich. Da es keine Axone sein können und die Punkte für Mikrotubuli der Axone nicht geordnet genug vorliegen, kann angenommen werden, dass es sich bei diesen Punkten um injizierte Nanopartikel handelt, die im interstiliellen Raum, das heißt zwischen den Axonen und den Zellen, angeordnet sind. Daher können zu den *in vitro*-Tests im Nerven keine genauen Aussagen über den Aufenthalt der Nanopartikel gemacht werden, da die Ergebnisse nicht aussagekräftig sind. Es könnte sein, dass sich die Nanopartikel noch im Nerven aufhalten oder eventuell aus dem Nerven heraus gespült wurden.

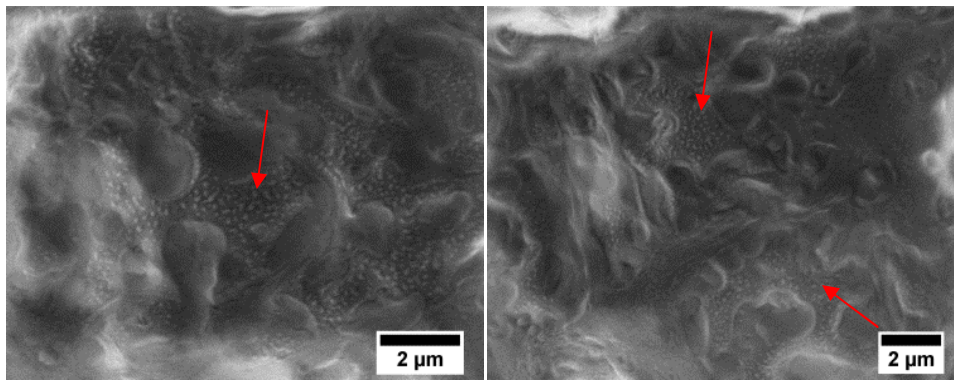


Abb. 5-36: REM-Aufnahmen im Hochvakuum von Nervenquerschnitten, in denen calcinierte mit PolySia-immobilisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-PCI).

Um die Aminogruppen der PolySia zu reacetylieren, wurden die mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel mit Essigsäureanhydrid umgesetzt. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wurden IR-Spektren nach den einzelnen Schritten aufgenommen, die in Abb. 5-37 gezeigt sind. Da bereits nach der Immobilisierung der PolySia keine Banden zu beobachten sind, die direkt der PolySia zugeordnet werden können, ist kein direkter Nachweis für den Erfolg der Reaktion zu erkennen. Allerdings kann nach der Reacetylierung eine leichte Zunahme der Intensität der Bande bei 1642 cm^{-1} beobachtet werden, die einer Amidbindung zugeordnet werden kann, die bei der Reacetylierung entstanden sein sollte. Nach der weiteren Umsetzung mit Natronlauge kann auch eine Zunahme der Intensität der zweiten Bande der Amidschwingung beobachtet werden, die ebenfalls für eine erfolgreiche Reacetylierung spricht. Des Weiteren ist eine Zunahme der Intensität der Bande bei

1701 cm^{-1} zu erkennen, die eventuell der wieder eingeführten Carbonylgruppe zugeordnet werden könnte. Eine Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-11 zu entnehmen.

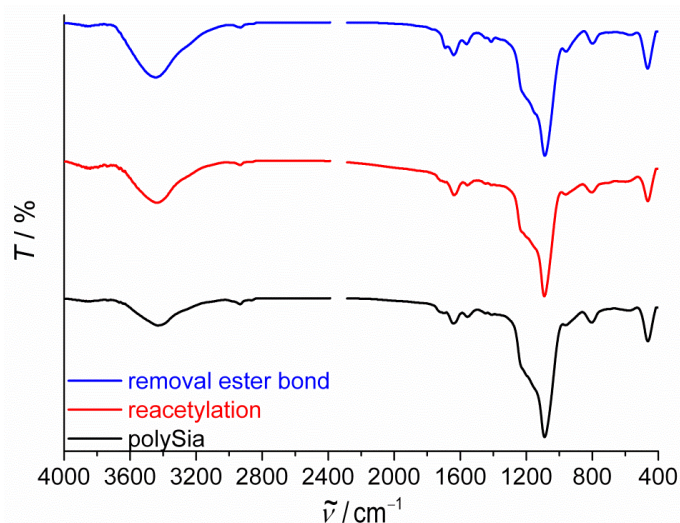


Abb. 5-37: IR-Spektren der calcinierten CMS-Nanopartikel, nach der Umsetzung mit PolySia, nach der Reacetylierung sowie nach der weiteren Umsetzung mit Natronlauge.

Tab. 5-11: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-37 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

PolySia	Et ₂ O	NaOH	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2937	2937	2937	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2870	2878	2863	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
1723	1723	1701	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1642	1642	1634	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1553	1561	1561	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
-	-	1420	(O-H)-Deformationsschwingung	Wasser, PolySia	[163]
1227	1249	1242	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1093	1093	1093	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
953	946	953	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
812	805	805	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
458	465	472	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Außerdem wurde nach der Reacetylierung sowie nach der weiteren Umsetzung mit Natronlauge die Menge an angebundener PolySia mittels des TBA-Tests bestimmt, um Aussagen über negative Effekte auf die Anbindung durch die weiteren Reaktionen zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-38 dargestellt. Anhand dieses Tests ist zu erkennen, dass die Menge an angebundener PolySia während der Reaktionen abnimmt, wobei eine wesentlich größere Abnahme bei der Entfernung der Esterbindungen auftritt. Dies könnte eventuell daran liegen, dass die Amidbindungen, über die die PolySia an die Nanopartikel angebunden ist, von der Natronlauge in wässriger Lösung teilweise angegriffen werden, so dass ein Teil der PolySia durch diese Reaktion abgetrennt wird und somit nicht mehr detektiert werden kann. Jedoch ist nach der Umsetzung mit Natronlauge noch eine große Menge an PolySia gebunden.

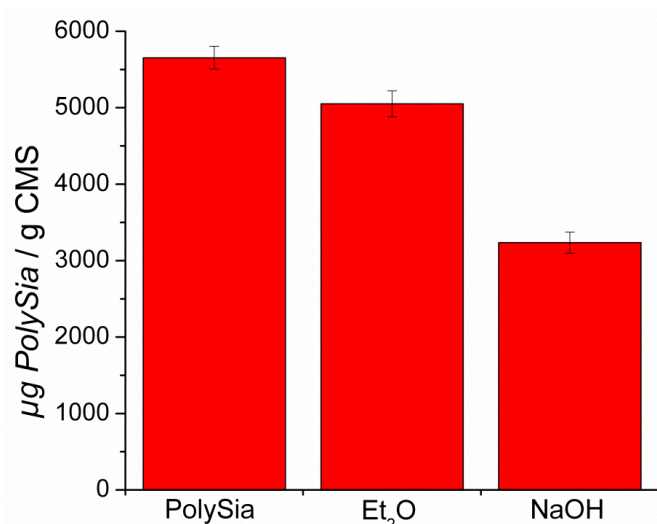


Abb. 5-38: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Umsetzung mit PolySia, nach der Reacetylierung und nach weiterer Umsetzung mit Natronlauge.

5.3.3 Vergleichende Diskussion

Es konnte erfolgreich PolySia an extrahierte und calcinierte MCM-41-Nanopartikel sowie an calcinierte CMS-Nanopartikel gebunden werden. Dabei konnte bei den MCM-41-Nanopartikeln mit 5600 µg PolySia pro Gramm MCM-41 die höchste Menge an extrahierte Nanopartikel gebunden werden. Mit 4800 µg PolySia pro Gramm MCM-41 zeigen die calcinierten MCM-41-Nanopartikel eine geringere Menge, während die calcinierten CMS-Nanopartikel mit 3300 µg PolySia pro Gramm CMS die geringste Menge aufweisen. Der Unterschied der Menge an angebundener PolySia zwischen den extrahierten und calcinierten MCM-41-Nanopartikeln liegt daran, dass bei der Calcination der Nanopartikel Kondensationsreaktionen auftreten, wodurch sich die Anzahl an Silanolgruppen, die für die Funktionalisierung zur Verfügung stehen, verringert. Das die CMS-Nanopartikel eine geringere Menge an immobilisierter PolySia aufweisen als die MCM-41-Nanopartikel, kann daran liegen, dass diese Nanopartikel kleiner sind und ein anderes Porensystem aufweisen, was sich auf die Anbindung auswirken kann. Eventuell kann das hexagonal geordnete Porensystem des MCM-41 besser funktionalisiert werden als das ungeordnete Porensystem der CMS-Nanopartikel. Des Weiteren könnte durch die größere Oberfläche der CMS-Nanopartikel im ersten Schritt bereits mehr APTES gebunden worden sein, so dass dies bei der Anbindung der PolySia stört und somit geringere Mengen angebonden werden konnten. Dass durch eine geringere Menge an APTES höhere Mengen an PolySia gebunden werden können, wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt.^[147,166] Weiterhin konnte an den MCM-41-Nanopartikeln mit Waschreihen gezeigt werden, dass sich ein Teil der PolySia nur auf die Oberfläche der Nanopartikel ablagert, der bereits nach einer Stunde durch Wasser abgewaschen werden konnte. Außerdem wurde gezeigt, dass sich der restliche Teil an gebundener PolySia in eine geringe Menge an ionisch gebundener und eine größere Menge an kovalent gebundener PolySia unterteilt. Die kovalent gebundene Menge konnte auch

nach zwei Wochen nicht abgewaschen werden und ist somit stabil an die Nanopartikel gebunden. Aufgrund der späteren Verwendung der Materialien in biomedizinischen Anwendungen wurden die Nanopartikel in Zellkulturexperimenten mit verschiedenen Zelltypen getestet. Dabei ergab sich, dass die calcinierten MCM-41-Nanopartikel nach jeder Funktionalisierung mit HepG2-Zellen eine gute Viabilität der Zellen zeigten, während die extrahierten Nanopartikel erst nach der BSA-Funktionalisierung gute Viabilitäten der Zellen zeigten. Daraus wurde geschlossen, dass bei der Anbindung von BSA in DMF restliches CTAB aus den Poren gewaschen wurde, wodurch sich die Viabilität der Zellen gegenüber diesen Nanopartikeln verbesserte. Um diese These zu prüfen, wurden extrahierte Nanopartikel mit DMF gewaschen und anschließend mit APTES umgesetzt. Nach dieser Behandlung zeigten auch die extrahierten Nanopartikel eine gute Viabilität der Zellen. Die calcinierten CMS-Nanopartikel, die mit PolySia funktionalisiert wurden, sind ebenfalls gut biokompatibel gegenüber HepG2-Zellen. Des Weiteren wurden die Nanopartikel mit ISC-Zellen getestet, wobei die MCM-41-Nanopartikel, die über zwei Wochen untersucht wurden, einen steten Anstieg der Viabilität der Zellen bis zu einer Woche zeigen, der dann etwa gleich bleibt bzw. leicht sinkt. Auch sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den extrahierten und calcinierten Nanopartikel zu beobachten, mit Ausnahme von Tag 14. Da die Viabilität der Zellen ansteigt und nicht sinkt, kann davon ausgegangen werden, dass die Nanopartikel gut biokompatibel sind, jedoch das Wachstum der Zellen verlangsamen. Bei dem Test mit ISC-Zellen der calcinierten CMS-Nanopartikel, die mit PolySia funktionalisiert wurden, zeigen nur die geringen Konzentrationen eine gute Viabilität der Zellen, die ab einer Konzentration von 250 ppm stark abnimmt. Da diese Nanopartikel nur über fünf Tage getestet wurden, kann es sein, dass die Viabilität erst nach ein paar weiteren Tagen steigen würde, wie es bei den MCM-41-Nanopartikeln der Fall ist, denn die Viabilität der Zellen an Tag 4 der MCM-41-Nanopartikel ist vergleichbar mit der Viabilität der Zellen der hohen Konzentrationen der CMS-Nanopartikeln an Tag 5. Daher sollten diese Nanopartikel nochmals über einen längeren Zeitraum mit den ISC-Zellen getestet werden. Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass mit der Anbindung der PolySia über das Linker-System biokompatible Nanopartikel hergestellt werden können, die mit einem Biomolekül für biomedizinische Anwendungen ausgestattet sind. Außerdem wurden die mit PolySia-immobilisierten CMS-Nanopartikel in gequetschte Nerven von Ratten *in vitro* injiziert. Dabei konnten keine aussagekräftigen Aufnahmen über den Aufenthaltsort der Nanopartikel in den Nerven nach sieben Tagen Kultivierung gemacht werden. Es ist möglich, dass die Nanopartikel durch Medium aus dem Nerven geschwemmt wurden, wodurch sie im Nervenquer- bzw. -längsschnitt nicht mehr zu erkennen sind. Oder die Untersuchungsmethoden sind für den Nachweis der Nanopartikel nicht ausreichend. Dass die PolySia auf den Nanopartikeln nicht angefärbt werden konnte, könnte daran liegen, dass diese eventuell durch Zellen abgebaut wurde. Auch wurde versucht, die angebundene PolySia an den CMS-Nanopartikeln zu reacylieren, um die Acetylgruppe wieder herzustellen. Dabei konnte der Erfolg der Reaktion nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings ist zu erkennen, dass nur ein geringer Teil der PolySia während der Reaktionen

abgewaschen wird, während der Rest stabil an die Nanopartikel gebunden ist. Die Abtrennung der PolySia könnte dabei durch den zweiten Schritt erfolgen, bei dem die Nanopartikel mit Natronlauge behandelt werden, wodurch eventuell die Amidbindung, über die die PolySia gebunden ist, angegriffen und teilweise abgebaut wird.

5.4 Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffes über das Linker-System an CMS-Nanopartikel

Weiterhin wurde versucht, den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin über das Linker-System aus APTES und BSA an calcinierte CMS-Nanopartikel anzubinden, um zu überprüfen, ob der Fluoreszenzfarbstoff unter diesen Bedingungen an die Nanopartikel gebunden werden kann. Die mit Fluoreszenzfarbstoff funktionalisierten Nanopartikel wurden außerdem auf ihre Toxizität gegenüber HepG2-Zellen untersucht.

Zur Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs wurden die mit BSA-modifizierten calcinierten CMS-Nanopartikel mit Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin umgesetzt. Die IR-Spektren von mit BSA-modifizierten Nanopartikeln vor und nach der Umsetzung mit dem Fluoreszenzfarbstoff sind in Abb. 5-39 zu sehen.

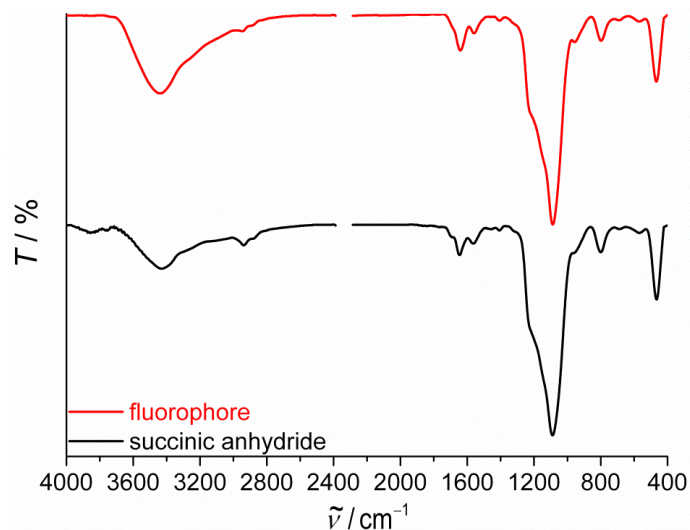


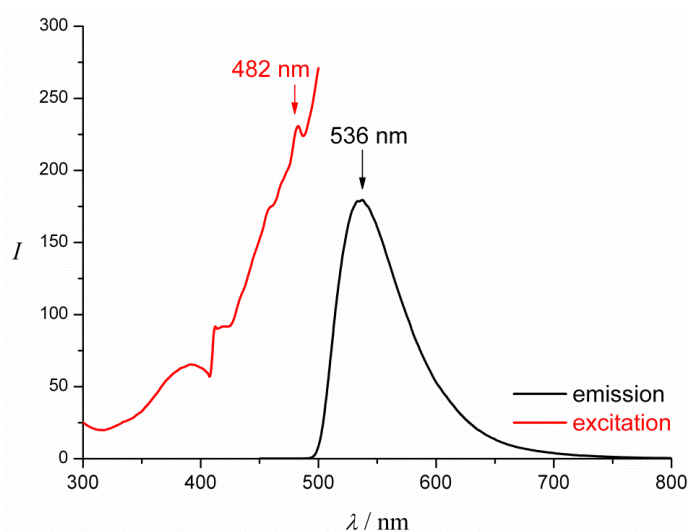
Abb. 5-39: IR-Spektren der mit APTES-funktionalisierten calcinierten CMS-Nanopartikel nach der Umsetzung mit BSA (unten) und nach weiterer Umsetzung mit Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin.

Es ist eine geringfügige Abnahme der Intensität der Bande bei 1707 cm^{-1} zu beobachten, die darauf hindeutet, dass die freien Carboxylgruppen des BSA mit den Aminofunktionen des Fluoreszenzfarbstoffs reagiert haben. Des Weiteren ist eine Zunahme der Intensität der beiden Banden bei 1648 und 1559 cm^{-1} zu erkennen, die einer Amidschwingung zugeordnet werden können. Daher kann angenommen werden, dass eine weitere Amidbindung entstanden ist, woraus folgt, dass die Reaktion erfolgreich abgelaufen ist. Allerdings kann keine Schwingung, die ausschließlich dem Fluoreszenzfarbstoff zuzuordnen wäre, beobachtet werden. Eine Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-12 zu finden.

Tab. 5-12: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-39 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

BSA	Alexa Fluor® 488	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2936	2936	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2877	2877	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
1707	-	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1648	1648	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Alexa	[163]
1559	1551	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Alexa	[163]
1092	1100	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
929	959	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	796	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	471	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um zu untersuchen, ob die Nanopartikel fluoreszieren, wurden Fluoreszenz-Emissions- und Anregungs-Spektren aufgenommen, die in Abb. 5-40 dargestellt sind. Dem Emissionsspektrum ist zu entnehmen, dass die Nanopartikel ein Maximum bei 536 nm aufweisen, welches in etwa dem angegebenen Emissions-Maximum der Literatur des reinen Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin, das bei 520 nm liegt, entspricht.^[96] Die Verschiebung des Maximums kann durch die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die Nanopartikel verursacht werden. Die Intensität der Fluoreszenz von etwa 150 zeigt, dass die Fluoreszenz stark genug für eine Detektion ist. Das dazugehörige Anregungsspektrum wurde bei dem Maximalwert des Emissionsspektrums gemessen. Anhand dieses Spektrums ist ein kleines Maximum bei 482 nm zu erkennen, das auf die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe hinweist, da dieser Wert in etwa mit dem angegebenen Literaturwert von 493 nm übereinstimmt.^[96] Auch bei der Anregung kann die Abweichung des Maximalwerts auf die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die Oberfläche der Nanopartikel zurückgeführt werden.

**Abb. 5-40:** Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren der mit Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin funktionalisierten calcinierten CMS-Nanopartikel unter Verwendung einer Konzentration von $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Des Weiteren wurden die Nanopartikel auf ihre Toxizität gegenüber HepG2-Zellen untersucht. Die Ergebnisse des Zellkulturexperiments sind in Abb. 5-41 gezeigt. Anhand dieser Kultivierungen ist zu erkennen, dass diese Nanopartikel eine gute Biokompatibilität gegenüber HepG2-Zellen zeigen. Dabei haben die Nanopartikel in einer Konzentration von 10 ppm eine vergleichbare Viabilität der Zellen wie beim reinen Medium. Mit zunehmender Konzentration auf 100 ppm nimmt die Viabilität leicht ab. Jedoch ist bei weiterer Erhöhung der Konzentration kaum ein Unterschied in den Viabilitäten zu beobachten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die mit Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten CMS-Nanopartikel nicht toxisch für HepG2-Zellen sind. Daraus folgt, dass die Anbindung über das Linker-System keine toxischen Effekte aufweist, weder wenn Polysialinsäure noch wenn ein Fluoreszenzfarbstoff über dieses System an die Oberfläche gebunden wird.

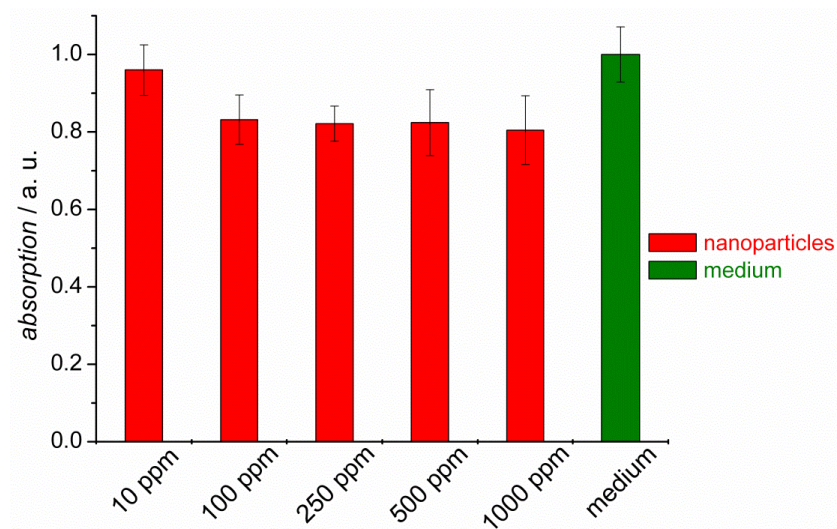


Abb. 5-41: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

5.5 „Click“-Reaktionen nach HUISGEN

Als alternative Anbindungsvariante wurden die extrahierten sowie calcinierten MCM-41-Nanopartikel über die „Click“-Chemie mit Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoffen funktionalisiert. Außerdem wurden diese Nanopartikel für weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf spätere Anwendungen in der Biomedizin verwendet, wie zum Beispiel die Untersuchung der Biokompatibilität der Nanopartikel nach jedem Funktionalisierungsschritt. Des Weiteren soll diese Anbindungsvariante mit dem Linker-System verglichen werden. Auch wurden Kupferanalysen durchgeführt, um die Auswirkung des Kupfers auf die Anbindung über die Kupfer(I)-katalysierte „Click“-Chemie zu zeigen. Weiterhin wurde versucht, die PolySia über eine Kupfer-freie „Click“-Reaktion an die calcinierten CMS-Nanopartikel zu binden.

5.5.1 Anbindung von Azid-modifizierter Polysialinsäure über „Click“-Chemie an MCM-41-Nanopartikel

Für die „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia wurden die mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel verwendet (s. Kapitel 5.3.1). Nach der Einführung einer Alkinfunktion mittels Propiolsäure auf der Oberfläche der Nanopartikel, kann so anschließend eine „Click“-Reaktion zwischen dieser Alkinfunktion und der Azidgruppe der PolySia stattfinden. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels IR-Spektroskopie untersucht. Die IR-Spektren der calcinierten MCM-41-Nanopartikel vor und nach der „Click“-Reaktion sind in Abb. 5-42 zu finden, während die der extrahierten Nanopartikel dem Anhang zu entnehmen sind.

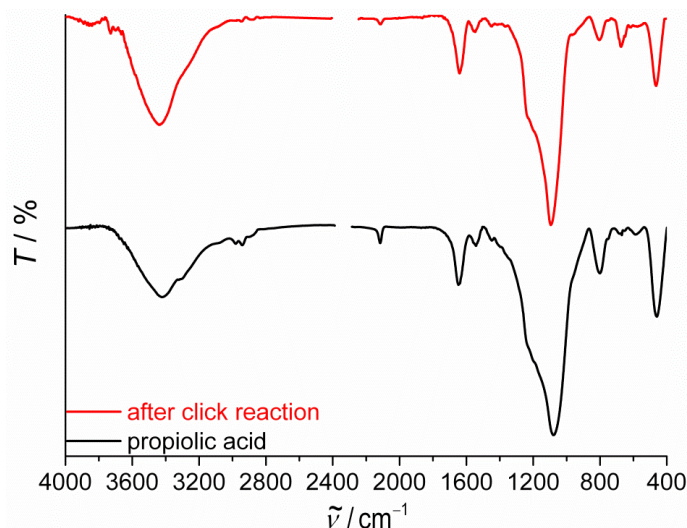


Abb. 5-42: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln nach der Reaktion mit Propiolsäure (unten) sowie nach weiterer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia.

Nach der Umsetzung der mit APTES-modifizierten Nanopartikel mit Propiolsäure sind zwei Banden bei 1641 und 1551 cm⁻¹ zu erkennen, die der in dieser Reaktion entstandenen

Amidbindung zugeordnet werden können. Des Weiteren können die charakteristischen Banden der Alkingruppe bei 3298 und 2114 cm^{-1} beobachtet werden, woraus folgt, dass die Nanopartikel erfolgreich mit einer Alkinfunktion ausgestattet werden konnten, so dass diese in einer „Click“-Reaktion eingesetzt werden können. Nach der „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia kann eine geringe Abnahme der Intensität der Alkinbande bei 2114 cm^{-1} sowie ein Verschwinden der anderen Alkinbande bei 3298 cm^{-1} beobachtet werden, die auf eine erfolgreiche Anbindung der PolySia über die „Click“-Chemie hindeuten. Da die Alkinbande bei 2114 cm^{-1} nicht vollständig verschwindet, kann davon ausgegangen werden, dass nicht alle Alkinfunktionen mit der Azid-modifizierten PolySia reagiert haben. Auch in diesen Spektren ist keine Bande zu erkennen, die ausschließlich der PolySia zugeordnet werden kann. Eine Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-13 zu entnehmen.

Tab. 5-13: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-42 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

Propiolsäure	nach „Click“	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
3298	-	(C-H)-Valenzschwingung (Dreifachbindung)	Propiolsäure	[163]
2995	-	(C-H)-Valenzschwingung	APTES	[163]
2944	2951	(C-H)-Valenzschwingung	APTES	[163]
2884	2892	(C-H)-Valenzschwingung	APTES	[163]
2114	2114	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1648	1648	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	APTES + Propiolsäure	[163]
1544	1551	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	APTES + Propiolsäure	[163]
1225	1248	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1085	1092	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
-	944	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
796	811	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
-	678	(C=C)-Deformationsschwingung (Ring)	Triazol-Ring	[163]
471	471	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Zu den IR-Spektren wurde nach jeder Stufe eine thermogravimetrische Messung durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der thermogravimetrischen Messungen ist Tabelle 5-14 zu entnehmen, während die Thermogramme im Anhang zu finden sind. Dabei kann die erste Stufe von 2.1 % für die mit Propiolsäure-funktionalisierten Nanopartikel und von 3.6 % für die Nanopartikel, die mit Azid-modifizierter PolySia umgesetzt wurden, einem Verlust von adsorbiertem Wasser zugeordnet werden. Nach der Funktionalisierung mit Propiolsäure kann der zweite Massenverlust von 18.1 % auf die Verbrennung der Organik, bestehend aus dem angebondenen APTES und der Propiolsäure, zurückgeführt werden. Dabei ist zu erkennen, dass dieser Massenverlust nach der Reaktion mit Propiolsäure wesentlich größer ist, als bei den Nanopartikeln, die ausschließlich mit APTES funktionalisiert wurden (s. Abb. 5-25). Bei den Nanopartikeln, die anschließend mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden, ist ein Massenverlust von 31.4 % zu beobachten, der der Verbrennung der Organik zugeordnet werden kann. Dieser Massenverlust ist größer als bei den Nanopartikeln, die noch nicht in der „Click“-Reaktion umgesetzt wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Azid-modifizierte

PolySia erfolgreich mittels „Click“-Chemie an die Alkinfunktionalisierte Oberfläche von MCM-41-Nanopartikeln binden kann. Die letzte Stufe von 1.7 % bei den mit Propiolsäure-funktionalisierten Nanopartikeln und von 3 % bei den Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden, ist der Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zuzuschreiben.

Tab. 5-14: Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia umgesetzt wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.

APTES	Propiolsäure	nach „Click“	Zuordnung	im Temperaturbereich
9.6 %	2.1 %	3.6 %	adsorbiertes Wasser	25–150 °C
10 %	18.1 %	31.4 %	Verbrennung der Organik	150–550 °C
1.6 %	1.7 %	3 %	Dehydroxylierung des Silica	550–1000 °C
78.8 %	78.1 %	62 %	Restmasse	–

Zur Untersuchung der Größe der Nanopartikel sowie deren Dispersionsverhalten, wurden DLS-Messungen an in Ethanol dispergierten calcinierten MCM-41-Nanopartikeln durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 5-43 gezeigt sind. Die Ergebnisse der Messungen mit den extrahierten Nanopartikeln sind im Anhang zu finden.

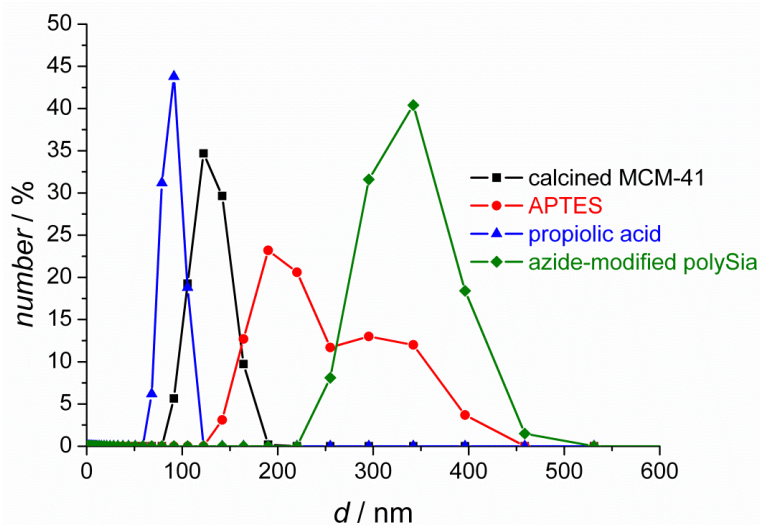


Abb. 5-43: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Alkinfunktion ausgestattet und anschließend mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.

Nach der bereits in Kapitel 5.3.1 erwähnten Zunahme der Größe der Primärpartikel von 125 nm auf circa 200 nm der mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel, kann nach einer weiteren Funktionalisierung mit Propiolsäure eine Primärpartikelgröße von 90 nm beobachtet werden, die kleiner ist als die der unfunktionalisierten Nanopartikel. Auch die Größenweitenverteilung, die zwischen 55 und 120 nm liegt, ist schmäler als die der unfunktionalisierten Nanopartikel. Dies deutet darauf hin, dass die mit Propiolsäure-modifizierten Nanopartikel nicht so stark zur Agglomeration neigen und deshalb die Größe der Nanopartikel genauer gemessen werden kann. Daher kann vermutet werden, dass nach

der Funktionalisierung mit Propiolsäure eventuell elektrostatische oder andere abstoßende Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln vorliegen, wodurch diese besser dispergiert werden können. Nach der Umsetzung dieser Nanopartikel in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia ist die Primärgröße von 340 nm der Nanopartikel sehr groß und es ist auch eine sehr breite Größenweitenverteilung zu erkennen. Daraus kann angenommen werden, dass nach der Immobilisierung der PolySia, die Nanopartikel eine stärkere Tendenz zur Zusammenlagerung aufweisen, die sich in den größeren Primärpartikelgrößen sowie in den breiteren Größenweitenverteilungen zeigt.

Um zu überprüfen, ob sich die Morphologie oder die Größe der calcinierten MCM-41-Nanopartikel nach dem Einsatz in der „Click“-Reaktion geändert hat, wurden diese Nanopartikel unter dem REM untersucht. Die Aufnahmen sind in Abb. 5-44 zu sehen. Anhand der REM-Aufnahmen ist ersichtlich, dass sich die sphärische Form sowie die Primärpartikelgröße von 50 bis 80 nm der Nanopartikel nicht verändert haben. Jedoch ist auch zu beobachten, dass die Nanopartikel, die mit Azid-modifizierter PolySia über die „Click“-Chemie funktionalisiert wurden, sehr stark dazu neigen sich zusammenzulagern und ausschließlich in Aggregaten zu finden sind, die mit einer Ultraschallbehandlung nicht zu trennen sind. Dies zeigt sich auch in der breiten Größenweitenverteilung der Nanopartikel bei den DLS-Messungen.

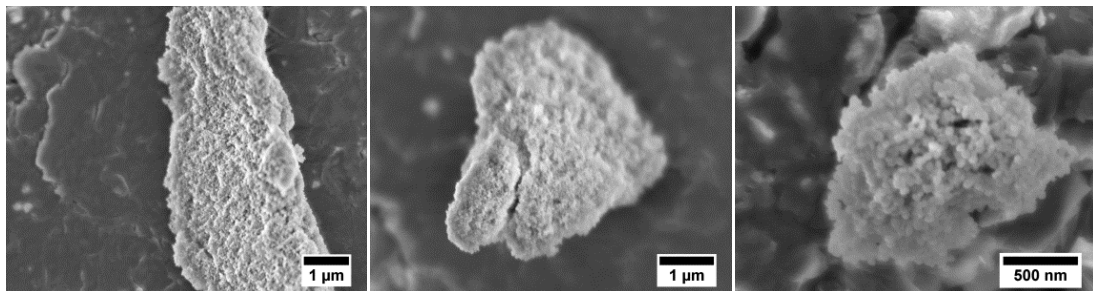


Abb. 5-44: REM-Aufnahmen von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter Polysialinsäure in einer „Click“-Reaktion mit Alkinfunktionalisierten Nanopartikeln eingesetzt wurden (REM-PCI).

Auch von diesen Nanopartikeln wurden Stickstoff-Sorptionsmessungen bei 77 K durchgeführt. Die Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der so funktionalisierten Nanopartikel sind vergleichend in Abb. 5-45 dargestellt, die dazugehörigen Sorptionsisothermen sind im Anhang zu finden. Wie bereits in Kapitel 5.3.1 erwähnt, nimmt das Porenvolumen nach der Funktionalisierung mit APTES sehr stark ab, wobei die Poren nur noch eine Größe von 2.1 nm haben. Nach weiterer Modifizierung dieser Nanopartikel mit Propiolsäure, sind keine Mesoporen mehr vorhanden, da diese vermutlich vollständig durch APTES und Propiolsäure ausgefüllt sind, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Funktionalisierung der Nanopartikel nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch im Porensystem stattfindet. Daher kann auch angenommen werden, dass die „Click“-Reaktion nur an der Oberfläche der Nanopartikel erfolgt, da die Poren bereits mit APTES und Propiolsäure besetzt sind.

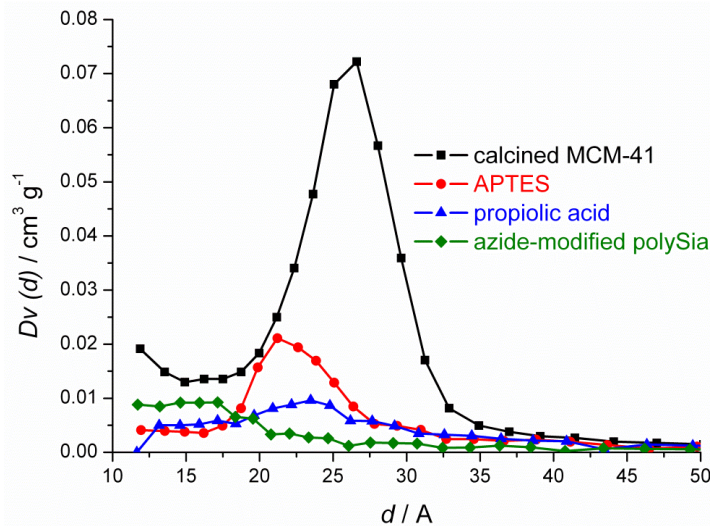


Abb. 5-45: Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit Propiolsäure und anschließend in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia umgesetzt wurden.

Zur Bestimmung der immobilisierten Menge an Azid-modifizierter Polysialinsäure mittels „Click“-Chemie wurde der TBA-Test verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-46 dargestellt.

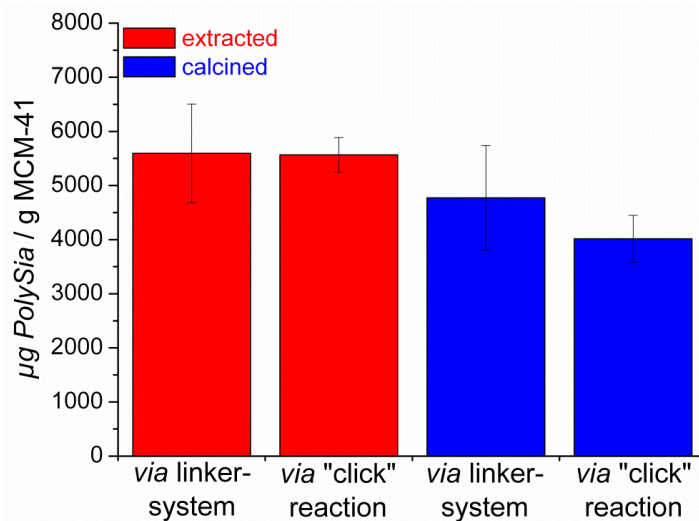


Abb. 5-46: Vergleich der Ergebnisse der TBA-Tests, die an extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41-Nanopartikel durchgeführt wurden. Die Nanopartikel wurden zum einen über das Linker-System (linke Spalten) und zum anderen über die „Click“-Chemie mit Azid-modifizierter PolySia (rechte Spalte) funktionalisiert.

Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass sich mit der „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia in etwa eine vergleichbare Menge an PolySia an die Oberfläche der MCM-41-Nanopartikel binden lässt, wie mit dem Linker-System, obwohl diese in einer wesentlich geringeren Menge als die deacetylierte PolySia beim Linker-System zugegeben wurde (5600 µg pro Gramm extrahierter MCM-41 und 4000 µg pro Gramm calcinierter MCM-41). Da weniger PolySia bei der „Click“-Reaktion eingesetzt wurde und mittels IR-Spektroskopie gezeigt werden konnte, dass nicht alle Alkinfunktionen reagiert haben, kann angenommen werden, dass mit dieser Methode noch größere Mengen an PolySia an die

Oberfläche angebunden werden kann, wenn diese in größerer Menge zur Lösung gegeben werden würde. Auch ist bei dieser Anbindungsvariante eine höhere immobilisierte Menge an PolySia bei den extrahierten Nanopartikeln zu beobachten, was auf eintretende Kondensationsreaktionen bei den calcinierten Nanopartikeln zurückgeführt werden kann, da diese dadurch weniger Silanolgruppen an der Oberfläche besitzen, die für Oberflächenmodifizierungen zur Verfügung stehen.

Die Nanopartikel, die mittels der „Click“-Reaktion funktionalisiert wurden, wurden ebenfalls mit dem MTT-Test auf ihre Toxizität nach jedem Schritt untersucht. Die Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen der Nanopartikel vor der „Click“-Reaktion sind in Abb. 5-47 gezeigt, während die Experimente mit den PC-12-Zellen den Anhang zu entnehmen sind. Die Nanopartikel, die mit Propiolsäure funktionalisiert wurden, zeigen eine gute Viabilität der Zellen, die erst ab einer Konzentration von 1000 ppm leicht abnimmt, woraus folgt, dass diese Nanopartikel keine relevanten toxischen Effekte gegenüber HepG2-Zellen zeigen. Auch gibt es kaum Unterschiede zwischen den extrahierten und calcinierten Nanopartikeln, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das CTAB nach der Funktionalisierung mit Propiolsäure aus den Poren gewaschen wurde.

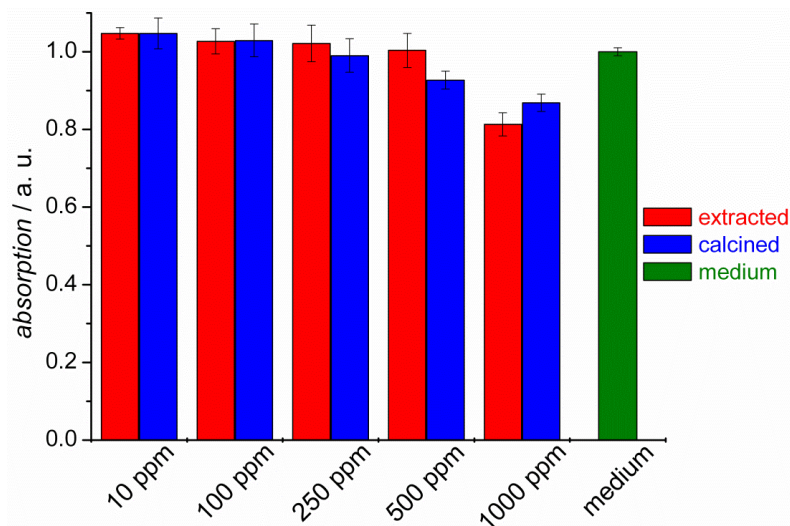


Abb. 5-47: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES und Propiolsäure-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

Die Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen der Nanopartikel nach der „Click“-Reaktion sind in Abb. 5-48 gezeigt, während die Experimente mit den PC-12-Zellen den Anhang zu entnehmen sind. Nach der Umsetzung der Nanopartikel in der „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia ist eine wesentlich höhere Toxizität gegenüber den HepG2-Zellen zu beobachten, da die Viabilität der Zellen bereits ab einer Konzentration von 100 ppm abnimmt, wobei die Abnahme größer wird, je höher die eingesetzte Konzentration ist. Dieser Effekt kann sowohl für die extrahierten als auch für die calcinierten Nanopartikel beobachtet werden. Da bei der Anbindung der PolySia über das Linker-System bereits gezeigt werden konnte, dass PolySia keine toxischen Effekte für HepG2-Zellen zeigt (Abb. 5-26), kann angenommen werden, dass die Toxizität dieser Nanopartikel auf die Anbindungsvariante der

Kupfer(I)-katalysierten „Click“-Chemie zurückgeführt werden kann. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die Toxizität von dem eingesetzten Kupfer stammt, das nicht von den Nanopartikeln abgetrennt werden konnte. Diese Vermutung wird durch die grünliche bzw. bläuliche Färbung der Nanopartikel nach der „Click“-Reaktion unterstützt, was auch von anderen „Click“-Reaktionen bekannt ist.^[43]

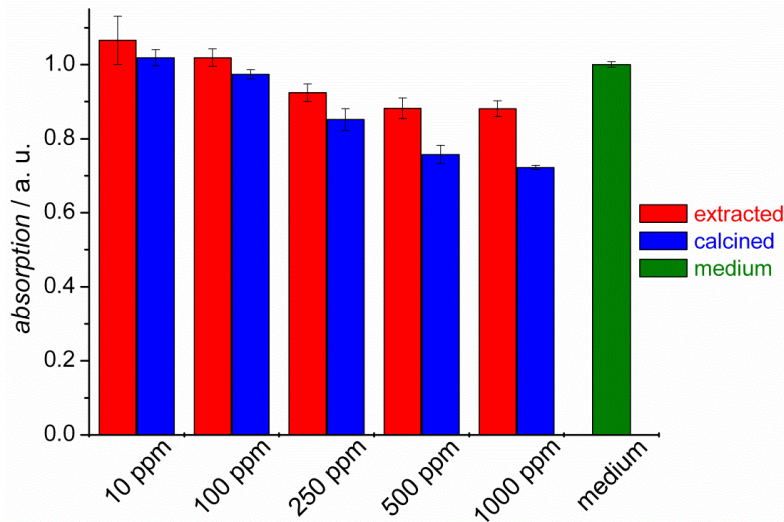


Abb. 5-48: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

Des Weiteren wurden die calcinierten Nanopartikel, die in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia eingesetzt wurden, in Zellkulturexperimenten mit ISC-Zellen über zwei Wochen getestet, um deren Auswirkung auf diese Zellen zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-49 dargestellt.

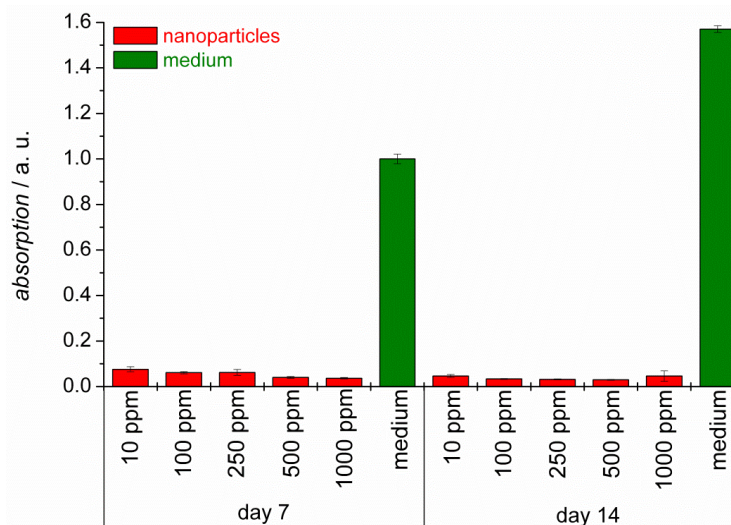


Abb. 5-49: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

Da keine Viabilität der ISC-Zellen bei keiner Konzentration der Nanopartikel zu erkennen ist, weder nach einer Woche noch nach zwei Wochen, kann angenommen werden, dass die Nanopartikel, die in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden, akut toxisch gegenüber diesen Zellen sind. Wie bereits bei den HepG2-Zellen angenommen, kann davon ausgegangen werden, dass dieser toxische Effekt von restlichem Kupfer herrührt, da bei den Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden, eine ansteigende Viabilität der Zellen bis zu einer Woche beobachtet werden kann, die anschließend vergleichbar bleibt und nicht sinkt (s. Abb. 5-27). Da keine Viabilität der ISC-Zellen beobachtet werden kann, jedoch aber in geringen Konzentrationen eine Viabilität von HepG2-Zellen gegenüber diesen Nanopartikeln sichtbar ist, kann daran liegen, dass es sich bei den HepG2-Zellen um humane Zellen aus der Leber handelt, während die ISC-Zellen Gliazellen aus dem Nervensystem sind. Da es sich bei der Leber um ein Abbaorgan handelt, kann es sein, dass diese Zellen etwas resistenter gegenüber Kupfer sind, so dass dadurch die schwächere Toxizität gegenüber diesen Zellen erklärt werden könnte.

Um die Hypothese, das Kupfer für die Toxizität der in der „Click“-Chemie verwendeten Nanopartikel verantwortlich ist, zu überprüfen, wurde der Gehalt an Kupfer von diesen Nanopartikeln mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt. Die ermittelten Mengen an Kupfer sind in Tabelle 5-15 zusammengefasst. Nach der „Click“-Reaktion zeigten die Nanopartikel eine Kupferkonzentration von 1.07 Massenprozent, woraus folgt, dass die Toxizität der Nanopartikel auf restliches Kupfer in den Nanopartikeln zurückgeführt werden kann, welches sich entweder in dem Porensystem der Nanopartikel befindet oder das eventuell durch die angebondenen PolySia-Ketten koordiniert ist. Da das gebildete Triazol die starke Eigenschaft hat, Komplexe mit dem Kupfer zu bilden, kann das Kupfer auch durch das Triazol gebunden sein.^[43] Es kann davon ausgegangen werden, dass das Kupfer vermutlich nur durch spezielle Methoden entfernt werden kann, die einen sehr hohen Aufwand besitzen, da das Kupfer durch das standardmäßige Waschen nicht entfernt werden konnte, auch wenn dies mehrmals erfolgte.

Tab. 5-15: Kupferkonzentrationen, die mittels AAS bestimmt wurden, der MCM-41-Nanopartikel, die in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden sowie die dazugehörige Viabilität der HepG2-Zellen aus den Zellkulturexperimenten, wenn die Nanopartikel in einer Konzentration von 1000 ppm zur Kultivierung gegeben wurden.

Probe	Cu-Konzentration / % Masse	Viabilität (1000 ppm)
calcinerter MCM-41 nach „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia	1.07	72 %
calcinerter MCM-41 nach „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia	1.39	41 %
extrahierter MCM-41 nach „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia	0.90	56 %

5.5.2 Anbindung von Alkin-modifizierter Polysialinsäure über „Click“-Chemie an MCM-41-Nanopartikel

Bei der „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia wurden die Nanopartikel zunächst mit BUTMS funktionalisiert, um anschließend eine Azidfunktion auf die Oberfläche der

Nanopartikel einzuführen, so dass die Nanopartikel „click“-fähig werden. Zur Überprüfung des Erfolgs dieser Modifikationen wurden IR-Spektren nach jedem Schritt aufgenommen. Die Spektren der calcinierten Nanopartikel sind in Abb. 5-50 gezeigt, während die der extrahierten dem Anhang zu entnehmen sind.

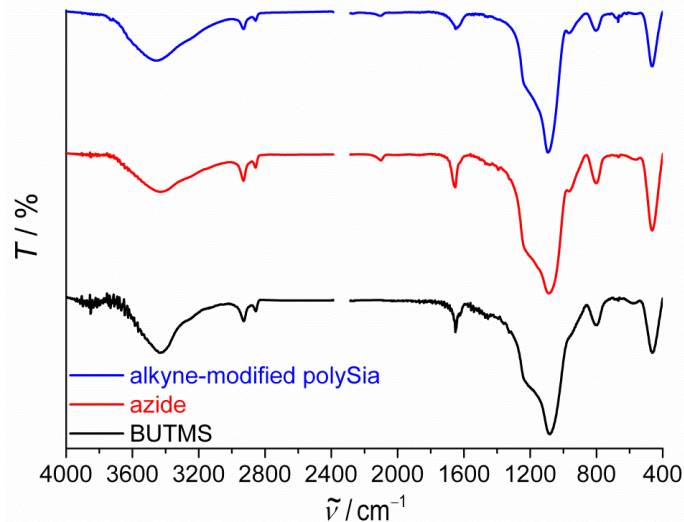


Abb. 5-50: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln nach der Anbindung von BUTMS, nach weiterer Reaktion mit Natriumazid sowie nach der „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia.

Nach der Anbindung von BUTMS sind zwei starke Banden bei 2936 und 2855 cm^{-1} zu erkennen, die der Valenzschwingung der Alkylgruppen des Silans zugeordnet werden können, woraus folgt, dass BUTMS erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden kann. Da die Intensität der Valenzschwingung der Alkylkette wesentlich stärker ist als bei den mit APTES-funktionalisierten Nanopartikeln, ist durch die wesentlich längere Alkylkette des BUTMS zu erklären. Nach der weiteren Umsetzung der Nanopartikel mit Natriumazid, kann eine neue Bande bei 2107 cm^{-1} beobachtet werden, die charakteristisch für Azide ist, so dass die Einführung eines Azids an die Oberfläche erfolgreich gelungen ist. Werden diese Nanopartikel in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia eingesetzt, kann eine leichte Abnahme der Intensität der Azid-Schwingung bei 2107 cm^{-1} beobachtet werden, die auf eine erfolgreiche Reaktion hindeutet. Da die Bande nicht vollständig verschwindet, kann angenommen werden, dass nicht alle Azidgruppen reagiert haben. Des Weiteren ist auch hier keine Bande zu erkennen, die eindeutig der PolySia zugeordnet werden könnte. Eine Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-16 zu finden.

Tab. 5-16: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-50 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

BUTMS	Azid	nach „Click“	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2936	2929	2936	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2855	2862	2855	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
-	2107	2099	(N ₃)-Valenzschwingung	Azid	[163]
1655	1655	1648	(O-H)-Deformationsschwingung	Wasser	[163]
1241	1248	1241	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1092	1092	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
-	952	959	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	811	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
-	-	671	(C=C)-Deformationsschwingung (Ring)	Triazol-Ring	[163]
463	463	471	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Des Weiteren wurden nach jeder Stufe thermogravimetrische Messungen durchgeführt. Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der thermogravimetrischen Messungen ist Tabelle 5-17 zu entnehmen, während die Thermogramme im Anhang zu finden sind.

Tab. 5-17: Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzt wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.

BUTMS	Azid	nach „Click“	Zuordnung	im Temperaturbereich
5.4 %	8.4 %	6.1 %	adsorbiertes Wasser	25–150 °C
8.4 %	13 %	17.3 %	Verbrennung der Organik	150–400 °C
9.4 %			Verbrennung der Organik	300–550 °C
1.3 %	1.2 %	1.7 %	Dehydroxylierung des Silica	550–1000 °C
75.5 %	77.4 %	74.9 %	Restmasse	-

Es ist anhand dieser Messungen ein Massenverlust von 5.4 % für die mit BUTMS-funktionalisierten, von 8.4 % für die mit Azid-modifizierten Nanopartikel und von 6.1 % für die Nanopartikel, die mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzt werden, bis zu einer Temperatur von 150 °C zu erkennen. Dieser kann adsorbiertem Wasser zugeordnet werden. Die Unterschiede bei dieser Stufe können unterschiedlichen Trocknungszeiten und –verfahren zugeschrieben werden. Bei den mit BUTMS-funktionalisierten Nanopartikeln können nachfolgend zwei Stufen von insgesamt 17.8 % beobachtet werden, die auf eine stufenweise Verbrennung der Organik zurückgeführt werden können. Dieser zweistufige Massenverlust liegt vermutlich an dem in der Alkylkette vorhandenen Halogen. Nach Anbindung des Azids erfolgt ein einstufiger Massenverlust von 13 % zwischen 150 und 500 °C, der der Verbrennung der Organik zugeordnet werden kann, wobei dieser vollständig in einer Stufe verläuft. Dass diese Stufe kleiner ist als bei den vorherigen Nanopartikeln, kann daran liegen, dass das Molekulargewicht von Brom in den BUTMS-funktionalisierten Nanopartikeln nahezu doppelt so groß ist wie das von drei Stickstoffatomen bei der Azidfunktionalisierung, so dass sich hierdurch die unterschiedlichen Massenverluste ergeben, da außer den Stickstoffatomen keine weitere Organik an die Nanopartikel gebunden wird. Nach weiterer Umsetzung der Nanopartikel in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia kann

der zweite Massenverlust von 17.3 % der Verbrennung der Organik zugeordnet werden. Dieser ist wesentlich größer als der Massenverlust der mit Azidfunktionalisierten Nanopartikel, woraus folgt, dass die PolySia erfolgreich angebunden werden konnte. Bei allen drei Proben kann der letzte Massenverlust bei Temperaturen über 500 °C auf eine Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zurückgeführt werden.

Von diesen Modifizierungen der Nanopartikel wurden ebenfalls DLS-Messungen aufgenommen, wobei die der calcinierten in Abb. 5-51 dargestellt sind, während die der extrahierten im Anhang zu finden sind. Nach der Funktionalisierung mit BUTMS kann eine Verkleinerung der Primärpartikelgröße von 125 nm auf 60 nm beobachtet werden, wobei die Größenweitenverteilung jedoch breiter wird. Daher kann vermutet werden, dass nach der Funktionalisierung mit BUTMS, Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln auftreten, wodurch diese sich gegenseitig Abstoßen und somit besser dispergiert werden können. Nach weiterer Umsetzung mit Natriumazid steigt die Primärpartikelgröße auf 92 nm an, wobei die breite der Größenverteilung wiederum abnimmt. Die mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzten Nanopartikel zeigen eine sehr starke Tendenz zum Aggregieren, da die Primärpartikelgröße nun bei 290 nm liegt und eine breite Größenweitenverteilung zu erkennen ist. Da dies bei allen mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikeln zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Nanopartikel nach der Immobilisierung noch stärker zur Agglomeration neigen.

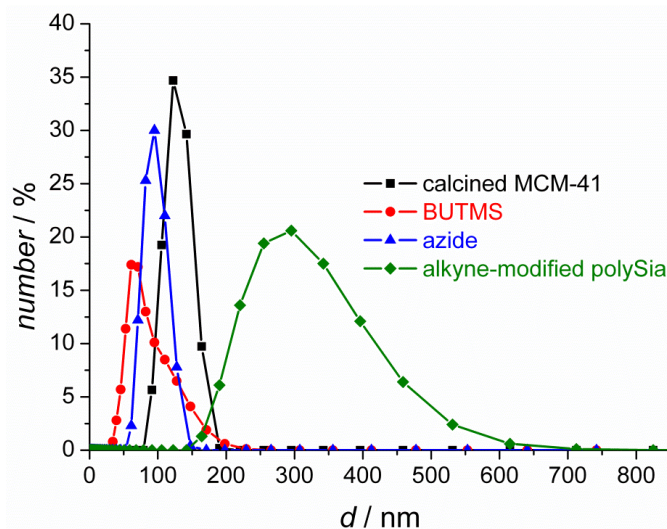


Abb. 5-51: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit BUTMS, Azid und mittels „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia funktionalisiert wurden.

Des Weiteren wurden die Nanopartikel nach jeder Funktionalisierung mittels Stickstoff-Sorptionsmessungen untersucht, um zu bestimmen, ob bei dieser Anbindungsvariante die Poren auch funktionalisiert werden. Die nach der BJH-Methode ermittelten Porenvolumen sind vergleichend in Abb. 5-52 gezeigt, während die Sorptionsisothermen im Anhang zu finden sind. Nach der Funktionalisierung mit BUTMS ist eine deutliche Abnahme des Porenvolumens im Vergleich zu den unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln zu beobachten, wobei die Größe der Poren ebenfalls von 2.7 nm auf 1.5 nm abnimmt. Nach

Anbindung einer Azidgruppe sind keine Poren mehr zu beobachten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese vollständig besetzt sind. Allerdings ist nach der Umsetzung dieser Nanopartikel in der „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia ein etwas größeres Porenvolumen zu beobachten. Eine Vermutung ist, dass durch die langen Alkylketten des BUTMS die Azidgruppen am Poreneingang sitzen und somit bei der „Click“-Reaktion der Alkin-modifizierten PolySia zur Verfügung stehen und dadurch die Poren wieder zum Teil freigeben, da die PolySia nicht mehr in die Poren eingelagert werden kann, weil diese bereits vorher gefüllt waren. Dadurch könnte das Porenvolumen wieder leicht ansteigen, wobei nicht alle in den Poren vorhandenen Azidfunktionen angegriffen werden.

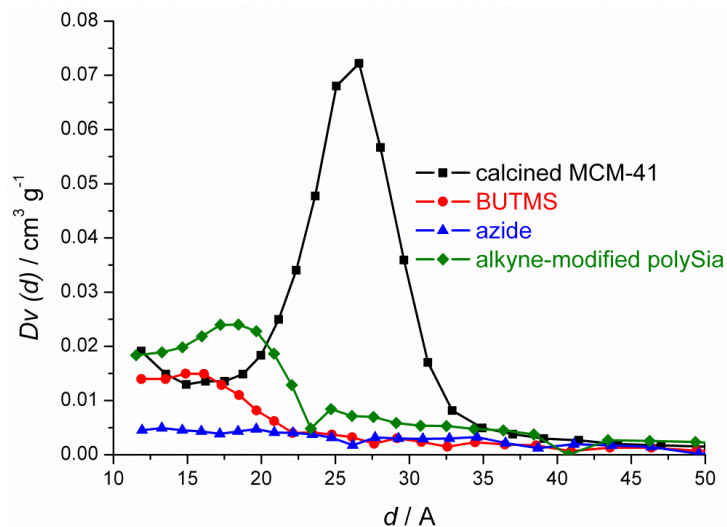


Abb. 5-52: Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit BUTMS, Natriumazid und anschließend in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzt wurden.

Zur Bestimmung der immobilisierten Menge an PolySia, wurde der TBA-Test verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-53 zu sehen. Aus den Ergebnissen folgt, dass eine sehr große Menge an PolySia mittels der „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia an die Oberfläche sowohl von extrahierten (8400 µg pro Gramm MCM-41) als auch von calcinierten (8700 µg pro Gramm MCM-41) MCM-41-Nanopartikeln gebunden werden konnte. Dabei ist die Menge an angebundener PolySia größer als die beim Linker-System oder der „Click“-Reaktion mit der Azid-modifizierten PolySia. Das bei dieser Variante der „Click“-Reaktion eine höhere Menge gebunden werden konnte, liegt vermutlich daran, dass die Azid-modifizierte PolySia nicht so stabil ist unter den wässrigen Reaktionsbedingungen. Ein weiterer Grund für die besseren Resultate, wenn das Azid immobilisiert vorliegt, könnte auch daran liegen, dass das immobilisierte Alkin für die Kupfer-Acetylid Bildung nicht frei zugänglich ist, so dass dieser Komplex erschwert gebildet wird. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten beobachtet.^[71] Da auch bei der Alkin-modifizierten PolySia diese in einer geringeren Menge als bei dem Linker-System zugegeben wurde, kann angenommen werden, dass bei Verwendung von einer größeren Menge eventuell noch mehr PolySia an die Oberfläche gebunden werden kann. Dies zeigt sich auch in den IR-Spektren (s. Abb.

5-50), da die charakteristische Azidbande nicht vollständig verschwindet, so dass davon ausgegangen werden kann, dass noch weitere Azidgruppen für die Funktionalisierung zur Verfügung stehen.

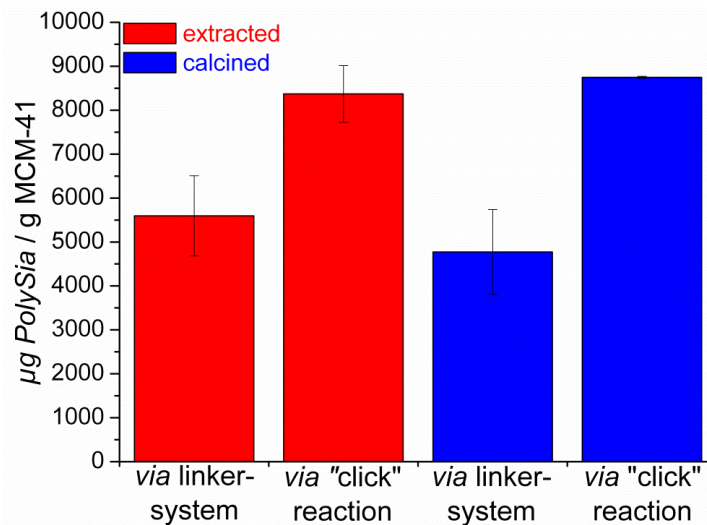


Abb. 5-53: Vergleich der Ergebnisse der TBA-Tests, die an extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41-Nanopartikel durchgeführt wurden. Die Nanopartikel wurden zum einen über das Linker-System (linke Spalten) und zum anderen über die „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia (rechte Spalte) funktionalisiert.

