
**-Vaterit als Biomaterial-
Relevanz für die natürliche Knochenregeneration
und die Apatit-Synthese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg – Universität Mainz
im Promotionsfach Chemie

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



UNIVERSITÄTS**medizin.**
MAINZ

Romina Schröder
geboren in Braunfels

Mainz, 2017

Dekan:



Erster Berichterstatter:



Zweiter Berichterstatter:



Tag der mündlichen Prüfung:

Meiner lieben Familie gewidmet.

*In Erinnerung an [REDACTED]:
„Wir waren geboren um zu leben*

Mit den Wandern jeder Zeit,

Sich niemals zu vergessen

Bis in aller Ewigkeit.“

(Unheilig)

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2014 bis September 2017 unter Betreuung von [REDACTED] am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Johannes Gutenberg – Universität Mainz, sowie am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg – Universität Mainz unter Betreuung von [REDACTED] [REDACTED] angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Mainz, im September 2017.

Romina Schröder

Danksagung

In den letzten 3 Jahren während meiner Promotion habe ich eine spannende, erlebnis- und vor allem abwechslungsreiche Zeit erleben dürfen. Ohne die Unterstützung einiger Menschen hätte ich meine Doktorarbeit niemals so erfolgreich abschließen können. Daher möchte ich die Gelegenheit nutzen und all denjenigen „*Dankeschön*“ sagen!

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater [REDACTED] bedanken. Er ermöglichte es mir an diesem umfangreichen und spannenden Thema arbeiten zu dürfen. Ein großes Dankeschön gilt auch meinem Betreuer [REDACTED] von der Universitätsmedizin Mainz für die Gelegenheit in der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie mitarbeiten zu dürfen. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen in gemeinsamen Gesprächen, zusammen mit dem großen Freiraum in der Gestaltung meiner eigenen Ideen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. In diesem Zusammenhang möchte ich sowohl dem Institutsleiter der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz [REDACTED], als auch dem ehemaligen Institutsleiter [REDACTED], für die Bewilligung und das Interesse an der Zusammenarbeit, danken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] bedanken. Die kreativen Ideen und die Ausarbeitung gemeinsamer Projekte haben mir viel Spaß bereitet und zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank geht auch an [REDACTED] als Ansprechpartner für die Röntgenbeugungsuntersuchungen. Vielen Dank für die Unterstützung bei den Auswertungen der Röntgenbeugungsdaten und den vielen hilfreichen Anregungen bei der Ausarbeitung meiner Doktorarbeit.

Ohne die vielen verschiedenen Messmethoden wäre meine Arbeit niemals so ergebnisreich geworden. Daher möchte ich mich an dieser Stelle von herzlich bei [REDACTED], für die Geduld bei der Bearbeitung meiner unzähligen Proben sowie ihrer freundlichen Art bedanken. Ein weiterer großer Dank geht an [REDACTED] für die Vorbereitung und Durchführung der Festkörper-NMR-Messungen, sowie für die Unterstützung und Diskussionen bei der Auswertung. [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] möchte ich ebenfalls danken, da sie als Ansprechpartner des Rasterelektronenmikroskops (REM) bei jeglichen Problemen bereitstanden und hilfreiche Tipps für die Messungen gaben. Weiterhin möchte ich mich auch bei [REDACTED] und [REDACTED] für die Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bedanken. Bei

■■■■■ bedanke ich mich für die spontanen REM-Messungen, beim Ausfall des Gerätes an dem ich selbst messen durfte, und für die Präparation einer TEM-Lamelle. ■■■■■ danke ich für die umfangreichen TEM-Messungen mit Elektronenbeugung und Elementanalysen. ■■■■■ danke ich für die Einführung und die Nutzung des Raman-Spektroskops. Daneben möchte ich mich noch bei dem gesamten **Arbeitskreis von** ■■■■■ für die Nutzung des Infrarot-Spektroskops und der Gefriertrocknung bedanken. Zusätzlich möchte ich mich auch bei dem gesamten **Arbeitskreis von** ■■■■■ für die Bereitstellung des Infrarot-Spektroskops für spezielle Messungen bedanken.

■■■■■, ■■■■■ und ■■■■■ danke ich für die tatkräftige Mitarbeit im Labor während ihrer Modulpraktika.

Insbesondere danke ich ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■ ■■■■■ und ■■■■■ für die Durchsicht meiner Arbeit und die Anregungen zur Korrektur.

Ich danke sowohl der **Arbeitsgruppe von** ■■■■■ als auch der ehemaligen **Arbeitsgruppe von** ■■■■■ für die freundliche Aufnahme, die Einarbeitung und die herzliche Arbeitsatmosphäre. Ein spezieller Dank geht vor allem an ■■■■■ und ■■■■■, die geduldig all meine Fragen beantworteten und mir stets eine große Hilfe im Labor waren. Ich habe sehr gerne mit euch zusammengearbeitet und denke oft an die netten Gespräche mit euch zurück. Bei ■■■■■ und ■■■■■ möchte ich mich auch für die amüsanten Stammtisch-Abende mit den „Klinik-Mädels“, bedanken.

Ich hatte viel Spaß im **Arbeitskreis von** ■■■■■ und habe mich dort auch sehr wohlfühlt und. Danke für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die lustigen Kaffeepausen, die Grill-Abende und die gemeinsamen Aktivitäten bei der „Meenzer Fassenacht“ sowie den AK-Ausflügen. Insbesondere bedanke ich mich bei ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■ und ■■■■■ für eure tolle Freundschaft – ihr seid mir sehr ans Herz gewachsen. Ein spezielles Lob für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen geht an die Kleingruppe der Biomineralisation, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■ und ■■■■■.

Ein lieber Dank gilt auch ■■■■■ für die gemeinsame Betreuung der Lehr-Praktika und für die aktive Mitwirkung bei den „AK-Mädels-Abenden“. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei allen Beteiligten des „AK-Mädels-Abends“ bedanken. Es war immer sehr lustig mit euch.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei [REDACTED]. Ihm gelang es immer wieder mich in anstrengenden und schwierigen Situationen mit seiner guten Laune zum Lachen zu bringen und mich aufzumuntern. Schön, dass es dich gibt und ich freuen mich auf die weiteren gemeinsamen Jahre mit dir.

Zuletzt möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern [REDACTED] **und** [REDACTED] bedanken. Ohne ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung würde ich vermutlich nicht dort stehen wo ich heute stehe. Ein großes Dankeschön möchte ich auch meiner Großmutter [REDACTED] aussprechen, die ebenfalls in allen Lebenslagen für mich da war und ist. Es ist schön, eine Familie wie euch zu haben, die immer an mich glaubten und glauben.

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen, synthetischen Biomaterialien zur Regeneration von kleinen Knochendefekten und Knochenerkrankungen (z. B. Osteoporose). Die Untersuchungen erfolgten am metastabilen Calciumcarbonat-Polymorph Vaterit. Ziel dieser Arbeit war eine Beurteilung der biologischen und chemischen Eigenschaften der synthetisch hergestellten Vaterit-Partikel als Biomaterial für die natürliche Knochenbildung und damit für eine potenzielle Anwendung in der Knochenregeneration.

Im ersten Kapitel dieser Arbeit wird eine einfache und schnelle Synthese von sterilen Vaterit-Partikeln mit nahezu quantitativer Ausbeute beschrieben. Die Partikel wurden als phasenreiner Vaterit erhalten und zeigten eine ellipsoide Form mit einem Durchmesser von 0,5 - 1,0 μm . Zusätzlich wurden umfangreichen *in vitro* Untersuchungen an humanen Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Vaterit-Partikel (i) keine zytotoxische Wirkung auf humane Zellen haben (Nachweis durch MTS-, LDH- und Kristallviolett-Assay), (ii) frei von Endotoxinen sind, (iii) keine inflammatorischen Effekte auf humane Endothelzellen haben, (iv) eine ausgezeichnete Zell-Biokompatibilität mit primären humanen Osteoblasten und Endothelzellen zeigen und (v) die Differenzierung von Osteoblasten anregen (nachgewiesen durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Umsetzung der synthetisierten Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit (HA). Gegenstand des zweiten Kapitels sind Inkubationen der Vaterit-Partikel in phosphathaltigen Lösungen (simulierte Körperflüssigkeit, Phosphat-gepufferte Salzlösung und Zellkulturmedium) bei physiologischem pH-Wert und 37 °C über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten. Die Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine HA-Spezies wurde durch eine Kombination von Pulver-Röntgenbeugungs- und spektroskopischen Untersuchungen (FT-IR, ^{31}P -Festkörper NMR) quantifiziert und mittels mikroskopischer Untersuchungen (REM, TEM) ergänzt. Darauf aufbauend wird im dritten Kapitel eine direkte Synthese der HA-Partikel ausgehend von Vaterit-Partikeln beschrieben. Die Reaktion wurde mit potentiometrischen Messungen kontrolliert und erste *in vitro* Zell-Untersuchungen durchgeführt. Folgende interessante und vorteilhafte Eigenschaften der entstehenden HA-Spezies wurden festgestellt. (i) Eine gezielte und kontrollierbare Kristallisation der HA-Spezies, durch die *in situ* Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, (ii) die Bildung einer spezifischen und individuell dem Reaktionsmilieu angepassten HA-Spezies mit Einschluss von Fremdionen, (iii) HA-Kristallite mit ähnlicher Morphologie und Kristallitgröße wie die biologischen HA-Kristallite, (iv) eine sehr gute Zell-Biokompatibilität mit humanen Osteoblasten und (v) eine physiologische Differenzierung von Osteoblasten wird ebenfalls gewährleistet.

Im abschließenden vierten Kapitel werden Hydrogel-basierte Transportformen für eine gezielte und lokalisierte Applikation der Vaterit-Partikel diskutiert. Im Gegensatz zu den frei vorliegenden Vaterit-Partikeln verlief die Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb eines chemisch und biologisch inerten PEG-basierten Hydrogels deutlich schneller. Weiterhin wurden durch *in vitro* Untersuchungen die zuvor bestimmten biologischen Eigenschaften der Vaterit-Partikel auch innerhalb der Hydrogele bestätigt. Demnach ist die Kombination der anorganischen Vaterit-Partikel mit einem organischen Hydrogel-Gerüst für die Anwendung im Bereich der Knochenregeneration dahingehend von Vorteil, indem (i) ein gezielter und individuell anpassungsfähiger Aufbau eines natürlichen Knochenminerals durch die Vaterit-Partikel stattfinden kann, (ii) keine zusätzlichen Knochenaufbau-fördernden Komponenten nötig sind, aufgrund der osteokonduktiven und osteoinduktiven Wirkung der Vaterit-Partikel, (iii) längerfristig gesehen könnte eine natürliche Knochenregeneration ohne Fremdkörper stattfinden, da sich die Vaterit-Partikel in ein natürliches Knochenmineral umsetzen und durch Verwendung von abbaubaren Hydrogel-Gerüsten keine fremde Bestandteile im Körper verbleiben würden.

Abstract

The present work investigates a promising alternative to conventional synthetic biomaterials for regeneration of small bone defects or bone diseases (e.g. osteoporosis). The studies were carried out on the least stable calcium carbonate polymorph vaterite. The aim of this thesis was to assess the biological and chemical properties of synthetically produced vaterite particles as a biomaterial for natural bone formation and thus for a potential application in bone regeneration.

The first chapter of the thesis describes a simple and fast synthesis of sterile vaterite particles resulting in a nearly quantitative yield. The particles were obtained as phase-pure vaterite and showed an ellipsoidal shape with a diameter of 0.5 – 1.0 μm . In addition, extensive *in vitro* studies were performed with human cells, showing that the synthesized vaterite particles (i) did not exhibit any cytotoxic effects on the human cells (detection by MTS, LDH and crystal violet assay), (ii) were free of endotoxins, (iii) did not induce an inflammatory response in human endothelial cells, (iv) showed superior cell biocompatibility with primary human osteoblasts and endothelial cells and (v) stimulated the differentiation of osteoblasts (demonstrated by activity of the alkaline phosphatase).

This thesis focusses on the study of the transformation of synthesized vaterite particles to a bone-like hydroxy apatite (HA). The second chapter deals with the incubation of vaterite particles in phosphate containing solutions (simulated body fluid, phosphate buffered saline and cell culture medium) at physiological pH and 37 °C up to 6 months. The transformation of vaterite to a HA species was quantified by using a combination of powder X-ray diffraction (XRD) and spectroscopic methods (FT-IR, ^{31}P solid state NMR) and supplemented by microscopic methods (SEM, TEM). Based on these results, a direct synthesis of HA particles from vaterite particles is described in the third chapter. The reaction was controlled by potentiometric measurements and initial *in vitro* cell tests were performed. The following interesting and advantageous properties of the resulting HA species were determined. (i) Targeted and controllable crystallization of the HA species by *in situ* release of Ca^{2+} ions, (ii) formation of a specific HA species including foreign ions adapted to the reaction medium, (iii) HA crystallites with similar morphology and size to the biological HA crystallites, (iv) very good cell biocompatibility with human osteoblasts and (v) a physiological differentiation of osteoblasts occurred.

In the final fourth chapter a hydrogel-based scaffold for a targeted and localized application of the vaterite particles is discussed. In contrast to free vaterite particles the transformation in a chemically and biologically inert PEG-based hydrogel scaffold proceeded significantly faster. Furthermore, the previously determined biological properties of vaterite particles were also detected *in vitro* within the hydrogel scaffold. It was shown that a combination of inorganic vaterite particles with an organic hydrogel scaffold is beneficial for use in bone regeneration application since (i) a targeted and individually adapted structure of a natural bone mineral occurred by the vaterite

particles, (ii) no additional compounds promoting bone formation are necessary due to the osteoconductive and osteoinductive effects of vaterite particles and (iii) in the long-term a natural bone regeneration without a foreign body should occur. *In vivo*, the vaterite particles should transform to a natural bone mineral and by using a degradable hydrogel scaffold no foreign components would remain in the body.

Inhaltsverzeichnis

Grundlagen und Motivation	1
1 Kristallisation	3
1.1 Keimbildung	3
1.1.1 Homogene Keimbildung	3
1.1.2 Heterogene Keimbildung	5
1.1.3 Nicht-klassische Keimbildung	5
1.2 Kristallwachstum	6
1.2.1 Nicht-klassisches Kristallwachstum	7
1.3 Ostwaldsche Stufenregel	8
2 Biominalisation und Biomminerale	9
2.1 Biomminerale	9
2.2 Calciumcarbonat	11
2.2.1 Calcit	13
2.2.2 Aragonit	14
2.2.3 Vaterit	14
2.3 Calciumphosphate	15
2.3.1 Hydroxylapatit (HA)	16
2.3.2 Carbonat-haltiger Hydroxylapatit (HCA, <i>hydroxycarbonate apatite</i>)	17
2.3.3 Amorphes Calciumphosphat (ACP)	18
3 Knochen und Knochenersatzmaterialien	21
3.1 Knochenstruktur und die Eigenschaften	21
3.2 Zusammensetzung des Knochenminerals	22
3.3 Prinzip des kontinuierlichen Auf- und Abbaus der Knochen	23
3.4 Knochenersatzmaterialien	24
4 Hydrogele	27
4.1 Was sind Hydrogele?	27
4.2 Tropfenbasierte Mikrofluidik-Technik zur Herstellung von Mikrogelen	29
5 Zellbiologische Grundlagen	31
5.1 Biokompatibilität und Zytotoxizität	31
5.1.1 MTS-Assay	31
5.1.2 LDH-Assay	32
5.1.3 Kristallviolett-Färbung	32
5.2 Primäre Zellen und Zelllinien	33
5.2.1 Zelllinie	33

5.2.2	Primäre Zellen	33
5.3	Differenzierung von Osteoblasten	34
5.3.1	Alkalische Phosphatase	35
5.4	Fetales Rinderserum.....	35
5.4.1	Serumproteine.....	36
6	Motivation.....	37
	Experimentelles	41
7	Vaterit-Partikel als Biomaterial für die schnelle Knochenregeneration	43
7.1	Einleitung.....	43
7.2	Materialien und Methoden.....	45
7.2.1	Synthesevorschrift der Vaterit-Partikel	45
7.2.2	Chemische Charakterisierungsmethoden.....	45
7.2.3	Biologische Methoden – <i>in vitro</i> Studien	45
7.3	Ergebnisse	51
7.3.1	Charakterisierung der synthetisierten Vaterit-Partikel	51
7.3.2	Sterilität.....	54
7.3.3	Nachweis von E-Selektin Expression durch primäre humane Endothelzellen.....	54
7.3.4	Zytotoxizitäts-Tests	56
7.3.5	Zell-Biokompatibilität	58
7.3.6	Differenzierung von Osteoblasten	61
7.4	Diskussion.....	63
7.5	Zusammenfassung und Ausblick	67
8	Umsetzung von Vaterit in Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit	69
8.1	Einleitung.....	69
8.2	Materialien und Methoden.....	71
8.2.1	Reagenzien / Chemikalien	71
8.2.2	Charakterisierungsmethoden	72
8.2.3	Exkurs: Probenpräparation für Zeta-Potential Messungen und Proteinkorona Analysen.....	73
8.3	Ergebnisse	74
8.3.1	Umsetzung der Vaterit-Nanopartikeln in Carbonat-haltigen Hydroxylapatit	74
8.3.2	Betrachtung der vollständigen Umsetzung von Vaterit in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit durch quantitative Analysemethoden in unterschiedlichen phosphathaltigen Lösungen.....	81
8.4	Abschließende Diskussion	107
8.5	Zusammenfassung und Ausblick	112

8.6	Exkurs: Effekt von Serumproteinen auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel in Knochen-ähnlichen Apatit.....	114
8.6.1	Inkubation der Vaterit-Partikel in Zellkulturmedium mit 10% FBS.....	114
8.6.2	Effekt von FBS auf die Vaterit-Partikel.....	116
9	Synthese und Charakterisierung von Hydroxylapatit ausgehend von Vaterit-Partikeln.....	121
9.1	Einleitung.....	121
9.2	Materialien und Methoden.....	123
9.2.1	Synthsevorschriften.....	123
9.2.2	Chemische Charakterisierungsmethoden.....	124
9.2.3	Biologische Methoden – <i>in vitro</i> Studien.....	125
9.3	Ergebnisse.....	126
9.3.1	Synthese der Hydroxylapatit-Partikel ausgehend von Vaterit-Partikeln.....	126
9.3.2	Effekte von Additiven in PBS auf die Synthese von Hydroxylapatit.....	131
9.3.3	Zytotoxizitäts-Tests.....	139
9.3.4	Zell-Biokompatibilität.....	140
9.3.5	Differenzierung von Osteoblasten.....	145
9.4	Diskussion.....	147
9.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	155
10	Kompositmaterialien aus PEG-basierten Hydrogelen.....	159
10.1	Einleitung.....	159
10.2	Materialien und Methoden.....	161
10.2.1	Reagenzien / Chemikalien.....	161
10.2.2	Chemische Charakterisierungsmethoden.....	163
10.2.3	Biologische Methoden – <i>in vitro</i> Studien.....	163
10.3	Ergebnisse.....	165
10.3.1	Charakterisierung der PEG-a-DMA Hydrogele und Umsetzung der Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit innerhalb der Hydrogele.....	165
10.3.2	Nachweis von E-Selektin Expression durch primäre humane Endothelzellen.....	171
10.3.3	Zell-Biokompatibilität des Makromonomers PEG-acetal-DMA.....	173
10.3.4	Zellenadhärenz und Viabilität in Anwesenheit der PEG-basierten Hydrogele....	175
10.3.5	Differenzierung von Osteoblasten.....	180
10.4	Diskussion.....	184
10.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	188
10.6	Exkurs A: Polyphosphorester-basierte Hydrogele.....	190
10.7	Exkurs B: Mikrogel-Kapseln durch Mikrofluidik-Technik.....	194
10.7.1	Durchführung.....	195
10.7.2	Ergebnisse und Diskussion.....	197

10.7.3 Zusammenfassung und Ausblick	201
Anhang	203
11 Anhang A	205
11.1 Gerätedetails und Messparameter	205
11.2 Ergänzungen zu den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse	210
11.3 Protokoll zur Isolation von HUVEC	212
11.4 Protokoll zum Ablösen und Zählen der Zellen	213
11.5 Berechnungen aus den Untersuchungen der quantitativen ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektroskopie	214
11.6 Ergebnisse der Identifizierung von Serumproteinen mittels LC-MS	216
11.7 Kalibrierungen der Ca ²⁺ -Ionenselektiven Elektrode	218
11.8 Synthesvorschrift und Charakterisierung der modifizierten PEG-Makromonomere	219
11.9 Resultate der PEG-DA Hydrogele	222
11.10 Synthesvorschrift und Charakterisierung des modifizierten PMEPE-Makromonomers und des verwendeten MEP Monomers	226
11.10.1 2-Methoxy-1,3,2-dioxaphospholan-2-oxid (MEP) Monomer	226
11.10.2 Polymethylethylenphosphate-Dimethacrylat (PMEPE-DMA) Makromonomer	227
12 Anhang B	229
12.1 Abkürzungsverzeichnis	229
12.2 Abbildungsverzeichnis	232
12.3 Tabellenverzeichnis	239
12.4 Literaturverzeichnis	240
13 Anhang C	251
13.1 Curriculum Vitae	251

Teil I

Grundlagen und Motivation

1

Kristallisation

Die Bildung eines Feststoffes ist ein fundamentales und allgegenwärtiges Phänomen, bei dem ein oder mehrere Komponenten einer Lösung, Schmelze oder Gasphase in eine feste Phase übergehen. Der Vorgang wird als Fällung oder Präzipitation bezeichnet. Handelt es sich bei der gebildeten festen Phase um einen geordneten Verband, der kein Lösungsmittel mehr enthält, wird von einem Kristall gesprochen.^[1] Ein kristalliner Festkörper besteht aus kleinsten strukturellen Einheiten, den sogenannten Elementarzellen, die sich in allen drei Raumrichtungen vielfach wiederholen. Der Vorgang der Kristallbildung wird als Kristallisation bezeichnet und kann in die beiden Vorgänge der Keimbildung und des Kristallwachstums eingeteilt werden.

1.1 Keimbildung

Die grundlegende Voraussetzung der Kristallisation ist die Übersättigung einer Lösung mit den zu kristallisierenden Komponenten. Dieser Zustand kann durch Abkühlen, Verdunsten des Lösungsmittels oder durch den Zusatz eines Verdrängungsmittels erreicht werden.^[2] Eine übersättigte Lösung liegt vor, wenn das Ionenprodukt einer Lösung größer als das Löslichkeitsprodukt ist. Dennoch ist eine übersättigte Lösung nicht unmittelbar zur Kristallisation befähigt. Vielmehr liegt eine metastabile übersättigte Lösung vor, die auf dem Weg von den gelösten Ionen zu den stabilen Kristallen eine Aktivierungsenergie überschreiten muss. Dieser Vorgang wird als Keimbildung oder auch Nukleation bezeichnet. Dabei treten metastabile Phasen, wie beispielsweise amorphe Phasen, als erste Keime auf. Die Keimbildung kann prinzipiell in zwei Vorgänge unterteilt werden. Der primäre Vorgang der Keimbildung findet in Systemen statt, die keine kristallinen Stoffe enthalten und kann sich homogen oder heterogen (durch Fremdkörper induziert) ereignen. Der sekundäre Vorgang der Keimbildung findet in Anwesenheit von Kristallen des gebildeten Feststoffs statt. Dabei können durch Kollisionen zwischen vorhandenen Kristallen Spaltprodukte abgelöst werden, die als Keime fungieren.

1.1.1 Homogene Keimbildung

Eine homogene Keimbildung findet ausschließlich durch eine Zusammenlagerung von Ionen oder Molekülen aus einer übersättigten Lösung statt. Wechselwirkung mit Fremdpartikel oder Oberflächen sind dabei ausgeschlossen.^[2] Basierend auf dem Prozess der Ostwaldreifung, dass kleine Keime gegenüber größeren Keimen eine erhöhte Löslichkeit aufweisen, erreichen nur wenige Keime eine überkritische Größe, sodass ein stabiler Keim gebildet werden kann.^[1] Dementsprechend bedarf

die homogene Keimbildung der größten Energie zur Bildung eines kritischen und damit stabilen Keims. Nach der klassischen Keimbildungstheorie setzt sich die freie Keimbildungsenthalpie ΔG_K aus einem endergonischen Oberflächenterm und einem exergonischen Volumenterm zusammen (s. Formel (1.1)).

$$\Delta G_K = \Delta G_O - G_V \quad (1.1)$$

Mit der Entstehung einer neuen Phasengrenze muss freie Oberflächenenthalpie ΔG_O aufgebracht werden. Gleichfalls wird durch den Übergang der gelösten Ionen in einen Feststoff freie Volumenenthalpie ΔG_V gewonnen. Der entstehende Keim wird als sphärischer Partikel mit dem Radius r angenommen. Demnach ergibt sich die freie Oberflächenenthalpie aus der Grenzflächenspannung γ und der Oberfläche des sich bildenen Keims. Die freie Volumenenthalpie setzt sich aus der Änderung der freien Energie pro Volumeneinheit eines entstehenden Keims ΔG_v zusammen (s. Formel (1.2)). Dabei gilt für übersättigte Lösungen $\Delta G_v < 0$.

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

Mit zunehmender Keimgröße nimmt die freie Volumenenthalpie stärker zu als die freie Oberflächenenthalpie und die freie Keimbildungsenthalpie ΔG_K wird zunehmend exergonisch. Damit erreicht die freie Keimbildungsenthalpie in Abhängigkeit des Keimradius ein Maximum, die ein Keim als Energiebarriere ΔG_K^* überwinden muss, um als stabiler Keim vorzuliegen.^[3] In Abb. 1.1 ist eine graphische Darstellung der Gibbs'schen Enthalpien für den Keimbildungsprozess dargestellt.

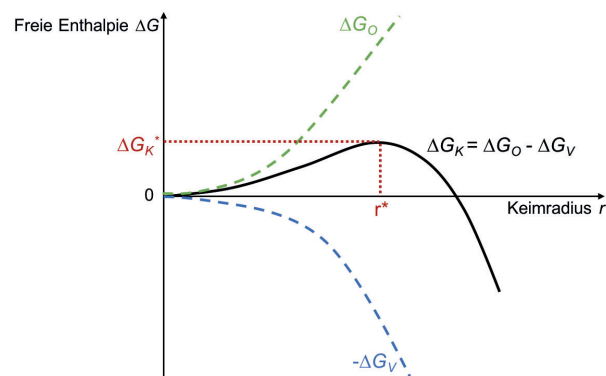


Abb. 1.1: Änderung der freien Keimbildungsenthalpie in Abhängigkeit der Keimradius.

Der sogenannte kritische Keimbildungsradius r^* lässt sich aus der Bestimmung des Maximums der freien Keimbildungsenthalpie durch Ableiten nach dem Radius wie folgt berechnen.

$$\left(\frac{\partial \Delta G_K}{\partial r} \right)_{r=r^*} = 8\pi r \gamma - 4\pi r^2 \Delta G_v = 0 \quad (1.3)$$

Daraus ergibt sich der kritische Keimbildungsradius r^* und die Energiebarriere ΔG_K^* mit:

$$r^* = \frac{2\gamma}{\Delta G_v} \quad (1.4)$$

$$\Delta G_K^* = \frac{16\pi}{3} \cdot \frac{\gamma^3}{(\Delta G_v)^2} = \frac{4}{3} \pi \gamma r^{*2} \quad (1.5)$$

Wie schnell ein Keim gebildet wird lässt sich mit der Keimbildungsgeschwindigkeit J nach Arrhenius mit der Gleichung (1.6) beschreiben.

$$J = A \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_K^*}{k_B T}\right) \quad (1.6)$$

Mit k_B als Boltzmann-Konstante und A als präexponentieller Faktor. Somit wird die metastabile Phase veranschaulicht, wobei die Keimbildungsrate bis zum Erreichen eines kritischen Wertes der Übersättigung fast null ist und erst ab diesem Wert exponentiell zunimmt.

1.1.2 Heterogene Keimbildung

Im Vergleich zur homogenen Keimbildung wird die Nukleation bei der heterogenen Keimbildung durch eine fremde Phase induziert. Diese fremde Phase können Fremdpartikel oder Oberflächen, wie Gefäßwände oder Rührwerke sein. Aufgrund des Kontaktes zu der fremden Phase ist die Grenzflächenspannung geringer als bei der homogenen Keimbildung. Folglich fließt in die Berechnung der freien Keimbildungsenthalpie ΔG_K eines heterogen gebildeten Keims noch ein Kontaktwinkel Θ -abhängiger Faktor $f(\Theta)$ ein (s. (1.7)).

$$\Delta G_K = \left(4\pi r^2 \gamma - \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v\right) \cdot f(\Theta) \quad (1.7)$$

Für eine glatte Oberfläche ist $f(\Theta)$ folgendermaßen definiert:

$$f(\Theta) = \frac{1}{4} (2 + \cos \Theta) \cdot (1 - \cos \Theta)^2 \quad (1.8)$$

Eine Benetzung findet statt, wenn $f(\Theta) < 1$ ist. Als Folge werden die Keimbildungsenthalpie sowie die Aktivierungsenergie erniedrigt und die Keimbildungsgeschwindigkeit erhöht. Im Gegensatz zur homogenen Keimbildung läuft die heterogene Keimbildung auch bei niedriger Übersättigung ab.

1.1.3 Nicht-klassische Keimbildung

Mit der zuvor beschriebenen Theorie der klassischen Keimbildung können allerdings nicht alle Prozesse der Keimbildung beschrieben werden. Deshalb sind in der Literatur weitere Modelle zu einer nicht-klassischen Keimbildung beschrieben, auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird. Eines der Modelle ist das der Pränukleationscluster. Hierbei wird die Existenz von stabilen Clustern, als Intermediat zwischen den Molekülen und einem Feststoff, in einer Lösung beschrieben. Bereits 1975 berichteten Posner *et al.*^[4,5] von den sogenannten Posner-Clustern. Diese wurden als

Vorläufer des amorphen Calciumphosphats vorgestellt. Weiterhin untersuchten Gebauer *et al.*^[2] und Pouget *et al.*^[6] die Frühphasen der Kristallisation des Calciumcarbonates. Hierbei bestimmt das strukturelle Wasser bzw. die Hydrathülle die Art der Kristallisation und die Stabilisierung von Intermediaten. Diese gebildeten Intermediate können sich zu amorphen oder kristallinen Phasen zusammenlagern und in nachfolgenden Prozessen der Phasenumwandlung in kristalline Produkte übergehen.

1.2 Kristallwachstum

Der zweite Vorgang der Kristallisation, der sich der Keimbildung anschließt, ist das Kristallwachstum. Die Keime beginnen zu einem Kristall mit sichtbarer Größe heranzuwachsen. Auch hier existieren verschiedene klassische Modelle. Das einfachste theoretische Modell wird mit der Oberflächenenergie beschrieben. Die Theorie basiert auf der Annahme, dass die Form, die ein Kristall beim Wachsen annimmt, durch die Oberflächenenergien der verschiedenen Kristallflächen bestimmt wird. Der wachsende Kristall zeigt planare Flächen mit definierten Winkeln zueinander und ist ein Vielfaches seiner kleinsten Einheit, die als Elementarzelle bezeichnet wird. Anhand dieser thermodynamischen Betrachtung etablierte Wulff^[7] ein Modell, mit dem die Gestalt eines Kristalls vorhersagbar ist. Diese Sichtweise entspricht nur in Ausnahmefällen der Realität. Hierbei werden Einflüsse wie Übersättigung oder Lösungs-Dynamik nicht berücksichtigt. Ein weiteres theoretisches Modell wird anhand der Diffusion beschrieben und hängt von der Stoßfrequenz der gelösten Ionen mit den Keimen ab (Stoßtheorie nach Trautz und Lewis). Dabei wird die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens eines Ions, in einer höheren Konzentration, mit einem Keim gesteigert und das Kristallwachstum findet verstärkt statt. Ist die Übersättigung in der Lösung allerdings groß genug, so tritt verstärkt Keimbildung auf und weniger freie Ionen stehen zur Verfügung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mit der Konzentration nicht unmittelbar das Kristallwachstum vorhergesagt werden kann.

Generell durchläuft das Kristallwachstum mehrere Schritte (s. Abb. 1.2), (i) den Transport der Baueinheiten zur Oberfläche und die Adsorption auf der Oberfläche, (ii) die Diffusion auf der Oberfläche bis zu einer Wachstumsstufe, (iii) die Diffusion entlang der Wachstumsstufe bis zu einer Ecke bzw. Kante, an der die finale Adsorption stattfindet und schließlich erfolgt im letzten Schritt (iv) der Abtransport der freigesetzten Adsorptionswärme und der Lösungsmittelmoleküle.

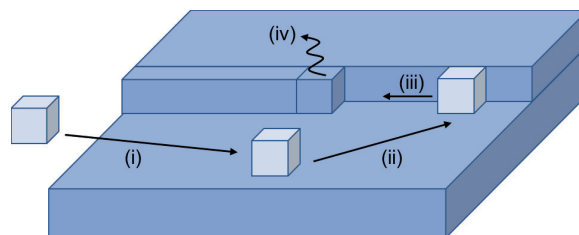


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Anlagerung eines weiteren Kristallbausteins, mit (i) Transport und Adsorption, (ii) Diffusion zur Stufe, (iii) Diffusion zur Kante und (iv) Freisetzung von Adsorptionswärme und Lösungsmittelmolekülen.

Es wird davon ausgegangen, dass an verschiedenen Stellen der Kristalloberfläche ein unterschiedlicher Energiegewinn bei der Anlagerung eines Kristallbausteins resultiert. So wird entweder beim Auftreten oder während einer Oberflächenwanderung durch Platzwechselfvorgänge die energetisch günstigste Position eingenommen. Mit dem „Schicht für Schicht“ (*layer by layer*) Modell von Vollmer, Kossel und Stranski wird das Kristallwachstum auf einer neuen Monoschicht, analog zu dem Wachstum auf einer glatten Oberfläche beschrieben (s. Abb. 1.3a).^[8] Im Gegensatz dazu postulierten Burton, Cabrera und Frank das nach ihnen benannte BCF-Modell.^[9,10] Dieses Modell basiert darauf, dass das Kristallwachstum an einer stufenartigen Schraubversetzungen beginnt und sich spiralförmig fortsetzt (s. Abb. 1.3b). Eine solche Schraubversetzung kann durch Kristallbaufehler, wie beispielsweise durch den Einbau von Fremdionen, ausgelöst werden.

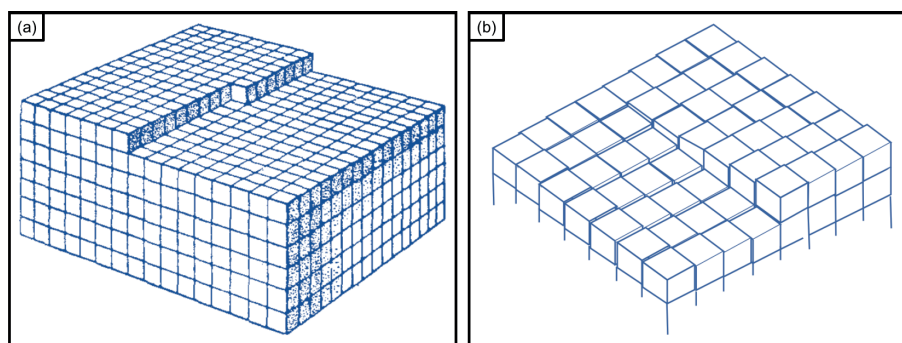


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Kristallwachstums. (a) „Schicht für Schicht“ Modell nach Vollmer, Kossel und Stranski, übernommen von Brandstätter^[8]. (b) BCF-Modell basierend auf einer Schraubversetzung, übernommen von Woodruff^[10].

1.2.1 Nicht-klassisches Kristallwachstum

Viele Biominerale sind in ihrer Kristallmorphologie zu komplex, als dass sie mit den klassischen Kristallwachstums-Modellen erklärt werden können. Aufgrund dessen wurde die klassische Kristallisation mit der nicht-klassischen Kristallisation erweitert. Das Konzept der nicht-klassische Kristallisation stützt sich auf nanoskopische, partikuläre Einheiten und kann mit einer strukturdirigierten Kristallfusion und der Bildung von Mesokristallen beschrieben werden.^[11,12] In Abb. 1.4 ist eine schematische Gegenüberstellung der klassischen und nicht-klassischen Modelle dargestellt. Die gebildeten Keime aggregieren zu primären Nanopartikeln. Während bei der klassischen Kristallisation diese Nanopartikel zu einem Einkristall fusionieren, organisieren sich diese bei der nicht-klassischen Theorie durch eine orientierte Anlagerung zu einem iso-orientierten Kristall. Dabei können die primär gebildeten Nanopartikel durch ein Additiv stabilisiert werden und sich als Mesokristall zusammenlagern. Bei nicht ausreichender Stabilisierung der Nanopartikel kann der Mesokristall zu einem iso-orientierten Kristall und letztlich zu einem Einkristall fusionieren. Mit Hilfe dieser nicht-klassischen Modelle können auch komplexere Morphologien erklärt werden.

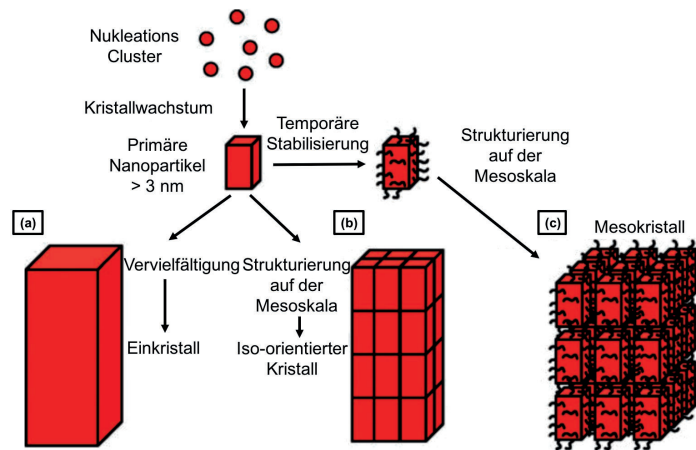


Abb. 1.4: Schematische Gegenüberstellung der klassischen und nicht-klassischen Kristallisation. (a) Modell der klassischen Kristallisation, (b) Modell der strukturdirigierten Kristallfusion und (c) Modell der Bildung eines Mesokristalls. Übernommen von Niederberger und Cölfen.^[12]

1.3 Ostwaldsche Stufenregel

Liegt eine Verbindung in mehreren Modifikationen mit unterschiedlichen Kristallstrukturen und dennoch identischer chemischer Zusammensetzung vor, wird sie als polymorph bezeichnet. Die Kristallisation solcher polymorpher Verbindungen folgt der nach Wilhelm Ostwald benannten Ostwaldschen Stufenregel.^[13] Bei gegebener Temperatur und gegebenem Druck fällt beim Einleiten der Kristallisation zunächst die Modifikation mit der größten Gibbs'schen Enthalpie aus. Diese metastabile Modifikation zeigt eine Kristallstruktur geringerer Ordnung, ist leichter löslich und kann eine Phasenumwandlung in eine thermodynamisch stabilere Modifikation durchlaufen. Aus kinetischer Sicht lässt sich dieser Prozess über die Aktivierungsenergie verstehen, die bei metastabilen Modifikationen vornehmlich niedriger sind. In der nachfolgenden Abb. 1.5 ist die Kristallisation verschiedener Modifikationen am Beispiel des Calciumcarbonates dargestellt und verläuft über das amorphe Calciumcarbonat (ACC), die Vaterit-Modifikation, die Aragonit-Modifikation bis zur thermodynamisch stabilen Calcit-Modifikation.

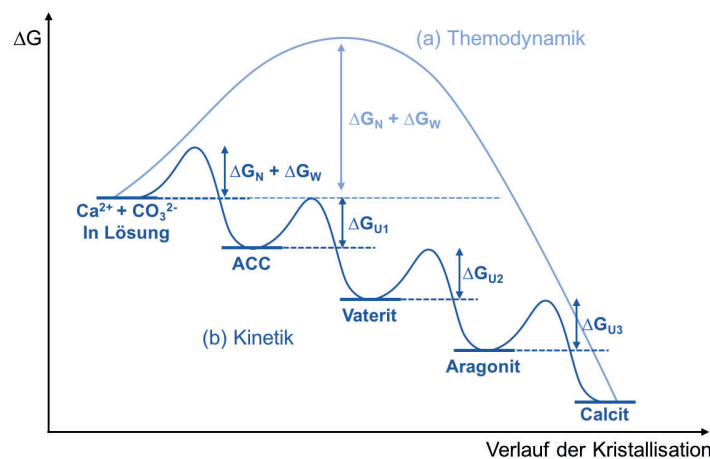


Abb. 1.5: Kristallisationsverlauf der Calciumcarbonat-Modifikationen in Abhängigkeit der freien Gibbs'schen Enthalpie aus (a) thermodynamischer und (b) kinetischer Sicht, mit N = Nukleation, W = Kristallwachstum und U = Phasenumwandlung. In Anlehnung an Cölfen und Mann.^[11]

2

Biominalisation und Biominerale

Die Biominalisation umfasst die biologische Bildung von anorganischen Mineralien unter sehr effizienten Kontroll- und Organisationsmechanismen.^[14] Lebende Organismen produzieren morphologisch komplexe Biominerale nach einem genetisch bestimmten Bauplan.^[15] Dies resultiert aus der Notwendigkeit heraus, um beispielsweise feste Stütz- und Schutzstrukturen zu erhalten. Im Laufe der Evolution haben die biologischen Systeme komplexe Regelmechanismen geschaffen, die eine lokale und kontrollierte Kristallisation von Biomineralen bewirken.^[16] Die Keimbildung und das Kristallwachstum treten, wie im vorherigen Kapitel 1 beschrieben, in einem übersättigten Medium auf. Im Organismus können sie allerdings durch spezifische Transportmechanismen und Oberflächenaktivitäten reguliert werden. Transportmechanismen wie beispielsweise transmembraner Ionenfluss, Ionen-(De-)Komplexierung, enzymatisch katalysierter Gasaustausch, lokale Redoxpotentiale oder pH-Wert Änderungen sowie Variationen in der Ionenstärke des Mediums können eine Übersättigung in einem begrenzten Raum erzeugen oder aufrechterhalten.^[15] Zusätzlich kann die Keimbildung durch die Aktivität bestimmter Oberflächen-Strukturen und kristallisationshemmenden Substanzen unterdrückt oder ausgelöst werden. Eine entscheidende Rolle dabei spielen Proteine (s. Kapitel 5, Abschnitt 5.4.1). Die Biominalisation lässt sich allgemein in fünf Abschnitte unterteilen, (i) die Kontrolle der Keimbildung, (ii) die Kontrolle des Kristallwachstums, (iii) die Kompartimentierung, darunter wird die Kristallisation in abgetrennten Bereichen verstanden, (iv) die Bildung eines Kompositmaterials aus anorganischen Biomineralen und organischer Matrix und letztlich (v) das Zusammenfügen von einzelnen Biokristalliten zu größeren Aggregaten.

2.1 Biominerale

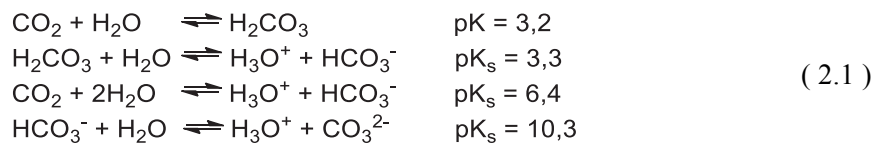
Zu den wichtigsten Biomineralen zählen die Calcium-enthaltenden tierischen Schalen, Zähne und Skelette. Weitere Biomaterialien sind die von Muscheln produzierten Perlen aus Aragonit, die aus Kieselsäure bestehenden Hüllen und Stacheln von Diatomeen, Radiolaren und bestimmte Pflanzenarten. Die Calcium-, Barium- und Eisen-haltigen Kristallite in Schwerkraft- und Magnetfeldsensoren sowie auch einige der pathologischen Ablagerungen in der Niere, Harnblase oder Gefäßen zählen zu den Biomineralen.^[15] Zum heutigen Zeitpunkt sind mehr als 70

unterschiedliche Biominerale bekannt, deren Verwendung völlig unterschiedliche Funktionen abdeckt. Entscheidende Funktionen sind beispielsweise mechanische Stütze, Speicherung, aktiver Schutz (im Aufbau von mechanischen Werkzeugen und Waffen), Sensorik (in den Schwerkraftempfindlichen Gleichgewichtsorganen) und passiver Schutz (im Aufbau von Gehäusen / Schalen und Stacheln). Zudem kann die Bildung von Biomineralen insbesondere bei Mikroorganismen auch einer Ablagerung oder Entgiftung dienen.^[15] Auch wenn die Biominerale vor allem der Konstruktion fester Stützelemente dienen, sind sie keine statischen Systeme, sondern unterliegen der aktiven Demineralisierung und Regeneration.^[14] Ein grundlegendes Beispiel stellt der kontinuierliche Knochenumbau dar (s. Kapitel 3, Abschnitt 3.3). Grundsätzlich können Biominerale als variabel zusammengesetzte oder reine Phasen, in amorpher oder (mikro-)kristalliner Form sowie als Kompositmaterialien mit einer organischen Polymer-Matrix auftreten. Im Allgemeinen handelt es sich bei den Biomineralen um schwerlösliche anorganische Salze. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der Begriff des Biominerals sich nicht ausschließlich auf ein von einem Organismus hergestelltes Mineral bezieht, vielmehr wird der Verbund aus anorganischem Mineral und organischer Matrix als Biomineral beschrieben. Die *in vivo* Bildung eines Biominerals unter streng kontrollierten Bedingungen führt zumeist zu enormen Abweichungen der Eigenschaften, wie Form, Größe, Kristallinität und Einbau von Fremdstoffen, wie sie im synthetischen Mineral gefunden werden.^[17]

Vor allem den Calcium-haltigen Biomineralen wird eine überragende Bedeutung zugeschrieben. Einerseits wird die Stabilität der Calciumsalze, durch ihre relative Unlöslichkeit im neutralen Milieu, gewährleistet und andererseits wird ihre Mobilität, durch die deutlich bessere Löslichkeit im sauren Milieu, sichergestellt. Für eine volle Funktionsfähigkeit der Biominerale spielt allerdings nicht nur die chemische Zusammensetzung eine entscheidende Rolle, sondern auch die entstehende Morphologie. Im Nachfolgenden werden die beiden wichtigsten Calcium-haltigen Minerale, das Calciumcarbonat und das Calciumphosphat, näher beschrieben.

2.2 Calciumcarbonat

Calciumcarbonat (CaCO_3) ist das mengenmäßig wichtigste Biomineral und kommt in Weichtieren, wie Schnecken und Muscheln, sowie in marinen Einzellern und Korallen vor. Weiterhin tritt Calciumcarbonat auch in Schwerkraft- und Trägheits-empfindlichen Sinnesorganen, wie z. B. in Otolithen (Gehörsteinchen) im Ohr oder in „Liebespfeilen“ von Schnecken, auf.^[1] In der Natur findet sich Calciumcarbonat als Kalkstein, Kreide und Marmor. Calciumcarbonat ist das Salz der mittelstarken, zweiprotonigen Kohlensäure mit zwei Dissoziationsstufen bei den pK_s -Werten von 3,3 und 10,3 (s. Formel (2.1)).^[18] Das erste Gleichgewicht liegt weitgehend auf der Seite von CO_2 . Da nur wenige CO_2 -Moleküle mit Wasser zu H_2CO_3 reagieren, wirkt die Gesamtlösung als schwache Säure. Durch Zusammenfassung der ersten beiden Gleichungen wird die Säurekonstante bezogen auf CO_2 erhalten.^[19]



Im neutralen Milieu ist Calciumcarbonat ein schwerlösliches Salz, das sich durch Einwirkung von Säuren unter Bildung von Kohlenstoffdioxid leicht zersetzt. Auch bei hohen Temperaturen oberhalb von 700 °C findet eine Zersetzung zu Calciumoxid unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid statt. Calciumcarbonat ist in fünf kristallinen Modifikationen vorzufinden. Es wird zwischen drei wasserfreien, polymorphen Phasen (Calcit, Aragonit und Vaterit) und zwei wasserhaltigen, pseudopolymorphen Phasen (Monohydrocalcit (MHC) und Ikkait) unterschieden (s. Abb. 2.1).



Abb. 2.1: (a) Polymorphe und (b) pseudopolymorphe Calciumcarbonat-Phasen. In angepasster Form übernommen von Cartwright *et al.*^[20].

Als metastabile Phase ist das amorphe Calciumcarbonat (ACC) bekannt. Im Vergleich zu den kristallinen Calciumcarbonat-Phasen zeigt ACC weder diskrete Röntgen- noch Elektronenbeugungsreflexe.^[21] Im Gegensatz dazu sind in kristallinen Proben die Atome in einem Gitter periodisch angeordnet, sodass sich Netzebenen definieren lassen, auf denen sich immer die gleichen Atome befinden. ACC existiert als wasserfreie transiente Phase und als wasserhaltige stabilisierte Phase. Der Wassergehalt des ACCs kann variieren, wobei überwiegend eine Zusammensetzung nahe $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ beobachtet wird.^[20] Zusätzlich werden verschiedene amorphe Zustände diskutiert, wobei von der sogenannten ACC-Polymorphie gesprochen wird. Hierbei

wurden in biogenen ACCs unterschiedliche Nahordnungs-Motive gefunden, die mit den kristallinen Calciumcarbonat-Modifikationen verwandt sind.^[20] Es wird zwischen calcitischem ACC, aragonitischem ACC, Monohydrocalcit-ähnlichem ACC und vateritischem ACC unterschieden, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

Bei Überschreitung des Löslichkeitsprodukts erfolgt im wässrigen Medium die Fällung der Calciumcarbonat-Modifikationen zumeist aus Alkalimetallcarbonaten und Calciumchlorid. Der Kristallisationsvorgang erfolgt, gemäß der Ostwaldschen Stufenregel, über das metastabile amorphe Calciumcarbonat, welches sich aufgrund der höheren Löslichkeit, verglichen mit den anderen Calciumcarbonat-Modifikationen, rasch in die kristallinen, wasserfreien, polymorphen Phasen umwandelt (vgl. Kapitel 1, Abschnitt 1.3 Abb. 1.5). Die Ausfällung der Polymorphe kann durch verschiedene Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Komponenten, Übersättigung, Ionenstärke oder auch Verunreinigungen beeinflusst werden.^[22] Aus Abb. 2.2a geht hervor, dass mit zunehmender Temperatur der Anteil der Calcit-Phase abnimmt und die vorherrschende Modifikation von Calcit über Vaterit zu Aragonit wechselt.^[23] Findet die Fällung der Polymorphe bei Raumtemperatur (24 °C) statt, so spielt der pH-Wert der Lösung eine entscheidende Rolle. Der Abb. 2.2b ist zu entnehmen, dass im pH-Bereich von 8,5 – 10,0 Vaterit die bevorzugte Phase darstellt, hingegen ist Aragonit bei einem pH-Wert von 11 und Calcit im stark alkalischen Bereich (pH-Wert > 12) die dominierende Phase.^[24]

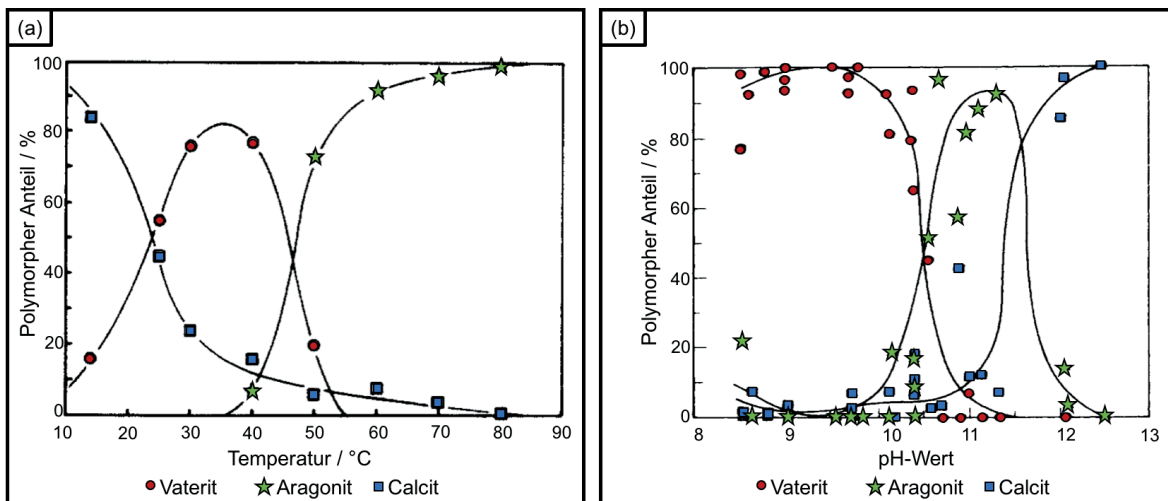


Abb. 2.2: Anteile der wasserfreien, polymorphen Calciumcarbonat-Phasen als Funktion (a) der Temperatur^[23] und (b) des pH-Werts^[24].

In Tab. 2.1 ist eine Übersicht der Modifikationen des Calciumcarbonats mit den entsprechenden Eigenschaften zusammengestellt. In den nachfolgenden Abschnitten werden die drei wasserfreien, kristallinen Modifikationen im Detail betrachtet.

Tab. 2.1: Übersicht der Calciumcarbonat-Modifikationen mit ihren Eigenschaften.^[1,25-28]

<i>CaCO₃</i> Modifikation	<i>Kristall-system</i>	<i>Raum-gruppe</i>	<i>Dichte / g·cm⁻³</i>	<i>Stabilität</i>	<i>Biologische Relevanz</i>
<i>Calcit</i> <i>CaCO₃</i>	trigonal	$R\bar{3}c$	2,71	thermodynamisch stabile Phase bei 25 °C, 1013hPa	sehr häufig; z.B. Schalen von Mollusken, Skelette von Foraminiferen, Coccolithophoridae und Stacheln von Seeigeln
<i>Aragonit</i> <i>CaCO₃</i>	orthorhombisch	<i>Pmcn</i>	2,93	stabil bei T > 70 °C	sehr häufig; z.B. Schalen von Mollusken, Korallen
<i>Vaterit</i> <i>CaCO₃</i>	triklin	$C\bar{1}$	2,65	metastabil bei T < 10 °C	sehr selten; z.B. Schalen von Mollusken, Stacheln, Gehörsteinchen
<i>Monohydrocalcit (MHC)</i> <i>CaCO₃·H₂O</i>	trigonal	$P3_121$	2,43	Wasserabgabe oberhalb von 60-80 °C	selten; z.B. in pathologischen Verkalkungen
<i>Ikait</i> <i>CaCO₃·6H₂O</i>	monoklin	$C2/c$	1,83	Wasserabgabe bereits <0 °C, stabil bei Raumtemperatur nur unter hohem Druck	bisher nicht nachgewiesen
<i>Amorphes Calciumcarbonat (ACC)</i> <i>CaCO₃·xH₂O</i>	röntgenamorph	-	1,6	metastabil	selten; Vorstufe auf dem Weg zu den kristallinen Phasen, Speicherphase für Calcium

2.2.1 Calcit

Calcit ist die thermodynamisch stabile Modifikation des Calciumcarbonats bei 25 °C und 1013 hPa. Reine Calcit-Kristalle sind durchsichtig, farblos und weisen meist eine rhomboedrische Morphologie^[29] auf. Calcit kristallisiert trigonal in der Raumgruppe $R\bar{3}c$.^[30] Die Kristallstruktur ist in Abb. 2.3a dargestellt. Aufgrund von Fremdionen-Einschlüssen sind die in der Natur vorkommenden Calcit-Kristalle gefärbt (z.B. gelb, braun, grün). Natürlich kommt der Calcit massiv, grob bis feinkörnig, selten faserig vor und ist als gesteinsbildendes Mineral in Kalkstein, Marmor und Tropfsteinhöhlen zu finden.^[25] Typisch sind auch die Calcit-Rhomboeder, die als „Island-Kalkspat“ mit der besonderen Eigenschaft der Doppelbrechung bekannt sind.^[1] Viele marine Organismen bilden Calcit, aufgrund der CaCO₃-Übersättigung im Meerwasser. Zudem bestehen die Schalen von Vogeleiern ebenfalls aus Calcit.^[1]

2.2.2 Aragonit

Aragonit, abgeleitet vom bedeutendsten Vorkommen des Minerals in Aragonien, ist im trockenen Zustand bei Raumtemperatur über einen unbestimmten Zeitraum „stabil“. Aragonit kristallisiert im orthorhombischen Kristallsystem in der Raumgruppe $Pm\bar{c}n$ (s. Abb. 2.3b) und zeigt meist eine pseudo-hexagonale, nadelförmige, faserige Morphologie.^[26,31] Weiterhin sind Aragonit-Kristalle häufig als Zwillings und Drilling zu finden. Wie auch der Calcit, kommt Aragonit in großen Mengen vor und findet sich in Ton, Mergel und Gips, als Speleothem in Höhlen, in der Oxidationszone von Erzlagerstätten (z.B. Aragonit-Eisenblüte), in Hohlräumen vulkanischer Gesteine und häufig in Basalt und Basalttuffen.^[32]

2.2.3 Vaterit

Vaterit (benannt nach dem deutschen Chemiker und Mineralogen Heinrich Vater) ist eine thermodynamisch metastabile Phase des Calciumcarbonats. Vaterit kristallisiert im triklinen Kristallsystem in der Raumgruppe $C\bar{1}$ ^[33] und zeigt meist eine ellipsoide Morphologie.^[34] Die Kristallstruktur ist in Abb. 2.3c dargestellt. Im trockenen Zustand ist Vaterit über einen längeren Zeitraum stabil. In Gegenwart von Wasser erfolgt eine rapide Phasenumwandlung in die thermodynamisch stabile Phase, Calcit. Aufgrund dessen ist die Fällung von Vaterit in wässriger Lösung stark zeit- und temperaturkontrolliert durchzuführen. Vaterit ist in der Natur viel seltener anzutreffen als die beiden anderen wasserfreien, polymorphen Phasen Calcit und Aragonit. In der Biomineralisation dient Vaterit als Präkursor zur Bildung von Aragonit und Calcit. In lebenden Organismen kommt Vaterit sowohl als Teil von Gallensteinen und in Gehörsteinchen als auch in Schalen von Mollusken vor.^[1]

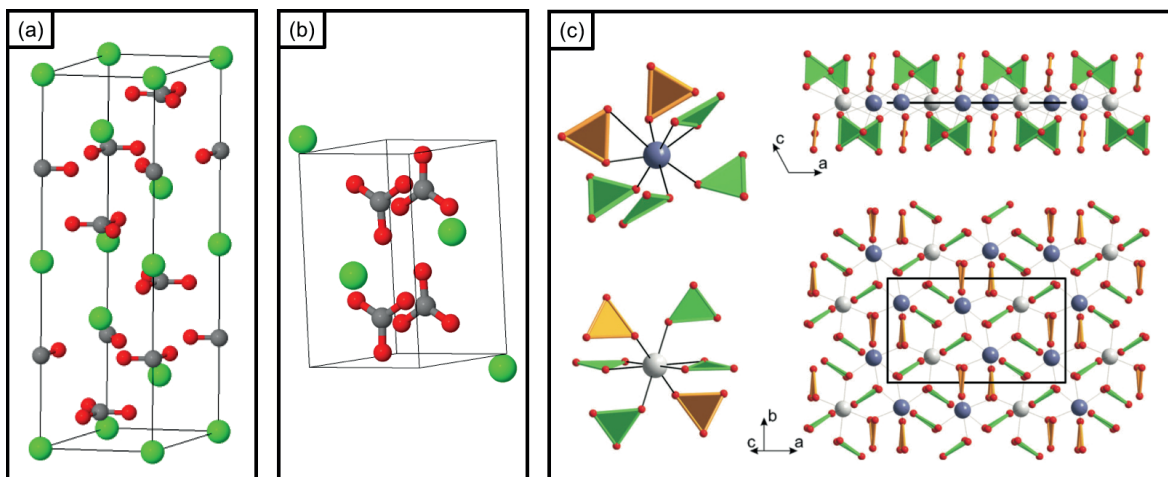


Abb. 2.3: Kristallstrukturen der wasserfreien, polymorphen Calciumcarbonat-Phasen. (a) Calcit^[25] und (b) Aragonit^[26], mit Ca = grün, O = rot und C = grau. (c) Vaterit: links Koordination der Ca²⁺-Ionen (Ca = hellgrau und blau) durch die CO₃²⁻-Ionen (orange und grün), rechts schichtartiger Aufbau und pseudo-hexagonale Anordnung der Ca²⁺-Ionen, übernommen von Mugnaioli *et al.*^[33].

2.3 Calciumphosphate

Die Calciumphosphate sind Salze der mittelstarken, dreiprotonigen Phosphorsäure, bestehend aus Calcium-Ionen und Dihydrogenphosphat- (H_2PO_4^-), Hydrogenphosphat- (HPO_4^{2-}) oder Orthophosphat- (PO_4^{3-}) Ionen. Das Protolysegleichgewicht der Phosphorsäure mit pK_s -Werten der drei Dissoziationsstufen bei 25 °C ist in Formel (2.2) angegeben.^[19] Zur besseren Veranschaulichung ist in Abb. 2.4 die Abhängigkeit der Ionenkonzentration vom pH-Wert einer Phosphatlösung dargestellt.

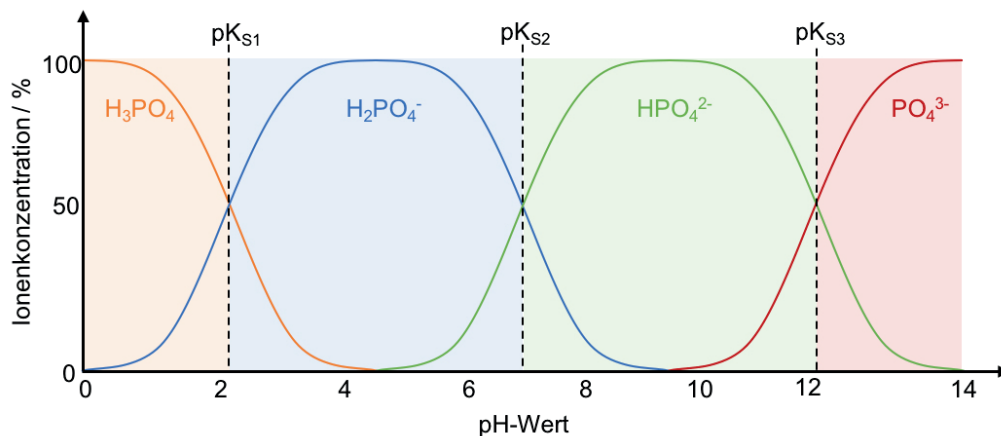
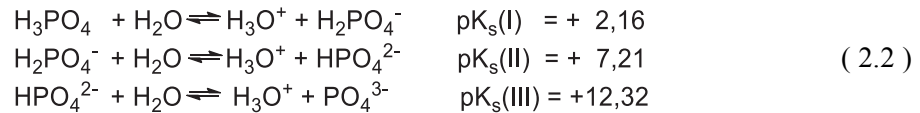


Abb. 2.4: Verteilungskurven der Phosphat-Ionen Spezies in Anhängigkeit des pH-Werts der Phosphorsäurelösung.

Mit zunehmendem pH-Wert verschiebt sich das Protolysegleichgewicht in Richtung der ersten, zweiten und dritten Dissoziationsstufe und die fortschreitende Bildung der deprotonierten Phosphat-Ionen Spezies kann beobachtet werden. Anhand des Diagrammes lässt sich erkennen, dass wässrige Lösungen der Phosphorsäure mittelstarke Säuren, die der H_2PO_4^- -Ionen schwache Säuren (pH-Wert von 4,5), die der HPO_4^{2-} -Ionen schwache Basen (pH-Wert von 9,5) und die der PO_4^{3-} -Ionen starke Basen (pH-Wert von 14) sind. Aus allen drei Dissoziationsstufen können die Calciumphosphate gebildet werden. Dabei werden die Salze der H_2PO_4^- -Ionen vornehmlich in saurem Milieu gebildet. Hingegen treten die Salze der HPO_4^{2-} und PO_4^{3-} -Ionen verstärkt im neutralen Milieu auf und sind in der anorganischen Komponente des Knochens und der Zähne zu finden. Zahlreiche Calciumphosphate sind bekannt, wobei manche Spezies Kristallwasser und andere Spezies, wie die der Apatit-Familie, Hydroxid-Ionen enthalten.

Bei allen Calciumphosphaten handelt es sich um farblose Feststoffe, die aufgrund von Fremdionen-Einschlüssen in der Natur häufig farbig vorzufinden sind.^[35] Zudem sind die meisten Calciumphosphate im neutralen Medium nur wenig löslich, erst im sauren Milieu steigt die Löslichkeit. Dieser Eigenschaft bedienen sich auch die knochenauflösenden Zellen (Osteoklasten)

bei dem Knochenabbau (s. Kapitel 3, Abschnitt 3.3). In der Abb. 2.5 sind die Löslichkeiten der Calciumphosphat-Phasen in Abhängigkeit des pH-Werts in Form eines Löslichkeitsphasen-Diagramms dargestellt. Die jeweilige Löslichkeitsisotherme beschreibt die Löslichkeit eines Salzes, in Form der Gesamtcalcium- und Gesamtphosphat-Konzentration der gesättigten Lösung als Funktion des pH-Werts.^[36] Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass Hydroxylapatit (HA) oberhalb eines pH-Werts von 4,5 die stabilste Phase ist.

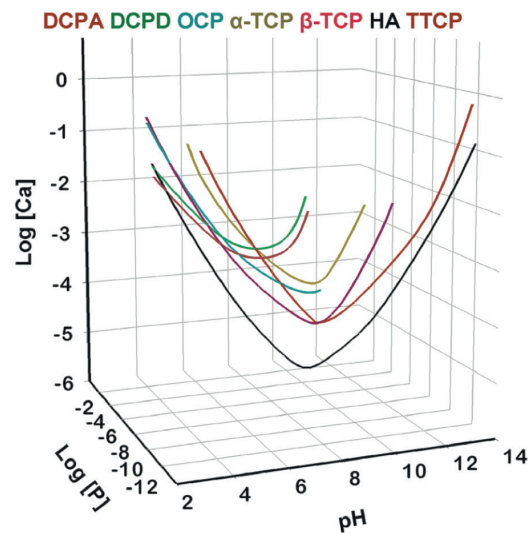


Abb. 2.5: 3-dimensionales Löslichkeitsphasen-Diagramm mit den Löslichkeitsisothermen von Dicalciumphosphat-Anhydrat (DCPA), Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD), Octacalciumphosphat (OCP), α -Tricalciumphosphat (α -TCP), β -Tricalciumphosphat (β -TCP), Hydroxylapatit (HA) und Tetracalciumphosphat (TTCP). Übernommen von Chow^[36].

Ein weiterer wichtiger Parameter neben der Löslichkeit ist das molare Calcium zu Phosphor (Ca:P) -Verhältnis. Für die stöchiometrisch zusammengesetzten Calciumphosphat-Phasen werden Ca:P-Verhältnisse von 0,5 – 2,0 gefunden.^[1] Allgemein gilt, je kleiner das Ca:P-Verhältnis, desto saurer und besser wasserlöslich ist das Calciumphosphat.^[35] Eine tabellarische Übersicht der biologisch relevanten Calciumphosphate ist am Ende des Kapitels in Tab. 2.2 zusammengestellt. Im Nachfolgenden wird nur auf die in der vorliegenden Arbeit relevanten Calciumphosphat-Phasen eingegangen.

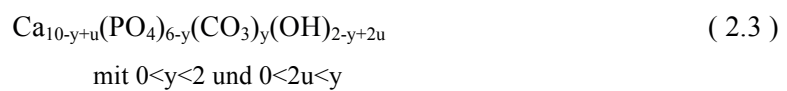
2.3.1 Hydroxylapatit (HA)

Der Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ist thermodynamisch betrachtet die stabile und im Vergleich zu den anderen Calciumphosphaten die Calciumphosphat-Phase mit der geringsten Löslichkeit. Bei Raumtemperatur kristallisiert chemisch reiner HA monoklin in der Raumgruppe $P2_1/b$ und oberhalb von 250 °C findet eine Phasenumwandlung zum hexagonalen Kristallsystem in der Raumgruppe $P6_3/m$ statt. Durch Einschlüsse von Fremdionen (wie beispielsweise Fluorid, Chlorid oder Carbonat) im Kristall wird die hexagonale Struktur auch bei Raumtemperatur stabilisiert.^[1] Die hexagonale Kristallstruktur ist in Abb. 2.6a dargestellt. Hydroxylapatit ist ein Feststoff, der zur Nichtstöchiometrie neigt. Die Struktur des HAs ist auf allen Ionenplätzen (Ca^{2+} ,

PO_4^{3-} und OH^-) so flexibel, dass leicht kleinere oder größere Mengen anderer Ionen eingebaut werden können.^[1] Stöchiometrisch reiner HA ist in biologischen Systemen nicht anzutreffen. Aufgrund der Ähnlichkeit zum biologischen, nichtstöchiometrischen Apatit, wird er häufig als Knochenersatzmaterial oder als biologisch aktive Beschichtung auf chirurgischen und zahnmedizinischen Implantaten eingesetzt (s. Kapitel 3).

2.3.2 Carbonat-haltiger Hydroxylapatit (HCA, *hydroxycarbonate apatite*)

Aufgrund der strukturellen Flexibilität des HAs kann durch Substitution der Hydroxid- oder der Phosphat-Ionen gegen Carbonat-Ionen der Carbonat-haltige Hydroxylapatit erhalten werden. Es existieren zwei Arten von HCA, die sich durch Infrarot-spektroskopische Untersuchungen unterschieden lassen.^[37,38] Beim A-Typ des HCAs findet eine Substitution der Hydroxid (OH^-) gegen Carbonat (CO_3^{2-}) -Ionen statt. Im Gegensatz dazu werden beim B-Typ des HCAs die tetraedrischen Phosphat (PO_4^{3-}) -Ionen gegen trigonal planare CO_3^{2-} -Ionen substituiert. Diese Substitution führt zu Gitterfehlstellen, Gitterstörungen und zu einer neuen Ladungssituation. Um eine Lösung der fehlenden negativen Ladung zu finden, die bei der Substitution entsteht, wurden diverse Modelle diskutiert. In einem der ersten Modelle wurde von Kühl und Nebergall^[39] die Formel (2.3) postuliert. Sie nahmen an, dass die Substitution eines PO_4^{3-} -Ions gegen ein CO_3^{2-} -Ion zu einer Erzeugung von einer Ca^{2+} -Ionen- und einer OH^- -Ionen-Fehlstelle führt. Dabei muss eine Anzahl u dieser Fehlstellen ersetzt werden.



Im Vergleich zum chemisch reinen HA resultiert durch die Ionen-Substitution im B-Typ des HCAs ein verringertes Ca:P-Verhältnis und damit eine höhere Löslichkeit. Aus ersten Berechnungen von Defektbildungsenergien von Kubota *et al.*^[40] wurde festgestellt, dass die Bildung des HCAs vom B-Typ in einer wässrigen Umgebung gegenüber dem A-Typ bevorzugt ist. Im Gegensatz dazu wird die Bildung des A-Typs durch höhere Temperaturen begünstigt. Aus diesen Untersuchungen resultierte die in Abb. 2.6 angegebene Kristallstruktur der beiden HCA-Phasen.

Durch Fällung im neutralen bis basischen Milieu lässt sich HCA leicht synthetisieren. Bei Anwesenheit von Fremdionen (wie Na^+ und Cl^-) werden diese stets zu einem kleinen Anteil eingebaut. Es resultiert eine nichtstöchiometrische Zusammensetzung, die eine direkte Strukturbestimmung des HCA erschwert, sodass die in der Literatur angegebenen Elementarzellenparameter variieren.^[35] Dennoch zeigt der HCA mit diesen Eigenschaften, gegenüber dem HA, eine größere Ähnlichkeit zum biologischen Hydroxylapatit (s. Kapitel 3, Abschnitt 3.2), wodurch er als Knochenersatzmaterial große Bedeutung erlangt.

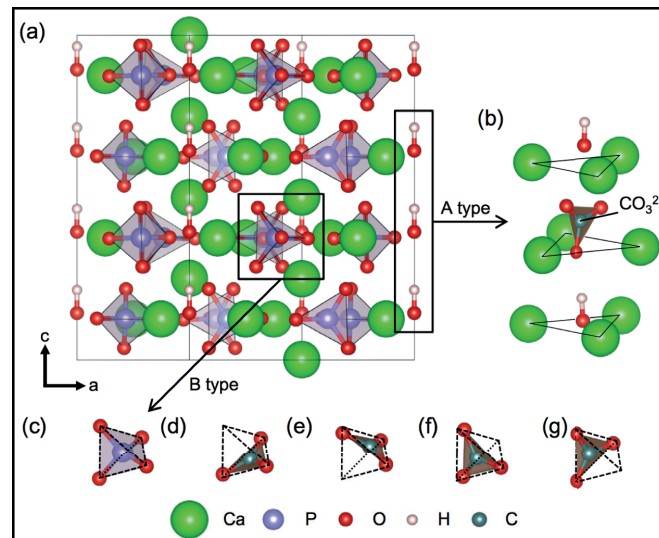


Abb. 2.6: Hexagonale Kristallstruktur des (a) chemisch reinen Hydroxylapatits (HA). (b) Darstellung der Substitution eines OH⁻-Ions durch ein CO₃²⁻-Ion des HCAs vom Typ A. (d)-(g) Darstellung der Substitution eines (c) tetraedrischen PO₄³⁻-Ions durch ein trigonal planares CO₃²⁻-Ion mit den verschiedenen Konfigurationen innerhalb des Tetraeders des HCAs vom Typ B. Übernommen von Kubota *et al.*^[40].

2.3.3 Amorphes Calciumphosphat (ACP)

Amorphes Calciumphosphat ist, wie ACC, eine metastabile Modifikation, die meist als erste Calciumphosphat-Phase bei der Fällung aus wässrigem Medium auftritt. Im Unterschied zu den kristallinen Verbindungen besitzt ACP keine Fernordnung der Atome im Gitter, wodurch es röntgenamorph ist. Bei einer Fällung im pH-Bereich von 6,6 - 11,7 entsteht ACP und kann in Gegenwart von Magnesium-, Pyrophosphat- oder Carbonat-Ionen stabilisiert werden.^[41] Biologisch wird ACP häufig mit diesen Fremdionen vorgefunden und tritt in pathologischen Verkalkungen von Weichgeweben auf.^[1] Die Morphologie des ACPs wird als annähernd runde Partikel mit Durchmessern von 40-100 nm beschrieben (s. Abb. 2.7a).^[42] Für die strukturelle Grundeinheit von ACP wurde von Posner *et al.*^[4,5] ein annähernd kugelförmiger Cluster, der sogenannte Posner-Cluster, mit einem Durchmesser von 9,5 Å und der Zusammensetzung Ca₉(PO₄)₆ vorgeschlagen (s. Abb. 2.7b). Diese Cluster wurden experimentell als erste Keime während der Kristallisation von HA gefunden und implizieren die Kristallisation von HA als stufenweise Zusammenlagerung dieser Einheiten.^[35]

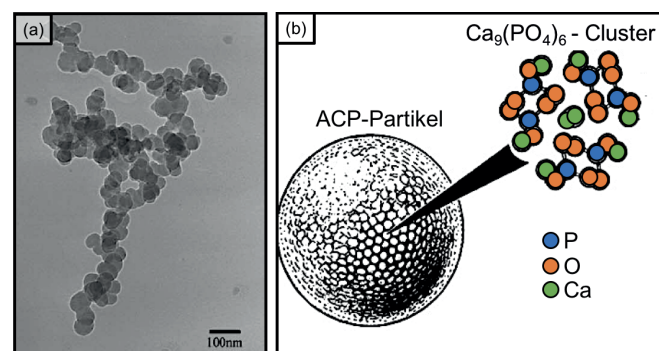


Abb. 2.7: Amorphes Calciumphosphat (a) TEM-Aufnahme und (b) Strukturmodell. In angepasster Form übernommen von Dorozhkin^[43].

Tab. 2.2: Übersicht der Calciumphosphat-Phasen mit ihren Eigenschaften. Die Löslichkeit ist als Logarithmus des Ionenprodukts der angegebenen Formel (ohne Hydratwasser) mit Konzentrationen in mol/L aufgeführt.^[1,35,38]

Verbindung	Formel	Ca:P - Verhältnis	Löslichkeit bei 25 °C, -log(K_{sp})	Kristallsystem, Raumgruppe	Dichte /g·cm ⁻³
Monocalciumphosphat-Monohydrat (MCPM)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	0,5	1,14	triklin P $\bar{1}$	2,23
Monocalciumphosphat-Anhydrat (MCPA)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,5	1,14	triklin P $\bar{1}$	2,58
Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD, Brushit)	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1,0	6,59	monoklin Ia	2,32
Dicalciumphosphat-Anhydrat (DCPA, Monetit)	CaHPO ₄	1,0	6,90	triklin P $\bar{1}$	2,89
Octacalciumphosphat (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1,33	96,6	triklin P $\bar{1}$	2,61
α -Tricalciumphosphat (α -TCP)	α -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	25,5	monoklin P2 ₁ /a	2,86
β -Tricalciumphosphat (β -TCP)	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	28,9	rhomboedrisch R3c	3,07
Amorphes Calciumphosphat (ACP)	Ca _x (PO ₄) _y ·nH ₂ O	1,2-2,5	ca. 25-33	-	-
Hydroxylapatit (HA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	116,8	monoklin P2 ₁ /b oder hexagonal P6 ₃ /m	3,16
Tetracalciumphosphat (TTCP)	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2,0	38-44	monoklin P2 ₁	3,05
Carbonat-haltiger Hydroxylapatit (HCA) A-Typ	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH, CO ₃) ₂	-	-	trigonal P3	-
Carbonat-haltiger Hydroxylapatit (HCA) B-Typ	Ca ₁₀ (PO ₄ , CO ₃) ₆ (OH) ₂	-	-	hexagonal P6 ₃ /m	-

3

Knochen und Knochenersatzmaterialien

Der Knochen macht den größten Teil des Hartgewebes im menschlichen Organismus aus. Zu den Aufgaben des Knochens gehören die Strukturgebung, der Schutz innerer Organe und im Zusammenspiel mit den Muskeln das Ermöglichen von Bewegungen. Gemeinsam mit den Zähnen bildet das Knochengewebe den härtesten Bestandteil des Körpers mit einer Zugfestigkeit von 10 Kilogramm pro Quadratmillimeter und einer Druckfestigkeit von 15 Kilogramm pro Quadratmillimeter.^[44] Es befindet sich ein bemerkenswerter Anteil von etwa 99% des Gesamtgehaltes an Calcium und etwa 85% des Gesamtgehaltes an Phosphor in den Knochen und Zähnen.^[17] Dies suggeriert die enorme Wichtigkeit der Knochen im Calcium-Metabolismus und als Mineral-Speicher.

3.1 Knochenstruktur und die Eigenschaften

Das Zusammenspiel der organischen Matrix mit der anorganischen Mineral-Phase erbringt die besonderen mechanischen Eigenschaften des Knochens. Die organische Matrix besteht hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen (~90%) und sorgt für die Elastizität (Zug- und Biegebelastung) des Knochens.^[45] Die restlichen Bestandteile der organischen Matrix sind amorphe Interzellulärsubstanzen, wie Osteocalcein, Osteonectin und Osteopontin.^[1] Der größte Bestandteil der anorganischen Mineral-Phase ist Calciumphosphat, im Speziellen Hydroxylapatit (HA). Daneben sind noch Fluorapatit, Carbonat-haltiger Apatit, Calciumcarbonat und Magnesiumcarbonat enthalten. Die Mineral-Phase sorgt für die Härte (Druckbelastung) des Knochens.^[45]

Die Struktur des Knochens unterliegt einem hierarchischen Aufbau. In Abb. 3.1 ist dieser Aufbau am Beispiel eines Lamellenknochens von der makroskopischen Skala des gesamten Knochengewebes über die mikroskopische und nanoskopische Skala bis hin zur atomaren Skala schematisch dargestellt. Auf der makroskopischen Ebene (s. Abb. 3.1a) ist der Knochen von einer Knochenhaut umgeben, der sich die Knochensubstanz mit einer relativ dichten äußeren Schicht (*Substantia corticalis*) anschließt. Das Innere des Knochens besteht aus einem weniger dichten, porösen Gerüst (*Substantia spongiosa*), das sich aus den sogenannten Knochenbälkchen aufbaut. Diese sind hart, haben aber viele Hohlräume, wodurch der Knochen stabil und zugleich leicht bleibt. Die Porosität ist wichtig für den Austausch von Stoffen und die Zugänglichkeit der Zellen. Die

mikroskopische Skala umfasst Knochenzellen (Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten) und die Osteone, die in der Längsrichtung des Knochens angeordnet sind und im Zentrum einen Havers-Kanal beinhalten (s. Abb. 3.1b). Der Havers-Kanal enthält kleine Blutgefäße und wird von Knochenlamellen umgeben, deren Verlaufsrichtung von Lamelle zu Lamelle variiert (s. Abb. 3.1c). Dies führt zu einer verbesserten Belastbarkeit des Knochens in unterschiedlichen Richtungen. Die Knochenlamellen sind aus Kollagenfasern aufgebaut (s. Abb. 3.1d). Die Betrachtung der nanoskopischen Ebene (s. Abb. 3.1e) zeigt, dass sich die Kollagenfasern aus mineralisierten Kollagenfibrillen zusammensetzen. Auf der letzten, atomaren Ebene (s. Abb. 3.1f und unter Teil) sind die tripelhelikalen Kollagenmoleküle und die biologischen Hydroxylapatit-Nanokristalle dargestellt.

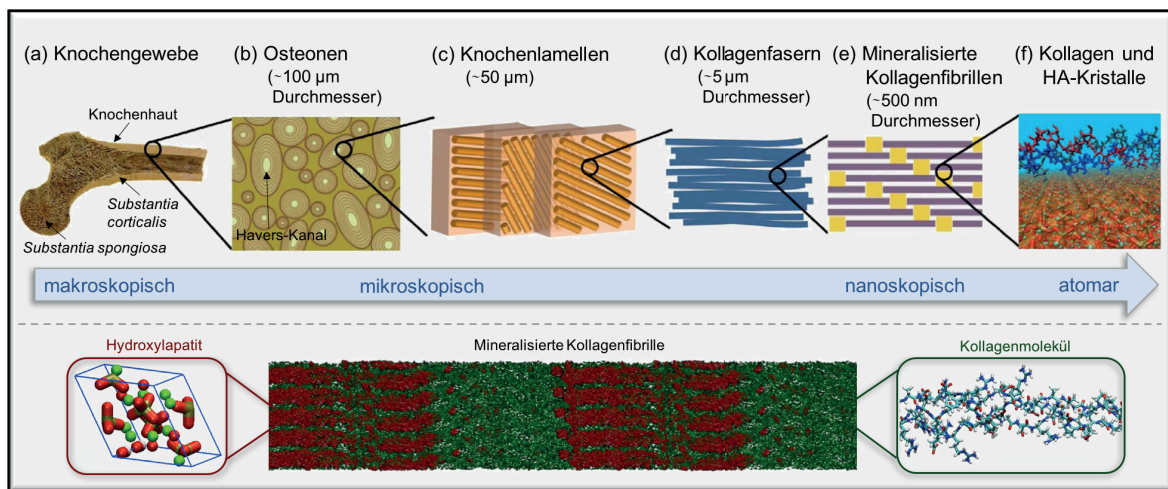


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des hierarchischen Aufbaus des Knochens (oben) von der makroskopischen bis zur atomaren Ebenen. (Unten) Mineralisierte Kollagenfibrille mit Angabe der Kristallstruktur des Hydroxylapatits und der tripelhelikalen Molekülstruktur des Kollagens. In angepasster Form übernommen von Nair *et al.*^[46]

3.2 Zusammensetzung des Knochenminerals

Die anorganische Komponente der Knochensubstanz besteht aus biologischem, nicht-stöchiometrischem Hydroxylapatit (HA) mit Substitutionen durch Fremdionen und wird auch als „Dahlit“ bezeichnet. Die nichtstöchiometrische Zusammensetzung des HA resultiert aus der Möglichkeit, Hydrogenphosphat in den Kristall einzubauen und damit formal Calcium-Ionen zu ersetzen.^[1] Es resultiert ein Calcium-defizitärer Hydroxylapatit (CDHA) mit der Summenformel $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ und $0 < x < 1$. Wie zuvor erwähnt ist HA strukturell sehr flexibel, sodass Calcium- (Ca^{2+}), Phosphat- (PO_4^{3-}) und Hydroxid- (OH^-) Ionen leicht durch eine Vielzahl anderer Ionen ersetzt werden können.^[1] Zu den wichtigsten Fremdionen zählen Natrium- (Na^+), Magnesium- (Mg^{2+}) und Kalium- (K^+) Ionen an Stelle des Ca^{2+} -Ions und Carbonat- (CO_3^{2-}) Ionen für die PO_4^{3-} -Ionen, sowie Fluorid- (F^-), Chlorid- (Cl^-) und CO_3^{2-} -Ionen für die OH^- -Ionen.^[1] Daneben sind im Knochenmineral noch Spurenelemente wie Strontium, Barium, Eisen, Zink und Kupfer zu finden.

In Tab. 3.1 sind die Massenanteile der im Knochenmineral enthaltenen Ionen zu entnehmen, der Anteil des Phosphors (P) umfasst die PO_4^{3-} und HPO_4^{2-} -Ionen.

Tab. 3.1: Zusammensetzung des humanen Knochenminerals.^[35]

Bestandteil:	Ca^{2+}	P	Na^+	Mg^{2+}	K^+	CO_3^{2-}	F^-	Cl^-
wt%	34,8	15,2	0,9	0,72	0,03	4-6	0,03	0,13

Morphologisch unterscheidet sich der biologische HA zum synthetischen HA (s. Abb. 3.2). Während synthetischer HA zumeist eine nadelförmige Morphologie aufweist (s. Abb. 3.2b), so sind die biologischen HA-Kristalle als nanokristalline Plättchen mit einer Länge von 8-50 nm, einer Breite von 5-25 nm und einer Dicke von 1-4 nm beschrieben (s. Abb. 3.2a).^[47-50]

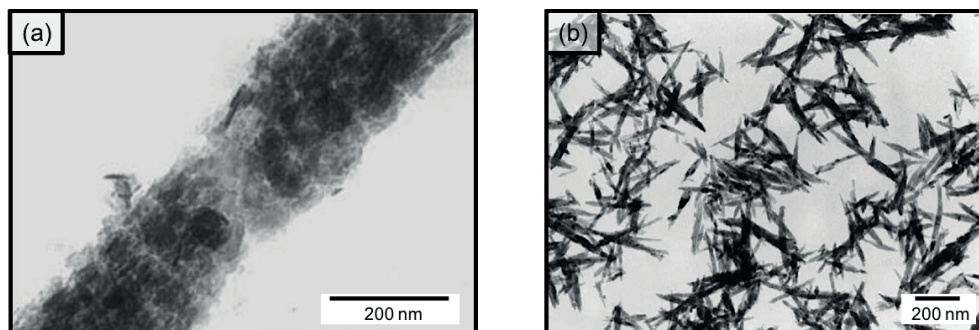


Abb. 3.2: TEM-Aufnahmen (a) einer mineralisierten Kollagenfibrille, übernommen von Weiner und Wagner^[47] und (b) von synthetischem Hydroxylapatit, übernommen von Arts *et al.*^[51].

3.3 Prinzip des kontinuierlichen Auf- und Abbaus der Knochen

Der Knochen ist einem kontinuierlichem Auf- und Abbau, dem sogenannten „Remodelling“, ausgesetzt. Die beteiligten Zellen sind Osteoblasten (knochenaufbauende Zellen) und Osteoklasten (knochenabbauende Zellen). Allgemein und stark vereinfacht lassen sich die Prozesse wie folgt beschreiben (s. Abb. 3.3). Osteoklasten binden an der Knochenmatrix, erzeugen ein saures Kompartiment ($\text{pH} \sim 4,5$), wodurch das Knochenmineral aufgelöst wird. Gleichzeitig wird die Ausscheidung spezieller Enzyme veranlasst, die die organische Matrix (Kollagen) abbauen. Durch die Freisetzung spezifischer Faktoren veranlassen Osteoklasten die Differenzierung von Vorläuferzellen (mesenchymale Stammzellen, MSC) zu reifen Osteoblasten, die zum Knochenaufbau beitragen (s. Abschnitt 5.2.2). Gleichzeitig steuern Osteoblasten die Reifung der Osteoklasten, indem ein Teil der Osteoblasten in den neu gebildeten Knochen einbettet wird und zu Osteozyten reift, deren Aufgabe vermutlich in der Regelung des Gleichgewichts zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau liegt.^[1] Das Wechselspiel zwischen Osteoblasten und Osteoklasten bietet dem Knochen die Möglichkeit sich von Verletzungen zu erholen und sich an unterschiedliche, von außen einwirkende Kräfte anzupassen.^[52]

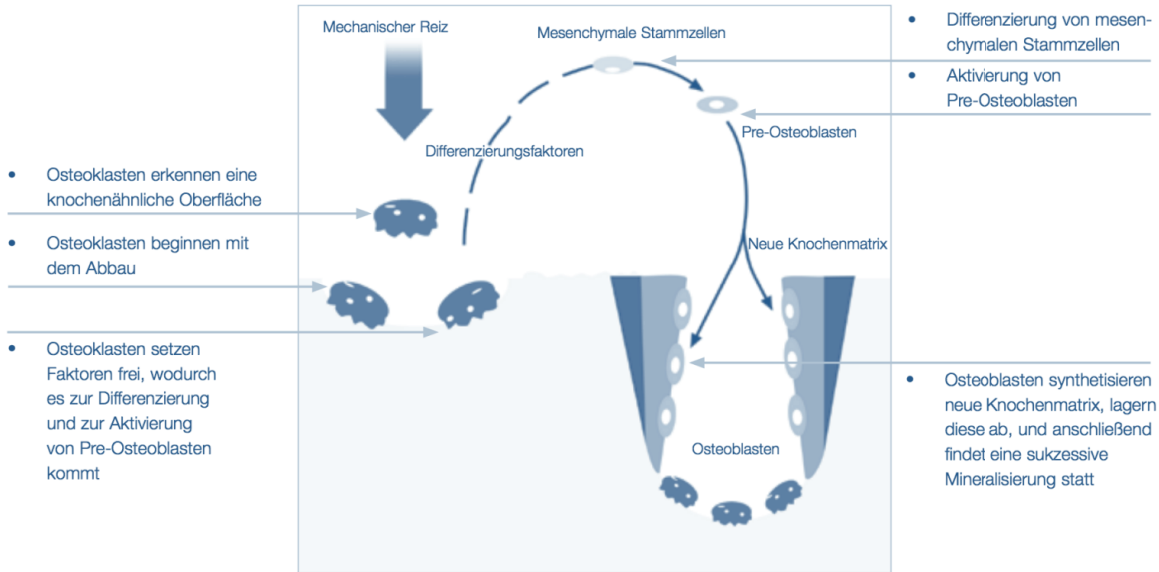


Abb. 3.3: Vereinfachte Darstellung des Knochenaufbaus und -abbaus, übernommen von Biomet.^[53]

3.4 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien (KEM) kommen zum Einsatz um Knochendefekte, wie beispielsweise Frakturen, Entzündungen oder Tumore, zu beheben. Diese Materialien können implantiert oder injiziert werden und fungieren zumeist als künstliche dreidimensionale extrazelluläre Matrix, welche die Neogenese des körpereigenen Knochens unterstützt und zugleich die Defektstelle stabilisiert.^[54] Es handelt sich dabei um eine osteokonduktive Wirkung, die durch eine definierte Struktur eine Art Leitschiene für einwachsende Blutgefäße und neugebildete Knochensubstanz vorgibt. Abb. 3.4 zeigt eine schematische Darstellung der Regeneration von neuem Knochengewebe auf der Basis eines KEMs.

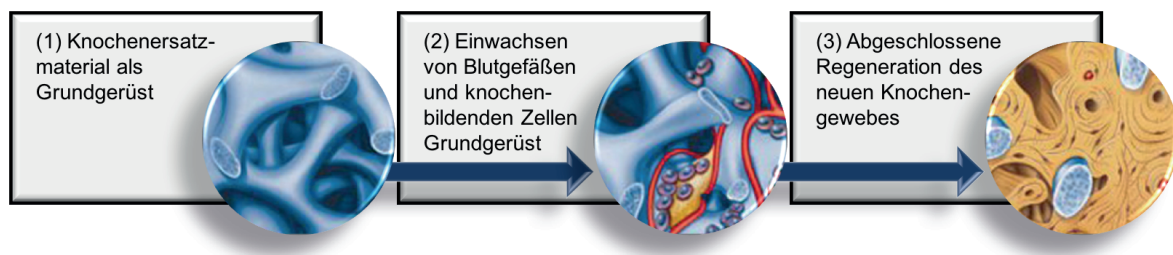


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Regeneration von neuem Knochengewebe auf der Grundlage eines Knochenersatzmaterials. In Anlehnung an das Bio-Oss® Knochenersatzmaterial-Schema.^[55]

Weitere Anforderungen an ein KEM umfassen neben der Sterilität und der Biokompatibilität (s. dazu Kapitel 5, Abschnitt 5.1), die Osteoinduktivität, die Porosität, die Belastungsstabilität, die Formbarkeit, und idealerweise die Biodegradation. Bewirkt das KEM eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu knochenbildenden Zellen (Osteoblasten), so wird von einer osteoinduktiven Wirkung gesprochen.^[56] Diese kann durch Freisetzung von bestimmten Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise durch das knochenmorphogenetische Protein (BMP: bone

morphogenetic protein), erfolgen. Die Porosität eines KEMs ist ebenfalls von großer Bedeutung für den Stoffaustausch, die schnelle Revaskularisierung und die Wirkung von osteoinduktiven Faktoren. Für eine optimale Grenzflächenaktivität, das Einwachsen von Knochen und die Implantatresorption werden Poren mit einem Durchmesser von 150-600 µm beschrieben.^[54] Die Belastungsstabilität als auch die Formbarkeit sind ebenfalls wichtige Eigenschaften die ein KEM erfüllen sollte, um einerseits der Defektstelle wieder die nötige Stabilität zu gewährleisten und andererseits sich der Form der Defektstelle perfekt anzupassen. Weiterhin zeichnet sich ein ideales KEM durch eine Biodegradation aus, sodass dieses körperfremde Material in leicht metabolisierbare, extrahierbare Einheiten zerlegt und aus dem Körper ausgeschieden werden kann.^[57] Aufgrund dieser ausgesprochen umfangreichen Anforderungen ist der autogene (körpereigene) Knochen das ideale KEM. Allgemein lassen sich die KEM nach ihrer Art und Herkunft in fünf Gruppen einteilen. (i) Die autogenen, (ii) die isogenen (Transplantat von einem Zwilling), (iii) die allogenen (Transplantat von einem anderen Menschen), (iv) die xenogenen (gewonnen aus Meeresalgen, Korallen oder tierischen Knochen, s. Abb. 3.5a) und die alloplastischen (synthetisch hergestellte) KEM.^[54] Obwohl die allogenen und xenogenen den autogenen Knochen in ihren Eigenschaften am ähnlichsten sind, bringen sie einige Nachteile und Risiken mit sich. Dazu zählen die Begrenztheit, die Notwendigkeit einer Sekundäroperation, Infektionsgefahren und Immunreaktionen. Im Gegensatz dazu bringen die synthetischen den enormen Vorteil der unbegrenzten Verfügbarkeit mit und sind somit von großem Interesse. Zudem sind sie nicht auf ein bestimmtes Spenderareal begrenzt und können in großen Mengen gefertigt werden. Eine Übersicht gängiger synthetischer KEM mit ihren wichtigsten Eigenschaften ist in Tab. 3.2 zusammengestellt.

Tab. 3.2: Vergleich der Eigenschaften gängiger Knochenersatzmaterialien.^[1]

<i>Material</i>	<i>mechanische Stabilität</i>	<i>Biodegradierbarkeit</i>	<i>Biokompatibilität im Gewebekontakt</i>	<i>Porosität</i>	<i>Formgebung im Defekt möglich</i>
Calciumphosphat-Keramiken	gut, aber spröde	sehr langsam bis schnell	sehr gut	möglich	nein
Calciumcarbonat-Keramiken	gut, aber spröde	ja	gut	möglich	nein
PMMA-Knochenzemente (Polymer)	gut	nein	gut	nein	ja
Polyester (Polyglycolid, Polylactid)	akzeptabel	ja	akzeptabel	möglich	nein
Calciumphosphat-Zemente	akzeptabel	ja	sehr gut	nein	ja
Calciumsulfat-Zemente	akzeptabel	ja	gut	nein	Ja
Metalle und Metallschäume (z.B. Titan, Tantal, NiTi)	sehr gut	nein	gut	möglich	nein

Die synthetischen Materialien können grob in vier Gruppen unterteilt werden. Es wird zwischen Keramiken, Polymeren, Zementen und Metallen unterschieden. Keramiken entstehen durch Sinterung von Calciumphosphaten, wie Hydroxylapatit (HA), Tricalciumphosphat (TCP) oder Gemischen aus beiden Calciumphosphaten, bei Temperaturen von 1000 – 1500 °C und hohem Druck. Dadurch sind sie zwar sehr biokompatibel und osteokonduktiv, aber zeigen keine osteoinduktiven Eigenschaften und nur eine geringe mechanische Belastbarkeit.^[54] Beispiele für synthetische Keramiken sind Maxresorb[®] (Biotiss Biomaterials GmbH), bestehend aus 60% HA und 40% β -TCP, Ostim[®] (Kulzer GmbH) und NanoBone[®] (Artoss GmbH) basieren auf phasenreinen HA-Nanokristallen und Cerasorb[®] (Riemser Arzneimittel AG), ein synthetisches β -TCP Granulat. Polymer-basierte KEM werden oftmals mit Calciumphosphaten kombiniert, um die mechanische Stabilität zu steigern (s. Abb. 3.5b-d). Die Zemente bestehen aus einem Zwei- oder Dreifachkomponenten-System aus 1-2 Pulverkomponenten (Calciumphosphaten, Calciumsulfaten oder Calciumcarbonaten) und einer wässrigen Lösung. Daraus resultiert eine formbare Paste, die mit Hilfe einer Spritze oder direkt appliziert werden kann. Die bekanntesten Vertreter der Calciumphosphat-Zemente sind Norian[®] Cranial Repair System (CRS) (Synthes-Holding AG) (s. Abb. 3.5e) und BoneSource[®] (Stryker GmbH & Co. KG).^[54] Metalle und Metallschäume (s. Abb. 3.5f) sind nicht resorbierbare und damit form- und dimensionstabile KEM, deren Verarbeitung aufgrund fehlender Aushärtungswartezeiten unkompliziert ist. Zudem zeichnen sie sich durch hohe Druck- und Zugfestigkeit aus, haben allerdings den Nachteil, dass sie körperfremde Stoffe sind. Somit kann es schneller zu Komplikationen oder Abstoßungen kommen, die eine Entfernung des Metall-basierten KEM erfordert.^[54] Abschließend ist festzuhalten, dass es bereits eine Palette gängiger KEM gibt, die allerdings alle Vor- und Nachteile besitzen und abhängig von ihren Eigenschaften und der Defektstelle eingesetzt werden können.



Abb. 3.5: Ausgewählte Beispiele von Knochenersatzmaterialien.^[58-63]

4

Hydrogele

4.1 Was sind Hydrogele?

Bei einem Hydrogel handelt es sich um ein in Wasser gequollenes, dreidimensionales Netzwerk, welches zumeist aus hydrophilen, aber wasserunlöslichen Polymerketten aufgebaut ist.^[64] Wie bereits das Präfix *Hydro-* verdeutlicht, zeichnen sich diese Netzwerke durch eine extrem hohe Wasseraufnahmekapazität aus.^[65] Dabei quillt das Netzwerk im Wasser bis zu einem Gleichgewichtsquellzustand auf, während die ursprüngliche Form erhalten bleibt.^[66] Dieses Zwei-Komponenten-System, aus einem festen und einem flüssigen Anteil, führt zu der entscheidenden viskoelastischen Eigenschaft eines Gels.^[67] Eine einfache Klassifizierung der Gele auf der Grundlage von strukturellen Kriterien erfolgte bereits 1974 von Flory.^[68] Es wurden vier Arten unterschieden, (1) gut geordnete lamellare Strukturen, (2) völlig ungeordnete kovalente polymere Netzwerke, (3) durch physikalische Aggregation gebildete polymere Netzwerke und (4) partikuläre ungeordnete Strukturen.^[68] Heute wird sich fast ausschließlich auf die beiden Klassen der chemisch- und physikalisch-vernetzten Gele beschränkt.^[67,69] Chemisch-vernetzte Gele basieren auf kovalenten Verknüpfungen, wohingegen physikalisch-vernetzte Gele durch hydrophobe Wechselwirkungen oder Coulombschen Kräften verknüpft werden.^[64,67]

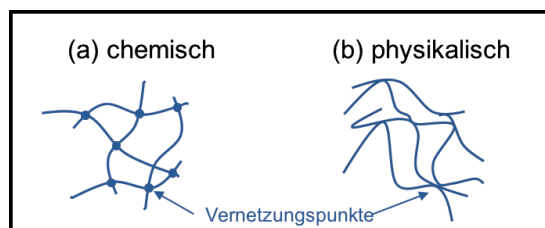


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Netzwerkknüpfung (a) eines chemisch-vernetzten Gels mit kovalenten Vernetzungspunkten und (b) eines physikalisch-vernetzten Gels aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen und Coulombschen Kräften.

Die Bildung eines physikalisch-vernetzten Gels kann durch hohe Temperaturen, Lösungsmittel- oder pH-Wert Änderungen erreicht werden und ist zumeist reversibel. Solche Gele setzen sich häufig aus Biopolymeren, wie beispielsweise Agarose oder Cellulose, und aus Proteinen, wie Gelatine oder Collagen, zusammen. Diese von der Natur abgeleiteten hydrogelbildenden Polymere sind entweder Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) oder haben ähnliche makromolekulare Eigenschaften

wie die EZM.^[69] Aufgrund dessen werden sie auch als natürliche Gel-Systeme bezeichnet. Die Bildung eines chemisch-vernetzten Gels kann beispielsweise durch eine UV-initiierte radikalische Polymerisation oder durch eine Säure- oder Basen-katalysierte Kondensation erfolgen. Das dreidimensionale Netzwerk wird somit durch kovalente Vernetzungen zwischen den strukturellen Einheiten der Polymerketten aufgebaut. Im Vergleich zu der physikalischen Vernetzung ist die chemische Vernetzung prinzipiell nicht reversibel. Die chemisch-vernetzten Gele bestehen aus synthetischen Materialien wie zum Beispiel Polyacrylamid^[67], Polylaktid^[70,71], Polycaprolakton^[72] und Polyvinylalkohol^[73]. Aufgrund dessen werden sie auch als synthetische Gel-Systeme bezeichnet. Im Vergleich zu den natürlichen Gelen sind die synthetischen Gele durch den Einsatz von Polymeren mit spezifischen Molekulargewichten, Blockstrukturen und abbaubaren Einheiten in ihren Eigenschaften kontrollier- und steuerbar.^[69,74]

Die hydrophile Eigenschaft der Hydrogele wird durch die durch funktionelle Gruppen, wie Hydroxyl-, Carboxylat-, Sulfonat- oder Amid-Gruppe, vermittelt. Eine schematische Darstellung der Wasseraufnahmekapazität, bzw. des Quellvorgangs eines Hydrogels ist in Abb. 4.2 angegeben. Eine direkte Adsorption von Wasser erfolgt am Polymernetzwerk, wobei von „primär gebundenem Wasser“ gesprochen wird. Diese adsorbierten Wassermoleküle benötigen einen hohen Platzbedarf woraus eine erste Ausdehnung des Polymernetzwerks resultiert. Folglich wird das Eindringen weiterer Wassermoleküle ermöglicht bis letztlich alle hydrophilen Gruppen hydratisiert vorliegen. Zusätzlich dringen weitere Wassermoleküle, als „sekundär gebundenes Wasser“ in das Polymernetzwerk ein und wechselwirken über Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Kräfte mit dem „primär gebundenem Wasser“. Daraus folgt eine weitere Ausdehnung des Polymernetzwerks und die Quellung des Gels wird verursacht. Aufgrund von osmotischen Kräften finden weitere Wassereinlagerungen („freies Wasser“) statt, bis die maximale Quellung und somit der Gleichgewichtszustand erreicht ist.^[75]

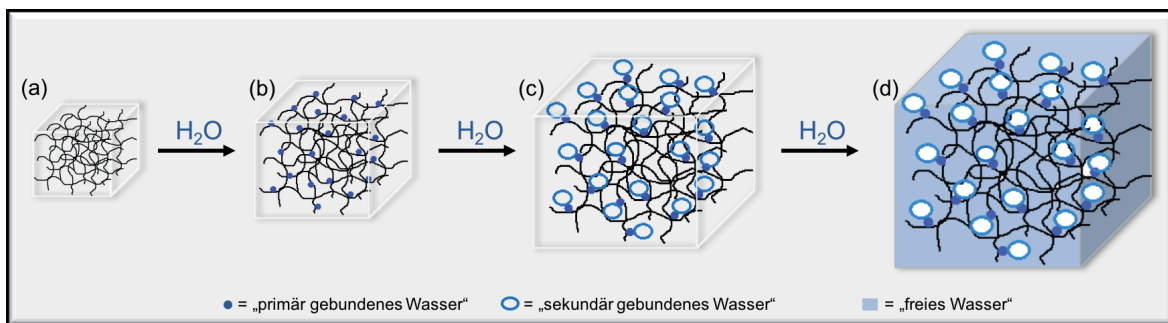


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Vorgangs des Quellens eines Hydrogels. (a) Wasserfreies Polymer-Netzwerk, (b) direkte Adsorption von Wasser am Polymernetzwerk, (c) Anlagerung weiterer Wassermoleküle an den vorhandenen Wassermolekülen und (d) Gleichgewichtsquell-Zustand.

Die Elastizität von chemischen Bindungen ist jedoch begrenzt, weshalb chemisch-vernetzte Gele eine eingeschränkte Quellfähigkeit besitzen. Die Terminierung erfolgt sobald der osmotische Druck und die kovalenten Bindungen im Gleichgewicht miteinander stehen (s. Abb. 4.2d). Dadurch wird

auch der Zusammenhang zwischen Vernetzungsgrad und Quellverhalten deutlich. Ein hoher Vernetzungsgrad führt zur eingeschränkten Bewegungsfreiheit und damit zur verminderten Wasseraufnahmekapazität. Die Eigenschaften der Hydrogele können somit durch die eingesetzten Makromonomere, die Art der Vernetzung und die Vernetzungsdichte gezielt reguliert werden. Darüber hinaus zeigen Hydrogele, aufgrund ihres hohen Wassergehaltes und ihrer Konsistenz, eine physikochemische Ähnlichkeit zur nativen EZM, wodurch sie für den biomedizinischen Einsatz von großem Interesse sind.^[64]

Hydrogele finden bereits breite Anwendung im Alltag. Eines der bekanntesten, natürlichen Hydrogele ist die „Götterspeise“, in der das Polymernetzwerk aus Gelatine besteht. Hierbei macht die Gelatine etwa 3% des Volumens des Hydrogels aus, der Rest ist gesüßtes, mit Aroma und Farbstoffen angereichertes Wasser.^[76] Das mengenmäßig größte Anwendungsgebiet ist jedoch die Verwendung als Superabsorber in Wegwerfwindeln, Hygiene-Erzeugnissen und in Wundpflastern.^[76] Weitere biomedizinische Anwendungsgebiete von Hydrogelen umfassen die Geweberekonstruktion, die Medikamentenfreigabe (*drug delivery*) und die Fertigung von Kontaktlinsen.^[77,78]

4.2 Tropfenbasierte Mikrofluidik-Technik zur Herstellung von Mikrogelelen

Unter der Mikrofluidik verbirgt sich die Wissenschaft und Technologie von Systemen mit integrierten mikrometergroßen Kanälen, durch die Flüssigkeiten in konstruierten Konfigurationen und systematischer Steuerung sowie Manipulation fließen können.^[79] Die tropfenbasierte Mikrofluidik-Technik ermöglicht die Herstellung von mikrometergroßen, monodispersen Hydrogel-Kapseln.^[80] Dieses Konzept basiert auf der Herstellung von Emulsionstropfen, die als Template für eine Polymerisation fungieren (s. Abb. 4.3). Dabei wird eine wässrige Makromonomer-Lösung als dispergierte Phase in einen Mikrokanal injiziert und ein Fluss eines Prä-Mikrogel-Fluides erzeugt. Durch das Einbringen einer zweiten nichtmischbaren Flüssigkeit als kontinuierliche Phase wird mittels hydrodynamischer Flussfokussierung eine periodische Unterbrechung der dispergierten Phase hervorgerufen. Als Resultat werden Emulsionstropfen, die Prä-Mikrogel-Kapseln, erhalten, die im Anschluss zu den Mikrogel-Kapseln polymerisieren.

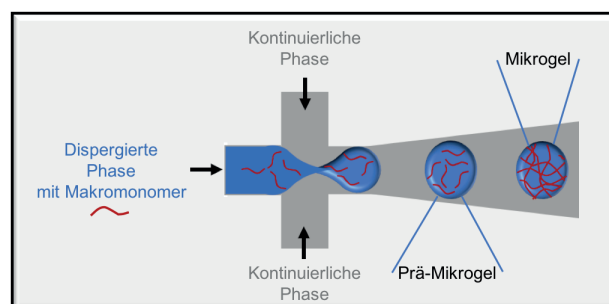


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der tropfenbasierten Mikrofluidik-Technik.

Die Mikrogele weisen elastische Moduli im Bereich von 0,1 – 100 kPa auf und eignen sich für die Verkapselung von Proteinen, Nucleinsäuren oder lebenden Zellen.^[81] Ein entscheidender Aspekt ist die Variation der Sensitivität der Gele. So können abhängig von der Art und der Konzentration der eingesetzten Polymersysteme die Elastizität und das Quellverhalten, bis zur vollständigen Auflösung der Gele, variiert werden. Zusätzlich ermöglicht die Mikrofluidik eine variable Größen- und Formgebung der Mikrogele, wodurch eine bestimmte Spezifität in der Anwendung gegeben ist. Aufgrund dessen finden sich Mikrogele in umfassenden Anwendungsgebieten wieder. Dabei können sie beispielsweise in der Grundlagenforschung als abgeschlossene Reaktionsräume oder zur Untersuchung der dreidimensionalen Einengung von Additiven dienen. In der anwendungsbezogenen Praxis erlauben Mikrogele die Verkapselung von Additiven und damit deren temporäre Inaktivierung und Abschirmung, sodass sie gezielt an einen Einsatzort transportiert und freigesetzt werden können.^[81,82] Zwei Möglichkeiten zur Einschließung von Additiven sind gegeben (s. Abb. 4.4). Die Mikrogele mit einfacher Struktur schließen Additive in das Polymernetzwerk ein (s. Abb. 4.4a). Im Gegensatz dazu verkapseln Mikrogele mit einer Kern-Hüll-Struktur Additive mit einem Lösungsmittel und sorgen damit für eine Isolation der Additive vor der Umgebung (s. Abb. 4.4b).

