



ulm university universität
uulm

Synthese und Charakterisierung hybrider Hydrogele für die Geweberekonstruktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)

2018

eingereicht von
Bernhard Harry Baumann
geboren in Ulm

Universität Ulm
»Fakultät für Naturwissenschaften«
Institut für Anorganische Chemie II

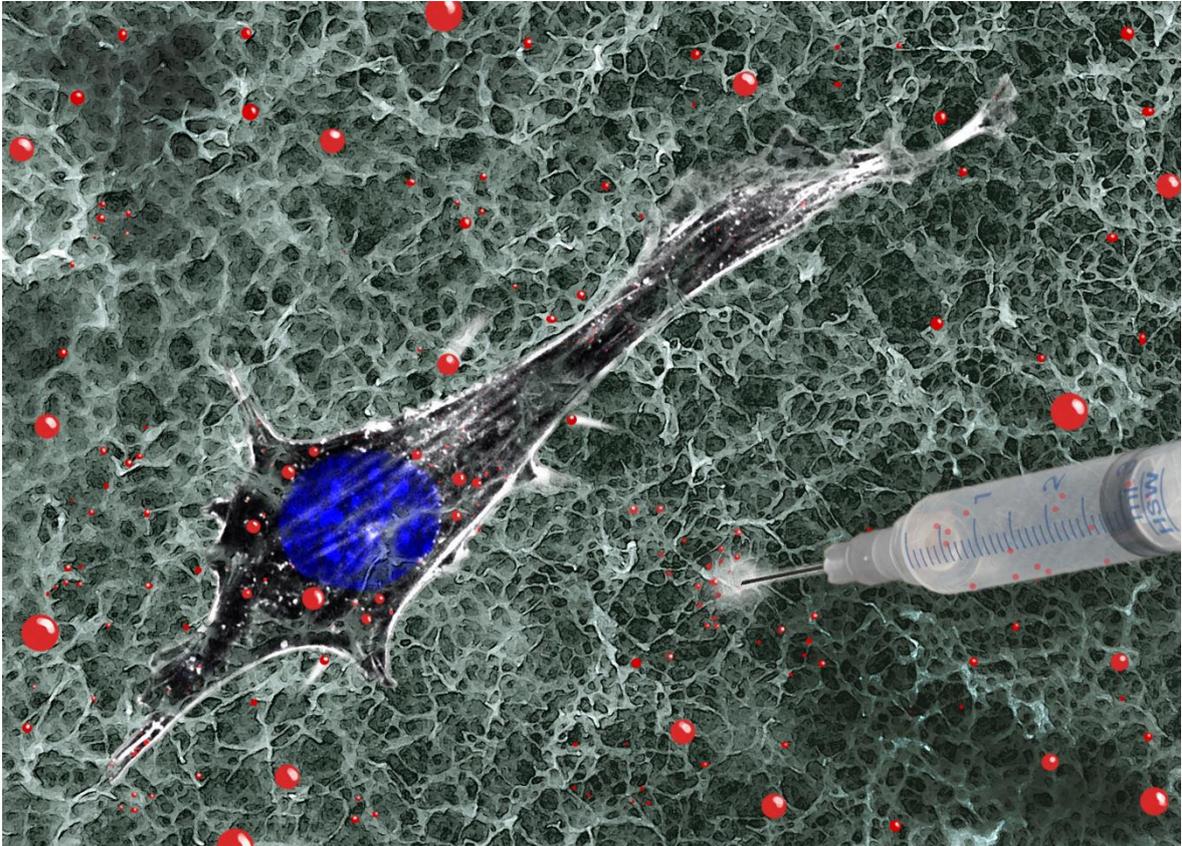
Amtierender Dekan: Prof. Dr. Peter Dürre

Erstgutachter: Prof. Dr. Mika Lindén

Zweitgutachter: Prof. Dr. Carsten Streb

Tag der Promotion: 24.05.2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2014 bis März 2018 am Institut für Anorganische Chemie II der Universität Ulm unter Leitung von Prof. Dr. Mika Lindén angefertigt.



Schematische Darstellung eines injizierbaren hybriden Hydrogels (Backcover 6. Ausgabe, *Nanoscale*, Baumann *et al.*, September 2017). Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Mika Lindén und *The Royal Society of Chemistry* [*Nanoscale*, **2017**, *9*, 12379-12390].

Kurzfassung der Dissertation

Im Bereich der Geweberekonstruktion ist es notwendig neue Materialien zu entwickeln, welche eine lokale sowie zeitlich gestaffelte Freisetzung von benötigten Wirkstoffen ermöglichen. Auf diese Weise sollen potentielle Nebenwirkungen reduziert und eine Kontrolle über die Entwicklung von Zellen generiert werden, um eine gezielte Herstellung neuen Gewebes zu gewährleisten.

Mesoporöse Silikananopartikel (MSN) sind auf Grund ihrer Eigenschaften, zu denen eine große innere Oberfläche, Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und eine einfache Zugänglichkeit zu Oberflächenfunktionalisierungsmöglichkeiten gehören, vielversprechende Kandidaten für den Einsatz als partikuläre Transportsysteme der verwendeten Wirkstoffe. Durch Variation der Form, Größe und Oberflächenbeschaffenheit kann die Interaktion dieser Partikel mit entsprechenden Wirkstoffen, Zellen sowie umgebenden Netzwerkkomponenten gezielt gesteuert werden, um so eine aktive und kontrollierte Zellaufnahme der MSN zu ermöglichen.

Aus diesen Gründen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Herstellung neuartiger hybrider Hydrogelsysteme für die Geweberekonstruktion, welche durch Kombination mit unterschiedlichen MSN erzeugt wurden. Die Synthese der mesoporösen Silikananopartikel erfolgte durch eine Kombination aus Endo-Templatverfahren und Sol-Gel-Prozess. Durch Variation einzelner Syntheseparameter konnten MSN unterschiedlicher Größe und Morphologie synthetisiert werden. Bei den durchgeführten Synthesen war es durch Variation der verwendeten Organoalkoxysilane möglich, MSN unterschiedlicher Oberflächenladung zu erzeugen. Durch weiterführende Kupplungsreaktionen konnten abschließend weitere Polysaccharide (Glucosederivate und Hyaluronsäure) auf die Oberfläche dieser unterschiedlich geladenen MSN angebunden werden. Auf diese Weise wurde eine Bibliothek aus 28 unterschiedlichen Partikeln für eine spätere Evaluation für die Eignung der Verwendung dieser Partikel in hybriden Hydrogelnetzwerken synthetisiert.

Zur Untersuchung neuartiger, partikelhaltiger hybrider Hydrogele wurden zwei unterschiedliche Systeme, mit dem Ziel einer lokalen Applikation sowie der gestaffelten zellulären Aufnahme der eingebrachten MSN, untersucht. Dabei handelte es sich zum

einen um ein peptidbasiertes injizierbares System und zum anderen um ein 3D-druckbares System.

Die Herstellung einer injizierbaren hybriden Hydrogelformulierung erfolgte hierbei durch die Kombination eines selbstassemblierenden Peptids (RADA16-I) mit unterschiedlich oberflächenfunktionalisierten MSN. Die Gelierung von RADA16-I wurde durch die Anwesenheit monovalenter Ionen induziert, weshalb an dieser Stelle von einem injizierbaren Hydrogel gesprochen werden kann. Durch rheologische Messungen konnte zunächst bestätigt werden, dass beigemischte MSN keinen Einfluss auf das scherverdünnende Verhalten der Lösung hatten, weshalb es sich weiterhin um injizierbare Systeme handelt. Das Ziel einer, für die Geweberekonstruktion angestrebten, lokalen Applikation konnte daher mit diesem hybriden System realisiert werden. Nach Injektion in ein Zellkulturmedium und einer daraus resultierenden Ausbildung des Hydrogelnetzwerks konnte, unabhängig der gewählten Oberflächenfunktionalisierung, mittels elektronenmikroskopischer Methoden eine homogene Verteilung der eingebrachten MSN visualisiert werden. Ebenfalls war es möglich, MC3T3-E1 Knochenvorläuferzellen der Hydrogelformulierung beizumischen, dabei konnte ein dreidimensionales Wachstum dieser Zellen sowie eine zelluläre Aufnahme von MSN innerhalb des Peptidnetzwerks realisiert werden. Die angestrebte aktive Aufnahme von eingebrachten MSN durch Zellen in eine 3D-Zellkultur konnte somit in dieser Arbeit ebenfalls erfolgreich gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Wechselwirkung mit umgebenden Peptiden als bedeutenden Einflussfaktor für die zelluläre Aufnahme von MSN identifiziert. So konnte, durch eine Variation der Wechselwirkung zwischen unterschiedlich funktionalisierten und geformten Partikeln mit dem umgebenden Peptid, die Ausbildung einer Peptid-Corona gesteuert und in Folge dessen die zelluläre Aufnahme beeinflusst werden. Jedoch war es trotz dieser variierten zellulären Aufnahme nicht möglich, eine verzögerte Aufnahme von Partikeln, welche im Rahmen der Geweberekonstruktion für einen kontrollierten und gestaffelten Transport von Wirkstoffen notwendig wäre, zu erreichen.

Um dieses noch nicht gelöste Problem zu bewältigen, wurden weitere hybride Hydrogelformulierungen für den 3D-Druck untersucht. Die diesem Projekt zugrundeliegende Formulierungen bestanden hauptsächlich aus einer Kombination aus Hyaluronsäure, unterschiedlich oberflächenfunktionalisierten MSN und funktionalisierten

Polyglycidolen, welche durch Bestrahlung mit UV-Licht ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden.