Um die Auswirkung dieser Modifizierungen auf Zellen zu testen, wurden Zellkulturexperimente mit HepG2 und PC-12-Zellen nach jedem Schritt durchgeführt. Die Ergebnisse aller Zelltests mit den PC-12-Zellen sind im Anhang zu finden. Die Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit BUTMS modifiziert wurden, sind in Abb. 5-54 zu sehen.

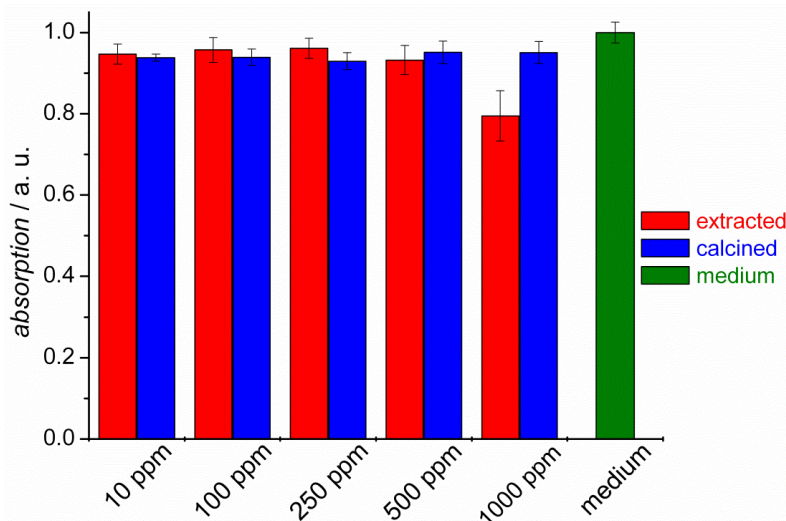


Abb. 5-54: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit BUTMS-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

Nach der Immobilisierung von BUTMS zeigen die Nanopartikel eine sehr gute Biokompatibilität gegenüber den HepG2-Zellen, die sich auch bei Zunahme der

Konzentration nicht verändert, mit Ausnahme von den extrahierten Nanopartikeln, die in einer sehr hohen Konzentration von 1000 ppm zur Kultivierung gegeben wurden. In diesem Fall nimmt die Viabilität der Zellen leicht ab. Die Viabilität der Zellen ist jedoch bei diesen Nanopartikeln noch sehr hoch, woraus folgt, dass BUTMS keine toxischen Auswirkungen auf HepG2-Zellen hat.

Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen an Nanopartikeln, die eine Azidfunktion tragen, sind in Abb. 5-55 gezeigt. Nach der weiteren Umsetzung mit Natriumazid ist die Viabilität der Zellen bereits bei sehr geringen Konzentrationen nicht so hoch wie bei den mit BUTMS funktionalisierten Nanopartikeln und nimmt mit steigenden Konzentrationen ab 250 ppm stark ab. Daraus folgt, dass die Nanopartikel durch die Azidfunktionalisierung toxisch gegenüber HepG2-Zellen sind, besonders wenn hohe Konzentrationen zu den Zellen gegeben werden.

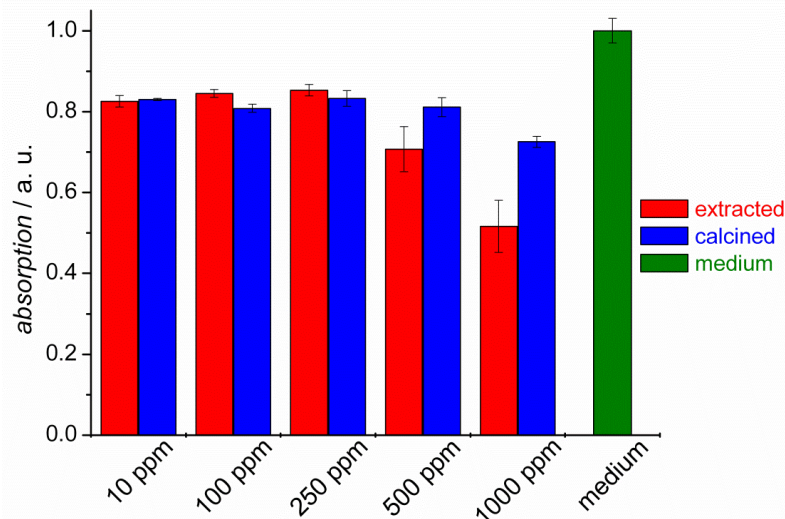


Abb. 5-55: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit BUTMS und Azid-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

In Abb. 5-56 sind die Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen der MCM-41-Nanopartikel, die in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia eingesetzt wurden, zu finden. Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Viabilität der HepG2-Zellen mit steigender Konzentration der Nanopartikel sehr stark sinkt. Daraus folgt, dass diese Nanopartikel sehr stark toxisch sind wie bereits die Nanopartikel, die in der gegensätzlichen „Click“-Reaktion eingesetzt wurden (s. Abb. 5-48). Auch bei diesen Nanopartikeln kann davon ausgegangen werden, dass die Toxizität der Nanopartikel aufgrund von restlichem Kupfer ausgelöst wird, da auch diese Nanopartikel nach der „Click“-Reaktion blau und grün gefärbt waren, wie es auch bei anderen „Click“-Reaktionen beschrieben ist.^[43] Des Weiteren konnte durch die Bestimmung des Gehalts an Kupfer gezeigt werden, dass das Kupfer nicht von den Nanopartikeln abgewaschen werden konnte und somit verantwortlich für die schlechte Biokompatibilität ist. Die Daten der Kupferkonzentrationen sind Tabelle 5-15 zu entnehmen.

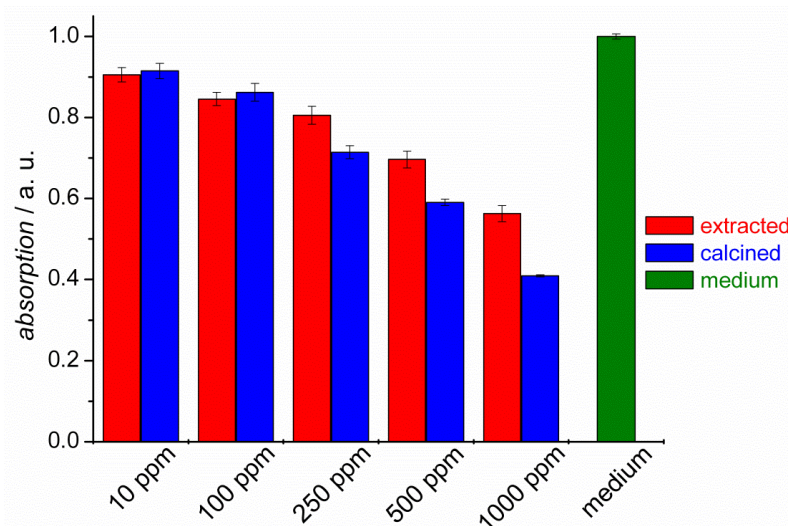


Abb. 5-56: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alkin-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

Da für die Nervenregeneration Schwann-Zellen (ISC) essentiell sind, wurden die extrahierten MCM-41-Nanopartikel, die mit Alkin-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden, mit ISC-Zellen über zwei Wochen kultiviert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-57 dargestellt. Wie bei der entgegengesetzten „Click“-Reaktion zeigen auch diese Nanopartikel eine akute Toxizität gegenüber ISC-Zellen, da keine Viabilität der Zellen beobachtet werden kann, was bedeutet, dass keine Zellen in Anwesenheit dieser Nanopartikel wachsen können aufgrund des bereits nachgewiesenen Gehalts an Kupfer (s. Tabelle 5-15). Auch bei diesen Nanopartikeln kann angenommen werden, dass die schlechtere Viabilität der ISC-Zellen daher kommt, dass die HepG2-Zellen aus humanen Leberzellen stammen, die vermutlich toleranter gegenüber Kupfer sind, da es sich bei der Leber um ein Abbaorgan handelt.

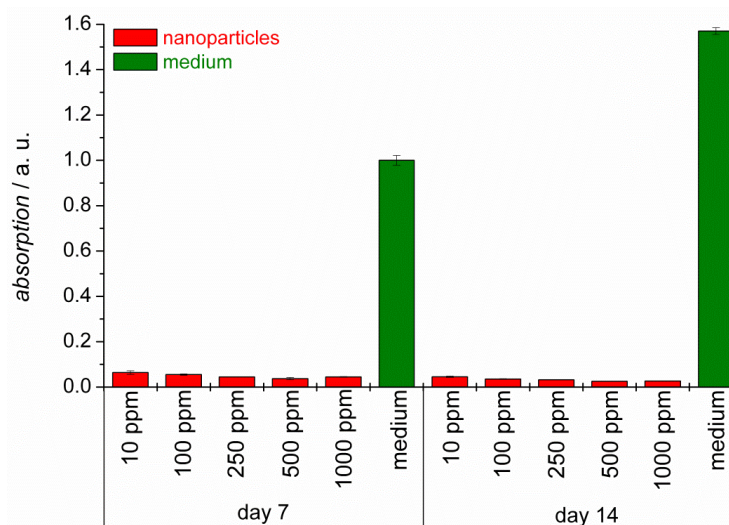


Abb. 5-57: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an extrahierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alkin-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

5.5.3 Anbindung von Polysialinsäure über eine Kupfer-freie „Click“-Reaktion an mit Azid-modifizierten CMS-Nanopartikeln

Für die Kupfer-freie „Click“-Reaktion mit einer alkynyl-analogen Polysialinsäure wurden mit Azidfunktionalisierte CMS-Nanopartikel verwendet, wobei zwei verschiedene Kettenlängen der so modifizierten PolySia getestet wurden (s. Abb. 4-13). Dieses Derivat der PolySia kann nur mit Azidgruppen reagieren und zwar ohne Kupfer als Katalysator. Dabei sind längere Reaktionszeiten notwendig, um einen guten Umsatz zu gewährleisten. Zur Überprüfung des Erfolgs der Reaktion wurden IR-Spektren vor und nach der Kupfer-freien „Click“-Reaktion aufgenommen. Da sich die IR-Spektren gleichen, sind in Abb. 5-58 nur die IR-Spektren der Reaktion der alkynyl-analogen PolySia mit einer Kettenlänge von fünf Kohlenstoffatomen gezeigt. Da keine Änderung der charakteristischen Bande der Azidgruppe bei 2108 cm^{-1} nach der Umsetzung der Nanopartikel in der Kupfer-freien „Click“-Reaktion zu erkennen ist, kann angenommen werden, dass diese Reaktion nicht erfolgreich war oder nur in einem sehr geringen Ausmaß abgelaufen ist, so dass die Abnahme zu gering zum Detektieren war. Eine vergleichende Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-18 zu finden.

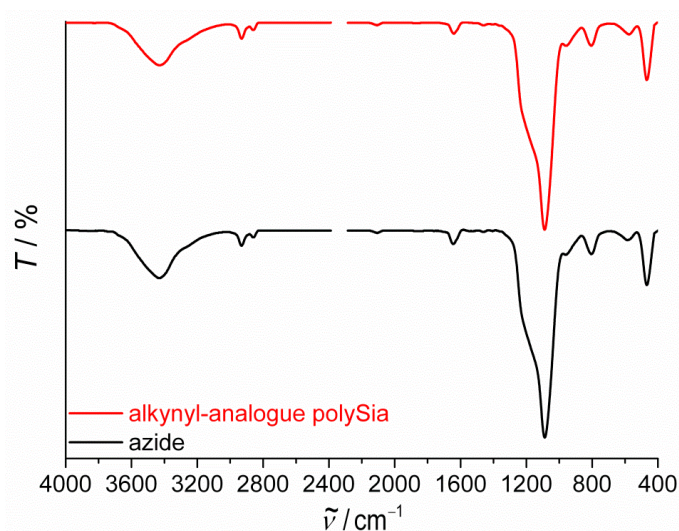


Abb. 5-58: IR-Spektren von calcinierten CMS Nanopartikeln vor und nach der Kupfer-freien „Click“-Reaktion mit der fünfkettigen alkynyl-analogen PolySia.

Tab. 5-18: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-58 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

Azid	nach „Click“	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2937	2930	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2856	2863	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2108	2108	(N ₃)-Valenzschwingung	Azid	[163]
1642	1642	(O-H)-Deformationsschwingung	Wasser	[163]
1227	1227	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1093	1101	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
960	953	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
805	805	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
472	465	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um die genaue Menge an PolySia an diesen Nanopartikeln zu bestimmen, wurde der TBA-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-59 gezeigt. Im Vergleich zu den normalen „Click“-Reaktionen, bei denen Alkin- und Azidgruppen durch Kupfer-Katalyse gekuppelt werden, konnte bei der Kupfer-freien „Click“-Reaktion nur eine sehr geringe Menge zwischen 400 und 450 μg PolySia pro Gramm CMS-Nanopartikel an die Oberfläche gebunden werden, obwohl dieses Derivat in größeren Mengen als die Alkin- bzw. Azid-modifizierte PolySia zur Lösung gegeben wurde. Dabei liegen die Werte etwa im Bereich der Blindwerte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Kupfer-freie „Click“-Reaktion nicht an den Nanopartikeln unter den Bedingungen möglich ist bzw. dass nur eine sehr geringe Menge angehängt werden kann, obwohl die Reaktionszeit bereits um 24 Stunden erhöht wurde.

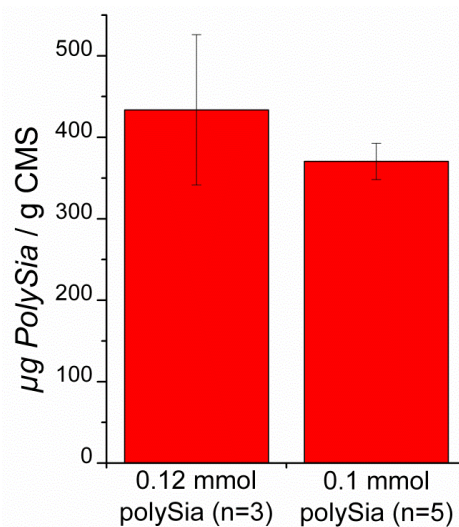


Abb. 5-59: Vergleich der Ergebnisse der TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die in einer Kupfer-freien „Click“-Reaktion mit alkynyl-analoger PolySia umgesetzt wurden.

5.5.4 „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Azid an MCM-41-Nanopartikel

Für die „Click“-Reaktion mit dem kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488-Azid wurden MCM-41-Nanopartikel verwendet, an denen eine Alkingruppe über APTES und Propiolsäure gebunden wurde. Zur Überprüfung des Erfolges der Reaktion wurden IR-Spektren vor und nach der „Click“-Reaktion aufgenommen, die in Abb. 5-60 sowie im Anhang zu sehen sind. Aus den Spektren ist zu erkennen, dass die Intensität der Bande bei 2114 cm^{-1} abgenommen hat, während die Bande bei 3291 cm^{-1} vollständig verschwindet. Da diese Banden der Schwingung der Dreifachbindung der Alkingruppe zugewiesen werden können, ist davon auszugehen, dass die „Click“-Reaktion mit dem Alexa Fluor® 488-Azid erfolgreich war. Dennoch ist nach der Reaktion noch die Bande bei 2114 cm^{-1} zu beobachten, so dass angenommen werden kann, dass nicht alle Alkingruppen in der Reaktion umgesetzt worden sind. Des Weiteren ist keine Bande im Spektrum zu erkennen, die ausschließlich dem Fluoreszenzfarbstoff zugeordnet werden kann. Dies könnte eventuell

daran liegen, dass dieser nur in einer sehr geringen Menge an die Nanopartikel gebunden wurde und somit die Banden nicht detektiert werden können. Eine Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-19 zu entnehmen.

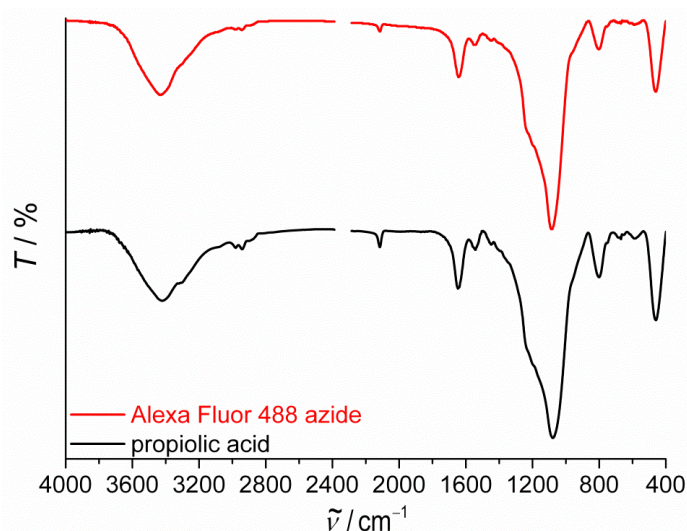


Abb. 5-60: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln vor und nach der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Azid.

Tab. 5-19: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-60 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

Azid	nach „Click“	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
3291	-	(C-H)-Valenzschwingung (Dreifachbindung)	Propiolsäure	[163]
2988	-	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2944	2958	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2884	2877	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2114	2114	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1648	1641	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	APTES + Propiolsäure	[163]
1544	1551	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	APTES + Propiolsäure	[163]
1248	1256	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1085	1085	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
804	796	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	463	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Die Nanopartikel wurden ebenfalls nach der „Click“-Reaktion mittels DLS-Messungen auf ihre Größenverteilung sowie das Aggregationsverhalten untersucht. Die Messungen der calcinierten Nanopartikel sind in Abb. 5-61 dargestellt, die der extrahierten sind im Anhang zu finden. Wie bereits in Kapitel 5.5.1 beschrieben, ist nach der Funktionalisierung mit APTES eine Zunahme der Größe der Primärpartikel zu beobachten, die nach weiterer Umsetzung mit Propiolsäure abnimmt und dabei kleinere Nanopartikel zeigt als die unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikel. Dabei ist ebenfalls erst eine Zunahme der Größenweitenverteilung zu erkennen, die anschließend wieder abnimmt. Nach dem Einsatz der Nanopartikel in der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Azid zeigen sich kaum Veränderungen in den DLS-Messungen. Die Primärpartikelgröße liegt bei etwa 80 nm und

die geringfügig breitere Größenweitenverteilung liegt zwischen 50 und 130 nm. Daraus folgt, dass nach der Immobilisierung des Fluoreszenzfarbstoffs die Nanopartikel weiterhin nicht so stark zur Agglomeration neigen wie die unfunktionalisierten oder die mit APTES-modifizierten Nanopartikel. Dies könnte durch eventuell vorliegende Oberflächenladungen des Fluoreszenzfarbstoffes erklärt werden.

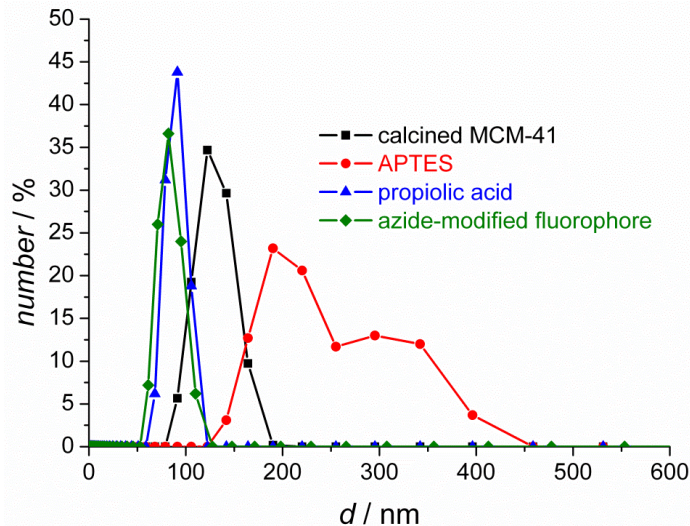


Abb. 5-61: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Alkylfunktion ausgestattet und anschließend mit Alexa Fluor® 488-Azid in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.

Um zu überprüfen, ob die Nanopartikel nach der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Azid fluoreszieren, wurden Fluoreszenz-emissions- und Anregungsspektren aufgenommen, die in Abb. 5-62 zu finden sind.

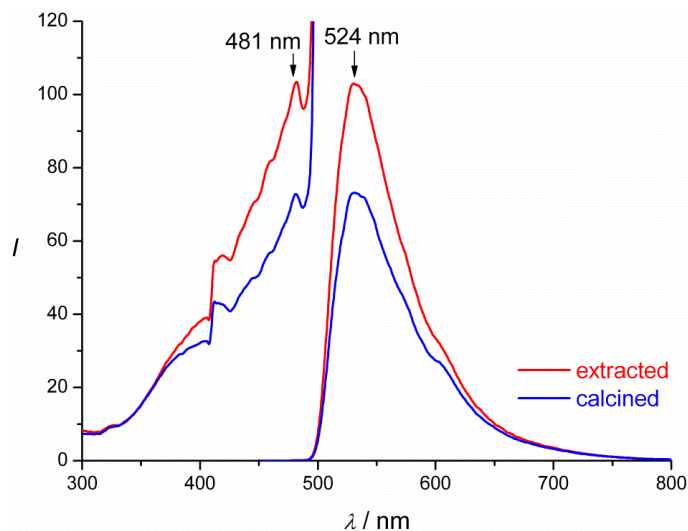


Abb. 5-62: Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren der mit Alexa Fluor® 488-Azid funktionalisierten MCM-41-Nanopartikel unter Verwendung einer Konzentration von $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Anhand der Emissionsspektren ist zu erkennen, dass sowohl die extrahierten als auch die calcinierten MCM-41-Nanopartikel eine Fluoreszenz bei einem Maximum von 524 nm

zeigen, welches etwa mit dem Literaturwert des reinen Alexa Fluor[®] 488 von 519 nm übereinstimmt.^[96] Dabei kann die Verschiebung auf die Anbindung des Farbstoffs an die Nanopartikel zurückgeführt werden. Zudem kann anhand der Intensitäten angenommen werden, dass eine höhere Menge an die extrahierten MCM-41-Nanopartikel gebunden werden konnte, da das Maximum eine höhere Intensität aufweist. Dies stimmt wiederum mit den Ergebnissen der Anbindung der PolySia mittels der „Click“-Chemie als auch mittels des Linker-Systems überein, bei denen ebenfalls höhere Mengen an PolySia an die extrahierten Nanopartikel gebunden werden konnte, da die calcinierten Nanopartikel weniger Silanolgruppen aufweisen aufgrund von eintretenden Kondensationsreaktionen während der Calcination (s. Abb. 5-20 und 5-53). Zu den Emissionsspektren wurden die jeweiligen Anregungsspektren bei den Maximalwerten der Emission aufgenommen. Bei diesen Spektren kann ein Maximum bei 481 nm beobachtet werden, dass der Anregung zugeordnet werden kann. Dabei stimmt der Wert des Maximums ebenfalls in etwa mit den Literaturdaten von 495 nm überein, wobei die Abweichung auch hier der Anbindung zugewiesen werden kann.^[96]

Zur weiteren Untersuchung der Nanopartikel auf ihre Fluoreszenzeigenschaften, wurden Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen aufgenommen, die in Abb. 5-63 gezeigt sind. Es ist auf den Aufnahmen zu erkennen, dass sowohl die extrahierten als auch die calcinierten MCM-41-Nanopartikel grün fluoreszieren. Daraus folgt, dass Alexa Fluor[®] 488-Azid erfolgreich an diese Nanopartikel gebunden werden kann. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass die extrahierten Nanopartikel eine etwas stärkere Fluoreszenz aufweisen, was mit den Messungen am Fluoreszenz-Spektroskop übereinstimmt.

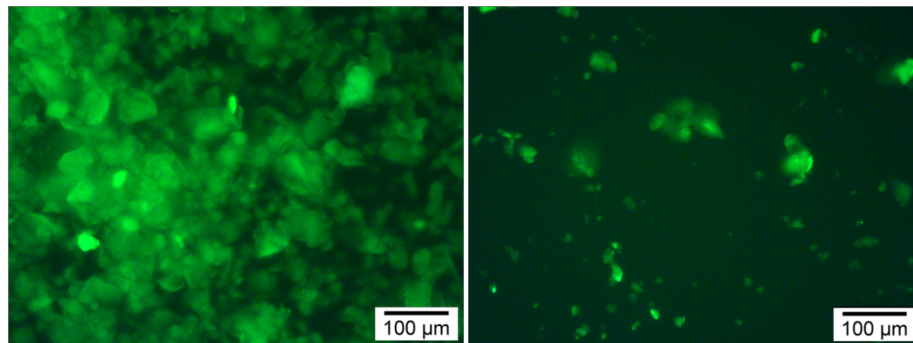


Abb. 5-63: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von extrahierten (links) und calcinierten (rechts) MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor[®] 488-Azid in einer „Click“-Reaktion funktionalisiert wurden.

Nach der „Click“-Reaktion wurde der Einfluss der Nanopartikel auf Zellen getestet, wobei der MTT-Test verwendet wurde. Die Ergebnisse der Untersuchung mit HepG2-Zellen ist Abb. 5-64 zu entnehmen, während die Ergebnisse mit den PC-12-Zellen im Anhang zu finden sind. Daraus ist zu entnehmen, dass die MCM-41-Nanopartikel, die in einer „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor[®] 488-Azid umgesetzt wurden, eine akute Toxizität zeigen, wobei es kaum Unterschiede zwischen den extrahierten und calcinierten Nanopartikeln gibt mit Ausnahme der Konzentration von 10 ppm. Dabei zeigen die extrahierten Nanopartikel noch eine gute Viabilität der Zellen, während die calcinierten Nanopartikel bereits eine schlechtere

Viabilität der Zellen aufweisen. Mit steigender Konzentration nimmt die Viabilität der Zellen für beide Nanopartikel stark ab, woraus folgt, dass diese toxisch für HepG2-Zellen sind. Da bereits bei den Nanopartikeln, die mit PolySia in der „Click“-Chemie umgesetzt wurden, nachgewiesen werden konnte, dass die Toxizität auf restliches Kupfer zurückzuführen ist, ist auch bei diesen Nanopartikeln davon auszugehen, dass Kupfer die schlechte Biokompatibilität hervorruft, da auch diese Nanopartikel nach der Reaktion blau oder grün gefärbt waren (s. Kapitel 5.5.1 und 5.5.2).

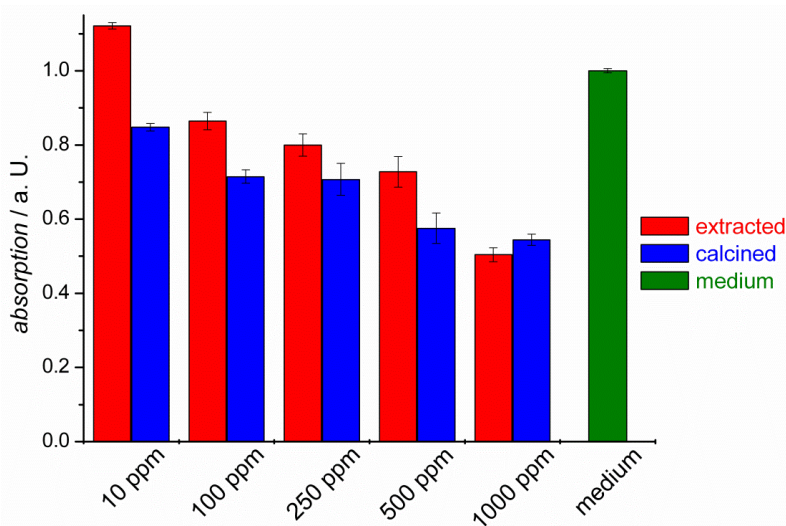


Abb. 5-64: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Azid in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

5.5.5 „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Alkin an MCM-41-Nanopartikel

Für die „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Alkin wurden die mit BUTMS und Azid-modifizierten MCM-41-Nanopartikel verwendet. Der Erfolg der Anbindung wurde auch bei diesen Nanopartikeln anhand von IR-Spektren überprüft. Die Spektren der calcinierten Nanopartikel sind in Abb. 5-65 gezeigt, während die der extrahierten dem Anhang zu entnehmen sind. Es ist anhand der Spektren zu erkennen, dass die Intensität der charakteristischen Bande der Azidgruppe bei 2107 cm^{-1} nach der „Click“-Reaktion leicht abnimmt, woraus folgt, dass der Fluoreszenzfarbstoff erfolgreich mittels „Click“-Chemie an die Oberfläche gebunden werden konnte. Da die Bande jedoch nicht vollständig verschwindet, kann angenommen werden, dass nicht alle Azidgruppen umgesetzt wurden, so dass die verbleibenden für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. Auch bei dieser Variante der „Click“-Chemie sind keine Banden, die allein dem Fluoreszenzfarbstoff zugeordnet werden können, zu erkennen. Die Zuordnung aller Banden ist in Tabelle 5-20 zu finden.

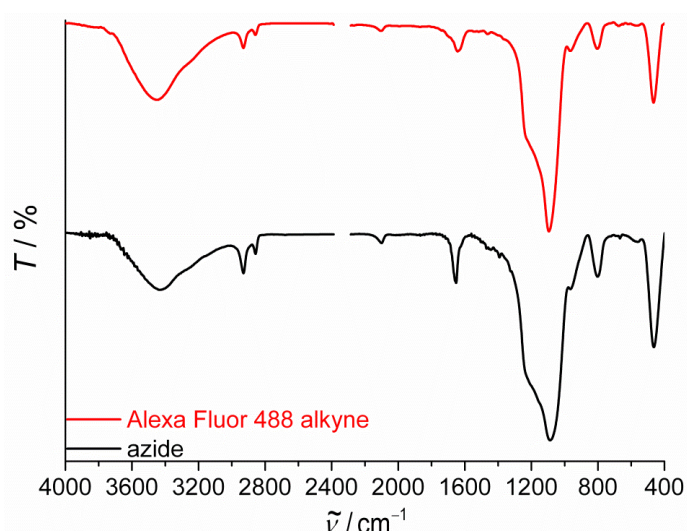


Abb. 5-65: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln vor und nach der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Alkin.

Tab. 5-20: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-65 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

Azid	nach „Click“	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2936	2929	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2862	2862	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2107	2107	(N ₃)-Valenzschwingung	Azid	[163]
1655	1648	(O-H)-Deformationsschwingung	Wasser	[163]
1248	1248	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1100	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
959	967	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
478	471	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Des Weiteren wurden DLS-Messungen an den Nanopartikeln durchgeführt. Die Messungen der calcinierten Nanopartikel sind in Abb. 5-66 zu sehen, während die der extrahierten im Anhang zu finden sind. Wie bereits in Kapitel 5.5.2 beschrieben, nimmt die Größe der Primärpartikel nach der Anbindung von BUTMS zunächst ab, wobei die Größenweitenverteilung wesentlich breiter wird. Nach weiterer Umsetzung mit Natriumazid nimmt die Primärpartikelgröße wieder zu und die Größenweitenverteilung wird wieder schmaler. Nach dem Einsatz der Nanopartikel in einer „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Alkin ist eine weitere Verkleinerung der Größe der Primärpartikel auf 70 nm zu beobachten, wobei diese Nanopartikel eine Größenweitenverteilung zwischen 40 und 130 nm zeigen. Dies weist darauf hin, dass durch die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs die Nanopartikel weniger zur Agglomeration neigen. Eine Vermutung ist, dass durch die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs Oberflächenladungen an den Nanopartikeln auftreten, wodurch diese separieren.

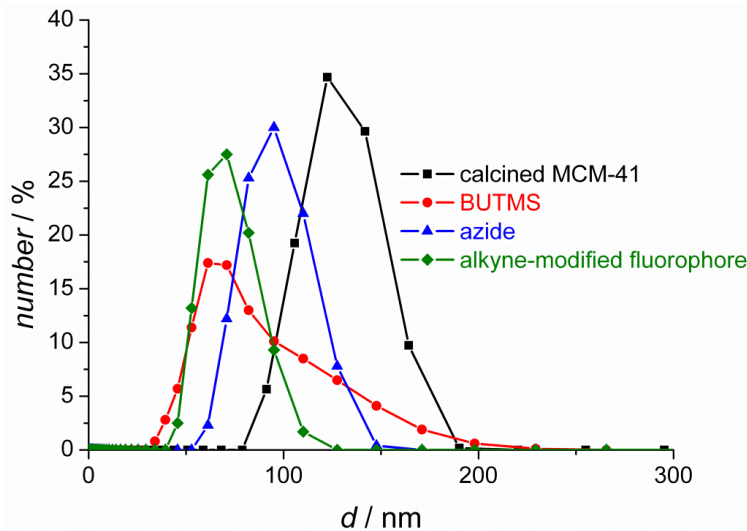


Abb. 5-66: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Azidfunktion ausgestattet und anschließend mit Alexa Fluor® 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.

Zur Überprüfung, ob die Nanopartikel nach der „Click“-Reaktion fluoreszieren, wurden Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren aufgenommen, die in Abb. 5-67 dargestellt sind.

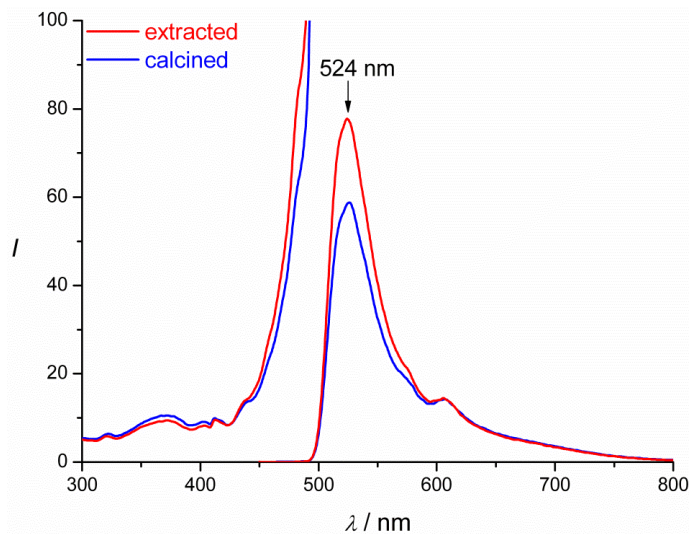


Abb. 5-67: Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren der mit Alexa Fluor® 488-Alkin funktionalisierten MCM-41-Nanopartikel unter Verwendung einer Konzentration von $1.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Aus den Emissionsspektren ist zu entnehmen, dass die Nanopartikel in etwa eine ähnlich starke Fluoreszenz zeigen wie die MCM-41-Nanopartikel, die in einer „Click“-Reaktion mit dem Alexa Fluor® 488-Azid umgesetzt wurden (s. Abb. 5-62), da die Intensitäten des Maximums bei 524 nm in etwa übereinstimmen. Auch ist das Maximum mit dem Literaturwert von 519 nm vergleichbar, so dass von einer erfolgreichen Anbindung ausgegangen werden kann.^[96] Die Abweichung ist auf die Anbindung zurückzuführen. Außerdem ist auch bei diesen Nanopartikeln der Trend zu erkennen, dass an den extrahierten Nanopartikel größere Mengen angebonden werden können, da bei diesen

Nanopartikeln mehr Silanolgruppen für die Funktionalisierung zur Verfügung stehen. Bei den Anregungsspektren ist bei diesen Nanopartikeln kein Maximum bei etwa 480 nm zu erkennen. Da die Intensität in diesem Bereich sehr stark ansteigt, kann es sein, dass die Intensität des Maximums zu klein ist, um detektiert zu werden, so dass das Signal untergeht und nicht sichtbar ist.

Des Weiteren wurden die Nanopartikel unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die Aufnahmen sind in Abb. 5-68 zu sehen. Darauf ist zu erkennen, dass sowohl die extrahierten als auch die calcinierten Nanopartikel grün fluoreszieren, wobei die Intensität bei den extrahierten Nanopartikeln leicht stärker ist, was mit den Intensitäten der Fluoreszenz-Emissions-Spektren (s. Abb. 5-67) übereinstimmt. Das heißt, dass das Alexa Fluor® 488-Alkin ebenfalls erfolgreich über die „Click“-Chemie an die Oberfläche von Silica-Nanopartikeln gebunden werden kann.

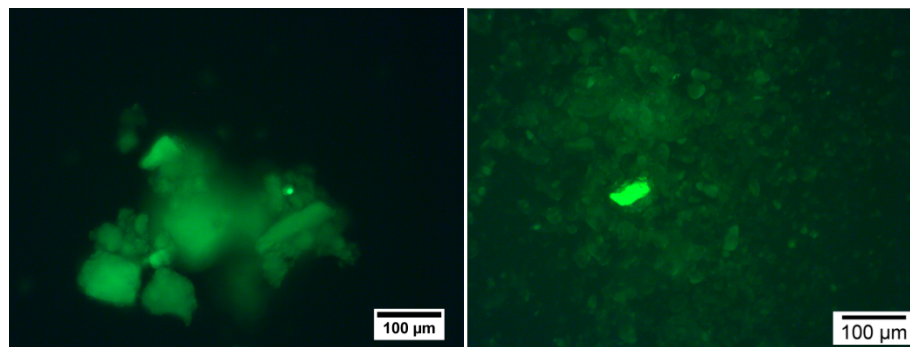


Abb. 5-68: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von extrahierten (links) und calcinierten (rechts) MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion funktionalisiert wurden.

Um die Nanopartikel in der Biomedizin anwenden zu können, wurde ihr Einfluss in Zellkulturexperimenten untersucht. Die Ergebnisse der Experimente mit HepG2-Zellen sind in Abb. 5-69 gezeigt, während die Ergebnisse mit PC-12-Zellen im Anhang zu finden sind.

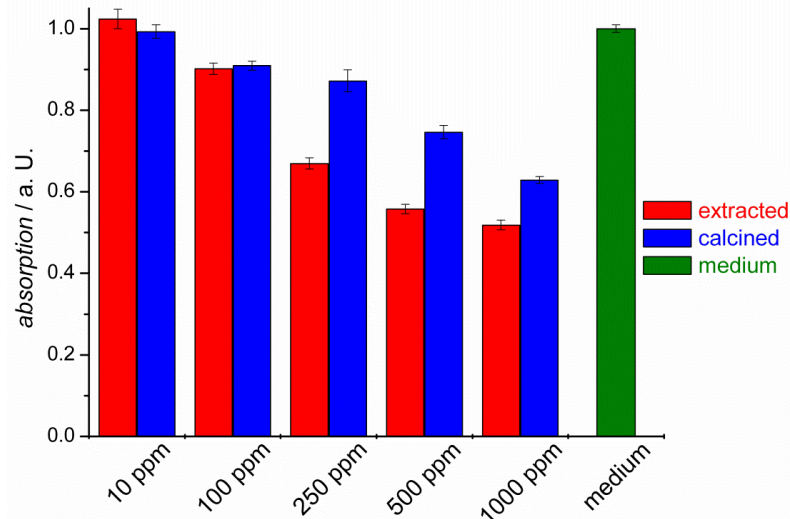


Abb. 5-69: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

Auch die in dieser „Click“-Reaktion eingesetzten Nanopartikel zeigen mit steigender Konzentration eine starke Abnahme der Viabilität der Zellen, woraus folgt, dass diese Nanopartikel toxisch für HepG2-Zellen sind, besonders wenn sie in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Dies ist auf restliches Kupfer, das sich entweder in den Poren befindet oder sich an den Fluoreszenzfarbstoff anlagert, zurückzuführen, da diese Nanopartikel nach der „Click“-Reaktion ebenfalls blau bzw. grün gefärbt sind. Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei der „Click“-Reaktion im Allgemeinen das Kupfer nicht vollständig von den Nanopartikeln entfernt werden kann, wodurch diese anschließend toxische Effekte auf Zellen zeigen.

5.5.6 Vergleichende Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass „click“-fähige PolySia als auch kommerziell erhältliche „click“-fähige Fluoreszenzfarbstoffe mittels beider Varianten der „Click“-Chemie an die Oberfläche von MCM-41-Nanopartikeln gebunden werden können. Dabei zeigten in allen Fällen die extrahierten Nanopartikel eine höhere immobilisierte Menge sowohl an PolySia als auch an Fluoreszenzfarbstoff. Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass mit der Calcination der Nanopartikel Kondensationsreaktionen einhergehen, wodurch die Anzahl der für die Funktionalisierung zur Verfügung stehenden Silanolgruppen verringert wird. Des Weiteren wurden alle Varianten der „Click“-Chemie auf ihre Toxizität gegenüber HepG2-Zellen untersucht, um mögliche Unterschiede zu dem Linker-System aufzuzeigen. Dabei konnte ebenfalls bei allen vier Varianten der „Click“-Chemie beobachtet werden, dass mit steigender Konzentration der Nanopartikel die Viabilität der HepG2-Zellen stark abnahm, woraus folgt, dass die „Click“-Chemie im Gegensatz zum Linker-System toxische Effekte aufweist. Da Kupfer als Katalysator in dieser Reaktion verwendet wird, ist anzunehmen, dass das Kupfer verantwortlich für die akute Toxizität ist, was auch in anderen „Click“-Reaktionen beobachtet werden kann.^[43] Dies wurde durch Bestimmungen des Gehalts an Kupfer bei den Nanopartikeln, die mit PolySia in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden, bestätigt, da bei allen Nanopartikeln ein Kupfer-Gehalt von etwa einem Gewichtsprozent gemessen werden konnte. Außerdem wurden die mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel über die „Click“-Chemie auf ihre Toxizität gegenüber ISC-Zellen untersucht, da diese für die Nervenregeneration, in der die Nanopartikel angewendet werden sollen, essentiell sind. Dabei konnte beobachtet werden, dass in diesem Fall keine Viabilität der Zellen zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung zu erkennen ist, woraus folgt, dass das Kupfer aus der „Click“-Chemie eine stärkere Toxizität gegenüber ISC-Zellen aufweist im Gegensatz zu den HepG2-Zellen. Die erhöhte Toxizität könnte daran liegen, dass es sich bei den ISC-Zellen um Gliazellen aus dem Nervensystem handelt, während die HepG2-Zellen aus humanen Leberzellen stammen. Da die Leber ein Abbauorgan ist, könnten diese Zellen resistenter gegenüber Kupfer sein, wodurch sich die etwas besseren Viabilitäten nach fünf Tagen Kultivierung erklären ließen. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Anbindung über die „Click“-Chemie sehr gut funktioniert, jedoch durch die toxischen Effekte des Kupfers, dass

sich nicht so einfach entfernen lässt bzw. einen Komplex mit dem gebildeten Triazol bildet, für biomedizinische Anwendungen sehr eingeschränkt ist. Eine Methode zur Entfernung des Kupfers müsste zunächst etabliert werden, was sehr umfangreich wäre. Daher sollte diese Anbindungsvariante für spätere biomedizinische Anwendungen nicht eingesetzt werden, da die Anbindung über das Linker-System eine sehr gute Biokompatibilität der Nanopartikel aufzeigt (s. Kapitel 5.3). Um kein Kupfer in der „Click“-Chemie verwenden zu müssen, wurde eine alkynyl-analoge PolySia im Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover synthetisiert, die mit Azidgruppen eine Kupfer-freie „Click“-Chemie eingeht, wobei eine Ringöffnungsreaktion stattfindet. Die Reaktion benötigt längere Reaktionszeiten, da ohne einen Katalysator gearbeitet wird. Da nach 48 Stunden der Reaktion nur sehr geringe Mengen an PolySia detektiert werden konnten, die dazu noch im Bereich des Blindwertes liegen, kann davon ausgegangen werden, dass mit dieser Methode nur sehr wenig bis gar keine PolySia an die Nanopartikel gebunden werden kann, so dass diese Variante keine Alternative zu den Kupfer-katalysierten „Click“-Reaktionen darstellt. Um die Toxizität der Nanopartikel nach der „Click“-Reaktion zu verringern, könnte auch versucht werden alternative Katalysatoren zu finden, die sich nicht im Produkt der Reaktion anlagern.

5.6 Multifunktionalisierung von CMS-Nanopartikeln mit Polysialinsäure und Fluoreszenzfarbstoff

Um die Nanopartikel bei der Anwendung in der Nervenregeneration optisch verfolgen zu können, wurde versucht diese multifunktionell mit PolySia und dem kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 auszustatten. Dabei wurden verschiedene Wege getestet und diese anschließend durch Änderung verschiedener Parameter optimiert. Es sollte dabei eine möglichst große Menge an PolySia immobilisiert werden und die Nanopartikel sollten mit dem Fluoreszenzfarbstoff nicht überladen sein, so dass kein Quenching auftritt, die Nanopartikel aber trotzdem beobachtet werden können. Dabei wurde auf die in den vorherigen Kapiteln angewendeten Anbindungsvarianten zurückgegriffen und verschiedene Kombinationen dieser Varianten getestet. Als erstes wurde versucht, die Nanopartikel über eine Kombination des Linker-Systems und der „Click“-Chemie zu multifunktionalisieren, wobei die PolySia über das Linker-System und die Fluoreszenzfarbstoffe über die „Click“-Reaktion angebunden werden sollten. Für diese Variante mussten zunächst die mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel mit Bernsteinsäureanhydrid und Propiolsäure multifunktionalisiert werden. Die zweite Variante ist die Multifunktionalisierung nur mittels der „Click“-Chemie und als letztes wurde die Multifunktionalisierung ausschließlich mit dem Linker-System getestet.

5.6.1 Multifunktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid und Propiolsäure

Für die Anbindung der PolySia und des Fluoreszenzfarbstoffs über eine Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie wurden die Nanopartikel zunächst mit Bernsteinsäureanhydrid und Propiolsäure multifunktionalisiert. Dafür wurden verschiedene Lösemittel getestet, da die einzelnen Reaktionen in unterschiedlichen Lösemitteln durchgeführt werden, wobei zunächst beide Substanzen gleichzeitig zur Lösung gegeben wurden. Zur Überprüfung des Erfolgs der Reaktion wurden IR-Spektren aufgenommen. Die IR-Spektren der Reaktion, die in Dichlormethan (DCM) durchgeführt wurde, sind in Abb. 5–70 dargestellt. Anhand dieser IR-Spektren ist zu erkennen, dass die Multifunktionalisierung der CMS-Nanopartikel mit BSA und Propiolsäure in DCM in einem Schritt erfolgreich war, da zum einen die charakteristische Bande der Alkin-Schwingung bei 2114 cm^{-1} zu erkennen ist. Zum anderen ist die Bande bei 1722 cm^{-1} der freien Carboxylgruppen, die aus der Anbindung von BSA resultieren und notwendig für die Immobilisierung der PolySia sind, zu sehen. Des Weiteren sind zwei Banden bei 1641 und 1551 cm^{-1} zu erkennen, die auf die bei beiden Reaktionen entstandenen Amidbindungen zurückzuführen sind. Die IR-Spektren nach den einzelnen Funktionalisierungen sind den Kapiteln 5.3.2 und 5.5.1 zu entnehmen. Eine Zuordnung der Banden nach der Multifunktionalisierung ist Tabelle 5-21 zu finden.

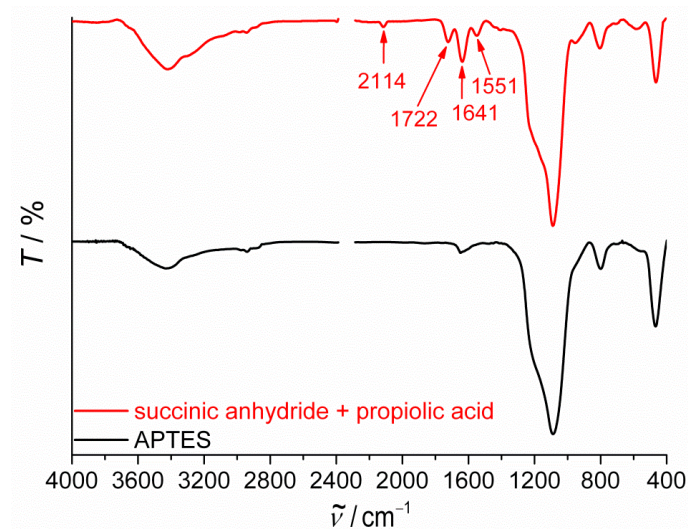


Abb. 5-70: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit BSA und Propiolsäure in DCM in einem Schritt multifunktionalisiert wurden.

Des Weiteren wurde die Multifunktionalisierung in DMF sowie in einem Lösemittel-Gemisch aus DMF und DCM in einem Schritt untersucht. Die IR-Spektren dieser Umsetzungen sind in Abb. 5-71 zu sehen.

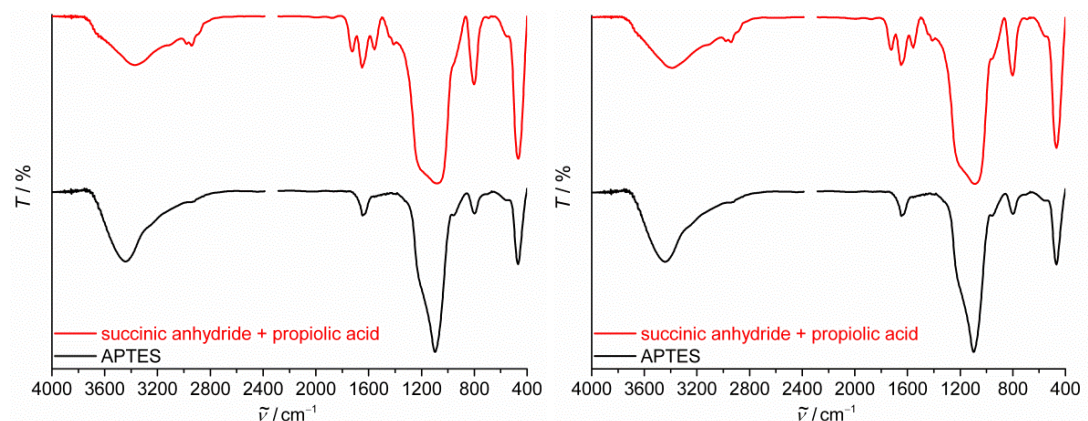


Abb. 5-71: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit BSA und Propiolsäure zum einen in DMF (links) und zum anderen in einem Gemisch aus DCM und DMF (rechts) in einem Schritt multifunktionalisiert wurden.

Aus diesen Spektren kann entnommen werden, dass die Multifunktionalisierung in diesen Lösemitteln nicht funktioniert, da nur die drei typischen Banden zwischen 1730 und 1550 cm^{-1} , die bei der Anbindung von BSA detektiert werden können, sichtbar sind. Jedoch ist keine Schwingung, die der Alkylgruppe zugeordnet werden könnte, zu beobachten. Daher wurden alle folgenden Reaktionen in DCM durchgeführt. Eine Zuordnung der Banden ist vergleichend in Tabelle 5-21 zu finden.

Tab. 5-21: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren nach der Multifunktionalisierung aus Abb. 5-70 und 5-71 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

in DCM	in DMF	in DCM/DMF	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
3291	-	-	(C-H)-Valenzschwingung (Dreifachbindung)	Propiolsäure	[163]
2973	2948	2957	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2884	2880	2880	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2114	-	-	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1722	1727	1733	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1641	1650	1650	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1551	1546	1562	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1418	1417	1426	(C-H)-Deformationsschwingung	APTES, BSA	[163]
1233	1230	1223	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1081	1081	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
944	946	962	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
811	804	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	467	467	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um die Anbindung von BSA und Propiolsäure zu optimieren, wurde die Reihenfolge der Zugabe verändert. In den bisherigen Untersuchungen wurden beide Reagenzien gleichzeitig zur Lösung gegeben. Des Weiteren wurde die Auswirkung untersucht, wenn zuerst Propiolsäure und anschließend BSA sowie die umgekehrte Reihenfolge in zwei getrennten Reaktionen an die Nanopartikel gebunden werden. Die IR-Spektren dieser Untersuchung sind in Abb. 5-72 gezeigt.

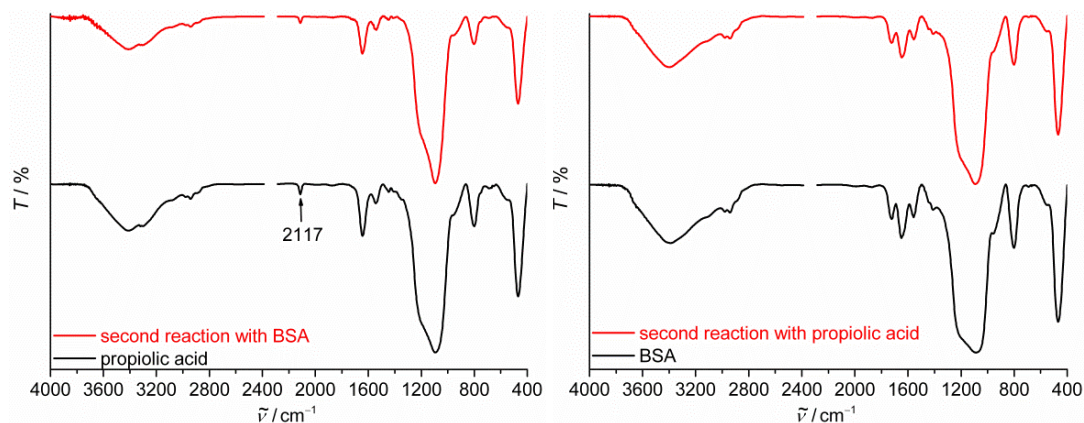


Abb. 5-72: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die zum einen zunächst mit Propiolsäure und anschließend mit BSA (links) und zum anderen erst mit BSA und anschließend mit Propiolsäure (rechts) multifunktionalisiert wurden.

Aus diesen Spektren ist zu entnehmen, dass eine Multifunktionalisierung in zwei Schritten nicht erfolgreich ist, gleich welches Reagenz zuerst zur Lösung gegeben wird, da in beiden Fällen nur die Banden für eine erfolgreiche erste Umsetzung zu erkennen sind. Das heißt, dass wenn Propiolsäure zuerst zur Lösung gegeben wird, die Bande bei 2117 cm^{-1} der Alkylgruppe sowie die typischen Amidbanden bei 1643 und 1539 cm^{-1} zu beobachten sind. Nach der Funktionalisierung mit BSA treten keine weiteren Banden auf. Daraus folgt, dass

nur Propiolsäure an die Nanopartikel über diese Variante gebunden wird. Des Weiteren kann eine Abnahme der Intensitäten der Bande der Alkenschwingung sowie der typischen Amidbanden nach der zweiten Reaktion mit BSA beobachtet werden, woraus folgt, dass ein Teil der Bindung nicht kovalent war und in der zweiten Reaktion abgewaschen wurde. Diese Beobachtungen sind auch für die zweite Anbindungsvariante zu erkennen, nur dass in diesem Fall die drei Banden der BSA-Funktionalisierung zu sehen sind und keine der charakteristischen Alkinbanden. Auch hier kann eine Abnahme der Intensität nach einer zweiten Reaktion beobachtet werden, so dass das BSA zum Teil nur auf der Oberfläche angelagert ist und somit abgewaschen werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte im folgenden die Multifunktionalisierung der Nanopartikel mit BSA und Propiolsäure nur in einer Reaktion.

5.6.2 Anbindung über Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie

Um die CMS-Nanopartikel multifunktionell mit PolySia und einem Fluoreszenzfarbstoff zu funktionalisieren, wurde zunächst eine Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie getestet. Bei dieser Anbindungsvariante wurde die deacetylierte TBA-PolySia über das Linker-System angebunden und das kommerziell erhältliche Alexa Fluor[®] 488-Azid über die „Click“-Reaktion mit einem terminalen Alkin. Dafür wurden die Nanopartikel, die multifunktionell mit Propiolsäure und BSA modifiziert waren, verwendet. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels IR-Spektroskopie überprüft. Die IR-Spektren vor und nach der Reaktion, wenn zunächst PolySia und nach 24 Stunden Alexa Fluor[®] 488-Azid zugegeben wurden (Variante A), sind als Beispiel in Abb. 5-73 dargestellt.

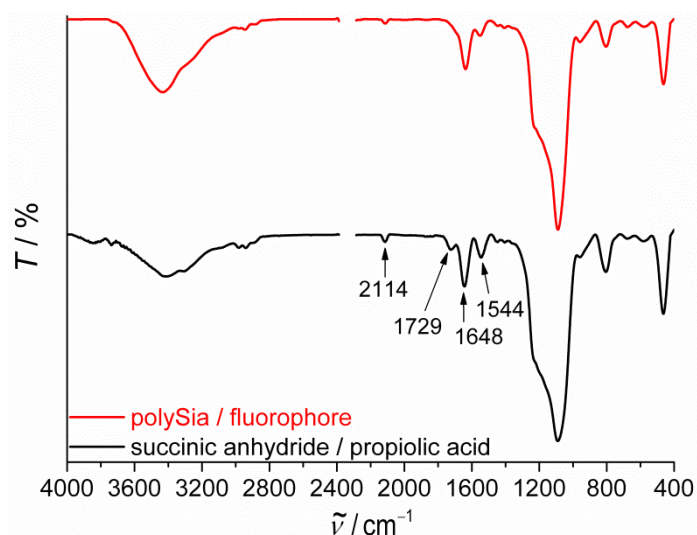


Abb. 5-73: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln mit Propiolsäure und BSA (unten) sowie nach weiterer Umsetzung mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid mittels des Linker-Systems und der „Click“-Chemie.

Aus den Spektren ist zu entnehmen, dass die Anbindung der PolySia erfolgreich war, da die Bande bei 1729 cm^{-1} , die der freien Carboxylatgruppen zugeordnet werden kann, vollständig

verschwindet. Da auch die Intensität der Alkinbande bei 2114 cm^{-1} nach der Reaktion abnimmt, kann auch davon ausgegangen werden, dass der Fluoreszenzfarbstoff erfolgreich über die „Click“-Chemie gebunden werden konnte. Daher ist anzunehmen, dass sich die Reaktionen nicht gegenseitig stören und eine Multifunktionalisierung der Nanopartikel möglich ist. Eine Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-22 zu finden.

Tab. 5-22: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-73 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

BSA / Propiolsäure	PolySia / Alexa Fluor®	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
3298	-	(C-H)-Valenzschwingung (Dreifachbindung)	Propiolsäure	[163]
2951	2944	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2892	2877	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2122	2114	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1729	-	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1648	1641	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure PolySia	[163]
1544	1551	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure, PolySia	[163]
1241	1241	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1092	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
959	959	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	463	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um zu überprüfen, ob PolySia und Fluoreszenzfarbstoff an die Oberfläche der CMS-Nanopartikel während der Multifunktionalisierung gebunden werden konnten, wurde die angebundene Menge an PolySia mittels des TBA-Tests bestimmt, während Fluoreszenzspektroskopie sowie –Mikroskopie für die Untersuchung der Fluoreszenz der Nanopartikel durchgeführt wurden. Dabei wurde zunächst die Reihenfolge der Zugabe zur Optimierung der Anbindung geändert. Die Ergebnisse des TBA-Tests sind in Abb. 5-74 zu sehen. Anhand des TBA-Tests ist zu erkennen, dass die höchsten Mengen an PolySia dann gebunden werden konnten, wenn die Anbindung nicht über zwei Reaktionen durchgeführt wurde (Variante A und B). Wenn die PolySia in einer ersten Reaktion angebonden wurde und die getrockneten Nanopartikel anschließend mit Alexa Fluor® 488-Azid umgesetzt wurden (Variante D), ist eine Abnahme der Menge an PolySia zu beobachten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese in der zweiten Reaktion durch die längere Lagerung in Ethanol während der zweiten Reaktion zum Teil abgewaschen wird. Dies konnte auch schon an den MCM-41-Nanopartikeln gezeigt werden, die lediglich mit PolySia über das Linker-System funktionalisiert wurden (s. Kapitel 5.3.1). Wurden die Nanopartikel in einer ersten Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoff modifiziert und die getrockneten Nanopartikel in einer zweiten Reaktion mit PolySia (Variante E), kann eine größere Menge an immobilisierter PolySia beobachtet werden, so dass angenommen werden kann, dass die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs die Immobilisierung der PolySia nicht stört. Werden beide Substanzen gleichzeitig zur Lösung gegeben (Variante C), kann wieder eine erhöhte Menge an PolySia detektiert werden, woraus folgt, dass die Multifunktionalisierung in einem

Schritt erfolgen sollte. Um zu überprüfen, ob dies durch aufeinanderfolgende Zugaben verbessert werden kann, wurde zunächst PolySia bzw. Fluoreszenzfarbstoff angebunden und ohne Trocknungsschritt nach einer gewissen Zeit die entgegengesetzte Chemikalie zur Lösung gegeben. Dabei ist zu erkennen, dass bei beiden Varianten (A und B) die Menge an immobilisierter PolySia stark ansteigt, wobei es besser zu sein scheint, wenn die PolySia zuerst immobilisiert wird (Variante A). Dies könnte daran liegen, dass die freien Carboxylatgruppen nach der Anbindung von Alexa Fluor® 488-Azid (Variante B) nicht mehr vollständig frei zugänglich sind, wodurch die PolySia in geringeren Mengen gebunden werden kann. Dass die Varianten A und B der Reaktion allgemein besser sind, könnte dadurch erklärt werden, dass zunächst eine Komponente zum Teil gebunden wird und somit die anderen funktionellen Gruppen besser zugänglich sind, wenn die zweite Komponente dazu gegeben wird, da anschließend beide noch weiter angebunden werden.

