
Calciumcarbonate als Biomaterial

Biokompatible anorganische sowie
anorganisch-organische Nanokomposite zur Knochenregeneration

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich 09 Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg – Universität Mainz

im Promotionsfach Chemie

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



UNIVERSITÄTSmedizin.
MAINZ

Laura Besch

geboren in Saarbrücken

Mainz, 2022

Dekanin:

Univ.-Prof. Dr. Tanja Schirmeister

Erster Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Tremel

Zweiter Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. Rudolf Zentgraf

Tag der mündlichen Prüfung:

Eigenständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2016 bis Dezember 2021 unter der wissenschaftlichen Leitung von **Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Tremel** im Department Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sowie am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz unter der Betreuung von **Dr. Ronald E. Unger** anfertigt. Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Mainz, Februar 2022

X

Laura Besch

Kurzfassung

In der Zahnheilkunde ist der Mangel an Knochensubstanz ein häufig auftretendes Problem, das vielfältige Ursachen haben kann und Situationen erzeugt, die den Knochenersatz oder eine Unterstützung der Knochenregeneration erfordern. Dabei müssen die Risiken und Vorzüge von xenogenen und alloplastischen Materialien stets abgewägt werden. Xenogene Materialien wie Cerabone® bestehen häufig aus gesintertem Knochenmineral bovinen Ursprungs, die eine hohe Volumenstabilität in Kombination mit einer sehr langsamen Resorptionsrate aufweisen. Demgegenüber steht der Einsatz alloplastischer Implantate, bestehend aus degradierbaren Materialien, die sich unter einem kontrollierten Volumenverlust in körpereigenen Knochen umwandeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Ansatz eines regenerativen Materials auf Calciumcarbonatbasis zur Knochenregeneration verfolgt. Im Fokus stand dabei das metastabile Calciumcarbonat-Polymorph, der Vaterit. Für die phasenreine Synthese des metastabilen Vaterit wurden die Kristallisationsprozesse unter entsprechenden Synthesebedingungen, sowie die Abstimmung der Syntheseparameter näher untersucht. Letztlich konnte die Ionendiffusität im Reaktionsmedium (Ethylenglykol-Wasser Gemisch) als Schlüsselparameter für die Phasenumwandlung unter gegebenen Bedingungen definiert werden. Die Partikel wurden als phasenreine Vaterit Nanoaggregaten im Größenbereich von 500 -1000 nm ohne vermeintliche Oberflächenfunktionalisierung erhalten. Aufbauend auf Inkubationsstudien in einem proteinfreien, azellulären Medium (SBF), wurden Inkubation in humanem Blutplasma durchgeführt. Über diesen Weg konnten Ergebnisse über die Konversion von Vaterit in einer biomimetischen, knochenbildenden Umgebung erlangt werden. Mittels spektroskopischer Methoden (FT-IR, NMR), Pulverröntendiffraktometrie (XRPD), Thermogravimetrischer Analysen (TGA) und mikroskopischer Methoden (REM-EDX, TEM) wurde die Umsetzung sowie die entstandene HCA-Phase hinsichtlich Zusammensetzung und Morphologie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Vateritphase auch in einem proteinhaltigen Medium zur Bildung einer Apatitphase geringer Kristallinität führt, deren Zusammensetzung und Morphologie mit dem Knochenmineral vergleichbar ist. Neben der chemischen Charakterisierung wurden biologische Studien zur Beurteilung des Risikopotentials der Vaterit Nanoaggregate sowie der HCA-Phase durchgeführt. Anhand eines systematischen Ansatzes konnte gezeigt werden, dass sowohl das Ausgangsmaterial Vaterit als auch die HCA-Polypartikelaggregate biomimetische, biokompatible Materialien darstellen, von denen keine Biomaterial-induzierten, proinflammatorischen oder zytotoxischen Effekte ausgehen. Im

direkten Vergleich mit Cerabone® zeigen die Ergebnisse der *in vitro* Studien, dass die untersuchten Materialien (Vaterit, HCA) mit Materialien biologischen Ursprungs konkurrieren können und somit für eine attraktive Alternative im Bereich Biomaterialien zur Knochenregeneration stehen.

In einem weiteren Kapitel wurden kombinierte Biomaterialien aus Vaterit Nanopartikel und einem phosphonylierten PEG-basierten Hydrogel beschrieben. Dabei stand die Entwicklung eines (3D)-Netzwerkes mit biokompatiblen bis bioaktiven Eigenschaften zur Behandlung von Knochengewebserkrankungen im Fokus. Die Ergebnisse der chemischen und biologischen Analyse zeigen, dass die Nanokomposite eine vielversprechende Alternative im Bereich alloplastischer Implantatmaterialien darstellen. Das ausgeprägte Quellverhalten sowie die spongiöse Struktur mit interkonnektierenden Poren erlauben den kontinuierlichen Stoffaustausch und ermöglichen die Umsetzung der Vaterit Nanopartikel in eine knochenähnliche Apatitspezies innerhalb der Hydrogelmatrix. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Hydrogelmatrix zu einem verstärkten Apatitwachstum beiträgt und somit eine osteofreundliche Umgebung generiert. Neben dem biologischen Risikoprofil hinsichtlich Pyrogenität, Zytotoxizität und gewebspezifische Verträglichkeit wurde auch die Zelladhäsion auf und innerhalb des Nanokomposites untersucht. Erste Experimente zeigen eine Kolonialisierung der MG63 auf der Hydrogelmatrix mit anschließender Infiltration. Weitere Untersuchungen sind notwendig, dennoch kann aufgrund der erzielten Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass diese Nanokomposite eine vielversprechende Variante zu bisherigen alloplastischen Implantaten darstellen können.

In einem dritten Projekt wurde amorphes Calcium-Magnesium-Carbonat (aMCC) mit einem Verhältnis von etwa 3:1 (Ca^{2+} zu Mg^{2+}) als potentielles Knochenregenerationsmaterial untersucht. Dabei ist der Magnesiumgehalt entsprechend hoch, um das amorphe Material zu stabilisieren. Aufgrund dieser Stabilisierung kann (im Gegensatz zu nicht-stabilisiertem amorphen Calciumcarbonat) durch Inkubation in einer simulierten Körperflüssigkeit eine Calcium-Phosphat-Spezies erhalten werden, die dem carbonathaltigen Apatit ähnlich ist. Auch erste biologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass BM-aMCC als neue Perspektive zur Behandlung von Knochendefekten betrachtet werden kann.

Abstract

In dentistry, the lack of bone substance is a common problem. The causes are manifold and may create situations that require bone replacement or bone regeneration support. The risks and benefits of xenogenic and alloplastic materials must always be evaluated. Xenogenic materials such as Cerabone[®] are composed of sintered bone mineral (bovine origin), which have high volume stability combined with a very slow resorption rate. This contrasts with the use of alloplastic implants, consisting of degradable materials that transform into autologous bone with a controlled loss of volume.

This work investigates a regenerative material based on calcium carbonate for bone regeneration. It focuses on the metastable calcium carbonate polymorph vaterite. For the phase-pure synthesis of the metastable vaterite, the crystallization processes under appropriate synthesis conditions, as well as the tuning of the synthesis parameters were investigated in more detail. Finally, the ion diffusivity in the reaction medium (ethylene glycol-water mixture) could be defined as a key parameter for the phase transformation under given synthesis conditions. The particles were obtained as phase-pure vaterite nanoaggregates in the size range of 500 -1000 nm without any surface functionalization. In addition to incubation studies in a protein-free acellular medium (SBF), incubation in human blood plasma was performed. This allowed results to be obtained on the conversion of vaterite in a biomimetic, bone-forming environment. By means of spectroscopic methods (FT-IR, NMR). Powder X-ray diffraction, thermogravimetric analyses and microscopic methods (SEM-EDX, TEM), the conversion as well as the resulting HCA phase were investigated with respect to composition and morphology. Finally, it was shown that the vaterite phase leads to the formation of an apatite phase of low crystallinity even in a protein-containing medium. The composition and morphology of this phase is comparable to the bone mineral. In addition to the chemical characterization, biological studies were carried out to assess the risk potential of the vaterite nanoaggregates as well as the HCA phase. Using a systematic approach, it was shown that the starting material vaterite as well as the HCA particle aggregates represent biomimetic, biocompatible materials that do not possess biomaterial-induced, proinflammatory or cytotoxic properties. In direct comparison, the results of the *in vitro* studies show no disadvantage compared to Cerabone[®] (a material of biological origin) with current clinical application. Hence, vaterite represents an attractive alternative in the field of biomaterials for bone regeneration.

In a second project, combined biomaterials consisting of vaterite nanoparticles and a phosphonylated PEG-based hydrogel were described. It focuses on the development of a (3D) network with biocompatible to bioactive properties for the treatment of bone tissue diseases. The results of the chemical and biological analysis show that the nanocomposites represent a promising alternative as alloplastic graft material. The highly swelling behavior as well as the spongy structure with interconnecting pores allow continuous mass transfer and enable the conversion of the vaterite nanoparticles into a bone-like apatite species within the hydrogel matrix. Additionally, it was observed that the hydrogel matrix amounts to enhanced apatite growth, generating an osteofriendly environment. In addition to the biological risk profile in terms of pyrogenicity, cytotoxicity, and tissue-specific compatibility, cell adhesion to and within the nanocomposites was also investigated. Initial experiments show colonization of MG63 cells on the hydrogel matrix with subsequent infiltration. Further investigations are necessary, but based on the obtained results it can be assumed that these nanocomposites can represent a promising alternative to previous alloplastic implant materials.

In a third project, amorphous calcium magnesium carbonate with a ratio of about 3:1 (Ca^{2+} to Mg^{2+}) was investigated as a potential bone regeneration material. Thus the magnesium content is appropriately high to stabilize the amorphous material. Due to this stabilization, a calcium phosphate species similar to carbonate-containing apatite can be obtained (in contrast to non-stabilized amorphous calcium carbonate) by incubation in a simulated body fluid. Furthermore initial biological studies indicate that BM-aCC could be considered as a new prospect for the treatment of bone defects.

Danksagung

Vorrangig möchte ich meinem Betreuer **Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Tremel** für die Möglichkeit, an diesem interdisziplinären Projekt zu arbeiten, danken. Zudem geht mein aufrichtiger Dank an meinen Co-Betreuer **Dr. Ronald E. Unger**. Ich danke Ihnen beiden für konstruktive, fachliche Diskussionen und Anregungen sowie für die Geduld und Ihren Rückhalt.

Außerdem danke ich **Dr. Mihail Mondeshki** für die Durchführung der NMR-Experimente sowie **Regine Jung-Pothmann** und **Stefanie Bernska** für die Aufnahme der PXRDs. Ein ‚Danke‘ auch an unserer TEM-Crew, die fantastische Bilder für diese Arbeit geliefert hat. Natürlich danke ich auch allen Kooperationspartnerinnen und Kooperationspartnern für den wissenschaftlichen Austausch und die gemeinsamen Arbeiten. Darüber hinaus danke ich der gesamten Tremel-Forschungsgruppe (in wechselnder Besetzung) für interessante Diskussionen und konstruktive Beiträge über viele Jahre. Ein besonderer Dank geht auch an **Barbara Pank** und **Nazneen Adenwalli** für die Hilfestellungen und Unterstützung im biologischen Labor. **Marcel Maslyk** ein großes Dankeschön auch an dich. Danke für jegliche Form der Unterstützung, den respektvollen Umgang sowie die ausgelassene Stimmung an unserem gemeinsamen Arbeitsplatz.

In besonderer Weise möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich in zweifelnden Momenten unterstützt und gestärkt haben. Daher ein ‚Danke‘ an meinen Freundeskreis sowie meine engsten Vertrauten **Dominik Rau, Lisa Besch, Monika Besch** und **Peter Besch**. Ich danke euch für jedes liebevolle und aufbauende Wort in Augenblicken des Frustes. Danke!

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretische Grundlagen	1
1.1. Kristallisation	1
1.1.1. Keimbildung	2
1.1.2. Ostwald-Volmer-Regel	6
1.1.3. 2-Stufen Nukleation	7
1.1.4. Amorphe Zwischenprodukte	9
1.1.5. Kristallwachstum	9
1.2. Biomineralisation und Biominerale	12
1.2.1. Biomineralisation	12
1.3. Knochen	20
1.3.1. Strukturelle Hierarchie des Knochens	20
1.3.2. Knochenmineral	21
1.3.3. Knochenhomöostase und Remodeling	22
1.4. Knochenersatzmaterialien	24
1.5. Zellkultur und <i>in vitro</i> Studien	26
1.5.1. Zelllinien und primäre Zellen	26
1.5.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität	27
1.5.3. Osteoblastäre Differenzierung – Owen-Modell	29
2. Vaterit Nanopartikel –Synthese und <i>in vitro</i> Studien–	31
2.1. Einleitung	31
2.2. Material und Methoden	33
2.2.1. Material	33
2.2.2. Vaterit-Nanopartikel – Synthesevorschrift	33
2.2.3. Chemische Charakterisierungsmethoden	34
2.2.4. Biologische Untersuchungsmethoden – <i>in vitro</i> Studien	35
2.3. Ergebnisse und Diskussion	39
2.3.1. Vaterit - Synthese	39
2.3.2. Vaterit – <i>in vitro</i> Studien	49
2.4. Zusammenfassung und Ausblick	56
3. Vaterit Nanopartikel – Biomaterial für die Knochenregeneration –	59
3.1. Einleitung	59
3.2. Material und Methoden	60
3.2.1. Material	60
3.2.2. Inkubation der Vaterit Nanopartikel	61

3.2.3.	Chemische Charakterisierungsmethoden	62
3.2.4.	Biologische Untersuchungsmethoden – <i>in vitro</i> Studien	64
3.3.	Ergebnisse und Diskussion	67
3.3.1.	Inkubation der Vaterit Nanopartikel	67
3.3.2.	<i>in vitro</i> Studien	81
3.4.	Zusammenfassung	86
4.	Vaterit-PEG-basiertes Nanokompositmaterial zur Knochenregeneration	89
4.1.	Einleitung	89
4.2.	Material und Methoden	91
4.2.1.	Material	91
4.2.2.	(P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogel – Synthesevorschrift	91
4.2.3.	(P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogel – Quellverhalten	92
4.2.4.	(P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogel – Inkubation in SBF	92
4.2.5.	Chemische Charakterisierung	92
4.2.6.	Biologische Untersuchungsmethoden – <i>in vitro</i> Studien	93
4.3.	Ergebnisse und Diskussion	95
4.3.1.	Hydrogele aus phosphonylierten Polyether-Triblock-Copolymeren – Synthese und Charakterisierung	95
4.3.2.	Hydrogele aus phosphonylierten Polyether-Triblock-Copolymeren – <i>in vitro</i> Studien	107
4.4.	Zusammenfassung und Ausblick	115
5.	Amorphes Magnesium-Calcium-Carbonat als Biomaterial für die Knochenregeneration	117
5.1.	Einleitung	117
5.2.	Material und Methoden	118
5.2.1.	Material	118
5.2.2.	Chemische Charakterisierungsmethoden	119
5.2.3.	Biologische Untersuchungsmethoden – <i>in vitro</i> Studien	120
5.3.	Ergebnisse und Diskussion	124
5.3.1.	Inkubation von BM-aMCC 30% in SBF	124
5.3.2.	BM-aMCC 30% – <i>in vitro</i> Studien	131
5.4.	Zusammenfassung und Ausblick	135
6.	Anhang A - Abbildungen	137
7.	Anhang B - Verzeichnisse	141
	Literaturverzeichnis	147
	Lebenslauf	158
	Publikationsliste	159

1

Theoretische Grundlagen

1.1. Kristallisation

Die Kristallisation beschreibt den Prozess der Kristallbildung und somit die Entstehung einer neuen festen Phase aus einer übersättigten Lösung, einer Schmelze oder einer Gasphase. Der gebildete kristalline Festkörper zeigt eine hochgeordnete Struktur, bestehend aus kleinsten strukturellen Einheiten, die sich in alle Raumrichtungen vielfach wiederholen.^[1] Klassischerweise lässt sich ein Kristallisationsprozess in zwei Teilprozesse, die Keimbildung und das anschließende Kristallwachstum unterteilen. Ein allgemeingültiges Modell für beide Teilprozesse wurde 1950 von Victor K. LaMer postuliert und beschreibt die Kristallbildung mithilfe eines kinetischen Ansatzes (Abb. 1-1).^[2,3]

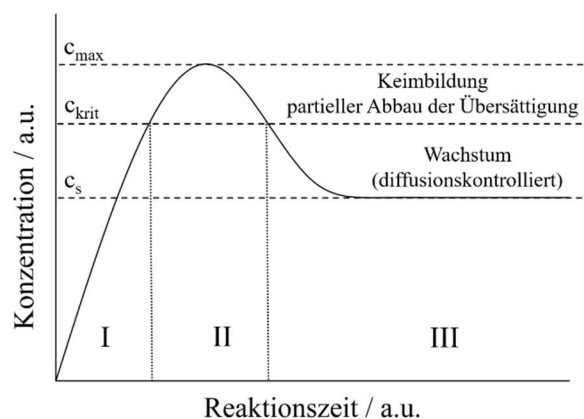


Abb. 1 - 1 LaMer Modell. Konzentrationsverlauf einer Fällungsreaktion in Abhängigkeit der Zeit, gegliedert in drei Phasen (I) Linearer Anstieg der Monomerkonzentration (II) Induktionsphase der Keimbildung (III) diffusionskontrolliertes Kristallwachstum. In Anlehnung an [2,3].

Das Modell beschreibt die zeitliche Abhängigkeit der Monomerkonzentration bei konstanter Additions- bzw. Generierungsrate und ist auf eine Vielzahl von Systemen anwendbar. In Stufe I gehen die Reaktanden in Lösung, die Monomerkonzentration steigt linear an und führt zur Übersättigung des Systems. Bei starker Übersättigung entspricht die Monomerkonzentration der kritischen Keimbildungskonzentration für die homogene Keimbildung und eine spontane Nukleation setzt ein. Im Maximum der Kurve wird die Erzeugung neuer Monomere durch die Keimbildung und das Kristallwachstum kompensiert. Sind stabile Keime vorhanden, beginnt

das Kristallwachstum. Monomere werden verbraucht und die Monomerkonzentration sinkt unter die kritische Keimbildungskonzentration – die Bildung neuer Keime stoppt. In Stufe III fließen die neu erzeugten Monomere in das Kristallwachstum, und die Monomerkonzentration nähert sich der Sättigungskonzentration an. Letztlich dominiert in dieser Stufe das diffusionskontrollierte Wachstum der Keime zu größeren Kristallen. Zur Synthese monodisperser Nanopartikel ist demnach eine hohe Nukleationsrate gefolgt von einem langsamen Wachstumsprozess nötig.

1.1.1. Keimbildung

Im Allgemeinen beschreibt die Keimbildung die Erzeugung einer neuen Phasengrenze und führt somit zu einem heterogenen System mit zwei getrennten Phasen. Die Thermodynamik erlaubt eine Keimbildung nur dann, wenn die freie Enthalpie des resultierenden Zweiphasensystems ΔG_2 niedriger ist als die des ursprünglichen Einphasensystems ΔG_1 . Es muss gelten $\Delta G_2 \geq \Delta G_1$.^[4] Zur Beschreibung der Keimbildungsprozesse wurden im letzten Jahrhundert zahlreiche Theorien postuliert. Neben der klassischen Keimbildungs-Theorie entstehen zunehmend nicht-klassische Ansätze wie die 2-Stufen Nukleation oder die Bildung von amorphen Intermediaten. Im folgenden Abschnitt wird zunächst die klassische Keimbildungstheorie als Ausgangspunkt zur Erklärung der Keimbildung beschrieben.

Klassische Keimbildungstheorie

Die Klassische Keimbildungstheorie beschreibt die homogene Keimbildung eines kugelförmigen Teilchens unter thermodynamischen Aspekten. Die Keimbildung bzw. die freie Keimbildungsenthalpie ΔG wird als die Summe eines exergonischen Volumenterms ΔG_V und eines endergonischen Oberflächenterms ΔG_O beschrieben.

$$\Delta G = \Delta G_V + \Delta G_O \quad (1.1)$$

Ein Keimbildungsereignis findet statt, wenn die freie Enthalpie des gesamten Systems durch diesen Prozess verringert wird. Die Bildung einer zweiten Phase bzw. die Erzeugung einer neuen Oberfläche geht dabei immer mit einer Zunahme der Grenzflächenoberfläche und einer Erhöhung der freien Enthalpie einher. Für sphärische Keime ist die freie Oberflächenenthalpie proportional zu r^2 des entstehenden Keims. Gleichzeitig bewirkt die Bildung einer zweiten Phase durch die erhöhte Anzahl attraktiven Wechselwirkungen und der Zunahme der Packungsdichte der Volumenphase eine Abnahme der freien Enthalpie. Die so freigesetzte Energie ist proportional zum Volumen ($\propto r^3$).

Daraus resultiert

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma - \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v \quad (1.2)$$

mit der Grenzflächenspannung γ zwischen Keim und umgebender Phase und der freien Enthalpie pro Volumeneinheit ΔG_v . Es gilt $\Delta G_v < 0$. Somit steht die Stabilität eines Keims in Abhängigkeit des Verhältnisses von Oberfläche zu Radius. Der entscheidende Faktor stellt die Grenzflächenspannung γ dar, sodass bei kleinen Keimradien der Oberflächenterm dominiert. Erst bei zunehmender Keimgröße übersteigt die freie Volumenenthalpie den Oberflächenterm und stabile Keime können vorliegen. Aus der Überlagerung beider Terme ergibt sich ein charakteristisches Enthalpiediagramm für den Keimbildungsprozess (Abb. 1-2).

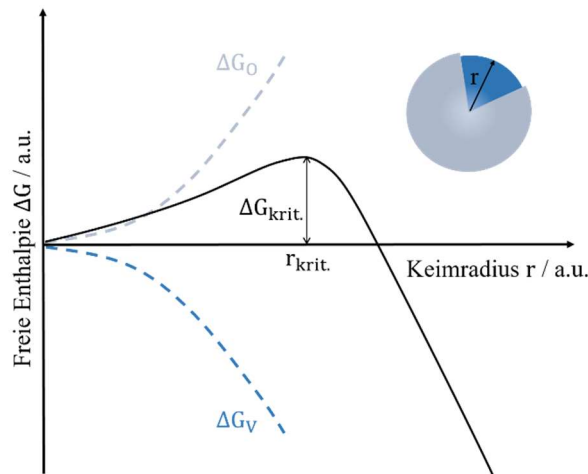


Abb. 1 - 2 Freie Enthalpiediagramm der homogenen Keimbildung nach der klassischen Keimbildungstheorie. Das Maximum stellt die freie Enthalpiebarriere $\Delta G_{krit.}$ in Abhängigkeit des kritischen Keimbildungsradius $r_{krit.}$ dar. Wachstum ist nur dann möglich, wenn eine kritische Keimgröße überschritten wurde und mit steigendem r eine Abnahme von ΔG einhergeht.

Der kritische Keimbildungsradius $r_{krit.}$ kann durch die Bestimmung des Maximums der freien Keimbildungsenthalpie und Ableiten nach r berechnet werden.

$$\frac{\partial \Delta G}{\partial r} = 8\pi r \cdot \gamma + \frac{4\pi r^2}{v} \cdot \Delta G_v = 0 \quad (1.3)$$

$$r_{krit.} = \frac{-2 \cdot v}{\Delta G_v} \quad (1.4)$$

Daraus ergibt sich für die Enthalpiebarriere der Keimbildung

$$\Delta G_{krit.} = \frac{16\pi \mu \cdot \gamma^3 \cdot v^2}{3 \cdot \Delta G_v^2} = \frac{4}{3} \pi \cdot \gamma \cdot r_{krit.}^2 \quad (1.5)$$

Die Höhe des Profils der Enthalpiebarriere $\Delta G_{\text{krit.}}$ ist abhängig von der Temperatur T und der Übersättigung S des jeweiligen Systems. Die Übersättigung S ist als das Verhältnis der Aktivität der gelösten Verbindungen α und der Aktivität im Gleichgewichtszustand α^* definiert.

$$S = \frac{\alpha}{\alpha^*} \quad (1.6)$$

Die Übersättigung S kann mit dem chemischen Potential μ über folgenden Term verknüpft werden

$$\Delta\mu = \mu^* - \mu = k_B T \cdot \ln\left(\frac{\alpha^*}{\alpha}\right) = -k_B T \cdot \ln(S) \quad (1.7)$$

$$\mu^* = \mu_{\text{Ref}} + k_B T \cdot \ln\left(\frac{\alpha^*}{\alpha_{\text{Ref.}}}\right) \quad \mu = \mu_{\text{Ref.}} + k_B T \cdot \ln\left(\frac{\alpha}{\alpha_{\text{Ref.}}}\right)$$

Die Kombination der Gleichungen ergibt für den kritischen Keimbildungsradius $r_{\text{krit.}}$ einen von der Übersättigung abhängigen Ausdruck.

$$r_{\text{krit.}} = \frac{2\gamma \cdot v}{k_B T \cdot \ln(S)} \quad (1.8)$$

Somit gilt für die Enthalpiebarriere der Keimbildung

$$\Delta G_{\text{krit.}} = \frac{16\pi \cdot \gamma^3 \cdot v^2}{3(k_B T \cdot \ln(S))^2} \quad (1.9)$$

Folglich steht die freie Enthalpiebarriere $\Delta G_{\text{krit.}}$ im Zusammenhang mit der Übersättigung als thermodynamische Antriebskraft für die Keimbildung. Neben thermodynamischen Aspekten beeinflusst die Übersättigung auch die Kinetik der Keimbildungsprozesse, die mit einem Arrhenius-Ansatz näherungsweise beschrieben werden kann.^[5]

$$J = A \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G_{\text{krit.}}}{k_B T}\right) \quad (1.10)$$

Dieser Ausdruck definiert die Keimbildungsrate J und zeigt die Wahrscheinlichkeit, mit der die „Schwellenenergie“ $\Delta G_{\text{krit.}}$ überschritten werden kann. Die klassische Keimbildungstheorie wird aufgrund der einfachen Struktur häufig als Ausgangspunkt zur Erklärung von Keimbildungsereignissen herangezogen. Dennoch ist zu bedenken, dass die vielen Annahmen und Vereinfachungen, wie die Modellierung des Keims als perfekte Kugel, die Vernachlässigung von Entropieeffekten, die größenunabhängige Volumen- und Oberflächenenergie sowie die Beschreibung des Nukleationsprozesses als Fließgleichgewicht, keine quantitative Aussage erlauben und experimentell bestimmte Keimbildungsraten oft um

Größenordnungen abweichen.^[6-10] Für eine korrekte Modellierung der Keimbildung als hochdynamischen Prozess ist eine umfassendere Theorie erforderlich.

Heterogene Keimbildung

Die heterogene Keimbildung wird durch „fremde Phasen“ wie Oberflächen und Grenzflächen von Gefäßwänden, Templaten oder Verunreinigungen induziert. Zur Beschreibung von heterogenen Keimbildungsereignissen ist ein Ansatz ähnlich der homogene Keimbildung möglich.^[11] Allerdings erfordert die Modellierung der heterogenen Keimbildung die Berücksichtigung aller Oberflächenwechselwirkungen des Systems.

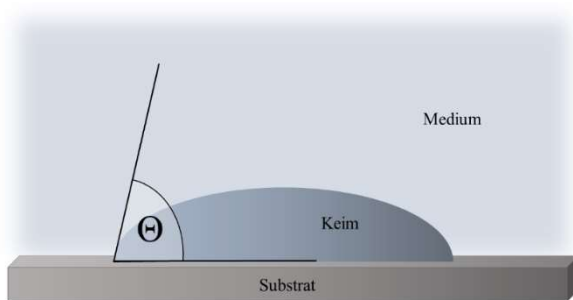


Abb. 1 - 3 Heterogene Keimbildung. Entscheidend für den Kontaktwinkel θ sind die spezifischen Oberflächenspannungen γ zwischen den jeweiligen Grenzflächen Keim-Medium (km), Substrat-Medium (sm), Keim-Substrat (ks).

Abbildung 1-3 zeigt, dass ein mit einer Oberfläche im Gleichgewicht stehender Keim einen Kontaktwinkel θ bildet, der mithilfe der Youngschen Gleichung definiert werden kann.

$$\cos \theta = \left(\frac{\gamma_{sm} - \gamma_{ks}}{\gamma_{km}} \right) \quad (1.11)$$

Ähnlich der homogenen Keimbildung kann für die heterogene Keimbildung unter Beachtung aller Wechselwirkungen geschrieben werden

$$\Delta G_H = V \Delta G_V + A_{km} \gamma_{km} - A_{ks} (\gamma_{sm} - \gamma_{ks}) \quad (1.12)$$

$$\Delta G_H = V \Delta G_V + A_{km} \gamma_{km} \left(1 - \frac{A_{ks}}{A_{km}} \cdot \frac{\gamma_{sm} - \gamma_{ks}}{\gamma_{km} \cos \theta} \right) \quad (1.13)$$

mit dem Volumen V , der Grenzfläche A , sowie der Grenzflächenenergie γ zwischen Keim und Medium (km), Substrat und Medium (sm) sowie Keim und Substrat (ks). Im Vergleich zur homogenen Keimbildung der klassischen Keimbildungstheorie wird der Volumenterm ebenso wie der Oberflächenterm bei Benetzung reduziert. Gleichzeitig müssen zwei zusätzliche Beiträge der Grenzflächenenergie, (1) die neue Grenzfläche zwischen Keim und Substratoberfläche (ks) sowie (2) der Verlust der Flüssigkeitsgrenzflächenwechselwirkung zwischen Substrat und umgebenden Medium (sm) beachtet werden (Abb. 1-3).

Anhand dieser Gleichung wird ersichtlich, dass die Abweichungen zur homogenen Keimbildung durch die Werte der Grenzflächenenergie (zweiter Term in der Klammer) bestimmt wird. Die Keimbildungsenergie der heterogenen Keimbildung verringert sich demnach, wenn die Wechselwirkungen der Substratoberfläche und dem Keim gegenüber den Wechselwirkungen der Substratoberfläche mit dem umgebenden Medium energetisch begünstigt sind, d.h.

$$-1 < \frac{\gamma_{sm} - \gamma_{ks}}{\gamma_{km}} > 1 \quad \text{bzw.} \quad \frac{\gamma_{sm} - \gamma_{ks}}{\gamma_{km}} > 1 \quad (1.14)$$

Im Fall von $\frac{\gamma_{sm} - \gamma_{ks}}{\gamma_{km}} < -1$, dominiert die homogene Keimbildung.

Eine Trennung beider Prozesse ist im experimentellen Aufbau oftmals kaum möglich, lediglich kann ein spezifischer Keimbildungsprozess durch die Wahl entsprechender Bedingungen gefördert werden. Die heterogene Keimbildung dominiert, wenn günstige Wechselwirkungen durch die Beschaffenheit der Substratoberfläche (z.B. entgegengesetzte Oberflächenladung^[12], Komplexierung von Ionen durch funktionelle Gruppen^[13]) vorhanden sind. Wird durch Erhöhung der Grenzflächenenergie die heterogene Keimbildung unterdrückt, so ist bei hoher Übersättigung die homogene Keimbildung begünstigt.

1.1.2. Ostwald-Volmer-Regel

Die nach dem Chemiker Wilhelm Ostwald und dem Physikochemiker Max Volmer benannten Regeln dienen als Konzept um komplexe Kristallisationsvorgänge polymorpher Verbindungen besser zu verstehen. Der Begriff ‚Polymorphismus‘ beschreibt die Existenz fester Verbindungen mit chemisch identischer Zusammensetzung und unterschiedlicher Kristallstruktur.^[1] Die verschiedenen Modifikationen haben je nach ihrer Struktur unterschiedliche Volumenenergien und Oberflächenenergien. Trotz des Vorkommens mehrerer Modifikationen stellt immer nur eine Modifikation die thermodynamisch stabile Phase im energieärmsten Zustand dar, und zeichnet sich in der Regel durch die höchste Dichte, realisiert durch attraktive Wechselwirkungen und dichteste Packung, aus. Metastabile Modifikationen sind hingegen weniger dicht und wandeln sich in Abhängigkeit der Bedingungen auf verschiedenen Zeitskalen in das thermodynamische Endprodukt um.^[14] In Abb. 1-4 ist der Polymorphismus des Calciumcarbonatsystems dargestellt.

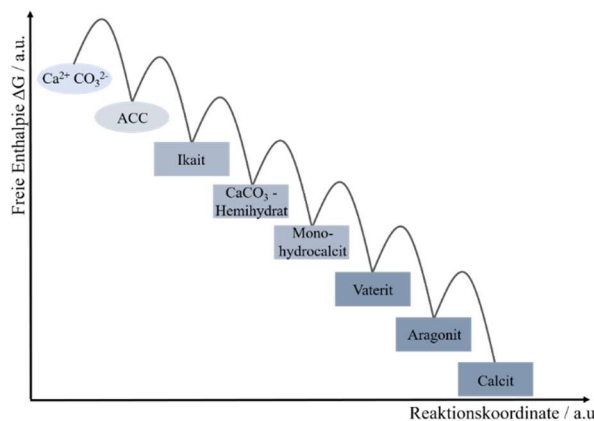


Abb. 1 - 4 Polymorphismus von Calciumcarbonat. Die Modifikationen sind hinsichtlich der freien Enthalpie geordnet. Amorphes Calciumcarbonat (aCC) als die am wenigsten stabile Modifikation. Ikait, Calciumcarbonat-Hemihydrat und Monohydrocalcit sind metastabile kristalline Hydrate. Vaterit ist die wasserfreie metastabile Modifikation, Aragonit stellt die Hochdruckphase und Calcit die thermodynamisch stabile Phase bei Umgebungsbedingungen dar.

Die Ostwaldsche Stufenregel besagt, dass die Kristallisation eines polymorphen Systems nicht unmittelbar zum energetisch niedrigsten Zustand führt, sondern metastabile Zwischenprodukte mit höherer Bildungsenthalpie gebildet werden. Zusätzlich wird bei energetisch ähnlichen Systemen zunächst die Modifikation mit der geringsten Dichte bevorzugt. Diese Annahme ist als Ostwald-Volmer-Regel bekannt und beinhaltet, dass bei weniger dichten Modifikationen die notwendige Anzahl an Monomeren zum Erreichen des kritischen Radius geringer ist. Im Calciumcarbonatsystem nukleiert bei ausreichender Übersättigung zunächst die löslichste Phase geringster Dichte – das amorphe Calciumcarbonat aCC. Durch anschließende Phasenumwandlung geht aCC stufenweise, über die metastabilen Phasen Vaterit und Aragonit, in das thermodynamisch stabile Produkt, den Calcit über.^[15] Die verschiedenen hydratisierten Modifikationen, die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung von den wasserfreien Pendanten unterscheiden, werden nicht berücksichtigt. Dieses Beispiel veranschaulicht, dass die Konzepte von Ostwald und Volmer eher als Faustregel mit möglichen Abweichungen statt als allgemeingültige Gesetze zu verstehen sind.

1.1.3. 2-Stufen Nukleation

Der zweistufige Nukleationsweg teilt die Keimbildung in zwei separate Prozesse, (i) die Bildung eines Tröpfchens dichter Flüssigkeit, die im Bezug auf den kristallinen Zustand metastabil ist, sowie (ii) die (Keim-)Bildung eines periodischen Kristalls innerhalb der dichten Flüssigkeit.^[16] Dabei soll im Allgemeinen die Bildung eines Kristalls aus Lösung als die Änderung zweier Ordnungsparameter, der Konzentration und der Struktur, betrachtet werden. Nach der klassischen Keimbildungstheorie muss angenommen werden, dass für die Entstehung eines Keims aus einer Lösung Konzentrations- und Strukturfluktuationen, also ein Übergang entlang beider Ordnungsparameter, simultan erfolgen muss. Die 2-Stufen Nukleation beinhaltet

hingegen einen sequentiellen Pfad, in dem der Übergang entlang der beiden Ordnungsparameter nacheinander verläuft. Durch die lokale Verdichtung der solvatisierten Monomere wird zunächst die Bildung eines Tropfens dichter Flüssigkeit induziert und anschließend durch eine nachfolgende Ordnung ein kristalliner Keim innerhalb dieses Tropfens gebildet. Es wird angenommen, dass dieser Ordnungsprozess durch kleine Fluktuationen in der dichten Flüssigkeit und die Agglomeration vororientierter Monomerpaare abläuft. Abb. 1-5 zeigt das Enthalpiediagramm der beiden möglichen Pfade zur Bildung eines Kristalls aus Lösung nach der 2-Stufen Nukleation *via* dichte Flüssigkeit.^[17]

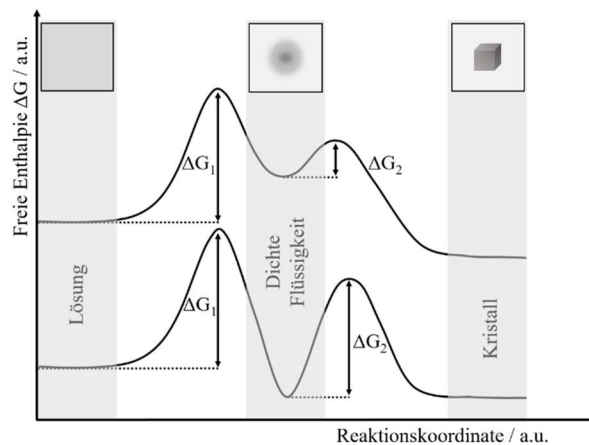


Abb. 1 - 5 Enthalpiediagramm der 2-Stufen Nukleation. Für die Bildung der dichten Flüssigkeits bzw. für die Kristallisation treten zwei Keimbildungsbarrieren auf. Die dichte Flüssigkeit kann metastabil (a) oder stabil (b) in Bezug auf die Lösung sein. Basierend auf [16].

Zur Bildung eines Kristalls nach dem Konzept der zweistufigen Nukleation müssen schrittweise zwei Energiebarrieren überwunden werden, deren Maxima im Vergleich zur klassischen Keimbildungstheorie niedriger sein sollten. Die beiden Minima charakterisieren die Bildung der dichten Flüssigkeit als Folge von Dichteschwankung, sowie die Bildung des Kristallisationskeims durch Strukturierung der dichten Flüssigkeit. Die Lage des Minimums der dichten Flüssigkeit zeigt, dass die dichte Phase sowohl stabil als auch metastabil (Dichteschwankung von begrenzter Lebensdauer) gegenüber der Ausgangslösung sein kann. Je nach Gegebenheit können demnach makroskopische Tröpfchen der dichten Flüssigkeit (stabil) oder flüssigkeitsähnliche Cluster (metastabil) mit anschließender Kristallisation gebildet werden.^[18–20] Der 2-Stufen Mechanismus wurde zunächst zur Beschreibung des Kristallisationsverhalten von Proteinen postuliert, ist aber auch auf die Kristallisation niedermolekularer organischer und anorganischer Substanzen, sowie Biomineralen anwendbar.^[21–23]

1.1.4. Amorphe Zwischenprodukte

Die Kristallisation über metastabile amorphe Phasen verschiedener Systeme (z.B. Phosphate,^[24] Carbonate,^[25,26] Siliciumdioxid^[27]) ist sowohl aus der chemischen Herstellung als auch der Biomineralisation bekannt. Insbesondere das Calciumcarbonatsystem ist aufgrund des biogenen amorphen Calciumcarbonats (aCC) als Vorläuferkomponente zur Bildung verschiedener Biominerale von Bedeutung.^[25] Eine Vielzahl von Studien zeigen, dass amorphes biogenes aCC wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Bildung fester Strukturen, sowohl in Wirbeltieren als auch bei Wirbellosen, spielt.^[28-30] Darüberhinaus gewinnt die Forschung zunehmend Kenntnis über die Stabilisierung dieser transienten amorphen Phasen.^[31,32] Der Kristallisationsweg ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Allgemeinen kann die Bildung einer amorphen Phase durch hohe Übersättigung gefördert werden. Bei ausreichend hoher Übersättigung folgt die Ausfällung metastabiler amorpher Phasen der Ostwald-Volmer-Regeln sowie der klassischen Keimbildungstheorie. Die amorphe Phase ist weniger dicht, die zusätzliche Hydratisierung führt zu attraktiven Wechselwirkungen mit der umgebenden Phase und sollte in einer niedrigen Keimbildungsbarriere resultieren. Für den weiteren Kristallisationsverlauf fanden verschiedene Theorien Anwendung. Jacobson *et al.*^[33] formulierten für die Bildung von Clathraten einen Mechanismus analog zu dem zweistufigen Mechanismus der Kristallisation von Proteinen und Kolloiden. Der amorphe Clathratkern entspricht dabei einer dichten Flüssigkeit, die sich als ausreichend große Cluster aus der Lösung bilden und anschließend durch Reorganisation zu einer geordneten Struktur, dem kristallinen Clathrat, übergehen. Ein weiterer Ansatz beschreibt die Auflösung der amorphen Phase, gefolgt von einer Rekristallisation zu kristallinen Modifikationen.^[34] Die Ausfällung der amorphen Phase führt so zu einer verringerten Übersättigung des Systems, sodass sich das System einem Gleichgewichtszustand nähert. Die Abnahme der Monomerkonzentration in Lösung führt letztlich zur Bildung des thermodynamischen Produktes und gleichzeitig zu einer Auflösung der amorphen Phase, da Monomere aus der Lösung für die Bildung kristalliner Phasen verbraucht werden.

1.1.5. Kristallwachstum

Das Kristallwachstum, als weiterer Teilprozess der Kristallisation, schließt sich an die Keimbildung an und beschreibt die Bildung des endgültigen Kristalls. Die Triebkraft für das Kristallwachstum wird dabei durch die kritische Monomerkonzentration in Abhängigkeit des Löslichkeitsproduktes der entstehenden kristallinen Phase, limitiert. Neben dem Modell des klassischen Kristallwachstums, das auf der schichtweisen Anlagerung von Monomeren basiert,

werden auch nicht-klassische Ansätze, wie die partikelvermittelte Aggregation im Folgenden kurz erläutert.

Klassisches Kristallwachstum

Das Wachstum eines Kristalls erfolgt durch die Adsorption einzelner Bausteine am Kristall und durchläuft generell mehrere Schritte:

- i. Transport des Bausteins/der Baueinheit zur Kristalloberfläche und Adsorption
- ii. Diffusion auf der Kristalloberfläche bis zur Wachstumsstufe
- iii. Diffusion entlang der Wachstumsstufe und finale Adsorption
- iv. Freisetzung Adsorptionswärme und Lösungsmittelmoleküle

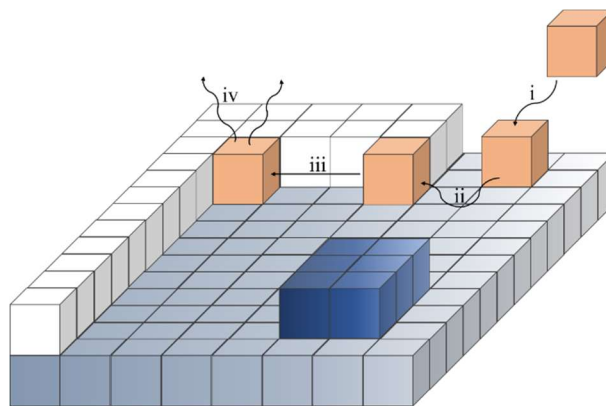


Abb. 1 - 6 Schematische Darstellung des Kristallwachstums nach der klassischen Theorie. Nach Adsorption an der Oberfläche diffundiert der Baustein zu einer Stufenkante oder einem Knick. An diesen Positionen ist der Einbau in den Kristall energetisch begünstigt, da die relative Zunahme der Oberflächenenergie minimiert wird. Daraus resultiert schichtweises Wachstum des Kristalls sowie die Bildung von Terrassen. Bei hohen Übersättigungen kann auch Inselwachstum auf flachen Oberflächen beobachtet werden.

Die Oberfläche eines wachsenden Kristalls findet nicht einheitlich statt, sodass die Anlagerung eines Kristallbausteins an verschiedenen Stellen zu unterschiedlichen Energiegewinnen führt. Demnach resultieren aus der spezifischen Oberfläche eines Kristalls bevorzugte Positionen für den Einbau des nächsten Bausteins und führt nach Adsorption an der flachen Oberfläche (kinetisch begünstigt) zur Diffusion des Bausteins entlang der Oberfläche. Erst beim Erreichen einer günstigen Position, in der mehr Bindungen zu benachbarten Bausteinen als auf der ebenen Flächen gebildet werden können (z.B. Stufe oder Kante), wird der Baustein ins Kristallgitter integriert. Der beschriebene Wachstumsprozess führt somit zur Bildung von Terrassen, deren Wachstumsfront eine neue Schicht auf der Kristalloberfläche bildet. Bei hoher Übersättigung können sich durch zweidimensionale Keimbildungsereignisse Inseln auf der Kristalloberfläche bilden.^[35] Das Absinken der Monomerkonzentration durch das Kristallwachstum unter die Übersättigung führt zum Wachstumstopp. Lediglich wenn die Kristalle eine ausreichend hohe Löslichkeit aufweisen kann ein anderer Prozess die Kristallgröße nachträglich beeinflussen. Es

können sich beispielsweise kleine Kristalle aufgrund der höheren Oberflächenenthalpie und des energetisch ungünstigen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses zugunsten größerer Kristalle mit der Zeit auflösen. Dementsprechend wachsen größere Kristalle auf Kosten der Kleineren – dieses Phänomen wird Ostwald-Reifung genannt.^[14]

Nicht-klassisches Kristallwachstum

Eine Vielzahl von Kristallen weisen eine komplexe Kristallmorphologie auf, die sich nicht durch schichtweises Wachstum kristalliner Einheiten erklärt werden können. Solche Nicht-Gleichgewichtsmorphologien (wie z.B. Nanofasern, Stäbchen) entstehen bevorzugt unter den Bedingungen des Nicht-klassischen Kristallwachstums. Während nach dem klassischen Modell das Kristallwachstum durch die Anlagerung einzelner Moleküle an den wachsenden Kristall erfolgt, werden nach dem Nicht-klassischen Ansatz primäre Nanopartikel gebildet, die sich anschließend selbst anordnen.^[36,37]

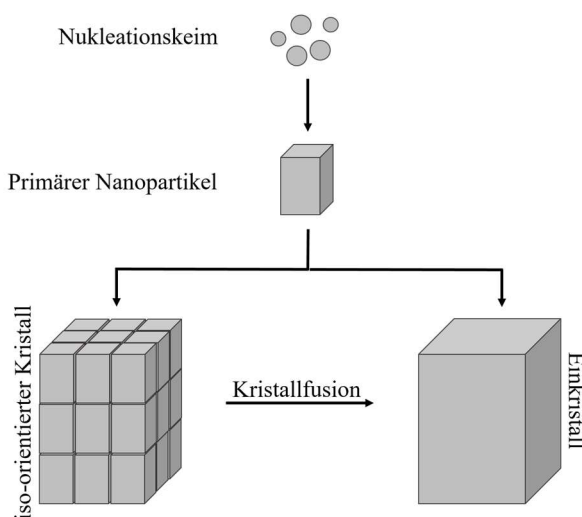


Abb. 1 - 7 Nicht-klassisches Kristallwachstum. Nukleationskeime bilden primäre Nanopartikel, die entlang einer speziellen kristallographischen Achse zu einem iso-orientierten Kristall (Mesokristall) agglomerieren. Durch strukturdirigierende Kristallfusion entstehen Einkristalle. Basierend auf [36].

Das Wachstum durch orientierte Anlagerung stellt einen alternativen Prozess zur Ostwald-Reifung dar, und dient führt zur Minimierung der Oberflächenenergie der Nanopartikel bzw. der Gesamtenergie des Systems. Dieser Wachstumsmechanismus dominiert bevorzugt bei hoher Übersättigung sowie in Gegenwart von stabilisierenden Additiven, die die Oberflächenenergie der Nanopartikel reduzieren. Zusätzlich wird das Wachstum bei orientierter Anlagerung durch eine vergleichsweise geringe Löslichkeit begünstigt. So entstehen durch die Selbstorganisation der Nanopartikel kristalline Überstrukturen (s.g. Mesokristalle), die sich entlang einer gemeinsamen kristallographischen Achse ausrichten. Die Ausrichtung der Untereinheiten führt zu einem Beugungsmuster, vergleichbar mit dem Beugungsmuster eines Einkristalls. Lediglich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die tektonischen

Untereinheiten erkennbar. Demnach wird ein Mesokristall über die Kombination der Eigenschaften eines Einkristalls als auch der Nanopartikel charakterisiert.^[38,39]

1.2. Biomineralisation und Biominerale

1.2.1. Biomineralisation

Die Biomineralisation umfasst die Bildung von Mineralkompositen mit vielfältigen Strukturen und maßgeschneiderten Eigenschaften durch lebende Organismen aller Art. Sowohl Wirbellose als auch Wirbeltiere verwerten Metallionen aus ihrer Umgebung um entsprechende Skelett- und Stützelemente oder Mineralspeicher mit metabolischer Regulationsfunktion zu konstruieren.^[40,41] Das vielfältige Vorkommen erfordert morphologisch komplexe Biominerale, deren Kristallisationsprozesse unter sehr effizienten Organisations- und Kontrollmechanismen ablaufen.^[42,43] Regulationsprozesse wie beispielsweise der transmembrane Ionenfluss, pH-Wert Änderungen, (De-)Komplexierung von Ionen sowie der enzymatisch katalysierte Gasaustausch können zu einer lokal hohen Übersättigung und somit zu einer kinetischen Steuerung der Kristallisationsvorgänge führen.^[40] Zusätzlich werden Makromoleküle/Biopolymere produziert, die die hohe Aktivierungsenergie des Kristallisationsprozesses herabsetzen und deren Anlagerung an bestimmte Kristallflächen zu einer Verringerung der Grenzflächenenergie und folglich zur Exponierung dieser Kristallflächen führt.^[44] Wie bereits in Kapitel 1.1.5. beschrieben, dominiert unter diesen Bedingungen und in Gegenwart stabilisierender Additive die Selbstorganisation durch orientierte Anlagerung den Kristallwachstumsprozess des entstehenden Kristalls. Die Entstehung von Mesokristallen wurde 2012 erstmal von Cölfen *et al.*^[45] in biologischer Erscheinungsform belegt und scheint entscheidend für die Bildung von Biomineralen mit einem breiten Spektrum an potentiellen Morphologien zu sein. Somit kann der Prozess der Biomineralisation in fünf Teilschritte untergliedert werden: (i) die Kontrolle der Keimbildung (ii) die Kontrolle des Kristallwachstums (iii) die Kompartimentierung (iv) die Bildung des anorganisch-organischen Kompositmaterials (v) die Selbstorganisation zu größeren Aggregaten. Diese Kontrollmechanismen sowie der Einfluss von Biomolekülen erschweren die Nachahmung bzw. die biomimetische Kristallisation *in vitro*.

Biominerale - Calciumcarbonat

Calciumcarbonat gilt als eines der häufigsten Biominerale in Lithosphäre und Biosphäre der Erde.^[46] Das globale Vorkommen umfasst hauptsächlich Gesteine der Erdkruste wie beispielsweise Kreide, Kalkstein und Marmor als auch Biominerale, die zur Bildung von dauerhaften und transistenten Endo-/Exoskelett oder intra-/extrazellulären Speicherdepots

beitragen.^[47-50] Dabei zeigen biogene Calciumcarbonatkristallite häufig einzigartige Morphologien, die aufgrund des Kristallisationsgeschehens *in vivo* stark von den Gleichgewichtsstrukturen abweichen.^[1] Im Nachfolgenden wird der ausgeprägte Polymorphismus unter Beachtung der für diese Arbeit relevanten kristallinen und amorphen Spezies von Calciumcarbonat ausführlicher betrachtet. Es existieren fünf kristalline Modifikationen von Calciumcarbonat – drei wasserfreie polymorphe Phasen (Vaterit, Aragonit, Calcit) sowie drei wasserhaltige pseudopolymorphe Phasen (Monohydrocalcit, Ikait, Calciumcarbonat-Hemihydrat) – und amorphe^[28] Spezies. Der Kristallisationsprozess lässt sich durch den breiten Löslichkeitsbereich der verschiedenen Modifikationen, die pH-Abhängigkeit des Systems und die reversible Hydratation des Calcium-Ions vielfältig beeinflussen.^[51]

i. Amorphes Calciumcarbonat aCC

Die direkte Bildung von synthetischem aCC gelingt, in Übereinstimmung mit der Ostwald-Vollmer-Regel, bei hoher Übersättigung und weist von allen Calciumcarbonat-Modifikationen die höchste Löslichkeit auf ($4,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol}^2 \text{ l}^{-2}$).^[52] Die Umwandlung in die kristallinen Modifikationen erfolgt in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen über Vaterit/Aragonit zur thermodynamisch stabilsten Modifikation, dem Calcit, über einen Auflösungs- und Rekristallisationsprozess in kürzester Zeit.^[15] Eine Stabilisierung der amorphen Phase kann durch den Einbau von Fremdionen, vor allem Magnesiumionen,^[53] sowie stabilisierende Additive (z.B. Aminosäuren) erreicht werden. Die signifikante Erhöhung der Stabilität durch den Einbau von Mg^{2+} wird durch die höhere Hydratationsenergie (des Mg^{2+} im Vergleich zu Ca^{2+}) und die damit verbundene hohe Barriere für die Umwandlung des magnesiumreichen aCCs in die wasserfreien kristallinen Modifikationen begründet. Ähnliche Stabilisierungsmechanismen sind in biogenem aCC zu finden, dessen Bedeutung in biologischen Kristallisationsprozessen zunehmend wächst. Die stabilisierende Wirkung von biologischen Makromolekülen aller Art, Wasser, Membranen (z.B. Einschluss in Vesikel) sowie ionische Bestandteile, darunter auch Metabolite wie anorganisches Phosphat oder Citrat, ermöglichen das vielseitige Auftreten von aCC *in vivo*.^[54-56] Dabei dient aCC oftmals als Vorstufe für kristallines Calciumcarbonat^[57] aber auch als Bestandteil strukturgebender Biominerale (z.B. calcitische Sklerite bei Schwämmen, Zystolithe bei Pflanzen)^[58,59] oder als Calciumcarbonat-Reservoir (z.B. bei Regenwürmern)^[60,61]. Es wird angenommen, dass die jeweiligen Additive in biogenem aCC genetischer Kontrolle unterliegen und letztlich unterschiedliche Nahordnungen induzieren, die die entstehende kristalline Phase entscheiden.^[28,62] Der genaue Mechanismus der

Additiv-Mineral-Wechselwirkung bzw. deren Einfluss auf den Kristallisationsprozess *in vivo* ist noch nicht vollständig verstanden.

ii. Vaterit

Vaterit gilt als die am wenigsten stabile wasserfreie kristalline Modifikation des Calciumcarbonatsystems und zeigt in Lösung gemäß der Ostwald-Volmer-Regel eine schnelle Phasenumwandlung zu energetisch niedrigeren Zuständen. Während die Struktur der kristallinen Modifikationen gänzlich bekannt ist, existieren für Vaterit nach aktuellem Stand eine Vielzahl von Strukturmodellen.^[63] Das von Mugnaioli *et al.*^[64] vorgeschlagene Strukturmodell zeigt eine monokline Einheitszelle mit zwei unterschiedlichen Positionen des Calcium-Ions.

Tab. 1 - 1 Kristallographische Daten von Vaterit.^[64]

Raumgruppe	$C2/c$ – monoklin, $Z = 12$
Gitterparameter	$a = 12.1700 \text{ \AA}$, $b = 7.1200 \text{ \AA}$, $c = 9.4700 \text{ \AA}$ $\beta = 118.3700^\circ$
Dichte ρ	$2,65 \text{ g/cm}^3$
Löslichkeitsprodukt $K_{sp}(25^\circ\text{C})$ ^[65]	$1,22 \cdot 10^{-8} \text{ mol}^2/\text{L}^2$

Das natürliche Vorkommen von Vaterit in Lithosphäre und Biomineralisation ist nur von geringer Bedeutung. Aufgrund der relativ hohen Löslichkeit dient der Vaterit hauptsächlich als Präkursor zur Bildung von biogenem Aragonit oder Calcit.^[66–68] Nur wenige Beispiele belegen die Existenz von Vaterit als strukturellen Bestandteil von Biomineralen, häufig in Coexistenz mit Aragonit oder Calcit (z.B. Statolithen und Otolithen, Schalen von Weichtieren).^[1]

iii. Calcit

Calcit ist die thermodynamisch stabile Modifikation des Calciumcarbonat-Systems. Aufgrund des energiereichsten Zustandes im thermodynamischen Minimum des Systems wandeln sich alle Calciumcarbonat-Modifikationen unter entsprechenden Bedingungen sukzessiv in Calcit um. Die Calcit-Kristallite weisen eine rhomboedrische Morphologie mit abwechselnden Schichten von Calcium- und Carbonat-Ionen auf.^[69]

Tab. 1 - 2 Kristallographische Daten von Calcit.^[69]

Raumgruppe	$R\bar{3}c$ – trigonal, $Z = 6$
Gitterparameter	$a = 4.9920 \text{ \AA}$, $c = 17.0690 \text{ \AA}$
Dichte ρ	$2,70 \text{ g/cm}^3$
Löslichkeitsprodukt $K_{sp}(25^\circ\text{C})$ ^[65]	$3,31 \cdot 10^{-9} \text{ mol}^2/\text{L}^2$

Biogener Calcit ist eines der meistverbreiteten Polymorphe von Calciumcarbonat in der Natur und ist in verschiedensten Bereichen vorzufinden. Als gesteinsbildendes Mineral ist der mengenmäßig größte Anteil auf Gesteinsablagerungen in Form von Kreide und Kalkstein,^[46] aber auch durch alternierende Substitution (von Ca^{2+} durch Mg^{2+}) entstandenes Dolomit zurückzuführen. Außerdem bestehen die Schalen von Hühner-, Vogel- oder Reptilieneiern,^[1,70] sowie das Exoskelett von Muscheln^[71] und andere marine Organismen (Kalkalge, Korallen)^[72,73] überwiegend aus Calcit.

Biomminerale – Calciumorthophosphat

Die Chemie der Calciumphosphate ist überwiegend in lebenden Organismen und weniger im Bereich der Gesteinsbildung von Bedeutung. Insbesondere Wirbeltiere nutzen die Merkmale des Phosphatsystems zur Bildung des Skeletts bzw. von Stützstrukturen. Hierzu wird, neben anderen biochemischen Regulationsmechanismen, die pH-Abhängigkeit des Protolysegleichgewichtes des Systems sowie der breite Löslichkeitsbereich der verschiedenen Calciumphosphatverbindungen zur Regulierung der Mineralisierung *in vivo* und somit der Phosphathomöostase genutzt.^[74] Biogene Calciumphosphate, überwiegend Calciumorthophosphate, sind wichtige Bestandteile von physiologischem Hartgewebe wie Knochen, Knorpel und Zähnen. Eine lokale Übersättigung kann jedoch auch zu einer ektopischen Mineralisierung von Calciumphosphat in Form von atherosklerotischen Ablagerungen, Harnsteinen oder Zahnstein führen. Die *in vivo* Mineralisation unter milden Bedingungen führt zu niedrig kristallinen Apatitphasen und oftmals zur Substitution von

Calcium- oder Phosphationen im Gitter.^[41,44,75] In Tabelle 1-3 sind die Eigenschaften von biologisch-relevanten Calciumorthosphosphaten gelistet.

Tab. 1 - 3 Eigenschaften von biologisch-relevanten Calciumorthosphosphaten.^[75]

	molares Ca:P- Verhältnis	-log (K _{sp} (25°C))	Dichte ρ / g/cm ³	pH-Stabilitätsbereich (25°C, wässrige Lösung)
Monocalcium-phosphat- Monohydrat (MCPM) Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	0,5	1,14	2,23	0,0 – 2,0
Monocalcium-phosphat-Anhydrat (MCPA) Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,5	1,14	2,58	–
Dicalcium-phosphat-Dihydrat (DCPD, Brushit) CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1,0	6,59	2,32	2,0 – 6,0
Dicalcium-phosphat-Anhydrat (DCPA, Monetit) CaHPO ₄	1,0	6,90	2,89	–
Octacalcium-phosphat (OCP) Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1,33	96,6	2,61	5,5 – 7,0
α-Tricalcium-phosphat (α-TCP) α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	25,5	2,86	–
β-Tricalcium-phosphat (β-TCP) β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	28,9	3,07	–
Amorphes Calciumphosphat (aCP) Ca _x (PO ₄) _y ·nH ₂ O	1,2-2,5	≈ 25-33	–	–
Hydroxylapatit (HA) Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	116,8	3,16	9,5 – 12,0
Tetracalciumphosphat (TTCP) Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2,0	38-44	3,05	–
Carbonathaltiger Hydroxylapatit (HCA) A-Typ Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH, CO ₃) ₂ B-Typ Ca ₁₀ (PO ₄ , CO ₃) ₆ (OH) ₂	–	–	–	6,5 – 9,5

Die für diese Arbeit relevanten Calciumphosphatverbindungen werden im Nachfolgenden zusätzlich kurz beschrieben.

i. Amorphes Calciumphosphat aCP

Entsprechend der Ostwald-Vollmer Regel bildet sich bei der Fällung von Calciumphosphaten aus Lösungen hoher Übersättigung zunächst das kinetisch begünstigte Produkt, das amorphe Calciumphosphat aCP. Dabei variiert die Zusammensetzung von aCP in Abhängigkeit der Synthese- bzw. Fällungsbedingungen (pH-Wert, Konzentrationen) durch die Änderung des entstehenden Ca/P-Verhältnisses. In der Literatur existieren amorphe Calciumphosphat-Phasen mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,18 bis 2,5,^[76–78] die sich im Wesentlichen in ihrer Stabilität unterscheiden. In sauren Lösungen führt der Einbau von HPO_4^{2-} (statt PO_4^{3-}) zu einer Verringerung des Ca/P-Verhältnis und somit zu instabilen amorphen Phasen, die sich leicht in kristalline Modifikationen umwandeln.^[76] Die Struktur von aCP sowie der Transformationsprozess in die kristallinen Phasen ist bis heute nicht eindeutig verstanden. Erste Ansätze von Posner *et al.*^[24] basieren auf der Beschreibung der strukturellen Grundeinheit als annähernd kugelförmige Cluster (Posner-Cluster) der Zusammensetzung $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ und einem gemittelten Durchmesser von 9,5 Å. Es wird angenommen, dass die Reorganisation und stufenweise Zusammenlagerung der in Lösung gebildeten Posner-Cluster zur Bildung von Apatit-Kristallen führt.^[75] Transformationsprozesse nach diesem Mechanismus würden jedoch keine Änderungen der chemischen Zusammensetzung sowie des Ca/P-Verhältnisses erlauben. Weitere Ansätze basieren auf Auflösungs- und Rekristallisationsprozessen oder einer oberflächenvermittelten Umwandlung durch Hydrolyse und anschließender Keimbildung der Apatitkristalle an der Oberfläche der aCP-Agglomerate. In einem von Eanes *et al.*^[78] beschriebenen Mechanismus stehen Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse im Vordergrund, die im Einklang mit der Ostwaldschen Stufenregel unter neutralen Bedingungen zur Bildung von Octacalciumphosphat und durch anschließende topotaktische Reaktion zur Bildung von Apatit führen. Puech *et al.*^[79] beschrieben hingegen einen oberflächenvermittelten Transformationsprozess, der durch Hydrolyse an der Oberfläche der aCP-Agglomerate zur Keimbildung von Apatit führt. Das Kristallwachstum wird anschließend durch die Migration der Ionen an der Oberfläche gefördert. Diese Mechanismen unterstützen mögliche Änderungen des Ca/P-Verhältnisses beim Übergang von der amorphen zur kristallinen Modifikation und zudem den Einbau von Fremdionen aus dem Mediums. Biogenes aCP wird vorallem als transiente amorphe Mineralvorläuferphase in Knochen- und Zahnmineralen diskutiert, sodass Calciumphosphatzemente und bioaktive Komposit-Materialien auf Calciumphosphatbasis in medizinischen Bereichen von aktuellem Interesse sind.

ii. Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (HA) ist die thermodynamische stabile Modifikation des Calciumorthosphosphatsystems und kristallisiert bei Raumtemperatur in einem monoklinen Kristallsystem der Raumgruppe $P2_1/b$. Eine thermisch induzierte Phasenumwandlung findet oberhalb von 250°C zu einem hexagonalen Kristallsystem der Raumgruppe $P6_3/m$. Die hexagonale Struktur kann jedoch auch durch Substitutionen von Fremdionen im Kristallgitter (z.B. CO_3^{2-} , F^-) bei Raumtemperatur stabilisiert werden. Dieser nichtstöchiometrische („biologische“) Apatit bildet die Hauptkomponente von Knochen- und Zahnmineral.^[1] Aufgrund der chemischen und strukturellen Ähnlichkeit sowie der bioaktiven Eigenschaften findet stöchiometrisch reiner HA zunehmend Anwendung als Implantatmaterial in der Mund-Kiefer-Chirurgie.