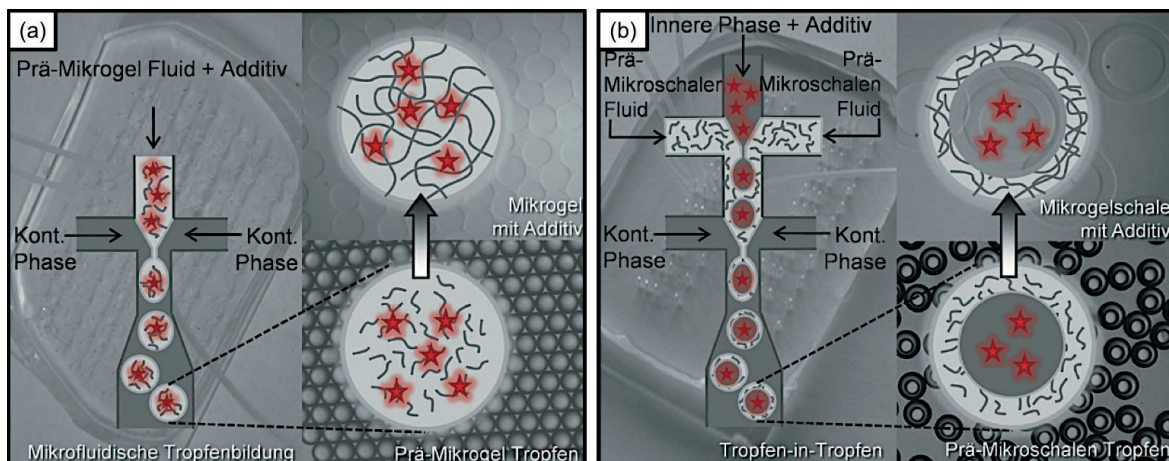


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der beiden Möglichkeiten zur Einschließung von Additiven mittels tropfenbasierter Mikrofluidik-Technik. (a) Einfache Mikrogele mit Einschluss der Additive im Polymernetzwerk und (b) Mikrogele mit Kern-Hüll-Struktur, in denen Additive mit einem Lösungsmittel verkapselt werden. Übernommen von S. Seiffert.^[81,82]

Die Mikrofluidik-Technik verbindet die Vorteile der Hydrogele mit den Vorteilen der kontrollierbaren, reproduzierbaren und sensitiven Verkapselung von Additiven und bietet damit ein intelligentes Transport- als auch Reaktionssystem.

5

Zellbiologische Grundlagen

5.1 Biokompatibilität und Zytotoxizität

Mit dem Begriff Biokompatibilität wird die Reaktion von Zellen auf synthetische Materialien beschrieben. Materialien, die keine zytotoxischen, inflammatorischen, genotoxischen oder karzinogene Eigenschaften hervorrufen, werden als biokompatibel bezeichnet.^[83] Die Biokompatibilität ist vor allem für die *in vivo* Anwendung von Implantaten bzw. synthetischen Materialien von großer Bedeutung, da diese über einen langen Zeitraum in direktem Kontakt zu lebenden Zellen stehen. Biokompatibilitätstests erfolgen durch *in vitro* und *in vivo* Studien, wodurch Sicherheitsbewertungen spezifischer Materialien durch Untersuchung der biologischen Effekte erfolgen.^[83] Durch Inkubation bzw. Stimulation gewebespezifischer Zellen, die am Implantationsort vorhanden sind, wird die biologische Verträglichkeit durch Analyse der Morphologie und der Proliferationseigenschaften dieser Zellen untersucht. Mit Hilfe von speziellen *in vitro* Testverfahren kann zusätzlich eine Aussage über die zytotoxischen Eigenschaften von Materialien getroffen werden. Zellen, die einem synthetischen Material ausgesetzt sind, reagieren in ihrer Stoffwechselaktivität entweder unverändert (von dem Material geht keine Zytotoxizität aus) oder es resultieren Zellschäden. Im Nachfolgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Testverfahren und Zelltypen kurz erläutert.

5.1.1 MTS-Assay

Mit dem MTS-Assay wird, durch Messung der mitochondrialen Aktivität, eine Aussage über die Viabilität der Zellen (Zell-Vitalität) getroffen. Dabei wird das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, kurz MTS, mit dem elektronenkoppelnden Reagenz, Phenazinethosulfat (PES) verwendet, das von lebenden stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen wird.^[84] Das MTS wird von den Dehydrogenasen in das braun-gefärbte wasserlösliche Formazan reduziert (s. Abb. 5.1). Die Absorption des Formazans bezieht sich auf die Menge an umgesetztem MTS, das proportional zur Anzahl lebender Zellen ist.^[85]

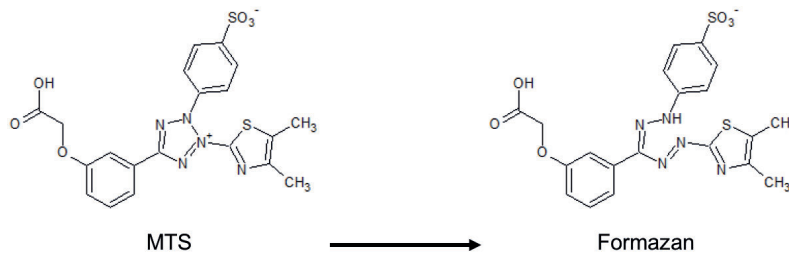


Abb. 5.1: Strukturformeln des Tetrazoliumsals (MTS) und der reduzierten Form, Formazan.

5.1.2 LDH-Assay

Mit Hilfe des LDH-Assays wird die Menge an freigesetzter Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Das Enzym ist im Zytosol der Zelle lokalisiert. Im Fall einer Zellyse gelangt LDH aus der Zelle und kann im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Der Test dient somit als Nachweis für Zellmembranschäden und gibt folglich erste Hinweise auf toxische Eigenschaften eines Materials. Zur Bestimmung der Menge an freigesetzter LDH wird das Tetrazoliumsals, 3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazol-3-iumchlorid (INT) verwendet, das in Anwesenheit von der LDH in ein rotes Formazan reduziert wird (s. Abb. 5.2).^[86] Die Bildung des Formazans ist proportional zur Menge an freigesetzter LDH und damit zur Anzahl lysierter Zellen.

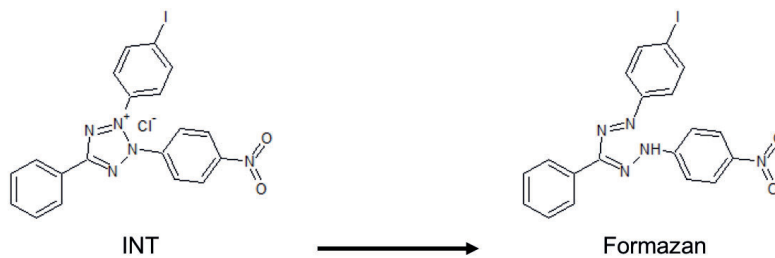


Abb. 5.2. Strukturformeln des Tetrazoliumsals (INT) und der reduzierten Form, Formazan.

5.1.3 Kristallviolett-Färbung

Bei der Kristallviolett-Färbung handelt es sich um ein spektralphotometrisches Verfahren, das auf der Anfärbbarkeit von Zell-DNA mit dem Farbstoff Kristallviolett (Hexamethylen-p-rosaliniumchlorid, s. Abb. 5.3) beruht.^[87] Hierbei werden nur adhärenente Zellen gefärbt. Die geschädigten bzw. toten Zellen, die den Kontakt zur Oberfläche verloren haben, werden durch vorherige Waschschrirte entfernt. Nach Herauslösen des gebundenen Farbstoffes aus den Zellen wird die Intensität des Farbstoffes photometrisch vermessen und kann als Maß für die Anzahl lebender Zellen verwendet werden. Kueger *et al.*^[88] zeigten, dass zwischen der vermessenen Absorption und der Anzahl der Zellen über einen großen Bereich ein linearer Zusammenhang besteht. Der Test ist eine einfache und kostengünstige Ergänzung zur Bestätigung der Resultate der MTS- und LDH-Assays.

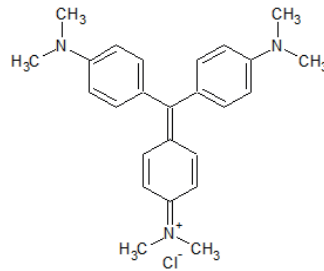


Abb. 5.3: Strukturformel von Kristallviolett.

5.2 Primäre Zellen und Zelllinien

Zur Beurteilung der Biokompatibilität eines Materials sind *in vitro* Tests sowohl mit Zelllinien als auch mit primären Zellen unabdingbar. Im Nachfolgenden werden die Unterschiede zwischen primären Zellen und einer Zelllinie, am Beispiel der in dieser Arbeit verwendeten Zellen, erläutert.

5.2.1 Zelllinie

Eine Zelllinie entstammt zwar einem Organismus, ist aber in ihrer genetischen Information so modifiziert, dass sich die biologischen Eigenschaften ändern, wie zum Beispiel das Proliferationsverhalten. Die Modifizierung kann entweder durch karzinogene oder ionisierende Strahlung während der Kultivierung von Zellen hervorgerufen werden, oder aber die Zellen werden direkt einem Tumorgewebe entnommen.^[89] Zelllinien sind immortalisierte Zellen, die sich unbegrenzt teilen können und dabei ihre phänotypischen Eigenschaften beibehalten.^[90] Dadurch sind sie leicht zu kultivieren und stehen unlimitiert zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die Osteosarkom-Zelllinie MG-63 verwendet, die ursprünglich aus einem juxtakortikalen Osteosarkom der distalen Diaphyse im linken Oberschenkelknochen eines 14-jährigen Jungen entstammt.^[91] Diese Zelllinie zeigt ähnliche hormonelle Reaktionen und phänotypische Eigenschaften wie primäre Osteoblasten und ist daher ein gutes Modell für die ersten Biokompatibilitäts-Untersuchungen von Biomaterialien für den Knochenersatz oder die Knochenregeneration.

5.2.2 Primäre Zellen

Im Gegensatz zu den Zelllinien werden primäre Zellen unmittelbar aus einem Organismus isoliert und unbehandelt in Kultur gehalten. Bei primären Zellen ist zu beachten, dass ihre Eigenschaften, wie beispielsweise das Proliferationsverhalten, spenderabhängig variieren können. Weiterhin sind sie in ihrer Anzahl begrenzt und können auch nicht über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten, bzw. in der Anzahl „hochgezüchtete“ werden. Verglichen mit einer Zelllinie sind primäre Zellen in der Kultivierung sehr empfindlich und können in ihren phänotypischen Eigenschaften leicht mutieren.^[90] Daher ist es wichtig Zelltests, unter Verwendung von primären Zellen, mit verschiedenen Spendern durchzuführen, wobei die Passage der Zellen gleichgehalten werden sollte. So wird sichergestellt, dass die beobachteten Ergebnisse spenderunabhängig sind und dennoch

vergleichbar. In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen primären Zelltypen gearbeitet, Osteoblasten und den Endothelzellen.

Osteoblasten sind für den Knochenaufbau zuständig und entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Die Reifung der MSC über Pre-Osteoblasten zu Osteoblasten wird als Differenzierung bezeichnet. Die reifen Osteoblasten produzieren und sezernieren Typ-I-Kollagen. Zunächst entsteht eine aus überwiegend Kollagen bestehende unmineralisierte Knochenmatrix, in deren Hohlräume schließlich die Mineralisierung des biologischen Hydroxylapatits durch Einlagerung von Calcium- und Phosphat-Ionen erfolgt.^[1] Der Vorgang der Differenzierung ist erst dann abgeschlossen, wenn die Zelle Knochenmatrix synthetisieren kann und die Mineralisierung der Matrix erfolgt.^[92]

Endothelzellen bilden die innere Schicht von Blutgefäßen und erzeugen eine antikoagulierende Barriere zwischen der Gefäßwand und dem Blut.^[93] Aufgrund ihrer Migrationsfähigkeit wird die Entwicklung und das Wachstum von Blutgefäßen, die Angiogenese, gesteuert. Die häufigste Quelle zur Isolation von Endothelzellen ist die humane Nabelschnur.^[94-97] Einerseits sind die Endothelzellen aus der Nabelschnur leichter verfügbar als aus anderen Gefäßen und andererseits sind sie auch frei von jeglichem pathologischen Prozess.^[97] Die Endothelzellen werden aus der Vene der Nabelschnur isoliert, weshalb sie als *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, kurz HUVEC, bezeichnet werden. Die Stoffwechselaktivität von Endothelzellen in Anwesenheit von Biomaterialien gibt Rückschlüsse auf mögliche inflammatorische Effekte oder das Vorhandensein von Endotoxinen.^[95,98] In beiden Fällen tritt eine vermehrte Expression von E-Selektin, ein integrales Glykoprotein in der Plasmamembran von Endothelzellen, auf. Der Nachweis von E-Selektin erfolgt durch Antikörperbasierte Detektionsmethoden (s. Abschnitt 7.2.3).

5.3 Differenzierung von Osteoblasten

Die Differenzierung von Osteoblasten ist ein komplexer Prozess, der hier in gekürzter und vereinfachter Form dargestellt wird. Auf Grundlage intensiver Untersuchungen an einem Rattenkalvarienzellsystem beschrieben Owen *et al.*^[99] die Differenzierung von Osteoblasten mit einem Osteoblastendifferenzierungs-Modell, auch Owen-Modell genannt. Hierbei wird die Differenzierung in drei Phasen eingeteilt: die Proliferation, die Matrix-Maturation und die Mineralisation (s. Abb. 5.4). In der Proliferationsphase erfolgt sowohl die Expression von Zellzyklus- und Wachstums-Genen als auch die Expression von extrazellulären Matrixproteinen, wie Pro-Kollagen I und Fibronectin. Die Matrix-Maturationsphase, oder auch Matrix-Reifephase genannt, wird durch die maximale Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) charakterisiert. In der letzten Phase, der Mineralisation, werden Gene für Proteine wie Osteokalzin und Osteopontin exprimiert, die den Reifeprozess zu Osteoblasten abschließen. Siggelkow *et al.*^[100] konnten derartige Wachstums- und Differenzierungsparameter auch an primären humanen Osteoblasten nachweisen.

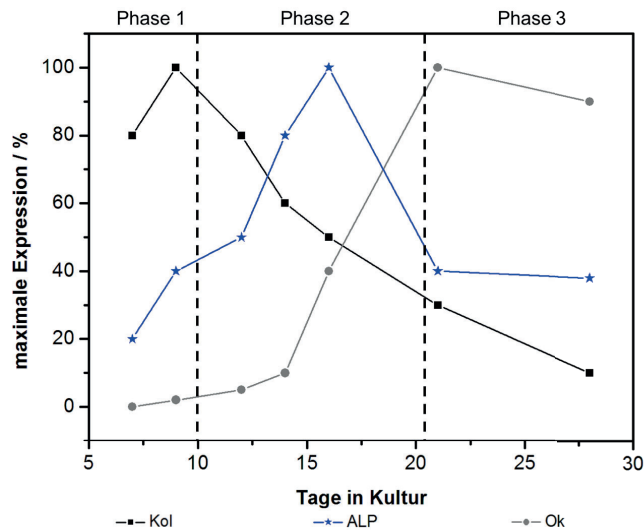
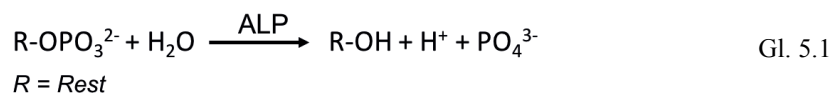


Abb. 5.4: Darstellung der drei Differenzierungs-Phasen von kultivierten Osteoblasten anhand der Genexpression von Osteoblasten-charakteristischen Proteinen nach dem Owen-Modell^[99]. Mit Kol: Kollagen I, ALP: alkalische Phosphatase und Ok: Osteokalzin.

5.3.1 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein Enzym mit der Fähigkeit Phosphorsäureester zu hydrolysieren (s. Gl. 5.1). Der Prozess wird als Dephosphorylierung bezeichnet, wobei die Phosphat-Gruppen unterschiedlicher Moleküle (wie beispielsweise Proteinen und Nukleotiden) im alkalischen Milieu entfernt werden. Eine wichtige Rolle spielt die ALP bei der Knochenmineralisierung durch die Bereitstellung der Phosphat-Ionen und dient daher als Marker für die Differenzierung von Osteoblasten und damit dem Knochenaufbau (Osteogenese).^[90,101] *In vitro* wird ALP in einer frühen Phase der Osteogenese, während der Matrix-Maturation exprimiert.



5.4 Fetales Rinderserum

In der Zellkultur ist die Verwendung von Seren als Zusatz in Zellkulturmedien eine geläufige Routinetechnik. Eines der gängigen Seren ist das Serum aus ungeborenen Rinderföten, das fetale Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*). Es wird nach der Schlachtung aus dem Blut von Rinderföten zwischen dem 3. und 7. Trächtigenmonat gewonnen. Nach abgeschlossener Blutgerinnung wird es steril filtriert und anschließend durch Hitzeinaktivierung (30 Minuten bei 56 °C) die thermolabilen Viren sowie Mykoplasmen abgetötet. Zusätzlich werden alle thermolabilen Komponenten auf eine möglichst niedrige Konzentration gebracht, wodurch eine bessere Standardisierung einzelner Serumchargen gewährleistet wird.^[102] Die Verwendung von Serum in der Zellkultur hat verschiedene Vorteile. Einerseits wird dadurch die Versorgung der Zellkultur mit Hormonen, Wachstums- und

Anheftungsfaktoren (z.B. Fibronectin), Bindungs- und Transportproteinen, zusätzlichen Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen, Fettsäuren und Lipiden sichergestellt.^[103] Andererseits übernimmt das Serum auch Funktionen wie Proteinaseinhibition und Detoxifizierung (durch unspezifische Bindung und Inaktivierung). Es trägt zu einer verbesserten Pufferwirkung bei, erhöht die Viskosität des Mediums und bietet zusätzlich einen mechanischen Schutz durch Herabsetzung von Scherkräften.^[102] Die im Serum enthaltenen Proteine spielen vor allem bei der Zelladhärenz *in vitro* und *in vivo* an Biomaterialien eine wichtige Rolle. Oftmals dauert es nur Sekunden, bis die Oberfläche eines Biomaterials von Serumproteinen vollständig bedeckt ist.^[104] Dieses Phänomen wird als Proteinkorona bezeichnet und vermittelt in den meisten Fällen den Kontakt der Zelle zum Biomaterial. Zudem ist die Proteinkorona auch in der Nanopartikel Anwendung von großer Bedeutung. Sie übt einen großen Einfluss auf das physiologische Schicksal der Nanopartikeln, wie z.B. die zelluläre Aufnahme, die Signalisierung, die Agglomeration und die Toxizität, aus.^[105-107]

5.4.1 Serumproteine

Bislang konnten etwa 1800 Serumproteine nachgewiesen werden, wovon nur weniger als die Hälfte identifiziert wurden.^[102] Die wichtigsten Aufgaben der Serumproteine liegen in der Pufferfunktion, die über ihre Aminosäuregruppen Protonen binden bzw. abgeben können, sowie in der unspezifischen Bindung und damit Inaktivierung von toxischen Stoffwechselprodukten. Zu den häufigsten Vertretern im fetalen Rinderserum zählen Albumin (BSA: *bovine serum albumin*) und Fetuin. Das Protein Albumin gehört zu der Gruppe der globulären Proteine und besteht mit einem Molekulargewicht von ~ 66 kDa aus etwa 580 bis 590 Aminosäuren.^[108,109] Albumin zeichnet sich durch den hohen Anteil an Cystein aus, ist wasserlöslich und weist einen amphoteren Charakter auf, wodurch es in der Lage ist sowohl Anionen als auch Kationen reversibel zu binden. Im Blutplasma ist es das Protein mit der höchsten Konzentration und sorgt maßgeblich für den kolloidosmotischen Druck. Weiterhin übernimmt Albumin eine Transportfunktion für viele niedermolekulare Verbindungen, wie z.B. Calcium, Magnesium, Bilirubin und freie Fettsäuren. Fetuin ist wie Albumin ein Blutprotein, das ebenfalls für den Transport von Substanzen im Blutkreislauf verantwortlich ist. In fetalem Rinderserum kommt das Fetuin (lat. Fetus) in besonders großen Mengen vor.^[110] Das humane Analogon ist als α_2 -Heremans Schmidt-Glycoprotein (α_2 -HS), bzw. Fetuin-A, bekannt und besitzt ein Molekulargewicht von ~ 48 kDa.^[111] Die Funktion des Fetuin-A wurde durch Schäfer *et al.*^[110] an Gen-*knockout* Mäusen aufgeklärt und als potenter Hemmstoff gegen Verkalkungen im Blut beschrieben.

6

Motivation

Das knöcherne Fundament ist das größte Mineraldepot im Körper und sorgt mit seiner enormen Festigkeit für eine mechanische Stabilität. Im Knochen des menschlichen Organismus sind ~ 99% des gesamten Calciums und ~ 85% des gesamten Phosphors, in Form von Phosphat, gespeichert.^[112] Die *in vivo* Knochenbildung ist ein enorm komplexer Prozess, der einem kontinuierlichen Umbau unterliegt. Dadurch passt sich die Knochenstruktur an die sich während des Lebens ändernden mechanischen Anforderungen an. Durch die Kombination einer anorganischen Mineralkomponente mit einer organischen Matrix entsteht dieses biologisch hochgradig strukturierte Kompositmaterial. Darin begründen sich auch die beeindruckenden Eigenschaften der Härte bei gleichzeitiger Elastizität. Dennoch kommt es mit zunehmendem Alter, durch Verletzungen, Infektionen, degenerativen Erkrankungen oder Krebs zu einer Beeinträchtigung dieser Eigenschaften.^[113] Der Knochen wird zerbrechlicher, die Calciumdepots sind oftmals erschöpft und als Folge ist die mechanische Funktionalität der Knochen nicht mehr oder nur noch eingeschränkt gegeben. Daher besteht eine große Nachfrage diese Defekte mit geeigneten Materialien aufzufüllen und die Knochenregeneration anzuregen, sodass die Lebensfunktionalität und damit die Lebensqualität erhalten bzw. fortgesetzt werden kann. Ein spezielles Anwendungsgebiet stellt die Kieferchirurgie dar. Oftmals müssen vor dem Setzen einer Zahnprothese die Kieferknochen aufgebaut werden, um der Prothese einen ausreichenden Halt zu gewährleisten. Dies trifft vor allem bei älteren Menschen zu, da sich die Eigenschaften des Knochens mit zunehmendem Alter deutlich verschlechtern.^[50]

Aufgrund der unbegrenzten Verfügbarkeit stehen synthetische Knochenersatzmaterialien (KEM) bzw. Biomaterialien, die die Knochenregeneration vorantreiben, im Fokus der aktuellen Forschung. Die komplexe Struktur, die beeindruckenden Eigenschaften und die strukturelle Varianz in der Zusammensetzung des Knochenminerals führen allerdings zu einem umfassenden Anforderungsprofil. Zahlreiche KEM sind bereits kommerziell erhältlich und im klinischen Einsatz (s. Kapitel 3, Abschnitt 3.4).^[54] Die meisten basieren auf Calciumphosphaten, wobei Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP) die gängigsten Materialien sind.^[114,115] Obwohl diese Calciumphosphate eine chemische Ähnlichkeit zum Knochenmineral zeigen und osteokonduktive Eigenschaften aufweisen,^[114–116] ahmen sie die physio-chemischen Eigenschaften des natürlichen Knochenminerals nicht exakt nach. Die Synthese einer chemisch und morphologisch dem Knochenmineral identischen Calciumphosphat-Phase gilt als eine der größten Herausforderungen. Da es hierzu der spezifischen Wechselwirkungen mit den entsprechenden Biomolekülen und

vermutlich auch der Kristallisation in abgetrennten Kompartimenten der Zelle bedarf, ist dieses Ziel bislang noch nicht realisiert worden.^[1]

In den letzten Jahren erlangten amorphe Modifikationen, wie amorphes Calciumphosphat (ACP) und Calciumcarbonat (ACC), als potentielle anorganische Vorstufen des Knochenminerals zunehmend an Bedeutung.^[42,117-119] Der große Nachteil dieser amorphen Modifikationen liegt in der thermodynamischen Triebkraft zur spontanen Kristallisation. Demnach ist eine Lagerung über längere Zeit bei Umgebungsbedingungen und ohne zusätzliche Stabilisatoren kritisch.^[120] Im Gegensatz zu den amorphen Modifikationen zeigt Vaterit, als metastabile Calciumcarbonat Modifikation, eine ausreichende Stabilität. Gleichzeitig bringt Vaterit auch die nötige Aktivität, bezüglich einer Auflösung und Rekristallisation, mit. Somit besteht großes Interesse, Vaterit als Präkursor einer HA-Spezies und deren Anwendung in der Knochenregeneration zu untersuchen. Bereits Maeda *et al.*^[71,72,121,122], aber auch Kim *et al.*^[123] und Wang *et al.*^[124] konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass Vaterit in einer simulierten Körperflüssigkeit das nötige Potential ausweist sich in eine HA-Spezies umzusetzen. Genaue Details zur Umsetzung, der gebildeten HA-Spezies, der biologischen Eigenschaften und der *in vitro* Reaktionen sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Aus diesem Grund ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, detaillierte Informationen zu den chemischen und biologischen Eigenschaften der synthetisch hergestellten Vaterit-Partikel zu erhalten. Im Vordergrund dabei steht die Umsetzung in eine Knochen-ähnliche HA-Spezies weiter aufzuklären und eine potentielle Anwendung in der Knochenregeneration voranzutreiben. Hierzu werden in dieser Arbeit kapitelweise die nachfolgenden Fragestellungen behandelt.

- (1) Lassen sich Vaterit-Partikel durch eine einfache und schnelle Synthese phasenrein unter sterilen Bedingungen und in nahezu quantitativer Ausbeute herstellen? Sind sie über einen längeren Zeitraum bei Umgebungsbedingungen beständig? Im Hinblick auf eine medizinische Anwendung sind dies die ersten Voraussetzungen, die erfüllt werden müssen. Weiterhin ist zu klären, ob die synthetisierten Vaterit-Partikel kompatibel mit humanen Zellen sind und welche Effekte *in vitro* hervorgerufen werden. In wie weit beeinflussen die Vaterit-Partikel die Differenzierung von Osteoblasten und damit die Regeneration von neuem Knochengewebe?
- (2) Findet eine vollständige Umsetzung der synthetisierten Vaterit-Partikel in eine Knochen-ähnliche HA-Spezies durch Inkubation in einer phosphathaltigen Lösung, die der Zusammensetzung des humanen Blutplasmas entspricht, bei physiologischem pH-Wert und 37 °C statt? Welchen Einfluss hat das Carbonat- zu Phosphat- Ionenverhältnis auf die Umsetzung? Lässt sich die Umsetzung der Vaterit-Partikel über den Inkubationszeitraum quantifizieren? Lassen sich Aussagen zum Mechanismus der Umsetzung treffen? Welchen

Einfluss hat die Zusammensetzung der phosphathaltigen Lösung auf die Geschwindigkeit der Umsetzung? Haben Serumproteine einen Effekt auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel?

- (3) Ist es möglich diese HA-Spezies durch eine schnelle Syntheseroute ausgehend von Vaterit-Partikeln herzustellen? Welchen Einfluss hat dabei die Reaktionstemperatur? Zu welchem Effekt führen zusätzliche Fremdionen, im Speziellen Magnesium- und Carbonat-Ionen, bei der Bildung der entstehende HA-Spezies? Lässt sich auf diese Weise eine individuell an das Reaktionsmilieu angepasste HA-Spezies synthetisieren? Wie verhält sich die Reaktion in Anwesenheit von Serumproteinen? Wie kompatibel sind die hergestellten Partikel mit humanen Zellen und welche Effekte werden *in vitro* hervorgerufen?
- (4) Auf welche Art und Weise lassen sich die Vaterit-Partikel zielgerichtet an eine Knochendefektstelle transportieren? Behalten die Vaterit-Partikel auch innerhalb eines möglichen Transportsystems ihre biologischen und chemischen Eigenschaften? Welchen Einfluss übt das Transportsystem auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies aus?

Teil II

Experimentelles

7

Vaterit-Partikel als Biomaterial für die schnelle Knochenregeneration

Optimierung der Syntheseroute und *in vitro* Zell-Studien

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind teilweise Gegenstand des Manuskripts „*Vaterite particles are a biomaterial for rapid bone regeneration*“ eingereicht bei *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.^[113]

7.1 Einleitung

Calciumcarbonat (CaCO_3) kommt in der Natur häufig vor und spielt vor allem im Bereich der Biomineralisation eine wichtige Rolle. Beispielsweise wird CaCO_3 in Schnecken, Muscheln, marinen Einzellern und Korallen vorgefunden.^[1] Ein solches bioinspiriertes Material ist aufgrund der einzigartigen Eigenschaften als auch der mangelnden Toxizität ein interessantes Ziel für intensive Forschung. In zahlreiche Arbeiten wurde CaCO_3 als populäres Modell-System für die Nukleation und Kristallisation präsentiert.^[125–128] Calciumcarbonat existiert in drei wasserfeien, kristallinen polymorphen Phasen, Calcit, Aragonit und Vaterit. Calcit stellt dabei die thermodynamisch stabile Modifikation dar und Vaterit die thermodynamisch metastabile Modifikation. Aufgrund der Metastabilität hat Vaterit in den letzten Jahren das Interesse der Forscher im Bereich der Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse geweckt. Im Fokus steht dabei die Umsetzung der CaCO_3 Modifikation in eine Hydroxylapatit Spezies und deren Anwendung als Knochenersatzmaterial^[71,121–124,129] (s. Kapitel 8). Neben den kristallinen CaCO_3 Polymorphen existiert auch eine amorphe Phase, das amorphe Calciumcarbonat (ACC). Aufgrund der höheren Löslichkeit von ACC verglichen mit den kristallinen Phasen, wandelt es sich schnell in eine der anderen genannten kristallinen Modifikation um.^[1] In ähnlichem Maße verhält sich das amorphe Calciumphosphat (ACP). In zahlreichen Untersuchungen wurden daher die beiden amorphen Phasen, ACC und ACP, als potentielle, metastabile Vorstufen zur Herstellung von Knochenmineral analysiert.^[42,117–119] Ein entscheidender Vorteil der Vaterit-Modifikation gegenüber den amorphen Phasen ist die verbesserte Stabilität unter trockenen Bedingungen.^[120] Vor allem die duale Funktion des Vaterits steigert die Attraktivität und das Interesse im Hinblick auf eine biomedizinische Anwendung. Einerseits gewährleistet Vaterit als potentieller Ionenpuffer die Knochenregeneration

und andererseits besitzt er eine ausreichende Reaktivität für die Umwandlung von Calciumcarbonat zu Knochen-ähnlichem Apatit.^[72,129]

Bisher wurden Vaterit-Partikel durch aufwendige nasschemische Synthesen hergestellt, meist unter Verwendung von Calciumchlorid und Alkalimetallcarbonaten in toxischen organischen Lösungsmitteln, wie Methanol^[121] oder Benzol^[130]. Eine altbewährte Methode zur Synthese von Vaterit-Partikeln stellt die zeitaufwendige Carbonisierung von Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) durch Einleitung CO_2 Gas dar.^[71,72,131] Wässrige Synthesen wurden von Sunjin *et al.*^[123] und Shivkumara *et al.*^[132] unter Verwendung von Additiven wie Dopamin, Glycin oder L-Alanin zur Stabilisierung der Vaterit-Bildung durchgeführt. Sarkar *et al.*^[133] beschrieben eine wässrige Synthesevariante ohne den Einsatz zusätzlicher Stabilisatoren. Der Nachteil dieser Syntheseroute ist die starke Partikelagglomeration sowie die aufwendige und problematische Aufarbeitung, die eine spontane Phasenumwandlung von Vaterit zu Calcit nicht ausschließt. Eine alternative Synthese-Variante wurde von Chen *et al.*^[134] beschrieben, die auf Additive verzichteten und weniger toxische Lösungsmittel verwendeten. Die Synthese basiert auf einer Mikrowellen-Reaktion bei 90°C und kurzer Reaktionszeit in einem wässrigen Ethylenglykol-Gemisch, allerdings mit starker Partikelaggregation. Eine ähnliche Syntheseroute in reinem Ethylenglykol wurde durch Schüler *et al.*^[34] definiert. Durch Einsatz von Calciumchlorid Tetrahydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) und Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) wurde durch Ultraschallbehandlung eine Möglichkeit geschaffen Vaterit-Nanopartikel in einer Größenordnung von ~ 50 nm zu synthetisieren, die keine Agglomeration und keine Funktionalisierung aufwiesen.^[34]

Ziel dieses Kapitels war es, an die bestehende einfache Synthesevorschrift der Vaterit-Nanopartikel von Schüler *et al.*^[34] anzuknüpfen und diese in optimierter Ausbeute unter sterilen Bedingungen durchzuführen, um damit ideale Voraussetzungen für die Anwendung als Biomaterial zu schaffen. Weiterhin sollten diese synthetisierten Vaterit-Partikel in einer umfangreichen *in vitro* Studie erstmals auf Biokompatibilität und Zytotoxizität an unterschiedlichen Zelltypen, auch primären humanen Zellen, im Hinblick auf eine medizinische Anwendung untersucht werden.

7.2 Materialien und Methoden

7.2.1 Synthesevorschrift der Vaterit-Partikel

Die Vaterit-Partikel wurden in Anlehnung an die Ultraschall-Synthese-Methode von Schüler *et al.*^[34] hergestellt. Die Synthese wurde im Hinblick auf die Ausbeute optimiert und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. 10 mmol Calciumchlorid Tetrahydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck, 99,995%) wurden in 100 mL Ethylenglykol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$, Sigma Aldrich, $\geq 99,0\%$) bei 40 °C im Ultraschallbad (100% Ultraschalleistung) gelöst. 20 mmol Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 , Sigma Aldrich, $\geq 99,7\%$) wurden in 100 mL Ethylenglykol durch mechanisches Rühren bei Raumtemperatur suspendiert. Der Suspension wurde die Calciumchlorid-Lösung zugesetzt und für 25 Minuten im Ultraschallbad bei 40 °C und 75% Ultraschalleistung (*sweep* Modus) zur Reaktion gebracht. Im Anschluss wurden 100 mL steriles, pyrogenfreies und hypotonisches Wasser (H_2O , Carl Roth) hinzugegeben und für weitere 5 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die resultierenden milchig, weiße Suspension wurde bei 9000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und der Niederschlag mehrfach mit sterilem, pyrogenfreiem und hypotonischem Wasser und anschließend Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, Sigma Aldrich, $\geq 99,8\%$) gewaschen. Die erhaltenen CaCO_3 Nanopartikel wurden im Hochvakuum bis zur Massenkonstanz getrocknet. Die Ausbeute wurde gravimetrisch bestimmt und betrug durchschnittlich 90%.

Für die *in vitro* Verwendung der Vaterit-Partikel wurde auf den Einsatz von sterilen Reagenzien und keimfreien Reaktionsgefäße während des gesamten Herstellungsprozesses besonderen Wert gelegt, sodass dieses Syntheseverfahren zur Herstellung steriler Partikel führte. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße bei 180 °C im Trockenschrank für 24 Stunden ausgeheizt.

7.2.2 Chemische Charakterisierungsmethoden

Die synthetisierten Vaterit-Partikel wurden mittels der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) morphologisch untersucht. Mit Hilfe der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD: *X-ray diffraction*) erfolgte eine quantitative Phasenanalyse mittels Vollprofilanpassung unter Verwendung des fundamentalen Parameter-Ansatzes, entsprechend der Implementierung aus TOPAS Academic Version 5.^[135] Die Fourier-Transformation-Infrarot-(FT-IR) und Raman-Spektroskopie wurden als weitere Charakterisierungsmethode zur Identifizierung der Vaterit Modifikation genutzt. Detaillierte Angaben zu den Messmethoden bzw. Geräteparametern sind dem Abschnitt 11.1 zu entnehmen.

7.2.3 Biologische Methoden – *in vitro* Studien

Sterilität

Die Sterilität der synthetisierten Vaterit-Partikel wurde über einen Zeitraum von bis zu 16 Tagen untersucht. Hierzu wurden die Partikel in Zellkulturmedium M199 (Sigma Aldrich) + 20% fetales

Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*, Sigma Aldrich) + 2 mM Glutamax I (Gibco® Thermo Fisher Scientific) ohne Antibiotika im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert.^[83]

Kultivierungs- und Wachstumsbedingungen der verwendeten Zellen

Es wurde mit einer humanen Osteoblasten-Zelllinie MG-63 (*American Type Culture Collection* ATCC® CRL-1427®, LGC Promochem) gearbeitet. Als Zellkulturmedium (kurz Medium) wurde das Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – high glucose, Sigma Aldrich) mit 10% FBS, 2 mM Glutamax I und 100 U / 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin (P/S, Gibco® Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Weiterhin wurden primäre humane Osteoblasten (pOB) eingesetzt, die aus gespendeten Knochengeweben (*iliac crest* Beckenkamm) von Knochentransplantationen isoliert wurden. Die Isolation erfolgte nach der Methode von Unger *et al.*^{[136],[137]} und wurde von [REDACTED] am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz ausgeführt. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium, F-12 Nutrient Mixture Ham (DMEM/F-12 + Glutamax I, gibco® Thermo Fisher Scientific) mit 10% FBS und 100 U/ 100 µg/mL P/S verwendet.

Zusätzlich wurden noch primäre humane Endothelzellen (HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells*) genutzt, die aus der Vene der humanen Nabelschnur isoliert wurden. Die Isolation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Jaffe *et al.*^[94] und ist im Detail im Anhang A, Abschnitt 11.2, aufgeführt. Als Medium wurde mit M199 (Sigma Aldrich) mit 20% FBS, 2 mM Glutamax I und 100 U / 100 µg/mL P/S gearbeitet. Zusätzlich wurde dem Medium 25 µg/mL eines Wachstumsfaktors (ECGS: *endothelial cell growth supplement*, Becton Dickinson and Company) und 25 µg/mL Heparin Natrium-Salz (Sigma Aldrich) unmittelbar vor der Anwendung frisch zugesetzt. Bei allen Experimenten mit HUVEC wurden sowohl die Zellkulturflaschen, als auch die Zellkultur-Platten zuvor mit 0,2% Gelatine (Sigma Aldrich) beschichtet, um eine gute Adhärenz der Zellen zu erzielen.

Die isolierten, primären, humanen Zellen wurden, entsprechend den gesetzlichen ethischen Vorschriften, anonym und ohne patientenbezogene Daten behandelt. Alle Zellkultivierungen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ durchgeführt.

Immunfluoreszenz-Färbung von E-Selektin

Mittels der Immunfluoreszenz-Färbemethode wurde die E-Selektin Expression von HUVEC nach Exposition mit Vaterit-Partikeln detektiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Der Nachweis von E-Selektin hat eine duale Funktion. Einerseits wird sowohl durch die Fluoreszenzfärbung als auch durch die CAM-EIA (*cell adhesion molecule – enzyme immunoassay*) Methode auf das Vorhandensein von Endotoxin (auch bekannt als Lipopolysaccharid, LPS) in den synthetisierten Vaterit-Partikel geprüft. Andererseits wird getestet ob die Partikel einen inflammatorischen Effekt auf die Endothelzellen ausüben.^[95] Es wurden 50.000 HUVEC pro Well einer 8-Well *chamber slide*

(Lab-Tek[®], Thermo Fisher Scientific) ausgesät, die zuvor mit 100 µL pro Well Fibronectin (1:200 in PBS) für 60 Minuten bei 37 °C beschichtet wurden. Nach 48 Stunden Kultivierung der HUVEC erfolgte die Stimulation mit den synthetisierten Vaterit-Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen (50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL). Als Positiv-Kontrollen wurden die Zellen mit 0,1 µg/mL und 1,0 µg/mL LPS (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma Aldrich) stimuliert. Als Negativ-Kontrollen wurden unbehandelte Zellen verwendet. Nach 4 Stunden Stimulation wurden die Zellen einmal mit 3,7% Paraformaldehyd (Merck) gewaschen, mit 3,7% Paraformaldehyd (250 µL pro Well) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dreimal mit PBS (500 µL pro Well) gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,1% Triton[®] X-100 (Merck) in PBS (300 µL pro Well) für 5 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend wieder dreimal mit PBS (500 µL pro Well) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die primäre Antikörperfärbung. Dafür wurde der E-Selektin Antikörper (CD62E mouse, Monosan) 1:100 in 1% Rinderserumalbumin / PBS (BSA: *bovine serum albumin*, Sigma Aldrich) verdünnt und über Nacht lichtgeschützt bei +4 °C inkubiert. Nach dreimaligen Waschvorgängen mit PBS erfolgte die sekundäre Antikörperfärbung mit Alexa Fluor[®] 488 (*goat anti-mouse*, Molecular Probes - Thermo Fisher Scientific) als 1:100 Verdünnung in 1% Rinderserumalbumin / PBS für 60 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Es wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Kernfärbung mittels Höchst Dye 33342 (Molecular Probes - Thermo Fisher Scientific) als 1:200 Verdünnung in PBS für 5 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Als letzter Schritt wurde die Kammer mit einem Plastikschieber entfernt und die Zellen durch ein Eindeckmedium, Fluoroshield (ImmunoBioScience Corp.) und Deckgläschen versiegelt. Die Auswertung der Fluoreszenz-Färbungen erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskop (s. Anhang A, Abschnitt 11.1).

Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assay (CAM-EIA)

Mit Hilfe der von Unger *et al.*^[95] etablierten CAM-EIA (*cell adhesion molecule – enzyme immunoassay*) Methode wurde der Gehalt an E-Selektin ermittelt und die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung von E-Selektin gestützt. Die Durchführung erfolgte durch [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (*REPAIR Lab*) des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz nach dem etablierten Protokoll^[95]. Es wurden 3 Vaterit-Partikel-Proben jeweils in zwei Wells als Duplikate behandelt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Die optische Dichte wurde an einem Mikroplatten Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm (s. Anhang A, Abschnitt 11.1) vermessen.

In vitro Zellviabilitäts- und Zytotoxizitäts-Tests

Mit Hilfe von drei verschiedenen Testverfahren (MTS, LDH und Kristallviolett) wurde der Effekt der synthetisierten Vaterit-Partikel auf die Stoffwechselaktivität der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG-63 untersucht. Hierzu wurden 25.000 Zellen pro Well einer sterilen 96-Well Zellkulturplatte (Greiner bio-one, Cellstar[®]) in 100 µL Medium ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C, 95%

Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert (s. Anhang A, Abschnitt 11.4). Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit den synthetisierten Vaterit-Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden. Es wurde eine 1 mg/mL Partikel-Stocklösung hergestellt und auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Eine Medium-Kontrolle (ohne Zellen) als auch eine Zell-Kontrolle (unbehandelte Zellen) wurde auf jeder Platte mitgeführt. Zusätzlich wurden Medium-Partikel-Kontrollen mit den identischen Konzentrationen an Vaterit-Partikel (ohne Zellen) mitgeführt, um unerwünschte Reaktionen mit den Reagenzien der Tests auszuschließen und um den Hintergrund von den Messwerten der behandelten Zellen zu subtrahieren. Alle Experimente wurden drei Mal, mit jeweils drei technischen Replikaten, durchgeführt. Ein *Student T-Test* Typ 3 wurde für die statistische Signifikanz berechnet. Die detaillierte Durchführung der einzelnen Tests wird im Nachfolgenden beschrieben.

MTS-Assay. Durch Verwendung eines kommerziell erworbenen *CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS, Promega, G3580) wurde die Viabilität der MG-63 Zellen durch Messung der Mitochondrien-Aktivität untersucht (s. Kapitel 5, Abschnitt 5.1.1). Hierbei wurde nach der Vorschrift des Herstellers^[84] verfahren. Die Vorgehensweise wird im Nachfolgenden kurz erläutert. Nach der entsprechenden Stimulationszeit der MG-63 Zellen mit den verschiedenen Vaterit-Partikelkonzentrationen wurden, zur Durchführung des LDH-Assay, je 50 µL pro Well des Überstandes abgenommen und in eine neue unsterile 96-Well Platte überführt. Der verbliebene Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 100 µL pro Well Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (DPBS: dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, D8537) gewaschen. Pro Well wurden 20 µL MTS-Reagenz (*CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent*) in 100 µL Medium zugegeben und die Zellen lichtgeschützt für 60 Minuten bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Je 100 µL des Überstandes wurde entnommen, in eine neue unsterile 96-Well Platte überführt und die Absorption bei 492 nm vermessen. Für die Auswertung wurden die Werte nach Abzug der Medium-Kontrolle bzw. der Medium-Nanopartikel-Kontrollen in Relation zu den unbehandelten Zellen in Prozent angegeben.

LDH-Assay. Durch Verwendung eines kommerziell erworbenen *CytoTox 96[®] Non-Radio Cytotoxicity Assay* (LDH, Promega, G1780) wurden Zellmembranschäden der MG-63 Zellen durch Messung der Menge an freigesetzter Lactatdehydrogenase (LDH) untersucht (s. Kapitel 5, Abschnitt 5.1.2). Hierbei wurde nach der Vorschrift des Herstellers^[86] verfahren. Die Vorgehensweise wird nachfolgend kurz beschrieben. Zu den zuvor entnommenen Überständen (50 µL pro Well) wurden jeweils 50 µL pro Well *CytoTox 96[®]* Reagenz (Kombination aus *Assay Buffer* und *Substrate Mix*) hinzugegeben und 15-20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 50 µL einer Stopp-Lösung (*Stop Solution*) beendet und unmittelbar die Absorption bei 492 nm gemessen. Als LDH-positive Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mittels einer 10x Lyse-Lösung (10 µL pro Well),

bereits 60 Minuten vor der Behandlung mit *CytoTox 96*[®] Reagenz, lysiert. Die Zell-Lysate wurden bei 20.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände für die Behandlung mit *CytoTox 96*[®] Reagenz verwendet. Für die Auswertung wurden die Werte nach Abzug der Medium-Kontrolle bzw. der Medium-Nanopartikel-Kontrollen relativ zu den lysierten Zellen in Prozent angegeben.

Kristallviolett-Färbung. Diese Methode wurde ergänzend zum MTS-Assay durchgeführt, wobei die Zell-DNA angefärbt und damit die vitale Zellmenge bestimmt wurde^[88] (s. Kapitel 5, Abschnitt 5.1.3). Im Anschluss an die MTS-Assay Durchführung wurden die Zellen zweimal mit PBS (100 µL pro Well) gewaschen, mit 100 µL pro Well Isopropanol (C₃H₈O, Sigma Aldrich, ≥ 99,5%) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden mit 0,1%iger, wässriger Kristallviolett Lösung (C₂₅H₃₀ClN₃, Merck) für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln (100 U/min) behandelt. Durch ausgiebiges Waschen mit Leitungswasser wurde die überschüssige Kristallviolett-Lösung entfernt und die gefärbten Zellen bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet. Der Zellgebundene Farbstoff wurde mittels 100 µL pro Well einer 33%-iger Essigsäure (C₂H₄O₂, Sigma Aldrich) für 10-15 Minuten auf dem Schüttler bei 180 U/min herausgelöst, die Überstände in eine neue unsterile 96-Well Platte überführt und die Absorption bei 600 nm vermessen. Die Kontrollen wurden lediglich mit 33%iger Essigsäure behandelt. Die Auswertung erfolgte analog zu der Auswertung des MTS-Assays.

Zell-Biokompatibilitäts-Tests

Die Zellverträglichkeit (Zell-Biokompatibilität) der synthetisierten Vaterit-Partikel wurde an drei verschiedenen Zelltypen (MG-63, HUVEC und pOB) untersucht. Hierzu wurden 50.000 MG-63 Zellen, 50.000 pOB und 80.000 HUVEC pro Well in jeweils eine sterile 24-Well Zellkulturplatte (Greiner bio-one Cellstar[®]) ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Die genaue Zellzahlbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 11.4 beschrieben. Nach 24 Stunden Kultivierung erfolgte die Stimulation der Zellen mit den synthetisierten Vaterit-Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL über einen Zeitraum von 24 und 72 Stunden bis hin zu 7 Tagen. Es wurde eine 1 mg/mL Partikel-Stocklösung hergestellt und auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Ein vorsichtiger Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 6 Tage ohne die Nanopartikel zu entfernen. Nach entsprechender Stimulationszeit wurden die Zellen mit 10 µM Calcein AM (AM: Acetoxymethylester, Thermo Fisher Scientific) für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. Anhang A, Abschnitt 11.1) analysiert. Calcein AM wird zum Nachweis von vitalen Zellen verwendet und diffundiert durch die Zellmembran lebender Zellen. In den Zellen wird Calcein AM durch intrazelluläre Esterasen von der maskierten Acetoxymethyl-Gruppe befreit, sodass Calcein in der Lage ist intrazelluläre Ca²⁺ Ionen zu komplexieren und eine intensiv grüne Fluoreszenz resultiert.^[138] Um eine Spender-unabhängige Aussage treffen zu können, wurden alle Experimente mit primären Zellen (pOB und HUVEC) mit Zellen von 3 verschiedenen

Spendern durchgeführt. Die Versuche mit MG-63 Zellen wurden als Doppelbestimmung mit zwei unterschiedlichen Zell-Passagen durchgeführt.

Osteogene Differenzierung mittels ALP-Färbung

Mit Hilfe eines kommerziell erworbenen *Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit* (ALP, Sigma Aldrich, 86R) wurde die Produktion der alkalischen Phosphatase (ALP) von MG-63 Zellen nachgewiesen, die als osteogener Differenzierungsmarker dient (s. Kapitel 5, Abschnitt 5.3). Es wurden 50.000 MG-63 Zellen pro Well in eine sterile 24-Well Zellkulturplatte ausgesät (s. Anhang A, Abschnitt 11.4), für 24 Stunden kultiviert und mit den synthetisierten Vaterit-Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL stimuliert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf ein osteogenes Differenzierungs-Medium (ODM), bestehend aus Minimum Essential Medium Alpha (MEM α + Glutamax I, gibco[®] Thermo Fisher Scientific) mit 10% FBS, 100 U / 100 µg/mL P/S und den Stimulantien 100 nM Dexamethason (Sigma Aldrich, \geq 97%), 50 µM Ascorbinsäure (Sigma Aldrich, γ -bestrahlt) und 10 mM β -Glycerolphosphat-Di-Natriumsatz Hydrat (Sigma Aldrich, \geq 99,0%). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7, 14 und 21 Tagen kultiviert, wobei alle 3 bis 4 Tage ein vorsichtiger Mediumwechsel mit frischem ODM erfolgte ohne die Nanopartikel zu entfernen. Als Negativ-Kontrolle wurden die Partikel in Abwesenheit von MG-63 Zellen in den entsprechenden Konzentrationen im ODM inkubiert. Alle Experimente wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Der Nachweis der ALP erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers,^[139] wobei die Vorgehensweise nachfolgend kurz beschrieben wird. Nach der entsprechenden Stimulationszeit der MG-63 Zellen mit den verschiedenen Vaterit-Partikelkonzentrationen wurden die Überstände verworfen und die Zellen mit 1 mL PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels einer Fixierlösung (10 mL Citratlösung (Kit.) + 26 mL Aceton (C₃H₆O Sigma Aldrich, \geq 99,9%) + 3,2 mL Formaldehyd (C₁H₂O, Sigma Aldrich, 36,5-38%)) für 30 Sekunden inkubiert und viermal mit 1 mL destilliertem Wasser (dH₂O, Braun) pro Well gewaschen. Die fixierten Zellen wurden mit 500 µL pro Well einer ALP-Färbelösung versetzt, 15 Minuten lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert, viermal mit 1 mL pro Well destilliertem Wasser gewaschen und mittels Phasenkontrast-Mikroskopie (s. Anhang A, Abschnitt 11.1) die Färbung detektiert. Die ALP-Färbelösungen wurde frisch hergestellt. Dabei wurde durch vorsichtiges Mischen von 0,25 mL alkalische FRV (*fast red violet*) - Lösung (Kit) mit 0,25 mL Natriumnitrit-Lösung ein Diazoniumsalz mittels Diazotierung hergestellt. Durch anschließende Zugabe von 11,25 mL destilliertem Wasser und 0,25 mL alkalischer Naphthol AS-BI-Lösung (Kit) erfolgte eine Azokupplung wodurch ein Azofarbstoff mit chromophorer Stickstoff-Doppelbindung entstand. Die Reaktion verläuft nur in Anwesenheit der ALP, wodurch der Phosphorsäureester (Naphthol AS-BI) in die reaktive Verbindung versetzt wurde.

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Charakterisierung der synthetisierten Vaterit-Partikel

Vaterit-Partikel wurden nach einer Ultraschallbad-Synthese aus Calciumchlorid Tetrahydrat und Natriumhydrogencarbonat in Ethylenglykol durch Zugabe von Wasser synthetisiert. Für die zellbiologische Anwendung erfolgte die Synthese unter sterilen Bedingungen. Durch die Zugabe von Wasser in den letzten fünf Minuten der Reaktionszeit konnte die Ausbeute der Partikel auf 90% gesteigert werden. Mit Hilfe der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD) wurde die Phase der erhaltenen Calciumcarbonat- (CaCO_3) Partikel identifiziert (s. Abb. 7.1a). Durch eine anschließende quantitative Phasenanalyse konnten die erhaltenen Partikel als phasenreiner Vaterit mit einer Kristallitgröße von $39 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ bestimmt werden. Details zur quantitativen Phasenanalyse sind im Anhang A, Abschnitt 11.2, aufgeführt. Zusätzlich wurden die hergestellten Partikel anhand der spektroskopischen Methoden, Fourier-Transformation-Infrarot- (FT-IR) und Raman-Spektroskopie charakterisiert. In Abb. 7.1b sind die beiden Spektren mit den für Vaterit charakteristischen Schwingungsmoden des Carbonat-Ions dargestellt.

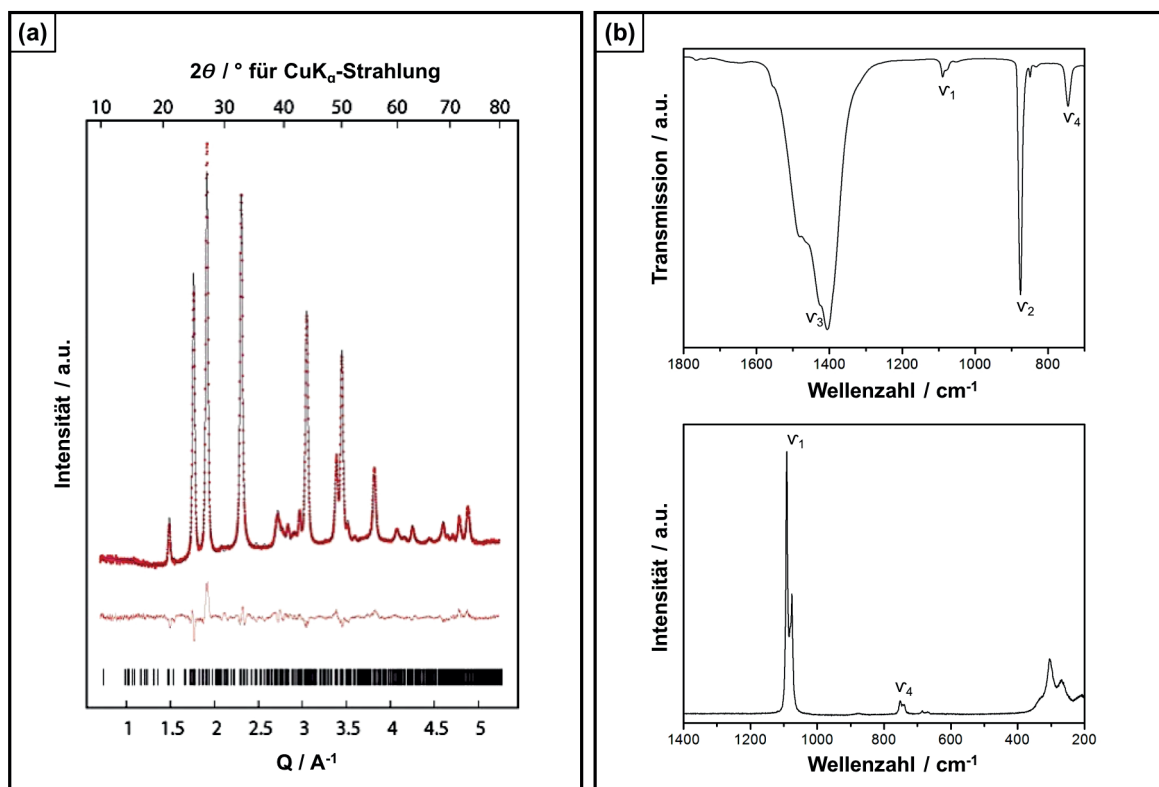


Abb. 7.1: Chemische Charakterisierung der synthetisierten CaCO_3 Partikel. (a) Pulverdiffraktogramm mit Vollprofilanpassung anhand des Strukturmodells von Mugnaioli *et al.*^[33], die roten Punkte stellen die Messdaten dar, die schwarze Liene zeigt die Anpassung und die rote Linie gibt die Differenz an. Die schwarzen Striche markieren die Reflexlage des Vaterits. (b) FT-IR-Spektrum (oben) und Raman-Spektrum (unten) mit den für Vaterit charakteristischen Schwingungsmoden des Carbonats.

Im FT-IR-Spektrum lassen sich alle Banden im Bereich von 1487 cm^{-1} bis 1411 cm^{-1} den asymmetrischen C-O Streckschwingung (ν_3) zuordnen. Die Banden bei 1090 cm^{-1} , 877 cm^{-1} und

744 cm^{-1} resultieren aus der symmetrische C-O Streckschwingung (ν_1), der O-C-O Kipp-Deformationsschwingung (ν_2), der O-C-O Spreiz-Deformationsschwingung (ν_4). In Tab. 7.1 sind die vier wichtigsten Schwingungsmoden des Carbonat-Ions für die drei wasserfreien, kristallinen Calciumcarbonat-Polymorphe aufgeführt. Die ν_3 und ν_4 Schwingungen sind doppelt entartet und werden beide sowohl im IR- als auch im Raman-Spektrum beobachtet. Hingegen tritt die ν_1 Schwingung nur im Raman-Spektrum auf. Durch die symmetrische Streckschwingung wird keine Änderung des Dipolmomentes, jedoch eine Änderung der Polarisierbarkeit hervorgerufen. Aus Symmetriegründen (Gruppentheorie) ist die ν_1 Schwingung jedoch im Vaterit und Aragonit IR-aktiv, lediglich im Calcit ist sie IR-inaktiv.^[140] Demgegenüber lässt sich die ν_2 Schwingung, aufgrund fehlender Änderung der Polarisierbarkeit, nur im IR-Spektrum nachweisen. Im Raman-Spektrum lassen sich, neben dem für Vaterit charakteristischen Triplett der ν_1 Schwingung, noch die für Vaterit charakteristischen Gerüstschwingungen im Bereich von 350 cm^{-1} bis 200 cm^{-1} nachweisen.^[141]

Tab. 7.1: IR-Normalschwingungsmoden des Carbonat-Ions in den Calciumcarbonat-Modifikationen ACC, Vaterit, Aragonit und Calcit mit ν_1 (symmetrische C-O Streckschwingung), ν_2 (O-C-O Kipp-Deformationsschwingung außerhalb der Molekülebene), ν_3 (asymmetrische C-O Streckschwingung) und ν_4 der O-C-O Spreiz-Deformation(O-C-O Spreiz-Deformationsschwingung innerhalb der Molekülebene).^[140]

Schwingungsmoden	Calciumcarbonat-Modifikation			
	<i>ACC</i>	<i>Vaterit</i>	<i>Aragonit</i>	<i>Calcit</i>
ν_1 / cm^{-1}	1067	1089	1089	--
ν_2 / cm^{-1}	864	877	854	877
ν_3 / cm^{-1}	1490	1487	1488	1420
	1425	1445	1440	
ν_4 / cm^{-1}	725	746	713	713
	690	738	700	

Die Morphologie der erhaltenen Vaterit-Partikel wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Die Resultate sind in Abb. 7.2 dargestellt. Es wurden ellipsoide Vaterit-Nanopartikel erhalten, die sich zu größeren ellipsoiden Aggregaten mit einem Durchmesser von etwa 500 nm bis 1000 nm zusammenlagerten. Diese Aggregate werden im Nachfolgenden als Vaterit-Partikel bezeichnet.

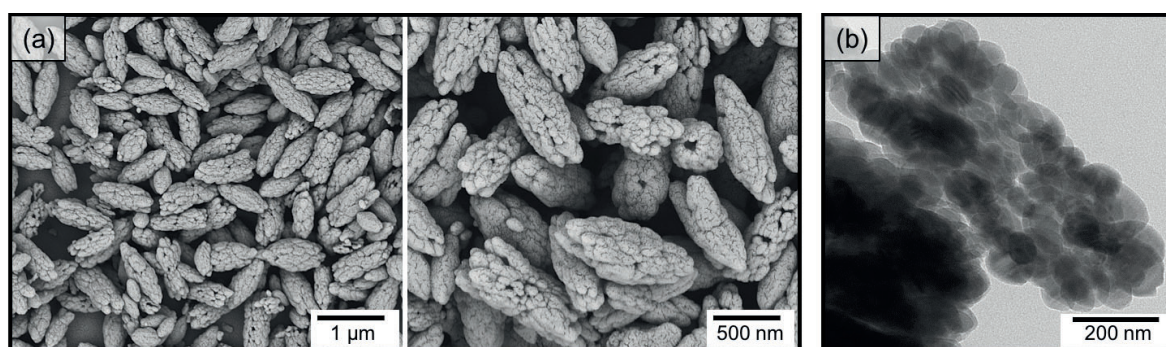


Abb. 7.2: Morphologische Charakterisierung der synthetisierten Vaterit-Partikel mittels (a) REM- und (b) TEM-Aufnahmen.

Die hergestellten Vaterit-Partikel wurden trocken und unter Umgebungsbedingungen über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren gelagert. Die in Abb. 7.3 dargestellten Diffraktogramme resultierten aus Messungen der Vaterit-Partikel (a) unmittelbar nach der Synthese, (b) nach etwa 6 Monaten, (c) nach etwa 12 Monaten und (d) nach etwa 24 Monaten aus derselben Partikel-Charge. Aus allen Diffraktogrammen geht das gleiche Reflexprofil hervor, was zeigt, dass sich die Partikel über den Zeitraum chemisch nicht verändert haben und keine spontane Umwandlung in eine thermodynamisch stabilere Calciumcarbonat-Phase erfolgte. Die Reflexlagen konnten Vaterit zugeordnet werden.^[33]

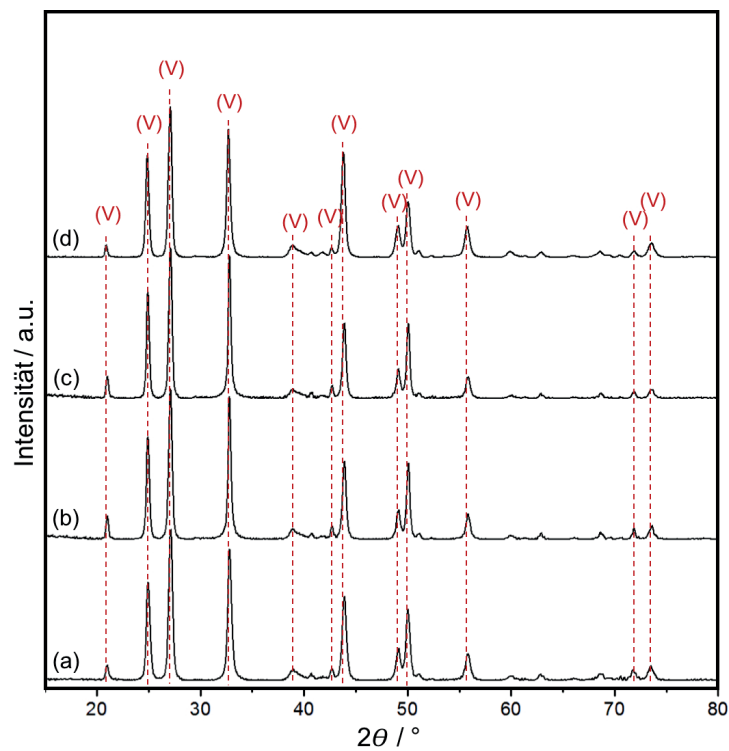


Abb. 7.3: Pulver-Diffraktogramme der Vaterit-Partikel (a) direkt nach der Synthese, (b) nach 6 Monaten, (c) nach 12 Monaten, (d) nach 24 Monaten trockener Lagerung bei Umgebungsbedingungen mit den markierten Reflexlagen des Vaterits nach Mugnaioli *et al.*^[33].

7.3.2 Sterilität

Um die Wirkung eines synthetischen Materials auf Zellen in *in vitro* Experimenten zu analysieren muss das Material, als grundlegende Voraussetzung, steril sein. Die Sterilität der in dieser Arbeit synthetisierten Vaterit-Partikel wurde über einen Zeitraum von bis zu 16 Tagen im Zellkulturmedium M199 + 20% FBS + 2 mM Glutamax I (kurz: Medium) ohne Zugabe von Antibiotikum analysiert. Antibiotika werden normalerweise den Zellkulturmedien zugesetzt, um auf andere Mikroorganismen (auch als Kontaminationen bezeichnet), wie Bakterien oder Pilze, wachstumshemmend zu wirken. Durch den gezielten Verzicht auf Antibiotika im Medium können Bakterien- oder Hefezellen leichter replizieren und eine sichtbare Trübung im Medium resultiert.^[83] In Abb. 7.4 sind die Aufnahmen der Zellkulturflaschen nach entsprechender Inkubationszeit (24 h, 48 h, 72 h, 6 Tage, 10 Tage und 16 Tage) zusammengestellt. Zur Beurteilung wurde die Trübung des Mediums mit Vaterit-Partikel im Vergleich zu reinem Medium mit Antibiotika (P/S: Penicillin / Streptomycin) gegenübergestellt. Bis hin zu 16 Tagen konnte keine Trübung des Mediums mit Vaterit-Partikel beobachtet werden. Die Medien zeigten durchweg eine klare Lösung und keinerlei Anzeichen einer Kontamination, wie es auch die Kontrolle, das Antibiotika-behandeltem Medium, zeigte.

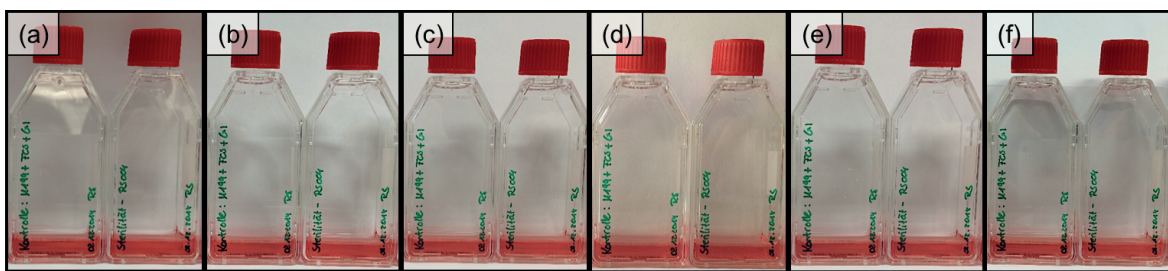


Abb. 7.4: Überprüfung der synthetisierten Vaterit-Partikel auf Sterilität. (a) Nach 24 h, (b) nach 48 h, (c) nach 72 h, (d) nach 6 Tagen, (e) nach 10 Tagen und (f) nach 16 Tagen Inkubationszeit in Zellkulturmedium M199 + 20% FBS + 2 mM Glutamax I ohne Antibiotika. Pro Abbildung zeigt die linke Zellkultur-Flasche die Kontrolle, reines Zellkulturmedium mit Antibiotika und ohne Vaterit-Partikel, hingegen zeigt die jeweils rechte Zellkultur-Flasche das Zellkulturmedium ohne Antibiotika und mit Vaterit-Partikel.

7.3.3 Nachweis von E-Selektin Expression durch primäre humane Endothelzellen

Ein synthetisches Material muss für den klinischen Einsatz nicht nur steril sein, sondern auch frei von Endotoxin und sollte keine inflammatorischen Effekte auf Zellen, speziell primären Endothelzellen, hervorrufen. Beide Fälle, sowohl die Anwesenheit von Endotoxin als auch Entzündungs-stimulierende Effekte, bewirken bei Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* eine rasche Expression von E-Selektin. Aufgrund dessen wurden die hergestellten Vaterit-Partikel durch zwei sich ergänzende Testverfahren an primären Endothelzellen (HUVEC) auf das Auslösen der Expression von E-Selektin getestet. Mit Hilfe der Antikörper-basierten Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte ein optischer E-Selektin Nachweis in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an Vaterit-Partikel (50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL). Die Ergebnisse sind in Abb. 7.5 zusammengestellt. Bei keiner der getesteten Konzentration an Vaterit-Partikel konnte eine E-Selektin Antikörper-Färbung nachgewiesen werden (s. Abb. 7.5d, e, f). Weiterhin konnten die

Zellkerne, in vergleichbarem Ausmaß wie bei den unbehandelten Zellen (s. Abb. 7.5a), durch eine blaue Färbung mittels Höchst Dye beobachtet werden. Als Positiv-Kontrollen wurden Endothelzellen mit niedriger Konzentration (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, s. Abb. 7.5b) und hoher Konzentration (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, s. Abb. 7.5c) an Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, wodurch eine entsprechende Menge E-Selektin von den HUVEC exprimiert und mittels Antikörper-Färbung detektiert wurde.

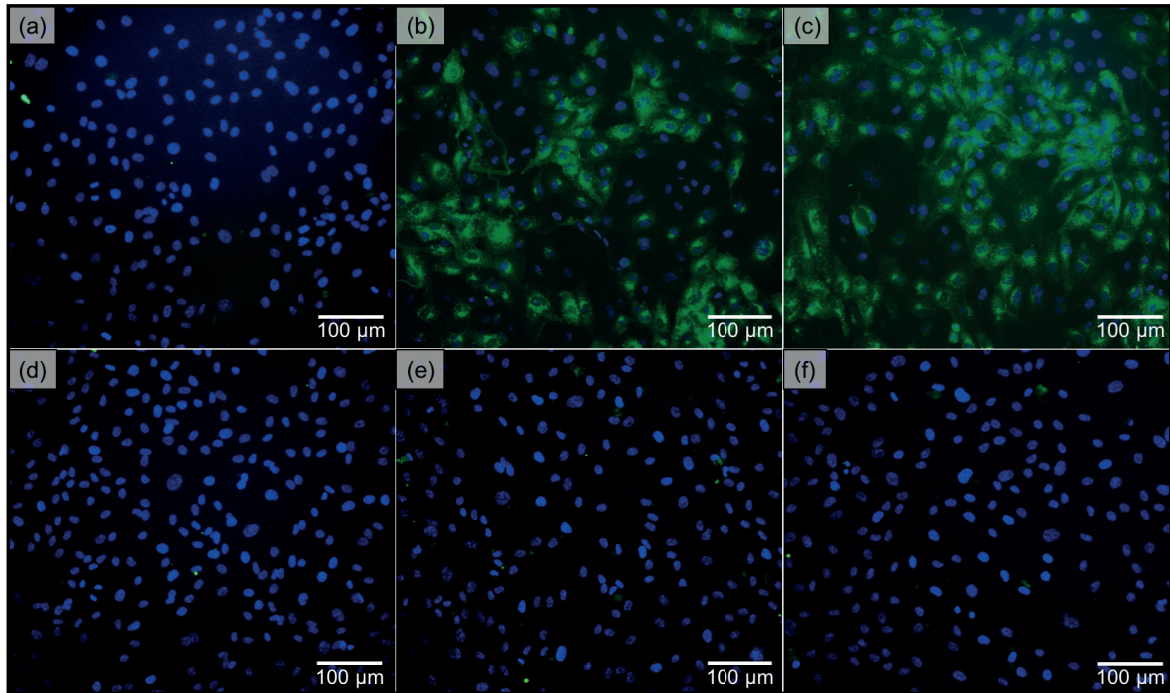


Abb. 7.5: Nachweis von E-Selektin durch Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung, getestet an primären Endothelzellen (HUVEC). (a) Negativ-Kontrolle: unbehandelte HUVEC, (b) Positiv-Kontrolle 1: mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimulierten HUVEC, (c) Positiv-Kontrolle 2: mit 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimulierten HUVEC, (d) mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vaterit-Partikel, (e) mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vaterit-Partikel und (f) mit 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vaterit-Partikel stimulierten HUVEC. Die Zellkerne wurden mit Höchst Dye 33342 angefärbt und E-Selektin mittels Antikörperfärbung grün markiert.

Die Ergebnisse wurden durch eine weitere Methode, dem Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immunoassay (CAM-EIA, *Cell Adhesion Molecule Enzym Immunoassay*), bestätigt und sind in Abb. 7.6 dargestellt. Auch hierbei wurden nur physiologisch niedrige Mengen an E-Selektin nachgewiesen, wie sie auch in den unbehandelten Zellen detektiert wurden.

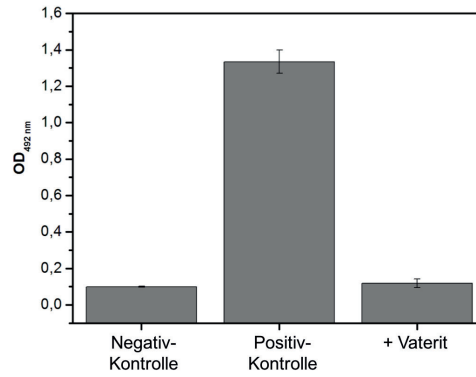


Abb. 7.6: Ergebnisse des Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assays (CAM-EIA) durch optische Dichte- (OD) Messungen. Mit unbehandelten HUVEC als Negativ-Kontrolle, mit 1 µg/mL LPS stimulierten Zellen als Positiv-Kontrolle und mit 500 µg/mL Vaterit-Partikel stimulierten HUVEC.

7.3.4 Zytotoxizitäts-Tests

Mögliche zytotoxische Effekte oder Einflüsse auf die Vitalität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 wurden nach der Exposition mit Vaterit-Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL untersucht. Hierzu wurde die mitochondriale Funktion, als Nachweis für die Vitalität der MG-63 Zellen, mittels eines MTS-Assays zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) bestimmt. In Abb. 7.7a sind die Ergebnisse des MTS-Assays graphisch dargestellt. Bei allen getesteten Konzentrationen an Vaterit-Partikeln konnte kein signifikanter Unterschied in der mitochondrialen Aktivität der MG-63 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Eine tabellarische Auflistung der Mittelwerte aus drei Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten der jeweiligen Tests ist in Tab. 7.2 zusammengestellt.

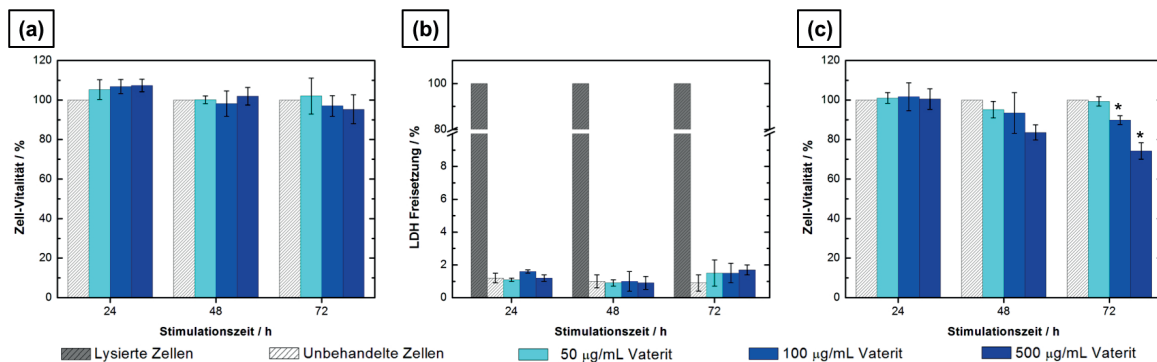


Abb. 7.7: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL Vaterit-Partikel. (a) MTS-Assay, (b) LDH-Assay und (c) Kristallviolett-Färbung. Die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei Experimenten, 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.

Mit einem zweiten Testverfahren, dem LDH-Assay, wurde die Integrität der Zellmembran nach der Partikel-Exposition überprüft. Zur Kontrolle wurden unbehandelte MG-63 Zellen lysiert, wodurch eine 100%-ige Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) erfolgte. Die Ergebnisse sind

in Abb. 7.7b graphisch dargestellt. Die Menge an LDH, die im Medium nach der Exposition der Vaterit-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen wurde, korreliert mit den Ergebnissen des MTS-Assay. Es konnte bei allen untersuchten Konzentrationen ein physiologisch niedriger Gehalt an LDH im Zell-Überstand beobachtet werden. Die Werte sind vergleichbar mit dem LDH Gehalt von unbehandelten MG-63 Zellen. Somit konnten keine zytotoxischen Effekte der synthetisierten Vaterit-Partikel in Konzentrationen von bis zu 500 µg/mL in einer Stimulationszeit von bis zu 72 Stunden auf MG-63 Zellen nachgewiesen werden. Ein weiterer Test, um die Ergebnisse der beiden verwendeten Zytotoxizitäts-Tests zu verifizieren, erfolgte durch eine Kristallviolett-Färbung, wobei die Zellzahl adhärenter Zellen und damit vitaler Zellen bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 7.7c dargestellt. Hierbei ließen sich über längere Stimulationszeiten und in Anwesenheit von höheren Konzentrationen an Vaterit-Partikel etwas abweichende Ergebnisse bezüglich der Resultate des MTS-Assays beobachten. Es wurden geringere Zellzahlen und damit eine abnehmende Zell-Vitalität mit zunehmender Konzentration an Vaterit-Partikel über einen längeren Stimulationszeitraum dargelegt. Nach 72 Stunden Kultivierung der MG-63 Zellen mit Vaterit-Partikel in Konzentrationen von 100 µg/mL und 500 µg/mL konnte eine signifikant zur Kontrolle unterschiedliche Kristallviolett-Färbung detektiert werden.

Tab. 7.2: Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (MTS, LDH und Kristallviolett) nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL Vaterit-Partikel. Die Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) 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, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

	MTS-Assay 24 h			LDH-Assay 24 h			Kristallviolett-Färbung 24 h		
	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test
LZ	--	--	--	100,0	0,0	--	--	--	--
UZ	100,0	0,0	--	1,2	0,3	--	100,0	0,0	--
50 µg/mL V	105,3	5,0	0,21	1,1	0,1	0,83	101,0	2,7	0,58
100 µg/mL V	106,8	3,6	0,08	1,6	0,1	0,10	101,6	7,1	0,73
500 µg/mL V	107,4	3,2	0,06	1,2	0,2	0,92	100,5	5,2	0,89
	MTS-Assay 48 h			LDH-Assay 48 h			Kristallviolett-Färbung 48 h		
	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test
LZ	--	--	--	100,0	0,0	--	--	--	--
UZ	100,0	0,0	--	1,0	0,4	--	100,0	0,0	--
50 µg/mL V	100,1	1,9	0,90	0,9	0,2	0,57	95,1	4,2	0,49
100 µg/mL V	98,2	6,4	0,68	1,0	0,6	0,98	93,4	10,3	0,55
500 µg/mL V	101,9	4,5	0,54	0,9	0,4	0,80	83,6	3,8	0,87
	MTS-Assay 72 h			LDH-Assay 72 h			Kristallviolett-Färbung 72 h		
	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test
LZ	--	--	--	100,0	0,0	--	--	--	--
UZ	100,0	0,0	--	0,9	0,5	--	100,0	0,0	--
50 µg/mL V	102,0	9,1	0,74	1,5	0,8	0,31	99,3	2,4	0,66
100 µg/mL V	97,0	5,2	0,43	1,5	0,6	0,25	89,8	2,2	0,02
500 µg/mL V	95,3	7,3	0,38	1,7	0,3	0,08	74,2	4,2	0,01

7.3.5 Zell-Biokompatibilität

Zur Beurteilung der Zellverträglichkeit, Zell-Biokompatibilität, wurde eine Reihe von *in vitro* Experimenten unter Verwendung des membranpermeablen Calcein-AM Fluoreszenzfarbstoffs durchgeführt. Dadurch wurde sowohl die Morphologie als auch das Proliferationsverhalten lebender Zellen in Anwesenheit der Vaterit-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen (50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL) in einem Zeitraum von bis zu 7 Tagen analysiert. Diese Untersuchung erfolgte nicht nur an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63, sondern auch an primären humanen Osteoblasten (pOB) und an primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) von drei verschiedenen Spendern. Die Ergebnisse der MG-63 Zellen sind in Abb. 7.8 an ausgewählten, repräsentativen Beispielen dargestellt.

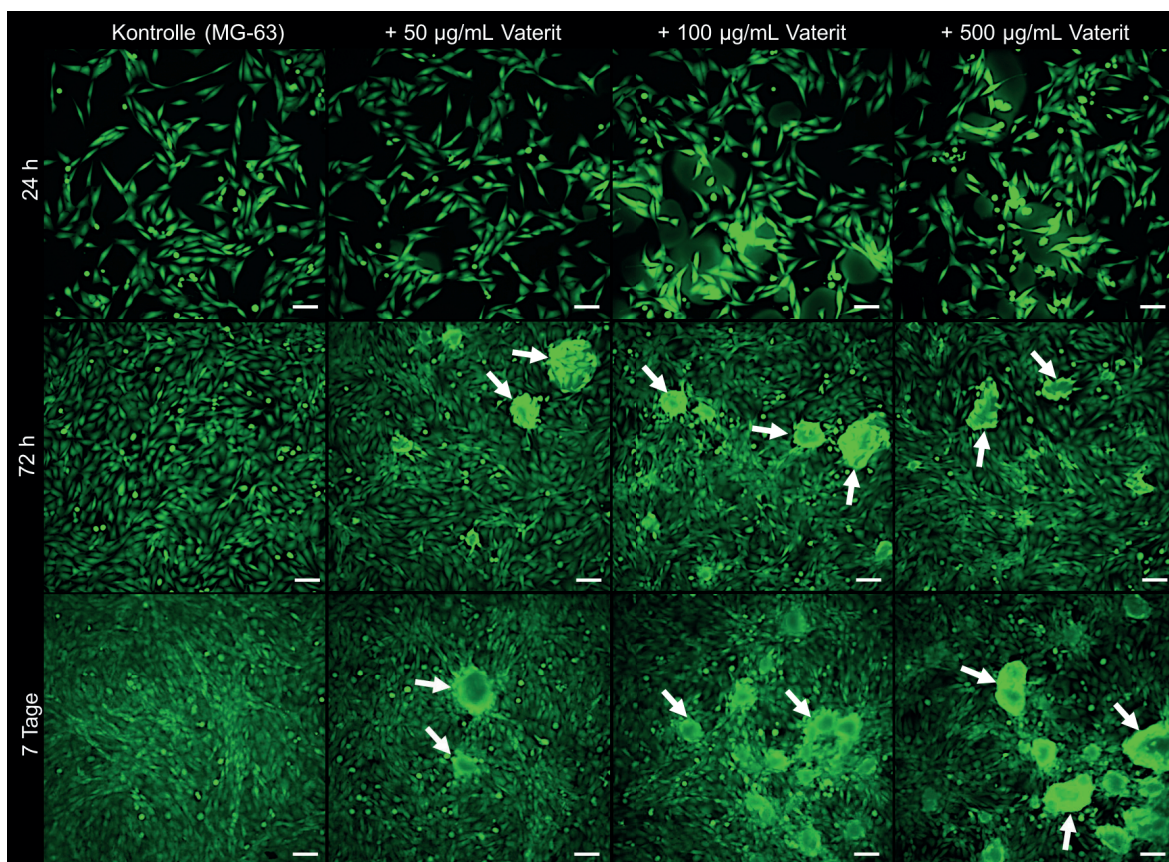


Abb. 7.8: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an Vaterit-Partikel getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Mit weißen Pfeilen sind akkumulierte Zellen auf den Agglomeraten der Vaterit-Partikel markiert. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

Die Abb. 7.9 und Abb. 7.10 zeigen die Ergebnisse der pOB und der HUVEC am Beispiel eines repräsentativen Spenders.

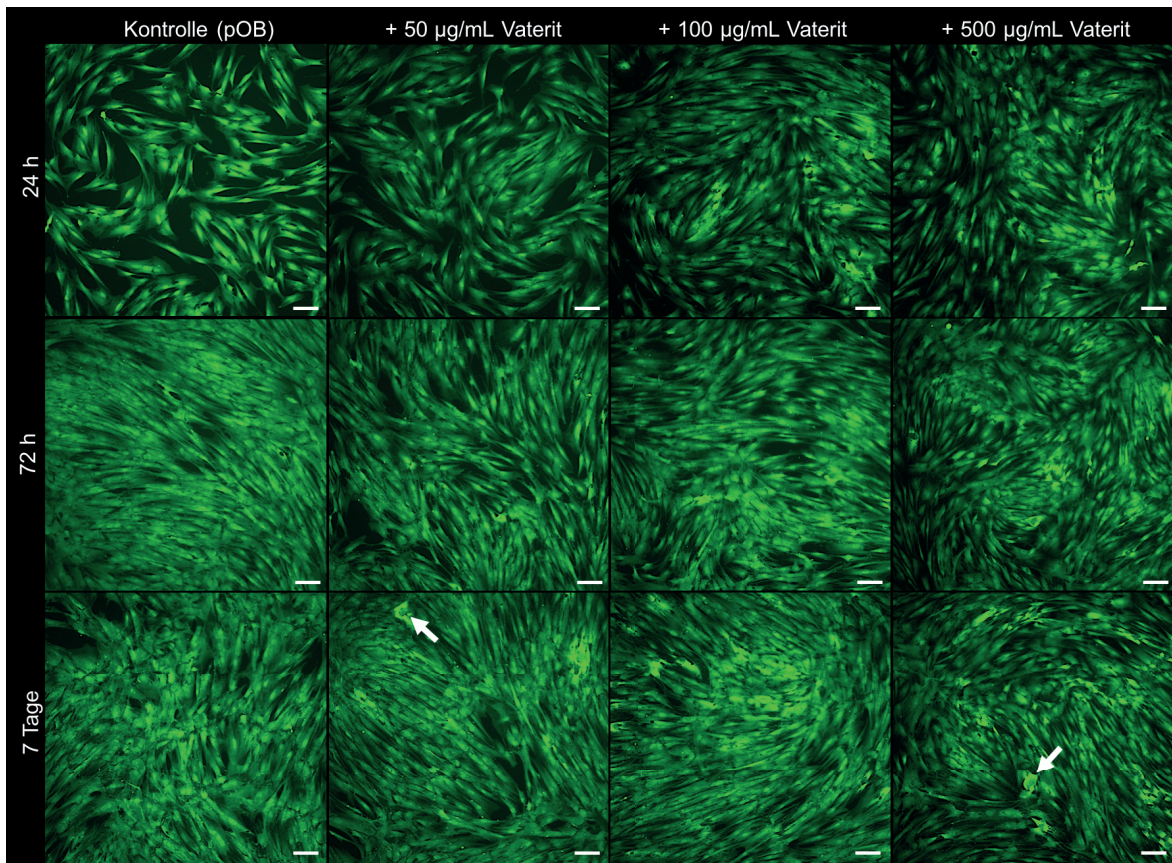


Abb. 7.9: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an Vaterit-Partikel getestet an primären humanen Osteoblasten (pOB) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Mit weißen Pfeilen sind akkumulierte Zellen auf Agglomeraten der Vaterit-Partikel markiert. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Aus den Fluoreszenzfärbungen der unterschiedlichen Zelltypen gingen ähnliche Ergebnisse, jeweils im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Zellen (Kontrollen), hervor. In allen untersuchten Fällen und einem Inkubationszeitraum von bis zu 7 Tagen zeigten die mit Vaterit-Partikel exponierten Zellen eine vergleichbare Wachstumsverteilung mit ähnlicher Zellmorphologie, wie sie bei den unbehandelten Kontroll-Zellen beobachtet wurde. Zusätzlich wurde eine Agglomeration der Vaterit-Partikel im Medium erfasst. Interessanterweise zeigten die MG-63 Zellen eine stark ausgeprägte, adhärenente Eigenschaft gegenüber diesen Agglomeraten der Vaterit-Partikel, die als intensive grüne Fluoreszenz um die Agglomerate detektiert wurde (s. Abb. 7.8, weiße Pfeile). Mit zunehmender Konzentration an Vaterit-Partikeln und längerer Inkubationszeit wurde dieses Phänomen stärker ausgeprägt. In deutlich geringerem Ausmaß wurde dieses Phänomen auch bei den primären Zellen, den pOB und den HUVEC, beobachtet (s. Abb. 7.9 und Abb. 7.10, weiße Pfeile).

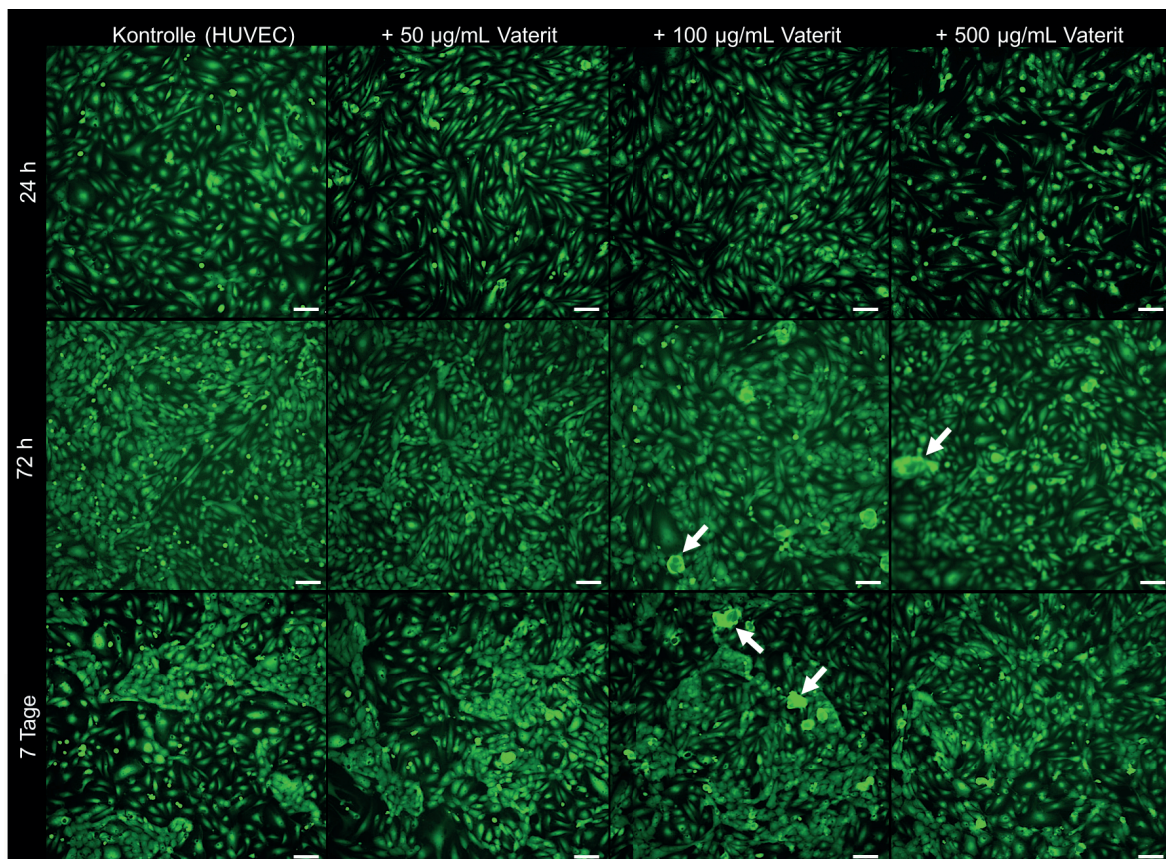


Abb. 7.10: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an Vaterit-Partikel getestet an primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Mit weißen Pfeilen sind akkumulierte Zellen auf den Agglomeraten der Vaterit-Partikel markiert. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

7.3.6 Differenzierung von Osteoblasten

Für den Einsatz der Vaterit-Partikel als Knochen-Biomaterial sollten die hergestellten Partikel eine gute Osteoinduktivität aufweisen, um die Knochenregeneration bei Knochendefekten zu fördern. Dazu wurde in einem ersten Test die Differenzierung der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in Anwesenheit von Vaterit-Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen bis hin zu 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untersucht. Nach Kultivierungen von 7, 14 und 21 Tagen wurde die Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) durch die MG-63 Zellen mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Testverfahrens (s. Abschnitt 7.2.3), durch Detektion eines Azofarbstoffes, nachgewiesen. Wie in Abschnitt 5.3 bereits beschrieben, dient der Nachweis der ALP als osteogener Differenzierungsmarker. In Abb. 7.11 sind die Resultate zusammengestellt.

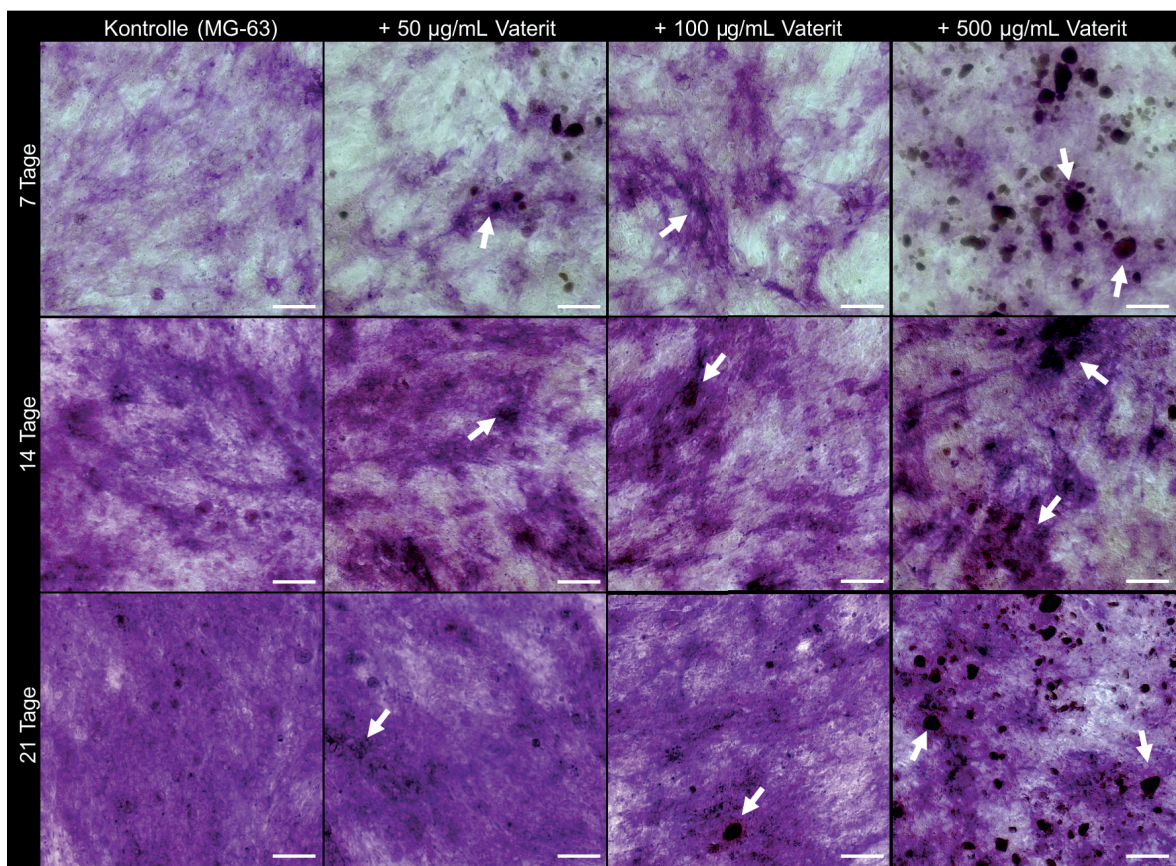


Abb. 7.11: Nachweis der Differenzierung von der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 durch Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) in Anwesenheit der Vaterit-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen nach Inkubationszeiten von 7, 14 und 21 Tagen. Mit weißen Pfeilen sind akkumulierte Zellen auf den Agglomeraten der Vaterit-Partikel markiert. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Bereits nach 7 Tagen Kultivierung der MG-63 Zellen in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM) in Anwesenheit von Vaterit-Partikeln konnte eine ALP-Aktivität nachgewiesen werden. Während der weiteren Kultivierungsphase, bis hin zu 21 Tagen, ließ sich eine kontinuierliche Zunahme der Farbintensität und damit der ALP-Aktivität nachweisen. Zunächst ließ sich beim Vergleich der unbehandelten Zellen (Kontrolle) mit den durch Vaterit-Partikel stimulierten Zellen kein entscheidender Unterschied feststellen. Alle untersuchten Proben zeigten nach einheitlicher

Inkubationszeit eine vergleichbare Färbung. Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass vor allem bei zunehmender Konzentration an Vaterit-Partikel und längerer Stimulationszeit eine intensive Färbung um die Agglomerate der Vaterit-Partikel (markiert durch weiße Pfeile in Abb. 7.11) zu beobachten war. Dieses Resultat korrespondiert mit den Beobachtungen aus Abschnitt 7.3.5, dass die MG-63 Zellen eine verstärkte Tendenz zur Adhärenz an den Agglomeraten der Vaterit-Partikel aufweisen. Um eine fehlerhafte Farbreaktion durch Anwesenheit der Vaterit-Partikel auszuschließen, wurden die entsprechenden Konzentration an Vaterit-Partikel in Abwesenheit der MG-63 Zellen über die entsprechenden Zeiträume inkubiert und ebenfalls eine ALP-Färbung durchgeführt. Die Resultate sind am Beispiel der 21 Tage Proben in Abb. 7.12 aufgeführt. Es konnte bei keiner Vaterit-Konzentration eine Färbung nachgewiesen werden, sodass die Färbungen in Anwesenheit der MG-63 Zellen ausschließlich auf die Aktivität der exprimierten ALP zurückzuführen ist.

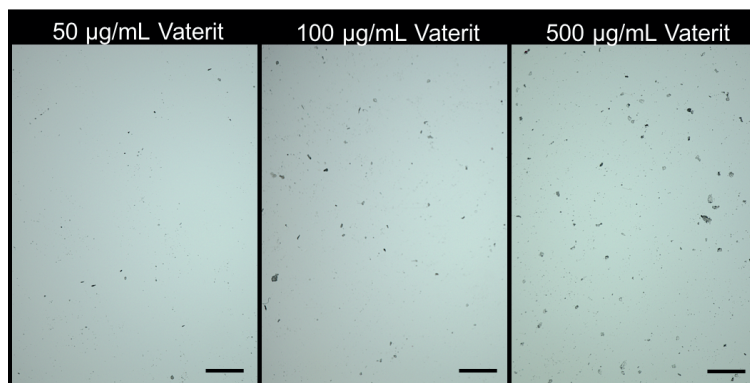


Abb. 7.12: Negativ-Kontrolle der ALP-Färbung nach 21 Tagen. Inkubation der Vaterit-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen in osteogenem Differenzierungs-Medium ohne MG-63 Zellen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 300 µm.

7.4 Diskussion

In diesem Kapitel wurde sich ausgiebig mit der Synthese von Vaterit-Partikeln, deren Charakterisierung und vor allem deren potentielle Anwendung als Biomaterial in der Medizin beschäftigt. Für anwendungsbezogene Materialien ist es von großer Bedeutung, dass sie unter möglichst einfachen Bedingungen mit großer Reinheit und in einer annähernd quantitativen Ausbeute angefertigt werden können. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden wurde eine einfache, bereits bestehende Syntheseroute nach Schüler *et al.*^[34] zur Herstellung der Vaterit-Nanopartikeln im Hinblick auf die Ausbeute, Reinheit und sterile Synthesebedingungen optimiert. Es wurde nachgewiesen, dass die Zugabe von Wasser einen enormen Einfluss auf die Ausbeute der Vaterit-Nanopartikel hat. Entscheidend hierbei waren der Zeitraum der Zugabe und die Menge an zugeführtem Wasser, um eine weitere Phasenumwandlung von Vaterit in die thermodynamisch stabile Phase, Calcit, zu unterbinden und ein phasenreines Produkt zu erhalten. In dieser Arbeit ist es gelungen die notwendige Wassermenge und die entsprechende Reaktionszeit zu bestimmen, um eine maximale Ausbeute von 90% an phasenreinen Vaterit-Partikel zu erzielen. Der Mechanismus der Kristallisation der Vaterit-Partikel lässt sich wie folgt beschreiben. Für die Vaterit-Keimbildung im Ethylenglykol sind bereits geringe Mengen an Wasser nötig. Durch das Lösen des Calciumchlorid Tetrahydrates im Ethylenglykol wird das Kristallwasser freigesetzt und dient voraussichtlich als Keimbildungs-Milieu für Vaterit. Im wässrigen Milieu herrscht eine größere Löslichkeit der Ionen, vor allem des Natriumhydrogencarbonates, das sich in reinem Ethylenglykol nur sehr schlecht löst. Es wird so viel Natriumhydrogencarbonat in Lösung gehen, bis eine Übersättigung im wässrigen Milieu resultiert, die zu einer Verringerung der freien Reaktionsenthalpie führt. Gleichzeitig wird die Aktivierungsenergie durch die erhöhte Löslichkeit überschritten mit der Folge der Calciumcarbonat-Keimbildung. Nach der Ostwaldschen Stufenregel fällt beim Einleiten der Kristallisation zunächst die energiereichste und damit metastabile Phase, der Vaterit, aus. Die so erhaltenen Vaterit-Keime begünstigen die Kristallisation weiterer Vaterit-Partikel. Vor allem durch die Zugabe von Wasser am Ende der Reaktionszeit wird dieser Vorgang, durch die erhöhte Löslichkeit und Überschreitung der Aktivierungsenergie, nochmals verstärkt und ermöglicht so eine nahezu quantitative Kristallisation der Vaterit Partikel. Der Einsatz von Ethylenglykol spielt bei der Synthese eine entscheidende Rolle. Durch die OH-Gruppen von Polyalkoholen wird ein elektrisches Feld verursacht, das eine Koordination der OH-Gruppen an die Vaterit-Partikel bewirkt, wodurch die hohe Oberflächenenergie von Vaterit kompensiert und damit eine verbesserte thermodynamische Stabilität erzeugt wird.^[142,143] Aufgrund der Verwendung der Hydrogencarbonat-Komponente, statt der Carbonat-Spezies, werden die CO_3^{2-} -Ionen erst durch die Ultraschallbehandlung erzeugt, wodurch zusätzlich eine kontrollierte Nukleation und Kristallisation stattfinden kann.

Mit Hilfe der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD) und den spektroskopischen Methoden (FT-IR, Raman) konnten phasenreine Vaterit-Partikel ohne Nebenprodukte oder Verunreinigungen nachgewiesen werden (s. Abschnitt 7.3.1), vergleichbar zu den von Schüler *et al.*^[34] synthetisierten

Vaterit-Nanopartikel. Allerdings unterschieden sie sich deutlich in der Morphologie. Die Zugabe von Wasser bewirkt eine Aggregation der Vaterit-Nanopartikel zu größeren Strukturen mit einem Durchmesser von 500 – 1000 nm. Die Aggregation der Vaterit-Nanopartikel lässt sich mit der verringerten Koordinationseigenschaft des Ethylenglykols, aufgrund der vermehrte Wasserzugabe, begründen. Die Oberflächenenergie der Vaterit-Nanopartikel wird dadurch vermutlich wieder erhöht und es resultieren durch eine Oberflächenenergie-getriebene Zusammenlagerung „self assembly“ größere Vaterit-Aggregate (Vaterit-Partikel) mit einer annähernd gleichen Größenverteilung. Ein möglicher Kristallisationsmechanismus ist in Abb. 7.13 illustriert. Hierbei erfolgt das Kristallwachstum nicht über eine klassische Ostwaldreifung, bei der größere Kristalle durch Auflösung kleinerer Kristalle gebildet werden, sondern durch orientierte Aggregation der primären Vaterit-Nanopartikel.

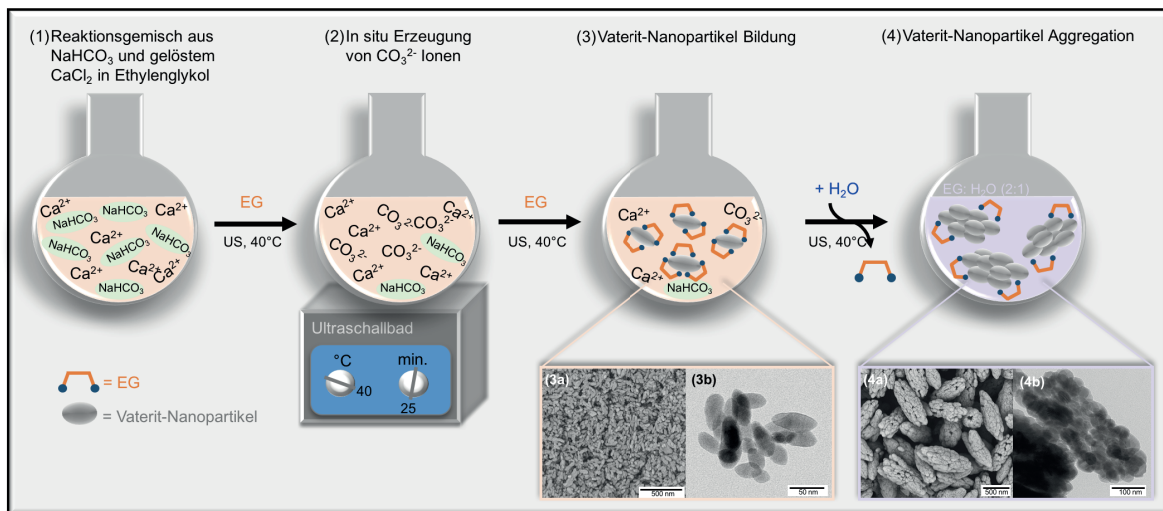


Abb. 7.13: Schematische Darstellung des möglichen Kristallisationsmechanismus der Vaterit-Partikel aus Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) und Calciumchlorid Tetrahydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) in Ethylenglykol (EG) mit anschließender Wasserzugabe. (1) Das in EG gelöste $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ wurde zu der Suspension aus NaHCO_3 in EG gegeben und durch Ultraschall (US) bei 40°C zur Reaktion gebracht. (2) Die Carbonat- (CO_3^{2-}) Ionen wurden in situ gebildet. (3) Erste Vaterit-Kristallisationskeime entstehen und werden durch die Koordination der OH-Gruppen des EG in der nanokristallinen Form stabilisiert. Nachgewiesen durch (3a) REM- und (3b) TEM- Aufnahmen. Im letzten Reaktionsschritt erfolgt eine Wasserzugabe, gefolgt von der nahezu vollständigen Kristallisation der Vaterit-Nanopartikel, aufgrund der niedrigeren Aktivierungsenergie von Vaterit in Wasser. Die Koordinationseigenschaft des EG wird verringert, wodurch eine Aggregation der Vaterit-Nanopartikel erfolgt, die den REM- (4a) und TEM- (4b) Aufnahmen zu beobachten sind.

Im Vergleich zu anderen, konventionellen nasschemischen Synthesen^[34,71,121,123,130,132,133] von Vaterit-Partikeln zeigt die hier beschriebene Synthese entscheidende Vorteile wie, (i) eine einfache Durchführung ohne Verwendung von toxischem Methanol oder Einleitung von CO_2 -Gas, (ii) keine Verwendung von zusätzlichen Additiven wie Dopamin zur Stabilisierung der Vaterit-Modifikation, (iii) und einfache Aufarbeitung, die zu reproduzierbaren, stabilen und lagerungsbeständigen Vaterit-Partikeln, ohne Phasenumwandlung führt. Letztendlich wurden mit dieser einfachen Methode größenkontrollierte Vaterit-Partikel in nahezu quantitativer Ausbeute in einer geringen Reaktionszeit von 30 Minuten hergestellt. Damit erfüllt diese Synthesvariante der Vaterit-Partikeln die

essentiellen synthetischen Voraussetzungen, um als Biomaterial für eine medizinische Anwendung Einsatz zu finden. Zusätzlich bietet die Aggregation der Vaterit-Nanopartikel hin zu größeren Partikel einen bedeutenden Vorteil für die Anwendung als Knochenersatzmaterial (s. Kapitel 8) im Gegensatz zu den nicht aggregierten Vaterit-Nanopartikeln. Die synthetisierten Vaterit-Aggregate sind gerade so groß, dass sie von den Zellen (getestet an MG-63, HUVEC und pOB) nicht aufgenommen werden, aber dennoch eine ausreichend große Oberfläche und Reaktivität für die Umwandlung in den HCA aufweisen (s. Kapitel 8). Aus anderen Arbeiten geht hervor, dass vor allem Endothelzellen dazu neigen Nanopartikel unkontrolliert „aufzufressen“ mit der Konsequenz eines toxischen Effekts.^[144,145] Auch Napierska *et al.*^[146] zeigten in ihrer Arbeit einen größeren toxischen Effekt kleiner Silica-Nanopartikel (bis 60 nm) im Vergleich zu größeren Partikel (bis 300 nm) bei der Stimulation mit Endothelzellen.

Für die Anwendung der hergestellten Vaterit-Partikel in der Medizin ist es dringend erforderlich die Toxizität und Zell-Biokompatibilität dieses Materials vorab zu testen. Durch die Verwendung von keimfreien Chemikalien und Reaktionsgefäßen sowie sterilen Lösungen ließen sich Vaterit-Partikel herstellen, die sowohl steril als auch frei von Endotoxin waren. Endothelzellen (HUVEC), die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Vater-Partikeln bis hin zu 500 µg/mL inkubiert wurden, zeigten keine Expression von E-Selektin. E-Selektin ist ein Oberflächenprotein, dessen Gen rasch durch Endothelzellen *in vivo* und *in vitro* in Reaktion auf Endotoxin exprimiert wird. Die Anwesenheit von Endotoxin *in vivo* kann zu Fieber, Entzündungen, Zell- und Gewebeschäden und letztendlich auch zu einem septischen Schock und Tod führen.^[96,147] Durch die Stimulation der Endothelzellen mit Endotoxin (LPS), wurde eine E-Selektin Expression induziert. Damit wurde gezeigt, dass Zellen auch in Gegenwart einer bestimmten Komponente wachsen und einen normalen Phänotyp aufweisen, was eine bakterielle Infektion im Körper simuliert. Zusätzlich wurde eine hohe Zell-Biokompatibilität der Vaterit-Partikel, sowohl mit Knochenzellen als auch mit Blutgefäßen bildenden Zellen, nachgewiesen. Eine starke adhärente Eigenschaft der MG-63 Osteoblasten gegenüber der im Medium agglomerierten Vaterit-Partikel ließ sich beobachten. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass das Matrixprotein Hyaluronan (auch bekannt als Hyaluronsäure) eine Schlüsselfunktion in der Zelloberflächenbindung aufweist und für die Vermittlung der ersten Zell-Adhärenz-Schritte von Osteoblasten und Endothelzellen verantwortlich ist.^[148,149] Hyaluronan ist ein großes, lineares Glycosaminoglycan mit einer stark negativen Ladung, hervorgerufen durch die Carboxylgruppen der Glukuronsäure.^[149] Im Gegensatz dazu zeigen die Vaterit-Partikel eine positive Oberflächenladung^[34] (s. dazu auch Abschnitt 8.6.2). Aus diesem Grund ist es möglich, dass die positiv geladene Oberfläche der Vaterit-Partikel die ersten Adhärenz-Schritte der Osteoblasten bewirkt und letztendlich auch zu einer starken Anhaftung und Proliferation der Osteoblasten führt.^[150,151] Dies konnte in der vorliegenden Arbeit in mehreren Experimenten beobachtet werden. Die starke, adhärente Eigenschaft der MG-63 Zellen zu den agglomerierten Vaterit-Partikeln könnte auch eine Erklärung für die geringere Zellzahl bei der Kristallviolett-Färbung sein. Hierbei wurden

mit zunehmender Konzentration an Vaterit-Partikeln und längerer Inkubationszeit weniger MG-63 Zellen nachgewiesen. Eine vermehrte Agglomeratbildung trat bei höheren Partikel-Konzentrationen und längerer Inkubationszeit auf, gefolgt von einer verstärkten Zelladhärenz auf den Vaterit-Agglomeraten, die nicht an der Zellkulturplatte fixiert waren. Durch anschließende Waschschriffe gingen die an Vaterit-Partikel adhärenzten Zellen verloren. Dieser Aspekt konnte mit zunehmender Partikelkonzentration und längerer Inkubationszeit in zunehmendem Maß beobachtet werden (s. Abschnitt 7.3.4, Abb. 7.7c). Eine spezifische Anlagerung der Osteoblasten an die Vaterit-Partikel ist vor allem bei der Anwendung in der Knochenregeneration und den Prozessen des Knochenaufbaus von großem Vorteil. Infolge der verstärkten Osteoblasten-Adhärenz ließ sich die Aktivität eines spezifischen Differenzierungsfaktors, die alkalische Phosphatase (ALP), auf den Vaterit-Partikel vermehrt nachweisen.