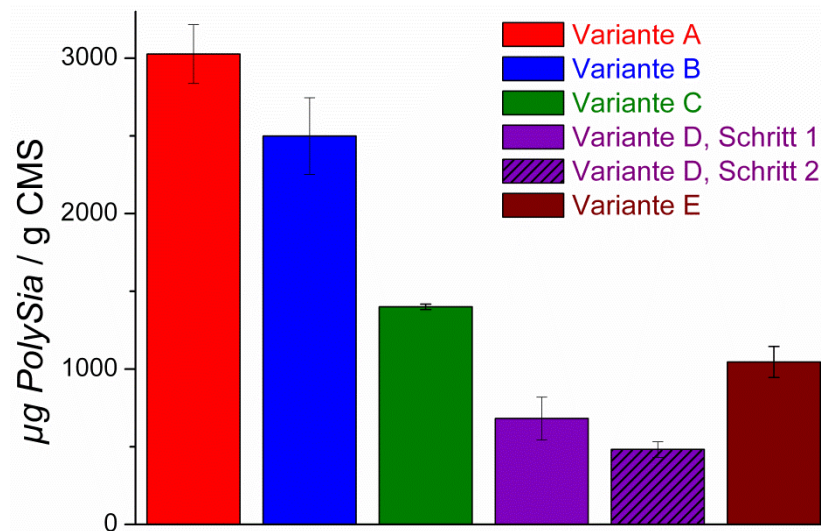


Abb. 5-74: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step, Variante D: erst PolySia (Schritt 1), in zweiter Reaktion Alexa (Schritt 2), Variante E: erst Alexa, in zweiter Reaktion PolySia).

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren dieser Nanopartikel sind vergleichend in Abb. 5-75 gezeigt. Anhand der Fluoreszenz-Emissionsspektren ist zu erkennen, dass bei allen Zugabereihenfolgen ein Emissionsmaximum bei 529 nm sichtbar ist, woraus folgt, dass die Multifunktionalisierung bei allen Varianten erfolgreich war. Dabei konnte die höchste Intensität der Fluoreszenz erreicht werden, wenn PolySia und Fluoreszenzfarbstoff gleichzeitig zur Lösung (Variante C) gegeben wurden, obwohl die wässrige Phase des Kupfers nicht in die DCM-Phase übergegangen ist. Die niedrigsten Intensitäten wurden erhalten, wenn zwei Reaktionen in Folge durchgeführt wurden (Variante D und E), wobei eine Abnahme der Intensität zu beobachten ist, wenn zunächst nur der Fluoreszenzfarbstoff angebunden wird und anschließend die PolySia (Variante E), so dass angenommen werden

kann, dass sich auch bei der „Click“-Chemie der Fluoreszenzfarbstoff zum Teil an die Nanopartikel anlagert und nicht vollständig kovalent gebunden ist.

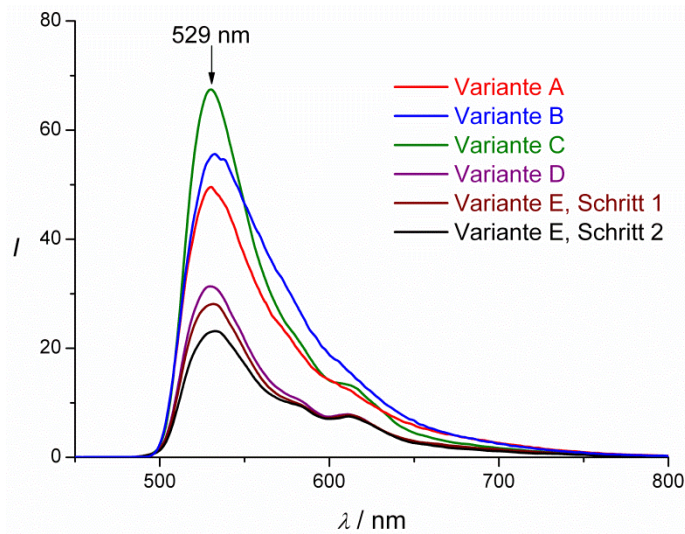


Abb. 5-75: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step, Variante D: erst PolySia, in zweiter Reaktion Alexa, Variante E: erst Alexa (Schritt 1), in zweiter Reaktion PolySia (Schritt 2)).

Des Weiteren wurden die Nanopartikel mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Die Aufnahmen sind in Abb. 5-76 gezeigt. Anhand der Aufnahmen ist zu erkennen, dass bei allen Proben eine grüne Fluoreszenz der Nanopartikel zu beobachten ist. Daraus folgt, dass bei allen Varianten eine ausreichende Menge an Fluoreszenzfarbstoff angehängt wurde, so dass die Fluoreszenz mit dem Mikroskop detektierbar ist. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel mit einer Intensität der Fluoreszenz ab etwa 30 im Fluoreszenz-Spektroskop auch unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet werden konnte.^[147] Daraus folgt, dass die Fluoreszenz ab einer Intensität von etwa 30 ausreichend ist, um die Nanopartikel optisch verfolgen zu können. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass die Nanopartikel stärker fluoreszieren, wenn diese in größeren Aggregaten zusammengelagert sind, während die einzeln vorliegenden Nanopartikel eher schwach fluoreszieren. Daher kann angenommen werden, dass bei diesen Mengen kein bzw. kaum Quenching des Fluoreszenzfarbstoffs auftritt. Da bei allen Proben Fluoreszenz beobachtet werden kann, wurde die Variante A für die folgenden Optimierungen der Multifunktionalisierung gewählt, da unter diesen Bedingungen die größte Menge an PolySia angehängt werden konnte.

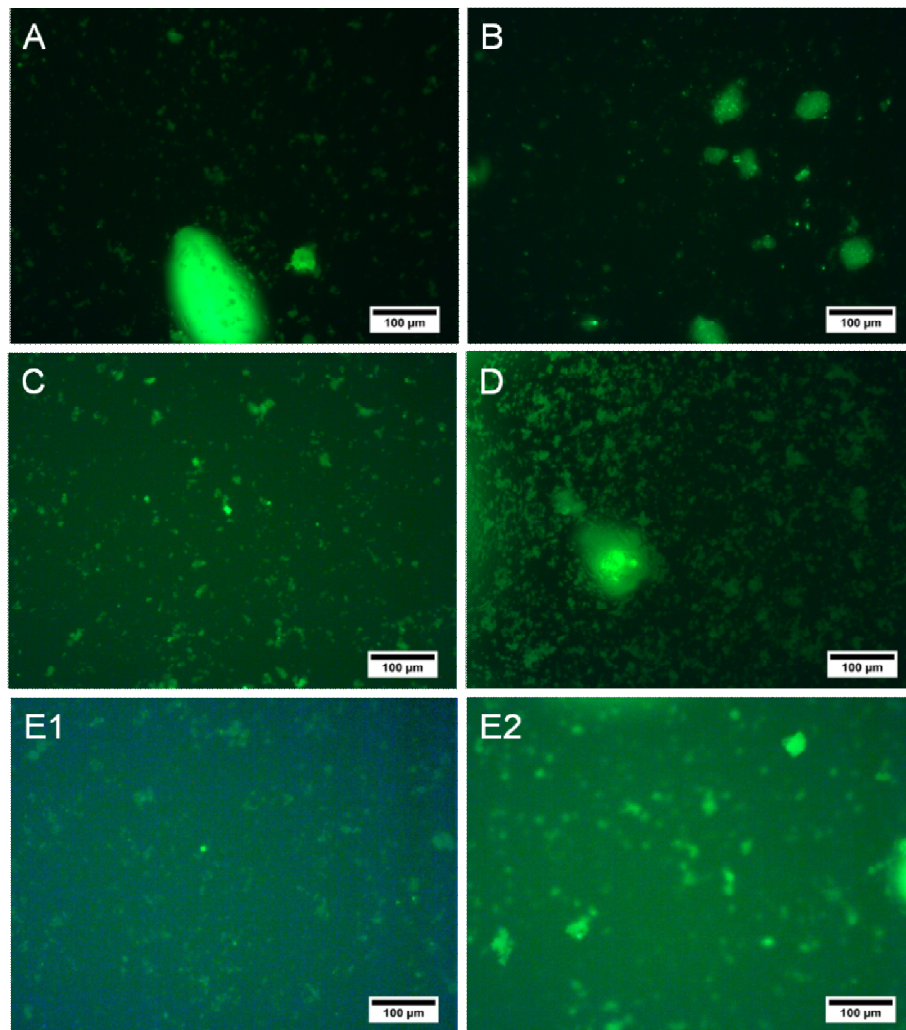


Abb. 5-76: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step, Variante D: erst PolySia, in zweiter Reaktion Alexa, Variante E: erst Alexa (E1), in zweiter Reaktion PolySia (E2)).

Eine Optimierung der Synthese erfolgte durch Variation der APTES-Menge im ersten Reaktionsschritt. Dabei wurde die Menge an APTES verringert, da bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass durch eine geringere Menge an APTES größere Mengen an PolySia gebunden werden können.^[147] Zur Untersuchung der Auswirkung der unterschiedlichen APTES-Mengen auf die multifunktionelle Anbindung von BSA und Propiolsäure, wurden nach dem zweiten Reaktionsschritt IR-Spektren aufgenommen, die in Abb. 5-77 dargestellt sind. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von APTES nach weiterer Umsetzung mit BSA und Propiolsäure vier neue Banden zu beobachten sind. Dabei können die beiden Banden bei 1645 und 1545 cm^{-1} den neu gebildeten Amidbindungen zugeordnet werden, während die Bande bei 1729 cm^{-1} auf freie Carboxylgruppen zurückgeführt werden kann, die durch die Ringöffnung des BSA entstehen und zur weiteren Anbindung der deacetylierten PolySia benötigt werden. Die letzte Bande bei 2110 cm^{-1} kann der Valenzschwingung der Dreifachbindung zugeordnet werden. Daraus folgt, dass sowohl das terminale Alkin als auch das BSA erfolgreich an die Oberfläche mit verschiedenen

Mengen an APTES gebunden werden kann. Wird allerdings auf die Anbindung von APTES im ersten Schritt verzichtet, kann zum einen keine Bande für die Alkinfunktion und zum anderen auch keine Banden für die freien Carboxylgruppen beobachtet werden. Es kann allerdings eine sehr schwache Schwingung bei 2950 cm^{-1} beobachtet werden, die der Schwingung von CH_2 -Gruppen zugeordnet werden kann. Daher ist davon auszugehen, dass wahrscheinlich das BSA erfolgreich angebinden werden konnte, jedoch nicht über eine Amidbindung, da keine Aminfunktionen für die Reaktion zur Verfügung standen. Das BSA könnte eventuell direkt mit den Silanolgruppen der Oberfläche reagiert haben, wodurch sich ein Kieselsäureester gebildet hätte.^[147] Eine vergleichende Zuordnung einiger IR-Spektren ist Tabelle 5-23 zu entnehmen.

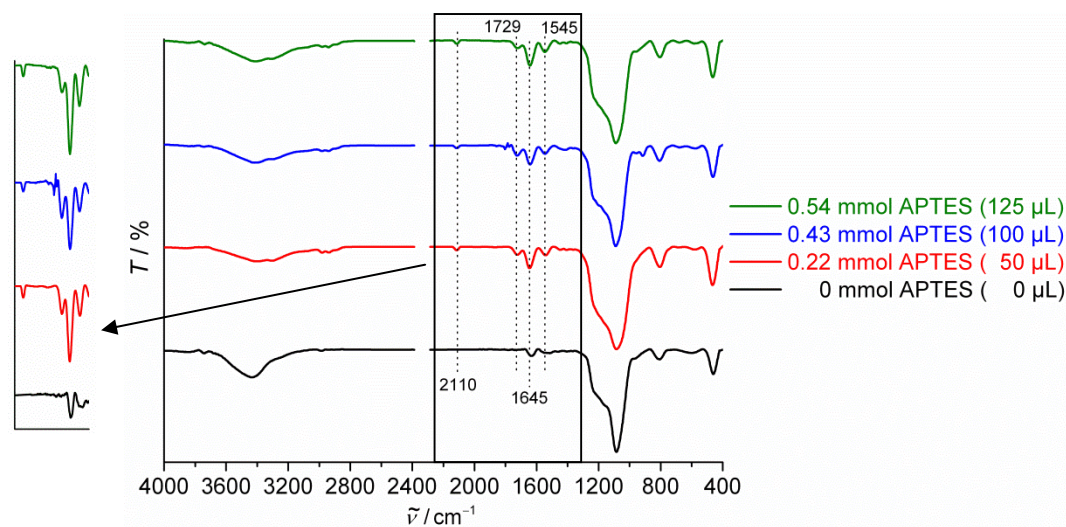


Abb. 5-77: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von BSA und Propiolsäure, wenn im ersten Schritt verschiedene Mengen an APTES verwendet wurden.

Tab. 5-23: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-77 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

0 mmol	0.22 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
-	3282	(C-H)-Valenzschwingung (Dreifachbindung)	Propiolsäure	[163]
2950	2985	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	2895	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	2109	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
-	1729	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1637	1645	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure, (Wasser)	[163]
-	1545	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1234	1226	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1089	1089	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
959	-	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
815	807	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
464	472	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Die IR-Spektren der CMS-Nanopartikel, die bei verschiedenen APTES-Mengen mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid umgesetzt wurden, sind in Abb. 5-78 gezeigt.

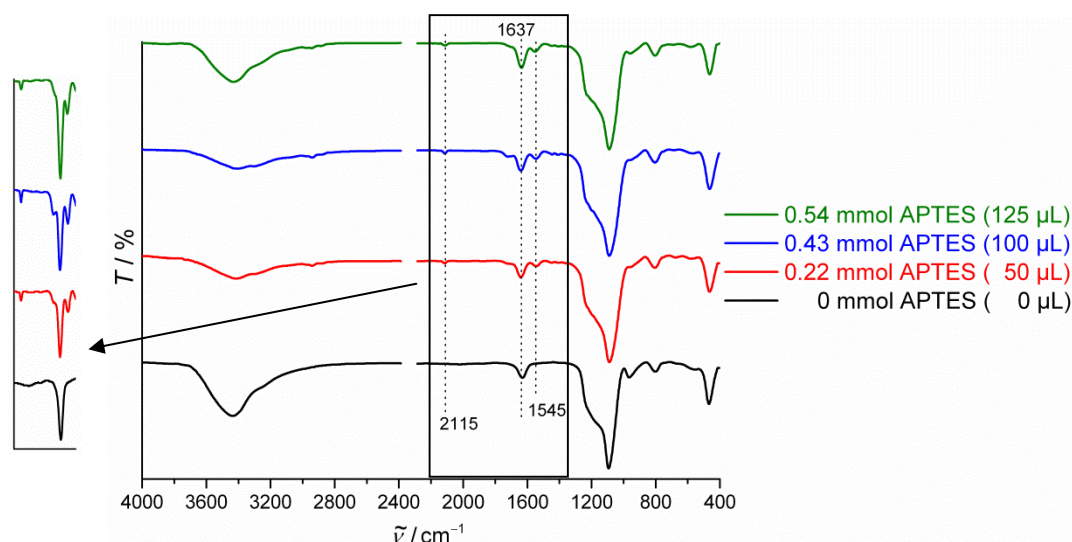


Abb. 5-78: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid, wenn im ersten Schritt verschiedene Mengen an APTES eingesetzt wurden.

Nach der Umsetzung mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid ist eine Abnahme der Bande der freien Carboxylgruppen bei 1729 cm^{-1} zu beobachten, was auf eine erfolgreiche Anbindung der PolySia hindeutet. Des Weiteren ist eine Zunahme der Intensitäten der typischen Amidbanden zu erkennen, die auf eine neu gebildete Amidbindung hinweisen, die bei der Umsetzung mit der deacetylierten PolySia entsteht. Auch kann eine leichte Abnahme der Intensität der Alkinbande beobachtet werden, so dass auch von einer erfolgreichen „Click“-Reaktion ausgegangen werden kann. Wird kein APTES verwendet, können keine neuen Banden bzw. Änderungen in den Intensitäten beobachtet werden, so dass anhand der IR-Spektren keine Aussagen über den Erfolg dieser Multifunktionalisierung getroffen werden kann. Eine Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-24 zu finden.

Tab. 5-24: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-78 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

0 mmol	0.22 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
-	2947	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	2871	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	2109	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1637	1637	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure, PolySia, (Wasser)	[163]
-	1553	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure, PolySia	[163]
1210	1234	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1096	1096	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
967	945	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
815	807	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
472	464	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um zu überprüfen, ob die eingesetzte Menge an APTES einen Einfluss auf die angebundene Menge an PolySia bei der Multifunktionalisierung hat, wurde der TBA-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-79 dargestellt. Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass bei allen eingesetzten Mengen an APTES PolySia erfolgreich an die

Nanopartikel gebunden werden konnte. Die höchste Menge an PolySia wurde dabei an die Nanopartikel gebunden, bei denen entweder kein oder 0.54 mmol APTES verwendet wurden. Dabei ist besonders interessant, dass eine große Menge an PolySia an die Oberfläche gebunden werden konnte, wenn auf den Einsatz von APTES verzichtet wurde. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass das BSA vermutlich direkt mit den Silanolgruppen an der Oberfläche der Nanopartikel zu einem Kieselsäureester reagiert und somit direkt für die Anbindung der PolySia zur Verfügung steht.

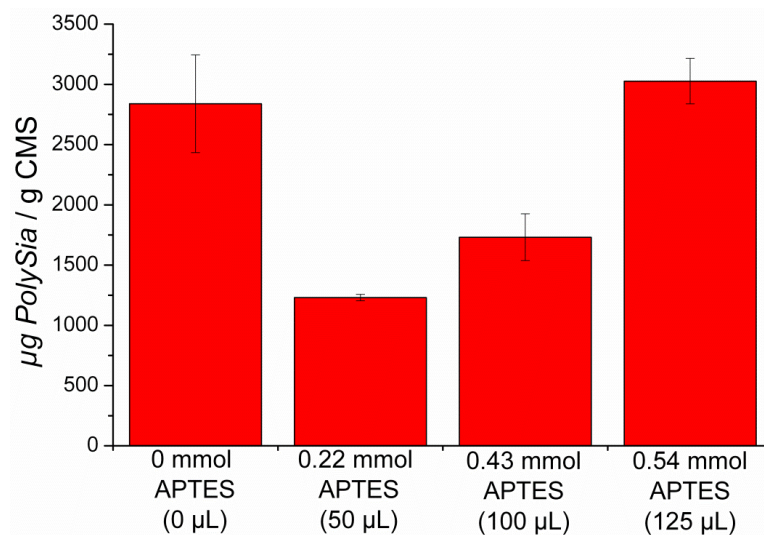


Abb. 5-79: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an APTES im ersten Schritt.

Um den Erfolg der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Azid zu untersuchen, wurden Fluoreszenz-Emissions-Spektren aufgenommen, die in Abb. 5-80 zu sehen sind.

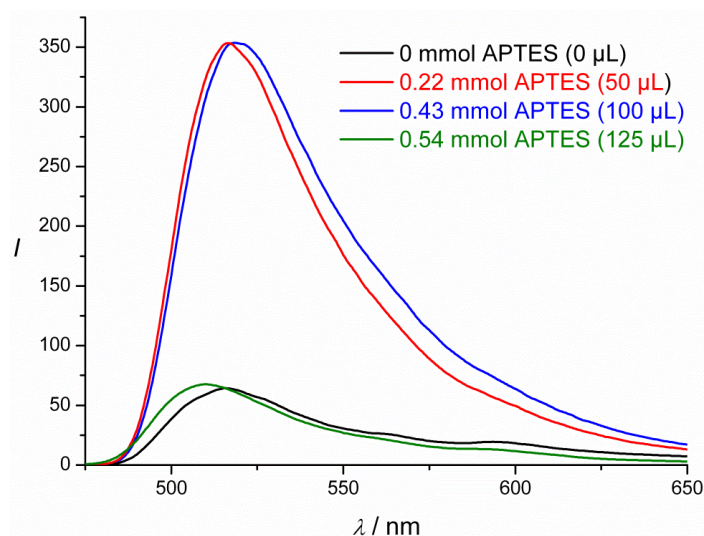


Abb. 5-80: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an APTES im ersten Schritt variiert wurde.

Darauf ist zu erkennen, dass alle Nanopartikel eine Fluoreszenz aufweisen. Dabei kann beobachtet werden, dass die Intensität der Fluoreszenz bei Verwendung von keinem APTES sehr gering ist, bei 0.22 mmol stark ansteigt, die dann bei 0.43 mmol etwa gleich bleibt und beim Einsatz von 0.54 mmol wieder stark sinkt. Dieses Ergebnis steht im Zusammenhang mit den angebondenen Mengen an PolySia. Immer wenn eine große Menge PolySia gebunden werden konnte (bei 0 und 0.54 mmol), die in etwa vergleichbar ist, konnte nur eine geringe Menge an Fluoreszenzfarbstoff immobilisiert werden, deren Intensitäten etwa im vergleichbaren Bereich liegen. Bei den beiden anderen Konzentrationen von 0.22 und 0.43 mmol konnten nur geringe Mengen an PolySia gebunden werden, dafür ist jedoch die Intensität der Fluoreszenz sehr stark, so dass angenommen werden kann, dass in diesem Fall mehr Alexa Fluor® 488-Azid gebunden wurde. Daraus folgt, dass der Einsatz von APTES einen Einfluss auf die Multifunktionalisierung hat. Es kann angenommen werden, dass PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid um die Anbindungsstellen konkurrieren.

Zur weiteren Optimierung der Multifunktionalisierung wurde im zweiten Schritt die Menge an Bernsteinsäureanhydrid variiert. Die IR-Spektren der Nanopartikel nach der Anbindung von BSA und Propiolsäure sind in Abb. 5-81 gezeigt.

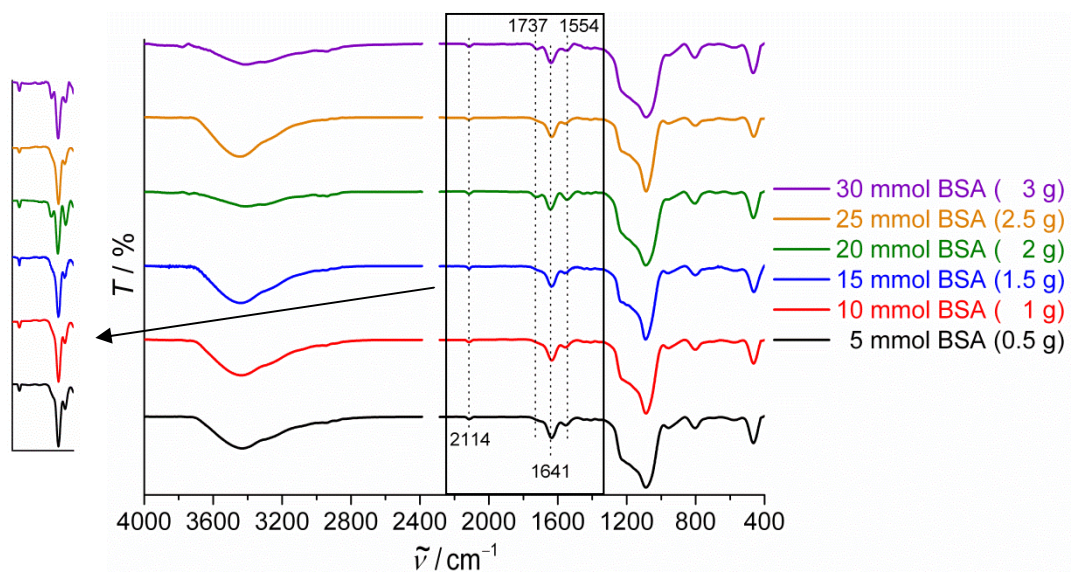


Abb. 5-81: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von BSA und Propiolsäure, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an BSA verwendet wurden.

Bei der Variation des BSA ist zu erkennen, dass bei allen eingesetzten Mengen eine Bande bei 2114 cm^{-1} sichtbar ist, die der Alkylschwingung zugeordnet werden kann. Daraus folgt, dass die Menge an BSA die Anbindung der Propiolsäure nicht stört. Des Weiteren können in allen Spektren die beiden typischen Amidbanden bei 1641 cm^{-1} und 1554 cm^{-1} beobachtet werden, so dass bei der Anbindung eine Amidbindung entstanden ist. Jedoch ist nur bei der Verwendung von 20 mmol und 30 mmol BSA eine dritte Bande bei 1737 cm^{-1} zu erkennen, die auf freie Carboxylgruppen zurückzuführen ist. Daraus folgt, dass in diesen beiden Fällen das BSA erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden konnte und dass eine Carboxylgruppe für die weitere Anbindung von PolySia zur Verfügung steht. Bei den

anderen könnte es sein, dass nur wenig BSA gebunden wurde, weil entweder geringere Mengen eingesetzt wurden oder eine Konkurrenz mit der Propiolsäure um die Aminfunktionen eingetreten ist, wodurch nur wenig BSA gebunden werden konnte, so dass nur wenige freie Carboxylgruppen vorhanden sind, die eventuell nicht detektiert werden konnte. Auf diese Möglichkeit weist auch eine leichte Andeutung der Bande bei 1737 cm^{-1} hin, die in den anderen Spektren zu erkennen ist, welche bei der Anbindung von Propiolsäure allein nicht zu erkennen ist. Eine vergleichende Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-25 zu finden.

Tab. 5-25: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-81 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

10 mmol	30 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
3246	3298	(C-H)-Valenzschwingung (Dreifachbindung)	Propiolsäure	[163]
2921	2965	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2862	2884	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2114	2114	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1729	1737	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1633	1641	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1544	1554	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1241	1241	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1085	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
967	944	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	811	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
471	463	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Die IR-Spektren der CMS-Nanopartikel, die in einer weiteren Reaktion mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid umgesetzt wurden, sind in Abb. 5-82 dargestellt. Bei allen Spektren ist eine leichte Abnahme der Intensität der Bande bei 2114 cm^{-1} zu beobachten, was auf eine erfolgreiche „Click“-Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff hindeutet. Bei Verwendung von 20 und 30 mmol BSA kann eine Abnahme der Intensität der Bande der freien Carboxylgruppen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass PolySia erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden konnte. Bei den anderen Spektren sind keine Veränderungen der Banden bzw. keine neuen Banden zu erkennen, die auf eine erfolgreiche Anbindung der PolySia hinweisen. Die Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-26 zu finden.

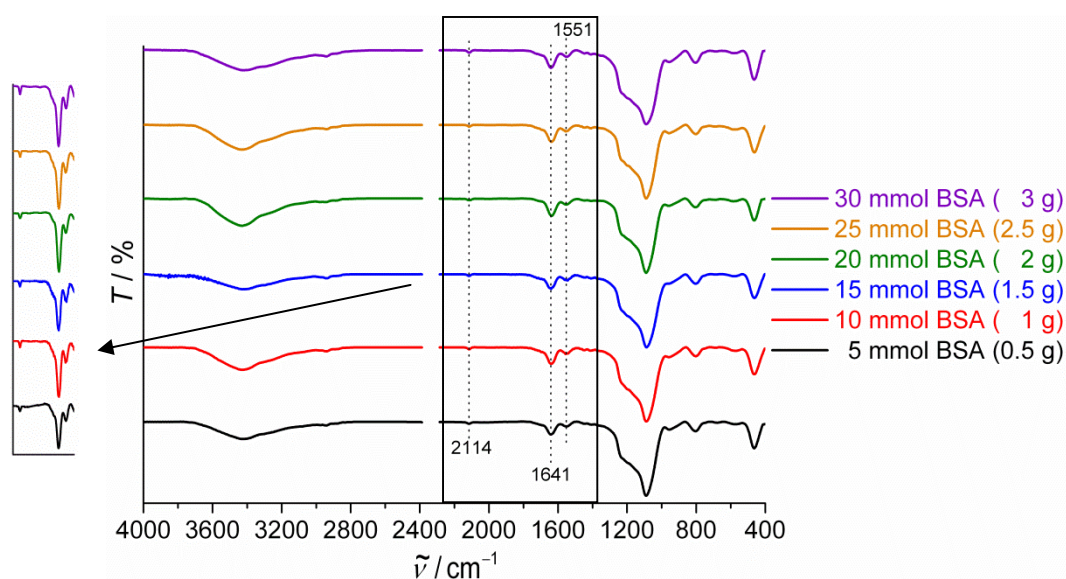


Abb. 5-82: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an BSA eingesetzt wurden.

Tab. 5-26: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-82 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

10 mmol	30 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2951	2936	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2892	2877	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2114	2114	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1641	1641	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure, PolySia	[163]
1551	1544	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure, PolySia	[163]
1233	1225	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1085	1092	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
937	937	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	471	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um die genaue Menge an PolySia zu bestimmen, wenn verschiedene Mengen an BSA verwendet wurden, wurde der TBA-Test an den Nanopartikeln durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-83 zu sehen. Bei allen eingesetzten Mengen an BSA konnte PolySia erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden. Dabei ist eine Zunahme der immobilisierten Menge mit zunehmender Menge an BSA bis zu einem Maximum bei 20 mmol zu beobachten, dass anschließend abnimmt. Daraus folgt, dass die bereits vorher verwendete Menge von 20 mmol die besten Ergebnisse für die Anbindung der PolySia erzielt. Das mit weiterer Zunahme des BSA die Menge an PolySia abnimmt, könnte daran liegen, dass die freien Carboxylgruppen eventuell durch einen erhöhten Grad an Oberflächenmodifizierung nicht mehr frei zugänglich sind, wodurch weniger PolySia an die Oberfläche gebunden werden kann. Wird weniger als 20 mmol BSA eingesetzt, sind weniger Anbindungsmöglichkeiten für die PolySia vorhanden, wodurch angenommen werden kann, dass vermutlich alle Gruppen reagiert haben und somit weniger PolySia gebunden werden konnte, da keine weiteren Anbindungsstellen mehr frei waren.

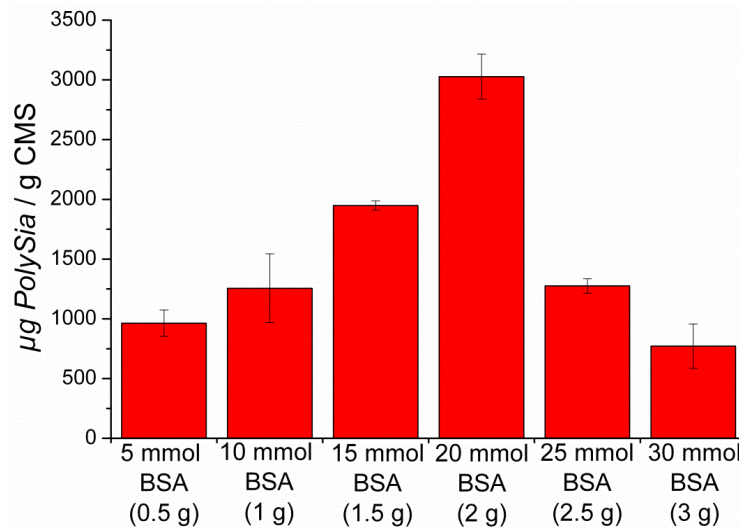


Abb. 5-83: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an BSA im zweiten Schritt.

Um die Nanopartikel auf Fluoreszenz zu untersuchen, wurden Fluoreszenz-Emissions-Spektren aufgenommen, die in Abb. 5-84 dargestellt sind.

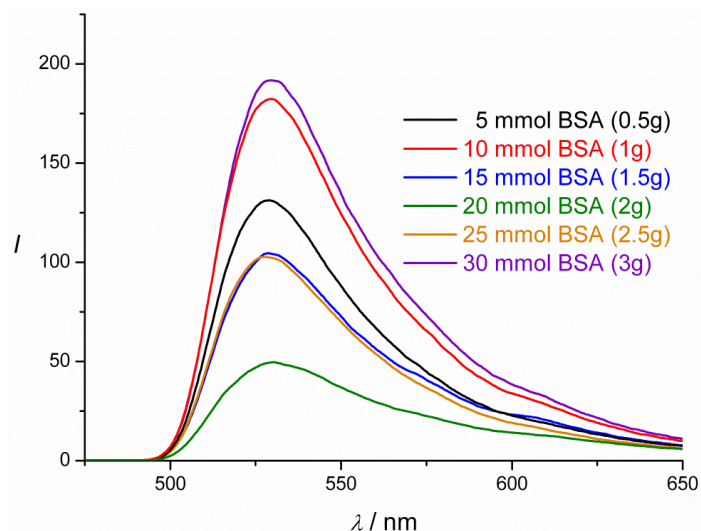


Abb. 5-84: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an BSA im zweiten Schritt variiert wurde.

Bei allen eingesetzten Mengen an BSA kann eine ausreichende Intensität der Fluoreszenz gemessen werden, so dass die „Click“-Reaktion trotz unterschiedlicher Mengen an BSA erfolgreich war. Dabei ist jedoch kein Zusammenhang der Intensität der Fluoreszenz mit der eingesetzten Menge an BSA zu erkennen, da sowohl wenig eingesetzte Mengen an BSA als auch große Mengen hohe sowie niedrige Intensitäten aufweisen. Die niedrigste Intensität wurde beim Einsatz von 20 mmol gemessen, bei der die höchste Menge an PolySia gebunden werden konnte. Da diese Intensität ausreichend ist, um die Fluoreszenz zu

detektieren, sind 20 mmol an BSA die optimale Menge für die Multifunktionalisierung mittels einer Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie.

Zur weiteren Optimierung wurde im zweiten Schritt die Menge an Propiolsäure verringert. Die IR-Spektren nach der Umsetzung mit BSA und verschiedenen Mengen an Propiolsäure sind in Abb. 5-85 gezeigt.

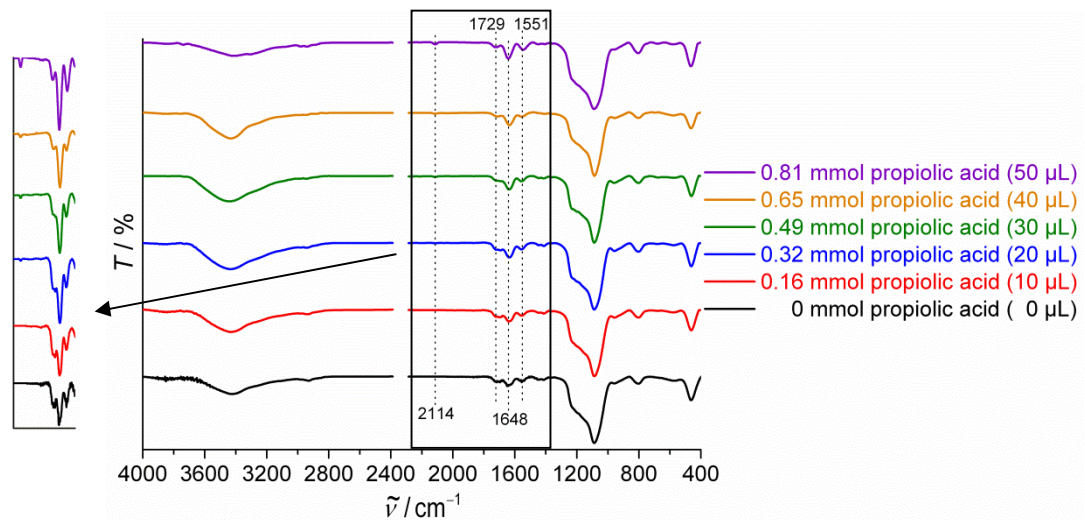


Abb. 5-85: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von BSA und Propiolsäure, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an Propiolsäure verwendet wurden.

Anhand der IR-Spektren ist zu erkennen, dass bei allen eingesetzten Mengen an Propiolsäure das BSA erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden konnte, da zum einen die beiden typischen Amidbanden bei 1648 und 1551 cm^{-1} und zum anderen die Bande der freien Carboxylgruppen bei 1729 cm^{-1} zu beobachten sind. Des Weiteren kann ab einer Menge von 0.32 mmol an Propiolsäure in der Vergrößerung eine leichte Bande bei 2114 cm^{-1} beobachtet werden, die mit zunehmender Menge an Propiolsäure weiter zunimmt, bis diese bei einer Menge von 0.81 mmol auch in den nicht vergrößerten Spektren sichtbar ist. Daraus folgt, dass ab einer Menge von 0.32 mmol die Anbindung der Propiolsäure erfolgreich war. Beim Einsatz von 0.16 mmol ist entweder keine Propiolsäure an die Oberfläche gebunden worden oder eine so geringe Menge, dass diese noch nicht detektiert werden kann. Die Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-27 zu entnehmen.

Tab. 5-27: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-85 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

0 mmol	0.49 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
-	3277	(C-H)-Valenzschwingung (Dreifachbindung)	Propiolsäure	[163]
2936	2965	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2884	2899	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	2114	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1722	1729	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1641	1641	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1551	1559	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1233	1241	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1092	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
944	959	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	463	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Die IR-Spektren nach weiterer Umsetzung mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid sind in Abb. 5-86 dargestellt.

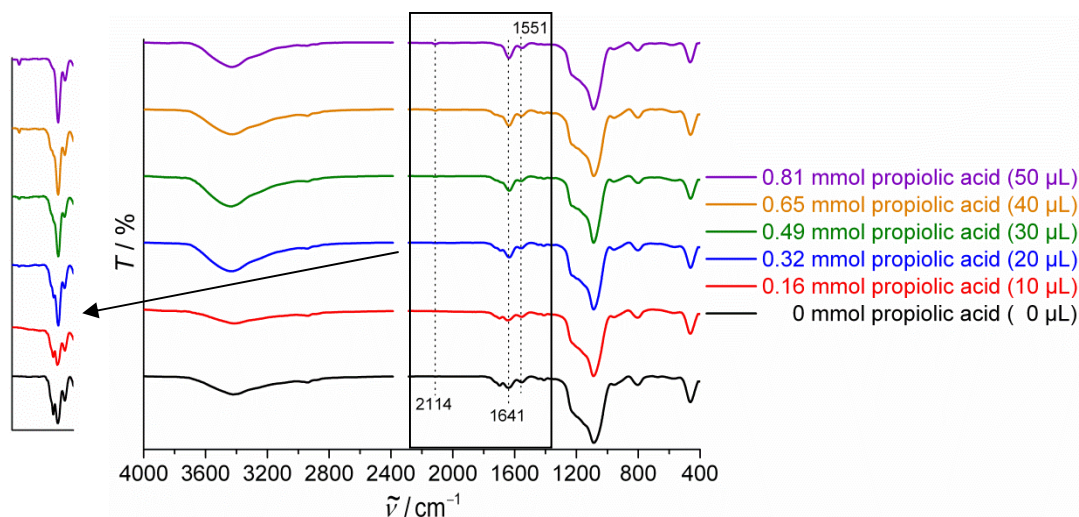


Abb. 5-86: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an Propiolsäure eingesetzt wurden.

Bei allen Spektren ab einer Menge von 0.32 mmol an Propiolsäure können Abnahmen der Intensität der Bande bei 2114 cm^{-1} sowie der Bande bei 1729 cm^{-1} beobachtet werden, woraus folgt, dass sowohl die Anbindung über das Linker-System als auch die „Click“-Reaktion erfolgreich war. Bei den eingesetzten Mengen von 0 und 0.16 mmol Propiolsäure ist die Anbindung der PolySia erfolgreich, was sich ebenfalls in der Abnahme der Bande bei 1729 cm^{-1} zeigt, während über den Erfolg der „Click“-Reaktion in diesen Fällen keine Aussage getroffen werden kann, da bei beiden Spektren die Alkinbande fehlt. Eine vergleichende Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-28 zu finden.

Tab. 5-28: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-86 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

0 mmol	0.49 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2951	2936	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2869	2869	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	2114	(C≡C)-Valenzschwingung	Propiolsäure	[163]
1707	-	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1641	1641	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1551	1551	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, Propiolsäure	[163]
1241	1233	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1085	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
937	952	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	796	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	463	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Zur Bestimmung des Gehalts an immobilisierter PolySia wurde ein TBA-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abb. 5-87 zu sehen sind.

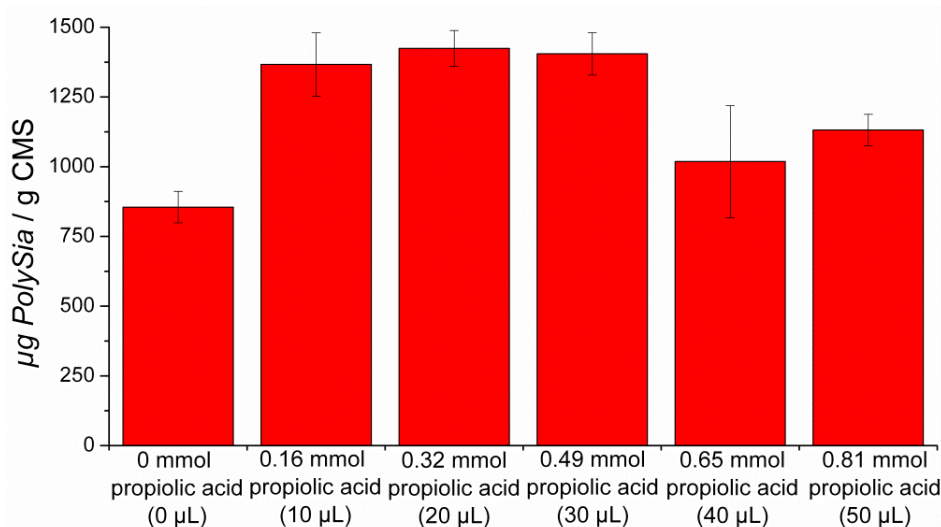


Abb. 5-87: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an Propiolsäure im zweiten Schritt.

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Menge an PolySia am höchsten ist, wenn weniger Propiolsäure eingesetzt wird. Dabei zeigen die Mengen zwischen 0.16 und 0.49 mmol vergleichbare Werte, während bei höheren Mengen an Propiolsäure die immobilisierte Menge an PolySia abnimmt. Daher kann angenommen werden, dass mehr Aminfunktionen im zweiten Schritt für die Anbindung des BSA zur Verfügung stehen, wodurch für die Immobilisierung der PolySia mehrere freie Carboxylgruppen vorhanden sind. Daraus folgt, dass mehr PolySia angebonden werden kann. Interessanterweise kann beim Verzicht auf Propiolsäure nur eine sehr geringe Menge an PolySia gebunden werden. Dies könnte eventuell daran liegen, dass der Fluoreszenzfarbstoff über seine Aminfunktionen mit den freien Carboxylgruppen des BSA reagiert, da keine Alkinfunktion für die „Click“-Reaktion

vorhanden ist. Dadurch könnte eine Konkurrenz zwischen der PolySia und dem Fluoreszenzfarbstoff um die freien Carboxylgruppen eintreten, so dass eine geringere Menge an PolySia gebunden werden kann, da nicht mehr alle freien Carboxylgruppen für die Funktionalisierung zur Verfügung stehen.

Zur Untersuchung, ob die Nanopartikel trotz dem Einsatz von weniger Propiolsäure fluoreszieren, wurden Fluoreszenz-Emissions-Spektren aufgenommen. Diese sind in Abb. 5–88 dargestellt.

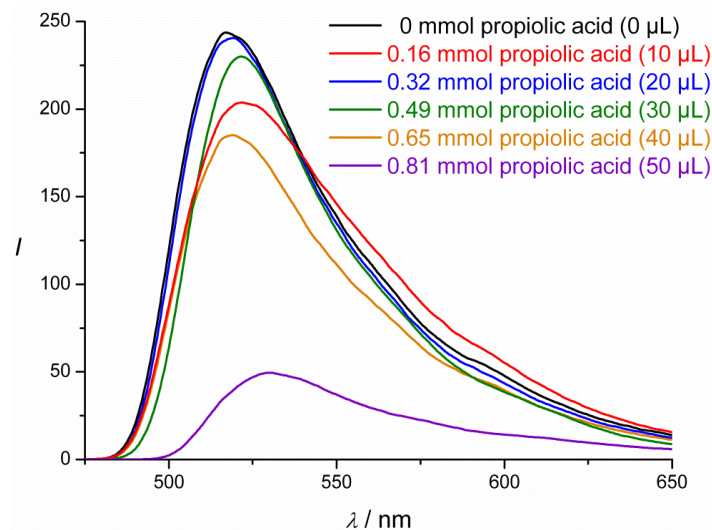


Abb. 5-88: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an Propiolsäure im zweiten Schritt variiert wurde.

Es kann dabei beobachtet werden, dass alle Nanopartikel eine ausreichende Intensität der Fluoreszenz aufweisen. Dabei liegen die Intensitäten von 0 bis 0.49 mmol Propiolsäure etwa im gleichen Bereich, danach kann zunächst eine leichte Abnahme der Intensität beobachtet werden, die beim Einsatz von 0.81 mmol stark sinkt. Die Verringerung der Intensität kann zum Beispiel daran liegen, dass sich größere Mengen an Fluoreszenzfarbstoff immobilisieren lassen, wodurch Quenching der Fluoreszenz eintritt, was die Intensität der Fluoreszenz verringert. Da die Nanopartikel beim Verzicht auf Propiolsäure trotzdem fluoreszieren, kann davon ausgegangen werden, dass der Fluoreszenzfarbstoff auch über seine Amingruppen mit den freien Carboxylgruppen reagieren kann. Dadurch könnte auch bei den anderen Multifunktionalisierungen, bei denen Propiolsäure vorhanden ist, ein Teil des Fluoreszenzfarbstoffs über die freien Carboxylgruppen binden, wodurch eine Konkurrenzreaktion gegenüber der PolySia existiert. Diese ist jedoch beim Verzicht auf Propiolsäure größer, da keine alternativen Anbindungsmöglichkeiten für den Fluoreszenzfarbstoff vorhanden sind. Als Optimum an Propiolsäure können 0.32 und 0.49 mmol an Propiolsäure angesehen werden, da hier die größten Mengen an PolySia gebunden werden und die Intensität der Fluoreszenz ausreichend ist.

Des Weiteren wurde die Menge an PolySia erhöht, um den Einfluss auf die Multifunktionalisierung zu überprüfen. Dabei wurde die genaue Menge an PolySia mittels

des TBA-Tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-89 zu sehen. Aus den Ergebnissen folgt, dass eine höhere Menge an PolySia immobilisiert werden konnte, wenn weniger PolySia in der Reaktion eingesetzt wurde. Daher kann angenommen werden, dass eine größere Menge an eingesetzter PolySia sich gegenseitig bei der Anbindung stört, indem zum Beispiel mehr Konkurrenz um die freien Anbindungsstellen vorhanden ist, wodurch weniger PolySia an die Oberfläche gebunden werden kann.

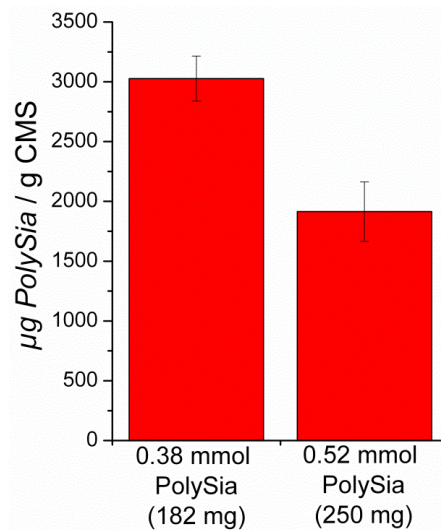


Abb. 5-89: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an PolySia im letzten Reaktionsschritt.

Diese Nanopartikel wurden auch auf ihre Intensität der Fluoreszenz untersucht. Die Fluoreszenz-Emissions-Spektren sind in Abb. 5-90 gezeigt.

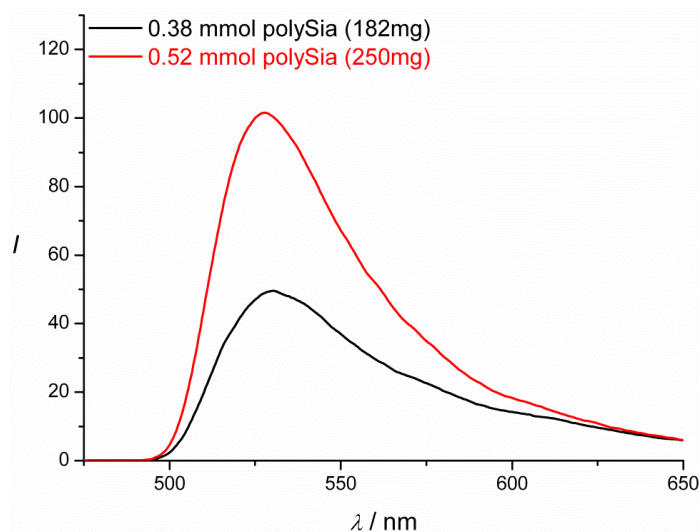


Abb. 5-90: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an PolySia im letzten Schritt variiert wurde.

Darauf ist zu erkennen, dass beide Proben eine ausreichende Intensität der Fluoreszenz aufweisen, so dass von einer erfolgreichen „Click“-Reaktion ausgegangen werden kann. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Nanopartikel, die mit einer größeren Menge an PolySia umgesetzt wurden, eine höhere Intensität der Fluoreszenz aufweisen. Dies könnte daran liegen, dass durch die erhöhte Konkurrenzreaktion der PolySia weniger PolySia immobilisiert wurde, wodurch die Alkinfunktion besser zugänglich für das Alexa Fluor[®] Azid waren, so dass eine größere Menge an Fluoreszenzfarbstoff gebunden wurde. Da jedoch bereits die angebundene Menge beim Einsatz von weniger PolySia ausreichend ist und eine höhere Menge an immobilisierter PolySia bei Verwendung von 0.38 mmol detektiert werden konnte, ist die optimale Menge an eingesetzter PolySia die geringere.

Es wurde auch überprüft, ob die verwendete Menge an Fluoreszenzfarbstoff. Zur Bestimmung des genauen Gehalts an PolySia wurde ein TBA-Test durchgeführt. Die Ergebnisse des Tests sind in Abb. 5-91 dargestellt.

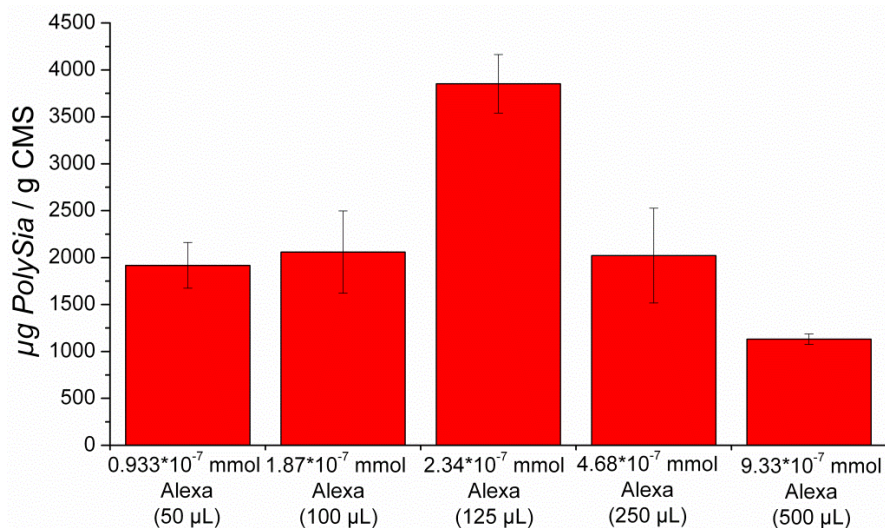


Abb. 5-91: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an Alexa Fluor[®] 488-Azid im letzten Reaktionsschritt.

Dabei ist zu beobachten, dass die Menge an angebundener PolySia zunächst mit steigender Menge an Fluoreszenzfarbstoff ansteigt, bis sie ein Maximum bei $2.34 \cdot 10^{-7}$ mmol Alexa Fluor[®] 488 erreicht. Anschließend nimmt die Menge an immobilisierter PolySia mit weiter steigender Menge an Fluoreszenzfarbstoff ab. Daraus folgt, dass die Menge an Fluoreszenzfarbstoff einen Einfluss auf die gebundene Menge an PolySia hat. Dabei scheinen höhere Mengen an Fluoreszenzfarbstoff die Anbindung von PolySia zu erschweren. Dies könnte eventuell daran liegen, dass mehr Fluoreszenzfarbstoff gebunden wird, wodurch einige der freien Carboxylgruppen abgeschirmt werden, so dass diese nicht mehr frei zugänglich sind und weniger PolySia gebunden werden kann. Da alle Werte etwa im gleichen Bereich liegen außer bei der Verwendung von $2.34 \cdot 10^{-7}$ mmol Alexa Fluor[®] 488-Azid, kann angenommen werden, dass es sich hierbei um die optimale Menge für die Multifunktionalisierung handelt.

Die Fluoreszenz-Emissions-Spektren, die zur Untersuchung der Intensität der Fluoreszenz aufgenommen wurden, sind in Abb. 5-92 gezeigt.

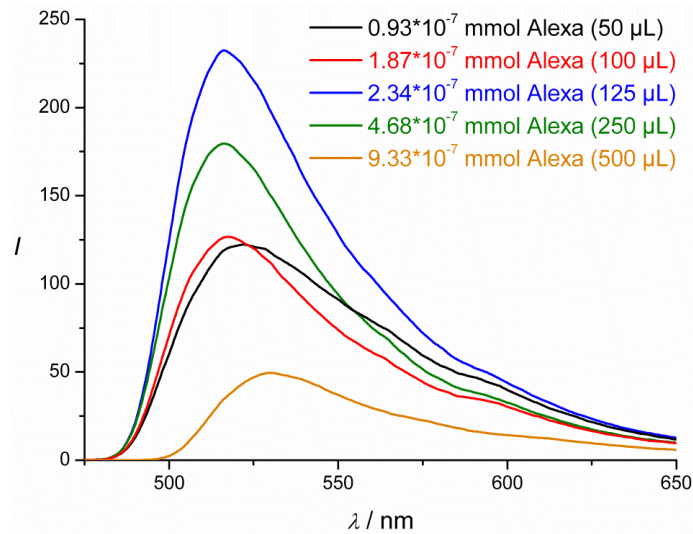


Abb. 5-92: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an Alexa Fluor[®] 488-Azid im letzten Schritt variiert wurde.

Bei allen Nanopartikeln kann eine Fluoreszenz beobachtet werden. Dabei steigt die Intensität der Fluoreszenz zunächst mit steigender Menge an Alexa Fluor[®] 488-Azid bis zu einem Maximum bei $2.34 \cdot 10^{-7}$ mmol an und nimmt anschließend wieder ab. Die Abnahme der Intensität könnte daraus resultieren, dass bei erhöhten Mengen an Fluoreszenzfarbstoff mehr gebunden wird, wodurch es zum Quenching der Fluoreszenz kommt und niedrigere Intensitäten gemessen werden. Da die höchste Menge an PolySia bei Verwendung von $2.34 \cdot 10^{-7}$ mmol detektiert wurde und die Fluoreszenz am stärksten ist, sollte zur optimalen Anbindung diese Menge an Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden.

Da beiden einzelnen Reaktionen, die bei der Multifunktionalisierung kombiniert werden, verschiedene Lösemittel verwendet werden, wurde überprüft, ob die Multifunktionalisierung besser in Dichlormethan (DCM) oder in Ethanol (EtOH) abläuft. Dabei wurde der genaue Gehalt an PolySia mittels des TBA-Tests ermittelt, dessen Ergebnisse in Abb. 5-93 dargestellt sind. Aus den Ergebnissen folgt, dass die Anbindung der PolySia viel besser in DCM erfolgt als in Ethanol. Dabei ist anzunehmen, dass bei der Verwendung von Ethanol nur sehr wenig bzw. keine PolySia gebunden wurde, da der ermittelte Wert im Bereich der Blindwerte liegt, die auch gemessen werden, wenn keine PolySia an den Nanopartikeln gebunden wurde. Das die deacetylierte PolySia schlecht in Ethanol an die Nanopartikel bindet, liegt vermutlich daran, dass für die Immobilisierung über das Linker-System DCC als Katalysator benötigt wird. Da DCC gar nicht bis sehr schlecht in Ethanol löslich ist, konnten die freien Carboxylgruppen an der Silica-Oberfläche nicht aktiviert werden, wodurch keine bzw. nur eine geringfügige Reaktion mit den Amingruppen der deacetylierten PolySia stattfand. Um eine höhere Menge an PolySia in Ethanol binden zu können, müsste ein anderer Katalysator verwendet werden, der in Ethanol besser löslich ist.

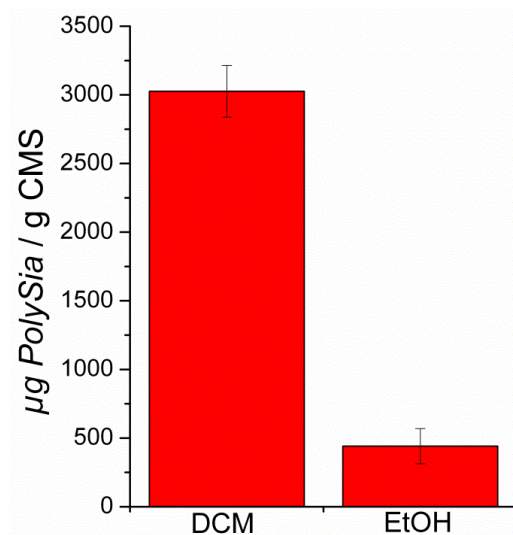


Abb. 5-93: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Verwendung von Dichlormethan bzw. Ethanol als Lösemittel.

Die Nanopartikel wurden des Weiteren auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die Fluoreszenz-Emissions-Spektren sind in Abb. 5-94 gezeigt.

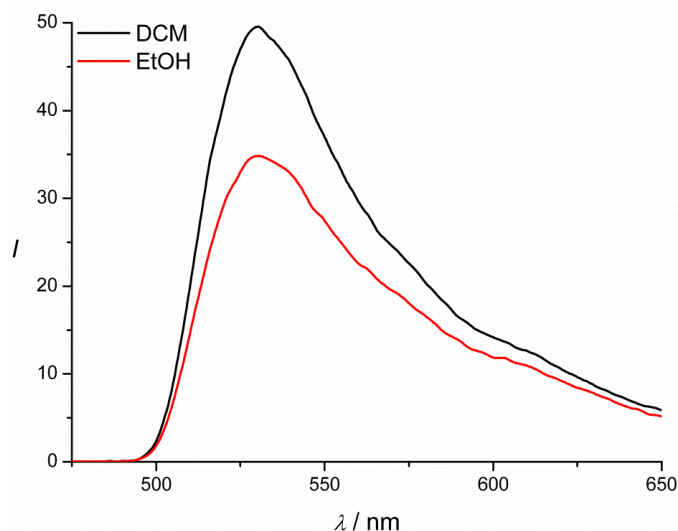


Abb. 5-94: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei Dichlormethan bzw. Ethanol als Lösemittel verwendet wurden.

Bei beiden Reaktionen kann eine ausreichende Fluoreszenz detektiert werden. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz unerwarteterweise höher, wenn die Reaktion in DCM durchgeführt wird, obwohl sowohl der Fluoreszenzfarbstoff als auch das Kupfer in wässriger Lösung zu der DCM-Suspension gegeben wurden und sich eine wässrige Phase gebildet hatte. Daraus folgt, dass sich der Wechsel des Lösemittels von Ethanol auf DCM nicht negativ auf die Anbindung per „Click“-Reaktion auswirkt. Dabei scheint das als Katalysator zugegebene Kupfer, das zuvor in wenig Wasser gelöst wurde, sich in die organische Phase zu begeben und da die Reaktion zu katalysieren. Daher sollte die Multifunktionalisierung aus der

Kombination von Linker-System und „Click“-Reaktion weiterhin in DCM, dem Lösemittel des Linker-Systems, durchgeführt werden, da sowohl bei der Anbindung von PolySia wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden als auch bei der Immobilisierung des Fluoreszenzfarbstoffes.

Als letztes wurde auf den Einsatz von Kupfer verzichtet, um zu überprüfen, ob die „Click“-Reaktion auch ohne Kupfer abläuft bzw. ob der Fluoreszenzfarbstoff eventuell über seine Amingruppen an die Oberfläche binden kann, so dass die Toxizität des Kupfers aus der „Click“-Chemie reduziert wird (s. Kapitel 5.5). Zur Bestimmung der angebondenen Menge an PolySia wurde der TBA-Test durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abb. 5-95 dargestellt. Interessanterweise scheint die Anwesenheit von Kupfer einen Einfluss auf die Immobilisierung der PolySia zu haben, denn bei dem Verzicht auf Kupfer konnte eine wesentlich geringere Menge an PolySia gebunden werden als wenn Kupfer in der Reaktion anwesend ist. Eventuell hat Kupfer eine Eigenschaft, die sich auf die Anbindung der PolySia an die Nanopartikel über das Linker-System auswirkt, wodurch die Immobilisierung erhöht wird. Eventuell liegt es auch daran, dass der Fluoreszenzfarbstoff ohne Kupfer nur über seine Amingruppen mit den freien Carboxylgruppen an der Oberfläche reagieren kann, wodurch eine Konkurrenz zwischen der PolySia und dem Alexa Fluor[®] 488-Azid entsteht.

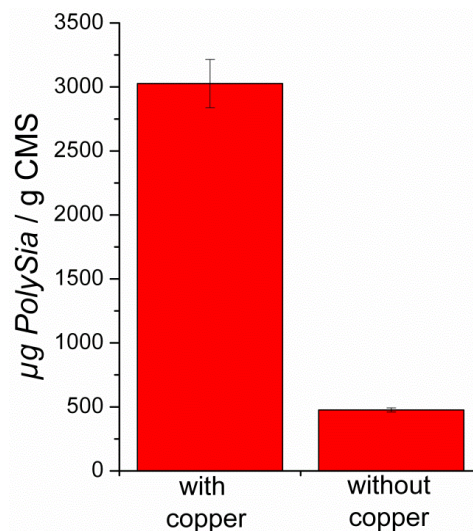


Abb. 5-95: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Verwendung und beim Verzicht auf Kupfer.