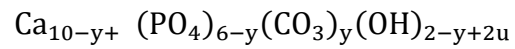
Tab. 1 - 4 Kristallographische Daten von Hydroxylapatit.^[75,80]

Raumgruppe	$P2_1/b$ – monoklin, $Z = 4$ $P6_3/m$ – hexagonal, $Z = 2$
Gitterparameter	$a = 9.8421 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6.8814 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$ (monoklin) $a = b = 9.4302 \text{ \AA}$, $c = 6.8911 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$ (monoklin)
Dichte ρ	2,70 g/cm ³
Löslichkeit K_{sp} (25°C) ^[80]	mol ² /L ²

iii. Carbonathaltiger Hydroxylapatit (*Hydroxycarbonate apatite*, HCA)

Die in Abschnitt 1.2.1. ii) bereits beschriebene strukturelle Flexibilität des Hydroxylapatit-Gitters gegenüber Substitutionen erlaubt das Vorkommen des carbonathaltigen Hydroxylapatits. In Abhängigkeit der Substitutionsposition werden zwei Arten des carbonathaltigen Hydroxylapatits unterschieden.^[81,82] Der A-Typ von HCA zeigt eine Substitution der Hydroxid-Gruppe gegen die Carbonat-Gruppe und wird bevorzugt bei hohen Temperaturen gebildet. Im Gitter des B-Typ HCA werden tetraedrische Phosphat-Gruppen gegen trigonal-planare Carbonat-Gruppen ersetzt, dessen Bildung in wässrigem Medium bevorzugt wird. Als Folge dieser Substitutionen resultiert eine Änderung der Ladungssituation die durch Gitterfehlstellen kompensiert wird. Kühl und Nebergall^[83] postulierten einen ersten Lösungsansatz zum Ladungsausgleich, basierend auf der Annahme,

dass eine Substitution zur Erzeugung von Calcium und Hydroxy-Leerstellen führt. Die daraus resultierende allgemeine Summenformel lautet



Zusätzlich können aufgrund des nicht-stöchiometrischen Charakter von HCA mögliche Fremdionen (Na^+ , F^- , Cl^- ,) sowie Kristallwasser in das Gitter eingebaut werden. Die damit verbundene Ähnlichkeit zum biologischen HA, insbesondere des Knochenminerals, begründen die zunehmende Bedeutung von HCA als Knochenersatzmaterial.

1.3. Knochen

Der Knochen bildet den Hauptanteil des Hartgewebes im menschlichen Organismus und erfüllt als hochspezialisiertes Organ sowohl stoffwechselrelevante als auch biomechanische Funktionen.^[84] Die Funktionsvielfalt erstreckt sich von Stütz- und Schutzfunktionen (Schädel, Brustkorb) über Aufgaben im Bewegungsapparat (Ansatzfläche für Muskulatur), des Stoffwechsels (Bildung Blutzellen im roten Knochenmark) und des Mineralhaushaltes (Mineralspeicher Ca^{2+} und PO_4^{3-}). Als biologischer Nanokomposit zeigt der Knochen eine über mehrere Größenordnungen ausgeprägten, hierarchischen Aufbau, der ausschlaggebend für die besonderen biomechanischen Eigenschaften hinsichtlich Zug- und Druckbelastung des Knochens ist.^[85] Ständig ablaufende Umbauprozesse (Remodeling) verleihen dem Knochen eine hohe Regenerationsfähigkeit (bei strukturellen Defekten) und zudem die Fähigkeit sich aktiv an auftretende Veränderungen der funktionellen Anforderungen hinsichtlich mechanischer Belastung anzupassen.^[86]

1.3.1. Strukturelle Hierarchie des Knochens

Der strukturelle Aufbau des Knochen zeigt, unter Abstufung des makroskopischen bis hin zum atomaren Bereich, mindestens fünf hierarchisch geordnete Organisationsebenen.^[85] Abb. 1-8 zeigt die strukturelle Hierarchie beispielhaft an einem Lamellenknochen.

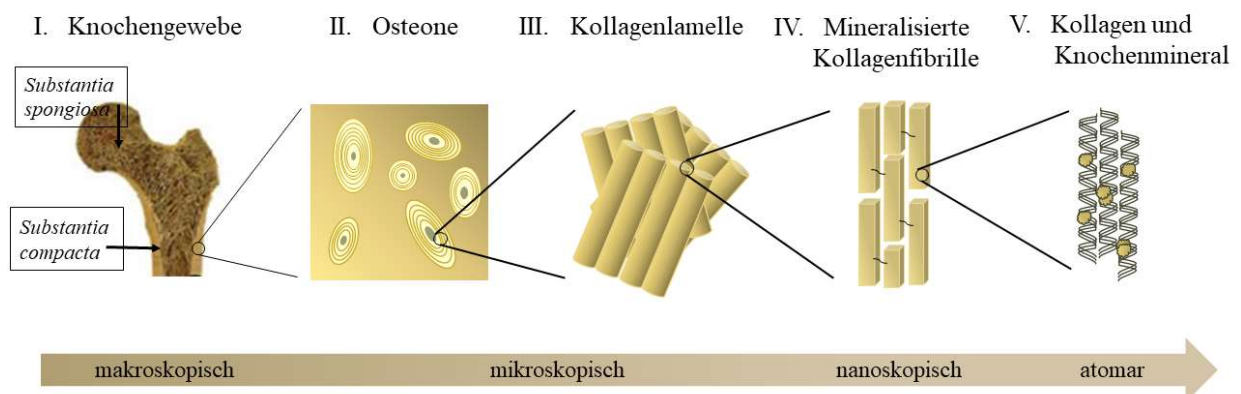


Abb. 1 - 8 Hierarchischer Aufbau des Knochens. Die Untergliederung der Organisationsebenen ist schematisch von makroskopischen bis zum atomaren Bereich dargestellt. In Anlehnung an [84].

Auf makroskopischer Ebene steht die Betrachtung der Art des Knochengewebes im Vordergrund. Die *substantia spongiosa* im Inneren des Knochens, ein poröses Knochengewebe bestehend aus Trabekeln, deren Ausrichtung entlang der größten Zug-/Druckkräfte (trajektorielle Ausrichtung) erfolgt, sowie der kompakte Knochen (*substantia corticalis*, *substantia compacta*), eine homogene und dichte Rindenschicht. Hauptbauelement der

Compacta sind auf mikroskopischer Ebene die s.g. Osteone, die aus konzentrischen Lamellen unterschiedlicher Dicke und Orientierung aufgebaut sind. Die Lamellenstruktur setzt sich aus Verbänden mineralisierter Kollagenfibrillen (= Kollagenfasern) mit wechselnder Orientierung zusammen. Diese Kollagenfibrillen bestehen auf atomarer Ebene aus Typ-1 Kollagen, das sich über mehrere Strukturebenen zu elastischen Fasern organisiert und die hohe Zugfestigkeit des Knochens bedingt. Die Belastbarkeit hinsichtlich Härte und Druck ist auf das Knochenmineral zurückzuführen, indem sich die Mineralpartikel parallel zur Kollagenfibrille anordnen und eine kontinuierliche kreuzfibrilläre Phase bilden. Die durch den speziellen Aufbau bedingte fraktalähnliche Struktur führt letztlich zur Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität des Knochens.

1.3.2. Knochenmineral

Allgemein anerkannt, besteht die anorganische Komponente der Knochensubstanz, „*Dahlit*“ genannt, aus einem biologischen, nicht-stöchiometrischen Hydroxylapatit, der einen signifikanten Anteil an Carbonat- und Hydrogenphosphat-Ionen und zusätzlichen Substitutionen durch weitere Fremdionen enthält. Arbeiten zur genauen Analyse des Knochenminerals bringen eine erhebliche Variation der chemischen Zusammensetzung der Mineralphase in biologischen Proben vor, die in erster Linie eine Funktion des Kristallalters darstellen.^[87] In Tab. 1-5 sind typische Werte für die Massenanteile der im Knochenmineral enthaltenen Ionen gelistet.

Tab. 1 - 5 Zusammensetzung des humanen Knochenminerals. PO₄³⁻ und HPO₄²⁻ sind unter P zusammengefasst.^[75]

	Ca ²⁺	P	CO ₃ ²⁻	Na ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	F ⁻	Cl ⁻
wt%	34,8	15,2	4-6	0,9	0,72	0,03	0,03	0,13

Durch die Substitution von Phosphat-Ionen durch bivalente Carbonat- oder Hydrogencarbonat-Ionen werden infolge der Ladungskompensationen Leerstellen erzeugt, die zu einem Calcium-defizitären Hydroxylapatit und einer verminderten Anzahl an Hydroxylgruppen im Vergleich zu synthetischem Calciumhydroxylapatit führt/der allgemeinen Summenformel (Ca)_{10-x}(HPO₄/CO₃)_x(PO₄)_{6-x}(OH)_{2-x} mit 0 < x < 1 führt.^[1] Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass ein erheblicher Teil der Hydrogenphosphat-Ionen neben der Präsenz im Kristallgitter auch in einer amorphen Oberflächenschicht der Knochenmineralkristalle vorhanden sein soll.^[88] Daraus resultierend wurde Octacalciumphosphat (OCP, (Ca)₈(HPO₄)₂(PO₄)₄ · 5H₂O) als mögliche Vorläuferphase und Bestandteil des Knochenminerals vorgeschlagen.^{[89] [90]}

Die Kristallisation des Knochenminerals wird durch heterogene Nukleation an den Typ-1-Kollagenfibrillen initiiert^[91,92] und führt strukturell zu sehr dünnen, plättchenförmigen Nanokristallen (mit einer Länge von 8-50nm, einer Breite von 5-25nm und einer Dicke von 1-4nm).^[90] Aktuelle nanoskopische Strukturuntersuchungen von Knochenmineral beschreiben jedoch, dass die Knochenmineralkristalle weder ausschließlich plättchen- noch nadelförmig sind, sondern dass gekrümmte nadelförmige Partikel seitlich zu leicht verdrehten Plättchen verschmelzen.^[93]

1.3.3. Knochenhomöostase und Remodeling

Zur Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität unterliegt das Knochengewebe konstanten Auf- und Abbauprozessen, dem s.g. Remodeling. Diese gegensätzlichen Prozesse organisieren den Knochenumbau und erfordern eine koordinierte Aktion von vier Haupttypen von Knochenzellen (basic multicellular unit)^[94] – die knochenaukleidende Zellen, die Osteozyten, die Osteoklasten und die Osteoblasten. Vereinfacht dargestellt, umfasst der Remodeling-Prozess vier verschiedene, sich überlappende Phasen.^[86,95]

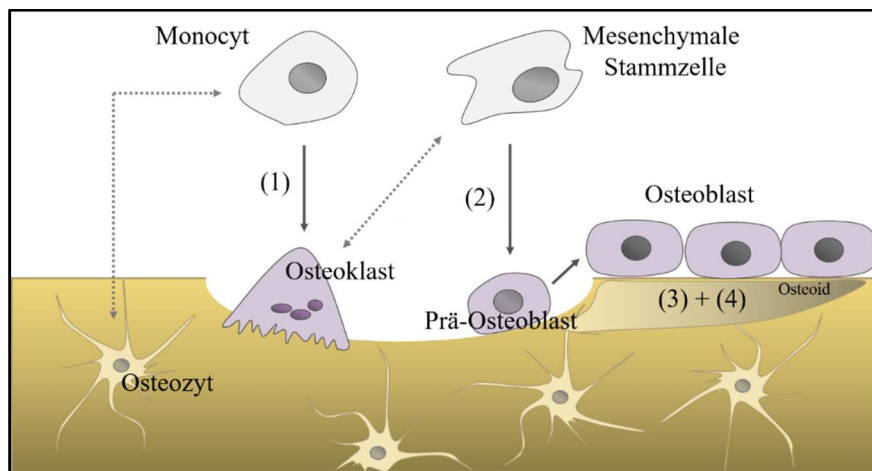


Abb. 1 - 9 Schematische Darstellung des Remodeling.

(1) Initiierung der Knochenumbauprozesse an einer bestimmten Stelle

Ausgelöst durch einen mechanischen Reiz werden Osteoklasten-Vorläufer-Zellen (mono-nukleäre Zellen der Monozyten-/Makrophagen-Zelllinie) rekrutiert und lagern sich an der entsprechenden Stelle an die Knochenmatrix an. Über mehrere Schlüsselschritte und durch verschiedene Faktoren stimuliert, differenzieren diese Vorläuferzellen zu den knochenresorbierenden Zellen, den Osteoklasten. Mit der Reifung der Osteoklasten geht der Umbauprozess in Phase 2 über.

(2) Knochenresorption und Differenzierung Osteoblasten

Die Knochenresorption stellt in Phase 2 des Umbauprozesses das vorherrschende Ereignis dar. Durch einen aktiven Protonentransport erzeugen die Osteoklasten ein saures Kompartiment zur Auflösung des Knochenminerals. Zusätzlich werden Enzyme zur Auflösung der organischen Matrix freigesetzt. Gleichzeitig

werden über einen bestimmten Signalweg mesenchymale Stammzellen rekrutiert, die über einen mehrstufigen Differenzierungsweg zu knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, reifen.

(3) Osteoidsynthese

In der dritten Phase des Umbauprozesses setzt die osteoblastische Knochenbildung ein, während die Knochenresorption gleichzeitig nachlässt. Die Knochenbildung beginnt mit der Synthese und gerichteten Sekretion von Typ-1-Kollagen durch die Osteoblasten, das im Verbund mit anderen kleineren Kollagentypen, Proteoglykanen, Fibronectin und spezifischen Knochenproteinen (Osteopontin, Osteoclaclin, Knochensialoprotein) das unmineralisierte, flexible Osteoid bilden. Die Bildung neuer Knochensubstanz überdauert den Knochenresorptionsprozess. Diese enge Kopplung bzw. dieses Gleichgewicht gewährleistet, dass sich die Knochenmasse und –qualität aufrecht erhalten wird.

(4) Mineralisierung des Osteoid

Phase 4 beinhaltet die Mineralisierung des gebildeten Osteoids und rundet somit den Umbauzyklus ab. Die Mineralisierung wird durch die lokale Freisetzung von Phosphat erreicht, das durch Phosphatasen in membrangebundenen Vesikeln (von Osteoblasten sezerniert) innerhalb des Osteoids erzeugt wird. Die hohe Calcium-Konzentration der extrazellulären Flüssigkeit initiiert die heterogene Keimbildung am Osteoid und führt zum Wachstum des Knochenminerals.

Osteoblasten können anschließend zu Osteozyten oder abgeflachten, knochenauskleidende Zellen, die die Knochenoberfläche als Monoschicht belegen, differenzieren. Es wurde vorgeschlagen, dass die in den Knochen eingebetteten Osteozyten durch mechanische Belastung verursachte Verformungen und Defekte des Knochens registrieren und über einen noch unbekanntem Signalweg Osteoklasten-Vorläufer-Zellen rekrutieren. ^[96]

1.4. Knochenersatzmaterialien

Die Knochenhomöostase wird durch eine Vielzahl an Signalwegen gesteuert, sodass hormonelle Veränderungen, altersbedingte Faktoren, Medikamente und Folgeerkrankungen zur Entstehung verschiedener Knochenfunktionsstörungen beitragen können. Die daraus resultierende quantitative und qualitative Verminderung der Knochensubstanz, ebenso wie knöcherne Defektsituationen (hervorgerufen durch Frakturen oder Tumore) erfordern den Einsatz von Knochenersatzmaterialien.^[95] Vordergründiges Ziel ist dabei der Zugewinn an knöcherner Hartschubstanz zur Stabilisierung der Defektstelle sowie die Unterstützung der Neogenese des körpereigenen Knochenmaterials (Osteokonduktion).^[97] Neben der Funktion als Leitstruktur für das regenerierende Knochengewebe ist eine stimulierende Wirkung auf osteogene Zellen (Osteopromotion) und somit die Induktion der Osteogenese (Osteoinduktion) wünschenswert.^[98,99] Darüber hinaus werden für eine langfristige Osseointegration des Implantates/Implantatintegration verschiedenste Anforderungen an die Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien gestellt. Die Basis für die Langzeitverträglichkeit wird durch die Biokompatibilität des Knochenersatzmaterials bei gegebener Sterilität gesichert, sodass proinflammatorischer Reaktionen und Abstoßungsreaktionen unterbleiben. Da die biomechanischen Eigenschaften des körpereigenen Knochens durch das Knochenersatzmaterial weitestgehend realisiert werden sollen, wird für eine frühzeitige Belastbarkeit eine ausreichende Stabilität des Materials bei gleichzeitiger interkonnetiver Porosität gefordert. Die Porosität gewährleistet den Stoffaustausch, ermöglicht eine vollständige Vaskularisierung und ist hinsichtlich Knochenaufbau- und Implantatabbauprozessen von Bedeutung. Für das An- und Einwachsen von Knochengewebe sowie die Implantatresorption wurden Poren mit einem Durchmesser von 150-600 µm als optimal beschrieben.^[97] Die Resorption des Knochenersatzmaterials führt über zellvermittelte, biologische und/oder chemisch-physikalische Abbauvorgänge zu leicht extrahierbaren Metaboliten und letztlich zur Ausscheidung des körperfremden Materials.^[99] Aufgrund des ausgearbeiteten Eigenschafts- und Anforderungsprofil existieren eine Vielzahl von Knochenersatzmaterialien, die gemäß ihrer Herkunft in vier Gruppen unterteilt werden können:

- (1) Autogene/Autologe Transplantate (Spender und Empfänger entsprechen der gleichen Person).
- (2) Allogene Transplantate (Spender und Empfänger gehören der gleichen Spezies an).

- (3) Xenogene Transplantate (Spender und Empfänger gehören nicht der gleichen Spezies an, z.B. knochenanaloge Calciumphosphate von tierischen oder pflanzlichen Materialien stammend).
- (4) Alloplastische Transplantate (Synthetische Materialien z.B. Keramiken, Zemente, Polymere, Komposite).

Allogene und xenogene Transplantate ähneln dem autogenen/autologen Knochen gemäß der Qualitätsanforderungen und zeigen eine osteokonduktive sowie teilweise osteoinduktiven Wirkung. Dennoch bleibt trotz initialer Entfernung potentiell infektiöser und immunogener Bestandteile das Restrisiko einer Infektion sowie einer Immunreaktion bestehen. Zusätzlich ist die Verfügbarkeit allogener Knochenersatzmaterialien meist in Abhängigkeit von geeigneten Organspendern begrenzt und autologe Knochenersatzmaterialien erfordern zusätzliche invasive Eingriffe.^[100] Um die natürlichen Ressourcen zu schonen, sind alloplastische Knochenersatzmaterialien zunehmend von Interesse. Zwar sind synthetische Transplantate den autologen Knochenersatzmaterialien noch immer unterlegen, sie können jedoch zum Teil bereits hochqualitative Ergebnisse aufzeigen und besitzen somit das größte Zukunftspotential.^[100] In Tab. 1.6. sind die gängigsten Knochenersatzmaterialien und deren wichtigsten Eigenschaften beispielhaft als Übersicht zusammengefasst.

Tab. 1 - 6 Beispielpräparate für natürliche und synthetische KEM.^[97,100]

Hauptgruppe	Untergruppe	Wirkung	Beispielpräparat
Natürliche KEM	Allogen	Osteokonduktiv	Maxgraft [®]
	Xenogen	Osteokonduktiv	Bio-Oss [®] , Cerabone [®] .
Synthetische KEM	Keramiken	Osteokonduktiv	Ostim [®] , Endobone [®]
	Zemente	Osteokonduktiv	Norian [®] CRS
	Komposite	Osteokonduktiv, Osteoinduktiv	NanoBone [®]

Folglich liegt der aktuelle Forschungsschwerpunkt in der graduellen Verbesserung und Neueinführung von alloplastischen Knochenersatzmaterialien zur Steigerung der Qualität und Erweiterung der Produktvielfalt dieser Materialien.

1.5. Zellkultur und *in vitro* Studien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien wurden sowohl mit Zellen einer Zelllinie als auch primären humanen Zellen durchgeführt. Im Nachfolgenden werden die verwendeten Zelltypen sowie die Methoden kurz erläutert.

1.5.1. Zelllinien und primäre Zellen

Die Zellen einer **Zelllinie** zeigen, aufgrund/bedingt durch eine genetische Modifikation, Veränderungen in ihren Eigenschaften insbesondere des Proliferationsverhaltens. Letztlich führt diese Chromosomenanomalie zu immortalisierten Zellen, die sich unter Aufrechterhaltung der phänotypischen Eigenschaften unbegrenzt vermehren. Immortalisierte Zellen lassen sich tendenziell leichter kultivieren, führen letztlich zu homogenen, genetisch identischen Populationen und somit zu konsistenten und reproduzierbaren Ergebnissen.^[101,102] In dieser Arbeit wurde ausschließlich die humane Osteosakrom-Zelllinie MG-63 verwendet. Diese Zelllinie wurde aus dem juxtakortikalen Osteosakrom der distalen Diaphyse des linken Oberschenkel eines 14-jährigen männlichen Patienten isoliert.^[103] Die Zellen zeigen ähnliche phänotypische Eigenschaften und hormonelle Reaktionen wie primäre Osteoblastenzellen/osteoblastische Zellen und gelten somit als ein geeignetes Modell für erste biologische Studien von Biomaterialien zum Knochenersatz/regeneration. Da immortalisierte Zellen jedoch häufig einzigartige Genmuster exprimieren, die *in vivo* nicht zu finden sind, sollten *in vitro* Studien sowohl mit Zellen einer Zelllinie als auch mit Primärzellen durchgeführt werden. **Primäre Zellen** werden direkt aus dem entsprechenden Gewebe isoliert und behalten daher die morphologischen und relevanten funktionellen Eigenschaften des Ursprungsgewebes bei. Sie durchlaufen Seneszenzprozesse und haben somit ein begrenztes Potential hinsichtlich Proliferation und Differenzierung. Zusätzlich können primäre Zellen in Abhängigkeit der genetischen Merkmale und des Alters des Spenders in ihren Eigenschaften variieren.^[102] Um spenderunabhängige und somit vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien mit Zellen von drei verschiedenen Spendern der gleichen Passage durchgeführt. Es wurde mit humanen primären Osteoblastenzellen (pOB) sowie humanen primären Endothelzellen (HUVEC) gearbeitet. Osteoblasten reifen über einen spezifischen Differenzierungsweg aus mesenchymalen Stammzellen und sind maßgeblich für den Knochenaufbau verantwortlich (s. Kap. 1.3.3.). Endothelzellen bilden ein einschichtiges Plattenepithel (Endothel) als innerste Schicht der Blutgefäße aus.^[104] Aufgrund ihrer Position an der Grenzfläche zwischen Blut und Gewebe können Endothelzellen verschiedene vaskuläre Funktionen steuern, u.a. die Komplementaktivierung. Vermittelt durch inflammatorische

Zytokine (z.B. IL-1, TNF α) oder bakterielle Endotoxine (LPS), wird ausgehend von einer Entzündungsreaktion die Expression von E-Selektin, einem endothelspezifischen Membranglykoprotein, transkriptionell hochreguliert und führt letztlich zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Somit kann zur Beurteilung von Biomaterialien hinsichtlich inflammatorischer Effekte die Stoffwechselaktivität von Endothelzellen *in vitro* betrachtet werden.^[105,106] Die Expression von E-Selektin wurde *in vitro* mittels einer Antikörper-basiertern Detektionsmethode nachgewiesen.

1.5.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität

Die **Biokompatibilität** beschreibt die biologische Verträglichkeit eines Materials hinsichtlich der umgebenden Zellen bei gleichzeitiger Erfüllung seiner Funktion. Materialien, die keine unerwünschten inflammatorischen, zytotoxische, genotoxische oder kanzerogene Effekte hervorrufen, werden als biokompatibel bezeichnet.^[107] Biokompatibilitätsstudien *in vitro* dienen somit als Schlüsselkonzept zur Untersuchung und dem verbesserten Verständnis biologischer Effekte ausgehend von spezifischen Materialien. Auf dieser Basis können Sicherheitsbewertungen erstellt werden, die vor allem für die Entwicklung und Indikation medizinischer Implantate von Bedeutung sind. Durch Stimulation gewebspezifischer Zellen, entsprechend des definierten Transplantationsortes, wird der Einfluss des Materials anhand des Proliferationsverhaltens und der Zellmorphologie untersucht.^[107] Zusätzlich werden anhand spezieller *in vitro* Testverfahren Veränderungen der Stoffwechselaktivität, hervorgerufen durch zytotoxische Eigenschaften des Materials, analysiert. Im Nachfolgenden werden die in dieser Arbeit relevanten **Zytotoxizitätstests** kurz beschrieben.

RES-Assay

Der Resazurin-Assay ist ein Fluoreszenzassay, der die zelluläre metabolische Aktivität detektiert und dient somit zur Bestimmung der Viabilität der eingesetzten Zellen. Resazurin, ein blauer, nicht-fluoreszierender Farbstoff wird in metabolisch aktiven Zellen durch intrazelluläre Dehydrogenasen und Umsetzung des Coenzym NAD⁺/NADH irreversibel zum stark rotfluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert. Das gemessene kolometrische Signal ist dabei proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

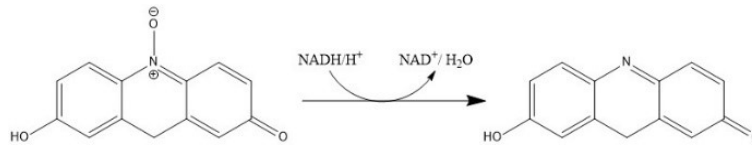


Abb. 1 - 10 Strukturformeln zur Reduktion von RES zu Resorufin.

LDH-Assay

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH), ein im Zytosol lokalisiertes/zytosolisches Enzym wird bei Zellyse bzw. Schädigungen der Plasmamembran vermehrt in den Kulturüberstand freigesetzt und dient daher als optimaler Marker zur Bestimmung zytotoxischer Effekte. Die Zunahme an LDH-Aktivität im Kulturüberstand wird mittels einer kolorimetrischen Methode bestimmt und ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. Die Laktat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Laktat mit/bei gleichzeitiger Reduktion des Coenzym NAD^+/NADH . Durch Zugabe des Tetrazoliumsalzes 3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazol-3-iumchlorid (INT) kann die Bildung von NADH/H^+ in einer gekoppelten (Farbreaktion) gemessen werden.^[108]

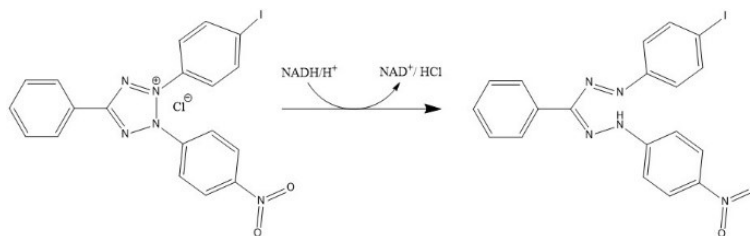


Abb. 1 - 11 Strukturformeln zur Reduktionsreaktion von INT zum roten, lösliche Formazanprodukt.

1.5.3. Osteoblastäre Differenzierung – Owen-Modell

Das Osteoblastendifferenzierungsmodell, auch Owen-Modell genannt, basiert auf intensiven Untersuchungen eines Rattenkalviarenzellsystems und beschreibt die sequentielle Differenzierung von Osteoblasten anhand der Unterscheidung dreier Phasen: (i) die Proliferation, (ii) die Matrix-Maturation, (iii) die Mineralisation.^[109]

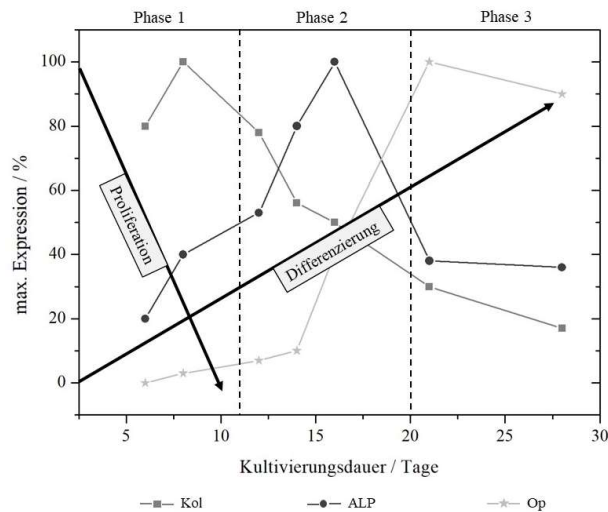


Abb. 1 - 12 Sequenzielle Differenzierung anhand von Proliferation und Genexpression Osteoblasten-spezifischer Proteine nach Owen.^[109]

Nach Owen *et al.*^[109] lässt sich der komplexe Prozess der osteoblastären Differenzierung durch eine Phase der Proliferation und anschließender koordinierter Expression knochencharakteristischer Proteine unterteilen. Während der Proliferationsphase erfolgt vornehmlich die Expression von Zellwachstums- und Zellzyklusgenen. Aber auch extrazelluläre Matrixproteine (Prokollagen I, Fibronectin) werden von den proliferierenden Osteoblasten in dieser Phase exprimiert. Der Übergang der Proliferationsphase in die Matrix-Maturation oder Matrix-Reifephase wird durch den Anstieg bzw. die maximale Expression der alkalischen Phosphatase charakterisiert. Die alkalische Phosphatase, ein cytoplasmatisches Enzym, reguliert die Bereitstellung von Phosphat-Ionen zur Knochenmineralisierung indem sie die hydrolytische Dephospholierung von Phosphorsäureester (z.B. in Proteinen, Nukleotiden) katalysiert. Aus diesem Grund eignet sich die ALP als Marker für die osteoblastische Differenzierung bzw. die Osteogenese. Zusätzlich geht die Initiierung der extrazellulären Matrixreife mit der Stimulation der Genexpression von Proteinen wie Osteopontin und Osteokalzin einher, deren Maxima in der Mineralisationsphase liegen und sich daher als Marker für reife Osteoblasten eignen.

2

Vaterit Nanopartikel – Synthese und *in vitro* Studien –

2.1. Einleitung

Sowohl in der Natur als auch in der chemischen Produktion stellt die Kristallisation einen Schlüsselschritt zur gezielten Herstellung von mineralischen Feststoffen dar. Das Verständnis der zugrundeliegenden Kristallisationsmechanismen ermöglicht die Kontrolle über die resultierenden Eigenschaften synthetischer, bioinspirierter Materialien in Abhängigkeit von Größe, Morphologie und Polymorphie. Wie in lebenden Organismen perfektioniert, bieten diese Erkenntnisse die Möglichkeit Biomaterialien zu generieren, deren Aufbau und Funktion eng miteinander verknüpft sind. Zu den prominentesten Vertretern dieser Biominerale gehört Calciumcarbonat (CaCO_3), dessen Vorkommen sich in der Natur vor allem in Weichtieren, marinen Einzellern und Wirbeltieren häuft.^[25,110,111] Seit den frühen 2000er Jahren gilt das Kristallisationsverhalten von CaCO_3 als populäres Modellsystem für die Nukleation und Kristallisation.^[3,112–114] In zahlreichen Kristallisationsstudien konnte gezeigt werden, dass CaCO_3 zunächst als amorphe, flüssigkeitsähnliche Phase auftritt und sich anschließend – in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen – in die kristallinen Modifikationen umwandelt (s. Kapitel 1.1.4.).^[115–118] Auch *in vivo* wird zunehmend angenommen, dass bei der Bildung von Endo- und Exoskelett amorphe Vorläuferphasen der Carbonate und Phosphate eine Rolle spielen. Spektroskopische Beobachtungen deuten drauf hin, dass amorphes Calciumcarbonat (aCC) als Vorläufer des carbonathaltigen Apatits fungiert.^[119,120] Die Verwendung von aCC als mineralische Vorläuferkomponente des Knochensminerals wird in *in vitro* Studien durch die höhere Löslichkeit der hydratisierten amorphen Phasen im Vergleich zu den kristallinen Modifikationen erschwert. Vaterit hingegen, als metastabile kristalline Modifikation, weist eine geringe Löslichkeit bei ausreichender Reaktivität auf, und erlaubt somit einen langsameren, kontrollierbareren Transformationsprozess *in vitro*.^[121] Grundvoraussetzung für *in vitro* Studien bezüglich der Anwendung von Vaterit als Biomaterial ist eine einfache, reproduzierbare Synthese phasenreinen Vaterits unter Ausschluss toxischer Materialien. Bisher wurden Vaterit überwiegend mittels aufwendiger flüssig-flüssig und gas-flüssig Methoden hergestellt. Die nasschemischen Syntheserouten basieren dabei meist auf der Verwendung von

Calciumchlorid und Alkalimetallcarbonaten in organischen, toxischen Lösungsmitteln wie Methanol.^[122,123] Eine weitere Möglichkeit bietet die zeitaufwendige Carbonatisierung von Ca(OH)_2 durch das Einleiten von CO_2 -Gas oder die Verwendung von Trockeneis in einem Wasser-Methanol-Gemisch.^[122,124,125] Wässrige Synthesen wurden meist unter Verwendung von Additiven wie Dopamin,^[126] Glycerol,^[127] Poly-L-Aminosäuren^[128] oder nichtionischen Tensiden (z.B. Tween)^[129] durchgeführt. Die daraus resultierende Oberflächenfunktionalisierung führt zwar zu einer Stabilisierung des gewünschten Vaterit-Polymorphs, gleichzeitig jedoch auch zu einer Veränderung der (Oberflächen-)Eigenschaften und somit zu Einschränkungen in entsprechenden Anwendungsbereichen. Einen weiteren Ansatz zeigen Li *et al.*^[130], die durch die Zersetzung von Harnstoff in einer Wasser-Ethylenglykol-Phase unter solvothermalen Bedingungen Carbonat-Ionen zur Bildung von Vaterit generieren. Eine ähnliche, vielversprechende Syntheseroute wurde von Schüler *et al.*^[131] postuliert. Unter Verwendung von Calciumchlorid-Dihydrat und Natriumhydrogencarbonat als Präkursor wurde mittels Ultraschallbehandlung eine Methode geschaffen, monodisperse Vaterit Nanopartikel im Größenbereich von ca. 50 nm ohne Oberflächenfunktionalisierung zu synthetisieren. In Anlehnung an die bestehende Synthesevorschrift von Schüler *et al.*^[131] wurde der Kristallisationsprozess unter gegebenen Bedingungen näher untersucht, mit dem Ziel den Reaktionsmechanismus besser zu verstehen und so die Synthese hinsichtlich der Ausbeute und der Phasenreinheit zu optimieren. Basierend auf den Untersuchungen der wasserabhängigen Kristallisationskinetik der Reaktion (mittels FTIR-Spektroskopie und Transelektronenmikroskopie), postulieren wir einen möglichen Reaktionsmechanismus für die Bildung phasenreiner Vaterit-Nanopartikel. Die Erkenntnisse eröffnen zudem neue Anwendungsmöglichkeiten zur bioinspirierten Synthese weiterer Biomaterialien.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Material

CaCl₂ · 2H₂O (Sigma Aldrich), NaHCO₃ (Sigma Aldrich, ≥99,7%), NaH¹³CO₃ (Sigma Aldrich, 98 atom% ¹³C, 99% (CP)), Ethanol (C₂H₅OH, Sigma Aldrich, ≥ 99,8%), Ethylenglykol (C₂H₅O₂, Sigma Aldrich, ≥ 99,7%), M199 (Sigma Aldrich), FBS (*fetal bovine serum, heat-inactivated*, Sigma Aldrich), Glutamax I (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), Osteoblasten-Zelllinie MG63 (*American Type Culture Collection, ATCC[®]CRL-1427[®]*, LGC Promochem), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*, Sigma Aldrich), Penicillin/Streptomycin P/S (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), ECGS (*endothelial cell growth supplement*, Becton Dickson and Company), Heparin-Natriumsalz (Sigma Aldrich), LPS (Lipopolysaccharid, *Escherichia coli* O111:B4, Sigma Aldrich), 3,7% Paraformaldehyd (Merck), 0,1% Triton[®] X-100 (Merck), DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D8537*, Sigma Aldrich), Antikörper CD62E (*mouse*, 6010, Monosan), BSA (*bovine serum albumin*, Sigma Aldrich), Fluoreszenz-marktiert Antikörper (*goat anti-mouse*, Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific), Höchst Dye 33342 (Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific), Fluoroshield (ImmunoBioScience Corporation), Calcein-AM (AM: *Acetoxymethylester*, Thermo Fisher Scientific), *CytoTox 96[®] Non-Radio Cytotoxicity Assay* (LDH, G1780, Promega), Fibronectin (Roche, 1080 938), Gelatine (Sigma Aldrich), Resazurin (Sigma, R7017), *Hank's Balanced Salt Solution* (Sigma, H9169), 8-Well *chamber slide* (LabTek[®], Thermo Fisher Scientific), Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Cellstar[®]), deionisiertes MilliQ-Wasser, hypotonisches Wasser (steril und pyrogenfrei, Carl Roth).

2.2.2. Vaterit-Nanopartikel – Synthesevorschrift

Die Synthese der Vaterit-Nanopartikel erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Schüler *et al.*^[131] Calciumchlorid Dihydrat (5 mmol) wurde in Ethylenglykol (50 mL) unter Ultraschalleinwirkung bei 40°C gelöst. Natriumhydrogencarbonat (10 mmol) wurde unter starkem Rühren in Ethylenglykol (50 mL) redispergiert. Die Lösungen wurden vereint und im Ultraschallbad bei 40°C für 25 min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden 50 mL MilliQ-Wasser für 5 min bei gleichbleibenden Bedingungen hinzugegeben. Der erhaltende Niederschlag wurde mit Wasser und anschließend mehrfach mit Ethanol gewaschen. Das farblose Produkt wurde im Vakuum getrocknet und analysiert. Die Ausbeute wurde gravimetrisch bestimmt (Ø 96%). Für die *in vitro* Studien wurden sterile Vaterit-Nanopartikel hergestellt. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße vorab bei 180°C für 24 Stunden im

Trockenschrank ausgeheizt sowie auf möglichst sterile Arbeitstechniken während der Synthese und der Aufreinigungsprozesse geachtet.

Zusätzlich wurde eine Versuchsdurchführung zur Verlaufskontrolle der Kristallisation erstellt. Um den Kristallisationsprozess besser verfolgen zu können, wurden der Reaktionslösung geringe Mengen an MilliQ-Wasser (10%, 30%, 50% (v/v)) zugesetzt. Zur Minimierung des energetischen Eintrags wurde bei der Dispersionsmethode auf die Ultraschallbehandlung verzichtet und ein Magnetrührer (200 rpm) bei Raumtemperatur verwendet. Auf diese Weise war es möglich eine verlangsamte Kristallisation zu initiieren. Die Aliquotentnahme erfolgte in unterschiedlichen Zeitintervallen über eine Gesamtreaktionsdauer von 5 Stunden. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Überschusses an Aceton gestoppt. Die Probe wurde durch Zentrifugation abgetrennt, mehrfach mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Für jede Probe wurde ein FTIR-Spektrum aufgezeichnet.

2.2.3. Chemische Charakterisierungsmethoden

ATR-FTIR-Spektroskopie. Die ATR-FTIR-Spektroskopie wurde mit einem Nicolet iS10 Spektrometer der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Frequenzbereich von 650 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} mit einer Auflösung von $1,4\text{ cm}^{-1}$ pro Datenpunkt aufgenommen.

Festkörper-NMR-Spektroskopie. Alle Experimente wurden mit einem Bruker Avance 400 DSX NMR-Spektrometer bei einer ^1H -Frequenz von 399,87 MHz und einer ^{13}C -Frequenz von 100,55 MHz aufgenommen. Es wurde ein 4 mm-Bruker-Doppelresonanz Messkopf bei 10 kHz Magic Angle Spinning (MAS) verwendet. Das ^{13}C *single plus* (SP)-Experiment wurde für die Vaterit-Probe durchgeführt. Die chemische Verschiebung $\delta(^{13}\text{C})$ wurde auf externes Adamantan als Sekundärstandard bei 38,48 ppm referenziert.

Pulver-Röntgenbeugung. Röntgendiffraktogramme wurden auf einem STOE Stadi P, ausgestattet mit einem Mythen 1k-Detektor, unter Verwendung von monochromatisierter $\text{MoK}\alpha$ -Strahlung aufgenommen. Die Probe wurde mit Perfluorether (Fomblin Y, Aldrich) zwischen Polyvinylacetat-Folien aufgebracht. Die Probe wurde in $0,015^\circ$ -Schritten (kontinuierlicher Scan, 150 s°) gemessen, die einen 2θ -Bereich von $1,5^\circ$ bis 47° abdecken.

Rasterelektronenmikroskopie. Die REM-Proben wurden an einem Nova NanoSEM 630 der Firma FEI durchgeführt. Es wurde im Hochvakuum mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV, einem Arbeitsabstand von 4 mm bis 7 mm und einem TLD Detektor, als Sekundärelektronendetektor zur Bildgebung gearbeitet. Zur Probenpräparation wurden $8\text{ }\mu\text{L}$ der

jeweiligen Probensipersion auf einen Silicium-Wafer aufgetropft und auf einem leitenden Kohlestoffpad fixiert. Anschließend wurden die Proben unter Verwendung einer MED020 Kleinbedampfungsanlage der Firma Bal-Tec mit einer Goldschicht 7,5 nm gesputtert.

Thermische Analyse. Die gekoppelte thermogravimetrische und differentielle Thermoanalyse (TGA-DTA) wurde mit einem Netzsch STA 449 F3 Jupiter-Gerät durchgeführt. Die Probe (~10 mg) wurde in einem Aluminiumoxidbecher unter Argonatmosphäre von 50 °C auf 600 °C bei einer Heizrate von 10 K/min erhitzt.

Transmissionselektronenmikroskopie. Die TEM-Proben wurden durch Auftropfen von 20 µL der jeweiligen Probendispersion auf ein 400 mesh Kohlenstoff-Kupfer-Gitter (Plano GmbH, Wetzlar) hergestellt, und mit einem Technai Spirit G2 bei 120 kV Beschleunigungsspannung, ausgestattet mit einer Standard 4K CCD-Kamera, vermessen.

2.2.4. Biologische Untersuchungsmethoden – *in vitro* Studien

Kultiverungsbedingungen der verwendeten Zellen – Für die *in vitro* Studien wurden zwei verschiedene Zelltypen verwendet. Es wurde mit der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG63 gearbeitet. Das entsprechende Zellkulturmedium beinhaltete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – high glucose) mit 10% FBS, 2 mM Glutamax I und 100 U/ 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin (P/S). Außerdem wurde mit primären humanen Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells* – HUVEC), gewonnen aus der Vene der humanen Nabelschnur, gearbeitet. Die Isolation der Zellen erfolgte in Anlehnung an die Literatur von Jaffe *et al.*^[132] und wurde von [Name] sowie [Name] aus der Gruppe von Prof. Dr. W. Rall am Institut für Pathologie durchgeführt. Die isolierten primären, humanen Zellen wurden unter Bezugnahme der gesetzlichen ethischen Vorschriften, anonym und ohne patientenbezogene Daten behandelt. Als Zellkulturmedium wurde M199 mit 20% FBS, 2 mM Glutamax I, 100 U/ 100 µg/mL P/S, 25 µg/mL des Wachstumsfaktors ECGS (*endothelia cell growth supplement*) sowie 25 µg/mL Heparin-Natriumsalz verwendet. Der Wachstumsfaktor sowie die Heparin-Natriumsalzlösung wurden jeweils frisch und unmittelbar vor der Anwendung dem Medium zugesetzt. Um eine gute Adhärenz der HUVEC zu erreichen, wurden die Zellkulturflaschen sowie die Zellkulturplatten mit 0,2% Gelatine beschichtet. Die Zellkultivierung wurde in einem Inkubator bei Kultivierungsbedingungen von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt durchgeführt.

Immunfluoreszenzfärbung von E-Selektin - Die Immunfluoreszenzfärbung gilt als diagnostische Methode der Immunhistochemie, und verwendet Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper

zur gezielten Detektion eines spezifischen Antigens. In unserem Experiment wurde die Expression von E-Selektin durch HUVEC nach Exposition mit Vaterit-Nanopartikeln detektiert bzw. mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Durch die Bestimmung von E-Selektin wird gleichzeitig auf das Vorhandensein von Endotoxin (auch bekannt als Lipopolysaccharid LPS) in der Probe sowie die Induktion inflammatorischer Effekte ausgehend von der Probe geprüft.^[105] Es wurden 50.000 HUVEC pro Well in einer 8-Well *chamber slide* ausgesät. Die Kammern wurden zuvor mit 100 µL pro Well Fibronectin (1:200 in PBS) für 60 min im Inkubator beschichtet. Nach 48 Stunden Kultivierung erfolgte die Stimulation der Zellen durch Vaterit-Nanopartikel. Unbehandelte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit 1 µg/mL LPS stimuliert. Nach einem Stimulationszeitraum von 4 Stunden wurden die Zellen mit 3,7% Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Membran-Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von 0,1% Triton® X-100 in PBS (300 µL pro Well) für 5 min bei Raumtemperatur. Für die primäre Antikörperfärbung wurde der E-Selektin Antikörper (CD62E mouse) in 1% BSA/PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt und 12 Stunden lichtgeschützt bei +4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die sekundäre Antikörperfärbung mit Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse), ebenfalls als 1:100 Verdünnung in 1% BSA/PBS für 60 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mittels Höchst Dye 33342, als 1:200 Verdünnung in PBS für 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Kammer entfernt und die Zellen durch ein Eindeckmedium Fluoroshield und Deckglas versiegelt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop.

In vitro Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstest – Der Effekt der Vaterit-Nanopartikel auf die Stoffwechselaktivität der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG63 wurde mit zwei verschiedener Testverfahren (Laktatdehydrogenase (LDH) - Assay, Resazurin (RES) - Assay) geprüft. Es wurden 25.000 Zellen pro Well in einer sterilen 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Im Anschluss erfolgte einer Stimulation durch Zugabe der Vaterit-Nanopartikel in Konzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 250 µg/mL über einen Zeitraum von 24 Stunden, 72 Stunden und 7 Tagen. Es wurde eine Medium-Kontrolle (ohne Zellen) sowie eine Zell-Kontrolle (unbehandelte Zellen) mitgeführt. Um unerwünschte Nebenreaktionen der Vaterit-Nanopartikel mit Reagenzien des Tests auszuschließen zu können und um eine korrekte Ermittlung der Messdaten zu gewährleisten zu können (Hintergrundmessung), wurde zusätzlich eine Medium-Partikel-Kontrolle mit identischen Konzentrationen an Vaterit-Nanopartikeln mitgeführt. Alle Experimente wurden drei Mal mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz

wurde ein *Student T-Test* Typ 3 verwendet. Die detaillierte Durchführung der Tests wird im Nachfolgenden beschrieben.

LDH-Assay – Unter Verwendung eines kommerziell erworbenen *CytoTox 96[®] Non-Radio Cytotoxicity Assay* konnten Zellmembranschäden der verwendeten MG63 Zellen bedingt durch die Exposition mit Vaterit-Nanopartikeln untersucht werden. Dabei wird die Menge an freigesetzter Laktat-Dehydrogenase (im Zytosol lokalisiert) im Überstand bestimmt. Es wurde nach den Anweisungen des Herstellers^[108] verfahren. Die entnommenen Überstände (50 µL pro Well) wurden mit jeweils 50 µL pro Well *CytoTox 96[®]* Reagenz versetzt und für 20 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Durch die Zugabe einer *Stop Solution* (50 µL pro Well) wurde die Reaktion beendet und die Absorption bei $\lambda = 492$ nm an einem *Tecan Spark Plate Reader* gemessen. Als LDH-positiv Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mit einem 10x Lyse-Puffer (10 µL pro Well) für eine Stunde im Inkubator lysiert, um eine vollständige LDH Freisetzung zu bewirken. Der Überstand des Zelllysats wurde anschließend mit *CytoTox 96[®]* Reagenz behandelt und vermessen. Die Messwerte wurden nach Abzug der Medium-Kontrolle bzw. Medium-Nanopartikel-Kontrolle relativ zu den lysierten Zellen in Prozent angegeben.

RES-Assay – Zum Nachweis der zellulären metabolischen Aktivität der mit Vaterit-Nanopartikel versetzten Zellen, wurde ein Resazurin-Zellviabilitäts-Assay durchgeführt. Dabei wird der nicht-fluoreszierende, tiefviolette Resazurin-Farbstoff durch Dehydrogenasen unter Verwendung der Reduktionsäquivalente NADH/H^+ in metabolisch aktiven Zellen irreversibel zu dem tiefroten, rot-fluoreszierenden Resorufin reduziert. Die Fluoreszenz kann bei einer Anregungswellenlänge von 530 – 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 580 – 600 nm mit einem *Tecan Spark Plate Reader* gemessen werden. Die Resazurin-Lösung wurde durch Auflösen von 20 mg Resazurin in 100 mL 100 ml *Hanks' Balanced Salt Solution* mit Mg^{2+} und Ca^{2+} hergestellt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden 20 µL dieser Lösung pro Well zugegeben, die behandelten Zellen für 3 bzw. 5 Stunden inkubiert und anschließend unter den angegebenen Wellenlängen vermessen. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Die Messwerte wurden nach Abzug der Medium-Kontrolle bzw. Medium-Nanopartikel-Kontrolle relativ zu der Positiv-Kontrolle (unbehandelte Zellen) in Prozent angegeben.

In vitro Zellbiokompatibilität – Die Zellverträglichkeit (Zellbiokompatibilität) wurde an zwei unterschiedlichen Zelltypen, der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG63 sowie den primären HUVEC getestet. Um eine spenderunabhängige Aussage treffen zu können, wurden die

Experimente der primären HUVEC mit Zellen von drei verschiedenen Spendern in der jeweils gleichen Passage durchgeführt. Die Experimente mit der Zelllinie MG63 wurden als Doppelbestimmung in zwei unterschiedlichen Passagen durchgeführt. Es wurden 50.000 MG63 und 80.000 HUVEC pro Well in einer sterilen 24-Well Zellkulturplatte ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Die anschließende Stimulation erfolgte durch die Zugabe der Vaterit-Nanopartikel in Konzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 250 µg/mL. Nach Stimulationszeiten von 24 Stunden, 72 Stunden und 7 Tagen wurden die Zellen mit 10 µM Calcein-AM Lösung versetzt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM dient zur Detektion vitaler Zellen. Durch intrazelluläre Esterasen wird der Farbstoff durch Abspaltung der Acetoxymethyl-Gruppe in die aktive Form umgesetzt, sodass durch Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen eine intensiv grüne Fluoreszenz resultiert.^[133]

Zellproliferation auf Vaterit-Presslingen als Prüfkörper – Das Wachstumsverhalten der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG63 wurde auf Vaterit-Presslingen mittels Zellzählung an einem CASY Zellanalysesystem untersucht. Die Inkubation der Prüfkörper erfolgte in einer 24Well Zellkulturplatte über einen Zeitraum von 10 Tagen. Als Kontrolle wurden das Wachstumsverhalten der Zellen auf Zellkultur-Polystyrol verfolgt. Alle Experimente wurden mit 50.000 Zellen pro Well in einem Inkubator durchgeführt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit je 1mL PBS gewaschen. Anschließend wurde der Prüfkörper in eine neue 24Well Zellkulturplatte überführt und die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in 1 mL Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µL der Zellsuspension in 10 mL isotonische Lösung gegeben und am CASY Zellanalysesystem direkt vermessen. Pro Zeitraum wurden je drei Prüfkörper und drei Kontrollexperimente mitgeführt, deren Zellzahl als dreifach Messung bestimmt wurden.

2.3. Ergebnisse und Diskussion

2.3.1. Vaterit - Synthese

Die Vaterit Nanopartikel wurden in Anlehnung an Schüler *et al.*^[131] über eine Ultraschallsynthese aus Calciumchlorid-Dihydrat und Natriumhydrogencarbonat in Ethylenglykol unter Zugabe von Wasser synthetisiert. Pulverröntgendiffraktometrie, ¹³C SP MAS-NMR-Spektroskopie sowie ATR-FTIR-Spektroskopie wurden zur Charakterisierung und Identifizierung der Calciumcarbonat-Modifikation durchgeführt (Abb. 2-1).

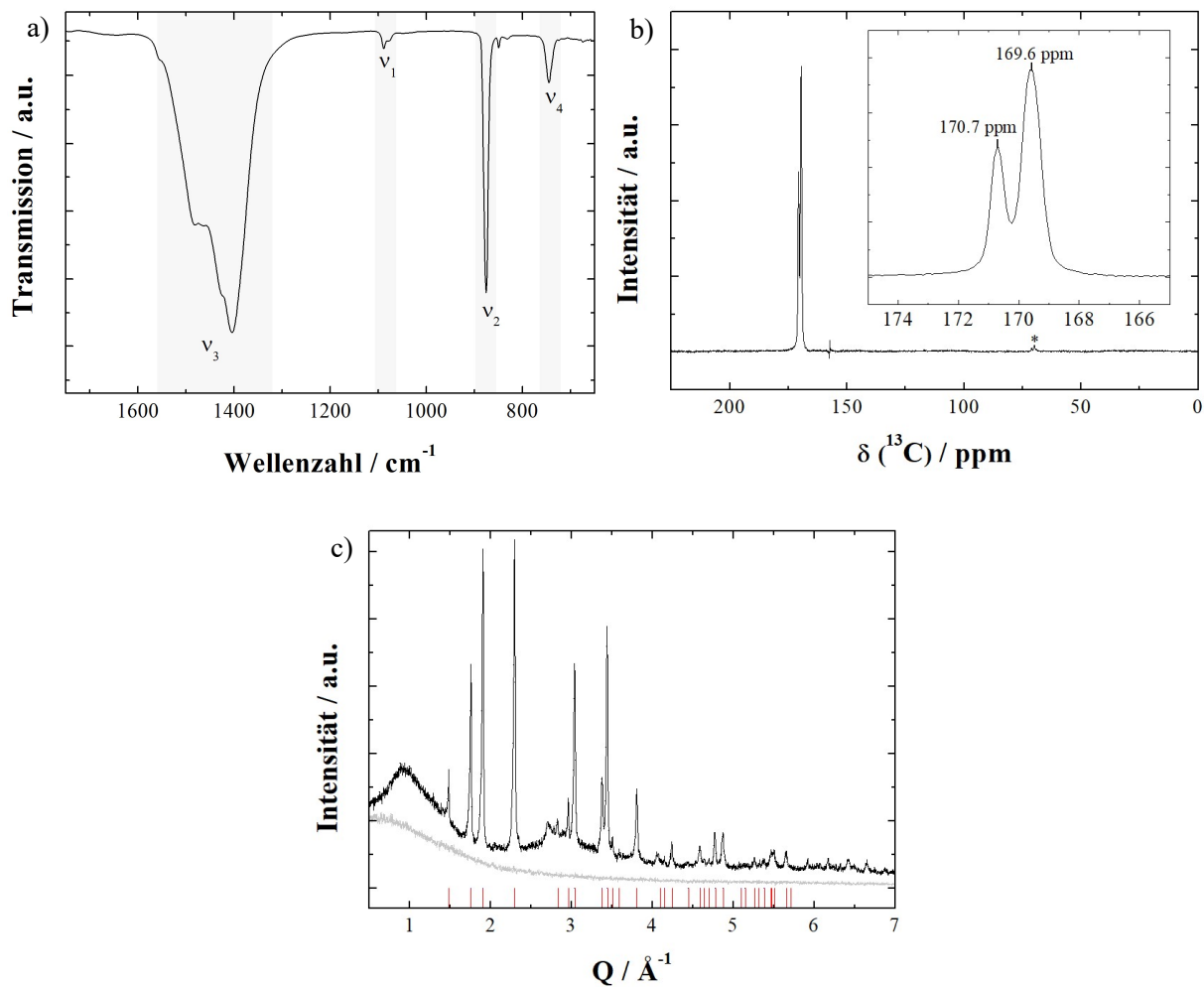


Abb. 2 - 1 Charakterisierung der synthetisierten Vaterit Nanopartikel. a) FTIR-Spektrum mit den charakteristischen Schwingungsmoden von CO₃²⁻ in Vaterit (v₁ : symmetrische C-O Streckschwingung, v₂ : O-C-O Kipp-Deformationsschwingung *out-of-plane*, v₃ : asymmetrische C-O Streckschwingung, v₂ : O-C-O Kipp-Deformationsschwingung *in-plane*), b) ¹³C SP MAS-NMR Spektrum, c) Pulverdiffraktogramm, Reflexprofil der Referenzreflexe von Vaterit^[64] (rot).

Das FTIR-Spektrum (Abb. 2-1 a)) zeigt die charakteristischen IR-Schwingungsmoden des Carbonat-Ions für Vaterit. Die Banden im Bereich von 1493 cm⁻¹ bis 1412 cm⁻¹ entsprechen der asymmetrischen C-O Streckschwingung (v₃). Die Banden bei 1088 cm⁻¹, 874 cm⁻¹ sowie 743 cm⁻¹ resultieren aus der symmetrischen C-O Streckschwingung (v₁), der O-C-O Kipp-Deformationsschwingungen (v₂) und der O-C-O Spreiz-Deformationsschwingung (v₄). Die

Lage der Schwingungsbanden stimmt mit früheren Arbeiten überein.^[134] Zusätzlich wurden Festkörper Kernspinresonanz (NMR) – Experimente zur Bestimmung der lokalen Struktur der Nanoaggregate durchgeführt. Das ^{13}C *single pulse* Direktangregungsexperiment zeigt zwei Signale bei einer chemischen Verschiebung 107.7 ppm und 169.6 ppm. Die beiden Signale sind auf die unterschiedliche relative Orientierung des Carbonats^[135] in Vaterit zurückzuführen und stimmen gut mit den Berichten von Gebauer *et al.*^[136] und Michel *et al.*^[137] überein. Im Zusammenhang mit der Reflexlage des erhaltenen Röntgenpulverdiffraktogrammes kann von Vaterit als Hauptphase ausgegangen werden. Rasterelektronenmikroskopischen und transelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen elliptische Vaterit Nanopartikel in einer Größenordnung von $\sim 50 \pm 10$ nm, die sich überwiegend zu größeren Aggregaten 500 – 1000 nm zusammenlagern.

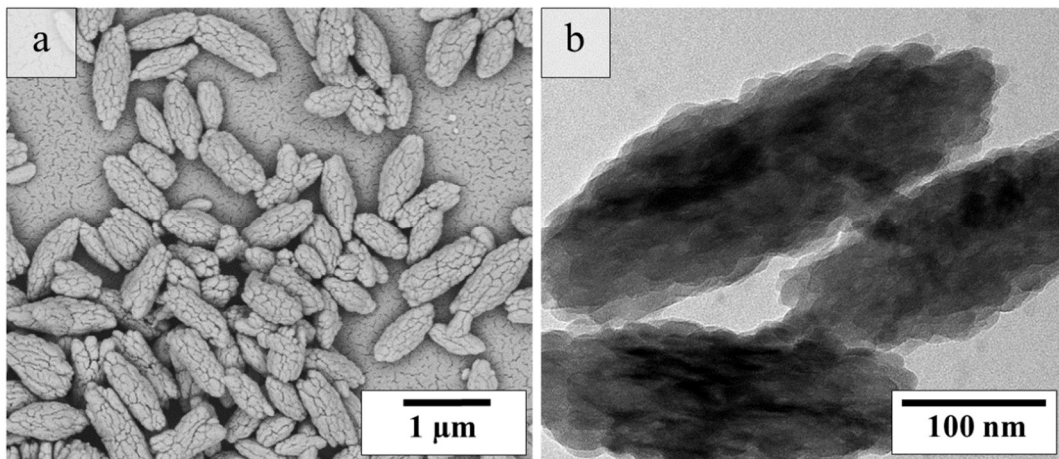


Abb. 2 - 2 Morphologische Charakterisierung der synthetisierten Vaterit-Nanopartikel mittels a) REM-Aufnahme und b) TEM-Aufnahme. Die polydispersen Nanoaggregate (500 -1000 nm) sind aus Vaterit-Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe von ~ 50 nm aufgebaut.