In rheologischen Messungen der ungelierten Formulierung zeigten die beigemischten MSN auch hier keinen Einfluss auf das scherverdünnende Verhalten, weshalb ein präziser Druck von Hydrogelsträngen möglich war. Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen unterschiedlich geladenen Partikeln und der umgebenden Hyaluronsäure war es weiterhin möglich, die Interaktion zwischen diesen Komponenten zu beeinflussen. Hierbei konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei Einflussfaktoren für die Steuerung der Beweglichkeit von Partikeln innerhalb eines gedruckten hybriden Hydrogelkonstrukts und deren Freisetzung in ein umgebendes Medium gefunden werden. Dabei handelt es sich um die Partikelladung und die gewählte Druckgeometrie. Durch den Einsatz positiv bzw. negativ geladener MSN innerhalb der gedruckten Hydrogele wurden unterschiedliche Freisetzungskinetiken in das umgebende Zellmedium realisiert. Zudem wurde durch Verwendung von vergleichbar funktionalisierten Goldnanopartikeln ein materialunabhängiges Verhalten in Bezug auf die Freisetzungskinetik gezeigt. Bei einer anschließenden Untersuchung der zellulären Aufnahme von MSN wurde, in Übereinstimmung mit dem Freisetzungsverhalten der jeweiligen Partikel, eine deutlich verzögerte Aufnahme von positiv geladenen, aminofunktionalisierten Partikeln beobachtet.

Abschließend wurde die Beladung von unterschiedlich funktionalisierten mesoporösen Silikananopartikeln mit drei potentiellen Wirkstoffen für die Geweberekonstruktion durchgeführt. Hierbei wurde, unabhängig der gewählten Wirkstoffe, eine erhöhte Wechselwirkung und somit erhöhte maximale Beladung mit aminofunktionalisierten Partikeln erzielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Herstellung neuartiger hybrider Systeme einige grundlegende und notwendige Voraussetzungen eines Materials für die Geweberekonstruktion erfüllt. Dazu zählen neben einer lokalen Applikation der erzeugten Materialien auch eine aktive sowie zeitlich gestaffelte und verzögerte Aufnahme der eingebrachten Trägersysteme (MSN). Weiterhin wurden wichtige Einflussfaktoren für das Verständnis der Wechselwirkung zwischen partikulären Systemen und umgebenden Netzwerkkomponenten in 3D-hybriden Hydrogelzellkulturen identifiziert. Durch eine hohe

Vielfalt an einführbaren Oberflächenfunktionalisierungen von MSN gelang es, die Wechselwirkungen zwischen Partikeln und den umgebenden Hydrogelnetzwerken zu steuern, um in Folge dessen eine veränderte zelluläre Aufnahme zu erzielen. So war es auf diese Weise erstmals möglich, eine deutliche, um mehrere Tage verzögerte, Aufnahme von MSN in Zellen zu erzielen.

Die Verwendung entsprechender hybrider Materialien stellt also einen vielversprechenden Ansatz zur Realisierung eines kontrollierten Zellwachstums und somit einer erfolgreichen Geweberekonstruktion dar.

Abstract

In the field of tissue engineering, it is necessary to develop new materials that allow a local and delayed release of drugs. By such an approach, potential side effects of the drugs can be reduced, and a controlled cell development is enabled, resulting in the formation of new, healthy tissue.

Mesoporous silica nanoparticles (MSN) have desired material characteristics, such as high internal surface area, biocompatibility, biodegradability, and easily tunable surface functionalization, and are promising candidates as drug carriers. By variations in particle shape and size, as well as surface functionalization, the interaction between particles and a relevant drug, cells, or surrounding network components can be tuned. This enables an active and controlled uptake of MSN by cells.

The present work covers the production of new hybrid hydrogel systems containing different MSNs for tissue engineering applications. The synthesis of mesoporous silica nanoparticles is based on a combination of endo-template processing and sol-gel synthesis. By varying the synthesis parameters, differently sized MSNs with various morphologies could be prepared. Using functionalized silanes, a controllable particle surface charge could be introduced. By coupling reactions, it was furthermore possible to bind mono- and polysaccharides (glucose derivatives or hyaluronic acid) to the surface of the differently charged particles. Hence, a library of 28 different MSNs could be synthesized and used in hybrid hydrogel cell cultures.

For the investigation of new, particle-based hybrid hydrogels, with the aim of a local and delayed cellular uptake of MSN, two different systems were investigated. One system is a peptide based injectable system, whereas the other one is 3D-printable.

Injectable hybrid hydrogel formulations were produced by the combination of a self-assembling peptide (RADA16-I) and MSN with different surface functionalizations. The gelation of RADA16-I was initiated by the presence of monovalent ions in a surrounding solution. This is the reason why this kind of hydrogels are called injectable system as the hydrogel network is formed immediately after contact with the surrounding media.

Performing rheological measurements with samples in an un-gelled state, a negligible influence of MSN on the shear thinning behavior of hydrogel formulations was observed. Thus, such a hybrid formulation still could be injected in a solution, or later on into the human body, whereby a desired local application of such a hybrid material could be achieved.

After the injection of MSN containing hybrid hydrogel formulations in cell culture media, a hydrogel network was formed. In such a network, independent of the surface functionalization of MSNs, a homogenous distribution of particles was observed via electron microscopy measurements.

In addition, it was also possible to mix osteoprogenitor cells (MC3T3-E1 cells) with the hydrogel formulation. Within such a hydrogel cell culture, a homogenous distribution of cells, as well as a cellular uptake of MSNs within the peptide network, was observed. Consequently, a desired active uptake of MSNs could be obtained as well. Furthermore, the interaction of MSNs with the surrounding peptide molecules was identified as an important, influencing factor for the cellular uptake of MSNs. By variations in the interaction between differently shaped and functionalized MSNs and the surrounding peptide, the formation of a peptide-corona could be tuned. Due to this altered peptide-corona it was possible to influence the cellular uptake of MSNs. Even though this interaction and the resulting cellular uptake could be tuned, it was not possible to identify a system with a delayed uptake of MSNs. This would be beneficial for a controlled and staged delivery of potential drugs for tissue engineering applications.

To overcome this still unsolved problem further, hybrid hydrogel formulations were tested in a 3D-printing approach. The formulations consisted mainly of hyaluronic acid, differently surface functionalized MSNs, and functionalized polyglycidols, that build up a 3D-network upon irradiation with UV-light.

Performing rheological measurements of the un-gelled formulations, the incorporated MSN showed no influence on the shear thinning behavior. Due to this, the printing of precise hydrogel strands was possible. By electrostatic interactions between differently charged particles and the surrounding hyaluronic acid, the migration behavior, as well as the general interaction of these particles within printed strands, could be influenced.

Thereby, two main influencing factors for the mobility of MSNs inside a printed hydrogel, and their release in a surrounding media, were identified. These are the surface charge of MSN and the printing geometry of printed strands. Using either positive or negative charged MSN inside the printed hydrogel, different release kinetics of MSNs into the surrounding cell culture media could be obtained. Using gold nanoparticles instead of MSNs, a material independent interaction and release behavior was shown.

In accordance to the changed release kinetics of differently charged particles from hydrogel structures, a delayed cellular uptake for positively charged, amino-functionalized MSN could be detected.

Finally, loading of three potential drugs into different surface functionalized mesoporous silica nanoparticles for tissue engineering applications was performed. Here, independent of the selected drug, an increased interaction, mainly based on hydrophobic interactions, with amino-functionalized MSN could be observed. This increased interaction led to a higher loading degree of these particles in comparison to COOH-functionalized MSN.

In this thesis, some basic and necessary requirements for materials in tissue engineering applications were fulfilled by using new hybrid systems. This includes a local application of such materials, and a phased and delayed uptake of incorporated carrier systems (MSN). Furthermore, important influencing factors for the understanding of interactions between particles and the surrounding components in a 3D-hybrid hydrogel cell culture were identified. By using a wide variety of MSN with different surface functionalizations, it was possible to control the interactions between particles and the surrounding network. Based on the tunable interaction, the cellular uptake of particles could be controlled as well. Consequently, it was possible to obtain a clearly delayed cellular uptake of MSN in a 3D hydrogel cell culture, for the first time in literature, using a 3D-printed hydrogel structure.