Die Fluoreszenz-Emissions-Spektren, die zur Untersuchung der Fluoreszenz der Nanopartikel aufgenommen wurden, sind in Abb. 5-96 zu sehen. Diese zeigen, dass die Intensität der Fluoreszenz wesentlich höher ist, wenn auf den Einsatz von Kupfer verzichtet wird. Dies wiederum ist ein Hinweis darauf, dass der Fluoreszenzfarbstoff in diesem Fall vermutlich mit seinen Amingruppen mit den freien Carboxylgruppen reagiert und somit über das Linker-System an die Oberfläche gebunden wird. Dadurch wird die Anbindung von PolySia gestört und somit verringert, da kaum Anbindungsstellen mehr vorhanden sind. Daher kommt es zu einer wesentlich höheren Intensität der Fluoreszenz, während nur eine

sehr geringe Menge an immobilisierter PolySia detektiert werden kann. Daraus folgt, dass der Verzicht auf Kupfer für den Fluoreszenzfarbstoff nicht relevant ist, da dieser trotzdem, wenn auch über eine andere Bindungschemie, an die Oberfläche binden kann. Jedoch ist der Verzicht auf Kupfer im Hinblick auf die angebundene PolySia nicht von Vorteil, da der Fluoreszenzfarbstoff hier die freien Carboxylgruppen abreagieren lässt. Daher sollte bei der Multifunktionalisierung in einer Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie nicht auf den Einsatz von Kupfer verzichtet werden, da sonst keine möglichst große Menge an PolySia an die Nanopartikel gebunden werden kann, auch wenn so die Toxizität des Kupfers noch vorhanden ist.

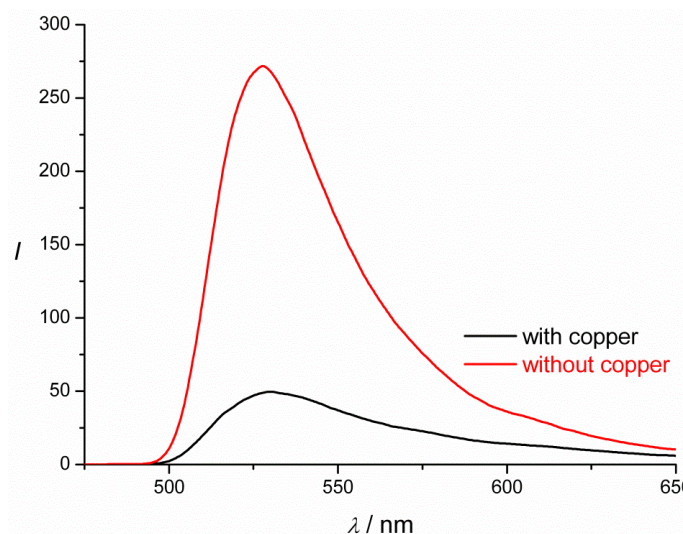


Abb. 5-96: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei zum einen Kupfer als Katalysator eingesetzt wurde und zum anderen auf den Einsatz verzichtet wurde.

5.6.3 Anbindung ausschließlich über „Click“-Chemie

Eine weitere Methode um die Nanopartikel multifunktionell mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff auszustatten, ist die Anbindung allein über die „Click“-Chemie. Dazu wurde die Alkin-modifizierte PolySia sowie das Alexa Fluor[®] 488-Alkin verwendet. Für die Anbindung wurden Nanopartikel verwendet, die zuvor über BUTMS mit einer Azidfunktion modifiziert wurden. Der Erfolg der Anbindung wurde mit IR-Spektroskopie überprüft. Die IR-Spektren vor und nach der „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Alkin sind in Abb. 5-97 dargestellt. Daran ist zu erkennen, dass die „Click“-Reaktion erfolgreich ist, da die Intensität der Bande bei 2108 cm^{-1} , die der Schwingung der Azidgruppe zugeordnet werden kann, nach der „Click“-Reaktion leicht abnimmt. Daraus folgt, dass einige der Azidfunktionen mit den Alkingruppen der PolySia sowie des Fluoreszenzfarbstoffs reagiert haben. Des Weiteren folgt daraus, dass noch nicht alle Azidgruppen abreagiert haben, da die Schwingung dieser Gruppe noch detektiert wird. Eine Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-29 zu entnehmen.

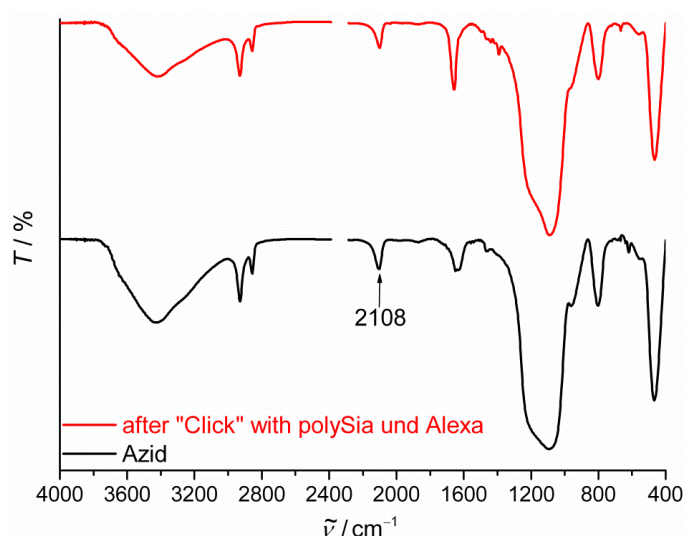


Abb. 5-97: IR-Spektren von Silica-Nanopartikeln nach der multifunktionellen Anbindung von Alkin-modifizierter PolySia und Alexa Fluor® 488-Alkin mittels der „Click“-Chemie.

Tab. 5-29: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-97 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

Azid	nach „Click“	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2934	2934	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2857	2857	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2108	2101	(N ₃)-Valenzschwingung	Azid	[163]
1636	1666	(O-H)-Deformationsschwingung	Wasser	[163]
1472	-	(C-H)-Deformationsschwingung	BUTMS	[163]
1088	1088	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
962	952	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
804	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
474	467	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Außerdem wurde der Gehalt an angebundener PolySia mittels des TBA-Tests bestimmt, dessen Ergebnisse in Abb. 5-98 gezeigt sind. Es ist zu erkennen, dass die Anbindung von PolySia mittels der „Click“-Reaktion bei der Multifunktionalisierung erfolgreich war. Dabei konnte eine sehr große Menge gebunden werden, obwohl in der „Click“-Chemie wesentlich geringere Mengen an PolySia eingesetzt worden sind (nur 0.072 mmol, während beim Linker-System 0.38 mmol eingesetzt wurden). Daraus folgt, dass die Anbindung über die „Click“-Chemie bei der Multifunktionalisierung sehr gute Ergebnisse erzielt und nicht von der zusätzlichen Immobilisierung von Alexa Fluor® 488-Alkin gestört wird. Der einzige limitierende Faktor dieser Reaktion ist, dass Kupfer als Katalysator eingesetzt wird und somit die Nanopartikel für anschließende Verwendungen in der Biomedizin toxische Effekte aufweisen. Dies zeigt sich auch bei der Multifunktionalisierung in den grünlich gefärbten Nanopartikeln nach der Reaktion.

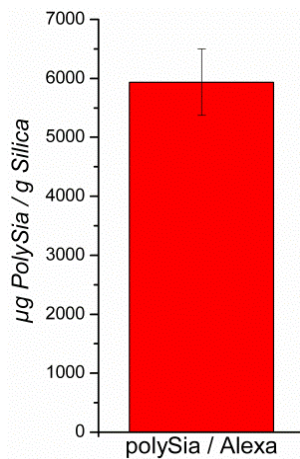


Abb. 5-98: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Nanopartikeln, die über die „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia sowie Alexa Fluor® 488-Alkin multifunktionalisiert wurden.

Die Fluoreszenz dieser Nanopartikel wurde zunächst mittels Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht. Die Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren sind in Abb. 5-99 zu sehen.

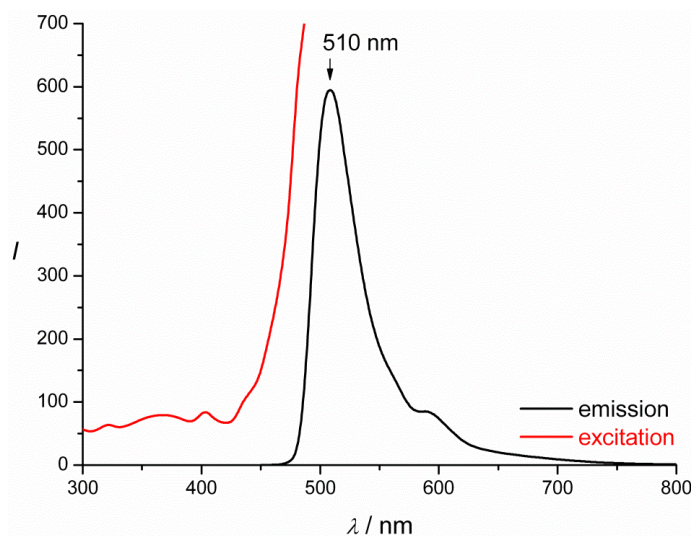


Abb. 5-99: Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren von Silica-Nanopartikeln, die nur über die „Click“-Chemie mit PolySia sowie Alexa Fluor® 488-Alkin multifunktionalisiert wurden.

Anhand des Emissionsspektrums ist zu erkennen, dass die Nanopartikel eine sehr starke Fluoreszenz aufweisen, da die Intensität von 600 sehr groß ist. Dabei zeigen die Nanopartikel ein Maximum bei etwa 510 nm, welches in etwa mit den Daten der Literatur des reinen Alexa Fluor® 488-Alkin übereinstimmt, dass bei 520 nm liegt.^[96] Die Verschiebung des Maximums könnte durch die Anbindung verursacht werden. Die multifunktionelle Immobilisierung könnte eventuell einen Effekt auf die Verschiebung haben, wodurch das Maximum zu kleineren Werten verschoben wird. Beim Anregungsspektrum ist kein Maximum bei 480 nm zu beobachten, was daran liegen könnte, dass durch den starken Anstieg der Intensität in diesem Bereich das Signal überlagert wird und somit nicht sichtbar ist.

Des Weiteren wurden die Nanopartikel unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die Aufnahmen sind in Abb. 5-100 abgebildet, wobei zunächst eine Belichtungszeit von 2 Sekunden gewählt wurde, damit die Aufnahmen mit den vorherigen vergleichbar sind. Dabei zeigen die Nanopartikel eine sehr starke grüne Fluoreszenz, die extrem leuchtet, so dass angenommen werden kann, dass eine sehr große Menge an Fluoreszenzfarbstoff über die Multifunktionalisierung angebinden werden konnte. Aufgrund der sehr starken Fluoreszenz bei einer Belichtungszeit von 2 Sekunden, wurde diese auf 640 ms verkürzt. In dem Fall leuchten die Nanopartikel immer noch sehr stark, jedoch kommt es nicht mehr zu Überbelichtung. Aus den Ergebnissen folgt, dass die Multifunktionalisierung ausschließlich über die „Click“-Chemie erfolgreich ist und sowohl eine sehr große Menge an PolySia als auch an Fluoreszenzfarbstoff an die Oberfläche gebunden werden kann, ohne dass sich die beiden Moleküle bei der Anbindung gegenseitig stören. Allerdings wird bei dieser Reaktion Kupfer als Katalysator verwendet. Daher können diese Nanopartikel anschließend nicht für biomedizinische Zwecke angewendet werden, aufgrund der akuten Toxizität des Kupfers gegenüber Zellen wie bereits in Kapitel 5.5 gezeigt werden konnte.

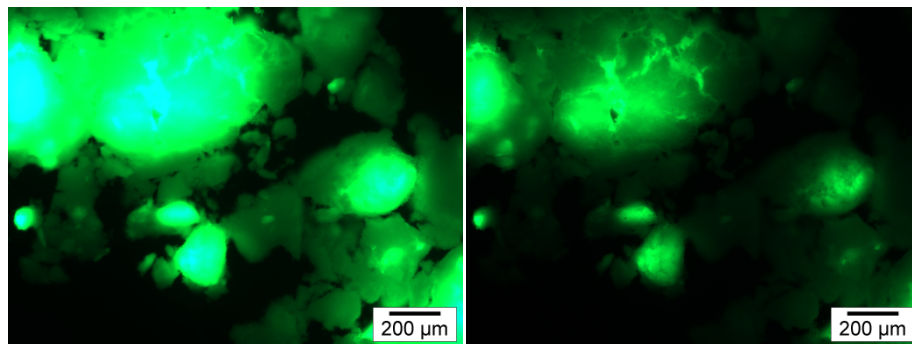


Abb. 5-100: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von Silica-Nanopartikeln, die mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Alkin über die „Click“-Chemie multifunktionalisiert wurden (Links: 2 s Belichtung; Rechts: 640 ms Belichtung).

5.6.4 Anbindung ausschließlich über das Linker-System

Die letzte getestete Möglichkeit die Nanopartikel zu multifunktionalisieren, ist die Anbindung von PolySia und Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin allein über das Linker-System. Dazu wurden calcinierte CMS-Nanopartikel, die mit BSA modifiziert wurden, verwendet. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels IR-Spektroskopie überprüft. Die IR-Spektren der Nanopartikel vor und nach der Multifunktionalisierung, wenn diese zunächst für 24 Stunden mit PolySia und dann für weitere 24 Stunden mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin umgesetzt wurden, sind als Beispiel in Abb. 5-101 dargestellt.

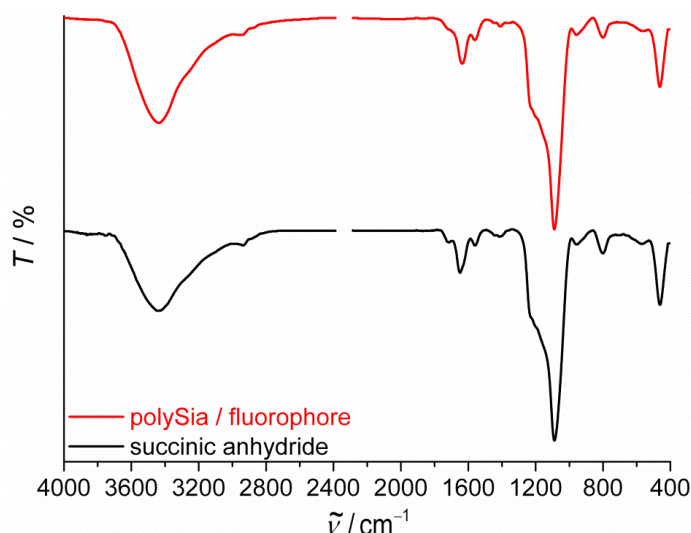


Abb. 5-101: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit BSA (unten) sowie mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin über das Linker-System funktionalisiert wurden.

Aus den IR-Spektren ist zu entnehmen, dass nach der Umsetzung mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin eine Abnahme der Intensität der Bande bei 1722 cm^{-1} , die der Schwingung von freien Carboxylgruppen zuzuordnen ist, zu beobachten ist. Daraus folgt, dass diese mit den Aminfunktionen der PolySia und des Fluoreszenzfarbstoffs reagiert haben. Des Weiteren ist eine leichte Zunahme der Intensität der typischen Amidbanden bei 1645 und 1559 cm^{-1} zu erkennen, so dass angenommen werden kann, dass sich weitere Amidbindungen ausgebildet haben. Wie schon in vorherigen Reaktionen können keine neuen Banden detektiert werden, die der PolySia bzw. dem Fluoreszenzfarbstoff zuzuordnen wären. Eine Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-30 zu entnehmen.

Tab. 5-30: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-101 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

BSA	PolySia / Alexa	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2944	2944	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2877	2869	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
1722	-	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1648	1641	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1559	1559	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1404	1404	(C-H)-Deformationsschwingung	APTES, BSA	[163]
1241	1241	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1092	1092	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
952	959	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
811	804	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
463	463	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Um zu überprüfen, ob die Nanopartikel tatsächlich mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wurden die Nanopartikel mittels des TBA-Tests auf den Gehalt an PolySia sowie mit der Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht. Dabei wurde zur Optimierung zunächst die Reihenfolge der Zugabe der Substrate verändert. Die Ergebnisse

des TBA-Tests sind in Abb. 5-102 zu sehen. Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass bei allen Varianten PolySia erfolgreich gebunden werden konnte, auch wenn die angebondenen Mengen stark variieren. Dabei zeigt die Variante A, bei der zunächst PolySia und nach 24 Stunden ohne Trocknungsschritt Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin zugegeben wurde, die besten Ergebnisse in Bezug auf die immobilisierte Menge an PolySia. Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass die PolySia zunächst ungestört an die freien Carboxylgruppen binden kann, ohne dass eine Konkurrenz zum Fluoreszenzfarbstoff besteht. Ungefähr die Hälfte dieser Menge konnte mittels der Variante C angebonden werden, bei der PolySia und Fluoreszenzfarbstoff gleichzeitig zur Lösung gegeben wurden, wobei davon ausgegangen werden kann, dass die beiden Moleküle um die Anbindungsstellen konkurrieren, wodurch eine geringere Menge an PolySia gebunden wurde. Nur eine sehr geringe Menge an PolySia konnte gebunden werden, wenn Variante B verwendet wurde, bei der zuerst der Fluoreszenzfarbstoff zugegeben wurde und nach 24 Stunden ohne Trocknungsschritt die PolySia. Dies könnte daran liegen, dass in diesem Fall die freien Carboxylgruppen bereits mit dem Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt wurden, so dass zum einen nicht mehr genügend Anbindungsstellen für die PolySia vorhanden waren und zum anderen die noch freien Gruppen eventuell zum Teil von den angebondenem Fluoreszenzfarbstoff abgeschirmt wurden.

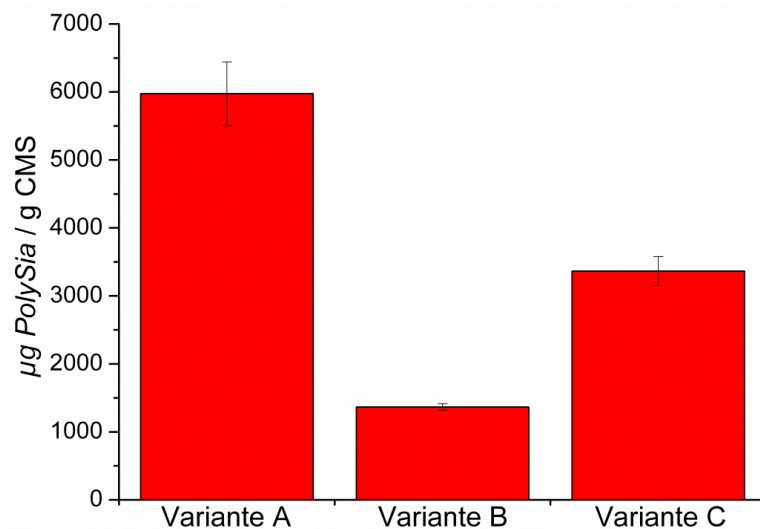


Abb. 5-102: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step).

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren dieser Nanopartikel sind in Abb. 5-103 gezeigt. Aus den Spektren ist zu entnehmen, dass bei allen Varianten eine ausreichende Menge an Fluoreszenzfarbstoff gebunden werden konnte, wobei bei den Varianten B und C die höchsten Intensitäten detektiert wurden, die in etwa vergleichbar sind. Daraus folgt, dass bei Variante C, der Fluoreszenzfarbstoff und die PolySia um die Anbindungsstellen konkurrieren. Dadurch kann der Fluoreszenzfarbstoff besser und die PolySia in geringeren Mengen angebonden werden als bei Variante A, da beide gleichzeitig mit den freien

Carboxylgruppen reagieren können und diese nicht bereits durch eins der Substrate abgeschirmt werden. Bei Variante B kann, wie beim TBA-Test schon vermutet, davon ausgegangen werden, dass der Fluoreszenzfarbstoff zuerst mit den freien Carboxylgruppen reagiert und somit besser angebunden werden kann, wodurch die weiteren freien Carboxylgruppen für die PolySia nicht mehr alle frei zugänglich sind, so dass eine wesentlich geringere Menge immobilisiert werden kann. Bei Variante A ist die Intensität der Fluoreszenz am geringsten, jedoch völlig ausreichend. In diesem Fall werden die restlichen unreaktierten freien Carboxylgruppen von der bereits gebundenen PolySia abgeschirmt, so dass weniger Fluoreszenzfarbstoff anbinden kann. Da die Intensität jedoch ausreichend ist und eine sehr große Menge an PolySia gebunden werden konnte, wurde in allen weiteren Reaktionen diese Anbindungsvariante verwendet.

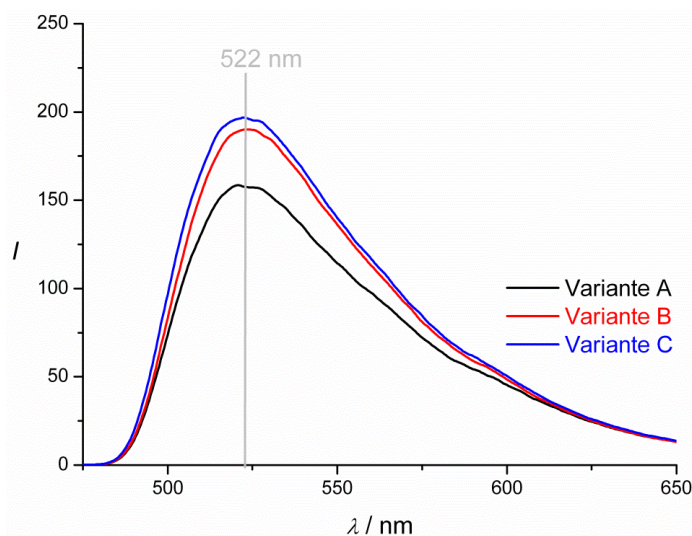


Abb. 5-103: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step).

Da bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die eingesetzte Menge an APTES einen Einfluss auf die Anbindung der PolySia hat, wurde der Einfluss des APTES auf die Multifunktionalisierung mittels des Linker-Systems untersucht.^[147] Die IR-Spektren nach der Umsetzung mit PolySia und Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin sind in Abb. 5-104 vergleichend gezeigt. In allen Spektren, bei denen APTES im ersten Schritt an die Oberfläche gebunden wurde, kann eine Abnahme der Intensität der Bande bei 1730 cm^{-1} beobachtet werden, woraus folgt, dass die freien Carboxylgruppen nicht mehr vorhanden sind und mit den Aminfunktionen der PolySia sowie des Alexa Fluor® 488-Hydroxylamins reagiert haben. Ein weiterer Hinweis für den Erfolg dieser Reaktion ist die Zunahme der Banden der Amidbindung bei 1637 und 1553 cm^{-1} , was auf eine neu gebildete Amidbindung hindeutet, die bei der Anbindung über das Linker-System entsteht. Wird das BSA direkt an die Oberfläche der Nanopartikel gebunden, kann keine neue Bande nach der Umsetzung mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff beobachtet werden sowie keine Änderung der Intensitäten

der Banden. Daher kann aus den IR-Spektren keine Aussage über den Erfolg der Reaktion ohne APTES gemacht werden. Eine Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-31 zu finden.

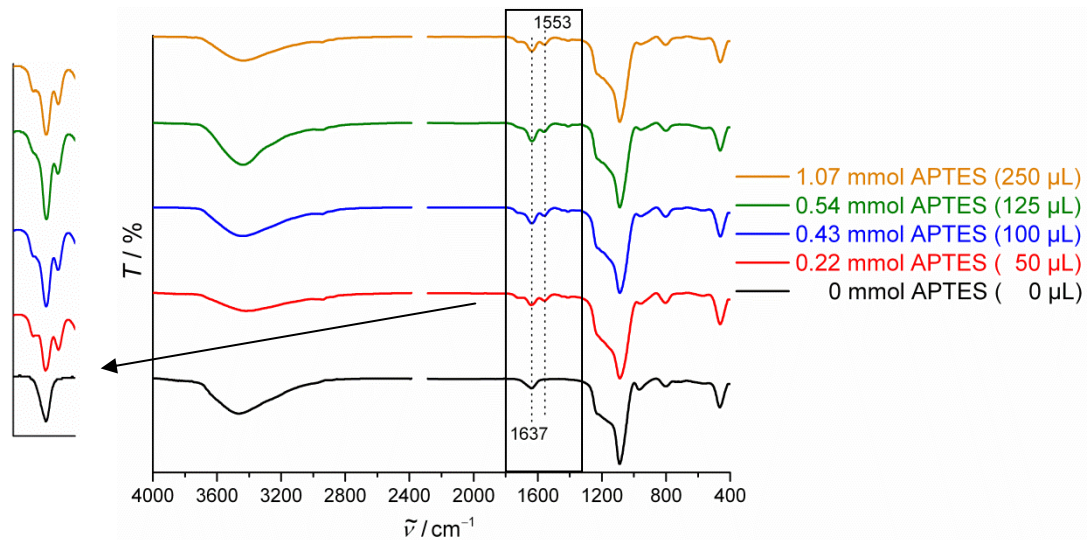


Abb. 5-104: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor® 488-Hydroxylamin, wenn im ersten Schritt verschiedene Mengen an APTES eingesetzt wurden.

Tab. 5-31: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-104 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

0 mmol	0.43 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
-	2933	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
-	2863	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
1637	1637	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia, (Wasser)	[163]
-	1553	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1248	1242	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1096	1089	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
967	953	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
807	799	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
464	472	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Zur Bestimmung des Gehalts an PolySia auf der Oberfläche der Nanopartikel, wurde der TBA-Test durchgeführt. Die Ergebnisse des Tests, wenn unterschiedliche Mengen an APTES im ersten Schritt eingesetzt wurden, sind in Abb. 5-105 dargestellt. Anhand der Ergebnisse des TBA-Tests ist zu erkennen, dass bei allen eingesetzten Mengen an APTES PolySia erfolgreich gebunden werden konnte und dass die Menge einen Einfluss auf die Anbindung der PolySia bei der Multifunktionalisierung mittels des Linker-Systems hat. Dabei nimmt die Menge an immobilisierter PolySia mit zunehmender Menge an APTES ab. Die höchsten Mengen konnten gebunden werden, wenn kein bzw. 0.22 mmol APTES verwendet wurden. Die schlechtesten Ergebnisse wurden mit der höchsten eingesetzten Menge an APTES (1.07 mmol) erzielt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen aus vorherigen Arbeiten.^[147] Da die PolySia gebunden werden konnte, wenn kein APTES verwendet wurde, kann angenommen werden, dass das BSA direkt mit den Silanolgruppen

der Silica-Oberfläche reagiert und zum Beispiel einen Kieselsäureester bildet, der anschließend direkt mit der PolySia reagieren kann.

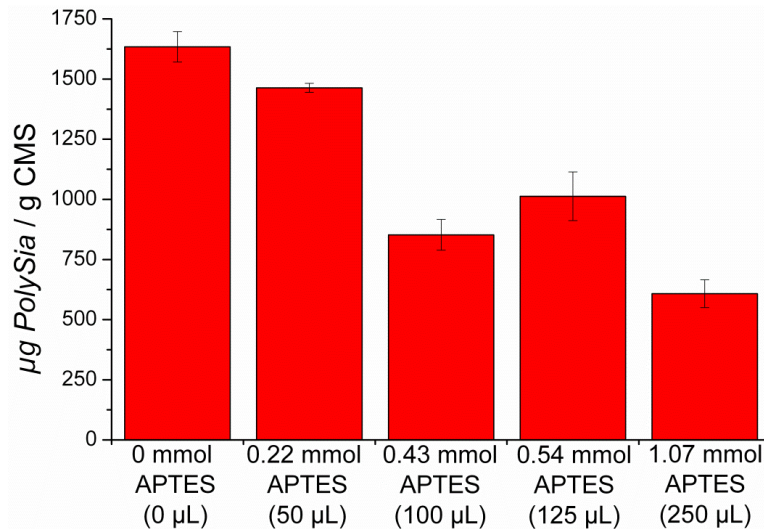


Abb. 5-105: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an APTES im ersten Reaktionsschritt variiert wurde.

Die Fluoreszenz dieser Nanopartikel wurde mittels der Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht. Die Fluoreszenz-Emissionsspektren sind in Abb. 5-106 gezeigt.

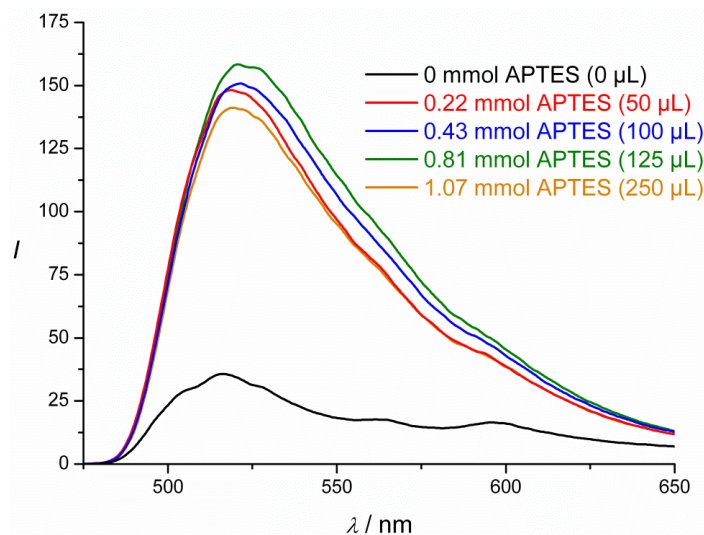


Abb. 5-106: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an APTES im ersten Reaktionsschritt verändert wurde.

Es ist zu erkennen, dass alle Nanopartikel eine Fluoreszenz aufweisen. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz bei den Nanopartikeln, bei denen APTES für die Anbindung verwendet wurde, in etwa vergleichbar, während die Intensität der Nanopartikel, bei denen kein APTES benutzt wurde, sehr gering ist. Aus den Ergebnissen folgt, dass die beste Zugabemenge an APTES 0.22 mmol ist, da unter anderem die höchste Menge an PolySia

immobilisiert werden konnte und die Intensität der Fluoreszenz ausreichend für die Verfolgung der Nanopartikel ist.

Zur weiteren Optimierung der Multifunktionalisierung mit dem Linker-System, wurde im zweiten Reaktionsschritt die Menge an BSA variiert. Die IR-Spektren der Nanopartikel, die mit verschiedenen Mengen an BSA funktionalisiert wurden, sind in Abb. 5-107 zu sehen. Nach der Umsetzung mit verschiedenen Mengen an BSA können bei allen Spektren drei neue Banden beobachtet werden, wobei die beiden Banden bei 1653 und 1553 cm^{-1} der gebildeten Amidbindung zugeordnet werden können, während die Bande bei 1736 cm^{-1} auf freie Carboxylgruppen zurückzuführen ist. Daraus folgt, dass in allen Fällen BSA erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden konnte. Des Weiteren ist eine Zunahme der Intensität der Banden mit zunehmender Menge an BSA zu beobachten, die ein Maximum bei 15 mmol hat. Die Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-32 zu sehen.

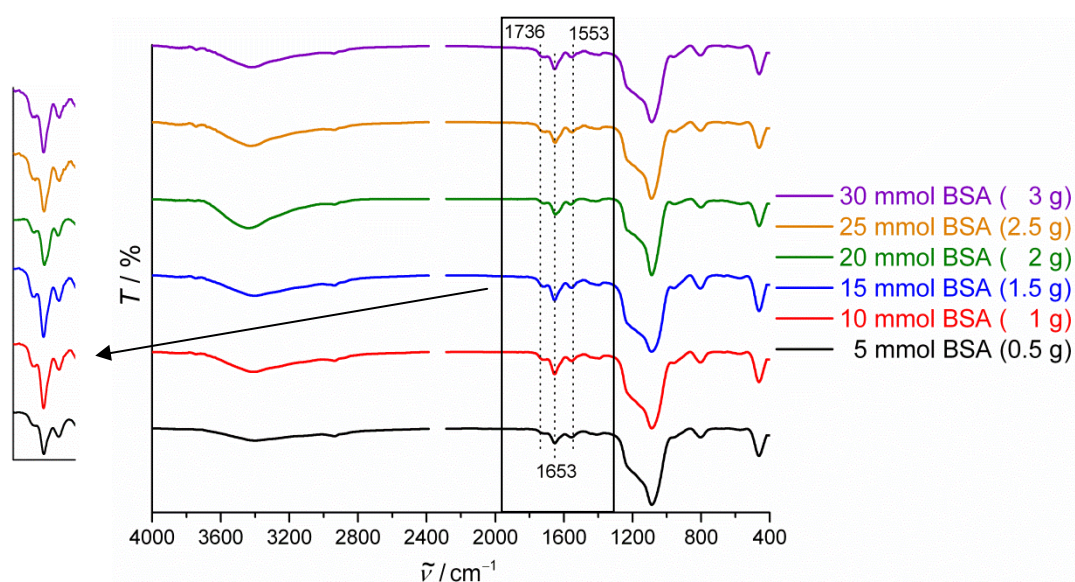


Abb. 5-107: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen an BSA modifiziert wurden.

Tab. 5-32: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-107 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

10 mmol	30 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2939	2947	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2863	2863	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
1736	1736	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1653	1653	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1545	1553	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1409	1401	(C-H)-Deformationsschwingung	APTES, BSA	[163]
1234	1248	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1089	1096	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
937	945	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
807	807	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
464	464	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Die IR-Spektren nach weiterer Umsetzung der Nanopartikel mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin sind in Abb. 5-108 gezeigt.

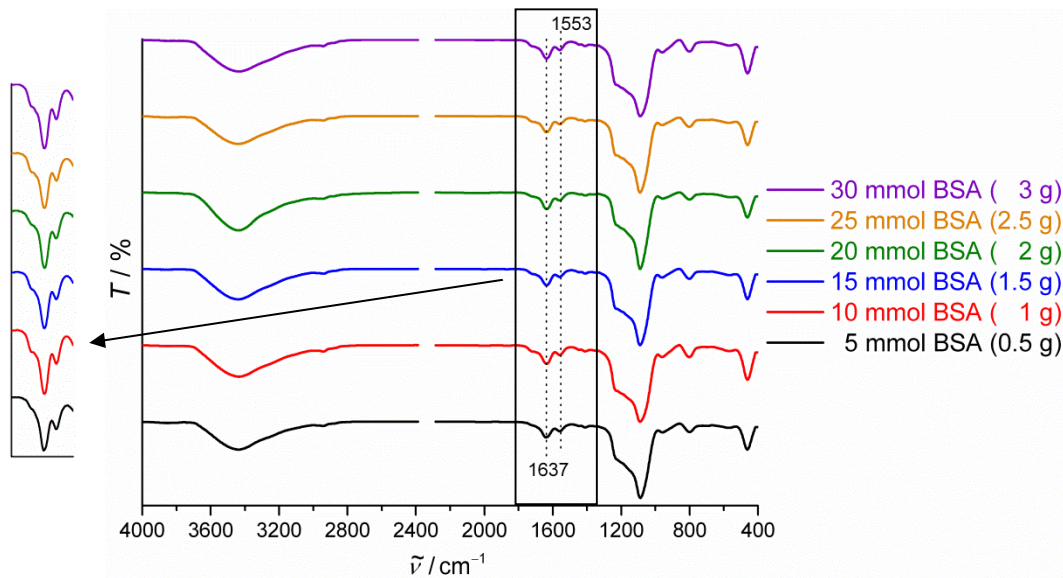


Abb. 5-108: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an BSA eingesetzt wurden.

Bei allen Spektren ist eine Abnahme der Intensität der Bande der freien Carboxylgruppen bei 1730 cm^{-1} zu beobachten. Daraus folgt, dass die freien Carboxylgruppen mit den Amingruppen der PolySia und des Fluoreszenzfarbstoffs umgesetzt wurden, so dass die Nanopartikel erfolgreich funktionalisiert werden konnten. Eine Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-33 zu entnehmen.

Tab. 5-33: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-108 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

10 mmol	30 mmol	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3200-3700	3200-3700	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2939	2939	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
2879	2887	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA	[163]
1645	1637	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1553	553	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia	[163]
1248	1242	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1096	1089	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
953	959	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
807	807	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
464	464	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Die genaue Menge an immobilisierter PolySia wurde mittels des TBA-Tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-109 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen verwendeten Mengen an BSA die PolySia erfolgreich an die Oberfläche immobilisiert werden konnte. Dabei ist eine Tendenz zu erkennen, dass die Menge an angebundener PolySia mit steigender Menge an eingesetztem BSA zu nimmt. Daher kann angenommen werden, dass bei höheren Mengen an BSA mehr Anbindungsstellen für die PolySia vorhanden sind,

wodurch eine höhere Menge gebunden werden kann. Diese erhöhte Anzahl an freien Carboxylgruppen scheint sich nicht gegenseitig zu behindern, so dass die Gruppen ungehindert für die Anbindung der PolySia zur Verfügung stehen. Daraus folgt, dass die eingesetzte Menge an BSA einen Einfluss auf die Immobilisierung der PolySia an die Oberfläche der Nanopartikel bei der Multifunktionalisierung *via* des Linker-Systems hat.

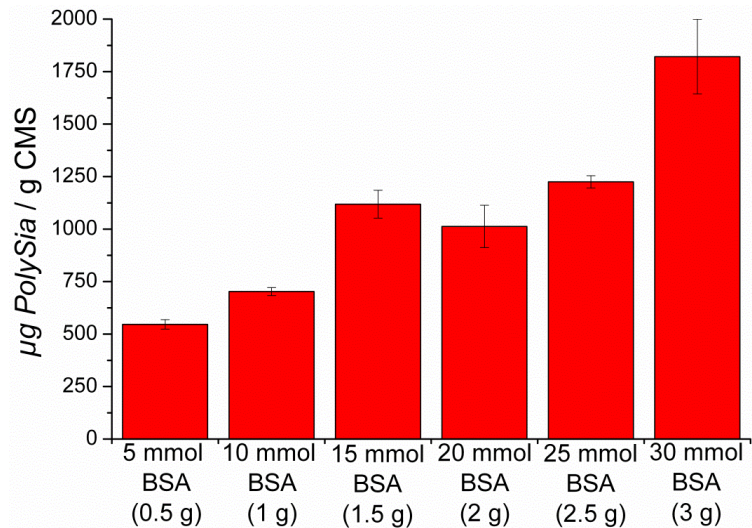


Abb. 5-109: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an BSA im zweiten Reaktionsschritt variiert wurde.

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren, die zur Untersuchung der Fluoreszenz der Nanopartikel aufgenommen wurden, sind in Abb. 5-110 gezeigt.

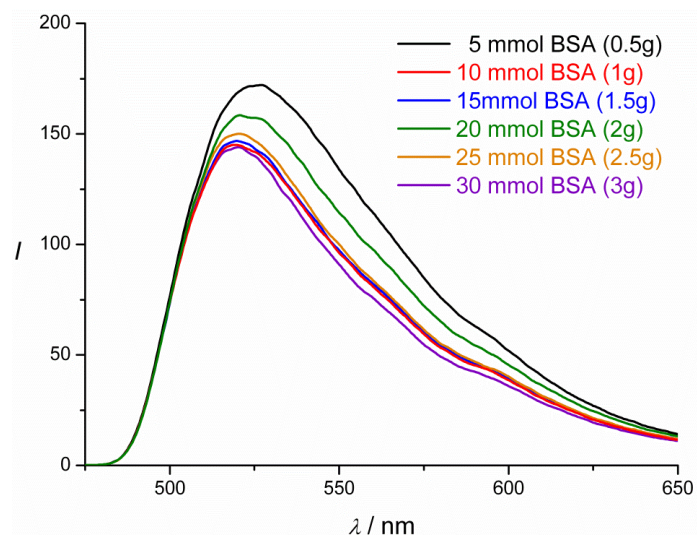


Abb. 5-110: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an BSA im zweiten Reaktionsschritt verändert wurde.

Anhand der Spektren ist zu erkennen, dass alle Proben eine ausreichende Fluoreszenz aufweisen, die in etwa im gleichen Bereich liegen. Daraus folgt, dass die Menge an

eingesetztem BSA keine bzw. nur eine sehr geringe Auswirkung auf die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs bei der Multifunktionalisierung hat. Daher ist die optimale Menge an BSA bei der Multifunktionalisierung mittels des Linker-Systems 30 mmol, weil in diesem Fall die größte Menge an PolySia gebunden werden konnte und die Nanopartikel eine ausreichende Fluoreszenz aufweisen.

Des Weiteren wurde der Einfluss der eingesetzten Menge an PolySia im letzten Reaktionsschritt auf die Multifunktionalisierung untersucht. Zur Bestimmung des Gehalts an PolySia wurde der TBA-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abb. 5-111 zu sehen sind.

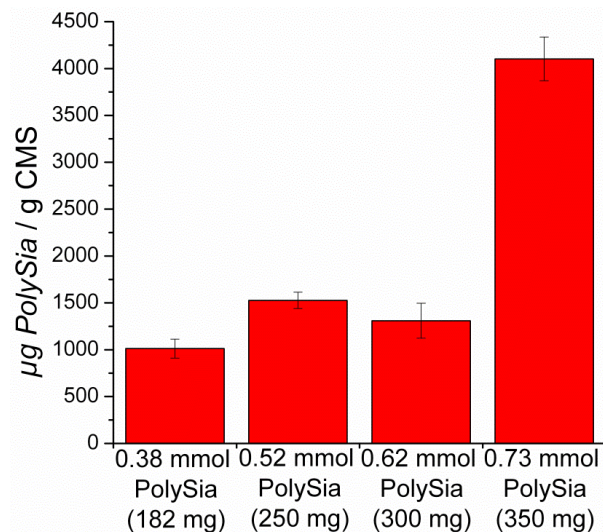


Abb. 5-111: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an PolySia im letzten Reaktionsschritt variiert wurde.

Aus den Ergebnissen folgt, dass bei allen eingesetzten Mengen an PolySia diese erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden konnte. Dabei ist zu beobachten, dass zunächst vergleichbare Werte detektiert werden, wenn die Menge erhöht wird. Außer bei einer sehr hohen eingesetzten Menge an PolySia von 0.73 mmol konnte eine wesentlich höhere Menge an PolySia gebunden werden.

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren dieser Nanopartikel sind in Abb. 5-112 dargestellt. Alle Nanopartikel zeigen eine Fluoreszenz, wobei die Intensitäten etwa im gleichen Bereich liegen. Dabei ist eine leichte Abnahme der Intensität mit steigender Menge an zugegebener PolySia zu beobachten. Jedoch ist die Fluoreszenz in allen Fällen ausreichend, woraus folgt, dass bei der Multifunktionalisierung eine höhere Menge an PolySia von 0.73 mmol am optimalsten ist.

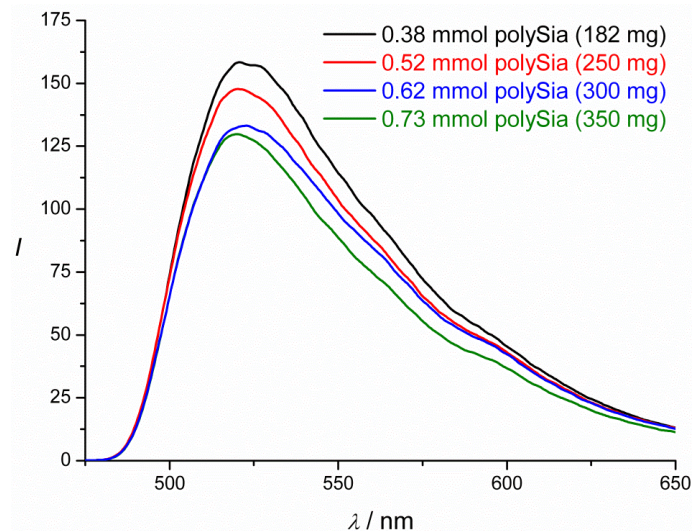


Abb. 5-112: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an PolySia im letzten Reaktionsschritt verändert wurde.

Als letztes wurde der Einfluss der Menge an eingesetztem Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin auf die Multifunktionalisierung *via* des Linker-Systems untersucht. Dabei wurde die Menge an PolySia mittels des TBA-Tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-113 gezeigt.

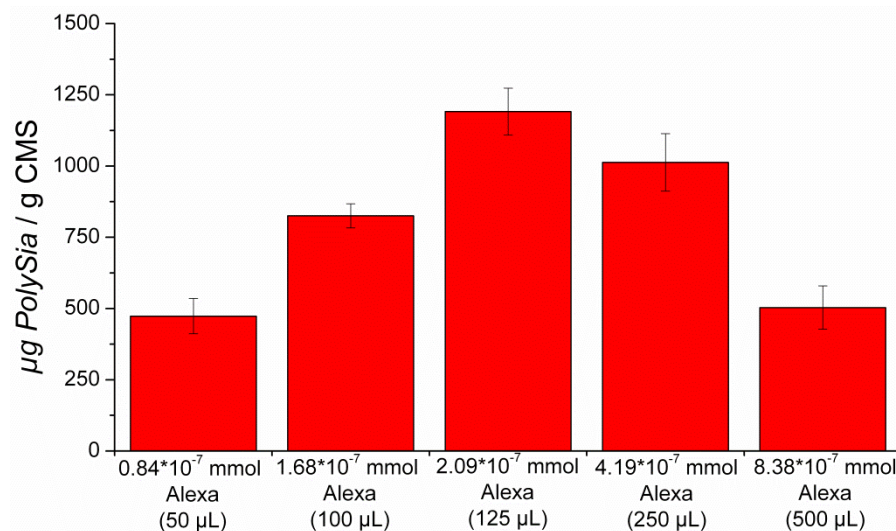


Abb. 5-113: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin im letzten Reaktionsschritt variiert wurde.

Bei allen eingesetzten Mengen an Fluoreszenzfarbstoff konnte PolySia erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden. Dabei nimmt die angebundene Menge an PolySia zunächst mit steigender Menge an eingesetztem Fluoreszenzfarbstoff zu, bis ein Maximum beim Einsatz von $2.09 \cdot 10^{-7}$ mmol erreicht wird. Anschließend nimmt die Menge an immobilisierter PolySia mit weiter steigender Menge an Fluoreszenzfarbstoff ab. Dieser Einfluss der Menge des Fluoreszenzfarbstoffs auf die Anbindung der PolySia konnte bereits bei der Multifunktionalisierung mit der Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie

beobachtet werden (s. Kapitel 5.6.2). Große Mengen an Fluoreszenzfarbstoff könnten die Anbindung der PolySia in der Weise stören, dass es eine Konkurrenz zwischen den beiden Molekülen um die freien Carboxylgruppen gibt, wodurch PolySia in nicht so großen Mengen angebonden werden kann.

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren dieser Nanopartikel sind in Abb. 5-114 dargestellt. Aus den Spektren ist zu entnehmen, dass alle Nanopartikel eine Fluoreszenz zeigen, deren Intensität mit steigender Menge an eingesetztem Fluoreszenzfarbstoff zunimmt. Da die höchste Menge an PolySia gebunden wird, wenn $2.09 \cdot 10^{-7}$ mmol an Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin eingesetzt werden und die Intensität der Fluoreszenz ausreichend ist, sollte diese Menge an Fluoreszenzfarbstoff als optimalste Menge angesehen werden.

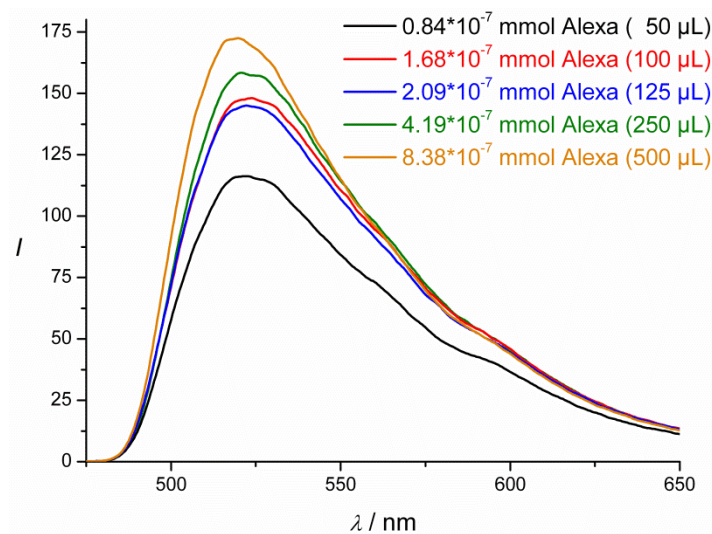


Abb. 5-114: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin im letzten Reaktionsschritt verändert wurde.

Um die multifunktionalisierten CMS-Nanopartikel in der Nervenregeneration einsetzen zu können, wurden diese auf toxische Eigenschaften untersucht. Dafür wurden aus jedem Optimierungsschritt die Nanopartikel mit den besten Resultaten getestet. Die Ergebnisse der MTT-Tests mit HepG2-Zellen sind in Abb. 5-115 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Nanopartikel alle eine gute Biokompatibilität zeigen, die bei der Variation der Reaktionsparameter leicht variiert. Es ist eine leichte Abnahme der Viabilität der Zellen mit zunehmender Konzentration der zugegebenen Nanopartikel zu beobachten, jedoch ist diese so geringfügig, dass die Viabilität noch in einem sehr guten Bereich liegt. Daraus folgt, dass die Nanopartikel, die mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin multifunktionell über das Linker-System modifiziert wurden, keine toxischen Effekte aufweisen und gut biokompatibel sind.

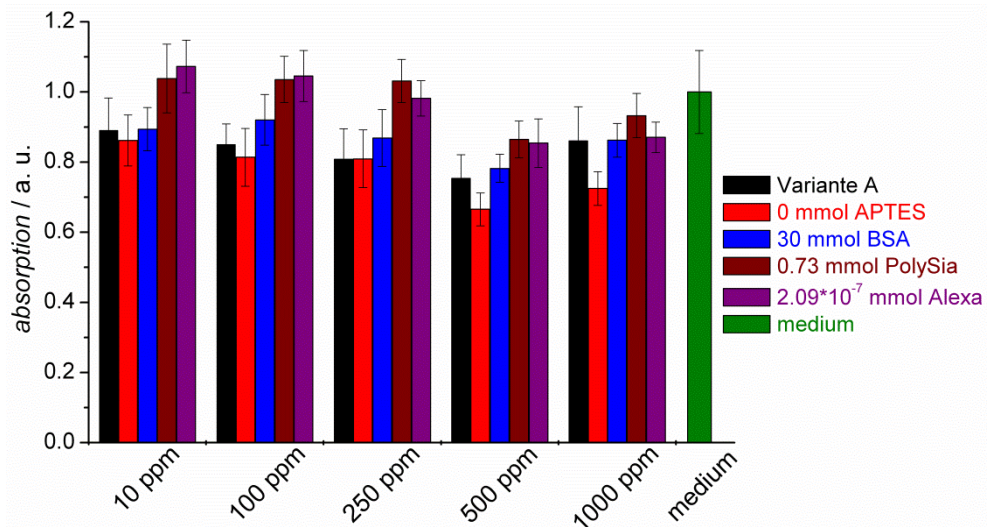


Abb. 5-115: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin multifunktionalisierten CMS-Nanopartikeln (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa).

Die Nanopartikel, die unter den Standardbedingungen (s. Kapitel 4.5.4) multifunktionell modifiziert wurden, wurden noch in Zellkulturexperimenten mit ISC-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-116 zu sehen.

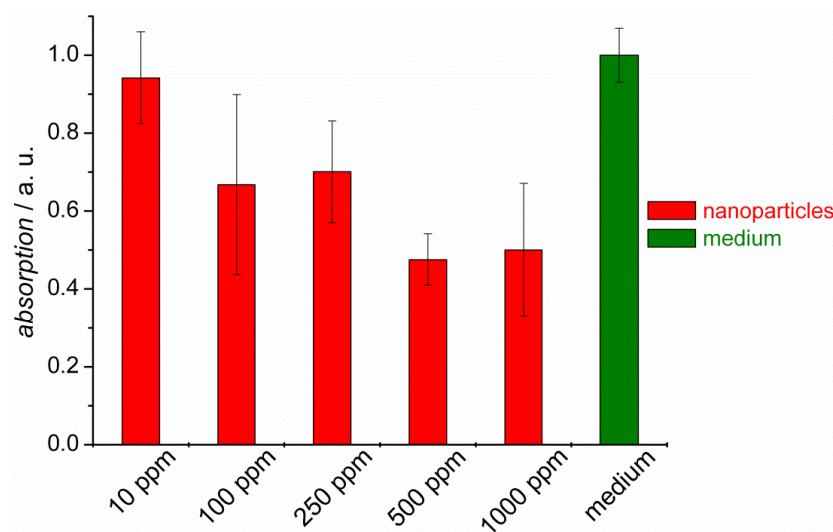


Abb. 5-116: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin multifunktionalisierten CMS-Nanopartikeln.

Dabei kann eine sehr gute Biokompatibilität bei sehr geringen Konzentrationen beobachtet werden, die mit zunehmender Konzentration sinkt. Wird dieses Ergebnis nach fünf Tagen Kultivierung mit den Ergebnissen der Kultivierung der MCM-41-Nanopartikel, die über zwei Wochen erfolgte, verglichen (s. Abb. 5-27), kann davon ausgegangen werden, dass nach einer Kultivierungsdauer von fünf Tagen die Zellen nicht ausreichend wachsen konnten, da bei den MCM-41-Nanopartikel die Viabilität der Zellen am vierten Tag vergleichbar ist mit den Viabilitäten der CMS-Nanopartikel, die in einer Konzentration von 500 und 1000 ppm eingesetzt wurden. Daher kann angenommen werden, dass die Viabilität der Zellen

vermutlich bei längerer Kultivierung ansteigt. Dies kann bereits bei den MCM-41-Nanopartikeln beobachtet werden, bei denen eine gute Biokompatibilität ab dem siebten Tag beobachtet werden konnte, da die ISC-Zellen auf den Nanopartikeln anscheinend ein eingeschränktes Wachstum besitzen.

Des Weiteren wurden die Nanopartikel, die unter den Standardbedingungen (s. Kapitel 4.5.4) multifunktionalisiert wurden, in einem *in vitro*-Test in gequetschte *N. ischiadicus* Nerven von adulten Ratten injiziert, um zu überprüfen, ob die Nanopartikel einen Einfluss auf die Nervenregeneration haben und ob diese nach sieben Tagen detektiert werden können. Bei diesen Nanopartikeln wurden zwei Färbeprotokolle von Längsschnitten angefertigt: zum einen mit der EndosialidaseN-APC (EndoN-APC), die spezifisch an PolySia bindet, diese jedoch nicht abbaut und zum anderen mit einem PolySia-Antikörper. Die Färbungen mit der EndoN-APC sind in Abb. 5-117 dargestellt. Auf den Aufnahmen sind nicht eindeutig Nanopartikel zu erkennen. Es könnte sich um zusammengelagerte Nanopartikel handeln, die stark grün fluoreszieren. Da die Nanopartikel, die ausschließlich mit PolySia beschichtet wurden, ebenfalls eine geringe grüne Fluoreszenz zeigen, kann nicht eindeutig davon ausgegangen werden, dass es sich hier um die Nanopartikel handelt. Jedoch ist auffällig, dass sich die EndoN-APC Färbung sowie die Fluoreszenz direkt überlagern. Daher kann angenommen werden, dass es sich dabei um die Nanopartikel handelt, da diese mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden und somit auf die Endo-APC sowie auf Fluoreszenz positiv reagieren müssten.

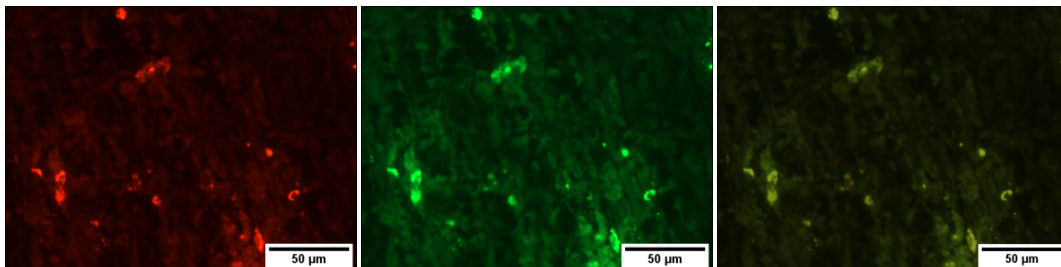


Abb. 5-117: Färbungen mit EndosialidaseN-APC von Nervenlängsschnitten, in die CMS-Nanopartikel injiziert wurden, die mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden (Links: EndoN-APC Färbung, Mitte: Fluoreszenz, Rechts: EndoN-APC und Fluoreszenz überlagert).

Die Färbungen der Nervenlängsschnitte mit dem PolySia-Antikörper sind in Abb. 5-118 zu sehen. Bei diesen Färbungen können ebenfalls keine einzelnen Nanopartikel deutlich identifiziert werden. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass es sich vermutlich um agglomerierte Nanopartikel handelt, da sich die Färbungen der PolySia mit der grünen Fluoreszenz in etwa überlagern, so dass angenommen werden kann, dass es sich um die Nanopartikel handelt, da diese mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionell ausgestattet wurden.

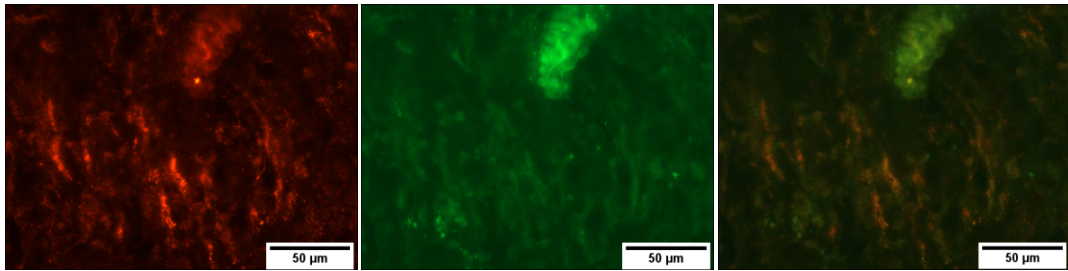


Abb. 5-118: Färbungen mit PolySia-Antikörper von Nervenlängsschnitten, in die CMS-Nanopartikel injiziert wurden, die mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden (Links: PolySia-Antikörper Färbung, Mitte: Fluoreszenz, Rechts: PolySia-Antikörper und Fluoreszenz überlagert).

Des Weiteren wurden von Nerven-Querschnitten REM-Aufnahmen angefertigt, die zunächst am REM-ACI mit dem „low vacuum-Modus“ aufgenommen wurden, um die Nerven nicht zu beschädigen. Die Aufnahmen sind in Abb. 5-119 gezeigt.

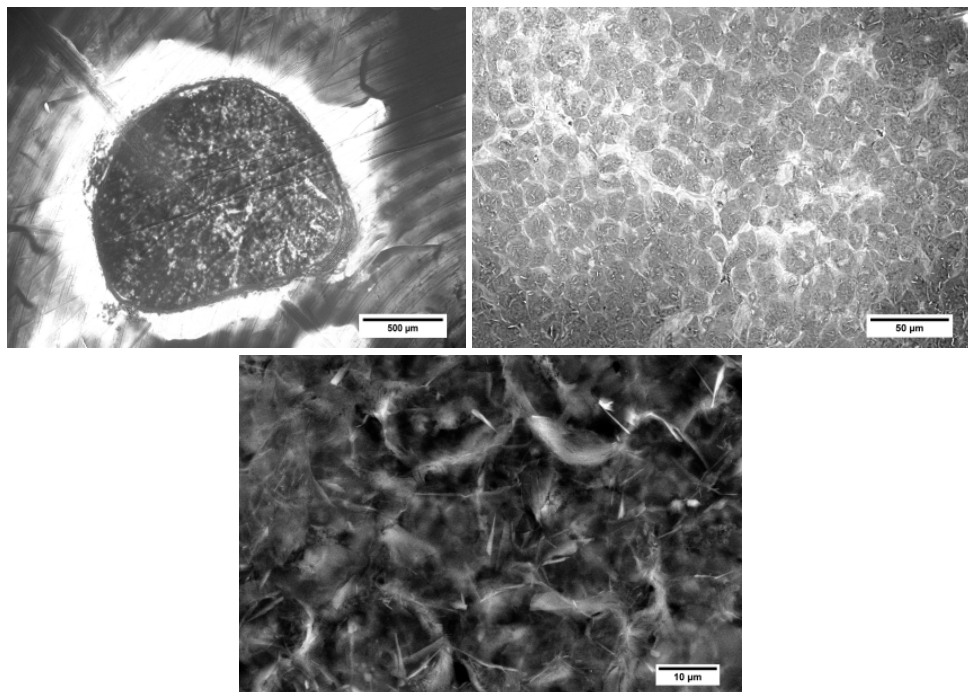


Abb. 5-119: REM-Aufnahmen im „low vacuum-Modus“ von Nervenquerschnitten, in denen calcinierte mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-ACI).

Auf den Aufnahmen ist die Struktur des Nerven sehr gut erkennbar. Jedoch können keine Nanopartikel beobachtet werden. Dies könnte zum Beispiel daran liegen, dass die Nanopartikel eine Primärpartikelgröße von etwa 40 nm haben und mit dem REM-ACI keine höhere Auflösung erzielt werden konnte.

Da keine Aussagen über die Nanopartikel unter dem REM-ACI gemacht werden konnten, wurden Querschnitte auch unter dem REM-PCI betrachtet, wobei ein Hochvakuum angelegt wurde. Die Aufnahmen sind in Abb. 5-120 dargestellt. Auch bei den multifunktionalisierten Nanopartikeln können kleine Punkte beobachtet werden, die jedoch nicht eindeutig den Nanopartikeln zugeordnet werden können, jedoch in etwa in dem Größenbereich liegen. Es kann jedoch angenommen werden, dass es sich dabei um Nanopartikel handelt, die sich im

interstiliellen Raum, also zwischen den Axonen und den Zellen, befinden, da es sich bei den Punkten nicht um Axone handeln kann und die Punkte für Mikrotubuli der Axone nicht geordnet genug vorliegen. Daher kann keine eindeutige Aussage über den Verbleib der Nanopartikel nach dem siebentägigen *in vitro*-Test im Nerven getroffen werden.