Es ist anzunehmen, dass das Verhältnis von Ethylenglykol zu Wasser die Kristallisationskinetik und somit die entstehende CaCO_3 -Modifikation, als auch die Nanoaggregation beeinflusst. Untersuchungen der Reaktionslösung nach 25minütiger Ultraschallbehandlung in einer wasserfreien Umgebung zeigen, dass zunächst eine amorphe Phase in Ethylenglykol gebildet wird (Abb. 2-3). Das amorphe Zwischenprodukt bildet tropfenförmige Nanopartikel mit einem Durchmesser von ~ 25 nm (Abb. 2-3 b)), die zu größeren Aggregaten „verschmolzen“ sind. Die tropfenförmige Morphologie steht im Einklang mit früheren Arbeiten, die flüssigkeitsähnliche Vorläufer von Carbonatmineralen zeigen.^[21,22,26,117] Das korrespondierende Beugungsbild bestätigt die Bildung einer amorphen Spezies. Abb. 2-3 a) zeigt das FTIR-Spektrum des amorphen Zwischenproduktes mit den charakteristischen Schwingungsmoden des Carbonat-Ions für aCC (vgl. Tabelle 2-1). Im Vergleich zu Vaterit sind die Schwingungsbanden

der amorphen Spezies aufgrund des Symmetrieverlustes zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben und stark verbreitert. Die O-C-O Kipp-Deformationsschwingung $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$ im Bereich von 700 cm^{-1} kann aufgrund der starken Verbreiterung nicht beobachtet werden.^[138] Neben den charakteristischen Carbonat-Schwingungsbanden ist eine intensive und breite Bande bei 3300 cm^{-1} sowie eine schwache Bande bei 1650 cm^{-1} zu erkennen, die auf die O-H Streckschwingung sowie die O-H Biegeschwingung von strukturell gebundenem Wasser zurückzuführen sind. Die Bande bei 1050 cm^{-1} ist primären O-H Gruppen und somit dem Ethylenglykol zuzuordnen. Die Schwingungsbanden im Bereich von $2850 - 3000\text{ cm}^{-1}$ sind charakteristisch für die C-H Streckschwingung. Daher kann vermutet werden, dass das amorphe Produkt durch oberflächengebundenes Ethylenglykol stabilisiert wird. Unter Verwendung von $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ wurden ^{13}C -angereicherten Proben zur Durchführung von ^{13}C MAS-NMR Experimente hergestellt (Abb. 2-3 c)). In Übereinstimmung mit bisherigen Arbeiten^[138,139] zeigt das amorphe Produkt ein für aCC charakteristisches Signal bei 169.5 ppm und einer FWHM von 276 Hz. Leukel *et al.*^[139] konnten zeigen, dass die starke Verbreiterung des Signals auf die unterschiedliche chemische Umgebung der Carbonatgruppe in aCC zurückzuführen ist. Die Anwesenheit des Ethylenglykol-Liganden wird durch das Signal bei 69.7 ppm im ^{13}C MAS-NMR-Spektrum bestätigt. Auch das ^1H MAS-NMR-Spektrum (Abb. 2-3 d)) zeigt die Protonen der alkoholischen Methylgruppe von Ethylenglykol bei einem Signal von 3.5 ppm. Das breite Signal mit dem Maximum bei 4.9 ppm kann nicht eindeutig zugeordnet werden. Frühere Studien zeigen strukturell gebundenes Wasser von aCC im Bereich von 5.3 ppm – 5.0 ppm.^[138,140] Auch alkoholische Hydroxygruppen zeigen ein Protonensignal im Bereich von 6.0 ppm – 4.0 ppm. Die Verbreitung kann demnach auf die unterschiedlich starke Koordination der OH-Funktion von Ethylenglykol an Ca^{2+} oder durch schwach koordiniertes Wasser in aCC zurückgeführt werden. Das Signal bei 1.0 ppm zeigt das Vorhandensein einer deprotonierten Ethylenglykol-Spezies an. Darauf basierend postulierten Schüler *et al.*^[131] einen Synthesemechanismus für Vaterit ausgehend von der thermischen Zersetzung von Calciumhydrogencarbonat. Das Vorkommen einer Hydrogencarbonat-Spezies konnte im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Typische Signale des Hydrogencarbonats im Bereich von $\delta(^{13}\text{C})$ 162.0 – 164.0 ppm und $\delta(^1\text{H})$ 12.0 – 18.0 ppm konnten mittels NMR-Analyse nicht gefunden werden.^[138,141–143]

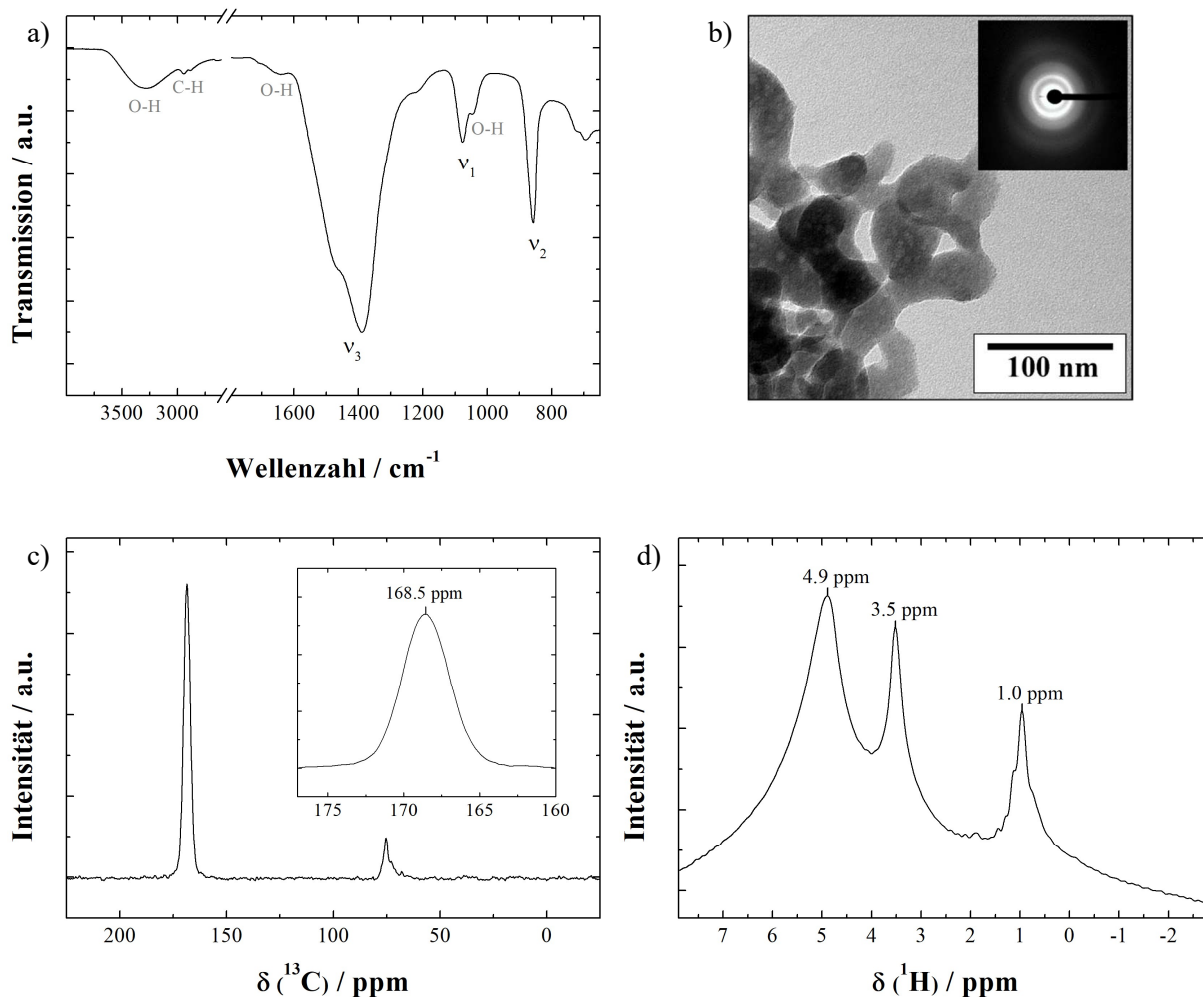


Abb. 2 - 3 Charakterisierung der amorphen Calciumcarbonat-Phase. a) FTIR-Spektrum mit den charakteristischen Schwingungsmoden von CO_3^{2-} in aCC (ν_1 : symmetrische C-O Streckschwingung, ν_2 : O-C-O Kipp-Deformationsschwingung out-of-plane, ν_3 : asymmetrische C-O Streckschwingung). b) TEM-Aufnahme von aCC mit entsprechendem Beugungsbild. c) ^{13}C MAS-NMR-Spektrum, d) ^1H MAS-NMR-Spektrum.

Die Zusammensetzung des amorphen Zwischenproduktes wurde über thermogravimetrische und differentielle Thermoanalyse (TGA-DTA) analysiert (Abb. 2-4). Die TGA-Kurve zeigt zwei Massenverluste im Temperaturbereich von 70 – 200 °C und 270 – 450 °C auf. Der erste Massenverlust (-6 Gew.-%) kann auf strukturell gebundenes Wasser in aCC zurückgeführt werden. Der zweite Massenverlust (-10 Gew.-%) zeigt die Zersetzung der koordinierenden Ethylenglykol-Liganden an. Die Zusammensetzung von aCC kann demnach als $\text{CaCO}_3 \times 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ und stimmt mit den Werten früherer Arbeiten überein.^[137,139,140,144] Der exotherme Effekt der DTA-Kurve bei 340 °C wird auf die Kristallisation von aCC zu Calcit zurückgeführt.^[145] Koordiniertes Ethylenglykol zeigt somit keinen Einfluss auf die thermisch induzierte Kristallisation von aCC.

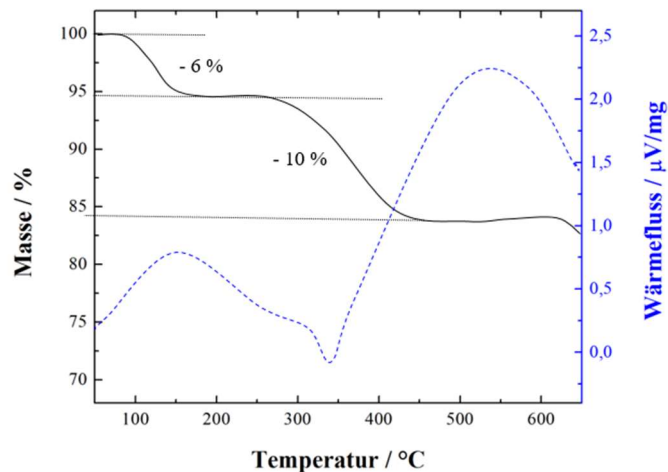


Abb. 2 - 4 TGA-DTA Kurve von aCC mit stabilisierendem Ethylenglykol-Liganden. Die Massenverluste sind auf sturktuell gebundenes Wasser sowie die thermische Zersetzung von Ethylenglykol zurückzuführen. Die DTA-Kurve zeigt die thermische induzierte Kristallisation von ACC zu Calcit bei 340°C.

Um den Einfluss von Wasser auf die Kristallisation zu untersuchen, wurde der Reaktionslösung Wasser in Konzentrationen von 10%, 30% und 50% (v/v) zugegeben. Der Kristallisationsprozess wurde in Abhängigkeit der Zeit verfolgt. Um eine verlangsamte Kristallisation und somit eine bessere Analyse zu ermöglichen, wurde auf eine weitere Ultraschallbehandlung verzichtet. Stattdessen wurde ein Magnetrührer (250 rpm) zum Dispergieren verwendet. Die Aliquotentnahme erfolgte in unterschiedlichen Zeitintervallen über eine Gesamtreaktionsdauer von 5h. Zur Analyse des Kristallisationsfortschrittes wurden die Schwingungsmoden ν_2 (O-C-O-Kipp-Defomationsschwingung, *out-of-plane*) sowie ν_4 (O-C-O Kipp-Deformationsschwingung, *in-plane*) betrachtet. Freie Carbonat-Ionen mit D_{3h} -Symmetrie zeigen eine ν_2 -Schwingungsbande bei 879 cm^{-1} .^[146] Die unterschiedlich starken Wechselwirkungen und Symmetrieeigenschaften des Carbonats in Bezug auf die Calciumcarbonat-Polymorphe resultiert in einer Verschiebung der ν_2 und ν_4 -Schwingungsbande und einem Symmetrieverbot der ν_1 -Schwingungsbande (Calcit). Somit lassen sich die amorphen und kristallinen Polymorphe des Calciumcarbonates anhand dieser Schwingungsbanden unterscheiden (Tabelle 2-1).

Tab. 2 - 1 IR-Schwingungsmoden des Calciumcarbonat-Ions für die wasserfreien, kristallinen Calciumcarbonat-Polymorphe und für aCC. ν_1 (symmetrische C-O Streckschwingung), ν_2 (O-C-O Kipp-Deformationschwingung out-of-plane), ν_3 (asymmetrische C-O Streckschwingung), ν_4 (O-C-O Kipp-Deformationschwingung in-plane). In Anlehnung an Andersen *et al.*^[134]

	aCC	Vaterit	Aragonit	Calcit
ν_1 / cm^{-1}	1067	1089	1089	-
ν_2 / cm^{-1}	864	877	854	877
ν_3 / cm^{-1}	1490, 1425	1487, 1445	1488, 1440	1420
ν_4 / cm^{-1}	725, 690	746, 738	713, 700	713

In Abb. 2-5 sind die FTIR-Spektren und die transelektronenmikroskopischen Aufnahmen des amorphen Calciumcarbonates vor Wasserkontakt ($t = 0\text{h}$), einer Momentaufnahme während der Kristallisation ($t = 10\text{min}$) sowie des Endprodukt ($t = 5\text{h}$) in Abhängigkeit der zugegebenen Wassermenge dargestellt.

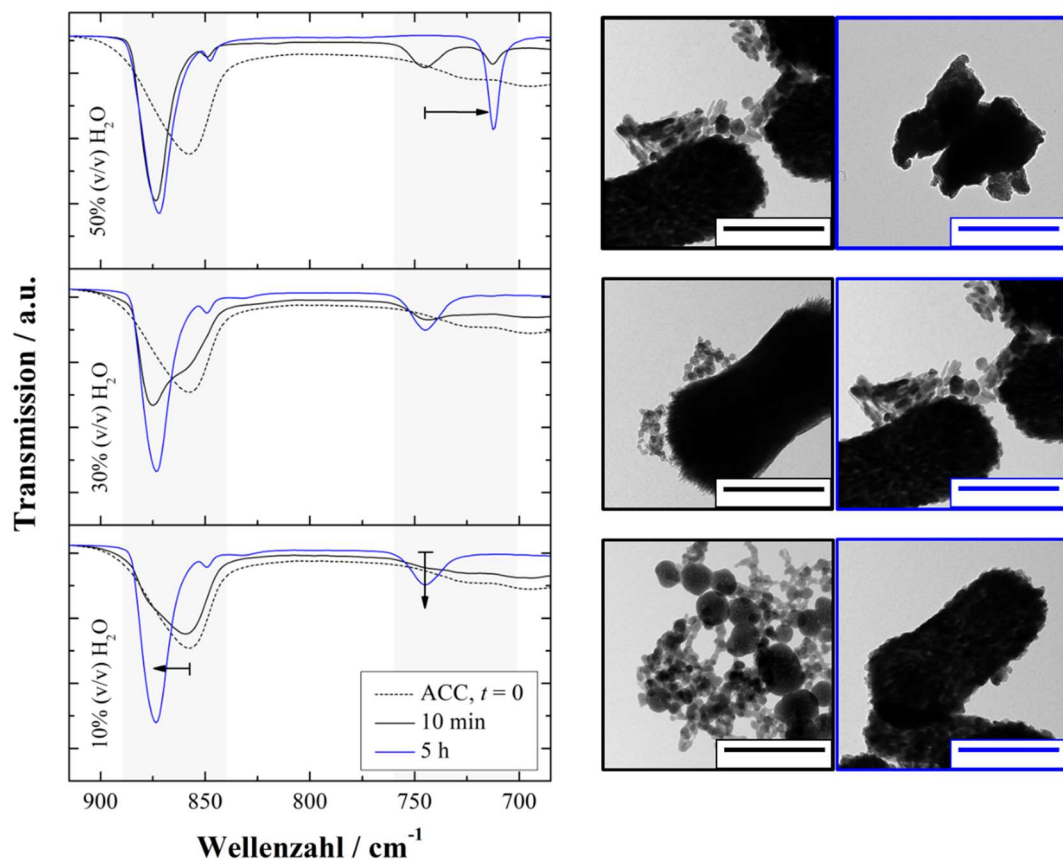


Abb. 2 - 5 FTIR-Spektren und TEM-Aufnahmen während der Kristallisation von Calciumcarbonat in Abhängigkeit des Verhältnisses von Ethylenglykol zu Wasser. Aufgenommen zu den Zeitpunkten $t = 0\text{ min}$, 5 min , 5 h . Skala: 500 nm .

Wie bereits beschrieben, bildet das amorphe Calciumcarbonat agglomerierte, tropfenförmige Nanopartikel mit einem Durchmesser von ~ 25 nm und zeigt im FTIR-Spektrum eine charakteristische, stark verbreiterte Bande bei 860 cm^{-1} (Abb. 2 - 3 a), b)). Die Momentaufnahmen der Kristallisation ($t = 10$ min) zeigen, dass in Abhängigkeit des Wassergehaltes verschiedene Calciumcarbonat Modifikationen entstanden sind, die sich in ihrer Morphologie unterscheiden. Während bei geringem Wassergehalt das amorphe Calciumcarbonat die vorherrschende Modifikation ist, dominieren bei höherem Wassergehalt die wasserfreien, kristallinen Modifikationen des Calciumcarbonats. Bei einem Wasseranteil von 30% (v/v) sind die Nanoaggregate elliptischer Vaterit Nanopartikel zu erkennen. Die zusätzlich auftretende rhomboedrische Morphologie bei einem Wasseranteil von 50% (v/v) zeigt die Bildung von Calcit, dem thermodynamisch stabilen Endprodukt. Die morphologischen Unterschiede stehen im Einklang mit der FTIR-Analyse. Die Aufspaltung und Verschiebung der ν_2 -Schwingungsbande hin zu höheren Wellenzahlen belegt die Entstehung der kristallinen Polymorphe Vaterit und Calcit. Die Verschiebung ist auf den Zugewinn an Symmetrie und die ausgeprägten Wechselwirkungen von Ca^{2+} und CO_3^{2-} zurückzuführen. Bei einem Wasseranteil von 10% - 30% (v/v) kann die Kristallisation zum thermodynamisch stabilen Produkt Calcit nicht beobachtet werden. Auch nach 5 Stunden ist der metastabile Vaterit die vorherrschende Phase. Die FTIR-Spektren als auch die TEM-Aufnahmen dieser Reaktionsreihen belegen die Koexistenz von amorpher und kristalliner Modifikation und lassen einen Auflösungs- und Rekristallisationsmechanismus vermuten. Ab einem Wasseranteil von 50% (v/v) kann die Entstehung von Calcit anhand der ν_4 -Schwingungsbande bei 713 cm^{-1} und der rhomboedrischen Morphologie detektiert werden.

Innerhalb einer Reaktionszeit von 5 Stunden kann in Abhängigkeit des Ethylenglykol zu Wasser - Verhältnisses das kinetische Produkt, der metastabile Vaterit (10% - 30% (v/v) H_2O) isoliert werden. Erst bei höheren Wasseranteilen scheint die Diffusion ausreichend hoch zu sein um die Kristallisation von Calcit zu induzieren. Um den zeitlichen Verlauf der Kristallisation in Abhängigkeit des Verhältnisses von Wasser zu Ethylenglykol besser beschreiben zu können, wurden die relativen Mengen der amorphen und kristallinen Phasen in Abhängigkeit der Zeit extrahieren. Der Transmissionsgrad T wurde in den Absorptionsgrad A ($A = -(\log(T))$) umgewandelt, der nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional zur Konzentration der jeweiligen Modifikation ist. Anschließend konnte unter Verwendung einer pseudo-Voigt Funktion der kristalline Anteil ermittelt werden.

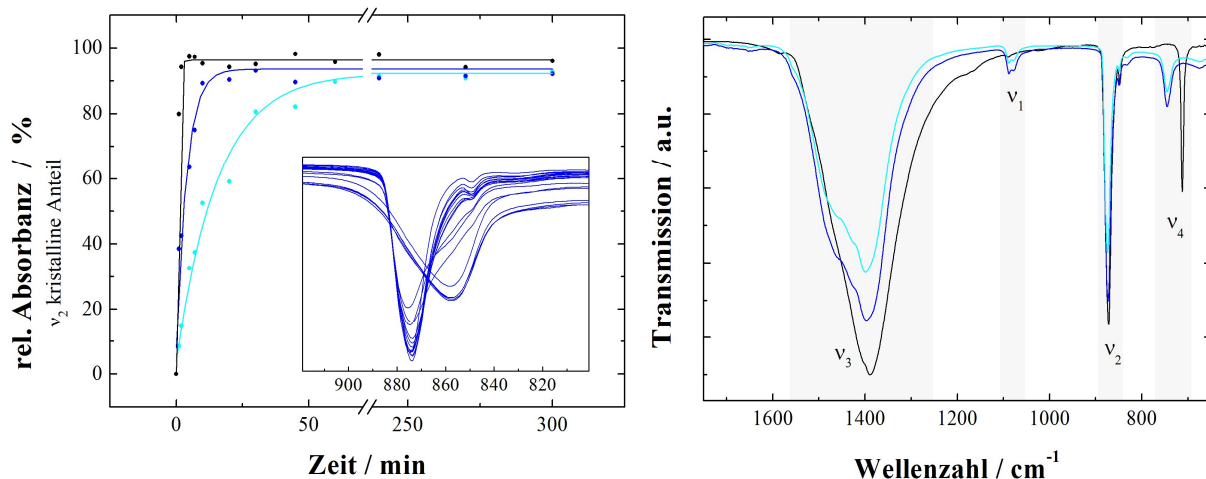


Abb. 2 - 6 Kristallisation von aCC in Ethylenglykol/Wasser-Gemisch für verschiedene Wasserkonzentrationen. a) Auswertung der ν_2 -Schwingungsbande zur Bestimmung des kristallinen Anteils. Inset: FTIR-Spektrum 30% (v/v) H_2O . b) FTIR-Spektren der Calciumcarbonate nach 5h Reaktionszeit und Wasseranteilen von 10% (v/v) (türkis), 30% (v/v) (blau), 50% (v/v) (schwarz).

Abbildung 2-6 a) zeigt die Zunahme des kristallinen Calciumcarbonat-Anteils in Abhängigkeit der Wassermenge als Funktion der Zeit. Der unterschiedliche Verlauf der Kurven deuten darauf hin, dass höhere Wasserkonzentrationen die Phasentransformation von amorph zu kristallin erheblich beschleunigen und belegen den entscheidenden Einfluss von Wasser auf den Kristallisationsprozess. Die Kristallisation wird in Abhängigkeit der Wasserkonzentration durch die Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit und der Löslichkeit der verwendeten Substanzen stark beeinflusst. Die erhöhte dynamische Viskosität von Ethylenglykol führt zu einer verminderten Diffusion und kann den Kristallisationsprozess verlangsamen. Folglich nimmt die Kristallinität bei niedrigen Wasseranteilen zunächst nur langsam zu (Abb. 2-6 a)). Nach dem Prinzip von Ostwald und Vollmer kristallisiert aCC zunächst als Vaterit. Die hohe Löslichkeit von Vaterit ($K_{sp} = 1,22 \times 10^{-8} \text{ mol}^2/\text{l}^2$) begründet den verzögerten Anstieg der Kristallinität in Zusammenhang mit dem Wassergehalt. Bei niedrigem Wasseranteil wird mehr Zeit benötigt um durch die Auflösung von aCC eine entsprechende Übersättigung zur Nukleation von Vaterit zu erreichen. Ein hoher Wasseranteil führt zur Kristallisation des thermodynamisch stabilen Produkt Calcit. Dieser Transformationsprozess ist bei niedrigem Wasseranteil (10% - 30% (v/v)) so langsam, dass er mit dem vorgestellten Versuchsaufbau nicht realisierbar war.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde der Versuchsaufbau auf die Ultraschallmethode von Schüler *et al.*^[131] übertragen. Durch den zusätzlichen energetischen Eintrag der Ultraschallbehandlung konnte nach einer Reaktionszeit von ca. 15min auch bei niedrigem Wasseranteil (10%(v/v)) die Bildung von Calcit beobachtet werden (Abb. 2-7) und belegt den Einfluss des Ultraschalls auf die Kristallisation.

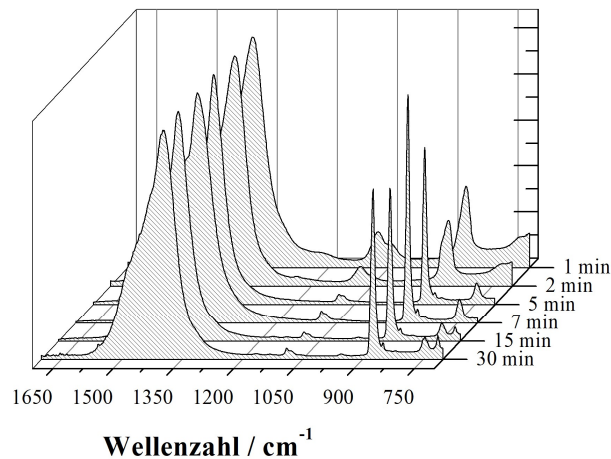


Abb. 2 - 7 Kristallisationsverlauf von amorphem Calciumcarbonat in Ethylenglykol/Wasser (10% (v/v)) und Ultraschallbehandlung für einen Gesamtzeitraum von 30 min.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann ein möglicher Mechanismus zur Synthese von Vaterit in Ethylenglykol-Wasser Gemischen mittels Ultraschallbehandlung schematisch zusammengefasst (Abb. 2-8) und wie folgt beschrieben werden.

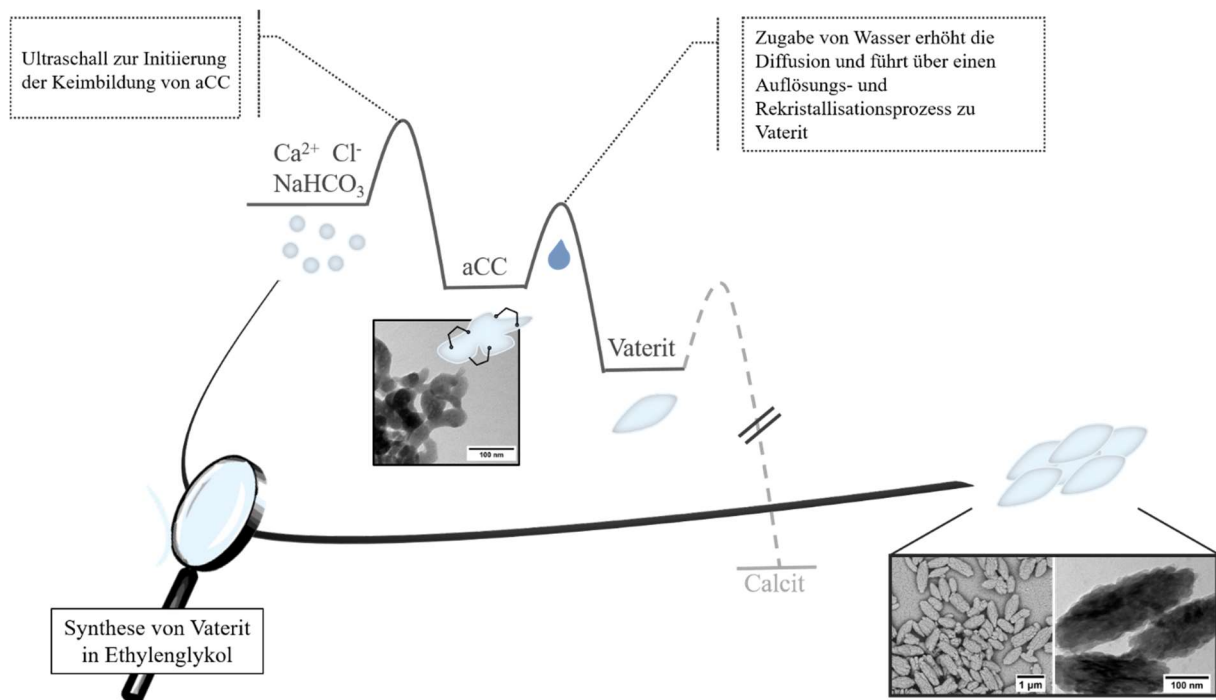


Abb. 2 - 8 Schematische Darstellung eines möglichen Kristallisationsmechanismus von Vaterit Nanopartikeln ausgehend von Calciumchlorid-Dihydrat und Natriumhydrogencarbonat in Ethylenglykol.

Calciumchlorid-Dihydrat wurde in Ethylenglykol gelöst und mit einer Suspension von Natriumhydrogencarbonat in Ethylenglykol versetzt. Mit zunehmendem Ethylenglykolanteil im Reaktionsmedium sinkt die Dielektrizitätskonstante des Mediums und folglich die Löslichkeit der verwendeten Salze. Ohne die Einwirkung von Ultraschall auf die Reaktionslösung konnte die Bildung von Calciumcarbonaten in entsprechenden

Vergleichsversuchen nicht gefunden werden. Es kann angenommen werden, dass die Nukleation des amorphen Calciumcarbonats auf synergistisch wirkenden Effekte von Reaktionsmedium, Kristallwasser und Ultraschallbehandlung zurückzuführen ist. Ultraschallwellen breiten sich in Form von Longitudinalwellen aus und führen durch abwechselnde Bereiche der Kompression und Verdünnung zur Bildung von Kavitationsblasen. Das Kollabieren der Kavitationsblase erzeugt innerhalb dieses Bereiches lokal extreme Bedingungen (Druck- und Temperaturanstieg) und zudem Scherkräfte in dem umgebenden Lösungsmittel, die in der Lage sind die Löslichkeit zu erhöhen.^[147] Dieser mechanische Effekt bzw. der zusätzliche Energieeintrag des Ultraschalls erhöht die Löslichkeit der verwendeten Salze in Ethylenglykol. Die Senkung der potentiellen Energie in den Fluktuationsregionen sowie die Koordination von Ca^{2+} durch die OH-Funktion des Ethylenglykols führen zu einer lokal hohen Übersättigung und nach Ostwald-Vollmer zur Nukleation des amorphen Calciumcarbonates. FTIR-Analysen, TGA-Analyse sowie ^{13}C und ^1H MAS-NMR-Experimente deuten darauf hin, dass das amorphe Zwischenprodukt durch die Koordination von Ethylenglykol kinetisch stabilisiert wird. Die Koordination der O-H Gruppen an der Partikeloberfläche kompensiert letztlich die Oberflächenenergie und führt so zu einer verbesserten thermodynamischen Stabilität. Durch die Zugabe von Wasser als Co-Lösungsmittel zur Reaktionslösung kann die Nukleation von Vaterit beobachtet werden. Ethylenglykol ist mit Wasser in allen Verhältnissen mischbar und kann aufgrund der O-H-Funktion dreidimensionale Netzwerke bilden, die denen von Wasser ähnlich sind.^[148] Die Geschwindigkeit des wasserinduzierten Auflösungs- und Rekristallisationsprozesses wird durch die Erhöhung der Diffusion der Ionen und somit durch den Anteil an Wasser im Reaktionsmedium bestimmt. Bei niedrigem Wasseranteil wird aufgrund der hohen Löslichkeit von Vaterit mehr Zeit benötigt um durch die Auflösung von aCC eine entsprechende Übersättigung zur Bildung von Vaterit zu erreichen. Zusätzlich kann angenommen werden, dass bei einem Überschuss von Ethylenglykol, Wasser bevorzugt an die Ca^{2+} koordiniert. Die Bindung der Hydratationshülle sollte stärker sein und kann somit zu einer kinetischen Barriere für die Kristallisation führen. Gleichzeitig erhöht die verringerte Löslichkeit die Tendenz zur Übersättigung und begünstigt die Bildung des kinetischen Produktes Vaterit.

Neben der chemischen Analyse wurden die nach Abschnitt 2.2. synthetisierten Vaterit Nanopartikel anhand eines systematischen Ansatzes auf ihre biologische Eignung als Biomaterial getestet und erste *in vitro* Studien zur Risikobewertung durchgeführt.

2.3.2. Vaterit – *In Vitro* Studien

E-Selektin Expression durch HUVEC

Endotoxin (auch bekannt als Lipopolysaccharid LPS) ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien und wird in pathologischen Mengen durch abgetötete bzw. lysierte Bakterien freigesetzt. Bakteriell Endotoxin führt im menschlichen Organismus zu spezifischen Entzündungsreaktionen begleitet von Fieber und Zell- bzw. Gewebeschäden.^[106] Somit können auch sterile Biomaterialien, frei von Kontaminationen mit lebensfähigen Organismen, endotoxin-vermittelte proinflammatorische Effekte auslösen. Zur weiteren Beurteilung der Vaterit-Nanopartikel hinsichtlich bakteriellem Endotoxin, wurde die Stoffwechselaktivität von primären Endothelzellen in Anwesenheit von Vaterit Nanopartikel *in vitro* betrachtet. Endothelzellen reagieren *in vitro* und *in vivo*, ausgehend von Entzündungsreaktionen/auf Entzündungsreaktionen mit einer verstärkten Expression von E-Selektin (endothelspezifisches Membranglykoprotein), das folglich als Marker für bakterielles Endotoxin dient.^[105] Mittels Antikörper-basierter Immunfluoreszenz-Färbung wurde die Expression von E-Selektion primärer Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) in Anwesenheit der Vaterit Nanopartikel (250 µg/mL) untersucht.

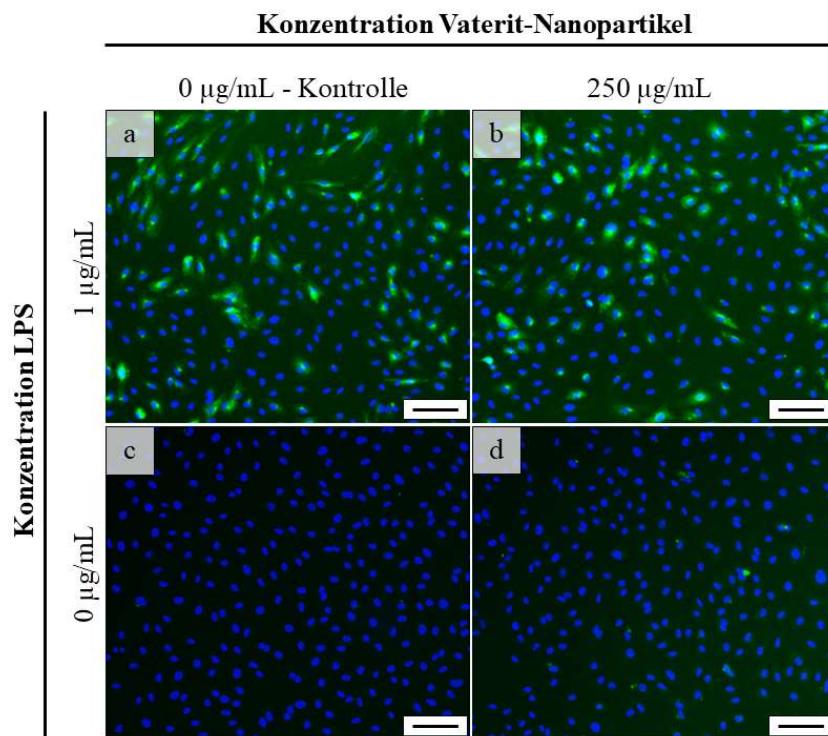


Abb. 2 - 9 Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung zum Nachweis von E-Selektin, getestet an primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). (a) Positiv-Kontrolle: mit 1,0 µg/mL LPS stimulierte HUVEC ohne Vaterit, (b) Positiv-Kontrolle: mit 1,0 µg/mL LPS stimulierte HUVEC mit Vaterit, (c) Negativ-Kontrolle: unbehandelte HUVEC, (d) mit 250 µg/mL Vaterit behandelte HUVEC. E-Selektin wurde mittels Antikörper-Färbung grün markiert. Die Zellkerne wurden mittels Höchst Dye 33342 blau angefärbt.

Abb. 2 - 9 zeigt die Zusammenstellung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Um die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Methode zu prüfen, wurden je eine Positiv-Kontrolle für Vaterit-unbehandelte Zellen (a) als auch für mit Vaterit-behandelte Zellen (b) mitgeführt. Die Expression von E-Selektin in den Positiv-Kontrollen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimuliert und mittels Antikörper-Färbung detektiert. Um mögliche individuelle Fehlerquellen während des Experimentes auszuschließen und somit eine ausreichende Spezifität sicherzustellen, wurde eine Negativ-Kontrolle (Vaterit-unbehandelte Zellen, keine LPS Stimulation, (c)) angefertigt. Die Aufnahme der Vaterit-behandelten Zellen/der Probe (d) stimmt mit der negativ-Kontrolle, in der -wie erwartet- kein E-Selektin mittels Antikörper-Färbung nachgewiesen werden konnte, überein. Auch die Expression von E-Selektin (visualisiert: Grünfärbung) der positiv-Kontrollen sind vergleichbar und somit unabhängig von der Exposition mit Vaterit-Nanopartikel. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein Endotoxin-freies Material vorliegt, von dem kein proinflammatorisches Potential ausgeht.

Zytotoxizität

Zur Prüfung der biomaterialinduzierten Toxizität wurde die Stoffwechselaktivität der Osteoblasten-Zelllinie MG63 nach Exposition mit Vaterit Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen anhand sich ergänzender *in vitro* Testverfahren untersucht. Hierzu wurde sowohl die metabolische Aktivität der Zellen mittels RES-Assay, als auch die Integrität der Zellmembran (Rückschlüsse auf Zellschädigungen/Zelllyse) durch die Bestimmung von LDH detektiert. Die Experimente wurden mit Vaterit-Nanopartikeln in den Konzentrationen 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt. In Abbildung 5.9 sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätsstest graphisch gegenübergestellt.

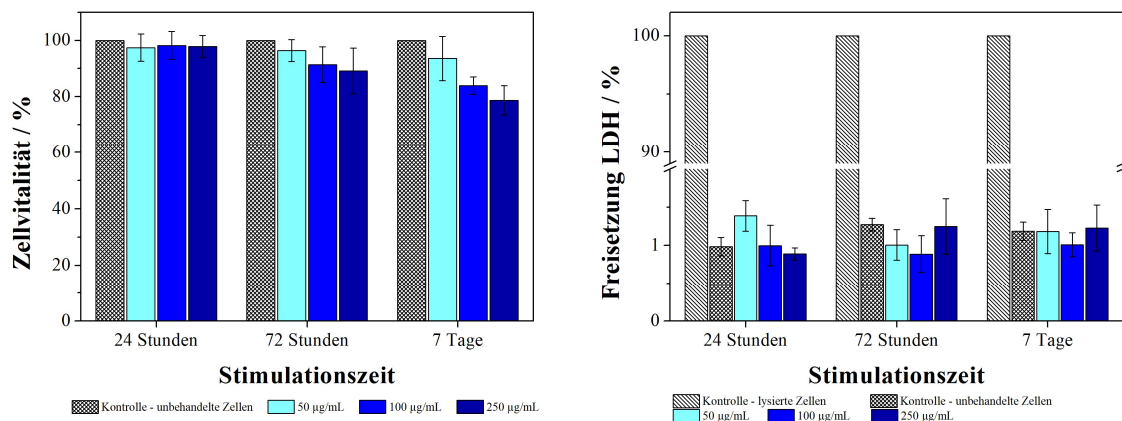


Abb. 2 - 10 Graphische Darstellung der Zytotoxizitätsassays (RES-Assay: links, LDH-Assay: rechts), getestet an der osteoblastischen Zelllinie MG63. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Experimenten, mit jeweils 3 technischen

Replikaten pro Stimulation, sind dargestellt. Die Angabe der statistischen Signifikanz erfolgte durch einen Student T-Test, Typ 3, mit $*p < 0,05$ im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Der RES-Assay (Abb. 2-10 links) dient zur Analyse der zellulären metabolischen Aktivität und gibt somit Rückschlüsse auf die Vitalität der verwendeten Zellen nach Exposition. Als Kontrollversuch wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die gemessene Zellvitalität der unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt und wird als Referenz/Vergleichswert herangezogen. Zu Beginn des Inkubationszeitraumes/In einem Zeitraum von bis zu 24h ist kein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität der MG63 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen/der Kontrolle zu erkennen. Bei längeren Stimulationszeiten und höheren Vaterit-Nanopartikel Konzentrationen (100 $\mu\text{g/mL}$ und 250 $\mu\text{g/mL}$) wurde ein geringes Fluoreszenzsignal detektiert, dass auf eine Abnahme der Zellvitalität durch zytotoxische Effekte ausgehend von den Vaterit Nanopartikeln zurückgeführt werden könnte. Die von Vaterit Nanopartikeln ausgehenden möglichen zytotoxischen Effekte würden, neben der Reduktion der metabolischen Aktivität/Stoffwechselaktivität, auch eine verstärkten Zelllyse induzieren und somit in einer vermehrten Freisetzung von LDH resultieren. Daher wurde als ergänzendes Testverfahren ein LDH-Assay unter gleichen Bedingungen/mit konstanten Versuchsparametern durchgeführt (Konzentration, Zeitraum). Neben der Negativ-Kontrolle (unbehandelten Zellen als Referenz/Vergleichswert) wurden zusätzlich unbehandelte Zellen lysiert, sodass von einer 100%igen Freisetzung von LDH ausgegangen werden kann. In einem Zeitraum von bis zu 7 Tagen konnte bei allen getesteten Vaterit Konzentrationen kein signifikanter Unterschied in der LDH-Freisetzung der MG63 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Somit können Vaterit-induzierte zytotoxische Effekte ausgeschlossen und von intakten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten und Konzentrationen ausgegangen werden. Dieses Ergebnis impliziert außerdem, dass andere Faktoren/zeitabhängige Faktoren die Messung des RES-Assay bei hohen Konzentrationen über einen längeren Zeitraum beeinflusst haben könnte. Die inhärente Instabilität von Vaterit lässt vermuten, dass während des Inkubationszeitraumes durch anfängliche Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse zunehmend Biomaterial kristallisiert, deren zunehmende Streuung zu einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals führt. Hinsichtlich/Unter diesem Aspekt, kann unter Kombination der beiden Testverfahren RES-Assay und LDH-Assay eine biomaterialinduzierte Toxizität ausgehend von Vaterit-Nanopartikeln als unwahrscheinlich betrachtet werden.

Zellbiokompatibilität

Zur Prüfung der allgemeinen Gewebetoleranz und der zellulären Wechselwirkungen, wurden die durch Inkubation gewebspezifischer Zellen mit dem entsprechenden Biomaterial hervorgerufene Veränderungen im Proliferationsverhalten und der Zellmorphologie untersucht. Es wurden sowohl osteoblastische Zellen (MG63) als auch Endothelzellen (HUVEC) mit Vaterit-Nanopartikeln unterschiedlicher Konzentrationen (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL) über einen Zeitraum von 7 Tagen inkubiert. In den Abbildungen 5.11 und 5.12 sind ausgewählte, repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie MG63 sowie der primären Endothelzellen HUVEC zusammengestellt.

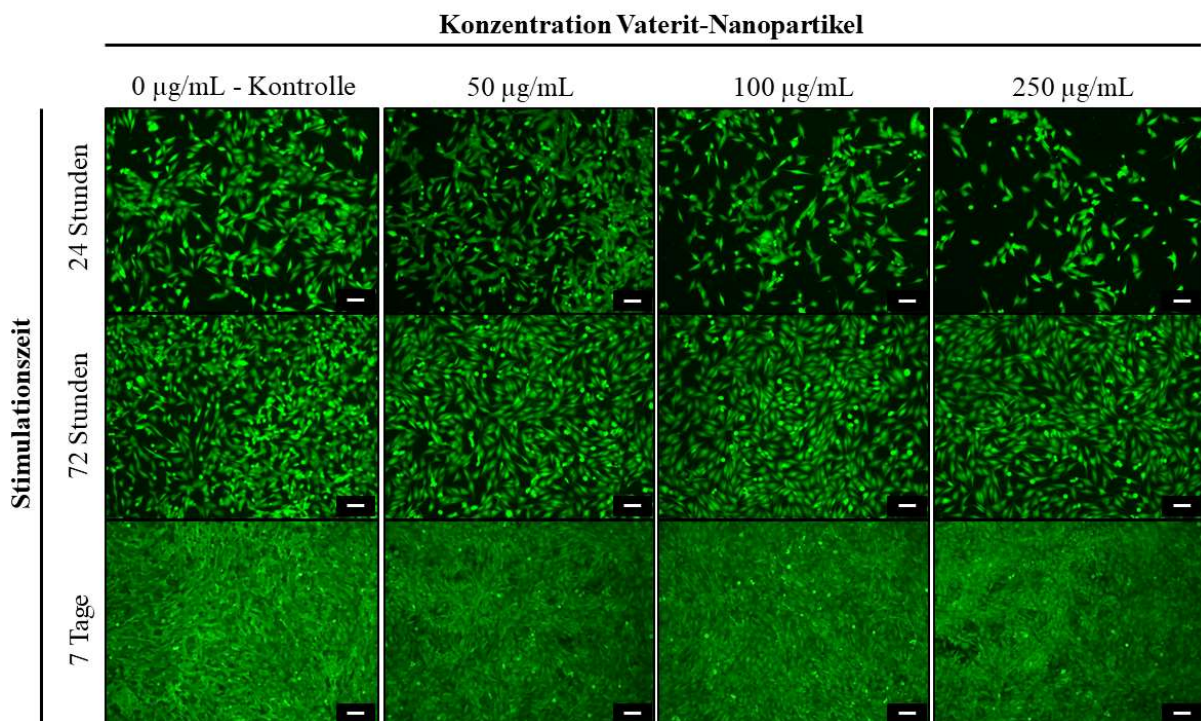


Abb. 2 - 11 Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von Vaterit Nanopartikel, getestet an osteoblastischen Zellen der Zelllinie MG-63. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

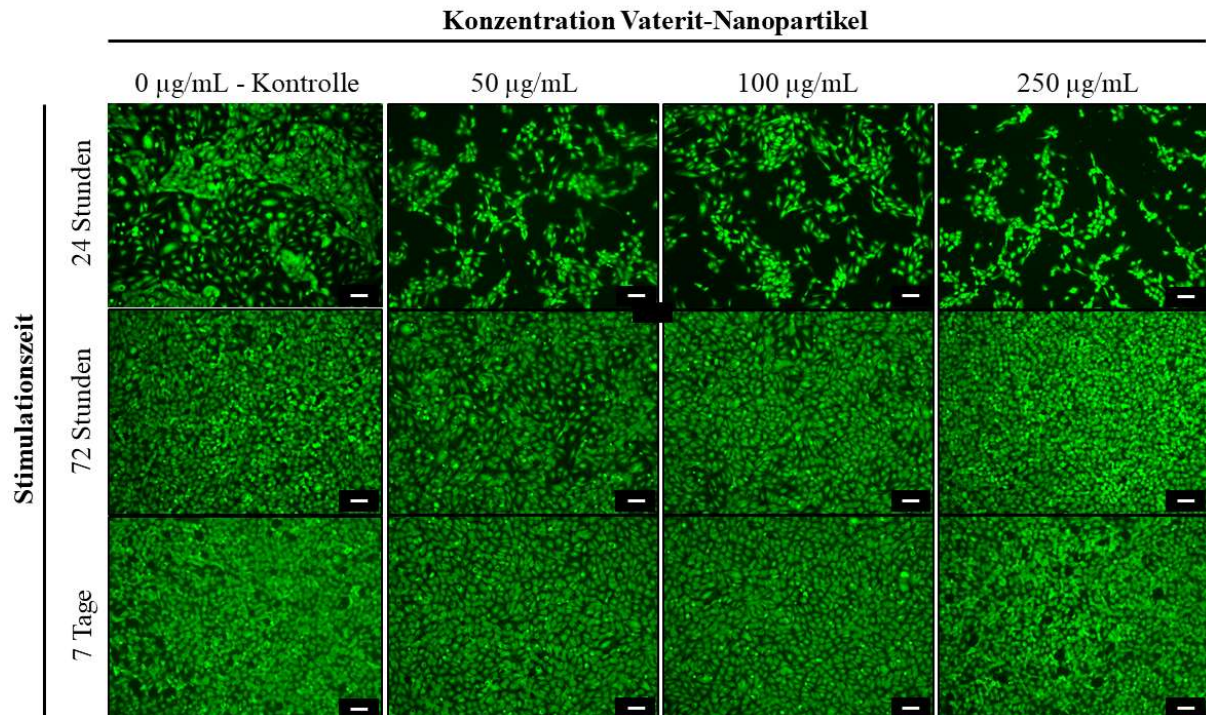


Abb. 2 - 12 Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von Vaterit Nanopartikel, getestet an der humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden in jedem Experiment eine Versuchskontrolle unbehandelter Zellen mitgeführt, deren Wachstumsverhalten als Vergleich/Referenz dient. In allen Experimenten zeigen die mit Vaterit-Nanopartikeln exponierten Zellen ähnliche Wachstumsverteilungen (im Vergleich zur Kontrolle) und zudem eine adhärente und typische Zellmorphologie. Weil Vaterit als metastabile Calciumcarbonat-Modifikation chemisch als nicht stabil gilt, wurden die Vaterit-Nanopartikel nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen mittels FTIR-Spektroskopie und REM-Messungen erneut charakterisiert (s. Anhang A). Neben Vaterit konnte eine Phosphatspezies nachgewiesen werden, die auf einen möglichen Auflösungs- und Rekristallisationsmechanismus der Vaterit-Nanopartikel hindeutet und somit eine kurzzeitige Änderung der Ionenstärke des Mediums hervorrufen würde. Aus diesem Grund ermöglicht der direkte Kontakt zwischen Vaterit-Nanopartikeln und gewebespezifischer Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen nicht nur die Prüfung der Vaterit-Nanopartikel sondern vielmehr die Toleranz gegenüber der Anfänge eines gewünschten Transformationsprozesses, der in Kapitel 3 näher untersucht und beschrieben wird.

Experiment zum Zellwachstum auf Vaterit-Presslingen

Um zusätzlich zur der Zellbiokompatibilität der Vaterit-Nanopartikel auch das Wachstumsverhalten der osteoblastischen Zellen MG63 auf dem Biomaterial zu prüfen, wurden gepresste Prüfkörper aus Vaterit mit einem Durchmesser von ca. 15 mm und einer Höhe von 2 mm angefertigt. Die Maße der Rundproben wurden passend für eine 24Well-Zellkulturplatte gewählt. Als Kontrollmaterial wurde das Zellkultur-Polystyrol der 24Well- Zellkulturplatte verwendet, sodass zusätzlich das Wachstumsverhalten mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie das Ablöseverhalten der Zellkulturen während des Experimentes verfolgt werden konnte. Nach einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden, 72 Stunden, 5 Tagen, 7 Tagen und 10 Tagen wurden die adhärennten Zellen des Kontrollexperimentes und der Prüfkörper abgelöst und die relative Zellzahl mit einem CASY-1 Zellanalysesystem bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 -13 graphisch dargestellt.

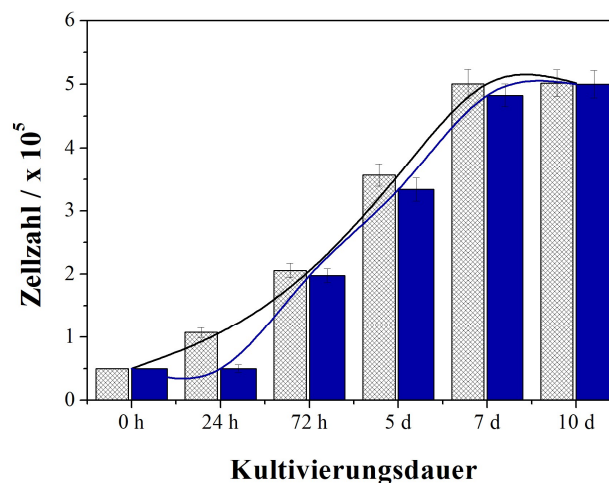


Abb. 2 - 13 Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens der Osteoblasten-Zelllinie MG63 auf Vaterit-Prüfkörpern.

Sowohl die Analyse/Ergebnisse des Kontrollexperimentes (Zellkultur-Polystyrol) als auch der Prüfkörperproben zeigen eine stetige Zunahme der Zellzahl während des Inkubationszeitraumes von 7 Tagen. Während das Zellwachstum des Kontrollexperimentes einen annähernd linearen Verlauf aufweist, scheint Zellproliferation der MG63 auf dem Vaterit-Prüfkörper zunächst gehemmt. Der sigmoidale Verlauf der Wachstumskurve kann auf eine anfänglich weniger ausgeprägte Zelloberflächenbindung zurückgeführt werden. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Matrixproteine wie Hyaluronan (auch bekannt als Hyaluronsäure) eine Schlüsselfunktion in der Zelloberflächenbindung besitzen und erste Zelladhärenz-Schritte von Osteoblasten vermitteln. Demnach kann der verzögerte Anstieg der Zellzahl durch eine notwendige

Adsorption stark negativ geladener Matrixproteine wie Hyaluronan vor der Adhäsion der Osteoblasten erklärt werden. Im Zeitraum von ca. 2 bis 7 Tagen ist der Anstieg der Zellzahl annähernd linear und mit der Kontrolle vergleichbar. Ab einem Kultivierungszeitraum von 7 Tagen lässt sich die stationäre Phase des Zellwachstums anhand eines Plateaus und einem abgeflachten Kurvenverlauf erkennen. Die Abnahme der Zellzahl in diesem Zeitraum lässt sich durch die zweidimensionale Kultivierung der Zellen erklären. Die Zellproliferation führt in einer zweidimensionalen Kultivierung im Laufe der Zeit zu einem vollständig ausgebildeten, nicht mehr steigerungsfähigen Monolayer, sodass nachwachsende Zellen eine gleichzeitige Ablösung und Apoptose der vorhandenen Zellen verursachen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Kontrollexperimentes nach 7 und 10 Tagen (s. Anhang A), zeigen einen konfluenten Monolayer und bestätigen somit die Annahme, dass zunehmend weniger Zellen adhären können. Letztlich zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass das Proliferationsverhalten der MG63 auf dem Prüfkörper Vaterit vergleichbar mit der Kontrolle ist. Diese Ergebnisse erlauben somit den Rückschluss, dass Vaterit als Biomaterial nicht nur biokompatibel ist, sondern durch seine positive Oberflächenladung ($13,5 \pm 0,8$ mV) erste Adhärenz-Schritte der MG63 stimulieren kann und die Proliferation adhärenter Zellen nicht negativ beeinflusst.

2.4. Zusammenfassung und Ausblick

Für die phasenreine Synthese des metastabilen Vaterit ist das Verständnis des Kristallisationsprozesses unter entsprechenden Synthesebedingungen, sowie die Abstimmung der Syntheseparameter eine notwendige Aufgabe. Die in dieser Arbeit verwendete Syntheseroute basiert auf den Arbeiten von Schüler *et al.*,^[131] die eine Vateritsynthese durch Ultraschalleinwirkung auf eine Dispersion von Calciumchlorid-Tetrahydrat und Natriumhydrogencarbonat in Ethylenglykol formulieren. Da Vaterit eine relativ hohe Löslichkeit in Wasser aufweist und somit eine schnelle Rekristallisation zu thermodynamisch stabileren Polymorphen erfolgt, wurde das von Schüler *et al.*^[131] verwendete Reaktionslösungsmittel Ethylenglykol übernommen und dessen Einfluss auf den Kristallisationsprozess untersucht. Das Reaktionslösungsmittel gilt als kritischer Faktor des Syntheseprozesses hinsichtlich der Steuerung der entstehenden Calciumcarbonat-Polymorphe. Durch die Dielektrizitätskonstante und die dynamische Viskosität des Mediums sowie die Solvatisierung der Ionen, wird die Kinetik der Keimbildung und das Kristallwachstum beeinflusst.^[127,149–151] Die Kombination dieser Faktoren führt zur Nukleation von amorphem Calciumcarbonat. Es wird vermutet, dass die Stabilisierung dieser transienten amorphen Phase auf der Koordination der Polyol O-H Gruppen an der Partikeloberfläche beruht, die letztlich die Oberflächenenergie kompensieren und so zu einer verbesserten thermodynamischen Stabilität führt.^[127,149] Zusätzlich wird durch die erhöhte Viskosität von Ethylenglykol die Ionendiffusivität eingeschränkt und dadurch die Geschwindigkeit der Kristallisation verlangsamt. Durch die Zugabe definierter Anteile von Wasser als Co-Lösungsmittel kann die Nukleation von Vaterit über einen Auflösungs- und Rekristallisationsprozess beobachtet werden. Die Stabilisierung von Vaterit ist auf die bereits diskutierten Eigenschaften von Ethylenglykol als Hauptkomponente des Reaktionsmediums und die daraus resultierenden Effekte zurückzuführen. Letztlich konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit des Wasseranteils die Phasenumwandlung abgestimmt werden kann, indem die Geschwindigkeit der Ionenverteilung im Ethylenglykol-Wasser Gemisch als Schlüsselparameter unter gegebenen Syntheseparametern definiert wurde. Die Abstimmung dieser Parameter ermöglicht eine schnelle, phasenreine Synthese von Vaterit Nanoaggregaten im Größenbereich von 500 -1000 nm ohne vermeintliche Oberflächenfunktionalisierung. Erste *in vitro* Studien zur Risikobewertung der Vaterit Nanopartikel zeigen, dass trotz der inhärenten Instabilität von Vaterit keine biomaterialinduzierten proinflammatorischen und zytotoxischen Effekte zu erwarten sind. Anhand der Ergebnisse der Biokompatibilitätsstudien dürfen die Vaterit Nanoaggregate als biokompatibel eingestuft werden. Die ausgeprägte Zelladhärenz auf den

Vaterit-Prüfkörpern erlauben den Rückschluss, dass Vaterit als Biomaterial nicht nur biokompatibel ist, sondern auch eine frühe Kolonisation mit gewebsspezifischen Zellen zeigt. Es kann angenommen werden, dass die positive Oberflächenladung ($13,5 \pm 0,8$ mV) der Vaterit Nanoaggregate erste Adhärenz-Schritte der MG63 stimulieren kann und *in vivo* eine Adhärenz sowie Proliferation knochenspezifischer Zellen bewirken kann. Zusätzlich kann durch den direkten Kontakt von Vaterit Nanoaggregaten und gewebespezifischen Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen die Verträglichkeit hinsichtlich des Transformationsprozesses in eine Apatitspezies belegt werden. Dieser Transformationsprozess wird in Kapitel 3 näher untersucht und beschrieben.

3

Vaterit Nanopartikel – Biomaterial für die Knochenregeneration –

3.1. Einleitung

Natürlich vorkommende Biominerale können aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt und einzigartigen Bauweise eine Vielzahl an Funktionen *in vivo* übernehmen. Die funktionellen Eigenschaften werden dabei durch den gezielten hierarchischen Aufbau dieser Minerale und Mineralkomposite gesteuert.^[43] Einer der bekanntesten Vertreter dieser Biomineralkomposite ist der biogene Knochen. Als hochdynamisches Organ erfüllt er lebenswichtige Funktionen hinsichtlich der Ca^{2+} -Speicherung und Homöostase *in vivo* aber auch als Stützelement im Endoskelettes.^[152–154] Die Komplexität der *in vivo* Knochenbildung zeigt sich an der Vielzahl der beteiligten Zelltypen, Zellkompartimente und anderer Biomoleküle während der Strukturbildung.^[155] Letztlich ergeben sich die mechanischen Eigenschaften des Knochens aus der kontrollierten Mineralisierung und dem ausgerichteten Wachstum des Knochenminerals auf den Kollagenfibrillen.^[152,156] Im Vergleich zu stöchiometrischem Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) weist das Knochenmineral durch Substitution entstandene Defizite hinsichtlich Ca^{2+} und OH^- -Ionen auf. Abhängig von den physiologischen Bedingungen werden hauptsächlich CO_3^{2-} -Ionen als Fremdionen integriert, die zu einer erhöhten Löslichkeit des Knochenminerals führen und so den natürlichen Knochenumbau (Remodelling) ermöglichen.^[75,134,157–160] Aufgrund von allgegenwärtigen Knochendefekten ist die Synthese von Biomaterialen mit Knochenbioaktivität sowohl in der Materialwissenschaft und Biotechnik als auch der klinischen Medizin von großem Interesse. Die aktuell für den Knochenersatz verwendeten anorganischen Biomaterialen basieren infolge ihrer chemischen Ähnlichkeit zur Mineralphase des Hartgewebes auf Calciumphosphatverbindungen (CAPs), wie Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP).^[77,161,162] Anhand zahlreicher *in vitro* und *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass sich diese Materialien vor allem durch ihr Biokompatibilität, Bioaktivität und Osteokonduktivität auszeichnen, indem sie die Adhärenz, Differenzierung und Proliferation der knochenbildenden Zellen fördern.^[163–167] Dennoch besteht aufgrund der thermodynamischen Stabilität von HA unter physiologischen Bedingungen der Nachteil der mangelnden Bioresorption und damit verbunden des

Remodelling Prozesses.^[77,168] Ein neuer Ansatz ist der Entwurf von Hybridmaterialien, die eine geeignete strukturelle Unterstützung bieten und zudem dem Knochengewebe entsprechen. Hench *et al.*^[169] konnten bereits in den 90iger Jahren zeigen, dass bei der Implantation von bioaktiven Gläsern und Keramiken eine zeitabhängige, kinetische Modifikation der Oberfläche unter Bildung eines biologisch aktiven carbonathaltigen Hydroxylapatits erfolgt.^[169–171] In diesem Zusammenhang rückte der carbonathaltige Hydroxylapatit (HCA) zunehmend in den Fokus der Biomaterialforschung. Neben den chemischen und strukturellen Ähnlichkeiten zur mineralischen Phase des Knochens zeigt der carbonathaltige Hydroxylapatit gegenüber dem HA zusätzlich eine gute Osteokonduktivität, Osseointegration (Grenzflächenbindung) sowie Bioresorption und gilt daher als vielversprechendes Biomaterial für den Knochenersatz.^[122,172–178] Mit dem Ziel einer *in vivo* Knochenbildung, wurde unter anderem in Arbeiten von Schröder *et al.*^[121,179] eine Calciumcarbonat-Phase, als potentielle anorganische Vorstufe zur Induktion der Bildung von Knochenmineral vorgestellt. In diesem Kapitel wird das Kristallisationsverhalten von Vaterit, der metastabilen Phase der drei kristallinen CaCO₃ Polymorphe, in einer dem Blutplasma angepassten simulierten Körperflüssigkeit untersucht. Neben Studien in einem proteinfreien, azellulären Medium, wurden die Vaterit Nanopartikel als Annäherung an die biomimetische, knochenbildende Umgebung *in vivo*, zusätzlich in humanem Blutplasma (hBP) inkubiert. In Abhängigkeit der Zeit wird die Umsetzung mittels spektroskopischer Methoden qualitativ und quantitativ analysiert, um ein Schema zur *in vitro* und *in vivo* Bildung der Apatitphase zu postulieren.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Material

NaCl (Acros, ≥ 99,0%), NaHCO₃ (Sigma Aldrich, ≥ 99,7%), KCl (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%), K₂HPO₄·3H₂O (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%), MgCl₂·6H₂O (Merck, ≥ 99,0%), HCl (Sigma Aldrich, 37%), CaCl₂ (Sigma Aldrich, ≥ 93,0%), Na₂SO₄ (Acros, 99,0%), Tris-Pufferan (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan C₄H₁₁NO₃, Carl Roth, ≥ 99,9%), RapiGest SF (0,1% (w/v), Waters), NaOCl-Lösung (5,25% akt. Cl, Bioanalytic), Hydroxylapatit (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, Sigma Aldrich, 677418, ≥ 97%), CuCN (Sigma Aldrich), Ethanol (C₂H₅OH, Sigma Aldrich, ≥ 99,8%), MEMα (*Minimum Essential Medium Alpha*, Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), M199 (Sigma Aldrich), FBS (*fetal bovine serum, heat-inactivated*, Sigma Aldrich), Glutamax I (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), Osteoblasten-Zelllinie MG63 (*American Type Culture Collection*, ATCC[®]CRL-1427[®], LGC Promochem), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*, Sigma Aldrich), Penicillin/Streptomycin P/S (Gibco[®] Thermo Fisher

Scientific), ECGS (*endothelial cell growth supplement*, Becton Dickson and Company), Heparin-Natriumsalz (Sigma Aldrich), LPS (Lipopolysaccharid, *Escherichia coli* O111:B4, Sigma Aldrich), 3,7% Paraformaldehyd (Merck), 0,1% Triton® X-100 (Merck), DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, D8537, Sigma Aldrich), Antikörper CD62E (*mouse*, Monosan), BSA (*bovine serum albumin*, Sigma Aldrich), Fluoreszenz-marktiert Antikörper (*goat anti-mouse*, Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific), Höchst Dye 33342 (Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific), Fluoroshield (ImmunoBioScience Corporation), Fluoromount-GTM (Southern Biotech), Calcein-AM (AM: *Acetoxymethylester*, Thermo Fisher Scientific), *CytoTox 96® Non-Radio Cytotoxicity Assay* (LDH, G1780, Promega), Gelatine (Sigma Aldrich), Resazurin (Sigma, R7017), Hank's Balanced Salt Solution (Sigma, H9169), Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Cellstar®), deionisiertes MilliQ-Wasser, hypotonisches Wasser (steril und pyrogenfrei, Carl Roth).