The use of hybrid materials is a promising approach to realize a controlled cell growth, and thus a successful tissue engineering application in the future.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung der Dissertation.....	V
Abstract	IX
Inhaltsverzeichnis	XII
Erläuterungen	XVIII
Nomenklatur.....	XXII
Abbildungsverzeichnis	XXIII
Tabellenverzeichnis	XLIII
I Einleitung.....	45
1. Regenerative Medizin (<i>Tissue Engineering</i>)	45
2. Allgemeine Eigenschaften der Materialien	47
3. Vorgehen bei der Geweberekonstruktion.....	49
4. Wirkstoffe in der Geweberekonstruktion	50
5. Aufbau von Mehrkomponentensystemen	53
6. Verwendung von mesoporösen Silikanano-partikeln als Wirkstoffträger.....	55
II Motivation und Zielsetzung.....	58
III Synthese mesoporöser Silikananopartikel	61
1. Theorie.....	61
1.1 Das Sol-Gel Verfahren	61
1.2 Einführung von Mesoporen	64
1.3 Einführung von Oberflächenfunktionalisierungen.....	65
2. Ergebnisse und Diskussion – Synthese und Charakterisierung funktionalisierter mesoporöser Silikananopartikel	67
2.1 Sphärische Partikel	67
2.1.1 Amino- und Carboxyfunktionalisierung von S200 und S400 MSN	67
2.1.2 Glukosefunktionalisierung von S200 MSN.....	74

2.1.3	Hyaluronsäurefunktionalisierung von S200 MSN.....	79
2.2	Stäbchenförmige mesoporöse Silikapartikel mit unterschiedlichen Funktionalisierungen.....	85
3.	Zusammenfassung aller synthetisierten Partikel	88
IV	Hybride Hydrogele für Anwendungen im Bereich der Geweberekonstruktion.....	91
1.	Theorie.....	91
1.1	Extrazelluläre Matrix (EZM).....	91
1.2	Hydrogele	92
1.3	Selbstassemblierende Peptide	93
2.	Ergebnisse und Diskussion – Injizierbare hybride Hydrogele	97
2.1	Allgemeine Machbarkeit eines injizierbaren hybriden-Hydrogels.....	97
2.2	Hybride Hydrogele mit eingebrachten sphärischen amino- und carboxyfunktionalisierten MSN ^[125]	102
2.2.1	Strukturuntersuchung.....	102
2.2.1.1	Untersuchung der Sekundärstruktur gebildeter Hydrogelnetzwerke in An- und Abwesenheit unterschiedlicher MSN.....	102
2.2.1.2	Verteilung von MSN in hybriden Hydrogelnetzwerken.....	104
2.2.1.3	Auswaschung von Partikeln aus hybriden Hydrogelnetzwerken ^[125] ..	109
2.2.2	Bestimmung rheologischer Eigenschaften von injizierbaren Hydrogelen	112
2.2.3	Verteilung, Wachstum und Zytotoxizität von MC3T3-E1 Zellen in einem RADA16-I basierten Hydrogel ^[125]	117
2.2.4	Aufnahme von Partikeln in 2D- und 3D-Zellkultur ^[125]	120
2.2.5	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und MSN in hybriden Hydrogelen ^[125]	132
2.2.6	Einfluss von Serumproteinen auf die Aufnahme von MSN durch MC3T3-E1 Zellen in hybrider Hydrogelzellkultur ^[125]	139

2.3	Veränderung des zellulären Aufnahmeverhaltens durch Variation der Oberflächenmodifikation	143
2.3.1	Glucosefunktionalisierungen von S200 Partikeln	143
2.3.1.1	Strukturuntersuchung hybrider Hydrogele	144
2.3.1.2	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und eingebrachten MSN	145
2.3.1.3	Aufnahme von glucosefunktionalisierten MSN in MC3T3-E1 Zellen..	148
2.3.2	Hyaluronsäure-Funktionalisierung von S200 Partikeln	151
2.4.2.1	Strukturuntersuchung hybrider Hydrogele	151
2.3.2.2	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und eingebrachten MSN	153
2.3.2.3	Aufnahme von hyaluronsäurefunktionalisierten MSN in MC3T3-E1 Zellen.....	154
2.4	Variation der zellulären Aufnahme durch Variation der Partikelmorphologie	156
2.4.1	Strukturuntersuchung hybrider Hydrogele	157
2.4.2	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und eingebrachten stäbchenförmigen MSN.....	159
2.4.3	Aufnahme von stäbchenförmigen Partikeln in MC3T3-E1 Zellen	163
2.5	Zusammenfassung.....	167
V	3D-Druck für die Geweberekonstruktion	168
1.	Theorie.....	168
2.	Ergebnisse und Diskussion – 3D gedruckte hybride Hydrogele	171
2.1	Aufbau eines druckbaren Systems	171
2.2	Rheologische Charakterisierung des hybriden Hydrogelsystems ^[173]	173
2.3	Verdruckung hybrider Hydrogel Formulierungen ^[173]	175
2.4	Strukturelle Aufklärung gedruckter hybrider Hydrogelstränge ^[173]	177

2.5	Beweglichkeit von MSN innerhalb eines gedruckten Konstrukts ^[173]	180
2.6	Zelluläre Aufnahme von freigesetzten MSN in C2C12 Zellen ^[173]	183
2.7	Einbringung von Goldnanopartikeln in 3D-gedruckte hybride Hydrogelformulierungen ^[173]	186
2.8	Zusammenfassung.....	188
VI	Wirkstoffbeladung.....	189
1.	Beladung von MSN mit GW9662	190
2.	Beladung von MSN mit Wnt-Agonist.....	195
3.	Beladung von MSN mit Roscovitin	198
VII	Experimentalteil	202
1.	Verwendete Chemikalien	202
2.	Messgeräte und Methoden	204
3.	Synthese unterschiedlicher Silikananopartikel	207
3.1	Synthese sphärischer, mesoporöser Silikananopartikel unterschiedlicher Größen (S200 und S400)	207
3.2	Templatentfernung	208
3.2.1	Extraktion.....	208
3.2.2	Kalzinierung.....	208
4.	Synthese nichtporöser Silikananopartikel (NP200-OH)	208
5.	Synthese mesoporöser Silikananopartikel mit unterschiedlichen Länge-Breite-Verhältnissen (Z1- Z4).....	209
6.	Post-Funktionalisierung.....	210
6.1	Post-synthetische NH ₂ -Funktionalisierung	210
6.2	Post-synthetische COOH-Funktionalisierung.....	210
6.3	EDC/NHS Kupplungsreaktion	211
6.4.	Glucosefunktionalisierung unterschiedlicher S200 MSN.....	211
6.4.1	Glucosaminfunktionalisierung von S200-COOH	211

6.4.2	Glucuronsäurefunktionalisierung	212
6.5	Hyaluronsäure(HS)-Funktionalisierung	213
7.	Fluoreszenzfarbstoffmarkierung von Partikeln	213
7.1	Fluoreszenzmarkierung mit ATTO-NH ₂ Farbstoffen	214
7.2	Fluoreszenzmarkierung mit ATTO-NHS Farbstoffen	214
8.	Dispersionsstabilität in Sucrose	214
9.	Funktionalisierung von Glasplättchen	215
10.	RADA16-I basiertes hybrides Hydrogel	216
10.1	Herstellung hybrider Hydrogele	216
10.2	Elektronenmikroskopische Analyse hybrider Hydrogelnetzwerke	216
10.3	RADA16-I Adsorptionstests und anschließende Bestimmung des Zeta-Potentials	217
10.4	Rheologische Messungen	219
10.5	ThT-Färbung	219
10.6	Biologische Evaluation	220
10.6.1	Zellkultur und FACS-Messungen mit MC3T3-E1	220
10.6.2	Konfokale Laser-Mikroskopie (KLM)	220
10.6.3	Konfokale RAMAN-Mikroskopie (KRM) Parameter	221
11.	3D-Verdruckung eines HS basierten hybriden Hydrogels	222
11.1	Herstellung der Einzelkomponenten	222
11.1.1	Partikelsynthese	222
11.1.1.2	Post-synthetische Modifikation zur Herstellung von S400-COOH Partikeln	222
11.1.1.3	Fluoreszenzfarbstoffmarkierung	222
11.1.2	Synthese und Charakterisierung von P(AGE-co-G) und (PG-SH)	222
11.1.3	Goldnanopartikel (AuNP) Synthese, Funktionalisierung und Charakterisierung	223

11.2	Langzeitdispersionsstabilität in Phosphat-gepuffertter Salzlösung (PBS)	223
11.3	Rheologische Messungen	223
11.4	Herstellung der Druckpaste	224
11.5	3D-Verdruckung.....	224
11.6	Quantifizierung der Freisetzung von Goldnanopartikeln	225
11.7	Biologische Evaluation.....	225
11.7.1	Zellkultur	225
11.7.2	Konfokale Laser-Mikroskopie (KLM)	225
12.	Beladung von MSN mit Wirkstoffen	226
12.1	GW9662	226
12.2	Wnt-Agonist.....	227
12.3	Roscovitin	227
VIII	Anhang.....	228
IX	Literaturverzeichnis	242
	Danksagung	251
	Curriculum Vitae	253
	Publikationen.....	254
	Erklärung.....	257

Erläuterungen

- Bei hochgestellten arabischen Ziffern handelt es sich um Verweise auf das Literaturverzeichnis, welches am Ende der Arbeit zu finden ist.
- Das folgende Abkürzungs- und Symbolverzeichnis dient der Erläuterung von in Text, Abbildungen und Tabellen verwendeten Termini.