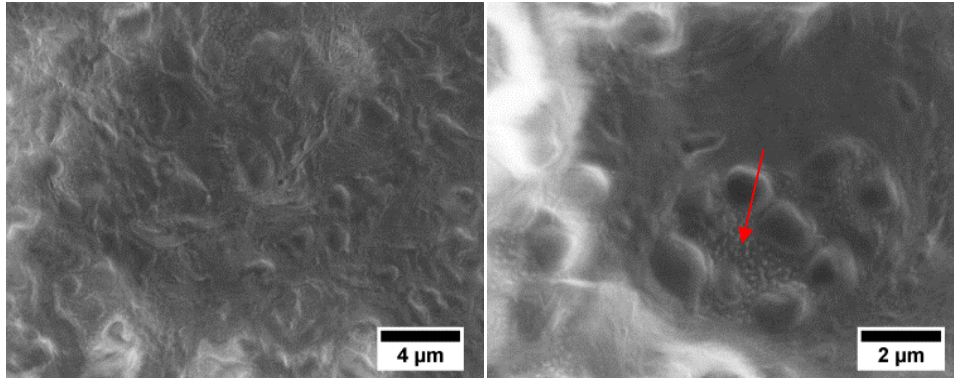


Abb. 5-120: REM-Aufnahmen im Hochvakuum von Nervenquerschnitten, in denen calcinierte mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff-multifunktionalisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-PCI).

5.6.5 Vergleichende Diskussion

Es konnten erfolgreich verschiedene Wege aufgezeigt werden, um CMS-Nanopartikel mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff zu multifunktionalisieren. Wenn dabei ausschließlich die „Click“-Chemie verwendet wurde, konnte sowohl die höchste Menge an PolySia gebunden werden, obwohl diese in einer sehr geringen Menge im Gegensatz zum Linker-System eingesetzt wurde, als auch eine sehr starke Fluoreszenz beobachtet werden. Jedoch ist bei dieser Variante der Einsatz von Kupfer als Katalysator ein negativer Faktor, da dadurch toxische Effekte der Nanopartikel auf Zellen hervorgerufen werden können, was sich bereits in den grünlich gefärbten Nanopartikeln nach der Reaktion zeigt und in Kapitel 5.5 nachgewiesen werden konnte. Die zweite erfolgreiche Methode zur multifunktionellen Anbindung ist eine Kombination aus dem Linker-System und der „Click“-Chemie, wobei die PolySia deactyliert über APTES und BSA gebunden wurde und Alexa Fluor® 488-Azid über die „Click“-Reaktion an eine Alkinfunktion. Dafür mussten bereits im zweiten Schritt die Nanopartikel multifunktionell mit BSA und Propiolsäure ausgestattet werden. Innerhalb dieses Verfahrens konnte gezeigt werden, dass DCM als Lösemittel die besten Ergebnisse erzielt hat, wobei sowohl BSA als auch Propiolsäure in einem Schritt an die Oberfläche gebunden werden konnte. Des Weiteren wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert, wobei sich herausstellte, dass die Multifunktionalisierung nur erfolgreich war, wenn die Reaktion in einem Schritt durchgeführt wurde. Diese multifunktionell mit BSA und Propiolsäure-funktionalisierten Nanopartikel wurden anschließend für die Multifunktionalisierung mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die höchste Menge an PolySia gebunden werden konnte, wenn die Variante A der Zugabe verwendet wurde, bei der zunächst PolySia und nach 24 Stunden Alexa Fluor® 488-Azid

zugegeben wurden. Diese Nanopartikel wiesen eine ausreichende Fluoreszenz auf, so dass die weiteren Optimierungsschritte mit dieser Variante durchgeführt wurden. Es wurde festgestellt, dass die eingesetzte Menge an APTES einen Einfluss auf die Multifunktionalisierung hat. Dabei konnten die größten Mengen an PolySia gebunden werden, wenn kein APTES oder eine Menge von 0.54 mmol eingesetzt wurden, wobei die Intensität der Fluoreszenz ausreichend stark war, so dass dies die optimalen Mengen für die Multifunktionalisierung sind. Außerdem ergab sich bei der Variation der Menge an APTES ein Zusammenhang zwischen den immobilisierten Mengen an PolySia und Fluoreszenzfarbstoff. Denn immer wenn hohe Mengen an PolySia gebunden wurden, konnte nur eine geringe Intensität der Fluoreszenz beobachtet werden und umgekehrt. Ansonsten konnte gezeigt werden, dass die optimale Menge an BSA 20 mmol ist, da in diesem Fall die größte Menge an PolySia gebunden werden konnte und die Intensität der Fluoreszenz ausreichend war. Dabei hat die Menge an eingesetztem BSA eine Auswirkung auf die Anbindung der PolySia, jedoch kann keine Tendenz beim Einfluss auf die Immobilisierung des Fluoreszenzfarbstoffs beobachtet werden. Auch wurde der Einfluss der eingesetzten Menge an Propiolsäure untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass die optimale Menge an Propiolsäure 0.32 bzw. 0.49 mmol beträgt, da mit diesen beiden Stoffmengen nahezu ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Interessanterweise konnte der Fluoreszenzfarbstoff an die Oberfläche gebunden werden, wenn keine Propiolsäure verwendet wurde, so dass angenommen werden kann, dass dieser ebenfalls über seine Aminfunktionen mit den freien Carboxylgruppen unter Bildung einer Amidbindung reagieren kann. Dadurch kann weniger PolySia immobilisiert werden, da die PolySia und der Fluoreszenzfarbstoff diese Anbindungsstelle benötigen. Daher kann auch davon ausgegangen werden, dass bei allen Anbindungen der Fluoreszenzfarbstoff ebenso über das Linker-System binden könnte. Des Weiteren wurde der Einfluss einer höheren PolySia-Menge untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit erhöhter Menge weniger PolySia gebunden werden konnte, woraus folgt, dass die Anbindung mit der vorher eingesetzten Menge optimal war. Ferner wurde der Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs getestet. Die eingesetzte Menge von $2.34 \cdot 10^{-7}$ mmol war dabei das Optimum, weil in diesem Fall eine sehr große Menge an PolySia gebunden werden konnte und die Intensität der Fluoreszenz am stärksten war. Da die einzelnen Anbindungen in verschiedenen Lösemitteln erfolgten, wurde der Einfluss von Ethanol und DCM auf die Multifunktionalisierung getestet. Bei der Verwendung von Ethanol konnte kaum PolySia an die Oberfläche gebunden werden. Dies liegt daran, dass das DCC, welches notwendig für die Amidbildung war, unlöslich in Ethanol war, wodurch die freien Carboxylgruppen nicht aktiviert wurden und die PolySia nicht binden konnte. Bei der Verwendung von DCM als Lösemittel konnte eine höhere Intensität der Fluoreszenz detektiert werden, so dass dieses Lösemittel für die Multifunktionalisierung über eine Kombination aus dem Linker-System und der „Click“-Chemie optimal war. Als letztes wurde getestet, ob die Reaktion auch ohne Kupfer stattfindet so dass keine toxischen Effekte durch das Kupfer auftreten können. Dabei zeigte sich, dass eine höhere Menge an PolySia in der Anwesenheit von Kupfer gebunden werden konnte. Interessanterweise konnte eine

wesentlich höhere Fluoreszenz detektiert werden, wenn kein Kupfer eingesetzt wurde. Dies könnte daran liegen, dass der Fluoreszenzfarbstoff in Abwesenheit von Kupfer vermutlich über seine Amingruppen an die Oberfläche der Nanopartikel bindet, wodurch nicht genügend freie Carboxylgruppen für die PolySia zur Verfügung stehen. Die letzte Anbindung der Multifunktionalisierung erfolgte ausschließlich über das Linker-System, bei dem die besten Resultate erzielt werden konnten, wenn zuerst PolySia zur Lösung gegeben wurde und nach 24 Stunden der Fluoreszenzfarbstoff (Variante A). Des Weiteren konnte ein Einfluss der Menge an APTES beobachtet werden, wobei die höchsten Mengen an PolySia gebunden werden konnten, wenn kein bzw. 0.22 mmol APTES eingesetzt wurden. Da bei der Anbindung des BSA direkt an die Silanolgruppen eine sehr geringe Intensität der Fluoreszenz beobachtet werden konnte, ist die optimale Menge an APTES 0.22 mmol. Außerdem wurde der Einfluss des eingesetzten BSA auf die Multifunktionalisierung untersucht. Dabei konnte ein Einfluss auf die Menge an gebundener PolySia beobachtet werden, während auf die Menge an Fluoreszenzfarbstoff kein direkter Einfluss zu existieren scheint. Aus den Ergebnissen folgt, dass 30 mmol an BSA die besten Resultate erzielt. Bei der Variation der Menge an PolySia konnte zum einen eine Zunahme der Menge an immobilisierter PolySia sowie eine Abnahme der Intensität der Fluoreszenz mit steigender Menge an eingesetzter PolySia beobachtet werden. Daher kann angenommen werden, dass höhere Mengen an PolySia besser für die multifunktionelle Anbindung sind. Des Weiteren wurde der Einfluss der Menge an Fluoreszenzfarbstoff untersucht, wobei die Auswirkung auf die Anbindung von PolySia vergleichbar mit der Auswirkung bei der Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie war. Auch konnte eine Zunahme der Intensität der Fluoreszenz mit steigender Menge an eingesetztem Fluoreszenzfarbstoff beobachtet werden. Da die höchste Menge an PolySia beim Einsatz von $2.09 \cdot 10^{-7}$ mmol Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin gebunden werden konnte und diese Nanopartikel eine ausreichende Fluoreszenz aufwiesen, ist dies die optimale Menge an Fluoreszenzfarbstoff für die Multifunktionalisierung mittels des Linker-Systems. Da die Nanopartikel auf dem Gebiet der Nervenregeneration eingesetzt werden sollen, wurden Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen durchgeführt. Alle getesteten Nanopartikel zeigen eine ähnliche Viabilität der Zellen, die leicht abnahm mit zunehmender Konzentration der Nanopartikel. Jedoch ist die Viabilität nur geringfügig kleiner als die des Mediums, woraus folgt, dass die Nanopartikel gut biokompatibel sind. Des Weiteren wurden die Nanopartikel mit ISC-Zellen getestet. Dabei haben die Nanopartikel nur in geringen Konzentrationen eine gute Biokompatibilität, während bei höheren Konzentrationen die Viabilität der Zellen abnahm. Da nur über fünf Tage kultiviert wurde, kann es sein, dass nicht genügend Zeit vorhanden war, um eine gute Viabilität zu erhalten. Bei den MCM-41-Nanopartikeln, die über zwei Wochen getestet wurden, konnte erst nach sieben Tagen eine gute Viabilität beobachtet werden, weil die ISC-Zellen auf den Nanopartikeln vermutlich langsamer wachsen (s. Kapitel 5.3.1). Die Viabilität der ISC-Zellen nach fünf Tagen bei der Kultivierung mit multifunktionalen Nanopartikeln war vergleichbar mit der Viabilität der ISC-Zellen bei der Kultivierung mit MCM-41-Nanopartikeln am Tag vier. Daher sollten die multifunktional ausgestatteten Nanopartikel nochmals über einen längeren Zeitraum mit ISC-

Zellen getestet werden. Außerdem wurden die Nanopartikel in einem *in vitro*-Nerventest untersucht, wobei die Längsschnitte der Nerven mit verschiedenen Färbungen angefärbt wurden. Dabei konnte sowohl bei der EndosialidaseN-APC als auch beim PolySia-Antikörper eine rote Färbung beobachtet werden, die sich mit der grünen Fluoreszenz überlagerte. Jedoch konnten die Nanopartikel nicht eindeutig identifiziert werden, da diese zu klein waren, um bei der Auflösung beobachtet werden zu können. Es könnte sich dabei um zusammengelagerte Nanopartikel handeln, da diese sowohl Fluoreszenz als auch PolySia aufweisen. Um eine genaue Aussage über den Aufenthalt der Nanopartikel zu treffen, wurden REM Aufnahmen angefertigt. Jedoch konnten die Nanopartikel nicht eindeutig ausgemacht werden. Bei den Aufnahmen am REM-PCI sind jedoch kleine Sphären zu erkennen, die in etwa die Größe der Nanopartikel aufweisen, so dass es sich dabei um Nanopartikel im interstiliellen Raum handeln könnte. Da es keine Axone sein können und die Punkte für Mikrotubuli der Axone nicht geordnet genug vorliegen, können diese Möglichkeiten ausgeschlossen werden.

5.7 Collagen-Silica-Komposit-Materialien

Da die PolySia für den Einsatz im Körper zum Zweck der Nervenregeneration festphasengebunden sein muss, wurde versucht Collagen-Silica-Komposit-Materialien herzustellen, die eventuell in Röhrchen geformt werden können und an die PolySia gebunden werden kann. Dabei wurde zunächst versucht, kommerziell erhältliches MatriStypt[®] (Collagen I aus der Rinderepidermis) mit calcinierten CMS-Nanopartikeln zu infiltrieren. Die daraus entstehenden Komposit-Materialien wurden zum einen mit Glutaraldehyd quervernetzt, um die Komposite zu stabilisieren. Zum anderen wurden sie auf ihre Stabilität gegenüber Wasser untersucht, um eventuell die Quervernetzung mit dem toxischen Glutaraldehyd zu umgehen. Die entstandenen Materialien wurden in Zellkulturexperimenten auf ihre Biokompatibilität untersucht. Des Weiteren wurde versucht, PolySia an die Komposite zu binden. Dafür wurden zwei Wege getestet: zum einen die Infiltrierung von mit PolySia-beschichteten CMS-Nanopartikeln in das MatriStypt[®] und zum anderen eine Funktionalisierung der mit CMS-Nanopartikeln infiltrierten Collagen-Membranen. Außerdem wurden beide Wege optimiert.

5.7.1 Infiltrierung mit unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln in MatriStypt[®]

Zur Herstellung von Collagen-Silica-Komposit-Materialien wurde zunächst versucht, calcinierte CMS-Nanopartikel in kommerziell erhältliches MatriStypt[®] (gereinigtes Collagen I aus der Rinderepidermis, 2 mm Dicke) zu infiltrieren und das erhaltene Material anschließend zur Stabilisierung mit Glutaraldehyd quervernetzen. Der Erfolg wurde zunächst mittels IR-Spektroskopie untersucht. Die IR-Spektren der calcinierten Silica-Nanopartikel, des reinen Collagens, des infiltrierten Collagens sowie der quervernetzten Komposite sind in Abb. 5-121 dargestellt.

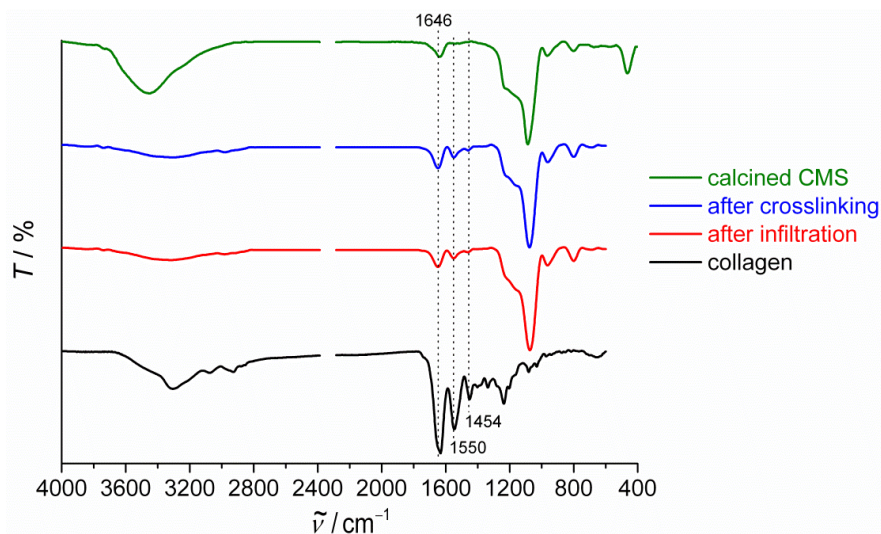


Abb. 5-121: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, reinem Collagen, mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen sowie infiltriertem Collagen nach der Quervernetzung mit Glutaraldehyd.

Anhand der Spektren ist zu erkennen, dass nach der Infiltrierung von CMS-Nanopartikeln in MatriStypt[®] die Silica-Banden bei 1090, 960 und 800 cm⁻¹ deutlich sichtbar sind, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Silica erfolgreich in das MatriStypt[®] infiltriert werden konnte. Des Weiteren sind zwei sehr schwache Banden zwischen 3000 und 2850 cm⁻¹ zu beobachten, die auf Valenzschwingungen von Alkylgruppen zurückgeführt werden können, die im Collagen vorhanden sind. Außerdem zeigen sich drei schwache Banden bei 1653, 1550 und 1454 cm⁻¹, die verschiedenen funktionellen Gruppen des Collagens zugeordnet werden können und in den unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln nicht vorhanden sind. Daher kann angenommen werden, dass Collagen-Silica-Komposit-Materialien über die Infiltrierung erfolgreich hergestellt werden konnten. Nach der Quervernetzung sind keine neuen Banden zu erkennen, die auf neu geknüpfte Bindungen hinweisen. Ferner kann eine leichte Zunahme der Intensität der Banden bei 1653 und 1550 cm⁻¹ beobachtet werden, so dass nach der Quervernetzung weiterhin Komposit-Materialien vorliegen. Bei dem reinen Collagen geben die beiden Banden bei 1080 und 1033 cm⁻¹ einen Hinweis darauf, dass es sich um Collagen des Typs I handelt.^[167] Eine Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-34 zu entnehmen.

Tab. 5-34: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-121 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

MatriStypt [®]	Infiltrierung	calciniert	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
-	-	3745	(Si-OH)-Valenzschwingung	Silica	[162]
3316	-	-	(N-H)-Valenzschwingung	Collagen	[127]
3100 - 3700	3000 - 3700	3000 - 3700	(O-H/N-H)-Valenzschwingung	Collagen, Wasser	[127,163]
3073	-	-	(NH ₃ ⁺)-Valenzschwingung	Collagen	[163]
-	2969	-	(C-H)-Valenzschwingung	Collagen	[127,167]
2973	2895	-	(C-H)-Valenzschwingung	Collagen	[127,167]
1639	1653	1645	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	Collagen, (Wasser)	[127,167]
1550	1550	-	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	Collagen	[127,167]
1454	1454	-	(C-H)-Deformationsschwingung	Collagen	[127,167]
1395	-	-	(C-H)-Deformationsschwingung	Collagen	[127,163]
1336	-	-	(C-H)-Wackelschwingung	Collagen	[127,163]
1240	1232	1247	(C-N)-Deformationsschwingung (Amid), (Si-O-Si)-Valenzschwingung	Collagen, Silica	[127,164]
1084	1084	1093	(C-O)-Valenzschwingung, (Si-O-Si)-Valenzschwingung	Collagen, Silica	[162,164]
1033	-	-	(C-O)-Valenzschwingung	Collagen	[127,163]
-	959	967	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
-	804	807	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
656	-	-	(N-H)-Deformationsschwingungen	Collagen	[127]
-	-	471	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Da die Komposite später auf dem Gebiet der Nervenregeneration eingesetzt werden sollen, wurde versucht aus den Membranen Röhren, als Beispiel für eine implantierbare Form, anzufertigen. Dabei sind die Komposite im feuchten Zustand sehr gut formbar und behalten nach dem Trocknen ihre Form. Jedoch konnten die beiden Enden nicht fest zu einer geschlossenen Röhre miteinander verbunden werden, auch nicht mittels der

Quervernetzung mit Glutaraldehyd. Daher müssten hierfür andere Methoden entwickelt werden, wie zum Beispiel das Zusammenzunähen der Enden oder einen Bioklebstoff zu verwenden. In Abb. 5-122 sind Bilder von den Röhrcchen gezeigt.

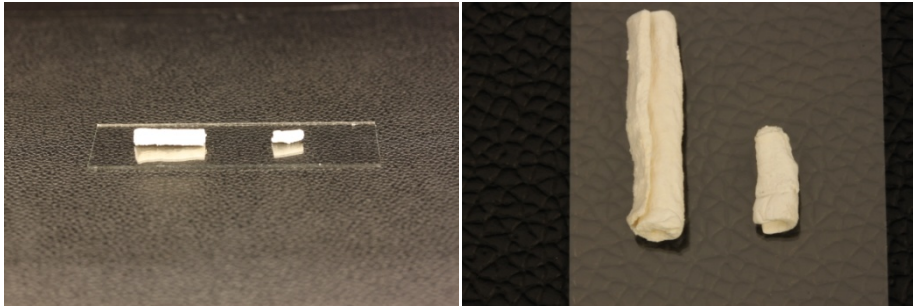


Abb. 5-122: Bilder von Collagen-Silica-Kompositen, die zu Röhrcchen geformt wurden.

Um die Materialien näher zu charakterisieren, wurden thermogravimetrische Messungen nach jedem Schritt aufgenommen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der thermogravimetrischen Messungen ist Tabelle 5-35 zu entnehmen, während die Thermogramme im Anhang zu finden sind.

Tab. 5-35: Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an MatriStypt[®], mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen und anschließend quervernetzte Collagen-Silica-Komposite.

MatriStypt [®]	Infiltrierung	Quervernetzung	Zuordnung	im Temperaturbereich
15.2 %	11.6 %	6.9 %	adsorbiertes Wasser	25–150 °C
43.7 %	16.8 %	14.1 %	Verbrennung der Organik	150–350 °C
39.6 %	11 %	10.6 %	Verbrennung der Organik	350–600 °C
–	0.7 %	1.1 %	Dehydroxylierung des Silica	600–1000 °C
1.5 %	59.9 %	67.3 %	Restmasse	–

Der Massenverlust von 15.2 % bis zu einer Temperatur von etwa 150 °C bei reinem MatriStypt[®] kann dem Verlust von Wasser zugeordnet werden. Die anschließenden Massenverluste von 43.7 % und 39.6 % zwischen 150 und 600 °C können auf eine schrittweise Verbrennung der organischen Komponenten zurück geführt werden. Bei dem mit CMS-Nanopartikeln infiltrierten Collagen kann ein Massenverlust von 11.6 % bis zu einer Temperatur von 200 °C beobachtet werden, der dem Verlust von adsorbiertem Wasser zuzuordnen ist. Des Weiteren folgen zwei Stufen von 16.8 % und 11 % bis zu einer Temperatur von etwa 600 °C. Diese Stufen erfolgen durch die schrittweise Verbrennung der organischen Komponenten des Collagens und befinden sich im gleichen Temperaturbereich. Die letzte Stufe von 0.7 % bei Temperaturen über 600 °C kann der Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zugeordnet werden. Die Restmasse von 59.9 % ist auf restliches Siliciumdioxid zurückzuführen. Daher kann von einer erfolgreichen Infiltrierung des MatriStypt[®] mit calcinierten CMS-Nanopartikeln ausgegangen werden. Nach weiterer Quervernetzung der infiltrierten Membranen ist die erste Stufe bis zu einer Temperatur von 150 °C dem Verlust von adsorbiertem Wasser zuzuordnen. Die folgenden Stufen von 14.1 % und 10.6 %, die bis zu einer Temperatur von 600 °C zu beobachten sind, können auf die

stufenweise Verbrennung des Collagens zurückgeführt werden, wobei die Verbrennung nach der Quervernetzung im gleichen Temperaturbereich und über zwei Stufen erfolgte. Die letzte Stufe bei Temperaturen über 600 °C von 1.1 % ist der Dehydroxylierung der Silica-Oberfläche zuzuordnen. Die Restmasse von 67.3 % ist auf Siliciumdioxid zurückzuführen, woraus folgt, dass auch nach der Quervernetzung Silica-Nanopartikel in den Membranen vorliegen.

Von allen Proben wurden REM-Aufnahmen angefertigt, um eine Aussage über die Morphologie sowie die Anordnung der Komposite zu erhalten. Die Bilder sind in Abb. 5-123 dargestellt.

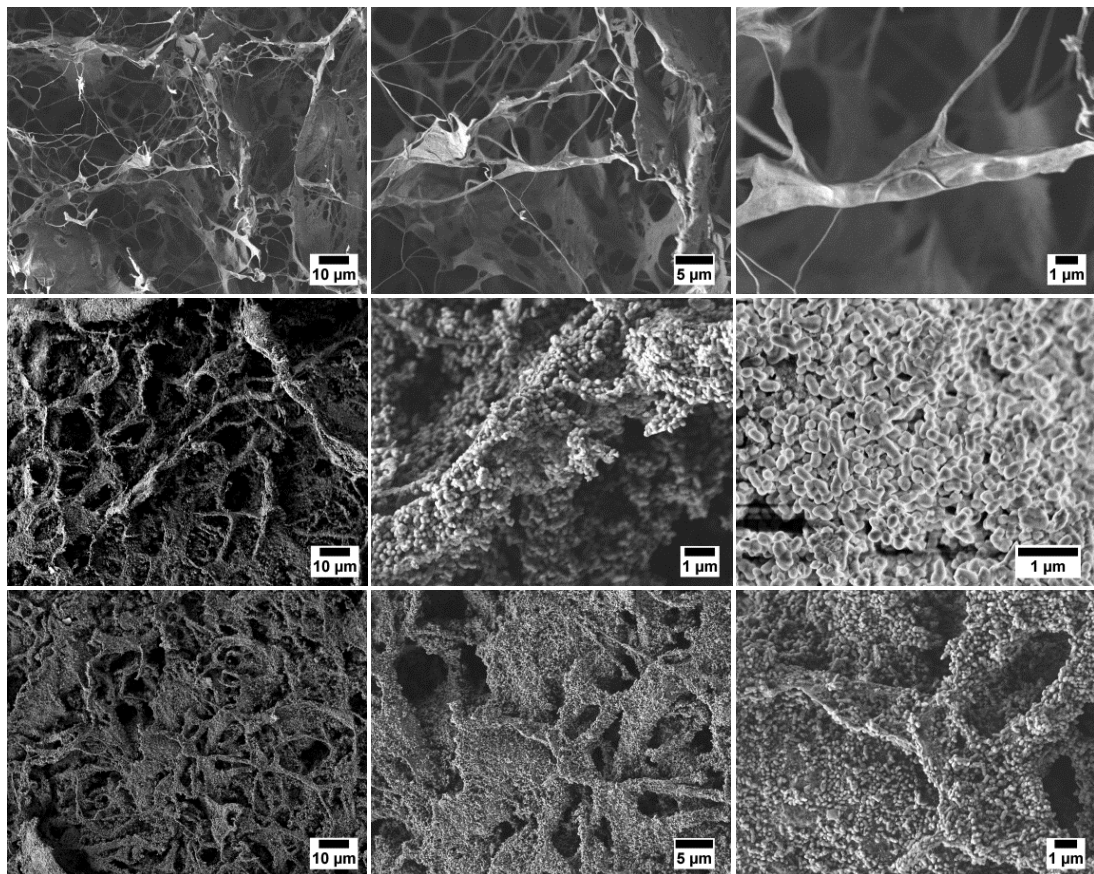


Abb. 5-123: REM-Aufnahmen von reinem MatriStypt® (oben), mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen (Mitte) und infiltriertes Collagen nach der Quervernetzung mit Glutaraldehyd (unten) (REM-PCI).

Das reine MatriStypt® zeigt die typische Faserstruktur des Collagens, wobei die Fasern über die gesamte Oberfläche miteinander verknüpft sind und unterschiedliche Dicken aufweisen. Nach der Infiltrierung mit calcinierten CMS-Nanopartikeln ist zu erkennen, dass die gesamte Oberfläche mit kleinen sphärischen Silica-Nanopartikeln bedeckt ist, wobei die Faserstruktur des Collagens weiterhin sichtbar ist. Die Primärgröße der Nanopartikel liegt nach der Infiltrierung zwischen 50 und 100 nm. Es kann ebenfalls beobachtet werden, dass sich die Nanopartikel zum Teil sehr stark zusammenlagern, was bereits durch die Dispersion hervorgerufen worden sein kann, da die Nanopartikel leicht zum Agglomerieren neigen. Daher kann angenommen werden, dass Collagen-Silica-Komposit-Materialien erfolgreich

hergestellt werden können, wenn kommerziell erhältliches Collagen mit nanoporösen Silica-Nanopartikeln infiltriert wird. Nach weiterer Quervernetzung mit Glutaraldehyd der Materialien sind ähnliche Morphologien zu erkennen, so dass angenommen werden kann, dass die Nanopartikel bei der Quervernetzung nicht vom Collagen abgespült werden.

Des Weiteren wurden von infiltrierten Collagen-Membranen REM-Aufnahmen aus dem Querschnitt aufgenommen, die in Abb. 5-124 zu sehen sind. Darauf ist ebenfalls zu erkennen, dass die Oberfläche des Collagens mit Silica-Nanopartikeln bedeckt ist, wobei die faserartige Struktur des Collagens noch gut zu sehen ist. Daraus folgt, dass sich die Nanopartikel nicht nur auf der Oberfläche ablagern, sondern sich auch in die Struktur des Collagens einlagern.

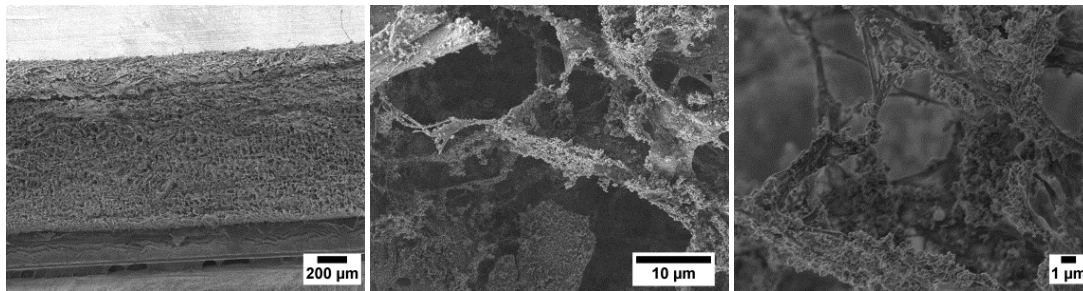


Abb. 5-124: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen im Querschnitt (REM-PCI).

Die Synthese für die Infiltrierung wurde in Ethanol an Stelle von Wasser durchgeführt, um die Auswirkung auf die Komposite zu testen. Die REM-Aufnahmen sind in Abb. 5-125 gezeigt. Auch bei der Synthese in Ethanol kann beobachtet werden, dass sich die Nanopartikel auf der Oberfläche der Fasern ablagern, wobei die faserartige Struktur des Collagens weiterhin beobachtet werden kann. Daraus folgt, dass das Lösemittel keinen großen Einfluss auf die Beschaffenheit der Komposite hat.

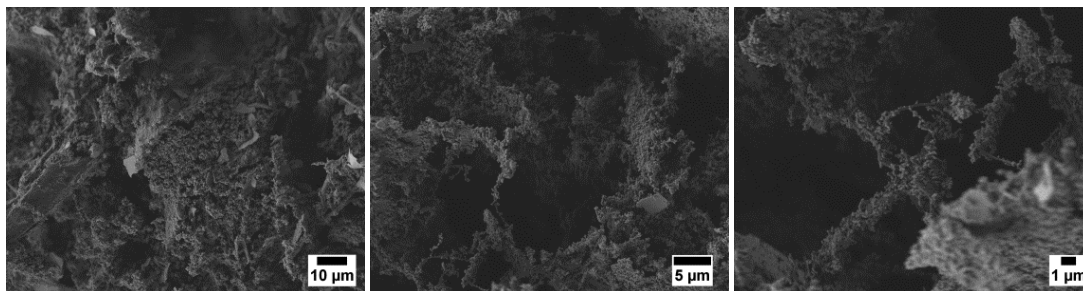


Abb. 5-125: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, die in Ethanol hergestellt wurden (REM-PCI).

Um möglicherweise auf den Einsatz von Glutaraldehyd verzichten zu können, da es toxisch ist, wurden die infiltrierten Collagen-Membranen auf eine ausreichende Stabilität getestet. Zunächst wurden sie in einem Wasserbad mit Ultraschall behandelt, um zu untersuchen, ob die Nanopartikel dadurch abgewaschen werden. Die REM-Aufnahmen dieser Komposite sind in Abb. 5-126 dargestellt.

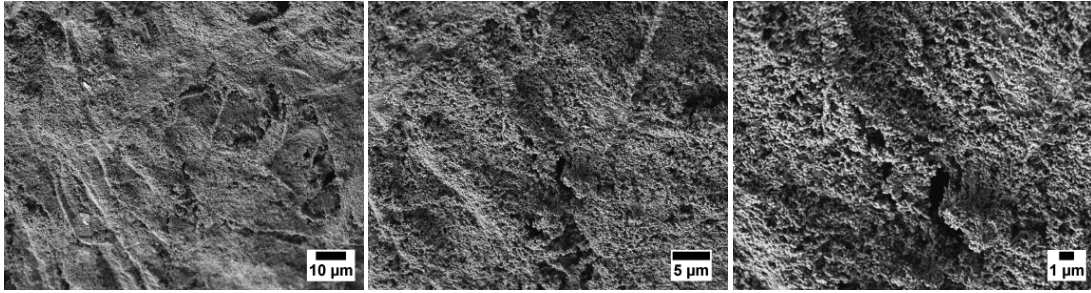


Abb. 5-126: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das in einem Wasserbad mit Ultraschall für eine halbe Stunde behandelt wurde (REM-PCI).

Darauf ist zu erkennen, dass die Oberfläche mit Nanopartikeln vollständig bedeckt ist, so dass angenommen werden kann, dass sich die Nanopartikel nicht nur auf der Oberfläche des Collagens abgelagert haben, sondern stabil auf den Fasern sitzen.

Zur weiteren Prüfung der Wasser-Stabilität der infiltrierten Collagene, wurden diese für unterschiedliche Zeiten in Wasser gelagert. Die REM-Aufnahmen der Komposite, die für 24 Stunden mit Wasser behandelt wurden, sind in Abb. 5-127 zu sehen. Da auch nach 24 Stunden die Oberfläche weiterhin mit Nanopartikeln bedeckt ist und auch die faserartige Struktur weiterhin beobachtet werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass die Komposite bis zu 24 Stunden in Wasser stabil sind, ohne dass Nanopartikel weiter abgewaschen werden.

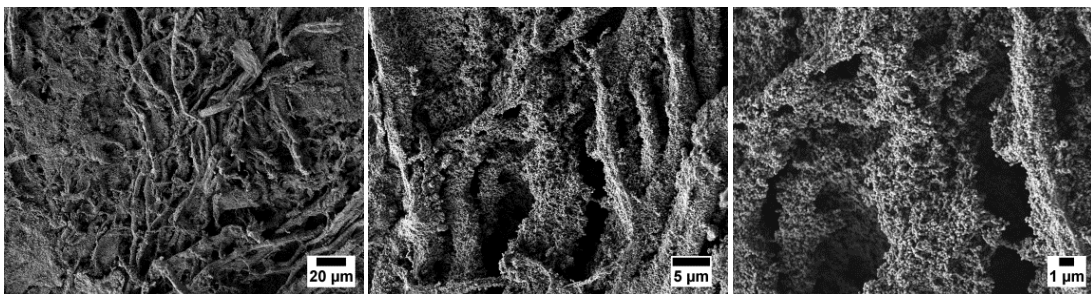


Abb. 5-127: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das für 24 Stunden in Wasser gelagert wurde (REM-PCI).

Um die Langzeit-Stabilität zu untersuchen, wurden die infiltrierten Komposite für 48 und 72 Stunden in Wasser gelagert. Die REM-Aufnahmen sind in Abb. 5-128 abgebildet. Sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden sind die Fasern des Collagens weiterhin mit Silica-Nanopartikeln bedeckt. Daraus folgt, dass die hergestellten Komposite über längere Zeiträume in Wasser stabil sind, wobei keine Nanopartikel von der Oberfläche abgewaschen wurden. Daher kann angenommen werden, dass die Quervernetzung mit Glutaraldehyd zur Stabilisierung nicht unbedingt notwendig ist, da die Nanopartikel auf dem Collagen „festgebunden“ sind.

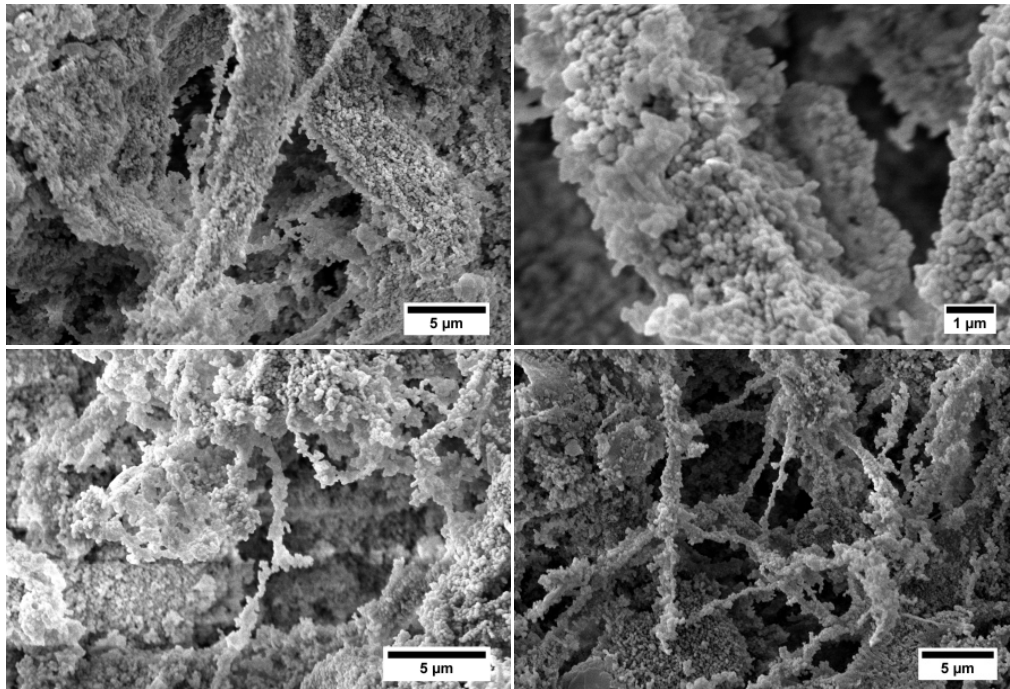


Abb. 5-128: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das für 48 Stunden (oben) bzw. 72 Stunden (unten) in Wasser gelagert wurde (REM-ACI).

Da die Collagen-Silica-Komposit-Materialien für biomedizinische Zwecke angewendet werden sollen, wurden Zellkulturexperimente im Rahmen der Bachelorarbeit von CHRISTINE STRAUß an der Universität für Bodenkultur in Wien (aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. KASPER) an reinem MatriStypt[®], dem infiltrierten Collagen sowie dem zusätzlich quervernetzten Collagen unter statischen sowie dynamischen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der statischen sowie dynamischen Kultivierungen mit HepG2-Zellen sind in Abb. 5-129 dargestellt, während die Kultivierungen mit den NIH 3T3- sowie adMSC-Zellen dem Anhang zu entnehmen sind.

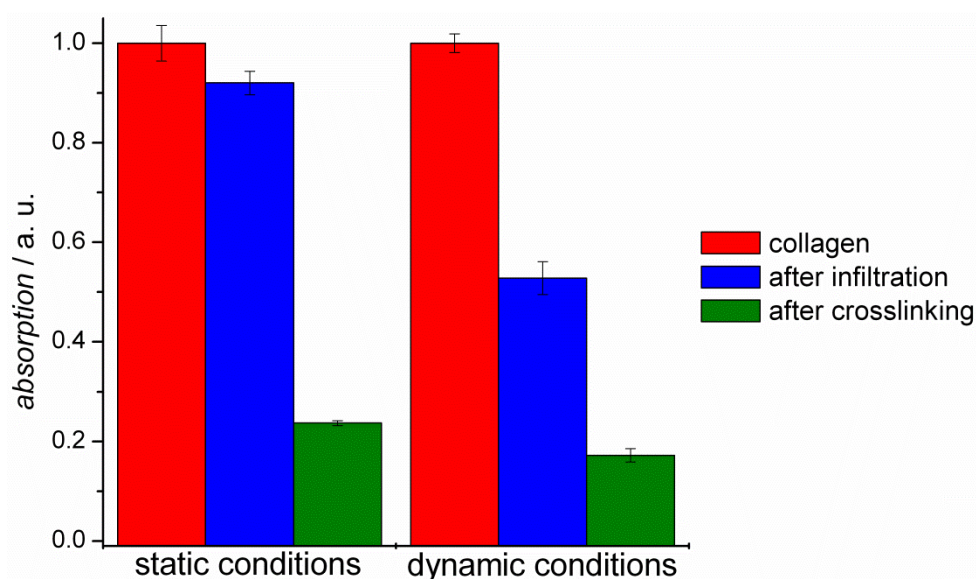


Abb. 5-129: Ergebnisse des statischen sowie dynamischen MTT-Tests mit HepG2-Zellen an MatriStypt[®], infiltriertem Collagen sowie zusätzlich quervernetztem Collagen-Silica-Komposit-Material.

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass bei den statischen Kultivierungen beim reinen sowie bei dem infiltrierten Collagen keine toxischen Effekt zu erkennen sind, da die Viabilität der Zellen vergleichbar ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Materialien sehr gut biokompatibel sind. Des Weiteren konnte bei der Kultivierung der infiltrierten Collagen-Materialien eine homogener verteilte Zellbesetzung beobachtet werden als bei dem reinen MatriStypt[®]. Bei der Kultivierung unter dynamischen Bedingungen kann bei den reinen Collagen-Materialien eine sehr gute Viabilität der Zellen beobachtet werden, während die Viabilität bei den infiltrierten Materialien etwa um die Hälfte geringer ist. Dies könnte zum einen daran liegen, dass bei den dynamischen Zellkulturexperimenten die Zellen weniger effektiv an der Oberfläche der infiltrierten Collagen-Materialien haften, so dass die Zellen durch den Medienstrom abgespült werden. Zum anderen könnten die infiltrierten Nanopartikel, die bei diesen Proben nicht mit dem Collagen quervernetzt wurden, durch das strömende Medium abgewaschen werden und somit auf diesen Nanopartikeln gewachsene Zellen mitnehmen. Dadurch würde sich die gemessene Viabilität verringern, da eventuell vorher gewachsene Zellen mit den Nanopartikeln zusammen aus der Kammer gespült werden würden. Auch bei den dynamischen Kultivierungen konnte eine homogenere Zelldichte bei dem infiltrierten Collagen beobachtet werden. Da die Viabilität bei den dynamischen Experimenten der infiltrierten Collagen-Materialien nicht so stark sinkt und diese in den statischen Experimenten sehr gute Viabilitäten zeigen, kann angenommen werden, dass diese Materialien sehr gut biokompatibel sind. Die zusätzlich quervernetzten Collagen-Materialien zeigen sowohl in den statischen als auch in den dynamischen Experimenten sehr geringe Viabilitäten der Zellen. Daraus folgt, dass das verwendete Glutaraldehyd in den Materialien noch vorhanden ist und dadurch einen toxischen Effekt auf Zellen hat. Daher sollte eine Quervernetzung der Materialien über andere Chemikalien wie zum Beispiel Transglutaminase erfolgen.

Des Weiteren wurden von den dynamischen Zellkulturexperimenten mit den HepG2-Zellen DAPI Färbungen von reinem Collagen sowie infiltriertem Collagen angefertigt, die in Abb. 5-130 zu sehen sind. Darauf ist zu erkennen, dass bei beiden Proben die Zellen bläulich angefärbt sind und sich über die gesamte Oberfläche verteilen. Bei den Experimenten ist zu sehen, dass sich die Zellen bei den mit calcinierten CMS-Nanopartikeln infiltrierten Collagen-Materialien homogener verteilen als bei den reinen Collagen-Materialien.

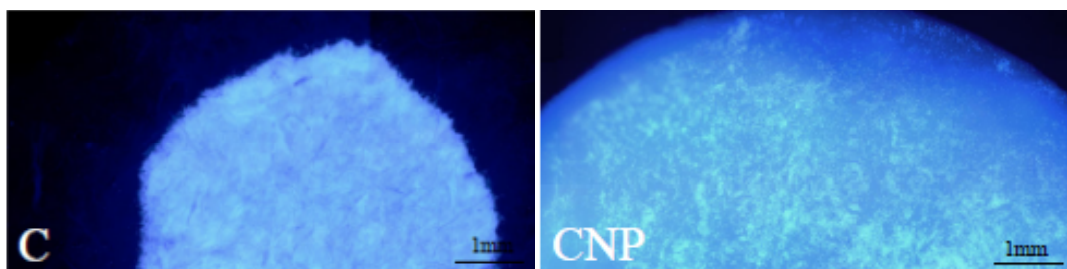


Abb. 5-130: DAPI Färbungen der dynamischen Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen von reinem Collagen (links) sowie mit calcinierten CMS-Nanopartikeln infiltrierten Collagen (rechts).

5.7.2 Funktionalisierung von infiltrierten Collagen-Silica-Kompositen

Um PolySia an Collagen-Silica-Komposit-Materialien zu binden, wurde versucht diese Materialien über das Linker-System nach der Infiltrierung zu funktionalisieren. Zur Untersuchung, ob die Komposite überhaupt funktionalisiert werden können, wurde zunächst getestet, ob das BUTMS an die Oberfläche von infiltriertem sowie anschließend quervernetztem Collagen gebunden werden kann, da dieses Silan im Gegensatz zum APTES eine höhere Anzahl an CH_2 -Gruppen aufweist. Der Erfolg der Anbindung wurde per IR-Spektroskopie überprüft. Die IR-Spektren sind in Abb. 5-131 dargestellt.

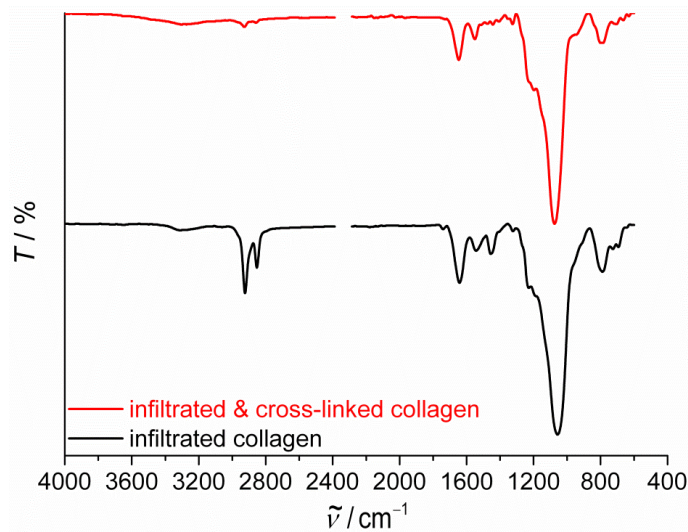


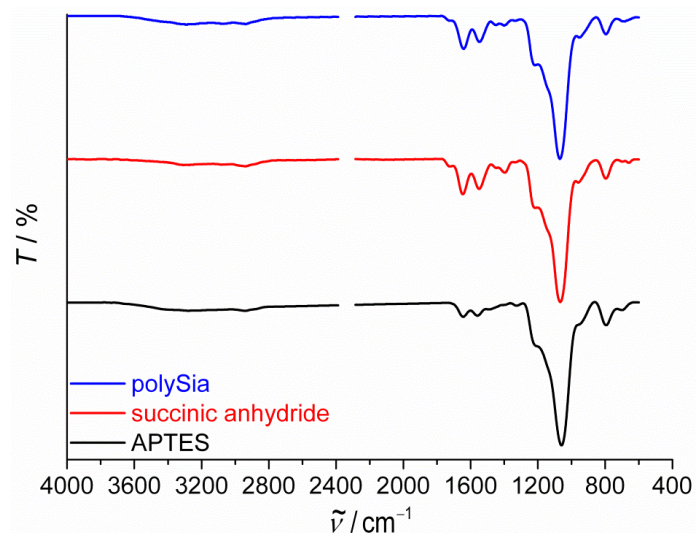
Abb. 5-131: IR-Spektren von infiltriertem Collagen (unten) sowie infiltriertem und anschließend quervernetztem Collagen (oben) nach der Umsetzung mit BUTMS.

Darauf ist zu erkennen, dass an beide Membranen BUTMS erfolgreich gebunden werden konnte, da jeweils zwei Banden bei 2900 und 2850 cm^{-1} beobachtet werden können, die den Valenzschwingungen der Alkylgruppen des Silans zuzuordnen sind. Dabei ist zu sehen, dass eine größere Menge an Silan gebunden werden konnte, wenn die Membranen nicht mit Glutaraldehyd quervernetzt wurden, da die Intensität der Banden bei dieser Probe wesentlich stärker ist. Dies könnte daran liegen, dass nach der Quervernetzung die Silanolgruppen mit Aminogruppen des Collagens reagiert haben, so dass nicht mehr so viele für die Anbindung des Silans zur Verfügung stehen. Außerdem kann festgestellt werden, dass bei der Funktionalisierung die Nanopartikel nicht von der Oberfläche abgewaschen werden, da die typischen Silica-Banden weiterhin sichtbar sind. Die Zuordnung der Banden ist Tabelle 5-36 zu entnehmen.

Tab. 5-36: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-131 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

Infiltrierung	Quervernetzung	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3100 - 3400	3000 – 3600	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2924	2931	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
2850	2858	(C-H)-Valenzschwingung	BUTMS	[163]
1645	1660	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	Collagen	[167]
1549	1549	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	Collagen	[167]
1460	-	(C-H)-Deformationsschwingung	BUTMS, Collagen	[163]
1327	1327	(C-H)-Deformationsschwingung	Collagen	[167]
1231	1224	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1061	1061	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
-	928	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
795	795	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Da die Anbindung des BUTMS an infiltrierte Collagen-Membranen erfolgreich war, wurde versucht diese über das Linker-System mit PolySia zu funktionalisieren. Die IR-Spektren nach jedem Reaktionsschritt sind in Abb. 5-132 gezeigt.

**Abb. 5-132:** IR-Spektren von infiltriertem Collagen, das mit APTES (unten), anschließend mit BSA (Mitte) und zuletzt mit PolySia (oben) modifiziert wurde.

Nach der Umsetzung mit APTES sind keine wesentlichen Änderungen im IR zu beobachten, woraus folgt, dass die Nanopartikel nicht von der Oberfläche abgewaschen wurden und keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob APTES erfolgreich an die Oberfläche gebunden werden konnte. Nach weiterer Anbindung von BSA kann zum einen eine neue Bande bei 1741 cm^{-1} beobachtet werden, die freien Carboxylgruppen des geöffneten BSA zugeordnet werden kann. Zum anderen ist eine Zunahme der Intensität der beiden Amidbanden bei 1650 und 1550 cm^{-1} zu erkennen. Dies spricht für eine Bildung einer weiteren Amidbindung. Daraus folgt, dass BSA über APTES erfolgreich an die Collagen-Silica-Komposite gebunden werden konnte. Nach der Reaktion mit der PolySia deuten zwei Hinweise auf eine erfolgreiche Anbindung hin. Da die Intensität der Bande der freien Carboxylatgruppen leicht abgenommen hat, kann angenommen werden, dass diese mit den

Amingruppen der deacetylierten PolySia reagiert haben. Des Weiteren kann eine Zunahme der Intensität der beiden Amidbanden beobachtet werden, woraus folgt, dass eine neue Amidbindung entstanden ist. Eine Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-37 zu finden.

Tab. 5-37: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-132 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

APTES	BSA	polySia	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3000-3600	3000-3600	3000-3600	(O-H)-Valenzschwingung	Wasser	[163]
2946	2946	2931	(C-H)-Valenzschwingung	APTES, BSA, Collagen	[163,167]
-	1741	1741	(C=O)-Valenzschwingung	BSA	[163]
1652	1652	1652	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	BSA, PolySia, Collagen	[163,167]
1564	1549	1549	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	BSA, PolySia, Collagen	[163,167]
1475	1453	1460	(C-H)-Deformationsschwingung	APTES, BSA, Collagen	[163,167]
-	1393	1401	(C-H)-Deformationsschwingung	Collagen	[167]
1231	1224	1224	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
1061	1068	1068	(Si-O-Si)-Valenzschwingung	Silica	[164]
935	957	950	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
802	802	802	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Zur weiteren Charakterisierung wurden nach jedem Funktionalisierungsschritt REM-Aufnahmen angefertigt, um eine Aussage über die Morphologie treffen zu können. Die REM-Aufnahmen der infiltrierten Collagen-Membran, die mit APTES funktionalisiert wurde, sind in Abb. 5-133 zu sehen.

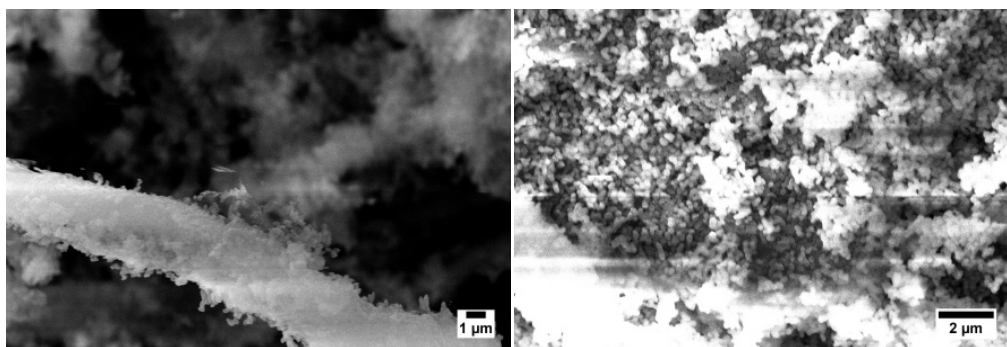


Abb. 5-133: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das anschließend mit APTES modifiziert wurde (REM-ACI).

Auf den Aufnahmen ist zu sehen, dass sich nach der Funktionalisierung mit APTES die Nanopartikel weiterhin auf der Oberfläche des Collagens befinden. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass die sphärische Form sowie die Größe in etwa gleich geblieben sind. Auch sind die Fasern des Collagens sichtbar, an denen sich die Nanopartikel anlagern, so dass die Struktur des Collagens durch die Funktionalisierung nicht verändert wird.

Die REM-Bilder, die nach weiterer Umsetzung mit BSA aufgenommen wurden, sind in Abb. 5-134 dargestellt. Auch nach der weiteren Umsetzung sind Nanopartikel auf den Fasern des Collagens zu erkennen, die über die gesamte Oberfläche angelagert sind. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Funktionalisierung von Collagen, in das CMS-

Nanopartikel infiltriert wurden, erfolgreich ist, ohne dass sich große Änderungen in der Morphologie der Komposite ergibt.

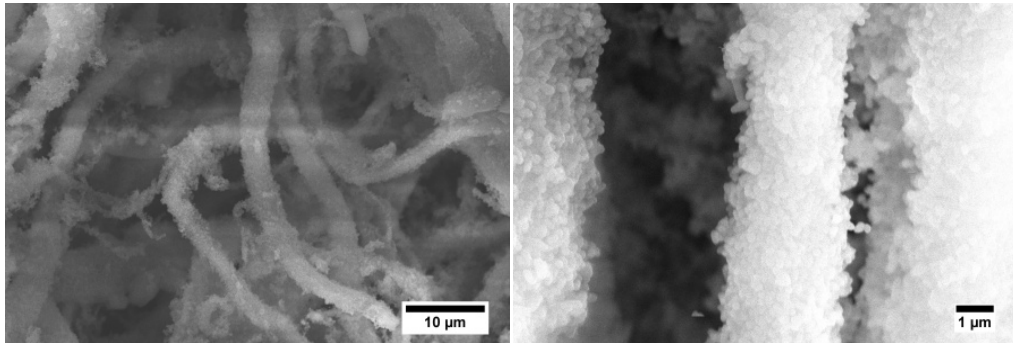


Abb. 5-134: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das anschließend mit APTES und BSA modifiziert wurde (REM-ACI).

Die REM-Aufnahmen nach der Immobilisierung der PolySia sind in Abb. 5-135 abgebildet. Auch nach dem letzten Funktionalisierungsschritt können Nanopartikel an den Fasern des Collagens beobachtet werden, woraus folgt, dass die Komposite auch ohne Quervernetzung mit Glutaraldehyd stabil sind, da nach drei Reaktionen kaum Änderungen in der Morphologie beobachtet werden können. Daraus folgt, dass Collagen-Silica-Komposit-Materialien erfolgreich hergestellt und funktionalisiert werden können.

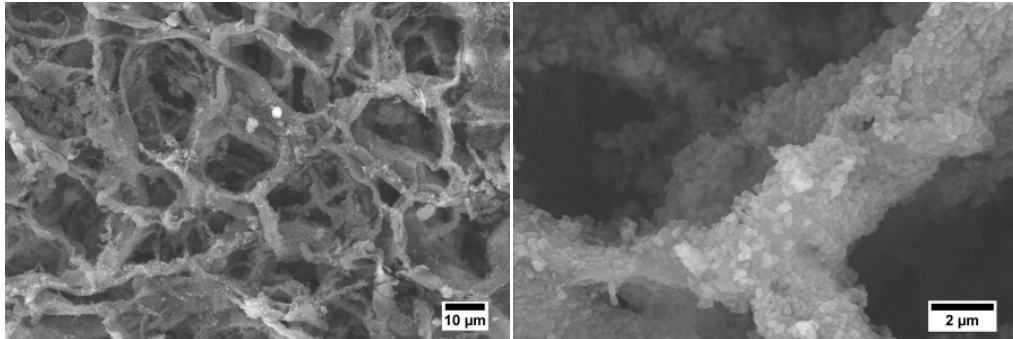


Abb. 5-135: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, an das PolySia über das Linker-System gebunden wurde (REM-ACI).

Um den genauen Gehalt an immobilisierter PolySia an den Kompositen zu bestimmen, wurde der TBA-Test durchgeführt. Die Ergebnisse an den Collagen-Membranen nach allen Reaktionsschritten sind in Abb. 5-136 gezeigt. Anhand der Ergebnisse ist sichtbar, dass nur nach der Anbindung von PolySia eine hohe Menge an immobilisierter PolySia detektiert wurde. Bei allen anderen Proben, an denen keine PolySia gebunden wurde, sind in etwa vergleichbare Werte gemessen worden, die alle im Bereich der Blindwerte liegen, die schon bei den calcinierten CMS-Nanopartikeln beobachtet werden konnten (s. Kapitel 5.3.2). Daher kann angenommen werden, dass PolySia erfolgreich an Collagen-Silica-Komposit-Materialien nach der Infiltrierung der Nanopartikel in die Membran über das Linker-System gebunden werden kann. Eine sehr interessante Beobachtung bei den TBA-Tests ist, dass sich das Collagen fast aller Collagen-Silica-Materialien während der Hydrolyse aufgelöst hat,

außer bei den Proben, bei denen PolySia angebunden wurde. Bei diesen Proben waren die Membranen noch vollständig vorhanden. Daher kann vermutet werden, dass die angebundene PolySia das Collagen schützt, bzw. dass die PolySia auch an die Säuregruppen des Collagens binden kann, wodurch sich eine Stabilisierung des Collagens ergibt.

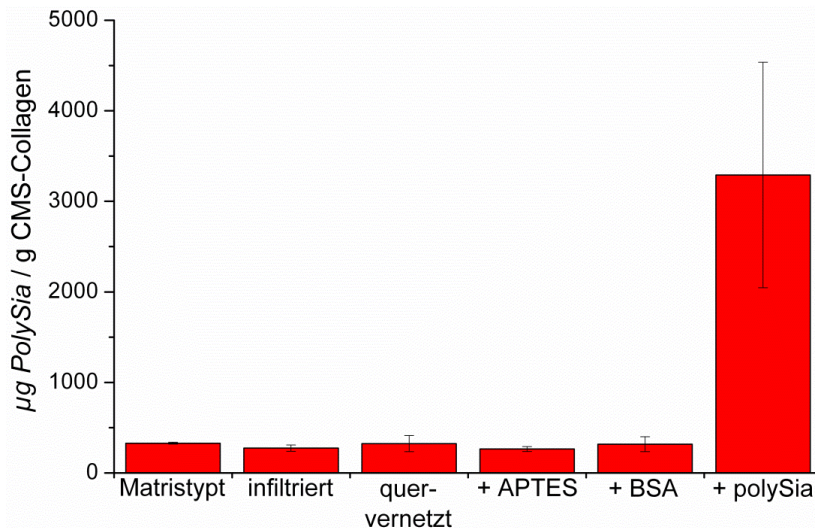


Abb. 5-136: Ergebnisse des TBA-Tests an verschiedenen Collagen-Membranen, die unterschiedlich behandelt wurden.

Zur Optimierung der Anbindung von PolySia über das Linker-System wurde zunächst die Menge an eingesetztem APTES im ersten Schritt variiert und die immobilisierte Menge an PolySia mit dem TBA-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-137 dargestellt.

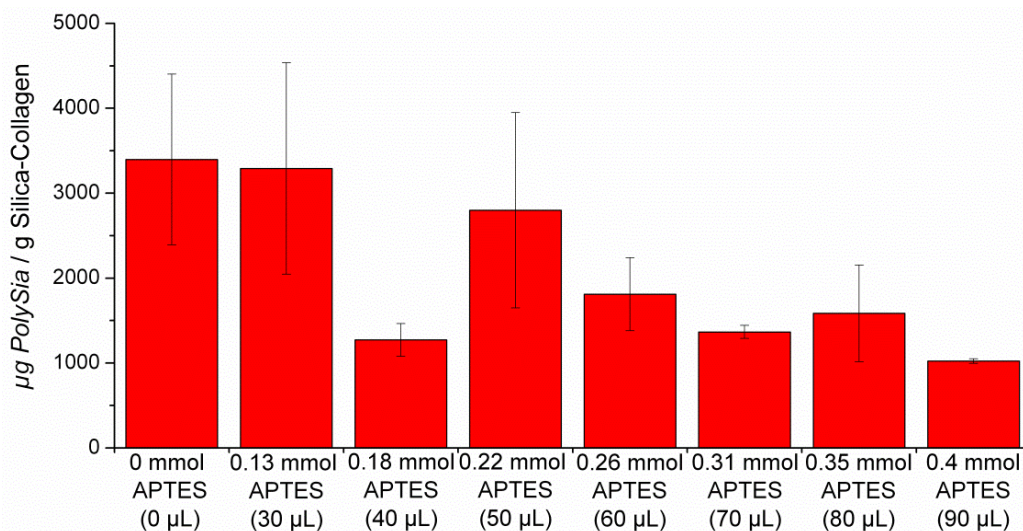


Abb. 5-137: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Collagen-Membranen, die mit PolySia immobilisiert wurden, wobei die Menge an APTES im ersten Schritt verändert wurde.