In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die in Kapitel 2 charakterisierten Vaterit Nanopartikel verwendet

3.2.2. Inkubation der Vaterit Nanopartikel

Die Inkubation erfolgte in Anlehnung an die Literatur von Kukobo *et al.*^[162] in einer frisch hergestellten simulierten Körperflüssigkeit, deren Ionenkonzentration entsprechend Tabelle 3-1 der Ionenkonzentration von humanem Blutplasma angepasst wurde.

Aufgrund der Temperaturabhängigkeit (der Säurekonstante) des verwendeten Puffersystems, wurde die Reaktionslösung während des gesamten Herstellungsprozesses sowie der anschließenden Einstellung des pH-Wertes (pH 7,37 - mit 1M HCl) auf 37°C temperiert. Des Weiteren wurden die Vaterit Nanopartikel in nicht-reduziertem Citratplasma inkubiert. Die Durchführung der Inkubationsexperimente mit menschlichem Blutplasma (hBP) erfolgten unter Einhaltung aller gesetzlichen ethischen Vorschriften und Richtlinien. Um restliche Proteinausfällungen zu entfernen, wurde das aufgetaute Plasma vor der Verwendung bei 20 000 g für 1h bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Inkubationsproben in SBF zur Aufreinigung zentrifugiert, der Niederschlag mehrfach mit Wasser und Ethanol gewaschen und anschließend im Hochvakuum bis zur Massenkonstanz getrocknet. Die in hBP inkubierten Proben wurden zusätzlich mit RapiGest sowie Natriumhypochlorit-Lösung zur Entproteinisierung bearbeitet. Alle Inkubationsreaktionen wurden in einem Heidolph Unimax 1010 Schüttler mit Inkubatormodul 1000 bei 37°C und konstantem Schütteln (200 U/min) durchgeführt. Um eine theoretisch vollständige Umsetzung in einen carbonat-haltigen Hydroxylapatit zu gewährleisten, wurden in allen

Inkubationsreaktionen der Vaterit-Gehalt hinsichtlich des angestrebten molaren Ionenverhältnisses von 2 zu 1 [$\text{CO}_3^{2-} : \text{PO}_4^{3-}$] variiert. Als Referenzmaterial wurden Teilstücke eines humanen Knochens verwendet. Um die organische Matrix des Knochens zu entfernen, wurde der Knochen mit einer 5,25%igen Natriumhypochlorit-Lösung über einen Zeitraum von 5 Tagen behandelt. Die Knochenspende erfolgte als anonyme Spende ohne patientenbezogene Daten entsprechend der gesetzlichen und ethischen Vorschriften im Rahmen einer Knochentransplantation.

3.2.3. Chemische Charakterisierungsmethoden

ATR-FTIR-Spektroskopie. Die ATR-FTIR-Spektroskopie wurde an einem Nicolet iS10 Spektrometer der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Frequenzbereich von 650 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} mit einer Auflösung von $1,4 \text{ cm}^{-1}$ pro Datenpunkt aufgenommen. Neben qualitativen Aussagen konnte durch eine quantitative Durchführung der Anteil der Apatitspezies näherungsweise bestimmt werden. Hierfür wurde eine Reihe an Standard-Proben mit definiertem Massenanteil (0, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100wt%) an kommerziell erworbenem Hydroxylapatit und synthetisiertem Vaterit hergestellt. Sowohl den Proben der Standardreihe als auch den Inkubationsproben wurde Kuper(I)-cyanid (80wt%) als interner Standard zur Normierung der Spektren beigemischt. Es wurden pro Mischverhältnis dreifach Replikate angefertigt und jede Probe drei Mal vermessen. Um die relativen Mengen der Phosphat- und Carbonatspezies zu extrahieren, wurde zunächst der Transmissionsgrad T in den Absorptionsgrad A ($A = -(\log(T))$) umgewandelt, der nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional zur Konzentration der jeweiligen Spezies ist. Es wurde sowohl anhand der maximale Intensität als auch des Flächenintegrals der spezifischen Schwingungsbanden der Apatit-Anteil bestimmt.

Festkörper-NMR-Spektroskopie. Alle NMR-Experimente wurden mit einem Bruker Avance 400 DSX NMR-Spektrometer bei einer ^1H -Frequenz von 399,87 MHz und einer ^{13}C -Frequenz von 100,55 MHz und einer ^{31}P -Frequenz von 161,87 MHz aufgenommen. Ein 4 mm-Bruker-Doppelresonanz Messkopf wurde verwendet. Die Einzelpuls-Anregungsexperimente (single pulse, SP) wurden mit einer Rotationsdrehzahl von 10kHz MAS (magic angle spinning) und einem initialen 90° Puls mit einer Länge von $4 \mu\text{s}$ und 5 s Recycle-Verzögerung durchgeführt. Die ^1H -NMR-Spektren und die um den ^1H -Hintergrund korrigierten Spektren wurden als Mittelwert von 32 Transienten mit 8 s Zyklusverzögerung aufgenommen. Das ^{13}C -Signal wurde mittels ^1H -Entkopplungsschema mit Zweipuls-Phasenmodulation (TPPM) erfasst. Für die CP-Experimente wurden 512 Transienten gemittelt. Die ^{31}P -Experimente mit Einzelpulsanregung

wurden mit einer Verzögerung von 60 s aufgezeichnet, wobei während der Erfassung des NMR-Signals 16 Scans unter TPPM-Heteronuklearentkopplung gemittelt wurden. Für die CP-Experimente wurden die Transienten von 64 gemittelt. Die Probenvorbereitung sowie die alle NMR-Messungen wurden von **Dr. Mihail Mondeshki** am Departement Chemie der JGU Mainz im Bereich Zentrale Analytik durchgeführt.

Pulver-Röntgenbeugung. Röntgendiffraktogramme wurden auf einem STOE Stadi P, ausgestattet mit einem Mythen 1k-Detektor, unter Verwendung von monochromatisierter MoK α -Strahlung aufgenommen. Die Probe wurde mit Perfluorether (Fomblin Y, Aldrich) zwischen Polyvinylacetat-Folien aufgebracht. Die Probe wurde in 0,015°-Schritten (kontinuierlicher Scan, 150 s/°) gemessen, die einen 2 θ -Bereich von 1,5° bis 47° abdecken. Die Messungen wurden von **[REDACTED]** (Gruppe von **Prof. Dr. Wolfgang Tremel**) sowie **[REDACTED]** (Gruppe von **Prof. Dr. Angela Möllen**) am Departement Chemie der JGU Mainz durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie. Die REM-Proben wurden an einem Nova NanoSEM 630 der Firma FEI durchgeführt. Es wurde im Hochvakuum mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV, einem Arbeitsabstand von 4 mm bis 7 mm und einem TLD Detektor, als Sekundärelektronendetektor zur Bildgebung gearbeitet. Zur Probenpräparation wurden 8 μ L der jeweiligen Probensuspension auf einen Silicium-Wafer aufgetropft und auf einem leitenden Kohlestoffpad fixiert. Anschließend wurden die Proben unter Verwendung einer MED020 Kleinbedampfungsanlage der Firma Bal-Tec mit einer Goldschicht 7,5 nm gesputtert.

Transmissionselektronenmikroskopie. Die TEM-Proben wurden durch Auftropfen von 20 μ L der jeweiligen Probendispersion auf ein 400 mesh Kohlenstoff-Kupfer-Gitter (Plano GmbH, Wetzlar) hergestellt, und mit einem Technai Spirit G2 bei 120 kV Beschleunigungsspannung, ausgestattet mit einer Standard 4K CCD-Kamera, vermessen.

Thermogravimetrische Analyse. Die thermogravimetrische Analyse (TGA) erfolgte an einem Perkin Elmer Pyris 6 Thermogravimetric Analyzer und wurden von **Zanab Liapa** aus der Gruppe von **Prof. Dr. Wolfgang Tremel** durchgeführt.

Zeta-Potential-Messungen. Die Zetapotentiale wurden auf einem Malvern Zetasizer Nano unter Verwendung von Einweg-Kapillarzellen (DTS1070) gemessen. Die Partikel wurden nach dem jeweiligen Inkubationszeitraum zentrifugiert, im entsprechenden Medium in einer Konzentration von 1mg/mL resuspendiert, mit 1mM KCl-Lösung auf eine finale Konzentration von 500 μ g/mL verdünnt und anschließend vermessen. Alle Proben wurden als Triplikate

bestimmt. Die entsprechende Datenanalyse erfolgte mit der Malvern Zetasizer Software 8.01.4906.

3.2.4. Biologische Untersuchungsmethoden – *in vitro* Studien

Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zellen – Die *in vitro* Studien wurden an einer Zelllinie, der Osteoblasten-Zelllinie MG63 sowie an primären Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) durchgeführt. Die humane Osteoblasten-Zelllinie MG wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 10% fötalem Rinderserum (FBS), 2mM Glutamax I und 100 U/100 µg mL⁻¹ Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die humanen Endothelzellen wurden nach dem Verfahren von Jaffe *et al.*^[132] isoliert. Als Zellkulturmedium wurde M199 mit 20% FBS, 2 mM Glutamax I, 100 U/100 µg/mL Penicillin/Streptomycin und 25 µg/mL Wachstumsfaktor *endothelial growth factor supplement* (ECGS) sowie 25 µg/mL Heparin-Natriumsalz verwendet. Der Wachstumsfaktor sowie die Heparin-Natriumsalzlösung wurden dem Medium jeweils frisch und unmittelbar vor der Anwendung zugesetzt. Um eine gute Adhärenz der HUVEC zu erreichen, wurden die Zellkulturflaschen sowie die Zellkulturplatten mit 0,2% Gelatine beschichtet. Die Zellkultivierung wurde in einem Inkubator bei Kultivierungsbedingungen von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt durchgeführt.

Immunfluoreszenzfärbung von E-Selektin – Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung basiert auf der gezielten Detektion eines spezifischen Antigens mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper. In diesem Kapitel wurde die Expression von E-Selektin durch HUVEC nach Exposition mit HCA Nanopartikel untersucht. Dabei wurde die Untersuchung der endothelialen Genexpression wie von Unger und Peters beschrieben durchgeführt.^[105] Es wurden 50.000 HUVEC in einen 8-Well-Kammer-Objektträger plattiert und über Nacht unter Kultivierungsbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurden 1 µg HCA Partikel oder 1 µg LPS in PBS sowie eine Kombination aus HCA + LPS zugegeben. und für 4 h inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 4 h wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und mit 0,5% Triton × 100 für 10 min permeabilisiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der Antikörper CD62E (1:100, E-Selectin, Monosan) zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und der sekundäre Antikörper (1:1000, anti-mouse Alexa Fluor 488, Molecular Probes) zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h bei Raumtemperatur. wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Hoechst 33342 (1:10 000 in PBS, Thermo Fisher Scientific) für 5 min gefärbt. Schließlich wurde die Transwell-Kammer entfernt und die Zellen auf dem Objektträger

mit Fluoromount-GTM fixiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

In vitro Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstest – Es wurden 25 000 MG 63 Zellen pro Well in eine sterile 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und für 24 h im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden HCA Partikel in Konzentrationen von 50, 100 und 250 µg/mL zugegeben. Die mit Partikel stimulierten Zellen wurden für 24 und 72 Stunden sowie für 7 Tage kultiviert. Außerdem wurden nicht-stimulierte Zellen sowie äquivalenten Partikelkonzentrationen ohne Zellen als Kontrollen vorbereitet und über äquivalent zu den stimulierten Zellen kultiviert bzw. inkubiert. Alle Experimente wurden dreimal und mit drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse des RES-Assays wurden als Prozentsatz der nicht-stimulierten Zellkontrolle dargestellt, deren Viabilität für diese Analyse auf 100 % gesetzt wurde. Die Ergebnisse des LDH-Assays wurden nach Abzug der Medium-Kontrolle bzw. Medium-Nanopartikel-Kontrolle relativ zu den lysierten Zellen in Prozent angegeben. Ein Student's t-Test Typ 3 wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz durchgeführt und ist als * $p < 0,05$ angegeben. Der LDH-Assay wurde nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.^[108]

RES – Assay – Die zelluläre metabolische Aktivität der mit HCA Partikel stimulierten Zellen, wurde mittels Resazurin-Zellviabilitäts-Assay bestimmt. Zur Analyse wurden 20 µL Resazurinlösung (20 mg Resazurin + 100 mL Hanks' Balanced Salt Solution mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) pro Well zugegeben und die behandelten Zellen für 3 bzw. 5 Stunden unter Kultivierungsbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 530 – 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 580 – 600 nm mit einem *Tecan Spark Plate Reader* gemessen. Letztlich ist das gemessene Fluoreszenzsignal ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

In vitro Zellbiokompatibilität – Die Zellverträglichkeit wurde an zwei Zelltypen, der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG63 sowie den primären HUVEC getestet. Um ein spenderunabhängige Ergebnis zu gewährleisten, wurden die Experimente der primären HUVEC mit Zellen von drei verschiedenen Spendern in der jeweils gleichen Passage durchgeführt. Die Experimente mit der Zelllinie MG63 wurden als Doppelbestimmung in zwei unterschiedlichen Passagen durchgeführt. Es wurden 50.000 MG 63 oder 80.000 HUVEC pro Well in einer sterilen 24-Well Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Kultivierungsdauer 24 Stunden wurden HCA Nanopartikel in Konzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 250 µg/mL zugegeben. Anschließend wurden die Zellen nach Stimulationszeiten von 24 Stunden,

72 Stunden und 7 Tagen mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Zugabe von 10 μM Calcein-AM Lösung analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt.

3.3. Ergebnisse und Diskussion

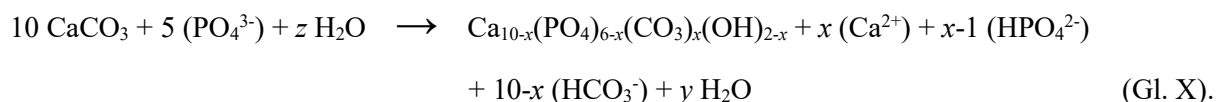
3.3.1. Inkubation der Vaterit Nanopartikel

Die in Anlehnung an Schüler *et al.*^[131] synthetisierten und in Kapitel 2 charakterisierten Vaterit Nanopartikel wurde in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF) mit angepasster Ionenstärke inkubiert. Um eine biomimetische, knochenbildende Umgebung zu imitieren, wurden die Vaterit Nanopartikel zusätzlich in humanem Blutplasma inkubiert. Auf diesem Weg kann nicht nur der Einfluss von Fremdionen untersucht werden, sondern auch Informationen zur Reaktivität der Vaterit Nanopartikel in einer nährstoffreichen, proteinhaltigen Umgebung gewonnen werden. Die Ionenkonzentrationen der verwendeten Inkubationsmedien sind in Tabelle 3-1 gegenübergestellt.

Tab. 3 - 1 Ionenstärke der verwendeten Inkubationsmedien.

	Na ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Kokubo <i>et al.</i> ^[180] (mM)	142.0	147.8	4.2	5.0	1.5	2.5	1.0	0.5
Angepasste Ionenkonzentration (mM)	142.0	125.0	27.0	5.0	1.5	2.5	1.0	0.5
hBP (mM)	142.0	103.0	27.0	5.0	1.5	2.5	1.0	0.5

Die signifikantesten Unterschiede der in dieser Arbeit verwendeten Ionenkonzentration im Vergleich zu vorhergehenden Arbeiten^[121,180-183] liegen in der Anpassung der nominalen, anfänglichen HCO₃²⁻ und der Cl⁻-Konzentrationen an die des humanen Blutplasmas. Die Kristallisation von carbonat-haltigem Hydroxylapatit kann ausgehend von Vaterit Nanopartikel über folgende Gleichung vereinfacht beschrieben werden



Basierend auf der aus Gleichung X hervorgehenden vereinfachten Darstellung, wurde für eine vollständige Umsetzung der Vaterit Nanopartikel ein theoretischer Wert von 2 [CO₃²⁻] : 1 [PO₄³⁻] festgelegt. Die Vaterit Nanopartikel wurden mit einer Konzentration von 0,2 mg/mL im jeweiligen Inkubationsmedium bei 37°C und unter leichtem Schütteln (200 U/min) inkubiert. Für eine erste qualitative Abschätzung wurden die inkubierten Proben

nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie analysiert. Abb.3-1 zeigt eine Zusammenstellung repräsentativer Spektren der inkubierten Vaterit Nanopartikel nach Inkubation in SBF und hBP mit steigender Inkubationsdauer. Alle Proben wurde mit Cu(I)CN als interner Standard versetzt und die Spektren auf die CN-Valenzschwingungsbande bei 2163 cm^{-1} normiert.

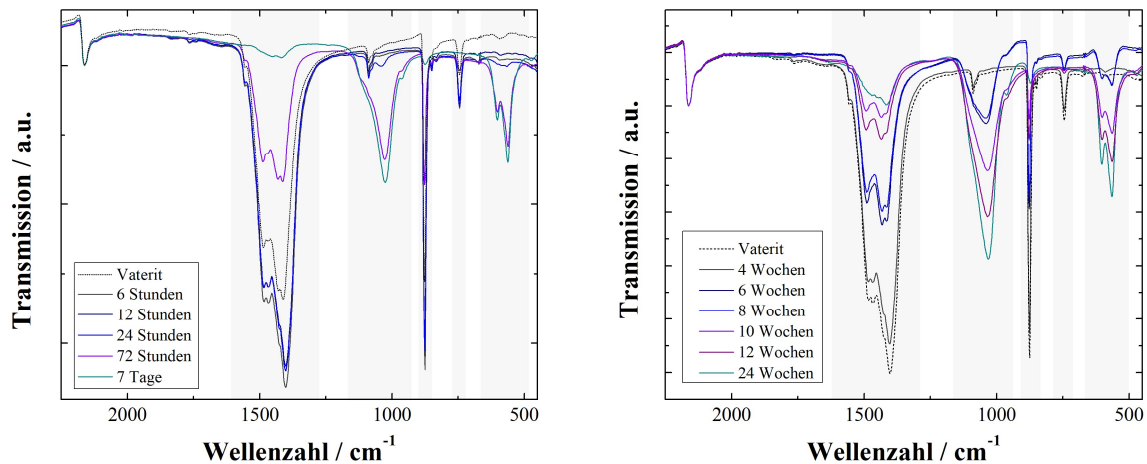


Abb. 3 - 1 *Ex situ* FTIR-Analyse der synthetisierten Vaterit-Nanopartikel nach Inkubation in SBF (links) und humanem Blutplasma (rechts).

Zu Beginn der Inkubation sind in allen Spektren die charakteristischen Schwingungsmodi des Carbonat-Ions der Vaterit-Modifikation zu erkennen. Die Schwingungsbanden im Bereich von 1493 cm^{-1} bis 1412 cm^{-1} entsprechen der asymmetrischen C-O Streckschwingung (ν_3). Die Banden bei 1088 cm^{-1} , 874 cm^{-1} sowie 743 cm^{-1} sind der symmetrischen C-O Streckschwingung (ν_1), der O-C-O Kipp-Deformationsschwingungen (ν_2) und der O-C-O Spreiz-Deformationsschwingung (ν_4) zuzuordnen. Die sukzessive Abnahme der Intensitäten der Carbonat-Schwingungsbanden mit gleichzeitiger Zunahme der Intensitäten der Phosphat-Schwingungsbanden lassen einen Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse vermuten. Außerdem belegen sie die Coexistenz beider Materialien während der Konversion. Dabei entspricht die Bande bei 1030 cm^{-1} der dreifach entarteten asymmetrischen P-O Streckschwingung. Die Bande bei 962 cm^{-1} lässt sich der symmetrischen P-O Streckschwingung zuordnen und ist charakteristisch für eine hochkristalline Phosphat-Apatit-Phase.^[184] Die beiden Banden bei 602 cm^{-1} und 565 cm^{-1} resultieren aus der dreifach entarteten O-P-O Deformationsschwingung der Phosphatgruppe.^[126,185] Eine nähere Betrachtung der Phosphatschwingungsbanden im Bereich von $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ und $\sim 600\text{ cm}^{-1}$ der in hBP inkubierten Vaterit Nanopartikel lassen die Nukleation einer amorphen Phosphat-Spezies vermuten. Amorphe Materialien zeigen aufgrund des Symmetrieverlustes breite, diffuse Absorptionsbanden, die häufig zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben sind. Auch in

Abb. 3-1 ist zu erkennen, dass die anfänglich auftretenden Phosphatschwingungsbanden (Inkubationszeitraum 6-8 Wochen) sich in breiten Banden geringer Aufspaltung darstellen. Mit steigender Inkubationsdauer nimmt nicht nur die Intensität, sondern auch die Bandenschärfe sowie die Aufspaltung dieser Schwingungsbanden zu. Daher kann angenommen werden, dass durch Auflösungsprozesse des Vaterits die Nukleation einer amorphen Phosphatspezies eingeleitet wird und mit zunehmender Inkubationsdauer durch Reifungsprozesse (gemäß Ostwald-Vollmer) in der Bildung einer kristallinen Apatitspezies endet. Die vollständige Umsetz der inkubierten Vaterit Nanopartikel kann durch die Abwesenheit der Carbonat-Schwingungsbande bei 743 cm^{-1} belegt werden. Im direkten Vergleich ist zu erkennen, dass eine vollständige Umsetzung in SBF bereits nach 7 Tagen, in hBP erst nach 6 Monaten erreicht wird. Da die verwendeten Inkubationsmedien SBF und hBP annähernd gleiche Ionenstärken aufweisen, ist die zeitliche Verzögerung der Umsetzung in hBP auf die Anwesenheit der Plasmaproteine zurückzuführen. Es ist inzwischen allgemein anerkannt, dass bei Kontakt von Biomaterialien mit biologischen Flüssigkeiten (z.B. hBP) die enthaltenen Proteine schnell an der Oberfläche adsorbieren und eine biomolekulare Korona bilden.^[186-188] Dieser Prozess wirkt sich stark auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Nanopartikel aus und bestimmt letztendlich das Verhalten *in vivo*.^[189-191] Das Zetapotential (ζ -Potential) liefert erste Informationen über eine mögliche Adsorption von Proteinen oder anderen Biomolekülen an die Partikeloberfläche. In Tabelle 3-2 sind die gemessenen Oberflächenpotentiale der inkubierten Vaterit Nanopartikel in Abhängigkeit des Inkubationsmediums und der Inkubationsdauer gegenübergestellt.

Tab. 3 - 2 Tabellarische Übersicht der gemessenen Zeta-Potentiale von Vaterit sowie der Inkubationsprodukte in SBF und humanem Blutplasma (hBP) zu Beginn und nach vollständiger Konversion.

	ζ -Potential in mV der inkubierten Vaterit Nanopartikel in:		
	H ₂ O	SBF	hBP
6 Stunden	+13,5 ± 0,8	-7,1 ± 1,2	-22,9 ± 0,7
7 Tage	–	-3,4 ± 0,2	–
6 Monate	–	–	-29,3 ± 0,9

Es wurde sowohl das ζ -Potential des Ausgangsmaterials Vaterit als auch der in SBF und hBP inkubierten Vaterit Nanopartikel nach 6 Stunden sowie nach vollständiger Konversion ermittelt. Die Vaterit Nanopartikel zeigen, wie bereits in Kapitel 2 beschreiben ein positives Oberflächenpotential, das mit vorangegangenen Arbeiten^[131] korreliert. Bereits nach sechs

stündiger Inkubation in SBF kann eine signifikante Änderung des ζ -Potentials festgestellt werden. Es wird angenommen, dass dieser Effekt auf die Wechselwirkung der Nanopartikel mit den in Lösung enthaltenen Anionen zurückzuführen ist. Nach einer Inkubationsdauer von 7 Tagen und vollständiger Umsetzung konnte für die Partikel der entstandenen Apatitphase ein annähernd ähnliches ζ -Potential wie für nanokristallinen Hydroxylapatit (ζ -Potential(HA): $-3,1 \pm 0,3$ mV) bestimmt werden. Die Bestimmung des Oberflächenpotentials der inkubierten Partikel in hBP zeigen ein deutlich negativeres ζ -Potential als die in SBF inkubierten Partikel. Die Abweichungen der ζ -Potentiale in Abhängigkeit des Inkubationsmediums belegen die Adsorption von Serumproteinen an das Ausgangsmaterial Vaterit sowie an die entstandene Apatit-Phase nach 6 Monaten Inkubation. In Kooperation mit Dr. Johana Sirová aus der Gruppe von Prof. Dr. Katarina Landrova wurde die Proteincorona der Nanopartikel näher betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass die Inkubationsdauer keinen Einfluss auf das Bandenmuster der desorbierten Proteine hat (s. Anhang A, SDS-Page). Zusätzlich wurden die an die Apatit-Phase adsorbierten Plasmaproteine der Inkubationsreihe hBP nach vollständiger Umsetzung mittels Flüssigchromatographie gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS: liquid chromatography mass-spectroscopy) identifiziert und quantifiziert. Die mit einer Häufigkeit von $\geq 1\%$ identifizierten Plasmaproteine sind in Anhang A in Form einer sogenannten *heat map* gelistet. Dabei konnte eine starke Anreicherung von α -2-HS-Glycoprotein ($\sim 50\%$) und Antithrombin III ($\sim 19\%$) in der Corona festgestellt werden. Bereits durch die Adsorption der Serumproteine an die Oberfläche der Vaterit Nanopartikel wird der Auflösungs- und Rekristallisationsprozess kinetisch stark verzögert. Zusätzlich ist bekannt, dass α -2-HS-Glycoprotein (auch Fetuin-A genannt) die Präzipitation schwer löslicher Calciumphosphate hemmt. α -2-HS-Glycoproteine gelten mitunter als die Haupt-Inhibitoren der spontanen Apatitbildung bzw. der pathologischen Calcifizierung *in vivo*.^[192] Am Beispiel mineralbindender Proteine aus Muscheln ist bekannt, dass für die feste Bindung von Protein und Mineral eine β -Faltblattstruktur mit sauren Aminosäureresten verantwortlich ist.^[193] Solche Strukturen sind auch in der Domäne D1 von α -2-HS-Glycoprotein auf der nach außen gerichteten Region des β -Faltblattes zu finden und ermöglichen die kolloidale Stabilisierung von neu gebildetem Calciumphosphat.^[194] Folglich kann die verzögerte Bildung der Apatit-Phase in hBP auf eine Stabilisierung des Ausgangsmaterials Vaterit durch die Anlagerung von Plasmaproteinen in Kombination mit einer zusätzlichen Stabilisierung von entstandenem Calciumphosphat als Kolloid vermittelt durch α -2-HS-Glycoprotein zurückgeführt werden.

Zum weiteren Vergleich der entstandenen Apatit-Phasen durch Inkubation in SBF und hBP sind die IR-Spektren der vollständig umgesetzten Inkubationsproben mit den entsprechenden

Referenzmaterialien in Abb. 3-2 dargestellt. Als Knochenreferenz wurde das Teilstück eines humanen Knochens verwendet. Durch Inkubation in einer 5,25% Natriumhypochlorit-Lösung sollte die organische Matrix des Knochens entfernt werden. Natriumhypochlorit wirkt unspezifisch proteolytisch und wird als Standardspüllösung in der Endodontie verwendet. Um den Einfluss auf das Knochenmineral möglichst gering zu halten, wurde die Knochenprobe bereits nach 5tägiger Inkubation aufgearbeitet. Die schwache Bande bei $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ ist der Amid-Schwingungsbande des Kollagens zuzuordnen und weist auf einen geringen Restanteil der organischen Matrix hin.

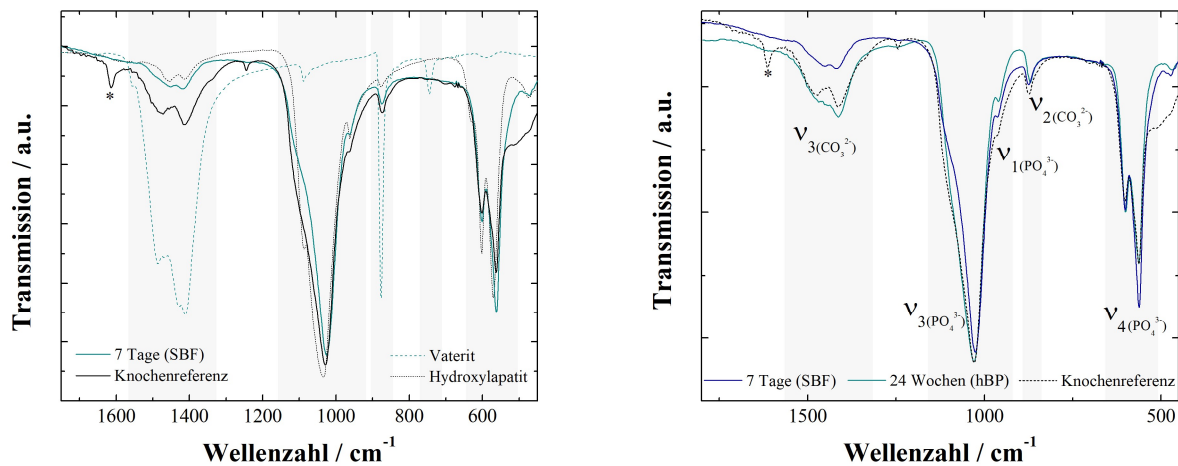


Abb. 3 - 2 *Ex situ* FTIR-Spektren der Inkubationsprodukte nach 7tägiger Inkubation in SBF sowie nach 24 Wochen Inkubation in hBP.

Das Schwingungsspektrum des nanokristallinen Hydroxylapatit zeigt scharfe Banden mit ausgeprägter Aufspaltung deren Maxima im Vergleich zur Knochenreferenz und den Inkubationsproben zu größeren Wellenzahlen hin verschoben sind (vgl. Tabelle 3-3). Die Phosphatbande bei $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ der in SBF inkubierten Probe zeigen eine schmalere Bandenform im Vergleich zu der in hBP inkubierten Probe und zusätzlich eine Schulter bei $\sim 1090\text{ cm}^{-1}$ ähnlich dem nanokristallinen HA. Auch die Aufspaltung der antisymmetrischen P-O Streckschwingung im Bereich von $\sim 500\text{ cm}^{-1}$ bis 600 cm^{-1} scheint ausgeprägter und deutet auf eine Apatitphase höherer Kristallinität hin. Schon früh wurde diese Aufspaltung als sogenannter *splitting factor* zur Quantifizierung der Kristallinität herangezogen.^[195,196] Die Phosphatschwingungsbanden der in hBP inkubierten Probe sind hinsichtlich der Bandenlage, Bandenbreite und Aufspaltung mit der Knochenreferenz vergleichbar. Neben den ausgeprägten Schwingungsbanden der PO_4^{3-} -Gruppe können zusätzlich die asymmetrische C-O Streckschwingung sowie die O-C-O Kipp-Defomationsschwingung der CO_3^{2-} -Gruppe beobachtet werden. Die Intensität dieser Schwingungsbanden ist im direkten Vergleich der beiden Inkubationsproben für die in SBF inkubierte Probe deutlich geringer.

Tab. 3 - 3 Wellenzahl der Bandenmaxima der Referenzsubstanzen HA und humanem Knochen sowie der Inkubationsproben aus SBF (7 Tage) und hBP(6 Monate). Die Lage der Maxima wurde anhand der Abbildungen 3-2 mittels Origin 8.1 Pro bestimmt und stehen im Einklang mit anderen Arbeiten. ^[88,197–201] Die HA-Referenz zeigt im betrachteten Transmissionsfenster eine geringe Adsorption im Bereich der Carbonatschwingungen.

		Wellenzahl der Bandenmaxima in cm ⁻¹			
		Knochen	hBP	SBF	HA
ν_3^-	asymmetische P-O Streckschwingung	1029	1029	1092	1087
				1026	1033
ν_1^-	symmetische P-O Streckschwingung	962	962	962	963
ν_4^-	O-P-O Deformationsschwingung	601	601	601	601
		563	563	563	571
ν_2	O-P-O Deformationsschwingung	–	470	472	474
ν_L	O-H Librationsschwingung	–	–	–	630
ν_3	asymmetische C-O Streckschwingung	1474	1471	1452	1456
		1413	1415	1417	1413
ν_1	symmetische C-O Streckschwingung	–	–	–	–
ν_2	O-C-O Deformationsschwingung	872	871	875	875
ν_4	O-C-O Deformationsschwingung	704	707	–	–
		675	682		

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Lage der Bandenmaxima äußerst sensibel gegenüber Substitutionen im HA Kristallgitter ist.^[202] Die Verschiebung der Maxima zu kleineren Wellenzahlen, sowie die Anwesenheit der asymmetrischen C-O Streckschwingung und der O-C-O Kipp-Deformationsschwingung deuten den Einbau von CO₃²⁻ in das HA Gitter an. Zusätzlich zeigt das Spektrum der Knochenreferenz sowie der in hBP inkubierten Probe schwache Absorptionsbanden im Bereich von 750 cm⁻¹ bis 670 cm⁻¹, die in früheren Arbeiten bereits für Carbonatapatite mit hohem Carbonatanteil sowie Knochenmineral gezeigt werden konnten. ^[198,203–205] In Abbildung XX ist das Ionenverhältnis PO₄³⁻ : CO₃²⁻ gegen die Inkubationszeit in SBF und hBP aufgetragen. Hierzu wurden die Flächen der $\nu_3 + \nu_1$ P-O Streckschwingungen und der ν_3 C-O Streckschwingung ins Verhältnis gesetzt. Alternativ wurde der Quotient der Absorbanz (Extinktion), die nach dem Lambert-Beerschen Gesetz der Stoffmengenkonzentration proportional ist, gebildet. Die Ergebnisse beider Vorgehensweisen kongruieren. Eine Standard-Reihe mit definierten Massenanteilen von Vaterit und HA erlauben zudem eine (semi)quantitative Abschätzung des Carbonatgehaltes der Inkubationsproben. Aus Tabelle 3-3 sowie Abbildung 3-2 ist zu erkennen, dass der nanokristallinen HA im verwendeten

Transmissionsfenster sowohl im Bereich um $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ als auch $\sim 875 \text{ cm}^{-1}$ eine geringe Absorption zeigt. Daher resultiert nach dieser Methode für nanokristallinen HA ein Verhältnis von 9,3. Ein ähnliches Ionenverhältnis wird durch die Inkubation von Vaterit in SBF über einen Zeitraum von 7 Tagen erhalten. Es kann vermutet werden, dass prozentual nur wenig bis kein CO_4^{3-} in das HA Gitter eingebaut wurde. Im Gegensatz dazu zeigt die in hBP inkubierte Probe nach 6 Monaten der Inkubation einen deutlichen höheren Carbonatanteil. Das Verhältnis von 4,8 entspricht einem Carbonatanteil von $\sim 7\%$ und ist mit dem in dieser Arbeit verwendeten Referenzknochen vergleichbar. Verschiedene Literaturdaten gehen von einem Carbonatanteil von 3-8% in Abhängigkeit von Alter und anderer individueller Aspekte.^[1,24,206,207]

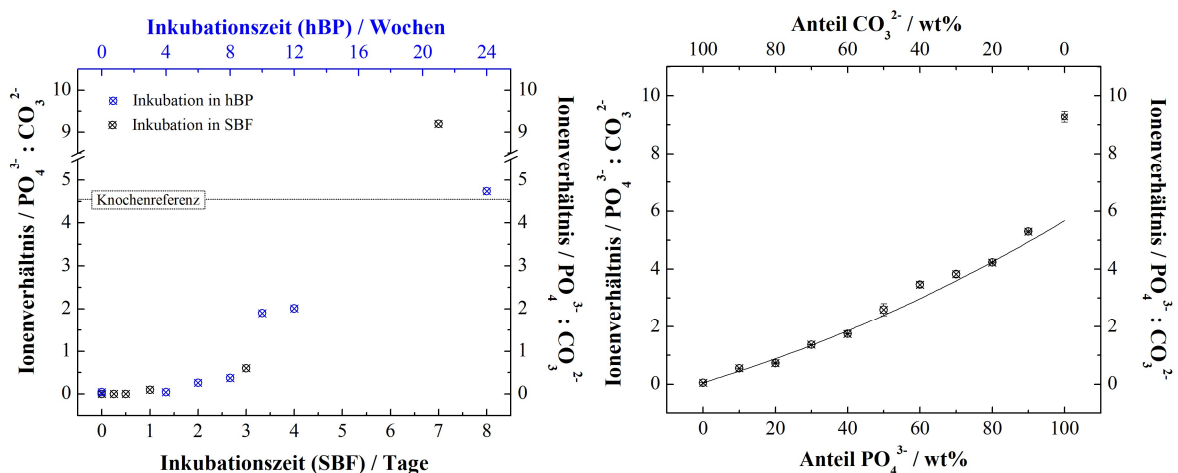


Abb. 3 - 3 Graphische Darstellung des $[\text{PO}_4^{3-}:\text{CO}_3^{2-}]$ -Ionenverhältnisses gegen die Inkubationszeit. Das Verhältnis wurde anhand der Flächen der $\nu_3 + \nu_1$ P-O Streckschwingungen und der ν_3 C-O Streckschwingung ermittelt. Links: Proben aus den Inkubationen in SBF und hBP. Rechts: Standard-Proben mit definierten Massenanteilen an HA und Vaterit.

Zusätzlich wurde die Gesamtzusammensetzung der Knochenreferenzprobe sowie der Inkubationsproben in SBF (7 Tage) und in hBP (6 Monate) mittels thermogravimetrischer Messungen untersucht. Der Massenabgang lässt sich in drei Schritte unterteilen: i) $50\text{-}240^\circ\text{C}$ Wasser, ii) $240\text{-}600^\circ\text{C}$ organische Matrix, iii) $650\text{-}840^\circ\text{C}$ Decarboxylierung des carbonathaltigen Hydroxylapatits. Die Messergebnisse sind in Abbildung 3-4 graphisch dargestellt.

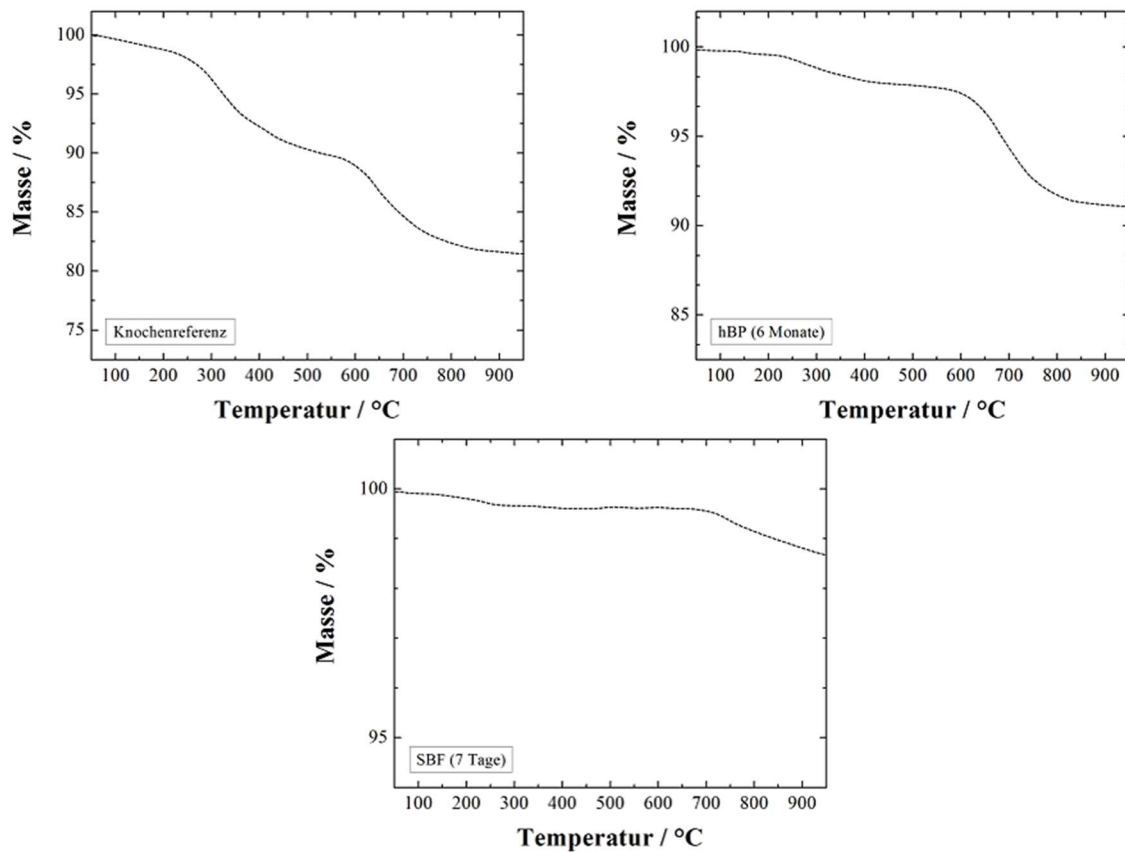


Abb. 3 - 4 Thermogravimetrische Analyse der Konversionsprodukte nach Inkubation in SBF und hBP, sowie der verwendeten Knochenreferenzprobe.

Unter Annahme einer stark vereinfachten Formel für die Zusammensetzung des carbonathaltigen Hydroxylapatit mit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \times x(\text{CaCO}_3)$ lässt sich das Anteil an Carbonat aus dem Massenabgang Δm zwischen 650°C und 1000°C über folgende Gleichung berechnen

$$w(\text{CaCO}_3) = \frac{\Delta m \cdot M(\text{CaCO}_3)}{M(\text{CO}_2)} = \Delta m \cdot 2,28$$

Die daraus resultierende Zusammensetzung der untersuchten Proben sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

Tab. 3 - 4 Tabellarische Übersicht der mittels TGA ermittelten Zusammensetzung der Konversionsprodukte nach Inkubation in SBF und hBP sowie der Knochenreferenzprobe.

	Wasser wt%	org. Matrix wt%	Mineralphase wt%	Carbonat wt%
Knochen	1,8	9,4	88,8	7,4
Inkubation in hBP	0,9	1,3	97,8	6,8
Inkubation in SBF	0,3	0	99,7	1,0

Im direkten Vergleich der mittels TG-Analyse erhaltenen Zusammensetzungen der untersuchten Proben, zeigt die verwendete Knochenreferenzprobe den höchsten Anteil an Wasser und organischer Matrix. Wie bereits in den FTIR-Spektren ersichtlich, resultiert der

Anteil organischer Matrix aus der unzureichenden Behandlung mit Natriumhypochlorit zur Entproteinisierung der Knochenprobe. Der erhöhte Wassergehalt kann daher auch auf die wasserbindende Eigenschaft des Kollagens zurückzuführen sein. ^[208] Der Carbonatgehalt der untersuchten Proben ist mit den Ergebnissen der (semi)quantitativen FTIR-Analyse vergleichbar. Die durch Inkubation in hBP erhaltene Apatitphase zeigt einen ähnlichen Carbonatgehalt wie die Knochenreferenzprobe. Der vermehrte Einbau von Carbonat führt zu einer thermodynamisch instabileren Apatitphase erhöhter Löslichkeit. Unter physikalisch-chemischen sowie thermodynamischen Gesichtspunkten wird sich die erhöhte Löslichkeit (im Vergleich zu HA) der Mineralphase positiv auf die Resorbierbarkeit und somit den *Remodelling*-Prozess *in vivo* auswirken^[1,75,76,168,209].

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden die Morphologie der Inkubationsproben untersucht. Die Aufnahmen der über 7 Tage in SBF inkubierten Probe zeigen Nanoaggregate im Größenbereich von ~ 2-4 µm. Wie bereits in vorherigen Arbeiten im Zusammenhang mit SBF-Inkubationen beschrieben, setzen sich diese *lath-like spherical agglomerates* aus kleinen, plättchenförmigen Partikeln zusammen.^[157,210,211] Neben den plättchenförmigen Strukturen konnte jedoch auch vermehrt eine (annähernd) rhomboedrische Morphologie beobachtet werden. Diese Morphologie ist charakteristisch für die Calcit-Modifikationen, die über ¹³C-NMR-Experimente eindeutig nachgewiesen werden konnte (s. Anhang A). Einige Arbeiten zeigen, dass auch im Knochenmineral in Abhängigkeit von Alter, Spezies und Geschlecht geringe Anteile an Calcit zu finden sind.^[212] Dennoch wird auf eine ausführlichere Analyse im Folgenden verzichtet.

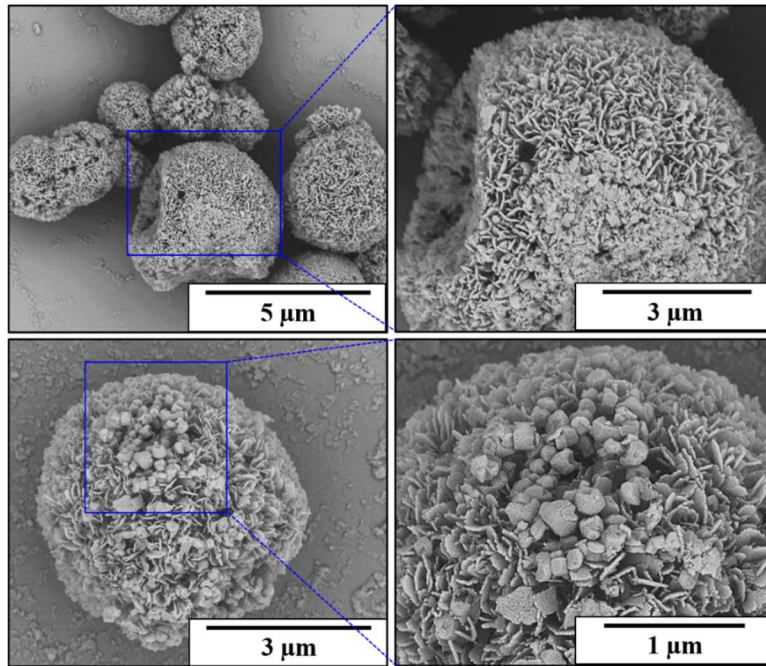


Abb. 3 - 5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nach 7tägiger Inkubation in SBF erhaltenen Produkte. Neben plättchenförmigen Strukturen sind weitere Partikel mit annähernd rhomboedrischer Morphologie zu erkennen.

Die morphologischen Untersuchungen der in hBP inkubierten Probe (6 Monate) mittels Rasterelektronenmikroskopie und Transelektronenmikroskopie zeigen ein „verzahntes“ Gefüge aus plättchenförmigen Kristallen wie sie bereits für das Knochenmineral beschrieben wurden. Sie gelten mit den Maßen $8\text{-}50\text{nm} \times 5\text{-}25 \text{ nm} \times 1\text{-}4 \text{ nm}$ ($L \times B \times D$) als die kleinsten biologischen Kristallite.^[158,210,211] An den Bruchstellen der Agglomerate ist gut zu erkennen, dass sich die übergeordnete Struktur bis ins Innere des Aggregates ausdehnt bzw. in dessen Inneren entsteht. Es scheint als seien die Kristallplättchen in ihrer länglichen Richtung vom Kern des Polypartikelaggregates zu seiner äußeren Schicht radial ausgerichtet.

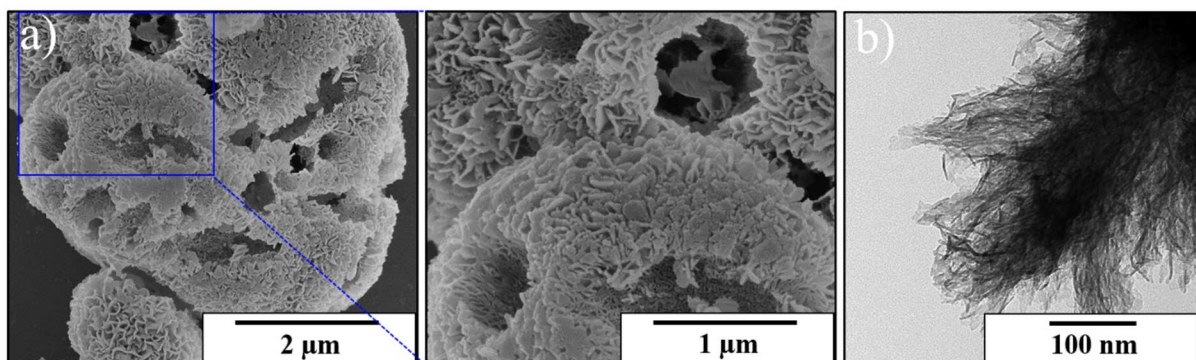


Abb. 3 - 6 a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nach Inkubation in hBP über einen Zeitraum von 6 Monaten erhaltenen Produkte. b) Transelektronenmikroskopische Aufnahme der Probe. Die Polypartikelaggregate sind aus einem verzahnten Gefüge plättchenförmiger Kristallite aufgebaut.

Eine Reihe zeitaufgelöster REM-Aufnahmen zeigen, dass erste HA-Plättchen durch sekundäre Nukleation auf den Vatrīt Nanopartikel aufwachsen. Die Form der Aggregate sowie die

Oberflächenbeschaffenheit implizieren, dass das Wachstum durch Partikelaggregation im Sinne einer regulären Anordnung und kugelförmigen Ausbreitung erfolgt. Die Inkubation in hBP für 6 Monate führt letztlich zu kompakten, kugelförmigen Polypartikelaggregaten mit einem Durchmesser von $\sim 3 \mu\text{m}$. Die plättchenförmige Morphologie der entstanden Apatitphase kann als Indiz für eine mögliche Substitution durch Fremdionen betrachtet werden.^[75,157,160,213,214] Im Einklang mit den Ergebnissen der IR-spektroskopischen Untersuchungen, kann davon ausgegangen werden, dass die Inkubation von Vaterit in hBP in der Bildung einer carbonat-haltigen Apatitphase resultiert. Es existieren zwei unterschiedliche Formen von synthetischen Carbonatapatiten. Der A-Typ zeichnet sich durch die Substitution von OH^- -Ionen durch CO_3^{2-} -Ionen aus und wird in der Regel unter trockenen Bedingungen bei hohen Temperaturen hergestellt. Aufgrund der Synthesebedingungen wird häufig ein hochkristallines Material erhalten. Hingegen sind im B-Typ die Ionengitterstellen des PO_4^{3-} -Ions durch CO_3^{2-} -Ionen ersetzt. Typischerweise wird diese Form des Carbonatapatites durch Fällung oder Hydrolyse in wässrigen Systemen erhalten und führt zur Bildung kleinerer Kristallite.^[207,215,216] Die Substitution des tetraedrisch koordinierten PO_4^{3-} -Ions durch CO_3^{2-} -Ionen trigonal-planarer Geometrie führt zu Gitterstörungen inkl. Leerstellen (Ca^{2+} -Defekte) sowie einer neuen Ladungssituation, deren Ausgleich in diversen Substitutionsmodellen diskutiert wurde.^[83,217–220]

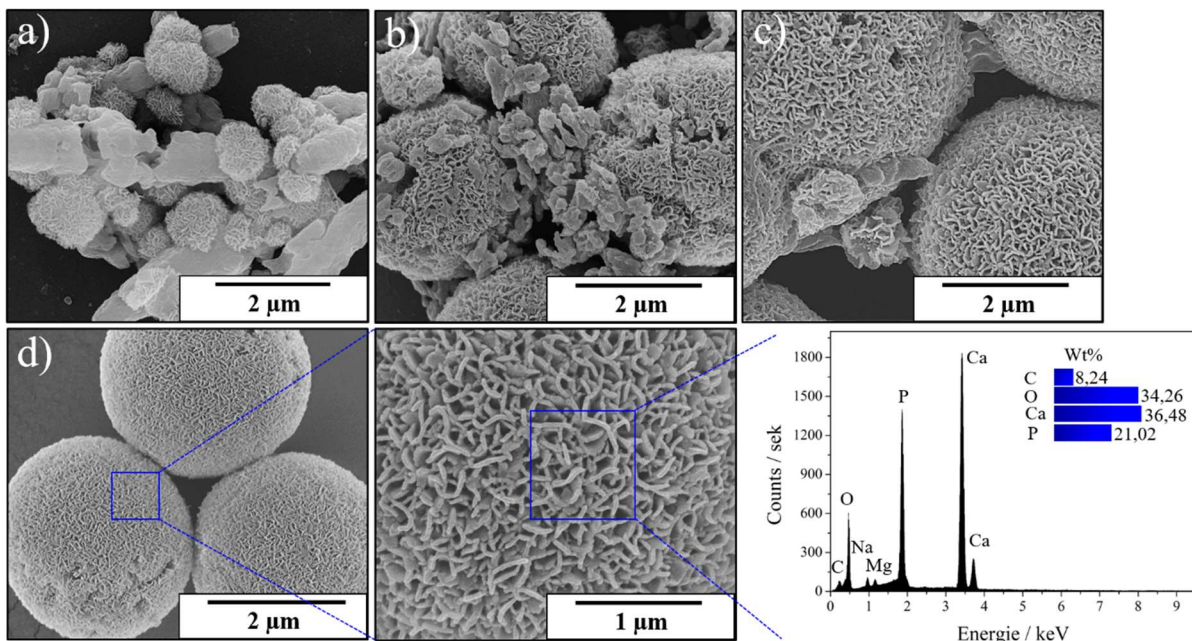


Abb. 3 - 7 Zeitaufgelöste Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nach Inkubation in hBP erhaltenen Produkte. a) 8 Wochen, b) 10 Wochen, c) 12 Wochen, d) 24 Wochen Inkubation in hBP. Die Inkubation in hBP resultiert in kompakten, kegelförmigen Polypartikelaggregaten, die sich aus kleinen, plättchenförmigen Kristallen aufbauen. Graphische Darstellung der REM-EDX-Analyse.

Im weiteren Vergleich konnte anhand der Elementaranalyse mittels REM-EDX ein dem Knochenmineral ähnliches Ca:P-Verhältnis von 1,74 ermittelt werden. Zusätzlich konnten geringe Spuren von Mg^{2+} und Na^+ detektiert werden, die auf die Bildung eines Calciumdefizitären Hydroxylapatit (CDHA) hinweisen. Die Anwesenheit von Na^+ konnte mittels ^{23}Na -NMR-Spektroskopie bestätigt werden (s. Anhang A) und stimmt mit Arbeiten zu biogenem HCA überein.^[221–227] Die Hydrolyse von CDHA führt aufgrund der erhöhten Löslichkeit zu einer Konversion zu nichtstöchiometrischem Hydroxylapatit in wässrigen Systemen. Somit kann der nachträgliche Einbau von CO_4^{2-} auf den Ionengitterpositionen des PO_4^{3-} gefördert und die Bildung von HCA des B-Types begünstigen werden. Zahlreiche Arbeiten über Substitutionen im HA-Gitter berichten, dass der Einbau von CO_3^{2-} im A-Typ und B-Typ Banden bei 880 cm^{-1} und $\sim 872\text{ cm}^{-1}$ erzeugen. Zur Analyse des entstandenen Carbonatapatites wurde die ν_2 Schwingungsbande des CO_3^{2-} -Ions bei $\sim 870\text{ cm}^{-1}$ (O-C-O Kipp-Deformationsschwingung) näher untersucht.^[201,205,218,228,229]

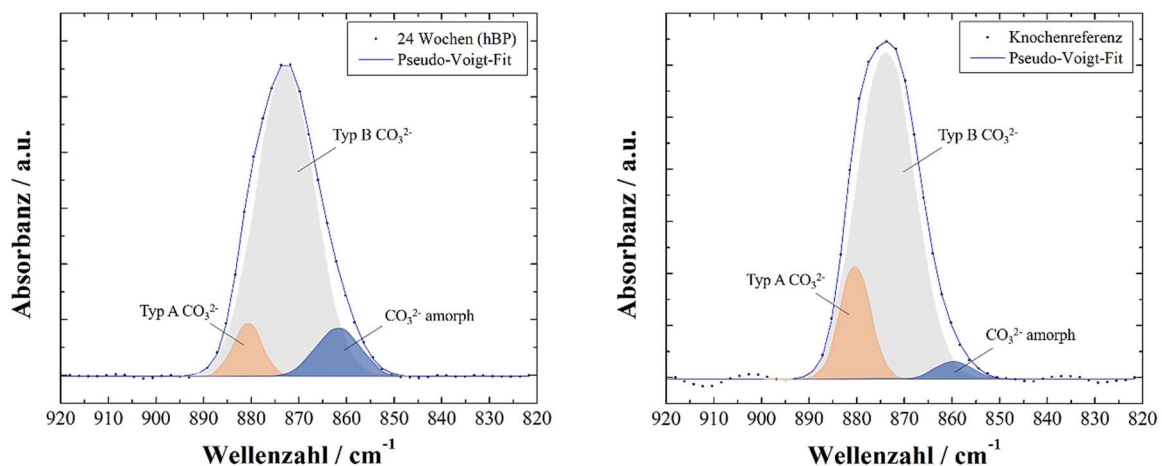


Abb. 3 - 8 Fourier-Transform-Infrarot-Spektrum (FT-IR) der $\nu_2(CO_3^{2-})$ -Schwingungsbande der Konversionsprobe in hBP (6Monate) sowie der Knochenreferenz und die entsprechende Anpassung (blaue Linie). CO_3^{2-} -Ionen vom Typ B besetzen die PO_4^{3-} -Stellen im Kristallgitter des Hydroxylapatits; CO_3^{2-} -Ionen vom Typ A besetzen die OH-Stellen im Kristallgitter des Hydroxylapatits. Nicht-apatitische CO_3^{2-} -Ionen sind in der amorphen Oberflächenschicht vorhanden, die die Knochenmineralpartikel umhüllt.^[88] Das ^{31}P -NMR Spektrum (Abb. 3-10) deutet die Anwesenheit von sauren HPO_4^{2-} -Gruppen an, deren P-OH Streckschwingung bei $\sim 870\text{ cm}^{-1}$ erwartet wird. Die P-OH Streckschwingung fällt mit der CO_3^{2-} -Bande des B-Typ zusammen und wurde in der Dekonvolierung nicht berücksichtigt.

In Abhängigkeit der unterschiedlichen Verzerrung der Molekülgeometrie des CO_3^{2-} kann mittels FT-IR-Analyse zwischen dem A-Typ und B-Typ unterschieden werden. Das Dekonvolvieren der betrachteten Schwingungsbande zeigt die bevorzugte Bildung von HCA des B-Typs nach 6monatiger Inkubation in hBP und ist mit den Ergebnissen der Knochenreferenz vergleichbar. In Anbetracht der Konversionsbedingungen (Auflösungs- und Rekristallisation in hBP) scheint dieses Ergebnis plausibel und wird durch XRPD-Analysen gestützt (s. Anhang A). Die verbreiterte Reflexform deutet auf eine Apatitphase geringer Kristallinität (im Vergleich zu HA) sowie kleine, ungeordnete Kristallite, wie bereits für HCA des B-Typs beschrieben, hin.^[160] Neben den IR-Banden, die von gitterassoziierten A/B-Spezies rühren,

kann eine Bande bei 860 cm^{-1} detektiert werden. Euw *et al.*^[88] führen die Anwesenheit dieser Bande auf eine nicht-apatitische amorphe Oberflächenschicht zurück. Basierend auf den Ergebnissen ihrer Analyse postulieren Sie ein Modell des reifen Knochenmineralpartikel, der sich aus einem inneren kristallinen Kern von carbonatisiertem HA und einer amorphen Oberflächenschicht (überwiegend HPO_4^{3-}) zusammensetzt. Weitere Studien von Yasar *et al.*^[221,227] zeigen, dass eine solche amorphe Schicht in ^{13}C -NMR-Experimenten von synthetischem und biogenem HCA eine Resonanz bei 168.7 ppm erzeugt. Abbildung 3-9 zeigt ^{13}C -CP-MAS-NMR-Spektren von Vaterit mit 2 ms Kontaktzeit vor und nach der Inkubation in hbP für 6 Monate. Das Spektrum der inkubierten Probe zeigt ein breites, leicht asymmetrisches Signal (FWHM = 397,2 Hz) mit einem Maximum bei 169.9 ppm. Die breite Resonanz ist charakteristisch für strukturell ungeordnete oder nanokristallinen Proben und deckt sich mit den Ergebnissen der XRPD-Analyse.

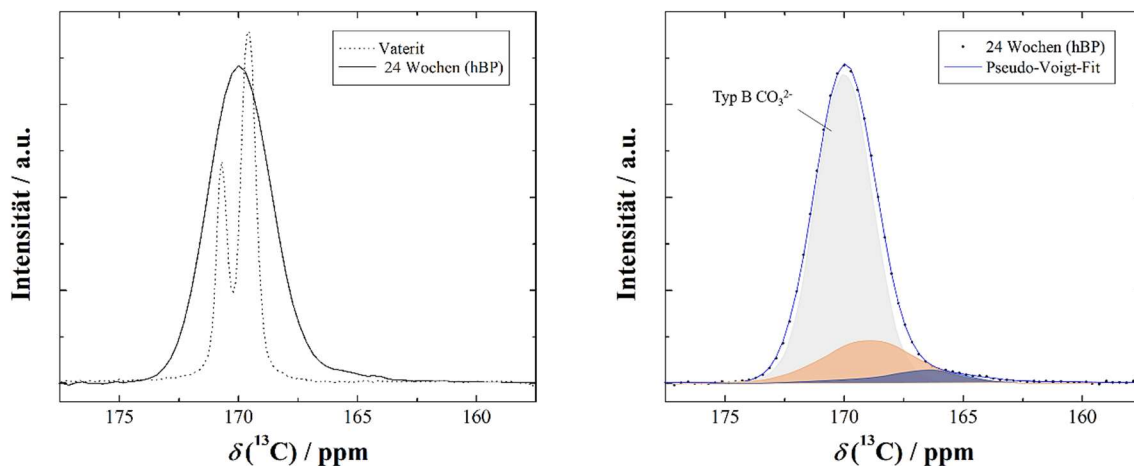


Abb. 3 - 9 ^{13}C CP-MAS-NMR-Spektren der in hbP inkubierten Probe (6 Monate) sowie des Ausgangsproduktes Vaterit. Das dekonvolvierte Spektrum (rechts) der Inkubationsprobe mit entsprechender Anpassung (blaue Linie) und drei Signalen.