Abkürzungen

AF	<u>A</u> dditive <u>F</u> ertigung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<u>a</u> tomic <u>f</u> orce <u>m</u> icroscopy),
a.u.	Willkürliche Einheiten (<u>a</u> rbitrary <u>u</u> nits)
Au	Gold (<u>A</u> urum)
AuNP	Goldnanopartikel (<u>a</u> urum <u>n</u> anop <u>a</u> rticles)
APTES	(3- <u>A</u> minopropyl) <u>t</u> ri <u>e</u> thoxysilan
APTMS	(3- <u>A</u> minopropyl) <u>t</u> ri <u>m</u> ethoxysilan
ATTO-XXX	Fluoreszenzfarbstoff benannt nach dem Hersteller <u>ATTO</u> -Tec
BET	Methode nach <u>B</u> runauer, <u>E</u> mmet und <u>T</u> eller
BMP	knochensubstanzbildendes Protein (<u>b</u> one <u>m</u> orphogenic <u>p</u> rotein)
CD	<u>C</u> ircular <u>d</u> ichroismus
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<u>c</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inases)
C ₁₆ TAB	<u>C</u> etyl <u>t</u> rimethylammonium <u>b</u> romid
C ₁₆ TAC	<u>C</u> etyl <u>t</u> rimethylammonium <u>ch</u> lorid
cmc	Kritische Mizellbildungskonzentration (<u>c</u> ritical <u>m</u> icelle <u>c</u> oncentration)

DCM	<u>D</u> ic <u>h</u> l <u>o</u> r <u>m</u> ethan
DLS	<u>D</u> yn <u>a</u> mische <u>L</u> ic <u>h</u> t <u>s</u> t <u>r</u> e <u>u</u> ng
DMEM	<u>D</u> ul <u>b</u> e <u>c</u> c <u>o</u> 's <u>m</u> o <u>d</u> i <u>f</u> i <u>e</u> d <u>e</u> a <u>g</u> l <u>e</u> <u>m</u> e <u>d</u> i <u>u</u> m
DMSO	<u>D</u> i <u>m</u> e <u>t</u> h <u>y</u> l <u>s</u> u <u>l</u> f <u>o</u> x <u>i</u> d
EDC	1- <u>E</u> thyl-3-(3- <u>d</u> i <u>m</u> e <u>t</u> h <u>y</u> l <u>a</u> m <u>i</u> n <u>o</u> p <u>r</u> o <u>p</u> yl) <u>c</u> ar <u>b</u> o <u>d</u> i <u>i</u> m <u>i</u> d
EG	<u>E</u> thylenglykol
EtOH	Ethanol (<u>E</u> thylal <u>k</u> o <u>h</u> o <u>l</u>)
EZM	<u>E</u> xtrazelluläre <u>M</u> atrix
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FIB	Ionenfeinstrahl (<i>Focused Ion Beam</i>)
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> th <u>i</u> o <u>c</u> ya <u>n</u> at
FT-IR	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransformations- <u>I</u> nfrar <u>o</u> t
Gew%	<u>G</u> ew <u>i</u> ch <u>t</u> s <u>p</u> ro <u>z</u> e <u>n</u> t
HS	<u>H</u> yaluron <u>s</u> äure
HeLa	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) benannt nach der ersten Patientin: <u>H</u> en <u>r</u> i <u>e</u> tta <u>L</u> ack <u>s</u>
HEPES	2-[4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1-piperazinyl]- <u>e</u> thansulfonsäure
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma (<i>inductively coupled plasma</i>)
IEP	<u>I</u> so <u>e</u> lektrischer <u>P</u> unkt
KRM	<u>K</u> onfokale <u>R</u> aman- <u>M</u> ikroskopie
KLM	<u>K</u> onfokale <u>L</u> aser- <u>M</u> ikroskopie
LVE	<u>L</u> inear- <u>v</u> isko <u>e</u> lastisch
MFI	<u>M</u> ittlere <u>F</u> luoreszenz <u>i</u> ntensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)

min	<u>M</u> inute
MS	<u>M</u> assens <u>s</u> pektroskopie
MSN	<u>M</u> esoporöse <u>S</u> ilika <u>n</u> anopartikel
NHS	<u>N</u> - <u>H</u> ydroxy <u>s</u> uccinimid
NL-DFT	<u>N</u> icht- <u>l</u> okale <u>D</u> ichtefunktionaltherorie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglycol
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid) (<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
PHBV	<u>P</u> oly(3- <u>h</u> ydroxy <u>b</u> utyrat-co-3- <u>h</u> ydroxy <u>v</u> alerat)
ppb	Teile pro Milliarde (<i>parts per billion</i>)
PZC	Ladungsnullpunkt (<i>point of zero charge</i>)
REM	<u>R</u> aster <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskopie
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SAP	<u>S</u> elbst <u>a</u> ssemblierendes <u>P</u> eptid
SBA-3	mesoporöses Silikamaterial der Bezeichnung <u>S</u> anta <u>B</u> arbara <u>A</u> morphous- <u>3</u>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS- <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> e <u>e</u> lektrophorese
TEM	<u>T</u> ransmission <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskopie
TEOS	<u>T</u> etra <u>e</u> thyl <u>o</u> rthos <u>i</u> likat
TG	<u>T</u> hermogravimetrie
ThT	<u>T</u> hioflavin <u>T</u>
TMOS	<u>T</u> etra <u>m</u> ethyl <u>o</u> rthos <u>i</u> likat
UV	<u>U</u> ltraviolettstrahlung

ÜZ	Übergangszustand
vis	Licht des sichtbaren Bereiches (<i>visible light</i>)
Vol%	Volumenprozent

Symbole

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
c_{eq}	Gleichgewichtskonzentration
d_{DLS}	Partikeldurchmesser bestimmt durch DLS-Messungen
$d_{Pore, NL-DFT}$	Porendurchmesser bestimmt basierend auf der NL-DFT Theorie
d_{TEM}	Partikeldurchmesser bestimmt aus TEM-Aufnahmen
h	Stunde
p/p_0	Relativdruck
R	ideale Gaskonstante
r	Radius
s	Sekunde
S	Sphärische Partikel
S_{BET}	spezifische Oberfläche nach Brunauer, Emmett und Teller
T	Temperatur
t	Zeit
Z	Zylindrische, stäbchenförmige Partikel
ζ-Pot.	Zeta-Potential
λ	Wellenlänge

Nomenklatur

Zugrundeliegende Partikelbezeichnung nach **Größe und Form**:

S400	Sphärische mesoporöse Silikananopartikel $\varnothing \sim 400$ nm
S200	Sphärische mesoporöse Silikananopartikel $\varnothing \sim 200$ nm
Z1	Sphärische mesoporöse Silikananopartikel $\varnothing \sim 100$ nm
Z1,5	Zylindrische mesoporöse Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 1,5 zu 1
Z2	Zylindrische mesoporöse Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2 zu 1
Z4	Zylindrische mesoporöse Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4 zu 1

Bezeichnung unterschiedlicher **Oberflächenfunktionalisierungen** am Beispiel von sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser von 200 nm.

S200-NH ₂	Funktionalisierung mit Amino (-NH ₂) Gruppen
S200-COOH	Funktionalisierung mit Carboxy (-COOH) Gruppen
S200-NH ₂ -Glu-X	Funktionalisierung mit Glucuronsäure X gibt die Menge an eingesetzter Glucuronsäure in μmol an.
S200-COOH-Glu-X	Funktionalisierung mit Glucosamin X gibt die Menge an eingesetztem Glucosamin in μmol an.
S200-HS-X	Funktionalisierung mit Hyaluronsäure (HS) (1500-1800 kDa), X gibt die Menge an eingesetzter Hyaluronsäure in Gew% an.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Anzahl an Veröffentlichungen zum Thema "Tissue Engineering" und unterschiedlichen Zielgeweben. Stand PubMed 06.02.18. Verwendete Suchbegriffe: »tissue engineering«, »bone tissue engineering«, »cartilage tissue engineering«, »skin tissue engineering« und »nerve tissue engineering«. 46
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der Geweberekonstruktion. Nach „Nanotechnological strategies for engineering complex tissues“.^[22] 49
- Abbildung 3: Aufnahme von DiO beladenen MSN-NH₂ (rot) in C2C12 Zellen (blau) nach zwölf sowie 24 h und Freisetzung des Modellwirkstoffs (grün) innerhalb der Zellen. Verändert nach „ Mesoporous silica particle-PLA–PANI hybrid scaffolds for cell-directed intracellular drug delivery and tissue vascularization “^[44] mit freundlicher Genehmigung von *The Royal Society of Chemistry*. 54
- Abbildung 4: Funktionalisierungsmöglichkeiten und Beladung von mesoporösen Silikananopartikeln. Nach „Mesoporous silica nanoparticles for the design of smart delivery nanodevices“^[45]. 55
- Abbildung 5: Reaktionen von Alkoxysilanen zur Bildung eines Silikanetzwerks unter basischen Bedingungen.^[54] 62
- Abbildung 6: pH-Wert abhängige Hydrolyse- und Kondensationsreaktionsgeschwindigkeit. Verändert nach D. Schaefer, “Polymers, Fractals, and Ceramic Materials”^[57]. Mit freundlicher Genehmigung von AAAS und Prof. D. Schaefer. 63
- Abbildung 7: Exemplarische elektronenmikroskopische Darstellung der Porosität und Morphologie von NH₂-funktionalisierten, sphärischen Partikeln. A) Querschnitt von S200-NH₂ Partikeln zur Visualisierung der Porenstruktur, b) TEM Aufnahme von S200-NH₂ Partikeln und c) REM Aufnahme von S200-NH₂. d) Querschnitt von S400-NH₂ Partikeln zur Visualisierung der Porenstruktur, e) TEM Aufnahme von S400-NH₂ Partikeln und f) REM Aufnahme von S400-NH₂. 68