Im Gegensatz zu den MG-63 Osteoblasten zeigten die HUVEC eine deutlich verringerte adhärenzte Eigenschaft auf den Agglomeraten der Vaterit-Partikel. Es ist allgemein bekannt, dass Endothelzellen Matrixproteine (wie z.B. Fibronektin) benötigen, um auf Oberflächen zu adhärenzen.^[152] Die hier verwendeten Vaterit-Partikel wurden nicht mit Oberflächenproteinen versetzt, weshalb die Endothelzellen keine adhärenzten Eigenschaften zu den Vaterit-Partikeln aufweisen. Die fehlende Adhärenz-Eigenschaft der Endothelzellen kann allerdings, im Hinblick auf die Anwendung der Partikel als Biomaterial, von Vorteil sein. Eine rapidere Zellmigration der Endothelzellen könnte gewährleistet werden und damit verbunden könnte eine schnellere Vaskularisierung (Prozess zur Neubildung kleiner Blutgefäße) erfolgen, ohne dass sich die Endothelzellen zuvor von ihrem Adhärenz-Ort ablösen müssten. In einer früheren Arbeit von Unger *et al.*^[153] wurde das Aufwachsen von Endothelzellen auf Fibronektin-beschichteten Hydroxylapatit-basierten 3-dimensionalen Gerüsten im Hinblick auf die Gefäßbildung *in vitro* untersucht. Trotz Angiogenese-stimulierenden Umständen wurde nur ein geringes Ablösen der adhärenzten Endothelzellen beobachtet mit der Folge einer sukzessiven Gefäßbildung.

Abschließend lässt sich festhalten, dass bedeutende phänotypische Eigenschaften von Osteoblasten und Endothelzellen nicht durch die Exposition der Vaterit-Partikel gestört oder verändert wurden. Durch das in dieser Arbeit vorgestellte Syntheseverfahren ist es möglich sterile, Endotoxin-freie, nicht inflammatorische und osteoinduktive Vaterit-Partikel herzustellen.

7.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen, synthetischen Knochen-Biomaterialien beschrieben mit dem Vorteil die natürliche Knochenregeneration zu stimulieren und damit physiologisches Knochenmineral in kurzer Zeit zu erzeugen (s. Abb. 7.14). Als Ausgangsmaterial wurden Vaterit-Partikel durch eine einfache Syntheseroute in nahezu quantitativer Ausbeute und einer hochreinen, sterilen und lagerungsbeständigen Form synthetisiert. Aus zwei entscheidenden Gründen wurden diese Vaterit-Partikel als potentiell Biomaterial für eine natürliche Knochenregeneration vorgeschlagen. Einerseits bringt Vaterit aufgrund der inhärenten Instabilität ideale Voraussetzungen für eine *in vivo* Umsetzung in einen Knochen-ähnlichen Apatit mit, worauf im nachfolgenden Kapitel 8 ausführlich eingegangen wird. Andererseits wurde durch den Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) Aktivität gezeigt, dass die hergestellten Vaterit-Partikel die Differenzierung von Osteoblasten anregen. Dadurch ist es nicht nur möglich, dass die Vaterit-Partikel die natürliche Knochenregeneration antreiben, sondern gleichzeitig durch die vermehrte Phosphat-Ionen Freisetzung mittels ALP ihre eigene Umsetzung in ein Knochenmineral beschleunigen. Darüber hinaus erfüllen die synthetisierten Vaterit-Partikel wichtige Anforderungen für eine biomedizinische Anwendung, indem bestätigt wurde, dass sie (i) keine zytotoxischen Wirkungen auf Zellen haben - nachgewiesen durch MTS-, LDH- und Kristallviolett-Assays, (ii) frei von Endotoxinen sind, (iii) keine inflammatorische Effekte auf humane Endothelzellen haben und (iv) eine ausgezeichnete Biokompatibilität mit primären humanen Osteoblasten und Endothelzellen bis zu einem Zeitraum von 7 Tagen in hohen Konzentrationen von bis zu 500 µg/mL aufweisen.

Aufgrund der hervorragenden ersten *in vitro* Zell-Experimenten ist es von großem Interesse weitere Untersuchungen an primären Zellen durchzuführen, um den Einfluss der Vaterit-Partikel auf die Differenzierung von Osteoblasten und auf die Vaskularisierung der Endothelzellen weiterführend zu beurteilen. In weiterführenden *in vivo* Experimenten ist eine abschließende Beurteilung des Einsatzes der Vaterit-Partikel für die Knochenregeneration zu klären. In diesem Zusammenhang muss noch ein geeignetes, biokompatibles Transportsystem geschaffen werden, das einerseits die Partikel gezielt an die Defektstelle bringt und andererseits für eine lokale Wirkung der Vaterit-Partikel sorgt (s. Kapitel 10). In Abwesenheit eines solchen Systems würde eine Auflösung der Vaterit-Partikel eine systemische und keine lokale Erhöhung der Calcium-Konzentration bewirken, was eine Rekristallisation in Form von „Verkalkungen“ an unerwünschten Stellen zur Folge hätte. Eine weitere interessante Fragestellung, ergibt sich durch die Verwendung von fetalen Rinderserum (FBS). Hierbei ist zu prüfen ob eine spezifische Bindung der Serumproteine an die Vaterit-Partikel erfolgt und dies eine Auswirkung auf die Umwandlung von Vaterit in den Knochen-ähnlichen Apatit hat. Im Hinblick auf die medizinische Anwendung der Vaterit-Partikel ist eine Übertragung der Synthesevorschrift vom Labor- in den nachhaltigen Produktionsmaßstab essentiell. Die hier präsentierte einfache Synthesevorschrift bietet dafür gute Voraussetzungen.

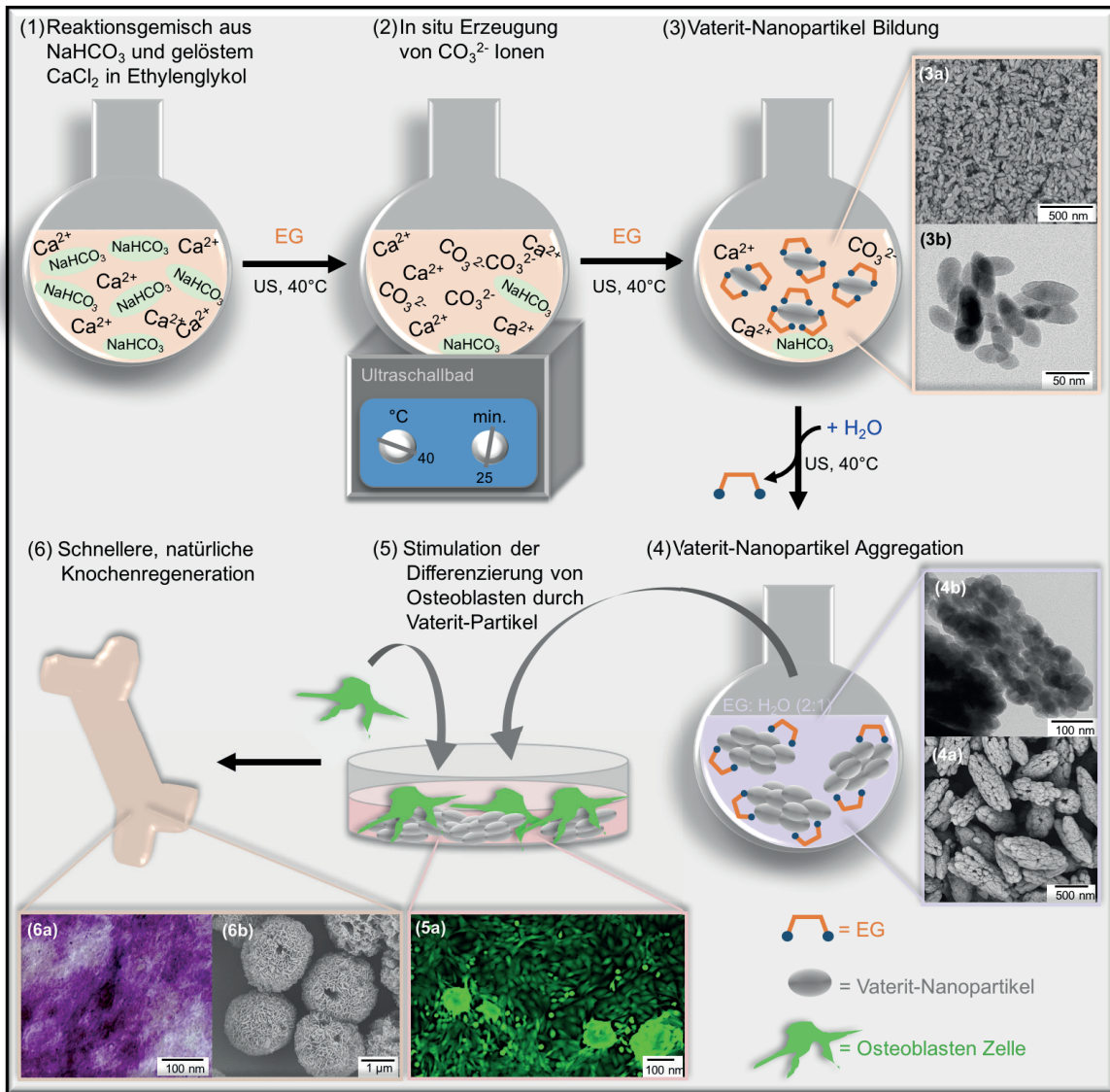


Abb. 7.14: Schematische Darstellung der optimierten Synthese von Vaterit-Partikel und deren biologische Anwendung in der Knochenregeneration.

Abschließend ist festzuhalten, dass in diesem Kapitel der vorliegenden Arbeit entscheidende, biologisch relevante Eigenschaften der Vaterit-Partikel aufgezeigt wurden, die sich besonders für eine zukünftige Anwendung im Bereich einer schnellen physiologischen Knochenregeneration auszeichnen.

8

Umsetzung von Vaterit in Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind teilweise Gegenstand des Manuskript „*Transformation of vaterite nanoparticles to hydroxycarbonate apatite in a hydrogel scaffold: relevance to bone formation*“ erschienen in *Journal of Materials Chemistry B* 2015, 3, 35, 7079 – 7089.^[129]

8.1 Einleitung

Die *in vivo* Knochenbildung ist ein sehr komplexer Prozess. Viele verschiedene Biomoleküle und Zellkompartimente spielen bei der Strukturbildung eine entscheidende Rolle und tragen zu den beeindruckenden Eigenschaften des Knochens bei.^[154] Aufgrund allgegenwärtiger Knochendefekte, wie beispielsweise Osteoporose, besteht eine hohe Nachfrage an synthetischen Knochenersatzmaterialien. Dadurch angetrieben besteht großes Interesse die Struktur des Knochens und den Knochenbildungsmechanismus besser zu verstehen. Im Vergleich zum stöchiometrischen Hydroxylapatit (HA) weist das Knochenmineral Defizite in Bezug auf Calcium- und Hydroxid-Ionen auf und ist ferner durch zahlreiche Substitutionen von Ionen, hauptsächlich Carbonat-Ionen, gekennzeichnet.^[47,50,98,140] Die Art und Menge dieser Substitutionen ist abhängig von physiologischen Bedingungen. Die Substitutionen beeinflussen sowohl die Kristallitgröße als auch die Löslichkeit des Knochenminerals, wodurch der natürliche Knochenumbau durch Aufbau- und Abbauprozesse ermöglicht wird.^[35,50,155] Ein synthetisches Abbild eines solchen physiologischen Knochenminerals zu schaffen, stellt eine der größten Herausforderung der aktuellen Forschung dar.

Aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zum Knochenmineral basieren gängige anorganische Biomaterialien für den Knochenersatz auf Calciumphosphaten (CaPs), wie zum Beispiel HA und Tricalciumphosphat (TCP).^[114,115] Diese CaPs zeichnen sich durch ihre Bioaktivität, Osteokonduktivität und direkten Bindung zum natürlichen Knochen aus.^[116] In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde nachgewiesen, dass HA^[156,157] und die verwandten CaPs^[158–160] die Adhärenz, Differenzierung und Proliferation von knochenbildenden Zellen (Osteoblasten und mesenchymale Stammzellen) unterstützen. Die osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften der CaPs hängen vor allem von ihrer Resorptionseigenschaft und ihrer Löslichkeit ab.^[161] Aufgrund der thermodynamischen Stabilität des HA unter physiologischen Bedingungen besteht der Nachteil der mangelnden Bioresorption.^[115] In den letzten Jahren erreichte der

Carbonat-haltigen Hydroxylapatit (HCA, *hydroxycarbonate apatite*) große Aufmerksamkeit als Knochenersatzmaterial. Sowohl die ähnliche chemische Zusammensetzung und Kristallstruktur zur Apatit-Phase im natürlichen Knochen, als auch die gute Osteokonduktivität und vor allem die Bioresorption zeichnen ihn gegenüber dem HA als vorteilhaftes Biomaterial für den Knochenersatz aus.^[71,162,163]

Von zunehmender Bedeutung für die Knochenregeneration sind amorphe Modifikationen des Calciumcarbonates (ACC) und des Calciumphosphates (ACP), die als potentielle anorganische Vorläufer für die Bildung des Knochenminerals beschrieben werden.^[42,117–119] Diese amorphen Modifikationen bringen allerdings einen entscheidenden Nachteil mit sich. Sie neigen als thermodynamisch metastabile Modifikationen zur spontanen Kristallisation und sind somit nicht lagerungsbeständig.^[120] Im Unterschied dazu hat Vaterit, als metastabile Calciumcarbonat Modifikation, in den letzten Jahren das Interesse der Forscher im Bereich der Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse geweckt. Im Fokus steht dabei die Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine HA-Spezies und deren Anwendung als Knochenersatzmaterial.^[71,121–124,129] Die in dieser Arbeit synthetisierten Vaterit-Partikel (s. Kapitel 7) zeigen, aufgrund der ausgezeichneten Biokompatibilität und Lagerungsbeständigkeit, ideale Voraussetzungen für die Anwendung als Biomaterial in der Knochenregeneration. Im Gegensatz zu den herkömmlich verwendeten Biomaterialien, beruht die Verwendung einer Vorstufe des Knochenminerals auf der *in vivo* Bildung des Knochenersatzmaterials und dient damit der natürlichen Knochenregeneration. Durch die *in vivo* Bildung könnte der Einbau weiterer Fremdionen (wie Na^+ , Mg^{2+} und vor allem CO_3^{2-}) und Zellen (Osteoblasten, Osteozyten) ermöglicht werden, wodurch eine HA-Spezies mit nahezu identischer chemischer und biologischer Ähnlichkeit zum natürlichen Knochenmineral entstehen könnte.

Die Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine solche Knochen-ähnliche Komponente wurde in diesem Kapitel verfolgt und quantifiziert. Dabei wurde die Umsetzung unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,4 und 37 °C über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten verfolgt. Zusätzlich wurden Effekte von Fremdionen und Serumproteinen auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel und die Bildung der HA-Spezies analysiert.

8.2 Materialien und Methoden

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, die synthetisierten und charakterisierten Vaterit-Partikel aus Kapitel 7 verwendet.

8.2.1 Reagenzien / Chemikalien

Die Inkubationen der Vaterit-Partikel erfolgten in einer nach Kokubo *et al.*^[164] frisch hergestellten simulierten Körperflüssigkeit (SBF: *simulated body fluid*). Hierfür wurden etwa 700 mL Wasser in einen 1000 mL Messkolben vorgelegt und auf 37 °C temperiert. Unter Rühren wurden die in Tab. 8.1 aufgeführten Reagenzien der Reihe nach gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 molarer Salzsäure auf pH 7,37 bei 37 °C eingestellt und der Messkolben, nach Abkühlung auf Raumtemperatur, bis zur Eichmarke mit Wasser befüllt.

Tab. 8.1: Gewicht und Konzentration der Reagenzien für die Herstellung von 1 L SBF.

Reagenz (Hersteller)	Gewicht / Volumen	Konzentration / mM
NaCl (Acros, ≥ 99,0%)	8,035 g	137,5
NaHCO ₃ (Sigma Aldrich, ≥ 99,7%)	0,355 g	4,2
KCl (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%)	0,225 g	3,0
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (Sigma Aldrich, ≥ 99,0%)	0,231 g	1,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Merck, ≥ 99,0%)	0,311 g	1,5
1M HCl	39 mL	-
CaCl ₂ (Sigma Aldrich, ≥ 93,0%)	0,292 g	2,63
Na ₂ SO ₄ (Acros, 99,0%)	0,072 g	0,51
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃ , Carl Roth, ≥ 99,9%)	6,118 g	50,5

Zusätzliche Inkubationen erfolgten in einer kommerziell erworbenen Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS: *phosphate buffered saline*, D8537 Sigma Aldrich) und in einem Zellkulturmedium, bestehend aus Minimum Essential Medium Alpha + Glutamax I (MEM α , gibco[®] Thermo Fisher Scientific) mit 10% fetalem Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*, Sigma Aldrich) und 100 U / 100 μ g/mL Penicillin/Streptomycin (P/S, Gibco[®] Thermo Fisher Scientific).

Nach entsprechender Inkubationszeit der Vaterit-Partikel erfolgte die Aufreinigung der Proben durch Zentrifugation bei 9000 U/min für 15 Minuten und mehrfachem Waschen des erhaltenen Feststoffes mit Wasser und Ethanol (C₂H₆O, Sigma Aldrich, ≥ 99,8%). Die erhaltenen Feststoffe wurden im Hochvakuum bis zur Massenkonstanz getrocknet und anschließend charakterisiert.

Als Referenzsubstanz wurde ein kommerziell erworbener Hydroxylapatit (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, Sigma Aldrich, ≥ 97%, 677418) verwendet. Zusätzlich wurde ein Referenz-Knochenmineral aus einem humanen Knochen durch Auskochen gewonnen. Der humane Knochen entstammte aus dem Knie eines 52-jährigen Mannes und erfolgte, entsprechend den gesetzlichen ethischen Vorschriften, als anonyme Spende ohne patientenbezogene Daten bei einer Knochen transplantation.

8.2.2 Charakterisierungsmethoden

Die Morphologie der untersuchten Proben wurde mittels der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermittelt. Durch energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) und Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS: *electron energy loss spectroscopy*) erfolgten Elementanalysen.

Mit Hilfe der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD: *X-ray diffraction*) wurden die Phasen zugeordnet. Quantifizierungen der Phasen ergaben sich durch Vollprofilanpassungen unter Verwendung des fundamentalen Parameter-Ansatzes, entsprechend der Implementierung aus TOPAS Academic Version 5 und Version 6.^[135] Detaillierte Angaben zu den Modellierungen sind dem Anhang A, Abschnitt 11.1 zu entnehmen. Abweichend dazu erfolgte die quantitative Phasenanalyse der Inkubationen aus Abschnitt 8.3.2 mittels simultaner Anpassung aller Diffraktogramme einer Inkubationsreihe. Dazu wurden für jede Einzelmessung jeweils nur der Skalierungsfaktor und die Kristallitgröße jeder Phase sowie die Probenposition, die Probenrauigkeit sowie drei Untergrundparameter verfeinert. Die Gitterparameter und die isotropen Auslenkungsparameter wurden simultan für alle Messungen angepasst. Dieser Ansatz führte, insbesondere bei schlechten Einzelmessungen oder geringen Massenanteilen einer einzelnen Phase, zu einer stabileren Anpassung und innerhalb einer Reihe zu vergleichbaren Ergebnissen. War keine exakte Quantifizierung der Kristallitabmessungen bei den Anpassungen erforderlich, erfolgte die Modellierung der anisotropen Kristallitausdehnung des kristallinen Hydroxylapatits anhand der Kugelflächenfunktionen. Die Koeffizienten der einzelnen Kugelflächenfunktionen wurden für alle Messungen simultan angepasst, sodass ein individueller isotroper Größenfaktor für jede Messung erforderlich war.

Die Fourier-Transformation-Infrarot- (FT-IR) und Raman-Spektroskopie wurden als weitere Charakterisierungsmethoden zur Identifizierung von funktionellen Gruppen genutzt. Eine quantitative Durchführung der FT-IR-Spektroskopie ermöglichte über das Phosphat zu Carbonat-Ionenverhältnis die Anteile an Hydroxylapatit (HA) und Vaterit zu bestimmen. Hierzu wurden Standard-Proben mit definiertem Massenanteil an kommerziell erworbenem HA (0, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 wt%) und synthetisiertem Vaterit (100, 90, 80, 75, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 0 wt%) hergestellt. Kupfer(I)-cyanid (CuCN, Sigma Aldrich) fungierte als interner Standard für die Normierung der Spektren. Im Verhältnis 80 wt% CuCN und 20 wt% Probe wurde es sowohl den Standard-Proben als auch den Proben der Inkubationen zugemischt. Pro Mischungsverhältnis wurden zwei Proben hergestellt und jeweils dreimal vermessen. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen wurden für die Quantifizierung verwendet.

Eine quantitative ³¹P-Festkörper-Kernresonanz-Spektroskopie (NMR: *solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy*) wurde an ausgewählten Proben, zur Identifizierung und Quantifizierung der Phosphorspezies, durchgeführt.

Detaillierte Angaben zu den Messmethoden bzw. Geräteparametern sind dem Anhang A, Abschnitt 11.1 zu entnehmen.

Alle Inkubationsreaktionen wurden auf einem Heidolph Unimax 1010 Schüttler mit Inkubatormodul 1000 bei 37 °C und leichtem Schütteln (150 U/min.) durchgeführt.

8.2.3 Exkurs: Probenpräparation für Zeta-Potential Messungen und Proteinkorona Analysen

Für die Zeta-Potential Messungen wurden Vaterit-Partikel im entsprechenden Medium (Wasser und 10x verdünntem PBS jeweils mit und ohne 10% FBS) in einer Konzentration von 1 mg/mL resuspendiert, für 30 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert und im Anschluss direkt bzw. nach 1 und 6 Stunden vermessen. Die Vaterit-Partikel-Suspensionen wurden mit einer 1 mM KCl-Lösung auf eine finale Konzentration von 500 µg/mL verdünnt und am Zetasizer Nano Series Instrument der Firma Malvern vermessen. Alle Proben wurden als Triplikate vermessen.

Für die Proteinkorona-Analyse wurden Vaterit-Partikel-Suspensionen in Konzentrationen von 50 µg/mL bis 10 mg/mL in Zellkulturmedium MEM α mit 10% FBS hergestellt. Zusätzlich wurden 100 µg/mL Vaterit-Partikel-Suspensionen in MEM α mit 50% FBS und in reinem FBS hergestellt. Die Suspensionen wurden für 10 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Zentrifugation (20.000 g, 4 °C, 30 Minuten) und dreimaligen Waschschritten mit PBS, zur Entfernung der nicht oder nur leicht gebundenen Proteinen. Die Desorption der an Vaterit-Partikel gebundenen Proteine erfolgte durch eine 62,5 mM TRIS / HCl gepufferten 2%-igen Natriumdodecylsulfat (SDS: *sodium dodecylsulfate*) –Lösung bei 95 °C für 5 Minuten. Nach anschließender Zentrifugation (20.000 g, 5 Minuten) lagen die desorbierten Proteine im Überstand vor. Die Masse an gebundenen Proteinen wurde mittels Pierce 660 nm Protein Assays bestimmt und anhand der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.^[107,165,166] Für die SDS-PAGE wurden, abhängig von der nachgewiesenen Proteinkonzentration in den Proben, 0,5-1,0 µg Protein aufgetragen und die Proteinbanden mittels Silberfärbung unter Verwendung des kommerziell erworbenen *Silver Quest Silver Staining Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers detektiert. Alle Proben wurden als Duplikate vermessen.

Die Probenpräparation und die Durchführung der Zeta-Potential Messungen und der Proteinkorona Analysen erfolgten von [REDACTED] aus der Gruppe von [REDACTED] unter Projektleitung von [REDACTED] am MPIP in Mainz.

8.3 Ergebnisse

Die Vaterit-Partikel wurden durch eine Ultraschall-basierte Synthese in einem Ethylenglykol-Wasser Gemisch aus Calciumchlorid Tetrahydrat und Natriumhydrogencarbonat, wie in Kapitel 7 beschrieben, hergestellt. Nach vollständiger Trocknung und Charakterisierung wurden die Partikel für die nachfolgenden Inkubationen verwendet.

8.3.1 Umsetzung der Vaterit-Nanopartikeln in Carbonat-haltigen Hydroxylapatit

Eine erste Beurteilungen zur Reaktivität und Umsetzungseigenschaft von Vaterit in eine Knochen-ähnliche Apatit-Spezies erfolgte an Vaterit-Nanopartikeln, die nach der Synthesvorschrift von Schüler *et al.*^[34] hergestellt wurden. Die Vaterit-Nanopartikel wurden in einer Konzentration von 1 mg/mL in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF), bei 37 °C und leichtem Schütteln (150 U/min.) über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten inkubiert. SBF ist eine TRIS-gepufferte Lösung mit einer nahezu identischen Ionenkonzentration wie sie im humanen Blutplasma (hBP) vorliegt (s. Tab. 8.2), wodurch eine biomimetische, knochenbildende Umgebung nachgeahmt wird.

Tab. 8.2: Ionenkonzentrationen in SBF verglichen mit den Ionenkonzentrationen im humanen Blutplasma (hBP).^[164]

	[Na ⁺] mM	[K ⁺] mM	[Mg ²⁺] mM	[Ca ²⁺] mM	[Cl ⁻] mM	[HCO ₃ ⁻] mM	[HPO ₄ ²⁻] mM	[SO ₄ ²⁻] mM	pH bei 37 °C
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,4
hBP	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,2-7,4

In Abb. 8.1 sind die Resultate der Inkubation der Vaterit-Nanopartikel in SBF bis zu einer Inkubationszeit von 72 Stunden zusammengestellt. Anhand einer quantitativen Phasenanalyse der Pulver-Röntgendiffraktometrie- (XRD) Daten wurde nachgewiesen, dass die nach Schüler *et al.*^[34] hergestellten Vaterit-Nanopartikel noch geringe Spuren von Calcit enthielten (Reflex (104) bei $2\theta \sim 29^\circ$) und somit nicht vollständig phasenrein vorlagen. Im Verlauf der Inkubation der Vaterit-Nanopartikel in SBF konnten zusätzliche Reflexe bei $2\theta \sim 26^\circ$ (002) und $2\theta \sim 32^\circ$ (211) nachgewiesen werden, die dem Hydroxylapatit (HA) zuzuordnen sind.^[167-169] Die Resultate der quantitativen Phasenanalyse sind in Abb. 8.2 aufgeführt und zeigen mit längerer Reaktionszeit eine Zunahme des Anteils der HA-Spezies, bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils an Vaterit. Auffällig ist allerdings auch, dass der Anteil an Calcit im Laufe der Reaktionszeit leicht anstieg. Details zur quantitativen Phasenanalyse sind im Anhang A, Abschnitt 11.2, aufgeführt.

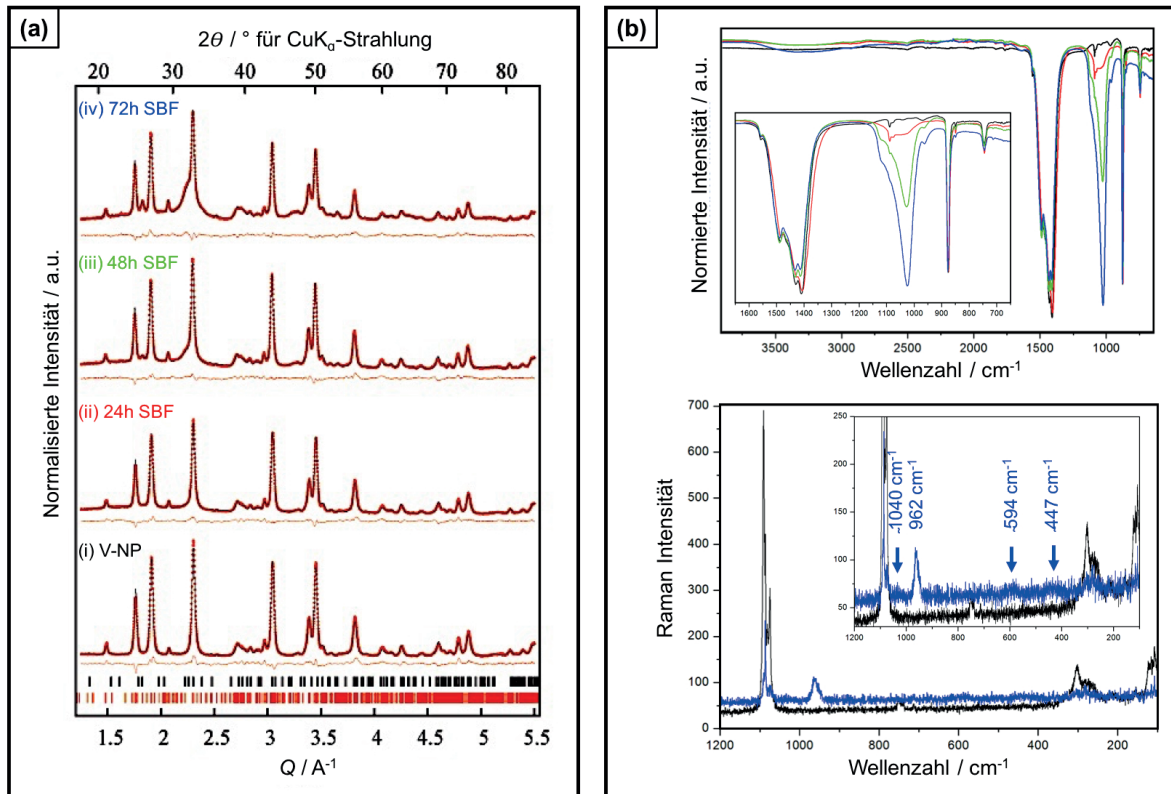


Abb. 8.1: Charakterisierung der Vaterit-Nanopartikel (V-NP) (i, schwarz) vor und nach der Inkubation in SBF für (ii, rot) 24h, (iii, grün) 48h und (iv, blau) 72h. (a) Pulverdiffraktogramme mit quantitativer Phasenanalyse durch Vollprofilanpassung, die roten Punkte stellen die Messdaten dar, die schwarze Linien zeigen die Anpassungen und die rote Linien geben die Differenzen an, rote Reflex-Markierungen = Vaterit^[33], schwarze Reflex-Markierung = HA^[170]. (b) FT-IR-Spektren (oben) sind auf die ν_2 (CO_3^{2-}) –Bande bei 744 cm^{-1} normiert und Raman-Spektren (unten).

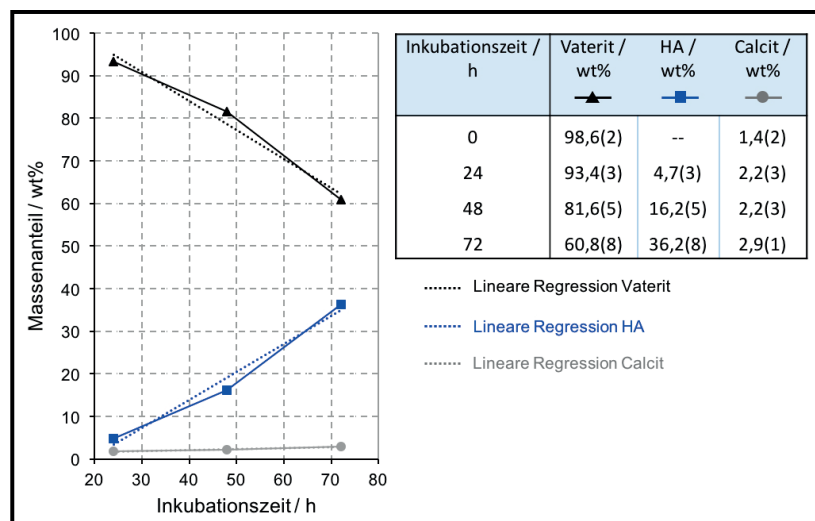


Abb. 8.2: Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse anhand der XRD-Daten der Vaterit-Nanopartikel vor und nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation in SBF mit graphischer Darstellung der Massenanteile der einzelnen Phasen als Funktion der Inkubationszeit.

Mittels der analytischen Methoden, FT-IR- und Raman-Spektroskopie, ließen sich neben den für Vaterit charakteristischen Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe (s. Kapitel 7, Tab. 7.1) weitere

Schwingungsbanden bei etwa 1024 cm^{-1} und 963 cm^{-1} nachweisen, die mit längerer Inkubationszeit in ihrer Intensität zunehmen. Die Bande bei 1024 cm^{-1} entspricht der dreifach entarteten asymmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe und die Bande bei 963 cm^{-1} lässt sich der symmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe zuordnen (s. Abb. 8.1b, oben).^[123,171] Zudem lässt sich auch eine Zunahme einer breiten OH-Bande, bei etwa 3400 cm^{-1} , im IR-Spektrum beobachten. In Abb. 8.1b (unten) ist das Raman-Spektrum der 72 Stunden SBF-Inkubation (blau) im Vergleich zu dem Raman-Spektrum der eingesetzten Vaterit-Nanopartikel (schwarz) aufgetragen. Die Bande der symmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe ist bei 962 cm^{-1} deutlich sichtbar. Zusätzlich sind noch weitere schwache Banden der PO_4^{3-} -Gruppe bei 1040 cm^{-1} (dreifach entartete asymmetrische P-O Streckschwingung), 594 cm^{-1} (dreifach entartete O-P-O Spreiz-Deformationsschwingung) und 447 cm^{-1} (doppelt entartete O-P-O Kipp-Deformationsschwingung) zu beobachten, die sich dem PO_4^{3-} -Ion des Hydroxylapatits zuordnen lassen.^[171,172] Darüber hinaus sind immer noch Banden der CO_3^{2-} -Gruppe vorhanden, allerdings in deutlich geringerer Intensität. Die Bande bei 962 cm^{-1} ist charakteristisch für eine hoch kristalline Phosphat-Apatit-Phase, wobei die Breite der Bande auf das Vorliegen von sehr kleinen und ungeordneten Kristalliten hinweist.^[173]

Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM und TEM) wurden, während der Inkubationszeit in SBF, signifikante Änderungen in der Morphologie beobachtet. Die REM-Aufnahmen sind in Abb. 8.3 zusammengestellt und zeigen Vaterit-Nanopartikel mit der typisch ellipsoiden Form in den Dimensionen von $25\text{ nm} \times 50\text{ nm}$ (Abb. 8.3a).^[34]

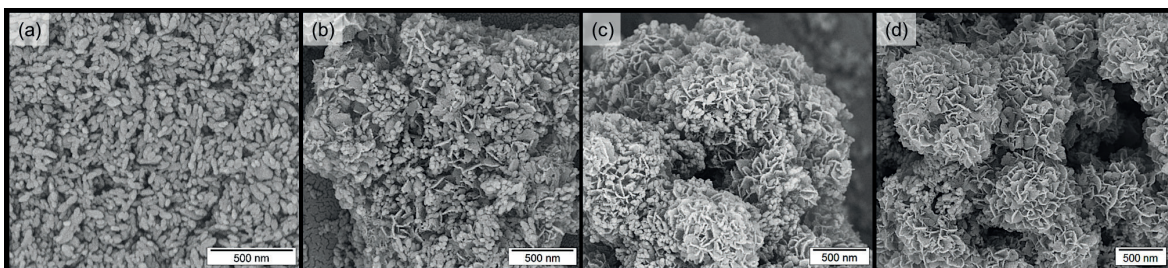


Abb. 8.3: REM-Aufnahmen der Vaterit-Nanopartikel (a) vor und nach der Inkubation in SBF für (b) 24 h, (c) 48 h und (d) 72 h, zeigen die Zunahme einer „Wüstenrosen-ähnlichen“ Struktur.

Durch die Inkubation in SBF sind neben den Vaterit-Nanopartikeln noch zusätzliche Strukturen entstanden, die im Laufe des Inkubationszeitraums bis hin zu 72 Stunden deutlich zunehmen (s. Abb. 8.3b-d). Die Veränderung der Morphologie bei fortschreitendem Kristallwachstum weist auf eine Veränderung des Auflösungs- und Kristallisations-Prozesses hin. In der ersten Phase des Kristallwachstums von HA werden die nanoskopischen Plättchen zwischen den Vaterit-Nanopartikeln gebildet (s. Abb. 8.3b). In der anschließenden zweiten Phase erfolgt eine Kristallisation weiterer Plättchen als diskrete Einheiten auf den vorhandenen plättchenförmigen Strukturen, wodurch sich die „Wüstenrosen-ähnlichen“ Gebilde formen (s. Abb. 8.3b-d). Hochaufgelöste REM-Aufnahmen in Abb. 8.4a und b zeigen die Zusammenlagerung der entstehenden Plättchen. Anhand von TEM-Aufnahmen nach 72 Stunden Inkubation in SBF wurde

bestätigt, dass die entstandenen Partikel aus aggregierten Nanoplättchen bestehen und wie eine Schicht über den noch vorhandenen Vaterit-Nanopartikeln wachsen (s. Abb. 8.4c, d).

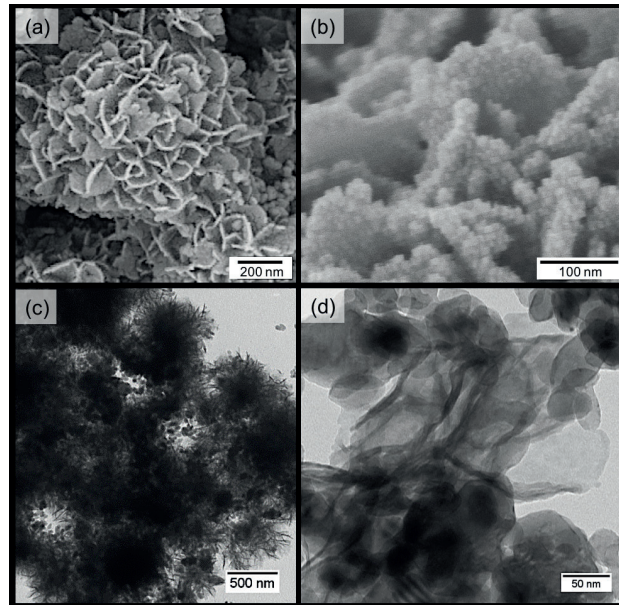


Abb. 8.4: (a, b) Hochaufgelöste REM-Aufnahmen und (c, d) TEM-Aufnahmen der plättchenförmigen Aggregate, die sich aus Plättchen-ähnlichen Nanokristallen zusammensetzten, die nach 72 h Inkubation von Vaterit-Nanopartikeln in SBF entstanden sind.

Die Kristallitgröße der entstandenen Nanoplättchen wurde mit Hilfe einer Vollprofilanpassung anhand der XRD-Daten aus Abb. 8.1 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8.3 dargestellt und zeigen Kristallitgrößen von 26-32 nm Länge und 13-17 nm Breite die auf der Basis eines hexagonalen Kristallsystems mit der Raumgruppe $P6_3/m$ berechnet wurden. Aus Abb. 8.4c und d geht hervor, dass die gebildeten Plättchen nur eine sehr geringe Dicke aufweisen. Des Weiteren scheint es als würden sie sich an den Kanten zum Teil einrollen, wodurch die „Igel-artige“ Struktur resultiert (s. Abb. 8.4c).

Tab. 8.3: Ergebnisse der Größenbestimmung der während der Inkubation von Vaterit-Nanopartikel entstehenden HA Kristallite durch Vollprofilanalyse der XRD-Daten (s. Abb. 8.1) mit einem Aspektverhältnis von 2:1.

Inkubationszeit / h	Länge der HA Kristallite / nm	Breite der HA Kristallite / nm
24	32(3)	17(2)
48	30(1)	15(1)
72	26(1)	13(1)

Während der Langzeit-Inkubation in SBF von bis zu 6 Monaten ließ sich anhand von XRD-Untersuchungen und morphologischen Betrachtungen mittels REM, ein signifikant zunehmender Anteil an Calcit feststellen (s. Abb. 8.5). Die deutliche Zunahme der Calcit-Phase ist am intensiven Reflex bei $2\theta \sim 29^\circ$ (104) zu beobachten. Nach 6 Monaten Inkubation in SBF konnten keine Reflexe der Vaterit-Phase zugeordnet werden. Hingegen wurden die Reflexlagen der Calcit-Phase zugewiesen. Die dem HA zugeordneten Reflexe bei $2\theta \sim 26^\circ$ (002) und $2\theta \sim 32^\circ$ (211) konnten

weiterhin nachgewiesen werden, allerdings mit stark verbreiteten Reflexen. Vor allem bei $2\theta \sim 32^\circ$ ist eine starke Verbreiterung und Überlappung mehrerer Reflexe zu beobachten. Demzufolge ist keine Zuordnung der einzelnen (211), (300) und (202) Reflexe möglich, wie sie im HA zu finden sind.^[168] Anhand der entsprechenden SEM-Aufnahmen ließen sich die XRD-Ergebnisse auch visuell bestätigen (s. Abb. 8.5 rechts). Nach einem Monat konnten immer noch viele, nicht umgesetzte stark agglomerierte, ellipsoide Vaterit-Nanopartikel beobachtet werden. Gleichzeitig konnten auch die „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen zwischen den Vaterit-Agglomeraten nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Partikel nach 3 Monaten konnte keine deutliche Zunahme der „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen erfasst werden. Hingegen trat verstärkt eine dritte, ausgeprägte rhomboedrische Morphologie auf, die charakteristisch für Calcit ist.^[29] Diese Morphologie konnte nach 6 Monaten als dominierende Struktur in der REM-Aufnahme bestätigt werden, wobei die „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen nach wie vor zu finden waren.

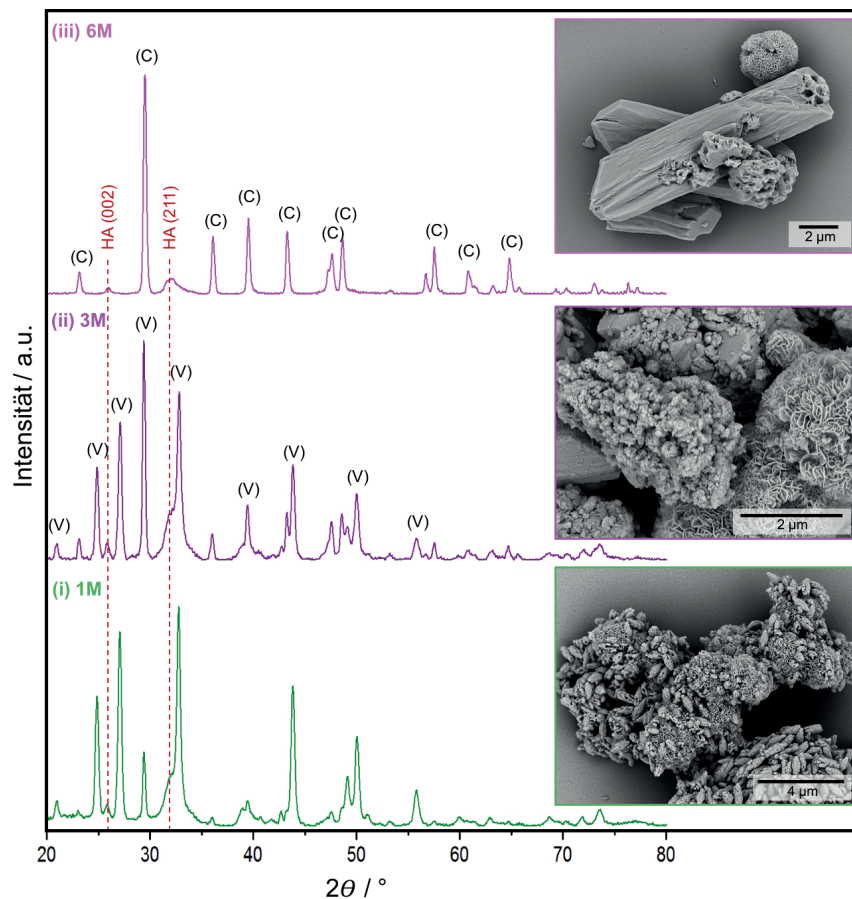


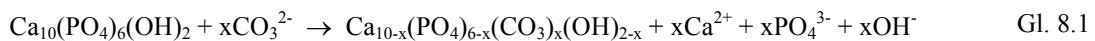
Abb. 8.5: Pulverdiffraktogramme der Langzeit-Inkubation der Vaterit-Nanopartikel (1 mg/mL) in SBF mit den entsprechenden REM-Aufnahmen nach (i) 1 Monat (grün), (ii) 3 Monaten (violett) und (iii) 6 Monaten (magenta). Mit Angabe der Reflexlagen von Calcit (C)^[30], Vaterit (V)^[33] und für Hydroxylapatit (HA)^[170]. Monat ist als M abgekürzt.

Diskussion:

In der Literatur sind die beobachteten „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen als *lath-like spherical agglomerates* beschrieben und stellen eine typische Morphologie des Knochen-ähnlichen Carbonathaltigen Hydroxylapatits (HCA) dar.^[47-49] Im Vergleich zum reinen Hydroxylapatit (HA) werden die Apatit-Kristallite des Knochens als plättchenförmig beschrieben. Mit einer Länge von 8-50 nm, einer Breite von 5-25 nm und einer Dicke von 1-4 nm gehören sie zu den kleinsten biologischen Kristalliten.^[48-50] In diesem Abschnitt konnten ähnliche morphologische Beobachtungen bei der Inkubation von Vaterit-Nanopartikeln in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF) gemacht werden. Mittels Vollprofilanpassung der XRD-Daten wurden die entstandenen HA-Kristallite mit einer Länge von 26-32 nm und eine Breite von 13-17 nm bestimmt. Peters *et al.*^[155] untersuchten und verglichen in ihrer Arbeit die Kristallitgrößen vom Knochenmineral und von synthetischem HA mittels hochauflösender XRD-Analyse. Sie konnten nachweisen, dass im Knochen die Apatit-Kristallite in der kristallographischen c-Achse elongiert sind. Diese Anisotropie konnten sie bei synthetischem HA nicht bestätigen. Bei den aus Vaterit-Nanopartikeln entstandenen HA-Kristalliten konnte eine vergleichbare Anisotropie nachgewiesen werden. Weiterhin ist bekannt, dass sich durch den Einbau von Carbonat-Ionen in das Kristallgitter des HAs die Morphologie verändert. Bereits LeGeros *et al.*^[167] beobachteten 1967 durch TEM-Studien eine Änderung der Morphologie des synthetischen HA von nadelförmigen zu plättchenförmigen Kristallen. Anhand der REM- und TEM-Aufnahmen konnten solche plättchenförmigen Strukturen auch bei dem aus Vaterit gebildeten HA beobachtet werden. Weiterhin wurde eine Aggregation dieser Nanoplättchen zu den „Wüstenrosen-ähnlichen“ Gebilden beobachtet. Die Vaterit-Nanopartikel fungieren als Ionenreservoir, bzw. als HA-Präkursor. Folglich resultieren die „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen durch eine sekundäre Keimbildung der HA-Plättchen auf der Oberfläche der Vaterit-Nanopartikel (vgl. Abb. 8.3). Die Oberflächenbeschaffenheit impliziert, dass das Wachstum der HA-Kristalle durch Partikelaggregation erfolgt. Es kann vermutet werden, dass Calcium (Ca^{2+})-Ionen und Carbonat (CO_3^{2-})-Ionen durch Auflösen der Vaterit-Nanopartikel während der Inkubation in SBF freigesetzt werden, wodurch eine lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Ionen auftritt. In Anwesenheit der im SBF befindlichen Phosphat (PO_4^{3-})-Ionen wird der Übersättigungspunkt von HA erreicht und eine HA-Keimbildung erfolgt auf der Oberfläche der Vaterit-Nanopartikel.

Die Morphologie der entstehenden HA Kristallite weist auf eine Substitution durch CO_3^{2-} -Ionen im HA hin, sodass ein nichtstöchiometrischer HA resultiert, wie er auch im Knochenmineral zu finden ist.^[35,47,155] Zusätzlich zu den Ca^{2+} -, PO_4^{3-} - und OH^- -Ionen besteht der biologische HA aus Verunreinigungen, bzw. Fremdionen, wobei die CO_3^{2-} -Ionen den größten Anteil mit 2-8 wt% ausmachen.^[35,174,175] Ein weiterer Hinweis darauf, dass CO_3^{2-} -Ionen in das HA-Gitter eingebaut sind, ist der ausgesprochen breite Reflex bei $2\theta \sim 32^\circ$, der in Abwesenheit der Vaterit-Phase nach 6 Monaten gut beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 8.5iii). Aus der Literatur ist bekannt, dass diese verbreiterte Reflexform sehr kleinen Kristalliten zuzuschreiben ist und / oder aus der Substitution

der PO_4^{3-} -Ionen gegen CO_3^{2-} -Ionen resultiert.^[168,169,174] Hierbei handelt es sich um den B-Typ des HCA, wohingegen beim A-Typ HCA die OH^- -Ionen gegen CO_3^{2-} -Ionen substituiert werden.^[38] Die Bildung des HCA vom B-Typ ist in einer wässrigen Umgebung gegenüber dem A-Typ bevorzugt, wobei der A-Typ durch höhere Temperaturen begünstigt wird.^[40] Eine mögliche Erklärung für die nanoskopische Kristallitgröße des erhaltenen HA ist durch das Einbringen der CO_3^{2-} -Ionen gegeben. Die Substitution der PO_4^{3-} -Ionen gegen CO_3^{2-} -Ionen (CO_3^{2-}) erfordert formell auch einen Ersatz der Ca^{2+} -Ionen, wie in Gl. 8.1 gezeigt. Das CO_3^{2-} -Ionen ist sowohl kleiner als auch geringer geladen als das PO_4^{3-} -Ion. Daraus resultiert einerseits die Entstehung von Ca^{2+} -Defekten (Leerstellen) und andererseits auch mechanischer Stress. Dies erklärt zugleich die geringe Kristallinität im Vergleich zum reinen HA. Hierin begründet sich auch die bessere biologische Aktivität und Abbaubarkeit des HCA im Vergleich zum HA, was für die Knochenregeneration von großem Vorteil ist.^[174]

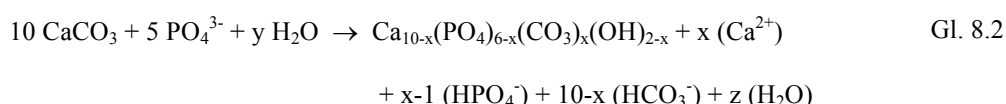


Die in den XRD-Untersuchungen beobachtete verringerte Kristallitgröße des HA mit längerer Inkubationszeit kann einerseits, wie zuvor beschrieben, mit der zunehmenden Substitution der PO_4^{3-} - gegen die CO_3^{2-} -Ionen erklärt werden. Andererseits nimmt die Kristallinität über den Inkubationszeitraum in Form eines Alterungsprozesses zu und kann wie folgt erläutert werden. Die Dichte einer kristallinen Probe ist höher als die einer Probe mit geringer Kristallinität. Während der fortschreitenden Inkubation gibt es kein zusätzliches Kristallwachstum mehr, nur die Kristallinität der Kristallite nimmt zu. Ist die Kristallitgröße limitiert, führt die Reorganisation der Kristallite zu einer kompakteren Form und damit zu einer zunehmenden Dichte. Als Folge nimmt die Kristallitgröße ab.

In diesem Abschnitt wurde anhand von XRD-Untersuchungen, sowie spektroskopischen und mikroskopischen Methoden nachgewiesen, dass Vaterit als metastabiles Calciumcarbonat-Polymorph die nötige Aktivität für eine Umwandlung in eine HA-Spezies besitzt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein HCA, mit großer Ähnlichkeit zum biologischen HA, gebildet wird. Die Inkubationen der Vaterit-Nanopartikel (1 mg/mL) in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF) zeigten allerdings in Langzeitexperimenten, dass die Phosphat-Ionenquelle schon nach 72 Stunden aufgebraucht war und keine weiteren PO_4^{3-} -Ionen für eine Reaktion mit den Vaterit-Nanopartikeln zur Verfügung standen. Folglich trat, gemäß der Ostwald'schen Stufenregel, eine Phasenumwandlung der metastabilen Vaterit-Phase in die thermodynamisch stabilere Calcit-Phase ein. Eventuell könnte die geringe Verunreinigung der eingesetzten Vaterit-Nanopartikel durch die Calcit Phase auch als Kristallisationskeime für die Bildung weiterer Calcit-Kristalle fungiert haben.

8.3.2 Betrachtung der vollständigen Umsetzung von Vaterit in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit durch quantitative Analysemethoden in unterschiedlichen phosphathaltigen Lösungen

In diesem Abschnitt wird die vollständige Umsetzung von Vaterit-Partikeln in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit (HA) betrachtet. Hierzu erfolgte eine Anpassung des Verhältnisses von Carbonat- (CO_3^{2-}) zu Phosphat- (PO_4^{3-}) Ionen ausgehend von der Zusammensetzung der Edukte. Es wurden die Vaterit-Partikel aus Kapitel 7 eingesetzt und zunächst überprüft, ob die aggregierte Form der Vaterit-Nanopartikel die gleiche Reaktivität aufweist, wie die zuvor getesteten Vaterit-Nanopartikel. Zur Aufklärung und besseren Beurteilung der in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF: *simulated body fluid*) stattfindenden Umsetzungsvorgänge der Vaterit-Partikel in eine HA-Spezies, wurde eine weitere phosphatgepufferte Salzlösung (PBS: *phosphate buffered saline*) herangezogen und vergleichbar getestet. Im Unterschied zur PBS-Lösung sind in der SBF-Lösung mehr Fremdionen (Mg^{2+} , Ca^{2+} , HCO_3^- und SO_4^{2-}) enthalten (s. Tab. 8.4). Diese Fremdionen können einen erheblichen Einfluss auf die Umsetzungsprozesse, die entstehende HA-Spezies und die resultierende Morphologie ausüben. Anhand von quantitativen Phasenanalysen der XRD-Daten, sowie quantitativer ^{31}P -NMR- und FT-IR -Spektroskopie wurde die Phasenumsetzung von Vaterit in die HA Spezies in SBF und PBS untersucht und verglichen. Für die Inkubationen in SBF und PBS wurde das von der Zusammensetzung ausgehende molare CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnis mit 2 zu 1 gewählt, um eine theoretisch vollständige Umsetzung von Vaterit in einen Carbonat-haltigen HA zu ermöglichen. Eine vereinfachte Reaktionsgleichung ist in Gl. 8.2 dargestellt. Anhand des Inkubationssystems in PBS wurden Konzentrationseffekte auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies näher untersucht.



Tab. 8.4: Vergleich der Ionenkonzentrationen in mmol/L in SBF und PBS. Die Stoffmenge der PO_4^{3-} -Ionen resultiert aus den Stoffmengen der HPO_4^{2-} - und H_2PO_4^- -Ionen. Im SBF dient das Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) als Phosphatquelle. Im PBS fungieren Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) als Phosphatquellen.^[164,176]

	[Na ⁺] mM	[K ⁺] mM	[Mg ²⁺] mM	[Ca ²⁺] mM	[Cl ⁻] mM	[HCO ₃ ⁻] mM	[PO ₄ ³⁻] mM	[SO ₄ ²⁻] mM	pH bei 37 °C
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,4
PBS	141,0	4,2	--	--	136,9	--	9,6	--	7,4

Inkubationen in SBF und PBS mit einem CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnis von 2 : 1

Um ein CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnis von 2:1 zu erhalten, wurden Vaterit-Partikel in einer Konzentration von 0,2 mg/mL in SBF und 2 mg/mL in PBS bei 37 °C und leichtem Schütteln (150 U/min.) über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten inkubiert. Die Morphologie der nach der Inkubation erhaltenen Partikel wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Die Ergebnisse der Kurzzeit-Inkubationen (24, 48 und 72 Stunden) sind in Abb. 8.6 und die der Langzeit-Inkubationen (1, 3 und 6 Monate) sind in Abb. 8.7 zusammengestellt.

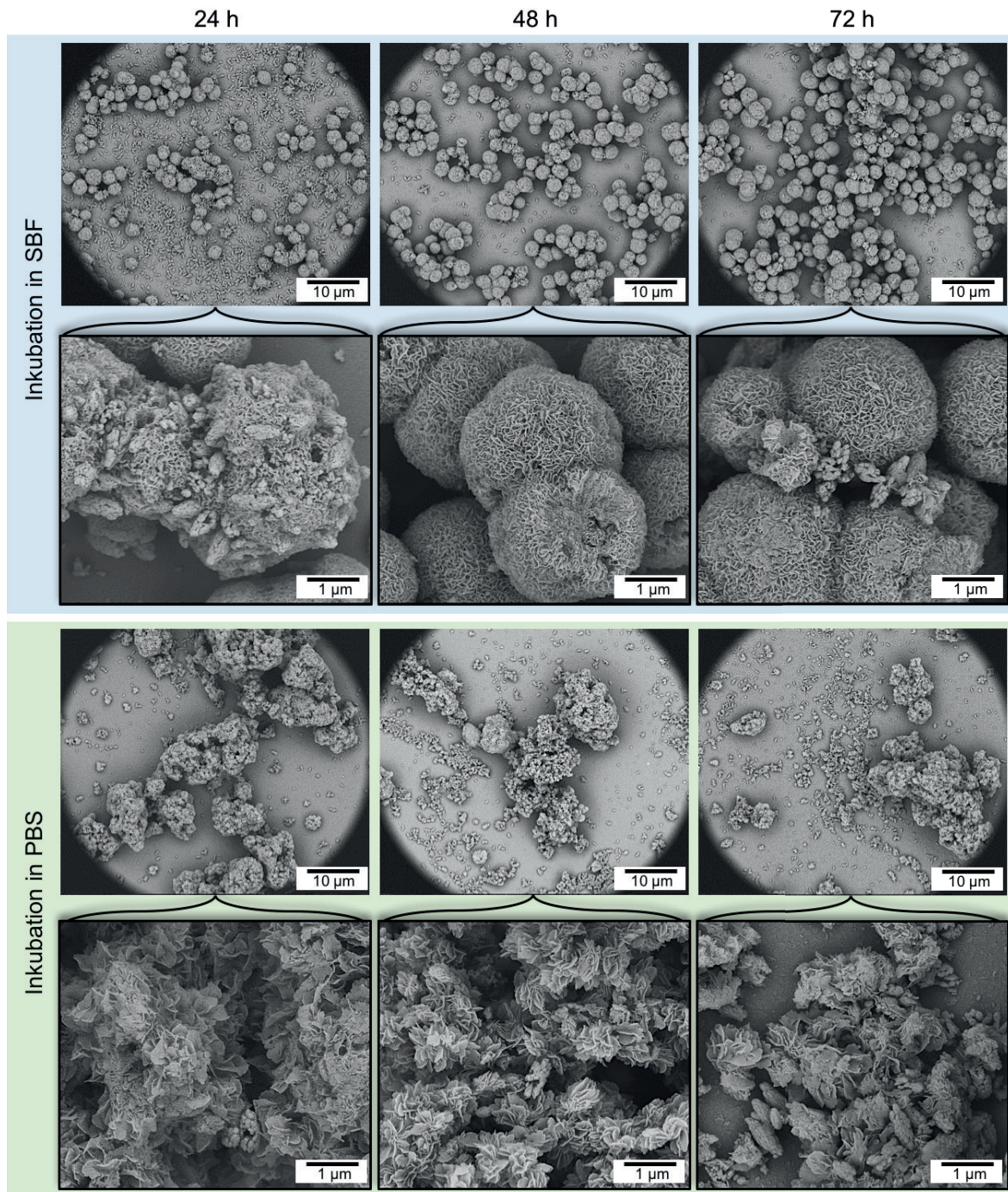


Abb. 8.6: REM-Aufnahmen der Vaterit-Partikel nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation in SBF (blau) und PBS (grün) mit jeweils einer Übersichtsaufnahme und einer Aufnahme mit 50.000-facher Vergrößerung.

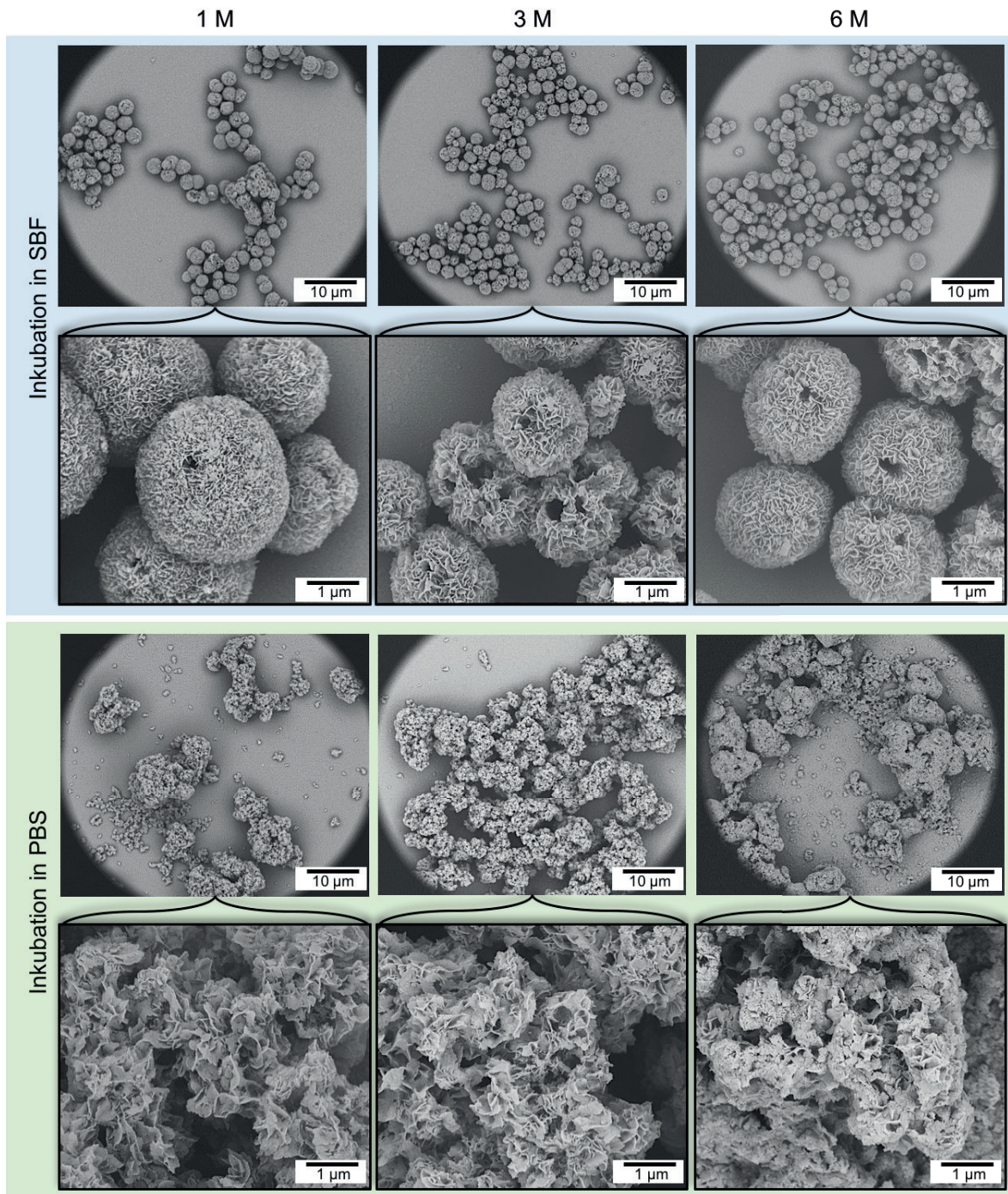


Abb. 8.7: REM-Aufnahmen der Vaterit-Partikel nach 1, 3 und 6 Monaten (M) Inkubation in SBF (blau) und PBS (grün) mit jeweils einer Übersichtsaufnahme und einer Aufnahme mit 50.000-facher Vergrößerung.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden der Vaterit-Partikel in SBF als auch in PBS ließen sich deutliche morphologische Unterschiede beobachten. Neben den ellipsoiden Vaterit-Partikeln sind plättchenförmige Strukturen entstanden, wie sie im vorherigen Abschnitt 8.3.1 beobachtet wurden. Bei den plättchenförmigen Strukturen, die während der Inkubation in SBF gebildet wurden, lässt sich wieder eine Zusammenlagerung zu größeren, sphärischen oder „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen von 2-3 μm Durchmesser beobachten. Diese „Selbstanordnung“ der entstehenden Plättchen ist bei der Inkubation in PBS nicht gegeben. Hier

liegen die Plättchen unstrukturiert und in stark agglomerierter Form vor. Bei der Betrachtung der Langzeit-Inkubationen von 1 bis 6 Monaten konnten weder bei der Inkubation in SBF noch in PBS ellipsoide Vaterit-Partikel beobachtet werden. Ausschließlich die plättchenförmigen Strukturen wurden vorgefunden und blieben in ihrer Morphologie unverändert. Lediglich nach 6 Monaten Inkubation in PBS scheint es als würde eine stärkere Agglomeration bis hin zur Aggregation erfolgen. Hingegen blieben die sphärischen Strukturen, die sich aus den Plättchen zusammensetzen, während der Langzeit-Inkubation in ihrer Morphologie unverändert. Eine Elementanalyse, durch energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) mit Hilfe des REM zeigte, dass die gebildeten plättchenförmigen Strukturen überwiegend aus Calcium (Ca) und Phosphor (P) bestehen (s. Abb. 8.8). Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O) konnten ebenfalls nachgewiesen werden, wurden allerdings bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt, da ihre Werte durch die Probenpräparation und Messbedingungen fehlerbehaftet sein können.

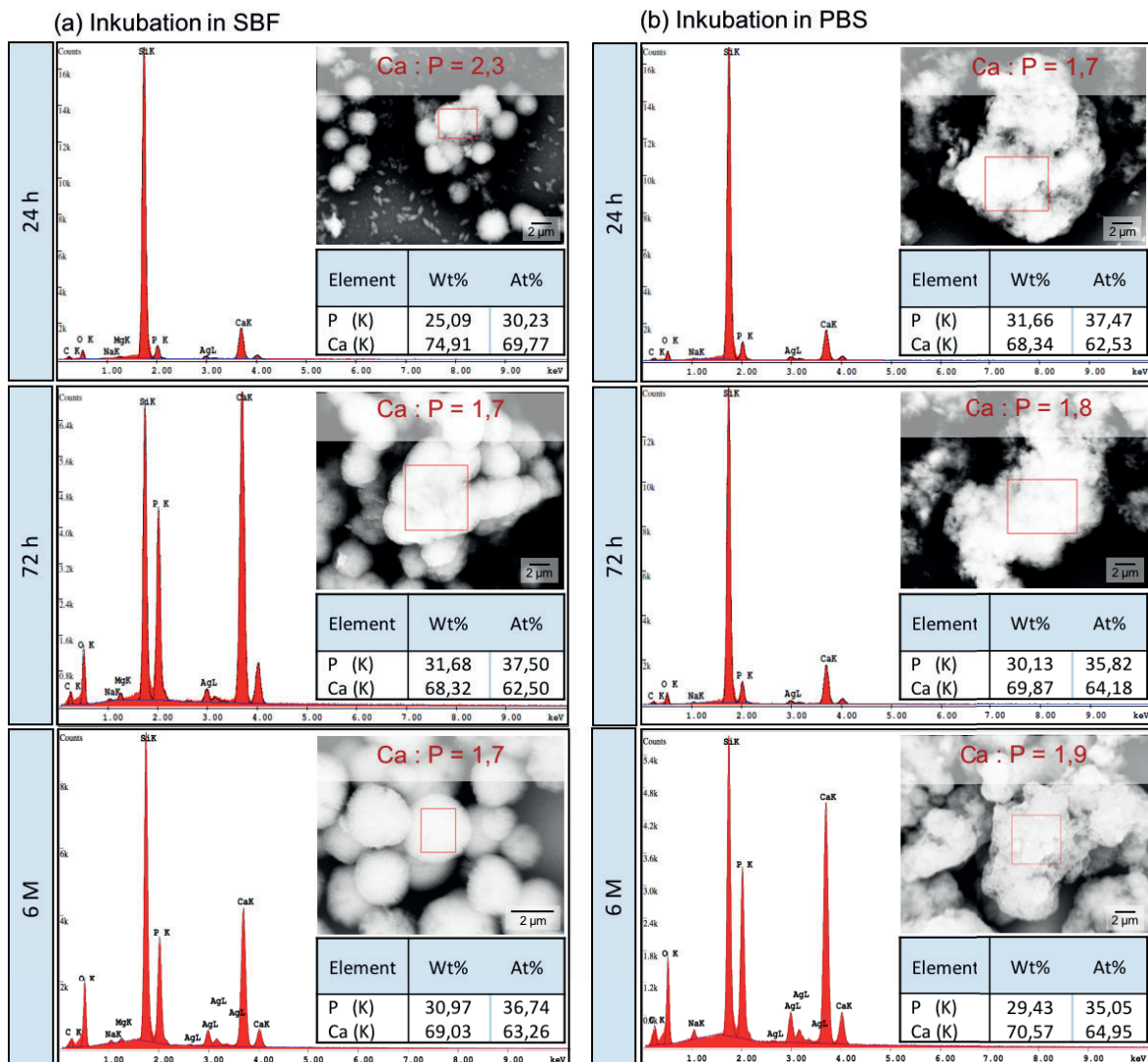


Abb. 8.8: Ergebnisse der REM-EDX-Messung der für 24 h, 72 h und 6 Monaten (M) inkubierten Vaterit-Partikel in (a) SBF und (b) PBS.

Die Detektion von Silicium (Si) und Silber (Ag) rührt aus der Probenpräparation (s. Abschnitt 11.1). Zusätzlich konnten während der Inkubation in SBF noch Spuren von Natrium (Na) und Magnesium (Mg) nachgewiesen werden. Auch während der Inkubation in PBS ließen sich Spuren von Natrium (Na) beobachten. Anhand der Quantifizierung von Ca und P wurde das Ca : P Verhältnis ermittelt. Hierbei zeigte sich nach 24 Stunden Inkubation in SBF noch ein erhöhtes Ca : P Verhältnis von 2,3, das auf die Anwesenheit von Vaterit-Partikel zurückzuführen ist (s. Abb. 8.6a). Über den weiteren Inkubationszeitraum der Vaterit-Partikel in SBF stellte sich ein Ca : P Verhältnis von 1,7 ein. Im Vergleich dazu konnte dieses Verhältnis bei der Inkubation der Vaterit-Partikel in PBS bereits nach 24 Stunden ermittelt werden, das allerdings im Laufe der Inkubationszeit eine leichte Zunahme bis auf 1,9 zeigte.

Mit Hilfe der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD) wurden die vorliegenden Phasen während den einzelnen Inkubationszeiträumen inspiziert (s. Abb. 8.9). Für die Inkubationen wurden phasenreine Vaterit-Partikel eingesetzt (s. Abb. 7.1). Den Diffraktogrammen der Inkubationen in SBF und PBS ist zu entnehmen, dass mit zunehmender Inkubationszeit die der Vaterit-Phase zugeordneten Reflexe in ihrer Intensität abnahmen und letztendlich nicht mehr nachweisbar waren. Gleichzeitig konnte eine Zunahme zweier Reflexe bei $2\theta \sim 26^\circ$ und $2\theta \sim 32^\circ$ beobachtet werden, die dem HA zuzuordnen sind.^[167–169]

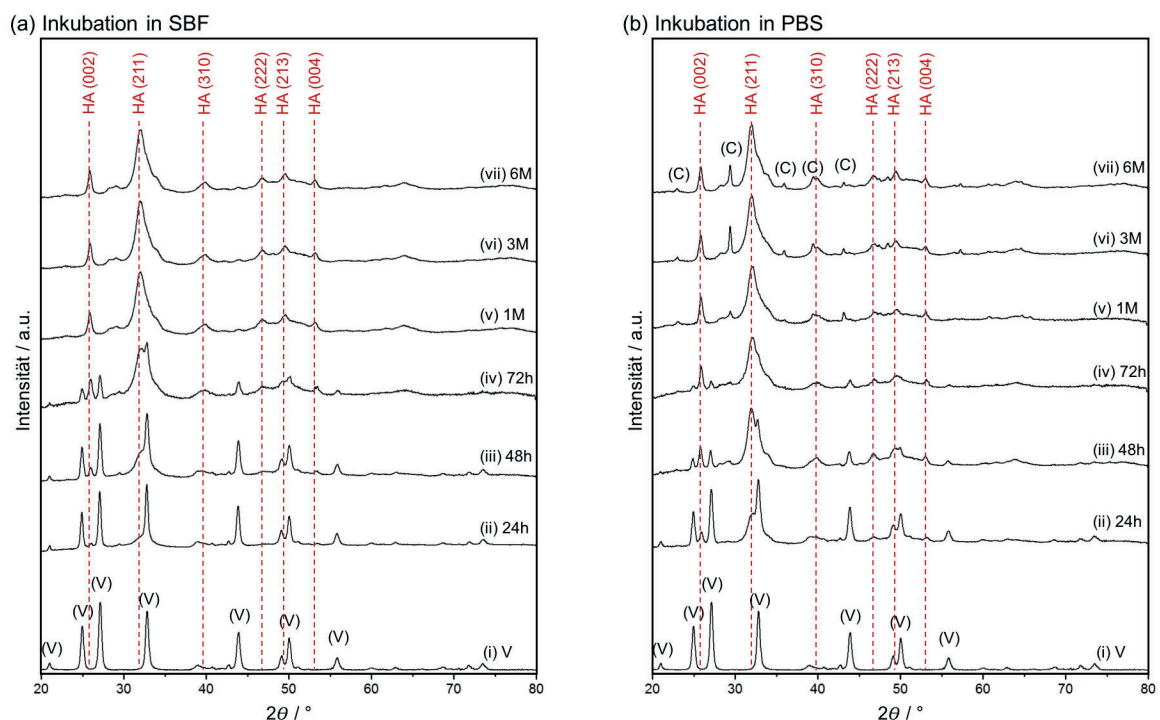


Abb. 8.9: Pulverdiffraktogramme der Inkubationen von (i) Vaterit-Partikel in (a) SBF und (b) PBS über einen kurzen Zeitraum von (ii) 24 h, (iii) 48 h und (iv) 72 h und einen langen Zeitraum von (v) 1 M, (vi) 3 M und (vii) 6 M bei 37°C und leichtem Schütteln. Mit M = Monaten. Mit Kennzeichnung der Reflexe von Vaterit (V)^[33], von Hydroxylapatit (HA)^[170] und Calcit (C)^[30].

Beim Vergleich der Diffraktogramme der Inkubationen in SBF und PBS ist festzustellen, dass die beiden HA-zugeordneten Reflexe während der Kurzzeit-Inkubation in PBS (24 h – 72 h) deutlich

schneller in ihrer Intensität zunehmen als während der Kurzzeit-Inkubation in SBF. In ähnlichem Maß konnte die Abnahme der Intensitäten der Reflexe des Vaterits beobachtet werden. Hingegen ließen sich bei den Langzeit-Inkubationen (1-6 Monate) in PBS weitere Reflexe bei $2\theta \sim 23^\circ$, 29° , 36° , 39° und 43° erkennen, die in ihrer Intensität zunahmten und der Calcit-Phase zugeordnet wurden.^[29,30] Zusätzlich konnte während der Kurzzeit-Inkubationen ein erhöhter Untergrund, in Form von breiten Streumaxima im Bereich von $2\theta \sim 32^\circ$ und $2\theta \sim 50^\circ$, beobachtet werden. Dies deutete auf die Anwesenheit einer röntgenamorphen Substanz hin.

Zum besseren Vergleich wurden ein kommerziell erworbener HA und ein humanes Knochenmineral, erhalten durch Auskochen eines Knochenstückes, mit Hilfe der XRD-Untersuchung charakterisiert. Die erhaltenen Diffraktogramme sind in Abb. 8.10 dargestellt. Für den kommerziell erworbenen HA konnte das Reflexprofil aus Abb. 8.10a nachgewiesen und die Reflexpositionen den Miller'schen Indizes (002), (210), (211), (300), (202), (310), (222), (213) und (004) zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu wurde im Knochenmineral ein deutlich verbreitertes Reflexprofil des HA beobachtet, vor allem die (211), (300) und (202) Reflexe sind nicht mehr getrennt aufgelöst (s. Abb. 8.10b). Dieses verbreiterte Reflexprofil mit den nicht aufgelösten (211), (300) und (202) Reflexen konnte auch bei den Langzeit-Inkubationen der Vaterit-Partikel beobachtet werden.

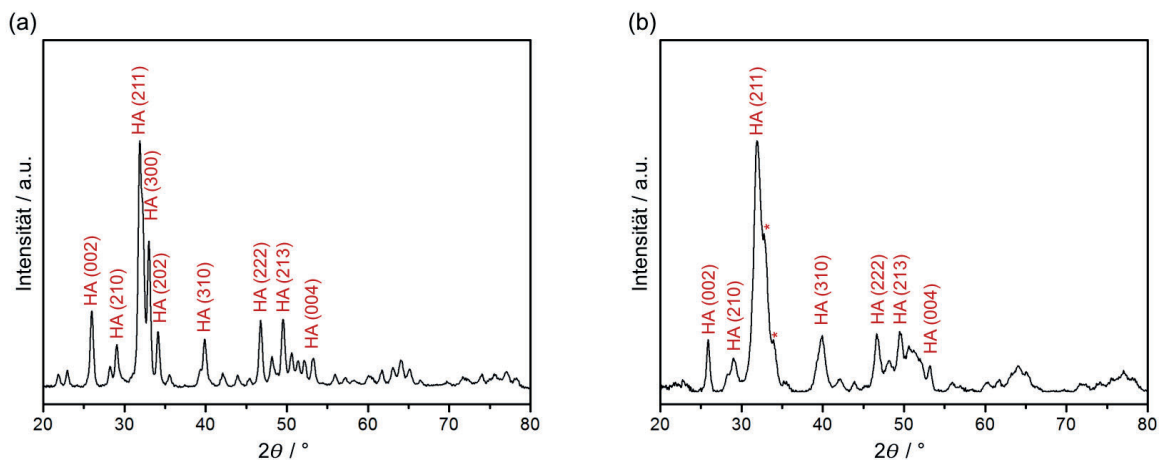
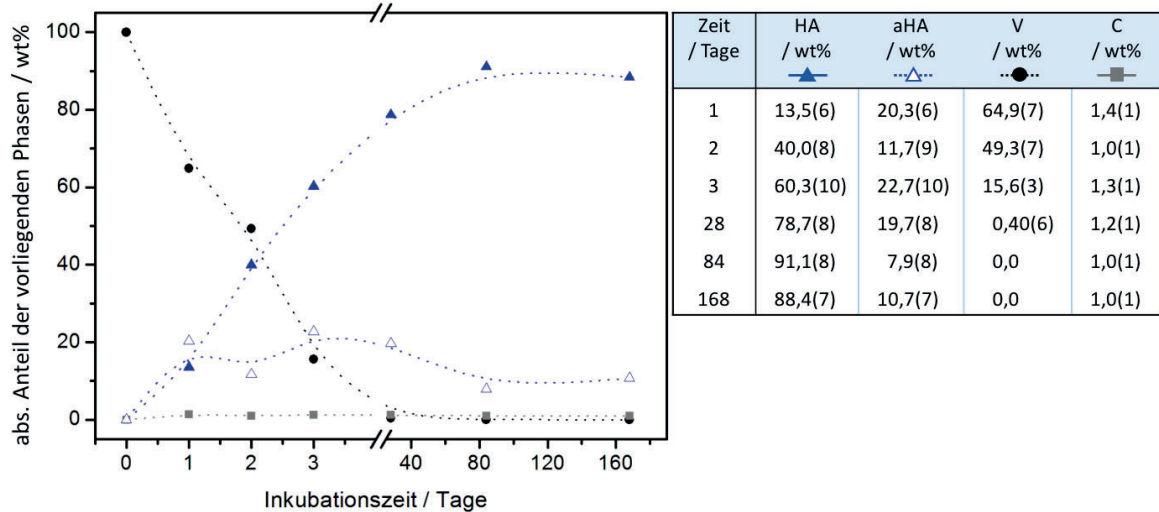


Abb. 8.10: Pulverdiffraktogramme (a) eines kommerziell erworbenen HA (Sigma Aldrich, $\geq 97\%$) und (b) eines humanen Knochenminerals. Mit Angabe der Miller'schen Indizes für Hydroxylapatit (HA)^[170]. Mit * sind die Reflexe (300) und (202) im Knochenmineral angedeutet.

Eine Quantifizierung der vorliegenden Phasen nach den Inkubationen in SBF und PBS erfolgte durch eine Vollprofilanpassung der XRD-Daten aus Abb. 8.9. Die Ergebnisse sind in Abb. 8.11 zusammengestellt. Zur besseren Veranschaulichung wurden die einzelnen, quantifizierten Phasen in Abhängigkeit der Inkubationszeit dargestellt. Aus den Betrachtung der Resultate der Inkubation in SBF (s. Abb. 8.11a) geht hervor, dass die Vaterit-Phase während der Kurzzeit-Inkubation bis zu 72 Stunden linear abnimmt und über die Langzeitinkubation vollständig verschwindet. Begleitend ist in den ersten 72 Stunden ein linearer Anstieg der kristallinen HA-Phase zu beobachten, der in der

Langzeit-Inkubation in ein Plateau bei ~ 90 wt% übergeht. Der erhöhte Untergrund wurde durch eine amorphen HA-Phase (aHA) modelliert und quantifiziert, die bereits nach 24 Stunden und nochmals nach 72 Stunden ihren höchsten Anteil während der Inkubationszeit aufweist. Über die Langzeit-Inkubation nimmt der Anteil der aHA-Phase ab und pendelt sich bei ~ 10 wt% ein. Zusätzlich wurde noch ein geringer Anteil an Calcit bestimmt, der über den gesamten Inkubationszeitraum nahezu unverändert bei ~ 1 wt% blieb.

(a) Inkubation in SBF



(b) Inkubation in PBS

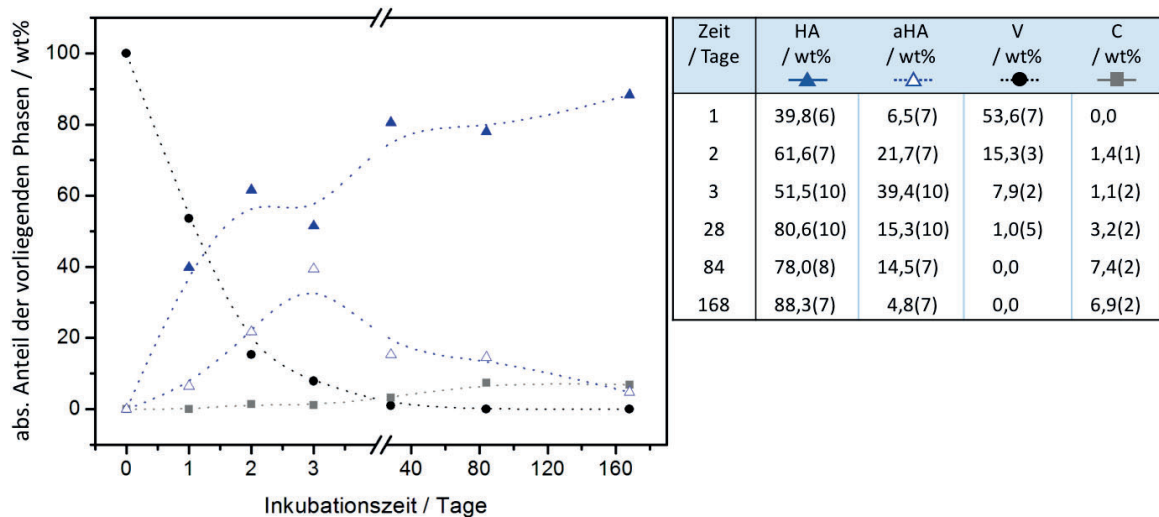


Abb. 8.11: Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse der XRD-Daten der Inkubationen von Vaterit-Partikel nach 1–168 Tagen in (a) SBF und (b) in PBS mit graphischer Darstellung der vorliegenden Phasen in Abhängigkeit der Inkubationszeit, mit den Phasen: Hydroxylapatit (HA)^[170], amorpher Hydroxylapatit (aHA), Vaterit (V)^[33] und Calcit (C)^[30].

Im Vergleich zur Inkubation in SBF zeigt die quantitative Phasenanalyse der Inkubation in PBS abweichende Ergebnisse (s. Abb. 8.11b). Hierbei lässt sich eine deutlich schnellere Abnahme der Vaterit-Phase in der Kurzzeit-Inkubation feststellen, wobei bereits nach 48 Stunden nur noch ~ 15 wt% vorliegen. Während der Langzeit-Inkubation ist bereits nach 1 Monat die Vaterit-Phase

nahezu nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig kommt es innerhalb der ersten 48 Stunden zu einem rapiden Anstieg der kristallinen HA-Phase mit ~ 62 wt%. Ein weiterer deutlicher Unterschied zur Inkubation in SBF lässt sich bei der Betrachtung der aHA-Phase feststellen. Im Gegensatz zur Inkubation in SBF nimmt die aHA-Phase erst im Verlauf der Inkubation in PBS zu und zeigt nach 72 Stunden mit ~ 39 wt% ein Maximum. Bei der Betrachtung der Langzeit-Inkubation lässt sich eine stetige Abnahme der aHA-Phase mit gleichzeitig kontinuierlicher Zunahme der kristallinen HA-Phase beobachten, wobei sich bei beiden Phasen kein Plateau einstellt, wie es bei der SBF-Inkubation festgestellt wurde.

Zur weiteren Charakterisierung der Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine HA-Spezies wurde die Infrarot (IR)-Spektroskopie herangezogen. Die Spektren der Inkubationen in SBF und PBS sind in Abb. 8.12 aufgeführt. Als interner Standard wurde den Proben Kupfer-(I)-cyanid (CuCN) zugemischt und eine Normierung der Spektren auf die Cyanid-Bande bei 2162 cm^{-1} durchgeführt (s. Abschnitt 8.2.2).

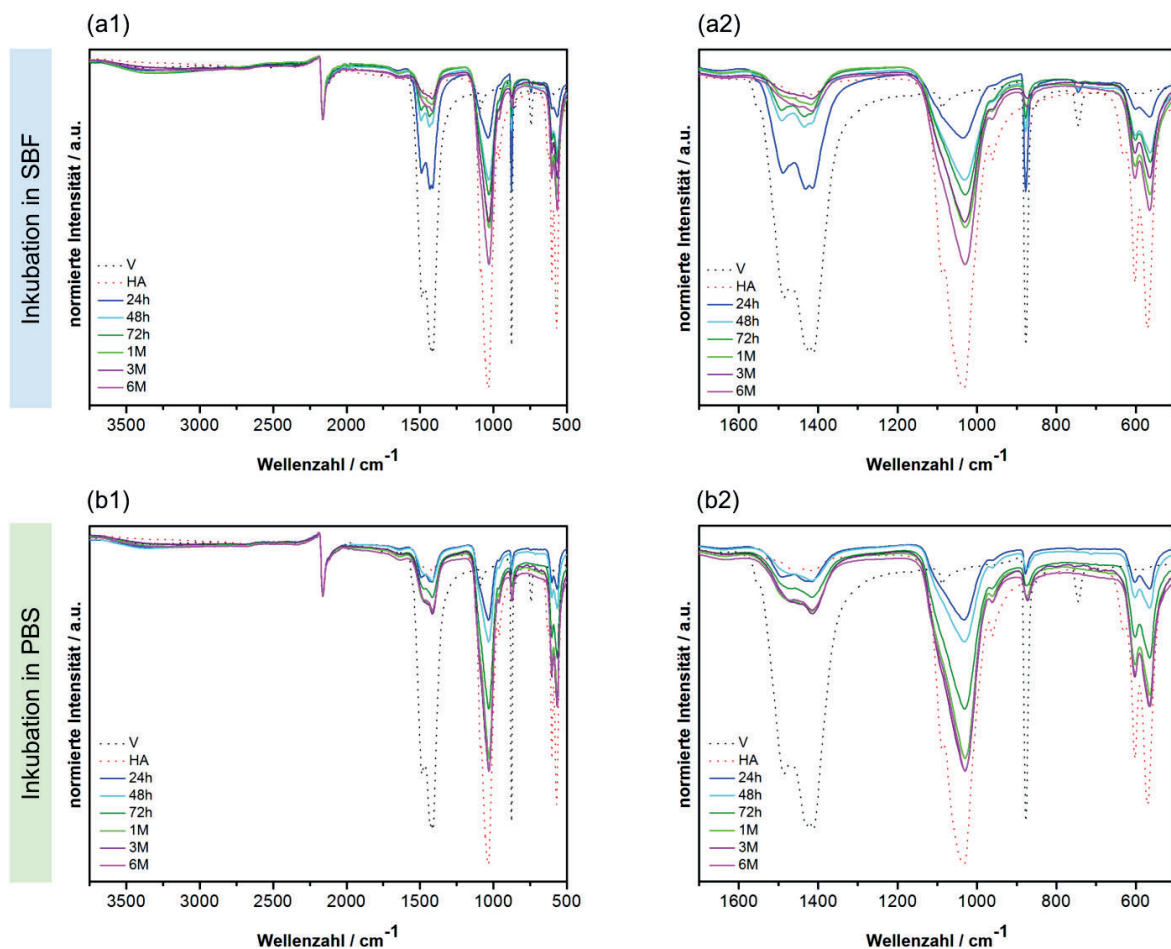


Abb. 8.12: IR-Spektren der Inkubationen der Vaterit-Partikel in (a1) SBF und (b1) PBS über einen Zeitraum 24 h (blau), 48 h (hellblau), 72 h (dunkelgrün), 1 Monat (hellgrün), 3 Monate (violett) und 6 Monaten (magenta). Mit den Vergleichsspektren von Vaterit (V, schwarz gepunktet) und kommerziell erworbenem Hydroxylapatit (HA, rot gepunktet). (a2) und (b2) zeigen Ausschnitte der SBF- und PBS-Inkubation. CuCN wurde als interner Standard beigemischt und alle Spektren auf die Cyanid-Bande bei 2162 cm^{-1} normiert.

Neben den für Vaterit charakteristischen Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe (s. Kapitel 7, Tab. 7.1) konnten weitere Banden bei $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$, 962 cm^{-1} , 602 cm^{-1} und 565 cm^{-1} nachgewiesen werden, die mit längerer Inkubationszeit in ihrer Intensität zunahmten. Diese Banden entsprechen den Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe und konnten bei dem kommerziell erworbenen HA auch nachgewiesen werden. Die Bande bei 1030 cm^{-1} entspricht der dreifach entarteten asymmetrischen P-O Streckschwingung, die Bande bei 962 cm^{-1} lässt sich der symmetrischen P-O Streckschwingung zuordnen und die beiden Banden bei 602 cm^{-1} und 565 cm^{-1} resultieren aus der dreifach entarteten OPO Deformationsschwingung.^[123,171] Die Bande bei 962 cm^{-1} ist charakteristisch für eine hochkristalline Phosphat-Apatit-Phase.^[173] Bei den Spektren der Inkubationen in SBF und PBS ist diese Bande deutlich breiter ausgeprägt, was auf das Vorliegen von sehr kleinen und ungeordneten Kristalliten hinweist.^[173] Zu Beginn der Inkubationen (nach 24 h) zeigen die Banden bei 1030 cm^{-1} , 602 cm^{-1} und 565 cm^{-1} eine deutliche Verbreiterung. Im Spektrum der 24 Stunden Inkubation in SBF ist die Aufspaltung der asymmetrischen P-O Streckschwingung in die 602 cm^{-1} und die 565 cm^{-1} Bande deutlich weniger ausgeprägt und nimmt erst über den weiteren Inkubationszeitraum zu. Die Verbreiterung der Banden deutet auf die Anwesenheit einer amorphen Phosphat-Spezies hin und untermauert die Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse der XRD-Daten. Eine detaillierte Auflistung der Banden mit Zuordnung der einzelnen Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe ist der Tab. 8.5 zu entnehmen. Die Banden der asymmetrischen P-O Streckschwingung und der dreifach entarteten O-P-O Deformationsschwingung zeigen bei den Inkubationen in SBF und PBS eine leichte Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen, im Vergleich zu denen die im kommerziell erworbenen HA nachgewiesen wurden. Eine ähnliche Verschiebung der Banden wurde auch im Spektrum des untersuchten Knochenminerals beobachtet und ist auf die Anwesenheit von CO_3^{2-} -Ionen im HA-Gitter zurückzuführen (s. Abb. 8.13).

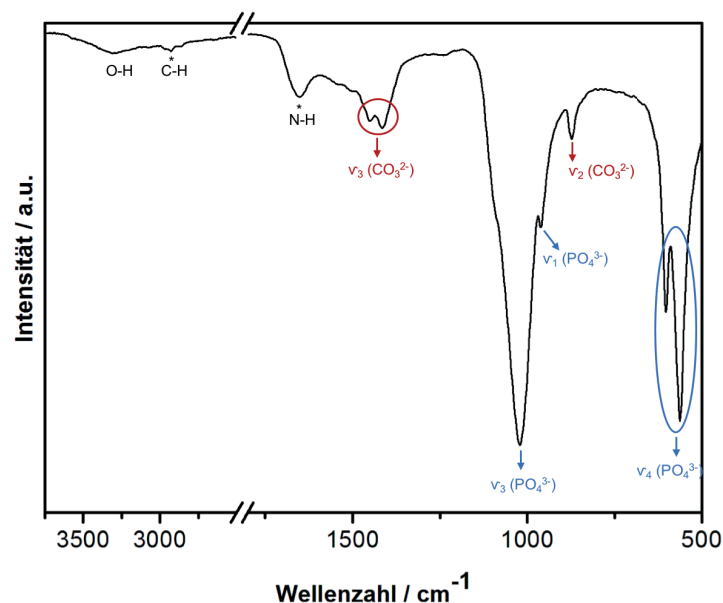


Abb. 8.13: IR-Spektrum eines humanen Knochenminerals, erhalten durch Auskochen eines Knochenstückes. Mit * gekennzeichnete Banden resultieren aus verbliebener organischer Kollagen-Matrix.

Die Lage der Bandenmaxima und die Halbwertsbreiten sind sehr sensibel gegenüber CO_3^{2-} -Substitutionen im HA, wodurch eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen resultiert.^[172] Zusätzlich wurde im Knochenmineral noch eine Bande bei 1651 cm^{-1} und eine sehr schwache Bande bei 2928 cm^{-1} nachgewiesen, die auf Reste der verbliebenen organischen Kollagen-Matrix zurückzuführen sind (s. Abb. 8.13, mit * gekennzeichnete Banden).^[172,177] Weiterhin konnte während des Inkubationszeitraums sowohl in SBF als auch in PBS eine Abnahme der CO_3^{2-} -Banden beobachtet werden. Dennoch ließen sich auch nach 6 Monaten Inkubation in SBF und in PBS noch die asymmetrische C-O Streckschwingung (1487 cm^{-1} - 1411 cm^{-1}) und die O-C-O Kipp-Deformationsschwingung (872 cm^{-1}) der CO_3^{2-} -Gruppe nachweisen. Dieses Ergebnis ist mit den Untersuchungen des Knochenminerals vergleichbar (s. Abb. 8.13). Die charakteristische O-C-O Spreiz-Deformationsschwingung der CO_3^{2-} -Gruppe in Vaterit konnte jedoch nicht mehr beobachtet werden. Dies spricht für eine vollständige Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies unter Einbau von CO_3^{2-} -Ionen in das HA-Gitter.

Tab. 8.5: Auflistung der gemessenen IR-Banden des kommerziell erworbenen Hydroxylapatit (HA), des humanen Knochens und der erhaltenen Feststoffe aus den Inkubationen in SBF und PBS nach 24 h, 48 h und 72 h sowie 1, 3 und 6 Monaten. Mit Zuordnung der einzelnen Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe.

Schwingungsmoden PO_4^{3-}	HA	Knochen	SBF-Inkubation	PBS-Inkubation
ν_1/cm^{-1} symmetrische P-O Streckschwingung	962	962	962 (24 h) 962 (48 h) 962 (72 h) 962 (1 M) 962 (3 M) 962 (6 M)	962 (24 h) 962 (48 h) 962 (72 h) 962 (1 M) 962 (3 M) 962 (6 M)
ν_3/cm^{-1} asymmetrischen P-O Streckschwingung	1034	1022	1035 (24 h) 1032 (48 h) 1030 (72 h) 1030 (1 M) 1030 (3 M) 1030 (6 M)	1034 (24 h) 1032 (48 h) 1032 (72 h) 1030 (1 M) 1030 (3 M) 1030 (6 M)
ν_4/cm^{-1} O-P-O Deformationsschwingung	602, 571	600, 561	600, 563 (24 h) 602, 563 (48 h) 602, 563 (72 h) 602, 563 (1 M) 602, 565 (3 M) 602, 565 (6 M)	602, 565 (24 h) 602, 565 (48 h) 602, 565 (72 h) 602, 563 (1 M) 602, 565 (3 M) 602, 565 (6 M)

In Abb. 8.14a ist das PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Extinktionen der intensiven ν_3 -Banden der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der PO_4^{3-} -Gruppe und der CO_3^{2-} -Gruppe wurden dabei ins Verhältnis gesetzt. Standard-Proben mit einem definierten Massenanteilen an kommerziell erworbenem HA und synthetisierten Vaterit-Partikel erlaubten eine quantitative Aussage über das vorliegende Verhältnis von PO_4^{3-} - zu CO_3^{2-} -Ionen zu treffen (s. Abb. 8.14b). Gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes ist die Absorbanz (Extinktion) eines Materials für Licht einer Wellenlänge λ bei gleicher Schichtdicke proportional zur Stoffmengenkonzentration (s. Formel (8.1)).

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \lg\left(\frac{1}{T_\lambda}\right) \quad (8.1)$$

Mit A_λ : Absorbanz (Extinktion) eines Materials für Licht einer Wellenlänge λ , ε_λ : dekadischer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , c : Stoffmengenkonzentration, d : Schichtdicke des durchstrahlten Materials, I_0 : Intensität des eingestrahlenen Lichtes, I : Intensität des abgeschwächten Lichtes, T_λ : Transmissionsgrad.

Für den kommerziell erworbenen HA ergibt sich mit dieser Methode rechnerisch ein PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis von 12,3. Dies ist darauf zurückzuführen, dass auch reiner HA im verwendeten Transmissionsfenster eine geringe aber nicht verschwindende Absorption aufweist. Der Abb. 8.14a ist sowohl bei der Inkubation in SBF als auch bei der Inkubation in PBS eine Zunahme des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses über die Inkubationszeit zu entnehmen. Dabei lässt sich eine deutlich geringere Zunahme während der Kurzzeit-Inkubation in SBF (24 h - 72 h) im Vergleich zu der Kurzzeit-Inkubation in PBS beobachten. Bei der Betrachtung der Langzeit-Inkubationen (1 – 6 Monate) zeigt sich ein deutlich höheres PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} -Ionenverhältnis der Proben aus der Inkubation in SBF gegenüber den Proben aus der Inkubation in PBS. Im SBF stellt sich ein konstantes Verhältnis von 4,8 ein, was einem Anteil an CO_3^{2-} -Ionen von ~ 5 wt% entspricht. Im PBS wird nach 6 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikel ein Verhältnis von 3,8 erreicht. Dies entspricht einem Anteil an CO_3^{2-} -Ionen zwischen 10-15 wt%. Der höhere Anteil an CO_3^{2-} -Ionen am Ende der Inkubation in PBS korrespondiert mit den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse anhand der XRD-Daten (vgl. Abb. 8.11b). Während der Langzeit-Inkubation in PBS konnte eine Zunahme der CaCO_3 -Phase, Calcit, nachgewiesen werden, die nach 6 Monaten zu ~ 7 wt% vorlag. Weitere Carbonat-Modifikationen konnten mittels XRD-Untersuchung nicht identifiziert werden, wodurch der restliche nachgewiesene Anteil an CO_3^{2-} -Ionen im HA-Gitter eingebaut sein sollte. Während bei der Inkubation in SBF mittels quantitativer Phasenanalyse der XRD-Daten nach 6 Monaten nur einen 1 wt%-igen Anteil an Calcit festgestellt wurde, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass der restliche Anteil an CO_3^{2-} -Ionen im HA-Gitter eingebaut wurde. Im humanen Knochen wurde anhand des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses von 4,5 ein Anteil an CO_3^{2-} -Ionen von 5-10 wt% quantifiziert.

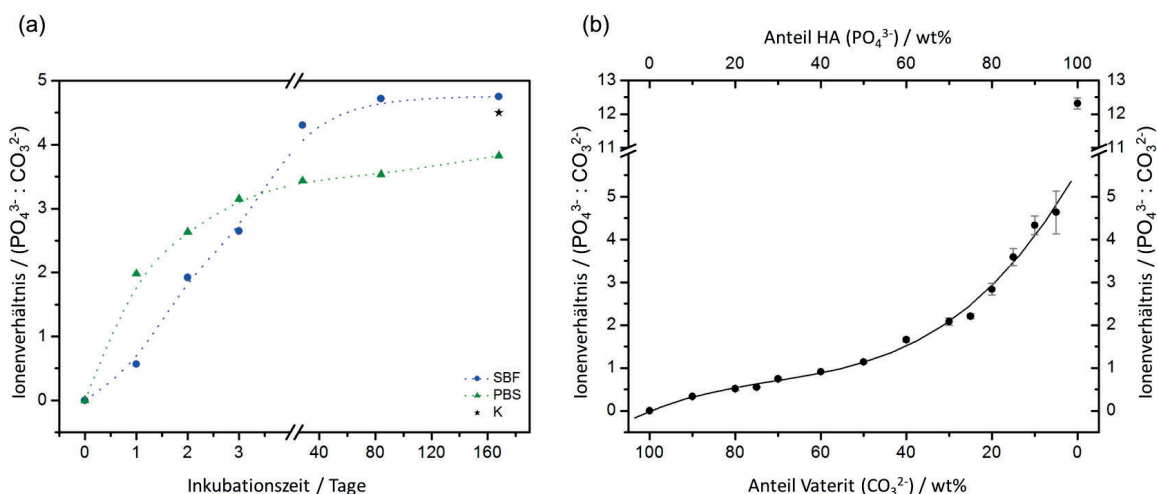


Abb. 8.14: Grafische Auftragung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses gegen die Inkubationszeit. Bestimmung des Verhältnisses anhand der Extinktionen der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen (a) der Proben aus den Inkubationen in SBF und PBS und (b) der Standard-Proben mit definierten Massenanteilen an kommerziell erworbenem HA und synthetisiertem Vaterit. Mit * gekennzeichnet gibt das Verhältnis im humanen Knochen (K) an.

Eine weitere Charakterisierung der während der Inkubationen entstehenden HA-Spezies erfolgte mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie. Die Spektren der Inkubationen in SBF und PBS sind in Abb. 8.15 zusammengestellt. Als Referenz wurde der kommerziell erworbene HA und der humane Knochen vermessen. Dem Spektrum des kommerziell erworbenen HA ist ein intensives Signal bei einer chemischen Verschiebung von 2,8 ppm mit einer typischen Lorentz Kurvenform zu entnehmen und kann den PO_4^{3-} -Ionen in kristallinem HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) zugeordnet werden.^[178] Das sehr schwache Signal bei etwa 6,5 ppm resultiert vermutlich aus geringfügiger Verunreinigung durch Tricalciumphosphat bei der Herstellung und wird bei der nachfolgenden Quantifizierung nicht berücksichtigt.^[179] Das Signalmaximum der Proben aus den Inkubationen in SBF und PBS, als auch des humanen Knochens, liegt bei $\sim 2,9$ ppm. Im Vergleich zum kristallinen HA zeigen die Signale eine deutlich breitere Form mit einer leichten Schulter im Bereich von ~ 5 ppm (s. Abb. 8.15a2, b2). Diese Beobachtungen deuten auf eine veränderte chemische Umgebung des untersuchten ^{31}P -Kerns hin. Die Spektren aus Abb. 8.15a1 und b1 repräsentieren die relativen Flächen unter den Resonanzsignalen, die sich aus dem Verhältnis der eingesetzten HA-Menge zu den eingesetzten Proben-Mengen ergeben. Dadurch war es möglich den Anteil an Phosphor (P) und damit den Anteil an PO_4^{3-} -Ionen in den Proben der Inkubationen in SBF und PBS zu quantifizieren (s. Anhang A, Abschnitt 11.5).

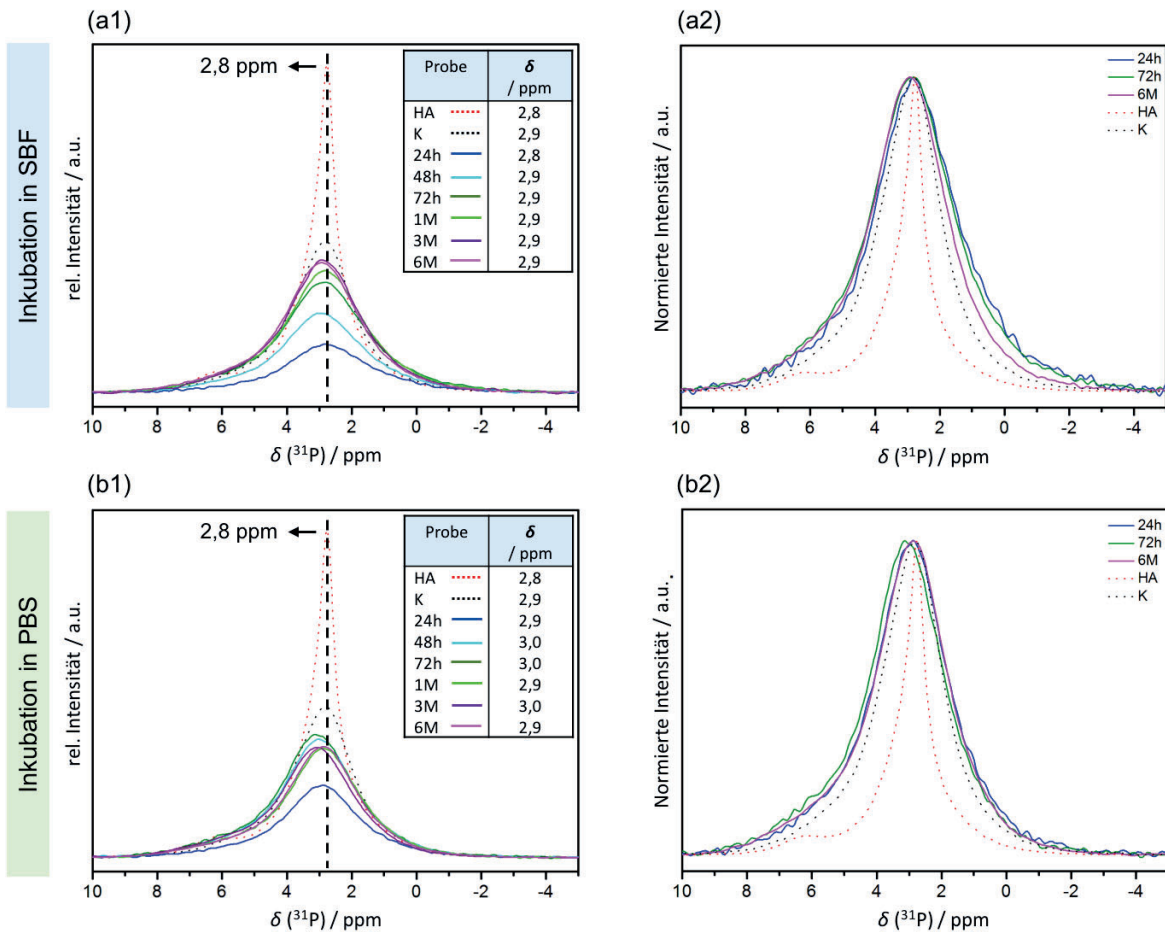


Abb. 8.15: ^{31}P -NMR-Spektren der Inkubationen der Vaterit-Partikel in (a1) SBF und (b1) PBS über einen Zeitraum 24 h (blau), 48 h (hellblau), 72 h (dunkelgrün), 1 Monat (hellgrün), 3 Monate (violett) und 6 Monaten (magenta). Mit den Vergleichsspektren des kommerziell erworbenen Hydroxylapatits (HA, rot gepunktet) und des humanen Knochens (Knochen, schwarz gepunktet). Es sind die relativen Intensitäten unter Berücksichtigung der RG (*receiver gain*) und der eingesetzten Probenmenge angegeben. Die chemische Verschiebung des HA-Signals ist mit 2,8 ppm gekennzeichnet. In (a2) und (b2) wurden die Spektren auf die Intensität des HA-Signals normiert.

Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abb. 8.16a dargestellt, wobei die Fläche unter dem Resonanzsignal vom kommerziell erworbenen HA auf einen 100 mol%-igen Anteil an P gesetzt wurde und damit $3,0$ ^{31}P -Kernen im HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) entspricht. Bei der Inkubation in SBF lässt sich in den ersten 72 Stunden eine annähernd lineare Zunahme des P-Anteils beobachten, die beim Übergang in die Langzeit-Inkubation in einem Plateau von ~ 90 mol% P stagniert und einer Anzahl von $2,7$ ^{31}P -Kernen im HA entspricht. Im Gegensatz dazu lässt sich während der Inkubation in PBS ein deutlich schnellerer Anstieg des P-Anteils beobachten, der nach 72 Stunden seinen maximalen Wert von ~ 84 mol% erreicht. Im Verlauf der Langzeit-PBS-Inkubation fällt der P-Anteil allerdings um ~ 10 mol% ab, was einer Anzahl von $2,2$ ^{31}P -Kernen entspricht. Die Abnahme des P-Anteils resultiert einerseits aus der Zunahme der Calcit-Phase (s. quantitative Phasenanalyse der XRD-Daten), wodurch eine Verunreinigung in der Probe vorlag. Andererseits wird hierbei die Substitution von PO_4^{3-} - gegen CO_3^{2-} -Ionen aus dem HA-Gitter deutlich, die dem B-Typ des HA zuzuordnen ist.^[37,38,40,168] Im humanen Knochen wurde ein P-Anteil von 85,7 mol% und damit eine Anzahl von

2,6 ^{31}P -Kernen nachgewiesen. Diese Resultate zeigen, dass bei den untersuchten Proben als auch im Knochen ein verringerter P-Anteil, verglichen zum reinen HA, vorliegt. Unter Betrachtung der Ergebnisse aus der quantitativen IR-Spektroskopie, lässt sich schlussfolgern, dass der fehlende Anteil an PO_4^{3-} -Ionen durch CO_3^{2-} -Ionen substituiert wurde. Die relativen Anteile an PO_4^{3-} - und CO_3^{2-} -Ionen in den Proben wurden über das Molekulargewicht und die Anzahl der nachgewiesenen ^{31}P -Kerne berechnet (s. Anhang A, Abschnitt 11.5). Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist der Abb. 8.16b zu entnehmen. Dabei wurde ein konstantes Molekulargewicht von 502 g/mol der entstehenden HA-Spezies angenommen. Am Ende der Inkubationszeit resultierte ein $\sim 4\%$ -iger Anteil an CO_3^{2-} -Ionen in der SBF-Probe und ein $\sim 10\%$ -iger Anteil an CO_3^{2-} -Ionen in der PBS-Probe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten der quantitativen IR-Spektroskopie.