Das Dekonvolvieren des Signals ergibt drei verschiedene Umgebungen für die Carbonatgruppe. Die Resonanz bei ~ 170.0 ppm resultiert aus dem entstandenen Carbonat-Apatit vom B-Typ.^[230-233] Das deutlich breitere Signal, das bei ~ 168.7 ppm ein Maximum zeigt, kann Carbonaten in der amorphen Oberflächenschicht zugeordnet werden und deckt sich mit der ^{13}C -Verschiebung, die bei ACP-Proben mit 6-14 Gew.-% beobachtet wurde.^[227] Zudem kann ein schwaches Signal bei ~ 166.0 ppm detektiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Carbonate des A-Typs ein scharfes Signal bei ~ 166.5 ppm erzeugen^[230-232,234,235] und würde demnach auf eine HCA-Phase des AB-Typs hinweisen. Die Breite des Signals korreliert jedoch nicht mit ausgeprägter Kristallinität des HCA vom A-Typs und ist daher vermutlich auf die Anwesenheit von HCO_3^- -Gruppen (Kaliumhydrogencarbonat $\delta(^{13}\text{C}) = 165.0$ ppm) zurückzuführen.^[236] Die ^{31}P -NMR-Experimente der Knochenreferenz sowie der durch

Inkubation in hBP erhaltenen Apatitphase ergeben vergleichbare Spektren, deren Peakmaxima bei ~ 3.1 ppm liegen. Im Vergleich zu gut geordnetem und stöchiometrischen HA (2.8 ± 0.1 ppm), zeigen diese Proben eine etwas höhere Verschiebung und stimmen gut mit bereits beschriebenen Werten von synthetischen und biogenem HCA ($3.0 - 3.3$ ppm) überein.^[88,237-241] Die FWHM von 388,5 Hz (Inkubation in hBP) bzw. 420,9 Hz (Knochenreferenz) spiegelt die strukturelle Ordnung der HCA-Phase wieder. Die Peakbreite kann auf die geringe HCA-Partikelgröße sowie auf die zunehmende strukturelle Unordnung der HCA-Phase durch Gittersubstitutionen und den Betrag einer amorphen Oberflächenschicht zurückgeführt werden. Das Spektrum der in hBP inkubierten Probe zeigt zusätzlich noch eine Schulter im Bereich von ca. 1 ppm bis -2 ppm. Dekonvolierung dieses Spektrums ergibt letztlich drei Resonanzen. Das Signal höchster Intensität und einem Peakmaximum bei 3.0 ppm (FWHM= 291,4 Hz) ist dem HCA zuzuordnen. Die breite Resonanz (FWHM=647.3 Hz) bei 3.4 ppm kann auf Oberflächenphosphatgruppen der amorphen Schicht zurückgeführt werden. Das Signal bei 1.1 ppm zeigt die Anwesenheit von sauren HPO_4^{3-} -Gruppen (FWHM=517,2 Hz).

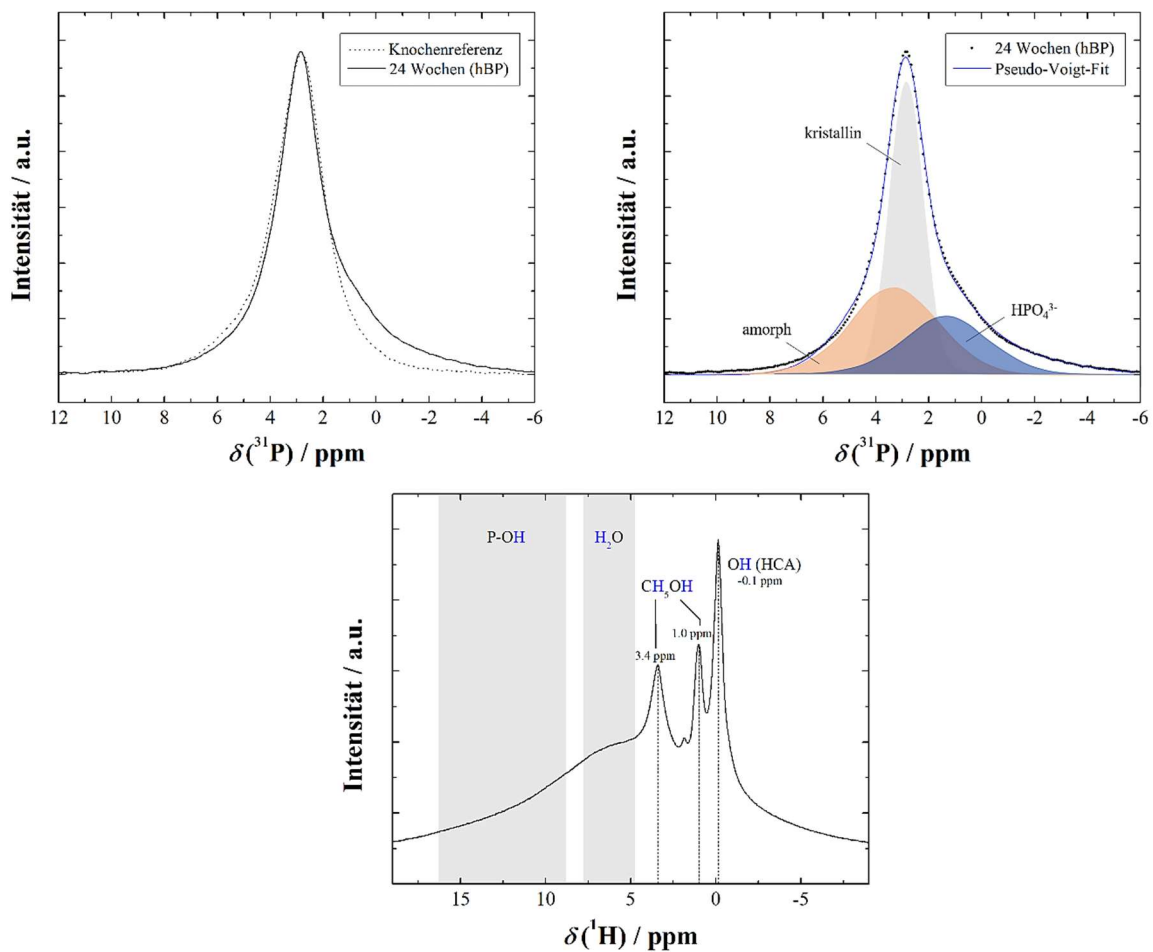


Abb. 3 - 10 ^{31}P -SPE-MAS-NMR-Spektrum (oben, links) der Inkubationsprobe (6 Monate, hBP) sowie der Knochenreferenzprobe. Nach Dekonvolvieren des ^{31}P -SPE-MAS-NMR-Spektrums der Inkubationsprobe zeigt das Signal drei verschiedene elektronische Umgebungen (oben, rechts). ^1H -MAS-NMR-Spektrum der Inkubationsprobe (unten).

Entsprechend den bisherigen Ergebnissen zeigt das ^1H -MAS-NMR-Spektrum eine scharfe HA-charakteristische Resonanz bei -0.1 ppm, die dem carbonat-haltigen Hydroxylapatit zuzurechnen sind. Die Schulter im Bereich von ~ 5.0 ppm und im Bereich von ≥ 8.0 ppm sind auf strukturell gebundenes Wasser sowie die Anwesenheit von sauren HPO_4^{2-} -Gruppen zurückzuführen. Die scharfen Signale bei 3.4 ppm und 1.0 ppm können zur Aufreinigung verwendeten Lösungsmittel Ethanol zusammenhängen. In Arbeiten von Osman *et al.*^[242] sowie Yasar *et al.*^[221] wird die Resonanz bei 1.0 ppm Wassermolekülen, die an die OH-Kanäle der HA-Struktur assoziieren zugeordnet.

Anhand eines systematischen Ansatzes wurde die durch Inkubation in hBP entstandene HCA-Phase auf ihre biologische Eignung als Biomaterial getestet und erste *in vitro* Studien zur Risikobewertung durchgeführt. Vorab wurden die Inkubationsproben mit $5,25\%$ Natriumhypochlorit-Lösung behandelt, um restliche Proteinanhaftungen sowie mögliche Pyrogene zu entfernen.

3.3.2. *In vitro* Studien

E-Selektin Expression durch HUVEC

Die Expression von E-Selektin (endothelspezifisches Membranglykoprotein) durch primärer Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) wird durch Endotoxine vermittelt. Endotoxin (auch bekannt als Lipopolysaccharid LPS) ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Pathologische Mengen von bakteriellem Endotoxin werden durch Bakteriolysen freigesetzt und führen im menschlichen Organismus zu spezifischen Entzündungsreaktionen, die häufig von Fieber und Zell- bzw. Gewebeschäden begleitet werden.^[106] Folglich können auch sterile Biomaterialien (frei von Kontaminationen mit lebensfähigen Organismen) endotoxin-vermittelte proinflammatorische Effekte auslösen. Folglich ist die Abwesenheit von Endotoxin für die Verwendung eines Materials als Transplantat von wesentlicher Bedeutung. Zur Beurteilung wird die Stoffwechselaktivität von primären Endothelzellen in Anwesenheit des Biomaterials *in vitro* betrachtet. Endothelzellen zeigen als Reaktion auf Entzündungsmediatoren *in vitro* und *in vivo* eine verstärkte Expression von E-Selektin. Über die schnelle Induktion von E-Selektin ausgehend von Endothelzellen in Gegenwart von Endotoxin wurde bereits früher berichtet. Somit kann E-Selektin als Marker für bakterielles Endotoxin herangezogen werden.^[105] Mittels Antikörper-basierter Immunfluoreszenz-Färbung wurde die Expression von E-Selektin durch HUVEC in Anwesenheit der HCA-Partikel ($250 \mu\text{g/mL}$) untersucht.

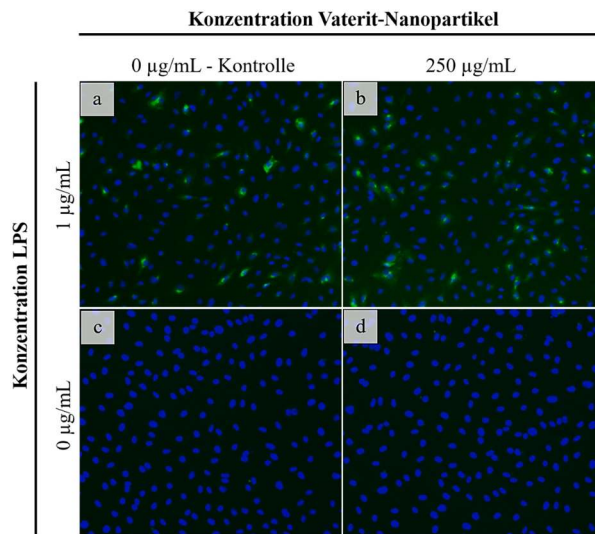


Abb. 3 - 11 Antikörper-basierte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von E-Selektin. Getestet an primären Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). (a) pos. Kontrolle, (b) pos. Kontrolle mit 250 µg/mL HCA, (c) neg. Kontrolle, (d) 250 µg/mL HCA. Skala: 100 µm.

Abbildung 3-11c zeigt die Aufnahme von unbehandelte HUVEC als Zellkontrolle zur Überprüfung der „Qualität“ der verwendeten Zellen. Abbildung 3-11a+b zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC nach vierstündiger Stimulation mit Endotoxin (LPS). Die Expression von E-Selektin wird durch die grüne Färbung visualisiert. Unter Entzündungsbedingungen reagieren Endothelzellen mit einer induzierten Expression von E-Selektin. Um sicher zu stellen, dass die verwendeten HUVEC auch bei Anwesenheit des Biomaterials eine normale Genexpression zeigen, wurde die Zellen sowohl mit 250 µg/mL HCA und LPS stimuliert. Abbildung 3-11b zeigt, dass HUVEC, die mit HCA unter entzündungsfördernden Bedingungen (Zugabe LPS) kultiviert wurden, E-Selektin exprimierten, und somit eine normale Endothelzell-Genexpression als Reaktion auf ein Entzündungssagens zeigen. Die Aufnahme der Zellen, die ausschließlich mit 250 µg/mL HCA kultiviert wurden (Abbildung 3-11d), zeigt keine Auffälligkeiten und ist mit den Aufnahmen der Zellkontrolle (Abbildung 3-11c) vergleichbar. Eine Expression von E-Selektin hätte in einer Grünfärbung resultiert. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass weder das Syntheseverfahren noch die Inkubationsprozesse zu einer Kontamination des Probenmaterials führen. Anhand dieser Untersuchung konnten die möglichen Auswirkungen des hergestellten Biomaterials auf die Genexpression von Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* analysiert werden.^[243] Die Ergebnisse zeigen, dass die hergestellten HCA-Partikel keine pro-inflammatorischen Effekte bewirken und, dass deren Risikopotential folglich als sehr gering einzustufen ist.

Zytotoxizität

Die biomaterialinduzierte Toxizität wurde anhand sich ergänzender *in vitro* Testverfahren untersucht. Hierzu wurde die Stoffwechselaktivität der Osteoblasten-Zelllinie MG63 nach Exposition mit HCA Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen betrachtet. Neben der metabolischen Aktivität (RES-Assay) wurde das Ausmaß der Zellyse durch die Bestimmung von LDH im Überstand detektiert. Die Experimente wurden mit HCA Nanopartikel-Suspensionen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 250 µg/mL über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt. Analog wurde eine Referenzprobe der Firma Botiss (Cerabone®) als Vergleichsmaterial mitgeführt. Cerabone® findet in der regenerativen Zahnmedizin sowie in anderen medizinischen Bereichen Anwendung als Implantatmaterial. Laut Herstellerangaben besteht Cerabone® zu 100% aus reinem Knochenmineral, dass durch Hochtemperaturbehandlung von bovinem Knochen erhalten wird. In Abbildung 3-12 sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätsstest graphisch gegenübergestellt.

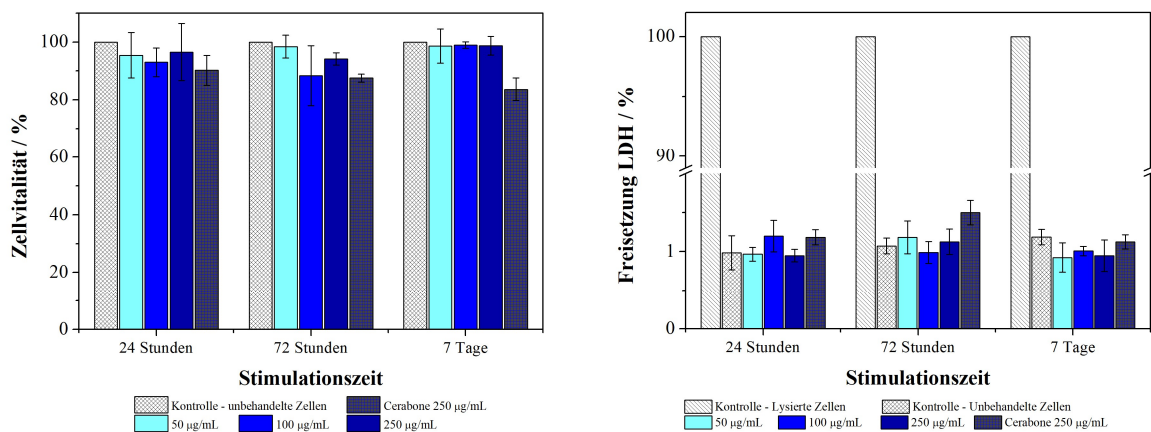


Abb. 3 - 12 Zytotoxizitätstests. Graphische Darstellung der Ergebnisse des RES-Assay (links) sowie der LDH-Assay (rechts), getestet an der osteoblastischen Zelllinie MG63. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Experimenten, mit jeweils 3 technischen Replikaten pro Stimulation, sind dargestellt. Die Angabe der statistischen Signifikanz erfolgte durch einen Student T-Test, Typ 3, mit $*p < 0,05$ im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Der RES-Assay (Abbildung 3-12, links) dient zur Analyse der zellulären metabolischen Aktivität. Denn nur in metabolisch aktiven Zellen wird der zugegebene Farbstoff Resazurin durch intrazelluläre Dehydrogenasen und unter Umsetzung von NAD^+/NADH reduziert. Letztlich ist das gemessene kolometrische Signal proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und gibt somit Rückschlüsse auf die Vitalität der verwendeten Zellen nach Exposition. Als Kontrollversuch wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Zellvitalität der unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt und wird als Vergleichswert herangezogen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt, dass über den gesamten Inkubationszeitraum keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Kontrollzellen und der mit HCA behandelten Zellen zu erkennen ist. Die metabolische Aktivität der mit HCA stimulierten Zellen scheint über den gesamten Untersuchungszeitraum sowie in allen Konzentrationen nicht von der Anfangsaktivität abzuweichen. Die Cerabone[®] Referenzprobe zeigt im direkten Vergleich eine um ~ 10% verminderte Aktivität. Aufgrund der hohen Stabilität des Materials kann eine zunehmende Streuung durch Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse des Materials ausgeschlossen werden. Wie in Kapitel 2 bereits erläutert, können Konversionsprozesse, die mit der Ausfällung einer neuen Phase einhergehen zu einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals führen. Als ergänzendes Testverfahren wurde ein LDH-Assay mit konstanten Versuchsparametern durchgeführt. Zusätzlich zur Zellkontrolle (unbehandelte Zellen) wurden Kontrolle lysierter Zellen mitgeführt, deren gemessene LDH-Aktivität als Vergleichswert herangezogen wurde. Es wurde von einer 100%igen Freisetzung von LDH ausgegangen. Auch in diesem Testverfahren zeigt die Cerabone[®] Referenzprobe eine geringfügig erhöhte Toxizität. Es wurde ein im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöhtes Fluoreszenzsignal detektiert, dass auf die vermehrte Freisetzung von LDH zurückzuführen ist. Die von Cerabone[®] ausgehenden zytotoxischen Effekte zeigen sich sowohl in der Reduktion der metabolischen Aktivität, als auch einer verstärkten Zelllyse. Aufgrund der geringen Abweichungen ist die Toxizität des Materials dennoch als marginal einzustufen. Die Ergebnisse der untersuchten HCA Proben sind mit den Ergebnissen der unbehandelten Zellen vergleichbar. Somit können HCA-induzierte zytotoxische Effekte ausgeschlossen, und von intakten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten und Konzentrationen ausgegangen werden. Unter diesem Aspekt, kann in Kombination der beiden angewendeten Testverfahren eine biomaterialinduzierte Toxizität als unwahrscheinlich betrachtet werden. Der direkte Vergleich zur Cerabone[®] Referenz *in vitro* zeigt, dass dieses HCA-Biomaterial eine vielversprechende Alternative in der klinischen Anwendung bieten kann.

Zellbiokompatibilität

Zur Prüfung der allgemeinen Gewebetoleranz werden zelluläre Wechselwirkungen, im Spezifischen das Proliferationsverhalten und die Zellmorphologie betrachtet. Gewebsspezifische Zellen wurden mit dem entsprechenden Biomaterial inkubiert und deren Veränderungen hinsichtlich der oben genannten Parameter mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurden osteoblastische Zellen (MG63) und Endothelzellen (HUVEC) mit HCA-Nanopartikeln Suspensionen unterschiedlicher Konzentration (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250

$\mu\text{g/mL}$) über einen Zeitraum von 7 Tagen inkubiert. In den Abbildungen 3-13 und 3.14 sind ausgewählte, repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zusammengestellt.

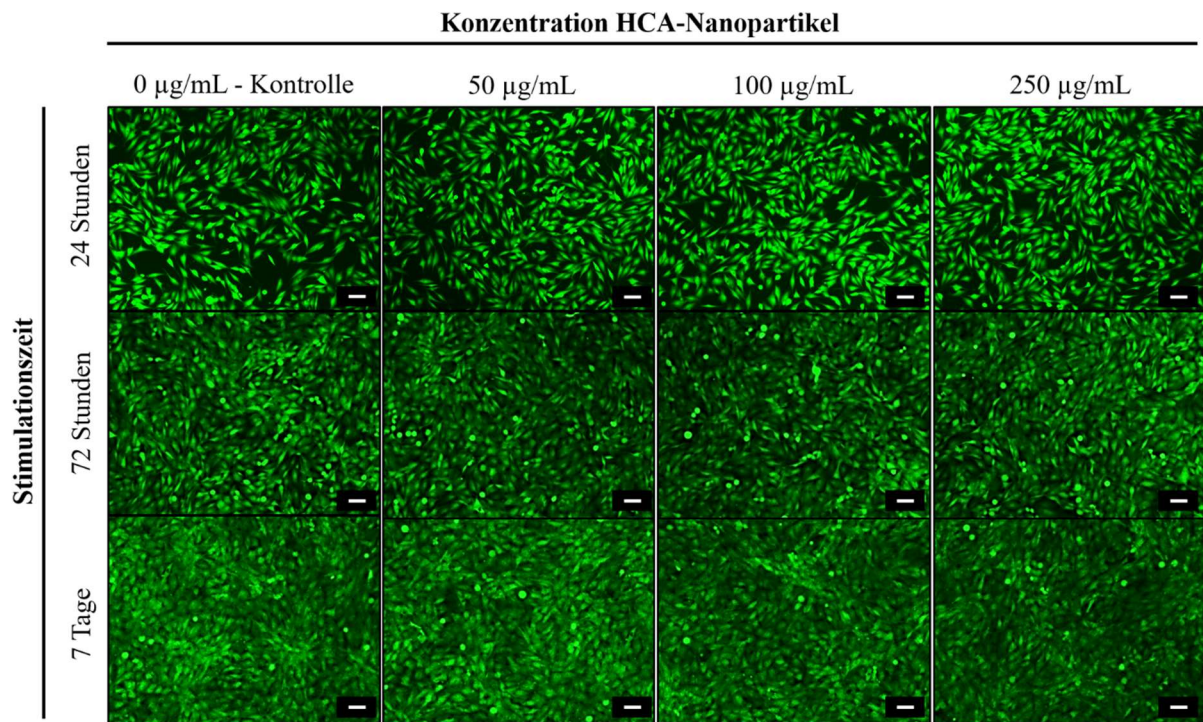


Abb. 3 - 13 Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von HCA Nanopartikel, getestet an der humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

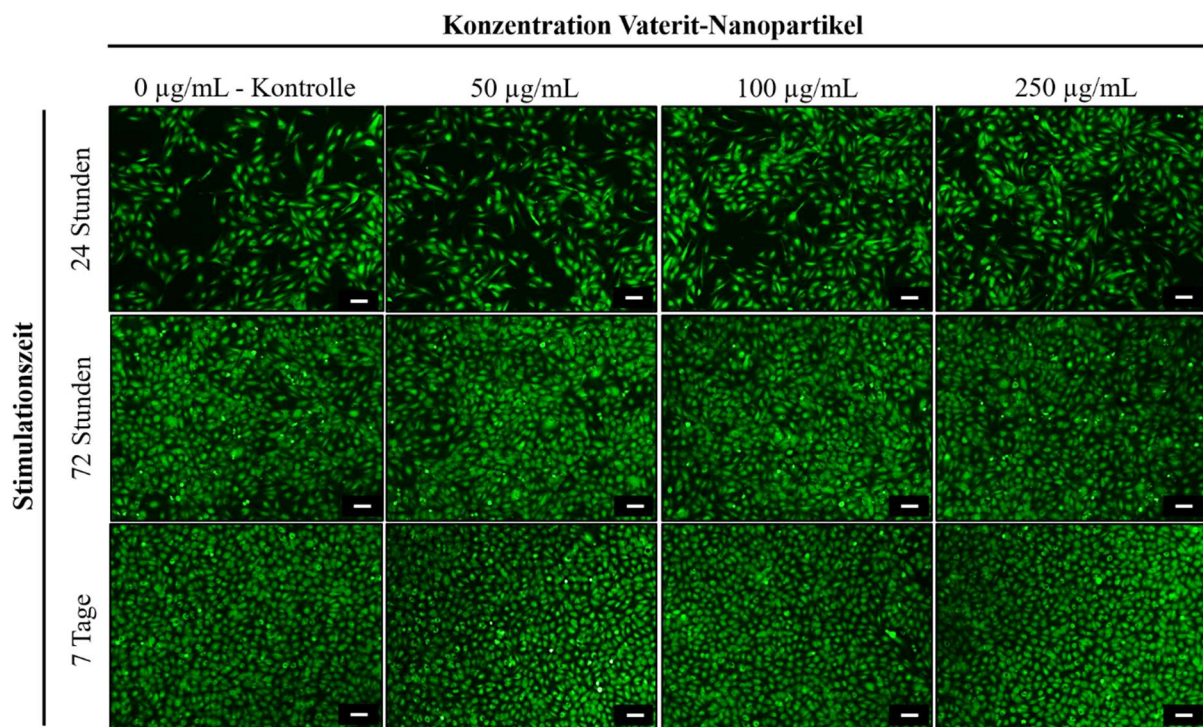


Abb. 3 - 14 Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von HCA Nanopartikel, getestet an der humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Zur Beurteilung der Ergebnisse und Überprüfung der verwendeten Zellen wurden in jedem Experiment eine Versuchskontrolle unbehandelter Zellen mitgeführt. Das Wachstumsverhalten sowie deren Verteilung dient als Referenz in diesem Experiment. Den Erwartungen entsprechenden ist anhand der Kontrollen zu erkennen, dass die Zellzahl mit zunehmendem Kultivierungszeitraum steigt. Die Proliferation der anfangs vereinzelter Zellen führt zur Bildung eines adhären Monolayers. In allen Experimenten zeigen die mit HCA-Nanopartikeln exponierten Zellen eine im Vergleich zur Kontrolle ähnliche Wachstumsverteilungen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen zudem eine adhären und typische Zellmorphologie, wie sie für gesunde Zellen zu erwarten ist. Würde das Biomaterial die zellulären Wechselwirkungen negativ beeinflussen, wären vermehrt apoptotische, abgerundete Zellen zu erkennen. In Summe deuten die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass die verwendeten HCA-Partikel eine ausgeprägte Gewebsverträglich aufweisen. In allen Experimenten wurden stoffwechselaktive Zellen mit einem gesunden Proliferationsverhalten sowie entsprechender Zell-Zell-Kontakte nachgewiesen. Weder die Zellanhaftung noch die Proliferation werden durch die HCA-Partikel negativ beeinflusst. Im Allgemeinen ist bekannt, dass primäre Zellen (HUVEC) hinsichtlich der Kultivierungsbedingungen anfälliger sind. Auch in diesen Untersuchungen konnten durchgängig positive Ergebnisse erzielt werden, die die ausgeprägte biologische Verträglichkeit des Materials unterstreichen.

3.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde das Kristallisationsverhalten der metastabilen CaCO_3 -Phase Vaterit, in humanem Blutplasma analysiert. Aus vielen Studien ist bekannt, dass die Inkubation von Biomaterialien in einer simulierten Körperflüssigkeit zur Ausfällung einer knochenähnlichen Apatitphase führt. Neben Studien in einem proteinfreien, azellulären Medium konnte durch die Inkubation in humanem Blutplasma Ergebnisse über die Konversion von Vaterit in einer biomimetischen, knochenbildenden Umgebung erlangt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Vateritphase auch in einem proteinhaltigen Medium zur Bildung einer Apatitphase führt, dessen Zusammensetzung mit dem Knochenmineral vergleichbar ist. Die Inkubation in hBP führt zu kompakten Polypartikelaggregaten, die sich vermutlich über eine keimbildungskontrollierte Reaktion wie sphärolithisches Wachstum, bilden. Diese Morphologie ist mit dem für den Knochen beschriebenen „Mosaik aus ineinandergreifenden Kristallkacheln“^[244] vergleichbar. Eine Kombination aus FT-IR und NMR-Spektroskopie, sowie Pulverröntgendiffraktometrie (XRPD) und mikroskopischer Methoden (REM, TEM)

zeigen die Umwandlung von Vaterit Nanopartikeln in carbonathaltige HA-Kristalle geringer Kristallinität. Zudem deuten die Untersuchungen darauf hin, dass neben Carbonat weitere Fremdionen (z.B. Na^+) durch Substitution in das HA-Gitter eingebaut wurden. Neben der chemischen Charakterisierung wurden biologische Studien, die die wesentlichen Aspekte zur Beurteilung des biologischen Risikopotentials umfassen, durchgeführt. Die positiven Ergebnisse bezüglich der Biokompatibilität und Zytotoxizität legen den Grundstein für eine erfolgreiche, implantologische Anwendbarkeit als Knochenersatzmaterial. Es konnte gezeigt werden, dass weder das Ausgangsmaterial Vaterit (s. Kapitel 2) noch die entstandenen HCA-Phase negative Auswirkung auf gewebespezifische Zellen (MG63, HUVEC) hervorrufen. Auch die Anfänge der Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse konnte anhand der Studien in Kapitel 2 abgedeckt werden. Außerdem ist bekannt, dass die in der resorptiven Phase freigesetzten Ca^{2+} -Ionen zu einem hohen Anteil an vitalem Knochen führt (Osteoinduktion) sowie die Proliferation von Osteoklasten unterstützen.^[245-247] In den biologischen Studien wurde zudem Cerabone[®] als Referenzprobe mitgeführt. Cerabone[®] besteht aus gesintertem Knochenmineral bovinen Ursprungs und findet seit vielen Jahren Anwendung in verschiedenen medizinischen Bereichen. Im direkten Vergleich untermauern die *in vitro* Ergebnisse die Wettbewerbsfähigkeit der in dieser Arbeit untersuchten HCA-Partikel und erlauben somit eine positive Prognose hinsichtlich einer *in vivo* Anwendung im Bereich der Dentalimplantate. Der Knochenumbau ist ein dynamischer Prozess, der für die Erhaltung der Knochenarchitektur als Reaktion auf die sich ändernden mechanischen Anforderungen oder Knochendefekte erforderlich ist. Im Gegensatz zu stabilen Biomaterialien wie Cerabone[®], bietet der Vaterit sowie die entstehende HCA-Phase die Möglichkeit der individuellen Anpassung während der Knochenregeneration. Der Vaterit als Vorstufe des Knochenminerals kann somit zu körpereigenem Knochen individueller Substitution und Eigenschaften führen. Als degradierbares und regeneratives Material gilt der Vaterit als attraktive Alternative im Bereich Biomaterialien zur Knochenregeneration. Zudem hat der Vaterit als alloplastisches Implantat keinerlei biologische Vorgeschichte, sodass Fremdkörperreaktionen und Risiken bzgl. Prionenübertragung ausgeschlossen werden können. Dennoch gilt es in Folgestudien zu klären, ob sich die *in vitro* Ergebnisse in *in vivo* Studien behaupten können. Neben der allgemeinen Verträglichkeit sollte unter anderem die Osseointegration sowie die Interpretation der Resorptionsrate im Vordergrund stehen. Außerdem gilt zu prüfen, inwiefern der durch Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse temporäre Volumenverlust die Stabilität der Defektstelle beeinflusst.

4

Vaterit-PEG-basiertes Nanokompositmaterial zur Knochenregeneration

4.1. Einleitung

Im Bereich des Knochenersatzes werden aktuell eine Vielzahl an rein keramischen - oftmals auf Calciumphosphatverbindungen basierende – Biomaterialien generiert.^[174,248,249] Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zur Mineralphase des Knochens, zeigen diese Materialien ausgeprägte biologische Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*.^[163–167] Dabei stehen die positiven biologischen Eigenschaften der Biokompatibilität, Bioaktivität sowie Osteoinduktivität den nachteiligen physikalischen Eigenschaften von Härte und Elastizität gegenüber. Aus diesem Grund rückten Kompositmaterialien, bestehend aus Hydrogel und mineralischer Phase, zunehmend in den Fokus der Forschung. Intensive Untersuchungen zeigten, dass sich Hydrogele aufgrund der physikochemischen Ähnlichkeit zur Extrazellulären Matrix ausgezeichnet als Gerüstmaterialien im Bereich des *Tissue Engineering* eignen.^[250–252] Je nach Ursprung werden zwei Hauptgruppen von Hydrogelen unterschieden:^[250,253–257] Die ‚natürlichen Hydrogele‘ bestehen aus natürlichen Materialien auf Polymerbasis, wie beispielsweise Proteinen (Kollagen, Fibrin) und Polysacchariden (Dextran, Alginat). Sie erfüllen aufgrund ihrer Beschaffenheit wichtige biologische Funktionen und erlauben den Abbau der Hydrogelmatrix *in vitro* und *in vivo*.^[252,258–263] Nachteilig sind jedoch die relativ schlechten mechanischen Eigenschaften sowie das Bedenken hinsichtlich immunogener Reaktionen durch die Transplantation allogener/xenogener Materialien.^[264–266] Als alternative Wahl für das Hydrogelgerüst werden daher zunehmend synthetische Polymere (PAA, PEG, PVA, PMMA, Polypeptide) zur Herstellung ‚synthetischer Hydrogele‘ verwendet. So können durch verschiedene Vernetzungsmethoden die mechanischen Eigenschaften und die Gerüstarchitektur kontrolliert, die Transporteigenschaften durch Änderungen der Polymerkettenlänge angepasst und der Einbau von Biofunktionen für spezifische Anwendungen ermöglicht werden.^[250,267,268] Die wichtigsten Vernetzungsmethoden sind neben der Photopolymerisation,^[269] spezifische chemische Reaktionen reaktiver PEG-Funktionalisierungen (z.B. Kondensation, Michael-Addition, Thiol-Acrylat-Reaktion, Click Chemie und enzymatische Reaktionen).^[270–280] Dabei können lineare oder vernetzte PEG-

Strukturen mit funktionellen (End-)Gruppen, wie Methoxy, Carboxy, Acrylat, Azid oder Thiol zur Bildung von Hydrogelen und zusätzlicher Konjunktion mit Biomolekülen Einsatz finden.^[281–287] Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass der hydrophile Charakter von PEG zu einer Reduzierung der unspezifischen Proteinadsorption von Opsoninen führt und daraus resultierend PEG-basierte Hydrogele eine niedrige Toxizität sowie Immunogenität aufweisen.^[288–291] Zusätzlich wird durch das elastische Polymernetzwerk ein dauerhafter Stofftransport ermöglicht. Daher gelten PEG-basierte Hydrogele als attraktive Gerüste zur Bereitstellung von (3D)-Gerüststrukturen in wässriger Umgebung für die Geweberegeneration.^[268,292,293] In dieser Arbeit wird ein PEG-basiertes Hydrogel mit zusätzlicher Phosphonsäurefunktionalisierung vorgestellt. Die zusätzliche Funktionalisierung ermöglicht eine Komplexierung von Erdalkalimetallionen und könnte somit eine *in situ* Kristallisation und damit verbunden die Knochenregeneration erleichtern. Danner *et al.*^[294] zeigen anhand PGylierter Polystyrol-Nanopartikel, dass der Einbau einer Phosphonsäure-Funktion in Polyglycerol (PG) Veränderungen im Zetapotential (ζ -Potential) hervorruft. Diese Veränderungen resultieren in ihren Studien, bis zu einer definierten Menge an negativen Ladungen, nicht in einer signifikanten Veränderung des adsorbierten Proteinmusters.^[294] In diesem Zusammenhang wurden kombinierte Biomaterialien aus Vaterit Nanopartikel und einem phosphonylierten PEG-basierten Hydrogel generiert um die chemischen und biologischen Eigenschaften zu analysieren, mit dem Ziel ein (3D)-Netzwerk mit biokompatiblen bis bioaktiven Eigenschaften und einer unterstützenden Funktion zur Behandlung von Knochengewebserkrankungen zu entwickeln.

4.2. Material und Methoden

4.2.1. Material

Pentaerythritol-tetrakis(3-mercaptopropionate) (Sigma Aldrich, > 95%), 2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon (C₁₀H₁₂O₂, Sigma Aldrich, 97,0%), 2-Propanol (C₃H₈O, Sigma Aldrich, ≥ 99,7%) NaCl (Acros, ≥ 99,0%), NaHCO₃ (Sigma Aldrich, ≥ 99,7%), KCl (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%), K₂HPO₄·3H₂O (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%), MgCl₂·6H₂O (Merck, ≥ 99,0%), HCl (Sigma Aldrich, 37%), CaCl₂ (Sigma Aldrich, ≥ 93,0%), Na₂SO₄ (Acros, 99,0%), Tris-Pufferan (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan C₄H₁₁NO₃, Carl Roth, ≥ 99,9%), Ethanol (C₂H₅OH, Sigma Aldrich, ≥ 99,8%), M199 (Sigma Aldrich), MEMα (*Minimum Essential Medium Alpha*, Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), Dexamethason (Sigma Aldrich, ≥ 97%), Ascorbinsäure (Sigma Aldrich, γ -bestrahlt), β -Glycerolphosphat-Di-Natriumsatz Hydrat (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%) FBS (*fetal bovine serum, heat-inactivated*, Sigma Aldrich), Glutamax I (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), Osteoblasten-Zelllinie MG63 (*American Type Culture Collection*, ATCC[®]CRL-1427[®], LGC Promochem), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*, Sigma Aldrich), DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, F-12 Nutrient Mixture Ham*, Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), Penicillin/Streptomycin P/S (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific), ECGS (*endothelial cell growth supplement*, Becton Dickson and Company), Heparin-Natriumsalz (Sigma Aldrich), DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, D8537, Sigma Aldrich), Calcein-AM (AM: *Acetoxymethylester*, Thermo Fisher Scientific), *CytoTox 96[®] Non-Radio Cytotoxicity Assay* (LDH, G1780, Promega), Gelatine (Sigma Aldrich), Resazurin (Sigma Aldrich, 7017), *Hank's Balanced Salt Solution* (Sigma Aldrich), Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Cellstar[®]), deionisiertes MilliQ-Wasser.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die in Kapitel 2, Abschnitt 2.3 charakterisierten Vaterit Nanopartikel verwendet. Die Synthese und Charakterisierung des verwendeten (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Copolymers wurde von **Dr. Olga Linker** aus der Arbeitsgruppe von **Prof. Dr. Holger Frey** am Institut für Organische Chemie der JGU Mainz durchgeführt.

4.2.2. (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel – Synthesevorschrift

Zur Synthese der Hydrogele wurde eine 10%ige (w/v) Lösung des PEG-basierten Copolymers (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) in DPBS hergestellt. Zur Polymerisation wurden 0,2% (v/v) des Photoinitiators 2-Hydroxy-2-methylpropiophenon als 10%ige (v/v) Stammlösung in 70%igem Ethanol zugegeben. Zur Herstellung der Vaterit-inkorporierten Hydrogele wurden zusätzlich 1% oder 2,5% (w/v) Vaterit Nanopartikel zur Polymerlösung

gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde im Ultraschallbad homogenisiert und die Polymerisation durch UV-Strahlung bei 365 nm gestartet. Die Synthese erfolgte in Zellkulturplatten (96- oder 48-Well) und einem Volumen von 50 μL oder 100 μL . Zur Unterdrückung von Kapillareffekten wurde die Reaktionslösung mit dem gleichen Volumen an 2-Propanol übersichtet und anschließend für 30 min bestrahlt. Anschließend wurden die Hydrogele zur Aufarbeitung je nach Analyse mehrfach gewaschen und im Lyophilisator bis zur Massenkonstanz getrocknet.

4.2.3. (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel – Quellverhalten

Zur gravimetrischen Bestimmung des Quellgrades Q im Gleichgewichtsquellzustand wurden die gefriergetrockneten (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele in DPBS bei 37°C und 150 U/min über einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert. Der Quellgrad Q berechnet sich wie folgt

$$Q = \frac{m_w}{m_t} = \frac{m_q - m_t}{m_t} \quad (4.1)$$

mit m_w : Menge an adsorbiertem Wasser, m_q : Masse des Hydrogels im gequollenen Zustand, m_t : Masse des Hydrogels im gefriergetrockneten Zustand.^[252] Die gravimetrische Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität wurde pro Zeitraum in fünffacher Ausführung durchgeführt und anschließend der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt.

4.2.4. (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel – Inkubation in SBF

Die verwendete simulierte Körperflüssigkeit (SBF: *simulated body fluid*) wurde nach der Vorschrift von Kokubo *et al.*^[180] hergestellt. Die Vorgehensweise ist Kapitel 2, Abschnitt 2.2 zu entnehmen.

4.2.5. Chemische Charakterisierung

ATR-FTIR-Spektroskopie. Die ATR-FTIR-Spektroskopie wurde mit einem Nicolet iS10 Spektrometer der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Frequenzbereich von 650 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} mit einer Auflösung von 1,4 cm^{-1} pro Datenpunkt aufgenommen.

NMR-Spektroskopie. ¹H NMR-Spektren wurden an einem Bruker Advance III HD 300 (5 mm BBFO-Probe mit z-Gradient und ATM) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden intern auf das Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels bezogen.

Pulver-Röntgenbeugung. Pulverröntgendiffraktogramme wurden auf einem STOE Stadi P, ausgestattet mit einem Mythen 1k-Detektor, unter Verwendung von monochromatisierter

MoK α -Strahlung aufgenommen. Die Probe wurde mit Perfluorether (Fomblin Y, Aldrich) zwischen Polyvinylacetat-Folien aufgebracht. Die Probe wurde in 0,015°-Schritten (kontinuierlicher Scan, 150 s/°) gemessen, die einen 2 θ -Bereich von 1,5° bis 47° abdecken.

Rasterelektronenmikroskopie. Die REM-Proben wurden an einem Nova NanoSEM 630 der Firma FEI durchgeführt. Es wurde im Hochvakuum mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV, einem Arbeitsabstand von 4 mm bis 7 mm und einem vCD Detektor, als Sekundärelektronendetektor zur Bildgebung gearbeitet. Die Elementaranalyse wurde mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) mit einem EDAX-Genesis Detektor und einer Beschleunigungsspannung von 30 kV durchgeführt. Zur Probenpräparation wurden 8 μ L der jeweiligen Probensuspension auf einen Silicium-Wafer aufgetropft und auf einem leitenden Kohlestoffpad fixiert. Anschließend wurden die Proben unter Verwendung einer MED020 Kleinbedampfungsanlage der Firma Bal-Tec mit einer Goldschicht 7,5 nm gesputtert.

Zetapotential. Zur Bestimmung des Zetapotentials (ζ -Potential) der Vateritproben und Hydrogelproben wurde ein Malvern Zetasizer Nano Series Instrument mit gefalteten Einweg-Kapillarzellen verwendet. Die Probelösungen wurden nach einer Inkubationsdauer von 6 Stunden in Wasser oder MEM α auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL mit 1 mM KCl verdünnt. Alle Proben wurden als Triplikate vermessen.

4.2.6. Biologische Untersuchungsmethoden – *in vitro* Studien

Die Prüfungen auf Pyrogenität, Zytotoxizität sowie gewebspezifische Zellverträglichkeit der synthetisierten (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele wurde an zwei Zelltypen, der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG63 sowie den primären humanen Endothelzellen HUVEC getestet. Zusätzlich wurde die Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG63 sowie der primären Osteoblasten pOB auf den Hydrogelen untersucht. Hierfür wurden die gefriergetrockneten Hydrogele in einer Zellsuspension (10.000 Zellen pro 500 μ L) für eine Stunde im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die gequollenen Hydrogele in eine 48-Well Zellkulturplatte überführt und 300 μ L Zellkulturmedium zugegeben. Die Kultivierung erfolgte als Dreifachbestimmung mit zwei unterschiedlichen Zellpassagen für 24 Stunden, 72 Stunden und 7 Tage. Als Kontrolle wurde die identische Zellzahl mitgeführt. Die Adhärenz von vitalen MG63 und pOB wurde mittels Calcein-AM am Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Zytotoxische Effekte wurden anhand des LDH-Assay und RES-Assay analysiert. Abweichend zu der allgemein beschriebenen Durchführung (Kapitel 2, Abschnitt Y) wurden zur Messung

nach entsprechender Inkubationsdauer 100µL der Reaktionslösung entnommen und anschließend die Fluoreszenz bei der angegebenen Wellenlänge vermessen. Der RES-Assay zur Analyse des Zellwachstums wurde nach dem Protokoll von E. M. Czekanska^[295] durchgeführt.

4.3. Ergebnisse und Diskussion

4.3.1. Hydrogele aus phosphonylierten Polyether-Triblock-Copolymeren – Synthese und Charakterisierung

Zur Synthese der Hydrogele wurden phosphonylierte Polyether-Triblock-Copolymeren ($P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE})$, $M = 8850 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) mit Pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionat) (PETMP, $M = 488,66 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) mittels UV-initiiertes Thiol-en-Klickreaktion vernetzt. Die gefriergetrockneten Gele wurden mittels abgeschwächter Totalreflexions-Fourier-Transformations-Infrarot (ATR-FTIR) - Spektroskopie analysiert (Abb. 4-1).

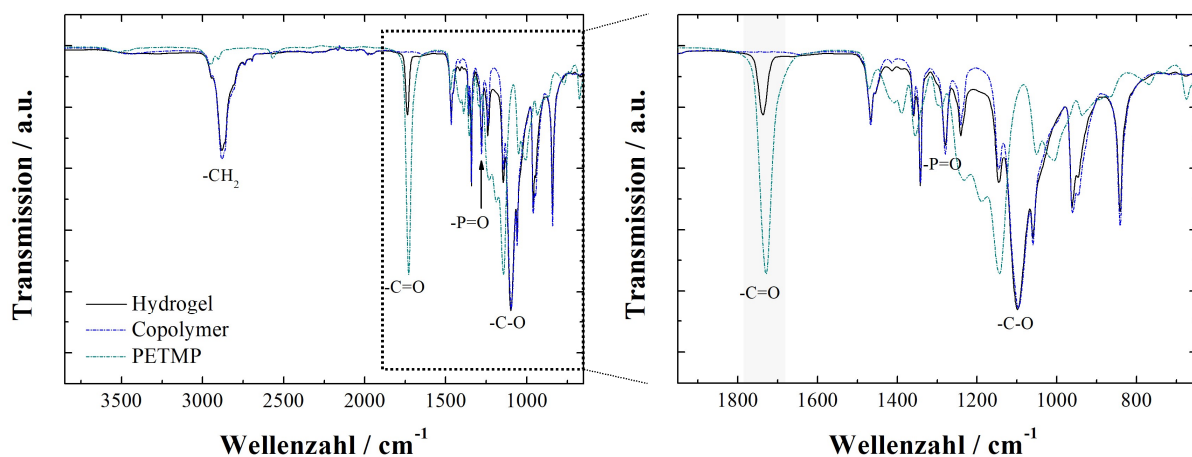


Abb. 4 - 1 Charakterisierung des synthetisierten Hydrogels ausgehend von ($P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE})$) und PETMP mittels UV-initiiertes Thiol-en-Klickreaktion. FTIR-Spektrum der Edukte sowie des Hydrogels. ($P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE})$, PETMP, ($P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE})$)-Hydrogel.

In Abb. 4-1 sind die FTIR-Spektren der Edukte ($P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE})$) und PETMP sowie des synthetisierten Hydrogels dargestellt. Die Spektren des verwendeten Makromoleküls sowie des Hydrogel zeigen die charakteristischen Schwingungsbanden der (-CH), (C-O) und (C-O-C) Valenz- und Deformationsschwingung des Poly(ethylenglykol)-Backbone ($\nu(-CH_2)$: $\sim 2881 \text{ cm}^{-1}$, $\delta(-CH_2)$: $\sim 1465 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(-C-O)$: 1098 cm^{-1} , $\nu_{as}(-C-O-C)$: $1145 - 1059 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{sy}(-C-O-C)$: 841 cm^{-1}). Anhand der Schwingungsbande bei $\sim 1279 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(-P=O)$) kann die Phosphorylgruppe identifiziert werden.^[296] Die im IR-Spektrum von PETMP prägnante Bande bei $\sim 1728 \text{ cm}^{-1}$ ist der $\nu(-C=O)$ der Esterfunktion zuzuordnen. Diese (-C=O)-Valenzschwingung ist auch im IR-Spektrum des Hydrogels unter leichter Verschiebung bei $\sim 1736 \text{ cm}^{-1}$ zu finden und deutet die Vernetzung von PETMP und $P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE})$ an.

Letztlich basiert die Synthese des Hydrogels auf der Reaktion der Thiofunktion von PETMP und der Vinylgruppe von $P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE})$. Die Schwingungsbanden

dieser funktionellen Gruppen ($\nu(=CH)$: 3150 - 3000 cm^{-1} , $\nu(C=C)$: 1690 - 1635 cm^{-1}) sind aufgrund der Dominanz des Poly(ethylenglykol)-Backbone nicht eindeutig zu erkennen. Das geringe Verhältnis von vernetzenden funktionellen Gruppen zu Poly(ethylenglykol)-Backbone in Kombination mit intensitätsschwachen Schwingungsbanden ($\nu(-S-H)$: 2600 – 2550 cm^{-1}) erlaubt keine eindeutige Aussage bezüglich einer vollständigen Vernetzung anhand des FTIR-Spektrums. Zur weiteren Analyse wurde das gefriergetrocknete (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Hydrogel in DMSO-*d*₆ gequollen und mit ¹H-NMR Spektroskopie untersucht (Abb. 4-2 (a)). Das ¹H-NMR-Spektrum des Hydrogels belegt die erfolgreiche Vernetzung des Hydrogels über Thiol-en-Klick Photopolymerisation. Weder die die Protonen der Allylgruppen von (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) im Bereich von 5-6 ppm noch die –SH-Funktion von PETMP bei 1,5 ppm zeigen ein Signal. Folglich kann von einer vollständigen Vernetzung ausgegangen werden.

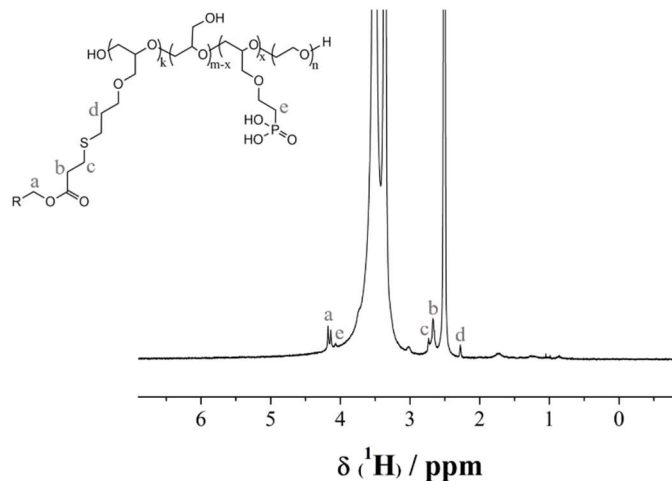


Abb. 4 - 2 Charakterisierung des (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Hydrogels mittels ¹H-NMR-Spektroskopie. Die Auswertung wurde durch Dr. Olga Linker aus der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Holger Frey am Departement Chemie durchgeführt.

Zur potentiellen Anwendung der Hydrogele als Nanokomposit-Materialien zur Knochenregeneration wurden mit Vaterit beladene Hydrogele mit einem Gehalt von 1% bis 2,5% (w/v) Vaterit hergestellt. Die Vaterit-inkorporierten Gele zeigen neben den Schwingungsbanden des Hydrogels die charakteristischen Schwingungsmoden des Vaterit ($\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$: 1410 cm^{-1} , $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$: 876 cm^{-1} , $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$: 743 cm^{-1}). Die Überlagerung der CH₂-Deformationsschwingung ($\delta(-\text{CH}_2)$: ~1465 cm^{-1}) und der asymmetrischen C-O-Streckschwingung ($\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$: 1493, 1412 cm^{-1}) resultiert in einer breiten Banden im Bereich von 1557 cm^{-1} bis 1376 cm^{-1} (Abb. 4-3).

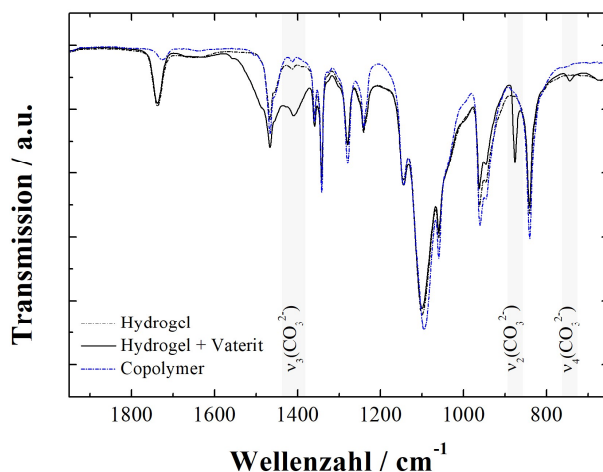
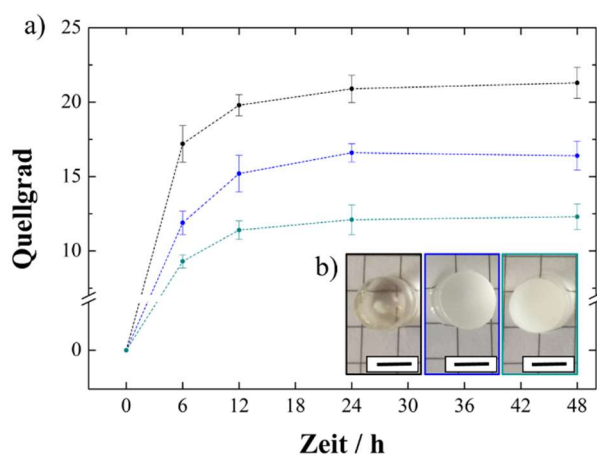


Abb. 4 - 3 FTIR-Spektrum der (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele ohne und mit Vaterit.

Durch UV-initiierte Thiol-en Klickreaktion werden formstabile, homogene Hydrogele erhalten. Abb. 4-4 (b) zeigt digitale Aufnahmen der synthetisierten (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Hydrogele ohne und mit Vaterit. Im Vergleich zu den Hydrogel ohne Vaterit (farblos, klar) zeigen die mit Vaterit beladenen Hydrogele eine zunehmende Trübung mit steigendem Vateritanteil.



Tab. 4-1 Mittelwerte und Standardabweichung des Quellgrades Q der Hydrogele in SBF über einen Inkubationszeitraum von 48 h.

Quellzeit t	Quellgrad Q		
	+ 0% (w/v) Vaterit	+ 1% (w/v) Vaterit	+ 2,5% (w/v) Vaterit
6 h	17,2 ± 1,2	11,9 ± 0,8	9,3 ± 0,4
12 h	19,8 ± 0,7	15,2 ± 1,2	11,4 ± 0,6
24 h	20,9 ± 0,9	16,6 ± 0,6	12,1 ± 1,1
48 h	21,3 ± 1,0	16,4 ± 0,9	12,3 ± 0,8

Abb. 4 - 4 a) Bestimmung des Quellgrades Q der (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Hydrogele ohne und mit Vaterit in SBF über einen Inkubationszeitraum von 48 Stunden. Graphische Darstellung. b) digitale Aufnahmen der (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Hydrogele ohne und mit Vaterit direkt nach der Synthese. Skala: 0,5 cm.

Im Hinblick auf die Anwendbarkeit des Nanokomposit-Materials als Biomaterial, muss u.a. die Diffusion von Nähr- und Abfallstoffen innerhalb des Nanokomposites und im Austausch mit der Umgebung gewährleistet sein. Neben einer interkonnetiven Porösität stellen die Hydratationseigenschaften des Nanokomposites einen entscheidenden Faktor im Hinblick auf den Stoffaustausch dar.^[297] Aus diesem Grund ist das Quellverhalten von Hydrogelen und Hydrogel-Mineral-Kompositen eine wichtige Eigenschaft zur Untersuchung der Wasseraufnahmekapazität und der Stoffdiffusion. Zur Bestimmung des Quellverhaltens

wurden der Quellgrad Q der Hydrogele ohne und mit Vaterit untersucht. Hierzu wurden die Hydrogele in SBF inkubiert und die Massendifferenz in Abhängigkeit der Inkubationszeit gravimetrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in in Tab. 4-1 zusammengefasst und in Abb. 4-4 graphisch dargestellt. Bei allen Proben ist nach einer Quellzeit von 12 Stunden keine signifikante Änderung des Quellgrades zu beobachten. Der Zustand der maximalen Quellung (Gleichgewichtsquellzustand) wird demnach innerhalb eines Zeitraumes von 12 Stunden erreicht. Mit zunehmendem Anteil an Vaterit ist tendenziell eine verminderte Quellung im Vergleich zu $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-}P(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ Hydrogel ohne Vaterit festzustellen. Im Allgemeinen resultiert die Adsorption von Wassermolekülen an das Polymernetzwerk (primär gebundenes Wasser) in einer ersten Ausdehnung des Netzwerkes und führt über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Bindung weitere Wassermoleküle (sekundär gebundenes Wasser). Anschließende Wassereinlagerungen werden osmotisch gesteuert und führen letztlich zum Gleichgewichtsquellzustand. Eine mögliche Interaktion des Polymernetzwerkes mit den Vaterit Nanopartikel und die damit verbundene limitierte Flexibilität der Polymerketten resultiert in einer verminderten Wasseraufnahmekapazität. Dabei spielen sowohl van der Waals als auch Coulomb Wechselwirkungen zwischen Vaterit Nanopartikel, Polymerketten und der in Lösung enthaltenen Ionen eine Rolle.

Wie bereits erwähnt ist eine interkonnektive Porösität des Hydrogels von zentraler Bedeutung für die Nährstoffperfusion, die Zellinfiltration sowie Neovaskularisierungsmechanismen, und ist somit der limitierende Faktor für eine mögliche Osseointegration des Transplantatmaterials.^[298-300] Zur Untersuchung der Porösität wurden die gefriergetrockneten $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-}P(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ Gele mit und ohne Vaterit mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) auf ihre Morphologie und Porenstruktur untersucht (Abb. 4-5). Obwohl die Porenstruktur der Hydrogele durch die Gefriertrocknung kollabieren kann, bestätigen die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine anhaltend hochporöse Struktur mit einer Porengröße im Bereich von $15\ \mu\text{m} - 92\ \mu\text{m}$ der Hydrogele ohne Vaterit und $21\ \mu\text{m} - 134\ \mu\text{m}$ der Vaterit-inkorporierten Hydrogele. Hinsichtlich der optimalen Porengröße von Biomaterialien zur Anwendung im *Tissue Engineering* von Knochen existieren in der Literatur verschiedene Berichte über Leitgerüste mit einer mittleren Porengröße von $20\ \mu\text{m}$ bis $1500\ \mu\text{m}$.^[301-305] In Abb. 4-5 (b) sind zusätzlich ellipsoide Vaterit-Nanopartikel auf der Hydrogelmatrix zu erkennen.

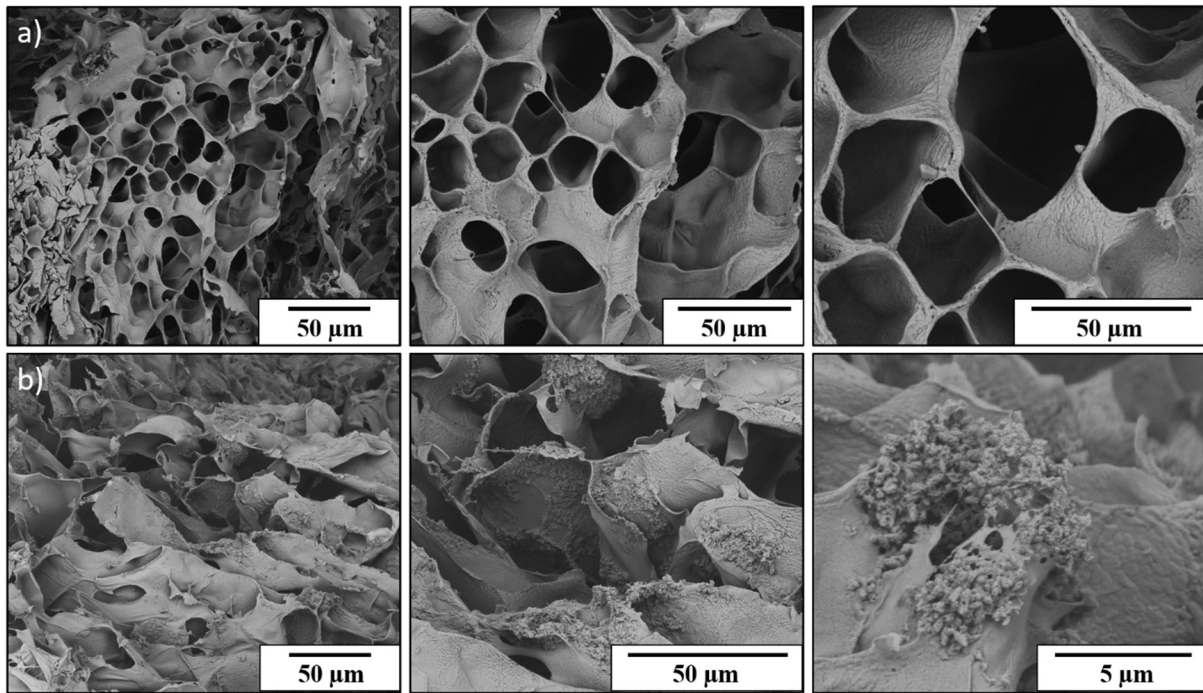


Abb. 4 - 5 REM-Aufnahmen der synthetisierten $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ Hydrogele im gefriergetrockneten Zustand unmittelbar nach der Synthese. a) $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ Hydrogel, b) $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ Hydrogel mit 2,5% (w/v) Vaterit.

Im Hinblick auf das Anwendungsziel der Knochenregeneration wurde die Mineralisierung der $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ Hydrogele und des Nanokomposites in SBF untersucht. In einem ersten Experiment wurde die Umsetzung von Vaterit in eine knochenähnliche Apatitspezies innerhalb der Hydrogelmatrix analysiert. Zusätzlich wurde in einem separaten Experiment der Einfluss der Phosphorylgruppen der PEG-Einheit in der Gelstruktur betrachtet. Hierzu wurden die Hydrogele bei 37°C unter konstantem Schütteln über einen Zeitraum von 14 Tagen in SBF inkubiert. Anschließend wurden die Hydrogele aufgearbeitet und lyophilisiert. Die gefriergetrockneten Proben wurden mittels REM-Aufnahmen auf morphologische Veränderungen geprüft (Abb. 4-6). Die mikroskopischen Aufnahmen der Vaterit beladenen Hydrogele zeigen eine deutliche Veränderung der Mineralphase im Hinblick auf die Morphologie. Statt der wie in Abb. 4-5 (b) gezeigten elliptischen Vaterit Nanopartikel können innerhalb der Hydrogelmatrix plättchenförmige Strukturen beobachtet werden, die stark aggregieren. In Kapitel 3 wurde die Umsetzung von Vaterit Nanopartikel in eine Apatitphase bereits ausführlich diskutiert. Die mineralische Phase innerhalb des Hydrogels weist eine vergleichbare Morphologie zur entstanden Apatitphase in Kapitel 3 auf. Letztlich kann davon ausgegangen werden, dass die $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ Hydrogelmatrix die Umsetzung des metastabilen Vaterit nicht wesentlich beeinflusst. Zusätzlich wurde eine Elementaranalyse durch energiedispersive Röntenspektroskopie (EDX) am Rasterelektronenmikroskop durchgeführt

(Abb. 4-7). Die EDX-Daten zeigen das Vorhandensein von Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Calcium (Ca) und Phosphor (P). Die Detektion von Silber (Ag) ist auf die Probenpräparation zurückzuführen (Abschnitt 4.2). Die Quantifizierung ergibt ein Ca:P - Verhältnis von 1,53. (Ca:P in HA - 10:6).