Abbildung 8:	Größenverteilung unterschiedlich funktionalisierter S200 (a) und S400 (b) Partikel.	69
Abbildung 9:	Exemplarische Stickstoffsorptionsmessung (a) und Bestimmung des Porendurchmessers mittels nicht-lokaler Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT-Methode) für sphärische S200 Partikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung.	70
Abbildung 10:	TGA-Messungen von sphärischen S200 a) und S400 b) Partikeln mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalitäten. Die erhaltenen Massenverluste wurden auf eine Temperatur von 150 °C normiert.....	72
Abbildung 11:	Exemplarische Darstellung der Partikelmorphologie von a) S200-NH ₂ -Glu und b) S200-COOH-Glu Partikeln. Glukosederivatkonzentration jeweils 280 µmol/g Partikel.....	74
Abbildung 12:	Partikelgrößenverteilung vor und nach der Anbindung unterschiedlicher Mengen an Glucuronsäure a) bzw. Glucosamin b).....	75
Abbildung 13:	TGA Untersuchung von Glukose funktionalisierten MSN ausgehend von S200-NH ₂ Partikeln mit steigendem Einsatz an Glucuronsäure. Normiert auf 150 °C.	75
Abbildung 14:	Stickstoffsorptionsmessungen von mesoporösen Silikananopartikeln, vor sowie nach der Anbindung unterschiedlicher Mengen an Glucosamin a) bzw. Glucuronsäure b). Die Suffixe 0-0,28 geben die jeweils verwendeten Mengen an Glucosederivaten in mmol/g an.	76
Abbildung 15:	Darstellung der Porenverteilung vor und nach der Funktionalisierung von S200-COOH bzw. S200-NH ₂ Partikeln mit Glucosamin a) bzw. Glucuronsäure b).....	77
Abbildung 16:	Ausschnitt aus der Strukturformel von Hyaluronsäure.	79
Abbildung 17:	TEM- und TEM-Querschnittsaufnahmen von Hyaluronsäure-modifizierten S200 Partikeln. A und c) S200-HS-5 Partikel; b und d) S200-HS-30 Partikel. Die Suffixe 5 bzw. 30 stellen die Einsatzmenge von HS in Gew% dar.	81
Abbildung 18:	Partikelgrößenverteilung vor und nach der Anbindung unterschiedlicher Mengen an Hyaluronsäure.	81
Abbildung 19:	A) Exemplarische Stickstoffsorptionsmessung und b) Bestimmung des Porendurchmessers mittels nicht-lokaler Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT-	

	Methode) für sphärische S200 Partikel, welche mit unterschiedlichen Mengen (5-30 Gew%) HS funktionalisiert wurden.	82
Abbildung 20:	Darstellung exemplarischer TGA-Messungen von S200-HS-funktionalisierten Partikeln. Die Funktionalisierung erfolgte auf Basis von S200-NH ₂ Partikeln mit unterschiedlichen Mengen an HS (5-30 Gew%). Die Messungen wurden normiert auf eine Temperatur von 150 °C.	83
Abbildung 21:	Darstellung der Abhängigkeit zwischen Oberflächenladung und verwendeter Hyaluronsäure-Menge. Die aufgeführten Massenverluste wurden in jeweiligen TGA-Messungen zwischen 150 °C und 600 °C bestimmt.	84
Abbildung 22:	Darstellung der Morphologie von stäbchenförmigen, unfunktionalisierten Silikananopartikeln, a)-d) mit Länge-zu-Breite-Verhältnissen von Z1; Z1,5; Z2 sowie Z4. Die Visualisierung des Porensystems erfolgte anhand von Querschnittsaufnahmen der jeweiligen Partikel e)-h).	85
Abbildung 23:	Schematische Darstellung der Synthese sphärischer Silikananopartikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung.	88
Abbildung 24:	Schematische Darstellung der Synthese stäbchenförmiger mesoporöser Silikananopartikel unterschiedlicher Länge-Breite-Verhältnisse und unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung.	89
Abbildung 25:	Konfokale Raman Mikroskopie zur Positionsbestimmung von MSN in einem hybriden RADA16-I Hydrogel. A) Hell-Dunkel Bild zur Detektion von S200-NH ₂ (hellgelb) in einem RADA16-I Hydrogel (orange-rot). Schwarze Bereiche nicht im Fokus; b) Einzelspektren von im Hydrogel enthaltenem Wasser (blau) und Partikeln (rot) aus der Graph Basis Analyse.	99
Abbildung 26:	Konfokale Raman Mikroskopie zur Darstellung von HeLa Zellen in einem RADA16-I Hydrogel. A) Hell-Dunkel Bild einer Zelle innerhalb des Hydrogels. Schwarze Bereiche nicht im Fokus. B) Darstellung von einzelnen Zellbereichen nach Anwendung einer Cluster Analyse (rot= Zellkern, grün= Zytoplasma, blau= umgebendes Wasser innerhalb des Hydrogels). Die zugehörigen Spektren einzelner identifizierter Cluster sind in c) dargestellt.	100

- Abbildung 27: Konfokale Raman Mikroskopie zur Detektion der Aufnahme von MSN durch HeLa-Zellen innerhalb eines hybriden Hydrogels basierend auf RADA16-I (0,25 Gew%). A) Lichtmikroskopische Aufnahme einer entsprechenden Zelle innerhalb eines hybriden Hydrogelnetzwerks. B) Hell-Dunkel-Bild der selben Zelle. Dabei kann die Position der Partikel (hellgelbe Punkte) durch deren Streusignal innerhalb der Zelle detektiert werden. 101
- Abbildung 28: Nachweis von β -Faltblatt-Fibrillen in einem RADA16-I Hydrogel in An- und Abwesenheit von unterschiedlichen, oberflächenfunktionalisierten MSN. Die Konzentration an MSN beträgt in allen Messungen 0,5 mg/mL. 103
- Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung von (hybriden) Hydrogelen mit eingebrachten MSN verschiedener Oberflächenfunktionalisierung. A) pures, feinfibrilläres RADA16-I Hydrogelnetzwerk, b) S200-NH₂ (0,5 mg/mL), c) S200-COOH (0,5 mg/mL), d) S200-NH₂ (10 mg/mL), e) S200-COOH (10 mg/mL). Die roten Sterne markieren einzelne Partikel auf der Oberfläche des Peptidnetzwerks. .. 105
- Abbildung 30: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen von RADA16-I Hydrogelen in An- und Abwesenheit von MSN mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen. A) pures RADA16-I Hydrogelnetzwerk ohne eingebrachte Partikel, b) Vergrößerung von ausgebildeten und gefärbten RADA16-I Fibrillen in einem puren RADA16-I Hydrogel, c) 0,5mg/mL S200-NH₂-haltiges Hydrogel, d) 10 mg/mL S200-NH₂-haltiges Hydrogel, e) 0,5 mg/mL S200-COOH-haltiges Hydrogel, f) 10 mg/mL S200-COOH-haltiges Hydrogel. 107
- Abbildung 31: Ionenfeinstrahl-REM (FIB-REM) Messungen eines hybriden Hydrogelnetzwerks mit enthaltenen S200-NH₂ Partikeln der Konzentrationen a) 0,5 mg/mL und b) 10 mg/mL. 108
- Abbildung 32: Auswaschung von MSN aus hybriden Hydrogelen bei deren Herstellung. Angegeben als absolut ausgewaschene Menge an Partikeln und prozentualer Verlust gegenüber der initial eingesetzten Menge an Partikeln. Die untersuchten Gelkonzentrationen betragen 0,125 Gew% und 0,25 Gew%. Es wurden Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm und unterschiedlich funktionalisierten (-NH₂ oder -COOH) Oberflächen

- untersucht. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry..... 109
- Abbildung 33: Auswaschung von MSN aus hybriden Hydrogelen bei deren Herstellung. Angegeben als absolut ausgewaschene Menge an Partikeln und prozentualer Verlust gegenüber der initial eingesetzten Menge an Partikeln. Die untersuchten Gelkonzentrationen betragen 0,125 Gew% und 0,25 Gew%. Es wurden Partikel mit einem Durchmesser von 400 nm und unterschiedlich funktionalisierten (-NH₂ oder -COOH) Oberflächen untersucht. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry..... 110
- Abbildung 34: Auftragung der Viskosität gegen Scherrate für ungelierete (hybride) Hydrogele bei Verwendung NH₂-funktionalisierter MSN unterschiedlicher Geometrie (sphärisch=S200, stäbchenförmig=Z4) und Konzentration. .. 112
- Abbildung 35: Auftragung der Viskosität gegen Scherrate für ungelierete Systeme bei Verwendung unterschiedlicher Partikeloberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ und -COOH) und -konzentrationen. A) Verwendung von sphärischen S200 Partikeln, b) Verwendung von stäbchenförmigen Z4 Partikeln..... 113
- Abbildung 36: Amplituden-Sweep zur Bestimmung des LVE-Bereichs gelierter Proben bei Verwendung einer Anregungsfrequenz von 10 Hz. Die Messung erfolgte für hybride Hydrogele mit entweder sphärischen S200-NH₂ Partikeln a) oder stäbchenförmigen Z4 Partikeln b)..... 114
- Abbildung 37: Amplituden-Sweep zur Bestimmung des LVE-Bereichs gelierter Proben bei Verwendung unterschiedlich funktionalisierter Partikel und einer Anregungsfrequenz von 10 Hz. Die Messung erfolgte für hybride Hydrogele mit a) sphärischen S200 Partikeln oder b) stäbchenförmigen Z4 Partikeln. (*Keine Gelierung für S200-COOH 5 mg/mL zu beobachten, daher wurde diese Kurve nicht aufgetragen.)..... 115
- Abbildung 38: Visualisierung des Zellwachstums innerhalb eines 3D-Hydrogelnetzwerks mittels konfokaler Laser-Mikroskopie. Die Visualisierung erfolgte nach einer Zellkulturdauer von 24 h in einem 0,125 Gew% RADA16-I Hydrogel.