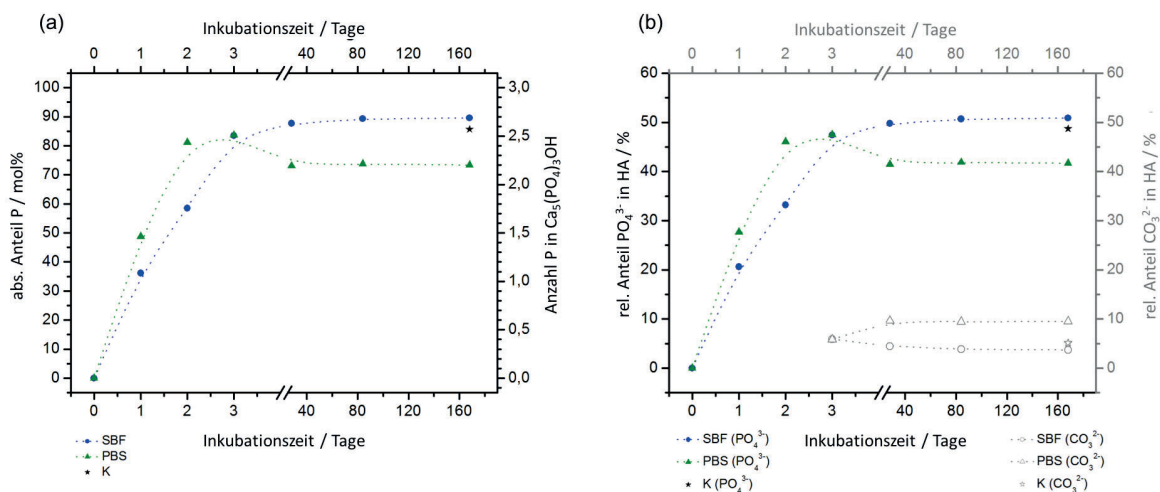
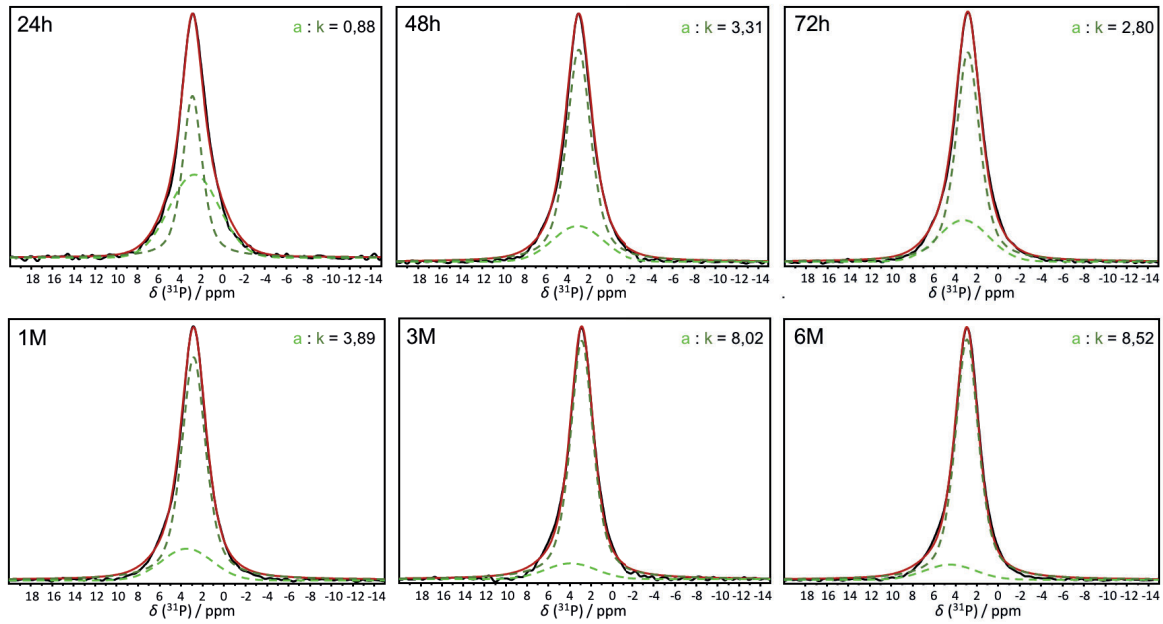


Abb. 8.16: Ergebnisse der quantitativen ^{31}P -NMR-Spektroskopie. (a) Auftragung der absoluten P-Anteile und den entsprechenden ^{31}P -Kernen in Abhängigkeit der Inkubationszeit in SBF (blau) und PBS (grün). Die Fläche unter dem Resonanzsignal des kommerziell erworbenen HA wurde auf einen 100 mol%-igen Anteil an P gesetzt und entspricht damit 3 ^{31}P -Kernen. (b) Auftragung der relativen Anteile an PO_4^{3-} -Ionen in den Proben der Inkubationen in SBF (blau) und PBS (grün), sowie der aus dem Molekulargewicht des HA berechneten relativen Anteile an CO_3^{2-} -Ionen (grau) in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

Die Signalbreite und die leichte Schulter im Bereich von ~ 5 ppm der ^{31}P -NMR-Spektren deuten auf einen amorphen Anteil hin. Das Mengenverhältnis von kristallinem zu amorphem Anteil der Proben wurde durch eine Entfaltung (*deconvolution*) des ^{31}P -Signals bestimmt. Hierbei wurde das Verhältnis der Flächen der kristallinen und amorphen Phase zueinander betrachtet. Abb. 8.17 zeigt die ^{31}P -NMR-Spektren mit Signalanpassungen durch die Entfaltung in einen kristallinen und einen amorphen Anteil. Die Ergebnisse sind in Tab. 8.6 erfasst.

(a) Inkubation in SBF



(b) Inkubation in PBS

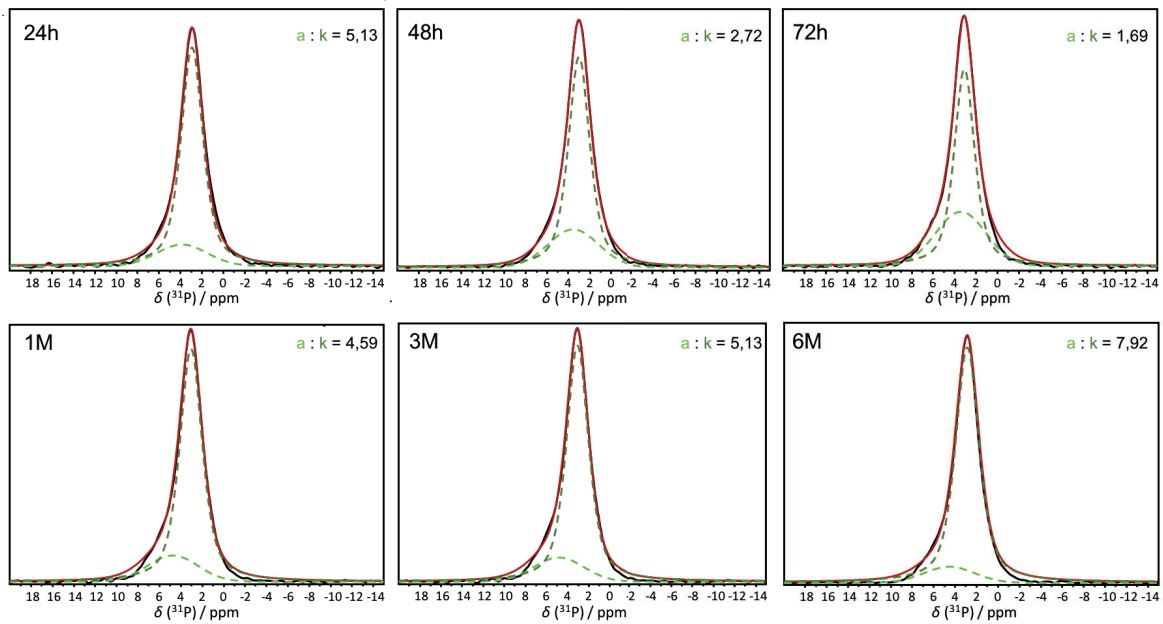


Abb. 8.17: ^{31}P -NMR-Spektren der Signalanpassungen durch die Entfaltung in einen kristallinen und einen amorphen Anteil der Inkubationen in (a) SBF und (b) PBS nach 24 h, 48 h und 72 h sowie nach 1, 3 und 6 Monaten (M). Der amorphe Anteil (a: hellgrüne, gestrichelte Linie) wurde durch eine Gauß-Kurve angepasst und der kristalline Anteil (k: dunkelgrüne, gestrichelte Linie) nach einem Gauß/Lorentz Verhältnis von 0,4. Die volle Halbwertsbreite (FWHM, *full width at half maximum*) des amorphen Signals wurde durchweg konstant bei 900 Hz gehalten. Schwarze Linie zeigt das gemessene Spektrum und die rote Linie die Anpassung.

Aus dem kristallinen zu amorphen Verhältnis wurden die relativen kristallinen und amorphen Anteile berechnet. Es konnte sowohl bei der Inkubation in SBF als auch bei der Inkubation in PBS ein amorpher Anteil festgestellt werden, der über den Inkubationszeitraum abnahm und folglich mit einer zunehmenden Kristallinität der entstehenden HA-Spezies einhergeht. Bei der Signalanpassung wurde die Halbwertsbreite (FWHM, *full width at half maximum*) die Anpassungskurve des amorphen Anteils bei allen Proben konstant bei 500 Hz gehalten, was charakteristisch für eine amorphe

Verbindung ist.^[178,180] Dadurch war es möglich eine Aussage über die FWHM der kristallinen Anpassungskurve zu treffen. Grundsätzlich zeigten die Modellierungen der kristallinen Kurve eine deutlich breitere FWHM mit 350 - 420 Hz im Vergleich zum kommerziell erworbenen HA mit einer FWHM von ~ 134 Hz. Weiterhin lässt sich über den Inkubationszeitraum eine größere FWHM des kristallinen Anteils bei den SBF-Proben beobachten im Vergleich zu PBS-Proben. Auffällig ist auch die chemische Verschiebung des modellierten amorphen Signals zu höheren ppm-Werten mit zunehmender Inkubationszeit, sowohl bei der SBF- als auch bei der PBS-Inkubation.

Tab. 8.6: Übersicht der Ergebnisse der Signalanpassungen durch die Entfaltung in einen kristallinen und einen amorphen Anteil der Inkubationen in (a) SBF und (b) PBS nach 24, 48 und 72 h sowie nach 1, 3 und 6 Monaten (M). Aus dem kristallinen zu amorphen Verhältnis (k:a) wurden die relativen k- und a-Anteile berechnet. Die volle Halbwertsbreite (FWHM, *full width at half maximum*) des amorphen Signals wurde durchweg konstant bei 900 Hz gehalten.

(a) SBF-Inkubation								
Inkubationszeit	k-Integral (abs.)	a-Integral (abs.)	Verhältnis k : a	rel. k-Anteil / %	δ (k) / ppm	k-FWHM / Hz	rel. a-Anteil / %	δ (a) / ppm
24 h	$2,71 \cdot 10^{10}$	$3,07 \cdot 10^{10}$	0,88	46,8	2,8	353,39	53,2	2,6
48 h	$2,61 \cdot 10^{10}$	$7,89 \cdot 10^9$	3,31	76,8	2,9	441,74	23,2	3,0
72 h	$2,68 \cdot 10^{10}$	$9,57 \cdot 10^9$	2,80	73,7	2,8	431,92	26,3	3,3
1 M	$3,14 \cdot 10^{10}$	$8,07 \cdot 10^9$	3,89	79,6	2,8	431,92	20,4	3,4
3 M	$3,02 \cdot 10^{10}$	$3,76 \cdot 10^9$	8,02	88,9	2,9	412,29	11,1	3,9
6 M	$2,59 \cdot 10^{10}$	$3,04 \cdot 10^9$	8,52	89,5	2,9	418,54	10,5	4,5
(b) PBS-Inkubation								
Inkubationszeit	k-Integral (abs.)	a-Integral (abs.)	Verhältnis k : a	rel. k-Anteil / %	δ (k) / ppm	k-FWHM / Hz	rel. a-Anteil / %	δ (a) / ppm
24 h	$3,17 \cdot 10^{10}$	$6,17 \cdot 10^9$	5,13	83,7	2,9	392,66	16,3	3,9
48 h	$3,61 \cdot 10^{10}$	$1,33 \cdot 10^{10}$	2,72	73,1	3,0	382,84	26,9	3,5
72 h	$2,73 \cdot 10^{10}$	$1,62 \cdot 10^{10}$	1,69	62,8	3,0	363,21	37,2	3,4
1 M	$4,67 \cdot 10^{10}$	$1,02 \cdot 10^{10}$	4,59	82,1	3,0	402,47	16,7	4,0
3 M	$4,72 \cdot 10^{10}$	$9,21 \cdot 10^9$	5,13	83,7	3,0	402,47	16,3	4,8
6 M	$5,43 \cdot 10^{10}$	$6,85 \cdot 10^9$	7,92	88,8	2,9	422,11	11,2	4,5

Abschließend ist festzuhalten, dass sowohl mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie als auch durch die quantitative Phasenanalyse anhand der XRD-Daten eine amorphe Phase während der Inkubationen der Vaterit-Partikel in SBF und auch in PBS beobachtet wurde. An dieser Stelle ist anzumerken, dass es noch nicht eindeutig geklärt ist, ob es sich bei der identifizierten amorphen Phase um eine vollständig amorphe Phase handelt oder aber um eine Phase mit geringerer Kristallinität, aufgrund von Substitutionen im HA-Kristallgitter. In Abb. 8.18 ist eine graphische Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Methoden dargestellt. Dabei sind die relativen Anteile der kristallinen und amorphen HA-Phase über den Inkubationszeitraum aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass mit beiden Untersuchungsmethoden ein vergleichbarer Trend bezüglich der entstandenen Phasen nachgewiesen wurde. Beim Vergleich der Resultate aus der Inkubation der Vaterit-Partikel in SBF mit denen in PBS sind vor allem während der Kurzzeit-Inkubationen entscheidende Unterschiede festzustellen. Während zu Beginn der Inkubation in SBF ein simultanes Vorliegen einer kristallinen und amorphen

Phase herrscht, entsteht die amorphe Phase während der Inkubation in PBS erst über den Zeitraum von 24 bis 72 Stunden, mit einem Maximum bei 72 Stunden. Auch bei der Inkubation in SBF ließ sich ein zweites schwächeres Maximum der amorphen Phase nach 72 Stunden beobachten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bildung des Carbonat-haltigen Hydroxylapatits (HCA: *hydroxycarbonate apatite*) aus den Vaterit-Partikeln in SBF und PBS unterschiedlich abläuft. Eine Hypothese der möglichen Umsetzungsmechanismen der Vaterit-Partikel in HCA-Partikel wird in der abschließenden Diskussion dieses Kapitels aufgestellt.

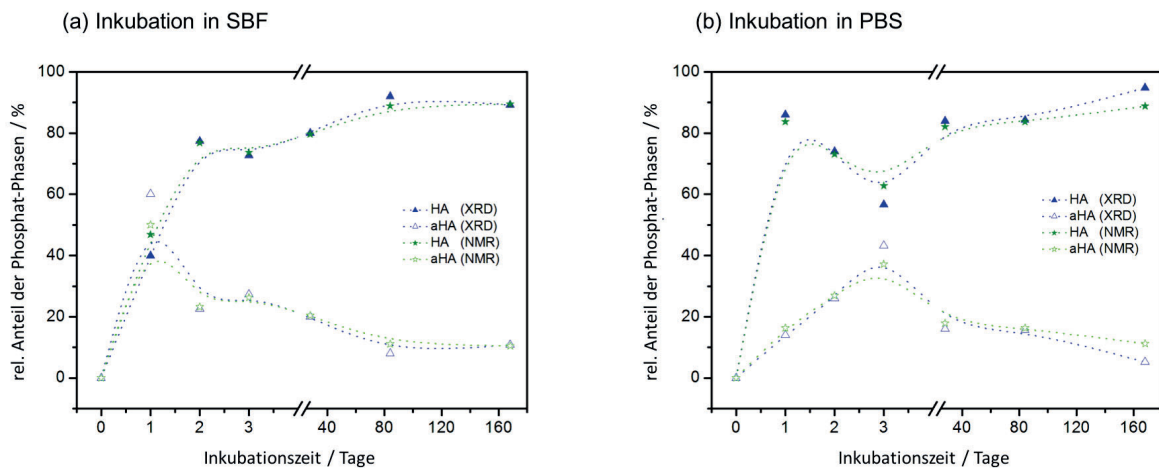


Abb. 8.18: Vergleich der relativen Anteile an kristalliner (HA) und amorpher Phosphat-Phase (aHA) während der Inkubationen in (a) SBF und (b) PBS. Graphische Gegenüberstellung der Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse anhand der XRD-Daten (blau) mit den Resultaten aus der Anpassung der ^{31}P -NMR-Signale durch *deconvolution* (grün).

Bei Betrachtung der Langzeit-Inkubationen geht aus Abb. 8.18 hervor, dass sich nach 3-6 Monaten Inkubation in SBF ein Plateau der kristallinen und amorphen Phase einstellt. Damit resultiert das Vorliegen eines definierten amorphen Anteils von ~ 10 wt% in der gebildeten HCA-Spezies. Im Gegensatz dazu konnte während der Langzeit-PBS-Inkubation kein Plateau der kristallinen und amorphen Phase beobachtet werden. Dies deutet auf eine Zunahme der Kristallinität auf Kosten der amorphen Phase der gebildeten HCA-Partikel hin. Diese Beobachtungen lassen sich anhand der Morphologie-Betrachtungen aus Abb. 8.7 nachvollziehen. Die gebildeten plättchenförmigen HCA-Partikel aus der Inkubation in SBF lagerten sich zu den „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen zusammen und könnten als eine Art „Passivierungsschicht“ die amorphe Phase stabilisieren. Während der PBS-Inkubation wurde eine solche Zusammenlagerung nicht beobachtet (s. Abb. 8.19) und die amorphe Phase wandelt sich gemäß der Ostwald'schen Stufenregel in die kristallinere Modifikation um.

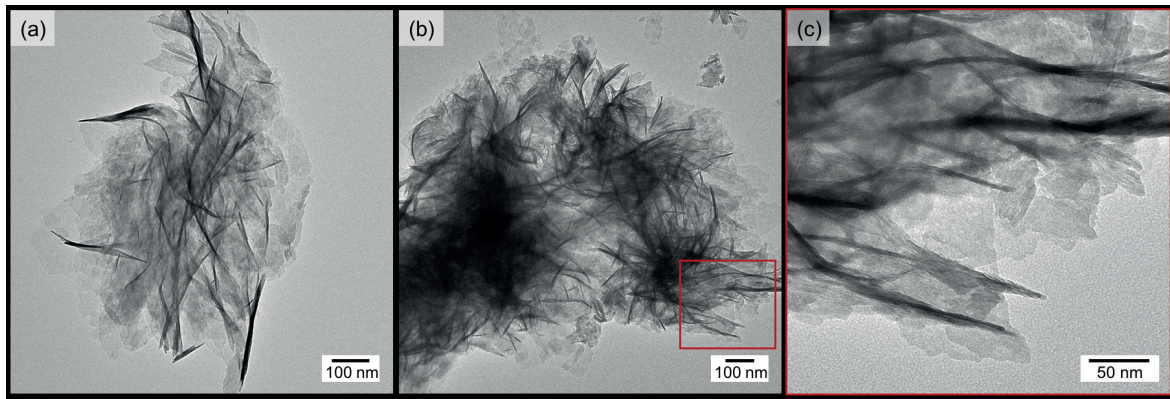


Abb. 8.19: TEM-Aufnahmen der aus Vaterit-Partikeln entstandenen plättchenförmigen HCA-Partikel nach 3 Monaten Inkubation in PBS, zeigen eine unstrukturierte Agglomeration mit teilweise aufgerollten Plättchen. Aufgenommen von [REDACTED] an der JGU Mainz im Arbeitskreis von [REDACTED].

Zur weiteren Untersuchung der in SBF gebildeten „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen wurde mit Hilfe der fokussierten Ionenstrahl- (FIB: *focused ion beam*) Rasterelektronenmikroskopie (REM) eine Lamelle aus der Mitte der sphärischen Strukturen präpariert. Die Vorgehensweise ist in Abb. 8.20 anhand von REM-Aufnahmen dargestellt. Informationen zur detaillierten Vorgehensweise sind im Anhang A, Abschnitt 11.1 zu finden.

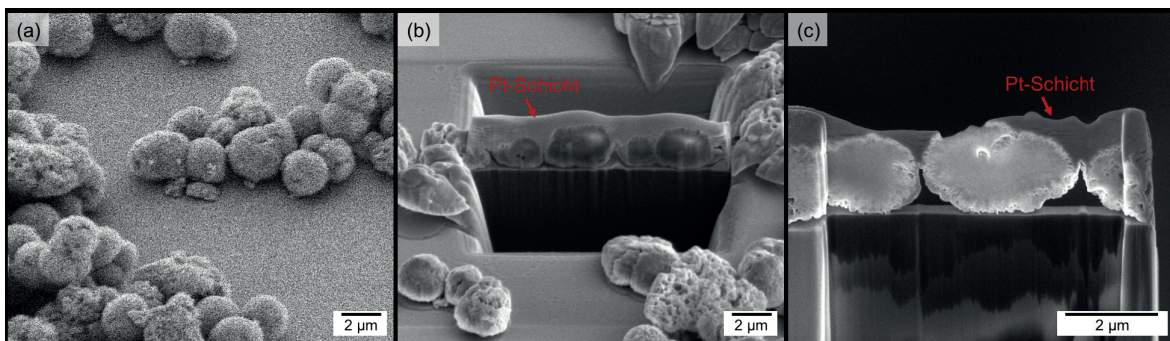


Abb. 8.20: REM-Aufnahmen der Lamellen-Präparation mittels FIB-REM der Probe nach 3 Monaten Inkubation in SBF. (a) Aufnahme vor Präparation. (b) Aufnahme nach Auftragung einer FIB-induzierten Platin (Pt) Schutzschicht und Schneiden zweier Gräben beiderseits der Lamelle. (c) Aufnahme nach Freischneiden, Herausheben und 6-fachen Ausdünnungsschritten bis zu einer Enddicke der Lamelle von ca. 50 nm.

Die präparierte Lamelle wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Die TEM-Aufnahmen sind in Abb. 8.21 zusammengestellt.

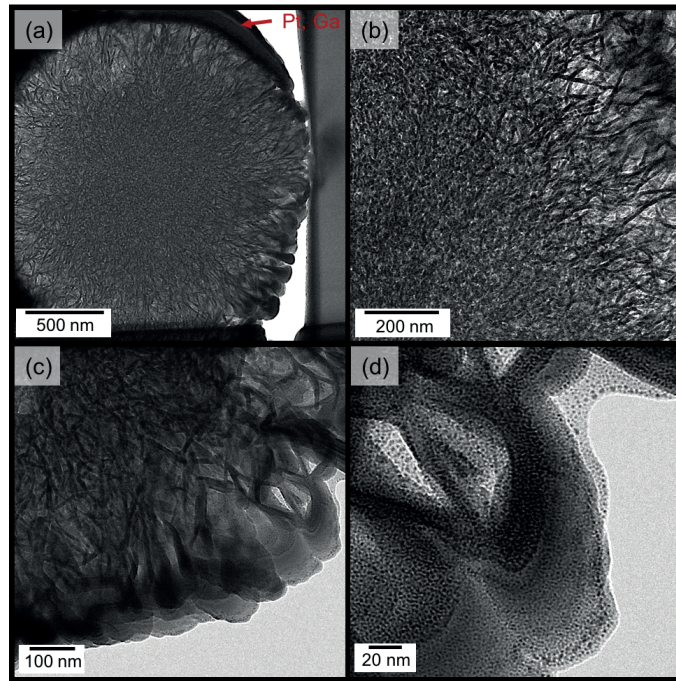


Abb. 8.21: TEM-Hellfeldaufnahmen der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikel in SBF. (a) Übersicht zeigt die innere und äußere Struktur der Kugeln. (b) Vergrößerte Aufnahme mit dem Übergang von der inneren (links unten) zur äußeren Schicht (rechts oben). (c) Vergrößerte Aufnahme der äußeren Schicht. (d) Hochauflösende Aufnahme der äußeren Schicht, zeigt eine plättchenförmige Struktur.

Da es sich um Hellfeldaufnahmen handelt, sind die Elemente hoher Ordnungszahl dunkel dargestellt. Aus der Abb. 8.21a resultiert die dunkle Schicht um die sphärische Struktur aus der Präparation der Lamelle und ist den Elementen Gallium (Ga) und Platin (Pt) zuzuordnen. Den Aufnahmen a und b aus Abb. 8.21 ist zu entnehmen, dass sich die sphärischen Strukturen aus kleineren plättchenförmigen Strukturen zusammensetzen. Zum Inneren der Kugel wird die Anordnung deutlich dichter mit kleineren Strukturen im Vergleich zu der äußeren Schicht (s. Abb. 8.21c und d). Mit Hilfe der Elektronenbeugung wurden unterschiedliche Bereiche im Inneren und Äußeren der gebildeten sphärischen Strukturen untersucht. Ein repräsentatives Beispiel für den äußeren und den inneren Bereich ist in Abb. 8.22 dargestellt. Im äußeren Bereich ließen sich mehrere Beugungsringe, bestehend aus vielen Reflexen beobachten, die durch Bestimmung der Netzebenenabstände (d -Abstände) den Miller'schen Indizes (004), (211), (112), (300), (002), (310), (213) und (222) von HA zugeordnet wurden (s. Abb. 8.22a). Wie auch bei der XRD-Untersuchung (vgl. Abb. 8.9) konnten die (211), (112) und (300) Beugungsreflexe nicht eindeutig getrennt voneinander identifiziert werden. Im Gegensatz zum äußeren Bereich konnten im inneren Bereich nur breite Beugungsmaxima mit hohem Untergrund detektiert werden. Der intensive Beugungsring ließ sich den (211), (112) und (300) Beugungsreflexen zuordnen. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der XRD- und ^{31}P -NMR-Untersuchungen, dass sich die gebildeten „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen aus verschiedenen HCA-Phasen mit unterschiedlicher Kristallinität zusammensetzen. Die Phase im Inneren zeigte dabei eine geringere Kristallinität im Vergleich zur äußeren Phase.

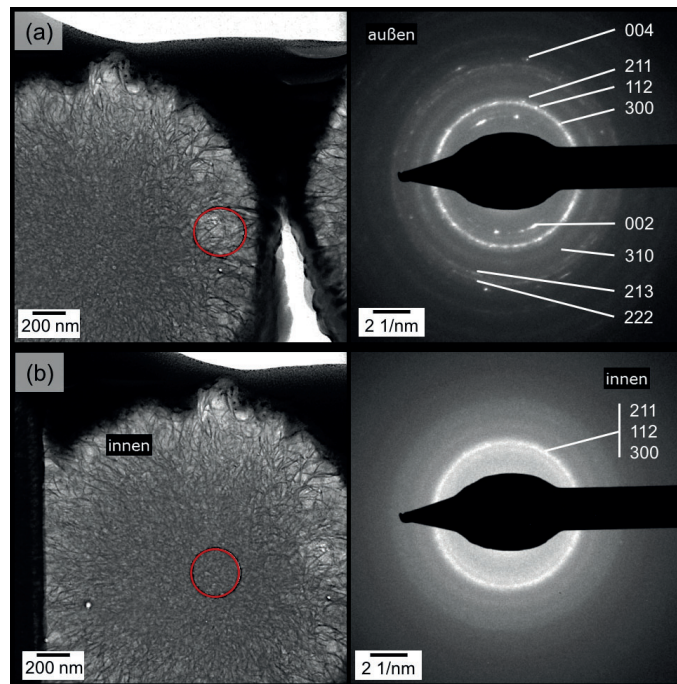


Abb. 8.22: Resultate der Elektronenbeugung an ausgewählten Bereichen (SAED: *selected area electron diffraction*) der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikel in SBF. (a) Am äußeren Bereich und (b) im inneren Bereich. Die jeweilige Untersuchungsfläche ist durch einen roten Kreis in den TEM-Hellfeldaufnahmen markiert. Mit Zuordnung der Miller'schen Indizes des HA, JCPDF 01-084-1998, über den Netzebenenabstand.

Eine Elementanalyse bzw. eine räumliche Verteilung der Elementhäufigkeit erfolgte durch Anwendung der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) und der Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS: *electron energy loss spectroscopy*) am Raster-Transmissionselektronenmikroskop (STEM: *scanning transmission electron microscope*). Die Ergebnisse der STEM-EDX Untersuchung sind in Abb. 8.23 dargestellt. Die räumliche Verteilung der Elementhäufigkeit als auch die Quantifizierung zeigten eine zunehmende Calcium- (Ca) Dichte und eine verringerte Kohlenstoff- (C) Dichte vom inneren Bereich zum äußeren Bereich. Der Nachweis von Phosphor (P) war mit dieser Methode nicht möglich, da sich das Pt-Signal aus der Probenpräparation mit dem P-Signal überlagerte. Die Signale von Kupfer (Cu) und Gallium (Ga) rühren ebenfalls aus der Probenpräparation. Ferner sind die Quantifizierungen von Sauerstoff (O) und Kohlenstoff (C) mit Vorsicht zu betrachten, da sie aufgrund der Messbedingungen fehlerbehaftet sein könnten. Aufgrund dessen wurde eine zweite Methode zur Elementverteilung, EELS, herangezogen.

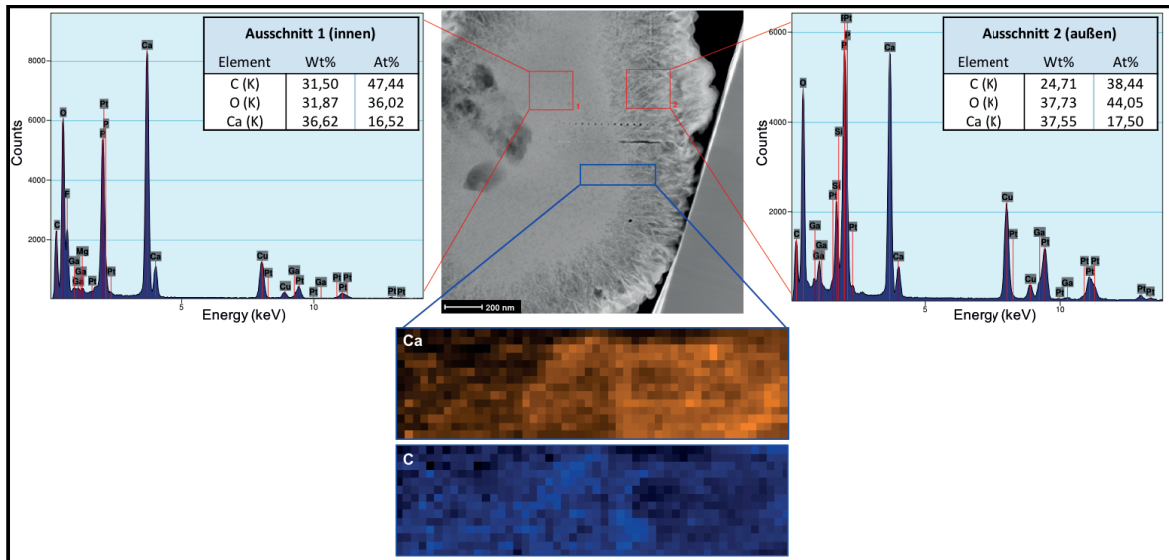


Abb. 8.23: Ergebnisse der Elementanalyse mittels STEM-EDX im inneren (Ausschnitt 1) und äußeren (Ausschnitt 2) Bereich der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikeln in SBF. Im blau markierten Bereich wurde eine räumliche Verteilung der Elementhäufigkeit von Calcium (Ca) und Kohlenstoff (C) aufgenommen. Bei der TEM-Aufnahme handelt es sich um eine Dunkelfeldaufnahme.

Die EELS-Methode gewährleistete auch eine Bestimmung der räumlichen Verteilung der Elementhäufigkeit von P, denn die Absorptionskanten-Energien von P (132,2 eV) und Pt (2122 eV) unterscheiden sich deutlich.^[181] Die Ergebnisse der STEM-EELS Untersuchung sind in Abb. 8.24 angegeben und zeigen einen höheren Ca-Anteil im äußeren Bereich. Zusätzlich konnte auch ein höherer P-Anteil im äußeren Bereich detektiert werden. Im Gegensatz zur C-Elementverteilung der STEM-EDX Messung wurde bei der STEM-EELS Messung im äußeren Bereich nur sehr wenig C nachgewiesen.

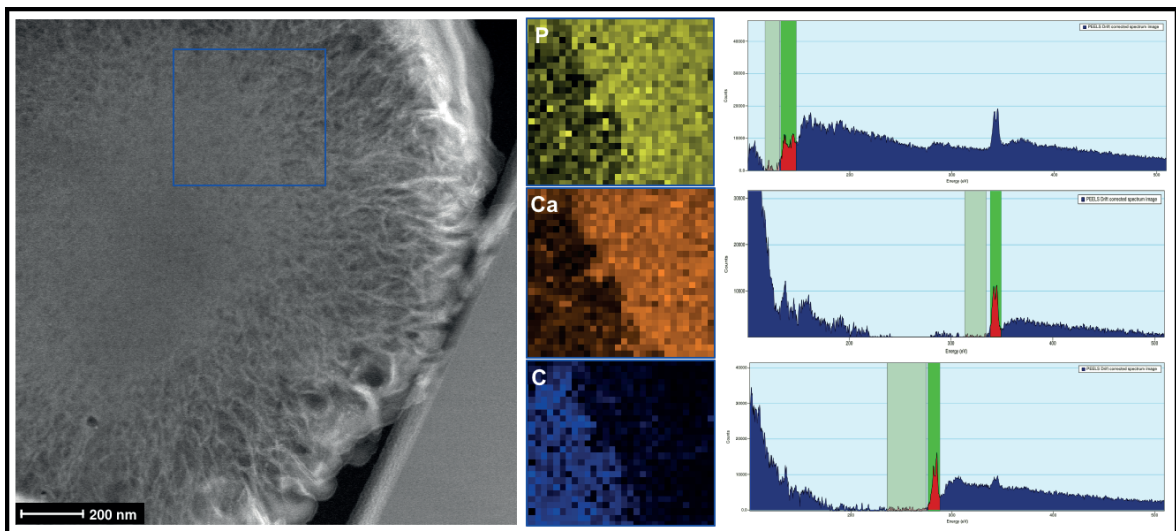


Abb. 8.24: Ergebnisse der räumlichen Verteilung der Elementhäufigkeit von Phosphor (P), Calcium (Ca) und Kohlenstoff (C) mittels STEM-EELS der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikeln in SBF. Der untersuchte Bereich ist blau markiert. Bei der TEM-Aufnahme handelt es sich um eine Dunkelfeldaufnahme. Die STEM-EELS Spektren zeigen in Grün markiert die detektierte Absorptionskante des untersuchten Elements und in blass Grün das Untergrundfenster, das kurz vor dem untersuchten Element abgezogen wurde.

Abschließend konnte mit diesen beiden Methoden nochmals bestätigt werden, dass die aus Vaterit-Partikeln in SBF gebildeten sphärischen HCA-Aggregate aus unterschiedlichen Phasen bestehen, wobei im Inneren eine weniger kristalline Phase mit geringerem Anteil an Calcium und Phosphor, aber höherem Anteil an Kohlenstoff vorliegt.

Konzentrationseffekte am Beispiel der Inkubation in PBS

In zwei weiteren Inkubationsreihen wurde sowohl der Einfluss der Konzentration als auch das, von der Zusammensetzung ausgehende, Verhältnis der CO_3^{2-} - zu PO_4^{3-} -Ionen am Beispiel der Inkubation der Vaterit-Partikel in PBS weiter untersucht. Es wurden 0,2 mg/mL Vaterit-Partikel in 10-fach verdünntem PBS inkubiert, was einem molaren CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnis von 2:1 entspricht. Durch die Verdünnung wurde die gleiche PO_4^{3-} -Ionenkonzentration wie im SBF erhalten, allerdings mit einer geringeren Ionenstärke (vgl. Tab. 8.2). In einer weiteren Versuchsreihe wurden 1 mg/mL Vaterit-Partikel in PBS inkubiert, was einem molaren CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnisses von 1:1 entspricht. Beide Inkubationen verliefen analog zu den vorherigen Inkubationen, bei 37 °C und leichtem Schütteln (150 U/min.), über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden. Nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72 Stunden wurden die erhaltenen Feststoffe mittels XRD- und FT-IR-Untersuchungen charakterisiert und anhand der REM-Aufnahmen ihre Morphologie bestimmt. Eine Quantifizierung der vorliegenden Phasen erfolgte durch eine Vollprofilanpassung der XRD-Daten. Die Ergebnisse sind in Abb. 8.25 zusammengefasst. Durch die geringeren Konzentrationen an Vaterit-Partikeln konnte eine deutlich schnellere Umsetzung in die HA-Spezies beobachtet werden. Bei beiden Inkubationen in PBS waren die Vaterit-Partikel nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bereits vollständig umgesetzt. Ein Unterschied zeigte sich in den entstehenden HA-Phasen. Während bei der Inkubation von 0,2 mg/mL Vaterit-Partikeln in verdünntem PBS nach 24 Stunden ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis zwischen kristalliner und amorpher HA-Phase vorlag, wurde bei der Inkubation von 1 mg/mL Vaterit-Partikeln in PBS ein deutlich höherer Anteil (~ 80 wt%) der kristallinen HA-Phase nachgewiesen. Das Verhältnis von kristallinem und amorphem Anteil der gebildeten HA-Spezies blieb über den weiteren Inkubationsverlauf von 1 mg/mL Vaterit-Partikel in PBS nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Inkubation im verdünnten PBS eine Abnahme und erneute Zunahme der amorphen HA-Phase, vergleichbar mit den Beobachtungen aus der Inkubationen in SBF (vgl. Abb. 8.11).

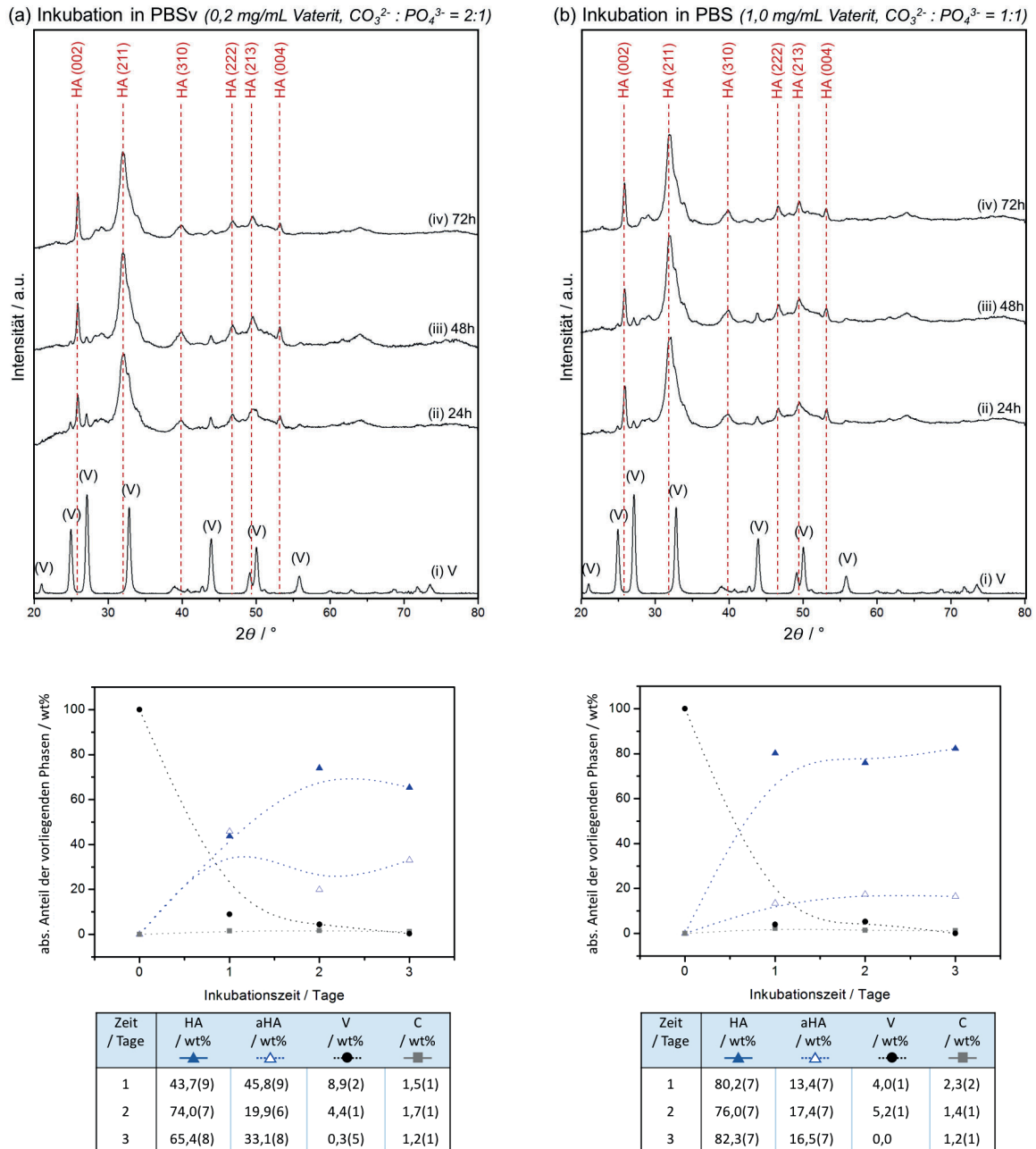


Abb. 8.25: Pulverdiffraktogramme der Inkubationen von (a) 0,2 mg/mL Vaterit-Partikel in verdünntem PBS (PBSv) und (b) 1,0 mg/mL Vaterit-Partikel in PBS über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h. Mit Angabe der Reflexlagen des Vaterits (V)^[33] und des Hydroxylapatits (HA)^[170]. Unter den Diffraktogrammen sind die Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse anhand der XRD-Daten aufgeführt und graphisch dargestellt. Mit den Phasen: Hydroxylapatit (HA), amorpher Hydroxylapatit (aHA), Vaterit (V) und Calcit (C).

Mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie wurde, über die Extinktionen der intensiven ν_3 -Banden der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der PO_4^{3-} - und der CO_3^{2-} -Gruppe, das PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (s. Abb. 8.26). Die IR-Spektren beider Inkubationen (s. Abb. 8.26a, c) zeigen die für HA typischen Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe ($\nu_3 \sim 1030 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_1 \sim 962 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu_4 \sim 602, 656 \text{ cm}^{-1}$). Im Vergleich zu den vorherigen Inkubationen in SBF und PBS (s. Abb. 8.12) sind die Banden deutlich schärfer ausgeprägt. Zudem ist die Aufspaltung der ν_4 (O-P-O) -Bande stärker ausgeprägt, was auf eine kristallinere HA-Spezies mit geringerem Carbonat-Anteil hinweist.^[173] Bei Betrachtung des PO_4^{3-} zu

CO_3^{2-} Ionenverhältnisses lassen sich bei den Inkubation der Vaterit-Partikel in geringen Konzentrationen generell höhere Verhältnisse feststellen (s. Abb. 8.26b). Bei der Inkubation im verdünnten PBS stellt sich über den Inkubationszeitraum von 24 bis 72 Stunden ein nahezu konstantes Verhältnis von $\sim 6,7$ ein. Dies entspricht einem sehr geringen Carbonat-Anteil von deutlich unter 5 wt% (vgl. Abb. 8.14b). Im Gegensatz dazu steigt bei der Inkubation von 1 mg/mL Vaterit-Partikeln in PBS das PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis bis auf ~ 10 an, was einem ungefähren Verhältnis von reinem HA entspricht (vgl. Abb. 8.14b).

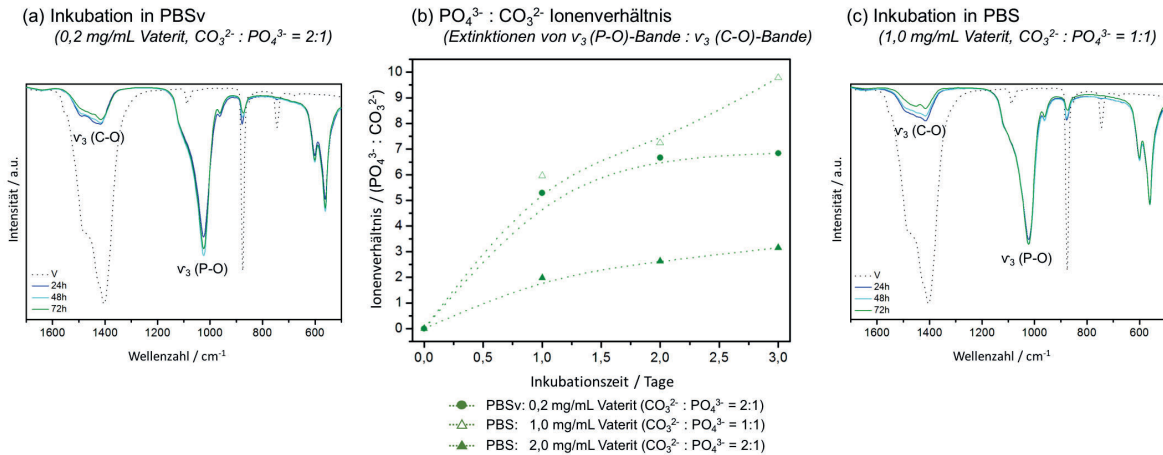


Abb. 8.26: Ergebnisse der FT-IR-Spektroskopie. IR-Spektren der Inkubationen von (a) 0,2 mg/mL Vaterit-Partikeln in verdünntem PBS (PBSv) und von (c) 1,0 mg/mL Vaterit-Partikeln in PBS über einen Zeitraum von 24 h (blau), 48 h (hellblau) und 72 h (dunkelgrün), mit dem Vergleichsspektrum des Vaterits (V, schwarz gepunktet). (c) PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis der untersuchten Inkubationen in PBS, anhand der Extinktionen der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen (ν_3), aufgetragen gegen die Inkubationszeit.

In Abb. 8.27 sind die REM-Aufnahmen der erhaltenen Feststoffe aus den beiden untersuchten Inkubationen in PBS zusammengestellt. Es konnte eine vergleichbare, plättchenförmige Morphologie der entstandenen HA-Spezies nachgewiesen werden, wie sie in der vorherigen Inkubation in PBS (vgl. Abb. 8.6) beobachtet wurde. Über den Inkubationszeitraum konnten keine signifikanten morphologischen Änderungen beobachtet werden. Wie auch bei der vorherigen PBS-Inkubation zeigte sich wieder eine unstrukturierte Agglomeration der entstandenen Partikel. Es ist nicht auszuschließen, dass die Agglomeration auf einen Trocknungseffekt durch die Probenpräparation zurückzuführen ist.

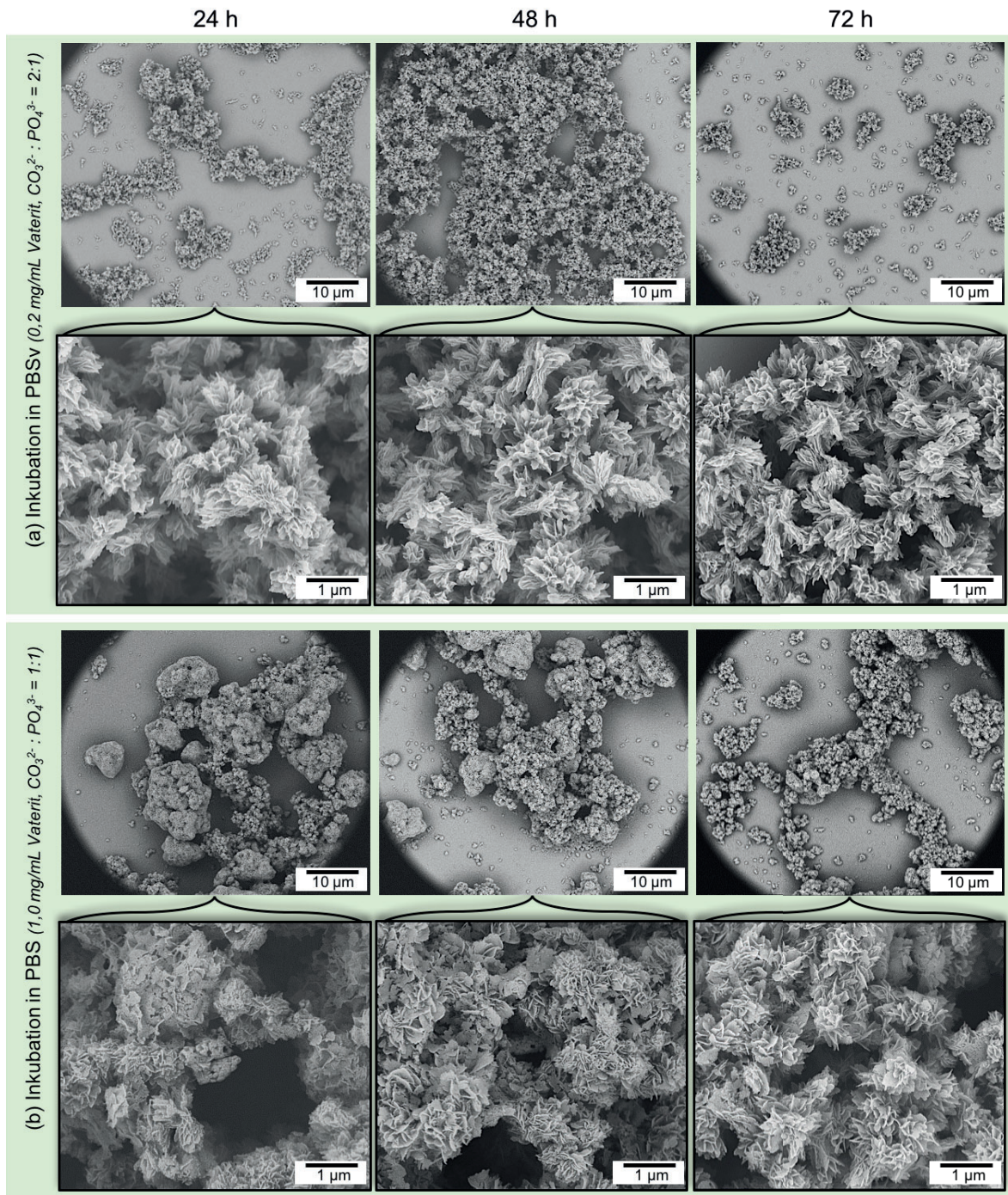


Abb. 8.27: REM Aufnahmen der Vaterit-Partikel nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation in (a) verdünntem PBS (PBSv) mit 0,2 mg/mL Vaterit-Partikeln und (b) in PBS mit 1,0 mg/mL Vaterit-Partikeln. Es ist jeweils eine Übersichtsaufnahme und eine Aufnahme mit 50.000-facher Vergrößerung dargestellt.

Anhand der beiden Inkubationen in PBS konnte der Einfluss der Vaterit-Partikelkonzentration als auch des molaren CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnisses näher beleuchtet werden. Es wurde festgestellt, dass bei geringerer Vaterit-Partikelkonzentration eine schnellere Auflösung stattfindet. Dadurch liegt ein höheres Ionenprodukt vor, welches das Löslichkeitsprodukt von HA überschreitet und zur Ausfällung führt. Während bei den Inkubationen von 0,2 mg/mL Vaterit-Partikel die Umsetzung über eine amorphe HA-Phase verläuft, ist dies bei den höheren Konzentrationen von 1 mg/mL und 2 mg/mL Vaterit-Partikeln und erhöhter Phosphat-Ionen-Konzentration nicht zu beobachten. Durch

die geringeren Konzentrationen findet eine schnellere Auflösung statt. Es resultiert eine stärkere Übersättigung und als Folge tritt eine Fällung der kinetisch bevorzugten amorphen Modifikation des HA auf, die sich gemäß der Ostwald'schen Stufenregel in die kristalline HA-Phase umwandelt.^[1] Hingegen fällt aus Lösungen niedriger Übersättigung direkt HA aus.^[182,183]

8.4 Abschließende Diskussion

In diesem Kapitel wurde sich intensiv mit der Umsetzung von Vaterit-(Nano-)Partikeln in eine Knochen-ähnliche Apatit-Spezies befasst. Die Umsetzung erfolgte unter *in vitro* Bedingungen in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF) und in einer weiteren phosphathaltigen Salzlösung (PBS), um die Anwendung als Biomaterial für die Knochenregeneration zu beurteilen. Es wurde gezeigt, dass nicht nur Vaterit-Nanopartikel, sondern auch die aggregierten Vaterit-Partikel (s. Kapitel 7), die nötige Reaktivität für eine Umsetzung in eine Hydroxylapatit (HA) -Spezies aufweisen. Im ersten Abschnitt (8.3.1) dieses Kapitels wurde anhand von Röntgenbeugungs- (XRD) Untersuchungen sowie spektroskopischen und mikroskopischen Methoden nachgewiesen, dass Vaterit als metastabiles CaCO_3 -Polymorph die nötige Aktivität für eine Umsetzung in eine HA-Spezies besitzt. Im zweiten Abschnitt (8.3.2) wurde erstmals der Mechanismus der Umsetzung und die entstehende HA-Phase anhand von drei Untersuchungsmethoden (XRD, FT-IR-, ^{31}P -NMR-Spektroskopie) quantitativ analysiert. Mit weiteren Untersuchungsmethoden (REM, TEM, REM-EDX, STEM-EDX, STEM-EELS) wurden die Ergebnisse der quantitativen Analysen gestützt. Im Nachfolgenden werden die Resultate aus Abschnitt (8.3.2) ausführlich diskutiert.

Beim Vergleich der Inkubation im verdünnten PBS mit der im SBF, unter gleicher Vaterit-Partikel- und Phosphationen-Konzentration, ließ sich bei der Inkubation in verdünntem PBS eine deutlich schnellere Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies nachweisen. Dies lässt sich damit begründen, dass im SBF weitere Fremdionen, wie beispielsweise Mg^{2+} -Ionen, vorliegen (vgl. Tab. 8.2). Es ist bekannt, dass Mg^{2+} -Ionen einen Einfluss auf die Bildung der CaCO_3 -Modifikationen ausüben und stabilisierend auf die metastabilen Phasen wirken.^[117,131] Einen ähnlichen Effekt zeigen Mg^{2+} -Ionen auch auf die Calciumphosphate (CaPs), indem sie eine konzentrationsabhängige, inhibierende Wirkung auf die Bildung und das Wachstum von HA und anderen CaPs bewirken.^[184] Die Anwesenheit der Mg^{2+} -Ionen wirkt stabilisierend auf die amorphe Calciumphosphat- (ACP) Phase, indem sie die Löslichkeit von ACP herabsetzt.^[5,184-186] Somit lässt sich die langsamere Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies in SBF wie folgt erklären. Einerseits wird durch die Mg^{2+} -Ionen eine Stabilisierung der vorliegenden Vaterit-Partikel ausgeübt und andererseits erfolgt eine kinetische Hemmung der HA-Kristallisation. Möglich ist auch eine Substitution der Ca^{2+} -Ionen im HA durch Mg^{2+} -Ionen aus der SBF-Lösung zu Beginn der HA-Kristallisation, wodurch es zur Bildung eines Calcium-defizitärem HA (CDHA) kommt. CDHA ist eine Calciumphosphat-Modifikation von geringerer Stabilität und zeigt damit eine erhöhte Löslichkeit im Vergleich zu HA.^[35,187] Anhand von Elementanalysen mittels EDX konnten geringe Mengen an Magnesium in den Proben der Inkubationen in SBF detektiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ionen mit einem kleineren Ionenradius als das Ca^{2+} -Ion das Volumen der Einheitszelle im HA verringern und die Nahordnung im Kristall stören, mit der Folge kleinerer Kristallite.^[168] Zusätzlich wurden mit Hilfe der Elementanalysen durch EDX sowohl bei den Inkubationen in SBF als auch bei den Inkubationen in PBS geringe Mengen an Natrium detektiert.

Dies lässt vermuten, dass nicht nur Mg^{2+} -Ionen, sondern auch Na^+ -Ionen in das HA-Gitter eingebaut wurden und die Bildung eines CDHA fördern. Nicht nur die Substitution von Ca^{2+} -Ionen durch Mg^{2+} - oder Na^+ -Ionen führt zu kleineren Kristalliten mit einer verringerten Kristallinität, sondern auch die Substitution von PO_4^{3-} - gegen CO_3^{2-} -Ionen, wie sie im Carbonat-haltigen Hydroxylapatit (HCA) vom Typ B zu finden ist.^[37,38,40,168] Im natürlichen Knochenmineral sind Mg^{2+} - oder Na^+ -Ionen mit einem Anteil von < 1 wt% vorzufinden.^[35,184] Hingegen kommen CO_3^{2-} -Ionen im Knochenmineral zu einem Anteil von 2-8 wt% vor, weshalb der Fokus dieser Arbeit auf dem Nachweis der CO_3^{2-} -Ionen lag.^[35,174,175,184] Zum Vergleich wurde in dieser Arbeit auch der Anteil an CO_3^{2-} -Ionen eines humanen Knochenminerals, aus dem Knie eines 52-jährigen Mannes, mittels XRD-, FT-IR- und ^{31}P -NMR-Untersuchungen quantitativ bestimmt. Es wurde ein Anteil von 5-10 wt% CO_3^{2-} -Ionen nachgewiesen, was mit den Werten aus der Literatur korreliert.^[35,174,175,184] Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Knochen auch einem Alterungsprozess unterliegt, wodurch die Zusammensetzung und die Kristallitgröße variieren können.^[50] Es konnte mit der Untersuchung des Knochenminerals gezeigt werden, dass die hier verwendeten quantitativen Methoden (XRD, FT-IR- und ^{31}P -NMR-Spektroskopie) sich für eine Einschätzung des vorliegenden CO_3^{2-} -Ionen Anteils in der aus Vaterit-Partikeln gebildeten HA-Spezies gut eignen und sich gegenseitig ergänzen.

Generell führen Ionen-Substitutionen im HA zu einer verminderten Kristallinität. Als Folge treten Verbreiterungen von Reflexprofilen in den Röntgendiffraktogrammen auf.^[168,169,175,186] Die Ionen-Substitutionen im HA ändern nicht nur das chemische Verhalten, sondern auch das biologische Verhalten, wodurch eine dem natürlichen Knochenmineral ähnliche HA-Spezies resultiert.^[188] Das Knochenmineral zeigt extrem kleine, ungeordnete Carbonat-haltige HA Kristallite geringerer Stabilität, wodurch eine höhere Löslichkeit im Vergleich zum geordneten, kristallinen HA resultiert.^[35,49,155] Dadurch wird die Resorption durch Osteoklasten in sauren Kompartimenten verbessert, wodurch der kontinuierliche Knochenumbau durch Auf- und Abbauvorgänge ermöglicht wird.^[155] Eine verringerte Kristallinität der aus Vaterit-Partikeln entstandenen HA-Spezies, aufgrund von Ionen-Substitutionen, wurde anhand der Verbreiterung des Reflexprofils der XRD-Untersuchung, der Phosphat-Banden der FT-IR-Spektroskopie und des Resonanzsignals der ^{31}P -NMR-Spektroskopie beobachtet (vgl. Abschnitt 8.3.2). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der erhaltenen HA-Spezies zeigten eine plättchenförmige Morphologie mit einer sehr geringen Dicke im Bereich von wenigen nm. Damit konnte eine vergleichbare Morphologie der erhaltenen HA-Spezies nachgewiesen werden, wie sie auch im natürlichen Knochen vorzufinden ist. Die biologischen Apatit-Kristallite des Knochenminerals werden in der Literatur als plättchenförmig beschrieben. Mit einer Länge von 8-50 nm, einer Breite von 5-25 nm und einer Dicke von 1,0-4,0 nm gehören sie zu den kleinsten biologischen Kristalliten.^[48-50] Interessanterweise wurde während der Inkubation in SBF eine Aggregation dieser plättchenförmigen Strukturen zu größeren Strukturen beobachtet, die in keiner der untersuchten Inkubationen in PBS vorgefunden wurde. Dieser

morphologische Effekt ist, wie auch die verringerte Umsetzungsgeschwindigkeit der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies, auf die Anwesenheit weiterer Fremdionen (Mg^{2+} , Ca^{2+} , HCO_3^- und SO_4^{2-}) zurückzuführen, die im PBS nicht anzutreffen sind (s. Kapitel 9).

Beim Vergleich der Inkubationen der Vaterit-Partikel in SBF und PBS, bei gleichem molarem CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnis von 2:1, wurden nicht nur morphologische Unterschiede festgestellt, sondern auch Unterschiede in der Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies. Einerseits wurde eine verlangsamte Umsetzung in der SBF-Lösung im Vergleich zur PBS-Lösung ermittelt, die wie zuvor diskutiert auf die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen zurückzuführen ist. Andererseits wurde die Anwesenheit von zwei verschiedenen HA-Phasen nachgewiesen, die sich in der Kristallinität unterscheiden. Die Resultate der quantitativen Phasenanalysen anhand der XRD-Daten und der Signalanpassung der ^{31}P -NMR-Untersuchungen implizieren, dass die Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies in SBF und PBS nach unterschiedlichen Mechanismen ablaufen. Im Nachfolgenden sollen die beiden möglichen Mechanismen, anhand der vorliegenden Resultate, diskutiert und postuliert werden.

Anhand der Resultate der quantitativen FT-IR- und ^{31}P -NMR-Spektroskopie konnte die Substitution durch CO_3^{2-} -Ionen am Ende der Inkubationszeit in SBF nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Resultate der quantitativen Phasenanalyse der XRD-Daten, konnten lediglich Spuren von Calcit (~ 1 wt%) nachgewiesen werden, sodass von einem CO_3^{2-} -Ionen Einbau in den HA-Kristall ausgegangen werden kann. Es ist bekannt, dass auch im Knochenmineral geringe Anteile von Calcit vorzufinden sind, die von Geschlecht, Alter und Umgebung abhängig sind.^[189] Durch die Inkubation der Vaterit-Partikel in SBF wurde ein Carbonat-haltiger HA (HCA) mit einem Anteil von etwa 5 wt% an CO_3^{2-} -Ionen erhalten. Auch die Inkubation der Vaterit-Partikel in PBS zeigte eine Umsetzung in den HCA. Eine hohe Varianz im CO_3^{2-} -Ionen Anteil konnte, in Abhängigkeit der eingesetzten Vaterit-Partikelkonzentration und damit des eingesetzten molaren CO_3^{2-} zu PO_4^{3-} Ionenverhältnisses beobachtet werden. Dieses Resultat lässt vermuten, dass eine bestimmte Konzentration an CO_3^{2-} -Ionen in der Inkubationslösung vorliegen muss, damit ein Einbau, bzw. eine Substitution von PO_4^{3-} -Ionen stattfinden kann. In der SBF-Lösung liegen bereits CO_3^{2-} -Ionen in Form von HCO_3^- -Ionen vor. Im Gegensatz dazu beinhaltet die PBS-Lösung keine CO_3^{2-} -Ionen (s. Tab. 8.4). Anhand der Untersuchungen mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurde während der Inkubation in SBF, im Vergleich zur Inkubation in PBS, eine durchweg größere Halbwertsbreite (FWHM) der modellierten kristallinen HA-Spezies vorgefunden (s. Tab. 8.6). Dieses Resultat ist ein erster Hinweis dafür, dass im SBF bereits zu Beginn der Einbau von CO_3^{2-} -Ionen in das HA-Gitter erfolgt.^[178,180,190] Zudem führte der Einbau von CO_3^{2-} -Ionen zu einer leichten chemischen Verschiebung des ^{31}P -Resonanzsignals was auch im Knochenmineral nachgewiesen wurde (s. Abb. 8.15a1).^[178,191] Aus den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse der XRD- und ^{31}P -NMR-Daten resultierte am Ende der Inkubation in SBF (nach 6 Monaten) immer noch ein ~ 10 wt%-iger Anteil einer weniger kristallinen Phase, die als amorphe Phase des HA bezeichnet

wurde (s. Abb. 8.18a). Diese Analysen deuten darauf hin, dass sich die im SBF gebildeten „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen aus verschiedenen HA-Phasen zusammensetzten. Gefestigt wurden die Hinweise durch die Ergebnisse der TEM/STEM-Untersuchungen einer aus den „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen präparierten Lamelle. Es konnte im inneren Bereich der „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen eine weniger kristalline HA-Spezies mit hohem Kohlenstoff-Anteil nachgewiesen werden. Wohingegen im äußeren Bereich eine kristallinere, Calcium- und Phosphat-reiche HA-Spezies vorgefunden wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich zu Beginn der Umsetzung der Vaterit-Partikel in SBF, unter Anwesenheit von gelösten HCO_3^- , HPO_4^{2-} und Mg^{2+} -Ionen, eine CO_3^{2-} -reiche, nanoskopische CDHA-Spezies geringer Kristallinität bildet. Aus den morphologischen Untersuchungen geht hervor, dass das weitere Kristallwachstum nicht über die klassische Ostwaldreifung erfolgt, sondern durch orientierte Anlagerung der primär gebildeten CDHA-Spezies zu den übergeordneten „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen. Dadurch werden im Inneren die nanoskopischen, plättchenförmigen Kristallite „abgeschirmt“ und bleiben über eine lange Zeit bis hin zu 6 Monaten stabil. Die äußere CDHA-Phase steht allerdings im direkten Kontakt mit der SBF-Lösung und unterliegt einem kontinuierlichen Austausch von Ionen mit der Folge einer zunehmenden Kristallinität, in Form eines Alterungsprozesses. Ein postuliertes Schema zur Umsetzung der Vaterit-Partikel in die Knochen-ähnliche HA-Spezies in der SBF-Lösung ist in Abb. 8.28a dargestellt.

Im Gegensatz zur Inkubation der Vaterit-Partikel in SBF, bei der eine CO_3^{2-} -reiche CDHA-Spezies zu Beginn entsteht, erfolgt im PBS die Substitution der PO_4^{3-} -Ionen gegen die CO_3^{2-} -Ionen erst nach zuvor gebildeter HA-Spezies. Den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse anhand der XRD- und ^{31}P -NMR-Daten (s. Abb. 8.18) zu Folge, findet die Substitution in PBS vermutlich nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden statt. Dabei ist ein erhöhter Anteil einer weniger kristallinen Phase, die als amorphe Phase des HA bezeichnet wurde, nachgewiesen worden. Wie vorweg erwähnt und aus der Literatur bekannt, führen Ionen-Substitutionen im HA-Gitter zu einer verminderten Kristallinität.^[168,169,175,186] Die deutliche Verbreiterung des ^{31}P -Resonanzsignals der NMR-spektroskopischen Untersuchung nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden der Vaterit-Partikel in PBS, im Vergleich zum Signal des reinen HA (s. Abb. 8.15b2), weist auf eine weniger geordnete HA-Phase mit erhöhter Löslichkeit hin. Der Nachweis von Na-Spuren durch die EDX-Messung deutet die Bildung eines CDHA an. Aufgrund der erhöhten Löslichkeit des CDHA^[1,35] wird der nachträgliche Einbau von CO_3^{2-} -Ionen durch Substitution von PO_4^{3-} -Ionen ermöglicht, wodurch der B-Typ des HCA entsteht. Ein weiterer Nachweis für die Bildung des HCA vom B-Typ resultiert aus den FT-IR-Spektren. Sowohl bei den Inkubationen in PBS als auch in SBF wurde die ν_2 (O-C-O) Bande bei 872 cm^{-1} der CO_3^{2-} -Gruppe nachgewiesen, die den CO_3^{2-} -Ionen des HCA vom B-Typ zuzuordnen sind.^[37,38] Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der entstehenden CDHA-Spezies aus den Vaterit-Partikeln durch Inkubation in PBS zeigten keine „Selbst-Anordnung“ zu größeren Strukturen. Dadurch steht die gebildete CDHA-Spezies im direkten Kontakt mit der PBS-

Lösung und als Folge eines Alterungsprozesses wandelt sich die weniger geordnete CDHA-Phase in eine geordnetere, kristallinere HA-Phase umwandelt. Ein postuliertes Schema zur Umsetzung der Vaterit-Partikel in die Knochen-ähnliche HA-Spezies in der PBS-Lösung ist in Abb. 8.28b dargestellt.

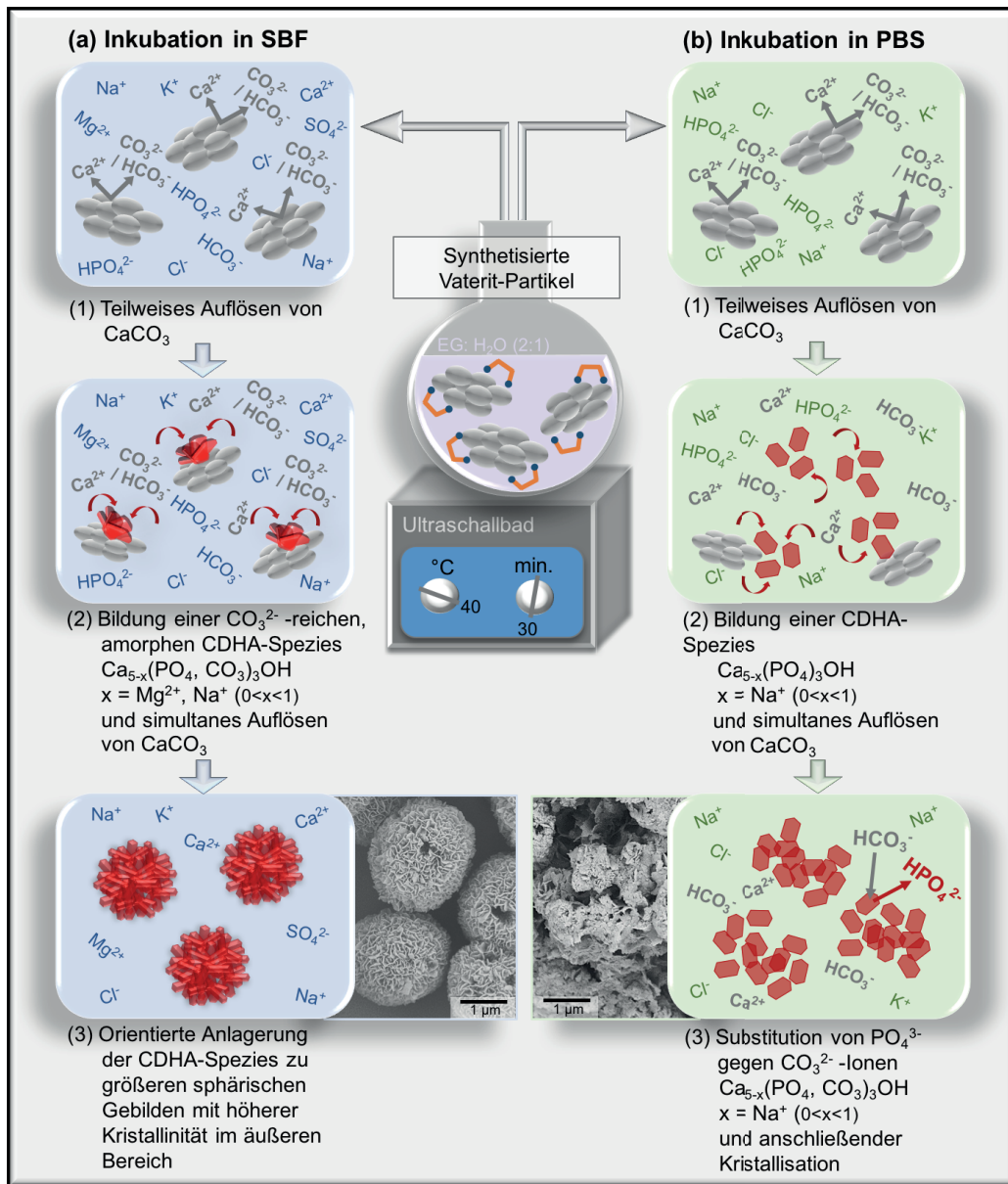


Abb. 8.28: Postulierter Mechanismus zur Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine Hydroxylapatit (HA)-Spezies über eine Calcium-defizitäre HA (CDHA)-Spezies durch Inkubation in (a) SBF und (b) PBS.

Dennoch wurde durch Inkubation der Vaterit-Partikel sowohl in SBF als auch in PBS eine Carbonat-haltige HA-Spezies, mit ähnlichen Eigenschaften wie sie im natürlichen Knochenmineral zu finden sind, nachgewiesen.

8.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend wurde bestätigt, dass die in Kapitel 7 synthetisierten Vaterit-Partikel ein hohes Potential aufweisen, sich in einen dem Knochen-ähnlichen Carbonat-haltigen Hydroxylapatit (HCA) umzusetzen. Vaterit als metastabiles Calciumcarbonat-Polymorph bringt ideale Voraussetzungen für eine solche Umsetzung mit. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Vaterit-Partikel lagerungsbeständig (s. Kapitel 7) und andererseits aber auch labil genug sind, sich durch Auflösung- und Rekristallisationsprozesse in eine Knochen-ähnlichen Apatit-Spezies umsetzen zu lassen. Durch eine Kombination aus Röntgendiffraktometrie (XRD), FT-IR- und ^{31}P -Festkörper-NMR Spektroskopie wurde die Umsetzung der Vaterit Partikel quantitativ über einen langen Zeitraum von bis zu 6 Monaten unter *in vitro* Bedingungen, in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF), bei 37 °C verfolgt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (REM, TEM/STEM, EDX, EELS) untermauerten die Resultate. Abhängig vom phosphathaltigen Inkubationsmedium konnten unterschiedliche Mechanismen der Umsetzung in den HCA festgestellt werden. Dabei wurde erkannt, dass die Anwesenheit stabilisierender Ionen, wie Mg^{2+} , als auch bindende Proteine (s. Abschnitt 8.6) einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionszeit ausüben. Die Resultate der quantitativen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Umsetzung über einen Calcium-defizitären Hydroxylapatit (CDHA) mit geringer Kristallinität verläuft. Bedingt durch die Anwesenheit weiterer Fremdionen im Inkubationsmedium, wie Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , werden diese konzentrationsabhängig in das Kristallgitter mit eingebaut. Eine Abwesenheit von CO_3^{2-} -Ionen im Inkubationsmedium, wie in der phosphathaltigen Salzlösung (PBS), zeigte, dass der Einbau von CO_3^{2-} -Ionen erst bei fortschreitender Vaterit-Umsetzung erfolgte. Dadurch konnte die Substitution von PO_4^{3-} -Ionen gegen CO_3^{2-} -Ionen und folglich die Bildung eines HCA vom B-Typ bestätigt wurde. Die Vaterit-Partikel dienen somit nicht nur als Ca^{2+} -Ionenreservoir für die Apatit-Bildung, sondern auch als CO_3^{2-} -Ionenquelle für die Bildung eines HCA. Eine vollständig stöchiometrische Zusammensetzung der aus Vaterit-Partikeln in phosphathaltigem Medium entstehenden HCA-Spezies konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wurde gezeigt, dass abhängig vom Inkubationsmedium weitere Ionen in die Kristalle der Apatit-Spezies eingebaut werden können. Folglich führt die Inkubation der Vaterit-Partikel zu einer Umsetzung in eine Apatit-Spezies, die sich dem Umfeld, bzw. dem Inkubationsmilieu in dem sie gebildet wird, anpasst.

Damit besitzen die in dieser Arbeit untersuchten Vaterit-Partikel essentielle Vorteile gegenüber den herkömmlichen Knochenersatzmaterialien, indem sie als Vorstufe des Knochenminerals fungieren und sich erst *in vivo* zu dem eigentlichen Knochenersatzmaterial umsetzen. Folglich dienen die Vaterit-Partikel der natürlichen Knochenregeneration und schaffen eine Apatit-Spezies mit nahezu identischen biologischen und chemischen Eigenschaften wie das natürliche Knochenmineral. Eine *in vivo* Umsetzung begünstigt den Einbau weiterer Fremdionen (wie Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-}) in die Apatit-Spezies, wie sie auch im natürlichen Knochenmineral zu finden sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Substitutionen abhängig vom Geschlecht, Alter und Ernährung sind und sich dem Körper

idealerweise anpassen können, sodass ein individuelles Knochenmineral aus den Vaterit-Partikel gebildet werden kann. Aus diesem Grund sind die Vaterit-Partikel ein vielversprechendes Material gegenüber den herkömmlichen Knochenersatzmaterialien.

Ein mögliches Anwendungsgebiet der Vaterit-Partikel könnten kleine Knochendefektstellen sein, bei denen das Gleichgewicht des natürlichen Knochenaufbaues und –abbaues gestört ist und der Knochenabbau überwiegt, wie beispielsweise bei der Osteoporose. Vaterit-Partikel würden einerseits die natürliche Knochenregeneration ankurbeln (wie in Kapitel 7 beschrieben) und andererseits sich selbst in eine Knochensubstanz umsetzen und damit das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und –abbau wiederherstellen. Denkbar wäre auch der Bereich der Kieferchirurgie. Meist müssen vor einer Zahnimplantation die Kieferknochen aufgebaut werden (medizinisch: Augmentation), um den Implantaten einen ausreichenden Halt zu gewährleisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in umfangreichen *in vitro* Studien eine ausgezeichnete Biokompatibilität (vgl. Kapitel 7), die Umsetzung in eine Knochen-ähnliche Apatit-Spezies und die osteoinduktive Wirkung (vgl. Kapitel 7) der Vaterit-Partikel belegt, was sie zu einem besonders attraktiven Biomaterial für die schnelle, natürliche Knochenregeneration macht.

Weiterführende Experimente sollen die Umsetzung der Vaterit-Partikel *in vivo* klären. Daneben stellt die Abbaubarkeit der aus Vaterit-Partikeln gebildeten Apatit-Spezies einen interessanten Aspekt dar. Zu testen ist, wie sich die gebildete Apatit-Spezies im sauren Milieu im Vergleich zu reinem Hydroxylapatit verhält, um die Resorptionseigenschaft der Osteoklasten zu simulieren. Aufschlussreich wären weitere Untersuchungen zu den frühen Phasen der Umsetzung der Vaterit-Partikel und der Bildung der Apatit-Spezies, um amorphe Frühphasen zu charakterisieren, wobei die simultane Auflösung der Vaterit Partikel und die Bildung der Apatit-Spezies die Identifizierung einer amorphen Phase erschwert.

8.6 Exkurs: Effekt von Serumproteinen auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel in Knochen-ähnlichen Apatit

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss von Serumproteinen auf die synthetisierten Vaterit-Partikel und deren Umsetzung untersucht.

8.6.1 Inkubation der Vaterit-Partikel in Zellkulturmedium mit 10% FBS

Für eine realistischere Einschätzung der *in vivo* Umsetzung von Vaterit-Partikel wurden 0,2 mg/mL in einem Zellkulturmedium, dem *Minimum Essential Medium Alpha* (MEM α), unter Zusatz von 10% fetalem Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*) und 100 U / 100 μ g/mL Penicillin/Streptomycin inkubiert (im weiteren Text nur noch als MEM α bezeichnet). Die Vorgehensweise erfolgte analog zu der Inkubation in simulierter Körperflüssigkeit (SBF: *simulated body fluid*) bei 37 °C über einen Zeitraum von bis zu 28 Tagen. Im Unterschied zum SBF enthält MEM α zusätzlich Aminosäuren, Vitamine, Ribonukleoside^[192] und wurde mit Serumproteinen versetzt. Dadurch wurde eine nahezu identische Umgebung wie im humanen Blutserum nachgeahmt und die Effekte der Proteine konnten analysiert werden. Die Inkubation der Vaterit-Partikel wurde mittels der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD) und der FT-IR-Spektroskopie verfolgt (s. Abb. 8.29) und morphologisch anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM und TEM) untersucht (s. Abb. 8.30). Es konnte sowohl anhand der Diffraktogramme als auch der FT-IR-Spektren eine Zunahme der Reflexe und Banden einer Phosphat-Spezies nachgewiesen werden, die dem Hydroxylapatit zuzuordnen sind. Den elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 8.30 ist zusätzlich zu den ellipsoiden Vaterit Partikeln eine weitere Morphologie zu entnehmen, bei der es sich um eine vergleichbare plättchenartige Struktur handelt, wie sie zuvor während der Inkubation von Vaterit-Partikeln in SBF beobachtet wurde. Im Vergleich zu den Resultaten der Inkubation von Vaterit-Partikeln in SBF wurde in MEM α eine deutlich verlangsamte Umsetzung der Vaterit-Partikel in die Apatit-Spezies beobachtet. Vor allem bei der Betrachtung der PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisse aus Abb. 8.29b2 wird es deutlich. Diese Ergebnisse deuten auf eine Proteinadsorption auf der Oberfläche der Vaterit Partikel hin, wodurch eine Stabilisierung erfolgt und die Auflösung und Rekristallisation der Apatit-Spezies verzögert stattfindet.

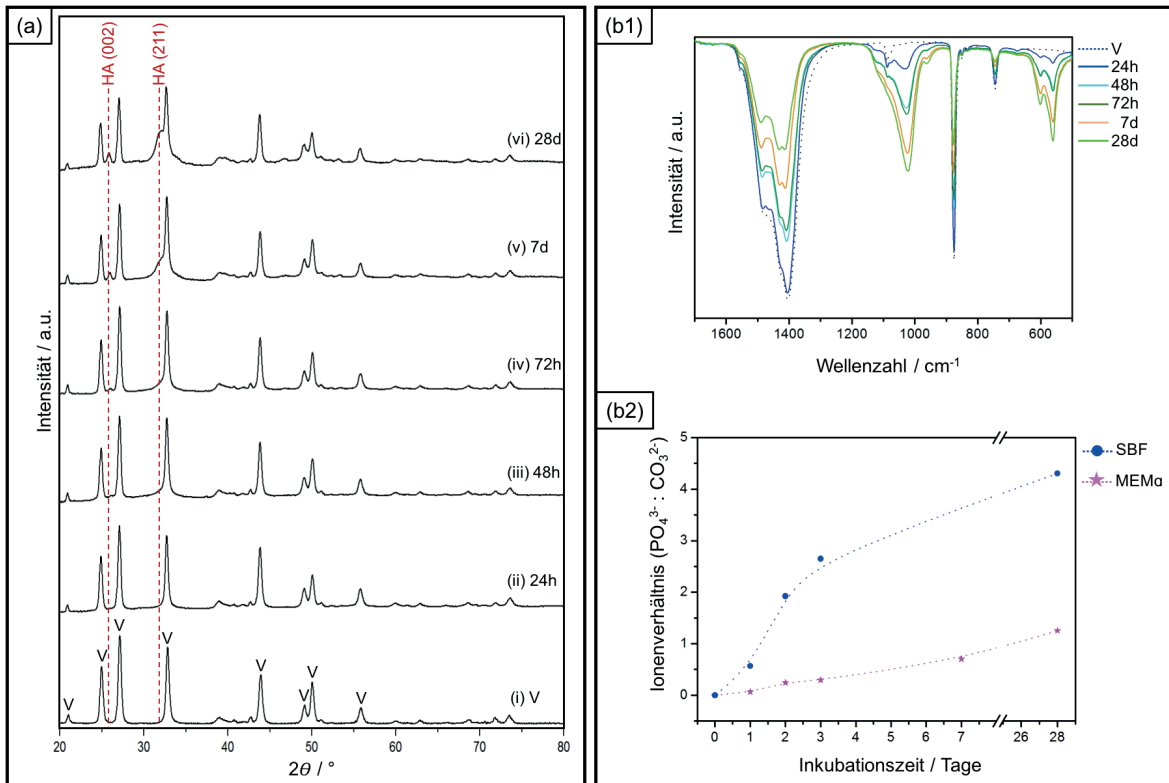


Abb. 8.29: Charakterisierung der Vaterit-Partikel (V, i) vor und nach der Inkubation in MEM α für (ii, blau) 24 h, (iii, hellbau) 48 h, (iv, dunkelgrün) 72 h, (v, orange) 7 Tage und (vi, hellgrün) 28 Tage. Mit d = Tage. (a) Pulverdiffraktogramme mit Kennzeichnung der Reflexlagen von Vaterit (V)^[33] und von Hydroxylapatit (HA)^[170] mit Angabe der Miller'schen Indizes. (b1) FT-IR-Spektren und (b2) Auftragung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses gegen die Inkubationszeit, anhand der Extinktionen der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen.

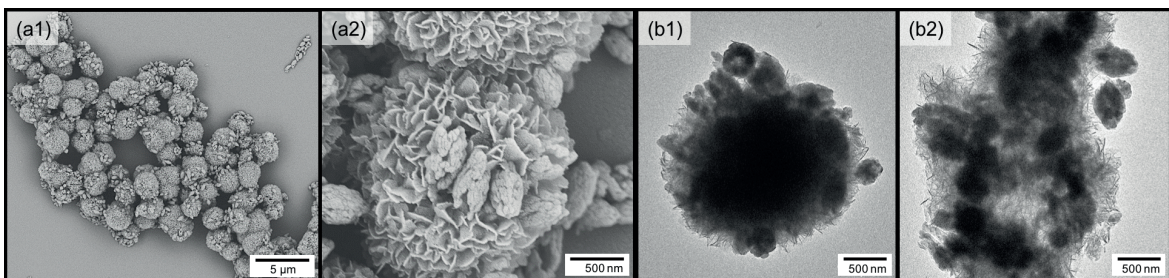


Abb. 8.30: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der in MEM α inkubierten Vaterit-Partikel nach 28 Tagen. (a1 und a2) REM-Aufnahmen. (b1 und b2) TEM-Aufnahmen, angefertigt von [redacted] an der JGU Mainz im Arbeitskreis von [redacted].

8.6.2 Effekt von FBS auf die Vaterit-Partikel

Auf der Grundlage der langsameren Umsetzung von Vaterit-Partikeln in serumhaltigem MEM α -Medium wurde, in Kooperation mit [REDACTED] aus der Gruppe von [REDACTED] unter Projektleitung von [REDACTED] am MPIP in Mainz, der Effekt von Serumproteinen im Hinblick auf die Ausbildung einer Proteinkorona untersucht. Die genaue Durchführung ist dem Abschnitt 8.2.3 zu entnehmen. Es wurden Vaterit-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis zu 10 mg/mL im Medium (MEM α : *Minimum Essential Medium Alpha*), unter Zusatz von 10% fetalem Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Um einen konzentrationsabhängigen Protein-Effekt zu untersuchen, wurden zusätzlich 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vaterit-Partikel in MEM α mit 50% FBS und in reinem FBS inkubiert. Die Desorption der an Vaterit-Partikel gebundenen Proteine erfolgte mit einer TRIS/HCl gepufferten 2%-igen Natriumdodecylsulfat- (SDS: *sodium dodecyl sulfate*) Lösung. Die absolute Menge an Vaterit gebundenen Proteinen wurde durch Verwendung des Pierce Assays bestimmt und die desorbierten Proteine anhand der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in Abb. 8.31 zusammengestellt.

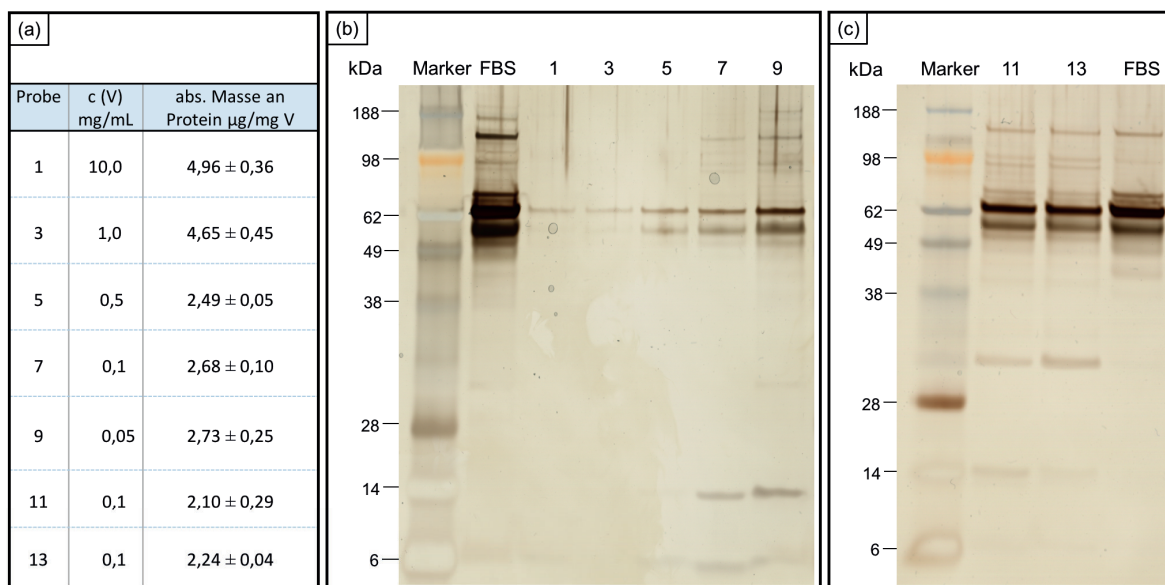


Abb. 8.31: (a) Resultate der absoluten Proteinmassenbestimmung mittels Pierce Assay. (b) Resultate der SDS-PAGE nach 1 h Inkubation der Vaterit-Partikel (V) bei 37 °C in Zellkulturmedium (MEM α) mit 10% FBS und Vaterit Konzentrationen von Probe 1: 10 mg/mL , Probe 3: 1 mg/mL , Probe 5: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Probe 7: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und Probe 9: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (c) Resultate der SDS-PAGE nach 1 h Inkubation von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vaterit Partikel bei 37 °C in Probe 11: 100% FBS und Probe 13: Zellkulturmedium (MEM α) mit 50% FBS. Alle Untersuchungen wurden in zweifache Ausführung durchgeführt.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der an Vaterit-Partikel gebundenen Proteine zeigten, unabhängig der vorliegenden Proteinkonzentration (10%, 50% und 100% FBS), nur sehr geringe Massen von etwa 2-5 μg Protein pro mg Vaterit-Partikel (s. Abb. 8.31a). Anhand der Identifikation der Proteinbanden mittels SDS-PAGE ließen sich ebenfalls nur wenige Proteinbanden nachweisen

(s. Abb. 8.31b, c). Bei allen getesteten Proben konnten die beiden Banden bei ~ 66 kDA und ~ 48 kDA beobachtet werden, die den Serumproteinen Albumin und Fetuin zuzuordnen sind. ^[109,111]

Die Adsorption der Serumproteine an Vaterit-Partikel wurde durch Zeta-Potential-Messungen weiterverfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 8.32 dargestellt. Hierbei konnte ein positives Zeta-Potential von $11,7 \pm 0,7$ mV der Vaterit-Partikel in reinem Wasser nachgewiesen werden, das mit den Angaben von Schüler *et al.* ^[34] übereinstimmt. Durch Inkubation der Vaterit-Partikel in Wasser über einen längeren Zeitraum von bis zu 6 Stunden konnte eine leichte Abnahme des Zeta-Potential auf $8,0 \pm 0,2$ mV beobachtet werden. Eine Begründung könnte in der Metastabilität und damit der Phasenumwandlung der Vaterit-Partikel liegen, wodurch Änderungen in der Oberflächenladung resultieren. ^[33,193] Wurden die Vaterit-Partikel in Wasser und Anwesenheit von 10% FBS inkubiert, so konnte eine signifikante Änderung des Zeta-Potentials beobachtet werden. Ein negatives Zeta-Potential von $-19,2 \pm 1,0$ mV wurde nachgewiesen, dass auf die Adsorption von Proteinen hinweist. ^[194,195] Über einen längeren Inkubationszeitraum konnte hier keine signifikante Änderung festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Adsorption der Proteine an der Oberfläche der Vaterit-Partikel in wenigen Minuten erfolgt. Zusätzlich wurde das Zeta-Potential der Vaterit-Partikeln vermessen, die in verdünntem PBS (PBSv) inkubiert wurden. Auch hier konnte ein negatives Potential von ~ -9 mV beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die in Lösung befindlichen Phosphat-Ionen mit der Oberfläche der Vaterit-Partikel in Wechselwirkung treten. Durch Zugabe von 10% FBS zum PBSv ließ sich ein vergleichbarer Effekt wie im Wasser beobachten, indem das Zeta-Potenzial auf ~ -16 mV absank.

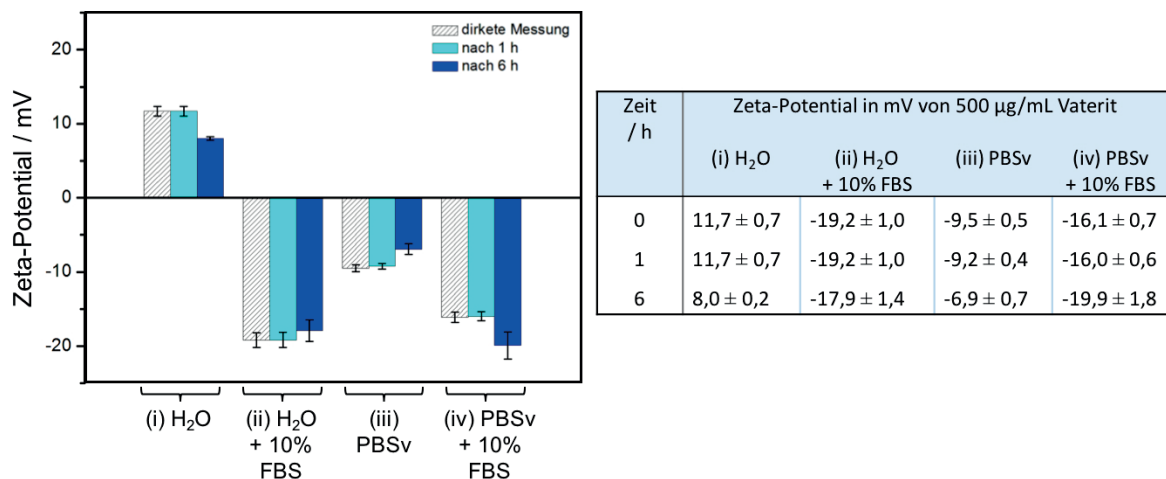


Abb. 8.32: Resultate der Zeta-Potential-Messung als grafische Darstellung (links) und tabellarische Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung (rechts) von 1 mg/mL Vaterit-Partikel in (i) H₂O, (ii) H₂O mit 10% FBS, (iii) 10-fach verdünntem PBS: PBSv und (iv) PBSv mit 10% FBS nach 0 h, 1 h und 6 h Inkubationszeit bei 37 °C. Für die Messung wurden die Proben unmittelbar zuvor mit 1 mM KCl auf eine Konzentration von 500 µg/mL verdünnt.

Abschließend ist festzuhalten, dass in dieser Untersuchung im Vergleich zu anderen Arbeiten, die sich mit der Ausbildung einer Proteinkorona um Nanopartikel befassen, ^[107,165,166,196,197] nur sehr

geringe Mengen an Protein pro mg Vaterit-Partikel nachgewiesen werden konnten. Anhand der Molekulargewichte wurde auf die Adsorption von Albumin und Fetuin geschlossen. Beide gehören zu den häufigsten Proteinen im FBS und wurden anhand von Flüssigchromatographie gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS: *liquid-chromatography mass-spectrometry*) mit einem Anteil von $\sim 46\%$ für Albumin und $\sim 19\%$ für Fetuin (*Alpha-2-HS-glycoprotein*) im FBS bestimmt (s. Anhang A, Abschnitt 11.6). Anhand der Zeta-Potential Messungen wurde eine Änderung des Oberflächenpotentials der Vaterit-Partikel in den negativen Bereich nachgewiesen, die auf eine Proteinadsorption zurückzuführen ist.^[194,195]

Eine grobe Abschätzung wieviel Proteine theoretisch maximal auf der Oberfläche eines Vaterit-Nanopartikels und eines aggregierten Vaterit-Partikels binden können, geht aus der nachfolgenden Berechnung hervor. Dabei wird von einer Monoschicht der Proteine ausgegangen. In Anlehnung an die Untersuchungen von Schüler *et al.*^[34] wurden die Vaterit-Nanopartikel als Ellipsoid mit einem Durchmesser von 50 nm und einer Breite von 25 nm betrachtet. Für die aggregierten Vaterit-Partikel wurde, aufgrund der elektronenmikroskopischen Untersuchungen aus Kapitel 7, Abschnitt 7.2.2 Abb. 7.2, ein Durchmesser von 500 nm und eine Breite von 250 nm angenommen. Die Berechnung der Ellipsoid-Oberfläche der Partikel ($A_{Partikel}$) erfolgte mittels der Näherungsformel nach *Knud Thomsen*.^[198,199]

$$A_{Partikel} = 4\pi \left[\frac{1}{3} \cdot ((a \cdot b)^p + (a \cdot c)^p + (b \cdot c)^p) \right]^{\frac{1}{p}} \quad (8.2)$$

Mit $a = b = 12,5$ nm bzw. 125 nm und $c = 25$ nm bzw. 250 nm und der Näherungskonstante $p = 1,6075$.

Die Berechnung der Fläche, die ein einzelnes globuläres Protein-Molekül auf der Oberfläche des Partikels besetzen kann, wird als Fußabdruck-Fläche (*footprint area*) (A_F) bezeichnet und lässt sich aus dem Volumen (V) bzw. dem Radius (r) des Proteins wie folgt bestimmen.^[200]

$$V = V_{sp} \cdot \frac{M}{N_A} \quad (8.3)$$

Mit dem spezifischen Volumen (V_{sp}), das mit 0,73 mL/g bestimmt ist,^[200] und der Avogadro-Konstante (N_A), die mit $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ definiert ist^[201].

$$r = \left(\frac{3}{4\pi} \cdot V \right)^{\frac{1}{3}} \quad (8.4)$$

$$A_F = \pi \cdot r^2 \quad (8.5)$$

Die theoretisch maximale Anzahl an Protein-Molekülen ($N_{P, theo.}$) die auf der Oberfläche der Vaterit-Nanopartikel und der aggregierten Vaterit-Partikel gebunden sein können ergibt sich aus

der Formel (8.6). Aufgrund der dichtesten Kugelpackung auf einer planaren Oberfläche sind ~ 9% der Fläche unbesetzt.

$$N_{P, theo.} = \frac{A_{Partikel}}{A_F} \cdot 0,91 \quad (8.6)$$

Mit der Oberfläche der Partikel ($A_{Partikel}$) und der Fußabdruck-Fläche des Proteins (A_F).

Basierend auf den Ergebnissen der absoluten Proteinmassenbestimmung anhand des Pierce Assay, (s. Abb. 8.31a) wurde die Anzahl der tatsächlich gebundenen Proteine bestimmt. Hierzu wurde die Masse von einem Vaterit-Nanopartikel bzw. von einem aggregierten Vaterit-Partikel über das Volumen eines Ellipsoids ($V_{Partikel}$) und die Dichte von Vaterit ($\rho = 2,65 \text{ g/cm}^2$)^[33] bestimmt.

$$V_{Partikel} = \frac{4\pi}{3} \cdot a \cdot b \cdot c \quad (8.7)$$

Mit $a = b = 12,5 \text{ nm}$ bzw. 125 nm und $c = 25 \text{ nm}$ bzw. 250 nm .

$$m_{Partikel} = \rho \cdot V_{Partikel} \quad (8.8)$$

Die Masse an gebundenen Proteinen (m_P) wurde anhand des Ergebnisses der Proteinmassenbestimmung von 1 mg Vaterit-Partikel wie folgt berechnet.

$$m_P = 4,65 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \cdot m_{Partikel} \quad (8.9)$$

Daraus ließ sich die tatsächliche Anzahl an gebundenen Protein-Molekülen ($N_{P, tats.}$) pro Vaterit-Nanopartikel bzw. pro Vaterit-Partikel bestimmen.

$$N_{P, tats.} = n \cdot N_A = \frac{m_P}{M} \cdot N_A \quad (8.10)$$

Die Resultate dieser Berechnungen sind in Tab. 8.7 zusammengestellt. Die Berechnung wurde für das Serumprotein Albumin mit einem Molekulargewicht von 66 kDa angestellt.

Tab. 8.7: Resultate der Berechnung für eine grobe Abschätzung wieviel Protein-Moleküle theoretisch auf der Oberfläche eines Vaterit-Nanopartikels und eines aggregierten Vaterit-Partikels binden können.

	A /nm ²	N _{P, theo.}	m _{Partikel} /mg	m _P /g	N _{P, tats.}	N _{P, tats.} /%
Für 1 V-NP:	3354	136,3	4,24·10 ⁻¹⁴	1,97·10 ⁻¹⁹	1,8	1,3
Für 1 V-P:	335401	13625,7	4,24·10 ⁻¹¹	1,97·10 ⁻¹⁶	1797	13,2

Aus der Berechnung geht hervor, dass nur ~ 13% der theoretisch möglichen Anzahl an Albumin-Molekülen auf der Oberfläche der Vaterit-Partikel gebunden sind. Dadurch kann von keiner vollständigen, homogenen Bildung einer Proteinkorona ausgegangen werden.

Der Nachweis von adsorbierten Serumproteinen liefert eine erste Erklärung für die verringerte Umsetzung der Vaterit-Partikel in die Apatit-Spezies (vgl. Abschnitt 8.6.1). Es wird von einer energetischen Stabilisierung der Vaterit-Partikel durch die Proteinadsorption ausgegangen. Dadurch, dass sich allerdings keine vollständige, homogene Proteinkorona ausbildet, weisen die Vaterit-Partikel noch eine ausreichende Labilität auf, um sich aufzulösen und sich in die Apatit-Spezies umzusetzen. Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass die Serumproteine Albumin und Fetuin Ca^{2+} -Ionen komplexieren und somit als Mineralisierungs-Inhibitoren fungieren.^[202-204] Folglich liegen weniger Ca^{2+} -Ionen in Lösung vor und eine Übersättigung mit anschließender Kristallisation der Apatit-Phase tritt erst verzögert, mit fortschreitender Inkubation und Auflösung der Vaterit-Partikel ein, wie es bei den Untersuchungen in Abschnitt 8.6.1 festgestellt wurde.

9

Synthese und Charakterisierung von Hydroxylapatit ausgehend von Vaterit-Partikeln

9.1 Einleitung

Der Hydroxylapatit (HA) gilt seit vielen Jahren als bedeutende Komponente der synthetischen Knochenersatzmaterialien.^[157,205] Seit 1980 findet HA in Form von Blöcken und Granulaten in der Orthopädie und Kieferchirurgie Anwendung.^[206] Obwohl in biologischen Systemen kein stöchiometrisch reiner HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) vorkommt, wird der HA häufig als biologisch aktive Beschichtung auf chirurgischen und zahnmedizinischen Implantaten eingesetzt.^[114,207,208] Ausschlaggebend ist dabei die Bioaktivität, die Osteokonduktivität und die direkte Bindung zum natürlichen Knochen.^[114,115,156,157,209] HA-basierte Keramiken sind die gängigsten Knochenersatzmaterialien.^[209] Dabei handelt es sich um gesinterte Materialien, die aus Herstellungsprozessen mit hohen Temperaturen von 700 °C zu 1200 °C hervorgehen.^[157,206] Folglich besitzen diese Materialien einen hohen Kristallinitätsgrad mit geringer innerer Oberfläche, wodurch die Bioresorption durch Osteoklasten stark beeinträchtigt ist.^[115,205]

Ein wesentlicher Fortschritt in der Entwicklung der Knochenersatzmaterialien wurde durch die Synthese von nanokristallinem HA erreicht, der morphologisch eine sehr hohe Ähnlichkeit zum biologischen Knochenmineral hat.^[205,206] Beispiele von nanokristallinem HA in der medizinischen Anwendung sind NanoBone[®]^[210] und Ostim[®]^[211]. Die Nano-Kristallite besitzen ein hohes Oberflächen zu Volumen-Verhältnis, wodurch die Löslichkeit und damit die Resorbierbarkeit im Vergleich zum gesinterten HA steigt.^[206] Weitere Vorteile liegen in der verbesserten Adhärenz der Osteoblasten, der Differenzierung, der Proliferation und der Ablagerung von calciumhaltigen Materialien auf der Oberfläche von nanokristallinem HA.^[205,208,212,213] Die Synthese von nanokristallinem HA erfolgt bei deutlich niedrigeren Temperaturen von weniger als 100 °C.^[205,212,214]

Neben dem stöchiometrisch reinen HA besteht großes Interesse an nichtstöchiometrischen Apatit-Modifikationen, zu denen der Calcium-defizitäre Hydroxylapatit (CDHA) zählt. Der CDHA ist leicht durch Fällung im neutralen oder basischen Milieu herzustellen, wobei ein amorphes Calciumphosphat (ACP) als Intermediat beschrieben wird.^[5,43,215,216] Die Fällung des ACP erfolgt bei

schnellen Fällungsreaktionen aus stark übersättigter Lösung und einem pH-Wert > 7 .^[120,216] In Gegenwart von Mg^{2+} -, $P_2O_7^{4-}$ - oder CO_3^{2-} -Ionen kann die ACP-Phase stabilisiert und eine Phasenumwandlung in eine geordnetere Phase unterbunden bzw. verzögert werden.^[43,120,215] Mg^{2+} -Ionen sind Bestandteile des humanen Blutserums (s.Kapitel 8, Tab. 8.2), die zusammen mit den Serumproteinen die Kristallisation von HA im übersättigten Blutserum vermeiden.^[5]

Bei Anwesenheit von Fremdionen (wie z. B. Na^+ , Mg^{2+} und CO_3^{2-}) im Reaktionsmedium können diese, aufgrund des nichtstöchiometrischen Charakters des CDHA, auch zu einem kleinen Anteil in den Kristall eingebaut werden.^[1,35,175] Folglich wird der CDHA in erster Näherung als HA mit Defekten durch Leer-, Fehlstellen und Fremdionen beschrieben, wodurch eine Variation der Parameter der Elementarzelle resultiert und eine direkte Strukturbestimmung des CDHA erschwert wird.^[217] Doch genau diese Defekte führen zur Bildung eines dem biologischen Knochenmineral ähnlichen Apatits mit kleinen Kristallitgrößen, einer besseren Löslichkeit und damit gesteigerten Bioresorption gegenüber dem stöchiometrischen, kristallinen HA.^[120,187,215] Aufgrund dessen ist der CDHA ein vielversprechendes Material als synthetisches Knochenersatzmaterial.

Basierend auf den Ergebnissen des Kapitels 8, wurde die Reaktivität der in Kapitel 7 synthetisierten Vaterit-Partikel ausgenutzt, um eine direkte Syntheseroute der HA-Partikel mit chemisch und biologisch ähnlichen Eigenschaften zum biologischen Knochenmineral zu entwickeln. Dabei sollte sowohl der Einfluss der Reaktionstemperatur als auch die Effekte von zusätzlichen Fremdionen (Mg^{2+} und HCO_3^{2-}) und Serumproteinen auf die Reaktion geklärt werden. In *in vitro* Experimenten an Osteoblasten und Endothelzellen erfolgte eine erste Beurteilung der synthetisierten HA-Partikel im Hinblick auf eine medizinische Anwendung.

9.2 Materialien und Methoden

Für die nachfolgenden Synthesen wurden die synthetisierten und charakterisierten Vaterit-Partikel aus Kapitel 7 verwendet.

Als Referenzsubstanz wurde ein kommerziell erworbener Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, Sigma Aldrich, $\geq 97\%$, 677418) verwendet.

9.2.1 Synthesevorschriften

Standardvorschrift

Basierend auf den Inkubationen aus Kapitel 8, wurden für die Synthese von Hydroxylapatit (HA) 1 mg/mL (10 mM) Vaterit-Partikel in einer kommerziell erworbenen Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS: *phosphate buffered saline*, D8537 Sigma Aldrich) unter mechanischem Rühren bei 500 U/min und 50 °C für 3 Stunden zur Reaktion gebracht. Die Aufreinigung erfolgte durch Zentrifugation bei 9000 U/min für 15 Minuten und mehrfachem Waschen des erhaltenen Feststoffes mit Wasser und Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, Sigma Aldrich, $\geq 99,8\%$). Der erhaltene Feststoff wurde im Hochvakuum bis zur Massenkonstanz getrocknet und anschließend charakterisiert.

Modifizierungen der Standardvorschrift

Es wurde der Effekt von zusätzlichen 42 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 , Sigma Aldrich, $\geq 99,7\%$) in PBS und einem pH-Wert von 7,4 untersucht. Der pH-Wert wurde mit 1 molarer HCl und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Carl Roth, $\geq 99,9\%$) eingestellt. Die Reaktion wurde nach Standardvorschrift durchgeführt und die Reaktionszeit angepasst.

Weiterhin wurde der Effekt von Mg^{2+} -Ionen auf die Umsetzung von Vaterit zu HA geprüft. Hierfür wurden 1,5 mM, 7,5 mM und 15,0 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, $\geq 99,0\%$) in PBS gelöst und dann die Reaktion nach der Standardvorschrift durchgeführt.

Abschließend wurde noch der Effekt von Serumproteinen untersucht. Hierzu wurden 10% fetales Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*) dem PBS zugesetzt und dann die Reaktion von 1 mg/mL Vaterit Partikel bei Raumtemperatur verfolgt.

Für die *in vitro* Verwendung der HA-Partikel wurde auf den Einsatz von sterilen Reagenzien und keimfreien Reaktionsgefäßen während des gesamten Herstellungsprozesses besonderen Wert gelegt. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße bei 180 °C im Trockenschrank für 24 Stunden ausgeheizt.

9.2.2 Chemische Charakterisierungsmethoden

Mit Hilfe von zwei potentiometrischen Elektroden und einer photometrischen Elektrode wurde der Reaktionsverlauf verfolgt. Hierfür kamen die in Tab. 9.1 aufgeführten Elektroden zum Einsatz.

Tab. 9.1: Angaben zu den verwendeten Elektroden.