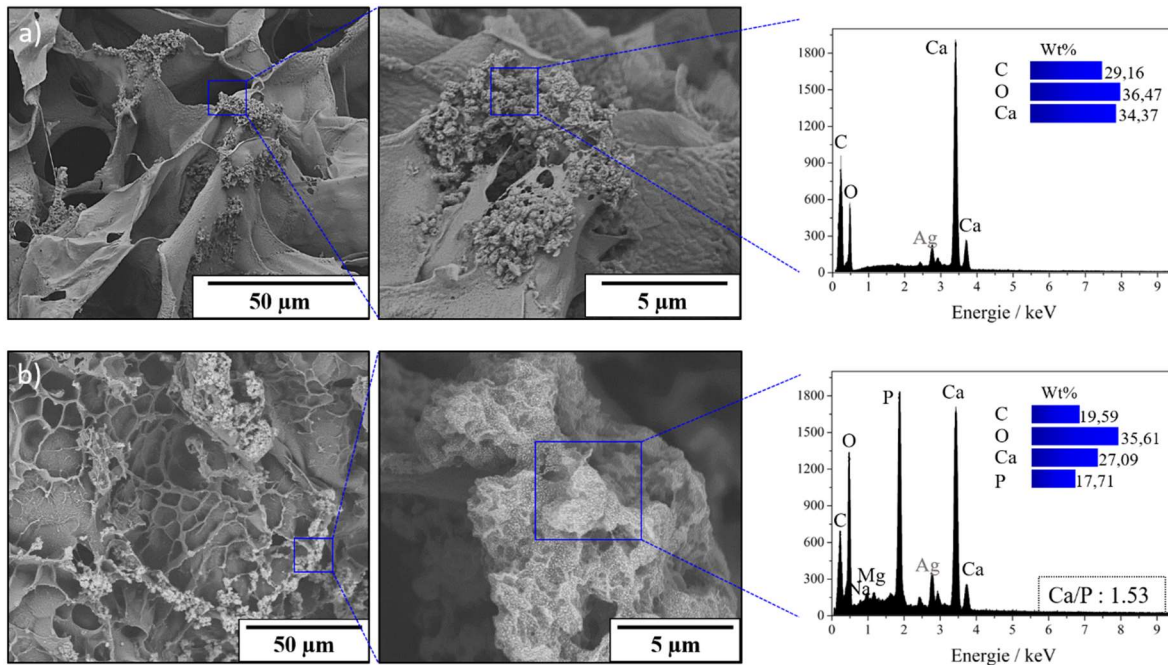


Abb. 4 - 6 REM-EDX Analyse der mineralischen Phase nach 14d Inkubation in SBF (b), ausgehend von (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Hydrogelmatrix mit 2,5% (w/v) Vaterit (a).

Zusätzlich wurden die inkubierten Materialien mittels ATR-FTIR-Spektroskopie (Abb. 4-7) und Röntgenpulverdiffraktometrie XRPD (Abb. 4-8) analysiert. Die FTIR-Spektren der inkubierten Komposite zeigen eine stetige Abnahme der Intensität der Carbonatschwingungsbanden ($\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$: 1410 cm^{-1} , $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$: 876 cm^{-1} , $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$: 743 cm^{-1}). Zusätzlich ist eine Schwingungsbande bei 1026 cm^{-1} zu erkennen, deren Intensität mit zunehmender Inkubationsdauer steigt. Die Schwingungsbande bei 1026 cm^{-1} entspricht der dreifach entarteten asymmetrischen $\nu(\text{P-O})$ Streckschwingung. Die Verschiebung des Maximums zu höheren Wellenzahlen zeigt eine zunehmende Kristallinität der Apatitphase an. Gemäß Ostwald-Vollmer nukleiert bei ausreichender Übersättigung zunächst amorphes Calciumphosphat, das anschließend als kristalliner Apatit rekristallisiert.

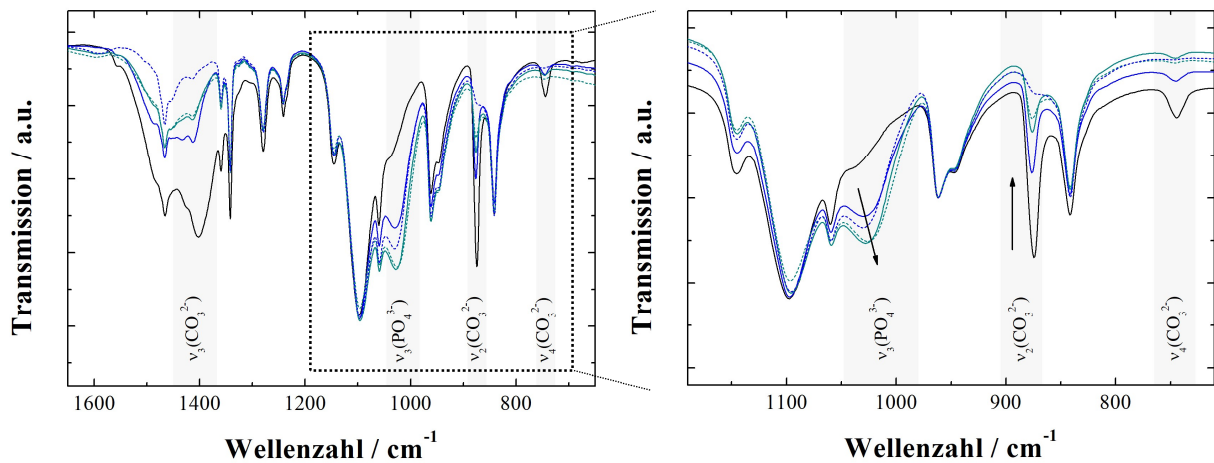


Abb. 4 - 7 FTIR-Spektren der in SBF inkubierten Vaterit-Hydrogel-Komposite nach unterschiedlicher Inkubationsdauer. — 0 Tage, — 3 Tage, 7 Tage, — 10 Tage, 14 Tage.

Auch im Pulverdiffraktogramm (Abb. 4-9) sind nach 14-tägiger Inkubation in SBF Reflexe zu erkennen, die den (002) und (211) Reflexen von HA zuzuordnen sind. Die für den Vaterit charakteristischen Reflexe sind, nach einer Inkubationsdauer von 14 Tagen, nicht mehr zu erkennen sind. In Kombination mit den Ergebnissen der FTIR-Spektroskopie kann davon ausgegangen werden, dass eine vollständige Umsetzung der Vaterit Nanopartikel innerhalb der Hydrogelmatrix in einem Zeitraum von 14 Tagen durch Inkubation in SBF erfolgt. Die Reflexe im Pulverdiffraktogramm des (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogels zeigen die kristallinen Domänen des Polymers. Polymere sind im Allgemeinen amorph oder teilkristallin. Starke Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sowie die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen den Ketten führen zu teilkristallinen Polymeren mit einer Ordnung in bestimmten Domänen. Zusätzlich können lokale Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung die Ausbildung von Überstrukturen induzieren.^[306–308]

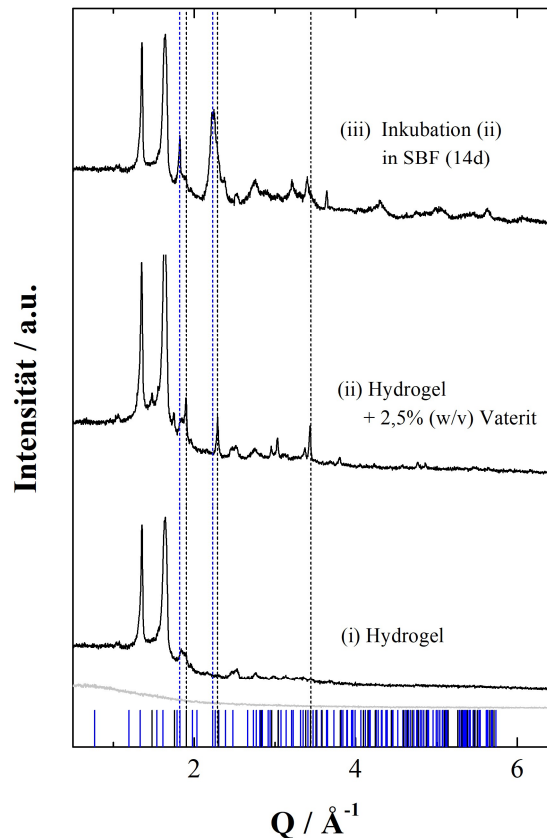


Abb. 4 - 8 Diffraktogramme des synthetisierten $(P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE}))$ -Hydrogels (i) , des synthetisierten $(P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE}))$ -Hydrogels mit 2,5% (w/v) Vaterit (ii) und des synthetisierten $(P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE}))$ -Hydrogels mit 2,5% (w/v) Vaterit nach 14tägiger Inkubation in SBF (iii). Reflexprofil der Referenzreflexe von $HA^{[309]}$ (blau) und $Vaterit^{[64]}$ (schwarz).

Zusätzlich zur Inkubation des synthetisierten Vaterit-beladenen $(P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE}))$ -Hydrogels wurden $(P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE}))$ -Hydrogel ohne Vaterit unter gleichbleibenden Bedingungen in SBF inkubiert. Aufgrund der Phosphonylierung des PEG-Polymers stellt das $(P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-P(G^{PE-co-AGE}))$ -basierte Hydrogel eine mögliche biomineralisierende Matrix dar, angetrieben durch die Affinität der Phosphorylgruppe zu Ca^{2+} oder anderen in SBF gelösten Ionen. Hierzu wurde das Hydrogel ohne Vaterit für 14 Tage in SBF inkubiert und anschließend mittels FTIR-Spektroskopie und SEM-EDX analysiert. Das zuvor farblose, klare Gel zeigt nach der Inkubation eine deutliche Trübung. Die FTIR-Analyse (Abb. 4-9 (links)) zeigt eine Phosphat-Schwingungsbande bei 1024 cm^{-1} , vergleichbar mit Vaterit-beladenen Hydrogelen nach 14-tägiger Inkubation, und bestätigt die Nukleation von phosphathaltigen Mineral. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. 4-9 (rechts)) zeigen plättchenförmige Strukturen an der Oberfläche der Hydrogel-Matrix. Die Elementaranalyse ergibt ein Ca : P Verhältnis von 1,64 (Ca:P in HaP 10:6). Es kann vermutet werden, dass die Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen durch die Phosphorylgruppen von $(P(G^{PE-co-AGE})-b-PEG-b-$

P(G^{PE}-co-AGE) zu einer lokal hohen Übersättigung und somit zur Nukleation von CaP führt. Es kann gezeigt werden, dass (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)), ähnlich wie Kollagen, die Nukleation von CaP steuern kann, indem die negativ geladene Phosphorylgruppen als Nukleationsstellen für die Apatitbildung fungieren.

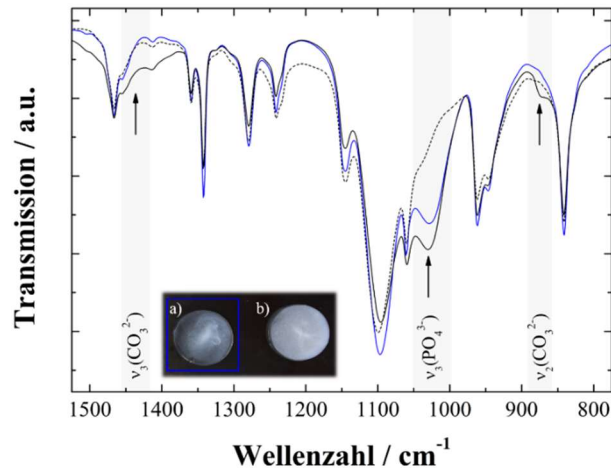


Abb. 4 - 9 FTIR-Spektrum der synthetisierten (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele nach 14-tägiger Inkubation in SBF. schwarz (---): (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel direkt nach der Synthese, schwarz: (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel mit 2,5% (w/v) Vaterit nach 14 Tagen Inkubation in SBF, blau: (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel ohne Vaterit nach 14 Tagen Inkubation in SBF. Inset: optische Aufnahmen der inkubierten Hydrogele. a) : (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel ohne Vaterit, b) (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel mit 2,5% (w/v) Vaterit .

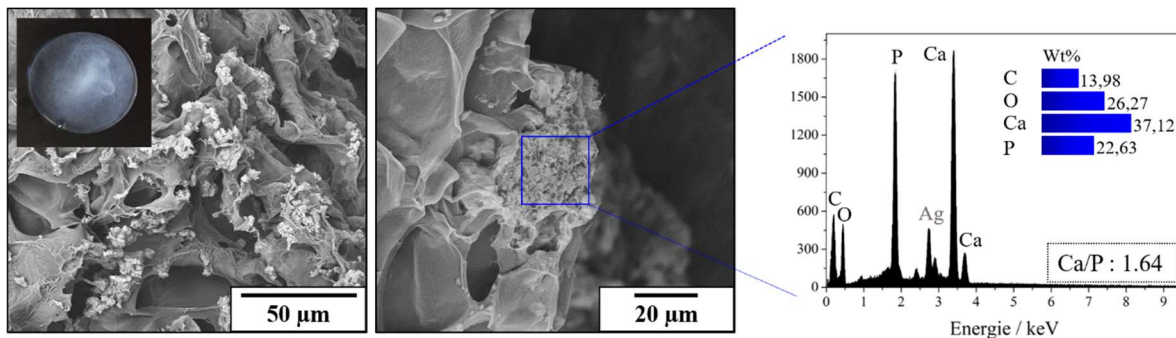


Abb. 4 - 10 REM-Aufnahmen und REM-EDX Analyse der mineralischen Phase nach 14d Inkubation in SBF, ausgehend von (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogelmatrix ohne Vaterit.

Diese Annahme wird zusätzlich durch die XPS-Analyse gestützt. Das Spektrum des (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel vor der Inkubation in SBF zeigt wie erwartet einen C 1s und O 1s Peak. Nach 14-tägiger Inkubation in SBF können zudem hochauflösende Ca 2p und P 2p-Signale detektiert werden. Es kann angenommen werden, dass in den frühen Phasen der Inkubation Ca²⁺-Ionen durch die Phosphoryl- oder Hydroxylgruppen des Polymers komplexiert werden und so die Keimbildung der Apatitphase an der Hydrogelmatrix erleichtern.

Abb. 4 - 11 XPS-Spektrum der (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogelmatrix ohne Vaterit. a) vor der Inkubation ins SBF, b) nach 14-tägiger Inkubation in SBF.

In einem weiteren Experiment wurde die Mineralisierung der (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele und des Nanokomposit-Materials in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM, s. Abschnitt 4.2) untersucht. Ausgehend von Minimum Essential Medium Alpha (MEM α) wurden 10% FBS und Stimulationen wie beispielsweise β -Glycerolphosphat zugegeben. Die ionische Zusammensetzung von MEM α und SBF sind vergleichbar. Folglich können Kenntnisse erworben werden, die die Mineralisierung der Hydrogele in Anwesenheit von Proteinen, Aminosäuren und Vitaminen (enthalten in MEM α) beschreiben. Eine zusätzliche Komplexierung von Ca²⁺ durch funktionelle Gruppen der in MEM α enthaltenen Proteine und Nährstoffe kann den Auflösungs- und Rekristallisationsprozess des Vaterit innerhalb der Hydrogelmatrix beeinflussen. Zusätzlich wurde die Mineralisierung der Hydrogele unter gleichbleibenden Bedingungen in Anwesenheit primärer Osteoblasten (pOB) untersucht. Die sukzessive Anpassung des Inkubationsmediums ausgehend von einer proteinfreien, azellulären Umgebung (SBF) über eine proteinhaltige, nährstoffreiche Umgebung (ODM) hin zu einer proteinhaltigen, zellulären Umgebung (ODM + pOB) ähnlich *in vivo*, ermöglicht ein umfangreiches Verständnis hinsichtlich des Einflusses dieser zusätzlichen Faktoren und erlaubt Rückschlüsse bezüglich des chemischen Verhaltens des Materials *in vivo*. Hierzu wurden die Hydrogele im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit über einen Zeitraum von 21 Tagen in ODM inkubiert. Die Hydrogele wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (7 Tage, 14 Tage, 21 Tage) mittels FTIR-Spektroskopie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-12 zusammengefasst und gegenübergestellt.

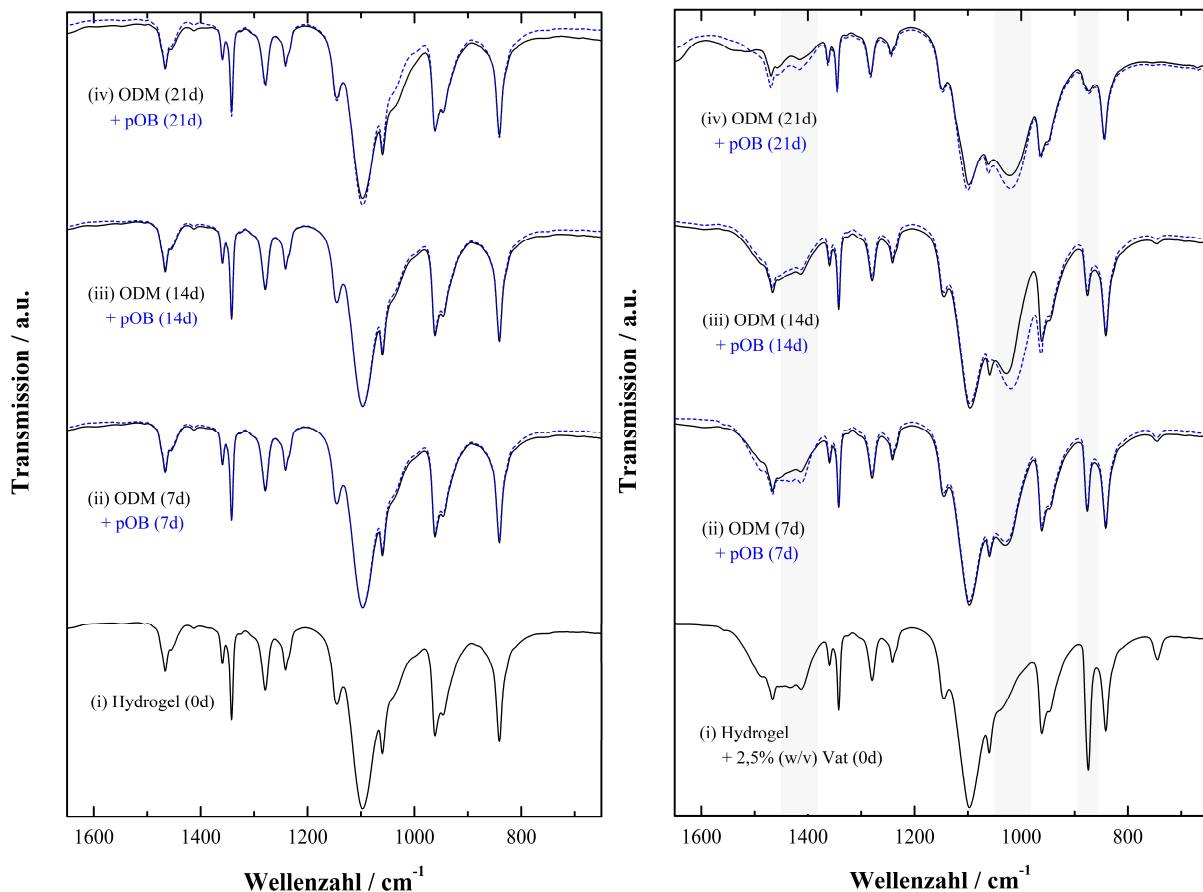


Abb. 4 - 12 FTIR-Spektren der $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-}P(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ -Hydrogele ohne Vaterit (links) und mit 2,5% (w/v) Vaterit (rechts). Schwarz: Inkubation in ODM, blau: Inkubation in ODM in Anwesenheit von pOB.

Die FTIR-Spektren der $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-}P(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ -Hydrogele ohne Vaterit (links) zeigen über den gesamten Inkubationszeitraum von 21 Tagen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der pOB keine Veränderung des Bandenmusters. Auch im Vergleich zu dem IR-Spektrum des $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-}P(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ -Hydrogels vor der Inkubation sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Trotz der ähnlichen Ionenstärke von ODM und SBF konnte keine Mineralisierung des Hydrogels durch Inkubation in ODM nachgewiesen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die funktionellen Gruppen der Proteine und Aminosäuren in ODM mit den Phosphorylgruppen von $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-}P(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ um die Ca^{2+} -Komplexierung konkurrieren, sodass die lokale Übersättigung innerhalb des Hydrogels nicht ausreicht, um eine Nukleation von CaP an den Phosphorylgruppen des Gels zu initiieren.

Im Gegensatz zu den $(P(G^{PE}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-}P(G^{PE}\text{-co-AGE}))$ -Hydrogele ohne Vaterit, zeigen die Vaterit-beladene Hydrogele (rechts) ähnlich der SBF-Inkubation eine Schwingungsbande bei 1024 cm^{-1} bzw. 1026 cm^{-1} , deren Intensität mit zunehmender Inkubationszeit steigt. Gleichzeitig ist eine Abnahme der Intensität der Carbonatschwingungsbanden ($\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$: 1410 cm^{-1} , $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$: 876 cm^{-1} , $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$: 743 cm^{-1})

zu beobachten. Die Inkubation der Vaterit-haltigen Hydrogele in SBF zeigt eine vollständige Umsetzung der Vaterit Nanopartikel innerhalb von 14 Tagen an (Abb. 4-7). Im Vergleich dazu, führt die Inkubation in ODM zu einer zeitlich verzögerten Bildung der Apatitphase unter vollständiger Auflösung der Vaterit Nanopartikel. Die verlangsamte Umsetzung kann, wie in Kapitel 3 nachgewiesen, auf die Ausbildung einer Proteincorona durch Adhäsion der in ODM enthaltenen Proteine an die positiv geladene Oberfläche der Vaterit Nanopartikel zurückgeführt werden. Je nach Ausmaß wird der Auflösungsprozess der Vaterit Partikel verlangsamt. Zusätzlich kann die Rekristallisation aufgrund der Komplexierung der frei werdenden Ca^{2+} durch in ODM enthaltene Proteine und Nährstoffe beeinflusst werden. Weiterhin ist zu beobachten, dass in Anwesenheit der pOB die Intensität der Phosphatschwingungsbande bei 1024 cm^{-1} ab einem Inkubationszeitraum von 14 Tagen stärker zunimmt. Die Intensität der Carbonatschwingungsbande bei 876 cm^{-1} bleibt unabhängig von pOB innerhalb eines Zeitraumes konstant. In Abb. 4-13 ist das Ionenverhältnis von Phosphat und Carbonat in An- und Abwesenheit der pOB graphisch dargestellt. Hierzu wurde über Lambert-Beer die Absorption berechnet und der Quotient der maximalen Intensität der $\nu(\text{PO}_4^{3-})$ bei 1024 cm^{-1} und der $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ bei 876 cm^{-1} gebildet.

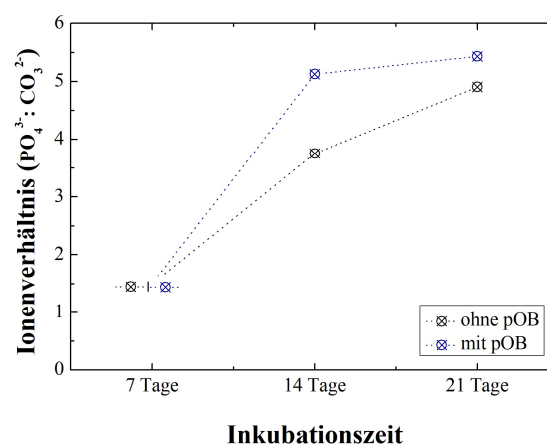


Abb. 4 - 13 Graphische Darstellung des Ionenverhältnisses $\text{PO}_4^{3-} : \text{CO}_3^{2-}$ der Vaterit-beladenen Hydrogele nach 7 Tagen, 14 Tagen, 21 Tagen. Schwarz: Inkubation in ODM ohne pOB, blau: Inkubation in ODM in Anwesenheit von pOB.

Die graphische Darstellung des Ionenverhältnisses verdeutlicht die Zunahme der Intensität der Phosphatschwingungsbande nach 14 Tagen in Anwesenheit von pOB. Eine zunehmende Mineralisierung ausgehend von den Phosphorylgruppen der Hydrogelmatrix und Nukleation von CaP kann anhand der Ergebnisse in Abb. 4-12 (links) ausgeschlossen werden. Letztlich kann vermutet werden, dass die Differenzierung der pOB eine zusätzliche Mineralisierung bewirkt. Nach dem Modell von Owen *et al.*^[109] zur Differenzierung von pOB (Kapitel 1, Abschnitt 1.5.3.), exprimieren differenzierende Osteoblasten sequenziell knochenspezifische

Proteine. Die maximale Expression der alkalischen Phosphatase findet nach diesem Modell innerhalb einer Kultivierungsdauer von 12 bis 18 Tagen statt. Die alkalische Phosphatase reguliert die Bereitstellung von Phosphat-Ionen zur Knochenmineralsierung, indem sie die hydrolytische Dephospholierung von Phosphorsäureester (z.B. in Proteinen, Nukleotiden) katalysiert. *In vivo* führt die Aktivität der ALP zu einer lokalen Freisetzung von Phosphat und initiiert, im Zusammenhang mit der hohen Calcium-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit, die heterogene Keimbildung und das Wachstum des Knochenminerals. Douglas *et al.*^[251] konnten zeigen, dass ALP-inkorporierte Hydrogele in Anwesenheit von Calcium und Glycerolphosphat in Lösung eine verstärkte Calciumphosphat-Mineralisierung aufweisen. Dabei dient das Glycerolphosphat als Substrat für die ALP. Auch in unserem Experiment wurde ODM β -Glycerolphosphat als Di-Natrium-Salz zugegeben. Es ist demnach durchaus denkbar, dass durch die Expression der ALP durch pOB zusätzliche Phosphat-Ionen generiert werden, die eine verstärkte Nukleation von CaP initiieren.

4.3.2. Hydrogele aus phosphonylierten Polyether-Triblock-Copolymeren – *in vitro* Studien

E-Selektin Expression durch HUVEC

Als Grundvoraussetzung zur klinischen Anwendung von Biomaterialien ist neben der Sterilität des Materials auch das Vorkommen von Endotoxin zu prüfen. Dabei wird die Sterilität der (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele durch die UV-Behandlung zur Synthese gewährleistet. Neben lebenden Organismen können aber auch bakterielle Endotoxine entzündlich und oxidative Reaktionen hervorrufen, die lokale und systemisch pathologische Zustände verursachen können. Um die Sicherheit der potentiellen Nanokomposit-Transplante zu prüfen, wurde das verwendete Makromonomer (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) auf Endotoxin geprüft. Wie in Abschnitt 4.2.6. beschrieben werden zum Nachweis von Endotoxin primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) verwendet. HUVEC exprimieren in Gegenwart von Endotoxin ein membrangebundenes Glykoprotein (E-Selektin), das letztlich über Antikörper-basierte Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden kann. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 4-14 zusammengefasst.

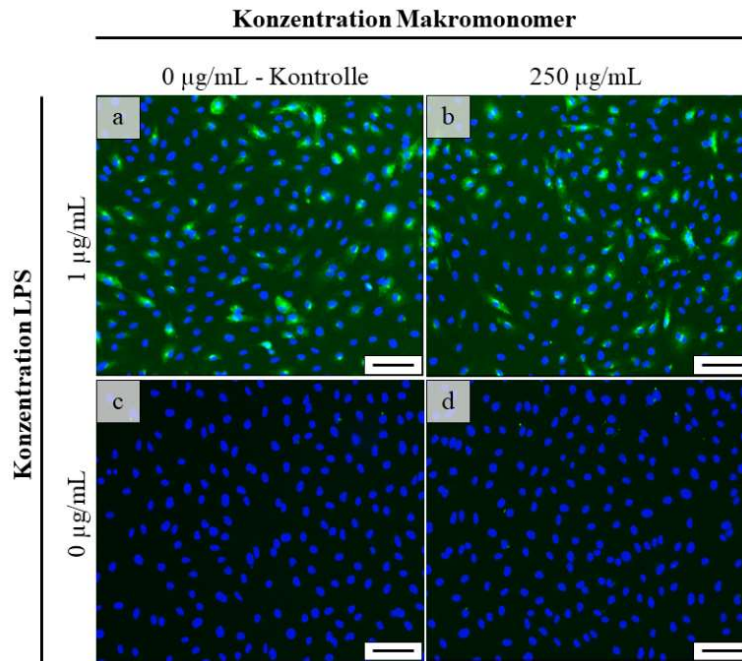


Abb. 4 - 14 Antikörper-basierte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von E-Selektin. Getestet an primären Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). (a) pos. Kontrolle, (b) pos. Kontrolle mit 250 $\mu\text{g/mL}$ (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)), (c) neg. Kontrolle, (d) 250 $\mu\text{g/mL}$ (P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)). Skala: 100 μm .

Als Versuchskontrolle wurde je eine Positiv-Kontrolle für unbehandelte Zellen (a) als auch für mit Makromonomer-behandelte Zellen (b) mitgeführt. Die Expression von E-Selektin wurde in beiden Positiv-Kontrollen mit Lipopolysaccharid (LPS, 1 $\mu\text{g/mL}$) stimuliert und mittels Antikörper-Färbung detektiert. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Spezifität und um mögliche individuelle Fehlerquellen auszuschließen, wurde eine Negativ-Kontrolle (unbehandelte Zellen, keine LPS Stimulation, (c)) mitgeführt. Die Aufnahme der mit Makromonomer behandelten Zellen (d) stimmt mit der negativ-Kontrolle überein. Es kann kein E-Selektin detektiert werden, sodass davon auszugehen ist, dass von dem Material keine proinflammatorischen Effekte ausgehen. Auch die Expression von E-Selektin der Positiv-Kontrollen sind vergleichbar und somit unabhängig von der Exposition mit Makromonomer. Zusätzlich konnten die Zellkerne in allen Proben in einem vergleichbaren Ausmaß mittels Höchst Dye angefärbt werden und gelten somit als repräsentativ.

Zytotoxizität P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Makromonomer und Hydrogel

Um eine biomaterialinduzierte Toxizität ausschließen zu können, wurde die Stoffwechselaktivität der MG63 in Anwesenheit unterschiedlicher P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Konzentrationen sowie des Hydrogels mittels sich ergänzender *in vitro* Testverfahren untersucht. Es wurde sowohl die metabolische Aktivität der Zellen (RES-Assay) als auch materialinduzierte Zellschädigungen (LDH-Assay) bedingt durch toxische Effekte

untersucht. Die ergänzenden Zytotoxizitätsstudien der verwendeten Vaterit Nanopartikel sind in Kapitel 2, Abschnitt 2.3.2 zu entnehmen. In Abb. 4-15 sind die Ergebnisse beider Testverfahren graphisch gegenübergestellt.

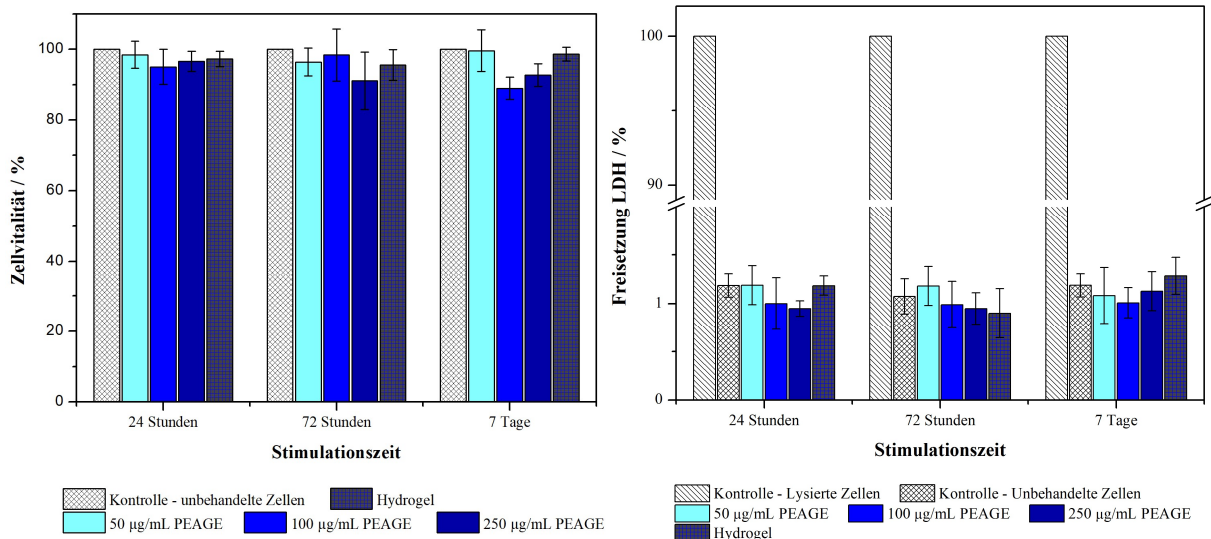


Abb. 4 - 15 Graphische Auswertung der Testverfahren zur Zytotoxizität. RES-Assay (links), LDH-Assay (rechts).

Mittels RES-Assay (Abb. 4-15 (links)) kann die zelluläre metabolische Aktivität detektiert werden. Somit erlaubt dieses Testverfahren Rückschlüsse auf die Vitalität der verwendeten Zellen nach Exposition mit P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) und des Hydrogels. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die gemessene Zellvitalität der unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt und wird als Referenz herangezogen. Die graphische Darstellung der Messwerte zeigt, dass über den gesamten Inkubationszeitraum von 7 Tagen in keiner der untersuchten Proben ein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu erkennen ist. Vom Material ausgehende zytotoxische Effekte würden in einer Reduktion der metabolischen Aktivität resultieren und sind somit auszuschließen. Als ergänzendes Testverfahren wurde ein LDH-Assay unter mit konstanten Versuchsparametern (Konzentration, Inkubationszeitraum) durchgeführt. Es wurden unbehandelte Zellen (Negativ-Kontrolle) als auch lysierte Zellen (Positiv-Kontrolle) als Referenzwerte mitgeführt. Innerhalb des Inkubationszeitraumes von bis zu 7 Tagen konnte bei allen getesteten Konzentrationen des Makromonomers sowie des Hydrogels kein signifikanter Unterschied in der LDH-Freisetzung der MG63 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Die Kombination der beiden Testverfahren erlaubt Material-induzierte zytotoxische Effekte auszuschließen. Zu allen untersuchten Zeitpunkten und Konzentrationen kann von intakten, stoffwechselaktiven Zellen ausgegangen werden.

Zellbiokompatibilität der P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Makromonomer und des Hydrogels

Um die zellulären Wechselwirkungen und die allgemeine Gewebetoleranz der verwendeten Makromonomer und der synthetisierten Hydrogele zu untersuchen, wurden die entsprechenden Materialien mit gewebsspezifischer Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen inkubiert. Dabei wurde, mithilfe unbehandelter Zellen als Kontrolle, mögliche Veränderungen im Proliferationsverhalten und der Zellmorphologie in Verbindung mit den Materialien untersucht. Sowohl die osteoblastische Zelllinie (MG63) als auch primäre Endothelzellen (HUVEC) wurden mit P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Makromonomer unterschiedlicher Konzentrationen (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL) sowie dem synthetisierten Hydrogel über einen Zeitraum von 7 Tagen inkubiert. In den Abb. 4-16 bis 4-17 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zellen nach unterschiedlichen Expositionszeiten mit den Materialien repräsentativ zusammengestellt.

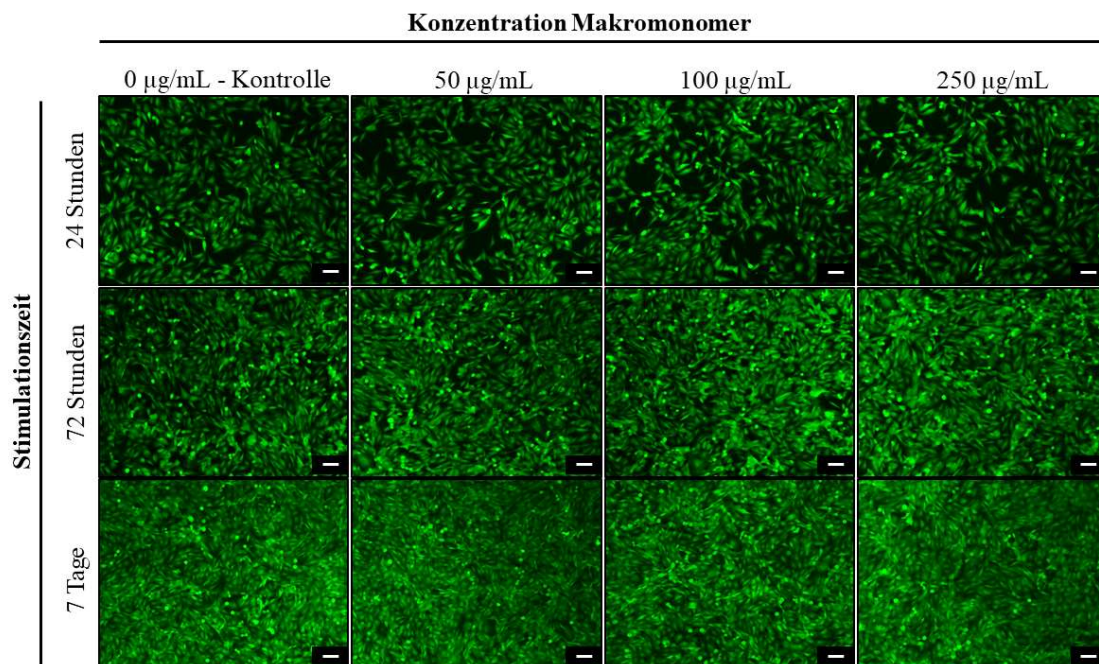


Abb. 4 - 16 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE), getestet an der osteoblastären Zelllinie (MG63). Vitale Zellen wurden mittels Calcein-AM angefärbt. Skala: 100 µm.

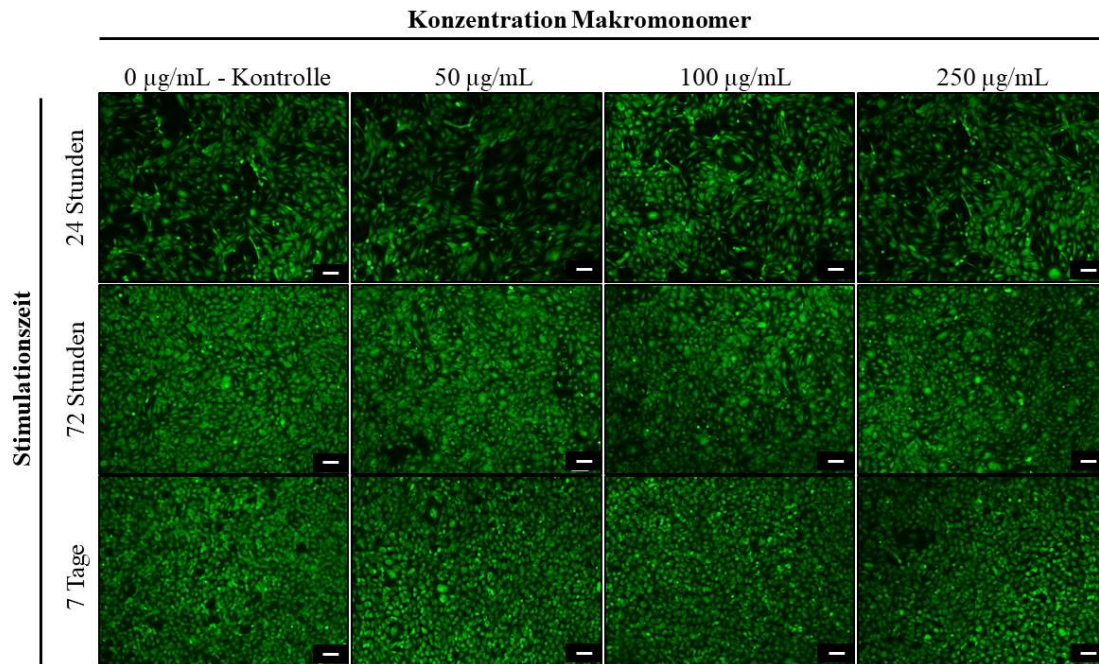


Abb. 4 - 17 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE), getestet an primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). Vitale Zellen wurden mittels Calcein-AM angefärbt. Skala: 100 µm.

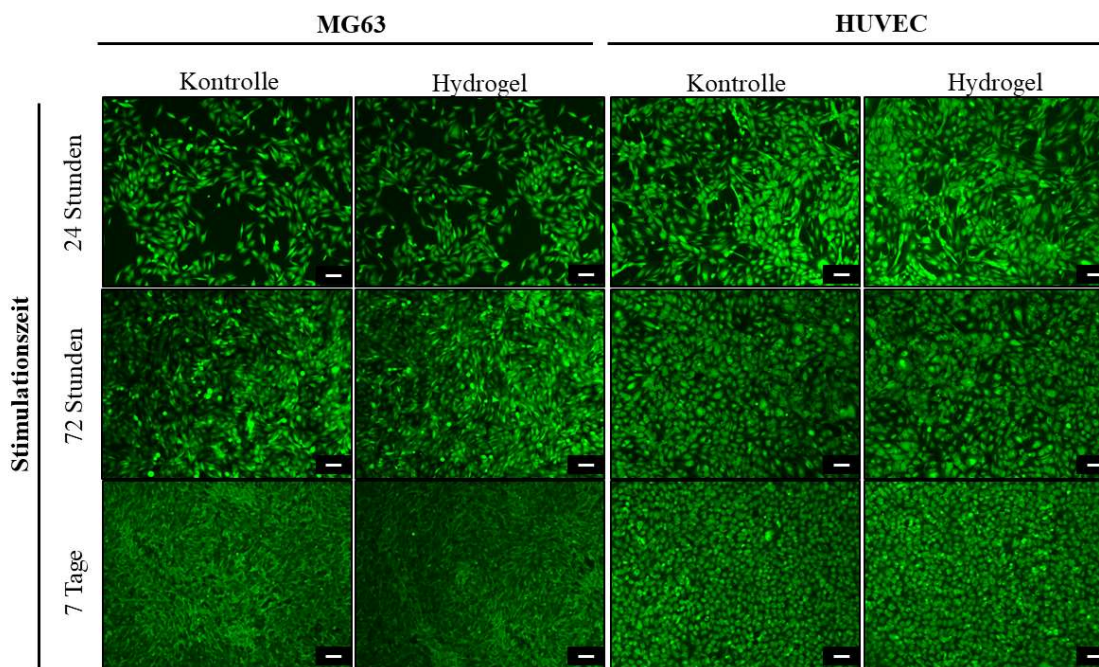


Abb. 4 - 18 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität des synthetisierten P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) - Hydrogel, getestet an der osteoblastären Zelllinie (MG63) und primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). Vitale Zellen wurden mittels Calcein-AM angefärbt. Skala: 100 µm

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen bei allen untersuchten Zellen, unabhängig von der P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Konzentration oder der Exposition mit dem synthetisierten Hydrogel eine vergleichbare Wachstumsverteilung und ähnliche Zellmorphologie wie die unbehandelten Zellen (Kontrolle). Biomaterialinduzierte Veränderungen des Proliferationsverhalten können demnach ausgeschlossen werden. Die

gewebespezifische Verträglichkeit der P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele legt in Kombination mit den Ergebnissen zur Pyrogenität und der Zytotoxizität den Grundstein für mögliche *in vivo* Untersuchungen und erlaubt eine positive Prognose hinsichtlich der vorgesehenen Anwendung als Implantatmaterial zur Knochenregeneration.

Zelladhärenz des P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel und des Vaterit-Hydrogel-Komposit

Um die Auswirkungen der matrixgebundenen Vaterit Nanopartikel auf die Zelladhäsion und Proliferation von Zellen im P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel zu untersuchen, wurden die synthetisierte Hydrogele unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell zerteilt, entsprechende Abschnitt 4.2 aufgearbeitet und gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Hydrogele für eine Stunde in einer Zellsuspension gequollen. Die gequollenen Gele wurden in eine 48-Well Zellkulturplatte überführt, mit Medium beschichtet und im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% für 7 Tage inkubiert. Die Zelladhärenz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nach 24 Stunden, 72 Stunden und 7 Tagen unter Zugabe des membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoffes Calcein-AM untersucht. In Abb. 4-19 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der Kontrolle sowie der Hydrogele zusammenfassend gegenübergestellt. Zur besseren Beurteilung des Proliferationsverhaltens der adhären Zellen wurde zusätzlich ein RES-Assay durchgeführt (Abb. 4-20). Diese Methode ermöglicht sowohl eine qualitative als auch quantitative Beurteilung des Wachstumsverhalten der inkorporierten Zellen.

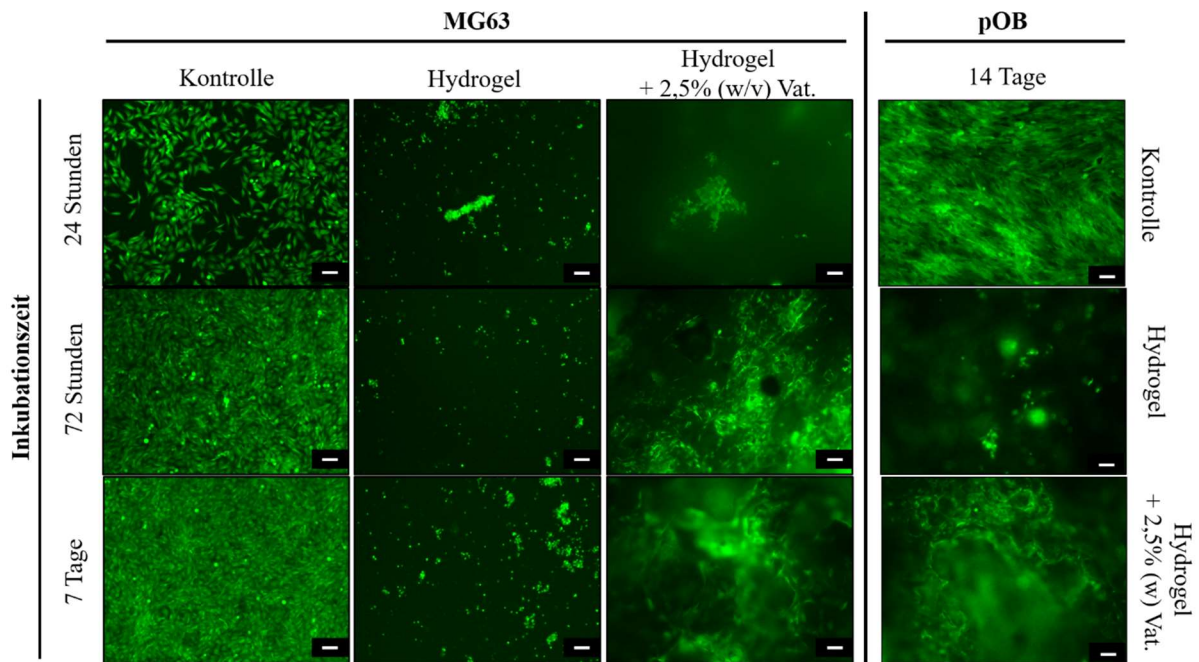


Abb. 4 - 19 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zelladhärenz und Viabilität von Zellen der Zelllinie MG63 sowie primären Osteoblasten pOB auf den P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel mit 2,5% (w/v) Vaterit und ohne Vaterit.

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden eine Versuchskontrolle unbehandelter Zellen mitgeführt, deren Wachstumsverhalten als Referenz dient. Die unbehandelten Zellen zeigen eine typische Zellmorphologie und gesundes Proliferationsverhalten bei zunehmender Inkubationszeit. Auf bzw. in den P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel ohne Vaterit sind lediglich wenige abgerundete Zellen zu erkennen, die auch mit zunehmender Inkubationszeit kein Wachstum oder Proliferation zeigen. Die P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogele, die mit 2,5% (w/v) Vaterit beladen wurden, zeigen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden vergleichbar wenig Zellen an der Hydrogeloberfläche. Die abgerundete Zellmorphologie sowie das verminderte Zellvolumen lässt auf eine nur geringe Adhärenz schließen. Auch mittels RES-Assay konnte kein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 24 Stunden detektiert werden. Jedoch kann mit zunehmender Kultivierungsdauer eine deutliche Zunahme der Zellzahl auf und innerhalb der Vaterit-beladenen Hydrogele nachgewiesen werden. Auch weisen die Zellen eine zunehmend adhärente Morphologie auf.

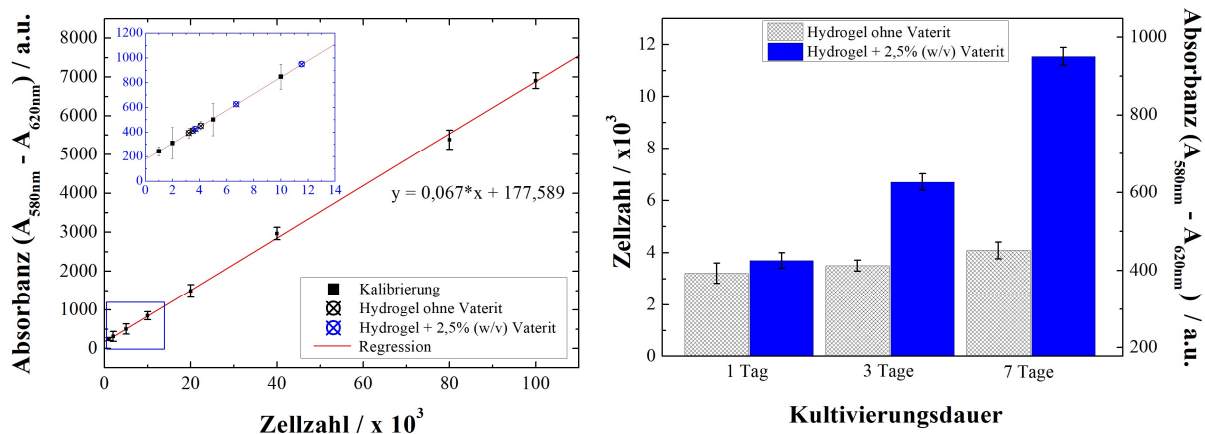


Abb. 4 - 20 RES-Assay zum Nachweis der Proliferation der MG63 auf bzw. innerhalb der Hydrogelmatrix. Externe Kalibrierung und Bestimmung der Zellzahl nach einer Kultivierung von 1 Tag, 3 Tagen und 7 Tagen. Die Fehlerintervalle der Kalibrierungsmessung und Probenmessung basieren auf der Messung von Triplikaten.

In Kapitel 2, Abschnitt 2.3.2. konnte anhand von Vaterit-Presslingen gezeigt werden, dass Vaterit Nanopartikel ein geeignetes Wachstumsmaterial für die osteoblastären Zellen der Zelllinie MG63 darstellt. Analog zu diesem Experiment, kann davon ausgegangen werden, dass die zelladhärenten Eigenschaften des Vaterit-Hydrogel-Komposites auf die Vaterit Nanopartikel innerhalb der Hydrogelmatrix zurückzuführen sind. Die verstärkte Adhärenz kann dabei auf die positive Oberflächennettoladung der Vaterit Nanopartikel (ζ -Potential, Kapitel 2, Abschnitt 2.3.2.) und somit auf eine mögliche Adsorption stark negativ geladener Matrixproteine (z.B. Hyaluronan) zurückgeführt werden. Zusätzlich ist bekannt, dass positiv geladene Oberflächen von Biomaterialien die Differenzierung von Osteoblasten und auch die Proliferation von Endothelzellen erhöhen.^[310–313] Zusätzlich ist zu beachten, dass die in P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) enthaltenen Phosphorylgruppen im Vergleich zu unfunktionalisierten PEG-basierten Polymeren zu einer Änderungen im Zetapotential führt.^[294] Die Änderungen des Zetapotentials können zur Verstärkung möglicher Wechselwirkungen mit dem Medium beitragen. Zwar konnte in ODM keine signifikante Mineralisierung des Gels beobachtet werden, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch die negative Ladung der Phosphorylgruppe verstärkt Ca²⁺ und PO₄³⁻-Ionen rekrutiert werden, und somit eine osteogen günstige Mirkoumgebung entsteht.

4.4. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel zeigen wir die Synthese von 10%igen P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogelen über eine UV-initiierte Thiol-en-Klickreaktion ausgehend von P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) Copolymer und PETMP. Durch die Kombination von P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) und PETMP sollte durch die saure Hydrolyse der Estergruppenspaltung sowie den langsamen oxidativen Abbau des PEG-Backbones mittels Etherspaltung eine vollständiger biologischer Abbau möglich sein.^[314,315] Zusätzlich kann durch Einbetten von Vaterit Nanopartikel in die Hydrogelmatrix ein Hydrogel-Nanokomposit mit potentieller Anwendung im Bereich Hartgeweberegeneration über eine einfache und sterile Synthese hergestellt werden. Das ausgeprägte Quellverhalten sowie die interkonnektive Porösität der P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel erlaubt den Stoffaustausch und ermöglicht die Umsetzung der Vaterit Nanopartikel in eine knochenähnliche Apatitspezies innerhalb der Hydrogelmatrix. Zudem garantieren diese Eigenschaften eine kontinuierliche Migration von Zellen, die Ausbildung von Blutgefäßen sowie eine zügige Osseointegration. In Anlehnung an Kapitel 3 können wir zeigen, dass das verwendete Hydrogel keinen Einfluss auf das Auflösungs- und Rekristallisationsprozess der Vaterit Nanopartikel zeigt und sich somit als geeignete Transportplattform auszeichnet. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die negativ-geladene Hydrogelmatrix durch die Komplexbildung von Ca²⁺-Ionen zu einer lokal hohen Übersättigung führt und die Nukleation von Apatit initiiert. Aufgrund der unterstützenden Funktion hinsichtlich des verstärkten Apatitwachstums und der so generierten osteofreundlichen Umgebung, können die Hydrogel-Nanokomposite zur *in situ* Knochenbildung eingesetzt werden. Erste Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Hydrogel-Nanokomposite die Differenzierung von primären Osteoblasten fördern und die Apatitbildung somit durch die Expression der ALP innerhalb der osteoblastären Differenzierung unterstützt wird. Um abschließend zu klären, ob die Kompositmaterialien einen osteoinduktiven Effekt bewirken, sollte die Expression der ALP mittels spezifischer Farbreaktion nachgewiesen werden. Neben der Funktion als Trägerplattform und biomineralisierender Matrix bieten die Phosphorylgruppe in P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogelen, aufgrund der inhärenten Fähigkeit des Phosphoratoms Triester zu bilden, die Möglichkeit zur zusätzlichen Funktionalisierung. Somit könnten bioaktive Substanzen zur Unterstützung der Osteogenese und Neovaskularisierung oder aber Wirkstoffen zur Einführung von bioaktiven Substanzen zur Unterstützung von Wundheilungsprozesse in Form von Antibiosen eingeführt werden. Diese strukturelle Vielfalt ermöglicht eine hohe Varianz der resultierenden Hydrogele mit unterschiedlichen Zielsetzungen. Obwohl PEG-basierte Materialien aufgrund der intrinsischen

Resistenz gegen Proteinadsorptionen und mangelnder Zelladhäsionssequenzen als biologisch inert gelten, konnten wir eine ausreichende Zelladhäsion und Proliferation von osteoblastären Zellen (MG63, pOB) auf den Hydrogel-Nanokompositen mit 2,5% (w/v) Vaterit Nanopartikel nachweisen. Wahrscheinlich ist dieser Effekt auf die Erhöhung des Zetapotentials der Hydrogel-Nanokomposite durch Inkorporation der positiv geladenen Vaterit Nanopartikel zurückzuführen. Zudem scheint eine Porengröße von 21 – 134 μm eine Zellinfiltration zu ermöglichen. Die Kombination der Untersuchung des biologischen Risikoprofils hinsichtlich Pyrogenität, Zytotoxizität und gewebspezifische Verträglichkeit, der Zelladhäsion sowie der chemischen Charakterisierung zeigen, dass die P(G^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE} -co-AGE)-Hydrogel-Nanokomposite eine vielversprechende Alternative als alloplastisches Transplantatmaterial in der biomedizinischen Anwendung zur komplexen Gewebsregeneration von Knochenmaterial darstellen können.

5

Amorphes Magnesium-Calcium-Carbonat als Biomaterial für die Knochenregeneration

Die Inhalte dieses Kapitels sind teilweise Gegenstand des Manuskriptes „*Insights into the In Vitro Formation of Apatite from Mg-Stabilized Amorphous Calcium Carbonate*“ veröffentlicht in *Advanced Functional Materials*.^[236]

5.1. Einleitung

Der Fortschritt sowie die guten klinischen Erfahrungen mit biomimetischen Materialien im Bereich der dentoalveolären Chirurgie rücken alloplastische Implantate zunehmend in das Zentrum des *Bone Tissue Engineering*. Die Entwicklung synthetischer Alternativen mit maßgeschneiderten Eigenschaften bilden dabei die zentrale Aufgabe. Um den nativen Knochen durch synthetische Biomaterialien zu ersetzen werden bislang verschiedene Ansätze verfolgt, deren Werkstoffe sich im Wesentlichen auf Metalle, Keramiken und Polymere beschränken.^[316] Die Indikationsbereiche sind dabei divers. Während Metalle (z.B. Titan oder CoCr-Legierung) überwiegend im Bereich der Endoprothetik Anwendung finden, werden Polymere (z.B. PMMA, PEEK, PSU) und Keramiken (z.B. HA) vor allem zur Augmentation im Rahmen von Dentalimplantaten verwendet.^[316] Zusätzlich zeigen nicht-keramische Materialien auf Calciumcarbonat-Basis in ersten Studien vielversprechende Eigenschaften in Bezug auf die Knochenregeneration. Anknüpfend an die Arbeiten von Schüler *et al.*^[131] sowie Schröder *et al.*^[121,179] konnte in den vorangegangenen Kapiteln bereits das unterstützende Potential von Vaterit, der metastabilen kristallinen Calciumcarbonat-Modifikation, hinsichtlich der Knochenregeneration anhand geeigneter *in vitro* Studien gezeigt werden. Spektroskopische Beobachtungen belegen jedoch, dass *in vivo* nicht die kristalline metastabile Phase sondern überwiegend amorphe Vorläuferphase der Carbonat und Phosphate zur Bildung von Endo- und Exoskelett von Bedeutung sind.^[88,237] Die Stabilität dieser biogenen amorphen Phasen *in vivo* wird durch verschiedene spezialisierte Proteine^[317], häufig in Kombination mit Erdalkalimetallionen (v.a. Mg^{2+}) kontrolliert. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass amorphes Calciumcarbonat (aCC) als Vorläufer des carbonathaltigen Apatits fungieren.^[119,120,318] Dennoch ist die Verwendung von nicht-biogenem hydratisiertem aCC als mineralische

Komponente zur Knochenregeneration *in vitro* durch die hohe Löslichkeit von aCC und den damit verbundenen schnellen Kristallisationsprozess zu Calcit erschwert. Unter *in vitro* Bedingungen kann nicht-biogenes aCC durch den Entzug von Wasser^[145,319] oder Additiven wie Mg²⁺^[320–322] oder (Oligo)Phosphaaten^[143,323] stabilisiert werden. Im Nachfolgenden wird das Kristallisationsverhalten von Mg²⁺-stabilisierten aCC in einer simulierten Körperflüssigkeit näher erläutert. Das Ausgangsmaterial wurde über eine mechanochemische Syntheseroute hergestellt, die aufgrund ihrer Skalierbarkeit eine großtechnische Synthese des Implantantmaterials erlaubt. Im Fokus der Untersuchungen stand neben dem Kristallisationsprozess zu carbonathaltigem Hydroxylapatit (ähnlich dem Knochenmineral) auch der Einfluss von Lösungsmitelein-schlüssen sowie die Änderung des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die biologische Verträglichkeit während des Transformationsprozesses.

5.2. Material und Methoden

5.2.1. Material

Ethanol (C₂H₅OH, Sigma Aldrich, ≥ 99,8%), NaCl (Acros, ≥ 99,0%), K₂HPO₄·3H₂O (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%), NaHCO₃ (Sigma Aldrich, ≥ 99,7%), MgCl₂·6H₂O (Merck, ≥ 99,0%), CaCl₂ (Sigma Aldrich, ≥ 93,0%), Na₂SO₄ (Acros, 99,0%), Tris-Pufferan (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan C₄H₁₁NO₃, Carl Roth, ≥ 99,9%), M199 (Sigma Aldrich), FBS (*fetal bovine serum, heat-inactivated*, Sigma Aldrich), Glutamax I (Gibco® Thermo Fisher Scientific), Osteoblasten-Zelllinie MG63 (*American Type Culture Collection, ATCC®CRL-1427®*, LGC Promochem), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*, Sigma Aldrich), Penicillin/Streptomycin P/S (Gibco® Thermo Fisher Scientific), ECGS (*endothelial cell growth supplement*, Becton Dickson and Company), Heparin-Natriumsalz (Sigma Aldrich), LPS (Lipopolysaccharid, *Escherichia coli* O111:B4, Sigma Aldrich), 3,7% Paraformaldehyd (Merck), 0,1% Triton® X-100 (Merck), DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D8537*, Sigma Aldrich), Antikörper CD62E (*mouse, 6010, Monosan*), BSA (*bovine serum albumin*, Sigma Aldrich), Fluoreszenz-marktiert Antikörper (*goat anti-mouse*, Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific), Höchst Dye 33342 (Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific), Fluoroshield (ImmunoBioScience Corporation), Calcein-AM (AM: *Acetoxymethylester*, Thermo Fisher Scientific), CytoTox 96® *Non-Radio Cytotoxicity Assay* (LDH, G1780, Promega), Fibronectin (Roche, 1080 938), Gelatine (Sigma Aldrich), Resazurin (Sigma, R7017), *Hank's Balanced Salt Solution* (Sigma, H9169), 8-Well *chamber slide* (LabTek®, Thermo Fisher Scientific), Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Cellstar®), deionisiertes MilliQ-Wasser, hypotonisches Wasser (steril und pyrogenfrei, Carl Roth).

Die simulierte Körperflüssigkeit (SBF) wurde nach der von Kokubo und Takadama beschriebenen Synthesemethode hergestellt.^[180] Der pH-Wert der SBF-Lösung wurde bei 37 °C mit 1 M HCl auf pH 7,37 eingestellt.

5.2.2. Chemische Charakterisierungsmethoden

ATR-FTIR-Spektroskopie. Die ATR-FTIR-Spektroskopie wurde mit einem Nicolet iS10 Spektrometer der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Frequenzbereich von 650 cm⁻¹ bis 4000 cm⁻¹ mit einer Auflösung von 1,4 cm⁻¹ pro Datenpunkt aufgenommen.