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Menge an eingesetztem APTES einen Einfluss auf die angebundene Menge an PolySia hat. Dabei kann beobachtet werden, dass

die größten Mengen gebunden werden können, wenn kein APTES oder eine sehr geringe Menge von 0.13 mmol verwendet werden. Des Weiteren nimmt die immobilisierte PolySia-Menge mit steigender Menge an APTES ab, so dass angenommen werden kann, dass geringe Mengen an APTES besser für die Anbindung sind, wie bereits bei den Nanopartikeln in vorherigen Studien gezeigt werden konnte.^[147] Daher kann davon ausgegangen werden, dass höhere Mengen an APTES die Anbindung des BSA stört bzw. dass das BSA ohne APTES besser an die Oberfläche binden kann, wobei vermutlich Kieselsäureester gebildet werden, wodurch sich die Anbindungsstellen für das BSA erhöhen.

Des Weiteren wurde die Auswirkung der eingesetzten Menge an BSA überprüft. Die Ergebnisse des TBA-Tests dieser Komposite sind in Abb. 5-138 zu sehen.

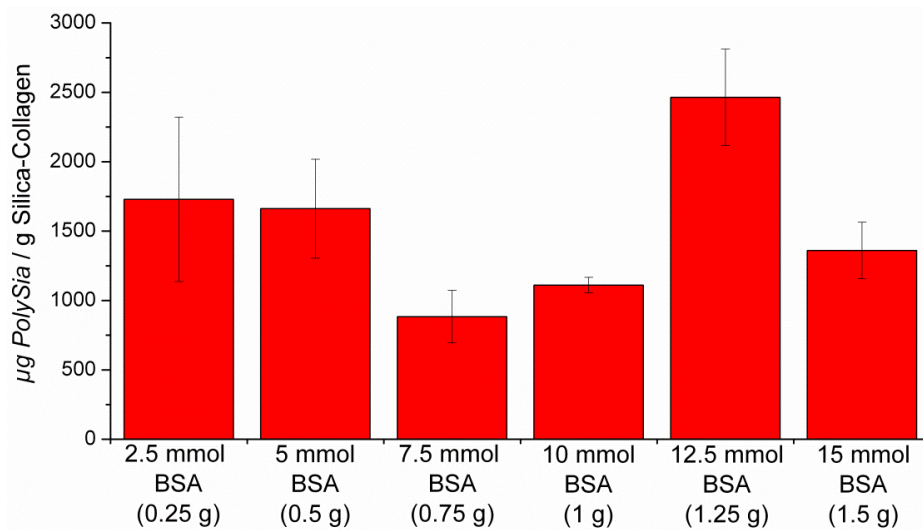


Abb. 5-138: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Collagen-Membranen, die mit PolySia immobilisiert wurden, wobei die Menge an BSA im zweiten Schritt verändert wurde.

Dabei ist zu sehen, dass zunächst eine Abnahme der gebundenen Menge an PolySia mit steigender Menge an BSA bis 7.5 mmol beobachtet werden kann. Anschließend nimmt die angebundene Menge bis zum Maximum bei 12.5 mmol BSA wieder zu und mit noch höheren Mengen an eingesetztem BSA wieder ab. Allerdings ist kein genauer Trend zu erkennen und die gemessenen Werte liegen alle etwa in einem Bereich. Dabei ist davon auszugehen, dass bei sehr geringen Mengen an BSA, sich nur wenige freie Carboxylgruppen für die PolySia-Anbindung an der Oberfläche befinden, die jedoch vermutlich alle frei zugänglich sind, so dass die Gruppen alle reagiert haben. Bei sehr großen Mengen an eingesetztem BSA könnte es sein, dass durch die erhöhten Anbindungsstellen, nicht mehr alle Gruppen frei zugänglich sind und eventuell auch durch angebundene PolySia abgeschirmt werden, so dass die Anbindung der PolySia gestört wird. Als letztes wurde die Menge an PolySia variiert, um deren Einfluss auf die Anbindung zu untersuchen. Die Ergebnisse des TBA-Tests sind in Abb. 5-139 dargestellt. Dabei kann beobachtet werden, dass die optimale Menge 0.21 mmol beträgt. Mit weiter steigender Menge an PolySia, nimmt die angebundene Menge wieder ab. Daher kann angenommen werden, dass sich höhere Mengen an PolySia bei der Anbindung vermutlich gegenseitig

stören. Auch könnte es sein, dass weitere freie Carboxylgruppen bei dem Einsatz von erhöhten Mengen an PolySia durch bereits angebundene PolySia abgeschirmt werden.

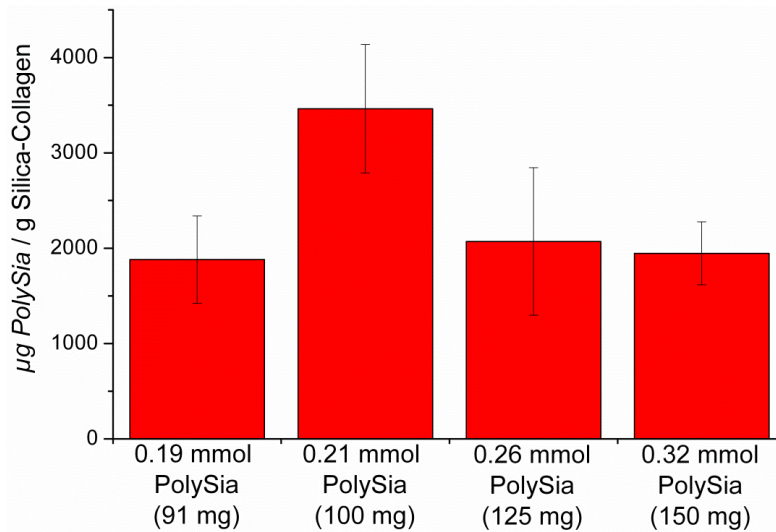


Abb. 5-139: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Collagen-Membranen, die mit PolySia immobilisiert wurden, wobei die Menge an PolySia im letzten Schritt verändert wurde.

5.7.3 Infiltrierung von mit Polysialinsäure beschichteten CMS-Nanopartikeln in MatriStypt®

Eine weitere Möglichkeit um Collagen-Silica-Komposite herzustellen, an denen PolySia gebunden ist, ist die Infiltrierung mit CMS-Nanopartikeln, die vor der Infiltrierung mit PolySia über das Linker-System beschichtet wurden. Der Erfolg der Infiltrierung mit PolySia-modifizierten Nanopartikeln wurde mittels IR-Spektroskopie untersucht. Die IR-Spektren sind in Abb. 5-140 gezeigt.

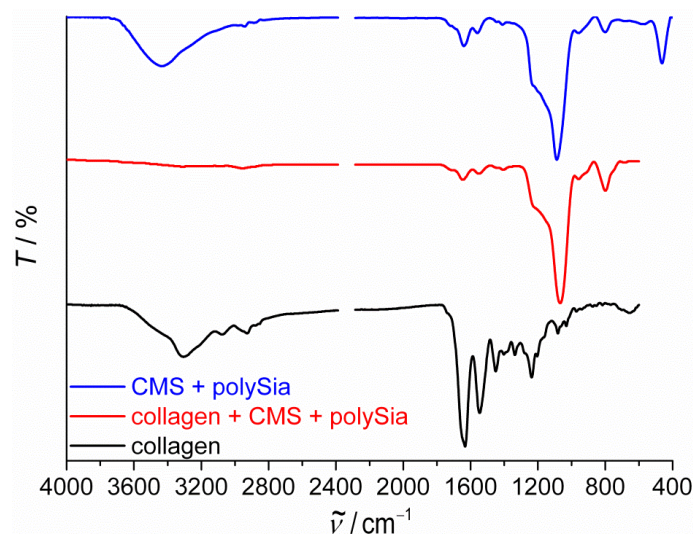


Abb. 5-140: IR-Spektren von reinem MatriStypt®, Collagen, das mit PolySia-modifizierten Nanopartikeln infiltriert wurde und CMS-Nanopartikel, die mit PolySia funktionalisiert wurden.

Aus den IR-Spektren ist zu entnehmen, dass die Collagen-Membran erfolgreich mit PolySia-beschichteten CMS-Nanopartikeln infiltriert werden konnte, da nach der Infiltrierung die typischen Silica-Banden zu beobachten sind. Des Weiteren können Amidbanden nach der Infiltrierung beobachtet werden, die zum einen dem Collagen und zum anderen den Amidbindungen der PolySia-Immobilisierung zugeordnet werden können. Es kann kein Hinweis auf die Anwesenheit von PolySia in den Spektren gefunden werden. Eine Zuordnung der Banden ist in Tabelle 5-38 zu finden.

Tab. 5-38: Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-140 (Wellenzahlen $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$).

MatriStypt®	Infiltrierung	CMS	Zuordnung der Banden	Quelle	Lit.
3316	-	-	(N-H)-Valenzschwingung	Collagen	[127,167]
3100-3700	-	3000-3700	(O-H/N-H)-Valenzschwingung	Collagen, Wasser	[127,163]
3073	-	-	(NH ₃ ⁺)-Valenzschwingung	Collagen	[163]
2973	2983	2939	(C-H)-Valenzschwingung	Collagen, APTES, BSA	[127,167]
-	2879	2865	(C-H)-Valenzschwingung	Collagen, APTES, BSA	[167]
1639	1652	1645	(C=O)-Valenzschwingung (Amid)	Collagen, (Wasser)	[127,167]
1550	1541	1549	(N-H)-Deformationsschwingung (Amid)	Collagen	[127,167]
1454	1408	1416	(C-H)-Deformationsschwingung	Collagen, APTES, BSA	[127,167]
1395	-	-	(C-H)-Deformationsschwingung	Collagen	[127,163]
1336	-	-	(C-H)-Wackelschwingung	Collagen	[127,163]
1240	1238	1238	(C-N)-Deformationsschwingung (Amid), (Si-O-Si)-Valenzschwingung	Collagen, Silica	[127,164]
1084	1068	1091	(C-O)-Valenzschwingung, (Si-O-Si)-Valenzschwingung	Collagen, Silica	[163,162]
1033	-	-	(C-O)-Valenzschwingung	Collagen	[127,163]
-	957	943	(Si-OH)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
-	802	809	(Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]
656	-	-	(N-H)-Deformationsschwingungen	Collagen	[127]
-	-	462	(O-Si-O)-Deformationsschwingung	Silica	[164]

Zur Überprüfung, wie sich die funktionalisierten Nanopartikel an das Collagen anlagern, wurden REM-Aufnahmen angefertigt, die in Abb. 5-141 dargestellt sind.

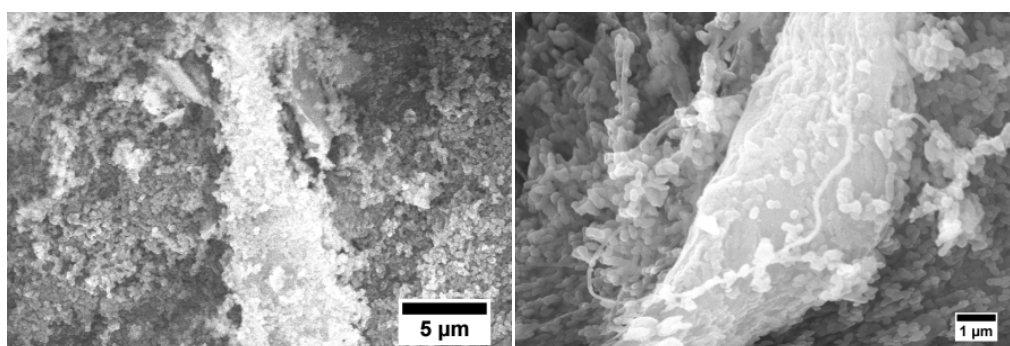


Abb. 5-141: REM-Aufnahmen von Collagen-Membranen, die mit PolySia-beschichteten CMS-Nanopartikeln infiltriert wurden (REM-ACI).

Darauf ist zu erkennen, dass sich auch diese Nanopartikel an der Oberfläche der Fasern des Collagens angelagert haben, wobei die sphärische Form der Nanopartikel erhalten bleibt. Daraus folgt, dass die im Vorfeld mit PolySia-funktionalisierten Nanopartikel in die Collagen-Membran infiltriert werden konnten.

Um zu untersuchen, ob die PolySia nach der Infiltrierung noch an den Kompositen immobilisiert ist und bei der Anbindung nicht abgewaschen wurde, wurde der TBA-Test durchgeführt. Die Ergebnisse der in verschiedenen Lösemitteln infiltrierten Membranen sowie der eingesetzten CMS-Nanopartikel sind in Abb. 5-142 dargestellt.

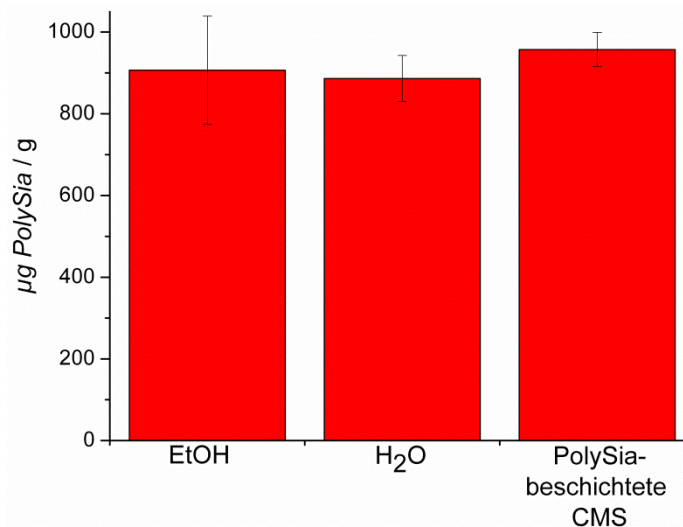


Abb. 5-142: Ergebnisse des TBA-Tests an Collagen-Membranen, die in verschiedenen Lösemitteln mit PolySia-modifizierten Nanopartikeln infiltriert wurden (μg PolySia pro Gramm CMS-Collagen), sowie von den eingesetzten CMS-Nanopartikeln (μg PolySia pro Gramm CMS).

Dabei kann beobachtet werden, dass sowohl in Wasser als auch in Ethanol nach der Infiltrierung PolySia detektiert werden kann und die Menge bei beiden nur geringfügig kleiner ist als bei den eingesetzten Nanopartikeln allein. Diese Abweichung kann auf die Schwankungen, die dem TBA-Test unterliegen zurückgeführt werden, so dass angenommen werden kann, dass die PolySia während der Infiltrierung nicht von den Nanopartikeln abgewaschen wird und dass die Infiltrierung in beiden Lösemitteln möglich ist. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Funktionalisierung der Collagen-Silica-Komposite mit PolySia nach der Infiltrierung ist zu erkennen, dass höhere Mengen immobilisiert werden können, wenn die Nanopartikel unfunktionalisiert in das Collagen infiltriert werden und die Komposite anschließend funktionalisiert werden.

Des Weiteren wurde die Auswirkung der eingesetzten Menge an PolySia-modifizierten Nanopartikeln auf die Infiltrierung untersucht. Die Ergebnisse des TBA-Tests sind in Abb. 5-143 gezeigt. Es ist zu sehen, dass bei allen eingesetzten Mengen an mit PolySia-beschichteten Nanopartikeln PolySia nach der Infiltrierung ins Collagen detektiert werden konnte. Dabei variieren die Mengen leicht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass unterschiedliche Mengen infiltriert wurden. Allerdings ist kein genauer Trend zu beobachten. Jedoch liegen die Werte etwa im selben Bereich, so dass angenommen werden kann, dass

die Unterschiede durch Schwankungen des TBA-Tests hervorgerufen werden. Diese Beobachtung könnte eventuell damit zusammenhängen, dass die Collagen-Membranen sich manchmal am Glasrand des Reaktionsgefäßes abgesetzt haben, wodurch eventuell die Nanopartikel nicht mehr so gut in die Membran infiltrieren konnten.

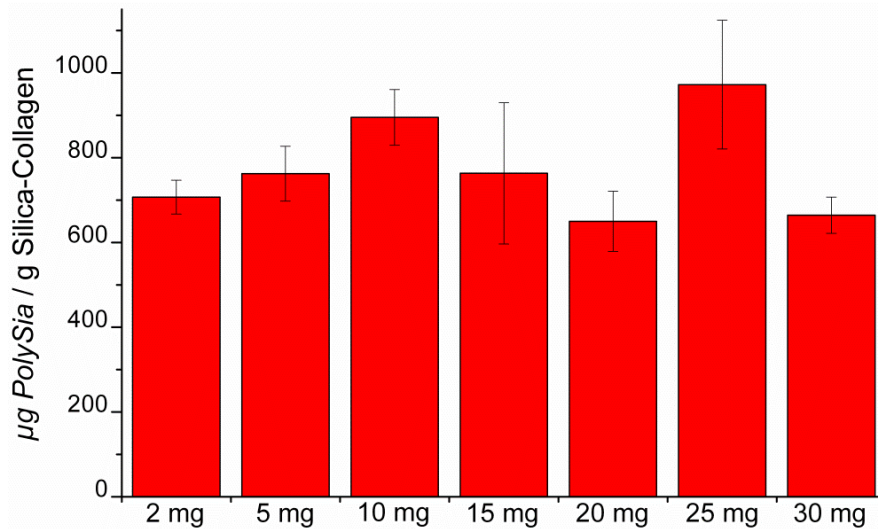


Abb. 5-143: Ergebnisse des TBA-Tests an Collagen-Membranen, bei denen verschiedene Mengen an CMS-Nanopartikeln zur Infiltrierung dispergiert wurden.

Als letztes wurde noch der Einfluss der Zeit auf die Infiltrierung der Nanopartikel untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-144 dargestellt.

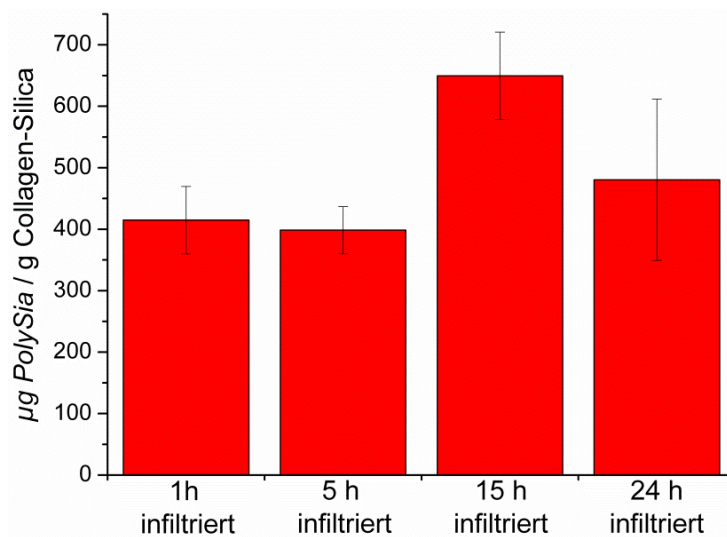


Abb. 5-144: Ergebnisse des TBA-Tests an Collagen-Membranen, bei denen die Dauer der Infiltrierung verändert wurde.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Dauer der Infiltrierung einen Einfluss auf die infiltrierte und somit gebundene Menge an PolySia hat. Dabei kann beobachtet werden, dass die detektierte Menge mit längerer Reaktionszeit zunächst zu nimmt bis zu einem Maximum bei der Reaktion über 15 Stunden. Wird die Dauer auf 24 Stunden erhöht, kann

wieder eine Abnahme der detektierten Menge an PolySia beobachtet werden. Durch die sehr hohe Standardabweichung in diesem Fall ist das Ergebnis nicht verlässlich. Das höhere Mengen mit längeren Zeiten gemessen werden, lässt die Vermutung zu, dass die Nanopartikel bei eine bzw. fünf Stunden nicht genügend Zeit hatten, um sich an das Collagen anzulagern. Das bei noch längeren Zeiten von 24 Stunden wiederum geringere Mengen detektiert werden, könnte dadurch erklärt werden, dass sich die Nanopartikel eventuell wieder ablösen.

5.7.4 Vergleichende Diskussion

Es konnten erfolgreich in mehreren Synthesen Komposit-Materialien aus calcinierten CMS-Nanopartikeln und kommerziell erhältlichen Collagen-Membranen hergestellt werden, indem die Nanopartikel in die Membran infiltriert wurden. Mittels IR-Spektroskopie und TG-Messungen konnte gezeigt werden, dass die hergestellten Komposite aus Silica und Collagen bestehen, denn in den IR-Spektren können nach der Infiltrierung sowohl die typischen Silica-Banden sowie Banden, die dem Collagen zugeordnet werden können, beobachtet werden. Die thermogravimetrischen Messungen zeigten, dass nach der Infiltrierung die Restmasse bei etwa 40 % konstant bleibt. Daher kann angenommen werden, dass diese Restmasse auf Silica-Rückstände zurückzuführen ist, da beim reinen Collagen die Restmasse bei 2 % liegt. Bei den Kompositen konnte weiterhin die faserartige Struktur des Collagens nach der Infiltrierung auf den REM-Aufnahmen beobachtet werden, an denen sich die Nanopartikel angeordnet haben. Diese haben ebenfalls ihre sphärische Form beibehalten. Nach Quervernetzung mit Glutaraldehyd waren die Nanopartikel weiterhin auf der Oberfläche angelagert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass erfolgreich Komposite in Wasser und Ethanol hergestellt werden konnten, die kaum Unterschiede unterm REM aufgezeigt haben, auch wenn bei der Synthese die Membranen unterschiedliches Verhalten gezeigt haben. Da die Collagen-Silica-Komposite auch über mehrere Tage stabil in Wasser sind ohne quervernetzt zu werden, kann davon ausgegangen werden, dass eine Quervernetzung mit Glutaraldehyd nicht notwendig ist, da die Nanopartikel stabil an den Fasern des Collagens angelagert sind und sich nicht durch Wasser abwaschen lassen. Des Weiteren wurden diese Materialien auf ihre Biokompatibilität geprüft, indem Zellkulturexperimente durchgeführt wurden. Dabei zeigt das MatriStypt[®] sowohl bei den statischen als auch dynamischen Experimenten eine sehr gute Biokompatibilität, während die Collagen-Silica-Materialien, die mit Glutaraldehyd quervernetzt wurden in beiden Fällen eine sehr schlechte Viabilität der Zellen zeigen. Daraus folgt, dass die quervernetzten Materialien akut toxisch für HepG2-Zellen sind. Daher sollte für die Quervernetzung auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Dabei könnte zum Beispiel Transglutaminase als Ersatzchemikalie für Glutaraldehyd eingesetzt werden oder es müssten eventuell physikalische Methoden wie zum Beispiel die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht getestet werden. Die Collagen-Materialien, die nur mit den calcinierten CMS-Nanopartikeln infiltriert wurden, zeigen in den statischen Experimenten eine sehr gute

Biokompatibilität, die mit der Viabilität der Zellen des reinen Collagens vergleichbar ist. Bei den dynamischen Experimenten ist die Viabilität dagegen nur halb so hoch wie bei dem reinen MatriStypt[®]. Dies könnte daran liegen, dass zum einen die Zellen auf den infiltrierten Materialien nicht so gut haften, so dass sie durch das strömende Medium abgespült werden. Zum anderen könnte es sein, dass die Nanopartikel durch das Medium ebenfalls zum Teil abgewaschen werden und dabei Zellen, die auf den Nanopartikeln gewachsen sind, mitnehmen. Daher kann angenommen werden, dass diese Materialien ebenfalls sehr gut biokompatibel sind.

Zur Immobilisierung der PolySia an den Kompositen wurden zwei Wege ausgetestet. Zum einen die Funktionalisierung von Collagen-Silica-Kompositen nach der Infiltrierung von unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln in die Membranen und zum anderen die Infiltrierung von mit PolySia-beschichteten CMS-Nanopartikeln. Bei der Funktionalisierung der Collagen-Silica-Komposite konnte zunächst gezeigt werden, dass das Silan BUTMS erfolgreich an die infiltrierten sowie infiltrierten und quervernetzten Komposite binden konnte, wobei eine wesentlich höhere Anbindung des BUTMS an den nur infiltrierten Membranen erzielt wurde. Dies könnte daran liegen, dass bei der Quervernetzung die Silanolgruppen der Silica-Oberfläche mit dem Collagen reagieren, wodurch es weniger Anbindungsstellen für das Silan gibt. Da die Anbindung von BUTMS erfolgreich war, wurde versucht PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA anzubinden. Anhand des TBA-Tests ist zu sehen, dass sich die PolySia erfolgreich an die Komposite über das Linker-System anbinden lässt. Eine sehr hohe Menge an PolySia konnte detektiert werden, wenn diese auch angebonden wurde. In allen anderen Fällen lag die detektierte Menge im gleichen Bereich, so dass dies als Messfehler des TBA-Tests angesehen werden kann. Aus den REM-Aufnahmen ist zu entnehmen, dass die Funktionalisierungen keine Auswirkungen auf die Beschaffenheit der Komposite haben. Da die Anbindung über das Linker-System erfolgreich war, wurden die Parameter zur Optimierung variiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass beim Verzicht bzw. einer sehr geringen Menge an APTES eine höhere Menge an PolySia immobilisiert werden konnte. Dies lässt vermuten, dass APTES die Anbindung des BSA stört bzw. dass das BSA besser an die unmodifizierte Oberfläche der Komposite binden kann. Dadurch könnten die freien Carboxylgruppen besser für die PolySia zugänglich sein. Wird kein APTES benutzt, ist keine Aminfunktion für die Immobilisierung des BSA vorhanden, so dass dies an die Silanolgruppen über eine andere Reaktion an die Oberfläche binden muss, wobei angenommen werden kann, dass dabei Kieselsäureester gebildet werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Menge an PolySia einen Einfluss auf die Anbindung hat, wobei zu hohe Mengen an eingesetzter PolySia schlechter für die Anbindung sind, da in diesem Fall weniger immobilisiert werden konnte. Dies könnte daran liegen, dass sich die PolySia-Moleküle bei der Anbindung gegenseitig stören und eventuell restliche freie Carboxylgruppen abgeschirmt werden, wenn PolySia bereits gebunden ist. Wurde die PolySia zuvor an die CMS-Nanopartikel gebunden und diese dann in die Membran infiltriert, kann eine vergleichbare Menge PolySia mit der an den Nanopartikeln allein bestimmten Menge detektiert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch diese

Methode zur Immobilisierung der PolySia erfolgreich ist. Dabei gibt es kaum Unterschiede in den angebundenen Mengen an PolySia, wenn die Anbindung in unterschiedlichen Lösemitteln durchgeführt wird. Werden jedoch die angebundenen Mengen an PolySia von beiden Varianten verglichen, kann beobachtet werden, dass höhere Mengen detektierbar sind, wenn die Collagen-Silica-Komposite nach der Infiltrierung funktionalisiert wurden. Dies könnte eventuell dadurch erklärt werden, dass auch das Collagen Hydroxygruppen aufweist, die mit den Aminfunktionen der deacetylierten PolySia reagieren können, wodurch mehr Anbindungsstellen für die PolySia vorhanden sind.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Immobilisierung von Polysialinsäure (PolySia) sowie Fluoreszenzfarbstoffen auf verschiedenen Materialien zur späteren Anwendung auf dem Gebiet der Nervenregeneration. Dabei wurden als Materialien verschiedene Silica-Nanopartikel und zum anderen Komposit-Materialien aus Silica und Collagen für die Immobilisierung hergestellt und verwendet. Die Anbindung der PolySia an die Oberfläche der Nanopartikel erfolgte über zwei verschiedene Wege: entweder mit einem konventionellen Linker-System oder über die „Click“-Chemie. Die durchgeführten Arbeiten lassen sich in sechs Teile gliedern:

- die Synthese und Charakterisierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs)
- die Untersuchung des Einflusses der Hydrolyse auf die PolySia-spezifischen Tests
- die Anbindung von PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin) über das Linker-System aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Bernsteinsäureanhydrid (BSA)
- die Immobilisierung der beiden Moleküle mittels der „Click“-Chemie
- die simultane Multifunktionalisierung der Oberfläche mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoffen (Alexa Fluor[®] 488-Azid und -Alkin)
- die Synthese von Collagen-Silica-Komposit-Materialien sowie deren Funktionalisierung mit PolySia.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MCM-41-Nanopartikel sowie kolloidale mesoporöse Silica-Nanopartikel (CMS) erfolgreich nach den Synthesevorschriften aus der Literatur hergestellt werden konnten.^[65,67] Dabei konnte beobachtet werden, dass sich bei der Calcination oder Extraktion der Nanopartikel die Größe sowie sphärische Form nicht verändern. Allerdings neigen beide Sorten von Nanopartikeln zur Agglomeration, wobei diese bei den MCM-41-Nanopartikeln wesentlich stärker ausgeprägt ist. Die CMS-Nanopartikel zeigen zwar auch eine Tendenz zum Agglomerieren, die jedoch im Gegensatz zu den MCM-41-Nanopartikeln nicht so stark ist. Trotzdem sollte in weiteren Versuchen eine Möglichkeit gefunden werden, diese Agglomeration zu unterbinden. Dies könnte z.B. durch die Zugabe von Silanen während der Synthese erreicht werden. Diese verringern die Neigung zur Agglomeration. Jedoch sind anschließend keine freien Silanolgruppen für weitere Oberflächenmodifizierungen vorhanden. Es könnte getestet werden, ob die Immobilisierung des APTES während der Nanopartikelsynthese einen Einfluss auf das Agglomerationsverhalten hat, allerdings müsste dabei beachtet werden, dass das SDA nur noch durch Extraktion aus den Poren entfernt werden kann, da das APTES bei der Calcination verbrennen würde. Es könnte ebenfalls versucht werden die Agglomeration durch Abstoßung von Molekülen zu verbessern, indem Moleküle mit einer gleichsinnigen Oberflächenladung angebunden werden. Dabei könnte untersucht werden, ob diese

Moleküle multifunktionell mit den anderen gewünschten Oberflächenmodifizierungen an die Oberfläche gebunden werden können.

Des Weiteren konnte für die unfunktionalisierten Nanopartikel gezeigt werden, dass die calcinierten Nanopartikel vom Typ MCM-41 als auch vom Typ CMS sehr gut biokompatibel sind, während die as-synthesized Nanopartikel eine sehr hohe Toxizität bei HepG2-Zellen aufweisen. Die Toxizität ist darauf zurückzuführen, dass das noch im Porensystem verbliebene CTAB freigesetzt wird und eine toxische Wirkung entfaltet. Auch die extrahierten Nanopartikel zeigen eine akute Toxizität besonders bei hohen Konzentrationen, da durch die Extraktion das SDA nicht vollständig aus dem Porensystem entfernt werden konnte. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass durch das Waschen der extrahierten Nanopartikel mit DMF weiteres CTAB aus dem Porensystem entfernt werden konnte, wodurch sich die Biokompatibilität der extrahierten Nanopartikel deutlich verbesserte. Daher sollten in weiteren Experimenten die extrahierten Nanopartikel mehrmals mit DMF gewaschen werden, um zu überprüfen, ob sich dadurch das toxische SDA vollständig aus dem Porensystem entfernen lässt, so dass auch bei diesen Nanopartikeln eine sehr gute Biokompatibilität erzielt werden kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Hydrolyse des TBA- sowie des Purpald[®]-Tests auf die Ergebnisse bei der quantitativen Bestimmung der angebundenen Polysialinsäure untersucht. Dabei wurden alle Proben sowohl mit als auch ohne Hydrolyse vermessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Werte überwiegend vergleichbar waren, sowohl beim TBA- als auch beim Purpald[®]-Test. Sofern Abweichungen zu beobachten waren, wurden höhere Werte detektiert, wenn auf die Hydrolyse verzichtet wurde. Da beide Tests ähnliche Ergebnisse zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die direkte Bestimmung der an die Nanopartikel angebundenen PolySia vorteilhaft ist, weil dadurch der langwierige Schritt der Hydrolyse erspart bleibt.

Der dritte Teil beschäftigt sich mit der Immobilisierung der PolySia sowie des Fluoreszenzfarbstoffs (Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin) über das Linker-System an verschiedene Silica-Nanopartikel, wobei der Schwerpunkt auf weiterführenden Untersuchungen im Hinblick auf die Anwendung in der Biomedizin lag. Dabei konnte gezeigt werden, dass PolySia sowohl an extrahierte und calcinierte MCM-41-Nanopartikel als auch an calcinierte CMS-Nanopartikel erfolgreich gebunden werden kann. Die größten Mengen an PolySia konnten bei den extrahierten MCM-41-Nanopartikeln detektiert werden. Der Grund hierfür liegt darin, dass hier keine Kondensationsreaktionen auftreten wie während der Calcination. Dass bei den CMS-Nanopartikeln die geringste Menge detektiert wurde, könnte daran liegen, dass es sich um Nanopartikel mit unterschiedlicher Größe, Porenvolumen und spezifischer Oberfläche handelt, was sich auf die Anbindung auswirken kann. Mittels Waschreihen wurde versucht, die Stabilität der Anbindung der PolySia zu testen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die PolySia zum Teil kovalent gebunden ist, jedoch auch ein größerer Anteil nur auf der Oberfläche adsorbiert wurde; dieser Anteil konnte bereits

nach einer Stunde abgewaschen werden. Durch Sorptionsmessungen konnte gezeigt werden, dass die Funktionalisierung mit APTES und BSA nicht nur an der Oberfläche der Nanopartikel stattfindet, sondern auch im Porensystem, wodurch dies nicht mehr frei zugänglich ist. Außerdem ergaben die durchgeführten Zellkulturexperimente, dass alle Funktionalisierungen bei dieser Anbindungsvariante ohne toxische Auswirkungen auf HepG2-Zellen blieben. Die einzigen Nanopartikel, die einen toxischen Effekt aufwiesen, waren extrahierte MCM-41-Nanopartikel, die mit APTES funktionalisiert wurden. Die Toxizität war in diesem Fall auf restliches CTAB zurückzuführen, da nach dem Waschen dieser Nanopartikel mit DMF keine toxischen Effekte mehr auftraten. Daraus folgt, dass die Anbindung über das Linker-System eine sehr gute Möglichkeit darstellt, um PolySia zu binden, ohne dass toxische Effekte der erhaltenen Materialien auftreten. Da die Versuche nur über fünf Tage erfolgten und nur bis zu Konzentrationen von 1000 ppm, sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, ob es einen Einfluss auf die Zellen über einen längeren Kultivierungszeitraum gibt oder ob noch höhere Konzentrationen sich auf die Viabilität auswirken. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die MCM-41-Nanopartikel, die mit PolySia immobilisiert wurden, auch biokompatibel gegenüber ISC-Zellen sind, die essentiell für die Nervenregeneration sind. Jedoch konnte erst ab einer Versuchsdauer von einer Woche eine sehr gute Viabilität beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Nanopartikel auf das Wachstum dieser Zellen einen behindernden Einfluss haben. Auch die CMS-Nanopartikel wurden mit ISC-Zellen getestet, jedoch nur über fünf Tage. Nach diesem Zeitraum wiesen die Kulturen, die höheren Konzentrationen an NPSNPs ausgesetzt waren, eine nicht so gute Viabilität auf. Da die erhaltenen Werte jedoch mit jenen vergleichbar sind, die mit MCM-41-Nanopartikeln am vierten Tag beobachtet wurden, kann es sein, dass das Wachstum der Zellen später ebenfalls ansteigen würde. Daher sollte die Untersuchung mit den ISC-Zellen an den CMS-Nanopartikeln über einen längeren Zeitraum wiederholt werden, um eine bessere Aussage über die Auswirkung treffen zu können.

Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Reacetylierung der PolySia an der Oberfläche der CMS-Nanopartikel erfolgreich war, da mittels der IR-Spektroskopie keine Unterschiede ermittelt werden konnten. Daher sollten in Zukunft Methoden entwickelt werden, um den Erfolg der Reaktion nachweisen zu können.

Bei den *in vitro*-Versuchen mit den CMS-Nanopartikeln, die mit PolySia beladen waren, am gequetschten Nerven einer Ratte konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden, die einen Hinweis über den Aufenthalt der Nanopartikel nach der siebentägigen Kultivierung gaben. Daher sollten in diesem Bereich Methoden entwickelt werden, die es ermöglichen, die Nanopartikel direkt und sicher zu identifizieren.

Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin konnte erfolgreich über das Linker-System an die Oberfläche der CMS-Nanopartikel gebunden werden. Jedoch sollte in weiteren Versuchen die Anbindung durch Variation verschiedener Parameter optimiert werden. Zu vermeiden gilt es hierbei, dass die modifizierten Nanopartikel zu stark mit Fluoreszenzmolekülen beladen werden, so dass ein Quenching auftreten würde. Auch diese Nanopartikel wurden mit HepG2-Zellen im MTT-Test untersucht, wobei keine toxischen

Effekte zu erkennen waren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Linker-System eine sehr gute Anbindungsmöglichkeit darstellt, wenn die Nanopartikel später in der Biomedizin Anwendung finden sollen. Diese Nanopartikel könnten ebenfalls noch weiter mit Zellkulturexperimenten untersucht werden, indem höhere Kultivierungsdauern oder höhere Konzentrationen eingesetzt werden.

Die Modifizierung der Silica-Nanopartikel mittels „Click“-Reaktionen wurde im vierten Teil dieser Arbeit untersucht. Dafür wurden kommerziell erhältliches Alexa Fluor[®] 488 mit einer Alkin- bzw. einer Azidfunktion sowie PolySia, die von Yi Su vom Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover (Arbeitsgruppe Dr. G. DRÄGER bei Prof. Dr. A. KIRSCHNING) mit einer Azid-, einer Alkin- oder einer alkynyl-analogen-Funktion ausgestattet wurde, eingesetzt. Dabei konnten bei der Synthese nur geringe Mengen an PolySia zur Immobilisierung eingesetzt werden, da diese nur in geringen Mengen verfügbar war. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl PolySia als auch der Fluoreszenzfarbstoff erfolgreich über die „Click“-Chemie an die Oberfläche der MCM-41-Nanopartikel angebunden werden konnte. Wie schon beim Linker-System wurden bei allen Versuchen größere Mengen an den extrahierten als an den calcinierten Nanopartikeln gebunden. Dies kann durch ein stärker kondensiertes Netzwerk mit weniger verfügbaren reaktiven Silanolgruppen bei den calcinierten Nanopartikeln erklärt werden. Es konnte auch beobachtet werden, dass die immobilisierte Menge an PolySia über die „Click“-Chemie mit Azid-modifizierter PolySia vergleichbar und mit Alkin-modifizierter PolySia wesentlich größer ist als die, die mit dem Linker-System angebunden werden konnte, obwohl kleinere Stoffmengen zugegeben wurden. Daher scheint die „Click“-Chemie für die Oberflächenmodifizierung sehr gut geeignet zu sein. Es sollte trotzdem in weiteren Versuchen überprüft werden, ob die immobilisierte Menge an PolySia weiter erhöht werden kann, wenn gleichzeitig auch die eingesetzte Menge an „click“-fähiger PolySia erhöht wird. Außerdem konnte durch Zellkulturexperimente an HepG2-Zellen an allen Arten von Nanopartikeln, die in der „Click“-Chemie eingesetzt wurden, gezeigt werden, dass diese Nanopartikel für Anwendungen in der Biomedizin nicht geeignet sind, da die Nanopartikel durch den Einsatz von Kupfer toxische Effekte auf Zellen zeigen, besonders wenn die Nanopartikel in höheren Konzentrationen eingesetzt wurden. An den mit PolySia-modifizierten Nanopartikeln konnte Kupfer nachgewiesen werden, das für die Toxizität verantwortlich ist. Daraus folgt, dass die „Click“-Chemie zwar eine sehr gute Anbindungsmethode für große Moleküle mit vielen Funktionalitäten an die Oberfläche ist, jedoch für Materialien, die biomedizinische Anwendungen haben, nicht geeignet ist. Daher sollte eine Möglichkeit gefunden werden, diese Reaktion so zu nutzen, dass entweder auf den Gebrauch von Kupfer verzichtet werden kann, indem zum Beispiel andere funktionelle Gruppen wie aktivierte Alkane oder Cyclooctine eingeführt werden, die ohne Kupfer eine „Click“-Reaktion eingehen, oder die Synthese ohne Kupfer bei höheren Temperaturen und über längere Zeiträume durchgeführt wird, wobei letzteres Nachteile im Bezug auf die Temperaturempfindlichkeit der PolySia mit sich bringt. Auch könnte versucht werden, das

Kupfer nach der Reaktion von den Nanopartikeln zu entfernen, indem das Kupfer durch Dialyse-Methoden oder durch Komplexierung mit beispielsweise Cyclam oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA) entfernt wird. Im Weiteren wurde auch versucht, PolySia über eine Kupfer-freie „Click“-Reaktion an die Oberfläche zu binden, jedoch konnten in mehreren Versuchen nur sehr geringe Mengen an PolySia an der Oberfläche detektiert werden. Daher scheint dieses Derivat für die Kupfer-freie „Click“-Chemie an Silica-Oberflächen nicht zu funktionieren. Es könnte noch getestet werden, ob die Menge durch längere Reaktionszeiten und eventuell noch größere Mengen an modifizierter PolySia gesteigert werden kann.

Des Weiteren wurde im fünften Teil der Arbeit versucht, die calcinierten CMS-Nanopartikel multifunktionell mit PolySia und einem Fluoreszenzfarbstoff auszustatten, wobei mehrere Synthesewege getestet wurden. Dabei konnten die besten Ergebnisse erzielt werden, wenn beide Substanzen über die „Click“-Reaktion an die Oberfläche gebunden wurden. Jedoch wird für diese Anbindung Kupfer benötigt, so dass diese Nanopartikel nicht für biomedizinische Zwecke anwendbar sind. Eine weitere Möglichkeit zur Multifunktionalisierung ist die Kombination aus dem Linker-System und der „Click“-Chemie, bei der die deacetylierte PolySia sowie Alexa Fluor[®] 488-Azid erfolgreich multifunktionell an die Oberfläche binden konnten. Darüber hinaus konnte die Multifunktionalisierung optimiert werden, so dass die Nanopartikel mit hohen Mengen an PolySia beladen werden konnten und trotzdem noch eine hinreichende Fluoreszenz zeigten. Die beste Variante um die beiden Moleküle zu binden, war zuerst die PolySia zur Dispersion der Nanopartikel zu geben und nach 24 Stunden den Fluoreszenzfarbstoff. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ohne vorhergehende Funktionalisierung mit APTES oder wenn eine Modifikation mit nur sehr geringen APTES-Mengen durchgeführt wurde, die angebundene Menge an PolySia erhöht werden konnte. So konnten optimierte Parameter für die kombinierte Anbindung von PolySia und Fluoreszenzfarbstoffen ermittelt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Lösemittel bei der Kombination einen Einfluss auf die Anbindung hat, da PolySia in Ethanol mit DCC nicht bzw. kaum an die Oberfläche bindet, wodurch DCM weiterhin als Lösemittel verwendet werden sollte. Auch bei dieser Variante der Multifunktionalisierung wird Kupfer als Katalysator verwendet, wodurch diese Nanopartikel nicht für die Biomedizin geeignet sind. Daher wurde ebenfalls die Anbindung über das Linker-System getestet, für die ebenfalls ein erfolgreiches Protokoll erarbeitet werden konnte. Dabei sollte auch hier zuerst die PolySia und nach 24 Stunden das Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin zur Dispersion gegeben werden. Hinsichtlich des Einsatzes von APTES ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie oben beschrieben.

Die so erhaltenen Nanopartikel wurden in Zellkulturexperimenten getestet, wobei eine gute Biokompatibilität gegenüber HepG2-Zellen beobachtet werden konnte. Bei den ISC-Zellen konnte wieder eine Abnahme der Viabilitäten der Zellen nach fünf Tagen Kultivierung beobachtet werden, was vergleichbar ist mit den Werten, die bei der Kultivierung in Gegenwart der MCM-41-Nanopartikel beobachtet wurden. Daher sollte die Kultivierung mit

den ISC-Zellen über einen längeren Zeitraum wiederholt werden, um zu überprüfen, ob ein anfangs eingeschränktes Wachstum vorliegt. Außerdem sollten noch weitere Untersuchungen mit den HepG2-Zellen erfolgen, in dem zum einen höhere Konzentrationen und zum anderen längere Kultivierungszeiträume untersucht werden.

In einem ersten *in vitro*-Test wurden diese Nanopartikel in gequetschte Nerven von adulten Ratten injiziert, um die Auswirkung auf die Regeneration sowie den Verbleib der Nanopartikel nach sieben Tagen zu untersuchen. Dabei konnten keine eindeutigen Aussagen über den Verbleib der Nanopartikel gemacht werden. Es konnten zwar sowohl eine grüne Fluoreszenz des Farbstoffs als auch PolySia mittels eines Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden; die beiden Fluoreszenzen überlagerten sich auch, jedoch könnte es sich dabei auch nur um agglomerierte Nanopartikel handeln. Da das Maximum der örtlichen Auflösung erreicht war, konnten die genauen Größen dieser großen Teilchen nicht bestimmt werden. Daher sollten weitere Methoden entwickelt werden, mit denen die Nanopartikel direkt nachgewiesen werden können.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung von Collagen-Silica-Kompositen, die zusätzlich mit PolySia funktionalisiert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass kommerziell erhältliches MatriStypt[®] mit calcinierten CMS-Nanopartikeln infiltriert und mit Glutaraldehyd quervernetzt werden konnte. Beim Aufbewahren der Komposite in Wasser über längere Zeiträume konnte zudem beobachtet werden, dass die Komposite stabil sind und nicht unbedingt quervernetzt werden müssen. Es sollte in weiteren Versuchen getestet werden, welche Auswirkungen die Konzentration der Suspension hat und ob über diese Konzentration verschiedene Komposit-Materialien durch geringere Anlagerung der Nanopartikel erhalten werden können. Eine weitere Möglichkeit, Collagen-Silica-Komposit-Materialien herzustellen, bestünde darin, zu versuchen, die Membranen mit einem Silica-Film zu beschichten, indem diese durch Dip-Coating in eine Silica-Lösung getaucht werden. Da hier keine Nanopartikel entstehen und sich nur ein Silica-Film auf dem Collagen ablagern würde, könnten vermutlich Komposite mit anderen Eigenschaften erhalten werden. Im Weiteren wurde versucht, aus den Kompositen Röhrchen zu formen, um diese als Nervenleitschienen einsetzen zu können. Dabei konnten die Membranen im feuchten Zustand sehr gut geformt werden, wobei die Form nach dem Trocknen erhalten blieb. Jedoch konnten die beiden Enden nicht fest miteinander verbunden werden um geschlossene Röhrchen herzustellen, auch nicht über die Quervernetzung mit Glutaraldehyd. Daher sollte in weiteren Versuchen getestet werden, ob die Öffnung durch Zunähen mit Mikro-Nähwerkzeug geschlossen werden kann, wobei diese Variante sehr aufwendig wäre und vermutlich noch eine gewisse Durchlässigkeit vorhanden bliebe. Des Weiteren könnte diese Öffnung durch einen Biokleber zusammengeklebt werden, wodurch stabile Röhrchen erhalten werden könnten.

Die erhaltenen Komposite wurden in statischen sowie dynamischen Zellkulturexperimenten untersucht. Aus diesen Experimenten folgt, dass das reine Collagen sehr gut biokompatibel ist, da sowohl in den statischen als auch in den dynamischen Experimenten eine sehr gute

Viabilität der Zellen beobachtet werden konnte. Bei den Collagen-Silica-Materialien, die mit Glutaraldehyd quervernetzt wurden, ist die Viabilität der Zellen in beiden Experimenten sehr gering, woraus folgt, dass diese Materialien akut toxisch für HepG2-Zellen sind. Da Glutaraldehyd toxisch ist, sollte die Quervernetzung über andere Methoden erfolgen, wobei andere chemische Reagenzien getestet werden sollten, die keine toxischen Effekte zeigen, wie zum Beispiel Transglutaminase. Oder es sollten physikalische Methoden ausprobiert werden wie die Quervernetzung über die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. Die mit calcinierten CMS-Nanopartikeln infiltrierte Collagen-Materialien zeigen in den statischen Zellkulturexperimenten eine vergleichbare Viabilität der Zellen wie das MatriStypt[®]. Bei den dynamischen Messungen ist die Viabilität allerdings nur halb so groß wie beim MatriStypt[®]. Dies könnte daran liegen, dass durch das strömende Medium die Zellen abgespült werden, die anscheinend an den infiltrierte Materialien nicht so gut haften und somit nicht mehr detektiert werden können. Auch könnte es sein, dass die Nanopartikel zum Teil abgewaschen werden und dabei anhaftende Zellen mit abtransportieren. Da die Viabilität bei den statischen Bedingungen sehr gut ist, kann angenommen werden, dass diese Materialien trotzdem sehr gut biokompatibel sind. Außerdem könnte die Degradierbarkeit der Materialien untersucht werden, um eine Aussage über die Langlebigkeit der Materialien zu treffen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die infiltrierte als auch die infiltrierte und quervernetzte Collagen-Silica-Komposite mit verschiedenen Silanen funktionalisieren lassen, wobei die besseren Resultate bei den nicht quervernetzten Kompositen erzielt wurden. Außerdem konnte PolySia über diese Methode mittels des Linker-Systems erfolgreich angebunden werden. Dabei zeigte sich, dass auch bei diesen Kompositen eine geringe Menge an APTES (bzw. die Nichtverwendung dieses Reagens) die Anbindung von PolySia erhöhen, woraus folgt, dass das APTES die Anbindung des BSA stört bzw. dieses besser über die Silanolgruppen an die Oberfläche binden kann. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass zu hohe Mengen an eingesetzter PolySia in diesem Fall negative Auswirkungen auf die Anbindung haben. Um diese Komposite in der Nervenregeneration anwenden zu können, sollten diese durch eine Variation der Synthesevorschriften weiter optimiert werden. Des Weiteren sollte getestet werden, ob über die Funktionalisierung der infiltrierte Collagen-Membranen auch PolySia über die „Click“-Chemie angebunden werden kann, ob Fluoreszenzfarbstoffe immobilisiert werden können sowie ob eine Multifunktionalisierung möglich ist. Auch sollten diese Komposite auf ihre Biokompatibilität gegenüber Zellen untersucht werden, so dass sie eventuell in der Nervenregeneration untersucht werden können. Und es sollte überprüft werden, inwiefern sich die Funktionalisierung auf die Eigenschaften des Collagens auswirkt, wobei darauf geachtet werden sollte, ob die Biodegradierbarkeit weiterhin vorhanden ist.

Es konnte gezeigt werden, dass calcinierte CMS-Nanopartikel, die zuvor mit PolySia beschichtet wurden, in die Membran eingelagert werden konnten, wobei die detektierte Menge an PolySia nach der Infiltration vergleichbar ist mit jener, die an den einzelnen Nanopartikeln gemessen werden konnte. Jedoch konnten hier geringere Mengen detektiert werden, als wenn infiltrierte Membranen funktionalisiert wurden, so dass diese Variante zu

bevorzugen ist. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die Wahl des Lösemittels keinen Einfluss auf die Menge an angebundener PolySia hat. Diese Variante der Immobilisierung von Silica-Collagen-Materialien mit PolySia sollte noch weiter optimiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob CMS-Nanopartikel, die vor der Infiltrierung bereits eine höhere gebundene Menge an PolySia tragen, die in den Kompositen detektierbare Menge an PolySia erhöhen kann. Auch sollten diese Komposite in Zellkulturexperimenten untersucht werden, um herauszufinden, ob die Art der PolySia-Anbindung einen Einfluss auf die Biokompatibilität hat.

Des Weiteren sollte versucht werden, dass BSA direkt an die Collagen-Membran zu binden, indem es mit den Aminfunktionen des Collagens reagiert. Anschließend sollte getestet werden, ob die PolySia über den so angebondenen Linker immobilisiert werden kann und ob sich diese Art der Modifikation auf die Eigenschaften des Collagens, wie beispielsweise die Biodegradierbarkeit, auswirkt.

Es konnten erfolgreich verschiedene nanoporöse Silica-Nanopartikel hergestellt und über verschiedene Wege mit Polysialinsäure sowie Fluoreszenzfarbstoffen funktionalisiert werden, die eine sehr gute Biokompatibilität zeigen. Auch eine Multifunktionalisierung mit beiden Molekülen konnte erreicht werden. Des Weiteren können Collagen-Silica-Komposit-Materialien hergestellt werden, die ebenfalls mit PolySia ausgestattet werden können. In Form von Röhren können diese später in der Nervenregeneration eingesetzt werden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Bryers; C. M. Giachelli; B. D. Ratner; *Biotechn. Bioeng.*; **2012**; 109; 1898-1911.
- [2] D. F. Williams; *J. Mater. Sci.*; **1987**; 22; 3421-3445.
- [3] Y. Piao; A. Burns; J. Kim; U. Wiesner; T. Hyeon; *Adv. Funct. Mater.*; **2008**; 18; 3745-3758.
- [4] N. Ehlert; P. P. Müller; M. Stieve; T. Lenarz; P. Behrens; *Mesoporous Silica Films as a Novel Biomaterial: Applications in the Middle Ear*, submitted.
- [5] J. E. Lee; N. Lee; T. Kim; J. Kim; T. Hyeon; *Acc. Chem. Res.*; **2011**; 44; 893-902.
- [6] *Novel cancer-targeting investigational nanoparticles receives FDA IND approval for first-Inhuman trial.*; <http://www.mskcc.org/mskcc/html/102185.cfm>. [31.01.2011]
- [7] N. Ehlert; M. Badar; A. Christel; S. J. Lohmeier; T. Lüßenhop; M. Stieve; T. Lenarz; P. P. Müller; P. Behrens; *J. Mater. Chem.*; **2011**; 21; 752-760.
- [8] Y.-S. Lin; C. L. Haynes; *Chem. Mater.*; **2009**; 21; 3979-3986.
- [9] N. Ehlert; P. P. Müller; M. Stieve; P. Behrens; *Microporous Mesoporous Mater.*; **2010**; 131; 51-57.
- [10] J. C. Vogt; G. Brandes; I. Krüger; P. Behrens; I. Nolte; T. Lenarz; M. Stieve; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*; **2008**; 19; 2629-2636.
- [11] N. Ehlert; A. Hoffmann; T. Lüßenhop; G. Gross; P. P. Müller; M. Stieve; T. Lenarz; P. Behrens; *Acta Biomaterialia*; **2011**; 7; 1772-1779.
- [12] J. C. Vogt; G. Brandes; N. Ehlert; P. Behrens; I. Nolte; P. P. Müller; T. Lenarz; M. Stieve; *J. Biomater. App.*; **2009**; 24; 175-191.
- [13] Y.-S. Lin; N. Abadeer; C. L. Haynes; *Chem. Comm.*; **2011**; 47; 532-534.
- [14] Y.-S. Lin; C. L. Haynes; *J. Am. Chem. Soc.*; **2010**; 132; 4834-4842.
- [15] A. Baeza; E. Guisasola; E. Ruiz-Hernández; M. Vallet-Regí; *Chem. Mater.*; **2012**; 24; 517-524.
- [16] V. Cauda; A. Schlossbauer; T. Bein; *Microporous Mesoporous Mater.*; **2010**; 132; 60-71.
- [17] H. Mader; X. Li; S. Saleh; M. Link; P. Kele; O. S. Wolfbeis; *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; **2008**; 1130; 218-223.
- [18] F. Mahtab; J. W. Y. Lam; Y. Yu; J. Liu; W. Yuan; P. Lu; B. Z. Tang; *small*; **2011**; 7; 1449-1455.
- [19] C. Barbé; J. Bartlett; L. Kong; K. Finnie; H. Q. Lin; M. Larkin; S. Calleja; A. Bush; G. Calleja; *Adv. Mater.*; **2004**; 16; 1959-1966.
- [20] C.-H. Lee; S.-H. Cheng; Y.-J. Wang; Y.-C. Chen; N.-T. Chen; J. Souris; C.-T. Chen; C.-Y. Mou; C.-S. Yang; L.-W. Lo; *Adv. Funct. Mater.*; **2009**; 19; 215-222.
- [21] S. A. Corr; Y. P. Rakovich; Y. K. Gun'ko; *Nanoscale Res Lett*; **2008**; 3; 87-104.
- [22] Y. Jin; A. Li; S. G. Hazelton; S. Liang; C. L. John; P. D. Selid; D. T. Pierce; J. X. Zhao; *Coord. Chem. Rev.*; **2009**; 253; 2998-3014.

- [23] Y.-S. Lin; S.-H. Wu; Y. Hung; Y.-H. Chou; C. Chang; M.-L. Lin; C.-P. Tsai; C.-Y. Mou; *Chem. Mater.*; **2006**; 18; 5170-5172.
- [24] S. Steinhaus; Y. Stark; S. Bruns; Y. Haile; T. Scheper; C. Grothe; P. Behrens; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*; **2010**; 21; 1371-1378.
- [25] E. C. Schulz; D. Schwarzer; M. Frank; K. Stummeyer; M. Mühlenhoff; A. Dickmanns; R. Gerardy-Schahn; R. Ficner; *J. Mol. Biol.*; **2010**; 397; 341-351.
- [26] F. A. Troy; *Glycobiol.*; **1992**; 2; 5-23.
- [27] T. Janas; T. Janas; *Biochim. Biophys. Acta*; **2011**; 1808; 2923-2932.
- [28] M. A. Ferrero; L. R. Aparicio; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; **2010**; 86; 1621-1635.
- [29] Y. Haile; K. Haastert; K. Cesnulevicius; K. Stummeyer; M. Timmer; S. Berski; G. Dräger; R. Gerardy-Schahn; C. Grothe; *Biomater.*; **2007**; 28; 1163-1173.
- [30] U. Rutishauser; *Nature*; **2008**; 9; 26-35.
- [31] J. Patane; V. Trapani; J. Villavert; K. D. McReynolds; *Carbohydrate Res.*; **2009**; 344; 820-824.
- [32] K. Angata; M. Fukuda; *Biochimie*; **2003**; 85; 195-206.
- [33] J. L. Brusés; U. Rutishauser; *Biochimie*; **2001**; 83; 635-643. [29] Y. Haile; K. Haastert; K. Cesnulevicius; K. Stummeyer; M. Timmer; S. Berski; G. Dräger; R. Gerardy-Schahn; C. Grothe; *Biomater.*; **2007**; 28; 1163-1173.
- [34] C. H. Lee; A. Singla; Y. Lee; *Internat. J. Pharmaceutics*; **2001**; 221; 1-22.
- [35] M. A. Meyers; P.-Y. Chen; A. Y.-M. Lin; Y. Seki; *Progress Mater. Sci.*; **2008**; 53; 1-206.
- [36] H. Ehrlich; *Internat. Geol. Rev.*; **2010**; 52; 661-699.
- [37] K. H. Stenzel; T. Miyata; A. L. Rubin; *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*; **1974**; 3; 231-253.
- [38] E.-J. Lee; S.-H. Jun; H.-E. Kim; Y.-H. Koh; *J. Biomed. Mater. Research A*; **2012**; 100A; 841-847.
- [39] M. M. Giraud Guille; G. Mosser; C. Helary; D. Eglin; *Micron*; **2005**; 36; 602-608.
- [40] H. C. Kolb; M. G. Finn; K. B. Sharpless; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2001**; 40; 2004-2021.
- [41] Y.-H. Zhang; Z.-X. Gao; C.-L. Zhong; H.-B. Zhou; L. Chen; W.-M. Wu; X.-J. Peng; Z.-J. Yao; *Tetrahedron*; **2007**; 63; 6813-6821.
- [42] G. K. Such; A. P. R. Johnston; K. Liang; F. Caruso; *Progress Polymer Sci.*; **2012**; 37; 985-1003.
- [43] B. Dervaux; F. E. Du Prez; *Chem. Sci*; **2012**; 3; 959-966.
- [44] P. Wu; V. V. Fokin; *Aldrichimica ACTA*; **2007**; 40; 7-17.
- [45] H. L. Tu; Y.-S. Lin; H.-Y. Lin; Y. Hung; L.-W. Lo; Y.-F. Chen; C.-Y. Mou; *Adv. Mater.*; **2009**; 21; 172-177.
- [46] F. Tang; L. Li; D. Chen; *Adv. Mater.*; **2012**; 24; 1504-1534.
- [47] C. Fruijtier-Pölloth; *Toxicology*; **2012**; 294; 61-79.
- [48] J. Kecht; A. Schlossbauer; T. Bein; *Chem. Mater.*; **2008**; 20; 7207-7214.
- [49] C. Turck; G. Brandes; I. Krüger; P. Behrens; H. Mojallal; T. Lenarz; M. Stieve; *Acta Oto-Laryngologica*; **2007**; 127; 801-808.