Elektrode	Hersteller	Serien-Nr.
Ca ²⁺ -Ionenselektiven Polymembranelektrode (ISE)	Metrohm	6.0508.110
Referenzelektrode (LL ISE <i>Reference Electrode</i>)	Metrohm	6.0750.100
Trübheitselektrode mit optischem Sensor (523 nm) (<i>Spectrosense</i>)	Metrohm	6.1109.110
pH-Elektrode (<i>Glass iUnitrode Electrode</i>)	Metrohm	6.0278.300

Die Reaktionen wurden in einem 150 mL zylindrischen Glasgefäß mit einem Reaktionsvolumen von 100 mL durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf die Umsetzungsgeschwindigkeit der Standardvorschrift untersucht (24 °C und 50 °C). Zur Bestimmung der freien Ca²⁺-Ionenkonzentration in Lösung wurden Kalibrierungen durchgeführt. Hierzu wurden Standardlösungen mit einer definierten Ca²⁺-Konzentration von 0,25 mM bis 1,25 mM in der entsprechenden Reaktionslösung (ohne Vaterit-Partikel) hergestellt und bei der jeweils bestimmten Reaktionstemperatur vermessen. Detaillierte Angaben sind dem Anhang A, Abschnitt 11.7 zu entnehmen. Somit wurde die Berechnung der Ca²⁺-Ionenkonzentrationen in den Reaktionslösungen ermöglicht. Eine Kalibrierung der pH-Elektrode wurde im Bereich von pH 4 – pH 10 mit den kommerziell erworbenen pH Standard-Pufferlösungen pH 4,008 (Fluka, 33593-1L), pH 6,865 (Fluka, 33594-1L) und pH 9,950 (Roth, P716.2) durchgeführt.

Die synthetisierten Produkte wurden mittels der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) morphologisch untersucht. Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte mit der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD: *X-ray diffraction*) und der Fourier-Transformation-Infrarot- (FT-IR) Spektroskopie. Bei den Endprodukten wurde eine quantitative Phasenanalyse mittels Vollprofilanpassung der XRD-Daten durchgeführt. Hierfür wurde der fundamentale Parameter-Ansatz, entsprechend der Implementierung aus TOPAS Academic Version 6, verwendet.^[135] Detaillierte Angaben zu den Messmethoden bzw. Geräteparametern sind dem Anhang A, Abschnitt 11.1 zu entnehmen.

Zeta-Potential-Messungen von Partikeln erfolgten in einer Konzentration von 500 µg/mL einer 1 mM KCl-Lösung und wurden am Zetasizer Nano Series Instrument der Firma Malvern durchgeführt. Die Desorption der an die Partikel gebundenen Proteine, sowie die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pierce Assay, erfolgte analog zur Vorgehensweise in Kapitel 8, Abschnitt 8.2.3. Die Identifizierung und die Quantifizierung der Serumproteine erfolgte durch Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS: *liquid-chromatography mass-spectrometry*) nach Schöttler *et al.*^[107]. Die Probenpräparation und die Durchführung der Zeta-Potential Messungen und der Protein-Analysen erfolgten durch [REDACTED] aus der Gruppe von

██████████, unter Projektleitung von ██████████ am MPIP in Mainz.

9.2.3 Biologische Methoden – *in vitro* Studien

Anhand von Zytotoxizitäts-Tests (MTS und LDH) wurde der Effekt der nach Standardvorschrift synthetisierten Partikel auf die Stoffwechselaktivität der humanen Osteoblasten-Zelllinie MG-63 untersucht. Die Biokompatibilität der synthetisierten Partikel wurde an einer humanen Osteoblasten-Zelllinie MG-63 und an primären humanen Osteoblasten (pOB), sowie an primären humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) untersucht. Mit Hilfe eines kommerziell erworbenen *Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit* (ALP, Sigma Aldrich, 86R) wurde die Produktion der alkalischen Phosphatase (ALP) von MG-63 Zellen nachgewiesen, die als osteogener Differenzierungsmarker dient (s. Kapitel 5, Abschnitt 5.3).

Die Kultivierungs- und Wachstumsbedingungen der verwendeten Zellen, sowie die genauen Durchführungen der *in vitro* Studien sind dem Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3 zu entnehmen.

9.3 Ergebnisse

9.3.1 Synthese der Hydroxylapatit-Partikel ausgehend von Vaterit-Partikeln

Für die Synthese der Hydroxylapatit (HA) -Partikel wurden 10 mM Vaterit-Partikel in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) unter Rühren zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde sowohl bei Raumtemperatur (24 °C), als auch bei 50 °C durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe einer Ca^{2+} -Ionenselektiven Elektrode (ISE), einer pH-Elektrode und einer Trübheitselektrode verfolgt. Die Charakterisierung der entstandenen Produkte erfolgte durch Röntgenbeugungs- (XRD) Untersuchungen und durch FT-IR-Spektroskopie. Die Ergebnisse der Reaktion bei 24 °C sind in Abb. 9.1 dargestellt.

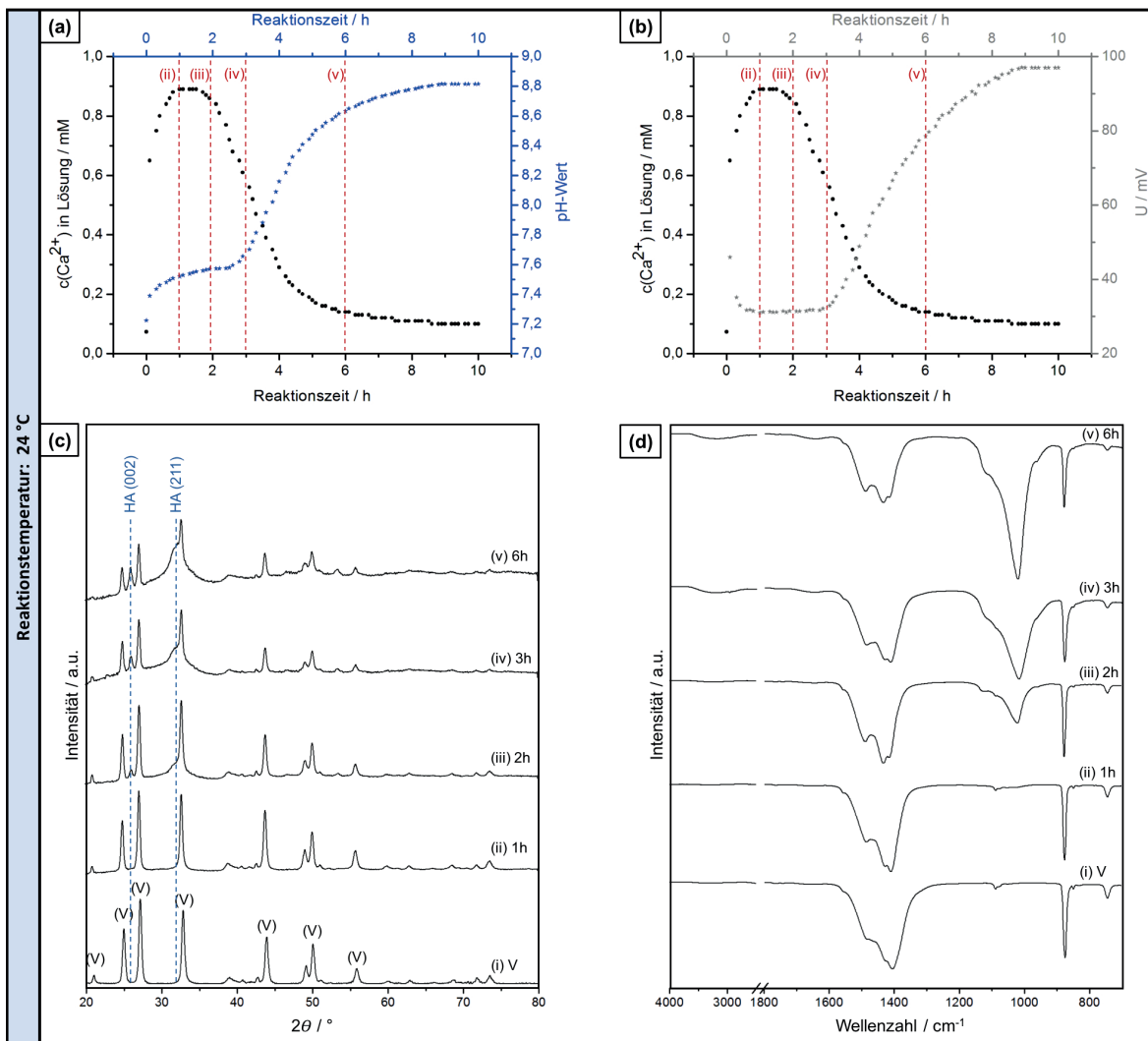


Abb. 9.1: (a), (b) Ergebnisse der Kontrolle des Reaktionsverlaufs anhand der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration (schwarze Messpunkte), des pH-Werts (blaue Messpunkte) und des photometrischen Signals (graue Messpunkte) in der Reaktionslösung aufgetragen gegen die Reaktionszeit. (c) Pulverdiffraktogramme mit Kennzeichnung der Reflexlagen von Vaterit (V)^[33] und von Hydroxylapatit (HA)^[70]. (d) IR-Spektren (i) der eingesetzten Vaterit-Partikel, (ii) nach 1 h, (iii) nach 2 h, (iv) nach 3 h und (v) nach 6 h Reaktionszeit in PBS bei 24 °C.

Anhand des Ca^{2+} -Signals der ISE ließ sich in der ersten Stunde ein Anstieg der gelösten Ca^{2+} -Ionen auf 0,9 mM nachweisen. Über einen Zeitraum von etwa einer weiteren Stunde blieb das Ca^{2+} -Signal konstant bei 0,9 mM und nahm erst nach der zweiten Stunde Reaktionszeit wieder stetig ab, bis es nach neun Stunden bei etwa 0,1 mM konstant blieb. Die Reaktionskontrollen mittels XRD- und FT-IR-Untersuchungen (s. Abb. 9.1c und d) zeigten noch nach einer Stunde das Reflexprofil des Vaterits und die Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe von Vaterit (vgl. Kapitel 7, Abschnitt 7.3.1). Erst nach der zweiten Stunde konnten zwei weitere Reflexe bei $2\theta \sim 26^\circ$ und $2\theta \sim 32^\circ$ nachgewiesen werden, die dem Hydroxylapatit (HA) zuzuordnen sind.^[167–169] Gleichzeitig wurden anhand des IR-Spektrums zusätzliche Banden bei $\sim 1030 \text{ cm}^{-1}$ und $\sim 963 \text{ cm}^{-1}$ identifiziert, die der asymmetrischen und der symmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe des HA entsprechen.^[123,171] Sowohl die beiden Reflexe als auch die Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe nahmen über den weiteren Reaktionsverlauf kontinuierlich in ihrer Intensität zu. Gleichzeitig konnte eine Abnahme der Intensitäten der Reflexe und Banden von Vaterit beobachtet werden. Aus den REM-Aufnahmen in Abb. 9.2 geht bereits nach einer Stunde eine morphologische Änderung hervor. Zwischen den ellipsoiden Vaterit-Partikeln ließen sich erste plättchenförmige Strukturen erkennen, die im Laufe der Reaktionszeit zunahmten und nach sechs Stunden als dominierende Struktur vorlagen. Parallel zum Ca^{2+} -Signal der ISE wurde der pH-Wert und die Spannung der Trübheitselektrode aufgezeichnet. Aus Abb. 9.1a und b geht hervor, dass sowohl der pH-Wert als auch die Spannung der Trübheitselektrode ab einer Reaktionszeit von etwa drei Stunden kontinuierlich anstiegen und nach etwa neun Stunden in einen konstanten Wert übergingen.

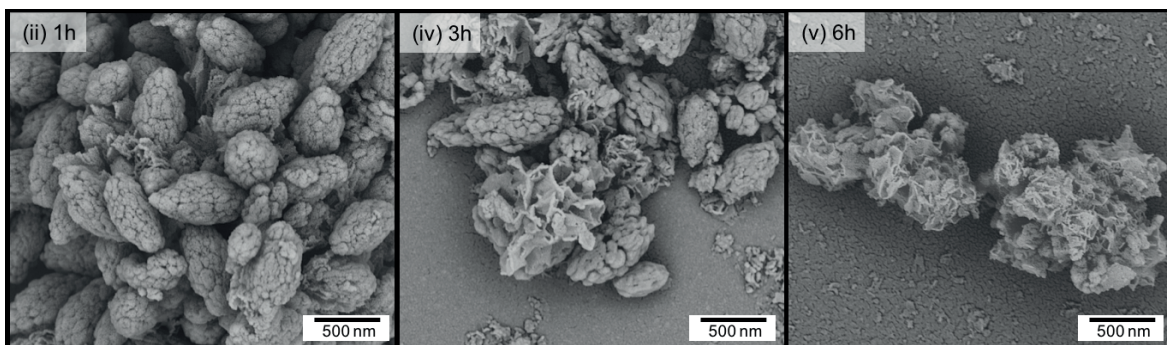


Abb. 9.2: REM-Aufnahmen der Produkte aus der Reaktion von Vaterit-Partikel in PBS bei 24°C nach (ii) 1 h, (iv) 3 h und (v) 6 h Reaktionszeit.

Analog zur Reaktion bei 24°C wurde die Reaktion bei einer erhöhten Temperatur von 50°C durchgeführt. Die Ergebnisse der Elektroden-Messungen, sowie der XRD- und FT-IR-Untersuchungen sind in Abb. 9.3 dargestellt. Anhand des Ca^{2+} -Signals der ISE ließ sich bereits in den ersten 15 Minuten ein direkter Anstieg der gelösten Ca^{2+} -Ionen auf 0,6 mM feststellen. Unmittelbar im Anschluss nahm das Ca^{2+} -Signal wieder ab und erreichte nach 1,5 Stunden einen Wert von annähernd 0,0 mM und blieb über die weitere Reaktionszeit bis hin zu drei Stunden unverändert. Vergleichbar zur Reaktion bei 24°C stieg sowohl der pH-Wert als auch die Spannung der

Trübheitselektrode am Wendepunkt (nach 30 Minuten bei 50 °C und nach 3 Stunden bei 24 °C) des Ca^{2+} -Signalverlaufs an (s. Abb. 9.3a und b). Der pH-Wert erhöhte sich auf einen Wert zwischen pH 8,7 und 8,8. Die Spannung der Trübheitselektrode stieg auf einen Wert von ~ 140 mV an und flachte im weiteren Reaktionsverlauf wieder kontinuierlich ab. Nach drei Stunden Reaktionszeit wurde ein Wert von ~ 85 mV erreicht. Die Reaktionskontrollen anhand der XRD- und FT-IR-Untersuchungen (s. Abb. 9.3c und d) zeigten, dass bereits nach 30 Minuten Reaktionszeit bei 50 °C ein vergleichbares Reflexprofil und IR-Spektrum erhalten wurde, wie nach drei Stunden Reaktion bei 24 °C (vgl. Abb. 9.1c und d).

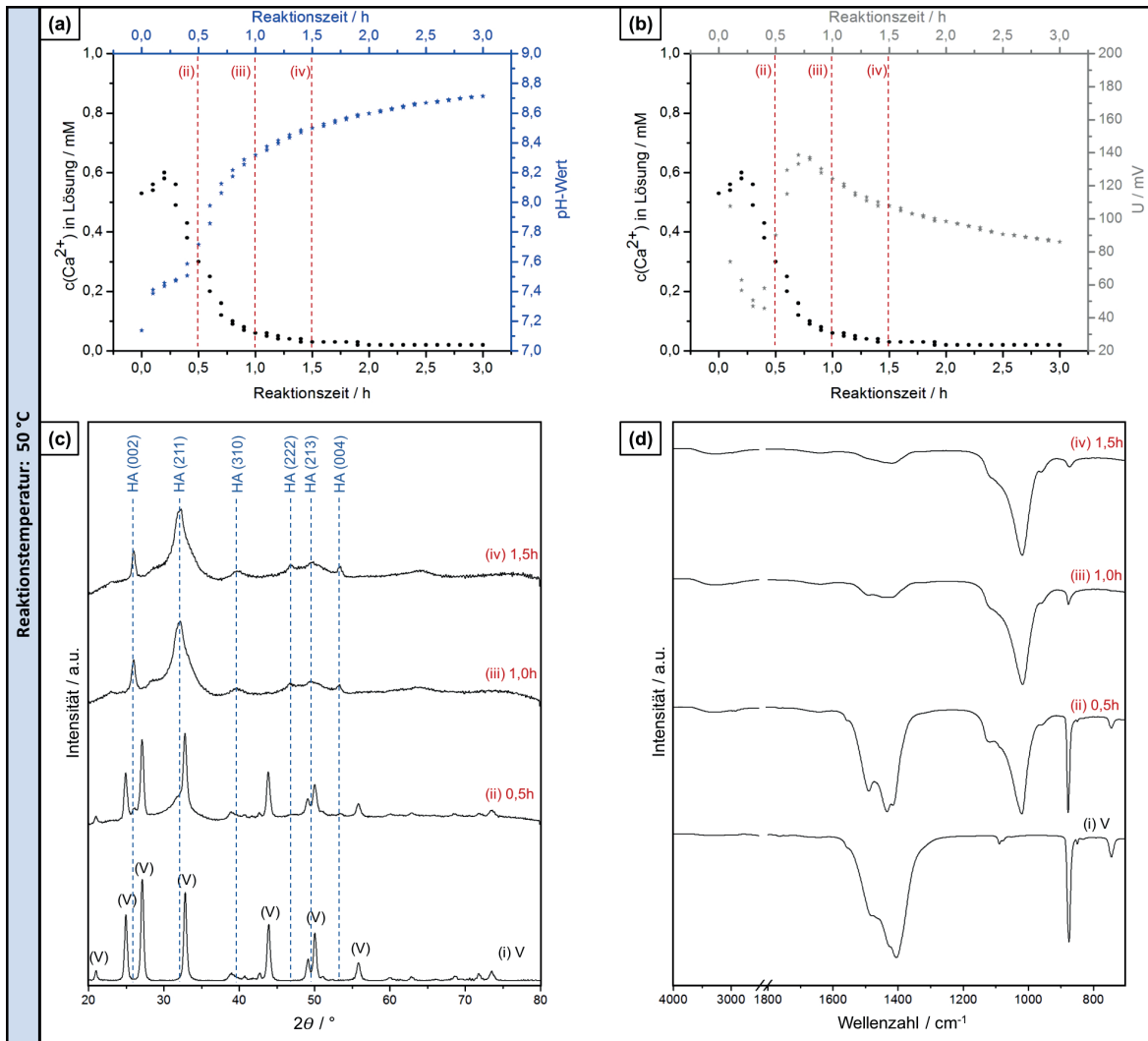


Abb. 9.3: (a), (b) Ergebnisse der Kontrolle des Reaktionsverlaufs anhand der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration (schwarze Messpunkte), des pH-Werts (blaue Messpunkte) und des photometrischen Signals (graue Messpunkte) in der Reaktionslösung aufgetragen gegen die Reaktionszeit. (c) Pulverdiffraktogramme mit Kennzeichnung der Reflexlagen von Vaterit (V)^[33] und von Hydroxylapatit (HA)^[170]. (d) IR-Spektren (i) der eingesetzten Vaterit-Partikel, (ii) nach 0,5 h, (iii) nach 1,0 h und (iv) nach 1,5 h Reaktionszeit in PBS bei 50 °C.

Nach weiteren 30 bzw. 60 Minuten Reaktionszeit konnten keine signifikanten Änderungen im Reflexprofil der XRD-Untersuchung und im IR-Spektrum festgestellt werden. Die Reflexlagen sind

dem HA zuzuordnen.^[167–169] Gleichfalls entsprechen die Banden bei $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ und $\sim 962\text{ cm}^{-1}$ der asymmetrischen und der symmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe des HA.^[123,171]

Die Endprodukte beider Reaktionen wurden abschließend mittels quantitativer Phasenanalyse der XRD-Daten untersucht. Weiterhin wurde das PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis, anhand der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der PO_4^{3-} - und CO_3^{2-} -Gruppe, bestimmt und mit dem kommerziell erworbenen HA verglichen. Die Resultate sind in Abb. 9.4 dargestellt.

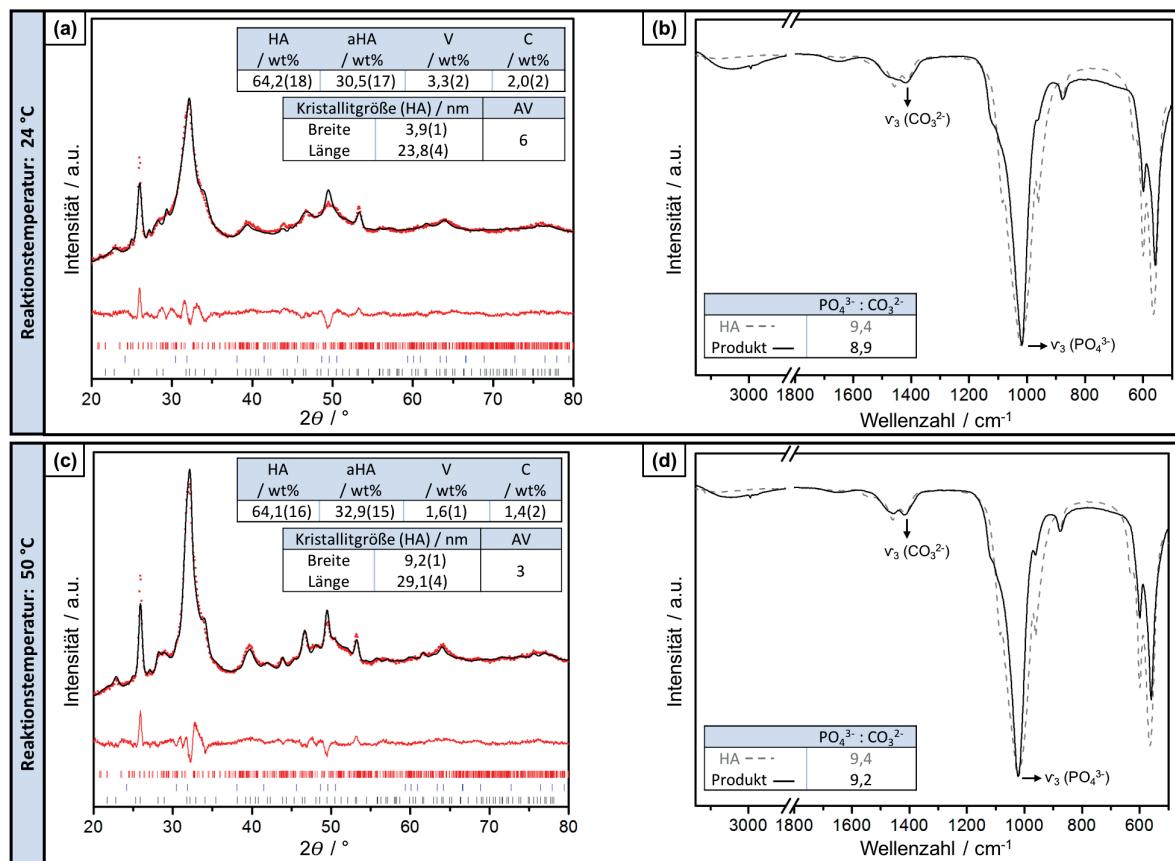


Abb. 9.4: Charakterisierung der Endprodukte der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit-Partikel in PBS bei 24 °C (oben) und bei 50 °C (unten). (a, c) Pulverdiffraktogramme mit quantitativer Phasenanalyse durch Vollprofilanpassung, die roten Punkte stellen die Messdaten dar, die schwarze Linien zeigen die Anpassungen und die roten Linien geben die Differenzen an, rote Reflex-Markierungen = Vaterit (V)^[33], blaue Reflex-Markierungen = Calcit (C)^[30] und schwarze Reflex-Markierungen = HA^[170]. aHA = amorpher HA und AV = Aspektverhältnis der Kristallite des HA. (b, d) IR-Spektren der Endprodukte (schwarz) und der kommerziell erworbenen HA-Referenz (graue unterbrochene Linie) unter Angabe des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses anhand der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der PO_4^{3-} - und CO_3^{2-} -Gruppe. Die Spektren sind auf die asymmetrische P-O Streckschwingung (ν_3) der PO_4^{3-} -Gruppe normiert.

Bei beiden Endprodukten konnte HA als dominierende Phase identifiziert werden. Spuren von Vaterit und Calcit konnten noch im Reaktionsprodukt bei einer Temperatur von 24 °C nachgewiesen werden (s. Abb. 9.4a). Hingegen sind die Anteile an Vaterit und Calcit im Reaktionsprodukt bei einer Temperatur von 50 °C vernachlässigbar gering (s. Abb. 9.4c). Die IR-Spektren beider Produkte (s. Abb. 9.4b und d) zeigten die für HA charakteristischen Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe bei 1032 cm^{-1} , 962 cm^{-1} , 602 cm^{-1} und 571 cm^{-1} (vgl. Kapitel 8, Abschnitt 8.3.2, Tab. 8.5).^[123,171] Zusätzlich konnten noch Banden im Bereich von $1487\text{ cm}^{-1} - 1411\text{ cm}^{-1}$ und bei $\sim 872\text{ cm}^{-1}$

nachgewiesen werden, die der asymmetrischen C-O Streckschwingung und der O-C-O Kipp-Deformationsschwingung der CO_3^{2-} -Gruppe zuzuordnen sind.^[140]

Vergleichbar mit den Resultaten der Inkubationen aus Kapitel 8, Abschnitt 8.3.2, konnte bei beiden Endprodukten ein stark verbreitertes Reflexprofil des HA beobachtet werden, mit einer Verschmelzung der (211), (300) und (202) Reflexe bei $2\theta \sim 32^\circ$ (s. Abb. 9.4a und c). Dieser Nachweis deutet einerseits auf den Einbau von Fremdionen in den HA-Kristall hin^[167–169,175,186] und andererseits auch auf nanoskopische Kristallite^[37,169]. Die Resultate der FT-IR-Spektroskopie beider Produkte zeigten allerdings, dass ein vergleichbares PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis wie im kommerziell erworbenen HA vorlag (s. Abb. 9.4b und d). Somit kann der Einbau von CO_3^{2-} -Ionen in den HA-Kristall ausgeschlossen werden kann. Das geringere PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis von 8,9 im HA-Produkt aus der Reaktion bei 24°C ist auf die Spuren von Vaterit und Calcit zurückzuführen. Mittels quantitativer Phasenanalyse wurde sowohl ein kristalliner Anteil als auch ein amorpher Anteil des HA modelliert (s. Abb. 9.4a und c). Hierbei erfolgte die Modellierung des amorphen HA-Anteils anhand des Strukturmodells des kristallinen HA^[170] unter der Vorgabe einer sehr geringen Kristallitausdehnung von 3 nm (vgl. Anhang A, Abschnitt 11.1). Somit war es möglich eine Aussage bezüglich der Kristallitgröße des kristallinen Anteils der HA-Phase zu treffen und diese reaktionsübergreifend zu vergleichen. Es resultierte bei einer erhöhten Reaktionstemperatur von 50°C ein Endprodukt mit HA-Kristalliten im Aspektverhältnis von ~ 3 (s. Abb. 9.4c). Im Vergleich dazu wurde bei einer Reaktionstemperatur von 24°C ein Endprodukt mit HA-Kristalliten mit einem doppelten Aspektverhältnis von ~ 6 und eine kleinere Kristallitgröße erhalten (s. Abb. 9.4a). Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die Morphologie der Endprodukte genauer untersucht. Die Resultate sind in Abb. 9.5 aufgeführt. Bei beiden Produkten wurde eine plättchenförmige Morphologie anhand der REM-Aufnahmen nachgewiesen (s. Abb. 9.5a, b, e und f). Wobei die Morphologie der HA-Partikel aus der Reaktion bei 24°C eine feinere Struktur aufwies (vgl. Abb. 9.5b), als die HA-Partikel aus der Reaktion bei 50°C (vgl. Abb. 9.5f). Aus den TEM-Aufnahmen (s. Abb. 9.5c, d, g und h) geht hervor, dass es sich um sehr dünne Strukturen handelt, die sich an den Kanten einzurollen scheinen.

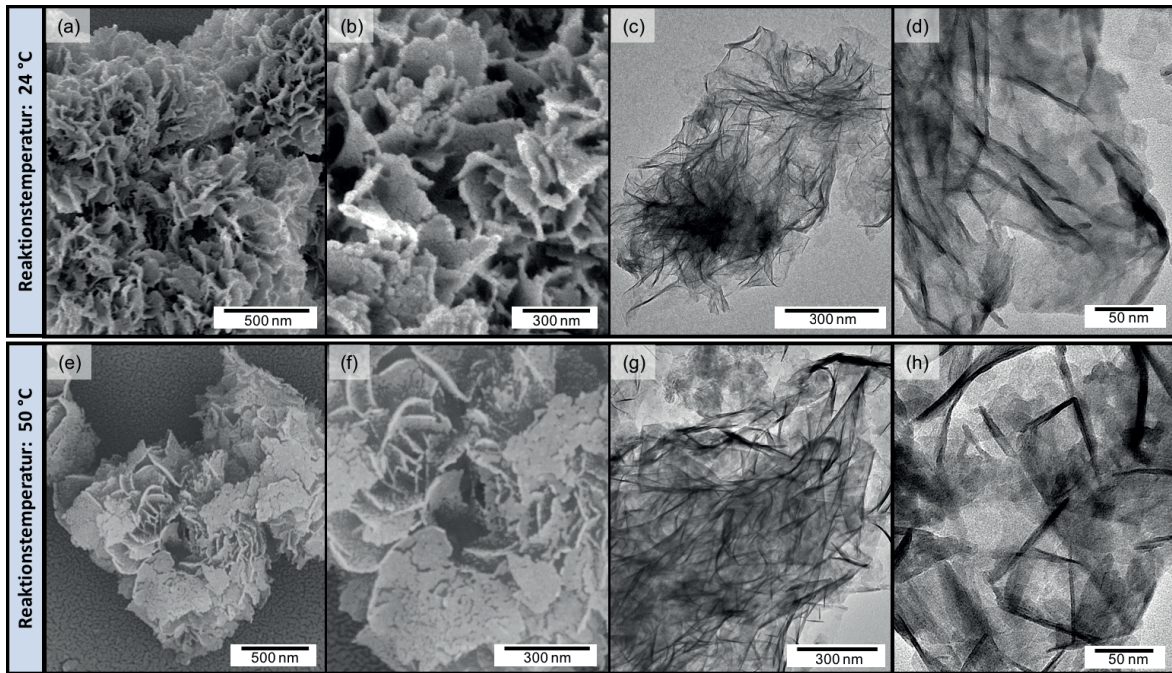


Abb. 9.5: Morphologische Eigenschaften der Endprodukte der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit in PBS bei 24 °C (oben) und bei 50 °C (unten) anhand von REM- (a), (b), (e), (f) und TEM- (c), (d), (g), (h) Aufnahmen. Die REM-Aufnahmen (a) und (b) wurden von [REDACTED], am MPIP Mainz in der Arbeitsgruppe von [REDACTED], angefertigt und alle TEM-Aufnahmen von [REDACTED], an der JGU Mainz im Arbeitskreis von [REDACTED].

Abschließend ist festzuhalten, dass durch die Reaktion von 10 mM Vaterit-Partikel in PBS HA-Aggregate entstehen, die sich aus nanokristallinen HA-Partikeln zusammensetzten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Reaktionstemperatur um nahezu das Doppelte eine Verkürzung der Reaktionszeit um das Sechsfache bewirkt. In der abschließenden Diskussion, am Ende dieses Kapitels, wird näher auf den Reaktionsmechanismus eingegangen.

9.3.2 Effekte von Additiven in PBS auf die Synthese von Hydroxylapatit

Effekt von 42 mM Natriumhydrogencarbonat in PBS

In diesem Abschnitt wurde der Effekt von Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) auf die Synthese von Hydroxylapatit (HA) untersucht. Hierbei wurde die Konzentration von NaHCO_3 mit 42 mM in PBS so gewählt, dass es dem HCO_3^- zu PO_4^{3-} Ionenverhältnis der simulierten Körperflüssigkeit (SBF, *simulated body fluid*) entspricht (vgl. Kapitel 8, Abschnitt 8.3.2 Tab. 8.4). In der SBF-Lösung ist die Phosphationen-Konzentration 10-fach niedriger als in der PBS-Lösung. Deshalb wurde in der PBS-Lösung eine 10-fach höhere NaHCO_3 -Konzentration eingesetzt, wie sie in der SBF-Lösung enthalten ist. Die Synthese der HA-Partikel erfolgte nach der Standardvorschrift mit 10 mM Vaterit-Partikel bei 50 °C. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe einer Ca^{2+} -Ionenselektiven Elektrode (ISE), einer pH-Elektrode und einer Trübheitselektrode untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 9.6 dargestellt.

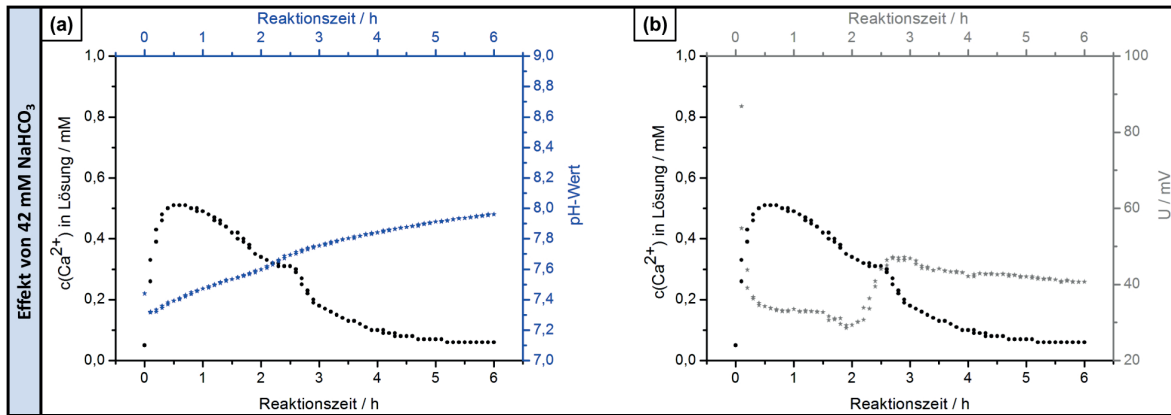


Abb. 9.6: (a), (b) Ergebnisse der Kontrolle des Reaktionsverlaufs von 10 mM Vaterit Partikel in PBS mit 42 mM NaHCO₃ anhand der freien Ca²⁺-Ionenkonzentration (schwarze Messpunkte), des pH-Werts (blaue Messpunkte) und des photometrischen Signals (graue Messpunkte) in der Reaktionslösung aufgetragen gegen die Reaktionszeit.

Im Vergleich zur Reaktion in reinem PBS bei 50 °C (s. Abb. 9.3a und b), zeigte sich zunächst ein vergleichbarer Anstieg des Ca²⁺-Signals der ISE in den ersten 15 Minuten. Allerdings wurde ein signifikanter Unterschied in der Abnahme des Ca²⁺-Signals festgestellt. Die Anwesenheit des in PBS gelösten NaHCO₃ scheint die Kristallisation der HA-Spezies zu verzögern. Dadurch wird eine vollständige Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Spezies erst nach sechs Stunden Reaktionszeit erreicht. Über die gesamte Reaktionszeit wurde ein kontinuierlicher Anstieg des pH-Werts auf ~ 8 aufgezeichnet. Der geringe pH-Anstieg um einen Wert von ~ 0,6 ist auf die Pufferwirkung von zusätzlichem TRIS/HCl zurückzuführen (vgl. Abschnitt 9.2.1). Ein weiterer wesentlicher Unterschied fällt bei der Betrachtung des Spannungssignals der Trübheitselektrode auf. Der Anstieg des Signals ist deutlich geringer als bei den vorherigen Reaktionsverläufen. Diese Beobachtung deutet auf die Bildung größerer Partikel hin, die das Signal der Trübheitselektrode stärker abschwächen. Die Charakterisierung des entstandenen Produkts erfolgte durch XRD-Untersuchungen mit quantitativer Phasenanalyse anhand der Vollprofilanpassung der XRD-Daten und durch FT-IR-Spektroskopie. Die Ergebnisse sind in Abb. 9.7 dargestellt. Eine vollständige Umsetzung der Vaterit-Partikel in den HA konnte nachgewiesen werden, mit einem vernachlässigbar geringen Anteil an Calcit. Das Aspektverhältnis der gebildeten HA-Kristallite ist ~ 3 (s. Abb. 9.7a). Wie auch bei den vorherigen Reaktionsprodukten ließ sich ein verbreitertes Reflexprofil beobachten. Mittels FT-IR-Spektroskopie wurde das PO₄³⁻ zu CO₃²⁻-Ionenverhältnis, anhand der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der PO₄³⁻- und CO₃²⁻-Gruppe, bestimmt und mit dem kommerziell erworbenen HA verglichen. Bei der in dieser Reaktion entstanden HA-Spezies konnte ein deutlich verringertes PO₄³⁻ zu CO₃²⁻-Ionenverhältnis von 6,7 bestimmt werden. Dieses Resultat ist ein Indiz für den Einbau von CO₃²⁻-Ionen in den HA-Kristall.

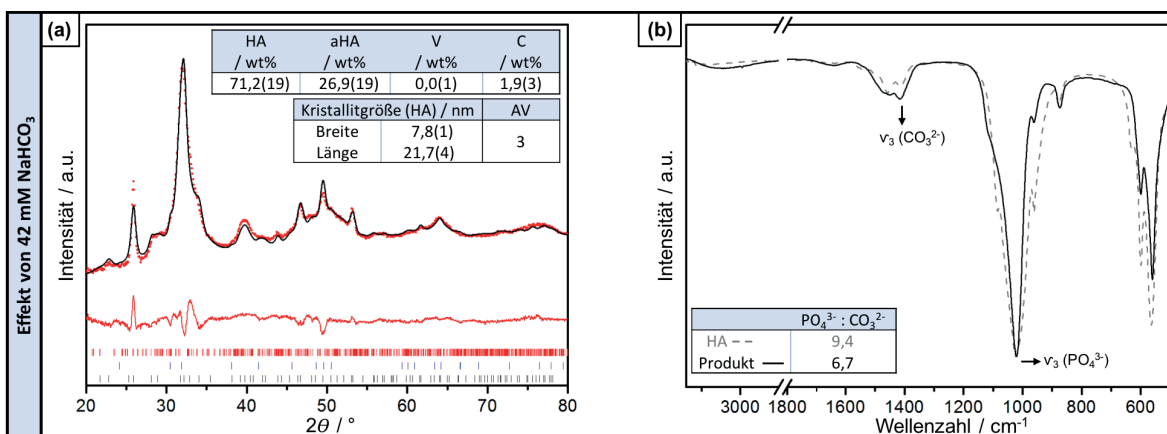


Abb. 9.7: Charakterisierung des Endprodukts der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit in PBS mit 42 mM NaHCO₃. (a) Pulverdiffraktogramm mit quantitativer Phasenanalyse durch Vollprofilanpassung, die roten Punkte stellen die Messdaten dar, die schwarze Linie zeigt die Anpassungen und die rote Linie gibt die Differenzen an, rote Reflex-Markierungen = Vaterit (V)^[33], blaue Reflex-Markierungen = Calcit (C)^[30] und schwarze Reflex-Markierungen = HA^[170]. aHA = amorpher HA und AV = Aspektverhältnis der Kristallite des HA. (b) IR-Spektrum des Endprodukts (schwarz) und der kommerziell erworbenen HA-Referenz (graue unterbrochene Linie) unter Angabe des PO₄³⁻ zu CO₃²⁻ Ionenverhältnisses anhand der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der PO₄³⁻- und CO₃²⁻-Gruppe. Die Spektren sind auf die asymmetrische P-O Streckschwingung (ν_3) der PO₄³⁻-Gruppe normiert.

Morphologisch wurden die entstandenen HA-Partikel mittels REM- und TEM-Aufnahmen untersucht. Den REM-Aufnahmen aus Abb. 9.8a und b ist zu entnehmen, dass sphärische Strukturen mit einem Durchmesser von 1-2 μm entstanden sind, die sich aus kleineren plättchenförmigen Partikeln zusammensetzen. Diese Morphologie erinnert stark an die „Wüstenrosen-ähnliche“ Morphologie des aus SBF entstandenen Carbonat-haltigen Hydroxylapatits (HCA: *hydroxycarbonate apatite*) (vgl. Kapitel 8, Abschnitt 8.3.2 Abb. 8.7). Die TEM-Aufnahmen aus Abb. 9.8c und d zeigen eine sehr dünne plättchenartige Morphologie, mit der Tendenz sich an den Kanten einzurollen.

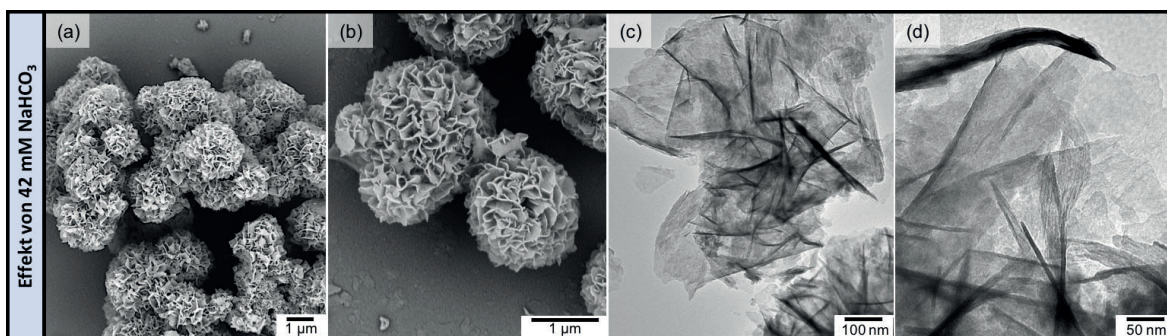


Abb. 9.8: Morphologische Beschaffenheit des Endprodukts der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit in PBS mit 42 mM NaHCO₃ anhand von REM- (a), (b) und TEM- (c), (d) Aufnahmen.

Effekt von Magnesium-Ionen in PBS

Basierend auf den Resultaten aus Kapitel 8 wurde der Effekt von in Lösung befindlichen Mg²⁺-Ionen auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel in die HA-Partikel untersucht. Die Reaktion erfolgte nach der Standardvorschrift mit 10 mM Vaterit-Partikeln bei 50 °C in PBS mit

unterschiedlichen Konzentrationen von 1,5 mM, 7,5 mM und 15,0 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Die Reaktionszeit betrug 3 Stunden. Die Endprodukte wurden anhand von XRD-Untersuchungen und FT-IR-Spektroskopie charakterisiert. Anhand der Pulverdiffraktogramme aus Abb. 9.9a wurde bei allen Endprodukten die Gesamtheit der Reflexe der Ausgangssubstanz, Vaterit, zugeordnet. Mittels FT-IR-Spektroskopie konnten ebenfalls die Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe des Vaterits nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 7, Abschnitt 7.3.1 Tab. 7.1). Zusätzlich konnte hier noch eine schwache und sehr breite Bande im Bereich von $1090\text{-}960\text{ cm}^{-1}$ beobachtet werden, die auf die asymmetrische P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe zurückzuführen ist. Aufgrund der Breite der Bande könnte es sich dabei um eine amorphe Phosphat-Spezies handeln, die mittels XRD-Untersuchungen und aufgrund des hohen kristallinen Anteils nicht nachweisbar war.

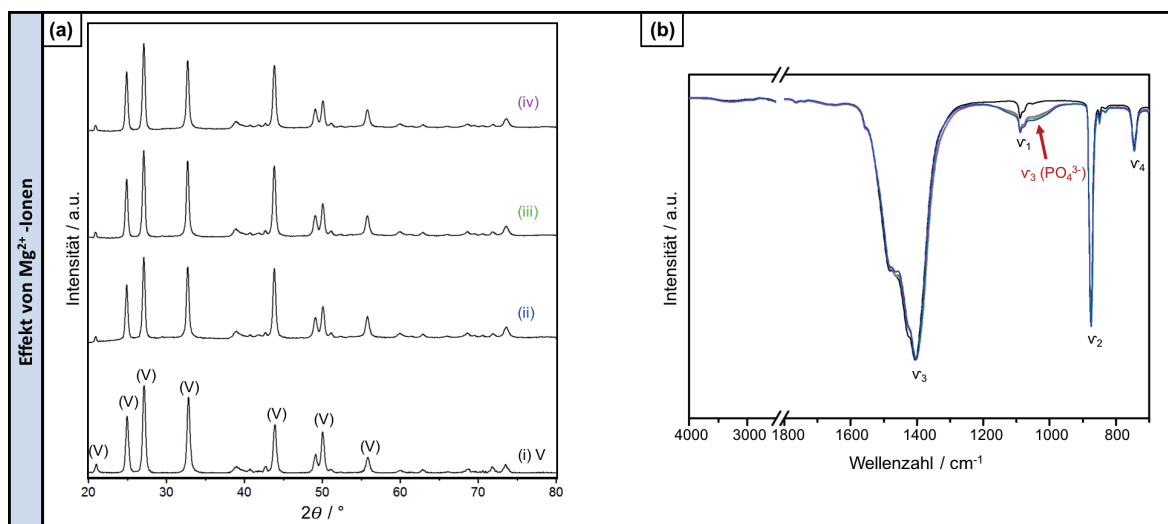


Abb. 9.9: Charakterisierung der Endprodukte nach 3 Stunden Reaktion von (i, schwarz) 10 mM Vaterit-Partikeln in PBS bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ unter Zugabe von (ii, blau) 1,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (iii, grün) 7,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und (iv, magenta) 15,0 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. (a) Pulverdiffraktogramme mit Kennzeichnung der Reflexlagen von Vaterit (V)^[33]. (b) IR-Spektren, normiert auf die intensive O-C-O Kipp-Deformationsschwingung (v_2) der CO_3^{2-} -Gruppe.

Morphologisch zeigten die erhaltenen Feststoffe die typische ellipsoide Form der Vaterit-Partikel (s. Abb. 9.10). Die REM-Aufnahmen der Feststoffe aus der Reaktion in PBS mit 1,5 mM und 7,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ließen zusätzlich vereinzelt plättchenförmige Strukturen erkennen (s. Abb. 9.10a und b, mit Pfeilen gekennzeichnet).

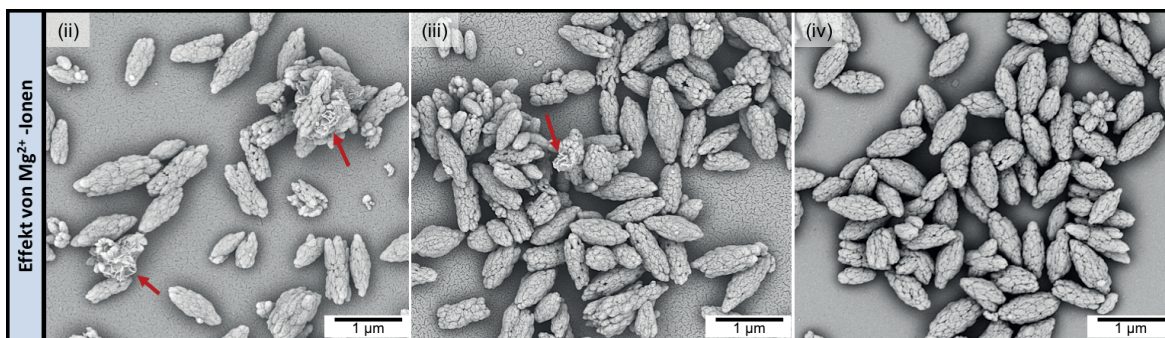


Abb. 9.10: REM-Aufnahmen der Endprodukte nach 3 Stunden Reaktion von 10 mM Vaterit-Partikeln in PBS bei 50 °C unter Zugabe von (ii) 1,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (iii) 7,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und (iv) 15,0 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Effekt von Serumproteinen in PBS

In diesem Abschnitt wurde der Effekt von Serumproteinen auf die Synthese von Hydroxylapatit (HA) untersucht. Hierbei wurden dem PBS 10% (v/v) fetales Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*) zugesetzt und die Reaktion von 10 mM Vaterit-Partikel bei 24 °C mit Hilfe einer Ca^{2+} -Ionenselektiven Elektrode (ISE) und einer pH-Elektrode über einen Zeitraum von 6 Tagen verfolgt. Der resultierende Feststoff wurde nach intensiver Aufreinigung durch mehrfaches Waschen mit Wasser und Ethanol mittels XRD-Untersuchungen und FT-IR-Spektroskopie charakterisiert. Die Morphologie wurde mittels Elektronenmikroskopie (REM und TEM) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 9.11 zusammengefasst. Anhand des Spannungssignals der Ca^{2+} -ISE konnte in Anwesenheit von Serumproteinen, im Vergleich mit den Ergebnissen der Reaktion der Vaterit-Partikel in PBS bei 24 °C (vgl. Abb. 9.1a), eine deutlich verzögerte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen mit einer verringerten Ca^{2+} -Ionenkonzentration festgestellt werden (s. Abb. 9.11a). Die freie Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Reaktionslösung nahm in den ersten 55 Stunden nur geringfügig ab. In diesem Bereich stieg der pH-Wert auf einen Wert von ~ 8 an und blieb relativ konstant. Während der Reaktionszeit von 55 – 75 Stunden kam es zu einem signifikanten Abfall der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration, bei gleichzeitigem Anstieg des pH-Werts. Nachfolgend trat ein erneuter, geringer Anstieg der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Bereich von 75 – 95 Stunden auf. Im weiteren Reaktionsverlauf nahm die freie Ca^{2+} -Ionenkonzentration auf einen konstanten Wert zwischen 0,0 und 0,1 mM ab.

Die Charakterisierung des entstandenen Produkts durch XRD-Untersuchungen mit quantitativer Phasenanalyse zeigte eine nahezu vollständige Umsetzung der Vaterit-Partikel in den HA (s. Abb. 9.11c). Die gebildeten HA-Kristallite wurden mit einem Aspektverhältnis von ~ 3 bestimmt und zeigten im Vergleich zu den HA-Kristalliten der vorherigen Reaktionen eine deutlich kleinere Kristallitgröße. Anhand der REM-Aufnahmen aus Abb. 9.11b1 und b2 lassen sich „Erdnuss-artige“ Strukturen in einer Größe von 200 – 500 nm erkennen. Den TEM-Aufnahmen aus Abb. 9.11b3 und b4 zufolge setzen sich diese Strukturen aus nanoskopischen, sehr dünnen Plättchen zusammen, die sich an den Kanten einzurollen scheinen. Vergleichbar mit der Reaktion von Vaterit in PBS mit 42 mM NaHCO_3 wurde anhand der IR-Spektren ein deutlich verringertes PO_4^{3-} zu CO_3^{2-}

Ionenverhältnis von 6,6 bestimmt (s. Abb. 9.11d). Dieses Resultat ist ein Indiz für den Einbau von CO_3^{2-} -Ionen in den HA-Kristall. Neben den charakteristischen Schwingungsmoden des HA wurden noch zwei zusätzliche Banden bei 1653 cm^{-1} und 1518 cm^{-1} nachgewiesen, die den Schwingungsmoden der Amid-Gruppen der Serumproteine zugeordnet werden können.^[202,218] Die Resultate deuten darauf hin, dass Serumproteine an die HA-Partikel adsorbiert sind.

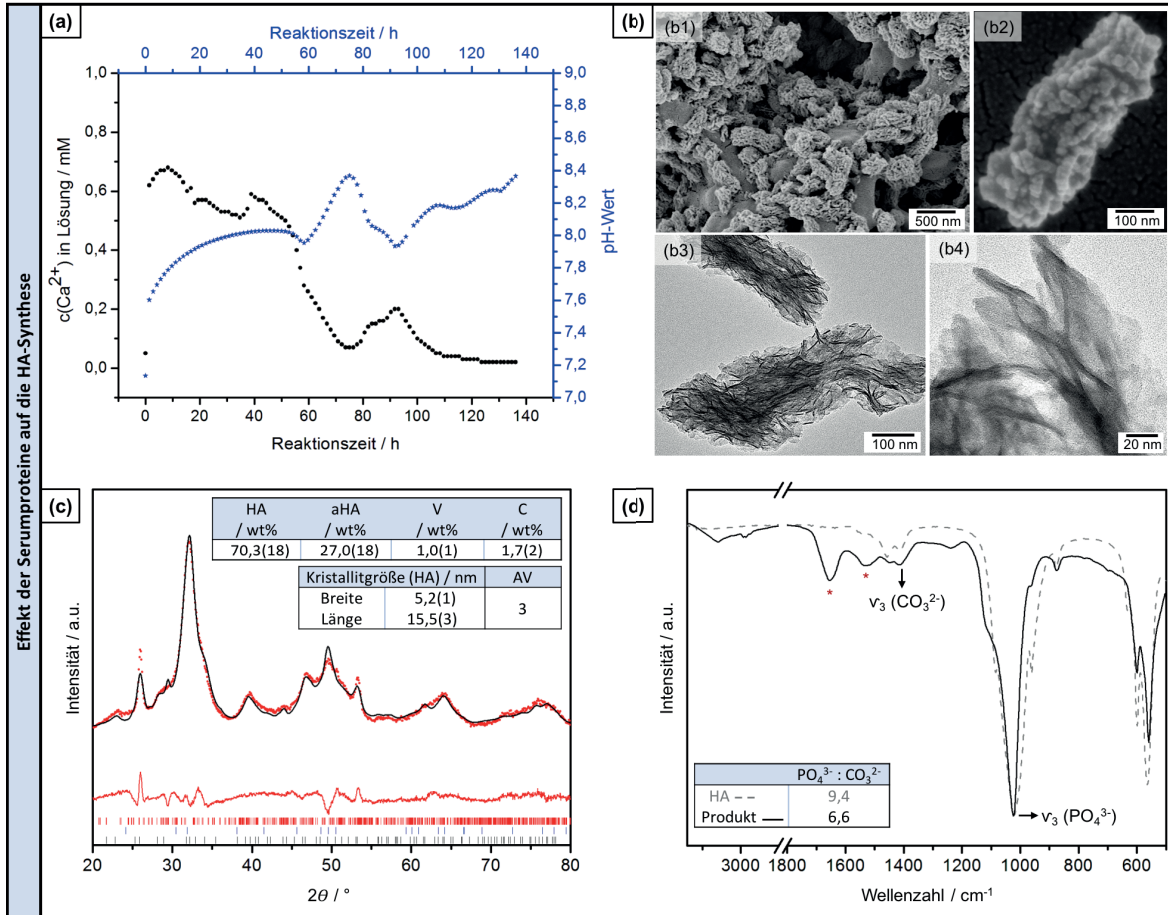


Abb. 9.11: Ergebnisse der Reaktion von 10 mM Vaterit Partikel in PBS mit 10% FBS bei 24 °C und einer Reaktionszeit von 6 Tagen. (a) Kontrolle des Reaktionsverlaufs anhand der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration (schwarze Messpunkte) und des pH-Werts (blaue Messpunkte) in der Reaktionslösung aufgetragen gegen die Reaktionszeit. (b) Morphologie des erhaltenen Produkts nach 6 Tagen anhand von (b1), (b2) REM-Aufnahmen, angefertigt von [REDACTED], am MPIP Mainz in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] und (b3), (b4) TEM-Aufnahmen, angefertigt von [REDACTED], an der JGU Mainz im Arbeitskreis von [REDACTED]. (c) Pulverdiffraktogramm mit quantitativer Phasenanalyse durch Vollprofilanpassung, die roten Punkte stellen die Messdaten dar, die schwarze Linie zeigt die Anpassungen und die rote Linie gibt die Differenzen an, rote Reflex-Markierungen = Vaterit (V)^[33], blaue Reflex-Markierungen = Calcit (C)^[30] und schwarze Reflex-Markierungen = HA^[170]. aHA = amorpher HA und AV = Aspektverhältnis der Kristallite des HA. (d) IR-Spektrum des Endprodukts (schwarz) und der kommerziell erworbenen HA-Referenz (graue unterbrochene Linie) unter Angabe des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses anhand der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der PO_4^{3-} - und CO_3^{2-} -Gruppe. Die Spektren sind auf die asymmetrische P-O Streckschwingung (ν_3) der PO_4^{3-} -Gruppe normiert.

In Kooperation mit [REDACTED], aus der Gruppe von [REDACTED] unter Projektleitung von [REDACTED] am MPIP in Mainz, wurde die Adsorption der Serumproteine näher untersucht. Zunächst wurde anhand von Zeta-Potential-Messungen das Oberflächenpotential der HA-Partikel bestimmt. Hierfür wurden HA-Partikel aus der Synthese nach Standardvorschrift (in PBS, bei 50 °C), HA-Partikel aus der Synthese in PBS mit 42 mM NaHCO₃ und HA-Partikel aus der Synthese in PBS mit 10% FBS vermessen. Die Resultate sind der Abb. 9.12 zu entnehmen. Die HA-Partikel, welche in Anwesenheit von Serumproteinen synthetisiert wurden, zeigen ein deutlich negativeres Zeta-Potential im Vergleich zu den beiden anderen HA-Partikeln. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Adsorption von Serumproteinen an die entstehenden HA-Partikel.

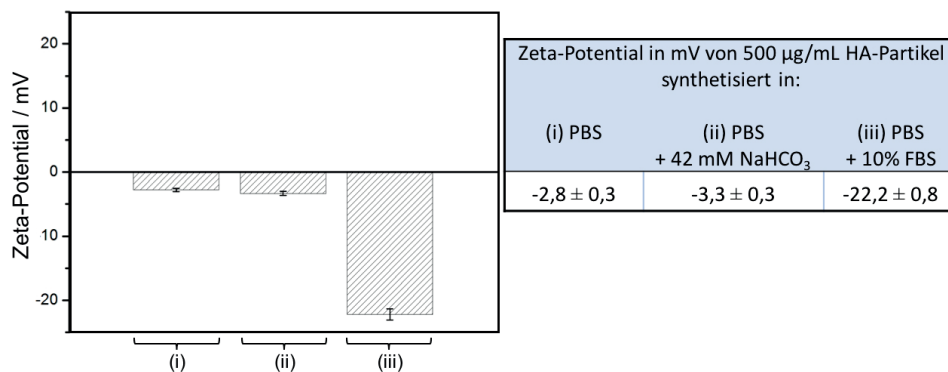


Abb. 9.12: Resultate der Zeta-Potential-Messung als grafische Darstellung (links) und tabellarische Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung (rechts) von 500 µg/mL HA-Partikel in 1 mM KCl. (i) HA-Partikel aus der Synthese nach Standardvorschrift in PBS, (ii) HA-Partikel aus der Synthese in PBS mit 42 mM NaHCO₃ und (iii) HA-Partikel aus der Synthese in PBS mit 10% FBS.

Zur Quantifizierung der an die HA-Partikel gebundenen Proteine wurde eine Desorption, mittels einer TRIS/HCl gepufferten 2%-igen Natriumdodecylsulfat (SDS: *sodium dodecyl sulfate*) -Lösung, durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde durch Verwendung eines Pierce Assays mit 0,4 mg/mL ± 0,1 mg/mL bestimmt.

Anhand der Flüssigchromatographie gekoppelten Massenspektroskopie (LC-MS: *liquid-chromatography mass-spectroscopy*) wurden die desorbierten Proteine identifiziert und quantifiziert. Zum Vergleich erfolgte auch eine Identifizierung und Quantifizierung der in FBS vorliegenden Proteine. Die Resultate der identifizierten Proteine mit einer Häufigkeit von > 1% sind in Abb. 9.13 aufgeführt. Eine detaillierte Auflistung aller nachgewiesenen Proteine mit genauen Prozentangaben sind dem Anhang A, Abschnitt 11.6, Tab. 11.5 zu entnehmen. Als desorbierte Proteine wurden die beiden häufigsten Serumproteine Albumin und Fetuin (*Alpha-2-HS-glycoprotein*) mit einem Anteil von ~ 9% und ~ 33% nachgewiesen. Im reinem FBS liegt Albumin mit einem höheren Anteil von ~ 46% vor, im Vergleich zu Fetuin mit einem Anteil von ~ 19%.

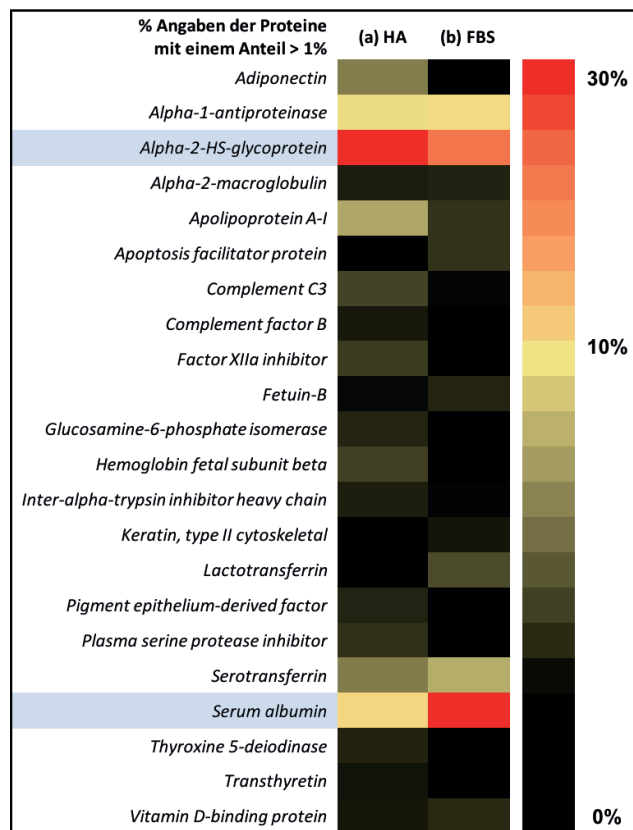


Abb. 9.13: Resultate der mittels LC-MS identifizierte und quantifizierte Serumproteine in FBS und der an die HA-Partikel adsorbierten Serumproteine aus der Synthese in PBS mit 10% FBS, dargestellt in Form einer „heat map“.

9.3.3 Zytotoxizitäts-Tests

Die nach Standardvorschrift synthetisierten Hydroxylapatit (HA) –Partikel wurden auf mögliche zytotoxische Effekte und Einflüsse auf die Zell-Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 untersucht. Die MG-63 Zellen wurden mit HA-Partikelkonzentrationen von 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden behandelt. Die mitochondriale Funktion, als Nachweis für die Vitalität der MG-63 Zellen, wurde mittels eines MTS-Assays zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) bestimmt. In Abb. 9.14a sind die Ergebnisse des MTS-Assays graphisch dargestellt. Bei allen getesteten HA-Konzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied in der mitochondrialen Aktivität der MG-63 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurden ähnliche Ergebnisse, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, erzielt. Eine tabellarische Auflistung der Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten ist in Tab. 9.2 zusammengestellt.

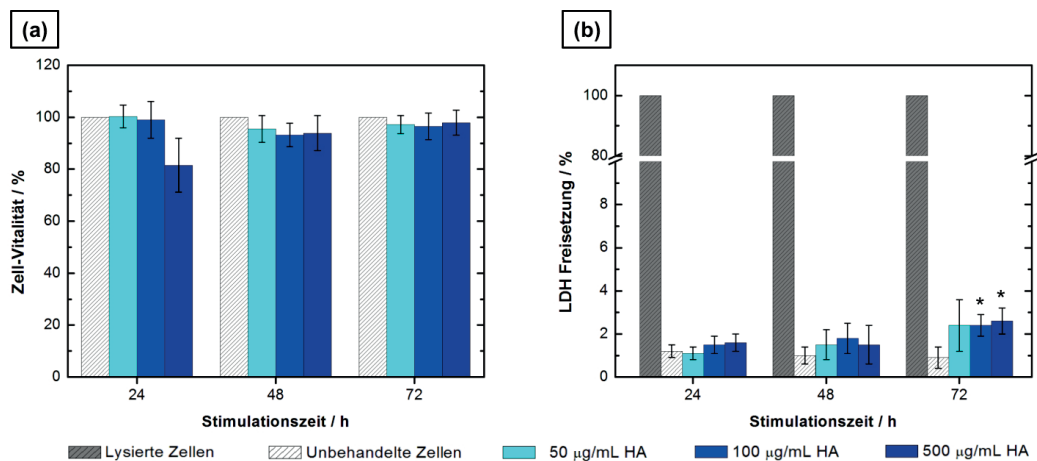


Abb. 9.14: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL HA-Partikel, synthetisiert nach Standardvorschrift. (a) MTS-Assay und (b) LDH-Assay. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Experimenten, 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.

Mit einem zweiten Testverfahren, dem LDH-Assay, wurde die Integrität der Zellmembran nach der HA-Partikel-Exposition überprüft. Zur Kontrolle wurden unbehandelte MG-63 Zellen lysiert, wodurch eine 100%ige Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) erfolgte. Die Ergebnisse sind in Abb. 9.14b graphisch dargestellt. Die Menge an LDH, die im Medium nach der HA-Partikel-Exposition in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen wurde, korreliert mit den Ergebnissen des MTS-Assays. Nach 24 und 48 Stunden konnte bei allen untersuchten Konzentrationen ein physiologisch niedriger Gehalt an LDH im Zell-Überstand festgestellt werden. Die Werte sind vergleichbar mit dem LDH Gehalt von unbehandelten MG-63 Zellen. Erst nach 72 Stunden Exposition wurde in Anwesenheit der höheren HA-Partikelkonzentrationen (100 µg/mL

und 500 µg/mL) eine signifikant höhere Menge an LDH nachgewiesen. Somit konnten keine zytotoxischen Effekte der synthetisierten HA-Partikel in Konzentrationen von bis zu 50 µg/mL in einer Stimulationszeit von bis zu 72 Stunden auf MG-63 Zellen nachgewiesen werden. Geringfügige zytotoxische Effekte, anhand der LDH-Freisetzung, traten erst nach 72 Stunden Stimulationszeit und bei erhöhten Konzentrationen auf.

Tab. 9.2: Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (MTS und LDH) nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL HA-Partikel, synthetisiert nach Standardvorschrift. Die Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) 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, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

	MTS-Assay 24 h			LDH-Assay 24 h		
	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test
LZ	--	--	--	100,0	0,0	--
UZ	100,0	0,0	--	1,2	0,3	--
50 µg/mL V	100,3	4,4	0,92	1,1	0,3	0,99
100 µg/mL V	99,0	7,1	0,83	1,5	0,4	0,36
500 µg/mL V	81,5	10,4	0,09	1,6	0,4	0,26
	MTS-Assay 48 h			LDH-Assay 48 h		
	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test
LZ	--	--	--	100,0	0,0	--
UZ	100,0	0,0	--	1,0	0,4	--
50 µg/mL V	95,5	5,2	0,28	1,5	0,7	0,42
100 µg/mL V	93,2	4,5	0,12	1,8	0,7	0,19
500 µg/mL V	93,9	6,8	0,26	1,5	0,9	0,48
	MTS-Assay 72 h			LDH-Assay 72 h		
	MW %	SD %	T- Test	MW %	SD %	T- Test
LZ	--	--	--	100,0	0,0	--
UZ	100,0	0,0	--	0,9	0,5	--
50 µg/mL V	97,2	3,5	0,29	2,4	1,2	0,16
100 µg/mL V	96,5	5,1	0,35	2,4	0,5	0,02
500 µg/mL V	97,9	4,8	0,54	2,6	0,6	0,02

9.3.4 Zell-Biokompatibilität

Zur Beurteilung der Zellverträglichkeit (Zell-Biokompatibilität), der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel, wurde eine Reihe von *in vitro* Experimenten unter Verwendung des membranpermeablen Calcein-AM Fluoreszenzfarbstoffs durchgeführt. Dadurch wurde sowohl die Morphologie als auch das Proliferationsverhalten lebender Zellen in Anwesenheit der HA-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen (50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL) in einem Zeitraum von bis zu 7 Tagen analysiert. Diese Untersuchung erfolgte nicht nur an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63, sondern auch an primären humanen Osteoblasten (pOB) und primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) von jeweils drei verschiedenen Spendern. Die Fluoreszenzaufnahmen der MG-63 Zellen sind in Abb. 9.15 an ausgewählten, repräsentativen

Beispielen dargestellt. In allen untersuchten Fällen und einem Inkubationszeitraum von bis zu 7 Tagen zeigten die mit HA-Partikel exponierten MG-63 Zellen eine vergleichbare Wachstumsverteilung mit ähnlicher Zellmorphologie, wie sie bei den unbehandelten Kontroll-Zellen beobachtet wurde.

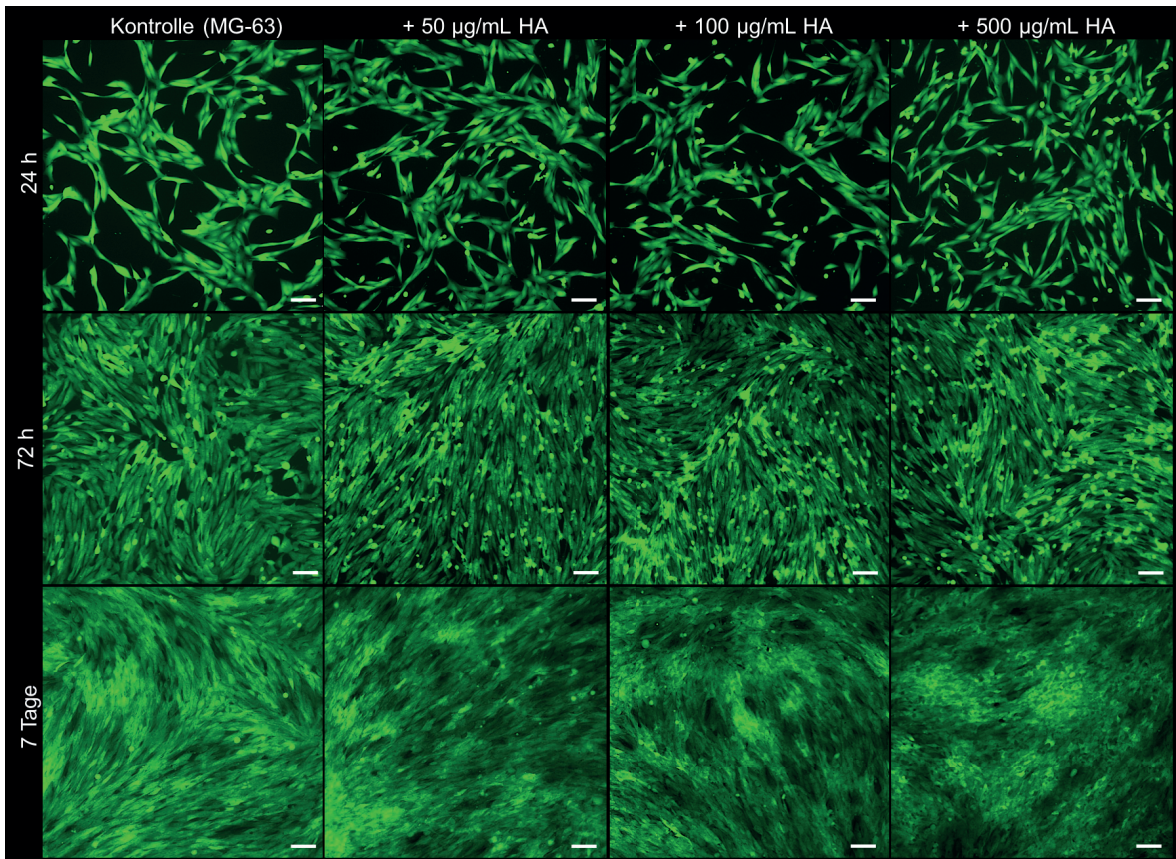


Abb. 9.15: Zell-Biokompatibilität der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel. Getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

Der Abb. 9.16 sind die Fluoreszenzaufnahmen der pOB, am Beispiel eines repräsentativen Spenders, zu entnehmen. Wie auch die MG-63 Zellen zeigten die pOB in allen untersuchten Fällen und einem Inkubationszeitraum von bis zu 7 Tagen eine vergleichbare Wachstumsverteilung mit ähnlicher Zellmorphologie, wie sie bei den unbehandelten Kontroll-Zellen beobachtet wurde.

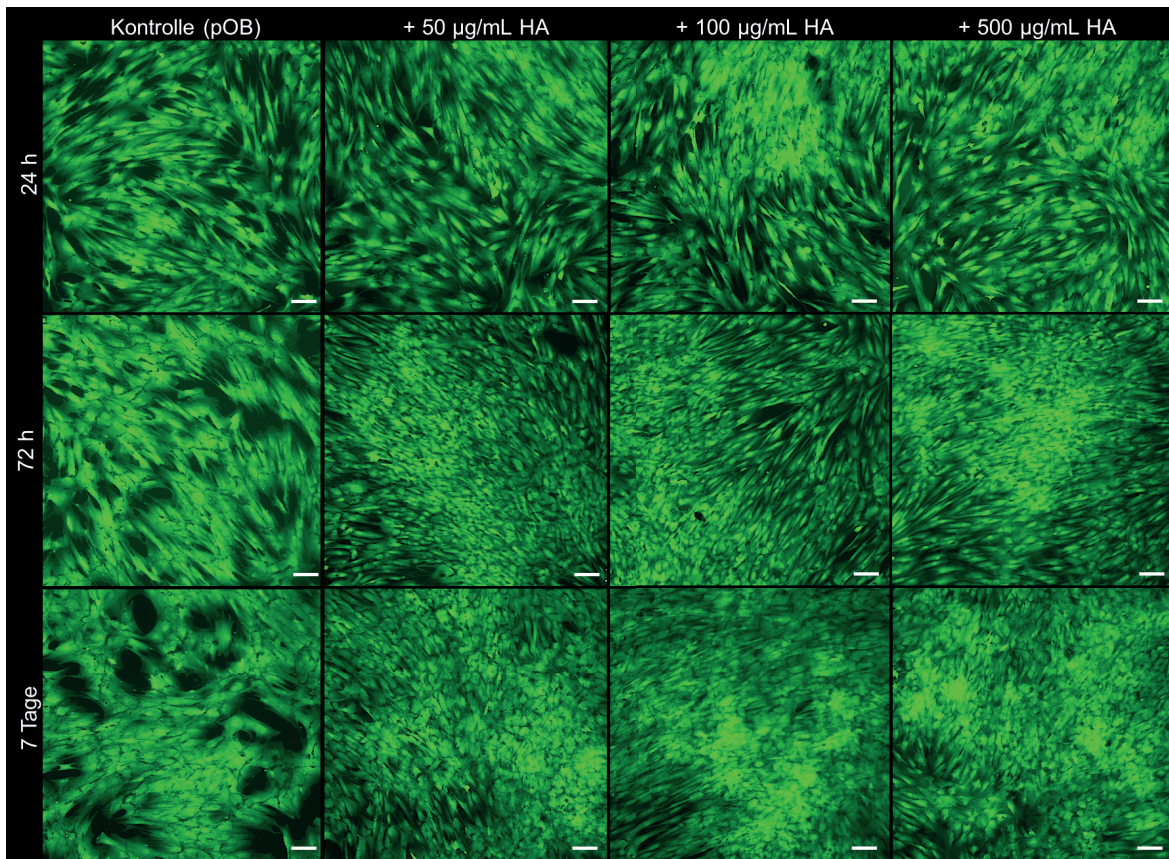


Abb. 9.16: Zell-Biokompatibilität der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel. Getestet an primären humanen Osteoblasten (pOB) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

Die Fluoreszenzaufnahmen aus Abb. 9.17 zeigen die Ergebnisse der Biokompatibilität der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel an Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC), am Beispiel eines repräsentativen Spenders. Abweichend zu den beiden anderen Zell-Typen konnten Änderungen in der Zellmorphologie als auch in der Vitalität der Zellen beobachtet werden. Bereits nach 24 Stunden Stimulation der Zellen mit einer HA-Partikelkonzentration von 100 µg/mL konnte eine verminderte Zellzahl, im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen, beobachtet werden. Mit zunehmender Partikelkonzentration von 500 µg/mL war die Zellzahl deutlich geringer. Gleichfalls wurde eine veränderte Zellmorphologie mit langen Zellfortsätzen beobachtet. Über den weiteren Kultivierungszeitraum bis hin zu 7 Tagen wurden diese Beobachtungen fortwährend gemacht. Vor allem nach 7 Tagen Exposition der HUVEC mit 500 µg/mL HA-Partikelkonzentration konnten kaum noch vitale Zellen nachgewiesen werden.

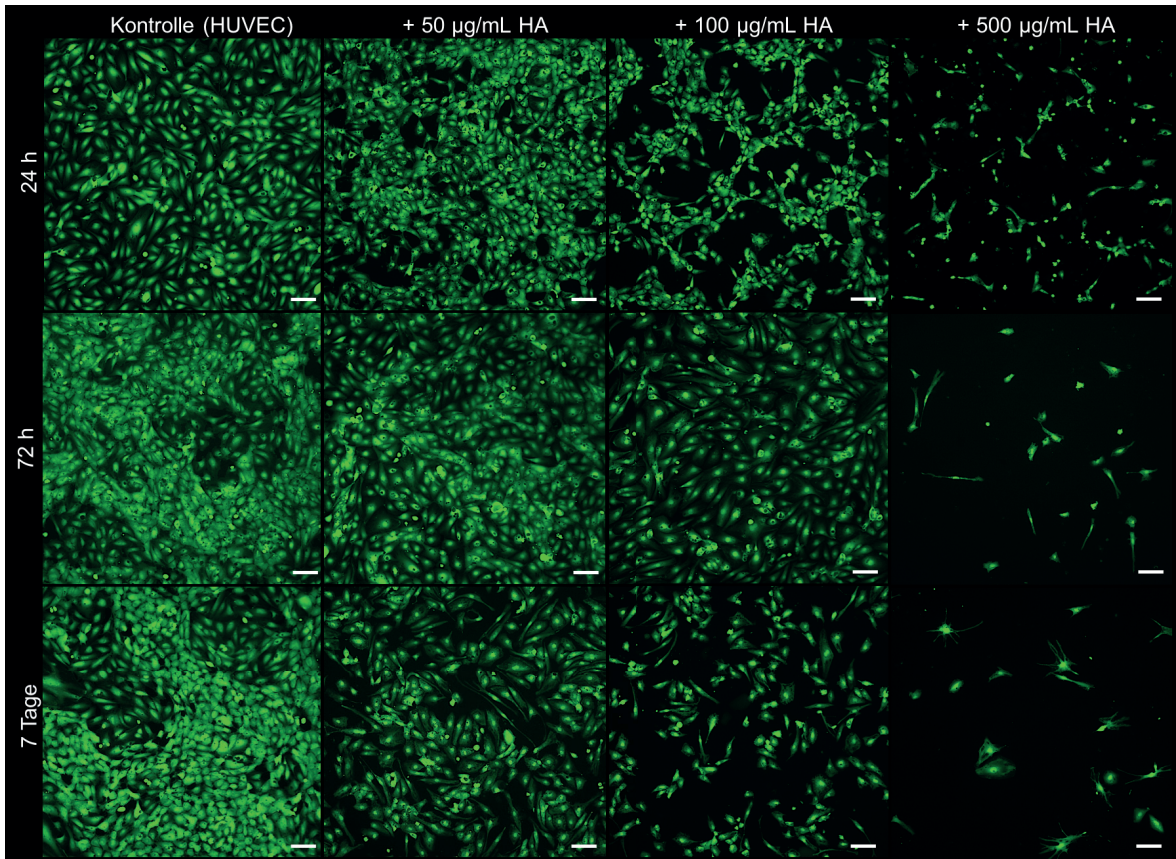


Abb. 9.17: Zell-Biokompatibilität der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel. Getestet an primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

Eine nähere Betrachtung der Zellmorphologie der mit 100 µg/mL HA-Partikel stimulierten HUVEC ist in Abb. 9.18, im Vergleich zu den unbehandelten HUVEC, dargestellt. Es zeigte sich eine deutlich veränderte Zellmorphologie mit einem verringerten Zellvolumen (s. Abb. 9.18b).

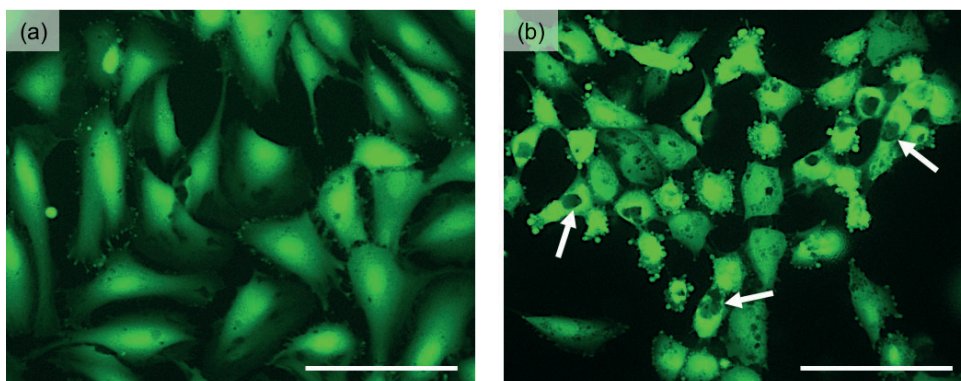


Abb. 9.18: Vergrößerte Aufnahme der primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) nach 24 h Inkubationszeit. (a) Unbehandelte Zellen und (b) mit 100 µg/mL HA-Partikel (nach Standardvorschrift synthetisiert) inkubierte Zellen. Der Maßstab entspricht jeweils einer Länge von 100 µm.

Zusätzlich ließen sich innerhalb der Zellen viele dunkle Stellen beobachten (angedeutet durch weiße Pfeile in Abb. 9.18b). Anhand der Charakterisierung der synthetisierten HA-Partikel aus Abb. 9.4c

und Abb. 9.5 (unten) geht hervor, dass es sich um nanoskopische HA-Partikel handelt. Diese Nanopartikel können leicht von Endothelzellen aufgenommen werden. Dies könnte eine Erklärung der dunklen Stellen innerhalb der Zellen sein.

Dieser morphologische Aspekt wurde näher untersucht. Hierfür wurden HUVEC mit den größeren HA-Partikel-Aggregaten aus der Synthese in PBS mit 42 mM NaHCO₃ (s. Abb. 9.8) über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen stimuliert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 9.19a zusammengestellt.

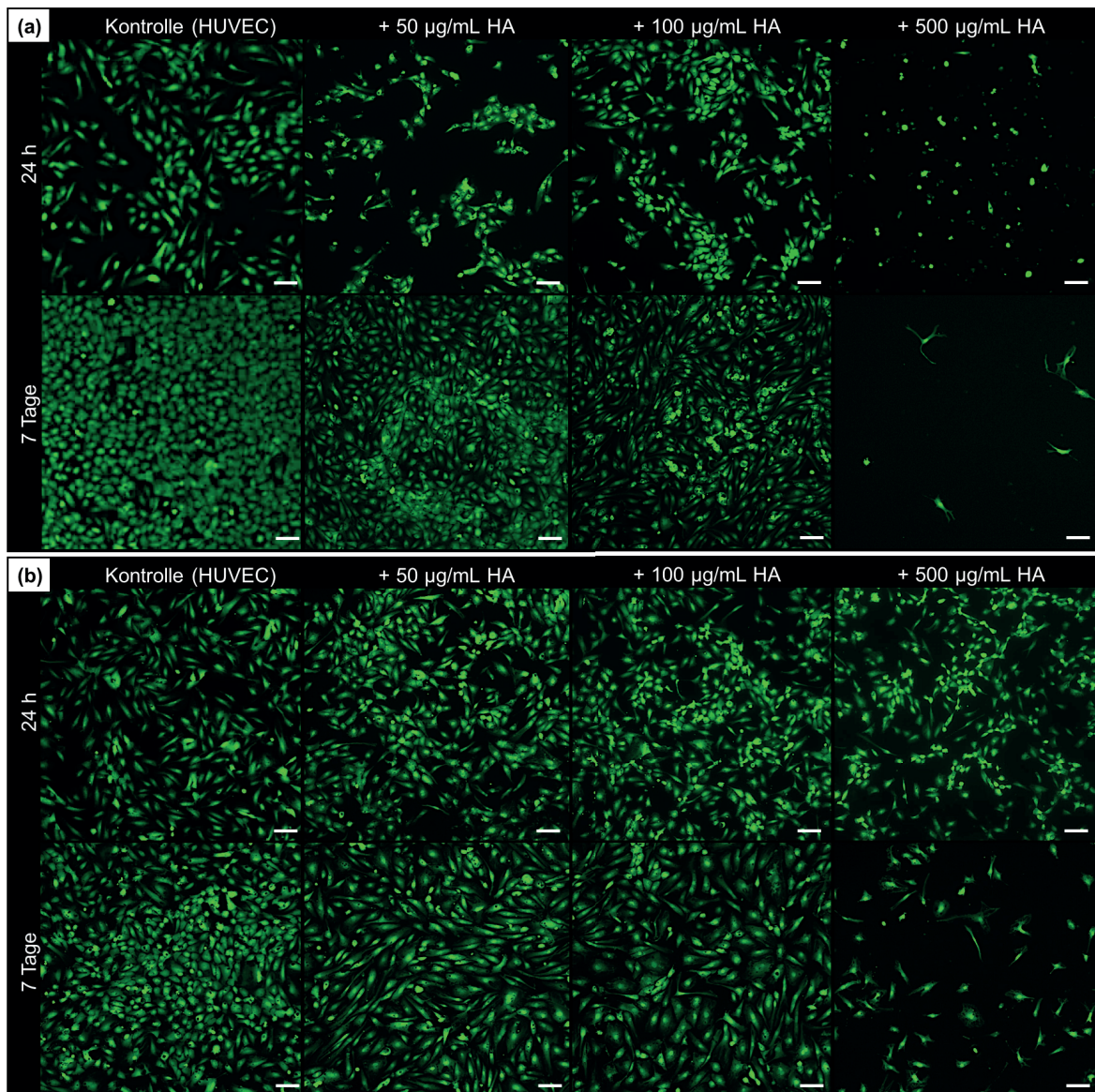


Abb. 9.19: Zell-Biokompatibilität der HA-Partikel (a) aus der Synthese in PBS mit 42 mM NaHCO₃ und (b) aus der Synthese in PBS mit 10% FBS. Getestet an primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h bis 7 Tagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm. Die Durchführung und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten durch [REDACTED], am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurden auch hierbei wieder eine verminderte vitale Zellzahl mit veränderter Morphologie festgestellt, vor allem bei hohen HA-Partikel-Konzentrationen von 500 µg/mL. Eine geringfügige, aber keine wesentliche Steigerung der Zell-Biokompatibilität der HA-Partikel konnte bei geringeren Partikelkonzentrationen beobachtet werden. Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass die Morphologie der HA-Partikel keinen entscheidenden Einfluss auf die Zell-Biokompatibilität mit den HUVEC ausübt. In einem weiteren *in vitro* Experiment wurde die Zell-Biokompatibilität der HA-Partikel mit adsorbierten Serumproteinen an HUVEC untersucht. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 9.19b ließ sich eine deutlich verbesserte Biokompatibilität der Protein-gebundenen HA-Partikel beobachten, mit ähnlicher Zellzahl und Morphologie wie sie bei den unbehandelten Zellen nachgewiesen wurde. Lediglich bei hohen Partikelkonzentrationen von 500 µg/mL wurde nach 7 Tagen Stimulationszeit eine verminderte Zellzahl mit veränderter Morphologie festgestellt.

Die veränderte Morphologie der Zellen bzw. die langen Zellfortsätze deuten auf eine mangelnde Zelladhärenz hin und führt letztlich zum Absterben der Zellen.

9.3.5 Differenzierung von Osteoblasten

Um die Knochenregeneration bei Knochendefekten zu fördern und somit den Einsatz von HA-Partikeln als Knochenersatz-Material zu gewährleisten, sollten die hergestellten Partikel eine gute Osteoinduktivität aufweisen. In einem ersten Test wurde hierfür die Differenzierung der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in Anwesenheit der HA-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen bis hin zu 500 µg/mL untersucht. Nach Kultivierungen von 7, 14 und 21 Tagen wurde die Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) durch die MG-63 Zellen mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Testverfahrens (s. Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3), durch Detektion eines Azofarbstoffes, nachgewiesen. Wie in Kapitel 5, Abschnitt 5.3 bereits beschrieben, dient der Nachweis der ALP als osteogener Differenzierungsmarker. In Abb. 9.20 sind die Resultate zusammengestellt.

Bereits nach 7 Tagen Kultivierung der MG-63 Zellen in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM) in Anwesenheit von HA-Partikeln konnte eine ALP-Aktivität beobachtet werden. Während der weiteren Kultivierungsphase, bis hin zu 21 Tagen, ließ sich eine kontinuierliche Zunahme der Farbintensität und damit der ALP-Aktivität nachweisen. Unabhängig von der eingesetzten Partikelkonzentration, konnte im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen bei den mit HA-behandelten Zellen, kein signifikanter Unterschied im Nachweis der ALP-Aktivität festgestellt werden. Alle untersuchten Proben zeigten nach einheitlicher Inkubationszeit eine vergleichbare Färbung. Um eine fehlerhafte Farbreaktion durch Anwesenheit der HA-Partikel auszuschließen, wurden die entsprechenden HA-Konzentrationen in Abwesenheit der MG-63 Zellen über die entsprechenden Zeiträume inkubiert und ebenfalls eine ALP-Färbung durchgeführt. Die Resultate sind am Beispiel der 21 Tage Proben in Abb. 9.21 aufgeführt. Es konnte bei keiner HA-

Konzentration eine Färbung nachgewiesen werden, sodass die Färbungen in Anwesenheit der MG-63 Zellen ausschließlich auf die Aktivität der exprimierten ALP zurückzuführen ist.

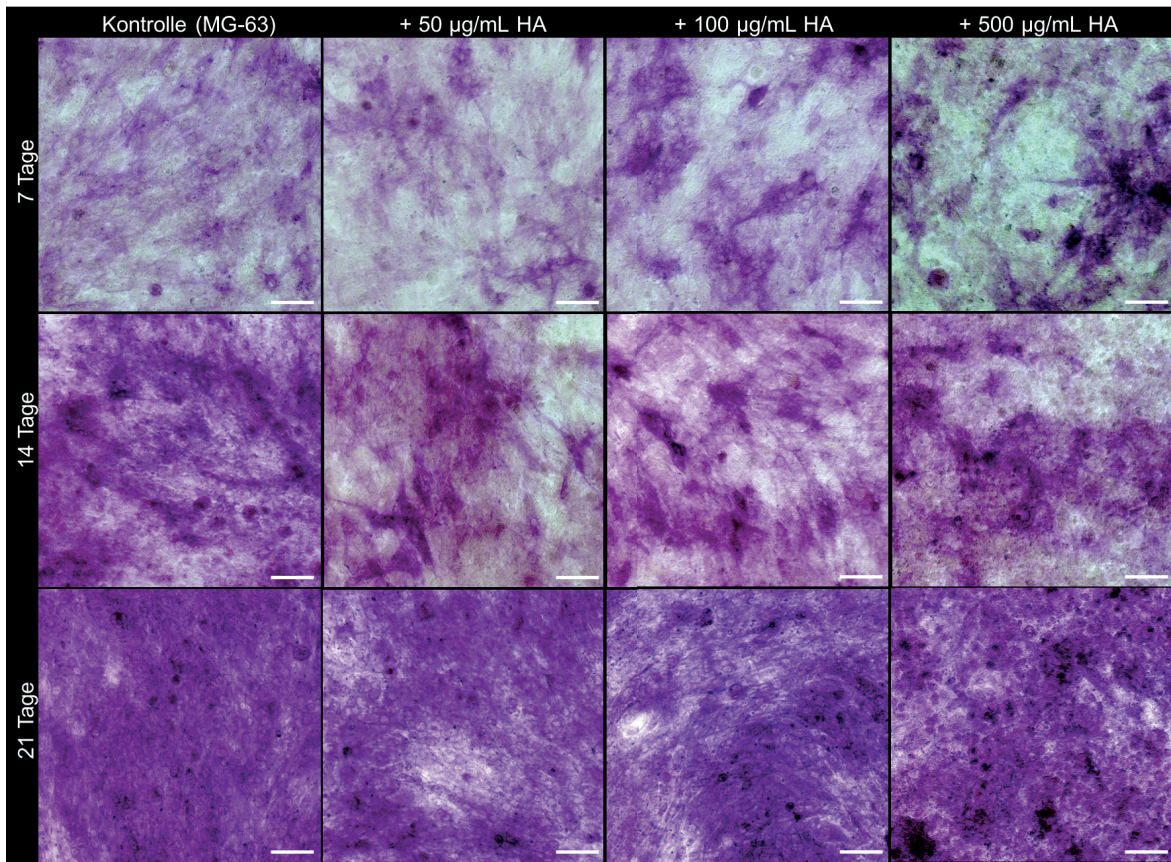


Abb. 9.20: Nachweis der Differenzierung der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 durch Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) in Anwesenheit der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen nach Inkubationszeiten von 7, 14 und 21 Tagen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

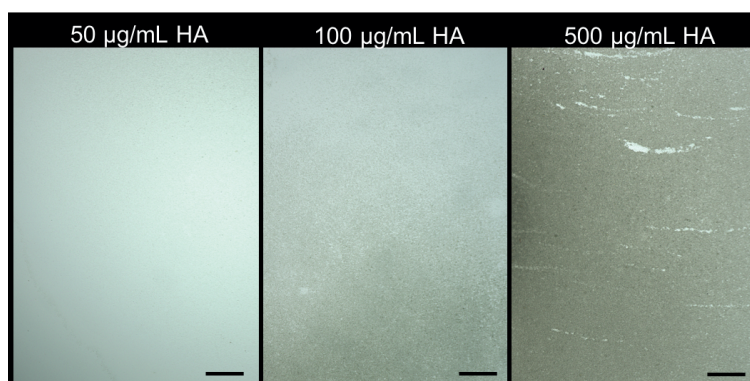


Abb. 9.21: Negativ-Kontrolle der ALP-Färbung nach 21 Tagen. Inkubation der HA-Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen in osteogenem Differenzierungs-Medium ohne MG-63 Zellen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 300 µm.

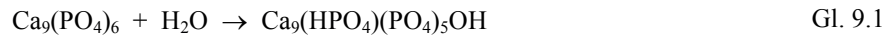
9.4 Diskussion

Gegenstand dieses Kapitels ist die Synthese von Hydroxylapatit (HA) ausgehend von Vaterit-Partikeln in einer wässrigen phosphathaltigen Salzlösung (PBS) und dessen potentielle Anwendung als Biomaterial. Hierbei wurde der Fokus auf die Umsetzung und Charakterisierung der entstandenen HA-Spezies gelegt und diverse einflussnehmende Effekte wie die Reaktionstemperatur, Anwesenheit von Magnesium- und Carbonat-Ionen sowie von Proteinen untersucht. Die Umsetzung wurde potentiometrisch und photometrisch mittels einer Ca^{2+} -Ionenselektiven Elektrode (ISE), einer pH-Elektrode und einer Trübheitselektrode verfolgt. Die Zunahme und Abnahme der gelösten Ca^{2+} -Ionenkonzentration, resultierend aus dem Signal der ISE, lässt auf eine Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine HA-Spezies auf der Grundlage von Auflösungs- und Rekristallisationsvorgängen schließen.

In zahlreichen Arbeiten wurde die amorphe Calciumphosphat- (ACP) Phase als Intermediat des kristallinen HA nachgewiesen und die Phasenumwandlung in wässriger Lösung ausführlich diskutiert.^[120,215,216,219-222] Bis heute liegt allerdings kein eindeutiger Mechanismus vor. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Phasenumwandlung von zahlreichen Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert, Fremdionen und organischen Molekülen beeinflusst wird.^[43,120,215]

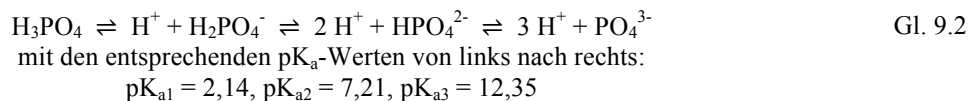
Der stöchiometrisch, chemisch reine HA, mit der Strukturformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, stellt oberhalb eines pH-Werts von 4,5 das stabile und damit am wenigsten lösliche Calciumphosphat dar.^[1,209] In frühen Arbeiten von Eanes *et al.*^[183] wurde bereits gezeigt, dass bei der Kristallisation der Calciumphosphate kinetische Faktoren eine entscheidende Rolle spielen. So entsteht bei schnellen Fällungsreaktionen aus stark übersättigten Lösungen und einem pH-Wert > 7 zunächst das kinetisch bevorzugte ACP^[120,216] oder in einigen Fällen auch das Octacalciumphosphat (OCP)^[223,224]. Hingegen fällt aus Lösungen mit niedriger Übersättigung direkt HA aus.^[182,183] Posner *et al.*^[4,5] haben in ihren Untersuchungen des ACP die Summenformel $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ abgeleitet. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die chemische Zusammensetzung der ACP-Phase stark von Fällungsbedingungen, wie pH-Wert, Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionenkonzentration, abhängig ist und daher in der Literatur oftmals auch mit der Summenformel $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$ beschrieben wird.^[1] Im wässrigen Milieu findet eine Phasenumwandlung der ACP-Phase in den thermodynamisch stabileren, nichtstöchiometrischen, Calcium-defizitären Hydroxylapatit (CDHA) statt.^[5,43,215,216] Bei Fällungen im neutralen oder basischen Milieu tritt bevorzugt die CDHA-Phase auf. Hierbei werden neben den PO_4^{3-} -Ionen auch HPO_4^{2-} -Ionen in den Kristall eingebaut, wodurch formell Ca^{2+} -Ionen ersetzt werden ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, mit $0 < x < 1$).^[120,215] Weiterhin ist die Struktur so flexibel, dass auch andere Ionen wie beispielsweise Na^+ und Mg^{2+} anstelle der Ca^{2+} -Ionen eingebaut werden können.^[1,35,175] Die meisten synthetisch und auch biologisch vorkommenden HA-Spezies besitzen eine nichtstöchiometrische Zusammensetzung mit kleinen Kristallitgrößen. Daraus resultiert die bessere Löslichkeit gegenüber dem stöchiometrischen, kristallinen HA.^[120,187,215] Heughebaert und

Montel^[219] beschrieben die Kristallisation von ACP mit der Hydrolyse von PO_4^{3-} -Ionen, gemäß Gl. 9.1.

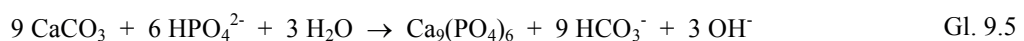


Mit der Zeit (Alterung des Niederschlags) nähert sich die Stöchiometrie der von defektfreiem HA an. Tung und Brown^[216] verfolgten die Phasenumwandlung von ACP in einen nichtstöchiometrischen HA mittels Potentialmessungen (pH-Wert und Ca^{2+} -Ionenkonzentration in Lösung).

In diesem Kapitel wurde die Umsetzung der metastabilen Vaterit-Partikel in ein Calciumphosphat in einer phosphathaltigen Salzlösung (PBS) mittels Potentialmessungen verfolgt. Bei der Durchführung der Reaktion unter Umgebungsbedingungen bei 24 °C ließ sich der Reaktionsverlauf anhand der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration in vier Phasen einteilen (s. Abb. 9.1a und b). Im Nachfolgenden wird ein möglicher Ablauf der Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine HA-Spezies, anhand der Potentialmessungen, postuliert. In der ersten Phase stieg die Ca^{2+} -Ionenkonzentration auf einen Wert von ~ 0,9 mM an und impliziert die teilweise Auflösung der metastabilen Vaterit-Partikel. In der darauffolgenden zweiten Phase wurde diese Konzentration über einen Zeitraum von etwa einer Stunde konstant gehalten. Vermutlich findet in dieser Zeit die Fällung des ACP, als metastabile leicht lösliche Calciumphosphat-Phase, statt. Gleichzeitig erfolgt eine weitere Auflösung der Vaterit-Partikel. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in das Löslichkeitsprodukt die Konzentration von PO_4^{3-} -Ionen eingeht. Diese ist aufgrund des Protolyse-Gleichgewichts stets niedriger als die Gesamt-Phosphat-Ionenkonzentration.



Durch das Auflösen der Vaterit-Partikel werden neben den Ca^{2+} -Ionen auch CO_3^{2-} -Ionen freigesetzt, gemäß Gl. 9.3. Bei einem neutralen pH-Wert liegen die CO_3^{2-} -Ionen als HCO_3^- vor, gemäß Gl. 9.4, wodurch der pH-Wert erhöht wird. Allerdings wird durch das simultane Freisetzen der CO_3^{2-} -Ionen und dem Verbrauch der PO_4^{3-} -Ionen der pH-Wert zunächst konstant gehalten. Ist genügend CaCO_3 umgesetzt, so liegen dreimal mehr HCO_3^- -Ionen im Vergleich zu den HPO_4^{2-} -Ionen in Lösung vor und damit steigt der pH-Wert gemäß Gl. 9.5 an. Dies konnte auch im Reaktionsverlauf beobachtet werden (dritte Phase).



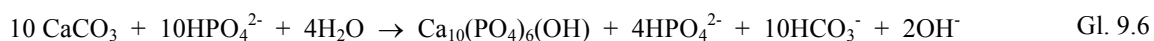
Beim Übergang in die dritte Phase wurde eine Abnahme der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration festgestellt. Somit werden mehr Ca^{2+} -Ionen in die neu gebildete Phase eingebaut, als von den verbliebenen Vaterit-Partikeln in Lösung gehen. Dieses Resultat deutet auf die Bildung einer stabileren, weniger löslichen HA-Phase hin und damit auf die Phasenumwandlung des ACP in die CDHA-Phase. Anhand von Röntgenbeugungsuntersuchungen (XRD) konnten neben den Reflexen der Vaterit-Phase erste Reflexe der HA-Phase zugeordnet werden, wodurch das Vorliegen einer kristallineren HA-Spezies, gegenüber dem röntgenamorphen ACP, gestützt wird. Mit der kontinuierlichen Abnahme der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration wurde eine stetige Zunahme der Intensitäten der HA-zugeordneten Reflexe als auch der asymmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe bei $\sim 1030 \text{ cm}^{-1}$ nachgewiesen (s. Abb. 9.1c und d).

Mit dem Anstieg des pH-Werts wurde gleichzeitig auch der Anstieg des Spannungssignals der Trübheitselektrode beobachtet. Dadurch wird eine Änderung in der Partikelgröße zu deutlich kleineren Partikeln signalisiert, was auf die Bildung der nanoskopischen CDHA-Partikel zurückzuführen ist. Aufgrund der Metastabilität der ACP-Phase und dem simultanen Vorliegen der $\sim 500 \text{ nm}$ Vaterit-Partikel, trat erst im späteren Reaktionsverlauf eine Änderung im Signal der Trübheitselektrode auf. Sowohl die mikroskopischen Aufnahmen (REM, TEM) als auch die Bestimmung der Kristallitgröße anhand der XRD-Daten bestätigen das Vorliegen nanoskopischer, polykristalliner Plättchen am Ende der Reaktionszeit (Phase vier). Die Verbreiterung der Reflexprofile der XRD-Untersuchungen ist typisch für die Bildung eines nichtstöchiometrischen HA mit geringerer Kristallinität, verglichen zum stöchiometrischen kristallinen HA.^[37,169] Somit konnte, innerhalb einer Reaktionszeit von 10 Stunden in PBS bei Raumtemperatur, eine nahezu vollständige Umsetzung der Vaterit-Partikel in plättchenförmige CDHA-Partikel geringerer Kristallinität nachgewiesen werden. Die Umsetzung erfolgte vermutlich über ACP als Intermediat.

Aufgrund der thermodynamischen Metastabilität der ACP-Modifikation findet, gemäß der Ostwald'schen Stufenregel, eine schnellere Phasenumwandlung des ACP in eine thermodynamisch stabilere Calciumphosphat-Modifikation statt.^[215,225] Aus frühen Arbeiten von Boskey und Posner^[226] wurde die Temperaturabhängigkeit bei einem pH-Wert von 8 untersucht. Dabei konnten sie feststellen, dass die Phasenumwandlung bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ erst nach 3 Tagen beginnt. Hingegen findet die Phasenumwandlung bei einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bereits nach weniger als 30 Minuten statt. Weitere Untersuchungen von Eanes und Meyer^[225] bestätigten diese Temperaturabhängigkeit. Heughebaert und Montel^[219] beschrieben die Phasenumwandlung bei erhöhter Temperatur als simultanen endothermen Lösungsvorgang des ACP mit $\Delta H > 0$ und exothermen Kristallisationsvorgang des CDHA mit $\Delta H < 0$.

Eine deutlich schnellere Umsetzung der Vaterit-Partikel konnte bei einer erhöhten Temperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ festgestellt werden (s. Abb. 9.3). Die Temperaturerhöhung bewirkt keine schnellere Auflösung der Vaterit-Partikel,^[1,23] führt allerdings zu einer deutlichen Reduzierung des Löslichkeitsprodukts des HA.^[227] Als Resultat müssen weniger Ca^{2+} -Ionen in Lösung gehen, um eine

Übersättigung und damit verbunden eine Kristallisation des HA zu bewirken. Anhand der Messung der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration konnte dies mit einem Nachweis von 0,6 mM an freien Ca^{2+} -Ionen bestätigt werden. Zusätzlich führt eine Erhöhung der Temperatur zur vermehrten Keimbildung mit der Folge kleinerer Partikelgrößen. Anhand der Messungen mit der Trübheitselektrode konnte, verglichen mit dem Signal bei 24 °C, ein deutlich höherer Anstieg des Spannungssignals beobachtet werden. Über den weiteren Reaktionsverlauf flachte das Spannungssignal wieder ab. Gleichzeitig wurde die freie Ca^{2+} -Ionenkonzentration mit ~ 0 mM bestimmt. Anhand dieser Resultate kann auf eine vollständige Umsetzung der Ca^{2+} -Ionen aus den Vaterit-Partikeln in einen nahezu stöchiometrischen und vergleichsweise defektarmen HA geschlossen werden, gemäß Gl. 9.6. Die Bestimmung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses, anhand der Untersuchung mittels FT-IR-Spektroskopie am Ende der Reaktionszeit, untermauerte die Bildung eines nahezu defektfreien HA. Die gebildeten Kristallite unterliegen hierbei einem Alterungsprozess, wobei größere Kristallite auf Kosten kleinerer Kristallite wachsen (Ostwaldreifung).^[1] Dennoch wurden Kristallite im Nanometerbereich erhalten, wodurch auch die Verbreiterung des Reflexprofils resultierte. Ein weiterer Effekt der Temperaturerhöhung zeigte sich in der Morphologie der resultierenden HA-Partikel. Bei 24 °C wurde anhand der Vollprofilanpassung der XRD-Daten ein Aspektverhältnis von ~ 6 bestimmt, wodurch eine eher stäbchenartige Morphologie mit elongierter c-Achse der Kristallite beschrieben wird. Durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C resultierte ein Aspektverhältnis von ~ 3, wodurch die Breite der Kristallite zunahm. Solche temperaturabhängigen Änderungen in der Morphologie der HA-Partikel sind aus der Literatur bekannt.^[227–229] Kumar *et al.*^[227] untersuchten die Morphologie des HA in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur bei 40 °C, 80 °C und 100 °C. Dabei konnten sie eine Reduzierung des Aspektverhältnisses nachweisen und eine Änderung der Morphologie der HA-Partikel zu annähernd sphärischen Strukturen.



In weiterführenden Reaktionen wurden die Effekte von zusätzlichen Ionen in der Reaktionslösung untersucht. Der Fokus lag auf Hydrogencarbonat-Ionen (HCO_3^-) und Magnesium-Ionen (Mg^{2+}). Vor allem sollte die Untersuchung zu einem besseren Verständnis der Umsetzung von Vaterit-Partikeln in die HA-Spezies in der simulierten Körperflüssigkeit (SBF) aus Kapitel 8 beitragen.

Das zusätzliche Einbringen von HCO_3^- -Ionen in die Reaktionslösung (PBS) zeigte keinen Effekt auf die Auflösung der Vaterit-Partikel. Es resultierte ein vergleichbarer Anstieg der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration wie bei den Reaktionen in reinem PBS. Allerdings konnte eine stark verzögerte Abnahme in der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration beobachtet werden (s. Abb. 9.6). Dieser Effekt lässt sich damit erklären, dass die zusätzlich in Lösung befindlichen HCO_3^- -Ionen die Bildung eines stöchiometrischen HA unterbinden. Einerseits fungieren die HCO_3^- -Ionen als stärkere Säure

im Vergleich zu den HPO_4^{2-} -Ionen. Dadurch liegen die PO_4^{3-} -Ionen bzw. die HPO_4^{2-} -Ionen bevorzugt in der protonierten Form vor und führen zur Bildung eines nichtstöchiometrischen HA $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$. Andererseits können die HCO_3^- -Ionen auch selbst in den HA-Kristall eingebaut werden. Folglich entsteht ein nichtstöchiometrischer Carbonat-haltiger Hydroxylapatit (HCA) mit einem größeren Löslichkeitsprodukt. Der Einbau der CO_3^{2-} -Ionen anstelle der PO_4^{3-} -Ionen führt zum HCA vom B-Typ und wird mit der Strukturformel $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ beschrieben, wobei $0 < x < 1$ ist.^[1,38,40] Es ist bekannt, dass in Lösung befindliche Carbonat-Ionen (CO_3^{2-}) die Löslichkeit des HA erhöhen.^[227,230-232] Betts *et al.*^[5] beschrieben bereits 1981 in ihrer Arbeit die erhöhte Löslichkeit des HCA als Resultat der Besetzung der tetraedrischen PO_4^{3-} -Ionen Position durch das trigonal planare CO_3^{2-} -Ion, mit der Folge einer verringerten Gitterenergie. Kürzlich bestätigten Kubota *et al.*^[40] dies durch Aufklärung der atomaren Struktur des HCA. Allerdings ist die Substitution der CO_3^{2-} -Ionen auch von der Temperatur abhängig und nimmt mit steigender Temperatur ab.^[227,233] Anhand der Bestimmung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses, mittels FT-IR-Spektroskopie am Ende der Reaktionszeit, wurde die Bildung eines HCA bestätigt. Es konnte ein deutlich niedrigeres PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis von 6,7 ermittelt werden, im Vergleich zu dem PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Verhältnisses von 9,4 des kommerziell erworbenen HA. Das verbreiterte Reflexprofil ist demnach nicht nur auf die nanokristalline Struktur zurückzuführen, sondern auch auf den Einbau von Carbonat-Ionen in den HA-Kristall.^[37,38,40,168,169,233] Weiterhin ließ sich, in Anwesenheit der zusätzlich in Lösung befindlichen HCO_3^- -Ionen, eine morphologische Änderung der gebildeten HCA-Partikel beobachten. Es konnte eine Aggregation der gebildeten plättchenförmigen Partikel zu größeren, sphärischen Strukturen mit einem Durchmesser von 1-2 μm beobachtet werden. Diese Strukturen zeigten eine vergleichbare „Wüstenrosen-ähnliche“ Morphologie wie die HCA-Partikel, die aus der Inkubation in SBF erhalten wurden (s. Kapitel 8). Demnach bewirken zusätzliche in Lösung befindlichen HCO_3^- -Ionen nicht nur die Bildung des HCA, sondern auch eine morphologische Änderung. Bereits LeGeros *et al.*^[234] konnten in ihrer Arbeit von 1967 solch einen morphologischen Effekt beobachten und beschrieben die entstehende Morphologie als „clusters of equiaxed crystals“. Der Effekt der Aggregation zu größeren „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen ist nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass diese Zusammenlagerung auf die verringerte Löslichkeit des HCA im Vergleich zum HA zurückzuführen ist. Durch den Einbau der CO_3^{2-} -Ionen in den HA-Kristall wird die Bindung im Kristall geschwächt und damit die Löslichkeit verbessert.^[5,40] Als Folge davon findet eine verzögerte Keimbildung statt, wobei erste Keime die Bildung weiterer Kristallisationskeime fördern und als Templat dienen. Somit findet kein klassisches Kristallwachstum durch Ostwaldreifung statt, sondern es erfolgt eine orientierte Anlagerung zu den „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen. Diese Annahme steht im Einklang mit den Resultaten der Bildung der „Wüstenrosen-ähnlichen“ Apatit-Strukturen in SBF aus Kapitel 8. Die stark verzögerte Abnahme der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration in Anwesenheit von in Lösung befindlichen HCO_3^- -Ionen stützt den in Kapitel 8 postulierten

Mechanismus der Umsetzung der Vaterit-Partikel in SBF (s. Abb. 8.28a). Dadurch wird impliziert, dass erste Kristallisationskeime des HCA mit einem hohen Anteil an CO_3^{2-} -Ionen gebildet werden. Liao *et al.*^[235] zeigten, dass mit höherem Anteil an CO_3^{2-} -Ionen sowohl eine geringere Kristallitgröße als auch eine geringere Kristallinität resultiert. Weiterhin untersuchten sie den Einfluss des Anteils an CO_3^{2-} -Ionen auf die Morphologie der entstehenden HCA-Partikel. Sie beschrieben die plättchenförmigen HCA-Kristallite als polykristallin. Hierbei konnten sie eine Abhängigkeit der Polykristallinität vom Anteil an CO_3^{2-} -Ionen feststellen, wodurch sich auch eine Änderung in der Morphologie bis hin zu sphärischen Partikeln ergab. Eine ähnliche Polykristallinität konnte bei den Plättchen der „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen anhand der TEM-Aufnahmen aus Abb. 9.8 beobachtet werden. Diese Beobachtung korreliert mit der Bestimmung der geringen Kristallitgröße und einem Aspektverhältnis von 3 anhand der Vollprofilanpassung der XRD-Daten.