Festkörper-NMR-Spektroskopie. Alle Experimente wurden mit einem Bruker Avance 400 DSX NMR-Spektrometer bei einer ¹H-Frequenz von 399,87 MHz und einer ¹³C-Frequenz von 100,55 MHz und einer ³¹P-Frequenz von 161,87 MHz aufgenommen. Es wurde ein 4 mm-Bruker-Doppelresonanz Messkopf bei 10 kHz Magic Angle Spinning (MAS) verwendet. Die ¹H-NMR-Spektren und die um den ¹H-Hintergrund korrigierten Spektren wurden als Mittelwert von 32 Transienten mit 8 s Zyklusverzögerung aufgenommen. Für alle Festkörper-¹³C-CP-MAS-NMR-Experimente wurde ein initialer 90°-Puls mit 4,0 µs Länge und 5 s Recycle-Verzögerung verwendet. Ein CP-Puls (von 64 bis 100 %) mit einer Dauer von 20, 50, 100, 200 und 500 µs sowie 1, 2, 3, 5 und 7 ms wurde für die Aufnahme der CP-Aufbaukurven verwendet. Für die Erfassung des ¹³C-Signals wurde das ¹H-Entkopplungsschema mit Zweipuls-Phasenmodulation (TPPM) verwendet. Für die CP-Experimente wurden 512 Transienten gemittelt. Die Spektren wurden grundlinienkorrigiert und es wurde eine Verbreiterung von 30 Hz angewendet. Quantitative ¹³C-Einzelimpuls-Anregungsexperimente, die eine vollständige Relaxation erlauben, wurden mit einer Mittelung von 16 Transienten mit einer Zyklusverzögerung von 2200 s und einer heteronuklearen TPPM-Entkopplung aufgenommen. Die 2D-NMR-Spektren der ¹H¹³C-Heteronuklearkorrelation (HETCOR) wurden mit Kontaktzeiten von 50 und 2000 µs und 256 Transienten aufgenommen. Die aufgenommenen Datenpunkte waren 1 k (t1) und 96 oder 128 (t2) und wurden vor der 2D-Fourier-Transformation auf 4 k (t1) und 256 (t2) aufgefüllt. Die anderen Parameter waren identisch mit denen der 1D CP-NMR-Experimente. Die ³¹P-Experimente mit Einzelpulsanregung wurden mit einer Verzögerung von 60 s aufgezeichnet, wobei während der Erfassung des NMR-Signals 16 Scans unter TPPM-Heteronuklearentkopplung gemittelt wurden. Für alle ³¹P CP-MAS-NMR-Experimente wurde ein initialer 90°-Puls mit 4,0 µs Länge und 5 s Recycle-Verzögerung verwendet. Für die Aufnahme der CP-Aufbaukurven wurde ein CP-Puls (von 64 bis 100%) mit einer Dauer von 20, 50s, 100, 250 und 500 µs sowie 1, 2, 3, 4 und 5 ms verwendet. Das TPPM

^1H -Entkopplungsschema wurde bei der Erfassung des ^3P -Signals verwendet. Für die CP-Experimente wurden die Transienten von 64 gemittelt. Die Spektren wurden grundlinienkorrigiert und es wurde eine Verbreiterung von 30 Hz angewendet. Die 2D-NMR-Spektren der $^1\text{H}^3\text{P}$ -Heteronuklearkorrelation (HETCOR) wurden mit $^1\text{H}^3\text{P}$ -Magnetisierungstransfer mit Kontaktzeiten von 20 und 2000 μs und 64 Transienten/ t_1 aufgenommen. Die aufgenommenen Datenpunkte waren 2 k (t_1) und 128 (t_2) und wurden vor der 2D-Fourier-Transformation auf 4 k (t_1) und 256 (t_2) aufgefüllt. Die weiteren experimentellen Parameter waren identisch mit denen der 1D CP-NMR-Experimente.

Pulver-Röntgenbeugung. Röntgendiffraktogramme wurden auf einem STOE Stadi P, ausgestattet mit einem Mythen 1k-Detektor, unter Verwendung von monochromatisierter $\text{MoK}\alpha$ -Strahlung aufgenommen. Die Probe wurde mit Perfluorether (Fomblin Y, Aldrich) zwischen Polyvinylacetat-Folien aufgebracht. Die Probe wurde in $0,015^\circ$ -Schritten (kontinuierlicher Scan, $150 \text{ s}/^\circ$) gemessen, die einen 2θ -Bereich von $1,5^\circ$ bis 47° abdecken.

Rasterelektronenmikroskopie. Die REM-Proben wurden an einem Nova NanoSEM 630 der Firma FEI durchgeführt. Es wurde im Hochvakuum mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV, einem Arbeitsabstand von 4 mm bis 7 mm und einem TLD Detektor, als Sekundärelektronendetektor zur Bildgebung gearbeitet. Zur Probenpräparation wurden 8 μL der jeweiligen Probensuspension auf einen Silicium-Wafer aufgetropft und auf einem leitenden Kohlestoffpad fixiert. Anschließend wurden die Proben unter Verwendung einer MED020 Kleinbedampfungsanlage der Firma Bal-Tec mit einer Goldschicht 7,5 nm gesputtert.

Transmissionselektronenmikroskopie. Die TEM-Proben wurden durch Auftropfen von 20 μL der jeweiligen Probendispersion auf ein 400 mesh Kohlenstoff-Kupfer-Gitter (Plano GmbH, Wetzlar) hergestellt, und mit einem Technai Spirit G2 bei 120 kV Beschleunigungsspannung, ausgestattet mit einer Standard 4K CCD-Kamera, vermessen.

5.2.3. Biologische Untersuchungsmethoden – *in vitro* Studien

Kultiverungsbedingungen der verwendeten Zellen – Für die *in vitro* Studien wurden zwei verschiedene Zelltypen verwendet. Die humane Osteoblasten-Zelllinie MG-63 (ATCC CRL-1427, LGC Promochem) wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, hohe Glukose, Sigma-Aldrich), 10% fötales Rinderserum (FBS, Sigma-Aldrich) + 2mM Glutamax I (Gibco Thermo Fisher Scientific) + 100 U/100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Penicillin/Streptomycin (Gibco Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Humane Endothelzellen, isoliert aus der Nabelschnur (HUVEC), wurden nach dem Verfahren von Jaffe *et al.*^[132] isoliert. Als Zellkulturmedium wurde M199 (Sigma-

Aldrich) + 20% FBS (Sigma-Aldrich) + 2 mM Glutamax I (Gibco Thermo Fisher Scientific) + 100 U/100 µg/mL Penicillin/Streptomycin (Gibco Thermo Fisher Scientific) + 25 µg/mL Wachstumsfaktor *endothelial growth factor supplement* (ECGS; Becton Dickinson and Company) + 25 µg/mL Heparin-Natriumsalz (Sigma-Aldrich) bei 37 °C und 5 % CO₂ verwendet. Der Wachstumsfaktor sowie die Heparin-Natriumsalzlösung wurden dem Medium jeweils frisch und unmittelbar vor der Anwendung zugesetzt. Um eine gute Adhärenz der HUVEC zu erreichen, wurden die Zellkulturflaschen sowie die Zellkulturplatten mit 0,2% Gelatine beschichtet. Die Zellkultivierung wurde in einem Inkubator bei Kultivierungsbedingungen von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt durchgeführt.

Immunfluoreszenzfärbung von E-Selektin - Die Immunfluoreszenzfärbung dient als diagnostische Methode der Immunhistochemie, und verwendet Fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper zur gezielten Detektion eines spezifischen Antigens. In unserem Experiment wurde die Expression von E-Selektin durch HUVEC nach Exposition mit BM-aMCC Nanopartikel detektiert bzw. mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Der Test auf das Vorhandensein von Endotoxin in BM-aMCC und die Untersuchung der endothelialen Genexpression wurde wie von Unger und Peters beschrieben durchgeführt.^[105] Es wurden 50.000 HUVEC in 8-Well-Kammer-Objektträger (Nunc, Sigma-Aldrich, Deutschland) plattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1 µg BM-aMCC, 1 µg LPS in PBS (E. coli Lipopolysaccharid, Sigma-Aldrich, Deutschland) oder eine Kombination aus beidem zugegeben und für 4 h inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 4 h wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert, viermal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5% Triton × 100 für 10 min permeabilisiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der Antikörper (1:100, E-Selectin, Monosan, Niederlande) zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und der sekundäre Antikörper (1:1000, anti-mouse Alexa Fluor 488, Molecular Probes) zugegeben. Die anschließende Inkubationsdauer betrug 1 h bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mittels Hoechst 33 342 (1:10 000 in PBS, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) für 5 min bei RT gefärbt. Schließlich wurde die Transwell-Kammer entfernt und die Zellen auf dem Objektträger mit Fluoromount-GTM (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) montiert. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die jeweiligen Geräteparameter sowie detaillierte Angaben zur Zellzahlbestimmung sind in Anhang A gelistet.

In vitro Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstest – Die Untersuchungen auf Zellviabilität und Toxizität wurden mit der Zelllinie MG63 durchgeführt. Es wurden 25 000 Zellen pro Well in eine sterile 96-Well-Zellkulturplatte mit flachem Boden (Greiner, bio-one Cellstar) ausgesät und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden BM-aMCC-Partikel in Konzentrationen von 50, 100 und 250 µg/mL zugegeben wurden. Die mit Partikel stimulierten Zellen wurden für 24 und 72 Stunden sowie für 7 Tage inkubiert. Zusätzlich wurden nicht-stimulierte Zellen sowie äquivalenten Partikelkonzentrationen ohne Zellen als Kontrollen vorbereitet. Alle Experimente wurden dreimal und mit drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse des RES-Assays wurden als Prozentsatz der nicht-stimulierten Zellkontrolle dargestellt. Die Viabilität der Zellkontrolle wurde für diese Analyse auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse des LDH-Assays wurden nach Abzug der Medium-Kontrolle bzw. Medium-Nanopartikel-Kontrolle relativ zu den lysierten Zellen in Prozent angegeben, die auf 100 % gesetzt wurde. Ein Student's t-Test Typ 3 wurde für die statistische Signifikanz durchgeführt und ist als * $p < 0,05$ angegeben. Die detaillierte Durchführung des RES-Tests wird im Nachfolgenden kurz beschrieben. Der LDH-Assay wurde nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.^[108] Die jeweiligen Geräteparameter sowie detaillierte Angaben zu den Untersuchungsmethoden sowie der genauen Zellzahlbestimmung sind Anhang A zu entnehmen.

RES – Assay – Zum Nachweis der zellulären metabolischen Aktivität der mit BM-aMCC versetzten Zellen, wurde ein Resazurin-Zellviabilitäts-Assay durchgeführt. Die Resazurin-Lösung wurde durch Auflösen von 20 mg Resazurin in 100 mL 100 ml *Hanks' Balanced Salt Solution* mit Mg^{2+} und Ca^{2+} hergestellt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden 20 µL dieser Lösung pro Well zugegeben, die behandelten Zellen für 3 bzw. 5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 530 – 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 580 – 600 nm mit einem *Tecan Spark Plate Reader* gemessen. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

In vitro Zellbiokompatibilität – Die Zellverträglichkeit (Zellbiokompatibilität) wurde an zwei der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG63 sowie den primären HUVEC getestet. Um eine spenderunabhängige Aussage treffen zu können, wurden die Experimente der primären HUVEC mit Zellen von drei verschiedenen Spendern in der jeweils gleichen Passage durchgeführt. Die Experimente mit der Zelllinie MG63 wurden als Doppelbestimmung in zwei unterschiedlichen Passagen durchgeführt. Es wurden 50.000 MG63 und 80.000 HUVEC pro Well in einer sterilen 24-Well Zellkulturplatte ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden BM-aMCC Nanopartikel in Konzentrationen von 50 µg/mL,

100 µg/mL und 250 µg/mL zugesetzt. Nach Stimulationszeiten von 24 Stunden, 72 Stunden und 7 Tagen wurden 10 µM Calcein-AM Lösung zugegeben und die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die jeweiligen Geräteparameter sowie detaillierte Angaben zur Zellzahlbestimmung sind Anhang A gelistet.

5.3. Ergebnisse und Diskussion

5.3.1. Inkubation von BM-aMCC 30% in SBF

Die verwendeten Nanopartikel wurden von **Dr. Phil. Opitz**, Arbeitskreis von **Prof. Dr. W. [REDACTED]** am Departement für Chemie synthetisiert und für die nachfolgenden Studien zur Verfügung gestellt. In der Arbeit von Opitz *et al.*^[236] wird das Kristallisationsverhalten von Mg^{2+} -stabilisierten aCC-Nanopartikel in Abhängigkeit des Mg^{2+} -Anteils ausführlich diskutiert. Auf dieser Grundlage wurde eine potentielle Anwendbarkeit von BM-aMCC-Nanopartikeln mit einem Mg^{2+} -Anteil von 30% untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Nanopartikel bei 37°C in SBF inkubiert. Die entsprechenden Kristallisationsprozesse wurden *ex situ* mittels ATR-FTIR-Spektroskopie und Pulverröntgendiffraktometrie überwacht. Abb. 5-1 zeigt die Spektren von BM-aMCC (30%) sowie von aCC als Referenz in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.

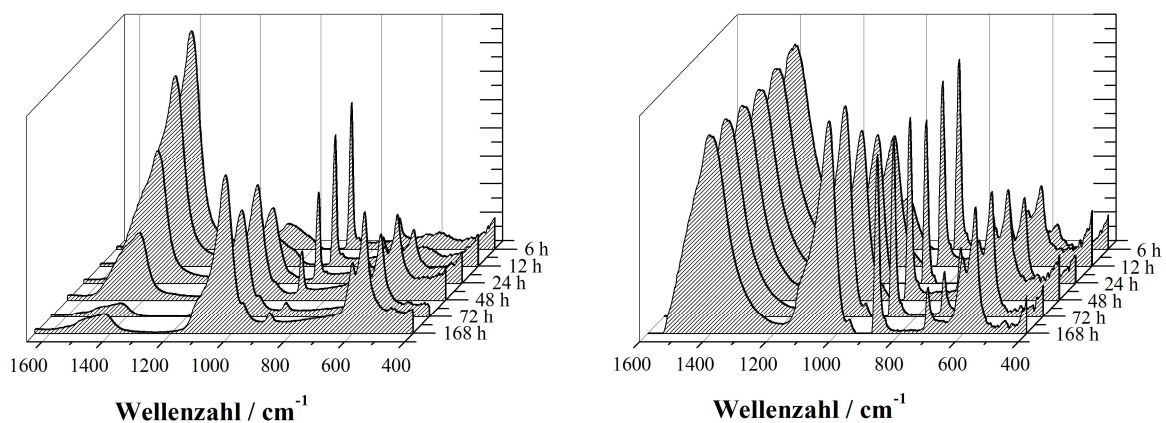


Abb. 5 - 1 *Ex situ* FTIR-Analyse der synthetisierten aCC-Partikel hergestellt nach der Vorschrift von Faatz *et al.*^[26] (links) und BM-aMCC-Partikel (rechts) nach Inkubationszeiten von 6 Stunden bis 168 Stunden (7 Tage).

Die Inkubation von aCC führt zu einer Verschiebung der ν_2 -Bande (*out-of-plane*) des CO_3^{2-} -Anions zu höheren Wellenzahlen, bei gleichzeitigem Auftreten einer zusätzlichen Bande bei 711 cm^{-1} (ν_4 -Bande, *in-plane* Deformationsschwingungsbande). Beide Effekte, sowohl die Verschiebung der ν_2 -Bande als auch das Vorhandensein der ν_4 -Bande des CO_3^{2-} -Anions, belegen die Bildung von Calcit im Laufe der Inkubation.^[138] Gemäß des Lambert – Beer'schen Gesetz ist die Absorption von elektromagnetischer Strahlung proportional zur Konzentration des absorbierenden Substanz. Unter Betrachtung der Fläche und Intensität der ν_2 -Bande bei 872 cm^{-1} kann im Zuge des Inkubationszeitraumes keine Änderung festgestellt werden. Folglich kann angenommen werden, dass die Menge an gebildetem Calcit während des gesamten Inkubationszeitraumes konstant blieb. Die neu auftretende Bande bei 962 cm^{-1} ist charakteristisch für die Kristallisation einer Apatitphase. Bereits nach einer Inkubationsdauer

von 6 Stunden kann demnach die Ausfällung einer Apatitphase beobachtet werden. Dabei nehmen Intensität und Schärfe der Schwingungsbande im Laufe der Inkubationsdauer zu. Dies lässt vermuten, dass gemäß der Ostwald-Vollmer Regel zunächst amorphes Calciumphosphat nukleiert und in der Bildung von kristallinem Apatit (ν_1 -Bande bei 962 cm^{-1}) endet.^[324] Die fehlende Korrelation zwischen dem Verlauf der Carbonat- und Phosphat-Schwingungsbanden lässt die Bildung eines Zweiphasensystems bestehend aus Calcit und Hydroxyapatit im Laufe der Inkubation vermuten. Diese Annahme wird durch die morphologische Betrachtung der Inkubationsproben gestützt. Abbildung 4-2 zeigt homogene, kugelförmigen aCC-Partikel hergestellt nach der Vorschrift von Faatz *et al.*^[26] Nach einer Inkubationsdauer von 7 Tagen in SBF, zeigen die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen neben den kugelförmigen aCC-Partikel weitere Calciumcarbonat-Polymorphe (Calcit, Argonit). Zusätzlich kann das Aufwachsen von kleinen plättchenförmigen Partikeln auf der Calciumcarbonatoberfläche beobachtet werden. REM-EDX-Untersuchungen zeigen an, dass es sich dabei um eine Apatitphase handelt.

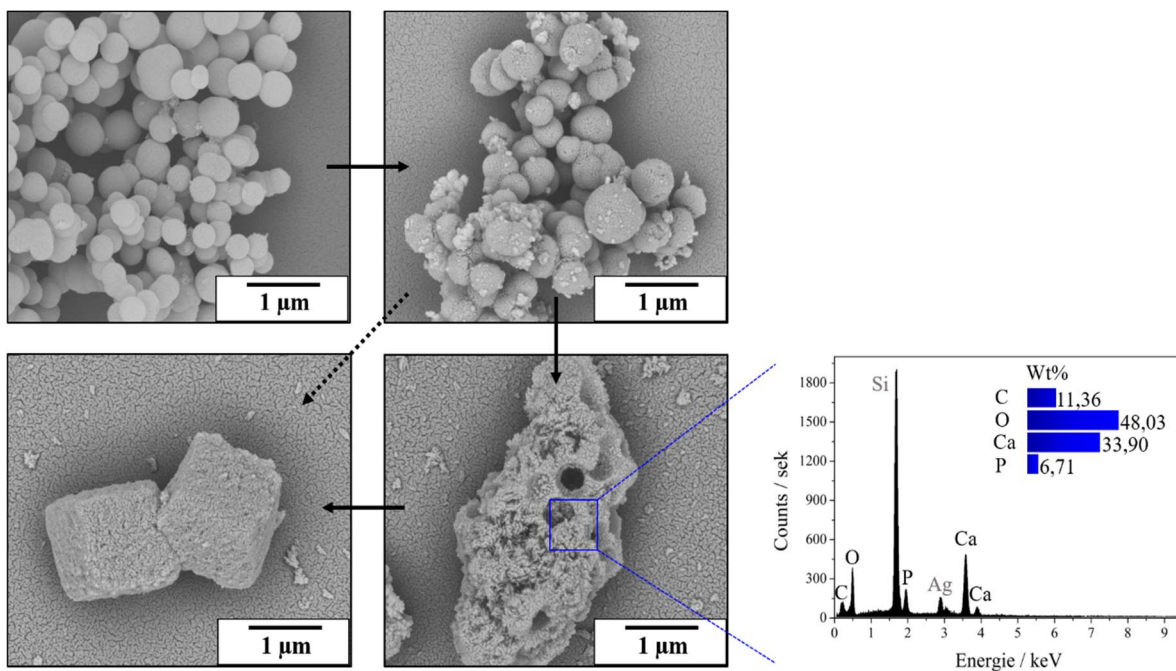


Abb. 5 - 2 REM-Aufnahmen und REM-EDX-Analyse der mineralischen Phase nach 7-tägiger Inkubation in SBF, ausgehend von aCC-Partikel hergestellt nach der Vorschrift von Faatz *et al.*^[23].

Da wasserhaltiges, nicht-stabilisiertes aCC in Bezug auf die kristallinen Calciumcarbonat-Modifikationen metastabil ist, führt die Inkubation von aCC in einem wässrigen Medium wie SBF nach spontaner Auflösung zu einer Rekristallisation als Calcit. Die thermodynamische Stabilität korreliert direkt mit der Löslichkeit der jeweiligen Phase, sodass die Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse von ACC sehr schnell erfolgen. Es wird davon ausgegangen,

dass die Keimbildung der Hydroxylapatit-Kristallite auf den Calciumcarbonat-Partikeln durch heterogene Keimbildung aufgrund der lokal steigenden Ca^{2+} -Konzentration erfolgt.

Im Vergleich zu der Inkubation der aCC-Proben sind Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse von BM-aMCC (30%) in SBF kinetisch stark verzögert. Phosphatbanden, die auf die Bildung von Calciumphosphaten hinweisen, konnten erst nach einer Inkubationsdauer von 12 Stunden nachgewiesen werden. Die anfängliche Verbreiterung der Schwingungsbanden sowie die schwache Aufspaltung der PO-Bande deuten – vergleichbar mit der Inkubation der aCC-Partikel – auf die Bildung eines amorphen Phosphats hin. Insbesondere in Proben mit niedriger Kristallinität ist die $\nu_1(\text{PO}_4)$ -Schwingung nicht eindeutig von der $\nu_3(\text{PO}_4)$ -Bande getrennt und erscheint als Schulter zu $\nu_1(\text{PO}_4)$. Im Laufe der Inkubation wird diese Aufspaltung gemäß der Ostwald-Volmer-Regel ausgeprägter.^[14] Zusätzlich ist zu erkennen, dass die ν_3 - und ν_4 -Bande der Phosphatgruppe, im Vergleich zu den Positionen in HA oder zu den Banden von den inkubierten aCC-Partikeln, zu niedrigen Wellenzahlen verschoben sind. Zudem verschwindet die ν_4 -Bande des CO_3^{2-} -Anions vollständig. Dies deutet auf die Bildung eines (knochenähnlichen) Hydroxycarbonat-Apatits (HCA, Dahllit) hin, eines einphasigen Carbonat-Apatits, mit Carbonat-Substitutionen sowohl an Typ-A (OH^-) als auch an Typ-B-Positionen (PO_4^{3-}).^[222] Auch die morphologische Betrachtung des entstandenen Materials gibt Hinweise auf ein einphasiges System. Die in Abbildung 5-3 zusammengefassten transelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen ausschließlich plättchenförmige Nanopartikel, die sich anfänglich teilweise aufrollen.

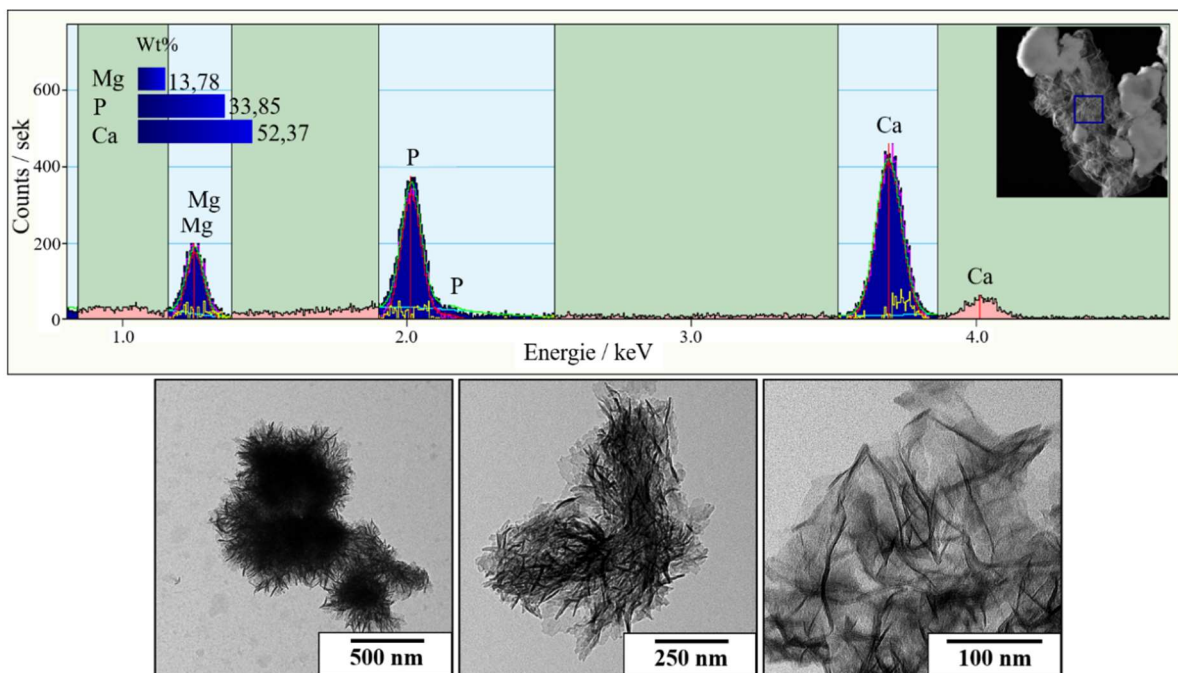


Abb. 5 - 3 TEM-Aufnahmen und TEM-EDX-Analyse der mineralischen Phase nach 7d Inkubation in SBF, ausgehend von BM-aMCC-Partikel.

Für das Knochenmineral ist diese Morphologie ebenfalls dokumentiert.^[210,211] In Anlehnung an Grunenwald *et al.*^[325] wurde ein Gewichtsanteil von 4,2 wt% mit einem Hauptanteil an Carbonat vom B-Typ gefunden, was mit dem Wert der von uns analysierten Knochenmineralprobe sowie den für andere Knochenmineralproben gefundenen Werte korreliert. Einige Arbeiten belegen die Existenz einer amorphen Oberflächenschicht, die die Knochenmineralpartikel umhüllen und nicht-apatitische CO_3^{2-} -Ionen enthalten.^[88,90] Diese Beobachtung konnte mit unserem Versuchsaufbau nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dennoch deuten die schlecht definierte ν_1 -Bande als auch die verbreiterten Reflexe im Pulverdiffraktogramm (s. Abb. 5-7) auf das Vorhandensein kleiner und stark ungeordneter Domänen aufgrund der Carbonat-Substitution hin.^[201]

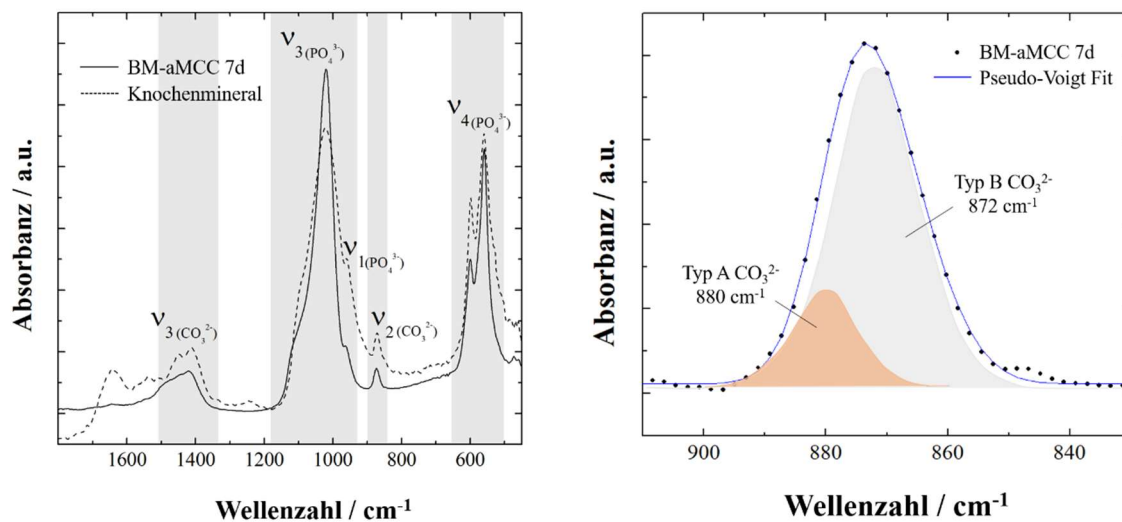


Abb. 5 - 4 Ex situ FTIR-Analyse der inkubierten BM-aMCC-Partikel (7 Tage) sowie das FTIR-Spektrum eines humanen Knochens als Referenz-Knochenmineral (links). Der humane Knochen entstammte aus dem Knie eines 52-jährigen Mannes und wurde als anonyme Spende ohne patientenbezogene Daten entsprechend der gesetzlichen und ethischen Vorschriften erhalten. Das dekonvolvierte Signal bei 873 cm^{-1} lässt einen Hauptanteil an Carbonat vom B-Typ vermuten. CO_3^{2-} -Ionen vom Typ B besetzen die PO_4^{3-} -Stellen im Kristallgitter des Hydroxylapatits; CO_3^{2-} -Ionen vom Typ A besetzen die OH-Stellen im Kristallgitter des Hydroxylapatits.

Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie kann aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber der spezifischen elektronischen Umgebung der Carbonatgruppe zwischen verschiedenen Carbonatphasen unterscheiden.^[138] Die FWHM der Resonanzbanden gibt Auskunft über die Kristallinität der Proben.^[326] Scharfe Resonanzen sind charakteristisch für kristalline Proben, breite Resonanzen weisen auf strukturell ungeordnete oder nanokristalline Proben hin. Abbildung 5-5 zeigt ^{13}C -CP-MAS-NMR-Spektren von BM-aMCC mit 2 ms Kontaktzeit vor und nach der Inkubation in SBF für 7 Tage. Das Spektrum der BM-aMCC-Probe zeigt ein breites Signal (FWHM = 449,3 Hz) bei 167,7 ppm, das typisch für aCC ist. Nach der Inkubation in SBF ist ein asymmetrisches Signal sowie eine leichte Verschiebung des Signals zu erkennen. Das Dekonvolvieren des Spektrums ergibt drei verschiedene Umgebungen für die Carbonatgruppe.

Das Signal bei 168.4 ppm ist auf eine Calcit-Modifikation geringer Kristallinität (FWHM = 366,4 Hz) zurückzuführen, das Signal bei 165 ppm ist auf Kaliumhydrogencarbonat aus dem SBF-Puffer zuzuordnen, und das Signal bei 170.0 ppm resultiert aus dem entstandenen Carbonat-Apatit. Die Signale bei ca. 56 ppm zeigen eine organische Verbindung an und sind durch den im SBF verwendeten TRIS-Puffer zu erklären (s. Anhang A).

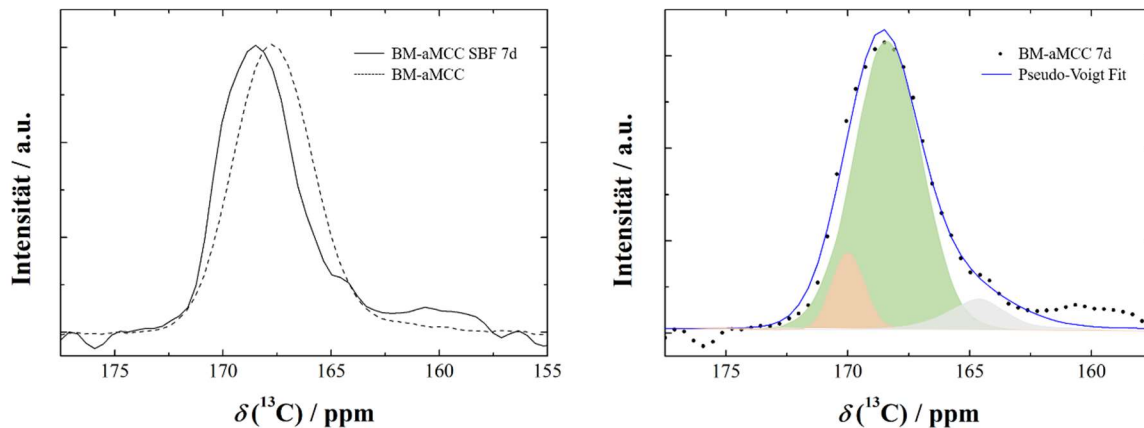


Abb. 5 - 5 ^{13}C CP-MAS-NMR-Spektren von BM-aMCC vor und nach der 7-tägigen Inkubation in SBF (links) sowie das dekonvolvierte Spektrum (rechts).

Das ^1H -MAS-NMR-Spektrum von BM-aMCC zeigt drei Signale. Das scharfe Signal bei 1.2 ppm steht im Zusammenhang mit dem in der Synthese verwendeten Cyclohexan, das in den Korngrenzen der entstandenen Partikel eingeschlossen ist. Das Signal bei -0.2 ppm ist auf Hydroxid-Ionen des basischen Magnesiumcarbonats, das als Ausgangsmaterial zur Synthese verwendet wurde, zurückzuführen. Das breite Signal bei ca. 5 ppm ist auf geringe Mengen an Strukturwasser, wie es häufig in amorphen Calciumcarbonaten gefunden werden kann, zurückzuführen. Nach Inkubation in SBF zeigt das ^1H -MAS-NMR-Spektrum von BM-aMCC vier Resonanzen, die mit dem organischen Puffer und dem Waschmittel Ethanol (0.9 und 3.5 ppm), eingeschlossenem Wasser (ca. 5.0 ppm) und Hydroxidionen von Hydroxylapatit und basischem Magnesiumcarbonat (ca. -0.2 ppm) zusammenhängen. Die Resonanz, die mit

eingeschlossenem Cyclohexan zusammenhängt, ist verschwunden, was auf eine Auflösung- und Rekristallisation von BM-aMCC durch die Inkubation in SBF deutet.

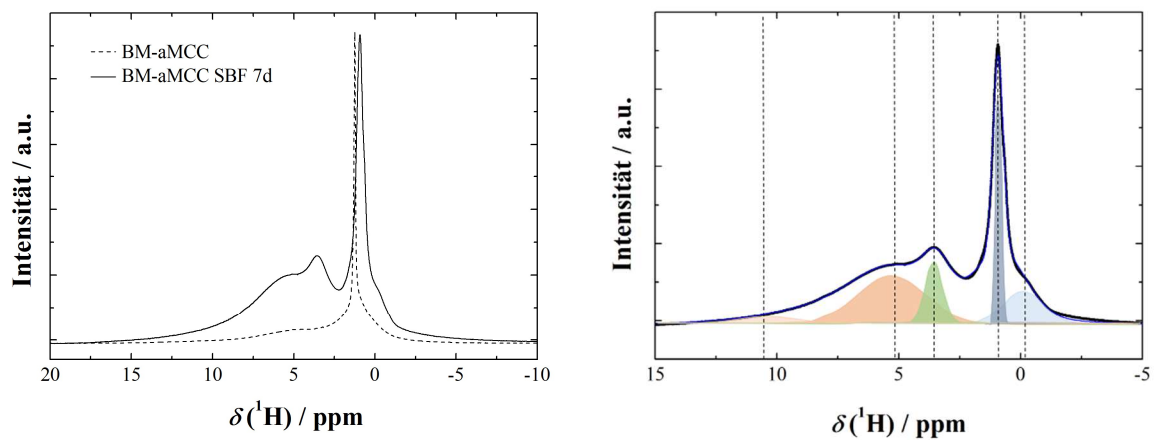


Abb. 5 - 6 ^1H -MAS-NMR-Spektren von BM-aMCC vor und nach der 7-tägigen Inkubation in SBF (links) sowie das dekonvolvierte Spektrum (rechts, • BM-aMCC SBF 7d, — Pseudo-Voigt-Fit).

Abbildung 5-7 zeigt das ^{31}P -SPE-MAS-NMR-Spektrum (links) von inkubiertem BM-aMCC. Das Signal wird von einer breiten Resonanz bei 3.0 ppm (FWHM = 178,0 Hz) dominiert, die dem Orthophosphat zugeordnet wird. Da deprotonierte Phosphatgruppen weniger abgeschirmt sind, ist das Signal bei 5.4 ppm mit deprotonierten Oberflächenphosphatgruppen assoziiert (FWHM = 404,7 Hz). Das Signal bei ca. 1.1 ppm (FWHM = 534,2 Hz) zeigt die Anwesenheit von Hydrogenphosphatgruppen. Die Signale sind breit, was auf ein nano-kristallines oder ein ungeordnetes System hinweist.

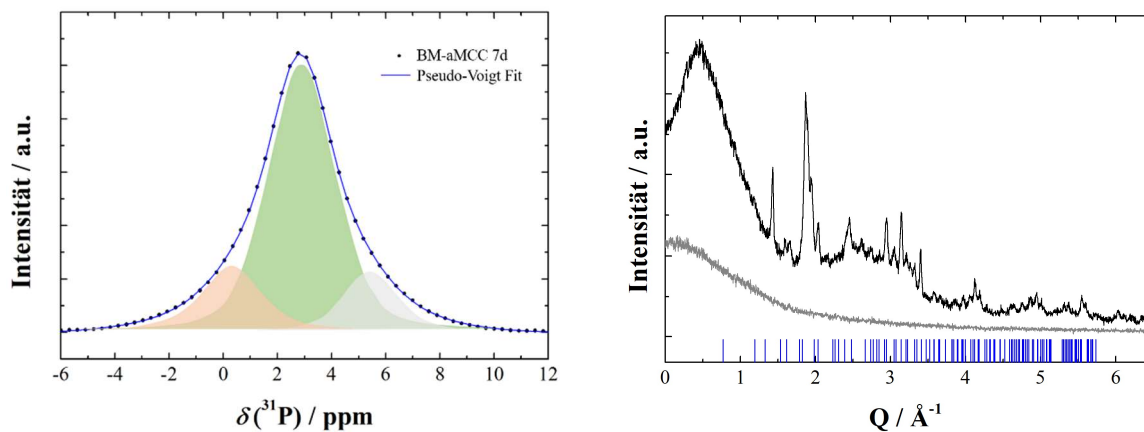


Abb. 5 - 7 ^{31}P -SPE-MAS-NMR-Spektrum (links) und XRPD-Spektrum (rechts, Reflexprofil der Referenzreflexe von $\text{HA}^{[34]}$ (blau)) von BM-aMCC nach 7-tägiger Inkubation in SBF. Nach Dekonvolvieren des ^{31}P -SPE-MAS-NMR-Spektrums zeigt das Signal drei verschiedene elektronische Umgebungen.

Abbildung 5-8 zeigt das ^1H - ^{31}P -HETCOR-Spektrum von BM-aMCC inkubiert in SBF, aufgenommen mit Kontaktzeiten von 20 und 2000 μs . Das HETCOR-Spektrum, das mit einer kurzzeitigen Kontaktzeit von 20 μs aufgenommen wurde, zeigt Korrelationen zwischen dem Protonensignal bei 11.0 ppm und dem breiten Signal bei ca. 1.0 ppm. Dieses Signal ist mit HPO_4^{2-} -Ionen vergleichbar, die für Knochenminerale und Ca-defizitären Apatitminerale berichtet wurden.^[327] Die breite Resonanz bei 6 ppm im ^{31}P -Spektrum mit kurzreichweitiger Kontaktzeit (20 μs) zeigt mit keiner ^1H -Resonanz eine Korrelation und deutet darauf hin, dass dieses Signal mit deprotonierten Oberflächenphosphatgruppen zusammenhängt. Langreichweitige Kontaktzeiten zeigen Korrelationen der Phosphorresonanz mit den Resonanzen bei -0.53 (vermutlich HA) und 5.3 ppm (Strukturwasser).

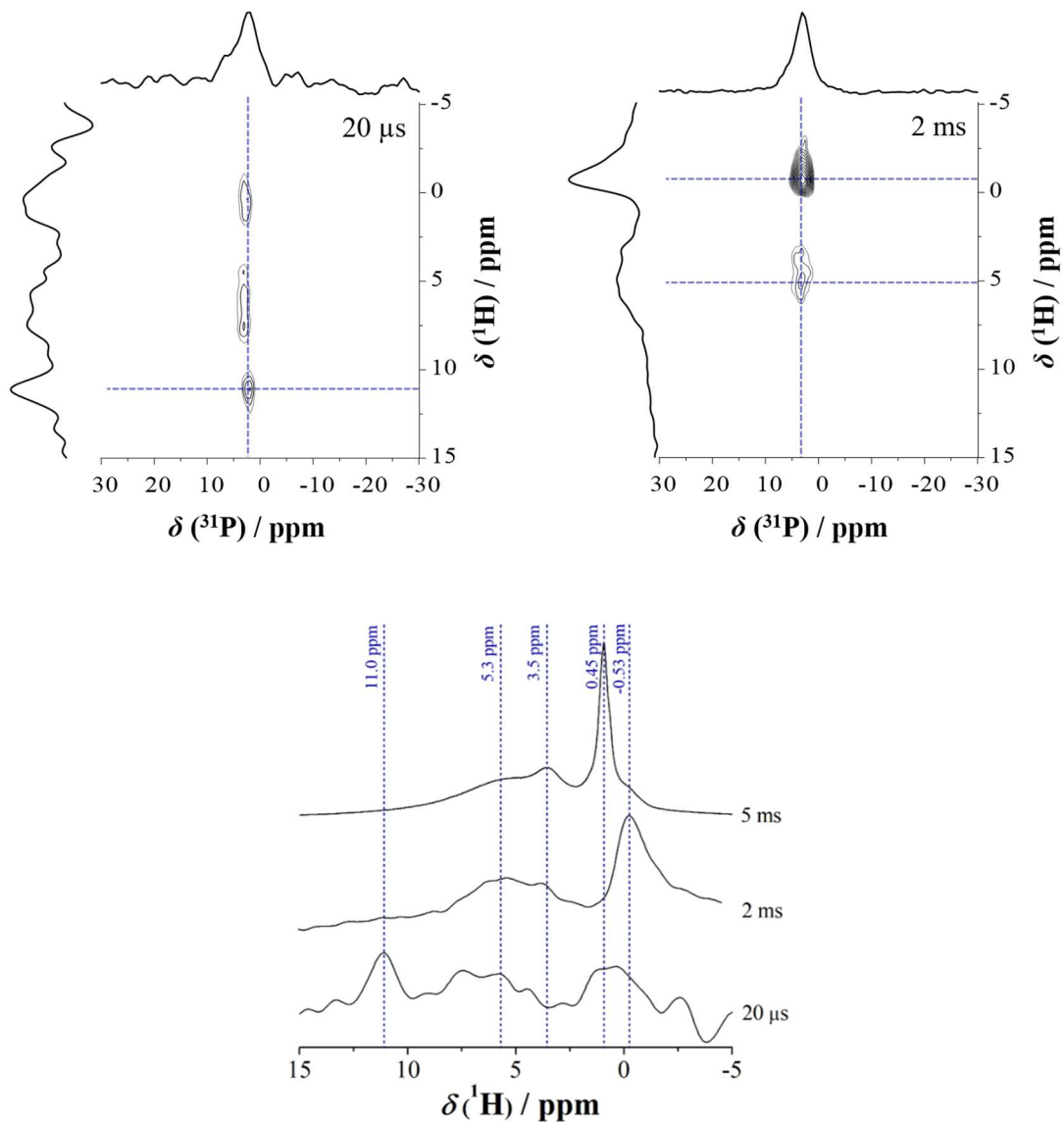


Abb. 5 - 8 ^1H - ^{31}P -HETCOR-Spektren von in SBF inkubierten BM-aMCC-Partikel mit kurzen Kontaktzeiten (20 μs , oben links) und langen Kontaktzeiten (2 ms, oben rechts). Die entsprechenden ^1H -Projektionen sind unterhalb dargestellt.

5.3.2. BM-aMCC 30% – *in vitro* Studien

Die Zellkompatibilität der BM-aMCC-Partikel wurde anhand zwei komplementärer Methoden untersucht. Die zelluläre Stoffwechselaktivität wurde mit einem Resazurin (RES)-Zellviabilitätstest analysiert. RES ist ein nicht-fluoreszierender membranpermeabler Farbstoff. Lebensfähige Zellen mit aktivem Stoffwechsel können RES zu dem Produkt Resorufin reduzieren, das rosa und fluoreszierend ist. Die Integrität der Zellmembran nach Partikelexposition wurde mittels Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay bestimmt.^[328] Das Auftreten von LDH in Zellüberständen ist ein Indikator für eine Schädigung der Zellmembran, die wiederum ein Indikator für den Zelltod ist. Er wird zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-9 nebeneinander dargestellt.

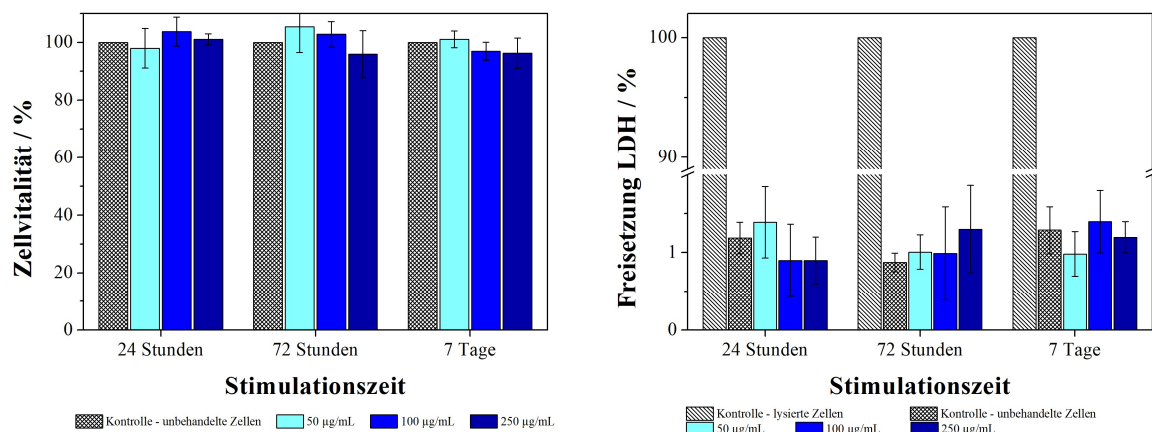


Abb. 5 - 9 Graphische Auswertung der Testverfahren zur Zytotoxizität. RES-Assay (links), LDH-Assay (rechts).

Der RES-Assay zeigt keine signifikanten Veränderungen bei Inkubationszeiten bis zu 72 h und einer Partikelexpositionskonzentration von bis zu 250 µg/mL. Folglich führt die Exposition der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 mit BM-aMCC-Partikeln nicht zu einer Abnahme der Zellstoffwechselaktivität, d.h. die Lebensfähigkeit der Zellen wird auch bei hohen Konzentrationen von BM-aMCC und längere Expositionszeiten nicht beeinflusst. In ähnlicher Weise wurden physiologisch sehr niedrige LDH-Konzentrationen in allen Zellüberständen beobachtet. Diese Werte sind vergleichbar mit den LDH-Werten, die im Überstand von unbehandelten Zellen detektiert wurden. Die Kombination beider Methoden erlaubt die Annahme, dass steigende Konzentrationen von BM-aMCC zu allen untersuchten Zeitpunkten keine zytotoxischen Effekte hervorrufen oder den Zellstoffwechsel negativ beeinflussen. Aufgrund einer Expositionsdauer von bis zu 72 Stunden kann zudem davon ausgegangen werden, dass nicht nur die Partikel selbst eine hohe Zellkompatibilität aufweisen, sondern auch, dass der Transformationsprozess und die damit verbundene kurzzeitige Änderung der Ionenstärke, des pH-Wertes sowie die Freisetzung geringer Mengen an Lösungsmittel keine

toxischen Effekte hervorrufen. Neben der Zytotoxizität ist die Untersuchung der Zell-Biokompatibilität essentiell für nachfolgende *in vivo* Experimente und weitere klinische Anwendungen.^[106] Die Zell-Biokompatibilität von BM-aMCC wurde an zwei verschiedenen Zelltypen untersucht. In diesen Studien wurde das Zellwachstum in Anwesenheit von BM-aMCC mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM verfolgt. Dabei wird der Farbstoff aktiv von lebenden Zellen aufgenommen und bei intakter Zellmembran zurückgehalten.^[106] Die Spaltung von Calcein-AM durch intrazelluläre Esterasen führt zu den nicht-membranpermeablen und fluoreszierenden Calcein-Farbstoff. Auf diese Weise können die Zellproliferation und die Zellmorphologie untersucht werden und die Zelllebensfähigkeit sowie die Biokompatibilität der Zellen bewertet werden. Die Abbildungen 5-10 und 5-11 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der osteoblastischen Zelllinie MG63 und der primären HUVEC zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Zellen wurden jeweils bis zu 7 Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BM-aMCC Partikeln (50, 100 und 250 µg/mL) exponiert.

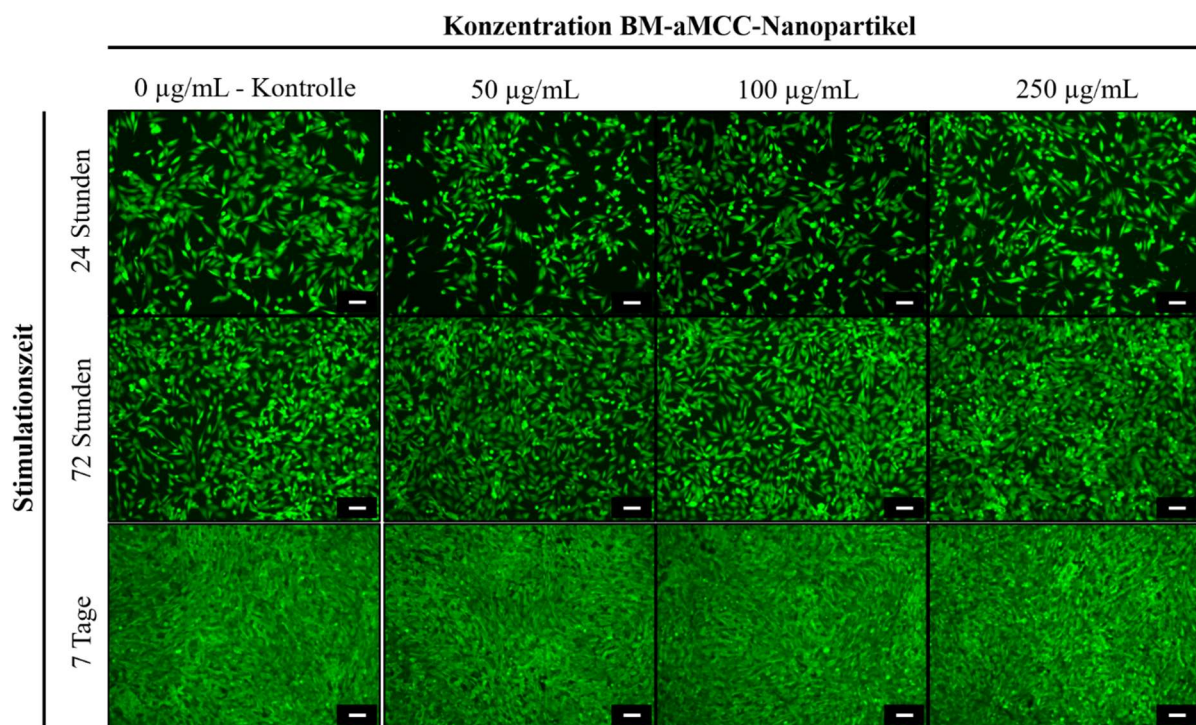


Abb. 5 - 10 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von BM-aMCC, getestet an der osteoblastären Zelllinie (MG63). Vitale Zellen wurden mittels Calcein-AM angefärbt. Skala: 100 µm.

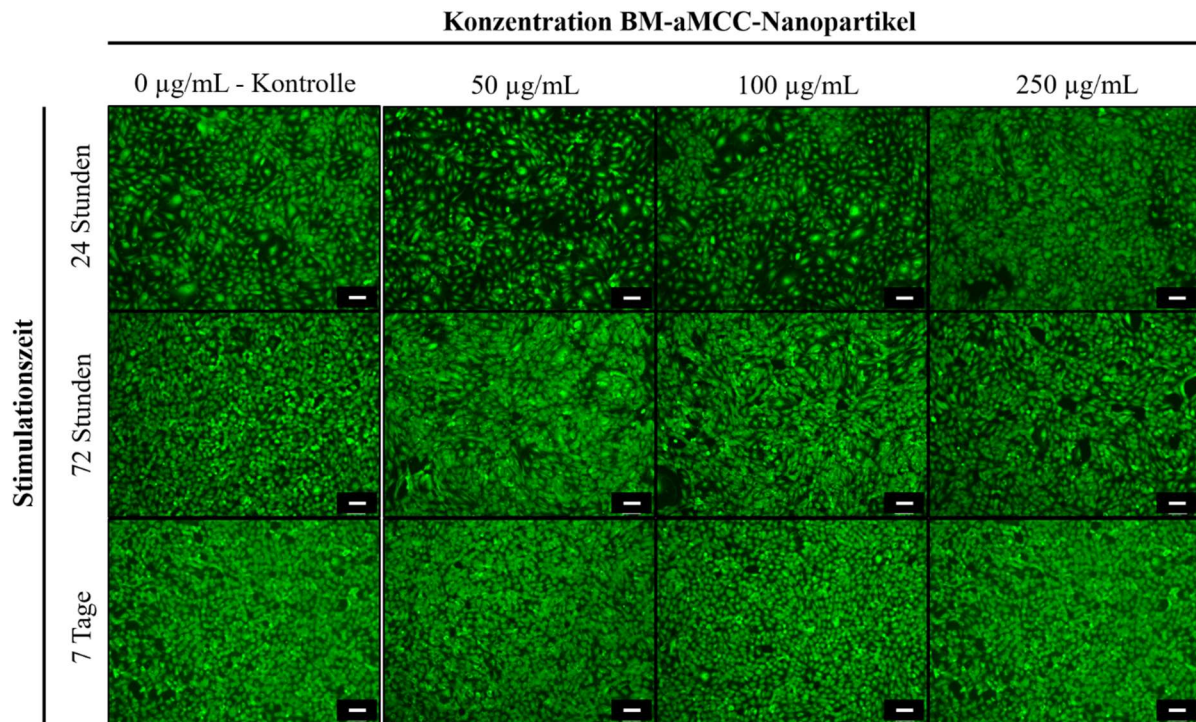


Abb. 5 - 11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von BM-aMCC, getestet an primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). Vitale Zellen wurden mittels Calcein-AM angefärbt. Skala: 100 μm .

Aus den Abbildungen 5-10 und 5-11 wird deutlich, dass sowohl Osteoblasten als auch Endothelzellen mit zunehmender Inkubationszeit proliferierten. Auch bei hohen Konzentrationen von BM-aMCC konnten ähnliche Zellmengen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachtet werden. Die Zellmorphologie im Monolayer der exponierten Zellen stimmt mit nicht-exponierten Zellen überein. Es konnten keine abgerundeten oder abgelösten Zellen beobachtet werden. In Summe deuten diese positiven Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass BM-aMCC-Partikel eine ausgeprägte Verträglichkeit aufweisen. Weder die Zellanhaftung noch die Proliferation werden negativ beeinflusst und in allen Experimenten wurden stoffwechselaktive und lebensfähige Zellen nachgewiesen. Im Allgemeinen ist bekannt, dass primäre Zellen (hier: HUVEC) hinsichtlich der Kultivierungsbedingungen anfälliger sind. Die Tatsache, dass auch die Untersuchungen mit diesen Zellen durchgängig positive Ergebnisse lieferten, unterstreichen die ausgeprägte biologische Verträglichkeit des Materials.

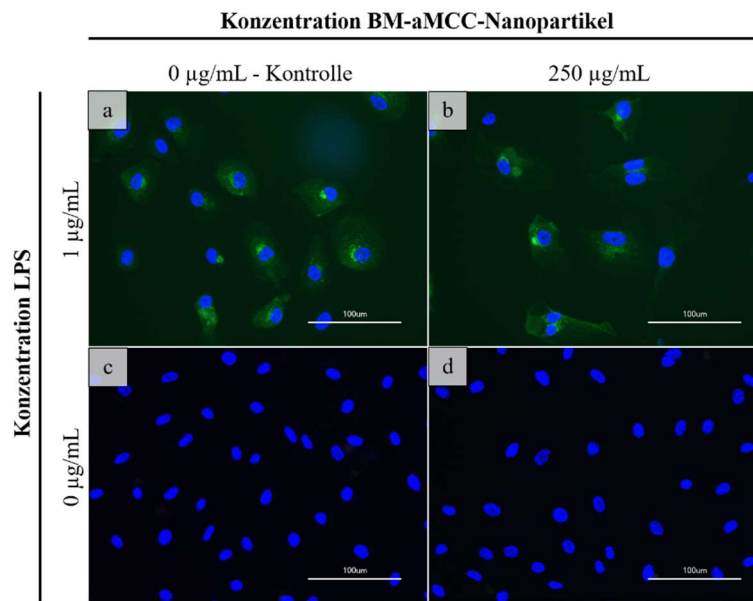


Abb. 5 - 12 Antikörper-basierte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von E-Selektin. Getestet an primären Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). (a) pos. Kontrolle, (b) pos. Kontrolle mit 250 µg/mL BM-aMCC, (c) neg. Kontrolle, (d) 250 µg/mL mL BM-aMCC. Skala: 100 µm.

Für die Verwendung eines Materials als Transplantat, ist die Abwesenheit von Endotoxin von wesentlicher Bedeutung. Außerdem sollten diese Materiale die Genexpression von Endothelzellen, die das Gefäßsystem bilden und für die Einleitung einer Immunreaktion als Reaktion auf ein körperfremdes Material verantwortlich sind, nicht negativ beeinflussen. Über die schnelle Induktion von E-Selektin ausgehend von Endothelzellen in Gegenwart von Endotoxin wurde bereits früher berichtet, und als Schnelltest für das Vorhandensein von Endotoxin in Biomaterialien adaptiert.^[105] Abbildung 5-12a+b zeigt die Expression von E-Selektin (grüne Färbung) nach Stimulation der Zellen für 4 h mit Endotoxin (LPS) und Abbildung 5-12c zeigt unbehandelte HUVEC als Zellkontrolle (kein LPS, keine grüne Färbung). Die Aufnahmen der mit BM-aMCC kultivierten HUVEC (Abbildung 5-12d) sind vergleichbar mit dieser Zellkontrolle. Eine Expression von E-Selektin hätte in einer Grünfärbung resultiert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Syntheseverfahren zu nicht kontaminierten und endotoxinfreien BM-aMCC führt. Wie bereits beschrieben, können anhand dieser Untersuchung auch die möglichen Auswirkungen eines Biomaterials auf die Genexpression von Endothelzellen analysiert werden.^[243] Endothelzellen zeigen unter Entzündungsbedingungen eine Induktion von E-Selektin. Abbildung 5-12b zeigt, dass HUVEC, die mit BM-aMCC kultiviert wurden, E-Selektin exprimierten, wenn entzündungsfördernde Bedingungen angewendet wurden (nachgeahmt durch die Zugabe von LPS). Somit zeigen HUVEC, die mit BM-aMCC kultiviert wurden, eine normale Endothelzell-Genexpression als Reaktion auf ein Entzündungsagens.

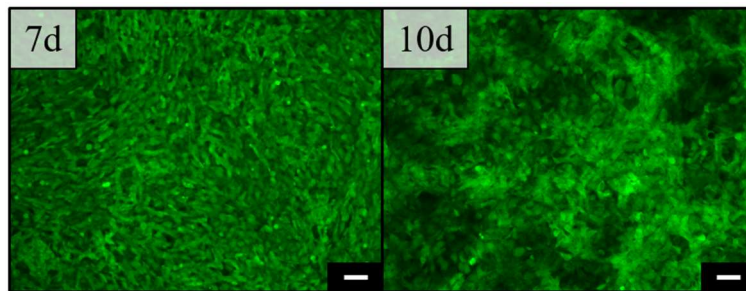
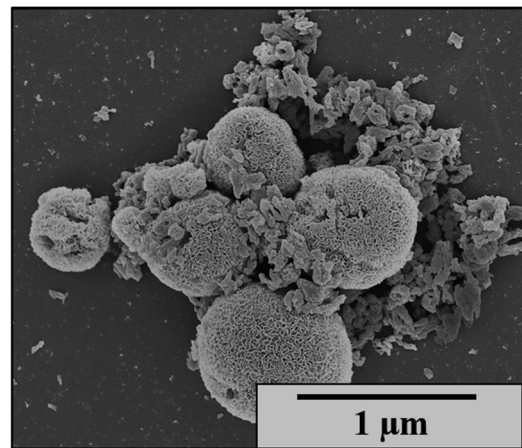
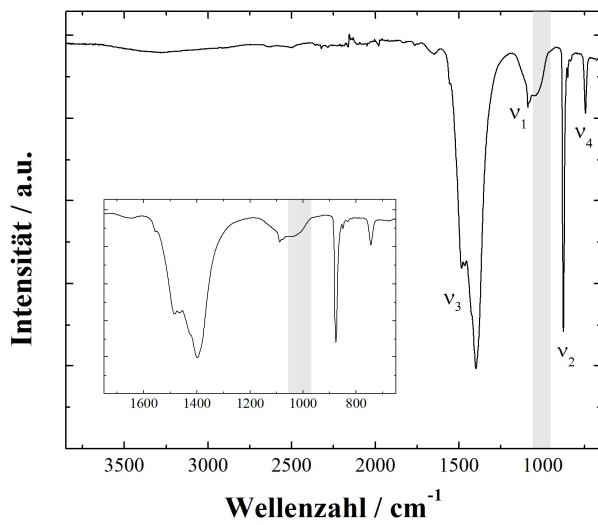
5.4. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wird eine vielversprechende Alternative für den Einsatz biologisch abbaubarer Materialien mit potentieller Fähigkeit zum Knochenaufbau demonstriert. Dabei basiert das verwendete Biomaterial auf einem magnesiumsubstituierten aCC-Nanopartikel, der in großen Mengen durch Kugelmahlen hergestellt werden kann. Magnesiumsubstituiertes aCC ist inhärent labil und gleichzeitig ausreichend reaktiv um als Ionenpuffer und gleichzeitig als Ausgangsmaterial zur Kristallisation von Hydroxycarbonat-Apatit zu wirken. Eine Kombination aus Pulverröntgendiffraktometrie, Transelektronen- und Raster-elektronenmikroskopie, *Multimagic Angle Spinning* Kernspinresonanzspektroskopie sowie *ex situ* FT-IR-Spektroskopie zeigt die Umwandlung von BM-aMCC-Nanopartikeln in Hydroxycarbonat-Apatit-Kristalle mit geringer Kristallinität nach Inkubation in SBF unter physiologischen Bedingungen. Während reines ACC in wässrigen Medien sehr schnell zu Calcit auskristallisiert, bildet sich aus magnesiumstabilisiertes aCC mit Mg-Gehalten $\leq 30\%$ in Gegenwart von Phosphationen knochenartiger HCA, ein einphasiger Carbonatapatit mit Substitution sowohl an Typ A- (OH^-) als auch an Typ B-Stellen (PO_4^{3-}). BM-aMCC ist vollständig biologisch abbaubar, da es als Speicherpuffermaterial für knochenbildende Zellen zur Regeneration von neuem Knochengewebe dient. Es konnte gezeigt werden, dass BM-aMCC frei von Endotoxin ist und kein inflammatorisches Potential aufweist. Somit kann eine neue Perspektive für zukünftige Anwendungen in der Behandlung von Knochendefekten und Knochendegenerationskrankheiten aufgezeigt werden.