- [50] R. I. Nooney; E. McCormack; C. McDonagh; *Anal. Bioanal. Chem.*; **2012**; 404; 2807-2818.
- [51] V. Sokolova; M. Epple; *Nanoscale*; **2011**; 3; 1957-1962.
- [52] M. Qobosheane; S. Santra; P. Zhang; W. Tan; *Analyst*; **2001**; 126; 1274-1278.
- [53] L. Zhao; Y. Zhao; Y. Han; *Langmuir*; **2010**; 26; 11784-11789.
- [54] V. Cauda; C. Argyo; D. G. Piercy; T. Bein; *J. Am. Chem. Soc.*; **2011**; 133; 6484-6486.
- [55] M. J. Sailor; J.-H. Park; *Adv. Mater.*; **2012**; 24; 3779-3802.
- [56] B. G. Trewyn; S. Giri; I. I. Slowing; V. S.-Y. Lin; *Chem. Comm.*; **2007**; 31; 3236-3245.
- [57] B. G. Trewyn; I. I. Slowing; S. Giri; H.-T. Chen; V. S.-Y. Lin; *Acc. Chem. Res.*; **2007**; 40; 846-853.
- [58] J. L. Vivero-Escoto; R. C. Huxford-Phillips; W. Lin; *Chem. Soc. Rev.*; **2012**; 41; 2673-2685.
- [59] B. Chang; J. Guo; C. Liu; J. Qian; W. Yang; *J. Mater. Chem.*; **2010**; 20; 9941-9947.
- [60] A. Bel; I. Acar; G. Güclü; *J. App. Polymer Sci.*; **2012**; 125; E85-E92.
- [61] V. Cauda; C. Argyo; T. Bein; *J. Mater. Chem.*; **2010**; 20; 8693-8699.
- [62] A. M. B. Furtado; Y. Wang; T. G. Glover; M. D. LeVan; *Microporous Mesoporous Mater.*; **2011**; 142; 730-739.
- [63] D. Q. Khieu; D. T. Quang; T. D. Lam; N. H. Phu; J. H. Lee; J. S. Kim; *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*; **2009**; 65; 73-81.
- [64] K. Möller; J. Kobler; T. Bein; *Adv. Funct. Mater.*; **2007**; 17; 605-612.
- [65] Z.-A. Qiao; L. Zhang; M. Guo; Y. Liu; Q. Huo; *Chem. Mater.*; **2009**; 21; 3823-3829.
- [66] A. J. Di Pasqua; K. K. Sharma; Y.-L. Shi; B. B. Toms; W. Ouelette; J. C. Dabrowiak; T. Asefa; *J. Inorg. Biochem.*; **2008**; 102; 1416-1423.
- [67] Q. Cai; Z.-S. Luo; W.-Q. Pang; Y.-W. Fan; X.-H. Chen; F.-Z. Cui; *Chem. Mater.*; **2001**; 13; 258-263.
- [68] C. Argyo; V. Cauda; H. Engelke; J. Rädler; G. Bein; T. Bein; *Chem. Eur. J.*; **2012**; 18; 428-432.
- [69] V. D. Bock; H. Hiemstra; J. H. van Maarseveen; *Eur. J. Org. Chem.*; **2006**; 51-68.
- [70] G. Clavé; S. Campidelli; *Chem. Sci.*; **2011**; 2; 1887-1896.
- [71] R. A. Evans; *Aust. J. Chem.*; **2007**; 60; 384-395.
- [72] T. Lummerstorfer; H. Hoffmann; *J. Phys. Chem. B*; **2004**; 108; 3963-3966.
- [73] B. J. Adzima; C. N. Bowman; *Am. Inst. Chem. Eng.*; **2012**; 58; 2952-2965.
- [74] S. Prakash; T. M. Long; J. C. Selby; J. S. Moore; M. A. Shannon; *Anal. Chem.*; **2007**; 79; 1661-1667.
- [75] Z. Li; T. Seo; J. Ju; *Tetrahedron Letters*; **2004**; 45; 3143-3146.
- [76] Z. Kaleta; O. Egyed; T. Soós; *Org. Biomol. Chem.*; **2005**; 3; 2228-2230.
- [77] V. Rostovtsev; L. G. Green; V. V. Fokin; K. B. Sharpless; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2002**; 41; 2596-2599.
- [78] W. H. Binder; R. Sachsenhofer; *Macromol. Rapid Commun.*; **2007**; 28; 15-54.
- [79] S. G. Agalave; S. R. Maujan; V. S. Pore; *Chem. Asian. J.*; **2011**; 6; 2696-2718.

- [80] P. C. Lin; S. H. Ueng; M. C. Tseng; J. L. Ko; K. T. Huang; S. C. Yu; A. K. Adak; Y. J. Chen; C. C. Lin; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2006**; 45; 4286-4290.
- [81] N. K. Devaraj; J. P. Collman; *QSAR Comb. Sci*; **2007**; 26; 1253-1260.
- [82] V. O. Rodionov; V. V. Fokin; M. G. Finn; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2005**; 44; 2210-2215.
- [83] N. J. Agard; J. A. Prescher; C. Bertozzi; *J. Am. Chem. Soc.*; **2004**; 126; 15046-15047.
- [84] Y. Khaniani; A. Badiei; *J. Mater. Res.*; **2012**; 27; 932-938.
- [85] T. Jin; M. Yan; Y. Yamamoto; *Chem. Cat. Chem.*; **2012**; 4; 1217-1229.
- [86] S. Rana; J. W. Cho; *Nanoscale*; **2010**; 2; 2550-2556.
- [87] J. Nakazawa; T. D. P. Stack; *JACS*; **2008**; 130; 14360-14361.
- [88] A. Schlossbauer; D. Schaffert; J. Knecht; E. Wagner; T. Bein; *JACS*; **2008**; 130; 12558-12559.
- [89] Q. Liu; P. DeShong; M. R. Zachariah; *J Nanopart Res*; **2012**; 14; 923-930.
- [90] C.-P. Tsai; Y. Hung; Y.-H. Chou; D.-M. Huang; J.-K. Hsiao; C. Chang; Y.-C. Chen; C.-Y. Mou; *small*; **2008**; 4; 186-191.
- [91] P. Atkins; *Physikalische Chemie*; Wiley-VCH; 3. Auflage; Weinheim; **2001**; 563-564.
- [92] A.-C. Faure; C. Hoffmann; R. Bazzi; F. Goubard; E. Pauthe; C. A. Marquette; L. J. Blum; P. Perriat; S. Roux; O. Tillement; *ACS Nano*; **2008**; 2; 2273-2282.
- [93] G. Galinis; H. Yazdanfar; M. Bayliss; M. Watkins; K. von Haefen; *J Nanopart Res*; **2012**; 14; 1019-1023.
- [94] M.-C. Estévez; M. B. O'Donoghue; X. Chen; W. Tan; *Nano Res*; **2009**; 2; 448-461.
- [95] W. Zhong; *Anal. Bioanal. Chem.*; **2009**; 394; 47-59.
- [96] Produktinformation Alexa Fluor[®] 488; INVITROGEN.
- [97] Y. Su; C. Kasper; A. Kirschning; G. Dräger; S. Berski; *Macromol. Biosci.*; **2010**; 10; 1028-1033.
- [98] B. Rode; C. Endres; C. Ran; F. Stahl; S. Beutel; C. Kasper; S. Galuska; R. Geyer; M. Mühlhoff; R. Gerardy-Schahn; T. Scheper; *J. Biotechn.*; **2008**; 135; 202-209.
- [99] S. Bruns; Y. Stark; S. Röker; M. Wieland; G. Dräger; A. Kirschning; F. Stahl; C. Kasper; T. Scheper; *J. Biotechn.*; **2007**; 131; 335-345.
- [100] K. Stummeyer; A. Dickmanns; M. Mühlhoff; R. Gerardy-Schahn; R. Ficner; *Nat. Struc. Mol. Bio.*; **2005**; 12; 90-96.
- [101] S. Berski; J. van Bergeijk; D. Schwarzer; Y. Stark; C. Kasper; T. Scheper; C. Grothe; R. Gerardy-Schahn; A. Kirschning; G. Dräger; *Biomacromolecules*; **2008**; 9; 2353-2359.
- [102] U. Rutishauser; *J. Cell. Biochem.*; **1998**; 70; 304-312.
- [103] Y. Haile; S. Berski; G. Dräger; A. Nobre; K. Stummeyer; R. Gerardy-Schahn; C. Grothe; *Biomaterials*; **2008**; 29; 1880-1891.
- [104] A. Varki; P. Gagneux; *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; **2012**; 1253; 16-36.
- [105] I. Maru; J. Ohnishi; Y. Ohta; M. Y. Tsukada; *J. Biosci. Bioeng.*; **2002**; 93; 258-265.

- [106] M. Mühlhoff; M. Eckhardt; R. Gerardy-Schahn; *Curr. Opin. Struc. Biol.*; **1998**; 8; 558-564.
- [107] U. Assmann; A. Szentivanyi; Y. Stark; T. Scheper; S. Berski; G. Dräger; R. H. Schuster; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*; **2010**; 21; 2115-2124.
- [108] J. Tang; U. Rutishauser; L. Landmesser; *Neuron*; **1993**; 13; 405-414.
- [109] E. E. Peacock Jr.; *J. Surgical Research*; **1967**; 7; 433-445.
- [110] A. V. Vashi; J. A. Werkmeister; T. Vuocolo; C. M. Elvin; J. A. M. Ramshaw; *J. Biomed. Mater. Research A*; **2012**; 100A; 2239-2243.
- [111] I. Sommer; P. M. Kunz; *J. Appl. Polymer Sci.*; **2012**; 125; E27-E41.
- [112] T. Mitra; G. Sailakshmi; A. Gnanamani; A. B. Mandal; *J. Appl. Polymer Sci.*; **2012**; 125; E490-E500.
- [113] C. Helary; I. Bataille; A. Abed; C. Illoul; A. Anglo; L. Louedec; D. Letourneur; A. Meddahi-Pellé; M. M. Giraud-Guille; *Biomater.*; **2010**; 31; 481-490.
- [114] K. A. Piez; *Annu. Rev. Biochem.*; **1968**; 37; 547-570.
- [115] D. Eglin; K. L. Shafran; J. Livage; T. Coradin; C. C. Perry; *J. Mater. Chem.*; **2006**; 16; 4220-4230.
- [116] S. Weiner; H. D. Wagner; *Annu. Rev. Mater. Sci.*; **1998**; 28; 271-298.
- [117] H.-S. Yu; G.-Z. Jin; J.-E. Won; I. Wall; H.-W. Kim; *J. Biomed. Mater. Research A*; **2012**; 100A; 2431-2440.
- [118] B. Marelli; C. E. Ghezzi; J. E. Barralet; A. R. Boccaccini; S. N. Nazhat; *Biomacromolecules*; **2010**; 11; 1470-1479.
- [119] S. Heinemann; H. Ehrlich; T. Douglas; C. Heinemann; H. Worch; W. Schatton; T. Hanke; *Biomacromolecules*; **2007**; 8; 3452-3457.
- [120] M. M. Giraud Guille; C. Helary; S. Vigier; N. Nassif; *Soft Matter*; **2010**; 6; 4963-4967.
- [121] J. Glowacki; S. Mizuno; *Biopolymers*; **2007**; 89; 338-344.
- [122] E. E. Peacock Jr.; *J. Surgical Research*; **1967**; 7; 481-497.
- [123] S. Heinemann; C. Heinemann; H. Ehrlich; M. Meyer; H. Baltzer; H. Worch; T. Hanke; *Advan. Eng. Mater.*; **2007**; 9; 1061-1068.
- [124] I. Jacquemart; E. Pamula; V. M. De Cupere; P. G. Rouxhet; Ch. C. Dupont-Gillain; *J. Colloid Interface Sci.*; **2004**; 278; 63-70.
- [125] K. Beck; B. Brodsky; *J. Struct. Biol.*; **1998**; 122; 17-29.
- [126] S. Heinemann; C. Heinemann; R. Bernhardt; A. Reinstorf; B. Nies; M. Meyer; H. Worch; T. Hanke; *Acta Biomaterialia*; **2009**; 5; 1979-1990.
- [127] I. V. Yannas; *J. Macromol. Sci. – Revs. Macromol. Chem.*; **1972**; C7; 49-104.
- [128] P. M. Gallop; O. O. Blumenfeld; S. Seifter; *Annu. Rev. Biochem.*; **1972**; 41; 617-672.
- [129] E. Adams; *Science*; **1978**; 202; 591-598.
- [130] H. Mori; K. Shimizu; M. Hara; *Mater. Sci. Eng. C*; **2012**; 32; 2007-2016.
- [131] R. W. Green; K. P. Ang; L. C. Lam; *Biochem. J.*; **1953**; 54; 181-187.
- [132] K. Matmaroh; S. Benjakul; T. Prodpran; A. B. Encarnacion; H. Kishimura; *Food Chemistry*; **2011**; 129; 1179-1186.

- [133] D. Eglin; G. Mosser; M.-M. Giraud-Guille; J. Livage; T. Coradin; *Soft Matter*; **2005**; 1; 129-131.
- [134] K. J. C. van Bommel; A. Friggeri; S. Shinkai; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2003**; 42; 980-999.
- [135] D. Eglin; T. Coradin; M. M. Giraud-Guille; C. Hélarly; J. Livage; *Bio-Med. Mater. Eng.*; **2005**; 15; 43-50.
- [136] S. Heinemann; T. Coradin; H. Worch; H. P. Wiesmann; T. Hanke; *Comp.Sci. Techn.*; **2011**; 71; 1873-1880.
- [137] S. Heinemann; C. Heinemann; M. Jäger; J. Neunzehn; H. P. Wiesmann; T. Hanke; *ACS Appl. Mater. Interfaces*; **2011**; 3; 4323-4331.
- [138] S. Quignard; G. J. Copello; C. Aimé; I. Bataille; C. Hélarly; M. F. Desimone; T. Coradin; *Adv. Eng. Mater.*; **2012**; 14; B51-B55.
- [139] M. F. Desimone; C. Hélarly; G. Mosser; M.-M. Giraud-Guille; J. Livage; T. Coradin; *J. Mater. Chem.*; **2010**; 20; 666-668.
- [140] M. F. Desimone; C. Hélarly; S. Quignard; I. B. Rietveld; I. Bataille; G. J. Copello; G. Mosser; M.-M. Giraud-Guille; J. Livage; A. Meddahi-Pellé; T. Coradin; *ACS Appl. Mater. Interfaces*; **2011**; 3; 3831-3838.
- [141] M. F. Desimone; C. Hélarly; I. B. Rietveld; I. Bataille; G. Mosser; M.-M. Giraud-Guille; J. Livage; T. Coradin; *Acta Biomaterialia*; **2010**; 6; 3998-4004.
- [142] D. Eglin; S. Maalheem; J. Livage; T. Coradin; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*; **2006**; 17; 161-167.
- [143] S. Brunauer; P. Emmet; E. Teller; *J. Am. Chem. Soc.*; **1983**; 60; 306-319.
- [144] E. P. Barrett; L. G. Joyner; P. P. Halenda; *J. Am. Chem. Soc.*; **1951**; 73; 373-380.
- [145] L. Warren; *J. Bio. Chem.*; **1959**; 234; 1971-1975.
- [146] G. B. Paerels; J. Schut; *Biochem. J.*; **1965**; 96; 787-792.
- [147] S. Williams; *Immobilisierung von Polysialinsäure auf funktionalisierten Silica-Nanopartikeln*; Diplomarbeit; Leibniz Universität Hannover; **2009**.
- [148] G. Avigad; *Analyt. Biochem.*; **1983**; 134; 499-504.
- [149] R. G. Dickinson; N. W. Jacobsen; *Chem. Comm.*; **1970**; 1719-1720.
- [150] H. B. Hopps; *Aldrichimica*; **2000**; 33; 28-30.
- [151] T. Mosmann; *J. Imm. Meth.*; **1983**; 65; 55-63.
- [152] M. V. Berridge; A. S. Tan; *Archives Biochem. Biophys.*; **1993**; 303; 474-482.
- [153] T. F. Slater; B. Sawyer; U. Sträuli; *Biochim. Biophys. Acta*; **1963**; 77; 383-393.
- [154] S. Hamada; S. Fujita; *Histochem.*; **1983**; 79; 219-226.
- [155] K. Moriwaka; M. Yanagida; *J. Biochem.*; **1981**; 89; 693-696.
- [156] S. C. Huelsenbeck; A. Rohrbeck; A. Handreck; G. Hellmich; E. Kiaei; I. Roettinger; C. Grothe; I. Just; K. Haastert-Talini; *Neurotherapeutics*; **2012**; 9; 185-198.
- [157] I. Bice; *Optimierung der biosynthetischen Produktion von Polysialinsäure und Oligosialinsäure aus Escherichia coli K1*; Dissertation; Leibniz Universität Hannover; **2012**.

- [158] S. Berski; *Synthese von α -2,8-Polysialinsäure-Matrizen zur Herstellung von Implantatmaterialien für das Tissue Engineering*; Dissertation; Leibniz Universität Hannover; **2008**.
- [159] S. P. Chandran; S. Hotha; B. L. V. Prasad; *Current Science*; 2008; 9; 1327-1333.
- [160] Y. Zhou; S. Wang; Y. Xie; W. Guan; B. Ding; Z. Yang; X. Jiang; *Nanotechn.*; **2008**; 19; 1-5.
- [161] S. Ciampi; T. Böcking; K. A. Kilian; J. B. Harper; J. J. Gooding; *Langmuir*; **2008**; 24; 5888-5892.
- [162] E. F. Vansant; P. Van der Voort; K. C. Vrancken; *Characterisation and Chemical Modifications of Silica Surface*; Elsevier; Amsterdam/ Lausanne/ New York/ Oxford/ Shannon/ Tokyo; **1995**; 59-74.
- [163] M. Hesse; H. Meier; B. Zeeh; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Thieme; 6. Auflage; Stuttgart/New York; **2002**; 31-71.
- [164] B. Malvi; B. Sarkar; D. Pati; R. Mathew; T. Ajithkumar; S. Gupta; *J. Mater. Chem.*; **2009**; 19; 1409-1416.
- [165] E. E. Connor; J. Mwamuka; A. Gole; C. J. Murphy; M. D. Wyatt; *small*; **2005**; 1; 325-327.
- [166] S. Steinhaus; *Auf dem Weg zu neuartigen Biomaterialien für die Nervenregeneration: Immobilisierung von Polysialinsäure*; Dissertation; Leibniz Universität Hannover; **2009**.
- [167] C. J. García-Valdés; G. Hernández-Padón; M. V. García-Garduno; V. M. Castano; *e-Polymers*; **2009**; 72; 1-7.
- [168] T. M. Abdel-Fattah; S. M. S. Haggag; M. E. Mahmoud; *Chem. Eng. J.*; **2011**; 175; 117-123.
- [169] J. P. DeRocher; P. Mao; J. Y. Kim; J. Han; M. F. Rubner; R. E. Cohen; *ACS Appl. Mater. Interfaces*; **2012**; 4; 391-396.
- [170] D. I. Fried; A. Schlossbauer; T. Bein; *Microporous Mesoporous Mater.*; **2012**; 147; 5-9.
- [171] K. Gosh; H.-J. Lehmler; S. E. Rankin; B. L. Knutson; *J. Coll. Inter. Sci.*; **2012**; 367; 183-192.
- [172] Y. Hoshikawa; H. Yabe; A. Nomura; T. Yamaki; A. Shimojima; T. Okubo; *Chem. Mater.*; **2010**; 22; 12-14.
- [173] J.-S. Lim; K. Lee; J.-N. Choi; Y.-K. Hwang; M.-Y. Yun; H.-J. Kim; Y. S. Won; S.-J. Kim; H. Kwon; S. Huh; *Nanotechnol.*; **2012**; 23; 085101.
- [174] R. Mout; D. F. Moyano; S. Rana; V. M. Rotello; *Chem. Soc. Rev.*; **2012**; 41; 2539-2544.
- [175] K. Suzuki; K. Ikari; H. Imai; *J. Am. Chem. Soc.*; **2004**; 126; 462-463.
- [176] J. Chen; M. Liu; C. Chen; H. Gong; C. Gao; *ACS Appl. Mater. Interfaces*; **2011**; 3; 3215-3223.
- [177] Y. Kim; J. B. Jeon; J. Y. Chang; *J. Mater. Chem.*; **2012**; 22; 24075-24080.

- [178] M. Ghosh; L. M. Tuesta; R. Puentes; S. Patel; K. Melendez; A. El Maarouf; U. Rutishauser; D. D. Pearse; *GLIA*; **2012**; 60; 979-992.
- [179] S. Chen; A. Osaka; N. Hanagata; *J. Mater. Chem.*; **2011**; 21; 4332-4338.
- [180] H. Ehrlich; S. Heinemann; C. Heinemann; P. Simon; V. V. Bashenov; N. P. Shapkin; R. Born; K. R. Tabchnick; T. Hanke; H. Worch; *J. Nanomater.*; **2008**.
- [181] L. Niu; K. Jiao; Y. Qi; C. K. Y. Yiu; H. Ryou; D. D. Arola; J. Chen; L. Breschi; D. H. Pashley; F. R. Tay; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2011**; 50; 11688-11691.
- [182] X. Ye; Y. Zhou; Y. Sun; J. Chen; Z. Wang; *Appl. Surface Sci.*; **2008**; 254; 5975-5980.
- [183] W. J. Znidarsic; I.-W. Chen; V. P. Shastri; *J. Mater. Sci.*; **2009**; 44; 1374-1380.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Schematische Darstellung einer Nervenleitschiene.	2
Abb. 1-2:	Multifunktionell ausgestattete nanoporöse Silica-Nanopartikel.	3
Abb. 2-1:	Bildung der möglichen Regioisomere des 1,2,3-Triazols bei der Cycloaddition von terminalen Alkinen und Aziden nach HUISGEN. ^[nach 71]	11
Abb. 2-2:	Veranschaulichung der beiden möglichen Reaktionsbedingungen für die Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden nach HUISGEN. ^[nach 71]	12
Abb. 2-3:	Möglicher Reaktionsmechanismus für die Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition zwischen terminalen Alkinen und Aziden nach HUISGEN. ^[nach 78,82]	13
Abb. 2-4:	Veranschaulichung der Vorgänge bei der Fluoreszenz. Durch einstrahlendes Licht wird Energie absorbiert, die anschließend als strahlungslose Desaktivierung an die Umgebung abgegeben wird. Durch spontane Emission wird die restliche Energie als Fluoreszenz abgegeben. ^[nach 91]	15
Abb. 2-5:	Molekularer Aufbau des Neu5Ac (links) sowie der Polysialinsäure (rechts). ^[nach 27,101]	18
Abb. 2-6:	Sterische Mechanismen der Zell-Zell-Interaktionen am NCAM, die durch PolySia beeinflusst werden können. ^[nach 33,102]	20
Abb. 2-7:	Einfluss der PolySia auf die Aussprossung von Axonen in Hühner-Embryos. Dabei liegen die Axone in Anwesenheit von PolySia gewunden und ungebündelt vor (links), während nach der Entfernung der PolySia die Axone zusammengelagert sind (rechts). ^[nach 33,108]	20
Abb. 2-8:	Aufbau der Primärstruktur des Collagens, die aus einer Sequenz von Aminosäuren besteht. Dabei steht Gly für Glycin, Pro für Prolin und Hyp für Hydroxyprolin. Bei X und Y handelt es sich um weitere Aminosäuren, die in der Sequenz auftreten können. ^[nach 127]	22
Abb. 2-9:	Schematischer Aufbau der Sekundärstruktur des Collagens, bei dem die Aminosäuresequenzen eine linksgängige Helix (α -Kette) ausbilden. ^[nach 127]	22
Abb. 2-10:	Aufbau der dreifach-helikalen Struktur des Collagens aus drei Polypeptid-Ketten. Die rote Linie zeigt dabei die Primärstruktur der Aminosäuresequenz. ^[35]	23
Abb. 3-1:	Bildung des Pre-Chromogens durch saure Oxidation der Sialinsäure mit Periodat. ^[146]	32
Abb. 3-2:	Entstehung des Chromogens β -Formylpyruvinsäure durch Aldolspaltung zwischen dem vierten und fünften Kohlenstoffatom des Pre-Chromogens unter sauren Bedingungen. ^[146]	32
Abb. 3-3:	Reaktion des Chromogens β -Formylpyruvinsäure mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure zum Methinfarbstoff, der bei 549 nm detektiert werden kann. ^[146]	33
Abb. 3-4:	Reaktion des Purpald [®] -Reagenz mit Formaldehyd, wobei zunächst ein instabiles Intermediat gebildet wird, dass anschließend zu einem lilafarbenen Farbstoff oxidiert wird, der bei 550 nm detektiert werden kann. ^[149,150]	34

Abb. 3-5:	Reaktion des Purpald [®] -Reagenz mit einem Keton, wobei ein Intermediat gebildet wird, das unter den Reaktionsbedingungen nicht zu einem Farbstoff weiter oxidiert werden kann. ^[150]	34
Abb. 3-6:	Reduktion des gelblichen MTT durch mitochondriale Dehydrogenase aktiver Zellen in das Wasser unlösliche blaue Formazan, das bei 570 nm detektiert werden kann. ^[151,152]	38
Abb. 3-7:	Molekülstruktur von DAPI.	39
Abb. 3-8:	Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> -Nervenimplantation von funktionalisierten Silica-Nanopartikeln in einem Nerven, bei dem zuvor ein „Crush“ durchgeführt wurde. ^[nach 156]	40
Abb. 4-1:	Deacetylierung der von ISMET BICE hergestellten PolySia. ^[97,158]	44
Abb. 4-2:	Reaktion von APTES mit den Silanolgruppen an der Oberfläche von Silica-Nanopartikeln.	45
Abb. 4-3:	Anbindung von Bernsteinsäureanhydrid über die Aminofunktion der mit APTES funktionalisierten Silica-Nanopartikel.	45
Abb. 4-4:	Anbindung von TBA-PolySia über ein Linker-System aus APTES und BSA durch Bildung einer Amidbindung.	45
Abb. 4-5:	Reacetylierung der restlichen Aminogruppen der PolySia, die nicht mit den freien Carboxylgruppen des Linker-Systems reagiert haben, mit Essigsäureanhydrid.	46
Abb. 4-6:	Entfernung der Esterbindungen, zur Wiederherstellung der Polysialinsäure.	47
Abb. 4-7:	Molekülstruktur des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor [®] 488-Hydroxylamin.	47
Abb. 4-8:	Umsetzung der mit APTES-funktionalisierten Nanopartikel mit Propiolsäure, um die Oberfläche mit einer Alkinfunktion für die „Click“-Reaktion auszustatten.	48
Abb. 4-9:	Anbindung von BUTMS über die Silanolgruppen der Silica-Nanopartikel.	48
Abb. 4-10:	Azidfunktionalisierung über den BUTMS-Linker.	48
Abb. 4-11:	„Click“-Reaktionen mit Alkin- bzw. Azidfunktionalisierten Nanopartikeln, die mit der entgegengesetzten Gruppe unter Bildung eines 1,2,3-Triazols reagieren. Als Reste können PolySia oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.	49
Abb. 4-12:	Molekülstrukturen der mit Alkin-modifizierten PolySia (links, DG: 80%) und der mit Azid-modifizierten PolySia (rechts, DG: 80%), die in der „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.	49
Abb. 4-13:	Molekülstruktur der alkynyl-analogen PolySia, die in einer Kupfer-freien „Click“-Reaktion eingesetzt werden kann, wobei in dieser Arbeit Derivate mit n = 3 und n = 5 verwendet wurden.	50
Abb. 4-14:	Molekülstrukturen von Alexa Fluor [®] 488-Azid (links) und -Alkin (rechts).	51
Abb. 4-15:	Multifunktionalisierung der Silica-Nanopartikel mit BSA und Propiolsäure zur weiteren Verwendung in einer Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie.	52
Abb. 4-16:	Zusammenfassung der Optimierungsschritte bei der Multifunktionalisierung über eine Kombination aus Linker-System und „Click“-Chemie.	54
Abb. 4-17:	Zusammenfassung der Optimierungsschritte bei der Multifunktionalisierung ausschließlich über das Linker-System.	56
Abb. 5-1:	Diffraktogramme von einer as syn (schwarz), einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) Probe von Silica-Nanopartikeln des Typs MCM-41 mit Indizierung der Reflexe.	60

Abb. 5-2:	IR-Spektren von as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41.	61
Abb. 5-3:	REM-Aufnahmen einer as syn (links), einer extrahierten (Mitte) und einer calcinierten (rechts) Probe der MCM-41 Silica-Nanopartikel (REM-PCI).	63
Abb. 5-4:	REM-Aufnahmen von der stabilen Suspension (oben) einer MCM-41-Probe und den sich am Boden abgesetzten Nanopartikeln (unten, REM-PCI).	64
Abb. 5-5:	Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) Silica-Nanopartikel vom Typ MCM-41.	64
Abb. 5-6:	Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) MCM-41 Probe.	65
Abb. 5-7:	Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.	66
Abb. 5-8:	Diffraktogramme von einer as syn (schwarz), einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) Probe der CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C synthetisiert wurden.	67
Abb. 5-9:	IR-Spektren von as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C synthetisiert wurden.	68
Abb. 5-10:	REM-Aufnahmen von CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden (REM-PCI).	69
Abb. 5-11:	Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C synthetisiert wurden.	70
Abb. 5-12:	Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) CMS-Probe, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurde.	70
Abb. 5-13:	Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.	71
Abb. 5-14:	Vergleich der Ergebnisse des TBA-Tests, wenn dieser mit bzw. ohne Hydrolyse vergleichend an Nanopartikeln durchgeführt wurde, die über das Linker-System mit variierender Menge an APTES mit PolySia funktionalisiert wurden.	75
Abb. 5-15:	Vergleich der Ergebnisse des Purpald [®] -Tests, wenn dieser mit bzw. ohne Hydrolyse vergleichend an Nanopartikeln durchgeführt wurde, die über das Linker-System mit variierender Menge an APTES mit PolySia funktionalisiert wurden.	76
Abb. 5-16:	IR-Spektren der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, nach den einzelnen Reaktionsschritten des Linker-Systems.	79
Abb. 5-17:	Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mittels des Linker-Systems mit Polysialinsäure funktionalisiert wurden, nach jedem Reaktionsschritt.	81
Abb. 5-18:	REM-Aufnahmen von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Polysialinsäure über das Linker-System aus APTES und BSA funktionalisiert worden sind (REM-PCI).	81
Abb. 5-19:	Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die über das Linker-System mit Polysialinsäure modifiziert wurden. Die Sorptionsmessungen wurden nach jedem Schritt durchgeführt.	82

- Abb. 5-20: Ergebnisse des TBA-Tests an extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden (rechte Spalten) und an Nanopartikeln, die nur mit APTES und BSA modifiziert sind (linke Spalten). 83
- Abb. 5-21: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert und anschließend über verschiedene Zeiträume mit Wasser gewaschen wurden. 84
- Abb. 5-22: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert und anschließend über verschiedene Zeiträume mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurden. 84
- Abb. 5-23: Ergebnisse der Umsetzung von unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln (linke Spalte), von extrahierten mit PolySia-beschichteten MCM-41-Nanopartikeln (mittlere Spalte) und von calcinierten mit PolySia-modifizierten MCM-41-Nanopartikeln (rechte Spalte) mit Endo-APC. In der oberen Reihe sind die Aufnahmen unter Weißlicht zu sehen, während in der unteren Reihe die Aufnahmen bei 690 nm abgebildet sind. 85
- Abb. 5-24: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln. 86
- Abb. 5-25: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES und BSA-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln. 87
- Abb. 5-26: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden. 87
- Abb. 5-27: Ergebnisse des MTT-Tests mit immortalisierten Schwann-Zellen (ISC) nach zwei Wochen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden. 88
- Abb. 5-28: DAPI Färbungen der Zellkulturexperimente mit ISC-Zellen von reinem Medium (rechts) sowie extrahierten (links) und calcinierten (Mitte) MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System funktionalisiert wurden. Diese wurden mit einer Konzentration von 500 ppm an Tag 4 (oben), Tag 7 (Mitte) und Tag 14 (unten) getestet. 89
- Abb. 5-29: IR-Spektren der calcinierten CMS-Nanopartikel, nach den einzelnen Reaktionsschritten des Linker-Systems. 90
- Abb. 5-30: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten CMS-Nanopartikel, die mittels des Linker-Systems mit Polysialinsäure funktionalisiert wurden. 92
- Abb. 5-31: Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten CMS-Nanopartikel, die über das Linker-System mit Polysialinsäure modifiziert wurden. 93
- Abb. 5-32: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden. Dabei wurde nach jedem Funktionalisierungsschritt ein TBA-Test durchgeführt. 93
- Abb. 5-33: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA funktionalisiert wurden. 94
- Abb. 5-34: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden. 95
- Abb. 5-35: REM-Aufnahmen im „low vacuum-Modus“ von Nervenlängsschnitten, in denen calcinierte mit PolySia-immobilisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-ACI). 95

- Abb. 5-36: REM-Aufnahmen im Hochvakuum von Nervenquerschnitten, in denen calcinierte mit PolySia-immobilisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-PCI). 96
- Abb. 5-37: IR-Spektren der calcinierten CMS-Nanopartikel, nach der Umsetzung mit PolySia, nach der Reacetylierung sowie nach der weiteren Umsetzung mit Natronlauge. 97
- Abb. 5-38: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Umsetzung mit PolySia, nach der Reacetylierung und nach weiterer Umsetzung mit Natronlauge. 98
- Abb. 5-39: IR-Spektren der mit APTES-funktionalisierten calcinierten CMS-Nanopartikel nach der Umsetzung mit BSA (unten) und nach weiterer Umsetzung mit Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin. 101
- Abb. 5-40: Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren der mit Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin funktionalisierten calcinierten CMS-Nanopartikel unter Verwendung einer Konzentration von $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 102
- Abb. 5-41: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden. 103
- Abb. 5-42: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln nach der Reaktion mit Propiolsäure (unten) sowie nach weiterer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia. 104
- Abb. 5-43: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Alkinfunktion ausgestattet und anschließend mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden. 106
- Abb. 5-44: REM-Aufnahmen von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter Polysialinsäure in einer „Click“-Reaktion mit Alkinfunktionalisierten Nanopartikeln eingesetzt wurden (REM-PCI). 107
- Abb. 5-45: Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit Propiolsäure und anschließend in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia umgesetzt wurden. 108
- Abb. 5-46: Vergleich der Ergebnisse der TBA-Tests, die an extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41-Nanopartikel durchgeführt wurden. Die Nanopartikel wurden zum einen über das Linker-System (linke Spalten) und zum anderen über die „Click“-Chemie mit Azid-modifizierter PolySia (rechte Spalte) funktionalisiert. 108
- Abb. 5-47: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES und Propiolsäure-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln. 109
- Abb. 5-48: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden. 110
- Abb. 5-49: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden. 110
- Abb. 5-50: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln nach der Anbindung von BUTMS, nach weiterer Reaktion mit Natriumazid sowie nach der „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia. 112
- Abb. 5-51: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit BUTMS, Azid und mittels „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia funktionalisiert wurden. 114

- Abb. 5-52: Vergleich der Porenvolumen, die mit der BJH-Methode bestimmt wurden, der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit BUTMS, Natriumazid und anschließend in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzt wurden. 115
- Abb. 5-53: Vergleich der Ergebnisse der TBA-Tests, die an extrahierten (rot) und calcinierten (blau) MCM-41-Nanopartikel durchgeführt wurden. Die Nanopartikel wurden zum einen über das Linker-System (linke Spalten) und zum anderen über die „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia (rechte Spalte) funktionalisiert. 116
- Abb. 5-54: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit BUTMS-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln. 116
- Abb. 5-55: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit BUTMS und Azid-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln. 117
- Abb. 5-56: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alkin-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden. 118
- Abb. 5-57: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an extrahierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alkin-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden. 118
- Abb. 5-58: IR-Spektren von calcinierten CMS Nanopartikeln vor und nach der Kupfer-freien „Click“-Reaktion mit der fünfkettigen alkynyl-analogen PolySia. 119
- Abb. 5-59: Vergleich der Ergebnisse der TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die in einer Kupfer-freien „Click“-Reaktion mit alkynyl-analoger PolySia umgesetzt wurden. 120
- Abb. 5-60: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln vor und nach der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Azid. 121
- Abb. 5-61: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Alkinfunktion ausgestattet und anschließend mit Alexa Fluor® 488-Azid in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden. 122
- Abb. 5-62: Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren der mit Alexa Fluor® 488-Azid funktionalisierten MCM-41-Nanopartikel unter Verwendung einer Konzentration von $1.6 \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 122
- Abb. 5-63: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von extrahierten (links) und calcinierten (rechts) MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Azid in einer „Click“-Reaktion funktionalisiert wurden. 123
- Abb. 5-64: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Azid in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden. 124
- Abb. 5-65: IR-Spektren von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln vor und nach der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor® 488-Alkin. 125
- Abb. 5-66: Vergleich der DLS-Messungen der calcinierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Azidfunktion ausgestattet und anschließend mit Alexa Fluor® 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden. 126
- Abb. 5-67: Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren der mit Alexa Fluor® 488-Alkin funktionalisierten MCM-41-Nanopartikel unter Verwendung einer Konzentration von $1.45 \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 126
- Abb. 5-68: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von extrahierten (links) und calcinierten (rechts) MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion funktionalisiert wurden. 127
- Abb. 5-69: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor® 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden. 127

- Abb. 5-70: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit BSA und Propiolsäure in DCM in einem Schritt multifunktionalisiert wurden. 131
- Abb. 5-71: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit BSA und Propiolsäure zum einen in DMF (links) und zum anderen in einem Gemisch aus DCM und DMF (rechts) in einem Schritt multifunktionalisiert wurden. 131
- Abb. 5-72: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die zum einen zunächst mit Propiolsäure und anschließend mit BSA (links) und zum anderen erst mit BSA und anschließend mit Propiolsäure (rechts) multifunktionalisiert wurden. 132
- Abb. 5-73: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln mit Propiolsäure und BSA (unten) sowie nach weiterer Umsetzung mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid mittels des Linker-Systems und der „Click“-Chemie. 133
- Abb. 5-74: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step, Variante D: erst PolySia (Schritt 1), in zweiter Reaktion Alexa (Schritt 2), Variante E: erst Alexa, in zweiter Reaktion PolySia). 135
- Abb. 5-75: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step, Variante D: erst PolySia, in zweiter Reaktion Alexa, Variante E: erst Alexa (Schritt 1), in zweiter Reaktion PolySia (Schritt 2)). 136
- Abb. 5-76: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step, Variante D: erst PolySia, in zweiter Reaktion Alexa, Variante E: erst Alexa (E1), in zweiter Reaktion PolySia (E2)). 137
- Abb. 5-77: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von BSA und Propiolsäure, wenn im ersten Schritt verschiedene Mengen an APTES verwendet wurden. 138
- Abb. 5-78: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid, wenn im ersten Schritt verschiedene Mengen an APTES eingesetzt wurden. 139
- Abb. 5-79: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an APTES im ersten Schritt. 140
- Abb. 5-80: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an APTES im ersten Schritt variiert wurde. 140
- Abb. 5-81: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von BSA und Propiolsäure, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an BSA verwendet wurden. 141
- Abb. 5-82: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an BSA eingesetzt wurden. 143

- Abb. 5-83: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an BSA im zweiten Schritt. 144
- Abb. 5-84: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an BSA im zweiten Schritt variiert wurde. 144
- Abb. 5-85: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von BSA und Propiolsäure, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an Propiolsäure verwendet wurden. 145
- Abb. 5-86: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor® 488-Azid, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an Propiolsäure eingesetzt wurden. 146
- Abb. 5-87: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an Propiolsäure im zweiten Schritt. 147
- Abb. 5-88: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an Propiolsäure im zweiten Schritt variiert wurde. 148
- Abb. 5-89: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an PolySia im letzten Reaktionsschritt. 149
- Abb. 5-90: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an PolySia im letzten Schritt variiert wurde. 149
- Abb. 5-91: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Variation der Menge an Alexa Fluor® 488-Azid im letzten Reaktionsschritt. 150
- Abb. 5-92: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die eingesetzte Menge an Alexa Fluor® 488-Azid im letzten Schritt variiert wurde. 151
- Abb. 5-93: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Verwendung von Dichlormethan bzw. Ethanol als Lösemittel. 152
- Abb. 5-94: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei Dichlormethan bzw. Ethanol als Lösemittel verwendet wurden. 152
- Abb. 5-95: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden bei Verwendung und beim Verzicht auf Kupfer. 153
- Abb. 5-96: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System und der „Click“-Chemie mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei zum einen Kupfer als Katalysator eingesetzt wurde und zum anderen auf den Einsatz verzichtet wurde. 154

- Abb. 5-97: IR-Spektren von Silica-Nanopartikeln nach der multifunktionellen Anbindung von Alkin-modifizierter PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Alkin mittels der „Click“-Chemie. 155
- Abb. 5-98: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Nanopartikeln, die über die „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia sowie Alexa Fluor[®] 488-Alkin multifunktionalisiert wurden. 156
- Abb. 5-99: Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren von Silica-Nanopartikeln, die nur über die „Click“-Chemie mit PolySia sowie Alexa Fluor[®] 488-Alkin multifunktionalisiert wurden. 156
- Abb. 5-100: Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen von Silica-Nanopartikeln, die mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Alkin über die „Click“-Chemie multifunktionalisiert wurden (Links: 2 s Belichtung; Rechts: 640 ms Belichtung). 157
- Abb. 5-101: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit BSA (unten) sowie mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin über das Linker-System funktionalisiert wurden. 158
- Abb. 5-102: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step). 159
- Abb. 5-103: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden. Dabei wurde die Reihenfolge der Zugabe variiert (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa, Variante B: 24 h Alexa + 48 h Alexa/PolySia, Variante C: one step). 160
- Abb. 5-104: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin, wenn im ersten Schritt verschiedene Mengen an APTES eingesetzt wurden. 161
- Abb. 5-105: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an APTES im ersten Reaktionsschritt variiert wurde. 162
- Abb. 5-106: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an APTES im ersten Reaktionsschritt verändert wurde. 162
- Abb. 5-107: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen an BSA modifiziert wurden. 163
- Abb. 5-108: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin, wenn im zweiten Schritt verschiedene Mengen an BSA eingesetzt wurden. 164
- Abb. 5-109: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an BSA im zweiten Reaktionsschritt variiert wurde. 165
- Abb. 5-110: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an BSA im zweiten Reaktionsschritt verändert wurde. 165
- Abb. 5-111: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an PolySia im letzten Reaktionsschritt variiert wurde. 166

- Abb. 5-112: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an PolySia im letzten Reaktionsschritt verändert wurde. 167
- Abb. 5-113: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten CMS-Nanopartikeln, die allein über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin im letzten Reaktionsschritt variiert wurde. 167
- Abb. 5-114: Fluoreszenz-Emissionsspektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia sowie Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden, wobei die Menge an Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin im letzten Reaktionsschritt verändert wurde. 168
- Abb. 5-115: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin multifunktionalisierten CMS-Nanopartikeln (Variante A: 24 h PolySia + 24 h PolySia/Alexa). 169
- Abb. 5-116: Ergebnisse des MTT-Tests mit ISC-Zellen nach 5 Tagen an mit PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin multifunktionalisierten CMS-Nanopartikeln. 169
- Abb. 5-117: Färbungen mit EndosialidaseN-APC von Nervenlängsschnitten, in die CMS-Nanopartikel injiziert wurden, die mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden (Links: EndoN-APC Färbung, Mitte: Fluoreszenz, Rechts: EndoN-APC und Fluoreszenz überlagert). 170
- Abb. 5-118: Färbungen mit PolySia-Antikörper von Nervenlängsschnitten, in die CMS-Nanopartikel injiziert wurden, die mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisiert wurden (Links: PolySia-Antikörper Färbung, Mitte: Fluoreszenz, Rechts: PolySia-Antikörper und Fluoreszenz überlagert). 171
- Abb. 5-119: REM-Aufnahmen im „low vacuum-Modus“ von Nervenquerschnitten, in denen calcinierte mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff multifunktionalisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-ACI). 171
- Abb. 5-120: REM-Aufnahmen im Hochvakuum von Nervenquerschnitten, in denen calcinierte mit PolySia und Fluoreszenzfarbstoff-multifunktionalisierte CMS-Nanopartikel injiziert wurden (REM-PCI). 172
- Abb. 5-121: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, reinem Collagen, mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen sowie infiltriertem Collagen nach der Quervernetzung mit Glutaraldehyd. 176
- Abb. 5-122: Bilder von Collagen-Silica-Kompositen, die zu Röhren geformt wurden. 178
- Abb. 5-123: REM-Aufnahmen von reinem MatriStypt[®] (oben), mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen (Mitte) und infiltriertes Collagen nach der Quervernetzung mit Glutaraldehyd (unten) (REM-PCI). 179
- Abb. 5-124: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen im Querschnitt (REM-PCI). 180
- Abb. 5-125: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, die in Ethanol hergestellt wurden (REM-PCI). 180
- Abb. 5-126: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das in einem Wasserbad mit Ultraschall für eine halbe Stunde behandelt wurde (REM-PCI). 181
- Abb. 5-127: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das für 24 Stunden in Wasser gelagert wurde (REM-PCI). 181
- Abb. 5-128: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das für 48 Stunden (oben) bzw. 72 Stunden (unten) in Wasser gelagert wurde (REM-ACI). 182

- Abb. 5-129: Ergebnisse des statischen sowie dynamischen MTT-Tests mit HepG2-Zellen an MatriStypt[®], infiltriertem Collagen sowie zusätzlich quervernetztem Collagen-Silica-Komposit-Material. 182
- Abb. 5-130: DAPI Färbungen der dynamischen Zellkulturexperimente mit HepG2-Zellen von reinem Collagen (links) sowie mit calcinierten CMS-Nanopartikeln infiltrierten Collagen (rechts). 183
- Abb. 5-131: IR-Spektren von infiltriertem Collagen (unten) sowie infiltriertem und anschließend quervernetztem Collagen (oben) nach der Umsetzung mit BUTMS. 184
- Abb. 5-132: IR-Spektren von infiltriertem Collagen, das mit APTES (unten), anschließend mit BSA (Mitte) und zuletzt mit PolySia (oben) modifiziert wurde. 185
- Abb. 5-133: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das anschließend mit APTES modifiziert wurde (REM-ACI). 186
- Abb. 5-134: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, das anschließend mit APTES und BSA modifiziert wurde (REM-ACI). 187
- Abb. 5-135: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen, an das PolySia über das Linker-System gebunden wurde (REM-ACI). 187
- Abb. 5-136: Ergebnisse des TBA-Tests an verschiedenen Collagen-Membranen, die unterschiedlich behandelt wurden. 188
- Abb. 5-137: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Collagen-Membranen, die mit PolySia immobilisiert wurden, wobei die Menge an APTES im ersten Schritt verändert wurde. 188
- Abb. 5-138: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Collagen-Membranen, die mit PolySia immobilisiert wurden, wobei die Menge an BSA im zweiten Schritt verändert wurde. 189
- Abb. 5-139: Ergebnisse des TBA-Tests an Silica-Collagen-Membranen, die mit PolySia immobilisiert wurden, wobei die Menge an PolySia im letzten Schritt verändert wurde. 190
- Abb. 5-140: IR-Spektren von reinem MatriStypt[®], Collagen, das mit PolySia-modifizierten Nanopartikeln infiltriert wurde und CMS-Nanopartikel, die mit PolySia funktionalisiert wurden. 190
- Abb. 5-141: REM-Aufnahmen von Collagen-Membranen, die mit PolySia-beschichteten CMS-Nanopartikeln infiltriert wurden (REM-ACI). 191
- Abb. 5-142: Ergebnisse des TBA-Tests an Collagen-Membranen, die in verschiedenen Lösemitteln mit PolySia-modifizierten Nanopartikeln infiltriert wurden (μg PolySia pro Gramm CMS-Collagen), sowie von den eingesetzten CMS-Nanopartikeln (μg PolySia pro Gramm CMS). 192
- Abb. 5-143: Ergebnisse des TBA-Tests an Collagen-Membranen, bei denen verschiedene Mengen an CMS-Nanopartikeln zur Infiltrierung dispergiert wurden. 193
- Abb. 5-144: Ergebnisse des TBA-Tests an Collagen-Membranen, bei denen die Dauer der Infiltrierung verändert wurde. 193

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 5-1:	Berechnung der Gitterkonstante der as syn, extrahierten und calcinierten Probe des MCM-41 aus den Röntgenpulverdaten.	61
Tab. 5-2:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-2 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	62
Tab. 5-3:	Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an unfunktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.	63
Tab. 5-4:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-9 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	68
Tab. 5-5:	Massenverluste sowie Restmassen der thermogravimetrischen Messungen an unfunktionalisierten CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C synthetisiert wurden.	69
Tab. 5-6:	Zusammenfassung und Vergleich der Nanopartikelgröße der synthetisierten MCM-41 und CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.	72
Tab. 5-7:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-16 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	79
Tab. 5-8:	Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.	80
Tab. 5-9:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-29 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	91
Tab. 5-10:	Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen der calcinierten CMS-Nanopartikel, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.	91
Tab. 5-11:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-37 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	97
Tab. 5-12:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-39 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	102
Tab. 5-13:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-42 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	105
Tab. 5-14:	Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia umgesetzt wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.	106
Tab. 5-15:	Kupferkonzentrationen, die mittels AAS bestimmt wurden, der MCM-41-Nanopartikel, die in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden sowie die dazugehörige Viabilität der HepG2-Zellen aus den Zellkulturexperimenten, wenn die Nanopartikel in einer Konzentration von 1000 ppm zur Kultivierung gegeben wurden.	111
Tab. 5-16:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-50 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	113
Tab. 5-17:	Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzt wurden. Nach jedem Reaktionsschritt wurde eine thermogravimetrische Analyse durchgeführt.	113
Tab. 5-18:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-58 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	119

Tab. 5-19:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-60 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	121
Tab. 5-20:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-65 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	125
Tab. 5-21:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren nach der Multifunktionalisierung aus Abb. 5-70 und 5-71 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	132
Tab. 5-22:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-73 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	134
Tab. 5-23:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-77 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	138
Tab. 5-24:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-78 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	139
Tab. 5-25:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-81 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	142
Tab. 5-26:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-82 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	143
Tab. 5-27:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-85 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	146
Tab. 5-28:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-86 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	147
Tab. 5-29:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-97 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	155
Tab. 5-30:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-101 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	158
Tab. 5-31:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-104 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	161
Tab. 5-32:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-107 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	163
Tab. 5-33:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-108 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	164
Tab. 5-34:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-121 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	177
Tab. 5-35:	Massenverluste sowie Restmassen der TG-Messungen an MatriStypt [®] , mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen und anschließend quervernetzte Collagen-Silica-Komposite.	178
Tab. 5-36:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-131 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	185
Tab. 5-37:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-132 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	186
Tab. 5-38:	Vergleichende Zuordnung der Banden der IR-Spektren aus Abb. 5-140 (Wellenzahlen ν/cm^{-1}).	191

8.3 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle	Reinheitsgrad
Alexa Fluor [®] 488-Alkin/Azid/Hydroxylamin	Invitrogen	-
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma- Aldrich	99 %
11-Bromoundecyltrimethoxysilan	ABCR	95 %
Bernsteinsäureanhydrid	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
Cetyltrimethylammoniumbromid	Fluka	purum; ~98 %
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	Fluka	puriss. ≥ 99 %
Diethylamin	Sigma-Aldrich	puriss. p.a.
Dichlormethan	Fluka	puriss. p.a.
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich	puriss. ≥ 99 %
Ethanol, mit Methylketon vergällt	Sigma-Aldrich	absolut
Flusssäure	Sigma-Aldrich	50 %
Glutaraldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich	25 % in H ₂ O
Kupfersulfatpentahydrat	Riedel-de Haën	puriss. p.a.
MatriStypt [®]	medskin solutions Dr. Suwelack	-
<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma-Aldrich	99 %
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Sigma-Aldrich	99 %
Natriumazid	Riedel-de Haën	≥ 99 %
Natriumascorbat	Fluka	≥ 99 %
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	
Natriumhydroxid-Plätzchen	AppliChem	p.a.
Natrium(meta)arsenid	Fluka	purum p.a.; ≥ 99 %
Natriumsulfat	Riedel-de Haën	-
PBS	Sigma-Aldrich	-
Periodsäure	Riedel-de Haën	purum
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich	≥ 85 Gew.-% Lsg in Wasser
Propiolsäure	Sigma-Aldrich	96 %
Purpald [®]	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
Salpetersäure	Sigma-Aldrich	68 %
Salzsäure (konz., min. 37%)	Riedel-de Haën	puriss. p.a.
Sipernat [®] 500 LS	Evonic Industries	-
Tetrabutylammoniumbromid	Sigma-Aldrich	purum; ≥ 98 %
Tetrabutylammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich	puriss.
Tetraethoxysilan	Fluka	purum; ≥ 98 %
Thiobarbitursäure	Fluka	-
Toluol, wasserfrei	Sigma-Aldrich	99.8 %
Triethylamin	Sigma-Aldrich	≥ 99 %

8.4 Nanopartikelsuspensionen für Zellkulturexperimente

Tab. 8-1: Gehalt an dispergierten Silica-Nanopartikeln vom Typ MCM-41 in 1.5 mL Wasser, um stabile Suspensionen für Zellkulturexperimente zu erhalten.

Funktionalisierung der Probe	Gehalt an NPSNPs / mg		
	as synthesized	extracted	calcined
unfunktionalisiert	163	122	117
mit DMF gewaschen	-	127	-
APTES	-	107	128
DMF gewaschen + APTES	-	138	-
Bernsteinsäureanhydrid	-	153	105
Bernsteinsäureanhydrid (ohne APTES)	-	145	125
deacetylierte TBA-PolySia	-	107	99
Propiolsäure	-	143	134
Azid-modifizierte PolySia	-	131	117
Alexa Fluor [®] 488-Azid	-	138	149
BUTMS	-	86	95
Azid	-	142	130
Alkin-modifizierte PolySia	-	130	142
Alexa Fluor [®] 488-Alkin	-	94	125

Tab. 8-2: Gehalt an dispergierten unfunktionalisierten Silica-Nanopartikeln vom Typ CMS in 1.5 mL Wasser, um stabile Suspensionen für Zellkulturexperimente zu erhalten.

Probe	Gehalt an NPSNPs / mg		
	as synthesized	extracted	calcined
DEA, 60 °C	131	146	134
DEA, 40 °C	102	152	144
TEA, 60 °C	81	103	148
TEA, 40 °C	105	91	139

Tab. 8-3: Gehalt an dispergierten calcinierten CMS-Nanopartikeln (DEA, 40 °C) in 1mL PBS, um stabile Suspensionen für Zellkulturexperimente zu erhalten.

Funktionalisierung der Probe	Gehalt an NPSNPs / mg
deacetylierte TBA-PolySia	98
Alexa Fluor [®] 488-Hydroxylamin	47
PolySia/Alexa - Linker/Click (Standardbedingungen)	97
PolySia/Alexa - Linker (Standardbedingungen)	99
PolySia/Alexa - Linker (0 µL APTES)	94
PolySia/Alexa - Linker (3 g BSA)	95
PolySia/Alexa - Linker (125 µL Alexa)	79
PolySia/Alexa - Linker (350 mg PolySia)	99

8.5 IR-Daten

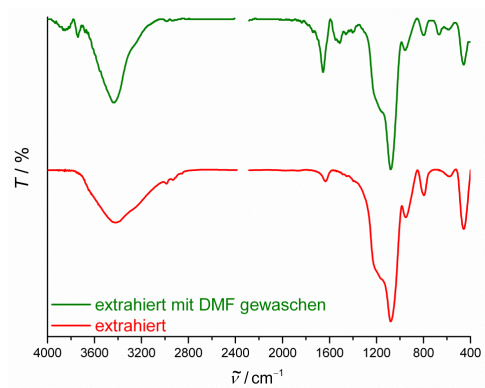


Abb. 8-1: IR-Spektren von extrahierten (rot) und extrahierten sowie mit DMF gewaschenen (grün) MCM-41-Nanopartikel.

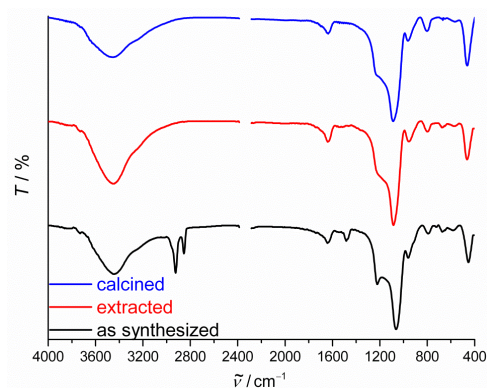


Abb. 8-4: IR-Spektren von as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 40 °C synthetisiert wurden.

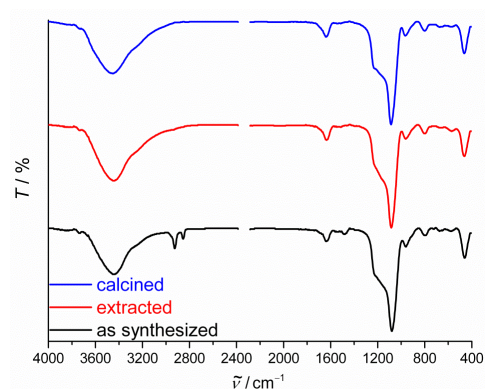


Abb. 8-2: IR-Spektren von as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 60 °C synthetisiert wurden.

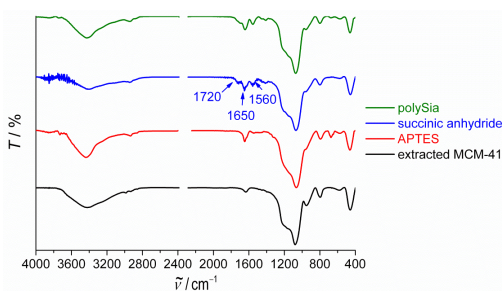


Abb. 8-5: IR-Spektren der extrahierten MCM-41-Nanopartikel, nach den einzelnen Reaktionsschritten des Linker-Systems.

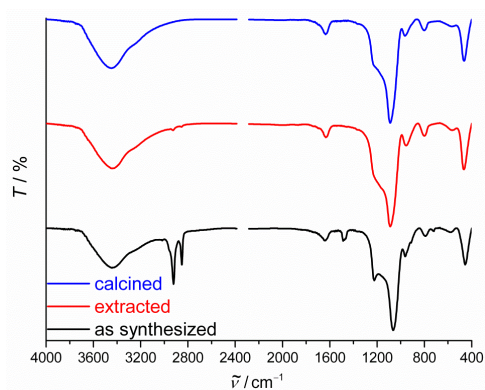


Abb. 8-3: IR-Spektren von as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 60 °C synthetisiert wurden.

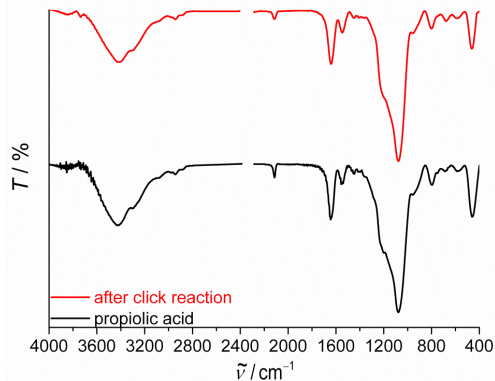


Abb. 8-6: IR-Spektren von extrahierten MCM-41-Nanopartikeln nach der Reaktion mit Propionsäure (unten) sowie nach weiterer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia.

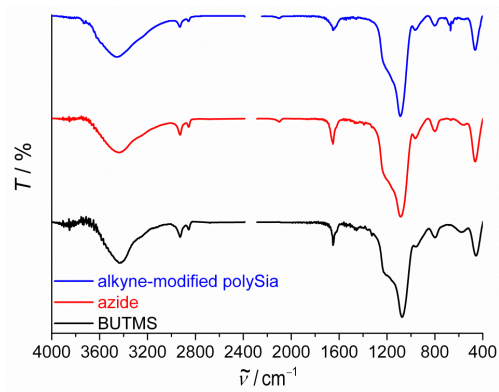


Abb. 8-7: IR-Spektren von extrahierten MCM-41-Nanopartikeln nach der Anbindung von BUTMS, nach weiterer Reaktion mit Natriumazid sowie nach der „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia.

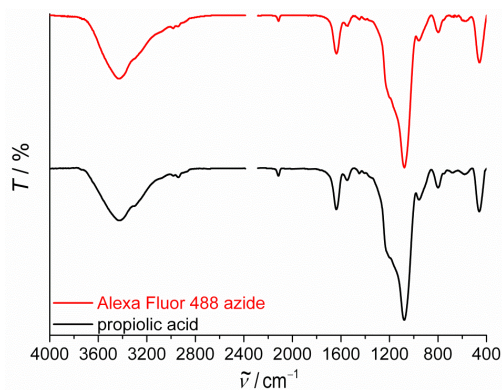


Abb. 8-8: IR-Spektren von extrahierten MCM-41-Nanopartikeln vor und nach der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor[®] 488-Azid.

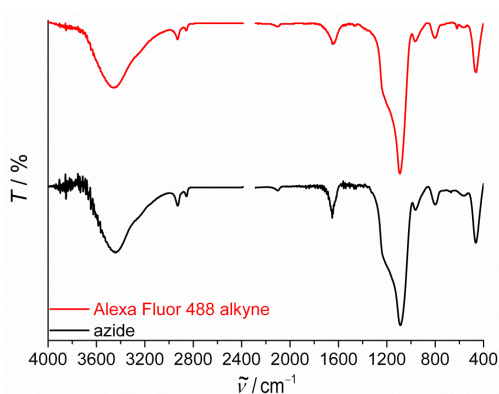


Abb. 8-9: IR-Spektren von extrahierten MCM-41-Nanopartikeln vor und nach der „Click“-Reaktion mit Alexa Fluor[®] 488-Alkin.

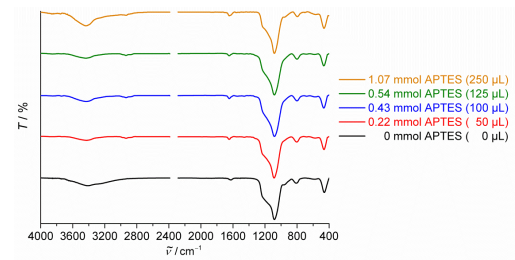


Abb. 8-10: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen an APTES modifiziert wurden.

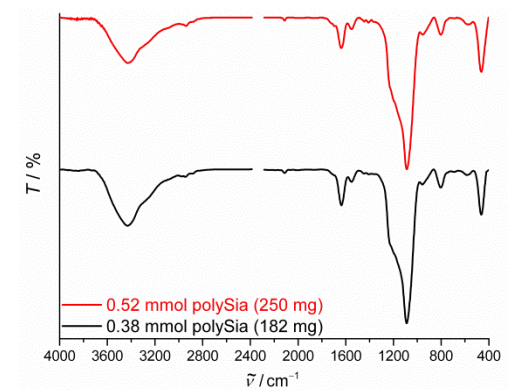


Abb. 8-11: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid, wenn im dritten Schritt verschiedene Mengen an PolySia verwendet wurden.