Das zusätzliche Einbringen von Mg^{2+} -Ionen in die Reaktionslösung (PBS) zeigte einen deutlich inhibierenden Effekt auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel (s. Abb. 9.9). Aus der Literatur ist bekannt, dass Mg^{2+} -Ionen einen Einfluss auf die Bildung der CaCO_3 -Modifikationen ausüben und stabilisierend auf die metastabilen Phasen wirken.^[117,131] Einen ähnlichen Effekt zeigen Mg^{2+} -Ionen auch auf die Calciumphosphate, indem sie eine konzentrationsabhängige, inhibierende Wirkung auf die Bildung und das Wachstum von HA und anderen Calciumphosphate bewirken.^[184] Die Anwesenheit der Mg^{2+} -Ionen wirkt stabilisierend auf die amorphe Calciumphosphat (ACP)-Phase, indem sie die Löslichkeit von ACP herabsetzen.^[5,184-186] Der genaue Effekt der stabilisierenden Wirkung der Mg^{2+} -Ionen auf die ACP-Phase ist bis heute noch umstritten und nicht vollständig geklärt. In frühen Arbeiten von Bett *et al.*^[5] und Abbona *et al.*^[185] wird die Stabilisierung des ACP durch den Ersatz der Ca^{2+} -Ionen durch Mg^{2+} -Ionen beschrieben. Sie begründen die Stabilisierung mit dem Auftreten einer kompakteren Umgebung der Ionen, aufgrund des kleineren Ionenradius des Mg^{2+} -Ions und der verringerten Bindungslänge mit Sauerstoff. Zusätzlich wurde eine Abhängigkeit vom Mg^{2+} zu Ca^{2+} Ionenverhältnis beschrieben. Liegt ein Verhältnis größer als 0,2 vor, so wird die Umwandlung von ACP in eine kristallinere Calciumphosphat-Modifikation wirksam verhindert.^[5,43,185] Im Gegensatz dazu schlagen Yang *et al.*^[236] anhand ihrer Untersuchungen vor, dass in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen die Bildung von Mg^{2+} - PO_4^{3-} -Ionenpaaren die thermodynamisch treibende Kraft der Nukleation und die Phasenumwandlung in den HA reduzieren. Aus den Ergebnissen der Umsetzung von Vaterit-Partikeln in HA in Anwesenheit unterschiedlicher Mg^{2+} -Ionenkonzentration resultierte einerseits eine Stabilisierung der Vaterit-Partikel. Andererseits konnte anhand der Resultate der FT-IR-Spektroskopie eine stark verbreiterte Bande der PO_4^{3-} -Gruppe nachgewiesen werden. Dieses Resultat deutet auf die Bildung einer ACP-Phase hin, die in Gegenwart der Mg^{2+} -Ionen stabilisiert wird. Anhand dieser Untersuchung konnte der angenommene Effekt der Mg^{2+} -Ionen in SBF aus Kapitel 8 belegt werden, wobei das Mg^{2+} zu Ca^{2+} -Ionenverhältnis eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Bereits im vorherigen Kapitel 8 wurde der Effekt von Serumproteinen auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel in einem Zellkulturmedium unter Zusatz von 10% fetalem Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*) untersucht. Hierbei wurde eine deutlich geringere Umsetzung der Vaterit-Partikel in die Apatit-Spezies festgestellt. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Zellkulturmediums wurde in diesem Kapitel der Effekt des FBS anhand der Reaktion von Vaterit-Partikel in PBS bei Raumtemperatur (24 °C) näher untersucht. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Ca^{2+} -ISE und pH-Elektrode verfolgt (s. Abb. 9.11). Eine deutlich verzögerte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den Vaterit-Partikeln wurde beobachtet und lässt sich aufgrund der energetischen Stabilisierung der Vaterit-Partikel durch die Proteinadsorption begründen (vgl. Resultate aus Kapitel 8, Abschnitt 8.6). Im Vergleich zu der Reaktion von Vaterit-Partikel in PBS ohne FBS bei 24 °C wurde eine deutlich verringerte freie Ca^{2+} -Ionenkonzentration nachgewiesen. Es wird angenommen, dass die Serumproteine einen Teil der freigesetzten Ca^{2+} -Ionen komplexieren. Vor allem Albumin und Fetuin, als häufigste Vertreter der Proteine im FBS, sind als Inhibitoren der Mineralisierung von Calciumphosphaten bekannt.^[202–204] Folglich liegen weniger Ca^{2+} -Ionen in Lösung vor und eine Übersättigung mit anschließender Kristallisation der HA-Spezies tritt erst verzögert, mit fortschreitender Auflösung der Vaterit-Partikel, ein. Nach ~ 60 Stunden Reaktionszeit konnte ein starker Abfall der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration über einen Zeitraum von ~ 12 Stunden beobachtet werden, der auf die Kristallisation der HA-Spezies hindeutet. Im darauffolgenden Reaktionszeitraum von ~ 72 Stunden bis ~ 92 Stunden erfolgte erneut ein geringer Anstieg der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration. Dies könnte auf eine Freisetzung der von Albumin und Fetuin komplexierten Ca^{2+} -Ionen hinweisen. Vermutlich resultiert die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aufgrund der erhöhten Affinität des Fetuins zum Knochenmineral als auch zu synthetischen Calciumphosphaten.^[237–240] Im weiteren Verlauf nimmt die freie Ca^{2+} -Ionenkonzentration auf ein Minimum von 0,0 - 0,1 mM ab, wodurch die vollständige Umsetzung in die HA-Spezies signalisiert wird. Mittels FT-IR-Spektroskopie wurde durch das verringerte PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis auf die Bildung des HCA hingewiesen. Anhand von Zetapotential-Messungen konnte die Adsorption von Proteinen an die HA-Spezies gestützt werden. Weitere Untersuchungen mittels Flüssigchromatographie gekoppelter Massenspektroskopie (LC-MS: *liquid-chromatography mass-spectroscopy*) bestätigten die Adsorption von Fetuin mit einem Anteil von ~ 33% und von Albumin mit einem Anteil von ~ 9%. Als Folge der Proteinadsorption konnte eine Änderung der Morphologie der erhaltenen HCA-Partikel festgestellt werden. Es wurden Aggregate mit einem Durchmesser von 200 – 500 nm erhalten, die sich aus nanoskopischen Plättchen zusammensetzen. Die Plättchen sind vermutlich polykristallin und bestehen aus deutlich kleineren Kristalliten, als sie in den vorherigen Versuchen beobachtet wurden. Der komplexe Einfluss der Serumproteine und ihr amphoterer Charakter erschwert die Interpretation des Signals der pH-Wert Messung. Dennoch lässt sich, vergleichbar zu den vorherigen Reaktionen, der grundlegende Trend einer Zunahme des pH-Werts

über den Reaktionszeitraum feststellen, der vermutlich auf die Freisetzung der CO_3^{2-} -Ionen zurückzuführen ist.

Abschließend wurden *in vitro* Zell-Tests durchgeführt, um eine erste Beurteilung zur Toxizität und Zell-Biokompatibilität der synthetisierten HA-Spezies zu treffen. Hierbei wurden bei den Zell-Kompatibilitäts-Untersuchungen deutliche Unterschiede in der Proliferation als auch in der Vitalität der untersuchten Zellen festgestellt. Während die Osteoblasten-Zelllinie MG-63 sowie die primären Osteoblasten (pOB) in Anwesenheit der HA-Partikel eine durchweg physiologische Morphologie, Proliferationsrate und Vitalität zeigten, konnte dies bei den Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) nicht beobachtet werden. Bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit ließen sich bei erhöhter Konzentration, der nach Standardvorschrift synthetisierten, HA-Partikel verminderte Zellzahlen und Veränderungen in der Zellmorphologie feststellen (s. Abb. 9.17). Die Resultate deuteten darauf hin, dass die Endothelzellen die HA-Partikel, aufgrund ihrer nanoskopischen Größe, unkontrolliert aufnehmen. In zahlreichen *in vitro* Studien wurden bereits zur Aufnahme von Nanopartikeln an Endothelzellen durchgeführt, mit dem Resultat eines konzentrations- und größenabhängigen toxischen Effekt.^[146,241,242] Im Unterschied zu den in Kapitel 7 getesteten Vaterit-Partikel konnte bei den HA-Partikeln keine Agglomeration der Partikel im Zellkulturmedium beobachtet werden. Vielmehr bewirkten sie eine konzentrationsabhängige, homogene Bedeckung des Bodens der Zellkultur-Platte (s. Abb. 9.21). Auch die HA-Partikel mit der sphärischen „Wüstenrosen-ähnlichen“ Struktur aus der Synthese in PBS mit 42 mM NaHCO_3 , zeigten trotz veränderter Morphologie keine wesentliche Steigerung der Zell-Biokompatibilität der HUVEC. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass nicht nur die Morphologie die Zell-Biokompatibilität der HUVEC beeinflusst. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Vaterit-Partikel wurde ein weiterer essentieller Unterschied in der Oberflächenladung festgestellt. Während bei den Vaterit-Partikeln ein positives Oberflächenpotential von $\sim +12$ mV bestimmt wurde, resultierte aus den Zeta-Potential-Messungen der HA-Partikel ein negatives Oberflächenpotential von ~ -3 mV (s. Abb. 9.12). Es wird angenommen, dass die Oberflächenladung der HA-Partikel einen starken Effekt auf die Adhärenz der HUVEC ausübt. Vermutlich können durch die negative Oberflächenladung weniger Matrixproteine binden, wodurch eine mangelnde Zell-Adhärenz resultiert. Hinzu kommt, dass sich die HA-Partikel konzentrationsabhängig homogen am Boden der Zellkultur-Platte verteilen und damit eine Adhärenz am Boden der mit Fibronectin-beschichteten Zellkultur-Platte unterbinden. Als Folge der fehlenden Adhärenz gehen die HUVEC in die Apoptose über. Es ist geläufig, dass Endothelzellen Matrixproteine (wie z. B. Fibronectin) benötigen, um auf Oberflächen zu adhären.^[152,153] Im Gegensatz dazu zeigen Osteoblasten zu HA auch ohne vermittelnde Proteine eine adhärenente Eigenschaft.^[104] Eine deutliche Steigerung der Vitalität und Proliferation der HUVEC konnte in Anwesenheit von Serumprotein-gebundenen HA-Partikeln festgestellt werden.

9.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden grundlegende Faktoren bezüglich der Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb einer phosphathaltigen Salzlösung (PBS) in eine Calciumphosphat (CaP) -Spezies aufgeklärt. Der Reaktionsverlauf wurde anhand von potentiometrischen Messungen verfolgt und ließ sich in vier Phasen einteilen. In Abb. 9.22 ist eine schematische Darstellung des möglichen Reaktionsverlaufs illustriert. Die erste Phase stellt die Auflösungs-Phase dar, in der ein Teil der Vaterit-Partikel in Lösung geht und zur Freisetzung der Ca^{2+} - und CO_3^{2-} -Ionen führt. Die zweite Phase wird als Nukleations-Phase postuliert. Während der weiteren Auflösung der Vaterit-Partikel findet eine simultane Bildung einer amorphen CaP-Intermediat-Phase statt, wodurch die freie in Lösung befindliche Ca^{2+} -Ionenkonzentration konstant gehalten wird. Die dritte Phase zeichnet sich durch eine Abnahme in der freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration aus und impliziert die Bildung einer stabileren, weniger löslichen Hydroxylapatit (HA) -Phase, vermutlich die des nichtstöchiometrischen Calcium-defizitären Hydroxylapatits (CDHA). In der vierten Phase wird abhängig von den Reaktionsbedingungen ein Alterungsprozess durchlaufen, in Folge dessen sich eine Reifung der gebildeten Kristallite zu größeren Kristalliten oder aber Ionen-Substitutionen vollziehen.

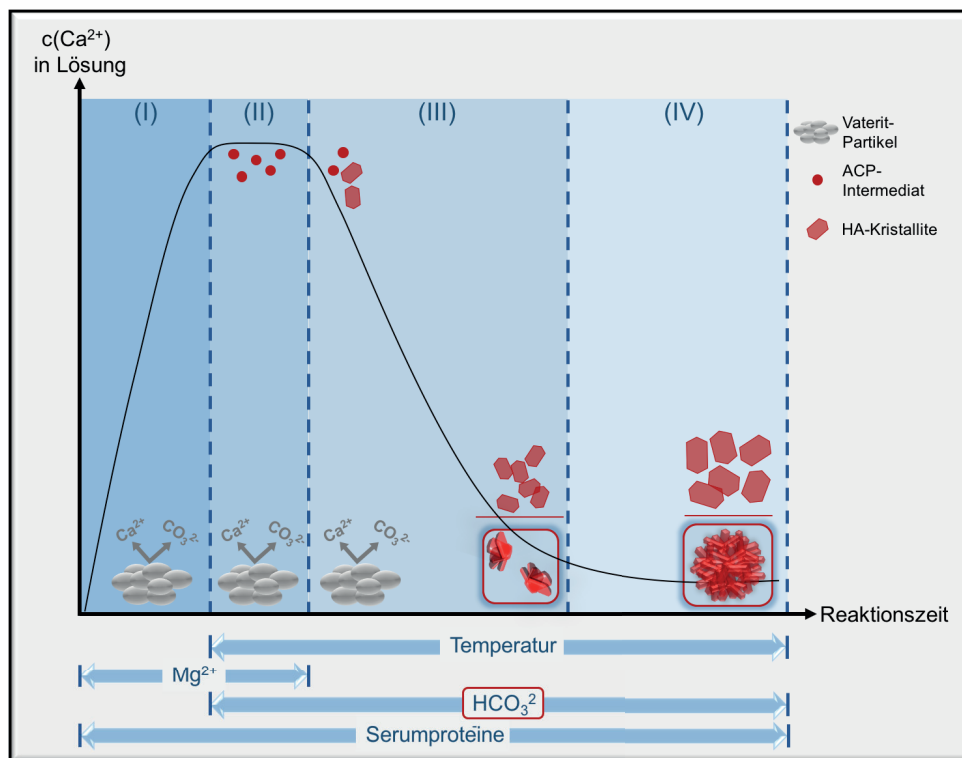


Abb. 9.22: Schematische Darstellung des Reaktionsverlaufs anhand der freien in Lösung befindlichen Ca^{2+} -Ionen über die Reaktionszeit mit Angabe der auf die Reaktion einflussnehmenden Faktoren. Einteilung in vier Phasen: (I) Auflösung von Vaterit-Partikel, (II) simultane Auflösung von Vaterit-Partikel und Bildung des amorphen Calciumphosphat- (ACP) Intermediats, (III) vollständige Auflösung der Vaterit-Partikel und Kristallisation einer stabileren HA-Phase und (IV) Alterungs- / Reifephase.

Es wurde festgestellt, dass diverse Faktoren, wie die Reaktionstemperatur und Additive in der Reaktionslösung einen erheblichen Einfluss auf die Bildung und Eigenschaften der einzelnen Phasen

ausüben. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Reaktionstemperatur um nahezu das Doppelte eine Reduktion der Reaktionszeit in der zweiten und dritten Phase um das Sechsfache bewirkt. Gleichzeitig führt die erhöhte Temperatur zu der Bildung eines annähernd stöchiometrischen, defektfreien HA. Das Einbringen von Additiven, wie Mg^{2+} -Ionen, HCO_3^- -Ionen und Serumproteinen in die Reaktionslösung wirkte sich vor allem auf die zweite Phase des Reaktionsverlaufs aus. Hierbei wurde sowohl der inhibierende Einfluss der Mg^{2+} -Ionen auf die Kristallisation der CaP-Phase als auch der stabilisierende Einfluss auf die Vaterit-Partikel beobachtet. Ein weiterer interessanter Effekt ergab sich aus dem zusätzlichen Einbringen von HCO_3^- -Ionen in die Reaktionslösung. Die Ergebnisse deuteten auf einen Einbau der CO_3^{2-} -Ionen in die entstehende CaP-Phase hin, wodurch die Bildung eines nichtstöchiometrischen Carbonat-haltigen Hydroxylapatits (HCA) hervorgerufen wird. Zusätzlich konnte eine Änderung in der Morphologie zu den „Wüstenrosen-ähnlichen“ Strukturen beobachtet werden. Diese Struktur ist im Hinblick auf die Anwendung als Knochenersatzmaterial von großem Vorteil, indem eine definierte Struktur mit einer gewissen Porosität erhalten wird. Dadurch wird nicht nur ein besserer Stoffaustausch ermöglicht, sondern auch die Funktion eines Templats für die knochenbildenden Zellen erbracht. Durch die Anwesenheit der Serumproteine konnte zwar ein stark verzögerter Effekt bezüglich der Umsetzung in den ersten drei Phasen des Reaktionsverlaufs festgestellt werden, die auf Adsorptionen von Proteinen zurückzuführen sind. Allerdings begünstigten die Serumproteine auch eine Änderung in der Morphologie zu „Erdnuss-artigen“ 200 – 500 nm großen HCA-Partikeln, bestehend aus polykristallinen Plättchen mit hoher Ähnlichkeit zu den biologischen Apatit-Kristalliten. Desweiteren wurde eine deutliche Steigerung in der Zell-Biokompatibilität mit den primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC), verglichen mit den „nackten“ HA-Partikeln, erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Synthesevarianten der HA-Partikel, ausgehend von Vaterit-Partikeln, bringen interessante und vorteilhafte Eigenschaften mit. Wie beispielsweise (i) eine gezielte und kontrollierbare Kristallisation der HA-Spezies, durch die *in situ* Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, (ii) Bildung einer spezifischen HA-Spezies mit Fremdionen in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen, (iii) HA-Kristallite mit ähnlicher Kristallitgröße wie die biologischen HA-Kristallite aufweisen, (iv) eine sehr gute Zell-Kompatibilität mit der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 als auch mit den primären humanen Osteoblasten und (v) eine physiologische Differenzierung der MG-63 Zellen wird ebenfalls gewährleistet.

Aufgrund der hohen Nachfrage an Knochenersatzmaterialien und dem großen Bestreben ein synthetisches Material mit vergleichbaren chemischen, biologischen und physikalischen Eigenschaften wie das physiologische Knochenmineral zu finden, wurde mit dieser Syntheseroute eine vielversprechende Grundlage für ein solches Material geschaffen. Aufgrund dessen besteht großes Interesse die gebildeten HA-Spezies weiter zu untersuchen und die Synthese im Hinblick auf

die Morphologie zu optimieren, sodass größere poröse Strukturen gebildet werden, die aus nanoskopischen HCA-Plättchen bestehen. In diesem Zusammenhang ist zu noch zu klären, welchen Einfluss Na^+ -Ionen auf die Bildung der HA-Spezies ausüben, da im Reaktionsmedium (PBS) eine hohe Konzentration an Na^+ -Ionen vorliegt. In weiterführenden *in vitro* Experimenten sollte die verminderte Zell-Biokompatibilität mit Endothelzellen aufgeklärt werden. Aufgrund der sehr guten Zell-Biokompatibilität der Osteoblasten mit den HA-Partikeln wäre der Einsatz einer Co-Kultur aus Osteoblasten und Endothelzellen sinnvoll. So könnten die Osteoblasten Matrixproteine bilden, die die Adhärenz der Endothelzellen fördern. Damit wird überprüft, ob die mangelnde Zell-Biokompatibilität aufgrund der fehlenden Zelladhärenz hervorgerufen wird.

10

Kompositmaterialien aus PEG-basierten Hydrogelen *Transportform für Vaterit-Partikel*

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind teilweise Gegenstand der nachfolgenden Manuskripte. „Transformation of vaterite nanoparticles to hydroxycarbonate apatite in a hydrogel scaffold: relevance to bone formation“ erschienen in *Journal of Materials Chemistry B* 2015, 3, 35, 7079 – 7089.^[129]

„Vaterite particles are a biomaterial for rapid bone regeneration“ eingereicht bei *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.^[113]

10.1 Einleitung

In den vergangenen 50 Jahren wurde sich mit einer Vielzahl von Knochenersatzmaterialien beschäftigt. Neben den rein keramischen, auf Calciumphosphat-basierten Materialien,^[163,177,209] deren Nachteil in der hohen Sprödigkeit und geringen Elastizität liegt, erlangten Kompositmaterialien große Aufmerksamkeit. Durch die Kombination aus anorganischen und organischen Komponenten wird nicht nur eine ausreichende Härte, sondern auch eine gewisse Elastizität geschaffen.^[243] Als organische Komponente sind Hydrogele von großem Interesse, da sie aufgrund ihrer Konsistenz eine physikochemische Ähnlichkeit zur nativen extrazellulären Matrix (EZM) besitzen.^[69,244–246] Die am häufigsten verwendeten Hydrogele sind physikalische oder sogenannte natürliche Gel-Systeme. Diese basieren auf Polysacchariden wie Agarose, Alginat, Xanthan und Cellulose oder Proteinen wie Kollagen oder Gelatine.^[67,245,247–252] Kituchi *et al.*^[253] entwickelten beispielsweise ein Kompositmaterial aus Kollagen und Hydroxylapatit (HA), das durch zusätzliche Verlinkung der Kollagen-Fasern mit Glutaraldehyd eine verbesserte mechanische Eigenschaft und ein gutes biologisches Verhalten *in vitro* aufweist.

In den letzten Jahren rückten die synthetischen Polyethylenglykol- (PEG) basierten Hydrogele immer mehr in den Fokus der Knochenersatzmaterial-Forschung. Aufgrund der kontrollierbaren und reproduzierbaren Eigenschaften sind sie den natürlichen Gelen überlegen. Dabei lassen sie sich in spezifischen Molekulargewichten, Blockstrukturen, abbaubaren Einheiten und in verschiedenen Vernetzungsarten herstellen.^[69,74] Weitere Materialeigenschaften sind durch die Transparenz, Formbarkeit, Biokompatibilität und die Durchlässigkeit für Gase und Nährstoffe gegeben.^[254]

Aufgrund dessen sind PEG-basierte Hydrogele bereits in der biomedizinischen Anwendung weit verbreitet. Typische Beispiele sind künstliches Gewebe, Transportmaterialien für die kontrollierte Freisetzung von Stoffen, Wundverbände und Kontaktlinsen.^[69,254–257] Aufgrund der ausgezeichneten Löslichkeit in wässrigen und organischen Lösungen, der sehr niedrigen akuten und chronischen Toxizität und der Flexibilität der Rückgrat-Kette wird PEG als der „Gold Standard“ bezeichnet.^[258,259] Die PEG-Polymerisation kann unter milden, nicht-toxischen Bedingungen mittels Photo-Polymerisation^[74,260–262] oder durch Mischen reaktiver, funktionalisierter PEG-Komponenten^[263] erfolgen. Dadurch wird sowohl das Einbringen von metastabilen Polymorphen, wie zum Beispiel die Vaterit-Partikel, als auch das Einschleusen von Zellen ermöglicht. Eines der gängigsten und leicht herstellbaren Hydrogele basiert auf dem Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) Makromonomer.^[254,260,262,264,265] Eine modifizierte, bioabbaubare Variante wurde kürzlich von Pohlitz *et al.*^[266] durch den Einbau von säurelabilen Acetal-Gruppen in ein Polyethylenglykol-Dimethacrylat (PEG-DMA) Makromonomer vorgestellt. Im Vergleich zur Hydrolyse der Esterbindungen der PEG-DA Hydrogele ist durch die säurelabilen Acetal-Gruppen der Vorteil eines schnelleren Abbaus gegeben. Von besonderem Interesse ist der Einsatz eines solchen bioabbaubaren Hydrogels in einer Umgebung mit einem sauren pH-Wert. So untersuchten Pohlitz *et al.*^[266] die Abbaubarkeit von nano-Hydrogelkapseln für den Allergen-Transport und der gezielten Freisetzung in Endolysosomen bei einem pH-Wert von 4,5 – 5,0. Diese Bioabbaubarkeit des Polyethylenglykol-acetal-Dimethacrylat (PEG-a-DMA) Hydrogels ist ein entscheidender Vorteil für den Einsatz an Knochendefektstellen, an denen beispielsweise der Knochenabbau gegenüber dem Knochenaufbau überwiegt. Ein bekanntes Beispiel ist die Osteoporose. Die Idee dahinter ist, dass ein Kompositmaterial geschaffen werden soll, das für eine gezielte und lokalisierte Knochenregeneration sorgt. Dabei sollen die in dieser Arbeit vorgestellten Vaterit-Partikel in ein Transportsystem eingebracht werden, welches für eine schnelle und lokale Wirkung der Vaterit-Partikel an der Defektstelle sorgt. Von enormem Vorteil wäre dabei ein bioabbaubares System, das problemlos über die Niere ausgeschieden werden kann und damit nicht dauerhaft im Körper verbleibt. Ziel ist es die natürliche Knochenregeneration durch die Vaterit-Partikel anzutreiben und gleichzeitig die Produktion eines natürlichen Knochenminerals durch die Umsetzung der Vaterit-Partikel in ein Knochen-ähnliches Mineral zu steigern. Auf dieser Grundlage bietet die Kombination der Bioaktivität und Osteokonduktivität der Vaterit-Partikel mit der Flexibilität und Abbaubarkeit des Hydrogels vielversprechende Voraussetzungen für die Entwicklung eines neuen Transplantatmaterials für die Knochenregeneration.

Ziel dieses Kapitels war sowohl das PEG-DA als auch das PEG-a-DMA Hydrogel als mögliche Transportform für die Vaterit-Partikel zu untersuchen. Im Fokus dabei stand die Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb eines solchen Transportsystems zu verfolgen. Anschließend sollten erste *in vitro* Zell-Experimente an diesen Kompositmaterialien durchgeführt werden.

10.2 Materialien und Methoden

Für die nachfolgenden Synthesen wurden die synthetisierten und charakterisierten Vaterit-Partikel aus Kapitel 7 verwendet.

Die Synthese und Charakterisierung der modifizierten Polyethylenglykol- (PEG) Makromonomere erfolgte von [REDACTED], aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] am Institut für Organische Chemie der JGU Mainz.

10.2.1 Reagenzien / Chemikalien

Die verwendete simulierte Körperflüssigkeit (SBF: *simulated body fluid*) wurde nach Kokubo *et al.*^[164] frisch hergestellt. Die genaue Vorgehensweise ist dem Kapitel 8, Abschnitt 8.2.1, zu entnehmen.

Synthese der modifizierten PEG-Makromonomere

Die Synthese des Polyethylenglykol-acetal-Dimethacrylat- (PEG-a-DMA) Makromonomers erfolgte nach der Vorschrift von Pohlit *et al.*^[266]. Die Synthese des Polyethylenglykol-Diacrylat- (PEG-DA) Makromonomers erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Pohlit *et al.*^[261]. Eine Kurzbeschreibung beider Synthesen sind dem Anhang A, Abschnitt 11.8 zu entnehmen. Als Ausgangssubstanz diente jeweils PEG mit einer molaren Masse von 8000 g/mol.

Synthese der PEG-basierten Hydrogele

Es wurde eine 8%-ige oder 10%-ige (w/v) Lösung aus dem entsprechenden PEG-Makromonomer in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS: *phosphate buffered saline*, D8537 Sigma Aldrich) hergestellt. Zur Polymerisation wurden 0,2% (v/v) des Photo-Initiators 2-Hydroxy-2-methylpropiophenon ($C_{10}H_{12}O_2$, Sigma Aldrich, 97,0%) zugesetzt. Hierzu wurde eine 10%-ige (v/v) Stammlösung des Initiators in 70%-igem Ethanol hergestellt. Für die Vaterit-inkorporierten Hydrogele wurden 1% (w/v) Vaterit-Partikel in der Polymerlösung für 10 Minuten mittels Ultraschall suspendiert. Die Synthese erfolgte in 24- oder 48-Well Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Cellstar®) mit einem Volumen von 250 μ L oder 100 μ L pro Well. Zur Unterdrückung von Luftblasen oder Kapillareffekten wurde die Polymer-(Vaterit-) Mischung mit gleichem Volumen an 2-Propanol (C_3H_8O , Sigma Aldrich, $\geq 99,7\%$) überschichtet. Die Polymerisation verlief radikalisch durch UV-Strahlung bei 365 nm für 15 Minuten mittels eines kommerziell erhältlichen UV-Nageltrockner-Gerät mit 4 x 9 W Lampen. Der Mechanismus der UV-induzierten radikalischen Polymerisation ist in Abb. 10.1 am Beispiel des PEG-a-DMA dargestellt.

Zur Aufarbeitung wurden die erhaltenen Hydrogele in eine nächst größere 12- oder 24-Well Zellkulturplatte transferiert und mehrfach mit PBS und bei den Zell-Experimenten noch zusätzlich mit entsprechendem Zellkulturmedium gewaschen.

Für die *in vitro* Verwendung der Hydrogele wurde auf den Einsatz von sterilen Reagenzien und keimfreien Reaktionsgefäße besonderen Wert gelegt.

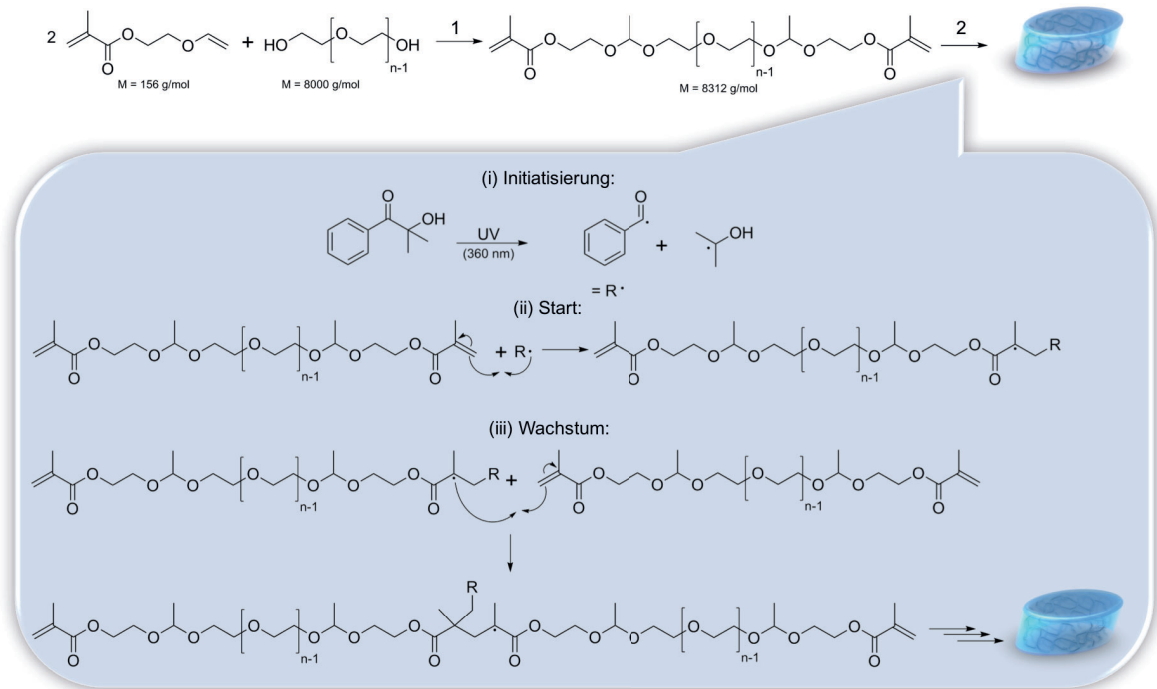


Abb. 10.1: Mechanismus der radikalischen Polymerisation am Beispiel des PEG-a-DMA Makromonomers, mit $n = 181$. Schritt 1: Synthese des Makromonomers ausgehend von PEG8000 und 2-(Vinyl-oxy)-Ethyl-Methacrylat. Schritt 2: Radikalische UV-induzierte Polymerisation mit (i) Initialisierung: heterolytischer Zerfall des Photo-Initiators mittels UV-Strahlung, (ii) Start: Angriff der endständigen Methylengruppe des PEG-a-DMA durch das reaktive Radikal des Initiators und (iii) Wachstum: Quervernetzung durch Kettenwachstum zum dreidimensionalen Polymernetzwerk. Die Terminierung erfolgt durch Rekombination zweier Radikaleinheiten.

Quellverhalten der PEG-basierten Hydrogele

Das Quellverhalten im Gleichgewichtsquellzustand wurde gravimetrisch bestimmt. Die synthetisierten Hydrogele wurden mehrfach gewaschen, kurz im untersuchten Medium quellen gelassen und bis zur Massenkonstanz gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Gele wurden für 6 Stunden und 24 Stunden in dem untersuchten Medium bei 37 °C im Inkubator bei 150 U/min quellen gelassen. Der Quellgrad Q wurde nach Formel (10.1) berechnet. Alle untersuchten Hydrogele wurden in vierfacher Ausführung hergestellt und der Mittelwert der Quellgrade mit Standardabweichung berechnet.

$$Q = \frac{m_w}{m_t} = \frac{m_q - m_t}{m_t} \quad (10.1)$$

Mit m_w = Menge an adsorbiertem Wasser des Hydrogels, m_q = Masse der Hydrogels im gequollenen Zustand und m_t = Masse des Hydrogels im getrockneten Zustand.^[245]

10.2.2 Chemische Charakterisierungsmethoden

Die synthetisierten Hydrogele wurden mittels der Rasterelektronenmikroskopie (REM) morphologisch untersucht. Durch energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) wurden Elementanalysen durchgeführt. Mit Hilfe der Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD: *X-ray diffraction*) erfolgte eine Phasenanalyse. Die Fourier-Transformation-Infrarot- (FT-IR) und Raman-Spektroskopie wurden als weitere Charakterisierungsmethode zur Identifizierung der CO_3^{2-} - und PO_4^{3-} -Gruppen der Vaterit- und HA-Partikel im Hydrogel verwendet. Detaillierte Angaben zu den Messmethoden bzw. Geräteparametern sind dem Abschnitt 11.1 zu entnehmen.

Alle Inkubationsreaktionen ohne Zellen wurden auf einem Heidolph Unimax 1010 Schüttler mit Inkubatormodul 1000 bei 37 °C und leichtem Schütteln (150 U/min.) durchgeführt.

10.2.3 Biologische Methoden – *in vitro* Studien

Die verwendeten PEG-basierten Makromonomere wurden sowohl auf die Anwesenheit von Endotoxin als auch inflammatorische Effekte untersucht. Hierzu wurde die Expression von E-Selektin durch primäre humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells*) nach Exposition mit den PEG-basierten Makromonomer und den Hydrogelen verfolgt. Der Nachweis erfolgte durch eine Immunfluoreszenz-Färbung von E-Selektin und mittels des Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assays (CAM-EIA: *cell adhesion molecule – enzyme immunoassay*) wie in Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3, beschrieben.

Die Zell-Biokompatibilität der verwendeten PEG-basierten Makromonomere wurde an einer humanen Osteoblasten-Zelllinie MG-63 und an primären humanen Osteoblasten (pOB), sowie an primären humanen Endothelzellen (HUVEC) untersucht.

Die Zell-Adhärenz und Viabilität der MG-63 Zellen und der pOB auf den Hydrogelen wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden 100.000 MG-63 Zellen pro Well auf je einem Hydrogel in einer 12-Well Zellkulturplatte (Greiner bio-one Cellstar®) ausgesät. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt und zwei unterschiedlichen Zell-Passagen getestet. 50.000 pOB wurden pro Well auf je ein Hydrogel in einer 24-Well Zellkulturplatte (Greiner bio-one Cellstar®) ausgesät. Dabei wurden pOB von drei verschiedenen Spendern verwendet. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 24 und 72 Stunden bis hin zu 7 Tagen.

Zusätzlich wurde noch die Differenzierung der Osteoblasten untersucht. Die Vorgehensweise ist dem Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3, zu entnehmen. Abweichend davon wurden 50.000 primäre humane Osteoblasten (pOB) pro Well einer 24-Well Zellkulturplatte auf die synthetisierten Vaterit-haltigen und Vaterit-freien Hydrogele ausgesät. Als Negativ-Kontrollen wurden die Hydrogele ohne pOB im osteogenen Differenzierungs-Medium (ODM) inkubiert. Nach einem Zeitraum von 7, 14 und 21 Tagen wurden die Hydrogele mit einem sterilen Skalpell halbiert. Eine Hälfte wurde in eine neue 24-Well Zellkulturplatte transferiert, viermal mit je 1 mL destilliertem Wasser (dH₂O, Braun)

gewaschen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet. Diese Hydrogel-Stücke wurden mittels FT-IR-Spektroskopie untersucht. An ausgewählten Proben erfolgte zusätzlich eine XRD-Untersuchung. Die verbliebene Hydrogel-Hälfte wurde erneut halbiert. An einem Viertel wurde mit einem kommerziell erworbenen *Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit* (ALP, Sigma Aldrich, 86R) die Produktion der alkalischen Phosphatase (ALP) der Osteoblasten untersucht (s. Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3). Am zweiten Hydrogel-Viertel erfolgte der Nachweis der Adhärenz von vitalen pOB mittels Calcein AM (AM: Acetoxymethylester, Thermo Fisher Scientific).

Die Kultivierungs- und Wachstumsbedingungen der verwendeten Zellen, sowie die genauen Durchführungen der *in vitro* Studien sind dem Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3, zu entnehmen.

10.3 Ergebnisse

Für den Einsatz der Vaterit-Partikel in der Knochenregeneration ist ein geeignetes, biokompatibles Transportsystem nötig. Damit soll gewährleistet werden, dass die Partikel einerseits gezielt an die Defektstelle gebracht werden und andererseits dort eine lokale Wirkung hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Polyethylenglykol (PEG) -basierte Hydrogele untersucht, die Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) und die bioabbaubaren Polyethylenglykol-acetal-Dimethacrylat (PEG-a-DMA) Hydrogele. Mit beiden Hydrogelen wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten. Aufgrund der Literaturbekanntheit der PEG-DA Hydrogele^[254,260,262,264,265] wird im Nachfolgenden auf die Ergebnisse der PEG-a-DMA Hydrogele näher eingegangen. Eine kurze Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse zu den PEG-DA Hydrogelen ist dem Anhang A, Abschnitt 11.9, zu entnehmen.

10.3.1 Charakterisierung der PEG-a-DMA Hydrogele und Umsetzung der Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit innerhalb der Hydrogele

Die UV-induzierte radikalische Polymerisation der PEG-a-DMA Makromonomere liefert formstabile und homogene Hydrogele, deren Form sich aus dem Reaktionsgefäß ergibt. Abb. 10.2 zeigt digitale Aufnahmen der synthetisierten und gequollenen Hydrogele. Die reinen PEG-a-DMA Hydrogele ohne Vaterit-Partikel zeigen farblose, klare Gele (Abb. 10.2a). Im Gegensatz dazu sind die Vaterit-inkorporierten PEG-a-DMA Hydrogele milchig trüb. Die Seitenansicht des Vaterit-beladenen Hydrogels (s. Abb. 10.2b, rechts) zeigt eine einheitliche Trübung, weshalb von einer homogenen Verteilung der Vaterit-Partikel innerhalb des Gels ausgegangen werden kann. Für die weitere chemische Charakterisierung der Hydrogele und den Nachweis der Vaterit-Partikel, sowie deren Umsetzung in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit (HA), wurden die Hydrogele mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren, in kleine Stücke zerschlagen und lyophilisiert. In Abb. 10.2c sind solche gefriergetrockneten Stücke des Hydrogels dargestellt.

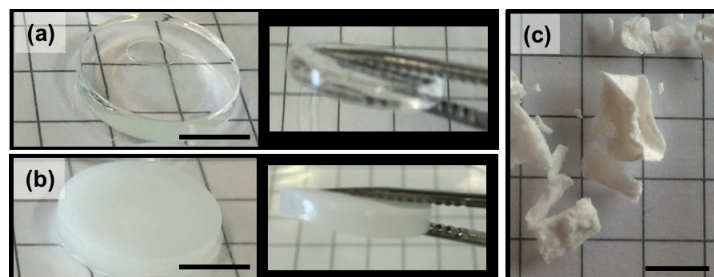


Abb. 10.2: Digitale Aufnahmen der synthetisierten 10%-ige PEG-a-DMA Hydrogele im gequollenen Zustand (a) ohne Vaterit-Partikel und (b) mit 1% Vaterit-Partikel. (c) gefriergetrocknete Hydrogel-Stücke für die chemische Charakterisierung. Der Maßstab entspricht einer Länge von 0,5 cm.

Das Quellverhalten wurde durch Bestimmung des Quellgrades der synthetisierten PEG-a-DMA Hydrogele sowohl in der simulierten Körperflüssigkeit (SBF) als auch in der Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 10.3 zusammengestellt und zeigen

prinzipiell nach 6 Stunden und 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied im Quellgrad. Daraus resultiert, unabhängig vom Medium in dem die Quellung stattfand, dass der Zustand maximaler Quellung (Gleichgewichtsquellzustand) bereits nach maximal 6 Stunden erreicht ist. In Anwesenheit von 1% Vaterit-Partikeln im Hydrogel konnte tendenziell ein verringerter Quellgrad bestimmt werden. Aus dem Vergleich der 10%-igen mit den 8%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen geht eine stärkere Quellung bei geringerem Anteil an Markmonomer hervor.

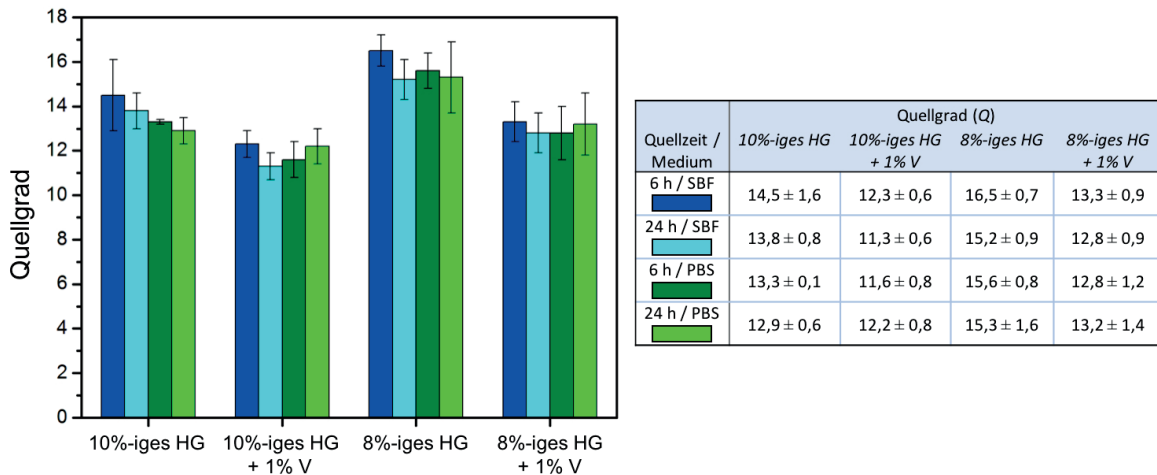


Abb. 10.3: Resultate der Bestimmung des Quellgrades (Q) von 10%-igen und 8%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (V) in SBF und PBS nach 6 und 24 Stunden. Graphische Darstellung (links) und tabellarische Darstellung (rechts) der Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die Morphologie und die Eigenschaft zur Mineralisierung der PEG-a-DMA Hydrogele wurde im lyophilisierten Zustand untersucht. Abb. 10.4 zeigt Rasterelektronenmikroskopie- (REM) Aufnahmen der Hydrogele unmittelbar nach der Synthese. Beide Aufnahmen zeigen ein dreidimensionales Polymer-Netzwerk. Bei dem Vaterit-beladenen Hydrogel aus Abb. 10.4b lassen sich zusätzlich noch ellipsoide Partikel erkennen, die der Morphologie der Vaterit-Partikel entsprechen (vgl. Kapitel 7, Abb. 7.2).

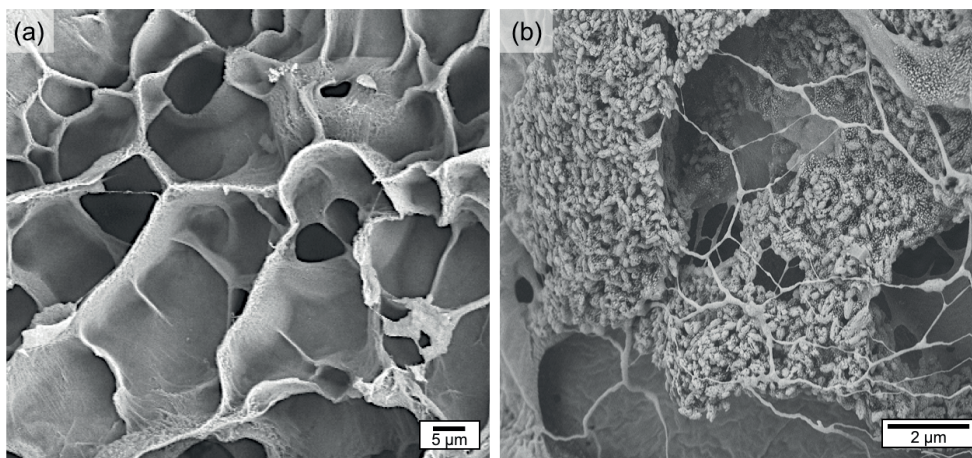


Abb. 10.4: REM-Aufnahmen der PEG-a-DMA Hydrogele unmittelbar nach der Synthese im lyophilisierten Zustand. (a) Hydrogel ohne Vaterit-Partikel, (b) Hydrogel mit Vaterit-Partikel.

Anhand der Röntgenbeugungs- (XRD) Untersuchungen und der FT-IR-Spektroskopie konnten die Reflexe und Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe (vgl. Kapitel 7, Tab. 7.1) des Vaterits innerhalb des Hydrogels nachgewiesen werden (s. Abb. 10.8iii und Abb. 10.9iii).

Weiterhin wurde die Umsetzung der Vaterit-Nanopartikel in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit (HA) innerhalb des Hydrogels untersucht. Hierzu wurden die Hydrogele sowohl in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF) als auch in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) bei 37 °C inkubiert. In Abb. 10.5 sind REM-Aufnahmen der PEG-a-DMA Hydrogele ohne Vaterit-Partikel nach 24 Stunden Inkubation in SBF und PBS dargestellt. Im Vergleich mit der REM-Aufnahme unmittelbar nach der Synthese (s. Abb. 10.4a) zeigte sich weder nach der Inkubation in SBF noch in PBS eine morphologische Veränderung. Neben dem Polymergerüst konnte keine Mineralisierung der in den Inkubationsmedien enthaltenen Salze auf der Oberfläche des Polymergerüsts beobachtet werden.

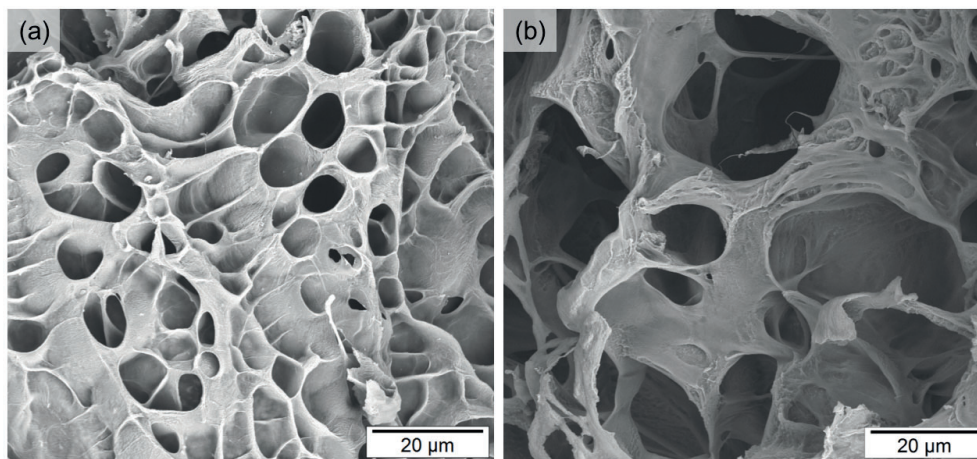


Abb. 10.5: REM-Aufnahmen der PEG-a-DMA Hydrogele ohne Vaterit-Partikel nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS im gefriergetrockneten Zustand.

Im Gegensatz dazu konnte bei den Vaterit-beladenen Hydrogelen nach 24 Stunden Inkubation sowohl in SBF als auch in PBS eine deutliche Änderung in der Morphologie beobachtet werden (s. Abb. 10.6). Die nach der Synthese im Netzwerk enthaltenen ellipsoiden Vaterit-Partikel ließen sich nicht mehr erkennen. Hingegen konnten plättchenförmige Strukturen auf der Oberfläche des Polymergerüsts nachgewiesen werden. Bei näherer Betrachtung der adsorbierten Partikel in Abb. 10.6a2 und b2 lässt sich eine vergleichbare Morphologie feststellen, wie sie zuvor bei der Umsetzung der Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnlichen HA in Kapitel 8, Abb. 8.6 und Abb. 8.7, beobachtet wurden. Die Elementaranalyse der gebildeten plättchenförmigen Strukturen durch energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) mit Hilfe des REMs ergab das Vorliegen von Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Calcium (Ca) und Phosphor (P). Die Ergebnisse sind in Abb. 10.7 dargestellt. Zusätzlich konnten Spuren von Natrium (Na) und nach der Inkubation in SBF noch Spuren von Magnesium (Mg) nachgewiesen werden. Die Detektion von Silicium (Si) und Silber (Ag) ist auf die Probenpräparation zurückzuführen (s. Abschnitt 11.1). Anhand der Quantifizierung von Ca und P

wurde das Ca : P Verhältnis ermittelt. Es ergab sich durch die Inkubation des Vaterit-beladenen Hydrogels in SBF ein Ca : P Verhältnis von 1,4 und in PBS ein Ca : P Verhältnis von 1,7.

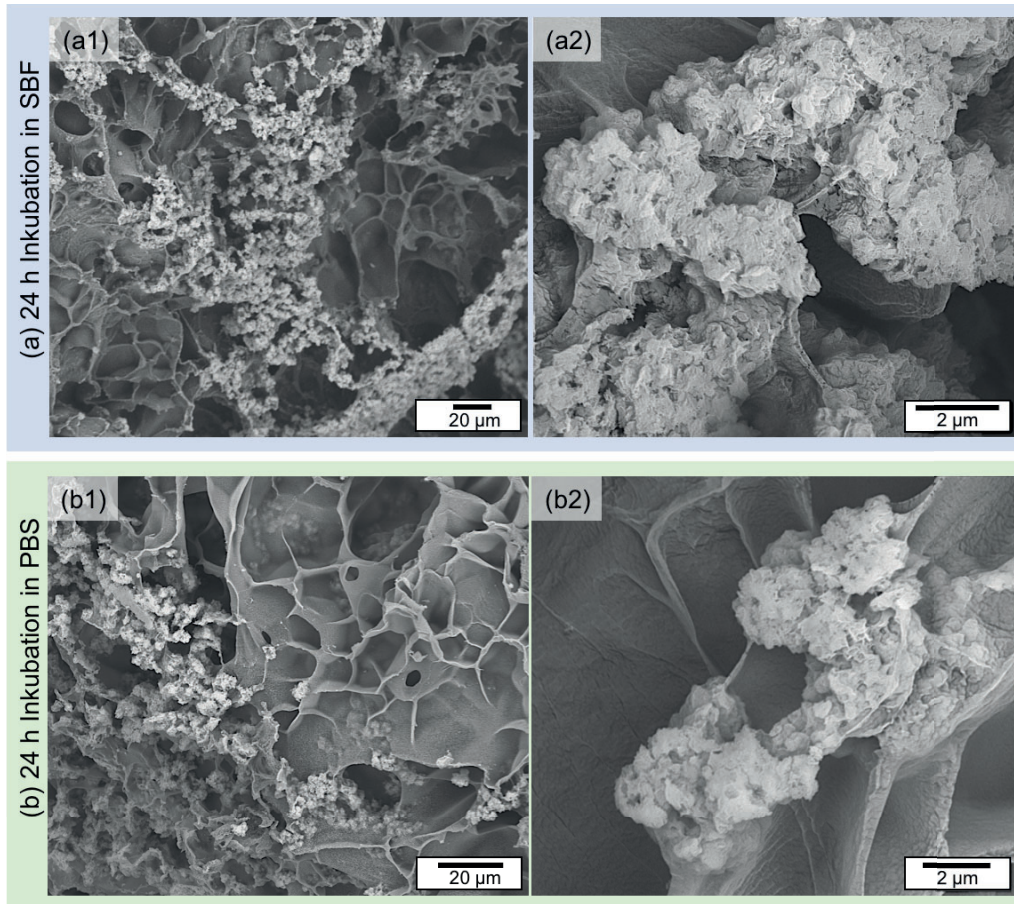


Abb. 10.6: REM-Aufnahmen der Vaterit-inkorporierten PEG-a-DMA Hydrogele nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS im gefriergetrockneten Zustand.

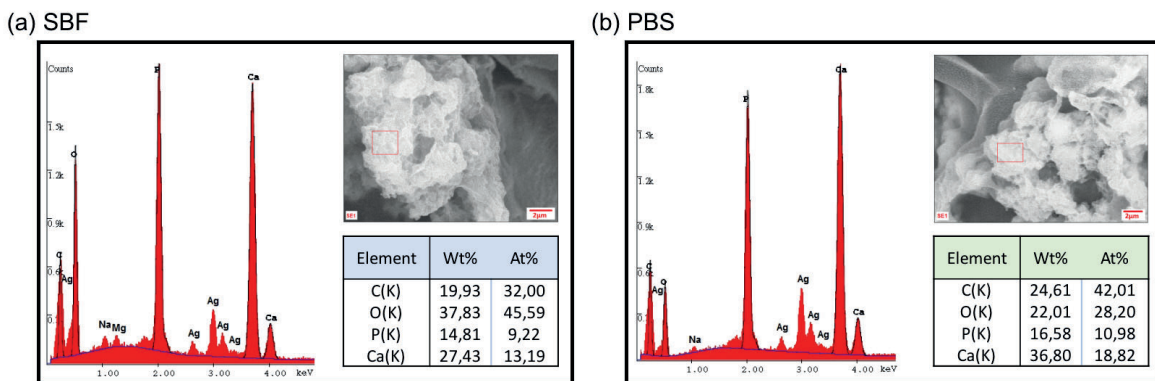


Abb. 10.7: Ergebnisse der REM-EDX-Messung der nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS entstandenen plattenförmigen Strukturen auf der Oberfläche der PEG-a-DMA Hydrogele.

Die weitere Charakterisierung erfolgte anhand von XRD-Untersuchungen und FT-IR- sowie Raman-Spektroskopie. Die Ergebnisse sind in Abb. 10.8, Abb. 10.9 und Abb. 10.10 präsentiert.

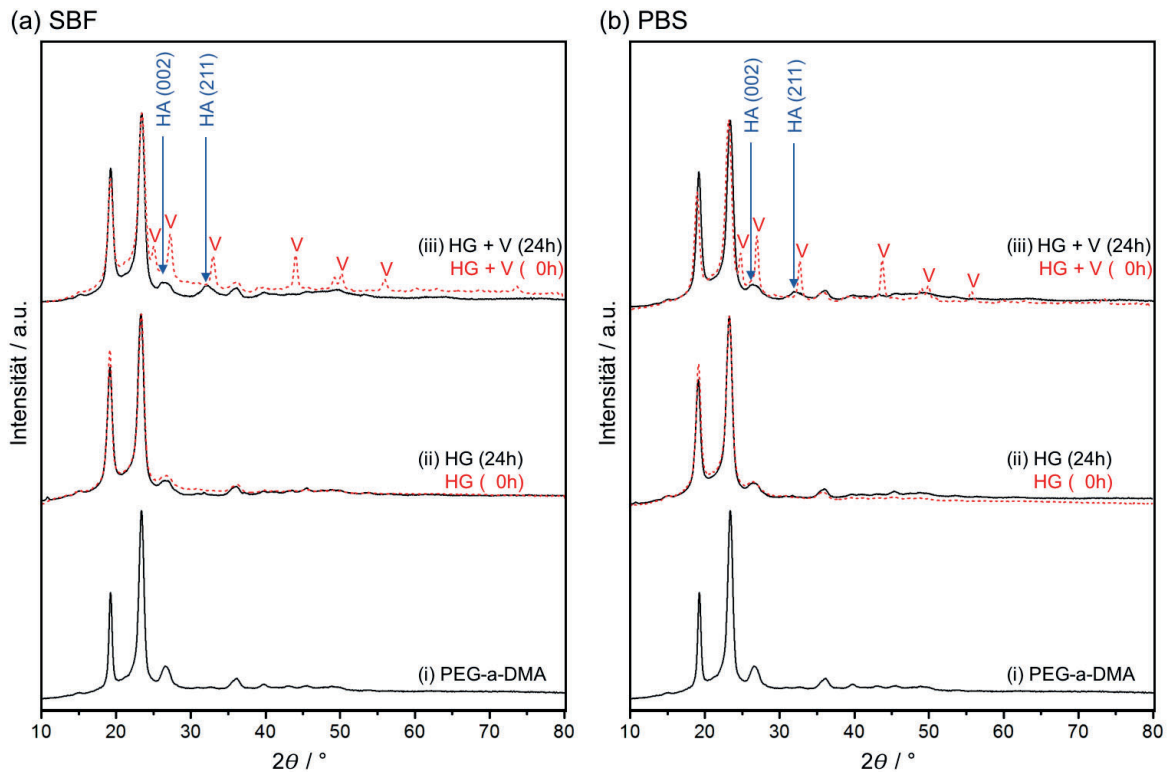


Abb. 10.8: Diffraktogramme (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS. Mit Kennzeichnung der Reflexe des Vaterits (V)^[33] und der beiden Reflexe des Hydroxylapatits (HA)^[170].

Bei den Vaterit-freien Hydrogelen konnte, unabhängig vom Inkubationsmedium, nach 24 Stunden Inkubation das gleiche Reflexprofil nachgewiesen werden, wie unmittelbar nach der Synthese des Hydrogels (s. Abb. 10.8ii). Ebenso wurde ein vergleichbares Bandenmuster der IR-Spektren vor und nach 24 Stunden Inkubation in den beiden Medien festgestellt werden (s. Abb. 10.9ii). Weiterhin zeigten die Hydrogele ein vergleichbares Reflexprofil und Bandenmuster wie bei das PEG-a-DMA Makromonomer. Folglich fand eine dreidimensionale Vernetzung der PEG-a-DMA Makromonomere statt (vgl. Abb. 10.1).

Der Vergleich der Vaterit-beladenen Hydrogele vor und nach 24 Stunden Inkubation lieferte deutliche Unterschiede. Sowohl nach 24 Stunden Inkubation der Hydrogele in der SBF als auch in der PBS konnten keine Reflexe und Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe des Vaterits nachgewiesen werden (s. Abb. 10.8iii, Abb. 10.9iii). Zusätzlich traten Reflexe bei $2\theta \sim 26^\circ$ (002) und $2\theta \sim 32^\circ$ (211) auf, die dem HA zuzuordnen sind (s. Abb. 10.8iii).^[167–169] Ebenso ließen sich mittels der spektroskopischen Methoden zusätzliche Schwingungsbanden bei 1024 cm^{-1} , 962 cm^{-1} und 447 cm^{-1} identifizieren (s. Abb. 10.9iii und Abb. 10.10iii), die den Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe entsprechen (vgl. Kapitel 8 Abschnitt 8.3.1).^[171,172]

Diese Ergebnisse bestätigen die morphologischen Beobachtungen und zeigen, dass eine vollständige Umsetzung der Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnliche HA innerhalb von 24 Stunden in einem PEG-basierten Hydrogel-Gerüst stattgefunden hat.

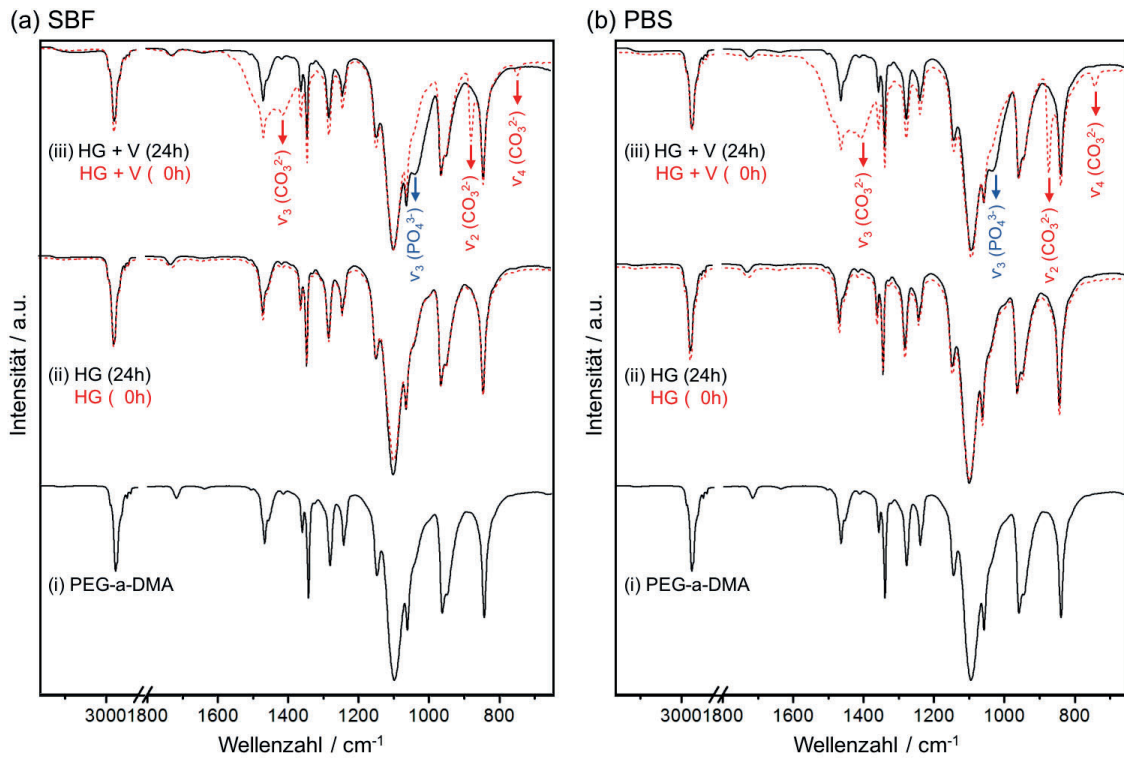


Abb. 10.9: IR-Spektren (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS. Mit Kennzeichnung der Banden der Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe des Vaterits^[140] und der asymmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe des Hydroxylapatits (HA)^[123,171].

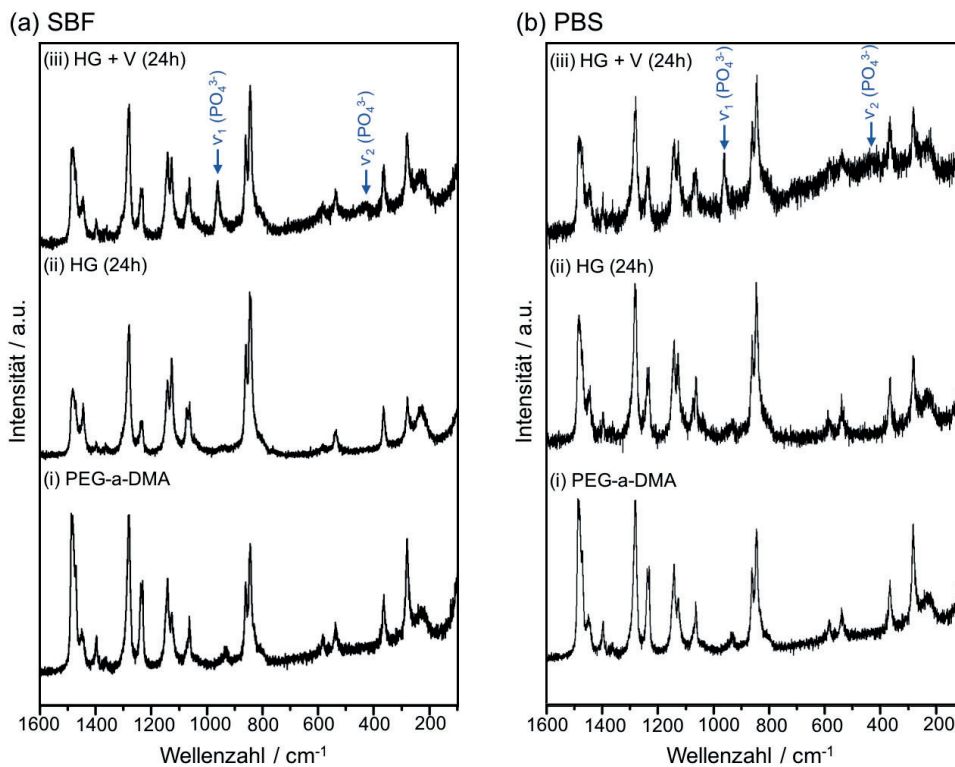


Abb. 10.10: Raman-Spektren (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers und der Hydrogele nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS (ii) ohne und (iii) mit Vaterit-Partikeln. Mit Kennzeichnung der Banden der Schwingungsmoden der PO_4^{3-} -Gruppe des Hydroxylapatits (HA)^[172].

10.3.2 Nachweis von E-Selektin Expression durch primäre humane Endothelzellen

Für den klinischen Einsatz muss ein synthetisches Material nicht nur steril sein, sondern auch frei von Endotoxin und sollte keine inflammatorischen Effekte auf Zellen, speziell primären Endothelzellen, hervorrufen. Wie bereits in Kapitel 7, Abschnitt 7.3.3 beschrieben, exprimieren Endothelzellen in Gegenwart von Endotoxin oder Entzündungs-stimulierenden Faktoren E-Selektin. Mit Hilfe der Antikörper-basierten Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte ein optischer Nachweis von E-Selektin in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen des PEG-a-DMA Makromonomer-Ausgangsmaterials (50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ und 500 $\mu\text{g/mL}$). Die Ergebnisse sind in Abb. 10.11 zusammengestellt. Bei keiner der getesteten Konzentration an PEG-a-DMA Makromonomer konnte eine E-Selektin Antikörper-Färbung nachgewiesen werden (s. Abb. 10.11d, e, f). Weiterhin konnten die Zellkerne, in vergleichbarem Ausmaß wie bei den unbehandelten Zellen (s. Abb. 10.11a), durch eine blaue Färbung mittels Höchst Dye beobachtet werden. Als Positiv-Kontrollen wurden Endothelzellen mit niedriger Konzentration (0,1 $\mu\text{g/mL}$, s. Abb. 10.11b) und hoher Konzentration (1 $\mu\text{g/mL}$, s. Abb. 10.11c) an Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, wodurch eine entsprechende Menge E-Selektin von den HUVEC exprimiert und mittels Antikörper-Färbung detektiert wurde.

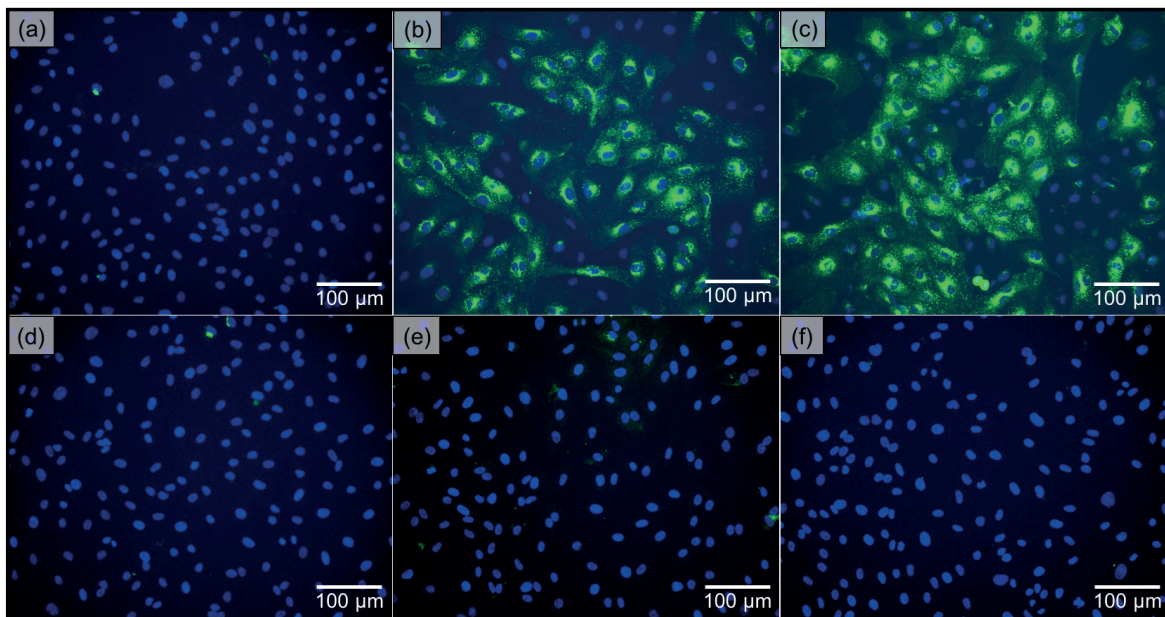


Abb. 10.11: Nachweis von E-Selektin durch Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung, getestet an primären humanen Endothelzellen (HUVEC). (a) Negativ-Kontrolle: unbehandelte HUVEC, (b) Positiv-Kontrolle 1: mit 0,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS stimulierten HUVEC, (c) Positiv-Kontrolle 2: mit 1,0 $\mu\text{g/mL}$ LPS stimulierten HUVEC, (d) mit 50 $\mu\text{g/mL}$ PEG-a-DMA Makromonomer, (e) mit 100 $\mu\text{g/mL}$ PEG-a-DMA Makromonomer und (f) mit 500 $\mu\text{g/mL}$ PEG-a-DMA Makromonomer stimulierten HUVEC. Die Zellkerne wurden mit Höchst Dye 33342 angefärbt und E-Selektin mittels Antikörperfärbung grün markiert.

Mittels der quantitativen Methode des Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assay (CAM-EIA, *Cell Adhesion Molecule Enzym Immunoassay*) wurde das negative Ergebnis bestätigt. Die Resultate sind in der Abb. 10.12 dargestellt. Zusätzlich wurden noch Vaterit-freie und Vaterit-beladene Hydrogele mit dieser Methode getestet. Bei allen untersuchten Proben konnten lediglich physiologisch niedrige Mengen an E-Selektin nachgewiesen werden, wie sie auch in den unbehandelten Zellen detektiert wurden.

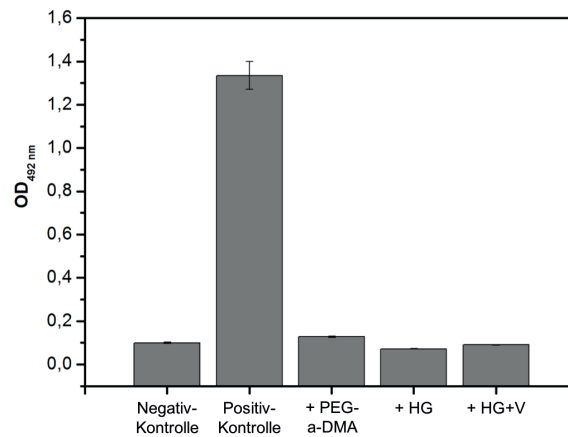


Abb. 10.12: Ergebnisse des Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assays (CAM-EIA) durch optische Dichte- (OD) Messungen der stimulierten HUVEC mit 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PEG-a-DMA Makromonomer und PEG-a-DMA Hydrogelen ohne Vaterit (HG) und mit Vaterit (HG+V). Mit unbehandelten HUVEC als Negativ-Kontrolle und mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimulierten Zellen als Positiv-Kontrolle.

10.3.3 Zell-Biokompatibilität des Makromonomers PEG-acetal-DMA

Im nächsten Schritt wurde die Zellverträglichkeit und Zell-Biokompatibilität des PEG-a-DMA Makromonomers *in vitro*, unter Verwendung des membranpermeablen Calcein-AM Fluoreszenzfarbstoffs, getestet. Die Untersuchung erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen des PEG-a-DMA Makromonomers an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63, den primären humanen Osteoblasten (pOB) und den primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) über einen Zeitraum von 24 Stunden bis zu 7 Tagen. Hierbei wurde die Morphologie als auch das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen verfolgt. Die Ergebnisse der MG-63 Zellen sind in Abb. 10.13 an ausgewählten, repräsentativen Beispielen dargestellt. In allen untersuchten Fällen und einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden bis zu 7 Tagen zeigten die mit PEG-a-DMA Makromonomer exponierten MG-63 Zellen eine vergleichbare Wachstumsverteilung mit ähnlicher Zellmorphologie, wie sie bei den unbehandelten Kontroll-Zellen beobachtet wurde.

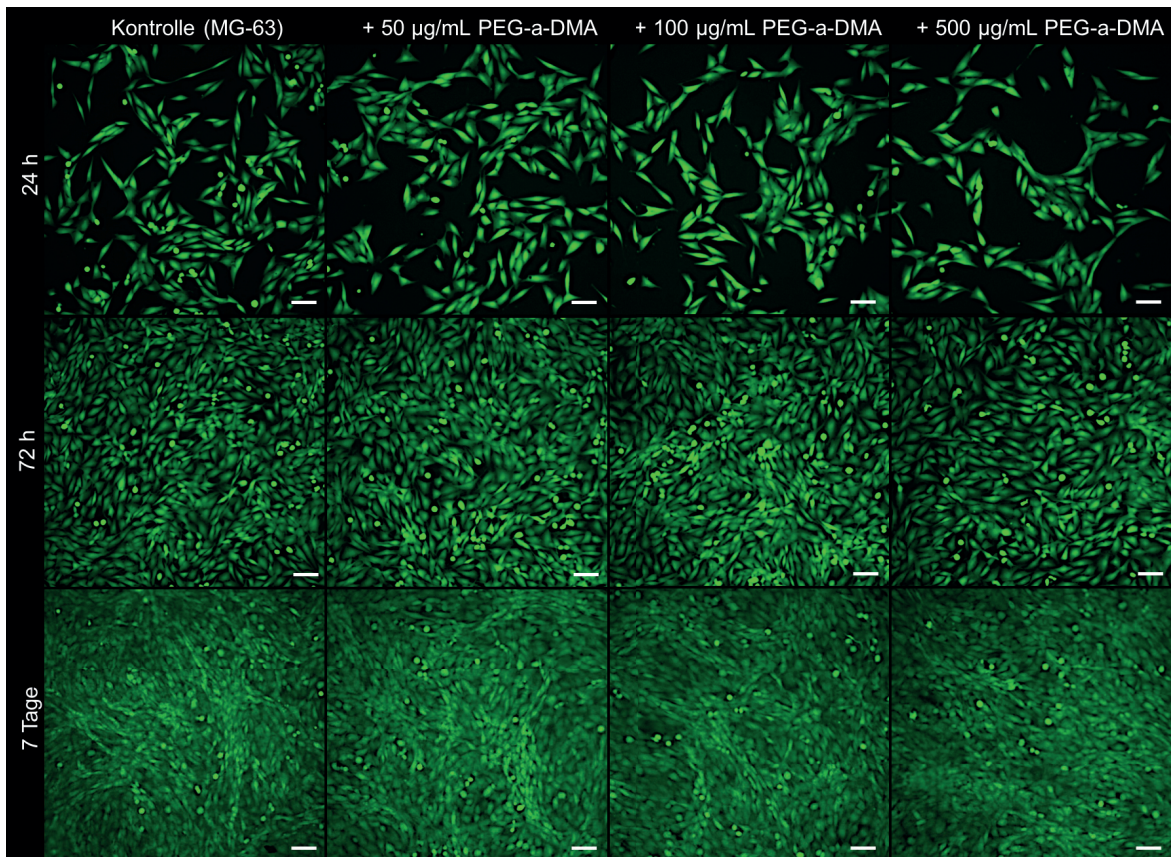


Abb. 10.13: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an PEG-a-DMA Makromonomer getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Die Abb. 10.14 und Abb. 10.15 zeigen die Ergebnisse der pOB und der HUVEC am Beispiel eines repräsentativen Spenders. Es wurden insgesamt drei verschiedene Spender getestet.

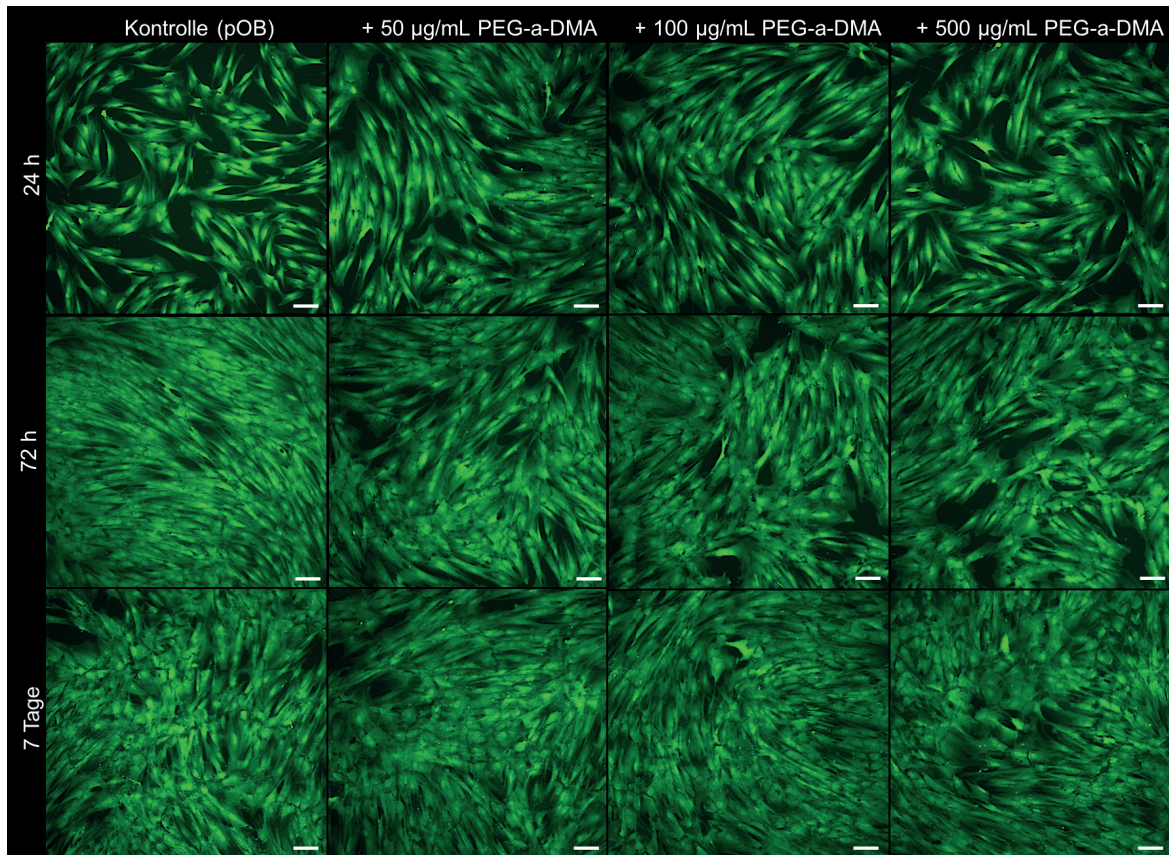


Abb. 10.14: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an PEG-a-DMA Makromonomer getestet an der primären humanen Osteoblasten (pOB) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

Anhand der Fluoreszenzfärbungen der primären humanen Zellen (pOB und HUVEC) konnte eine vergleichbare Wachstumsverteilung mit ähnlicher Zellmorphologie, wie bei den unbehandelten Zellen (Kontrolle), beobachtet werden. Diese Beobachtungen wurden bei allen untersuchten Zellen, unabhängig von der getesteten Polymer-Konzentration und dem Inkubationszeitraum, festgestellt.

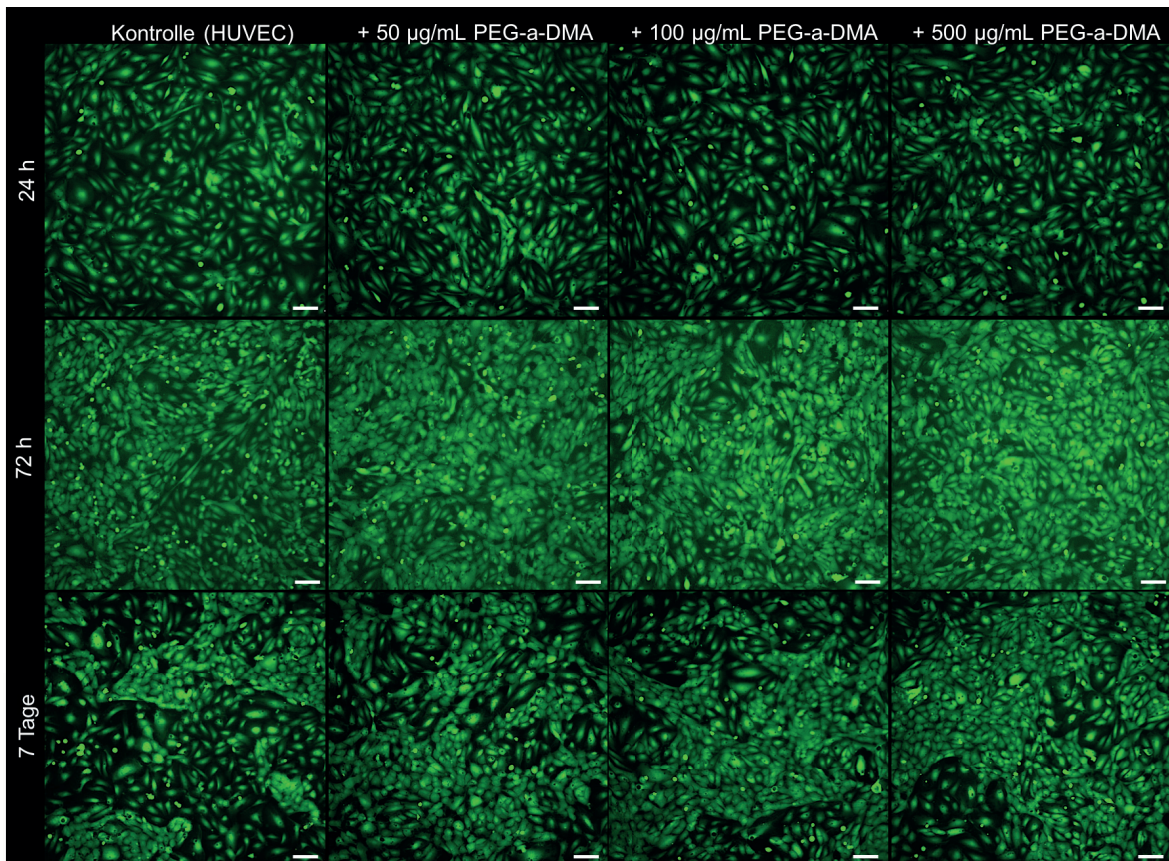


Abb. 10.15: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an PEG-a-DMA Makromonomer getestet an primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

10.3.4 Zellenadhärenz und Viabilität in Anwesenheit der PEG-basierten Hydrogele

Anhand der vorherigen chemischen Untersuchungen wurde das Einbringen der Vaterit-Partikel in ein PEG-basiertes Hydrogel beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Hydrogel-Matrix ein vorteilhaftes dreidimensionales Gerüst darstellt, indem es die Umsetzung der Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit (HA) beschleunigt (vgl. Kapitel 8, Abschnitt 8.3). Bereits in Kapitel 7 konnte gezeigt werden, dass von den Vaterit-Partikeln keinerlei zytotoxische Effekte hervorgehen und diese die osteogene Differenzierung anregen. Weiterhin wurde in Kapitel 9 nachgewiesen, dass auch von der aus Vaterit-Partikeln entstandenen HA-Spezies keine zytotoxischen Effekte hervorgehen. Weiterhin konnten keine zytotoxischen Effekte des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers nachgewiesen werden. Somit sollte in anschließenden *in vitro* Experimenten die Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 und der primären humanen Osteoblasten (pOB) auf den Hydrogelen untersucht werden.

Wie der Abb. 10.16 zu entnehmen ist, zeigten die PEG-a-DMA Hydrogele auch nach der Inkubation in Zellkulturmedium eine stabile und gut händelbare Form.

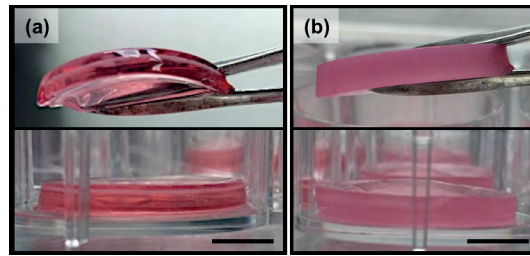


Abb. 10.16: Digitale Aufnahmen der synthetisierten 10%-ige PEG-a-DMA Hydrogele nach Quellung im Zellkulturmedium (a) ohne Vaterit-Partikel und (b) mit 1% Vaterit-Partikel. Der Maßstab entspricht einer Länge von 0,5 cm. Die rötliche Färbung der Hydrogele resultiert aus der Quellung in Phenolrot-haltigem Zellkulturmedium.

MG-63 Zellen wurden sowohl auf 10%-ige als auch auf 8%-ige Hydrogele ausgesät. Hierbei wurde der Effekt einer stärkeren Quellung durch geringere Polymerkonzentration auf die Adhärenz und Viabilität der Zellen untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der 10%-igen Hydrogele sind in Abb. 10.17 und die der 8%-igen Hydrogele sind in Abb. 10.18 zusammengestellt.

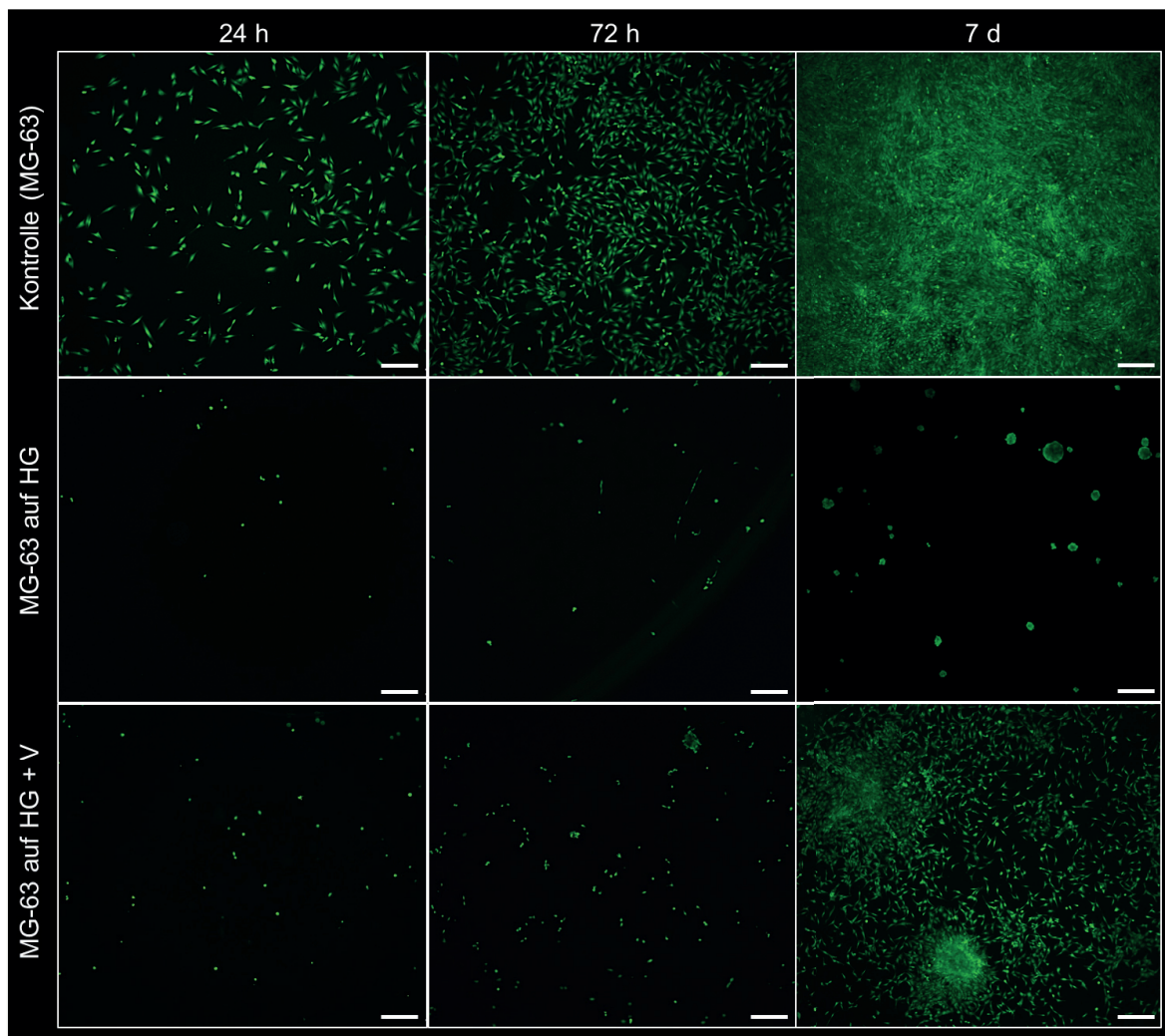


Abb. 10.17: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 auf 10%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 300 μm .

Trotz unterschiedlicher Anteile an Polymer zeigten beide Hydrogele einen deutlichen Trend bezüglich der Zelladhärenz und folglich der Viabilität. Bei den Vaterit-haltigen Hydrogelen konnten nach 24 Stunden Kultivierung einige wenige Zellen nachgewiesen werden. Über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen ließ sich eine deutliche Proliferation der Zellen auf den Hydrogelen beobachten. Im Vergleich dazu zeigten die Vaterit-freien Hydrogele nahezu keine adhärennten Zellen. Die Morphologie der Zellen auf den Vaterit-haltigen Hydrogelen ist vergleichbar mit der Morphologie der Kontroll-Zellen und lässt auf einen vitalen Zustand der Zellen schließen. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Morphologie der Zellen abhängig vom Untergrund ist, auf dem sie adhären und proliferieren. Ein Hydrogel besitzt aufgrund des Polymernetzwerks Unebenheiten mit kleinen Lücken (Netzwerk-Maschen) und keine durchgängige, ebene Fläche wie sie bei den Zellkulturplatten vorzufinden ist. Beim Vergleich der unterschiedlichen Polymer-Anteile der Hydrogele fällt auf, dass das geringer konzentrierte Vaterit-beladene Hydrogel eine deutlich höhere Zellzahl aufweist.

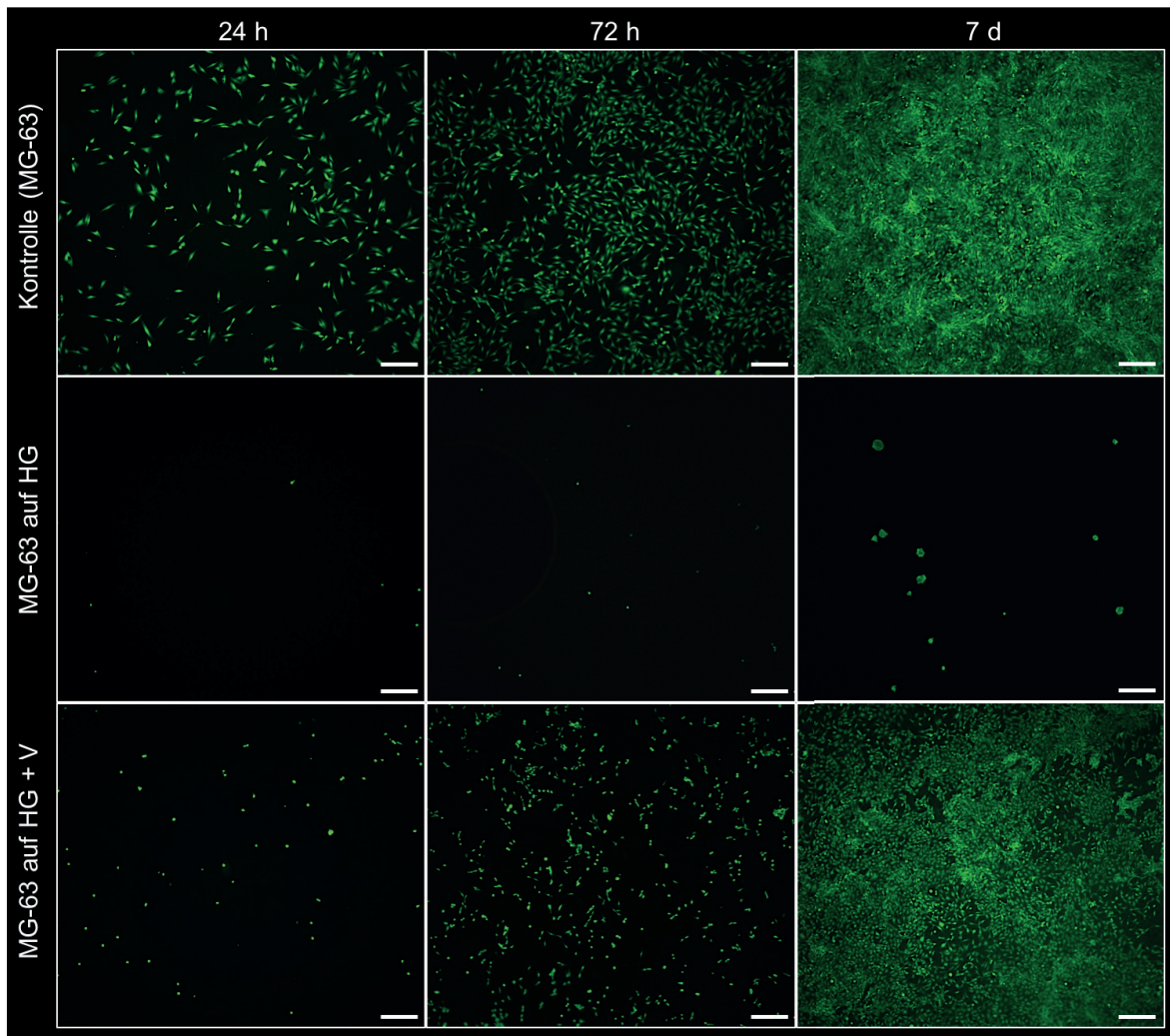


Abb. 10.18: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 auf 8%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 300 μm .

Der Abb. 10.19 sind die Ergebnisse der Kultivierung der pOB auf 10%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen zu entnehmen. Wie auch mit den MG-63 Zellen zeigten die pOB einen vergleichbaren Trend mit einer höheren Zellmenge auf den Vaterit-haltigen Hydrogelen. Allerdings ließ sich keine signifikante Zunahme in der Zellmenge über den Kultivierungszeitraum feststellen. Auch bei den pOB der Kontrolle konnte keine so eindeutige Proliferationsrate wie bei den MG-63 Zellen beobachtet werden. Vor allem der Vergleich der Anzahl an vitalen Zellen nach 72 Stunden und 7 Tagen lässt keine Zunahme erkennen. Weiterhin konnten Unterschiede in der Morphologie der pOB auf den Hydrogelen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen beobachtet werden. Während die pOB der Kontrolle eine typisch adhärente Morphologie mit Zellfortsätzen aufwies, zeigten die pOB auf den Vaterit-beladenen Hydrogelen eher eine abgerundete Form und liegen in Zell-Anhäufungen vor. Erst nach 7 tägiger Kultivierung ließen sich vermehrt Zellen mit Zellfortsätzen beobachten.

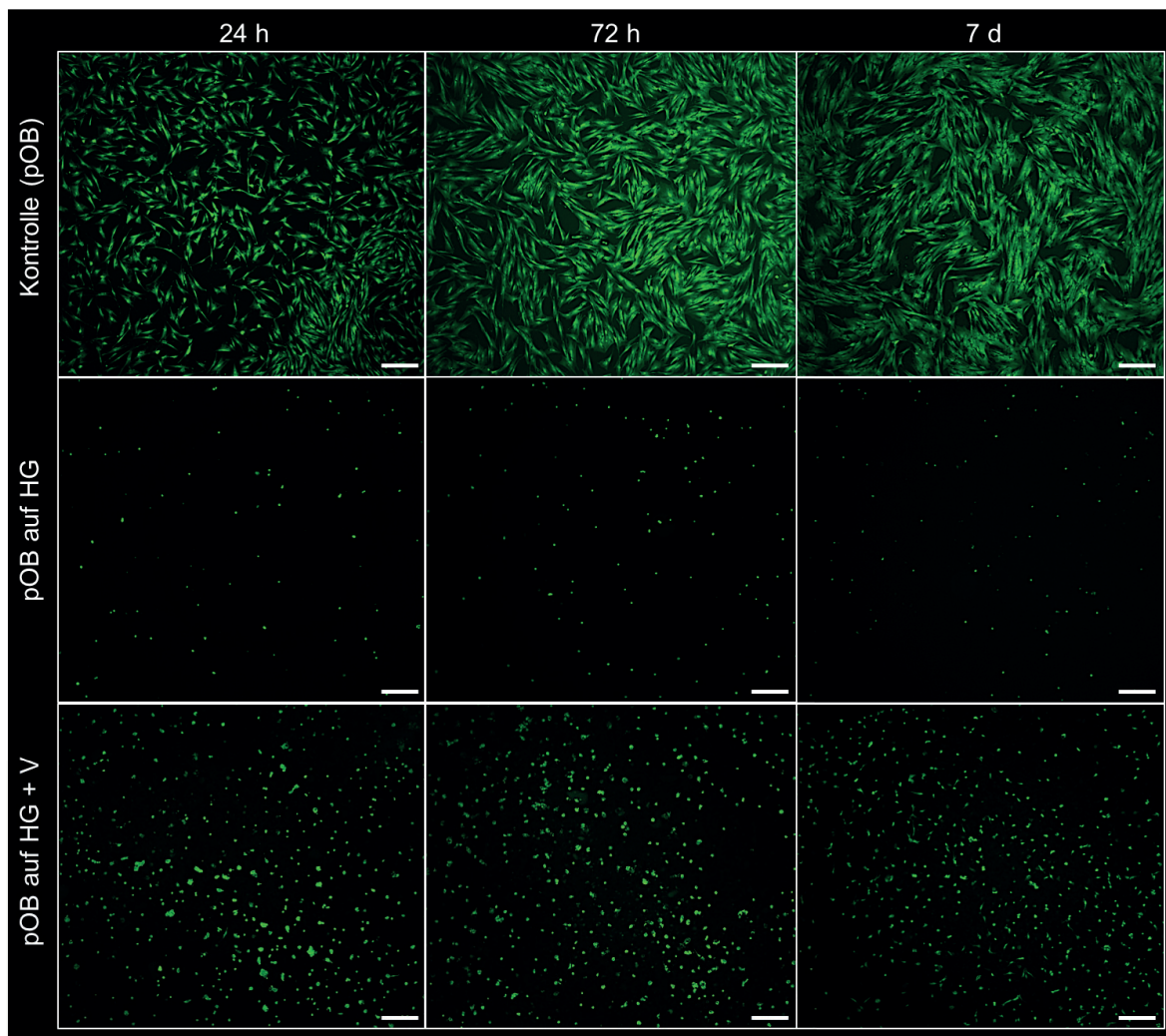


Abb. 10.19: Zelladhärenz und Viabilität von primären humanen Osteoblasten (pOB) auf 10%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 300 μm .

Eine Problematik dieser Untersuchung lag im Aufschwimmen der Hydrogele im Zellkulturmedium, sodass sich die Zellen bevorzugt am Boden der Zellkulturplatte absetzen. Eine

Lösung dieses Problems bestand darin bei der Aussaat der Zellen das Volumen des Zellkulturmediums bei der Aussaat der Zellen um die Hälfte zu minimieren. Für eine 24-Well Zellkulturplatte wurden beispielsweise nur 250 μL Zellkulturmedium pro Well verwendet. Dadurch konnten die Hydrogele nicht aufschwimmen. Nach 4 stündiger Kultivierung der Zellen auf den Hydrogelen wurde das Zellkulturmedium auf das doppelte Volumen aufgefüllt, um eine ausreichende Nährstoffkonzentration für die Zellen zu gewährleisten. Vermutlich war die Zeitspanne von 4 Stunden für die Adhärenz der pOB am Hydrogel nicht ausreichend. Im Vergleich zu den Resultaten der MG-63 Zellen könnte dies ein möglicher Grund für die verringerte Zellmenge auf den Vaterit-beladenen Hydrogelen sein. In Abb. 10.20 sind, am Beispiel des Vaterit-beladenen Hydrogels, fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der pOB unter dem Hydrogel am Boden der Zellkulturplatte dargestellt. Über den gesamten Kultivierungszeitraum bis hin zu 7 Tagen ließ sich eine vergleichbare Morphologie und Proliferation der pOB wie bei den Zellen der Kontrolle beobachten. Folglich geht keine toxische Wirkung von den Hydrogelen hervor, lediglich bei der Adhärenz der Zellen auf den Hydrogelen ließen sich Unterschiede feststellen. Hierbei ist noch zu klären, ob dies mit der Beschaffenheit des Hydrogels oder der oben genannten Präparation zusammenhängt.

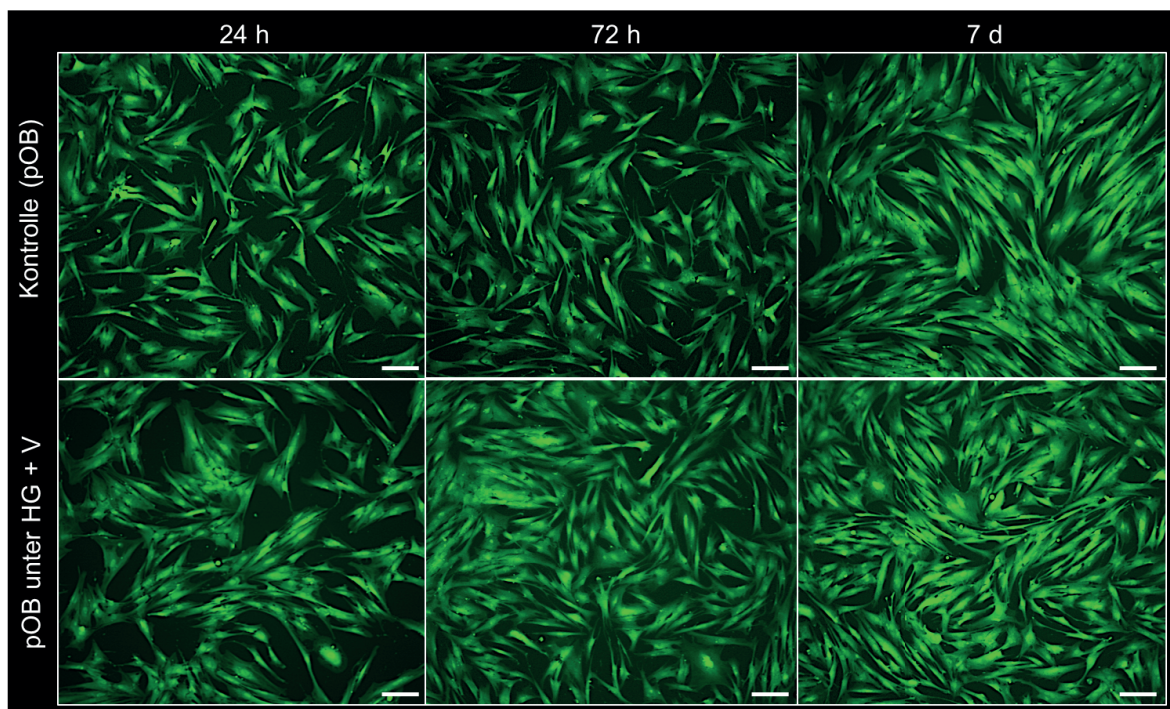


Abb. 10.20: Morphologie und Viabilität von primären humanen Osteoblasten (pOB) unter dem PEG-a-DMA Hydrogel mit 1% Vaterit-Partikel (HG+V) am Boden der Zellkulturplatte nach 24 h, 72 h und 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

10.3.5 Differenzierung von Osteoblasten

In einem ersten Experiment wurde die Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb der PEG-a-DMA Hydrogel-Matrix im Zellkulturmedium untersucht. Hierfür wurde das osteogene Differenzierungs-Medium (ODM) verwendet. Die Untersuchungen fanden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und ohne Bewegung über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen statt. Zusätzlich wurde die Umsetzung auch in Anwesenheit der primären humanen Osteoblasten (pOB) verfolgt. Die Charakterisierung der Umsetzung erfolgte mittels der FT-IR-Spektroskopie. Die Ergebnisse sind in Abb. 10.21 dargestellt.

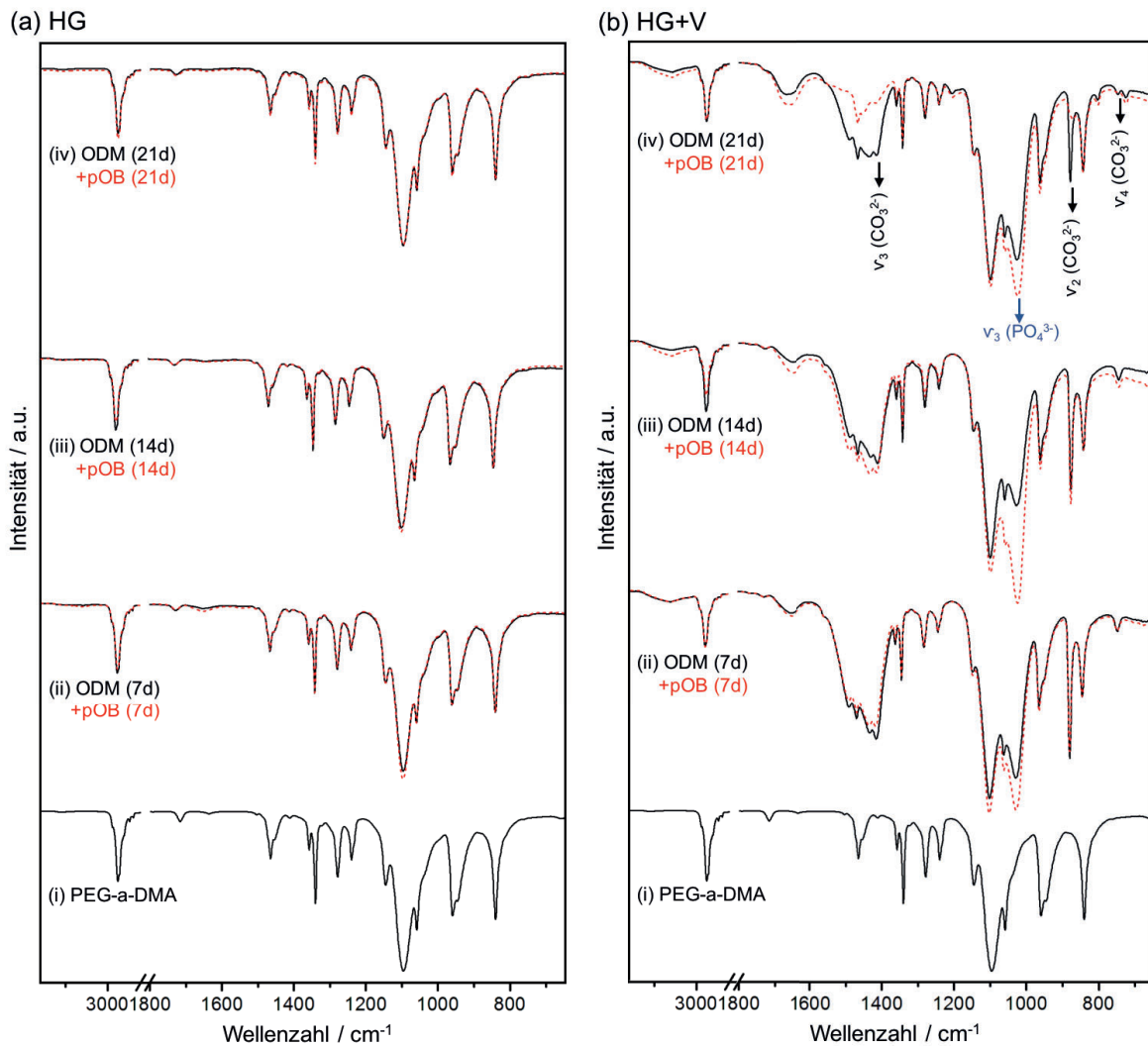


Abb. 10.21: IR-Spektren (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, (a) der synthetisierten Vaterit-freien Hydrogele (HG) und (b) der synthetisierten Vaterit-haltigen Hydrogele (HG+V) nach Inkubation in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM) für (ii) 7 Tage, (iii) 14 Tage und (iv) 21 Tage. Schwarze Spektren sind Inkubationen der Hydrogele ohne primäre humane Osteoblasten (pOB) und rote Spektren sind Inkubationen mit pOB. Mit Kennzeichnung der Banden der Schwingungsmoden der CO₃²⁻-Gruppe des Vaterits^[140] und der asymmetrischen P-O Stretschwingung der PO₄³⁻-Gruppe des Hydroxylapatits (HA)^[123,171].

Anhand der IR-Spektren der Vaterit-freien Hydrogele ließ sich über den gesamten Inkubationszeitraum, sowohl in An- als auch in Abwesenheit der pOB, keine Änderung im Bandenmuster erkennen (s. Abb. 10.21). Die Banden sind dem PEG-a-DMA Makromonomer zuzuordnen. Im Gegensatz dazu konnte bei den Vaterit-beladenen Hydrogelen neben den Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe (vgl. Kapitel 7, Tab. 7.1) des Vaterits noch eine weitere Bande bei 1024 cm^{-1} beobachtet werden. Wie auch bei den Inkubationen in SBF und PBS (vgl. Abschnitt 10.3.1) entspricht diese Bande der asymmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe des Hydroxylapatits. Die Betrachtung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses, anhand der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der IR-Spektren, zeigt einen Anstieg über den Inkubationszeitraum (s. Abb. 10.22). Auffällig ist vor allem das deutlich höhere PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnis in Anwesenheit der pOB gegenüber der Inkubation in reinem ODM.