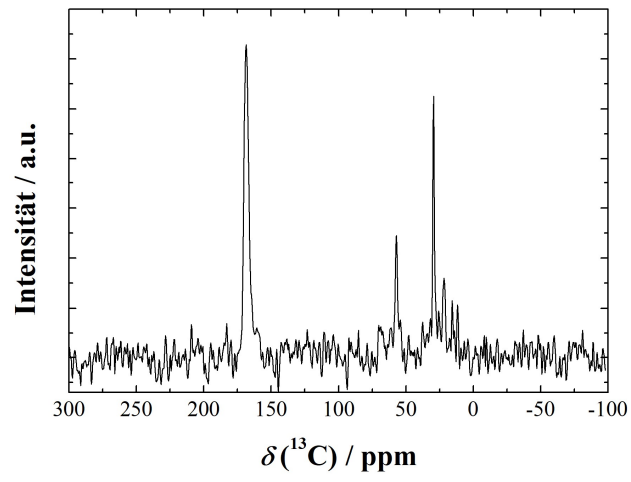
6

Anhang A Abbildungen

6.1. Kapitel 2



6.4. Kapitel 5



7

Anhang B

Verzeichnisse

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 - 1	LaMer Modell. Konzentrationsverlauf einer Fällungsreaktion in Abhängigkeit der Zeit, gegliedert in drei Phasen (I) Linearer Anstieg der Monomerkonzentration (II) Induktionsphase der Keimbildung (III) diffusionskontrolliertes Kristallwachstum.	1
Abb. 1 - 2	Freie Enthalpiediagramm der homogenen Keimbildung nach der klassischen Keimbildungstheorie.	3
Abb. 1 - 3	Heterogene Keimbildung.	5
Abb. 1 - 4	Polymorphismus von Calciumcarbonat. Die Modifikationen sind hinsichtlich der freie Enthalpie geordnet.	7
Abb. 1 - 5	Enthalpiediagramm der 2-Stufen Nukleation.	8
Abb. 1 - 6	Schematische Darstellung des Kristallwachstums nach der klassischen Theorie.	10
Abb. 1 - 7	Nicht-klassisches Kristall-wachstum.	11
Abb. 1 - 8	Hierarchischer Aufbau des Knochens. Die Untergliederung der Organisationsebenen ist schematisch von makroskopischen bis zum atomaren Bereich dargestellt.	20
Abb. 1 - 9	Schematische Darstellung des Remodeling.	22
Abb. 1 - 10	Strukturformeln zur Reduktion von RES zu Resorufin.	28
Abb. 1 - 11	Strukturformeln zur Reduktionsreaktion von INT zum roten Formazanprodukt.	28
Abb. 1 - 12	Sequenzielle Differenzierung anhand von Proliferation und Genexperssion Osteoblasten-spezifischer Proteine nach Owen. ^[109]	29
Abb. 2 - 1	Charakterisierung der synthetisierten Vaterit Nanopartikel. a) FTIR-Spektrum mit den charakteristischen Schwingungsmoden von CO_3^{2-} in Vaterit, b) ^{13}C SP MAS-NMR Spektrum, c) Pulverdiffraktogramm.	39
Abb. 2 - 2	Morphologische Charakterisierung der synthetisierten Vaterit-Nanopartikel mittels a) REM-Aufnahme und b) TEM-Aufnahme.	40
Abb. 2 - 3	Charakterisierung der amorphen Calciumcarbonat-Phase. a) FTIR-Spektrum mit den charakteristischen Schwingungsmoden von CO_3^{2-} in aCC, b) TEM-Aufnahme von aCC mit entsprechendem Beugungsbild. c) ^{13}C MAS-NMR-Spektrum, d) ^1H MAS-NMR-Spektrum.	42
Abb. 2 - 4	TGA-DTA Kurve von aCC mit stabilisierendem Ethylenglykol-Liganden.	43

- Abb. 2 - 5** FTIR-Spektren und TEM-Aufnahmen während der Kristallisation von Calciumcarbonat in Abhängigkeit des Verhältnisses von Ethylenglykol zu Wasser. Aufgenommen zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$, 5 min , 5 h . 44
- Abb. 2 - 6** Kristallisation von aCC in Ethylenglykol/Wasser-Gemisch für verschiedene Wasserkonzentrationen. a) Auswertung der ν_2 -Schwingungsbande zur Bestimmung des kristallinen Anteils. Inset: FTIR-Spektrum 30% (v/v) H_2O , b) FTIR-Spektren der Calciumcarbonate nach 5h Reaktionszeit und Wasseranteilen von 10% (v/v), 30% (v/v), 50% (v/v). 46
- Abb. 2 - 7** Kristallisationsverlauf von amorphem Calciumcarbonat in Ethylenglykol/Wasser (10% (v/v)) und Ultraschallbehandlung für einen Gesamtzeitraum von 30 min. 47
- Abb. 2 - 8** Schematische Darstellung eines möglichen Kristallisationsmechanismus von Vaterit Nanopartikeln ausgehend von Calciumchlorid-Dihydrat und Natriumhydrogencarbonat in Ethylenglykol. 47
- Abb. 2 - 9** Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung zum Nachweis von E-Selektin, getestet an primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). (a) Positiv-Kontrolle: mit $1,0 \mu\text{g/mL}$ LPS stimulierte HUVEC ohne Vaterit, (b) Positiv-Kontrolle: mit $1,0 \mu\text{g/mL}$ LPS stimulierte HUVEC mit Vaterit, (c) Negativ-Kontrolle: unbehandelte HUVEC, (d) mit $250 \mu\text{g/mL}$ Vaterit behandelte HUVEC. E-Selektin wurde mittels Antikörper-Färbung grün markiert. 49
- Abb. 2 - 10** Graphische Darstellung der Zytotoxizitätsassays (RES-Assay: links, LDH-Assay: rechts), getestet an der osteoblastischen Zelllinie MG63. 50
- Abb. 2 - 11** Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von Vaterit Nanopartikel, getestet an osteoblastischen Zellen der Zelllinie MG-63. 52
- Abb. 2 - 12** Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von Vaterit Nanopartikel, getestet an der humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). 53
- Abb. 2 - 13** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens der Osteoblasten-Zelllinie MG63 auf Vaterit-Prüfkörpern. 54
- Abb. 3 - 1** *Ex situ* FTIR-Analyse der synthetisierten Vaterit-Nanopartikel nach Inkubation in SBF (links) und humanem Blutplasma (rechts). 68
- Abb. 3 - 2** *Ex situ* FTIR-Spektren der Inkubationsprodukte nach 7tägiger Inkubation in SBF sowie nach 24 Wochen Inkubation in hBP. 71
- Abb. 3 - 3** Graphische Darstellung des $[\text{PO}_4^{3-}:\text{CO}_3^{2-}]$ -Ionenverhältnisses gegen die Inkubationszeit. Das Verhältnis wurde anhand der Flächen der $\nu_3 + \nu_1$ P-O Streckschwingungen und der ν_3 C-O Streckschwingung ermittelt. Links: Proben aus den Inkubationen in SBF und hBP. Rechts: Standard-Proben mit definierten Massenanteilen an HA und Vaterit. 73
- Abb. 3 - 4** Thermogravimetrische Analyse der Konversionsprodukte nach Inkubation in SBF und hBP, sowie der verwendeten Knochenreferenzprobe. 74

- Abb. 3 - 5** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nach 7tägiger Inkubation in SBF erhaltenen Produkte. 76
- Abb. 3 - 6** a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nach Inkubation in hBP über einen Zeitraum von 6 Monaten erhaltenen Produkte. b) Transelektronenmikroskopische Aufnahme der Probe. 76
- Abb. 3 - 7** Zeitaufgelöste Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nach Inkubation in hBP erhaltenen Produkte. a) 8 Wochen, b) 10 Wochen, c) 12 Wochen, d) 24 Wochen Inkubation in hBP. Graphische Darstellung der REM-EDX-Analyse. 77
- Abb. 3 - 8** Fourier-Transform-Infrarot-Spektrum (FT-IR) der $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ -Schwingungsbande der Konversionsprobe in hBP (6Monate) sowie der Knochenreferenz und die entsprechende Anpassung (blaue Linie). 78
- Abb. 3 - 9** ^{13}C CP-MAS-NMR-Spektren der in hBP inkubierten Probe (6 Monate) sowie des Ausgangsproduktes Vaterit. Das dekonvolvierte Spektrum (rechts) der Inkubationsprobe mit entsprechender Anpassung (blaue Linie) und drei Signalen. 79
- Abb. 3 - 10** ^{31}P -SPE-MAS-NMR-Spektrum (oben, links) der Inkubationsprobe (6 Monate, hBP) sowie der Knochenreferenzprobe. Nach Dekonvolvieren des ^{31}P -SPE-MAS-NMR-Spektrums der Inkubationsprobe zeigt das Signal drei verschiedene elektronische Umgebungen (oben, rechts). ^1H -MAS-NMR-Spektrum der Inkubationsprobe (unten). 80
- Abb. 3 - 11** Antikörper-basierte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von E-Selektin. Getestet an primären Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). (a) pos. Kontrolle, (b) pos. Kontrolle mit 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HCA, (c) neg. Kontrolle, (d) 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HCA. 82
- Abb. 3 - 12** Zytotoxizitätstests. Graphische Darstellung der Ergebnisse des RES-Assay (link) sowie der LDH-Assay (rechts), getestet an der osteoblastischen Zelllinie MG63. 83
- Abb. 3 - 13** Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von HCA Nanopartikel, getestet an der humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). 85
- Abb. 3 - 14** Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen von HCA Nanopartikel, getestet an der humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). 85
- Abb. 4 - 1** Charakterisierung des synthetisierten Hydrogels ausgehend von $(\text{P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE}))$ und PETMP mittels UV-initiiertes Thiol-en-Klickreaktion. FTIR-Spektrum der Edukte sowie des Hydrogels. 95
- Abb. 4 - 2** Charakterisierung des $(\text{P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE}))$ Hydrogels mittels ^1H -NMR-Spektroskopie. 96
- Abb. 4 - 3** FTIR-Spektrum der $(\text{P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE}))$ -Hydrogele ohne und mit Vaterit. 97
- Abb. 4 - 4** a) Bestimmung des Quellgrades Q der $(\text{P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE})\text{-b-PEG-b-P}(\text{G}^{\text{PE}}\text{-co-AGE}))$ Hydrogele ohne und mit Vaterit in SBF über einen Inkubationszeitraum von 48 Stunden. Graphische

Darstellung. b) digitale Aufnahmen der (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE) Hydrogele ohne und mit Vaterit direkt nach der Synthese.	97
Abb. 4 - 5 REM-Aufnahmen der synthetisierten (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE) Hydrogele im gefrier-getrockneten Zustand unmittelbar nach der Synthese. a) (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE) Hydrogel, b) (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE) Hydrogel mit 2,5% (w/v) Vaterit.	99
Abb. 4 - 6 REM-EDX Analyse der mineralischen Phase nach 14d Inkubation in SBF (b), ausgehend von (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE) Hydrogelmatrix mit 2,5% (w/v) Vaterit (a).	100
Abb. 4 - 7 FTIR-Spektren der in SBF inkubierten Vaterit-Hydrogel-Komposite nach unterschiedlicher Inkubationsdauer.	101
Abb. 4 - 8 Diffraktogramme des synthetisierten (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogels (i) , des synthetisierten (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogels mit 2,5% (w/v) Vaterit (ii) und des synthetisierten (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogels mit 2,5% (w/v) Vaterit nach 14tägiger Inkubation in SBF (iii).	102
Abb. 4 - 9 FTIR-Spektrum der synthetisierten (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogele nach 14-tägiger Inkubation in SBF.	103
Abb. 4 - 10 REM-Aufnahmen und REM-EDX Analyse der mineralischen Phase nach 14d Inkubation in SBF, ausgehend von (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogelmatrix ohne Vaterit.	103
Abb. 4 - 11 XPS-Spektrum der (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogelmatrix ohne Vaterit. a) vor der Inkubation ins SBF, b) nach 14-tägiger Inkubation in SBF.	104
Abb. 4 - 12 FTIR-Spektren der (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE)-Hydrogele ohne Vaterit (links) und mit 2,5% (w/v) Vaterit (rechts).	105
Abb. 4 - 13 Graphische Darstellung des Ionenverhältnisses PO ₄ ³⁻ : CO ₃ ²⁻ der Vaterit-beladenen Hydrogele nach 7 Tagen, 14 Tagen, 21 Tagen.	106
Abb. 4 - 14 Antikörper-basierte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von E-Selektin. Getestet an primären Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). (a) pos. Kontrolle, (b) pos. Kontrolle mit 250 µg/mL (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE), (c) neg. Kontrolle, (d) 250 µg/mL mL (P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE).	108
Abb. 4 - 15 Graphische Auswertung der Testverfahren zur Zytotoxizität. RES-Assay (links), LDH-Assay (rechts).	109
Abb. 4 - 16 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE), getestet an der osteoblastären Zelllinie (MG63).	110
Abb. 4 - 17 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von P(G ^{PE} -co-AGE)-b-PEG-b-P(G ^{PE} -co-AGE), getestet an primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC).	111

- Abb. 4 - 18** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität des synthetisierten P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE) - Hydrogel, getestet an der osteoblastären Zelllinie (MG63) und primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). 111
- Abb. 4 - 19** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zelladhärenz und Viabilität von Zellen der Zelllinie MG63 sowie primären Osteoblasten pOB auf den P(G^{PE}-co-AGE)-b-PEG-b-P(G^{PE}-co-AGE)-Hydrogel mit 2,5% (w/v) Vaterit und ohne Vaterit. 113
- Abb. 4 - 20** RES-Assay zum Nachweis der Proliferation der MG63 auf bzw. innerhalb der Hydrogelmatrix. Externe Kalibrierung und Bestimmung der Zellzahl nach einer Kultivierung von 1 Tag, 3 Tagen und 7 Tagen. 114
- Abb. 5 - 1** *Ex situ* FTIR-Analyse der synthetisierten aCC-Partikel hergestellt nach der Vorschrift von Faatz et al.^[26] (links) und BM-aMCC-Partikel (rechts) nach Inkubationszeiten von 6 Stunden bis 168 Stunden (7 Tage). 124
- Abb. 5 - 2** REM-Aufnahmen und REM-EDX-Analyse der mineralischen Phase nach 7-tägiger Inkubation in SBF, ausgehend von aCC-Partikel hergestellt nach der Vorschrift von Faatz et al.^[23]. 125
- Abb. 5 - 3** TEM-Aufnahmen und TEM-EDX-Analyse der mineralischen Phase nach 7d Inkubation in SBF, ausgehend von BM-aMCC-Partikel. 126
- Abb. 5 - 4** *Ex situ* FTIR-Analyse der inkubierten BM-aMCC-Partikel (7 Tage) sowie das FTIR-Spektrum eines humanen Knochens als Referenz-Knochenmineral (links). 127
- Abb. 5 - 5** ¹³C CP-MAS-NMR-Spektren von BM-aMCC vor und nach der 7-tägigen Inkubation in SBF (links) sowie das dekonvolvierte Spektrum (rechts). 128
- Abb. 5 - 6** ¹H-MAS-NMR-Spektren von BM-aMCC vor und nach der 7-tägigen Inkubation in SBF (links) sowie das dekonvolvierte Spektrum. 129
- Abb. 5 - 7** ³¹P-SPE-MAS-NMR-Spektrum (links) und XRPD-Spektrum von BM-aMCC nach 7-tägiger Inkubation in SBF. Nach Dekonvolvieren des ³¹P-SPE-MAS-NMR-Spektrums zeigt das Signal drei verschiedene elektronische Umgebungen. 129
- Abb. 5 - 8** ¹H-³¹P-HETCOR-Spektren von in SBF inkubierten BM-aMCC-Partikel mit kurzen Kontaktzeiten (20 μ s, oben links) und langen Kontaktzeiten (2 ms, oben rechts). Die entsprechenden ¹H-Projektionen sind unterhalb dargestellt. 130
- Abb. 5 - 9** Graphische Auswertung der Testverfahren zur Zytotoxizität. RES-Assay (links), LDH-Assay (rechts). 131
- Abb. 5 - 10** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von BM-aMCC, getestet an der osteoblastären Zelllinie (MG63). 132
- Abb. 5 - 11** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Zellbiokompatibilität von BM-aMCC, getestet an primären Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). Vitale Zellen wurden mittels Calcein-AM angefärbt. Skala: 100 μ m. 133

Abb. 5 - 12 Antikörper-basierte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von E-Selektin. Getestet an primären Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). (a) pos. Kontrolle, (b) pos. Kontrolle mit 250 µg/mL BM-aMCC, (c) neg. Kontrolle, (d) 250 µg/mL mL BM-aMCC. 134

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 - 1	Kristallographische Daten von Vaterit. ^[64]	14
Tab. 1 - 2	Kristallographische Daten von Calcit. ^[69]	15
Tab. 1 - 3	Eigenschaften von biologisch-relevanten Calciumorthosphaten. ^[75]	16
Tab. 1 - 4	Kristallographische Daten von Hydroxylapatit. ^[75,80]	18
Tab. 1 - 5	Zusammensetzung des humanen Knochenminerals.	21
Tab. 1 - 6	Beispielpräparate für natürliche und synthetische KEM. ^[97,100]	25
Tab. 2 - 1	IR-Schwingungsmoden des Calciumcarbonat-Ions für die wasserfreien, kristallinen Calciumcarbonat-Polymorphe und für aCC.	44
Tab. 3 - 1	Ionenstärke der verwendeten Inkubationsmedien.	67
Tab. 3 - 2	Tabellarische Übersicht der gemessenen Zeta-Potentiale von Vaterit sowie der Inkubationsprodukte in SBF und humanem Blutplasma (hBP) zu Beginn und nach vollständiger Konversion.	69
Tab. 3 - 3	Wellenzahl der Bandenmaxima der Referenzsubstanzen HA und humanem Knochen sowie der Inkubationsproben aus SBF (7 Tage) und hBP(6 Monate).	72
Tab. 3 - 4	Tabellarische Übersicht der mittels TGA ermittelten Zusammensetzung der Konversionsprodukte nach Inkubation in SBF und hBP sowie der Knochenreferenzprobe.	74

7.3. Literaturverzeichnis

- [1] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*, Springer-Verlag **2013**.
- [2] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4847.
- [3] F. C. Meldrum, H. Cölfen, *Chemical reviews* **2008**, 108, 4332.
- [4] P. Ehrenfest, *Proc. R. Neth. Acad. Arts Sci* **1933**, 36, 153.
- [5] M. Volmer, A. Weber, *Zeitschrift für physikalische Chemie* **1926**, 119, 277.
- [6] R. B. Heady, J. W. Cahn, *The Journal of Chemical Physics* **1973**, 58, 896.
- [7] G. F. Neilson, M. C. Weinberg, *Journal of Non-Crystalline Solids* **1979**, 34, 137.
- [8] S.-T. Yau, P. G. Vekilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1080.
- [9] H. N. W. Lekkerkerker, A. Stroobants, *Nature* **1998**, 393, 305.
- [10] N. C. Karayiannis, K. Foteinopoulou, M. Laso, *Physical review letters* **2009**, 103, 45703.
- [11] J. J. de Yoreo, P. G. Vekilov, *Reviews in mineralogy and geochemistry* **2003**, 54, 57.
- [12] P. Zhu, Y. Masuda, K. Koumoto, *Biomaterials* **2004**, 25, 3915.
- [13] H. Cölfen, *Nature materials* **2010**, 9, 960.
- [14] W. Ostwald, *Zeitschrift für physikalische Chemie* **1897**, 22, 289.
- [15] J. D. Rodriguez-Blanco, S. Shaw, L. G. Benning, *Nanoscale* **2011**, 3, 265.
- [16] P. G. Vekilov, *Crystal Growth & Design* **2004**, 4, 671.
- [17] P. G. Vekilov, *Nanoscale* **2010**, 2, 2346.
- [18] D. Maes, M. A. Vorontsova, M. A. C. Potenza, T. Sanvito, M. Sleutel, M. Giglio, P. G. Vekilov, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* **2015**, 71, 815.
- [19] M. Shah, O. Galkin, P. G. Vekilov, *The Journal of Chemical Physics* **2004**, 121, 7505.
- [20] B. A. Garetz, J. Matic, A. S. Myerson, *Physical review letters* **2002**, 89, 175501.
- [21] S. E. Wolf, J. Leiterer, V. Pipich, R. Barrea, F. Emmerling, W. Tremel, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 12642.
- [22] S. E. Wolf, L. Müller, R. Barrea, C. J. Kampf, J. Leiterer, U. Panne, T. Hoffmann, F. Emmerling, W. Tremel, *Nanoscale* **2011**, 3, 1158.
- [23] M. A. Bewernitz, D. Gebauer, J. Long, H. Cölfen, L. B. Gower, *Faraday Discussions* **2012**, 159, 291.
- [24] A. S. Posner, F. Betts, *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 273.
- [25] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Advanced Materials* **2003**, 15, 959.
- [26] M. Faatz, F. Gröhn, G. Wegner, *Advanced Materials* **2004**, 16, 996.
- [27] A.-M. El-Sayed, Y. Wimmer, W. Goes, T. Grasser, V. V. Afanas' ev, A. L. Shluger, *Physical Review B* **2015**, 92, 14107.
- [28] J. H. E. Cartwright, A. G. Checa, J. D. Gale, D. Gebauer, C. I. Sainz-Díaz, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 11960.
- [29] M. S. Reddy, *Frontiers in microbiology* **2013**, 4, 314.

- [30] Y. U. T. Gong, C. E. Killian, I. C. Olson, N. P. Appathurai, A. L. Amasino, M. C. Martin, L. J. Holt, F. H. Wilt, P. Gilbert, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 6088.
- [31] Y. Politi, D. R. Batchelor, P. Zaslansky, B. F. Chmelka, J. C. Weaver, I. Sagi, S. Weiner, L. Addadi, *Chemistry of Materials* **2010**, *22*, 161.
- [32] S. Raz, P. C. Hamilton, F. H. Wilt, S. Weiner, L. Addadi, *Advanced Functional Materials* **2003**, *13*, 480.
- [33] L. C. Jacobson, W. Hujo, V. Molinero, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11806.
- [34] E. M. Pouget, P. H. H. Bomans, J. A. Goos, P. M. Frederik, N. A. Sommerdijk, *Science* **2009**, *323*, 1455.
- [35] J. Krug, P. Politi, T. Michely, *Physical Review B* **2000**, *61*, 14037.
- [36] H. Cölfen, S. Mann, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 2350.
- [37] M. Niederberger, H. Cölfen, *Physical chemistry chemical physics* **2006**, *8*, 3271.
- [38] L. Bergström, *Acc. Chem. Res* **2015**, *48*, 1391.
- [39] L. Yang, C. E. Killian, M. Kunz, N. Tamura, P. Gilbert, *Nanoscale* **2011**, *3*, 603.
- [40] W. Kaim, B. Schwederski, A. Klein, *Bioinorganic Chemistry--Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide*, John Wiley & Sons **2013**.
- [41] A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel, *Biom mineralization: from nature to application*, John Wiley & Sons **2008**.
- [42] S. Mann, *Chemie in unserer Zeit* **1986**, *20*, 69.
- [43] S. Mann, *Biomimetic materials chemistry*, John Wiley & Sons **1995**.
- [44] S. V. Dorozhkin, *Biomatter* **2011**, *1*, 121.
- [45] J. Seto, Y. Ma, S. A. Davis, F. Meldrum, A. Gourrier, Y.-Y. Kim, U. Schilde, M. Sztucki, M. Burghammer, S. Maltsev, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 3699.
- [46] Y. Mimran, *Sedimentology* **1977**, *24*, 333.
- [47] T. F. Goreau, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1963**, *109*, 127.
- [48] S. Hild, O. Marti, A. Ziegler, *Journal of structural biology* **2008**, *163*, 100.
- [49] J.-P. Gattuso, M. Frankignoulle, I. Bourge, S. Romaine, R. W. Buddemeier, *Global and Planetary Change* **1998**, *18*, 37.
- [50] R. Lakshminarayanan, X. J. Loh, S. Gayathri, S. Sindhu, Y. Banerjee, R. M. Kini, S. Valiyaveetil, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3202.
- [51] C. Y. Tai, F.-B. Chen, *AIChE Journal* **1998**, *44*, 1790.
- [52] L. Brečević, A. E. Nielsen, *Journal of crystal growth* **1989**, *98*, 504.
- [53] E. Loste, R. M. Wilson, R. Seshadri, F. C. Meldrum, *Journal of crystal growth* **2003**, *254*, 206.
- [54] J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, G. Lambert, *Advanced Materials* **1996**, *8*, 222.
- [55] Y.-Y. Kim, K. Ganesan, P. Yang, A. N. Kulak, S. Borukhin, S. Pechook, L. Ribeiro, R. Kröger, S. J. Eichhorn, S. P. Armes, *Nature materials* **2011**, *10*, 890.
- [56] S. Weiner, I. Sagi, L. Addadi, *Science* **2005**, *309*, 1027.

- [57] L. B. Gower, *Chemical reviews* **2008**, *108*, 4551.
- [58] A. Gal, A. Hirsch, S. Siegel, C. Li, B. Aichmayer, Y. Politi, P. Fratzl, S. Weiner, L. Addadi, *Chemistry—A European Journal* **2012**, *18*, 10262.
- [59] Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **2004**, *306*, 1161.
- [60] M. E. Hodson, L. G. Benning, B. Demarchi, K. E. H. Penkman, J. D. Rodriguez-Blanco, P. F. Schofield, E. A. A. Versteegh, *Geochemical transactions* **2015**, *16*, 1.
- [61] L. Gago-Duport, M. J. Briones, J. B. Rodríguez, B. Covelo, *Journal of structural biology* **2008**, *162*, 422.
- [62] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *Advanced Functional Materials* **2002**, *12*, 43.
- [63] A. G. Christy, *Crystal Growth & Design* **2017**, *17*, 3567.
- [64] E. Mugnaioli, I. Andrusenko, T. Schüler, N. Loges, R. E. Dinnebier, M. Panthöfer, W. Tremel, U. Kolb, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 7041.
- [65] L. N. Plummer, E. Busenberg, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1982**, *46*, 1011.
- [66] S. E. Grasby, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2003**, *67*, 1659.
- [67] H. A. Lowenstam, D. P. Abbott, *Science* **1975**, *188*, 363.
- [68] S. Berland, Y. Ma, A. Marie, J.-P. Andrieu, L. Bedouet, Q. Feng, *Protein and peptide letters* **2013**, *20*, 1170.
- [69] H. Sitepu, B. H. O'Connor, D. Li, *Journal of Applied Crystallography* **2005**, *38*, 158.
- [70] T. Baird, S. E. Solomon, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1979**, *36*, 295.
- [71] E. Vander Putten, F. Dehairs, E. Keppens, W. Baeyens, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2000**, *64*, 997.
- [72] H. Takano, H. Furu-une, J. G. Burgess, E. Manabe, M. Hirano, M. Okazaki, T. Matsunaga, *Applied biochemistry and biotechnology* **1993**, *39*, 159.
- [73] M. G. Weinbauer, F. Brandstätter, B. Velimirov, *Marine Biology* **2000**, *137*, 801.
- [74] L. C. Chow, *Dental materials journal* **2009**, *28*, 1.
- [75] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 3130.
- [76] C. Combes, C. Rey, *Acta biomaterialia* **2010**, *6*, 3362.
- [77] S. V. Dorozhkin, *Acta biomaterialia* **2010**, *6*, 4457.
- [78] E. D. Eanes, *Monogr Oral Sci* **2001**, *18*, 130.
- [79] J. Puech, J.-C. Heughebaert, G. Montel, *Journal of crystal growth* **1982**, *56*, 20.
- [80] J. C. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier **2013**.
- [81] J. M. Delgado-López, M. Iafisco, I. Rodríguez, A. Tampieri, M. Prat, J. Gómez-Morales, *Acta biomaterialia* **2012**, *8*, 3491.
- [82] M. E. Fleet, X. Liu, P. L. King, *American Mineralogist* **2004**, *89*, 1422.
- [83] G. Kühn, W. H. Nebergall, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **1963**, *324*, 313.

- [84] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On biomineralization*, Oxford University Press on Demand **1989**.
- [85] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, M. J. Buehler, *Nature communications* **2013**, *4*, 1.
- [86] J. C. Crockett, M. J. Rogers, F. P. Coxon, L. J. Hocking, M. H. Helfrich, *Journal of cell science* **2011**, *124*, 991.
- [87] M. J. Glimcher, *Reviews in mineralogy and geochemistry* **2006**, *64*, 223.
- [88] S. von Euw, Y. Wang, G. Laurent, C. Drouet, F. Babonneau, N. Nassif, T. Azais, *Scientific reports* **2019**, *9*, 1.
- [89] M. S. Tung, W. E. Brown, *Calcified tissue international* **1985**, *37*, 329.
- [90] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M. J. Glimcher, *Osteoporosis International* **2009**, *20*, 1013.
- [91] C. Rey, J. L. Miquel, L. Facchini, A. P. Legrand, M. J. Glimcher, *Bone* **1995**, *16*, 583.
- [92] M. J. Glimcher, *Reviews of Modern Physics* **1959**, *31*, 359.
- [93] N. Reznikov, M. Bilton, L. Lari, M. M. Stevens, R. Kröger, *Science* **2018**, 360.
- [94] H. M. Frost, *Clinical orthopaedics and related research* **1989**.
- [95] X. Feng, J. M. McDonald, *Annual review of pathology* **2011**, *6*, 121.
- [96] J. A. Gasser, M. Kneissel, in *Bone Toxicology* (Eds.: S. Y. Smith, A. Varela, R. Samadfam), Springer International Publishing. Cham **2017**, p. 27.
- [97] R. Smeets, H. Hanken, O. Jung, D. Rothamel, J. Handschel, A. Al-Dam, M. Blessmann, M. Heiland, A. Kolk, *Der MKG-Chirurg* **2014**, *7*, 53.
- [98] S. N. Parikh, *Journal of postgraduate medicine* **2002**, *48*, 142.
- [99] L. Claes, I. Höllen, A. Ignatius, *Der Orthopade* **1997**, *26*, 459.
- [100] H. F. Sailer, F. E. Weber, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie MKG* **2000**, *4 Suppl 1*, S384-91.
- [101] G. Hermey, C. Mahlke, M. Schwake, T. Sommer, *Der Experimentator: Neurowissenschaften*, Springer-Verlag **2010**.
- [102] E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, J. R. Ralphs, R. G. Richards, J. S. Hayes, *Journal of biomedical materials research Part A* **2014**, *102*, 2636.
- [103] E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, R. G. Richards, J. S. Hayes, *Eur Cell Mater* **2012**, *24*, 1.
- [104] B. E. Sumpio, J. T. Riley, A. Dardik, *The international journal of biochemistry & cell biology* **2002**, *34*, 1508.
- [105] R. E. Unger, K. Peters, A. Sartoris, C. Freese, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2014**, *35*, 3180.
- [106] R. E. Unger, K. Peters, Q. Huang, A. Funk, D. Paul, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3461.
- [107] R. E. Unger, *Adv. Biomater. Devices Med.* **2014**.
- [108] Promega, *Promega Tech. Bull.* **2016**, *7*, 1.
- [109] T. A. Owen, M. Aronow, V. Shalhoub, L. M. Barone, L. Wilming, M. S. Tassinari, M. B. Kennedy, S. Pockwinse, J. B. Lian, G. S. Stein, *Journal of cellular physiology* **1990**, *143*, 420.

- [110] F. Marin, I. Bundeleva, T. Takeuchi, F. Immel, D. Medakovic, *Journal of structural biology* **2016**, *196*, 98.
- [111] T. Mass, A. J. Giuffre, C.-Y. Sun, C. A. Stiffler, M. J. Frazier, M. Neder, N. Tamura, C. V. Stan, M. A. Marcus, P. U. P. A. Gilbert, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2017**, *114*, E7670-E7678.
- [112] J. W. Morse, R. S. Arvidson, A. Lüttge, *Chemical reviews* **2007**, *107*, 342.
- [113] S. L. P. Wolf, K. Jähme, D. Gebauer, *CrystEngComm* **2015**, *17*, 6857.
- [114] D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen, *Science* **2008**, *322*, 1819.
- [115] C. Rodriguez-Navarro, K. Kudłacz, Ö. Cizer, E. Ruiz-Agudo, *CrystEngComm* **2015**, *17*, 58.
- [116] P. Bots, L. G. Benning, J.-D. Rodriguez-Blanco, T. Roncal-Herrero, S. Shaw, *Crystal Growth & Design* **2012**, *12*, 3806.
- [117] S. E. Wolf, J. Leiterer, M. Kappl, F. Emmerling, W. Tremel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12342.
- [118] V. Pipich, M. Balz, S. E. Wolf, W. Tremel, D. Schwahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6879.
- [119] S. Bentov, P. Zaslansky, A. Al-Sawalmih, A. Masic, P. Fratzl, A. Sagi, A. Berman, B. Aichmayer, *Nature communications* **2012**, *3*, 1.
- [120] C. J. S. Ibsen, D. Chernyshov, H. Birkedal, *Chemistry—A European Journal* **2016**, *22*, 12347.
- [121] R. Schröder, H. Pohlit, T. Schüler, M. Panthöfer, R. E. Unger, H. Frey, W. Tremel, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 7079.
- [122] H. Maeda, V. Maquet, T. Kasuga, Q. Z. Chen, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2007**, *18*, 2269.
- [123] J. Jiang, Y. Wu, C. Chen, X. Wang, H. Zhao, S. Xu, C. Yang, B. Xiao, *Advanced Powder Technology* **2018**, *29*, 2416.
- [124] A. Declat, E. Reyes, O. M. Suárez, *Reviews on Advanced Materials Science* **2016**, *44*.
- [125] F. C. Donnelly, F. Purcell-Milton, V. Framont, O. Cleary, P. W. Dunne, Y. K. Gun'ko, *Chemical Communications* **2017**, *53*, 6657.
- [126] S. Kim, C. B. Park, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6628.
- [127] D. B. Trushina, T. V. Bukreeva, M. N. Antipina, *Crystal Growth & Design* **2016**, *16*, 1311.
- [128] B. Njegić-Džakula, G. Falini, L. Brečević, Ž. Skoko, D. Kralj, *Journal of colloid and interface science* **2010**, *343*, 553.
- [129] Y. Mori, T. Enomae, A. Isogai, *Materials Science and Engineering: C* **2009**, *29*, 1409.
- [130] Q. Li, Y. Ding, F. Li, B. Xie, Y. Qian, *Journal of crystal growth* **2002**, *236*, 357.
- [131] T. Schüler, W. Tremel, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 5208.
- [132] E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, C. R. Minick, *The Journal of clinical investigation* **1973**, *52*, 2745.
- [133] K. Peters, H. Schmidt, R. E. Unger, M. Otto, G. Kamp, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3413.

- [134] F. A. Andersen, L. Brecevic, *Acta Chem. Scand* **1991**, *45*, 1018.
- [135] J. Wang, U. Becker, *American Mineralogist* **2009**, *94*, 380.
- [136] D. Gebauer, P. N. Gunawidjaja, J. Y. P. Ko, Z. Bacsik, B. Aziz, L. Liu, Y. Hu, L. Bergström, C.-W. Tai, T.-K. Sham, M. Edén, N. Hedin, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2010**, *49*, 8889.
- [137] F. M. Michel, J. MacDonald, J. Feng, B. L. Phillips, L. Ehm, C. Tarabrella, J. B. Parise, R. J. Reeder, *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 4720.
- [138] H. Nebel, M. Neumann, C. Mayer, M. Epple, *Inorganic Chemistry* **2008**, *47*, 7874.
- [139] S. Leukel, M. Panthöfer, M. Mondeshki, G. Kieslich, Y. Wu, N. Krautwurst, W. Tremel, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14638.
- [140] M. P. Schmidt, A. J. Ilott, B. L. Phillips, R. J. Reeder, *Crystal Growth & Design* **2014**, *14*, 938.
- [141] C. Jäger, H. Cölfen, *CrystEngComm* **2007**, *9*, 1237.
- [142] J. Feng, Y. J. Lee, R. J. Reeder, B. L. Phillips, *American Mineralogist* **2006**, *91*, 957.
- [143] P. Opitz, M. P. Asta, A. Fernandez-Martinez, M. Panthöfer, A. Kabelitz, F. Emmerling, M. Mondeshki, W. Tremel, *Crystal Growth & Design* **2020**, *20*, 6831.
- [144] V. G. Dubrovskii, *Nucleation theory and growth of nanostructures*, Springer **2014**.
- [145] J. Ihli, W. C. Wong, E. H. Noel, Y.-Y. Kim, A. N. Kulak, H. K. Christenson, M. J. Duer, F. C. Meldrum, *Nature communications* **2014**, *5*, 1.
- [146] G. Busca, V. Lorenzelli, *Materials Chemistry* **1982**, *7*, 89.
- [147] H. Li, H. Li, Z. Guo, Y. Liu, *Ultrasonics sonochemistry* **2006**, *13*, 359.
- [148] L.-H. Fu, Y.-Y. Dong, M.-G. Ma, W. Yue, S.-L. Sun, R.-C. Sun, *Ultrasonics sonochemistry* **2013**, *20*, 1188.
- [149] E. M. Flaten, M. Seiersten, J.-P. Andreassen, *Chemical Engineering Research and Design* **2010**, *88*, 1659.
- [150] P. Wang, J. J. Kosinski, A. Anderko, R. D. Springer, M. M. Lencka, J. Liu, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 15968.
- [151] T. Sun, A. S. Teja, *J. Chem. Eng. Data* **2003**, *48*, 198.
- [152] S. Mann, *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*, Oxford University Press on Demand **2001**.
- [153] J. Aizenberg, J. C. Weaver, M. S. Thanawala, V. C. Sundar, D. E. Morse, P. Fratzl, *Science* **2005**, *309*, 275.
- [154] L. Addadi, S. Weiner, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1992**, *31*, 153.
- [155] R. Z. LeGeros, *Clin Orthop Relat Res* **2002**, *395*, 81.
- [156] T. A. Taton, *Nature* **2001**, *412*, 491.
- [157] S. Weiner, H. D. Wagner, *Annual review of materials science* **1998**, *28*, 271.
- [158] A. L. Boskey, R. Coleman, *Journal of dental research* **2010**, *89*, 1333.

- [159] M. P. Bevilacqua, J. S. Pober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran, M. A. Gimbrone, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84*, 9238.
- [160] F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, *Thermochimica Acta* **2000**, *361*, 131.
- [161] W. Suchanek, M. Yoshimura, *Journal of Materials Research* **1998**, *13*, 94.
- [162] T. Kokubo, *Acta materialia* **1998**, *46*, 2519.
- [163] K. Ogata, S. Imazato, A. Ehara, S. Ebisu, Y. Kinomoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, *Journal of biomedical materials research Part A* **2005**, *72*, 127.
- [164] J.-S. Sun, H.-C. Liu, W. Hong-Shong Chang, J. Li, F.-H. Lin, H.-C. Tai, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* **1998**, *39*, 390.
- [165] J. Wang, J. de Boer, K. de Groot, *Journal of biomedical materials research Part A* **2009**, *90*, 664.
- [166] T. Okuda, K. Ioku, I. Yonezawa, H. Minagi, G. Kawachi, Y. Gonda, H. Murayama, Y. Shibata, S. Minami, S. Kamihira, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2612.
- [167] A. Ehara, K. Ogata, S. Imazato, S. Ebisu, T. Nakano, Y. Umakoshi, *Biomaterials* **2003**, *24*, 831.
- [168] S. V. Dorozhkin, *Int. J. Mater. Chem* **2012**, *2*, 19.
- [169] L. L. Hench, *Journal of the american ceramic society* **1991**, *74*, 1487.
- [170] L. L. Hench, J. M. Polak, *Science* **2002**, *295*, 1014.
- [171] L. L. Hench, I. D. Xynos, J. M. Polak, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2004**, *15*, 543.
- [172] H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, M. Ueda, *Science and Technology of Advanced Materials* **2005**, *6*, 48.
- [173] M. Neo, T. Nakamura, C. Ohtsuki, T. Kokubo, T. Yamamuro, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* **1993**, *27*, 999.
- [174] Y. Doi, T. Shibusaki, Y. Moriwaki, T. Kajimoto, Y. Iwayama, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* **1998**, *39*, 603.
- [175] B. R. Adams, A. Mostafa, Z. Schwartz, B. D. Boyan, *Journal of biomedical materials research Part A* **2014**, *102*, 3237.
- [176] L. Borkowski, A. Sroka-Bartnicka, P. Drączkowski, A. Ptak, E. Zięba, A. Ślósarczyk, G. Ginalska, *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *62*, 260.
- [177] H. Kaneko, H. Sasaki, S. Honma, T. Hayakawa, M. Sato, Y. Yajima, M. Yoshinari, *Dental materials journal* **2014**, *33*, 39.
- [178] S. Li, W. Yu, W. Zhang, G. Zhang, L. Yu, E. Lu, *International journal of nanomedicine* **2018**, *13*, 3643.

- [179] R. Schröder, L. Besch, H. Pohlit, M. Panthöfer, W. Roth, H. Frey, W. Tremel, R. E. Unger, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2018**, *12*, 1754.
- [180] T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907.
- [181] L. Müller, F. A. Müller, *Acta biomaterialia* **2006**, *2*, 181.
- [182] M. Bohner, J. Lemaitre, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2175.
- [183] M. Asadollahzadeh, S. M. Rabiee, H. Salimi-Kenari, *International Journal of Applied Ceramic Technology* **2019**, *16*, 1969.
- [184] J. R. Dorvee, A. L. Boskey, L. A. Estroff, *CrystEngComm* **2012**, *14*, 5681.
- [185] S. Koutsopoulos, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* **2002**, *62*, 600.
- [186] L. Shen, S. Tenzer, W. Storck, D. Hobernik, V. K. Raker, K. Fischer, S. Decker, A. Dzionek, S. Krauthäuser, M. Diken, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2018**, *142*, 1558.
- [187] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nature nanotechnology* **2012**, *7*, 779.
- [188] J. Simon, G. Kuhn, M. Fichter, S. Gehring, K. Landfester, V. Mailänder, *Cells* **2021**, *10*.
- [189] P. C. Ke, S. Lin, W. J. Parak, T. P. Davis, F. Caruso, *ACS nano* **2017**, *11*, 11773.
- [190] M. M. Yallapu, N. Chauhan, S. F. Othman, V. Khalilzad-Sharghi, M. C. Ebeling, S. Khan, M. Jaggi, S. C. Chauhan, *Biomaterials* **2015**, *46*, 1.
- [191] M. P. Monopoli, A. S. Pitek, I. Lynch, K. A. Dawson, in *Nanomaterial interfaces in biology*, Springer **2013**, p. 137.
- [192] A. Heiss, A. DuChesne, B. Denecke, J. Grötzinger, K. Yamamoto, T. Renné, W. Jahnen-Dechent, *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 13333.
- [193] L. Addadi, S. Weiner, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82*, 4110.
- [194] C. Schäfer, A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Müller-Esterl, T. Schinke, W. Jahnen-Dechent, *The Journal of clinical investigation* **2003**, *112*, 357.
- [195] J. D. Termine, A. S. Posner, *Nature* **1966**, *211*, 268.
- [196] N. C. Blumenthal, F. Betts, A. S. Posner, *Calcified tissue research* **1975**, *18*, 81.
- [197] C. B. Baddiel, E. E. Berry, *Spectrochimica Acta* **1966**, *22*, 1407.
- [198] A. C. Tas, *Biomaterials* **2000**, *21*, 1429.
- [199] D. Eichert, *Nanocrystalline apatite-based biomaterials*, Nova Science Publishers **2009**.
- [200] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, A. Lebugle, H. Sfihi, A. Barroug, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2007**, *38*, 996.
- [201] J. B. Kendall, *Biomaterials Research Advances*, Nova Publishers **2007**.
- [202] L. G. P. Soares, A. M. C. Marques, M. G. Guarda, J. M. S. Aciole, A. S. Andrade, A. L. B. Pinheiro, L. Silveira, *Lasers in medical science* **2014**, *29*, 1927.
- [203] H. el Feki, C. Rey, M. Vignoles, *Calcified tissue international* **1991**, *49*, 269.
- [204] M. Wang, R. Qian, M. Bao, C. Gu, P. Zhu, *Materials Letters* **2018**, *210*, 203.

- [205] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I. R. Dickson, M. J. Glimcher, *Calcified tissue international* **1989**, *45*, 157.
- [206] A. S. Posner, *Clinical orthopaedics and related research* **1985**, *2000*, 87.
- [207] R. Z. LeGeros, in *Hydroxyapatite and related materials*, CRC press **2017**, p. 3.
- [208] S. Kudo, H. Ogawa, E. Yamakita, S. Watanabe, T. Suzuki, S. Nakashima, *Applied spectroscopy* **2017**, *71*, 1621.
- [209] G. Daculsi, *Biomaterials* **1998**, *19*, 1473.
- [210] L. C. Palmer, C. J. Newcomb, S. R. Kaltz, E. D. Spoerke, S. I. Stupp, *Chemical reviews* **2008**, *108*, 4754.
- [211] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, L. B. Gower, *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2007**, *58*, 77.
- [212] A. Adamiano, D. Fabbri, G. Falini, M. G. Belcastro, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2013**, *100*, 173.
- [213] A. Porter, N. Patel, R. Brooks, S. Best, N. Rushton, W. Bonfield, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2005**, *16*, 899.
- [214] D. M. Ibrahim, A. A. Mostafa, S. I. Korowash, *Chemistry Central Journal* **2011**, *5*, 1.
- [215] T. Gassmann, *1437-4315* **1928**.
- [216] L. A. Romo, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3924.
- [217] D. G. Nelson, J. D. Featherstone, *Calcified tissue international* **1982**, *34*, S69-81.
- [218] M. Vignoles, G. Bonel, D. W. Holcomb, R. A. Young, *Calcified tissue international* **1988**, *43*, 33.
- [219] J. Barralet, S. Best, W. Bonfield, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* **1998**, *41*, 79.
- [220] H. El Feki, J. M. Savariault, A. B. Salah, M. Jemal, *Solid State Sciences* **2000**, *2*, 577.
- [221] O. F. Yasar, W.-C. Liao, R. Mathew, Y. Yu, B. Stevansson, Y. Liu, Z. Shen, M. Edén, *The Journal of Physical Chemistry C* **2021**, *125*, 10572.
- [222] R. Z. LeGeros, O. R. Trautz, E. Klein, J. P. LeGeros, *Experientia* **1969**, *25*, 5.
- [223] A. C. Deymier, A. K. Nair, B. Depalle, Z. Qin, K. Arcot, C. Drouet, C. H. Yoder, M. J. Buehler, S. Thomopoulos, G. M. Genin, *Biomaterials* **2017**, *127*, 75.
- [224] F. C. Driessens, R. M. Verbeeck, H. J. Heijligers, *Inorganica Chimica Acta* **1983**, *80*, 19.
- [225] R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, R. I. Smith, *Biomaterials* **2004**, *25*, 2205.
- [226] D. Laurencin, A. Wong, W. Chrzanowski, J. C. Knowles, D. Qiu, D. M. Pickup, R. J. Newport, Z. Gan, M. J. Duer, M. E. Smith, *Physical chemistry chemical physics* **2010**, *12*, 1081.
- [227] O. F. Yasar, W.-C. Liao, B. Stevansson, M. Edén, *The Journal of Physical Chemistry C* **2021**, *125*, 4675.
- [228] J. D. Termine, Lundy, *Calcified tissue international* **1973**, *13*, 73.

- [229] G. Montel, G. Bonel, J. C. Heughebaert, J. C. Trombe, C. Rey, *Journal of crystal growth* **1981**, 53, 74.
- [230] K. Beshah, C. Rey, M. J. Glimcher, M. Schimizu, R. G. Griffin, *Journal of Solid State Chemistry* **1990**, 84, 71.
- [231] N. Nassif, F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, M.-M. Giraud-Guille, *Chemistry of Materials* **2010**, 22, 3653.
- [232] C. Leroy, F. Aussenac, L. Bonhomme-Coury, A. Osaka, S. Hayakawa, F. Babonneau, C. Coelho-Diogo, C. Bonhomme, *Analytical chemistry* **2017**, 89, 10201.
- [233] H. E. Mason, A. Kozlowski, B. L. Phillips, *Chemistry of Materials* **2008**, 20, 294.
- [234] Y. Wang, S. von Euw, F. M. Fernandes, S. Cassaignon, M. Selmane, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, C. Coelho, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, *Nature materials* **2013**, 12, 1144.
- [235] P. Regnier, A. C. Lasaga, R. A. Berner, O. H. Han, K. W. Zilm, *American Mineralogist* **1994**, 79, 809.
- [236] P. Opitz, L. Besch, M. Panthöfer, A. Kabelitz, R. E. Unger, F. Emmerling, M. Mondeshki, W. Tremel, *Advanced Functional Materials* **2021**, 31, 2007830.
- [237] Y. Wang, S. von Euw, G. Laurent, C. Crevant, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, N. Nassif, T. Azaïs, *Mater. Horiz.* **2014**, 1, 224.
- [238] J.-D. P. McElderry, P. Zhu, K. H. Mroue, J. Xu, B. Pavan, M. Fang, G. Zhao, E. McNerny, D. H. Kohn, R. T. Franceschi, *Journal of Solid State Chemistry* **2013**, 206, 192.
- [239] C. Turdean-Ionescu, B. Stevansson, J. Grins, I. Izquierdo-Barba, A. Garcia, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén, *RSC advances* **2015**, 5, 86061.
- [240] K. S. K. Lin, Y.-H. Tseng, Y. Mou, Y.-C. Hsu, C.-M. Yang, J. C. C. Chan, *Chemistry of Materials* **2005**, 17, 4493.
- [241] P. N. Gunawidjaja, A. Y. H. Lo, I. Izquierdo-Barba, A. Garcia, D. Arcos, B. Stevansson, J. Grins, M. Vallet-Regí, M. Edén, *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, 114, 19345.
- [242] M. Ben Osman, S. Diallo-Garcia, V. Herledan, D. Brouri, T. Yoshioka, J. Kubo, Y. Millot, G. Costentin, *The Journal of Physical Chemistry C* **2015**, 119, 23008.
- [243] M. I. Santos, S. Fuchs, M. E. Gomes, R. E. Unger, R. L. Reis, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2007**, 28, 240.
- [244] E. McNally, F. Nan, G. A. Botton, H. P. Schwarcz, *Micron* **2013**, 49, 46.
- [245] N. Kondo, A. Ogose, K. Tokunaga, H. Umezū, K. Arai, N. Kudo, M. Hoshino, H. Inoue, H. Irie, K. Kuroda, *Biomaterials* **2006**, 27, 4419.
- [246] J. Eyckmans, S. J. Roberts, J. Schrooten, F. P. Luyten, *Journal of cellular and molecular medicine* **2010**, 14, 1845.
- [247] D. Riccardi, G. Gamba, *Archives of medical research* **1999**, 30, 436.
- [248] D. Tadic, M. Epple, *Biomaterials* **2004**, 25, 987.

- [249] G. P. Jayaswal, S. P. Dange, an Khalikar, *The Journal of Indian Prosthodontic Society* **2010**, *10*, 8.
- [250] J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337.
- [251] T. E. L. Douglas, P. B. Messersmith, S. Chasan, A. G. Mikos, E. L. W. de Mulder, G. Dickson, D. Schaubroeck, L. Balcaen, F. Vanhaecke, P. Dubruel, *Macromolecular bioscience* **2012**, *12*, 1077.
- [252] V. B. Bueno, R. Bentini, L. H. Catalani, L. R. S. Barbosa, D. F. S. Petri, *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *37*, 195.
- [253] C. Lee, J. Shin, J. S. Lee, E. Byun, J. H. Ryu, S. H. Um, D.-I. Kim, H. Lee, S.-W. Cho, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2004.
- [254] J.-Y. Sun, X. Zhao, W. R. K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K. H. Oh, D. J. Mooney, J. J. Vlassak, Z. Suo, *Nature* **2012**, *489*, 133.
- [255] H. Tan, K. G. Marra, *Materials* **2010**, *3*, 1746.
- [256] S. Mantha, S. Pillai, P. Khayambashi, A. Upadhyay, Y. Zhang, O. Tao, H. M. Pham, S. D. Tran, *Materials* **2019**, *12*, 3323.
- [257] K. Lee, E. A. Silva, D. J. Mooney, *Journal of the Royal Society Interface* **2011**, *8*, 153.
- [258] M. Kikuchi, H. N. Matsumoto, T. Yamada, Y. Koyama, K. Takakuda, J. Tanaka, *Biomaterials* **2004**, *25*, 63.
- [259] R. Kniep, P. Simon, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 1405.
- [260] J. Sun, H. Tan, *Materials* **2013**, *6*, 1285.
- [261] L. Xing, J. Sun, H. Tan, G. Yuan, J. Li, Y. Jia, D. Xiong, G. Chen, J. Lai, Z. Ling, *International journal of biological macromolecules* **2019**, *127*, 340.
- [262] H. Tlatlik, P. Simon, A. Kawska, D. Zahn, R. Kniep, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1905.
- [263] D. G. Wallace, J. Rosenblatt, *Advanced drug delivery reviews* **2003**, *55*, 1631.
- [264] R. M. Nerem, D. Seliktar, *Annual review of biomedical engineering* **2001**, *3*, 225.
- [265] J. M. Orban, L. B. Wilson, J. A. Kofroth, M. S. El-Kurdi, T. M. Maul, D. A. Vorp, *Journal of biomedical materials research Part A* **2004**, *68*, 756.
- [266] R. Chen, J. A. Hunt, *Journal of Materials Chemistry* **2007**, *17*, 3974.
- [267] I. Gibas, H. Janik **2010**.
- [268] A. S. Hoffman, *Advanced drug delivery reviews* **2012**, *64*, 18.
- [269] J. A. Beamish, J. Zhu, K. Kottke-Marchant, R. E. Marchant, *Journal of biomedical materials research Part A* **2010**, *92*, 441.
- [270] J. A. Hubbell, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **1998**, *3*, 246.
- [271] A. Metters, J. Hubbell, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 290.
- [272] H. Shih, C.-C. Lin, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2003.

- [273] Y. Park, M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, E. B. Hunziker, M. Wong, *Tissue engineering* **2004**, *10*, 515.
- [274] C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nature materials* **2009**, *8*, 659.
- [275] M. Malkoch, R. Vestberg, N. Gupta, L. Mespouille, P. Dubois, A. F. Mason, J. L. Hedrick, Q. Liao, C. W. Frank, K. Kingsbury, *Chemical Communications* **2006**.
- [276] B.-H. Hu, J. Su, P. B. Messersmith, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2194.
- [277] J. Su, *Gels* **2018**, *4*, 72.
- [278] T. J. Sanborn, P. B. Messersmith, A. E. Barron, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2703.
- [279] M. Ehrbar, S. C. Rizzi, R. G. Schoenmakers, B. San Miguel, J. A. Hubbell, F. E. Weber, M. P. Lutolf, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3000.
- [280] M. Ehrbar, S. C. Rizzi, R. Hlushchuk, V. Djonov, A. H. Zisch, J. A. Hubbell, F. E. Weber, M. P. Lutolf, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3856.
- [281] N. A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J. H. Ward, J. Zhang, *Annual review of biomedical engineering* **2000**, *2*, 9.
- [282] N. A. Peppas, K. B. Keys, M. Torres-Lugo, A. M. Lowman, *Journal of controlled release* **1999**, *62*, 81.
- [283] S. A. Schoonraad, M. L. Trombold, S. J. Bryant, *Biomacromolecules* **2021**.
- [284] X. He, J. Ma, E. Jabbari, *Langmuir* **2008**, *24*, 12508.
- [285] S. H. Park, J. S. Kwon, B. S. Lee, J. H. Park, B. K. Lee, J.-H. Yun, B. Y. Lee, J. H. Kim, B. H. Min, T. H. Yoo, *Scientific reports* **2017**, *7*, 1.
- [286] J. J. Roberts, S. J. Bryant, *Biomaterials* **2013**, *34*, 9969.
- [287] J. I. Paez, A. Farrukh, R. Valbuena-Mendoza, M. K. Włodarczyk-Biegun, A. Del Campo, *ACS applied materials & interfaces* **2020**, *12*, 8062.
- [288] J. Simon, T. Wolf, K. Klein, K. Landfester, F. R. Wurm, V. Mailänder, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 5548.
- [289] N. A. Alcantar, E. S. Aydil, J. N. Israelachvili, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* **2000**, *51*, 343.
- [290] J. H. Lee, H. B. Lee, J. D. Andrade, *Progress in polymer science* **1995**, *20*, 1043.
- [291] S. Schöttler, G. Becker, S. Winzen, T. Steinbach, K. Mohr, K. Landfester, V. Mailänder, F. R. Wurm, *Nature nanotechnology* **2016**, *11*, 372.
- [292] A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, J. P. Vacanti, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 2480.
- [293] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chemical reviews* **2001**, *101*, 1869.
- [294] A.-K. Danner, S. Schöttler, E. Alexandrino, S. Hammer, K. Landfester, V. Mailänder, S. Morsbach, H. Frey, F. R. Wurm, *Macromolecular bioscience* **2019**, *19*, 1800468.
- [295] E. M. Czekanska, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *740*, 27.

- [296] J. He, M. Zhang, P. Ni, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6033.
- [297] J. A. Benton, C. A. DeForest, V. Vivekanandan, K. S. Anseth, *Tissue Engineering Part A* **2009**, *15*, 3221.
- [298] J. R. Xavier, T. Thakur, P. Desai, M. K. Jaiswal, N. Sears, E. Cosgriff-Hernandez, R. Kaunas, A. K. Gaharwar, *ACS nano* **2015**, *9*, 3109.
- [299] H. D. Kim, E. A. Lee, Y.-H. An, S. L. Kim, S. S. Lee, S. J. Yu, H. L. Jang, K. T. Nam, S. G. Im, N. S. Hwang, *ACS applied materials & interfaces* **2017**, *9*, 21639.
- [300] N. Annabi, J. W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, F. Dehghani, *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2010**, *16*, 371.
- [301] D. Baksh, J. E. Davies, S. Kim, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1998**, *9*, 743.
- [302] S. J. Lee, I. W. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, G. Khang, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2004**, *15*, 1003.
- [303] S. Nehrer, H. A. Breinan, A. Ramappa, G. Young, S. Shortkroff, L. K. Louie, C. B. Sledge, I. V. Yannas, M. Spector, *Biomaterials* **1997**, *18*, 769.
- [304] R. M. Pilliar, J. M. Lee, C. Maniopoulos, *Clinical orthopaedics and related research* **1986**.
- [305] J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister, S. Das, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4817.
- [306] S. Koltzenburg, M. Maskos, O. Nuyken (Eds.), *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2014**.
- [307] L. E. Alexander **1979**.
- [308] F. J. Balta-Calleja, C. G. Vonk, *X-ray scattering of synthetic polymers*, Elsevier Science Limited **1989**.
- [309] R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. Dowker, *American Mineralogist* **1999**, *84*, 1406.
- [310] E. Zimmerman, B. Geiger, L. Addadi, *Biophysical journal* **2002**, *82*, 1848.
- [311] B. Finke, F. Luethen, K. Schroeder, P. D. Mueller, C. Bergemann, M. Frant, A. Ohl, B. J. Nebe, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4521.
- [312] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, A. J. Garcia, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 5953.
- [313] G. B. Schneider, A. English, M. Abraham, R. Zaharias, C. Stanford, J. Keller, *Biomaterials* **2004**, *25*, 3023.
- [314] B. Reid, M. Gibson, A. Singh, J. Taube, C. Furlong, M. Murcia, J. Elisseeff, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2015**, *9*, 315.
- [315] A. D. Lynn, T. R. Kyriakides, S. J. Bryant, *Journal of biomedical materials research Part A* **2010**, *93*, 941.
- [316] R. Kramme, *Medizintechnik: Verfahren, systeme, informationsverarbeitung*, Springer, Berlin, New York **2011**.

- [317] J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 32.
- [318] K. Nitiputri, Q. M. Ramasse, H. Autefage, C. M. McGilvery, S. Boonrungsiman, N. D. Evans, M. M. Stevens, A. E. Porter, *ACS nano* **2016**, *10*, 6826.
- [319] J. Ihli, A. N. Kulak, F. C. Meldrum, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 3134.
- [320] S.-Y. Yang, H.-H. Chang, C.-J. Lin, S.-J. Huang, J. C. C. Chan, *Chemical Communications* **2016**, *52*, 11527.
- [321] B. Purgstaller, K. E. Goetschl, V. Mavromatis, M. Dietzel, *CrystEngComm* **2019**, *21*, 155.
- [322] J. Zhang, C. Dong, Y. Sun, J. Yu, *Crystal Research and Technology* **2018**, *53*, 1800075.
- [323] W. E. G. Müller, M. Neufurth, J. Huang, K. Wang, Q. Feng, H. C. Schröder, B. Diehl-Seifert, R. Munoz-Espi, X. H. Wang, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1323.
- [324] I. Rehman, W. Bonfield, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1997**, *8*, 1.
- [325] A. Grunenwald, C. Keyser, A.-M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, C. Drouet, *Journal of Archaeological Science* **2014**, *49*, 134.
- [326] S. E. Wolf, C. Böhm, J. Harris, M. Hajir, M. Mondeshki, F. Marin (Ed.), *Single nanogranules preserve intracrystalline amorphicity in biominerals*, Trans Tech Publ **2015**.
- [327] M. Jarlbring, D. E. Sandström, O. N. Antzutkin, W. Forsling, *Langmuir* **2006**, *22*, 4787.
- [328] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences* **2004**.

LAURA BESCH

Dipl.-Chem.

Geb. am [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



Beruflicher und Wissenschaftlicher Werdegang

04/2021 – heute

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

10/2016 – heute

Promotion

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Department Chemie

Arbeitskreis [REDACTED]

Universitätsmedizin Mainz

Institut für Molekulare Pathologie

Arbeitskreis [REDACTED]

Thema der Dissertation:

„Calciumcarbonate als Biomaterial – Biokompatible anorganische sowie anorganisch-organische Nanokomposite zur Knochenregeneration“

12/2015-08/2016

Diplomarbeit

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Department Chemie

Arbeitskreis [REDACTED]

[REDACTED]

Thema der Diplomarbeit

„Synthese, Funktionalisierung und Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln“

10/2009-08/2016

Studium Biomedizinische Chemie

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Schwerpunkte:

- Biochemie
- Medizinisch-Pharmazeutische Chemie
- Organische Chemie
- Bioanorganische Chemie

Abschluss: **Dipl.-Chem.** mit Abschlussnote ██████████

Publikationsliste

Unger, R. E., Stojanovic, S., **Besch, L.**, Alkildani, S., Schröder, R., Jung, O., Bogram, C., Görke, O., Najman, S., Tremel, W., Barbeck, M. (2022). In vivo Biocompatibility Investigation of an Injectable Calcium Carbonate (Vaterite) as a Bone Substitute including Compositional Analyses via SEM-EDX Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, 23, 1196. DOI: 10.3390/ijms23031196.

Opitz, P., **Besch, L.**, Panthöfer, M., Kabelitz, A., Unger, R. E., Emmerling, F., Mondeshki, M., Tremel, W., Insights into the In Vitro Formation of Apatite from Mg-Stabilized Amorphous Calcium Carbonate. *Advanced Functional Materials*, **2021**, 31(3), 2007830. DOI: 10.1002/adfm.202007830.

Stengelin, E., Kuzmina, A., Beltramo, G. L., Koziol, M. F., **Besch, L.**, Schröder, R., Unger, R. E., Tremel, W., Seiffert, S., Bone Scaffolds Based on Degradable Vaterite/PEG-Composite Microgels. *Advanced healthcare materials*, **2020**, 9(11), 1901820. DOI: 10.1002/adhm.201901820.

Ewald, J., Blankenburg, J., Worm, M., **Besch, L.**, Unger, R. E., Tremel, W., Frey, H., Pohlit, H., Acid-Cleavable Poly (ethylene glycol) Hydrogels Displaying Protein Release at pH 5. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **2020**, 26(13), 2947. DOI: 10.1002/chem.201905310.

Schröder, R., **Besch, L.**, Pohlit, H., Panthöfer, M., Roth, W., Frey, H., Tremel, W., Unger, R. E., Particles of vaterite, a metastable CaCO₃ polymorph, exhibit high biocompatibility for human osteoblasts and endothelial cells and may serve as a biomaterial for rapid bone regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **2018**, 12(7), 1754-1768. DOI: 10.1002/term.2703.