- Zellfärbung: Rot=Neutralrot zur Färbung der lebenden Zellen; blau= DAPI (Zellkern). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry..... 117
- Abbildung 39: Bestimmung der Zellviabilität von MC3T3-E1 Zellen bei Verwendung unterschiedlicher Zellzahlen in 2D-Monolagen Zellkultur und 3D-Zellkultur in einem Hydrogelnetzwerk (a: 0,125 Gew% RADA16-I, b: 0,25 Gew% RADA16-I). Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten und die daraus bestimmte Standardabweichung. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 118
- Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von MC3T3-E1 Zellen nach einer Zellkulturdauer von a) 7 und b) 14 Tagen (bzw. 11 Tage nach Einleitung der Zelldifferenzierung durch Zugabe von Ascorbinsäure und β -Glycerinphosphat.). Für die Aufnahme wurden die Zellen mittels Formaldehyd fixiert und angefärbt (rot = Aktinskelett, blau = Zellkern). Die weißen Pfeile zeigen dendritische Zellstrukturen an, die auf eine Differenzierung dieser Zellen zurückzuführen sind. Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 100 μm . Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 119
- Abbildung 41: A) TEM-Querschnitt einer MC3T3-E1 Zelle ohne Inkubation mit einer Partikeldispersion, b) Visualisierung der Aufnahme von S200-NH₂ in MC3T3-E1 Zellen mittels TEM-Querschnitten nach Inkubation mit einer 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Partikeldispersion (N= Nukleus, Z= Zytoplasma, T= TEM-Träger Oberfläche, Stern= Aufgenommene S200-NH₂ Partikel), c) Aufklärung des Aufnahmemechanismus von Partikeln in MC3T3-E1 Zellen mittels Acridinorange-Färbung (blau= Interkalation in Nukleinsäuren (Zellkern), grün= saure Kompartimente, rot= S200-NH₂ Partikel, gelb= Überlagerung der Einzelbilder). 121
- Abbildung 42: Zelltoxizität von MC3T3-E1 Zellen in hybrider 3D-Zellkultur in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an MSN. Hierfür wurden MSN

unterschiedlicher Größe (S200 und S400) und veränderter Oberflächenfunktionalisierung (-NH₂ und -COOH) untersucht. Die Bestimmung der Zelltoxizität wurde in Triplikaten durchgeführt. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry..... 122

Abbildung 43: A) Quantitative Bestimmung der Aufnahmemenge von S200-NH₂ und S200-COOH Partikeln in MC3T3-E1 Zellen nach 24 h und 48 h in 2D-Zellkultur, b) und c) exemplarische Darstellung einer qualitativen Bestimmung der Aufnahme von Partikeln in MC3T3-E1 Zellen in 2D-Zellkultur mittels konfokaler Laser-Mikroskopie: b) S200-NH₂, c) S200-COOH. (Farbcode: weiß = Zytoskelett, blau = Zellkern, rot = MSN der entsprechenden Funktionalisierung). Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 100 µm. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry..... 126

Abbildung 44: Quantifizierung der von M3T3-E1 Zellen aufgenommenen Partikel in 2D-Zellkultur mittels Durchflusszytometrie (FACS) Messungen. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry..... 127

Abbildung 45: A) Quantitative Bestimmung der Aufnahme von S200-NH₂ und S200-COOH Partikeln in MC3T3-E1 Zellen in einer hybriden 3D-Hydrogelzellkultur nach einer Kultivierungsdauer von 24 h bzw. 48 h in hybriden Hydrogelzellkulturen mit einer RADA16-I Menge von 0,125 Gew% oder 0,25 Gew%. B) und c) sind exemplarische Darstellung der Aufnahme von S200-NH₂ Partikeln nach einer Kultivierungsdauer von 24 h mittels KLM. D) und e) visualisieren exemplarische Darstellung der Aufnahme von S200-COOH Partikeln nach einer Kultivierungsdauer von 24 h mittels KLM. Dabei stellen b) und d) einen Querschnitt durch eine exemplarische Zelle und c) sowie e) eine 3D-Rekonstruktion der jeweiligen Zellen, welche mittels „LAS-X 3D viewer software“ erzeugt wurde, dar. Alle Maßstabsbalken beziehen sich

auf 10 µm. (Farbcode der KLM-Messungen: blau= DAPI zur Färbung des Zellkerns, weiß= Phalloidin-TRITC zur Färbung des Zytoskeletts, rot= Fluoreszenz gelabelte Partikel (b/c =S200-NH₂; d/e =S200-COOH). Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 10 µm. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 128

Abbildung 46: Bestimmung der in MC3T3-E1 aufgenommenen Menge an S200 bzw. S400 Partikeln in einer 3D-Zellkultur innerhalb eines hybriden Hydrogels. Die von Zellen aufgenommene Partikelmenge wurde nach 24 h bzw. 48 h mittels FACS-Messungen detektiert. A) Aufnahme von S200 Partikeln, b) Aufnahme von S400 Partikeln. Die Aufnahmemengen stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen dar. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 130

Abbildung 47: Darstellung des Verhältnisses aus der Aufnahme in 3D- vs. 2D-Zellkultur nach 24 h bzw. 48 h. Die bestimmten Aufnahmemengen (MFI) wurden mit der jeweiligen, partikelspezifischen Fluoreszenz bewertet. A) Verwendung von S200 Partikeln, b) Verwendung von S400 Partikeln. Die gestrichelte rote Linie gibt ein Verhältnis von 1 an, hier sind die Aufnahmen in 3D und 2D identisch. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 131

Abbildung 48: RADA16-I Adsorption auf NH₂- und COOH-funktionalisierten Nanopartikeln. Inkubation von 10 mg/mL Partikeln mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an RADA16-I (0,125 Gew% und 0,25 Gew%) für jeweils 15 min. Nach dem Abtrennen mittels Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der im Überstand verbliebenen Peptidkonzentration mittels *Fluorescamin-Assay*. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich jeweils auf Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels:

- factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry..... 133
- Abbildung 49: Bestimmung des Zeta-Potentials von unterschiedlich funktionalisierten Partikeln vor und nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an RADA16-I Peptid. Alle Messungen wurden mit einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL in 1 mM KCl-Lösung (aq) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 136
- Abbildung 50: Bestimmung des IEP für a) S200-COOH und b) S200-NH₂ nach der Inkubation mit unterschiedlich konzentrierten RADA16-I Lösungen. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und die verbleibenden Partikel mit MilliQ gewaschen. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (IEP) erfolgte bei einer Partikelkonzentration von 0,2 mg/mL in 1 mM KCl-Lösung (aq). 137
- Abbildung 51: Variation der Inkubationszeit für die Adsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) auf S200-COOH Partikel. Die Detektion der im Überstand verbleibenden Peptidmenge erfolgte nach Abzentrifugation der Partikel mittels *Fluorescamin-Assay*. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet. 138
- Abbildung 52: Einfluss von Serumproteinen auf die Aufnahme von MSN in hybriden Hydrogelen. A) Bestimmung der Aufnahme von S200-COOH und S400-COOH in hybriden Hydrogelen in An- und Abwesenheit von Serumproteinen (10 Vol%) im Zellkulturmedium mittels FACS-Messungen. B) Bestimmung der Aufnahme von S200-NH₂ und S400-NH₂ in hybriden Hydrogelen in An- und Abwesenheit von Serumproteinen im Zellkulturmedium mittels FACS-Messungen. SDS-Page von c) S200 Partikeln und d) S400 Partikeln mit und ohne Vorinkubation mit einer 0,25 Gew% RADA16-I Lösung. Die Seruminkubation erfolgte mit 80 Vol% fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS). (Zuordnung: U= unbehandelte, pure

Partikeldispersion, ohne fötales Kälberserum, F= nach FCS-Inkubation, R+F= RADA16-I Präinkubation mit anschließender FCS-Inkubation, L= Proteinreferenzen - *Ladder*). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 140

Abbildung 53: REM-Messungen zur Visualisierung der Verteilung von 0,5 mg/mL glucosefunktionalisierten MSN an der Oberfläche hybrider Hydrogelnetzwerke (a S200-NH₂-Glu-0,28, b S200-COOH-Glu-0,28). TEM-Querschnittsaufnahmen der Verteilung von c) 0,5 mg/mL sowie d) 10 mg/mL S200-NH₂-Glu-0,28 Partikeln im Inneren hybrider Hydrogelnetzwerke. TEM-Querschnittsaufnahmen der Verteilung von e) 0,5 mg/mL sowie f) 10 mg/mL von S200-COOH-Glu-0,28 Partikeln im Inneren hybrider Hydrogelnetzwerke..... 144

Abbildung 54: Adsorption des RADA16-I Peptids auf der Oberfläche von glucosefunktionalisierten Partikeln, welche auf der Basis von a) S200-NH₂ und b) S200-COOH hergestellt wurden. Die Inkubation mit einer 0,25 Gew% Peptidlösung erfolgte für 15 min. Eine anschließende Detektion der im Überstand verbleibenden Konzentration an RADA16-I wurde mittels *Fluorescamin-Assay* durchgeführt. In dem in der Nomenklatur enthaltenen Teil „Glu-X“ gibt das Suffix X die jeweilige, für die Funktionalisierung verwendete, Menge an Glucosederivat in µmol/g an. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen bestimmt. 146

Abbildung 55: Bestimmung von Zeta-Potentialen nach Adsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) auf der Partikeloberfläche von a) S200-NH₂-Glu und b) S200-COOH-Glu. Messung in 1 mM KCl-Lösung (aq.) und einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL. In dem in der Nomenklatur enthaltenen Teil „Glu-X“ gibt das Suffix X die jeweilige, für die Funktionalisierung verwendete, Menge an Glucosederivat in µmol/g an. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen bestimmt..... 147