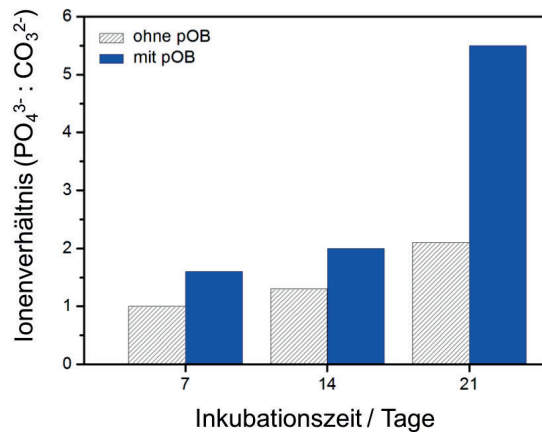


Abb. 10.22: Graphische Darstellung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses anhand der Extinktionen der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der IR-Spektren der Vaterit-beladenen Hydrogele nach 7, 14 und 21 Tagen Inkubation in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM) (weiß schraffiert) ohne primäre humane Osteoblasten (pOB) und (blau) mit pOB.

Eine Kontrolle der Mineralisierung und vorliegenden Phase erfolgte nach 14 Tagen anhand der Röntgenbeugungs- (XRD) Untersuchung (s. Abb. 10.23). Vergleichbar mit den Resultaten der FT-IR-Spektroskopie konnte bei den Vaterit-freien Hydrogelen, unabhängig von der An- oder Abwesenheit der pOB, das Reflexprofil des PEG-a-DMA Makromonomers nachgewiesen werden. Die Vaterit-haltigen Hydrogele zeigten neben den Reflexen des Vaterits noch zwei weitere Reflexe bei $2\theta \sim 26^\circ$ (002) und $2\theta \sim 32^\circ$ (211), die dem HA zuzuordnen sind (s. Abb. 10.8iii).^[167–169] Dabei ist die Intensität des (211) Reflexes bei dem mit pOB behandelten Vaterit-beladenen Hydrogel deutlich stärker ausgeprägt und spiegelt die Ergebnisse der FT-IR-Spektroskopie wieder.

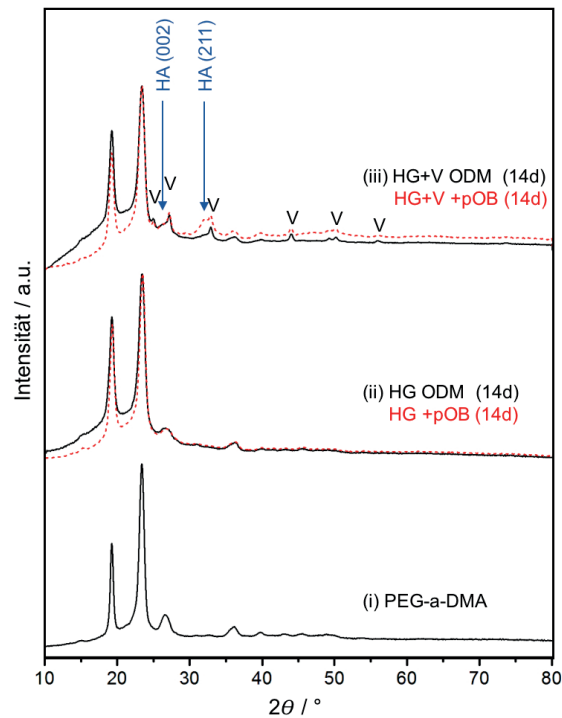


Abb. 10.23: Diffraktogramme (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii) ohne und (iii) mit Vaterit-Partikeln nach 14 tägiger Inkubation in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM) (schwarz) ohne primäre humane Osteoblasten (pOB) und (rote) mit pOB. Mit Kennzeichnung der Reflexe des Vaterits (V)^[33] und der beiden Reflexe des Hydroxylapatits (HA)^[170].

Folglich deuten die Resultate der FT-IR-Spektroskopie und der XRD-Untersuchung auf eine beschleunigte Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine HA-Spezies durch Anwesenheit der pOB hin. Ein möglicher Grund könnte durch die Differenzierung der pOB gegeben sein. Dadurch erfolgt die Expression der alkalischen Phosphatase und somit die Bereitstellung zusätzlicher Phosphat-Ionen (s. Kapitel 5, Abschnitt 5.3.1 Gl. 5.1). Aufgrund dessen wurde nach 14 Tagen Kultivierung mittels eines kommerziell erworbenen Testverfahrens die Expression der alkalischen Phosphatase durch die pOB untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 10.24 dargestellt. Anhand der digitalen Aufnahmen der einzelnen Wells der Zellkulturplatte konnte in Anwesenheit der pOB eine deutliche Färbung und damit ALP-Aktivität beobachtet werden (s. Abb. 10.24a-c). Im Vergleich dazu zeigen die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Hydrogel-Oberflächen nur vereinzelt eine Färbung. Dies lässt auf eine verminderte Zelladhärenz auf den Hydrogelen schließen und konnte auch anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 10.25 bestätigt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten der *in vitro* Untersuchungen aus dem vorherigen Abschnitt 10.3.4. Im Vergleich zu der 7 Tage-Kultivierung (s. Abb. 10.19) wiesen die pOB auf den Vaterit-haltigen Hydrogelen jedoch nach 14 Tagen eine adhärentere Morphologie mit Zellfortsätzen auf.

Die rot-violette Färbung am Wellboden impliziert allerdings eine physiologische ALP-Produktion wie sie auch bei den unbehandelten Zellen nachgewiesen wurde. Die ungefärbten Stellen am Wellboden der Hydrogele sind auf die Probenpräparation zurückzuführen (s. Abb. 10.24b und c, digitale Aufnahmen), indem mit einem Skalpell die Hydrogele halbiert wurden und damit eine

Beschädigung der Zellschicht resultierte. Um eine fehlerhafte Farbreaktion durch die Anwesenheit der Hydrogele auszuschließen, wurden die entsprechenden Hydrogele auch in Abwesenheit der pOB auf eine ALP-Aktivität untersucht. Dabei konnte keine Färbung nachgewiesen werden (s. Abb. 10.24d und e), sodass die Färbung in Anwesenheit der pOB ausschließlich auf die Aktivität der exprimierten ALP zurückzuführen ist.

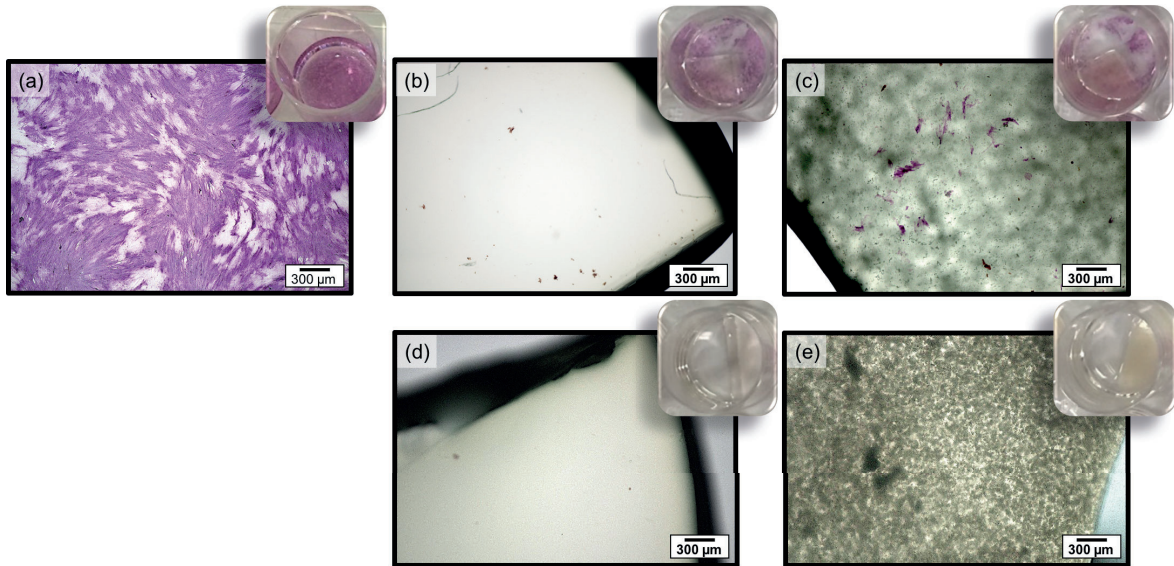


Abb. 10.24: Nachweis der Differenzierung von primären humanen Osteoblasten (pOB) durch Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) nach 14 Tagen Kultivierung. Lichtmikroskopische Aufnahme und digitale Aufnahme des entsprechenden Wells. (a) Kontrolle: unbehandelte pOB, (b) PEG-a-DMA Hydrogel mit pOB, (c) Vaterit-haltiges PEG-a-DMA Hydrogel mit pOB, (d) PEG-a-DMA Hydrogel ohne pOB, (e) Vaterit-haltiges PEG-a-DMA Hydrogel ohne pOB.

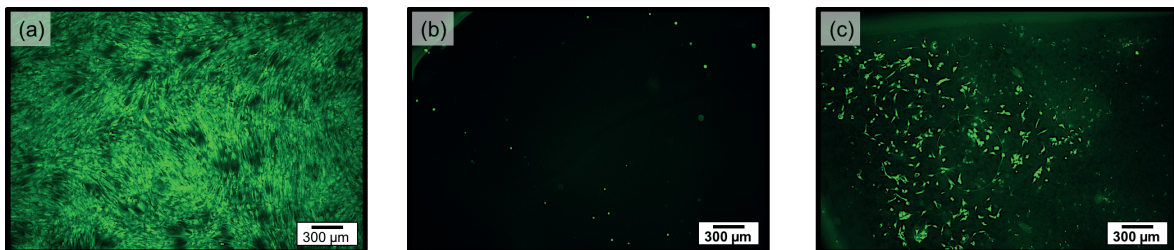


Abb. 10.25: Zelladhärenz und Viabilität von primären humanen Osteoblasten (pOB) nach 14 Tagen Kultivierung in ODM. (a) Kontrolle: unbehandelte pOB, (b) PEG-a-DMA Hydrogel mit pOB, (c) Vaterit-haltiges PEG-a-DMA Hydrogel mit pOB. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen.

10.4 Diskussion

In diesem Kapitel wurde sich mit der Synthese eines Kompositmaterials, dessen chemische Charakterisierung und der ersten *in vitro* Untersuchungen befasst. Für einen gezielten Einsatz der in dieser Arbeit synthetisierten und ausgiebig untersuchten Vaterit-Partikel wurden diese in eine Polyethylenglykol- (PEG) basierte Hydrogele-Matrix eingebracht. Aufgrund der zahlreichen Eigenschaften wie hohe Wasseraufnahmekapazität, Biokompatibilität, schnelle und nicht-toxische Abbauprodukte sind PEG-basierte Hydrogele die am häufigsten genutzten synthetischen Biomaterialsysteme.^[256,262,266]

In dieser Arbeit wurden zwei PEG-basierte Hydrogele untersucht, das literaturbekannte Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)^[254,260,262,264,265] und das bioabbaubare Polyethylenglykol-acetal-Dimethacrylat (PEG-a-DMA) Hydrogel. Beide Hydrogele ließen sich durch eine einfache und milde UV-initiierte radikalische Polymerisation der Acrylat-Gruppen herstellen. Diese milde Bedingung der Polymerisation ermöglichte das Einbringen der thermodynamisch metastabilen Vaterit-Partikel. Bei einer thermischen Gelbildung, wie beispielsweise bei den Agarose- und Gelatine-basierten Gelen^[67,247], ist die Einbringung von Vaterit-Partikeln erschwert und eine Phasenumwandlung in die thermodynamisch stabileren Calciumcarbonat-Phasen ist nicht auszuschließen. Weiterhin wurde durch die UV-Behandlung die Sterilität der synthetisierten Hydrogele gewährleistet, was eine der ersten Voraussetzungen für eine biomedizinische Anwendung darstellt.^[83] Beide Hydrogele unterscheiden sich in der Langzeit-Stabilität. Aus den Untersuchungen von Pohlit *et. al.*^[266] an PEG-a-DMA-basierten Nano-Hydrogelkapseln geht ein Abbau nach mehreren Wochen unter physiologischen Bedingungen hervor. Der Abbau ist auf die säurelabilen Acetal-Gruppen zurückzuführen. Die dabei resultierenden PEG-Fragmente liegen unterhalb der Ausscheidungsgrenze (30.000 g/mol) der Niere und könnten auf diesem Weg aus dem Körper entfernt werden.^[266] Jüngste Arbeiten von Pohlit *et. al.*^[261] stellten ein Polyethylenglykol-Dimethacrylat (PEG-DMA) Hydrogel mit labilen Ketal-Gruppen vor, das bei physiologischem pH-Wert innerhalb weniger Tage abbaut. Im Vergleich dazu ist das Poly(ether)-Rückgrad hydrolysestabil und die PEG-DA Hydrogele sind biostabilere Systeme.^[262,264,267] Dennoch ist bekannt, dass auch die PEG-DA Hydrogele *in vivo* anfällig für einen langsamen Abbau sind.^[262,268] Damit ist gewährleistet, dass beide Hydrogele nicht permanent im Körper verbleiben und somit lediglich als Transportform für die Vaterit-Partikel dienen würden.

Eine erste Beurteilung der synthetisierten Hydrogele erfolgte über die Bestimmung des Quellgrads (Q). Hierbei wurde durchschnittlich eine verminderte Quellfähigkeit der PEG-basierten Hydrogele in Anwesenheit von Vaterit-Partikeln festgestellt. Dies kann mit einer limitierten Flexibilität der Polymerketten durch eine Koordination an die Vaterit-Partikel begründet werden. Als Folge resultiert eine verminderte Wasseraufnahmekapazität und ein geringerer Quellgrad. Zusätzlich

beeinträchtigen Wechselwirkungen zwischen den Vaterit-Partikeln, den gelösten Ionen und den Polymerketten die Wasseraufnahmekapazität. Dabei spielen sowohl Ion-Ion-Wechselwirkungen als auch Ion-Dipol-Wechselwirkungen eine Rolle. Des Weiteren hat der Anteil an eingesetztem Makromonomer einen erheblichen Einfluss auf den Quellgrad. So untersuchten bereits Hagel *et al.*^[254] in ihrer Arbeit den Einfluss unterschiedlicher PEG-DA Konzentrationen auf die Eigenschaften des resultierenden Hydrogels. Dabei konnten sie zeigen, dass die Makromonomer-Konzentrationen einen großen Einfluss auf die Vernetzungsdichte und damit auch auf den Quellgrad ausübt. In der vorliegenden Arbeit konnte bei einem geringeren Anteil an Makromonomer von 8% (w/v) eine stärkere Quellung nachgewiesen werden. Somit bewirkt eine geringere Konzentration an Makromonomer eine Verringerung der Vernetzungsdichte im Polymernetzwerk. Dadurch können sich verstärkt Wassermoleküle einlagern, was eine Zunahme des Quellgrads und damit der Porosität bzw. der Porengröße zur Folge hat. Die Porosität des Polymernetzwerks ist nicht nur für den Stoffaustausch und damit für die Umsetzung der Vaterit-Partikel essentiell, sondern stellte sich auch für die Adhärenz der Osteoblasten auf den Vaterit-beladenen Hydrogelen als vorteilhaft heraus. Während der *in vitro* Untersuchungen an Osteoblasten konnte nahezu keine Adhärenz auf der Oberfläche der Vaterit-freien Hydrogelen nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden zelladhärenten Eigenschaften sowie der intrinsischen Resistenz gegen Proteinadsorptionen PEG-basierter Materialien^[258,269–271] ist dieser Befund nicht ungewöhnlich. Diese bioinerte Eigenschaft der synthetisierten PEG-basierten Hydrogelen war besonders geeignet, um eine erste Beurteilung der Vaterit-Partikel, deren Umsetzung und *in vitro* Effekte innerhalb eines dreidimensionalen Transportsystems anzustellen.

Im Gegensatz zu den Vaterit-freien Hydrogelen konnte bei den Vaterit-haltigen Hydrogelen eine deutlich ausgeprägte Adhärenz der Osteoblasten beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Polymerkonzentration und damit eine geringere Vernetzungsdichte einen besseren Kontakt der Zellen mit den Vaterit-Partikeln im Polymernetzwerk ermöglicht. Wie bereits in Kapitel 7 beobachtet und diskutiert wurde, zeigen die Osteoblasten eine verstärkte adhärenz Eigenschaft zu den Vaterit-Partikeln, die eine positive Oberflächenladung aufweisen (vgl. Kapitel 8, Abschnitt 8.2.3 Abb. 8.32). Dieser Effekt konnte auch innerhalb der PEG-basierten Hydrogele bestätigt werden. Weiterhin ist bekannt, dass positiv geladene Oberflächen die Differenzierung der Osteoblasten als auch die Proliferation der Endothelzellen erhöhen.^[150,151,272] Dennoch konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der Kontrolle eine verminderte Adhärenz der Zellen, vor allem der primären humanen Osteoblasten (pOB), auf den Hydrogelen festgestellt werden. Dies ist einerseits mit der bioinerten Eigenschaft der PEG-Matrix^[258,269–271] zu begründen und andererseits spielt vermutlich die Probenpräparation eine nicht unerhebliche Rolle, mit der ein Aufschwimmen der Hydrogele im Zellkulturmedium nicht unterbunden werden konnte. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die verminderte Zell-Adhärenz auf den Hydrogelen keine Auswirkungen auf die Vitalität, Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten im gleichen

Kultivierungsgefäß (Well) hat. Somit ist davon auszugehen, dass kein toxischer Effekt von den synthetisierten Hydrogelen ausgeht.

Im Fokus dieser Untersuchung stand vor allem die Beurteilung der Reaktivität der Vaterit-Partikel und deren Umsetzung in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit (HA) innerhalb einer Hydrogel-Matrix. Aus diesem Grund war es zunächst essentiell, dass die verwendeten Hydrogele nicht nur bioinert sind, sondern auch eine chemische Inertheit aufweisen und keine Mineralisierung in Abwesenheit der Vaterit-Partikel stattfindet. In den vergangenen Jahren wurden Hydrogele oft für Biominalisierungen eingesetzt.^[67,265] Von Bedeutung sind dabei synthetische Hydrogele, die ionische Wechselwirkungen ermöglichen. Typische Bestandteile sind Acrylsäure, Acrylamid und Allylamin.^[67,265,273] Ein Beispiel für ein sogenanntes natürliches Gel-System ist Collagen, das die Nukleation von Apatit induziert.^[5,169,274] Diese natürlichen Gel-Systeme basieren auf Polysacchariden, wie zum Beispiel Alginat, Agarose, Hyaluronsäure und Chitosan, die entweder Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) sind oder vergleichbare makromolekulare Eigenschaften aufweisen.^[67,69] Folglich besitzen diese Gele gute zelladhärente Eigenschaften.

Vergleichbar zu den Untersuchungen aus Kapitel 8 wurden die frisch synthetisierten PEG-basierten Hydrogele in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF) und einer phosphathaltigen Salzlösung (PBS) bei 37 °C inkubiert. Anhand von Röntgenbeugungs- und spektroskopischen Untersuchungen wurde die Umsetzung der Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnlichen HA verfolgt. Im Vergleich zu der Umsetzung der frei vorliegenden Vaterit-Partikeln aus Kapitel 8, konnte eine signifikant rapidere Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb der Hydrogele festgestellt werden. Bereits nach 24 Stunden Inkubation war die Umsetzung in einen Knochen-ähnlichen HA sowohl in SBF als auch in PBS abgeschlossen. Die rapidere Umsetzung im Hydrogel kann mit der größeren Reaktionsoberfläche aufgrund der Kompartimentierung und den funktionellen Carbonyl-Gruppen begründet werden. Es ist bekannt, dass funktionelle Gruppen von Polymergerüsten mit den gelösten Calcium-Ionen des Vaterits wechselwirken und somit die Keimbildung des HA induzieren oder vielmehr beschleunigen.^[71,72,275] Die Vaterit-freien Hydrogele zeigten keinerlei Mineralisierungseigenschaften und blieben sowohl in den phosphathaltigen Lösungen (SBF und PBS) als auch während den *in vitro* Untersuchungen chemisch inert. Aufgrund dessen ist die Bildung des HA ausschließlich auf die Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb der Hydrogele zurückzuführen.

In ersten Untersuchungen zur Differenzierung der Osteoblasten in Anwesenheit von PEG-a-DMA Hydrogelen konnte eine physiologische Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) und damit eine Differenzierung der Osteoblasten nachgewiesen werden. Weiterhin wurden erste Hinweise gegeben, dass die differenzierten Osteoblasten durch die Produktion der ALP und damit die Bereitstellung weiterer freier Phosphat-Ionen die Umsetzung der Vaterit-Partikel vorantreiben. In der Arbeit von

Douglas *et al.*^[244] wurde der Effekt der ALP auf die Calciumphosphat-Mineralisierung innerhalb einer Hydrogel-Matrix verfolgt. Sie konnten zeigen, dass eine Mineralisierung innerhalb der ALP-inkorporierten Hydrogelen in einer Lösung bestehend aus Calcium-Ionen und Glycerolphosphat stattfindet. Dabei fungierte Glycerolphosphat als Substrat für die ALP, wodurch freie Phosphat-Ionen für eine Reaktion mit den Calcium-Ionen bereitgestellt wurden.

10.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem abschließenden Kapitel der vorliegenden Arbeit konnten nochmals die vorteilhaften Eigenschaften der Vaterit-Partikel für die Anwendung im Bereich der Knochenregeneration bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass die synthetisierten Vaterit-Partikel auch innerhalb eines chemisch und biologisch inerten Transportsystems die nötige Aktivität für eine Umsetzung in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit (HA) beibehalten. Der Einbau der Vaterit-Partikel in ein dreidimensionales, poröses Polymernetzwerk bietet die Möglichkeit, die Partikel gezielt an einer Defektstelle zu platzieren. Auf diese Weise wird eine lokale Knochenregeneration ermöglicht. Hierbei wurde eine starke Interaktion der Vaterit-Partikel mit dem Polymernetzwerk festgestellt, wodurch eine deutlich rapidere Umsetzung in die HA-Spezies erfolgte. Basierend auf der Elastizität des organischen Hydrogels und der Härte der, aus den anorganischen Vaterit-Partikeln entstehenden, HA-Spezies wird eine der wichtigsten Eigenschaften des natürlichen Knochens simuliert.

Wesentliche Vorteile gegenüber anderen Kompositmaterialien liegen (i) in einem gezielten und individuell anpassungsfähigen Aufbau eines natürlichen Knochenminerals durch die Vaterit-Partikel, (ii) in der fehlenden Notwendigkeit von zusätzlichen Knochenaufbau-fördernden Komponenten, aufgrund der osteokonduktiven und osteoinduktiven Wirkung der Vaterit-Partikel, (iii) längerfristig gesehenen in der natürlichen Knochenregeneration ohne Fremdkörper, da sich die Vaterit-Partikel in ein natürliches Knochenmineral umsetzen und durch Verwendung von abbaubaren PEG-basierten Hydrogelen das Transportnetzwerk über die Zeit abgebaut und renal ausgeschieden werden kann.

Aufgrund dessen wurde mit dem säurelabilen Polyethylenglykol-acetal-Dimethacrylat (PEG-a-DMA) Hydrogel das Fundament für ein solches Transportsystem gelegt. Die einfache und milde Synthese durch UV-initiierte Polymerisation der PEG-basierten Hydrogele ist eine ideale Methode um die metastabilen Vaterit-Partikel einzubringen. In ersten *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Makromonomere sowie die Hydrogele frei von Endotoxin sind und keine inflammatorische Effekte auf humane Endothelzellen ausüben. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Hydrogele kompatibel mit Osteoblasten sind und in Anwesenheit von Vaterit-Partikeln die Adhärenz der Zellen auf den Hydrogelen signifikant gesteigert wird. Erste Ergebnisse zur Differenzierung der Osteoblasten deuten, aufgrund der Bereitstellung zusätzlicher Phosphat-Ionen, auf eine Unterstützung der Umsetzung der Vaterit-Partikel in einen Knochen-ähnlichen HA hin. Folglich bietet das vorgestellte Kompositmaterial aus einem Vaterit-beladenen PEG-basierten Hydrogel entscheidende Anforderungen eines Biomaterials für die Knochenregeneration. Die Knochenzellen können adhären, proliferieren und differenzieren, wodurch die Knochenneubildung angeregt wird. Durch die Porosität des Hydrogels wird ein Transport der Nähr- und Abfallstoffe in und aus dem Netzwerk ermöglicht, was vor allem für die Umsetzung der Vaterit-Partikel essentiell ist. Das dreidimensionale Netzwerk bietet am Transplantationsort dem umliegenden Gewebe zusätzlich die Möglichkeit einzuwachsen. Die Wahl des säurelabilen PEG-a-DMA Hydrogels ermöglicht ein

schnelles Abbauen der Hydrogel-Matrix ohne toxische Abbauprodukte. Interessant ist dies vor allem an Defektstellen an denen der Knochenabbau überwiegt und folglich ein geringerer pH-Wert vorherrscht, wie beispielsweise bei der Osteoporose. Zugleich würde durch die Anwesenheit der Vaterit-Partikel das gestörte Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und –aufbau wieder reguliert und zusätzlich neues Knochenmineral gebildet werden. In diesem Zusammenhang wäre es durchaus spannend die *in vitro* Umsetzung der Vaterit-Partikel bei unterschiedlichen pH-Werten zu verfolgen. Eine weitere mögliche Strategie in der Knochenregeneration könnte der Einbau von Osteoblasten und Endothelzellen in die Vaterit-beladenen Hydrogele sein. Dadurch würde eine Anlagerung der Osteoblasten an das Hydrogel und ein Einschluss der Endothelzellen in das Hydrogel erfolgen, sodass nach der Implantation ein schnelleres Knochenwachstum und eine schnellere Vaskularisierung erfolgen könnte. Ein erster Ansatz hierfür wird durch eine spannungsgesteuerte Polymerisationsmethode gegeben (s. Abschnitt 10.7).

Abschließend ist festzuhalten, dass mit den getesteten chemisch inerten PEG-basierten Hydrogelen eine schnellere Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb des Gelsystems nachgewiesen wurde. Somit stellen Vaterit-beladene Hydrogele einerseits ein geeignetes Mineralreservoir und andererseits auch ein Gerüst für die natürliche Knochenregeneration durch Osteoblasten dar. Mit den beiden getesteten Hydrogelen, basierend auf dem PEG-a-DMA und dem Polyethylenglykol-Dimethacrylat (PEG-DA) Makromonomer konnte die Aktivität der Vaterit-Partikel untersucht und nachgewiesen werden. Denkbar wäre für die Zukunft ein bioaktives Hydrogel, dass die Adhärenz der Knochenzellen zusätzlich fördert, wie beispielsweise eine Kollagen-Matrix oder aber durch das Einbringen von RGD-Sequenzen^[276,277], Fibronectin^[278,279] oder Fibrinogen^[74] in das Polymernetzwerk.

10.6 Exkurs A: Polyphosphorester-basierte Hydrogele

Eine weitere interessante Alternative zu den PEG-basierten Hydrogelen ist durch die Polyphosphorester- (PPE) basierten Hydrogele gegeben. In der Vergangenheit bestand das Interesse an phosphorhaltigen Polymeren nur wegen ihrer flammenhemmenden Eigenschaften, aber heute wecken sie großes Interesse in der klinischen und pharmazeutischen Anwendung.^[280,281] In der Natur sind Polymere mit einer wiederholenden Phosphorester-Bindung im Rückgrat eine dominierende Materialklasse und die Quelle des Lebens, indem sie Bestandteile der Nukleinsäuren (DNA und RNA) sind.^[282] Nicht nur die strukturelle Ähnlichkeit mit den natürlichen Biomakromolekülen ist vielversprechend, sondern auch die Biokompatibilität, die Hämokompatibilität und die Abbaubarkeit der PPE durch Hydrolyse und enzymatischen Verdau mittels der Phosphodiesterase I oder der alkalischen Phosphatase.^[280,283,284] Im Vergleich zu anderen bioabbaubaren Polymeren ist die molekulare Funktionalisierung der PPE einfacher. Der entscheidende Vorteil liegt in der inhärenten Fähigkeit der Phosphate Triester zu bilden.^[281,282] Aufgrund des fünfwertigen Phosphoratoms ist die Einführung von funktionellen Gruppen und bioaktiven Molekülen an jeder Wiederholungseinheit entlang des Polymergerüsts möglich.^[280,285,286] Mit der chemischen Variabilität des Phosphorzentrums schaffen die PPE, gegenüber den konventionellen aliphatischen Polyestern, eine erhebliche strukturelle Vielfalt. Dadurch wird eine hohe Varianz der physikalischen und chemischen Eigenschaften der resultierenden Endprodukte gegeben. Diese Flexibilität bei der Anpassung der Struktur macht die PPE zu einem vielversprechenden alternativen Material in der biomedizinischen Anwendung, wie beispielsweise in der Geweberegeneration „*tissue engineering*“ und in der zahnmedizinischen Anwendung.^[281,287] Eine weitere einzigartige Eigenschaft einiger Polyphosphate ist die untere kritische Lösungstemperatur (LCST: *lower critical solution temperature*).^[282] Von Vorteil ist vor allem die chemische Anhaftung der Phosphoester am Knochenmineral, bzw. an den Calcium-Ionen.^[288] Aufgrund dieser aussichtsreichen Eigenschaften stellen die PPE eine interessante Polymermatrix für die Vaterit-Partikel, im Hinblick auf eine Anwendung in der Knochenregeneration, dar. Bisher sind nur wenige Untersuchungen zu Hydrogelen mit einem Phosphat-Rückgrad im Polymernetzwerk beschrieben.^[284,289,290] Zum Beispiel berichteten Wang *et al.*^[290] von der Photo-initiierten Synthese eines nanoskopischen Hydrogels „Nanogel“ basierend auf Block-Copolymeren aus PPE und PEG für die Anwendung in der gezielten Medikamentenfreigabe „*drug delivery*“. In Anlehnung an diese Arbeit und aufgrund der aussichtsreichen Eigenschaften, vor allem der Bioabbaubarkeit unter physiologischen Bedingungen, wurde die Synthese eines Vaterit-beladenen PPE-basierten Hydrogels in ersten Versuchen getestet.

Hierzu wurde ein Polymethylethylenphosphate-Dimethacrylat- (PMEP-DMA) Makromonomer mit einer molaren Masse von 12000 g/mol synthetisiert. Die Strukturformel ist der Abb. 10.26 zu entnehmen. Die Synthese erfolgte von [REDACTED], aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED]

unter Projektleitung von am MPIP in Mainz und ist dem Anhang A, Abschnitt 11.10 zu entnehmen.

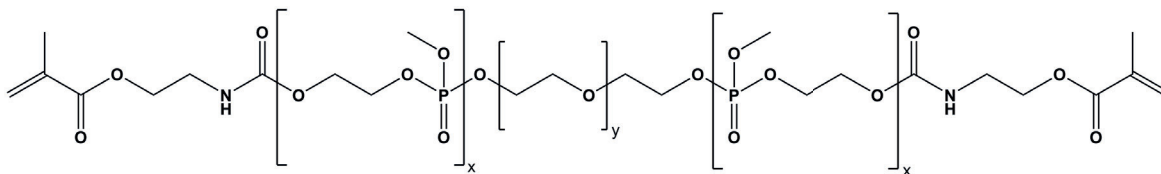


Abb. 10.26: Strukturformel des PMEP-DMA Makromonomers.

Die Synthese des Hydrogels erfolgte wie zuvor in Abschnitt 10.2.1 beschrieben mittels UV-induzierter radikalischer Polymerisation. Aufgrund des höheren Molekulargewichts, verglichen zu den PEG-basierten Hydrogelen, wurden Gele mit einem 10%-igen und 15%-igen (w/v) Anteil an PMEP-DMA Makromonomer in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS: *phosphate buffered saline*, D8537 Sigma Aldrich) hergestellt. Wie zuvor beschrieben wurden auch hierbei 1% (w/v) Vaterit-Partikel in die Makromonomerlösung eingebracht. In der Abb. 10.27 sind die ersten Resultate der synthetisierten PMEP-DMA Hydrogele dargestellt. Wie auch bei den PEG-a-DMA und PEG-DA Makromonomeren konnte mit dem PMEP-DMA Makromonomer ein formstabiles Hydrogel in variabler Dicke hergestellt werden. Dabei zeigten die Hydrogele mit einem geringeren Makromonomer-Anteil von 10% (s. Abb. 10.27b) eine leicht labilere Form gegenüber den 15%-igen Gelen (s. Abb. 10.27c). Die Verteilung der Vaterit-Partikel im Hydrogel scheint homogen zu sein (s. Abb. 10.27 obere Aufnahmen). Vermutlich wechselwirken die Phosphoester mit den Calcium-Ionen des Vaterits.

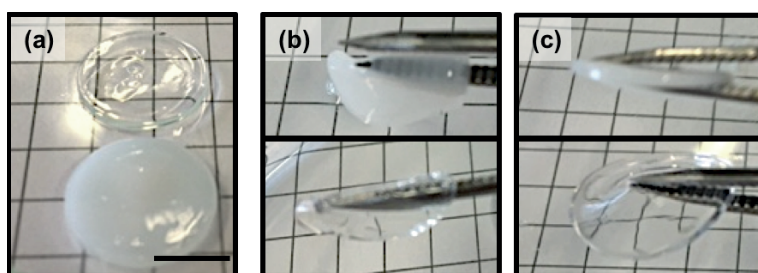


Abb. 10.27: Digitale Aufnahme der synthetisierten PMEP-DMA Hydrogele unmittelbar nach der Synthese (a) 200 µL 10%-ige Makromonomerlösung pro Well einer 48-Well Zellkulturplatte, (b) 100 µL 10%-ige Makromonomerlösung pro Well einer 48-Well Zellkulturplatte und (c) 100 µL 15%-ige Makromonomerlösung pro Well einer 48-Well Zellkulturplatte. Die oberen Aufnahmen zeigen die Vaterit-enthaltenen PMEP-DMA Hydrogele und die unteren Aufnahmen die Vaterit-freien PMEP-DMA Hydrogele.

Eine erste Charakterisierung der PMEP-DMA Hydrogele erfolgte mittels FT-IR-Spektroskopie im gefriergetrockneten Zustand. Die Spektren sind in Abb. 10.28 dargestellt. Es ließen sich die charakteristischen Banden des PMEP-Makromonomers in den Hydrogelen nachweisen, sodass von einer Polymerisation der Acrylat-Gruppen ohne eine Veränderung des Polymerrückgrates ausgegangen werden kann. Dabei konnten die Banden bei $\sim 1266 \text{ cm}^{-1}$ und bei $\sim 958 \text{ cm}^{-1}$ der P=O und P-O-C Steckschwingung der Phosphoester-Gruppen identifiziert werden.^[284] Die Betrachtung

des IR-Spektrums des Vaterit-beladenen PMEP-DMA Hydrogels (s. Abb. 10.28iii) lässt zusätzliche Banden erkennen, die den Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe des Vaterits entsprechen (vgl. Kapitel 7, Abschnitt 7.3.1 Tab. 7.1).

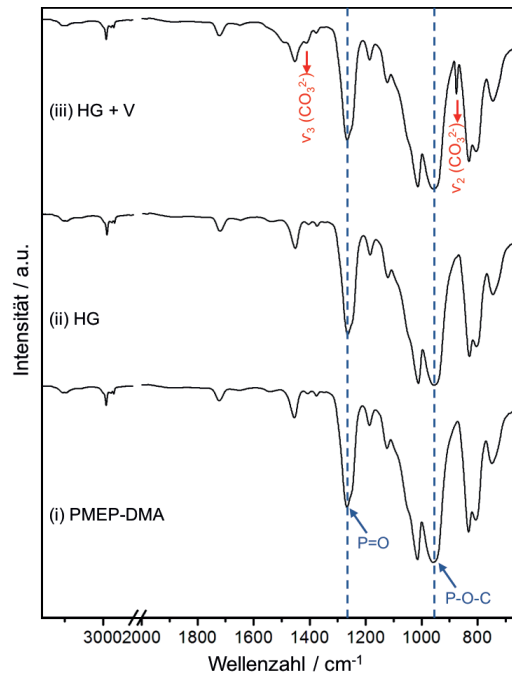


Abb. 10.28: IR-Spektren (i) des eingesetzten PMEP-DMA Makromonomers, (ii) des synthetisierten Vaterit-freien Hydrogels und (iii) des synthetisierten Vaterit-haltigen Hydrogels. Mit Kennzeichnung der Banden der Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe des Vaterits^[140] und der charakteristischen Banden des Phosphoesters.

Im Vergleich zu den PEG-basierten Hydrogelen konnte bei den synthetisierten und gefriergetrockneten PMEP-DMA Hydrogele eine weitere Eigenschaft, die des Klebens, festgestellt werden. In Abb. 10.29a ist zu erkennen, dass das gefriergetrocknete Vaterit-beladene PMEP-DMA Hydrogel in der Lage ist ein Schnappdeckel-Gläschen (Fassungsvolumen von 5 mL) mit einem Mikrospatel zu fixieren und dieses problemlos anzuheben. Weiterhin konnte nach ~ 16 Tagen Inkubation in PBS bei einem pH-Wert von ~ 7,4 ein vollständiges Auflösen der Hydrogele mit und ohne Vaterit-Partikel beobachtet werden (s. Abb. 10.29b). Vermutlich erfolgte die Auflösung der Polymermatrix durch Hydrolyse der Phosphoester-Bindungen.^[280,283,284] Möglich wäre auch eine Hydrolyse der Urethan-Bindung zum Acrylat.

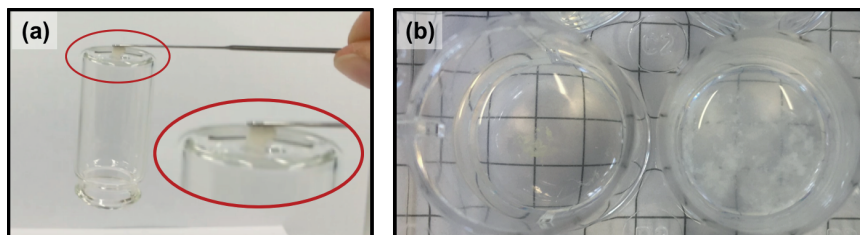


Abb. 10.29: Digitale Aufnahme (a) des Vaterit-enthaltenen PMEP-DMA Hydrogel im gefriergetrockneten Zustand und (b) nach ~ 16 Tagen Inkubation der PMEP-DMA Hydrogele ohne (links) und mit Vaterit-Partikeln (rechts) in PBS.

In einem ersten *in vitro* Zell-Experiment wurde die Osteoblasten-Zelllinie MG-63 auf die etwas stabileren 15%-igen PMEPE-DMA Hydrogele ausgesät. Das Experiment wurde analog zum Experiment in Abschnitt 10.2.3 durchgeführt. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 10.30 zusammengestellt. Hierbei konnte ein vergleichbarer Trend wie bei PEG-basierten Hydrogelen beobachtet werden. Während bei den Vaterit-haltigen PMEPE-DMA Hydrogelen über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen Kultivierung eine deutliche Zunahme an adhärennten Zellen festgestellt wurde, ließen sich den Vaterit-freien Hydrogelen durchweg nur wenige Zellen nachweisen.

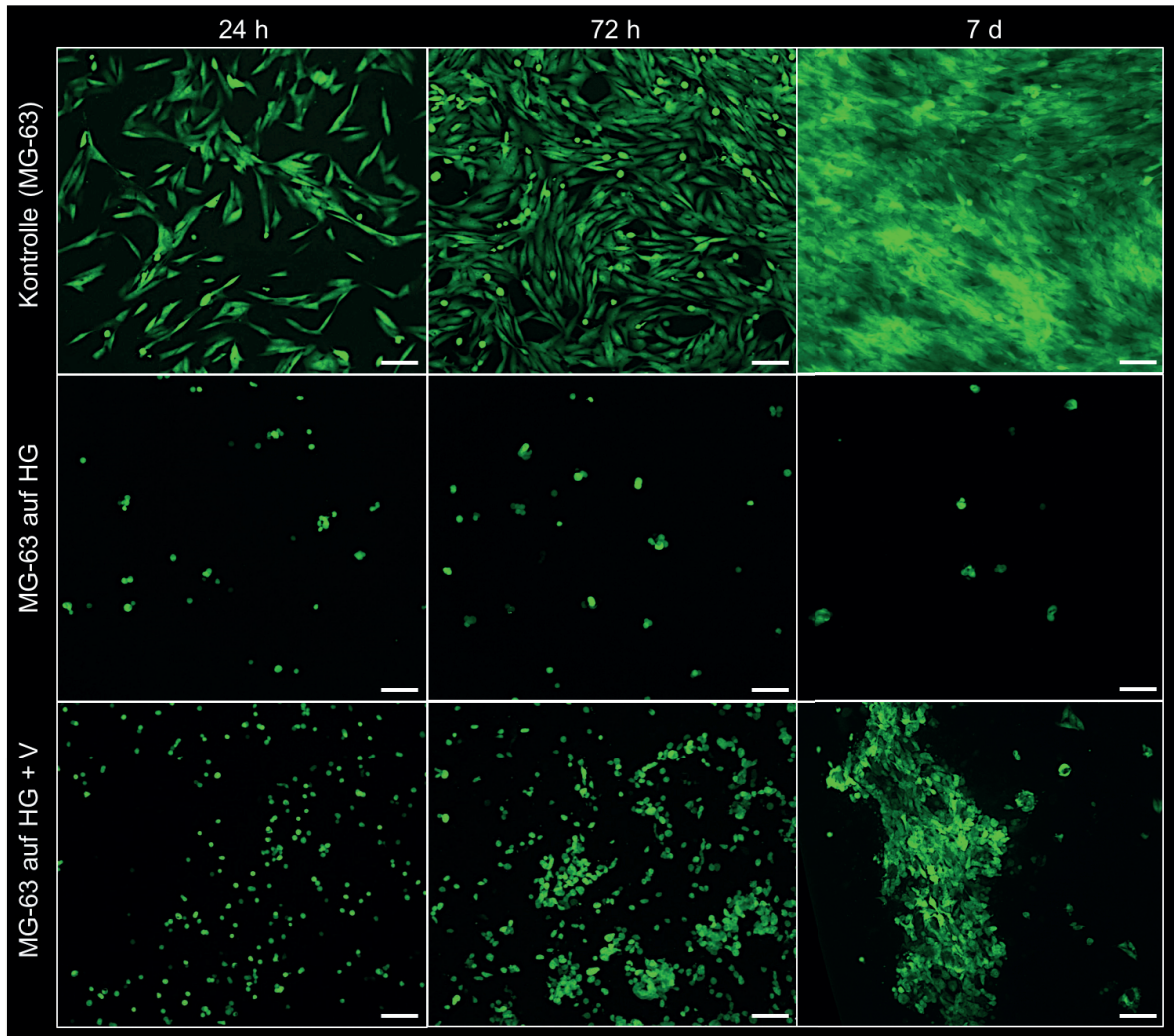


Abb. 10.30: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 auf 15%-igen PMEPE-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Abschließend ist festzuhalten, dass die hier vorgestellten PMEPE-DMA Hydrogele durch ihre schnelle Abbaubarkeit und die klebende Wirkung vorteilhafte Eigenschaften für eine Anwendung als Transportform der Vaterit-Partikel für die Knochenregeneration mitbringen. Folglich wurde eine weitere mögliche alternative Transportform zu den PEG-basierten Hydrogelen vorgestellt, die allerdings noch weitere detaillierte Untersuchungen erfordert.

10.7 Exkurs B: Mikrogel-Kapseln durch Mikrofluidik-Technik

In den vergangenen Jahren haben mikrometergroße Hydrogel-Kapseln „Mikrogel-Kapseln“, hergestellt durch die tropfenbasierte Mikrofluidik-Technik, zunehmend an Aufsehen erregt. Diese Methode ermöglicht die Herstellung monodisperser Tropfen mit einer genau einstellbaren Größe und Form. Durch einen anschließenden Gelierungsprozess bleibt die Uniformität erhalten und monodisperse Mikrogel-Kapseln resultieren.^[81] Das Konzept dieser Methode besteht darin, ein Mikrogel-Vorstufenfluid in einem Mikrokanal durch Flussfokussierung mit einer Trägerflüssigkeit zu bilden, welches im Anschluss zu einem Mikrogel geliert.^[81,82,291] Die Flussfokussierung ist dabei durch leicht handhabbare Parameter wie die Grenzflächenspannung, die Viskosität und die Flussgeschwindigkeit der Fluide bestimmbar, kontrollierbar und damit reproduzierbar.^[81] Aufgrund dessen ist, gegenüber herkömmlichen Emulgierv Verfahren, mit der tropfenbasierten Mikrofluidik eine höhere Produktionseffizienz und Monodispersität gegeben.^[79] Mit Hilfe dieser Technik können „maßgeschneiderte“ Reaktionsräume bzw. Transportformen für diverse Anwendungen angefertigt werden. Vor allem in der medizinischen Anwendung sind die Mikrogel-Kapseln vielversprechend, da sie injizierbar sind und damit schnell und ohne großen Aufwand an einem gewünschten Wirkort platziert werden können.^[291]

Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit vitale Zellen zu verkapseln.^[263,291–293] Zum Beispiel entwickelten Steinhilber *et al.*^[294] pH-sensitive Mikrogele, um lebende Zellen zu verkapseln. Dabei fungierten ein Polyethylenglykol-Dicyclooctin und ein dendritisches Polyglycerinazid als bioinerte Makromonomere, deren Vernetzung über eine milde spannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC: *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*) verlief und das Einbringen von Zellen ermöglichte. Durch den Einbau von unterschiedlich substituierten Benzacetal-Linker in das dendritische Polyglycerinazid wurde ein Abbau der Mikrogel-Kapseln im pH-Bereich von 4,5 – 7,4 erreicht. Auf diese Weise wurde eine pH-kontrollierte Freisetzung der verkapselten Zellen mit einer Überlebensrate von ~ 96% erzielt.^[294]

Diese Art von Mikrogelen stellt eine vielversprechende Methode dar, um vitale Zellen auch innerhalb eines Polymernetzwerks zu untersuchen. Damit könnte ein entscheidender Fortschritt geschaffen werden die Effekte der Vaterit-Partikel auf humane Osteoblasten und Endothelzellen auch innerhalb einer Polymer-Matrix zu untersuchen. Weiterhin wäre durch eine Anlagerung der Osteoblasten an das Hydrogel und durch den Einschluss der Endothelzellen in das Mikrogel das Potential für ein schnelleres Knochenwachstum und eine schnellere Vaskularisierung gegeben (s. Abb. 10.31).

In Anlehnung an die Arbeiten von Steinhilber *et al.*^[294] und Rossow *et al.*^[293,295] wurde in ersten Experimenten die Verkapselung von Vaterit-Partikeln und Zellen mittels der Mikrofluidik-Technik getestet. Dies erfolgte in Kooperation mit [REDACTED] aus dem Arbeitskreis von

der JGU Mainz und aus dem Arbeitskreis von der JGU Mainz.

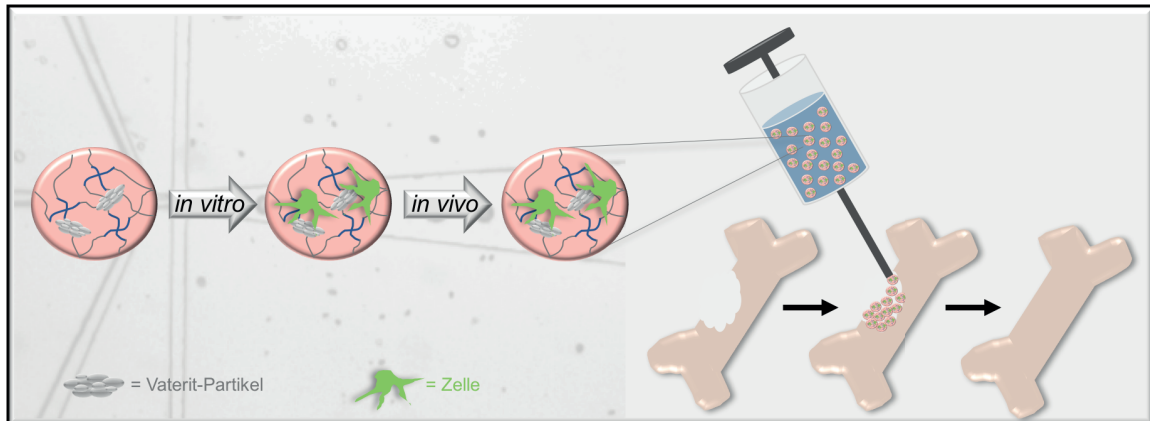


Abb. 10.31: Schematische Darstellung des potentiellen Einsatzes der Vaterit-Partikel- und Zell-beladenen Mikrogel-Kapseln in der Knochenregeneration.

10.7.1 Durchführung

Es wurde ein nicht-sensitives Polymersystem hergestellt, das auf einem Cyclooctin-funktionalisierten Polyethylenglykol (PEG-DIC: Polyethylenglykol-Dicyclooctin) und einem vierarmigen Azid-funktionalisierten Polyethylenglykol (Stern-PEG-Azid) basiert und als Grundgerüst für nachfolgende Arbeiten dient. Die kovalente Vernetzung der beiden Makromonomere erfolgte durch SPAAC wie in Abb. 10.32 dargestellt. Die Synthesen der Makromonomere erfolgte von . Das PEG-DIC wurde nach den Vorschriften von Rossow *et al.*^[293] und Steinhilber *et al.*^[294] mit einer molaren Masse von 10.000 g/mol hergestellt und die Synthese des Stern-PEG-Azids mit einer molaren Masse von 12.000 g/mol erfolgte nach der Vorschrift von Rossow und Seiffert^[295]. Im Vergleich zu den PEG-DA und PEG-a-DMA Makromonomeren bietet die Verwendung des Stern-PEG-Azids den Vorteil einer homogenen Verteilung der Netzwerkmaschen.

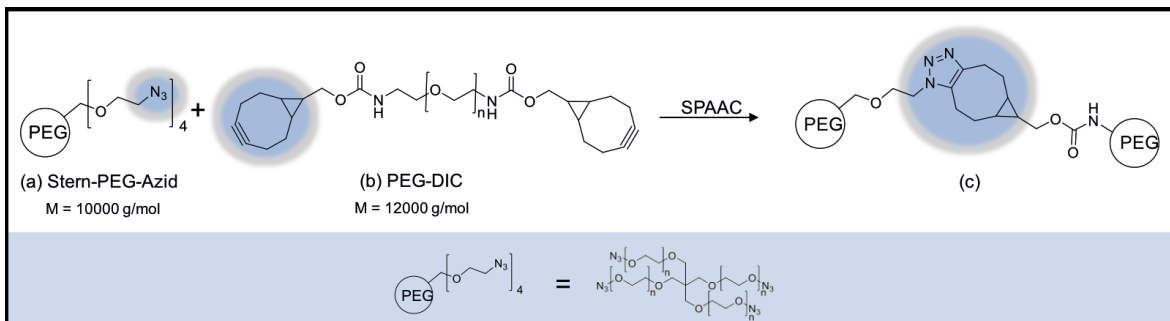


Abb. 10.32: Reaktionsgleichung der spannungsgesteuerten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) des (a) Azid-funktionalisierten Polyethylenglykols und des (b) Cyclooctin-funktionalisierten Polyethylenglykols zur Verkapselung der Vaterit-Partikel und der Osteoblasten-Zelllinie MG-63.

Die Herstellung der Vaterit-Partikel- und Zell-beladenen Mikrogele erfolgte mittels eines Polydimethylsiloxan (PDMS) Mikrokanal-Systems (Durchmesser von 150 μm) mit insgesamt vier Einlass-Kanälen (1-4) und einem Auslass-Kanal (5) (s. Abb. 10.33b). Als wässriges Medium für die Makromonomere und die Suspension der Zellen wurde das Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – high glucose, Sigma Aldrich) mit 10% fetalem Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*, Sigma Aldrich), 2 mM Glutamax I und 100 U / 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Penicillin/Streptomycin (P/S, Gibco® Thermo Fisher Scientific) verwendet. Ein Öl-Stabilisator-Gemisch aus dünnflüssigem 98 wt% Paraffinöl (Roth), 1 wt% ABIL EM 90 (Evonik) und 1 wt% Grindsted PGPR90 Kosher (Danisco) fungierte als nicht-mischbare, kontinuierliche Phase. Nach Steinhilber *et al.*^[294] geht von dem Gemisch keine toxische Wirkung auf Zellen aus. Die Dosierung der einzelnen Reaktionslösungen erfolgte durch Verwendung von Spritzenpumpen (Harvard Apparatus, Modelle PHD ULTRA™ und Pump 11 Elite). Mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Nikon, Eclipse TS100-F), ausgestattet mit einer digitalen Kamera (ABS UK1155), wurde die Tropfenbildung überwacht. In Abb. 10.33a ist eine schematische Darstellung des verwendeten Mikrokanal-Systems gezeigt.

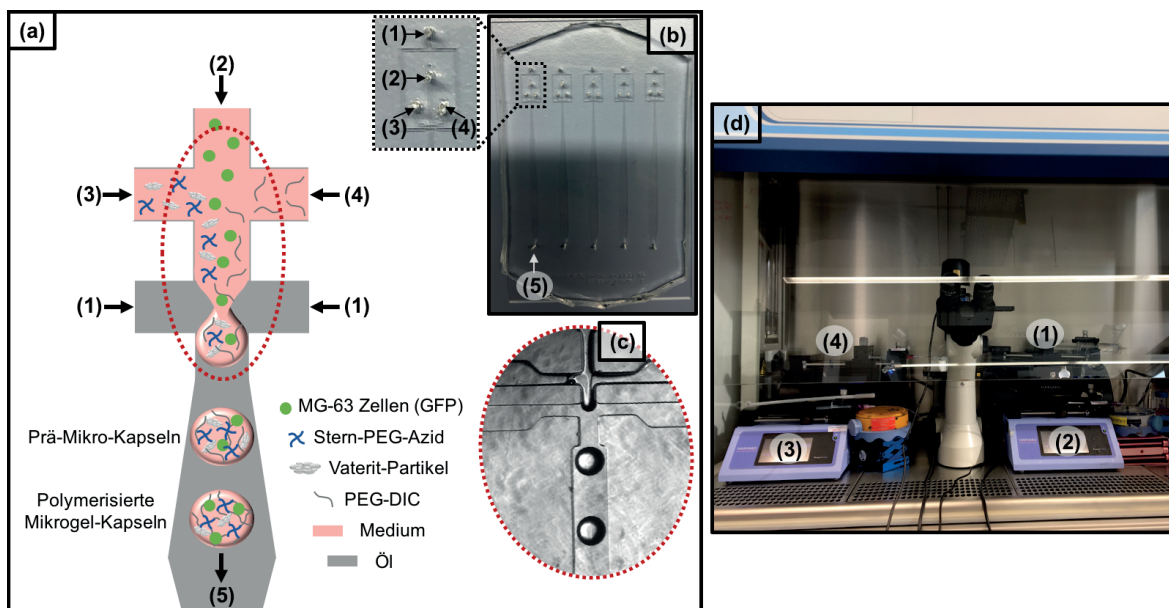


Abb. 10.33: Tropfenbasierte Mikrofluidik zur Synthese von Vaterit-Partikel- und Zell-beladenen Mikrogelelen. (a) Schematische Darstellung der Tropfenbildung an der Grenzfläche zweier nicht-mischbarer Flüssigkeiten. (b) Digitale Aufnahme des Polydimethylsiloxan (PDMS) Mikrokanal-Systems mit einer vergrößerten Darstellung der Einlässe. (c) Lichtmikroskopische Aufnahme der Mikrokanäle. (d) Aufbau der Mikrofluidik mit den Spritzenpumpen (1-4) und dem Lichtmikroskop in einer Sterilbank.

Über den Kanal (1) wurde das Öl-Stabilisator-Gemisch injiziert, dabei wurde eine Flussrate von 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$ eingestellt. Die Zellsuspension mit 10^5 Zellen pro mL wurde über den Kanal (2) zugegeben. Es wurde die Osteoblasten-Zelllinie MG-63 verwendet, die mit einem grünfluoreszierenden Protein (GFP) markiert und von [REDACTED] zu Verfügung gestellt wurde. Die Kultivierungs- und Wachstumsbedingungen der verwendeten Zelllinie sind dem

Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3, zu entnehmen. Die Vorgehensweise des Ablöses der Zellen und die Herstellung der Zellsuspension sind in dem Protokoll im Anhang A, Abschnitt 11.4 vorzufinden. Die Zugabe der beiden Makromonomere erfolgte über die Kanäle (3) und (4). Sowohl die Zellsuspension als auch die Polymer-Lösungen wurden mit einer Flussrate von 50 $\mu\text{L/h}$ zugegeben. Hierzu wurde eine 10 wt%-ige Stern-PEG-Azid Lösung hergestellt, in der 200 $\mu\text{g/mL}$ Vaterit-Partikel suspendiert und mittels Ultraschallbehandlung kurz homogenisiert wurden. Das PEG-DIC wurde als 18 wt%-ige Lösung eingesetzt. Damit es weder bei den Zellen noch bei den Vaterit-Partikeln zu einer inhomogenen Verteilung in der Spritze kommt, wurde mit Hilfe eines Magnetrührers eine kontinuierliche und langsame Durchmischung geschaffen. Die Durchführung erfolgte unter sterilen Bedingungen, wobei auf den Einsatz von sterilen Reagenzien und keimfreien Reaktionsgefäßen besonders geachtet wurde.

10.7.2 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde in einem ersten Durchlauf der Mikrofluidik die Verkapselung der Vaterit-Partikel getestet. Hierfür wurde ein PDMS-Mikrokanal-System mit einem Durchmesser von 50 μm an der Kreuzungsstelle der Kanäle verwendet. Die Tropfenbildung wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops verfolgt und es konnten homogene Emulsionstropfen, das sogenannte Mikrogel-Vorstufenfluid, beobachtet werden (s. Abb. 10.34a). Die lichtmikroskopische Aufnahme in Abb. 10.34b zeigt die Vaterit-beladenen Mikrogel-Kapseln nach der Polymerisation.

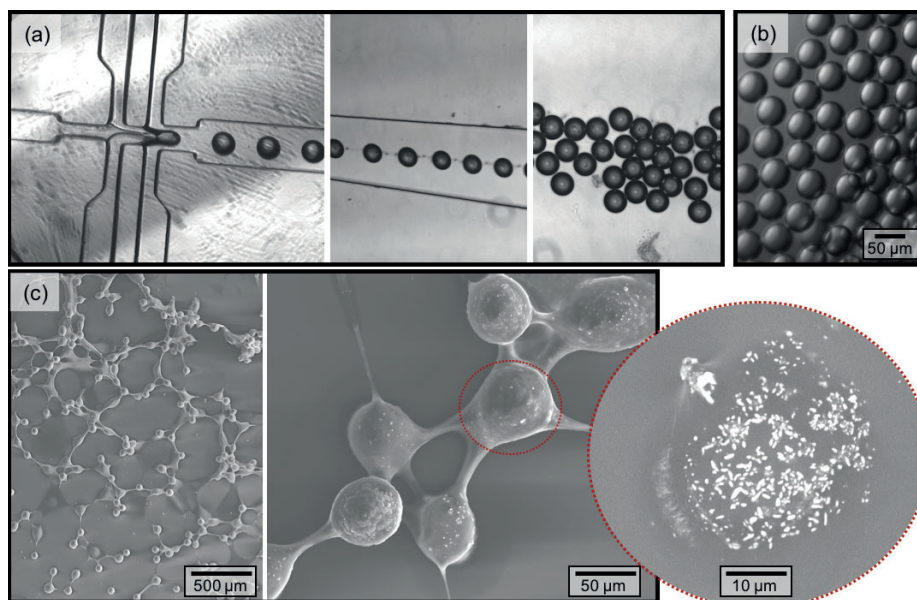


Abb. 10.34: Mikroskopische Aufnahmen der Verkapselung von Vaterit-Partikeln. (a) Lichtmikroskopische Aufnahmen während des Mikrofluidik-Vorgangs, (b) lichtmikroskopische Aufnahmen polymerisierter Kapseln und (c) REM-Aufnahmen der getrockneten Mikrogel-Kapseln.

Für eine rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung wurden die Kapseln auf einen Silicium-Träger pipettiert und an der Luft getrocknet. Die REM-Aufnahme aus Abb. 10.34c zeigt die getrockneten Kapseln. Anhand einer Aufnahme mit höherer Vergrößerung konnten ellipsoide

Partikel innerhalb der Kapseln beobachtet werden. Diese Morphologie ist vermutlich auf die Anwesenheit von Vaterit-Partikel zurückzuführen. Dies ist ein erster Hinweis, dass die Verkapselung der Vaterit-Partikel zu monodispersen Mikrogel-Kapseln erfolgreich war.

Vor Beginn der Verkapselung der Zellen, wurden die eingesetzten Makromonomere auf die Zell-Biokompatibilität mit der verwendeten Osteoblasten-Zelllinie MG-63 getestet. Die Vorgehensweise verlief analog zu der Vorgehensweise in Kapitel 7, Abschnitt 7.2.3 beschrieben. Die Vitalität und Proliferation der Zellen in Anwesenheit von 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Makromonomer wurde über einen Zeitraum von 24 und 72 Stunden mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 10.35 dargestellt. Vergleichbar zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) konnte, in Anwesenheit der gelösten Makromonomere, eine vitale Morphologie und eine physiologische Proliferation der Zellen beobachtet werden.

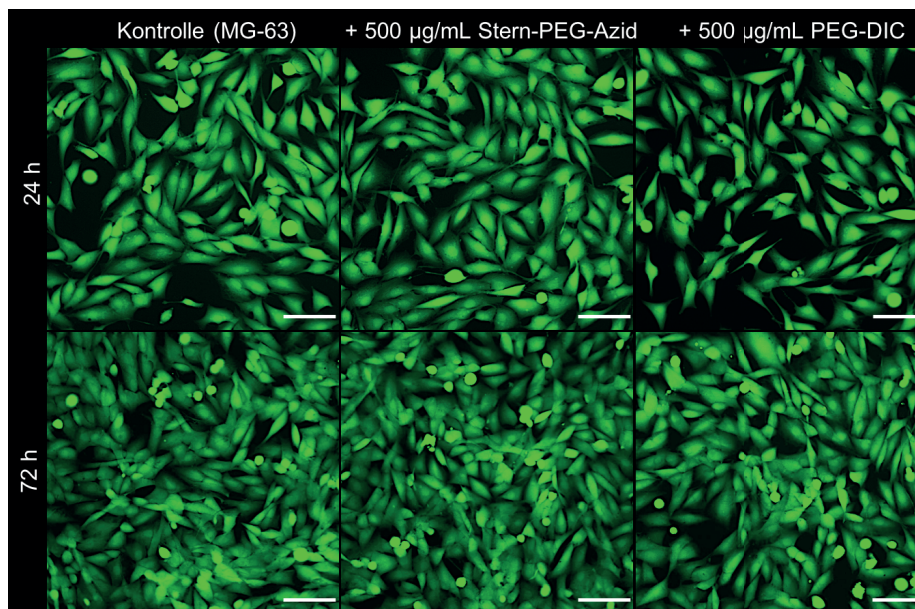


Abb. 10.35: Zell-Biokompatibilität der Makromonomere, Stern-PEG-Azid und PEG-DIC, getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h und 72 h. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Im Anschluss wurde die Zell-Biokompatibilität der synthetisierten Vaterit-beladenen Mikrogel-Kapseln auf die MG-63 Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden und 4 Tagen untersucht. Die Vorgehensweise verlief wie bei den Hydrogelen in Abschnitt 10.2.3. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 10.36 kann auf eine vitale Morphologie und Proliferation der Zellen in Anwesenheit der Vaterit-beladenen Mikrogel-Kapseln geschlossen werden.

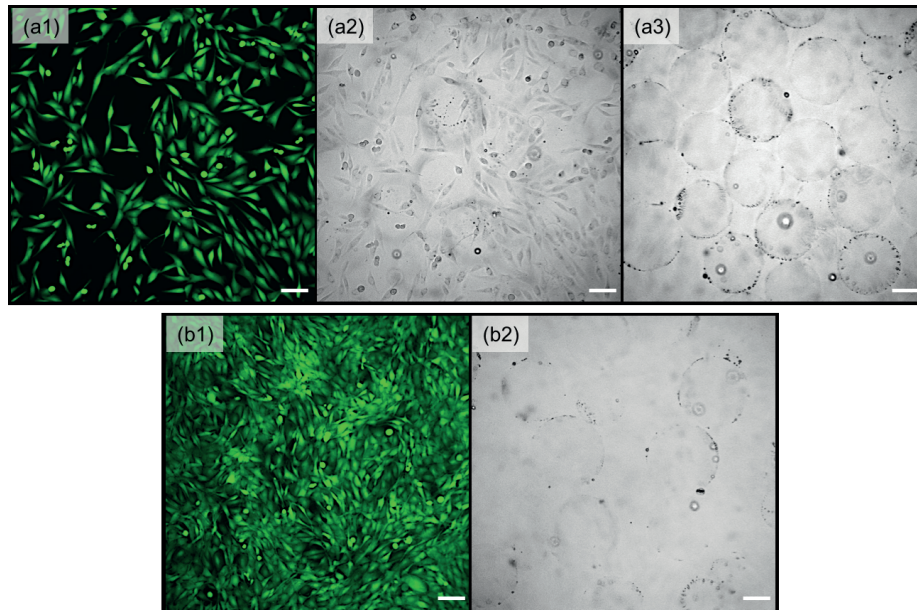


Abb. 10.36: Zell-Biokompatibilität der Vaterit-beladenen Mikrogel-Kapseln getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von (a) 24 h und (b) 4 Tage. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. (a1), (b1) sind Fluoreszenz-Aufnahmen und (a2), (a3), (b2) sind Phasenkontrast-Aufnahmen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

Da die Durchführung der Mikrofluidik bei Raumtemperatur und Umgebungsbedingungen und nicht unter Kultivierungsbedingungen (d.h. bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 Gehalt) stattfand, wurde noch weitere Kontrollen durchgeführt. Zunächst wurde die Zellsuspension durch das System mit einer Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{h}$ gepumpt (Test 1). Damit sollte geprüft werden, ob das System ein Überleben der Zellen garantiert. Im Anschluss wurden die Zellen in eine 24-Well Zellkulturplatte ausgesät und bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 Gehalt kultiviert. Als zweite Kontrolle wurde die eingesetzte Zellsuspension nach Beendigung der Mikrofluidik (nach ~ 5 Stunden) ausgesät und kultiviert (Test 2). Dabei sollte der Effekt der Umgebungsbedingung auf die Vitalität und Proliferation der Zellen über den Zeitraum der Durchführung untersucht werden. Zum Vergleich wurde ein Teil der eingesetzten Zellsuspension unmittelbar nach dem Ablösen wieder ausgesät und kultiviert (Kontrolle). Die Morphologie und Proliferation der Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 48 Stunden und 6 Tagen verfolgt. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 10.37 dargestellt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach 48 Stunden Kultivierung sowohl bei dem Test 1 als auch bei dem Test 2 eine vitale und adhärente Morphologie aufwiesen, wie sie auch bei der Kontrolle beobachtet wurde. Im Vergleich zu den Aufnahmen nach 48 Stunden konnte nach 6 Tagen bei allen untersuchten Zellen eine deutliche Zunahme der Zellzahl und damit eine Proliferation der Zellen festgestellt werden. Hierbei ist zu beachten, dass bei den Tests 1 und 2 sowie der Kontrolle vermutlich keine identischen Zellzahlen ausgesät wurden. Dies ist damit zu begründen, dass es zu Anhaftungen der Zellen innerhalb des Mikrofluidik-Systems kommen kann. Hierfür stehen noch weitere Untersuchungen aus. Dennoch wurde mit diesen Kontroll-Untersuchungen gezeigt, dass die Zellen einerseits das Mikrofluidik-

System überleben und andererseits auch den Umgebungsbedingungen über den Zeitraum der Durchführung standhalten.

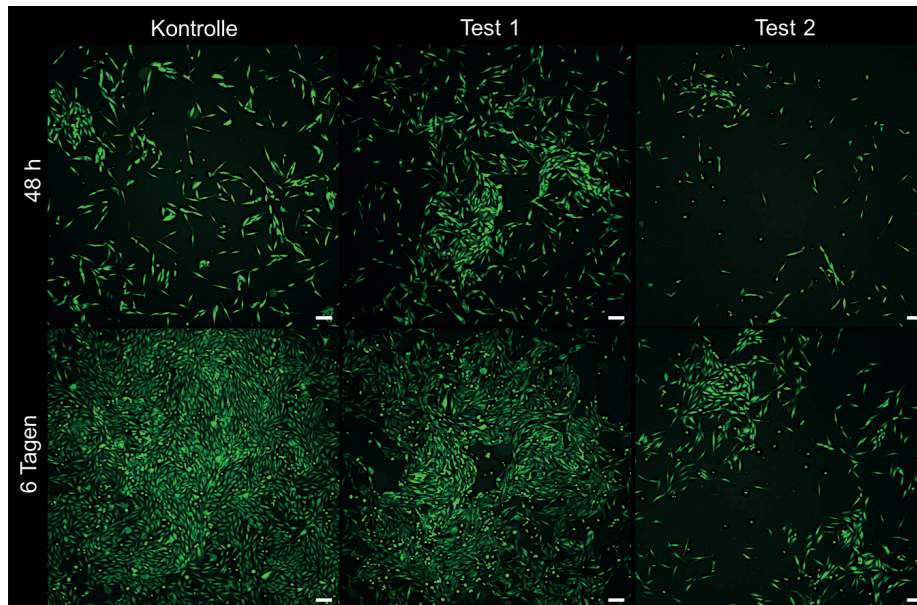


Abb. 10.37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der eingesetzten GFP-markierten MG-63 nach 48 h und 6 Tagen Kultivierung. (Kontrolle) ausgesäte Zellen unmittelbar nach dem Ablösen, (Test 1) ausgesäte Zellen nachdem sie das Mikrokanal-System mit 50 $\mu\text{L}/\text{h}$ passiert hatten und (Test 2) ausgesäte Zellen nach 5 Stunden bei Raumtemperatur und Umgebungsbedingungen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

In Abb. 10.38 sind die Resultate des ersten Mikrofluidik-Experiments zur simultanen Verkapselung von Zellen und Vaterit-Partikel zusammengestellt. Anhand der Phasenkontrast-Aufnahmen konnten sowohl nach 24 Stunden (Abb. 10.38a1) als auch nach 4 Tagen (Abb. 10.38b1) Kultivierung in Zellkulturmedium stabile Mikrogel-Kapseln nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Fluoreszenzkanals wurde die Anwesenheit der GFP-markierten MG-63 Zellen untersucht. Hierbei ließen sich grünfluoreszierende Zellen nach 24 Stunden (Abb. 10.38a2) und auch noch nach 4 Tagen (Abb. 10.38b2) beobachten. Die Abb. 10.38a3 und b3 zeigen Überlagerungen der Phasenkontrast- und der Fluoreszenz-Aufnahmen. Aufgrund der unterschiedlichen Fokussierungsebenen der dreidimensionalen Kapseln und der Zellen konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob sich die beobachteten Zellen auch wirklich in den Mikrogel-Kapseln befanden.

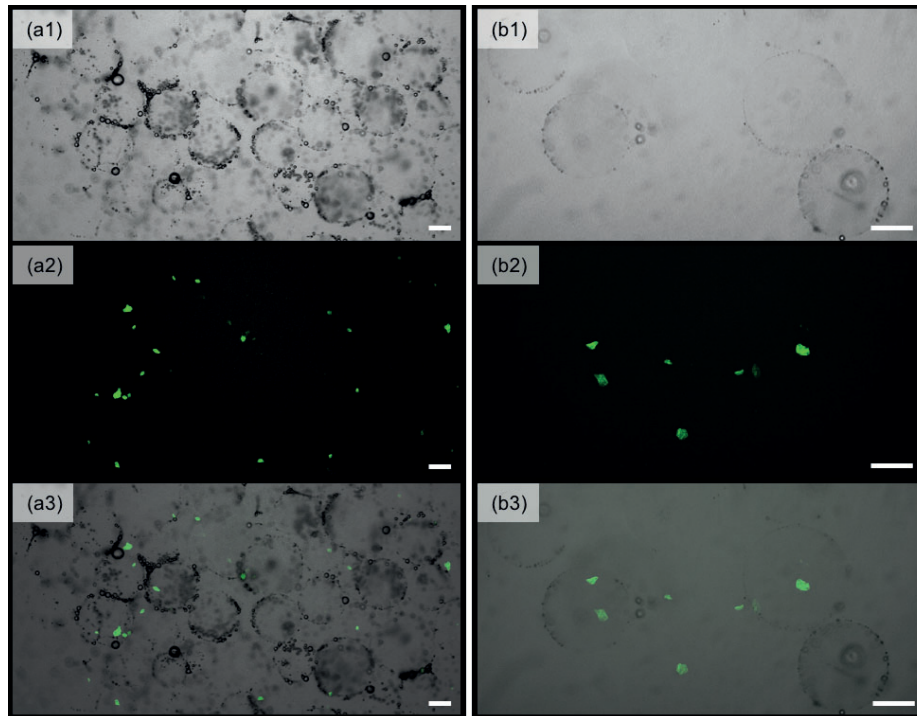


Abb. 10.38: Mikroskopische Aufnahmen der Vaterit-Partikel- und GFP-markierten MG-63-beladenen Mikrogel-Kapseln nach (a) 24 h und (b) 4 Tagen Kultivierung im Zellkulturmedium. (a1), (b1) sind Phasenkontrast-Aufnahmen. (a2), (b2) sind Fluoreszenz-Aufnahmen und (a3), (b3) zeigen eine Überlagerung der Phasenkontrast und der Fluoreszenz-Aufnahmen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 μm .

10.7.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Grundidee Vaterit-Partikel zusammen mit vitalen Zellen in eine Hydrogel-Kapsel einzubringen wird mit dem System der Mikrofluidik ermöglicht. Hierbei ist noch zu prüfen, ob die Vaterit-Partikel zunächst phasenrein vorliegen und ob eine Umsetzung in das Knochenmineral auch innerhalb der Mikrogel-Kapseln erfolgt. Ein Problem stellt das verwendete Öl-Stabilisator-Gemisch dar, welches durch die Aufreinigung mit wässrigem Zellkulturmedium nicht vollständig entfernt werden konnte und als eine Art inerte Hülle um die Mikrokapseln verblieb. Diese Öl-basierte Hülle unterbindet einen Austausch von Nähr- und Abfallstoffen zwischen dem Zellkulturmedium außerhalb und innerhalb der Mikrogel-Kapseln. Der Austausch ist allerdings für die Vitalität und Proliferation der Zelle und auch für die Umsetzung der Vaterit-Partikel essentiell. Daher ist es von großem Interesse eine geeignetere nicht-mischbare Phase zu finden, die eine leichtere Aufreinigung mit dem verwendeten Zellkulturmedium ermöglicht. Basierend auf diesen ersten Resultaten wird ein umfassendes Gebiet eröffnet auf das mit zahlreichen weiterführenden Untersuchungen aufgebaut werden kann. Beispielsweise (i) die Verwendung eines möglicherweise leichter zu entfernenden Perfluorooctanol-basierten Öl-Stabilisator-Gemischs, (ii) die Umsetzung der Vaterit-Partikel innerhalb der Mikrogel-Kapseln, (iii) die Varianz im Polymersystem durch den Einbau von steuerbaren Einheiten (durch pH, Temperatur), um ein sensitive-abbaubares System zu schaffen sowie (iv) intensive *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur besseren Beurteilung der Interaktionen zwischen Vaterit-Partikeln und Zellen in einer Hydrogel-Matrix.

Teil III

Anhang

11

Anhang A

11.1 Gerätedetails und Messparameter

Festkörper-Kernmagnetresonanz-Spektroskopie

Die Messungen aller Festkörper-NMR-Experimente (ssNMR: *solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy*) wurden an einem Bruker Avance DSX 400 NMR Spektrometer mit einer ^{31}P -Frequenz von 161,87 MHz durchgeführt. Es wurde ein Bruker Doppelresonanz-Messkopf verwendet, der mit 2,5 mm Durchmesser großen Rotoren betrieben wurde. Die Einzelpuls-Anregungsexperimente (*single pulse*, SP) wurden mit einer Rotationsdrehzahl von 20kHz MAS (*magic angle spinning*) und mit einem 90° Puls, mit einer jeweiligen Länge von $4\ \mu\text{s}$ und einer Wiederholungszeit von 600 s vermessen, um eine vollständige Relaxation zu gewährleisten. Die chemischen Verschiebungen der ^{31}P -NMR-Messung wurden auf den externen Standard $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_3$ bei 0,9 ppm kalibriert.

Die Messungen wurden von [REDACTED], an der JGU Mainz, durchgeführt. Die Auswertung, Interpretation und Darstellung der Ergebnisse erfolgte selbstständig in Rücksprache mit [REDACTED]. Die Spektren wurden mit Hilfe der Programme Mestrenova 10.0.1, 1D-WIN-NMR (Bruker) und Origin 7 ausgewertet und dargestellt.

Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskopie

Die Messungen wurde mit einem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop vom Model Keyence BZ-9000E (Bioevo) der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. durchgeführt.

Alle Messungen wurden sowohl selbstständig durchgeführt, als auch analysiert, interpretiert und präsentiert.

Infrarot-Spektroskopie

Die Fourier-Transformation Infrarot (FT-IR) -Spektroskopie erfolgte an einem Nicolet iS10 FT-IR Spektrometer mit Platinum-ATR (ATR: *attenuated total reflection*, abgeschwächte Totalreflexion) der Firma Thermo Scientific. Die Spektren wurden in einem Bereich von $4000\ \text{cm}^{-1}$ bis $650\ \text{cm}^{-1}$ mit jeweils 16 Scans und einer Auflösung von $4\ \text{cm}^{-1}$ aufgenommen. Spektren in einem Bereich von $4000\ \text{cm}^{-1}$ bis $400\ \text{cm}^{-1}$ wurden mit jeweils 16 Scans und einer Auflösung von $4\ \text{cm}^{-1}$ an einem TENSOR 27 FT-IR Spektrometer mit Platinum-ATR der Firma Bruker aufgenommen. Die

Proben wurden im getrockneten bzw. im gefriergetrockneten Zustand vermessen. Alle FT-IR Spektren wurden mit Hilfe des Programms Origin 7 dargestellt.

Alle Messungen wurden sowohl selbstständig durchgeführt, als auch analysiert, interpretiert und präsentiert.

Mikroplatten Reader

Die Auswertungen der Zytotoxizitäts-Tests und der Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assay erfolgten durch Absorptionsmessungen an einem Tecan GENios *Mircoplate Reader* der Firma Tecan Trading AG.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Messungen sowohl selbstständig durchgeführt, als auch analysiert, interpretiert und präsentiert.

Millipore Anlage

Wenn nicht abweichend beschrieben, wurden alle Reaktionen im wässrigen Medium mit Wasser aus einer Millipore Anlage Synergy 185 ($R = 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ bei 25°C) durchgeführt.

Raman-Spektroskopie

Die Messungen erfolgten an einem Horiba Jobin Yvon LabRAM HR (High Resolution) 800 Spektrometer mit einem Si-basierten Charge-Coupled Device (CCD)-Detektor (Peltier-gekühlt), einem integrierten Olympus BX41 Lichtmikroskop und einer automatisiert ausgestatteten x-y-Bühne. Die Spektren wurden im Bereich von 1600 cm^{-1} bis 150 cm^{-1} aufgenommen. Die getrockneten Partikel oder gefriergetrockneten Hydrogele wurden auf einen Glasträger gegeben und mit einer 50-fachen Vergrößerung, einer Spaltbreite von $100 \mu\text{m}$ und einer Laserspot-Größe von $2 \times 2 \mu\text{m}$ vermessen. Es wurde mit einem frequenzverdoppelten Nd-YAG-Laser ($\lambda = 632,817 \text{ nm}$) jeweils zwei Mal gemessen. Alle Raman-Spektren wurden mit Hilfe des Programms Origin 7 dargestellt.

Alle Messungen wurden sowohl selbstständig durchgeführt, als auch analysiert, interpretiert und präsentiert.

Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDS)

Die Messungen der Rasterelektronenmikroskopie (REM, SEM: *scanning electron microscopy*) wurden mit einem Nova NanoSEM 630 der Firma FEI durchgeführt. Dabei wurde im Hochvakuum mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV, einem Arbeitsabstand von 4 mm bis 7 mm und einem vCD (*low voltage high contrast detector*) Detektor, als Sekundärelektronendetektor zur Bildgebung, gearbeitet.

Die REM-Aufnahmen aus Kapitel 9, aufgenommen von [REDACTED] am MIPP in Mainz in der Arbeitsgruppe von [REDACTED], erfolgten an einem LEO Gemini 1530 Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss. Dabei wurde im Hochvakuum mit einer Beschleunigungsspannung von 3 kV, einem Arbeitsabstand von 1,5 mm bis 1,7 mm und einem Inlens Detektor, als Sekundärelektronendetektor zur Bildgebung, gearbeitet.

Zur Messung wurden die hergestellten Partikel in Ethanol suspendiert, 9 μL auf einen Silicium-Wafer aufgetragen und luftgetrocknet. Der Silicium-Wafer wurde auf einem leitenden Kohlenstoff-Pad fixiert. Die Hydrogele wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, sofort in kleine Stücke zerbrochen, gefriertrocknet und auf einem leitenden Kohlenstoff-Pad aufgetragen. Diese Probenpräparation war nötig, um die natürliche Morphologie der gequollenen Hydrogele zu bewahren. Zur verbesserten Leitfähigkeit wurden alle untersuchten Proben mit Hilfe einer MED020 Kleinbedampfungsanlage der Firma Bal-Tec mit Gold in einer Schichtdicke von 7,5 nm gesputtert.

An ausgewählten Proben wurde eine Elementanalyse mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDS, EDX: *energy dispersive x-ray spectroscopy*) mit einem EDAX-Genesis Detektor durchgeführt. Hierbei wurde eine Beschleunigungsspannung von 30 kV angelegt. Die Proben für die EDX-Analyse wurden mit Silber in einer Schichtdicke von 7,5 nm gesputtert.

Alle Messungen wurden sowohl selbstständig durchgeführt, als auch analysiert, interpretiert und präsentiert.

Rasterelektronenmikroskopie (REM) mit fokussiertem Ionenstrahl (FIB, *focused ion beam*)

Mit Hilfe eines Nova 600 Nanolab der Firma FEI wurde eine Lamelle für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durch einen fokussierten Ionenstrahl präpariert. Als Ionenquelle diente eine Flüssigmetall-Ionen-Quelle mit Gallium-Ionen. Die Zweistrahl- (*dual beam*) Anlage ermöglichte das simultane Abbilden und Bearbeiten einer Probe. Zur Messung wurden die hergestellten Partikel in Ethanol suspendiert, 9 μL auf einen Silicium-Wafer aufgetragen und luftgetrocknet. Die Präparation der Lamelle lief in folgenden Schritten ab: (i) Auftragen einer FIB-induzierten, lokalen Platin (Pt) –Beschichtung von $12 \times 2 \times 1 \mu\text{m}$ als Schutzschicht bei 30 kV und 50 pA, (ii) Schneiden von zwei Gräben beiderseits der Lamelle bei 30 kV und 3 nA, (iii) Freischneiden und Herausheben der Lamelle mit einem Nanomanipulator der Firma Omniprobe, (iv) Transfer der Lamelle zu einem Kohlenstoff beschichteten Kupfernetz und Fixierung mittels FIB-induzierter Pt-Beschichtung. Im Anschluss erfolgte eine schrittweise Ausdünnung der Lamelle mit 1 nA, 0,5 nA und 0,1 nA bei 30 kV bis zu einer Enddicke von ca. 50 nm.

Die Präparation der TEM-Lamelle wurde von [REDACTED], am MPIP in Mainz im Arbeitskreis von [REDACTED], ausgeführt.

Röntgendiffraktometrie (XRD, *X-ray diffraction*)

Die Messungen der Röntgendiffraktometrie erfolgten an einem Bruker AXS D8 Discover 7-Kreis-Diffraktometer mit einem 2D HiStar Flächendetektor. Als Röntgenquelle wurde eine Cu-Anode mit K_{α} -Strahlung ($\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$) und einem Graphit-Monochromator verwendet. Einzelaufnahmen wurden in 10° Schritten im 2θ Bereich von 10° bis 80° (Detektorabstand von 150 mm, Öffnungswinkel Detektor $\Delta(2\theta) = 35^{\circ}$) mit 600 s pro Aufnahme gemessen. Die Partikel-Proben wurden in Form eines Pulvers auf einen Glasträger durch leichtes Anpressen aufgetragen. Die Analyse der Hydrogele erfolgte in Form eines Presslings. Dazu wurden die gefriergetrockneten

Hydrogel-Stücke bei einem Druck von 5 bar für etwa 30 min gepresst und an drei unterschiedlichen Stellen vermessen.

Die Röntgenbeugungsmuster der einzelnen Aufnahmen wurden mit der AXS GADDS Software Version 4.1.X.X (Bruker) integriert und mit Diffracplus Basic EVA 13 Release 2007 (Bruker) zusammengefügt.

Die quantitativen Phasenanalysen erfolgten mittels Vollprofilanpassung unter Verwendung des fundamentalen Parameter-Ansatzes, entsprechend der Implementierung aus TOPAS Academic Version 5 und Version 6.^[135] In diesem Ansatz ergeben sich die Reflexprofile aus der Faltung der jeweiligen Beiträge des Diffraktometers mit den Beiträgen der Probe. Letztere sind die Ausdehnung der kohärent streuenden Volumina und ggf. interne Spannungen. In Tab. 11.1 sind die nachgewiesenen Verbindungen mit den verwendeten Strukturmodellen aufgeführt.

Tab. 11.1: Angabe der verwendeten Strukturmodelle für die quantitative Phasenanalyse der XRD-Daten von Vaterit, Calcit und Hydroxylapatit.

Verbindung	Strukturmodell nach
Vaterit (CaCO ₃)	Mugnaioli <i>et al.</i> ^[33]
Calcit (CaCO ₃)	Chessin <i>et al.</i> ^[30]
Hydroxylapatit (Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH)	Wilson <i>et al.</i> ^[170]

Bei kleinen und zugleich anisotropen Kristallitausehnungen treten richtungsabhängig unterschiedlich breite Reflexprofile auf. Diese können mittels einer quadratischen Form oder Kugelflächenfunktionen modelliert werden. Während die Modellierung mittels Kugelflächenfunktionen, insbesondere bei höheren Ordnungen, in der Regel bessere Modellierungen ermöglicht, sind die Parameter der Modellierung mittels quadratischer Form einfach in realistische Kristallitausehnungen zu übersetzen. Soweit nicht anders aufgeführt, wurde der Ansatz mittels quadratischer Form gewählt. Die Modellierung der Streukurve des amorphen Hydroxylapatits erfolgte anhand des Strukturmodells von kristallinem Hydroxylapatit^[170] unter Vorgabe einer sehr geringen Kristallitausehnung von 3 nm. In Ermangelung der Strukturmodelle amorpher Phasen hat sich dieser Ansatz in der Vergangenheit bewährt.^[296,297]

Die Messungen wurden von [REDACTED], an der JGU Mainz im Arbeitskreis von [REDACTED], ausgeführt. Die Analysen, Interpretationen und Präsentationen der Röntgen-Pulverdiffraktogramme erfolgte mit Hilfe der PDF-2 Datenbank (JCPDS – International Centre for Diffraction Data) unter Verwendung von AXS EVA 10.0 Rev. 1 und wurden selbstständig durchgeführt. Die quantitativen Phasenanalysen erfolgten durch [REDACTED], an der JGU Mainz im Arbeitskreis von [REDACTED].

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Messungen wurden, mit einem EM 420 der Firma Philips oder einem Tecnai G2 Spirit Twin der Firma FEI mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV. Eine Lanthanhexaborid-Kathode

diente als Elektronenquelle und die Bildaufnahme erfolgte mit einer Slow-Scan CCD-Kamera (1k x 1k) bzw. mit einer 2k x 2k CCD-Kamera. Die Größenbestimmung der Partikel erfolgte unter Verwendung der Grafiksoftware ImageJ. Die hergestellten Partikel wurden in Ethanol suspendiert, 6 µl der Suspension auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfernetz aufgetragen und luftgetrocknet.

Alle Messungen wurden, wenn nicht explizit beschrieben, selbstständig durchgeführt, analysiert, interpretiert und präsentiert.

(Raster-) Transmissionselektronenmikroskop (TEM / STEM, *scanning transmission electron microscope*)

Die Messungen wurden an einem Tecnai F20 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) der Firma FEI mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV und einer Auflösung von 0,24 nm durchgeführt. Eine Schottky *field emission gun* (FEG) diente als Elektronenquelle und die Bildaufnahme erfolgte mit einer 2k CCD-Kamera. Dunkelfeldbilder wurden mit der STEM Technik und einem HAADF (*high-angle annular dark field*) -Detektor aufgenommen. Elementanalysen erfolgten im STEM Modus mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX, *energy dispersive X-ray spectroscopy*) mit einem EDAX-Detektor und durch Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS, *electron energy loss spectroscopy*) mit einer *post column Gatan Tridem* Kamera.

Die Messungen wurden von [REDACTED], am MPIP in Mainz unter der Projektleitung von [REDACTED], durchgeführt.

Ultraschallbad-Gerät

Für die Nanopartikel-Synthesen wurde mit einem Ultraschallbad-Reinigungsgerät Emmi 40HC der Firma EMAG-Technologies mit einer maximalen Ultraschall-Leistung von 250 W und einer Frequenz von 45 kHz gearbeitet.

Zellzähler-Gerät

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde mit einem CASY[®] Model TTC der Firma Schärfe-System GmbH gearbeitet.

Die Messungen wurden selbstständig durchgeführt und ausgewertet.

11.2 Ergänzungen zu den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse aus der quantitativen Phasenanalyse der Röntgendiffraktometrie der synthetisierten Vaterit Nanopartikel, aus Abschnitt 7.3.1, im Detail aufgelistet.

Tab. 11.2: Detaillierte Angaben zu den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse der synthetisierten Vaterit Nanopartikel, mittels Vollprofilanpassung nach Mugnaioli *et al.*^[33] unter Verwendung des fundamentalen Parameter-Ansatzes entsprechend der Implementierung aus TOPAS Academic Version 6.

Diffractometer	Bruker AXS D8 Discover with HiStar
Sample preparation	On a glass substrate by gently pressing
Measuring mode	Reflection
Wavelength	CuK α (graphite monochromatized)
Measuring range	$10 \leq 2\theta / ^\circ \leq 79.9$; $0.71 \leq Q / \text{\AA}^{-1} \leq 5.23$
Temperature / K	298K
Profile Fit	Rietveld refinement according to reported crystal structure models
Background	Chebyshev
Profile function	Fundamental Parameters Approach, crystallite size anisotropy modeled in quadratic correction
Program	TOPAS Academic V6
Total No. of Parameters / Background	21 / 10
R _{wp}	4.14
GoF	0.39
DW	0.13
Biso (overall)	3.1(1)
CaCO₃ – Vaterite	
Space group	C-1
Cell parameters / Å	a = 12.352(3) b = 7.165(2) c = 25.742(5) $\beta = 99.01(3)^\circ$
Crystallite size / nm	39(1)
Mass fraction /%wt.	100

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse der Röntgendiffraktometrie der SBF-Inkubationen von Vaterit Nanopartikel, aus Abschnitt 8.3.1 im Detail aufgelistet.

Tab. 11.3: Detaillierte Angaben zu den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse der SBF-Inkubation von Vaterit Nanopartikel, mittels Vollprofilanpassung unter Verwendung des fundamentalen Parameter-Ansatzes, entsprechend der Implementierung aus TOPAS Academic Version 5.

	V-NP in SBF after 24 h	V-NP in SBF after 48 h	V-NP in SBF after 72 h
Diffractometer	Bruker AXS D8 Discover with HiStar		
Sample preparation	On a glass substrate by gently pressing		
Measuring mode	Reflection		
Wavelength	CuK α (graphite monochromatized)		
Measuring range	$5.7 \leq 2\theta / ^\circ \leq 86.6$; $0.48 \leq Q / \text{\AA}^{-1} \leq 5.59$		
Temperature /K	298K		
Profile Fit	Rietveld refinement according to reported crystal structure models		
Background	Chebyshev		
Profile function	Fundamental Parameters Approach, crystallite size anisotropy modeled in quadratic correction		
Program	TOPAS Academic V5		
Total No. of Parameters / Background	30 / 12	30 / 12	30 / 12
R _{wp}	5.36	6.05	4.56
GoF	0.68	0.77	0.59
DW	0.07	0.05	0.08
Biso (overall)	1.20(6)	1.35(8)	
CaCO₃ – Calcite			
Space group		R-3c	
Cell parameters / \AA	a = 4.996(2) c = 17.042(8)	a = 4.996(2) c = 17.047(9)	a = 4.995(2) c = 17.051(8)
Crystallite size / nm	55(4)	51 (3)	44(2)
Mass fraction /%wt.	1.9(1)	2.2(3)	2.9(1)
CaCO₃ – Vaterite			
Space group		C-1	
Cell parameters / \AA	a = 12.359(1) b = 7.1684(6) c = 25.722(1) $\beta = 98.98(9)^\circ$	a = 12.370(2) b = 7.1678(9) c = 25.763(1) $\beta = 99.47(1)^\circ$	a = 12.359(2) b = 7.164(1) c = 25.704(2) $\beta = 98.95(2)^\circ$
Crystallite size / nm	37(1)	39(1)	39(3)
Mass fraction /%wt.	93.4(3)	81.6(5)	60.8(8)
Ca₅(PO₄)₃OH – Hydroxyapatite			
Space group		P6 ₃ /m	
Cell parameters / \AA	a = 9.46(1) c = 6.935(5)	a = 9.477(5) c = 6.892(2)	a = 9.458(3) c = 6.884(1)
Crystallite size / nm	17(2) by 32(3)	15(1) by 30(1)	13(1) by 26(1)
Mass fraction /%wt.	4.7(3)	16.2(5)	36.2(8)

11.3 Protokoll zur Isolation von HUVEC

Die in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Endothelzellen (HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells*) wurden aus gespendeten, frischen, humanen Nabelschnüren isoliert. Der Transport und die kurzzeitige Lagerung der Nabelschnüre erfolgte in einem Nabelschnurtransportpuffer bei +4°C (Abb. 11.1a). Auf einer sterilen Unterlage wurden die Nabelschnur von Blut- und Geweberesten befreit (Abb. 11.1b). Über sterile Kanülen wurde die Nabelschnurvene mit HEPES-Puffer 1x (verdünnt aus 10x HEPES-Puffer, Sigma Aldrich) gespült und auf Durchlässigkeit und Dichtheit geprüft (Abb. 11.1c, d). Zum Ablösen der Endothelzellen wurde die Vene mit 0,1% Collagenase (Worthington Biochemical Corporation) befüllt, die Kanülen mit Stopfen verschlossen und die Nabelschnur im Wärmeschrank bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert (Abb. 11.1e). Im Anschluss wurden die abgelösten Endothelzellen unter Verwendung von Medium M199 (Sigma Aldrich) mit 20% FBS (Sigma Aldrich), 2 mM Glutamax I und 100 U / 100 µg/mL P/S (Gibco® Thermo Fisher Scientific) aus der Nabelschnurvene in ein 50 mL Zentrifugen-Röhrchen überführt (Abb. 11.1f) und bei 1200 U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem M199 Medium unter Zusatz von 25 µg/mL ECGS (Becton Dickinson and Company) und 25 µg/mL Heparin Natrium-Salz (Sigma Aldrich) resuspendiert und in eine mit 0,2% Gelatine (Sigma Aldrich) vorbehandelte T25-Zellkulturflasche (Greiner bio-one Cellstar®) als Passage 0 (p0) ausgesät (Abb. 11.1g). Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden bis zur konfluenten Zellrasenbildung weiter kultiviert. Erst dann wurden die HUVEC mittels 0,25% Trypsin/EDTA (Gibco® Thermo Fisher Scientific) abgelöst und im Verhältnis 1:3 in eine neue T75-Zellkulturflasche (Greiner bio-one Cellstar®) als Passage 1 (p1) ausgesät.

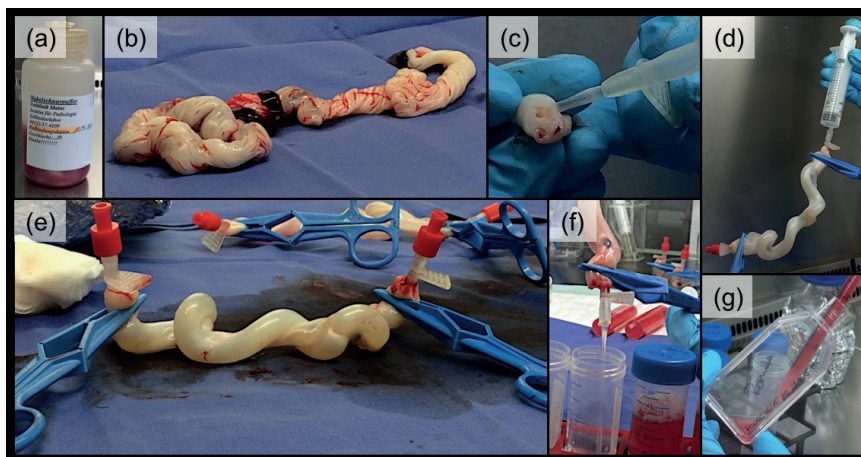


Abb. 11.1: Essentielle Isolationsschritte der HUVEC. (a) Transportgefäß einer Nabelschnur im Nabelschnurpuffer. (b) Humane Nabelschnur mit Blut- und Geweberesten. (c) Querschnitt einer Nabelschnur mit Kanüle in der großlumigen Vene (*vena umbilicalis*). (d) Spülen der Nabelschnur mit HEPES-Puffer und Überprüfung der Dichtheit, (e) Mit 0,1% Collagenase gefüllte Nabelschnur mit roten Verschlussstopfen und blauen Nabelschnurklemmen. (f) Überführung der abgelösten Zellen in ein Zentrifugen-Röhrchen mittels Medium. (g) Aussaat der frisch isolierten HUVEC in eine mit 0,2% Gelatine beschichtete T25-Zellkulturflasche.

Optional erfolgte ein weiterer Passagier-Vorgang zu Passage 2 (p2) oder die Zellen wurden bei -180°C gelagert (Kyokonservierung). In dieser Arbeit wurden ausschließlich HUVEC der Passage 2 (p2) verwendet, sodass sie sich im Experiment in Passage 3 (p3) befanden.

11.4 Protokoll zum Ablösen und Zählen der Zellen

Das nachfolgende Protokoll wird am Beispiel einer T25 Zellkulturflasche (Greiner bio-one Cellstar[®]) mit 25 cm^2 Wachstumsfläche beschrieben. Das Zellkultur-Medium wurde abgenommen, die Zellen wurden mit 5 mL PBS (Sigma Aldrich) gewaschen und mit 1 mL 0,25% Trypsin/EDTA (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific) vollständig bedeckt. Trypsin/EDTA wurde direkt nahezu vollständig abgenommen und die Zellen zum Ablösen bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert. Eine Kontrolle des Ablösestadiums der Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops, da die Ablösezeit von Zelltyp zu Zelltyp variiert. Anschließend wurden die Zellen in 6 mL frischem Zellkultur-Medium resuspendiert. Optional wurden die Zellen nun für ein Experiment ausgesät oder durch Aufteilen auf weitere Zellkulturflaschen in Kultur gehalten.

Zellzahl-Bestimmung

Die genaue Zellzahl wurde mit einem elektronischen Zellzähler (s. Abschnitt 11.1) bestimmt. Hierzu wurden $100\ \mu\text{L}$ der Zell-Medium-Suspension in 10 mL einer isotonischen Lösung (CASYton, OMNI Life Science GmbH & Co. KG) gegeben und die Zellzahl pro mL vermessen. Durch Multiplikation des Volumens, in dem die Zellen resuspendiert sind, wird die Gesamtzellzahl erhalten.

11.5 Berechnungen aus den Untersuchungen der quantitativen ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Berechnungen aus den Untersuchungen der quantitativen ^{31}P -Festkörper-NMR Spektroskopie zusammengestellt (vgl. Kapitel 8). Die Formeln der Berechnungen sind im Anschluss an die Tabelle aufgeführt. Als Referenz wurde der kommerziell erworbene Hydroxylapatit (HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) von Sigma Aldrich mit einem Molekulargewicht von 502 g/mol verwendet.

Tab. 11.4: Berechnungen des absoluten Anteils an P-Atomen und den relativen Anteilen der PO_4^{3-} und CO_3^{2-} -Ionen in Hydroxylapatit (HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) in den erhaltenen Feststoffen aus den Inkubationen in SBF und PBS für 24, 48 und 72 Stunden bis 1, 3 und 6 Monaten (M). Mit dem kommerziell erworbenen HA als Referenz. Die Fläche* entspricht der Fläche unter dem Resonanzsignal im Bereich von 15 ppm bis -10 ppm und ist auf eine RG (*resiver gain*) von 8192 normiert.

Bezeichnung	Fläche* <i>A</i>	Masse <i>m</i> / mg	Faktor <i>k</i>	<i>n</i> (P) / mmol	abs. Anteil (P) / %	Anzahl (P) in $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	rel. Anteil PO_4^{3-} in $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ / %	rel. Anteil CO_3^{2-} in $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ / %
HA kommerziell	$2,85 \cdot 10^{10}$	19,2	1,0	0,207	100	3	56,8	0,0
SBF_24 h	$6,07 \cdot 10^9$	11,3	1,7	0,075	36,2	1,1	20,6	22,9
SBF_48 h	$7,12 \cdot 10^9$	8,2	2,3	0,121	58,5	1,8	33,2	14,9
SBF_72 h	$7,80 \cdot 10^9$	6,3	3,1	0,173	83,5	2,5	47,4	5,9
SBF_1 M	$8,33 \cdot 10^9$	6,4	3,0	0,181	87,7	2,6	49,8	4,4
SBF_3 M	$7,29 \cdot 10^9$	5,5	3,5	0,185	89,3	2,7	50,7	3,8
SBF_6 M	$1,25 \cdot 10^{10}$	9,4	2,0	0,185	89,6	2,7	50,9	3,7
PBS_24 h	$8,26 \cdot 10^9$	11,4	1,7	0,101	48,8	1,5	27,7	18,3
PBS_48 h	$1,06 \cdot 10^{10}$	8,8	2,2	0,168	81,2	2,4	46,1	6,7
PBS_72 h	$9,06 \cdot 10^9$	7,3	2,6	0,173	83,7	2,5	47,5	5,8
PBS_1 M	$1,10 \cdot 10^{10}$	10,1	1,9	0,151	73,1	2,2	41,5	9,6
PBS_3 M	$1,17 \cdot 10^{10}$	10,7	1,8	0,153	73,8	2,2	41,9	9,4
PBS_6 M	$1,24 \cdot 10^{10}$	11,4	1,7	0,152	73,4	2,2	41,7	9,5
Knochen	$1,79 \cdot 10^{10}$	14,1	1,4	0,177	85,7	2,6	48,7	5,1

Berechnung der Stoffmenge *n* an Phosphor in HA (kommerziell):

$$n_{\text{HA}} = \frac{m}{M(\text{P}) \cdot 3} \quad (11.1)$$

mit der eingewogenen Masse (*m*) und einem Molekulargewicht (*M*) von Phosphor (*P*) von 30,97 g/mol.

Berechnung der Stoffmenge *n* an Phosphor in den Feststoffen aus den Inkubationen in SBF und PBS und in dem humanen Knochenmineral:

$$n_{\text{F}} = \frac{n_{\text{HA}}}{A_{\text{HA}} \cdot A_{\text{F}} \cdot k} \quad (11.2)$$

mit der Stoffmenge von Phosphor im kommerziell erworbenen HA (n_{HA}), der Fläche unter dem Resonanzsignal des kommerziell erworbenen HA (A_{HA}) und der Fläche unter dem Resonanzsignal der Feststoffe aus den Inkubationen in SBF und PBS (A_{F}). Der Faktor *k* berücksichtigt die eingesetzte Probenmenge.

Berechnung der Anzahl an P-Atomen in den Feststoffen aus den Inkubationen in SBF und PBS und in dem humanen Knochenmineral:

$$\text{Anzahl P} = \frac{3}{n_{HA} \cdot n_F} \quad (11.3)$$

Berechnung des relativen Anteils (η) an PO_4^{3-} Ionen in $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$:

$$\eta = \frac{\text{Anzahl P} \cdot M(\text{PO}_4^{3-})}{M(\text{HA})} \cdot 100\% \quad (11.4)$$

mit einem Molekulargewicht (M) der PO_4^{3-} -Ionen von 95 g/mol und einem M des HA von 502 g/mol.

Berechnung des relativen Anteils (η) an CO_3^{2-} Ionen in $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$:

$$\eta = \frac{\text{Anzahl P} \cdot M(\text{CO}_3^{2-})}{M(\text{HA})} \cdot 100\% \quad (11.5)$$

mit einem Molekulargewicht (M) der CO_3^{2-} -Ionen von 60 g/mol.

11.6 Ergebnisse der Identifizierung von Serumproteinen mittels LC-MS

Die Identifizierung der Serumproteine des fetalen Rinderserums (FBS: *fetal bovine serum*) erfolgte mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie gekoppelten Massenspektrometrie (LC-MS: *liquid-chromatography mass-spectrometry*) nach Schöttler *et al.*^[107] und wurde von [REDACTED], aus der Gruppe von [REDACTED] unter Projektleitung von [REDACTED] am MPIP in Mainz durchgeführt.

Tab. 11.5: Liste der mittels LC-MS identifizierten und quantifizierten Serumproteine in FBS und der adsorbierten Serumproteine der HA-Partikel aus der Synthese in PBS mit 10% FBS (FBS-HA). Die Proteinmassen wurden anhand einer überprüften Rinder Proteinsequenz Datenbank von UniProt^[298] bestimmt.

Nummer	Bezeichnung	Anteil in fmol		Anteil in %	
		FBS	FBS-HA	FBS	FBS-HA
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein	90,29	206,32	19,33	33,21
P34955	Alpha-1-antitrypsin	40,49	48,73	8,67	7,84
P02769	Serum albumin	216,58	56,23	46,37	9,05
Q29443	Serotransferrin	29,10	28,02	6,23	4,51
P15497	Apolipoprotein A-I	8,83	37,34	1,89	6,01
Q3Y5Z3	Adiponectin	0,57	28,31	0,12	4,56
Q2UVX4	Complement C3	2,16	15,54	0,46	2,50
P02081	Hemoglobin fetal subunit beta	1,14	15,01	0,24	2,42
P50448	Factor XIIIa inhibitor	0,28	13,84	0,06	2,23
Q5I3B1	Thyroxine 5-deiodinase	0,00	8,83	0,00	1,42
Q9N2I2	Plasma serine protease inhibitor	0,18	11,55	0,04	1,86
Q17QL1	Glucosamine isomerase 2	0,00	9,23	0,00	1,49
Q95121	Pigment epithelium-factor 1	0,61	8,97	0,13	1,44
O46375	Transthyretin	1,08	6,39	0,23	1,03
P81187	Complement factor B	0,45	7,15	0,10	1,15
Q3T052	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	1,80	8,08	0,39	1,30
Q3MHN5	Vitamin D-binding protein	7,52	6,94	1,61	1,12
Q7SIH1	Alpha-2-macroglobulin	6,57	7,75	1,41	1,25
P41361	Antithrombin-III	0,64	4,79	0,14	0,77
Q3SX14	Gelsolin	0,23	4,78	0,05	0,77
P68138	Actin, alpha skeletal muscle	0,00	4,09	0,00	0,66
Q0VCM5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	0,00	4,54	0,00	0,73
P01030	Complement C4 (Fragments)	0,26	3,87	0,06	0,62
Q0P5F3	Protein lin-7 homolog C	0,00	3,69	0,00	0,59
P07589	Fibronectin	0,00	4,70	0,00	0,76
Q58D62	Fetuin-B	6,74	4,27	1,44	0,69
Q28178	Thrombospondin-1	0,00	3,31	0,00	0,53
P00978	Protein AMBP	1,74	3,63	0,37	0,58
P56652	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	0,48	2,72	0,10	0,44
P17690	Beta-2-glycoprotein 1	1,08	3,65	0,23	0,59
Q3SZ57	Alpha-fetoprotein	3,44	2,40	0,74	0,39
Q3MHN2	Complement component C9	0,00	2,49	0,00	0,40
Q32KY0	Apolipoprotein D	0,00	2,72	0,00	0,44
Q03247	Apolipoprotein E	0,00	2,34	0,00	0,38
P28800	Alpha-2-antiplasmin	0,71	2,43	0,15	0,39
P02453	Collagen alpha-1(I) chain	0,00	2,42	0,00	0,39
P20811	Calpastatin	0,00	1,95	0,00	0,31
Q28085	Complement factor H	0,00	2,65	0,00	0,43

Q9TTE1;	Serpin A3-1	0,00	2,25	0,00	0,36
P17697	Clusterin	0,00	2,17	0,00	0,35
P02676	Fibrinogen beta chain	0,00	2,13	0,00	0,34
P01966	Hemoglobin subunit alpha	0,00	2,29	0,00	0,37
Q3MHZ4	Transforming growth factor	0,00	2,02	0,00	0,32
P00735	Prothrombin	0,45	1,44	0,10	0,23
P60712	Actin, cytoplasmic 1	0,00	1,53	0,00	0,25
Q3SWW8	Thrombospondin-4	0,00	1,20	0,00	0,19
Q28065	C4b-binding protein alpha chain	0,00	1,40	0,00	0,22
Q05443	Lumican	0,00	1,23	0,00	0,20
P01044	Kininogen-1	1,99	1,10	0,43	0,18
Q29RQ1	Complement component C7	0,00	1,09	0,00	0,18
A6QPQ2	Serpin A3-8	0,07	0,80	0,01	0,13
P06868	Plasminogen	1,57	0,91	0,34	0,15
P35445	Cartilage oligomeric matrix protein	0,00	0,85	0,00	0,14
P62739	Actin, aortic smooth muscle	0,00	0,74	0,00	0,12
Q3SZV7	Hemopexin	1,87	0,91	0,40	0,15
Q2KIG3	Carboxypeptidase B2	0,00	0,85	0,00	0,14
Q29RH3	Pyrophosphatase NUDT12	0,00	0,80	0,00	0,13
Q9TT36	Thyroxine-binding globulin	0,32	0,82	0,07	0,13
Q2KJF1	Alpha-1B-glycoprotein	2,12	0,95	0,45	0,15
P02584	Profilin-1	0,00	0,44	0,00	0,07
A2I7N3	Serpin A3-7	0,49	0,40	0,11	0,06
A2I7N2	Serpin A3-6	0,00	0,45	0,00	0,07
P81644	Apolipoprotein A-II	0,00	0,48	0,00	0,08
Q3T0A3	Complement factor D	0,00	0,25	0,00	0,04
Q08DB5	Syntaxin-5	0,00	0,16	0,00	0,03
Q3ZC07	Actin, alpha cardiac muscle 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Q3ZEJ6;A2I7N0	Serpin A3-3	0,00	0,00	0,00	0,00
A2I7N1	Serpin A3-5	0,00	0,00	0,00	0,00
P24627	Lactotransferrin	12,79	0,00	2,74	0,00
Q29S21	Keratin, type II cytoskeletal 7	0,00	0,00	0,00	0,00
Q5E9L4	Apoptosis facilitator protein	8,81	0,00	1,89	0,00
A0JND2	Keratin, type II cytoskeletal 80	4,91	0,00	1,05	0,00
Q3SZR3	Alpha-1-acid glycoprotein	4,15	0,00	0,89	0,00
A2I7M9	Serpin A3-2	1,90	0,00	0,41	0,00
Q08D91	Keratin, type II cytoskeletal 75	0,00	0,00	0,00	0,00
P01045	Kininogen-2	0,76	0,00	0,16	0,00
P63258;P60712	Actin, cytoplasmic 2	0,50	0,00	0,11	0,00
P06394	Keratin, type I cytoskeletal 10	0,00	0,00	0,00	0,00
A2I7N1;A2I7N2	Serpin A3-5	0,40	0,00	0,09	0,00
A7YWK3	Keratin, type II cytoskeletal 73	0,00	0,00	0,00	0,00
Q58CQ9	Pantetheinase	0,18	0,00	0,04	0,00
Q28115	Glial fibrillary acidic protein	0,16	0,00	0,03	0,00
Q2KJ39	Reticulocalbin-3	0,16	0,00	0,03	0,00
A1L595	Keratin, type I cytoskeletal 17	0,16	0,00	0,03	0,00
Q2KIT0	Protein HP-20 homolog	0,14	0,00	0,03	0,00
Q2YDF2	Mediator of RNA polymerase II	0,12	0,00	0,02	0,00
Q5XQN5	Keratin, type II cytoskeletal 5	0,09	0,00	0,02	0,00

11.7 Kalibrierungen der Ca^{2+} -Ionenselektiven Elektrode

Es wurden Standardlösungen mit einer definierten Ca^{2+} -Konzentration von 0,25 mM, bis 1,25 mM in den entsprechenden Reaktionslösungen hergestellt und bei der entsprechenden Temperatur vermessen. Die erhaltene Kalibrierkurve stellt den linearen Zusammenhang zwischen gemessener Spannung U und dem Logarithmus der Ionenaktivität a_i dar. Die Ionenaktivität ist das Produkt aus Ionenkonzentration und dem stoffspezifischen Aktivitätskoeffizienten. Bei geringen Ionenkonzentrationen c_i ist der Aktivitätskoeffizient $\gamma_i \sim 1$ und die Ionenaktivität entspricht der Ionenkonzentration.

$$a_i = c_i \cdot \gamma_i \quad (11.6)$$

Die Spannung U ionenselektiver Elektroden ist abhängig von der Aktivität a_i der freien Ionen und wird durch der Nernst-Gleichung beschrieben.

$$U = U_0 + \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{z_i \cdot F} \cdot \log a_i = U_0 + U_N \cdot \log a_i \quad (11.7)$$

Mit U_0 = Standardspannung der Messkette, R = ideale Gaskonstante ($8,31441 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T = absolute Temperatur, z_i = Ladung des Messions i , F = Faraday Konstante ($96484,56 \text{ Cmol}^{-1}$), a_i = Aktivität des Messions und U_N = Nernst-Steilheit bzw. Elektrodensteilheit. Die Elektrodensteilheit ist abhängig von der Ladung des Ions und von der Temperatur.