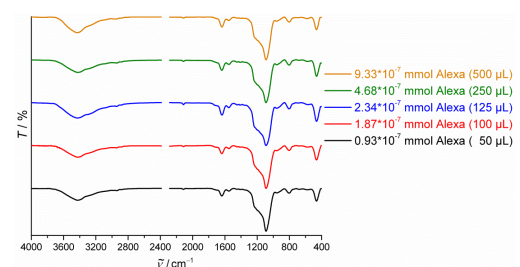


Abb. 8-12: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid, wenn im dritten Schritt verschiedene Mengen an Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurden.

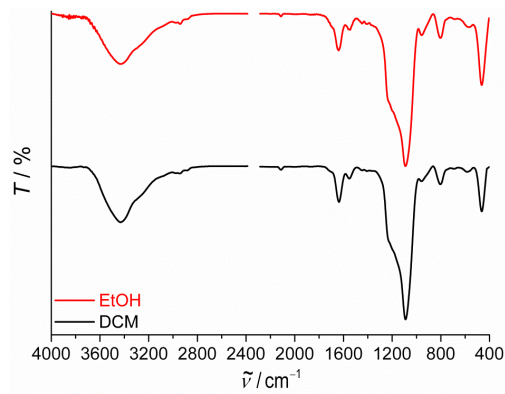


Abb. 8-13: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid, wenn im dritten Schritt Dichlormethan (unten) bzw. Ethanol (oben) als Lösemittel verwendet wurde.

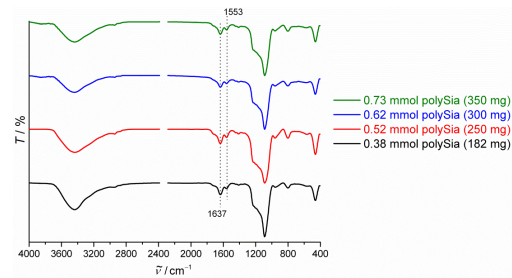


Abb. 8-16: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin, wenn im dritten Schritt verschiedene Mengen an PolySia verwendet wurden.

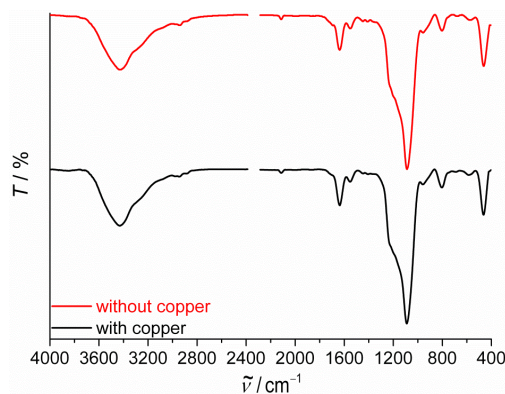


Abb. 8-14: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Azid, zum einen unter Verwendung von Kupfer als Katalysator und zum anderen unter Verzicht auf Kupfer.

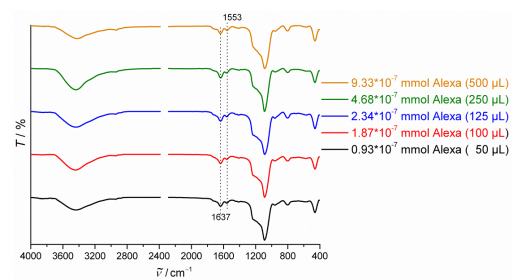


Abb. 8-17: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln nach der Anbindung von PolySia und Alexa Fluor[®] 488-Hydroxylamin, wenn im dritten Schritt verschiedene Mengen an Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurden.

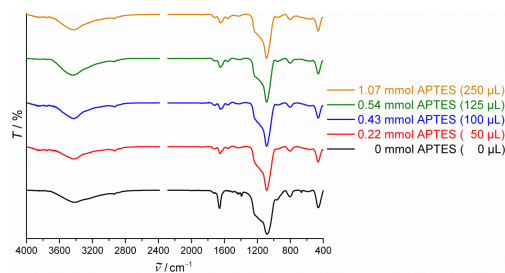


Abb. 8-15: IR-Spektren von calcinierten CMS-Nanopartikeln, nach der Modifizierung mit BSA, wenn im ersten Reaktionsschritt unterschiedliche Mengen an APTES eingesetzt wurden.

8.6 Thiobarbitursäure- und Purpald®-Test

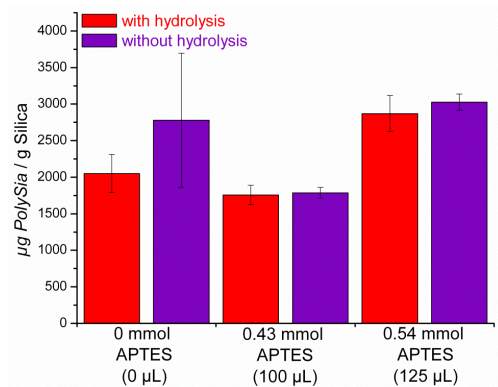


Abb. 8-18: Vergleich der Ergebnisse des TBA-Tests, wenn dieser mit bzw. ohne Hydrolyse vergleichend an Nanopartikeln durchgeführt wurde, die über das Linker-System mit variierender Menge an APTES mit PolySia funktionalisiert wurden.

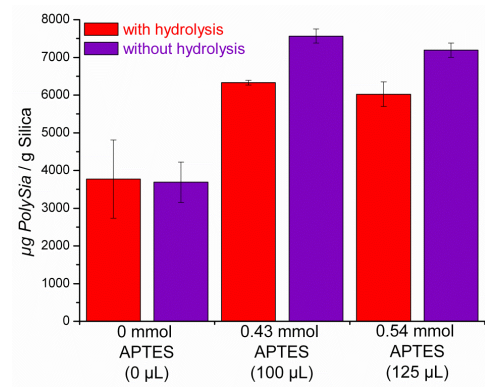


Abb. 8-19: Vergleich der Ergebnisse des Purpald®-Tests, wenn dieser mit bzw. ohne Hydrolyse vergleichend an Nanopartikeln durchgeführt wurde, die über das Linker-System mit variierender Menge an APTES mit PolySia funktionalisiert wurden.

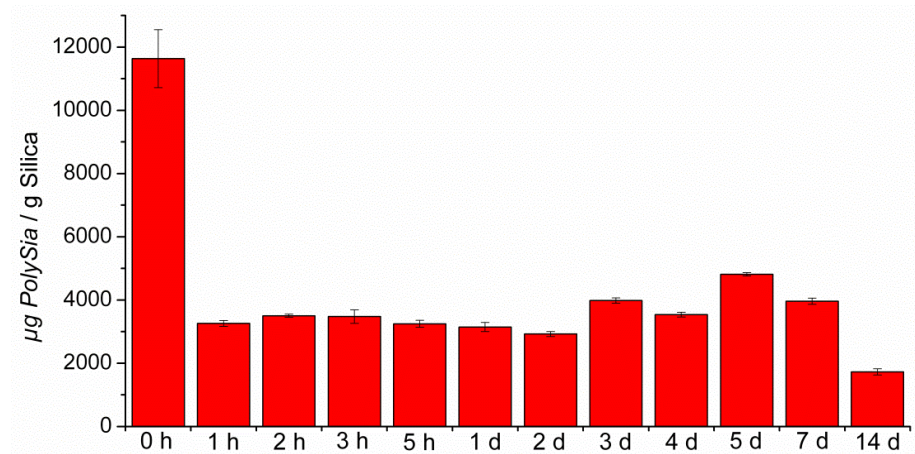


Abb. 8-20: Ergebnisse des TBA-Tests an calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert und anschließend über verschiedene Zeiträume mit PBS gewaschen wurden.

8.7 REM-Aufnahmen

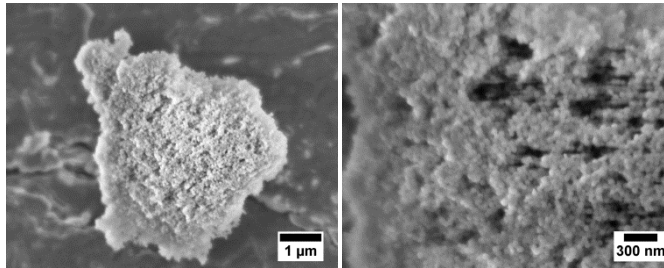


Abb. 8-21: REM-Aufnahmen einer extrahierten MCM-41-Probe, die nach der Extraktion mit DMF gewaschen wurde (REM-PCI).

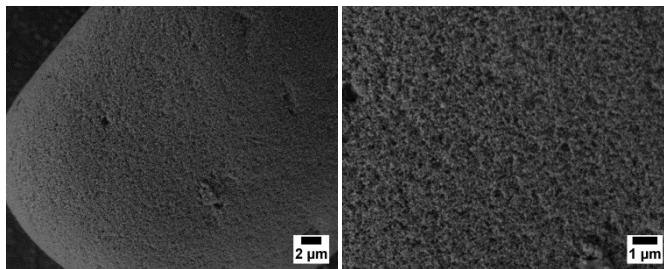


Abb. 8-22: REM-Aufnahmen vom Bodensatz einer MCM-41-Probe (REM-PCI).

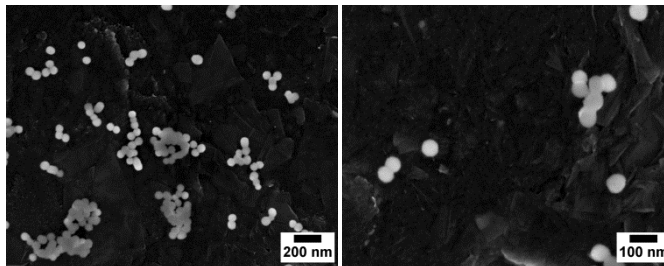


Abb. 8-23: REM-Aufnahmen von CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 60 °C hergestellt wurden (REM-PCI).

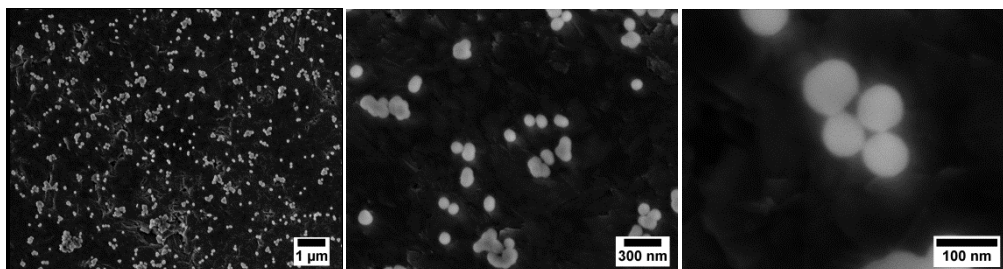


Abb. 8-24: REM-Aufnahmen von CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 40 °C hergestellt wurden (REM-PCI).

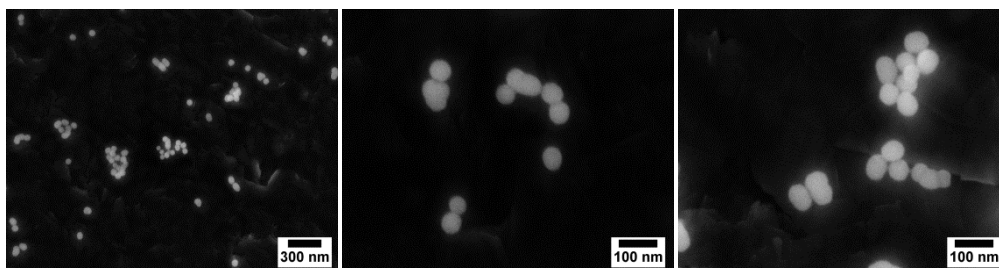


Abb. 8-25: REM-Aufnahmen von CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 60 °C hergestellt wurden (REM-PCI).

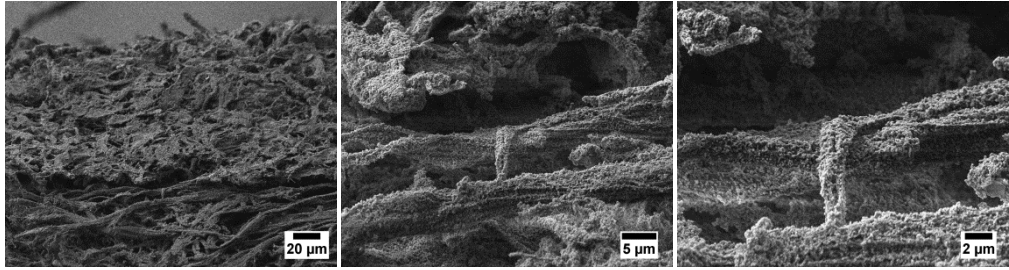


Abb. 8-26: REM-Aufnahmen von mit CMS-Nanopartikeln infiltriertem Collagen im Querschnitt (REM-PCI).

8.8 DLS-Daten

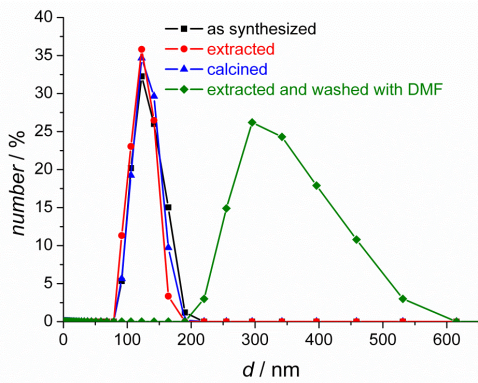


Abb. 8-27: Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot), calcinierten (blau) und einer extrahierten sowie zusätzlich mit DMF gewaschenen (grün) MCM-41-Probe.

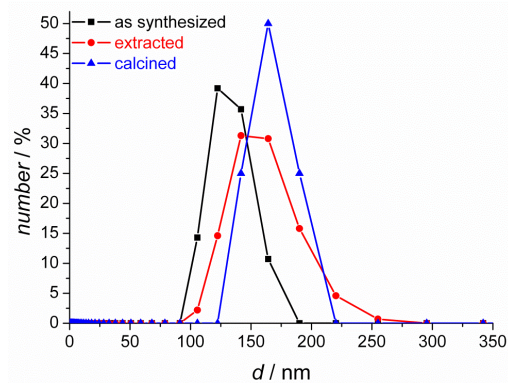


Abb. 8-30: Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikel, die mit TEA bei 60 °C synthetisiert wurden.

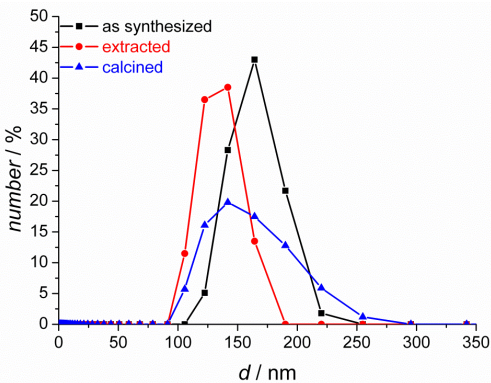


Abb. 8-28: Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 60 °C synthetisiert wurden.

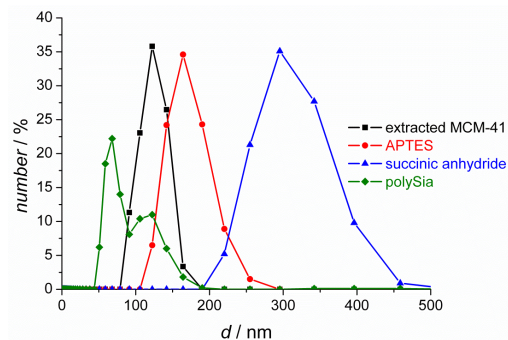


Abb. 8-31: Vergleich der DLS-Messungen der extrahierten MCM-41-Nanopartikel, die mittels des Linker-Systems mit Polysialinsäure funktionalisiert wurden.

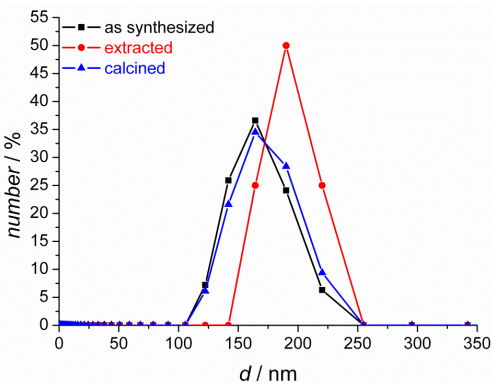


Abb. 8-29: Vergleich der DLS-Messungen der as syn (schwarz), extrahierten (rot) und calcinierten (blau) CMS-Nanopartikel, die mit TEA bei 40 °C synthetisiert wurden.

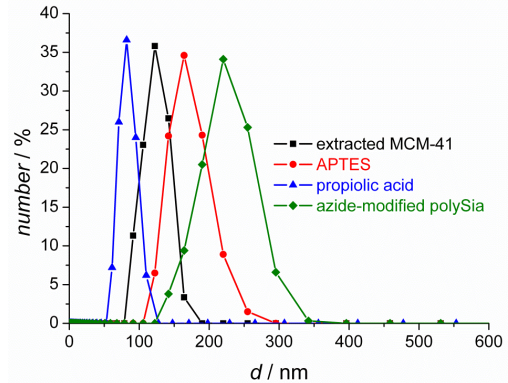


Abb. 8-32: Vergleich der DLS-Messungen der extrahierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Alkinfunktion ausgestattet und anschließend mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.

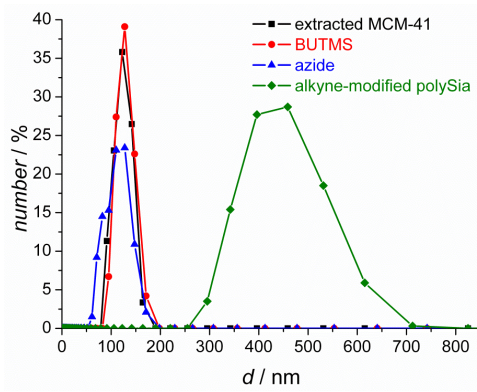


Abb. 8-33: Vergleich der DLS-Messungen der extrahierten MCM-41-Nanopartikel, die mit BUTMS, Azid und mittels „Click“-Chemie mit Alkin-modifizierter PolySia funktionalisiert wurden.

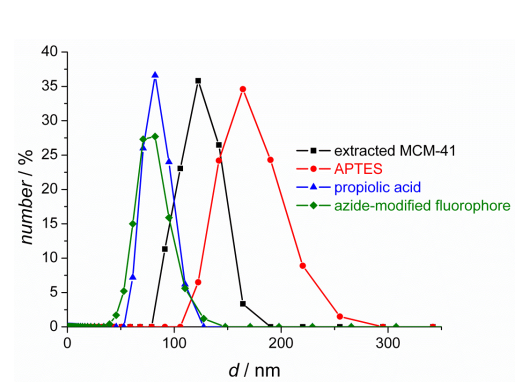


Abb. 8-34: Vergleich der DLS-Messungen der extrahierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Alkinfunktion ausgestattet und anschließend mit Alexa Fluor® 488-Azid in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.

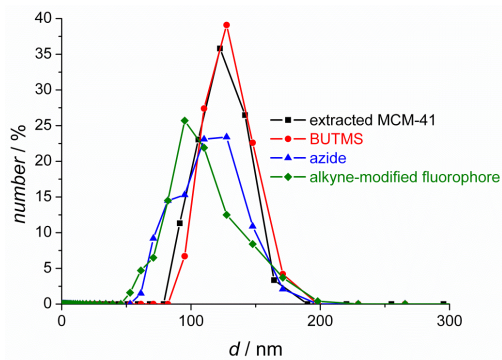


Abb. 8-35: Vergleich der DLS-Messungen der extrahierten MCM-41-Nanopartikel, die mit einer Azidfunktion ausgestattet und anschließend mit Alexa Fluor® 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion eingesetzt wurden.

8.9 Sorptionsmessungen

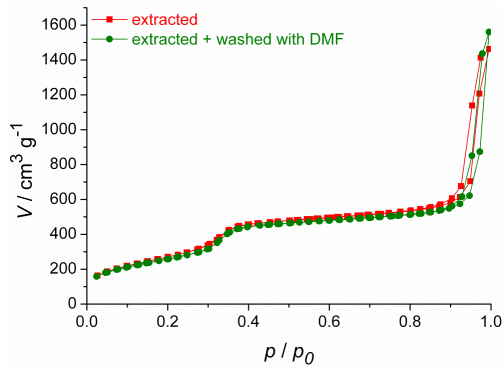


Abb. 8-36: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionskurven einer extrahierten (rot) und einer extrahierten sowie zusätzlich mit DMF gewaschenen (grün) MCM-41-Probe.

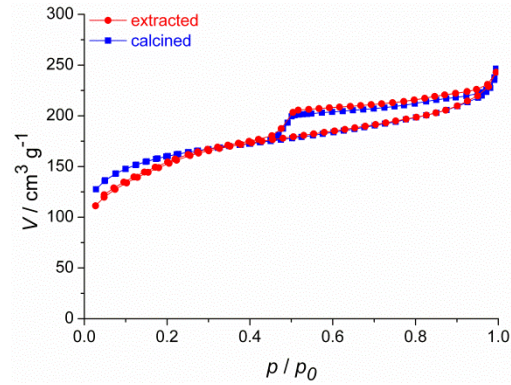


Abb. 8-39: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) CMS-Probe, die mit TEA bei 40 °C hergestellt wurden.

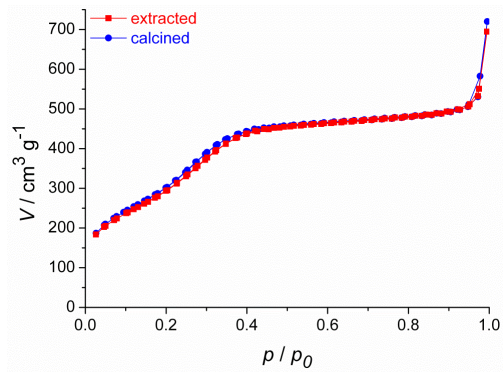


Abb. 8-37: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) CMS-Probe, die mit DEA bei 60 °C hergestellt wurden.

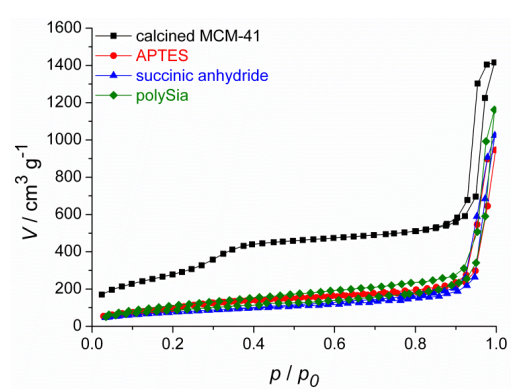


Abb. 8-40: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden.

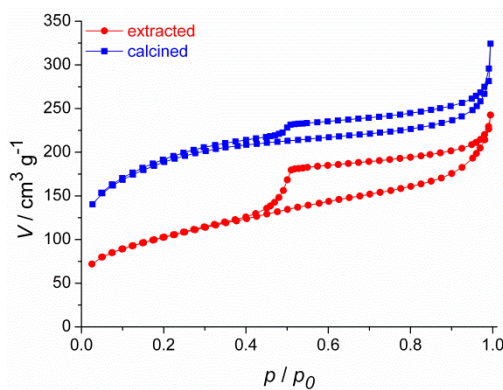


Abb. 8-38: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen einer extrahierten (rot) und einer calcinierten (blau) CMS-Probe, die mit TEA bei 60 °C hergestellt wurden.

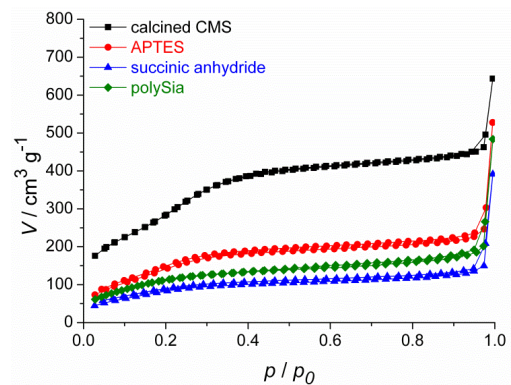


Abb. 8-41: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen von calcinierten CMS-Nanopartikeln, die über das Linker-System mit PolySia funktionalisiert wurden.

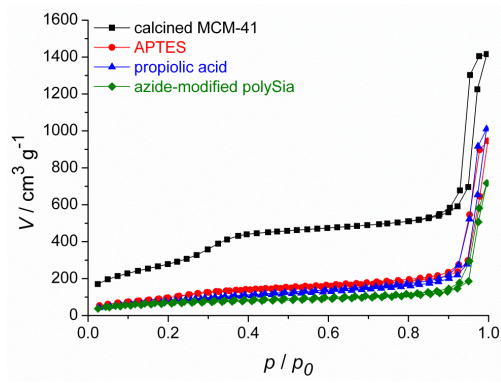


Abb. 8-42: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Propiolsäure und anschließend in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia umgesetzt wurden.

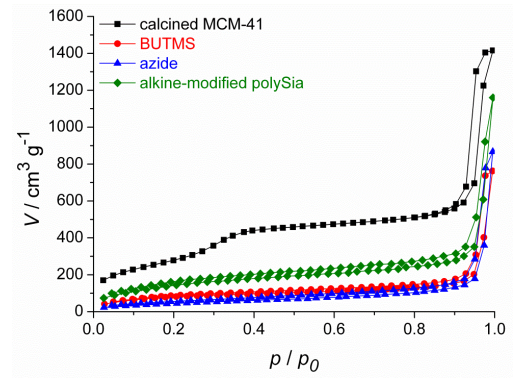


Abb. 8-43: Stickstoff Adsorptions- und Desorptionsisothermen von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit BUTMS, Natriumazid und anschließend in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzt wurden.

8.10 Ergebnisse der Zellkulturexperimente

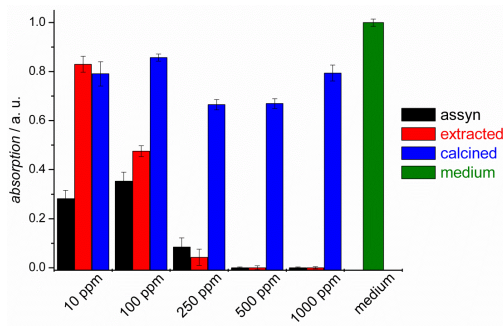


Abb. 8-44: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

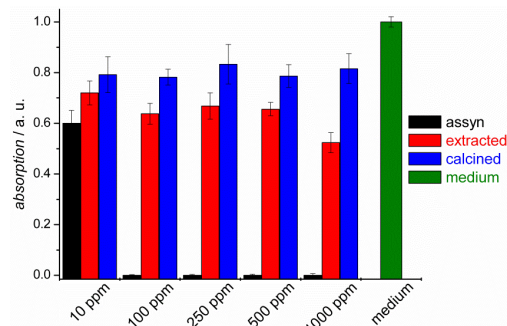


Abb. 8-47: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 60 °C hergestellt wurden.

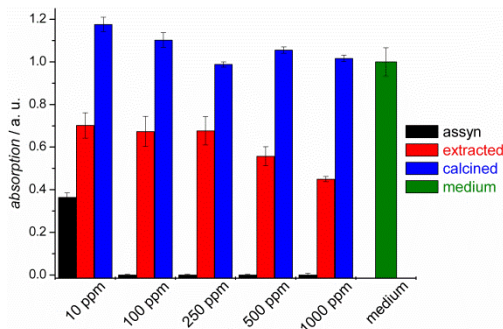


Abb. 8-45: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.

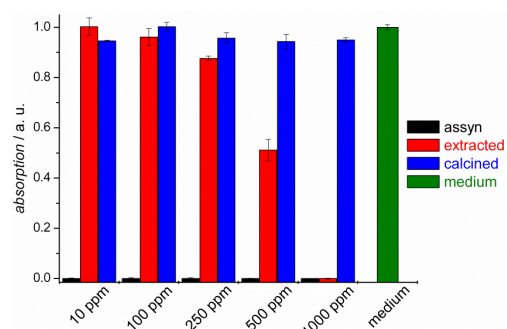


Abb. 8-48: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 60 °C hergestellt wurden.

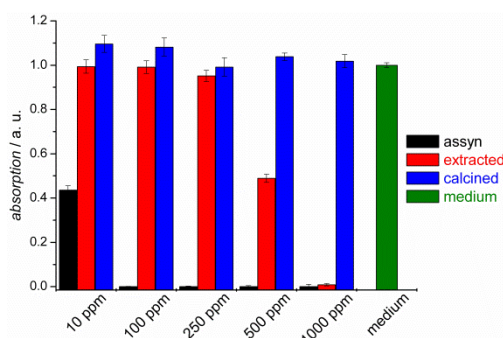


Abb. 8-46: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit DEA bei 60 °C hergestellt wurden.

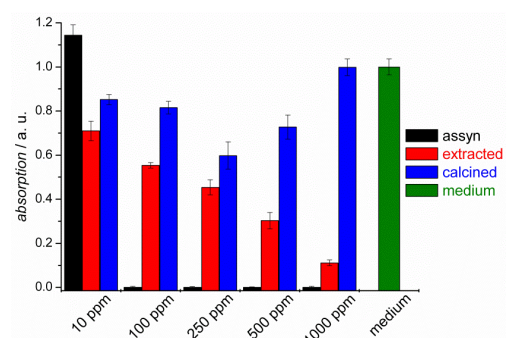


Abb. 8-49: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an unfunctionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 60 °C hergestellt wurden.

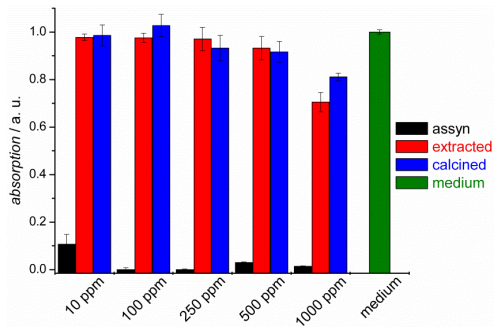


Abb. 8-50: Ergebnisse des MTT-Tests mit HepG2-Zellen nach 5 Tagen an unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 40 °C hergestellt wurden.

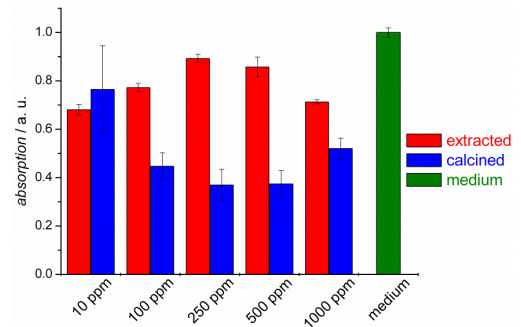


Abb. 8-53: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES und BSA-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

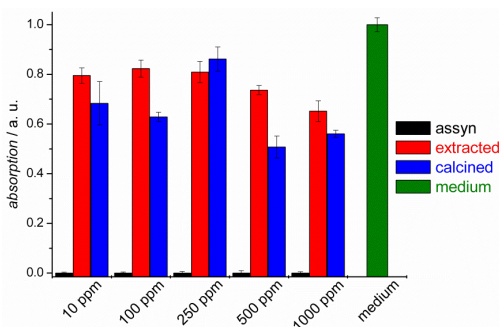


Abb. 8-51: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an unfunktionalisierten CMS-Nanopartikeln, die mit TEA bei 40 °C hergestellt wurden.

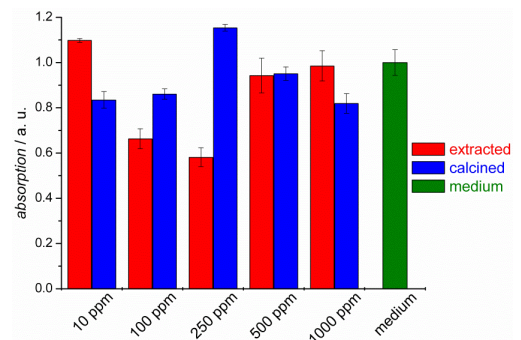


Abb. 8-54: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

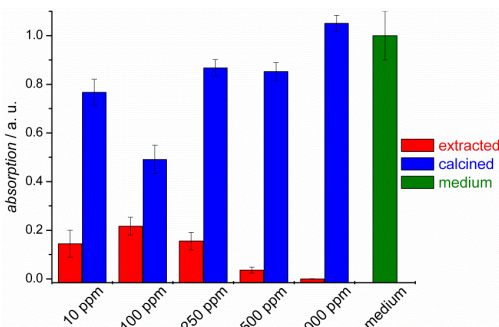


Abb. 8-52: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

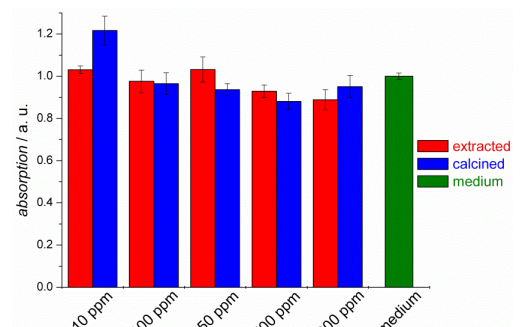


Abb. 8-55: Ergebnisse des MTT-Tests mit immortalisierten Schwann-Zellen (ISC) nach 7 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

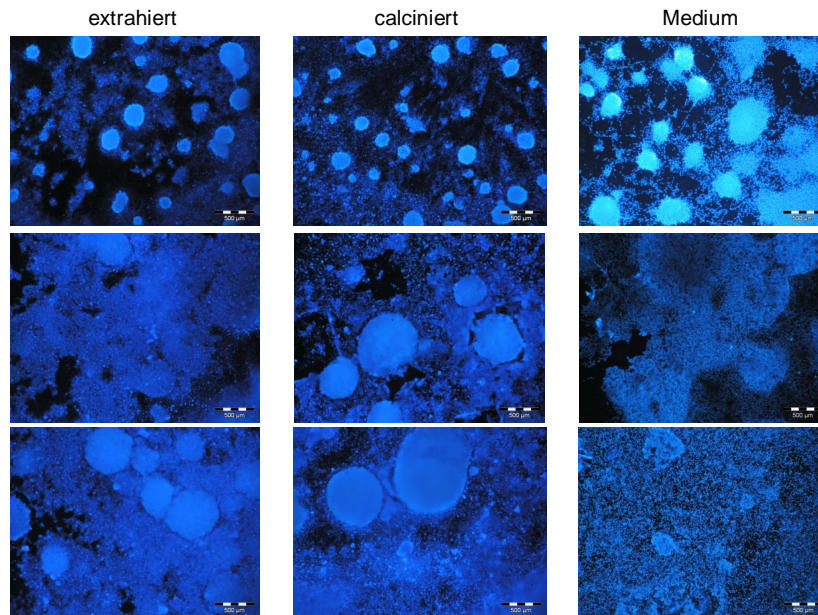


Abb. 8-56: DAPI Färbungen der Zellkulturexperimente mit ISC-Zellen von reinem Medium (rechts) sowie extrahierten (links) und calcinierten (Mitte) MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System funktionalisiert wurden. Diese wurden mit einer Konzentration von 1000 ppm an Tag 4 (oben), Tag 7 (Mitte) und Tag 14 (unten) getestet.

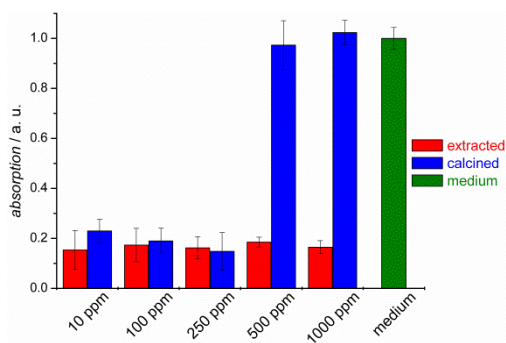


Abb. 8-57: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an mit APTES und Propiolsäure-funktionalisierten MCM-41.

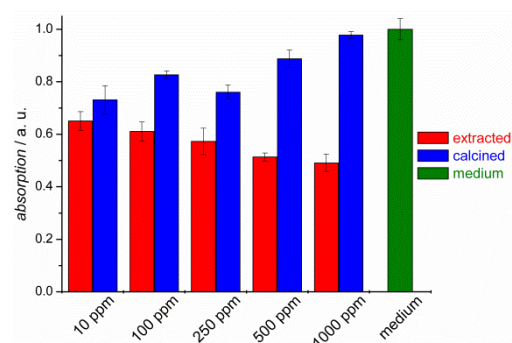


Abb. 8-59: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an mit BUTMS-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

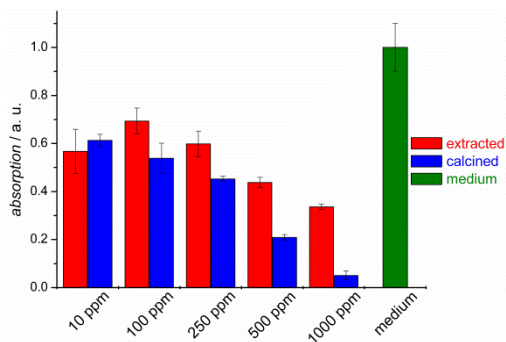


Abb. 8-58: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Azid-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

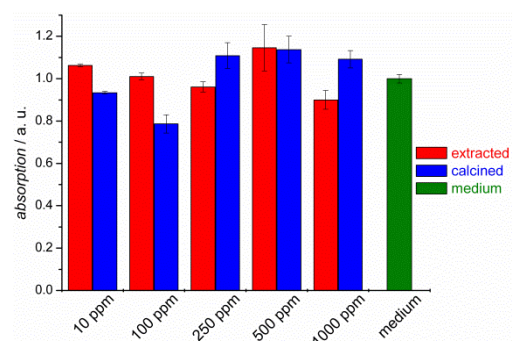


Abb. 8-60: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an mit BUTMS und Azid-funktionalisierten MCM-41-Nanopartikeln.

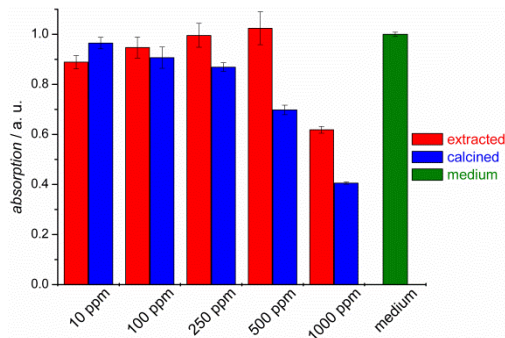


Abb. 8-61: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alkin-modifizierter PolySia in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

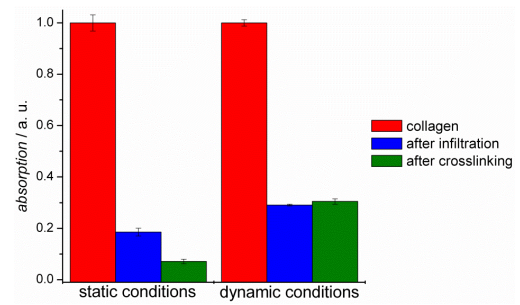


Abb. 8-64: Ergebnisse des statischen sowie dynamischen MTT-Tests mit NIH 3T3-Zellen an MatriStypt[®], infiltriertem Collagen sowie zusätzlich quervernetztem Collagen-Silica-Komposit-Material.

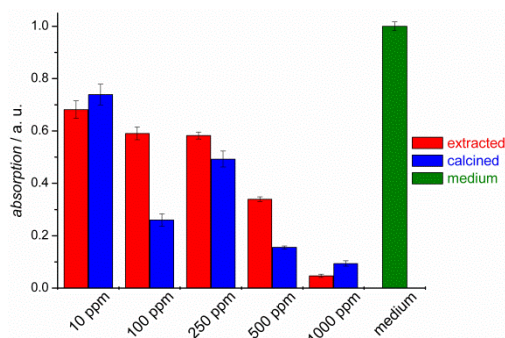


Abb. 8-62: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor[®] 488-Azid in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

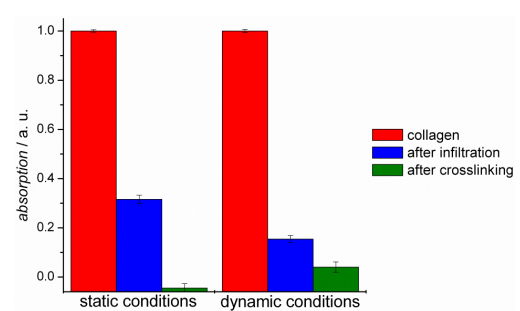


Abb. 8-65: Ergebnisse des statischen sowie dynamischen MTT-Tests mit adMSC-Zellen an MatriStypt[®], infiltriertem Collagen sowie zusätzlich quervernetztem Collagen-Silica-Komposit-Material.

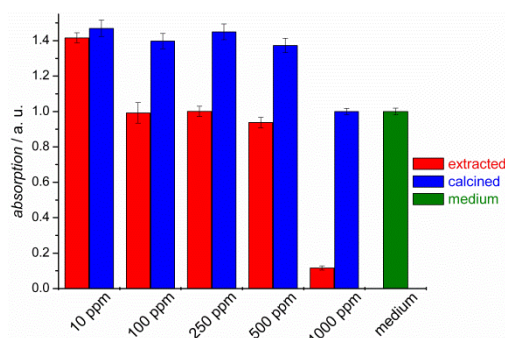


Abb. 8-63: Ergebnisse des MTT-Tests mit PC-12-Zellen nach 5 Tagen an MCM-41-Nanopartikeln, die mit Alexa Fluor[®] 488-Alkin in einer „Click“-Reaktion umgesetzt wurden.

8.11 TG-Daten

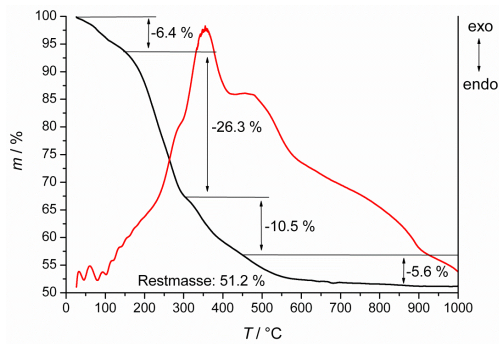


Abb. 8-66: Ergebnisse der TG-Messung einer as synthesized Probe des MCM-41.

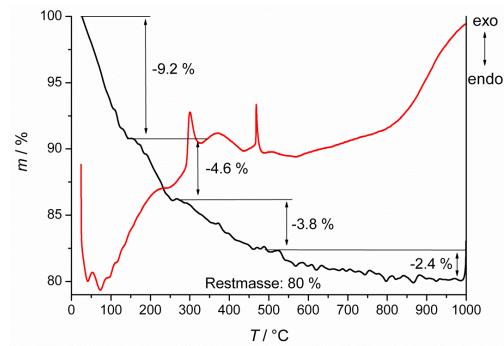


Abb. 8-69: Ergebnisse der TG-Messung einer extrahierten Probe des MCM-41, die anschließend mit DMF gewaschen wurde.

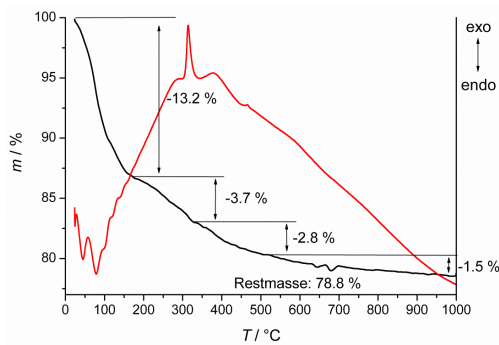


Abb. 8-67: Ergebnisse der TG-Messung einer extrahierten Probe des MCM-41.

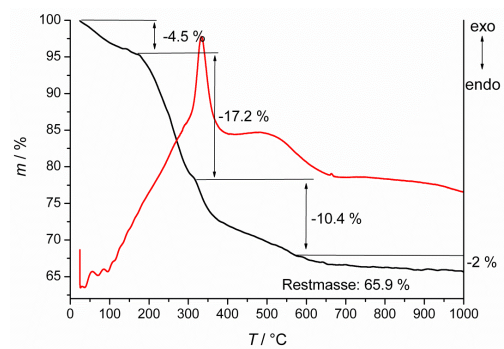


Abb. 8-70: Ergebnisse der TG-Messung einer as synthesized Probe der CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.

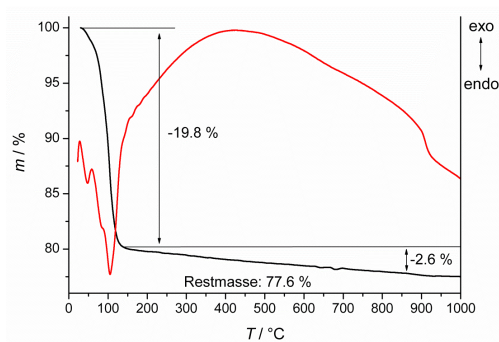


Abb. 8-68: Ergebnisse der TG-Messung einer calcinierten Probe des MCM-41.

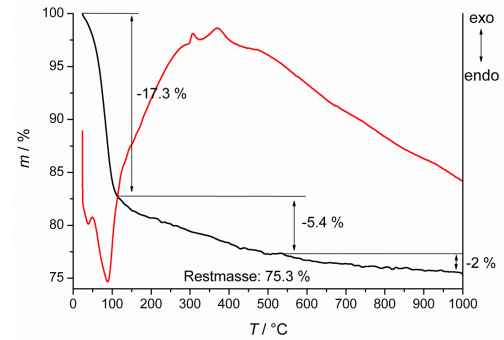


Abb. 8-71: Ergebnisse der TG-Messung einer extrahierten Probe der CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.

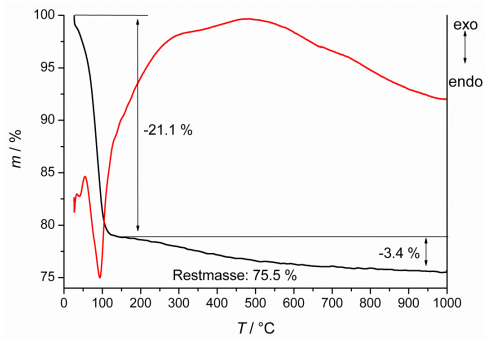


Abb. 8-72: Ergebnisse der TG-Messung einer calcinierten Probe der CMS-Nanopartikel, die mit DEA bei 40 °C hergestellt wurden.

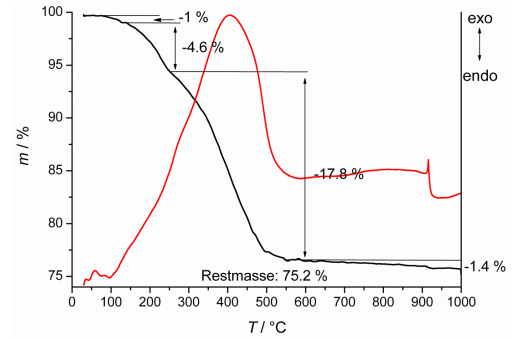


Abb. 8-75: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

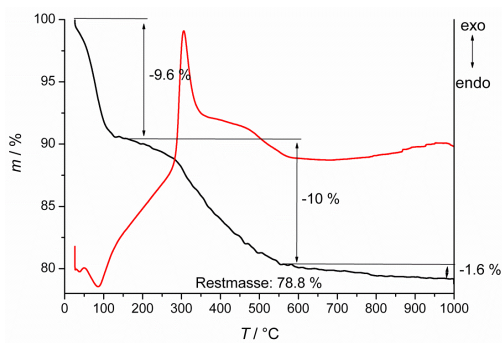


Abb. 8-73: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit APTES modifiziert wurden.

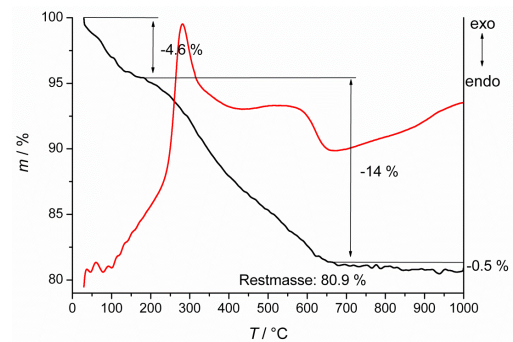


Abb. 8-76: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten CMS-Nanopartikeln (DEA, 40°C), die mit APTES funktionalisiert wurden.

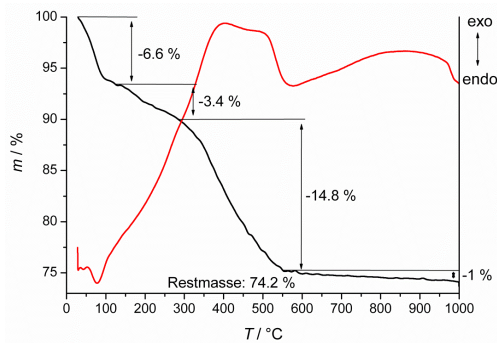


Abb. 8-74: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit APTES und BSA modifiziert wurden.

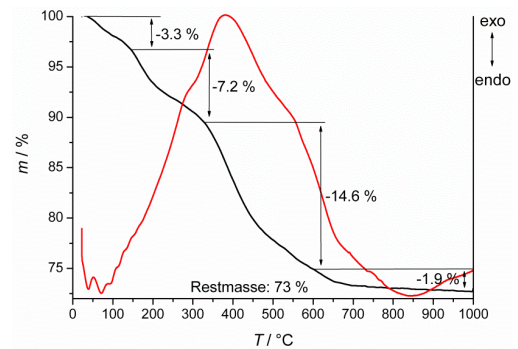


Abb. 8-77: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten CMS-Nanopartikeln (DEA, 40°C), die mit APTES und BSA funktionalisiert wurden.

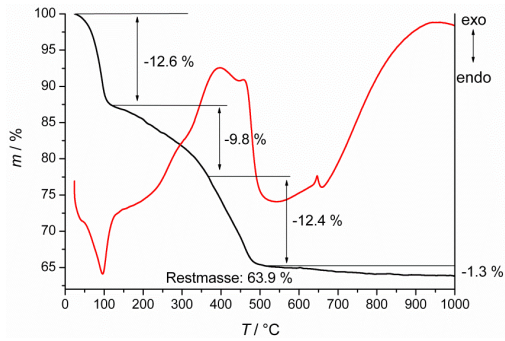


Abb. 8-78: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten CMS-Nanopartikeln (DEA, 40°C), die mit PolySia über das Linker-System aus APTES und BSA modifiziert wurden.

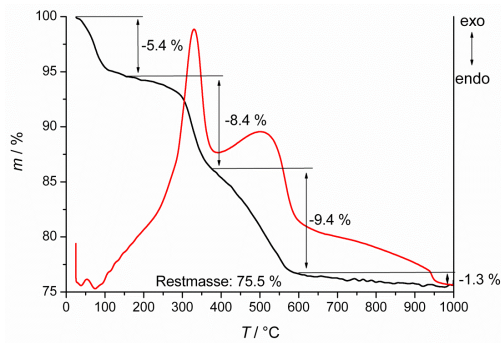


Abb. 8-81: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit BUTMS funktionalisiert wurden.

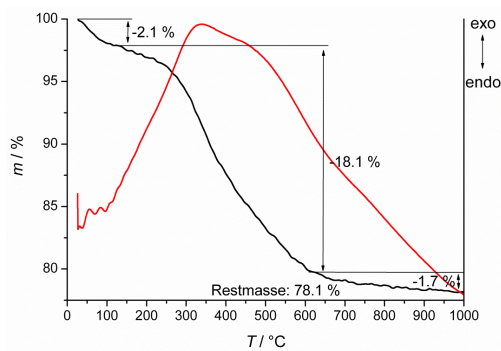


Abb. 8-79: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit Propionsäure für anschließende „Click“-Reaktionen versehen wurden.

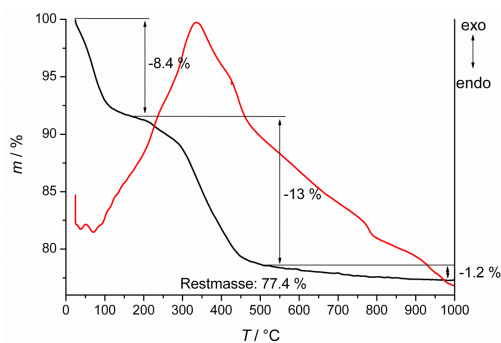


Abb. 8-82: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die mit einer Azidfunktion zur weiteren Verwendung in der „Click“-Reaktion ausgestattet wurden.

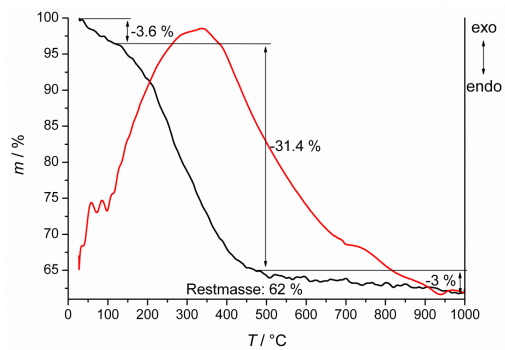


Abb. 8-80: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die in einer „Click“-Reaktion mit Azid-modifizierter PolySia umgesetzt wurden.

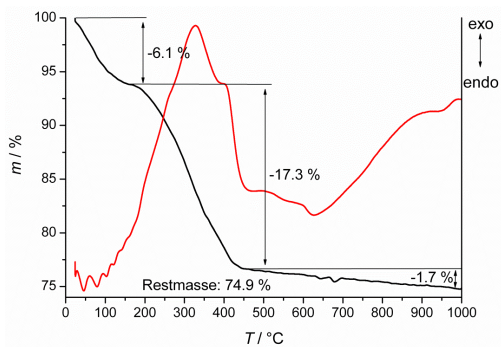


Abb. 8-83: Ergebnisse der TG-Messung von calcinierten MCM-41-Nanopartikeln, die in einer „Click“-Reaktion mit Alkin-modifizierter PolySia umgesetzt wurden.

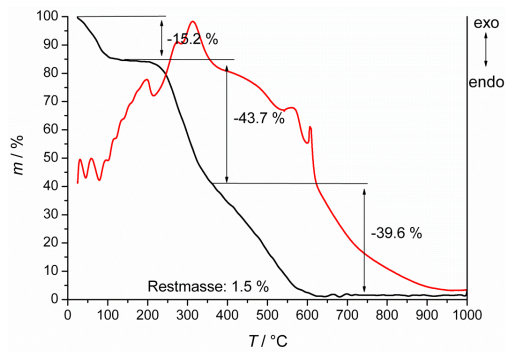


Abb. 8-84: Ergebnisse der TG-Messung von reinem MatriStypt®.

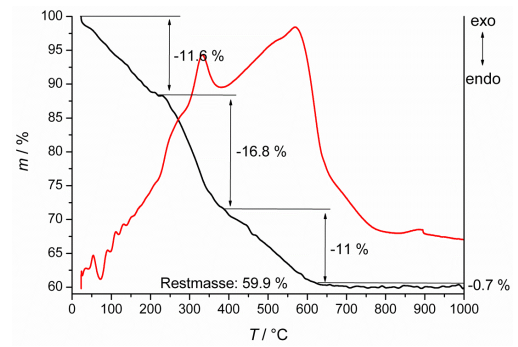


Abb. 8-85: Ergebnisse der TG-Messung von mit calcinierten CMS-Nanopartikeln infiltriertem MatriStypt®.

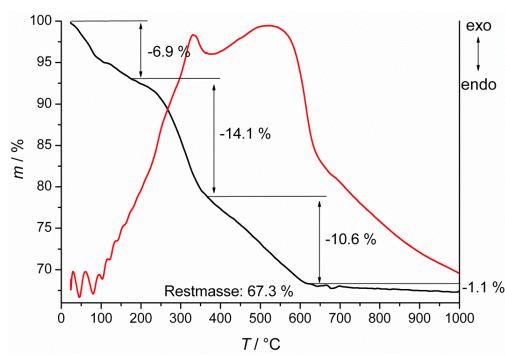


Abb. 8-86: Ergebnisse der TG-Messung an Collagen, das mit CMS-Nanopartikeln infiltriert und mit Glutaraldehyd quervernetzt wurde.

8.12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sina Williams
Geburtsdatum: 11.12.1984
Geburtsort: Uelzen
Familienstand: ledig
Anschrift: Borsigweg 3, 30165 Hannover

Schulbildung

1991-1997 Grundschule Lucas-Backmeister-Schule, Uelzen
1995-1997 Orientierungsstufe Lucas-Backmeister-Schule, Uelzen
1997-2004 Herzog-Ernst-Gymnasium, Uelzen
2004 Abitur

Studium

10/2004-08/2009 Studiengang Chemie-Diplom an der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover

Thema: Immobilisierung von Polysialinsäure auf funktionalisierten
Silica-Nanopartikeln

seit 10/2009 Beginn der Promotion zum Dr. rer. nat. in Chemie in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Behrens,
Institut für Anorganische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Thema: Entwicklung multifunktional modifizierter Silica-Nanopartikel
und deren Kompositmaterialien für Anwendungen in der
Nervenregeneration

8.13 Veröffentlichungen

Artikel

S. Williams, S. Steinhaus; Y. Su; G. Dräger; A. Kirschning; P. Behrens; Immobilisierung von Polysialinsäure auf Silica-Nanopartikeln; *Biomaterialien* 10; **2009**; 155.

S. Williams; I. Bremer; A. Christel; S. Böhm; C. Kasper; T. Scheper; R. Gerardy-Schahn; P. Behrens; Immobilization of polysialic acid on nanoporous silica nanoparticles; *Biomaterialien* 11; **2010**; 180.

A. Christel; S. Williams; C. Kasper; A. Hoffmann; P. Behrens; Functionalized nanoporous silica nanoparticles for stem cell engineering; *Biomaterialien* 11; **2010**; 178.

S. Williams; A. Christel; A. Neumann; S. Böhm; C. Kasper; P. Behrens; Nanoporöse Silica-Nanopartikel: Funktionalisierungsstrategien und Zellkulturtests; *Biomaterialien* 12; **2011**; 145.

S. Williams; A. Neumann; I. Bremer; Y. Su; G. Dräger; A. Kirschning; C. Kasper; P. Behrens; Nanoporous silica nanoparticles as biomaterials: Functionalization strategies and cell-culture studies; *in preparation*.

Mündliche Präsentationen

A. Christel; A. Neumann; S. Williams; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoporöse Silica-Nanopartikel für biomedizinische Anwendung*; NanoDay 2012; Hannover; 27. September 2012.

Posterbeiträge

S. Williams, S. Steinhaus; Y. Su; G. Dräger; A. Kirschning; P. Behrens; *Immobilization of polysialic acid on silica particles*; Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien; Tübingen; 8.-10. Oktober 2009.

S. Williams; I. Bremer; A. Christel; S. Böhm; C. Kasper; Y. Su; G. Dräger; A. Kirschning; R. Gerardy-Schahn; P. Behrens; *Immobilization of polysialic acid on nanoporous silica particles*; Posterbeitrag zur Sialoglyco; Potsdam; 21.-26. August 2010.

A. Christel; N. Ehlert; S. Williams; A. Hoffmann; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoparticles for multiple functionalization of scaffolds for stem cell engineering*; Posterbeitrag zur BioStar 2010; Stuttgart; 13.-15. Oktober 2010.

S. Williams; I. Bremer; A. Christel; S. Böhm; C. Kasper; T. Scheper; R. Gerardy-Schahn; P. Behrens; *Immobilization of polysialic acid on nanoporous silica nanoparticles*; Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien; Heilbad Heiligenstadt; 18.-20. November 2010.

A. Christel; N. Ehlert; S. Williams; A. Hoffmann; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoparticles for multiple functionalization of scaffolds for stem cell engineering*; Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien; Heilbad Heiligenstadt; 18.-20. November 2010.

A. Christel; A. Neumann; S. Williams; A. Hoffmann; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoparticles for multiple functionalization of scaffolds for tissue engineering applications*; Posterbeitrag zur Hybrid Materials; Strasbourg; 6.-10. März 2011.

A. Christel; A. Neumann; S. Williams; A. Hoffmann; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoparticles for multiple functionalization of scaffolds for tissue engineering applications*; Posterbeitrag zum NanoDay 2011; Hannover; 29. September 2011.

A. Christel; A. Neumann; S. Williams; A. Hoffmann; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoparticles for multiple functionalization of scaffolds for tissue engineering applications*; Posterbeitrag zum World congress on regenerative medicine; Leipzig; 2.-4. November 2011.

S. Williams; A. Christel; A. Neumann; S. Böhm; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoporous silica nanoparticles: Strategies for functionalization and cell culture tests*; Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien; Gießen; 10.-12. November 2011.

S. Williams; A. Christel; A. Neumann; S. Böhm; C. Kasper; P. Behrens; *Nanoporous silica nanoparticles: Strategies for functionalization and cell culture tests*; Posterbeitrag zur Nanomaterials for Biomedical Technologies; Frankfurt a. M.; 6.-7. März 2012.

A. Christel; A. Neumann; S. Williams; A. Hoffmann; C. Kasper; P. Behrens; *Multifunctionalization of nanoporous silica nanoparticles for tissue engineering applications*; Posterbeitrag zur Nanomaterials for Biomedical Technologies; Frankfurt a. M.; 6.-7. März 2012.

A. Neumann; C. Strauß; A. Christel; S. Williams; P. Behrens; C. Kasper; *Evaluation of biocompatibility of silica nanoparticles in vitro using bioreactors*; Posterbeitrag zur 5th Vienna Biomaterials Symposium; Wien; 19.-21. November 2012.

S. Williams; N. Wendt; A. Christel; P. Behrens; *Sorption measurements on differently functionalized mesoporous silica nanoparticles*; Posterbeitrag zum ENMIX Workshop; Hannover; 25.-27. März 2013.