- Abbildung 56: Zelluläre Aufnahme von glucosefunktionalisierten MSN in MC3T3-E1 Zellen innerhalb einer 3D-Zellkultur. Dargestellt sind glucosefunktionalisierte MSN ausgehend von sowohl S200-NH₂ als auch S200-COOH Partikeln mit aufsteigender Menge an verwendeter Glucuronsäure- bzw. Glucosaminkonzentration (0,01 = 10 µmol/g, 0,1 = 100 µmol/g und 0,28 = 280 µmol/g)..... 149
- Abbildung 57: Darstellung der Verteilung von Partikeln auf der Oberfläche (REM, a und d) und im Inneren (TEM-Querschnitte b, c, e und f) von hybriden Hydrogelnetzwerken mit einer RADA16-I Konzentration von 0,25 Gew%. Dargestellt sind die Verteilungen für S200-HS-5 (a, b und c) sowie für S200-HS-10 (d, e, f) Partikel. Die verwendeten Partikelkonzentrationen betragen für REM-Messungen 0,5 mg/mL. Für TEM-Querschnittsuntersuchungen wurden die Partikelverteilungen für geringe (0,5 mg/mL – b und e) sowie für hohe (10 mg/mL – c und f) Partikelkonzentrationen untersucht. Die in der Partikelbezeichnung enthaltenen Suffixe 5 und 10 geben die für die Funktionalisierung eingesetzte Menge an HS in Gew% an..... 152
- Abbildung 58: Bestimmung der Peptidadsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) auf die Partikeloberfläche von S200-NH₂, S200-HS-5 und S200-HS-10 Partikeln. Die während der Inkubation verwendete Partikelkonzentration innerhalb der hybriden Hydrogellösung betrug 10 mg/mL. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. Die Suffixe 5 und 10 in der Partikelbezeichnung geben die für die Funktionalisierung eingesetzte Menge an HS in Gew% an. 153
- Abbildung 59: Quantifizierung der zellulären Aufnahme von HS-modifizierten MSN in 3D-Zellkultur nach einer Kultivierungsdauer von 24 h bzw. 48 h. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Partikel wurden mittels Bewertungsfaktoren korrigiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (24 h). Für eine Zellaufnahme von HS-modifizierten MSN nach 48 h wurde lediglich eine Einfachbestimmung durchgeführt (markiert mit einem Stern). Die Suffixe 5 und 10 der

- Partikelbezeichnung geben die für die Funktionalisierung verwendete Menge an HS in Gew% an. 155
- Abbildung 60: REM-Untersuchung der Verteilung stäbchenförmiger Partikel auf der Oberfläche ausgebildeter hybrider Hydrogelnetzwerke. Hierbei wurden NH₂-funktionalisierte, stäbchenförmige Partikel unterschiedlicher Konzentration (0,5 mg/mL oder 10 mg/mL) und mit unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnissen eingesetzt. A) Z1,5 - 0,5 mg/mL, b) Z2 - 0,5 mg/mL, c) Z4 - 0,5 mg/mL, d) Z1,5 - 10 mg/mL, e) Z2 - 10 mg/mL, f) Z4 - 10 mg/mL. 157
- Abbildung 61: TEM-Untersuchung der Verteilung von NH₂-funktionalisierten, stäbchenförmigen Partikeln unterschiedlicher Konzentration (0,5 mg/mL oder 10 mg/mL) und mit unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnissen im Inneren von hybriden Hydrogelnetzwerken. A) Z1 100nm - 0,5 mg/mL, b) Z1,5 - 0,5 mg/mL, c) Z2 - 0,5 mg/mL, d) Z4 - 0,5 mg/mL, e) Z1 100nm - 10 mg/mL, f) Z1,5 - 10 mg/mL, g) Z2 - 10 mg/mL, h) Z4 - 10 mg/mL..... 158
- Abbildung 62: RADA16-I Adsorption auf NH₂- und COOH-funktionalisierten Nanopartikeln. Inkubation von 10 mg/mL Partikeln mit einer ungelierten RADA16-I Peptidlösung (0,25 Gew%) für jeweils 15 min. Nach dem Abtrennen mittels Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der im Überstand verbleibenden Peptidkonzentration mittels *Fluorescamin-Assay*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen..... 159
- Abbildung 63: Bestimmung der Zeta-Potentiale vor und nach der Inkubation von stäbchenförmigen MSN mit einer 0,25 Gew% RADA16-I Peptidlösung. Für die Bestimmung des Zeta-Potentials wurden die Partikel nach dem Abtrennen von der Peptidlösung mit MilliQ Wasser gewaschen, um lose gebundene Peptide zu entfernen. Die Messung des Zeta-Potentials erfolgte bei einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL in 1 mM KCl-Lösung (aq). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen..... 162
- Abbildung 64: Darstellung der mittels FACS bestimmten Menge an MSN, welche in einer 3D-Zellkultur (Peptidkonzentration: 0,25 Gew%) von MC3T3-E1 Zellen nach

- 24 h bzw. 48 h aufgenommen wurden. Die verwendeten Partikel wiesen dabei unterschiedliche Länge-Breite-Verhältnisse (Z1 - Z4) sowie unterschiedliche Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ und -COOH) auf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen..... 163
- Abbildung 65: Vergleich der zellulären Aufnahme sphärischer Partikel mit unterschiedlichen Partikeldurchmessern (100, 200, 400 nm) und Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ und -COOH) in Abhängigkeit des Zeta-Potentials, welches in Folge der Adsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) bestimmt wurde (1 mM KCl-Lösung (aq.)). Die jeweiligen aufgenommenen Partikelmengen wurden mit den Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden Partikel bewertet, wodurch unterschiedliche Markierungseffizienzen der Partikel ausgeglichen wurden. 165
- Abbildung 66: Schematische Darstellung der Schlüsseleigenschaften von Hydrogelformulierungen für den 3D-Druck. Nach „25th Anniversary Article: *Engineering Hydrogels for Biofabrication*“^[171]..... 169
- Abbildung 67: Bestimmung des scherverdünnenden Verhaltens druckbarer (hybrider) Hydrogelformulierungen. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission. 173
- Abbildung 68: Wiederherstellungstest von (hybriden) Hydrogelformulierungen bei Anregung mit abwechselnd hoher (5 1/s) und niedriger (0,1 1/s) Scherrate zur Ermittlung der entsprechenden Viskositäten. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission. 174
- Abbildung 69: A) Stereomikroskopische Aufnahme eines 4-lagigen gedruckten hybriden Hydrogelkonstrukts. B) Lichtbildaufnahme eines gedruckten hybriden Hydrogelkonstrukts mit 16 aufeinander gedruckten Strängen und einer Größe von 12 x 12 x 3 mm. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*,

- 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission..... 176
- Abbildung 70: TEM-Querschnitte zur Bestimmung der Partikelverteilung innerhalb eines gedruckten hybriden Hydrogels. Dabei wurde sowohl a) die Verteilung von S400-NH₂, als auch von b) S400-COOH Partikeln untersucht sowie c) die Verteilung einer 1:1 Mischung dieser beiden Partikel. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, Angew. Chemie - Int. Ed., 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission..... 177
- Abbildung 71: TEM-Querschnittsaufnahmen und REM-Messungen hybrider Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich funktionalisierten Partikeln (S400-NH₂ und S400-COOH), bestrahlt für 14 bzw. zwei Sekunden..... 178
- Abbildung 72: Untersuchung der Verteilung von Partikeln in einem gedruckten hybriden Hydrogelstrang mit einer Mischung aus S400-NH₂ (rot) und S400-COOH (grün) Partikeln. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, Angew. Chemie - Int. Ed., 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission..... 179
- Abbildung 73: 3D-Druck hybrider Hydrogelformulierungen mit unterschiedlicher Ausrichtung: a) senkrecht zueinander (mit direktem Kontakt zwischen beiden Strängen), b) parallel zueinander (ohne direkten Kontakt zwischen beiden Strängen). Das linke Bild zeigt eine schematische Darstellung der gedruckten Stränge direkt nach dem Druckprozess. Die restlichen Bilder zeigen die Verteilung der unterschiedlich Fluoreszenz-gelabelten Partikel (rot S400-NH₂, grün S400-COOH) innerhalb der gedruckten Konstrukte nach Lagerung in PBS-Puffer für einen Tag bzw. sechs Wochen. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, Angew. Chemie - Int. Ed., 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission..... 181
- Abbildung 74: Bestimmung der zellulären Aufnahme mittels konfokaler Laser-Mikroskopie. Die Messungen erfolgten nach einer Kultivierungsdauer von einem, drei und fünf Tagen. Auf Grund der geringen Zellzahl wurden an Tag

1 zwei unabhängige Messpunkte dargestellt. Die zelluläre Aufnahme wurde für gegossene Hydrogele, welche entweder S400-COOH, S400-NH₂ Partikel oder eine Mischung aus beiden Partikeln enthielten, bestimmt. Die Färbung der Zelle erfolgte mittels Phalloidin-TRITC (weiß) für das Zytoskelett und DAPI (blau) für den Zellkern. S400-COOH Partikel sind in grün dargestellt und S400-NH₂ Partikel in rot. Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 10 µm. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission..... 184

Abbildung 75: Freisetzung von unterschiedlich funktionalisierten Goldnanopartikeln (-NH₂ und -COOH) aus gegossenen hybriden Hydrogelnetzwerken, bestimmt mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission..... 186

Abbildung 76: Strukturformeln der potentiellen Wirkstoffe für die Beladung von MSN. A) GW9662, b) Wnt-Agonist, c) Roscovitin. 190

Abbildung 77: Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit GW9662 in Cyclohexan. 191