Gemäß Gleichung (11.6) gilt:

$$U = U_0 + U_N \cdot \log c_i \quad (11.8)$$

Die Ergebnisse der Kalibrierungen in PBS bei 50 °C, in PBS bei 24 °C, in PBS mit 42 mM NaHCO_3 und pH 7,4 bei 50 °C und in PBS mit 10% FBS bei 24 °C sind in Abb. 11.2 zusammengestellt.

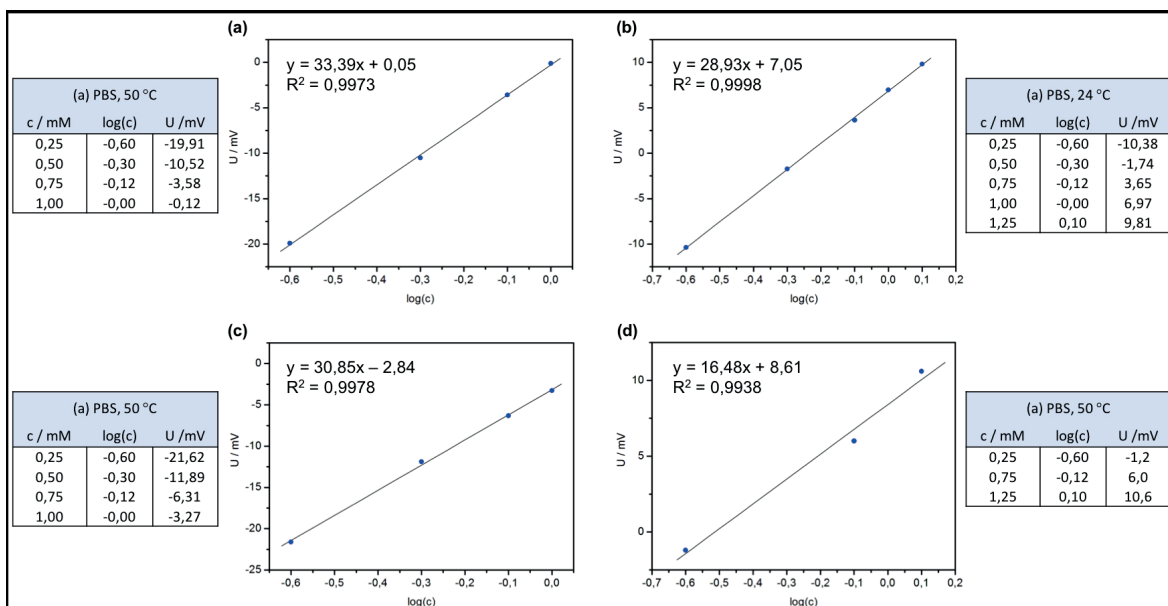


Abb. 11.2: Lineare Kalibrierkurven der Standardlösungen mit einer definierten Ca^{2+} -Konzentration von 0,25 mM bis 1,25 mM in (a) PBS bei 50 °C, (b) PBS bei 24 °C, (c) PBS mit 42 mM NaHCO_3 und pH 7,4 bei 50 °C und (d) PBS mit FBS bei 24 °C.

11.8 Synthesevorschrift und Charakterisierung der modifizierten PEG-Makromonomere

Die Synthese und Charakterisierung der modifizierten PEG-Makromonomere wurde von [REDACTED], aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] am Institut für Organische Chemie der JGU Mainz, durchgeführt.

Die Synthese des PEG-acetal-DMA Makromonomers erfolgte nach der Vorschrift von Pohlit *et al.*^[266]. 1 mmol PEG8000 (Sigma Aldrich), 5 mmol 2-(Vinyl-oxo)-ethyl-methacrylat (synthetisiert nach einer modifizierten Vorschrift von Vysotskaya *et al.*^[299]) und 0,1 mmol para-Toluolsulfonsäure (Sigma Aldrich) wurden in 5 mL Dichlormethan (Sigma Aldrich) gelöst. 20 mg Hydrochinon (Acros) wurden als Radikalinhibitor hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 25 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 0,2 mmol Triethylamin (Sigma Aldrich) gequentscht. Die Aufarbeitung erfolgte durch Ausschütteln mit dem gleichen Volumen von 1 mol/L Natronlauge (Sigma Aldrich). Die wässrige Phase wurde zweimal mit dem gleichen Volumen an Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Vereinigung der organischen Phase und deren Trocknung mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde in kaltem Ether gefällt mit zusätzlichen 20 mg Hydrochinon als Radikalinhibitor versetzt, bevor die vollständige Trocknung im Hochvakuum erfolgte. PEG-acetal-DMA wurde als farbloser Feststoff in quantitativer Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-Kernmagnetresonanz (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*) -Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie (GPC). Die Ergebnisse sind in Abb. 11.3 dargestellt.

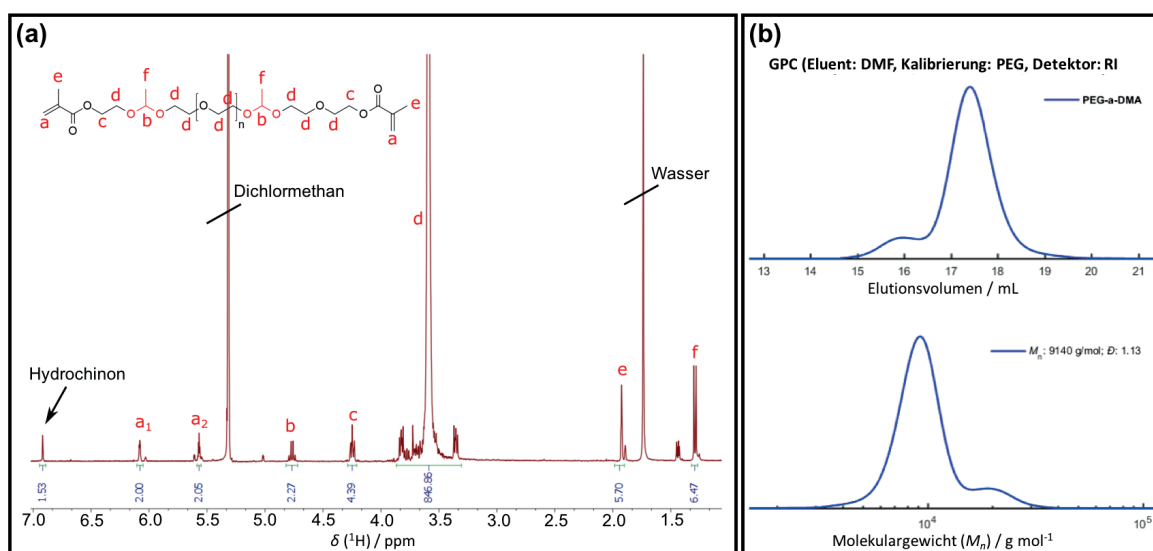


Abb. 11.3: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des PEG-a-DMA Makromonomers, mit $n = 180$. (a) ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₂Cl₂) δ / ppm: = 1,33 (d, 6H, CH-CH₃, J = 5.37 Hz), 1,92 (t, 6H, CH₂=CR-CH₃), 3,30–3,85 (m, 847H, (O-CH₂-CH₂)_n), 4,23–4,25 (m, 4H, CH₂-O-CO), 4,76–4,78 (q, 2H, O₂CH-CH₃), 5,57 (d, 2H, CH₂=CR-CH₃), 6,08 (d, 2H, CH₂=CR-CH₃). Mit R ist der Rest des Moleküls gekennzeichnet. Signale, die nicht zum Produkt gehören: 6,92 ppm (Hydrochinon), 5,32 ppm Dichlormethan (Lösungsmittel), 1,74 ppm (Wasser, wurde durch Messung in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) bestätigt. (b) GPC-Eluogramm mit einem berechneten zahlenmittleren Molekulargewicht (M_n) von 9140 g/mol und einer Polydispersität (\bar{D}) von 1,13.

Das theoretisch berechnete Molekulargewicht des PEG-a-DMA Makromonomers beträgt 8312 g/mol. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurde ein Molekulargewicht von 9350 g/mol bestimmt. Die GPC-Untersuchung ergab ein Molekulargewicht von 9140 g/mol mit einer Polydispersität (\mathcal{D}) von 1,13. Beide Methoden liefern einen Wert des Molekulargewichts, der über dem theoretisch erwarteten Wert von 8312 g/mol liegt. Dies liegt daran, dass bei der Reaktion ein geringer Anteil der PEG-Moleküle umacetalisiert wurden und dadurch das Molekulargewicht verdoppelt wurde (s. Reaktionsschema Abb. 11.4). Die höhermolekulare Schulter im Elugramm der GPC-Untersuchung ist auf das Produkt der Umacetalisierung zurückzuführen. Die Molekulargewichte von 9350 g/mol und 9140 g/mol sind Mittelwerte aus dem erwarteten Produkt (8312 g/mol) und dem umacetalisierten Produkt (16338 g/mol). Als geringfügiges Nebenprodukt liegt das umacetalisierte PEG-a-DMA Makromonomer vor wodurch die Verschiebung des gemessenen Molekulargewichts von 8312 g/mol auf ~ 9200 g/mol resultiert.

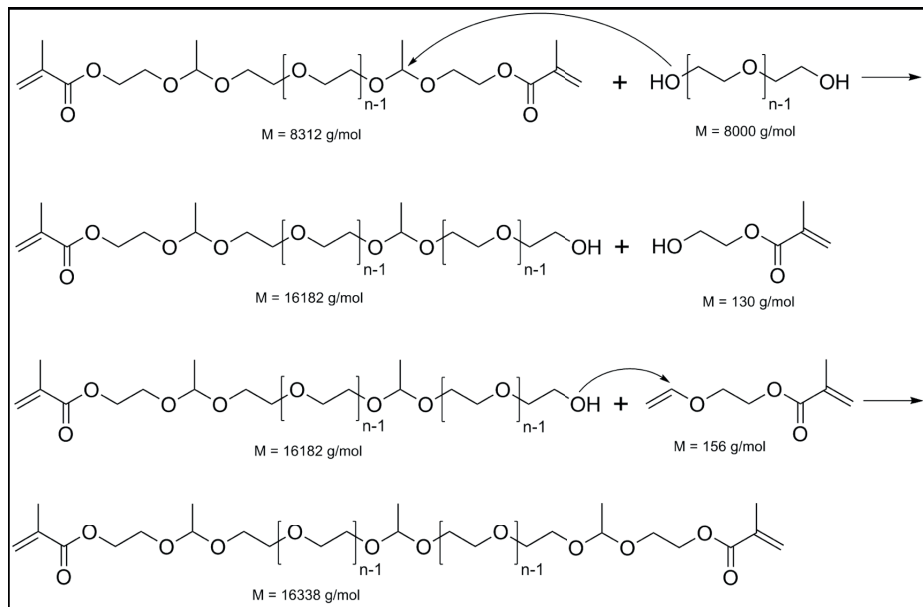


Abb. 11.4: Reaktionsschema der Umacetalisierung und Funktionalisierung des PEG-a-DMA Makromonomers mit einem theoretischen Molekulargewicht (M) von 8312 g/mol zum PEG-a-DMA Makromonomer mit einem Molekulargewicht von 16338 g/mol. Mit $n = 181$.

Die Synthese des PEG-DA Makromonomers erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Pohlit *et al.*^[261]. 1,25 mmol PEG8000 (Sigma Aldrich) wurde in 20 mL Benzol (Sigma Aldrich) gelöst und im Hochvakuum getrocknet. Zuvor wurde das Wasser durch eine azeotrope Destillation des Benzols entfernt. PEG und 500 mg Hydrochinon (Acros) wurden in Toluol (Sigma Aldrich) gelöst. Es wurden 500 mg *Candida antarctica* Lipase B immobilisiert auf Immobead 150 (CALB, Sigma Aldrich) und 12,5 mmol Vinyl-acrylat (Tokyo Chemical Industry) hinzugefügt und für 96 Stunden bei 50 °C zur Reaktion gebracht. Im Anschluss wurde CALB durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte durch zweimalige Ausfällung aus Methanol in eiskaltem Diethylether (Sigma Aldrich). Zusätzlich wurde das Produkt mit etwa 0,1 mol% Hydrochinon versetzt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurde PEG-DA als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 87% erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-Kernmagnetresonanz (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*) -Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie (GPC). Die Ergebnisse sind in Abb. 11.5 dargestellt.

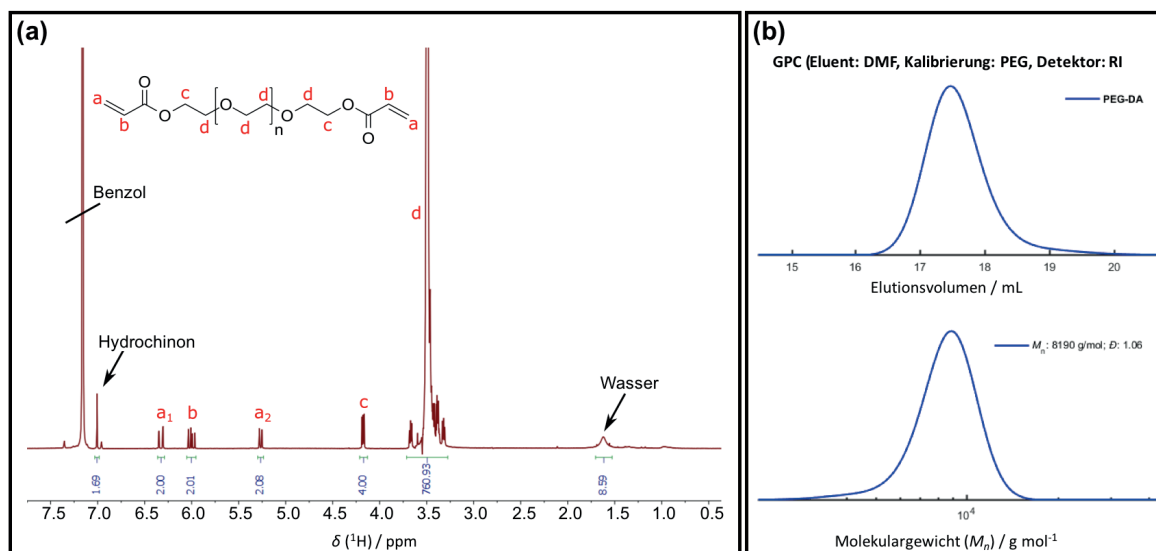


Abb. 11.5: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des PEG-DA Makromonomers, mit $n = 179$. (a) ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, C₆D₆) δ / ppm: = 3.31–3.67 (m, 761H, (O-CH₂-CH₂)_n), 4.16–4.19 (m, 4H, CH₂-O-CO), 5.25–5.28 (d, 2H, CH₂=CH-R), 5.97–6.04 (dd, 2H, CH₂=CH-R), 6.30–6.35 (d, 2H, CH₂=CH-R). Signale, die nicht zum Produkt gehören: 7,01 ppm (Hydrochinon), 7,16 ppm Benzol (Lösungsmittel), 1,62 ppm (Wasser, wurde durch Messung in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) bestätigt). (b) GPC-Elugramm mit einem berechneten zahlenmittleren Molekulargewicht (M_n) von 8190 g/mol und einer Polydispersität (\bar{D}) von 1,06.

Das theoretisch berechnete Molekulargewicht des PEG-DA Makromonomers beträgt 8126 g/mol. Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie wurde ein Molekulargewicht von 8370 g/mol bestimmt. Die GPC-Untersuchung ergab ein Molekulargewicht von 8190 g/mol mit einer Polydispersität (\bar{D}) von 1,06. Die Abweichungen zum theoretisch berechneten Molekulargewicht liegen im Bereich der Messfehler.

11.9 Resultate der PEG-DA Hydrogele

Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse der PEG-DA Hydrogele mit den PEG-a-DMA Hydrogelen (s. Kapitel 10), bezogen auf den Einbau der Vaterit-Partikel, deren Umsetzung in einen Knochen-ähnlichen Hydroxylapatit und der zellbiologischen Untersuchungen, werden die Ergebnisse im Nachfolgenden kommentarlos aufgelistet.

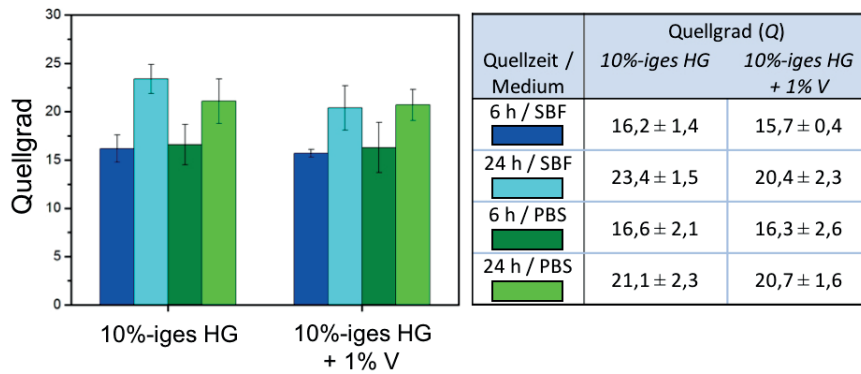


Abb. 11.6: Resultate der Bestimmung des Quellgrades (Q) von 10%-igen PEG-DA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (V) in SBF und PBS nach 6 und 24 Stunden. Graphische Darstellung (links) und tabellarische Darstellung (rechts) der Mittelwerte mit Standardabweichung.

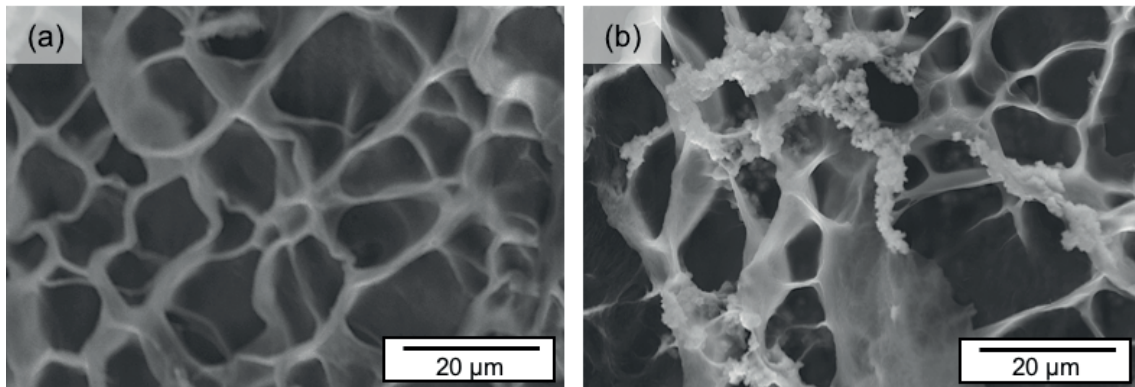


Abb. 11.7: REM-Aufnahmen der PEG-DA Hydrogele unmittelbar nach der Synthese im lyophilisierten Zustand. (a) Hydrogel ohne Vaterit-Partikel, (b) Hydrogel mit Vaterit-Partikel.

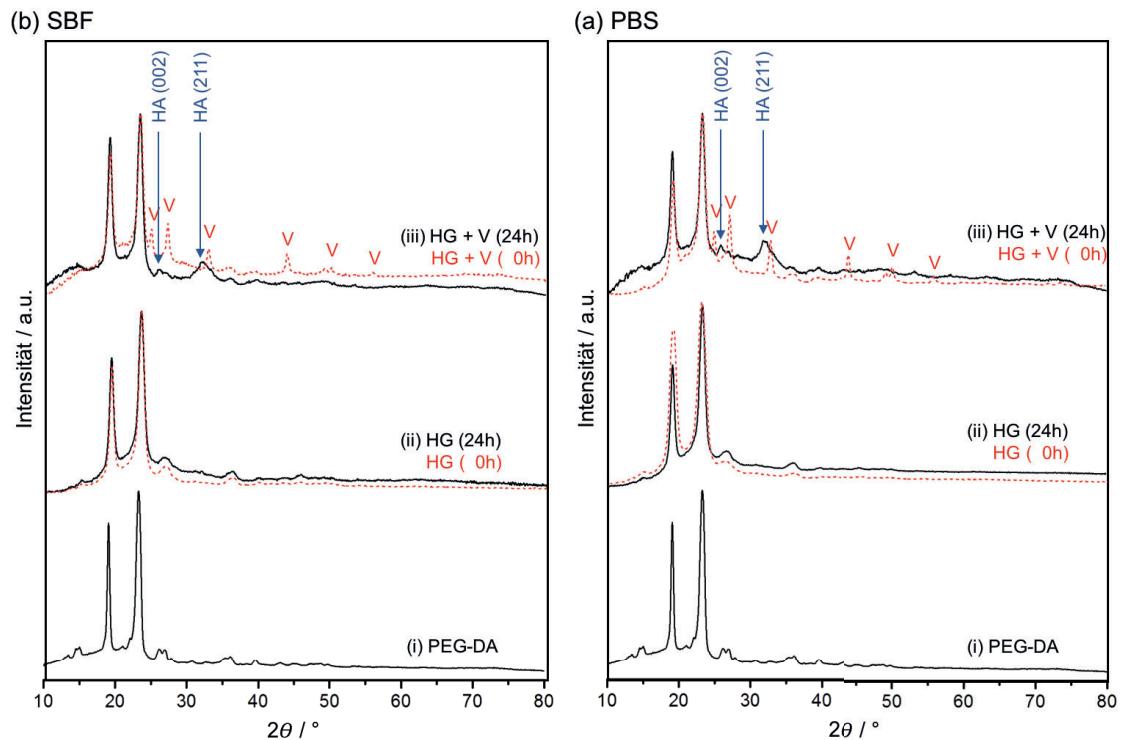


Abb. 11.8: Pulverdiffraktogramme (i) des eingesetzten PEG-DA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS. Mit Kennzeichnung der Reflexe des Vaterits (V)^[33] und der beiden Reflexe des Hydroxylapatits (HA)^[170].

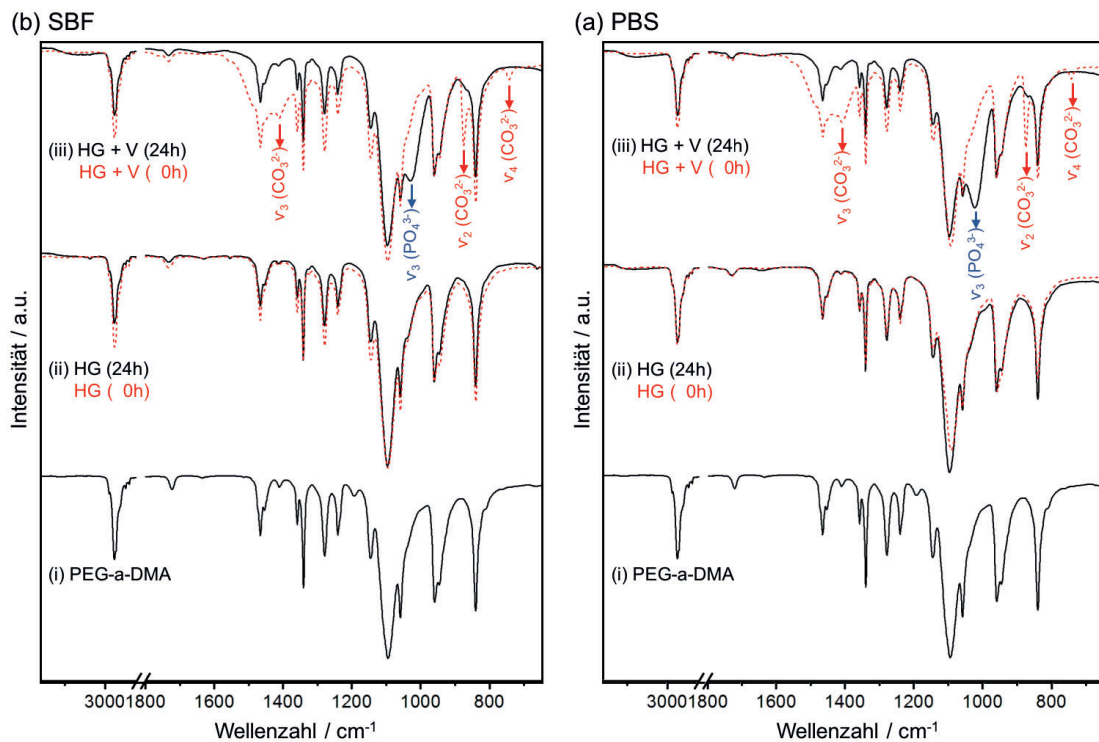


Abb. 11.9: IR-Spektren (i) des eingesetzten PEG-DA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS. Mit Kennzeichnung der Banden der Schwingungsmoden der CO_3^{2-} -Gruppe des Vaterits^[140] und der asymmetrischen P-O Streckschwingung der PO_4^{3-} -Gruppe des Hydroxylapatits (HA)^[123,171].

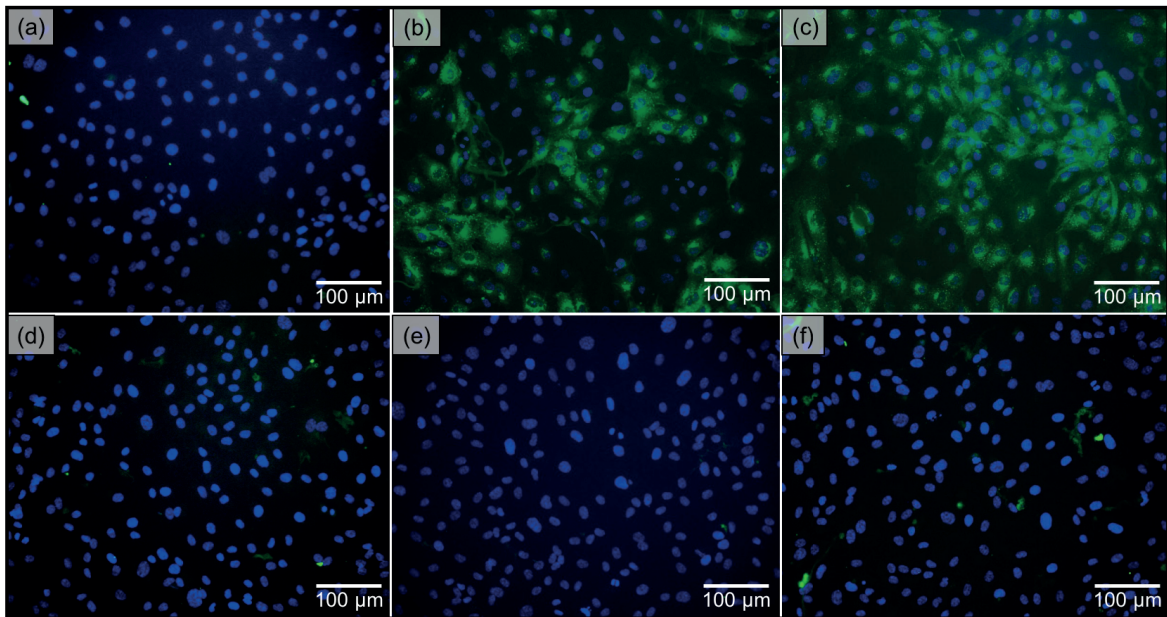


Abb. 11.10: Nachweis von E-Selektin durch Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung, getestet an primären humanen Endothelzellen (HUVEC). (a) Negativ-Kontrolle: unbehandelte HUVEC, (b) Positiv-Kontrolle 1: mit 0,1 µg/mL LPS stimulierten HUVEC, (c) Positiv-Kontrolle 2: mit 1,0 µg/mL LPS stimulierten HUVEC, (d) mit 50 µg/mL PEG-DA Makromonomer, (e) mit 100 µg/mL PEG-DA Makromonomer und (f) mit 500 µg/mL PEG-DA Makromonomer stimulierten HUVEC. Die Zellkerne wurden mit Höchst Dye 33342 angefärbt und E-Selektin mittels Antikörperfärbung grün markiert.

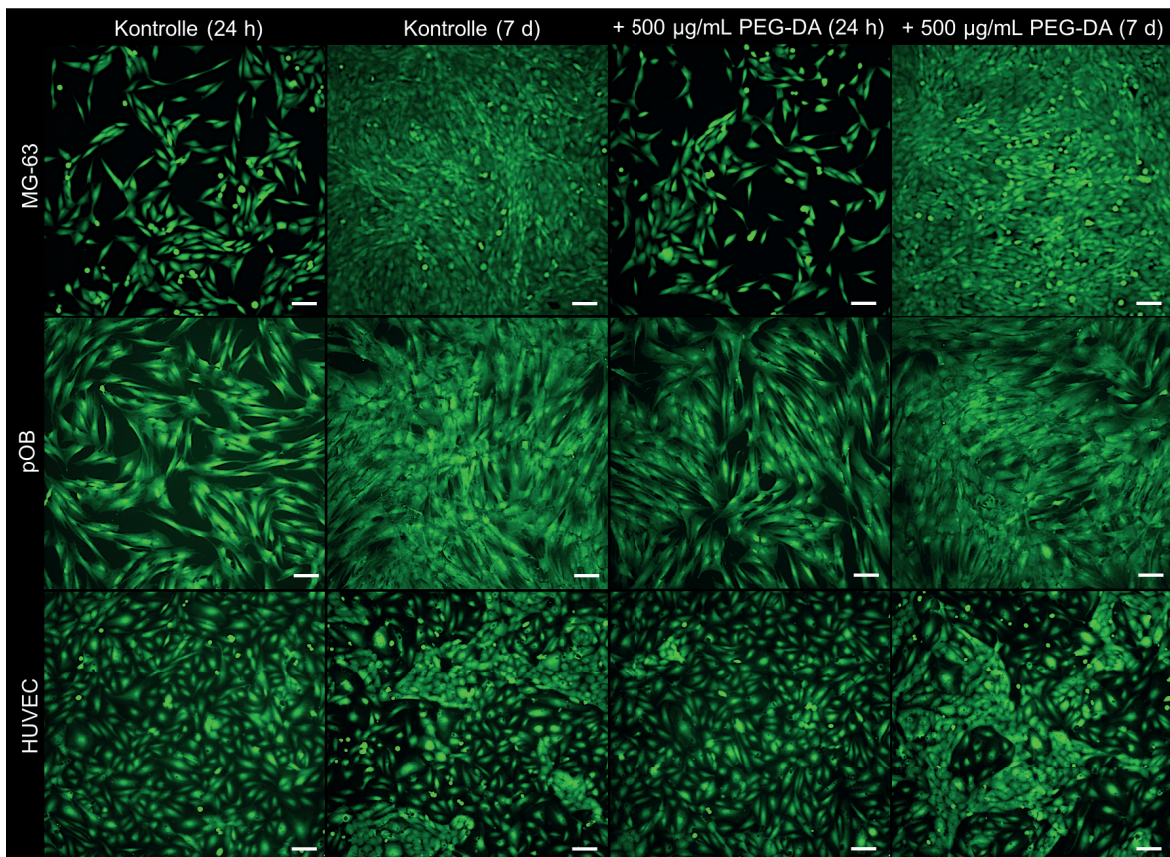


Abb. 11.11: Zell-Biokompatibilität von 500 µg/mL PEG-DA Makromonomer getestet an der Osteoblasten Zelllinie MG-63, den primären humanen Osteoblasten (pOB) und den primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) nach 24 h und 7 Tagen (d). Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 100 µm.

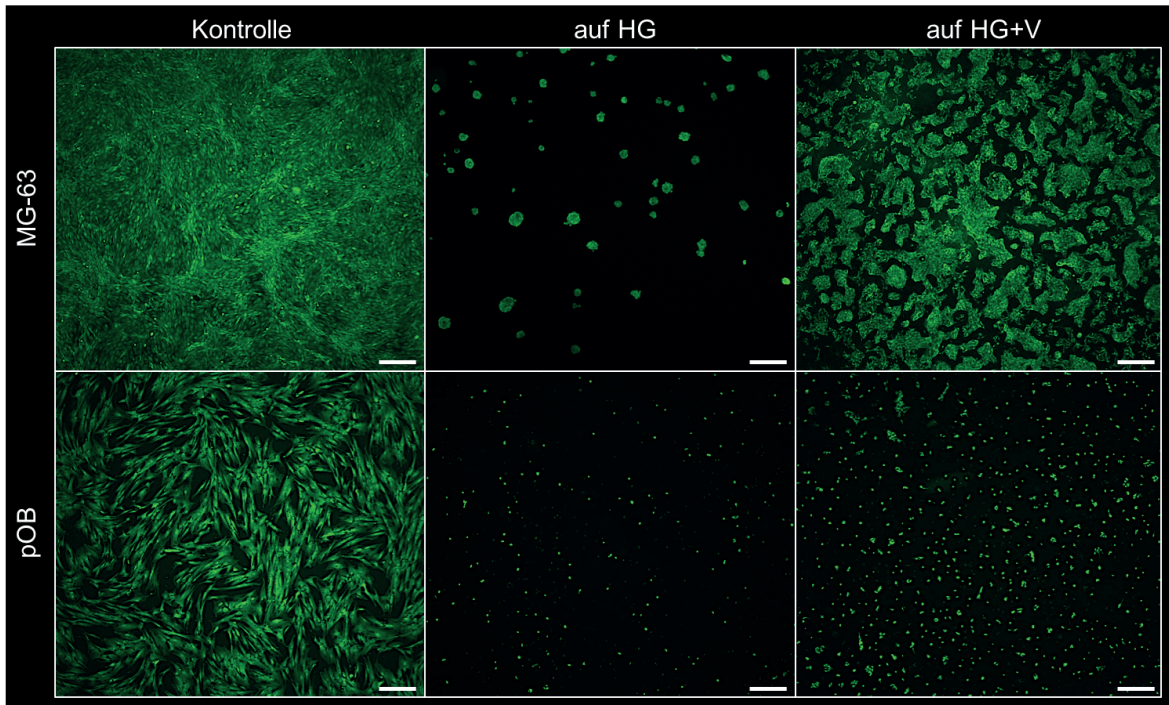


Abb. 11.12: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten Zelllinie MG-63 und von primären humanen Osteoblasten (pOB) auf 10%-igen PEG-DA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 7 Tagen. Vitale Zellen wurden mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM nachgewiesen. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 300 μm .

11.10 Synthesevorschrift und Charakterisierung des modifizierten PME_P-Makromonomers und des verwendeten MEP Monomers

Die Synthese und Charakterisierung des modifizierten Polymethylethylenphosphate- (PME_P) Makromonomers, sowie von dem verwendeten MEP-Monomer wurde von [REDACTED], aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] unter Projektleitung von [REDACTED] am MPIP in Mainz, durchgeführt.

11.10.1 2- Methoxy-1,3,2-dioxaphospholan-2-oxid (MEP) Monomer

0,35 mol 2-Chlor-1,3,2-dioxaphospholan-2-oxid (COP) (Sigma Aldrich) und 300 mL trockenes Tetrahydrofuran (Fluka) wurden in einem ausgeheizten 1000 mL Dreihalskolben vorgelegt. Über einen Tropftrichter wurde eine Lösung aus 0,35 mol trockenem Methanol (Fluka) und 0,35 mol trockenem Triethylamin (Roth; getrocknet mit CaH₂, destilliert und über einem Molsieb (4 Å) gelagert) bei -20 °C unter Argon Atmosphäre zu der rührenden COP Lösung zugetropft. Das während der Reaktion entstandene Chlorwasserstoff fiel als Triethylammoniumchlorid aus. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde das Triethylammoniumchlorid durch Filtration entfernt und das Filtrat im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde durch eine fraktionierte Destillation aufgereinigt und das Produkt bei 89-97 °C und 0,001 mbar als klare, farblose Flüssigkeit in einer 77%-igen Ausbeute gewonnen. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-Kernmagnetresonanz- und ³¹P-Kernmagnetresonanz- Spektroskopie. Die Ergebnisse sind in Abb. 11.13 dargestellt.

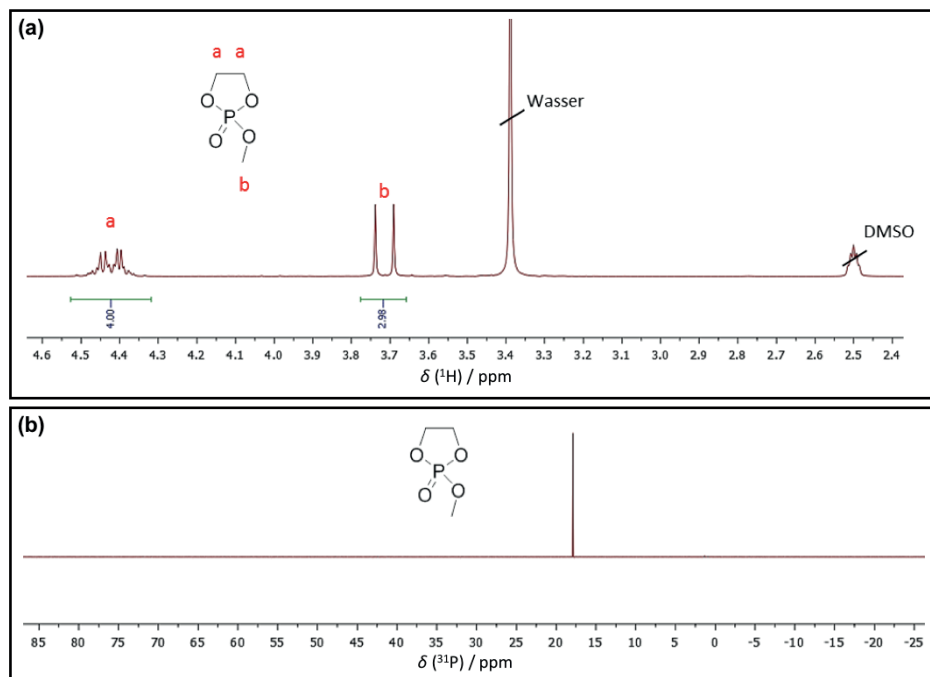


Abb. 11.13: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des Monomers MEP. (a) ¹H NMR-Spektrum (250 MHz, DMSO-d₆) δ / ppm: = 4,52-4,33 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3,71 (d, 3H, O-CH₃, J = 12.5 Hz). Signale, die nicht zum Produkt gehören: 3,92 ppm (Wasser), 2,50 ppm (Dimethylsulfoxid - DMSO) (Lösungsmittel). (b) ³¹P-NMR- Spektrum (121 MHz, DMSO-d₆) δ / ppm: 17,90.

11.10.2 Polymethylethylenphosphate-Dimethacrylat (PMEP-DMA) Makromonomer

Die Polymerisation von MEP erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Clément *et al.*^[280]. N-Cyclohexyl-N'-(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)-Thioharnstoff (TH) synthetisiert nach der Vorschrift von Pratt *et al.*^[300] und PEG 400 (Sigma Aldrich) wurden vor Benutzung mit Benzol (VWR) gefriergetrocknet. 1,37 mmol MEP Monomer, 13,73 mmol TH und 1,37 mmol PEG 400 wurden in ein 100 mL Schlenkkolben unter Rühren mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Die Konzentration des MEP Monomers wurde mit trockenem Dichlormethan (Fluka) auf eine Konzentration von 4 mol/L eingestellt. Die Initiierung der Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 13,73 mmol Diazabicycloundecen (Sigma Aldrich; destilliert und über einem Molsieb (4 Å) gelagert). Die Reaktion wurde nach einer Stunde durch Zugabe von 27,47 mmol Methacrylsäure-2-isocyanatoethylester terminiert. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte durch zweimaliges Ausfällen aus Dichlormethan in eiskaltem Ethylacetat (Fluka) und anschließender Fällung in Diethylether (VWR). Das Produkt wurde mit 0,067 mol% Hydrochinon (Acros) versetzt in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Es wurde PMEPE-DMA als farblose, hochviskose Flüssigkeit in einer Ausbeute von 65% erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-Kernmagnetresonanz-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie (GPC). Die Ergebnisse sind in Abb. 11.14 dargestellt.

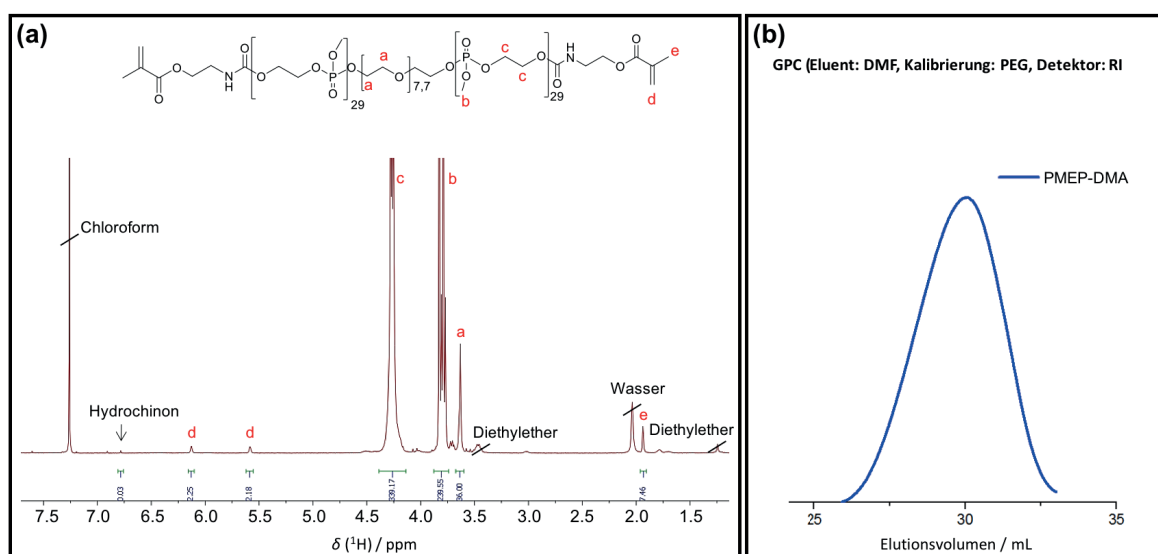


Abb. 11.14: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des Polymers PMEPE-DMA. (a) ¹H NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) δ / ppm: = 6,12 (s, 2H, C=CH₂), 5,59 (s, 2H, C=CH₂), 4,38-4,14 (m, 339H, O-CH₂-CH₂-O) 3,89-3,74 (m, 240H, O-CH₃), 3,67-3,60(m, 36H, (CH₂-CH₂-O)_{8,7}), 1,95-1,91 (s, 6H, C-CH₃). Signale, die nicht zum Produkt gehören: 7,26 ppm (Chloroform, Lösungsmittel) 6,79 ppm (Hydrochinon), 3,53-3,40 ppm (Diethylether), 2,05 ppm (Wasser), 1,25 ppm Diethylether. (b) GPC-Eluogramm mit einem berechneten zahlenmittleren Molekulargewicht (M_n) von 3649,62 g/mol und einer Polydispersität (\bar{D}) von 1,50.

12

Anhang B

12.1 Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
Abb.	Abbildung
ACC	Amorphes Calciumcarbonat
ACP	Amorphes Calciumphosphat
ALP	Alkalischen Phosphatase
AM	Acetoxymethylester
AV	Aspektverhältnis
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (engl. <i>Bone morphogenetic protein</i>)
BSA	Rinder-Serumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CAM-EIA	Zelladhäsionsmolekül - Enzym-Immuno-Assay (engl. <i>cell adhesion molecule – enzyme immunoassay</i>)
CaP	Calciumphosphat
CDHA	Calcium-defizitärer Hydroxylapatit
\mathcal{D}	Polydispersität
DCPA	Dicalciumphosphat-Anhydrat
DCPD	Dicalciumphosphat-Dihydrat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
ECGS	Endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>endothelial growth factor supplement</i>)
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EG	Ethylenglykol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Rinderserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)

FT	Fouriertransformation
Gl.	Gleichung
GPC	Gelpermeationschromatographie
HA	Hydroxylapatit
HCA	Carbonat-haltiger Hydroxylapatit (engl. <i>hydroxycarbonate apatite</i>)
HG	Hydrogel
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
IR	Infrarot
JGU	Johannes Gutenberg-Universität
KEM	Knochenersatzmaterial
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (engl. <i>liquid-chromatography mass-spectrometry</i>)
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Lysierte Zellen
MCPA	Monocalciumphosphat-Anhydrat
MCPM	Monocalciumphosphat-Monohydrat
MEM α	<i>Minimum Essential Medium Alpha</i>
MHC	Monohydrocalcit
MPIP	Max-Planck-Instituts für Polymerforschung
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MW	Mittelwert
NMR	Kernresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NP	Nanopartikel
OCP	Octacalciumphosphat
ODM	Osteogenes Differenzierungs-Medium
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PBSv	10-fach verdünnte Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PEG-DA	Polyethylenglykol-Diacrylat
PEG-a-DMA	Polyethylenglycol-acetal-Dimethacrylat
PES	Phenazinethosulfat
pOB	Primäre Osteoblasten
P/S	Penicillin / Streptomycin

REM	Rasterelektronenmikroskopie
RI	Brechungsindex (engl. <i>Refractive index</i>)
SBF	simulierte Körperflüssigkeit (engl. <i>simulated body fluid</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SR	Quellverhältnis (engl. <i>swelling ratio</i>)
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalciumphosphat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTCP	Tetracalciumphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UZ	Unbehandelte Zellen
V	Vaterit
V-NP	Vaterit Nanopartikel
wt%	Gewichtsprozent (engl. <i>weight percent</i>)

12.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Änderung der freien Keimbildungsenthalpie in Abhängigkeit der Keimradius	4
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Anlagerung eines weiteren Kristallbausteins .	6
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Kristallwachstums	7
Abb. 1.4: Schematische Gegenüberstellung der klassischen und nicht-klassischen Kristallisation.....	8
Abb. 1.5: Kristallisationsverlauf der Calciumcarbonat-Modifikationen	8
Abb. 2.1: (a) Polymorphe und (b) pseudopolymorphe Calciumcarbonat-Phasen	11
Abb. 2.2: Anteile der wasserfreien, polymorphen Calciumcarbonat-Phasen	12
Abb. 2.3: Kristallstrukturen der wasserfreien, polymorphen Calciumcarbonat-Phasen.....	14
Abb. 2.4: Verteilungskurven der Phosphat-Ionen Spezies	15
Abb. 2.5: 3-dimensionales Löslichkeitsphasen-Diagramm mit den Löslichkeitsisothermen von Dicalciumphosphat-Anhydrat (DCPA), Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD), Octacalciumphosphat (OCP), α -Tricalcium-phosphat (α -TCP), β -Tricalciumphosphat (β -TCP), Hydroxylapatit (HA) und Tetracalciumphosphat (TTCP).....	16
Abb. 2.6: Hexagonale Kristallstruktur des (a) chemisch reinen Hydroxylapatits (HA). (b) Darstellung der Substitution eines OH ⁻ -Ions durch ein CO ₃ ²⁻ -Ion des HCAs vom Typ A. (d)-(g) Darstellung der Substitution eines (c) tetraedrischen PO ₄ ³⁻ -Ions durch ein trigonal planares CO ₃ ²⁻ -Ion mit den verschiedenen Konfigurationen innerhalb des Tetraeders des HCAs vom Typ B	18
Abb. 2.7: Amorphes Calciumphosphat (a) TEM-Aufnahme und (b) Strukturmodell.....	18
Abb. 3.1: Schematische Darstellung des hierarchischen Aufbaus des Knochens (oben) von der makroskopischen bis zur atomaren Ebenen. (Unten) Mineralisierte Kollagenfibrille mit Angabe der Kristallstruktur des Hydroxylapatits und der tripelhelikalen Molekülstruktur des Kollagens ..	22
Abb. 3.2: TEM-Aufnahmen (a) einer mineralisierten Kollagenfibrille und (b) von synthetischem Hydroxylapatit	23
Abb. 3.3: Vereinfachte Darstellung des Knochenaufbaus und -abbaus	24
Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Regeneration von neuem Knochengewebe auf der Grundlage eines Knochenersatzmaterials	24
Abb. 3.5: Ausgewählte Beispiele von Knochenersatzmaterialien	26
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Netzwerknüpfung (a) eines chemisch-vernetzten Gels mit kovalenten Vernetzungspunkten und (b) eines physikalisch-vernetzten Gels aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen und Coulombschen Kräften	27
Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Vorgangs des Quellens eines Hydrogels.....	28
Abb. 4.3: Schematische Darstellung der tropfenbasierten Mikrofluidik-Technik.....	29
Abb. 4.4: Schematische Darstellung der beiden Möglichkeiten zur Einschließung von Additiven mittels tropfenbasierter Mikrofluidik-Technik	30
Abb. 5.1: Strukturformeln des Tetrazoliumsals (MTS) und der reduzierten Form, Formazan	32
Abb. 5.2. Strukturformeln des Tetrazoliumsals (INT) und der reduzierten Form, Formazan.....	32
Abb. 5.3: Strukturformel von Kristallviolett.....	33
Abb. 5.4: Darstellung der drei Differenzierungs-Phasen von kultivierten Osteoblasten anhand der Genexpression von Osteoblasten-charakteristischen Proteinen nach dem Owen-Modell.....	35
Abb. 7.1: Chemische Charakterisierung der synthetisierten CaCO ₃ Partikel	51
Abb. 7.2: Morphologische Charakterisierung der synthetisierten Vaterit-Partikel	52
Abb. 7.3: Pulver-Diffraktogramme der Vaterit-Partikel (a) direkt nach der Synthese, (b) nach 6 Monaten, (c) nach 12 Monaten, (d) nach 24 Monaten trockener Lagerung bei Umgebungsbedingungen	53
Abb. 7.4: Überprüfung der synthetisierten Vaterit-Partikel auf Sterilität.....	54

Abb. 7.5: Nachweis von E-Selektin durch Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung, getestet an primären Endothelzellen (HUVEC).....	55
Abb. 7.6: Ergebnisse des Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assays (CAM-EIA) durch optische Dichte-(OD) Messungen.....	56
Abb. 7.7: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL Vaterit-Partikel	56
Abb. 7.8: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an Vaterit-Partikel getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen.....	58
Abb. 7.9: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an Vaterit-Partikel getestet an primären humanen Osteoblasten (pOB) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen.....	59
Abb. 7.10: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an Vaterit-Partikel getestet an primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen	60
Abb. 7.11: Nachweis der Differenzierung von der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 durch Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) in Anwesenheit der Vaterit-Partikel.....	61
Abb. 7.12: Negativ-Kontrolle der ALP-Färbung nach 21 Tagen	62
Abb. 7.13: Schematische Darstellung des möglichen Kristallisationsmechanismus der Vaterit-Partikel.....	64
Abb. 7.14: Schematische Darstellung der optimierten Synthese von Vaterit-Partikel und deren biologische Anwendung in der Knochenregeneration	68
Abb. 8.1: Charakterisierung der Vaterit-Nanopartikel (V-NP) (i, schwarz) vor und nach der Inkubation in SBF für (ii, rot) 24h, (iii, grün) 48h und (iv, blau) 72h	75
Abb. 8.2: Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse anhand der XRD-Daten der Vaterit-Nanopartikel vor und nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation in SBF	75
Abb. 8.3: REM-Aufnahmen der Vaterit-Nanopartikel (a) vor und nach der Inkubation in SBF für (b) 24 h, (c) 48 h und (d) 72 h.....	76
Abb. 8.4: (a, b) Hochaufgelöste REM-Aufnahmen und (c, d) TEM-Aufnahmen der plättchenförmigen Aggregate.....	77
Abb. 8.5: Pulverdiffraktogramme der Langzeit-Inkubation der Vaterit-Nanopartikel (1 mg/mL) in SBF mit den entsprechenden REM-Aufnahmen	78
Abb. 8.6: REM-Aufnahmen der Vaterit-Partikel nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation in SBF (blau) und PBS (grün)	82
Abb. 8.7: REM-Aufnahmen der Vaterit-Partikel nach 1, 3 und 6 Monaten (M) Inkubation in SBF (blau) und PBS (grün)	83
Abb. 8.8: Ergebnisse der REM-EDX-Messung der für 24 h, 72 h und 6 Monaten (M) inkubierten Vaterit-Partikel in (a) SBF und (b) PBS.....	84
Abb. 8.9: Pulverdiffraktogramme der Inkubationen von (i) Vaterit-Partikel in (a) SBF und (b) PBS über einen kurzen Zeitraum von (ii) 24 h, (iii) 48 h und (iv) 72 h und einen langen Zeitraum von (v) 1 M, (vi) 3 M und (vii) 6 M	85
Abb. 8.10: Pulverdiffraktogramme (a) eines kommerziell erworbenen HA (Sigma Aldrich, ≥ 97%) und (b) eines humanen Knochenminerals	86
Abb. 8.11: Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse der XRD-Daten der Inkubationen von Vaterit-Partikel nach 1–168 Tagen in (a) SBF und (b) in PBS	87
Abb. 8.12: IR-Spektren der Inkubationen der Vaterit-Partikel in (a1) SBF und (b1) PBS	88
Abb. 8.13: IR-Spektrum eines humanen Knochenminerals.....	89
Abb. 8.14: Grafische Auftragung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses gegen die Inkubationszeit.....	92
Abb. 8.15: ^{31}P -NMR-Spektren der Inkubationen der Vaterit-Partikel in (a1) SBF und (b1) PBS.....	93
Abb. 8.16: Ergebnisse der quantitativen ^{31}P -NMR-Spektroskopie	94

Abb. 8.17: ³¹ P-NMR-Spektren der Signalanpassungen durch die Entfaltung in einen kristallinen und einen amorphen Anteil der Inkubationen in (a) SBF und (b) PBS.....	95
Abb. 8.18: Vergleich der relativen Anteile an kristalliner (HA) und amorpher Phosphat-Phase (aHA) während der Inkubationen in (a) SBF und (b) PBS.....	97
Abb. 8.19: TEM-Aufnahmen der aus Vaterit-Partikeln entstandenen plättchenförmigen HCA-Partikel nach 3 Monaten Inkubation in PBS.....	98
Abb. 8.20: REM-Aufnahmen der Lamellen-Präparation mittels FIB-REM der Probe nach 3 Monaten Inkubation in SBF.....	98
Abb. 8.21: TEM-Hellfeldaufnahmen der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikel in SBF.....	99
Abb. 8.22: Resultate der Elektronenbeugung an ausgewählten Bereichen (SAED: <i>selected area electron diffraction</i>) der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikel in SBF.....	100
Abb. 8.23: Ergebnisse der Elementanalyse mittels STEM-EDX im inneren (Ausschnitt 1) und äußeren (Ausschnitt 2) Bereich der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikeln in SBF.....	101
Abb. 8.24: Ergebnisse der räumlichen Verteilung der Elementhäufigkeit von Phosphor (P), Calcium (Ca) und Kohlenstoff (C) mittels STEM-EELS der präparierten Lamelle der gebildeten sphärischen Strukturen nach 3 Monaten Inkubation der Vaterit-Partikeln in SBF.....	101
Abb. 8.25: Pulverdiffraktogramme der Inkubationen von (a) 0,2 mg/mL Vaterit-Partikel in verdünntem PBS (PBSv) und (b) 1,0 mg/mL Vaterit-Partikel in PBS.....	103
Abb. 8.26: Ergebnisse der FT-IR-Spektroskopie. IR-Spektren der Inkubationen von (a) 0,2 mg/mL Vaterit-Partikeln in verdünntem PBS (PBSv) und von (c) 1,0 mg/mL Vaterit-Partikeln in PBS.....	104
Abb. 8.27: REM Aufnahmen der Vaterit-Partikel nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation in (a) verdünntem PBS (PBSv) mit 0,2 mg/mL Vaterit-Partikeln und (b) in PBS mit 1,0 mg/mL Vaterit-Partikeln.....	105
Abb. 8.28: Postulierter Mechanismus zur Umsetzung der Vaterit-Partikel in eine Hydroxylapatit (HA)-Spezies über eine Calcium-defizitäre HA (CDHA)-Spezies durch Inkubation in (a) SBF und (b) PBS.....	111
Abb. 8.29: Charakterisierung der Vaterit-Partikel (V, i) vor und nach der Inkubation in MEMα.....	115
Abb. 8.30: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der in MEMα inkubierten Vaterit-Partikel.....	115
Abb. 8.31: (a) Resultate der absoluten Proteinmassenbestimmung mittels Pierce Assay. (b) Resultate der SDS-PAGE.....	116
Abb. 8.32: Resultate der Zeta-Potential-Messung als grafische Darstellung (links) und tabellarische Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung (rechts) von 1 mg/mL Vaterit-Partikel.....	117
Abb. 9.1: (a), (b) Ergebnisse der Kontrolle des Reaktionsverlaufs in PBS bei 24 °C.....	126
Abb. 9.2: REM-Aufnahmen der Produkte aus der Reaktion von Vaterit-Partikel in PBS bei 24 °C.....	127
Abb. 9.3: (a), (b) Ergebnisse der Kontrolle des Reaktionsverlaufs in PBS bei 50 °C.....	128
Abb. 9.4: Charakterisierung der Endprodukte der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit-Partikel in PBS bei 24 °C (oben) und bei 50 °C (unten).....	129
Abb. 9.5: Morphologische Eigenschaften der Endprodukte der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit in PBS bei 24 °C (oben) und bei 50 °C (unten).....	131
Abb. 9.6: (a), (b) Ergebnisse der Kontrolle des Reaktionsverlaufs von 10 mM Vaterit Partikel in PBS mit 42 mM NaHCO ₃	132
Abb. 9.7: Charakterisierung des Endprodukts der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit in PBS mit 42 mM NaHCO ₃	133
Abb. 9.8: Morphologische Beschaffenheit des Endprodukts der Synthese von HA aus 10 mM Vaterit in PBS mit 42 mM NaHCO ₃	133

Abb. 9.9: Charakterisierung der Endprodukte nach 3 Stunden Reaktion von (i, schwarz) 10 mM Vaterit-Partikeln in PBS bei 50 °C unter Zugabe von (ii, blau) 1,5 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, (iii, grün) 7,5 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O und (iv, magenta) 15,0 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O	134
Abb. 9.10: REM-Aufnahmen der Endprodukte nach 3 Stunden Reaktion von 10 mM Vaterit-Partikeln in PBS bei 50 °C unter Zugabe von (ii) 1,5 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, (iii) 7,5 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O und (iv) 15,0 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O.....	135
Abb. 9.11: Ergebnisse der Reaktion von 10 mM Vaterit Partikel in PBS mit 10% FBS bei 24 °C und einer Reaktionszeit von 6 Tagen.....	136
Abb. 9.12: Resultate der Zeta-Potential-Messung als grafische Darstellung (links) und tabellarische Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung (rechts) von 500 µg/mL HA-Partikel	137
Abb. 9.13: Resultate der mittels LC-MS identifizierten und quantifizierten Serumproteine in FBS und der an die HA-Partikel adsorbierten Serumproteine aus der Synthese in PBS mit 10% FBS	138
Abb. 9.14: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL HA-Partikel	139
Abb. 9.15: Zell-Biokompatibilität der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel. Getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen.....	141
Abb. 9.16: Zell-Biokompatibilität der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel. Getestet an primären humanen Osteoblasten (pOB) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen	142
Abb. 9.17: Zell-Biokompatibilität der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel. Getestet an primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen.....	143
Abb. 9.18: Vergrößerte Aufnahme der primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) nach 24 h Inkubationszeit.....	143
Abb. 9.19: Zell-Biokompatibilität der HA-Partikel (a) aus der Synthese in PBS mit 42 mM NaHCO ₃ und (b) aus der Synthese in PBS mit 10% FBS. Getestet an primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h bis 7 Tagen	144
Abb. 9.20: Nachweis der Differenzierung der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 durch Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) in Anwesenheit der nach Standardvorschrift synthetisierten HA-Partikel	146
Abb. 9.21: Negativ-Kontrolle der ALP-Färbung nach 21 Tagen	146
Abb. 9.22: Schematische Darstellung des Reaktionsverlaufs anhand der freien in Lösung befindlichen Ca ²⁺ - Ionen über die Reaktionszeit mit Angabe der auf die Reaktion einflussnehmenden Faktoren	155
Abb. 10.1: Mechanismus der radikalischen Polymerisation am Beispiel des PEG-a-DMA Makromonomers	162
Abb. 10.2: Digitale Aufnahmen der synthetisierten 10%-ige PEG-a-DMA Hydrogele im gequollenen Zustand	165
Abb. 10.3: Resultate der Bestimmung des Quellgrades (<i>Q</i>) von 10%-igen und 8%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen.....	166
Abb. 10.4: REM-Aufnahmen der PEG-a-DMA Hydrogele unmittelbar nach der Synthese im lyophilisierten Zustand.....	166
Abb. 10.5: REM-Aufnahmen der PEG-a-DMA Hydrogele ohne Vaterit-Partikel nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS im gefriergetrockneten Zustand	167
Abb. 10.6: REM-Aufnahmen der Vaterit-inkorporierten PEG-a-DMA Hydrogele nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS im gefriergetrockneten Zustand	168
Abb. 10.7: Ergebnisse der REM-EDX-Messung der nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS entstandenen plättchenförmigen Strukturen auf der Oberfläche der PEG-a-DMA Hydrogele	168
Abb. 10.8: Diffraktogramme (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS	169

Abb. 10.9: IR-Spektren (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS.....	170
Abb. 10.10: Raman-Spektren (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers und der Hydrogele nach 24 h Inkubation in (a) SBF und (b) PBS (ii) ohne und (iii) mit Vaterit-Partikeln.....	170
Abb. 10.11: Nachweis von E-Selektin durch Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung, getestet an primären humanen Endothelzellen (HUVEC).....	171
Abb. 10.12: Ergebnisse des Zelladhäsionsmolekül-Enzym-Immuno-Assays (CAM-EIA) durch optische Dichte- (OD) Messungen der stimulierten HUVEC mit 500 µg/mL PEG-a-DMA Makromonomer und PEG-a-DMA Hydrogelen ohne Vaterit (HG) und mit Vaterit (HG+V).....	172
Abb. 10.13: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an PEG-a-DMA Makromonomer getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen	173
Abb. 10.14: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an PEG-a-DMA Makromonomer getestet an der primären humanen Osteoblasten (pOB) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen	174
Abb. 10.15: Zell-Biokompatibilität verschiedener Konzentrationen an PEG-a-DMA Makromonomer getestet an primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem Zeitraum von 24 h über 72 h bis hin zu 7 Tagen.....	175
Abb. 10.16: Digitale Aufnahmen der synthetisierten 10%-ige PEG-a-DMA Hydrogele nach Quellung im Zellkulturmedium (a) ohne Vaterit-Partikel und (b) mit 1% Vaterit-Partikel	176
Abb. 10.17: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 auf 10%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen.....	176
Abb. 10.18: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 auf 8%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen.....	177
Abb. 10.19: Zelladhärenz und Viabilität von primären humanen Osteoblasten (pOB) auf 10%-igen PEG-a-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen	178
Abb. 10.20: Morphologie und Viabilität von primären humanen Osteoblasten (pOB) unter dem PEG-a-DMA Hydrogel mit 1% Vaterit-Partikel (HG+V) am Boden der Zellkulturplatte nach 24 h, 72 h und 7 Tagen	179
Abb. 10.21: IR-Spektren (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, (a) der synthetisierten Vaterit-freien Hydrogele (HG) und (b) der synthetisierten Vaterit-haltigen Hydrogele (HG+V) nach Inkubation in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM).....	180
Abb. 10.22: Graphische Darstellung des PO_4^{3-} zu CO_3^{2-} Ionenverhältnisses anhand der Extinktionen der asymmetrischen P-O und C-O Streckschwingungen der IR-Spektren der Vaterit-beladenen Hydrogele nach 7, 14 und 21 Tagen Inkubation in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM) (weiß schraffiert) ohne primäre humane Osteoblasten (pOB) und (blau) mit pOB	181
Abb. 10.23: Diffraktogramme (i) des eingesetzten PEG-a-DMA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii) ohne und (iii) mit Vaterit-Partikeln nach 14 tägiger Inkubation in osteogenem Differenzierungs-Medium (ODM) (schwarz) ohne primäre humane Osteoblasten (pOB) und (rote) mit pOB.....	182
Abb. 10.24: Nachweis der Differenzierung von primären humanen Osteoblasten (pOB) durch Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) nach 14 Tagen Kultivierung.....	183
Abb. 10.25: Zelladhärenz und Viabilität von primären humanen Osteoblasten (pOB) nach 14 Tagen Kultivierung in ODM. (a) Kontrolle: unbehandelte pOB, (b) PEG-a-DMA Hydrogel mit pOB, (c) Vaterit-haltiges PEG-a-DMA Hydrogel mit pOB	183
Abb. 10.26: Strukturformel des PMP-DMA Makromonomers.....	191
Abb. 10.27: Digitale Aufnahme der synthetisierten PMP-DMA Hydrogele unmittelbar nach der Synthese	191
Abb. 10.28: IR-Spektren (i) des eingesetzten PMP-DMA Makromonomers, (ii) des synthetisierten Vaterit-freien Hydrogels und (iii) des synthetisierten Vaterit-haltigen Hydrogels.....	192

Abb. 10.29: Digitale Aufnahme (a) des Vaterit-enthaltenen PMP-DMA Hydrogel im gefriergetrockneten Zustand und (b) nach ~ 16 Tagen Inkubation der PMP-DMA Hydrogele ohne (links) und mit Vaterit-Partikeln (rechts) in PBS	192
Abb. 10.30: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 auf 15%-igen PMP-DMA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 24 h, 72 h und 7 Tagen.....	193
Abb. 10.31: Schematische Darstellung des potentiellen Einsatzes der Vaterit-Partikel- und Zell-beladenen Mikrogel-Kapseln in der Knochenregeneration.....	195
Abb. 10.32: Reaktionsgleichung der spannungsgesteuerten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) des (a) Azid-funktionalisierten Polyethylenglykols und des (b) Cyclooctin-funktionalisierten Polyethylenglykols zur Verkapselung der Vaterit-Partikel und der Osteoblasten-Zelllinie MG-63	195
Abb. 10.33: Tropfenbasierte Mikrofluidik zur Synthese von Vaterit-Partikel- und Zell-beladenen Mikrogelen	196
Abb. 10.34: Mikroskopische Aufnahmen der Verkapselung von Vaterit-Partikeln.....	197
Abb. 10.35: Zell-Biokompatibilität der Makromonomere, Stern-PEG-Azid und PEG-DIC, getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von 24 h und 72 h.....	198
Abb. 10.36: Zell-Biokompatibilität der Vaterit-beladenen Mikrogel-Kapseln getestet an der Osteoblasten-Zelllinie MG-63 in einem Zeitraum von (a) 24 h und (b) 4 Tage.....	199
Abb. 10.37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der eingesetzten GFP-markierten MG-63 nach 48 h und 6 Tagen Kultivierung. (Kontrolle) ausgesäte Zellen unmittelbar nach dem Ablösen, (Test 1) ausgesäte Zellen nachdem sie das Mikrokanal-System mit 50 μ L/h passiert hatten und (Test 2) ausgesäte Zellen nach 5 Stunden bei Raumtemperatur und Umgebungsbedingungen.....	200
Abb. 10.38: Mikroskopische Aufnahmen der Vaterit-Partikel- und GFP-markierten MG-63-beladenen Mikrogel-Kapseln nach (a) 24 h und (b) 4 Tagen Kultivierung im Zellkulturmedium.....	201
Abb. 11.1: Essentielle Isolationsschritte der HUVEC	212
Abb. 11.2: Lineare Kalibrierkurven der Standardlösungen mit einer definierten Ca^{2+} -Konzentration von 0,25 mM bis 1,25 mM in (a) PBS bei 50 °C, (b) PBS bei 24 °C, (c) PBS mit 42 mM NaHCO_3 und pH 7,4 bei 50 °C und (d) PBS mit FBS bei 24 °C	218
Abb. 11.3: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des PEG-a-DMA Makromonomers	219
Abb. 11.4: Reaktionsschema der Umacetalisierung und Funktionalisierung des PEG-a-DMA Makromonomers	220
Abb. 11.5: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des PEG-DA Makromonomers.....	221
Abb. 11.6: Resultate der Bestimmung des Quellgrades (Q) von 10%-igen PEG-DA Hydrogelen.....	222
Abb. 11.7: REM-Aufnahmen der PEG-DA Hydrogele	222
Abb. 11.8: Pulverdiffraktogramme (i) des eingesetzten PEG-DA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS	223
Abb. 11.9: IR-Spektren (i) des eingesetzten PEG-DA Makromonomers, der synthetisierten Hydrogele (ii, rot) ohne und (iii, rot) mit Vaterit-Partikeln unmittelbar nach der Synthese (0 h) und nach 24 h Inkubation der Hydrogele ohne (ii, schwarz) und mit Vaterit-Partikeln (iii, schwarz) in (a) SBF und (b) PBS.....	223
Abb. 11.10: Nachweis von E-Selektin durch Antikörper-basierte Immunfluoreszenz-Färbung, getestet an primären humanen Endothelzellen (HUVEC).....	224
Abb. 11.11: Zell-Biokompatibilität von 500 μ g/mL PEG-DA Makromonomer getestet an der Osteoblasten Zelllinie MG-63, den primären humanen Osteoblasten (pOB) und den primären humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) nach 24 h und 7 Tagen.....	224
Abb. 11.12: Zelladhärenz und Viabilität der Osteoblasten Zelllinie MG-63 und von primären humanen Osteoblasten (pOB) auf 10%-igen PEG-DA Hydrogelen ohne (HG) und mit 1% Vaterit-Partikeln (HG+V) nach 7 Tagen	225

Abb. 11.13: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des Monomers MEP	226
Abb. 11.14: Ergebnisse der chemischen Charakterisierung des Polymers PMEP-DMA.....	227

12.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Übersicht der Calciumcarbonat-Modifikationen mit ihren Eigenschaften	13
Tab. 2.2: Übersicht der Calciumphosphat-Phasen mit ihren Eigenschaften	19
Tab. 3.1: Zusammensetzung des humanen Knochenminerals	23
Tab. 3.2: Vergleich der Eigenschaften gängiger Knochenersatzmaterialien	25
Tab. 7.1: IR-Normalschwingungsmoden des Carbonat-Ions in den Calciumcarbonat-Modifikationen	52
Tab. 7.2: Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (MTS, LDH und Kristallviolett) nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL Vaterit-Partikel	57
Tab. 8.1: Gewicht und Konzentration der Reagenzien für die Herstellung von 1 L SBF	71
Tab. 8.2: Ionenkonzentrationen in SBF verglichen mit den Ionenkonzentrationen im humanen Blutplasma (hBP)	74
Tab. 8.3: Ergebnisse der Größenbestimmung der während der Inkubation von Vaterit-Nanopartikel entstehenden HA Kristallite durch Vollprofilanalyse der XRD-Daten	77
Tab. 8.4: Vergleich der Ionenkonzentrationen in mmol/L in SBF und PBS	81
Tab. 8.5: Auflistung der gemessenen IR-Banden des kommerziell erworbenen Hydroxylapatit (HA), des humanen Knochens und der erhaltenen Feststoffe aus den Inkubationen in SBF und PBS	90
Tab. 8.6: Übersicht der Ergebnisse der Signalanpassungen durch die Entfaltung in einen kristallinen und einen amorphen Anteil der Inkubationen in (a) SBF und (b) PBS	96
Tab. 8.7: Resultate der Berechnung für eine grobe Abschätzung wieviel Protein-Moleküle theoretisch auf der Oberfläche eines Vaterit-Nanopartikels und eines aggregierten Vaterit-Partikels binden können	119
Tab. 9.1: Angaben zu den verwendeten Elektroden	124
Tab. 9.2: Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (MTS und LDH) nach 24 h, 48 h und 72 h Stimulation der MG-63 Zellen mit 50 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL HA-Partikel, synthetisiert nach Standardvorschrift	140
Tab. 11.1: Angabe der verwendeten Strukturmodelle für die quantitative Phasenanalyse der XRD-Daten von Vaterit, Calcit und Hydroxylapatit	208
Tab. 11.2: Detaillierte Angaben zu den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse der synthetisierten Vaterit Nanopartikel	210
Tab. 11.3: Detaillierte Angaben zu den Ergebnissen der quantitativen Phasenanalyse der SBF-Inkubation von Vaterit Nanopartikel	211
Tab. 11.4: Berechnungen des absoluten Anteils an P-Atomen und den relativen Anteilen der PO_4^{3-} und CO_3^{2-} -Ionen in Hydroxylapatit (HA , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) in den erhaltenen Feststoffen aus den Inkubationen in SBF und PBS	214
Tab. 11.5: Liste der mittels LC-MS identifizierten und quantifizierten Serumproteine in FBS und der adsorbierten Serumproteine der HA-Partikel aus der Synthese in PBS mit 10% FBS (FBS-HA)	216

12.4 Literaturverzeichnis

- [1] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner, **2003**.
- [2] A. Mersmann, M. Kind, J. Stichlmair, *Thermische Verfahrenstechnik- Grundlagen Und Methoden, Kapitel 7 Kristallisation*, Springer-Verlag, **2005**.
- [3] K. Sangwal, *Additives and Crystallization Processes: From Fundamentals to Applications*, Wiley, **2007**.
- [4] A. S. Posner, F. Betts, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 273–281.
- [5] F. Betts, N. C. Blumenthaland, A. S. Posner, *J. Cryst. Growth* **1981**, *53*, 63–73.
- [6] E. M. Pouget, P. H. H. Bomans, J. A. C. M. Goos, P. M. Frederik, G. de With, N. A. . J. M. Sommerdijk, *Science* **2009**, *323*, 1455–1458.
- [7] G. Wulff, *Z. Krist.* **1901**, *34*, 449–480.
- [8] M. Brandstätter, *Micochimica Acta* **1956**, *44*, 154–158.
- [9] W. K. Burton, N. Cabrera, F. C. Frank, *Phil. Trans. R. Soc. A* **1951**, *243*, 299–358.
- [10] D. P. Woodruff, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2015**, *373*: 20140.
- [11] H. Cölfen, S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2350–2365.
- [12] M. Niederberger, H. Cölfen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3271–3287.
- [13] W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1897**, *22*, 289–330.
- [14] S. Mann, *Chemie unserer Zeit* **1986**, *20*, 69–76.
- [15] W. Kaim, S. Brigitte, *Bioanorganische Chemie*, Vieweg + Teubner Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [16] S. Mann, *J. Mater. Chem.* **1995**, *5*, 935–946.
- [17] S. V. Dorozhkin, *Biomatter* **2011**, *1*, 121–164.
- [18] A. F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch Der Anorganischen Chemie*, Walter De Gryter GmbH & Co. KG, **2007**.
- [19] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, Walter De Gryter GmbH & Co. KG, **2007**.
- [20] J. H. E. Cartwright, A. G. Checa, J. D. Gale, D. Gebauer, C. I. Sainz-Díaz, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12126–12137.
- [21] S. Raz, O. Testeniere, A. Hecker, S. Weiner, G. Luquet, *Biol. Bull.* **2002**, *203*, 269–274.
- [22] G. Santomauro, J. Baier, W. Huang, S. Pezold, J. Bill, *J. Biomater. an Nanotechnol.* **2012**, *3*, 413–420.
- [23] T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1987**, *51*, 2757–2767.
- [24] C. Y. Tai, F.-B. Chen, *AIChE J.* **1998**, *44*, 1790–1798.
- [25] <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Calcit>, (07.09.2017).
- [26] <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Aragonit>, (07.09.2017).
- [27] <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Ikait>, (07.09.2017).
- [28] <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Monohydrocalcit>, (07.09.2017).
- [29] N. Koga, Y. Yamane, T. Kimura, *Thermochim. Acta* **2011**, *512*, 13–21.

- [30] H. Chessin, W. C. Hamilton, B. Post, *Acta Crystallogr.* **1965**, *18*, 689–693.
- [31] N. H. de Leeuw, S. C. Parker, *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 2914–2922.
- [32] <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/Mineralienportrait/Aragonit>, (08.09.2017).
- [33] E. Mugnaioli, I. Andrusenko, T. Schüler, N. Loges, R. E. Dinnebier, M. Panthöfer, W. Tremel, U. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1–7.
- [34] T. Schüler, W. Tremel, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5208–5210.
- [35] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3130–3146.
- [36] L. C. Chow, *Dent. Mater. J.* **2009**, *28*, 1–10.
- [37] J. M. Delgado-López, M. Iafisco, I. Rodríguez, A. Tampieri, M. Prat, J. Gómez-Morales, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 3491–3499.
- [38] M. E. Fleet, X. Liu, P. L. King, *Am. Mineral.* **2004**, *89*, 1422–1432.
- [39] G. Kühn, W. H. Nebergall, *Z. Anorg. Allgem. Chem.* **1963**, *324*, 313–320.
- [40] T. Kubota, A. Nakamura, K. Toyoura, K. Matsunaga, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 3716–3722.
- [41] J. Zhao, Y. Liu, W.-B. Sun, H. Zhang, *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 1–7.
- [42] S. Kim, H. S. Ryu, H. Shin, H. S. Jung, K. S. Hong, *Mater. Chem. Phys.* **2005**, *91*, 500–506.
- [43] S. V Dorozhkin, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4457–4475.
- [44] <http://www.onmeda.de/anatomie/skelett-knochen-15962-2.html>, (10.09.2017).
- [45] E. Mutschler, H.-G. Schaible, P. Vaupel, G. Thews, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **2007**.
- [46] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, M. J. Buehler, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1–9.
- [47] S. Weiner, H. D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 271–298.
- [48] L. C. Palmer, C. J. Newcomb, S. R. Kaltz, E. D. Spoerke, S. I. Stupp, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4754–4783.
- [49] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, L. B. Gower, *Mater. Sci. Eng. R* **2007**, *58*, 77–116.
- [50] S. Boonen, D. Vanderschueren, F. Callewaert, P. Haentjens, *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 1333–1348.
- [51] J. J. C. Arts, N. Verdonshot, B. W. Schreurs, P. Buma, *Biomaterials* **2006**, *27*, 1110–1118.
- [52] J. Markel, D. Sadava, G. H. Orians, C. Heller, *Purves Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2011**.
- [53] http://www.biomet.de/userfiles/files/knochenersatz_dt_181109_web.pdf, (05.05.2017).
- [54] R. Smeets, H. Hanken, O. Jung, D. Rothamel, J. Handschel, A. Al-Dam, M. Blessmann, M. Heiland, A. Kolk, *Der MKG-Chirurg* **2014**, *7*, 53–67.
- [55] http://www.drzieger.de/bio_oss.pdf, (12.09.2017).
- [56] S. N. Parikh, *J. Postgrad. Med.* **2002**, *48*, 142–148.
- [57] L. Claes, I. Hoellen, A. Ignatius, *Orthopade* **1997**, *26*, 459–462.
- [58] http://www.biomet.de/userfiles/files/knochenersatz_dt_181109_web.pdf, (13.09.2017).
- [59] <https://botiss-dental.com/de/products/maxresorb-de/>, (13.09.2017).
- [60] http://www.biomet.de/userfiles/files/knochenersatz_dt_181109_web.pdf, (13.09.2017).
- [61] https://www.zwp-online.info/sites/default/files/produktbroschueren/1cerasorb_m-8seiter-dt-

- 08-11-10--web_version.pdf%0D, (13.09.2017).
- [62] <http://synthes.vo.llnwd.net/o16/Mobile/SynthesInternational/KYO/CMF/PDFs/036.000.650.pdf%0D>, (13.09.2017).
- [63] https://www.ikts.fraunhofer.de/de/departments/structural_ceramics/nonoxide_ceramics/porous_filter_ceramics/bone_substitute_materials.html, (13.09.2017).
- [64] T. R. Hoare, D. S. Kohane, *Polymer* **2008**, *49*, 1993–2007.
- [65] S. J. Bryant, J. A. Arthur, K. S. Anseth, *Acta Biomater.* **2005**, *1*, 243–252.
- [66] M. Daoud, E. Bouchaud, G. Jannink, *Macromolecules* **1986**, *19*, 1955–1960.
- [67] E. Asenath-Smith, H. Li, E. C. Keene, Z. W. Seh, L. A. Estroff, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 2891–2914.
- [68] P. J. Flory, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1974**, *57*, 7–18.
- [69] J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351.
- [70] T. Kasuga, H. Maeda, K. Kato, M. Nogami, K. I. Hata, M. Ueda, *Biomaterials* **2003**, *24*, 3247–3253.
- [71] H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, M. Ueda, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2005**, *6*, 48–53.
- [72] H. Maeda, V. Maquet, Q. Z. Chen, T. Kasuga, H. Jawad, A. R. Boccaccini, *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 741–745.
- [73] S. Jiang, S. Liu, W. Feng, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4*, 1228–1233.
- [74] L. Almany, D. Seliktar, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2467–2477.
- [75] A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23.
- [76] http://www.geoplant-aquasafe.com/index.php?page=_hydrogele, (31.08.2017).
- [77] S. J. Buwalda, K. W. M. Boere, P. J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W. E. Hennink, *J. Control. Release* **2014**, *190*, 254–273.
- [78] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267.
- [79] L. Shang, Y. Cheng, Y. Zhao, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7964–8040.
- [80] S. Seiffert, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1600–1609.
- [81] S. Seiffert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11462–11468.
- [82] S. Seiffert, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 295–304.
- [83] R. E. Unger, *Adv. Biomater. Devices Med.* **2014**, *1*, 38–45.
- [84] Promega, *Promega Tech. Bull. 245* **2012**, *12*, 1–12.
- [85] G. Malich, B. Markovic, C. Winder, *Toxicology* **1997**, *124*, 179–192.
- [86] Promega, *Promega Tech. Bull. 163* **2016**, *7*, 1–20.
- [87] D. A. Flick, G. E. Gifford, *J. Immunol. Methods* **1984**, *68*, 167–75.
- [88] W. Kueng, E. Silber, U. Eppenberger, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 16–19.
- [89] G. Hermeijer, C. Mahlke, M. Schwanke, T. Sommer, *Der Experimentator: Neurowissenschaft, Spektrum Akademischer Verlag*, **2011**.
- [90] E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, J. R. Ralphs, R. G. Richards, J. S. Hayes, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *102*, 2636–2643.
- [91] E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, R. G. Richards, J. S. Hayes, *Eur. Cells Mater.* **2012**, *24*, 1–17.
- [92] U. Meyer, H. P. Wiesmann, *Bone and Cartilage Engineering*, Springer Verlag, Berlin

- Heidelberg, 2006.
- [93] B. E. Sumpio, J. Timothy Riley, A. Dardik, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 1508–1512.
- [94] E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, C. R. Minick, *J. Clin. Invest.* **1973**, *52*, 2745–2756.
- [95] R. E. Unger, K. Peters, A. Sartoris, C. Freese, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2014**, *35*, 3180–3187.
- [96] R. E. Unger, K. Peters, Q. Huang, A. Funk, D. Paul, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3461–3469.
- [97] V. Marin, G. Kaplanski, S. Grès, C. Farnarier, P. Bongrand, *J. Immunol. Methods* **2001**, *254*, 183–190.
- [98] M. P. Bevilacqua, J. S. Pober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran, M. A. Gimbrone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 9238–9242.
- [99] 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, *J. Cell. Physiol.* **1990**, *143*, 420–430.
- [100] H. Siggelkow, D. Hilmes, K. Robenstorff, W. Kurre, I. Engel, M. Hüfner, *Clin. Chim. Acta* **1998**, *272*, 111–125.
- [101] Y. P. Guo, T. Long, Z. F. Song, Z. A. Zhu, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 2899–2909.
- [102] G. Gstraunthaler, T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur*, Springer Spektrum, **2013**.
- [103] P. J. Price, E. A. Gregory, *In Vitro* **1982**, *18*, 576–584.
- [104] N. Duewelhenke, P. Eysel, *Der Orthopäde* **2007**, *36*, 220–226.
- [105] M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. Yahia, M. Mahmoudi, *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*, Springer Series In Biophysics, **2013**.
- [106] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780–99.
- [107] S. Schöttler, K. Klein, K. Landfester, V. Mailänder, *Nanoscale* **2016**, *8*, 5526–5536.
- [108] <http://flexikon.doccheck.com/de/Albumin>, (15.05.2017).
- [109] R. G. Reed, F. W. Putnam, T. Peters, *Biochem. J.* **1980**, *191*, 867–868.
- [110] C. Schäfer, A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Müller-Esterl, T. Schinke, W. Jahn-Dechent, *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 357–366.
- [111] R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1960**, *225*, 2860–2869.
- [112] T. Herdegen, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme, **2010**.
- [113] R. Schröder, L. Besch, H. Pohlit, M. Panthöfer, W. Roth, H. Frey, W. Tremel, R. E. Unger, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, submitted.
- [114] W. Suchanek, M. Yoshimura, *J. Mater. Res.* **1998**, *13*, 94–117.
- [115] S. V. Dorozhkin, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4457–4475.
- [116] T. Kokubo, *Acta Mater.* **1998**, *46*, 2519–2527.
- [117] L. Gower, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4551–4627.
- [118] E. D. Eanes, J. D. Termine, M. U. Nylen, *Calcif. Tissue Res.* **1973**, *12*, 143–158.
- [119] E. Tolba, W. E. G. Müller, B. M. Abd El-Hady, M. Neufurth, F. Wurm, S. Wang, H. C. Schröder, X. Wang, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *5*, 376–386.
- [120] S. V. Dorozhkin, *Int. J. Mater. Chem.* **2012**, *2*, 19–46.
- [121] H. Maeda, V. Maquet, T. Kasuga, Q. Z. Chen, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 2269–2273.
- [122] H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, *Mater. Trans.* **2004**, *45*, 989–993.

- [123] S. Kim, C. B. Park, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6628–6634.
- [124] Y. Wang, Y. X. Moo, C. Chen, P. Gunawan, R. Xu, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *352*, 393–400.
- [125] J. W. Morse, R. S. Arvidson, A. Lüttge, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 342–381.
- [126] S. L. P. Wolf, K. Jähme, D. Gebauer, *CrystEngComm* **2015**, *17*, 6857–6862.
- [127] D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen, *Science* **2008**, *322*, 1819–1822.
- [128] F. C. Meldrum, H. Cölfen, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4332–4432.
- [129] R. Schröder, H. Pohlitz, T. Schüler, M. Panthöfer, R. E. Unger, H. Frey, W. Tremel, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 7079–7089.
- [130] S. Lyu, S. Park, G. Sur, *Korean J. Chem. Eng.* **1999**, *16*, 538–542.
- [131] A. Declet, E. Reyes, O. Suárez, *Rev. Adv.* **2016**, *44*, 87–107.
- [132] C. Shivkumara, P. Singh, A. Gupta, M. S. Hegde, *Mater. Res. Bull.* **2006**, *41*, 1455–1460.
- [133] A. Sarkar, S. Mahapatra, *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 2129–2135.
- [134] Y. Chen, X. Ji, X. Wang, *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 3191–3197.
- [135] R. W. Cheary, A. Coelho, *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, *25*, 109–121.
- [136] R. E. Unger, A. Sartoris, K. Peters, A. Motta, C. Migliaresi, M. Kunkel, U. Bulnheim, J. Rychly, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3965–3976.
- [137] J. W. Haycock, *3D Cell Culture Methods and Protocols*, Springer - Humana Press, **2011**.
- [138] K. Peters, H. Schmidt, R. E. Unger, M. Otto, G. Kamp, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3413–3419.
- [139] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/1/86.pdf, (04.05.2017).
- [140] F. A. Andersen, L. Brečević, *Acta Chem. Scand.* **1991**, *45*, 1018–1024.
- [141] U. Wehrmeister, A. L. Soldati, D. E. Jacob, T. Häger, W. Hofmeister, *J. Raman Spectrosc.* **2010**, *41*, 193–201.
- [142] Q. Li, Y. Ding, F. Li, B. Xie, Y. Qian, *J. Cryst. Growth* **2002**, *236*, 357–362.
- [143] E. M. Flaten, M. Seiersten, J. P. Andreassen, *J. Cryst. Growth* **2009**, *311*, 3533–3538.
- [144] A. Nel, *Science* **2007**, *311*, 622–627.
- [145] S. P. Samuel, N. Jain, F. O’Dowd, T. Paul, D. Kashanin, V. A. Gerard, Y. K. Gun’ko, A. Prina-Mello, Y. Volkov, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 2943–2956.
- [146] D. Napierska, L. C. J. Thomassen, V. Rabolli, D. Lison, L. Gonzalez, M. Kirsch-Volders, J. A. Martens, P. H. Hoet, *Small* **2009**, *5*, 846–853.
- [147] X. Wang, P. J. Quinn, *Prog. Lipid Res.* **2010**, *49*, 97–107.
- [148] E. Zimmerman, B. Geiger, L. Addadi, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1848–1857.
- [149] B. Finke, F. Luethen, K. Schroeder, P. D. Mueller, C. Bergemann, M. Frant, A. Ohl, B. J. Nebe, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4521–4534.
- [150] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, A. J. Garcia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5953–5957.
- [151] G. B. Schneider, A. English, M. Abraham, R. Zaharias, C. Stanford, J. Keller, *Biomaterials* **2004**, *25*, 3023–3028.
- [152] C. R. Wittmer, J. A. Phelps, W. M. Saltzman, P. R. Van Tassel, *Biomaterials* **2007**, *28*, 851–860.

- [153] R. E. Unger, Q. Huang, K. Peters, D. Protzer, D. Paul, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials* **2005**, *26*, 1877–1884.
- [154] R. Z. LeGeros, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2002**, *395*, 81–98.
- [155] F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, *Thermochim. Acta* **2000**, *361*, 131–138.
- [156] K. Ogata, S. Imazato, A. Ehara, S. Ebisu, Y. Kinomoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *72*, 127–135.
- [157] J. S. Sun, H. C. Liu, W. H. S. Chang, J. Li, F. H. Lin, H. C. Tai, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 390–397.
- [158] J. Wang, J. de Boer, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *90*, 664–670.
- [159] T. Okuda, K. Ioku, I. Yonezawa, H. Minagi, G. Kawachi, Y. Gonda, H. Murayama, Y. Shibata, S. Minami, S. Kamihira, et al., *Biomaterials* **2007**, *28*, 2612–2621.
- [160] A. Ehara, K. Ogata, S. Imazato, S. Ebisu, T. Nakano, Y. Umakoshi, *Biomaterials* **2003**, *24*, 831–836.
- [161] N. Kondo, A. Ogose, K. Tokunaga, H. Umezu, K. Arai, N. Kudo, M. Hoshino, H. Inoue, H. Irie, K. Kuroda, et al., *Biomaterials* **2006**, *27*, 4419–4427.
- [162] M. Nee, T. Nakamura, C. O. T. Kokubo, T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, *27*, 999–1006.
- [163] Y. Doi, T. Shibutani, Y. Moriwaki, T. Kajimoto, Y. Iwayama, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 603–610.
- [164] T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915.
- [165] S. Schöttler, G. Becker, S. Winzen, T. Steinbach, K. Mohr, K. Landfester, V. Mailänder, F. R. Wurm, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 372–377.
- [166] L. K. Müller, J. Simon, S. Schöttler, K. Landfester, V. Mailänder, K. Mohr, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 96495–96509.
- [167] R. Z. LeGeros, O. R. Trautz, J. P. LeGeros, E. Klein, *Science* **1967**, *155*, 1409–1411.
- [168] M.-H. Chen, N. Hanagata, T. Ikoma, J.-Y. Huang, K.-Y. Li, C.-P. Lin, F.-H. Lin, *Acta Biomater.* **2016**, *37*, 165–173.
- [169] Y. Wang, T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, N. Nassif, *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 724–733.
- [170] R. Wilson, J. Elliott, S. Dowker, *Am. Mineral.* **1999**, *84*, 1406–1414.
- [171] S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 600–612.
- [172] 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 Med. Sci.* **2014**, *29*, 1927–1936.
- [173] J. R. Dorvee, A. L. Boskey, L. A. Estroff, *CrystEngComm* **2012**, *14*, 5681–5700.
- [174] A. Porter, N. Patel, R. Brooks, S. Best, N. Rushton, W. Bonfield, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, *16*, 899–907.
- [175] D. Ibrahim, A. A. Mostafa, S. Korowash, *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 74.
- [176] <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Formulation/d8537for.pdf>, (22.05.2017).
- [177] D. Tadic, M. Epple, *Biomaterials* **2004**, *25*, 987–994.
- [178] W. Kolodziejski, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *246*, 235–270.
- [179] M. Braun, P. Hartmann, C. Jana, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1995**, *6*, 150–154.
- [180] P. N. Gunawidjaja, I. Izquierdo-Barba, R. Mathew, K. Jansson, A. García, J. Grins, D. Arcos,

- M. Vallet-Regí, M. Edén, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 7214.
- [181] C. C. Ahn, *Transmission Electron Energy Loss Spectrometry in Materials Science and the EELS ATLAS*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2004**.
- [182] A. S. Posner, F. Betts, N. C. Blumenthal, *Prog. Cryst. Growth Charact.* **1980**, *3*, 49–64.
- [183] E. D. Eanes, I. H. Gillessen, A. S. Posner, *Nature* **1965**, *128*, 365–367.
- [184] K. S. TenHuisen, P. W. Brown, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *36*, 306–314.
- [185] F. Abbona, A. Baronnet, *J. Cryst. Growth* **1996**, *165*, 98–105.
- [186] B. N. Bachra, O. R. Trautz, S. L. Simon, *Arch. oral Biol.* **1965**, *10*, 731–738.
- [187] G. Daculsi, *Biomaterials* **1998**, *19*, 1473–1478.
- [188] J. Marchi, A. C. S. Dantas, P. Greil, J. C. Bressiani, A. H. A. Bressiani, F. A. Müller, *Mater. Res. Bull.* **2007**, *42*, 1040–1050.
- [189] A. Adamiano, D. Fabbri, G. Falini, M. Giovanna Belcastro, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2013**, *100*, 173–180.
- [190] P. N. Gunawidjaja, A. Y. H. Lo, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, B. Stevansson, J. Grins, M. Vallet-Regí, M. Edén, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 19345–19356.
- [191] Y. Wu, M. J. Glimcher, C. Rey, J. L. Ackerman, *J. Mol. Biol.* **1994**, *244*, 423–435.
- [192] <http://www.thermofisher.com/de/de/home/technical-resources/media-formulation.110.html>, (13.06.2017).
- [193] K. Sawada, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 921–928.
- [194] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 428–437.
- [195] M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. Baldelli Bombelli, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2525–2534.
- [196] J. Simon, Influencing Cellular Uptake by Tailoring the Protein Corona, Johannes Gutenberg-University of Mainz, **2015**.
- [197] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780–2799.
- [198] <http://www.numericana.com/answer/ellipsoid.htm>, (16.08.2017).
- [199] D. Xu, J. Cui, R. Bansal, X. Hao, J. Liu, B. S. Peterson, *Magn Reson Imaging* **2009**, *27*, 311–323.
- [200] D. R. Schmidt, H. Waldeck, W. J. Kao, *Protein Adsorption to Biomaterials in Biological Interactions on Materials Surfaces*, Springer, **2009**, pp. 1–18.
- [201] P. J. Mohr, D. B. Newell, B. N. Taylor, *CODATA Recommended Values of the Fundamental Physical Constants*, **2015**.
- [202] C. Y. Wu, J. Martel, D. Young, J. D. Young, *PLoS One* **2009**, *4*, 24–27.
- [203] A. Heiss, T. Eckert, A. Aretz, W. Richtering, W. Van Dorp, C. Schäfer, W. Jahnen-Dechent, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14815–14825.
- [204] P. Stenvinkel, K. Wang, A. R. Qureshi, J. Axelsson, R. Pecoits-Filho, P. Gao, P. Barany, B. Lindholm, T. Jogestrand, O. Heimbürger, C. Holmes, M. Schalling, L. Nordfors, *Kidney Int.* **2005**, *67*, 2383–2392.
- [205] I. Mobasherpour, M. S. Heshajin, A. Kazemzadeh, M. Zakeri, *J. Alloys Compd.* **2007**, *430*, 330–333.
- [206] C. Harms, K. Helms, A. Ignatius, T. Gerber, S. Rammelt, B. Vollmar, T. Mittlmeier, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 2883–2889.

- [207] L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.* **1998**, *81*, 1705–1728.
- [208] A. Bigi, M. Fini, B. Bracci, E. Boanini, P. Torricelli, N. Aldini, A. Facchini, G. Giavaresi, F. Sbaiz, R. Giardino, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1730–1736.
- [209] G. P. Jayaswal, S. P. Dange, A. N. Khalikar, *J. Indian Prosthodont. Soc.* **2010**, *10*, 8–12.
- [210] <http://www.artoss.com/>, (11.07.2017).
- [211] http://kulzer.de/media/webmedia_local/downloads_new/ostim_3/Ostim_Produktinfo_DE.pdf, (11.07.2017).
- [212] R. Murugan, S. Ramakrishna, *J. Cryst.* **2005**, *274*, 209–213.
- [213] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, R. Bizios, *Biomaterials* **2000**, *21*, 1803–1810.
- [214] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 573–580.
- [215] C. Combes, C. Rey, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3362–3378.
- [216] M. S. Tung, W. E. Brown, *Calcif. Tissue Int.* **1983**, *35*, 783–790.
- [217] P. W. Brown, R. I. Martin, *J. Phys. Chem.* **1999**, *103*, 1671–1675.
- [218] V. Militello, C. Casarino, A. Emanuele, A. Giostra, F. Pullara, *Biophys. Chem.* **2004**, *107*, 175–187.
- [219] J. C. Heughebaert, G. Montel, *Calcif. Tissue Int.* **1982**, *34*, 103–108.
- [220] J. E. Harries, D. W. L. Hukins, C. Holt, S. S. Hasnain, *J. Cryst. Growth* **1987**, *84*, 563–570.
- [221] S. J. Gadaleta, E. P. Paschalis, F. Betts, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, *Calcif. Tissue Int* **1996**, *58*, 9–16.
- [222] N. Ikawa, T. Kimura, Y. Oumi, T. Sano, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 4906–4913.
- [223] P. Koutsoukos, Z. Amjad, M. B. Tomson, G. H. Nancollas, *Am. Chem. Society* **1980**, *102*, 1553–1557.
- [224] T. P. Feenstra, P. L. Bruyn, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 475–479.
- [225] E. D. Eanes, J. L. Meyer, *Calcif. Tissue Res.* **1977**, *23*, 259–269.
- [226] A. L. Boskey, A. S. Posner, *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 2313–2317.
- [227] R. Kumar, K. H. Prakash, P. Cheang, K. A. Khor, *Langmuir* **2004**, *20*, 5196–5200.
- [228] Y. X. Pang, X. Bao, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2003**, *23*, 1697–1704.
- [229] E. Bouyer, F. Gitzhofer, M. I. Boulos, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2000**, *11*, 523–531.
- [230] K. H. Prakash, R. Kumar, C. P. Ooi, P. Cheang, K. A. Khor, *Langmuir* **2006**, *22*, 11002–11008.
- [231] A. Ito, K. Maekawa, S. Tsutsumi, F. Ikazaki, T. Tateishi, *J. Biomed. Mater. Res. A* **1996**, *36*, 522–528.
- [232] P. Gron, M. Spinelli, F. Brudevold, *Arch. oral Biol.* **1963**, *8*, 251–263.
- [233] J. Barralet, S. Best, W. Bonfield, *J. Biomed. Mater. Res. A* **1998**, *41*, 79–86.
- [234] Z. LeGeros, Racquel, O. R. Trautz, J. P. LeGeros, E. Klein, W. P. Shirra, *Science* **1967**, *155*, 1409–1411.
- [235] S. Liao, F. Watari, G. Xu, M. Ngiam, S. Ramakrishna, C. K. Chan, *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 3624–3628.
- [236] X. Yang, B. Xie, L. Wang, Y. Qin, J. Henneman, G. H. Nancollas, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 1153–1158.
- [237] P. A. Price, G. R. Thomas, A. W. Pardini, W. F. Figueira, J. M. Caputo, M. K. Williamson,

- J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 3926–3934.
- [238] P. A. Price, M. K. Williamson, T. Minh, T. Nguyen, T. N. Than, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 1594–1600.
- [239] R. A. Terkeltaub, D. A. Santoro, G. Mandel, N. Mandel, *Arthritis Rheum.* **1988**, 31, 1081–1089.
- [240] B. A. Ashton, H. Hshling, *Calcif. Tissue Res.* **1976**, 22, 27–33.
- [241] C. Freese, D. Schreiner, L. Anspach, C. Bantz, M. Maskos, R. E. Unger, C. J. Kirkpatrick, *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, 68, 1–12.
- [242] J. Kasper, M. I. Hermanns, C. Bantz, O. Koshkina, T. Lang, M. Maskos, C. Pohl, R. E. Unger, C. J. Kirkpatrick, *Arch. Toxicol.* **2013**, 87, 1053–1065.
- [243] K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, A. R. Boccaccini, *Biomaterials* **2006**, 27, 3413–3431.
- [244] 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, J. A. Jansen, S. C. G. Leeuwenburgh, *Macromol. Biosci.* **2012**, 12, 1077–1089.
- [245] V. B. Bueno, R. Bentini, L. H. Catalani, L. R. S. Barbosa, D. Freitas, S. Petri, *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, 37, 195–203.
- [246] M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 103, 655–663.
- [247] N. C. Hunt, R. M. Shelton, L. M. Grover, *Biotechnol. J.* **2009**, 4, 730–737.
- [248] D. G. Wallace, J. Rosenblatt, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, 55, 1631–1649.
- [249] H. Tlatlik, P. Simon, A. Kawska, D. Zahn, R. Kniep, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1905–1910.
- [250] M. Xie, M. Ø. Olderøy, J. Andreassen, S. Magnus, B. L. Strand, P. Sikorski, *Acta Biomater.* **2010**, 6, 3665–3675.
- [251] J. Sun, H. Tan, *Materials* **2013**, 6, 1285–1309.
- [252] R. Kniep, P. Simon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1405–1409.
- [253] M. Kikuchi, H. N. Matsumoto, T. Yamada, Y. Koyama, K. Takakuda, J. Tanaka, *Biomaterials* **2004**, 25, 63–69.
- [254] V. Hagel, T. Haraszti, H. Boehm, *Biointerphases* **2013**, 8, 1–9.
- [255] B. L. Seal, T. C. Otero, A. Panitch, *Mater. Sci. Eng. R* **2001**, 34, 147–230.
- [256] M. M. Stevens, *Mater. Today* **2008**, 11, 18–25.
- [257] H. Tan, K. G. Marra, *Materials* **2010**, 3, 1746–1767.
- [258] C. Dingels, M. Schömer, H. Frey, *Chem. Unserer Zeit* **2011**, 45, 338–349.
- [259] J. Herzberger, K. Niederer, H. Pohlit, J. Seiwert, M. Worm, F. R. Wurm, H. Frey, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 2170–2243.
- [260] S. Lin, N. Sangaj, T. Razafiarison, C. Zhang, S. Varghese, *Pharm. Res.* **2011**, 28, 1422–1430.
- [261] H. Pohlit, D. Leibig, H. Frey, *Macromol. Biosci.* **2017**, 1–9.
- [262] M. B. Browning, S. N. Cereceres, P. T. Luong, E. M. Cosgriff-Hernandez, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, 102, 4244–4251.
- [263] S. Hackelbusch, T. Rossow, D. Steinhilber, D. A. Weitz, S. Seiffert, *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, 4, 1841–1848.
- [264] B. K. Mann, A. S. Gobin, A. T. Tsai, R. H. Schmedlen, J. L. West, *Biomaterials* **2001**, 22, 3045–3051.
- [265] M. B. Mellott, K. Searcy, M. V Pishko, *Biomaterials* **2001**, 22, 929–941.

- [266] H. Pohlitz, I. Bellinghausen, M. Schömer, B. Heydenreich, J. Saloga, H. Frey, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3103–3111.
- [267] S. J. Bryant, K. S. Anseth, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2002**, *1*, 70–79.
- [268] B. Reid, M. Gibson, A. Singh, J. Taube, C. Furlong, M. Murcia, J. Elisseeff, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, *9*, 315–318.
- [269] C. R. Deible, P. Petrosko, P. C. Johnson, E. J. Beckman, A. J. Russell, W. R. Wagner, *Biomaterials* **1998**, *19*, 1885–1893.
- [270] W. R. Gombotz, W. Guanghui, T. A. Horbett, A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25*, 1547–1562.
- [271] F. Yang, C. G. Williams, D. A. Wang, H. Lee, P. N. Manson, J. Elisseeff, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5991–5998.
- [272] S. Kim, A. E. English, K. D. Kihm, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 144–151.
- [273] O. Grassmann, P. Löbmann, *Biomaterials* **2004**, *25*, 277–282.
- [274] F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. J. Hilbers, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 1004–1009.
- [275] M. Tanahashi, T. Yao, T. Kokubo, T. Miyamotoy, T. Nakamura, T. Yamamuroq, *J. Appl. Biomater.* **1994**, *5*, 339–347.
- [276] H. D. Kim, J. Heo, Y. Hwang, S. Kwak, O. K. Park, H. Kim, S. Varghese, N. S. Hwang, *Tissue Eng. A* **2015**, *21*, 757–766.
- [277] R. H. Schmedlen, K. S. Masters, J. L. West, *Biomaterials* **2002**, *23*, 4325–4332.
- [278] S. K. Seidlits, C. T. Drinnan, R. R. Petersen, J. B. Shear, L. J. Suggs, C. E. Schmidt, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2401–2409.
- [279] C. R. Nuttelman, D. J. Mortisen, S. M. Henry, K. S. Anseth, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2001**, *57*, 217–223.
- [280] B. Clément, B. Grignard, L. Koole, C. Jérôme, P. Lecomte, *Macromolecules* **2012**, *45*, 4476–4486.
- [281] S. Monge, B. Canniccioni, A. Graillot, J. Robin, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1973–1982.
- [282] T. Steinbach, R. Schröder, S. Ritz, F. R. Wurm, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 4469–4479.
- [283] J. Baran, S. Penczek, *Macromolecules* **1995**, *28*, 5167–5176.
- [284] J. He, M. Zhang, P. Ni, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6033–6038.
- [285] A. Cankaya, M. Steinmann, Y. Bülbül, I. Lieberwirth, F. R. Wurm, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 5004–5010.
- [286] F. Marsico, M. Wagner, K. Landfester, F. R. Wurm, *Macromolecules* **2012**, *45*, 8511–8518.
- [287] Q. Li, J. Wang, S. Shahani, D. D. N. Sun, B. Sharma, J. H. Elisseeff, K. W. Leong, *Biomaterials* **2006**, *27*, 1027–1034.
- [288] B. Fu, X. Sun, W. Qian, Y. Shen, R. Chen, M. Hannig, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5104–5110.
- [289] J. Du, T. Sun, S. Weng, X. Chen, J. Wang, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3375–3381.
- [290] Y.-C. Wang, J. Wu, Y. Li, J.-Z. Du, Y.-Y. Yuan, J. Wang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3520–3522.
- [291] T. Rossow, J. A. Heyman, A. J. Ehrlicher, A. Langhoff, D. A. Weitz, R. Haag, S. Seiffert, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4983–4989.
- [292] M. P. Cuchiara, A. C. B. Allen, T. M. Chen, J. S. Miller, J. L. West, *Biomaterials* **2010**, *31*, 5491–5497.

- [293] T. Rossow, S. Bayer, R. Albrecht, C. C. Tzschucke, S. Seiffert, *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 1401–1407.
- [294] D. Steinhilber, T. Rossow, S. Wedepohl, F. Paulus, S. Seiffert, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13538–13543.
- [295] T. Rossow, S. Seiffert, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 3018–3029.
- [296] S. Bach, V. R. Celinski, M. Dietzsch, M. Panthöfer, R. Bienert, F. Emmerling, J. Schmedt auf der Günne, W. Tremel, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2285–2294.
- [297] S. Bach, M. Panthöfer, R. Bienert, A. D. O. G. Buzanich, F. Emmerling, W. Tremel, *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 4232–4239.
- [298] <http://www.uniprot.org/>, (19.06.2017).
- [299] O. V. Vysotskaya, L. A. Oparina, L. N. Parshina, N. K. Gusarova, B. A. Trofimov, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, *38*, 1082–1087.
- [300] R. C. Pratt, B. G. G. Lohmeijer, D. A. Long, P. N. P. Lundberg, A. P. Dove, H. Li, C. G. Wade, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7863–7871.

13

Anhang C

13.1 Curriculum Vitae

ROMINA SCHRÖDER



PERSÖNLICHES

[Redacted personal information]

BERUFLICHER WERDEGANG

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

AKADEMISCHE UND SCHULISCHE AUSBILDUNG

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

PUBLIKATIONEN

2017	R. Schröder , L. Besch, H. Pohlitz, M. Panthöfer, W. Roth, H. Frey, W. Tremel, R. E. Unger, “ <i>Vaterite particles are a biomaterial for rapid bone regeneration</i> “, <i>J. Tissue Eng. Regen. Med.</i> , 2017. (eingereicht)
2015	R. Schröder , H. Pohlitz, T. Schüler, M. Panthöfer, R. E. Unger, H. Frey, W. Tremel, “ <i>Transformation of vaterite nanoparticles to hydroxy-carbonate apatite in a hydrogel scaffold: relevance to bone formation</i> “, <i>J. Mater. Chem. B</i> , 2015, 3, 7079-7089.
2013	T. Steinbach, R. Schröder , S. Ritz, F. R. Wurm, “ <i>Microstructure analysis of biocompatible phosphoester copolymers</i> “, <i>Polym. Chem.</i> , 2013, 4, 4469-4479.