Abbildung 78: Bestimmung des minimalen Platzbedarfs von adsorbierten GW9662-Molekülen für steigende Beladungsschritte. 193

Abbildung 79: Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit Wnt-Agonist in DCM. ... 195

Abbildung 80: Bestimmung des minimalen Platzbedarfs von adsorbierten Wnt-Agonist-Molekülen für steigende Beladungsschritte. 196

Abbildung 81: Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit Roscovitin in DCM. 198

Abbildung 82: Bestimmung des minimalen Platzbedarfs von adsorbierten Roscovitin-Molekülen für steigende Beladungsschritte. 200

Abbildung 83: Schematische Darstellung der Aktivierung von COOH-Funktionalitäten auf der Oberfläche von MSN mittels EDC/NHS Kupplung. 211

Abbildung 84: Schematische Darstellung der Zellaussaat um ein gegossenes Hydrogel (blau), sowie der zur Bestimmung der zellulären Aufnahme verwendete Detektionsbereichs (grün). 226

- Abbildung 85: Elektronenmikroskopische Visualisierung der Porosität und Größenverteilung von eingesetzten, -COOH funktionalisierten Partikeln. A) Querschnitt von S200-COOH Partikeln, b) TEM-Aufnahme von S200-COOH Partikeln und c) REM-Aufnahme von S200-COOH. D) Querschnitt von S400-COOH Partikeln, e) TEM-Aufnahme von S400-COOH Partikeln und f) REM-Aufnahme von S400-COOH..... 228
- Abbildung 86: A) Stickstoffsorptionsmessung und b) Bestimmung des Porendurchmessers mittels NL-DFT-Methode für sphärische S400 Partikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. 228
- Abbildung 87: TGA-Untersuchung von glucosefunktionalisierten MSN ausgehend von S200-COOH Partikeln mit steigendem Einsatz an Glucosamin..... 229
- Abbildung 88: Darstellung der Stickstoffsorptionsmessungen mesoporöser, sphärischer und stäbchenförmiger Partikel mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. A) sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm, b) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1, c) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 1,5:1, d) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1. 229
- Abbildung 89: Darstellung der Porendurchmesser nach Anwendung der NL-DFT-Methode: a) sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm, b) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1, c) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 1,5:1, d) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1. 230
- Abbildung 90: Darstellung der mittels TGA bestimmten Massenverluste mesoporöser, sphärischer und stäbchenförmiger Partikel mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. A) sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm, b) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 1,5:1, c) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1, d) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1. Alle Messkurven wurden auf eine Temperatur von 150 °C normiert. 230

- Abbildung 91: Messung der Langzeitdispersionsstabilität für S200 und S400 Partikel unterschiedlicher Partikeloberflächenfunktionalisierung in Sucrose 10 Gew% über einen Zeitraum von 24 h mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS). 231
- Abbildung 92: REM-Untersuchung von RADA16-I Hydrogelnetzwerken a) ohne und b) mit Austausch des innerhalb des Netzwerks enthaltenen Wassers gegen Ethanol. 231
- Abbildung 93: TEM-Untersuchungen von RADA16-I Hydrogelen in An- und Abwesenheit von MSN unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierungen. A) pures RADA16-I Hydrogelnetzwerk ohne eingebrachte Partikel, b) 0,5mg/mL S400-NH₂-haltiges Hydrogel, c) 0,5mg/mL S400-COOH-haltiges Hydrogel d) Vergrößerung von ausgebildeten und gefärbten RADA16-I Fibrillen in einem puren RADA16-I Hydrogel, e) 10 mg/mL S400-NH₂-haltiges Hydrogel, f) 10 mg/mL S400-NH₂-haltiges Hydrogel. 232
- Abbildung 94: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung von (hybriden) Hydrogelen mit eingebrachten MSN verschiedener Oberflächenfunktionalisierung. A) pures RADA16-I Hydrogelnetzwerk, b) S200-NH₂ (0,5 mg/mL), c) S200-COOH (0,5 mg/mL, d) S200-NH₂ (10 mg/mL), e) S200-COOH (10 mg/mL). Die roten Sterne markieren einzelne Partikel auf der Oberfläche des Peptidnetzwerks. 232
- Abbildung 95: Vollständige Darstellung von Amplituden-Sweep Messungen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit NH₂-funktionalisierten Partikeln unterschiedlicher Form (sphärisch (S200) oder stäbchenförmig (Z4)) im gelierten Zustand. 233
- Abbildung 96: Vollständige Darstellung von Amplituden-Sweep Messungen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich geformten Partikeln und unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ oder -COOH). A) Messungen mit sphärischen S200 Partikeln und b) mit stäbchenförmigen Z4 Partikeln. Alle Messungen erfolgten im gelierten Zustand. * Bei Verwendung einer Konzentration von 5 mg/mL S200-COOH

- konnte kein stabiles Hydrogel gebildet werden, weshalb diese Messung nicht aufgeführt ist..... 233
- Abbildung 97: Vollständige Darstellung von Frequenz-Sweep Messungen bei einer konstanten Deformation von 0,1% inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich geformten Partikeln (sphärisch (S200) oder stäbchenförmig (Z4)) im gelierten Zustand. 234
- Abbildung 98: Vollständige Darstellung von Frequenz-Sweep Messungen bei einer konstanten Deformation von 0,1% inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich geformten Partikeln und unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ oder -COOH). A) Messungen mit sphärischen S200 Partikeln und b) mit stäbchenförmigen Z4 Partikeln. Alle Messungen erfolgten im gelierten Zustand. * Bei Verwendung einer Konzentration von 5 mg/mL S200-COOH konnte kein stabiles Hydrogel gebildet werden, weshalb diese Messung nicht aufgeführt ist..... 234
- Abbildung 99: A) TEM-Querschnitt einer MC3T3-E1 Zelle ohne Inkubation mit einer Partikeldispersion, b) Visualisierung der Aufnahme von S200-COOH in MC3T3-E1 Zellen mittels TEM-Querschnitten nach Inkubation mit einer 100 µg/mL Partikeldispersion (N= Nukleus, Z= Zytoplasma, T= TEM-Träger Oberfläche, Stern= Aufgenommene S200-COOH Partikel), c) Aufklärung des Aufnahmemechanismus von Partikeln in MC3T3-E1 Zellen mittels Acridiorange-Färbung (blau= Einlagerung in DNA (Zellkern), grün= saure Kompartimente, rot= S200-NH₂ Partikel, gelb= Überlagerung von sauren Kompartimenten und S200-COOH Partikeln). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 235
- Abbildung 100: Beispielhafte Kalibriergerade zur Auswertung der im Überstand befindlichen Menge an RADA16-I Peptid mittels *Fluorescamin-Assay*. .. 235
- Abbildung 101: Bestimmung der Fluoreszenzspektren vor und nach der Anbindung unterschiedlich funktionalisierter ATTO647N Farbstoffe an die Oberfläche von NH₂-(a), sowie COOH- funktionalisierter MSN (b). Die Bestimmung der

Fluoreszenz erfolgte bei einer Partikelkonzentration von 100 mg/mL in Sucroslösung (10 Gew%).....	236
Abbildung 102: TEM-Untersuchung der Verteilung von COOH-funktionalisierten, stäbchenförmigen Partikeln unterschiedlicher Konzentration (0,5 mg/mL oder 10 mg/mL) und unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnissen im Inneren von hybriden Hydrogelnetzwerken. A) Z1 100nm - 0,5 mg/mL, b) Z1,5 - 0,5 mg/mL, c) Z2 - 0,5 mg/mL, d) Z4 - 0,5 mg/mL, e) Z1 100nm - 10 mg/mL, f) Z1,5 - 10 mg/mL, g) Z2 - 10 mg/mL, h) Z4 - 10 mg/mL.....	236
Abbildung 103: Langzeitdispersionsstabilitätsmessungen für S400 Partikel unterschiedlicher Partikeloberflächenfunktionalisierung in Zellkulturmedium mit 10 Vol% fötalem Kälberserum (FCS) über einen Zeitraum von 24 h. Baumann <i>et al.</i> , Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, Angew. Chemie - Int. Ed., 2017, 56, 4623–4628. ^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.....	237
Abbildung 104: Frequenz-Sweep Messungen bei einer konstanten Deformation von 0,1% inklusive G' und G'' von hybriden 3D-druckbaren Hydrogelformulierungen mit und ohne sphärischen Partikeln unterschiedlicher Funktionalisierungen (S400-NH ₂ und S400-COOH). Alle Messungen erfolgten im ungelierten Zustand. Baumann <i>et al.</i> , Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, Angew. Chemie - Int. Ed., 2017, 56, 4623–4628. ^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.....	238
Abbildung 105: Amplituden-Sweep Messungen von hybriden 3D druckbaren Hydrogelformulierungen mit und ohne sphärischen Partikeln unterschiedlicher Funktionalisierungen (S400-NH ₂ und S400-COOH) bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz. Alle Messungen erfolgten im ungelierten Zustand. Baumann <i>et al.</i> , Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, Angew. Chemie - Int. Ed., 2017, 56, 4623–4628. ^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.....	238

- Abbildung 106: Detektion der Fluoreszenzintensität von NH₂-funktionalisierten Partikeln, welche mit zwei unterschiedlichen ATTO Farbstoffen funktionalisiert wurden. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgte nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten mit einem UV-Laser (bluepoint 4, Dr. Hönle AG), bei 60% Intensität der Maximalleistung..... 239
- Abbildung 107: A) Aufnahme von S400-NH₂ und b) S400-COOH Partikeln durch C2C12-Zellen in einer klassischen 2D-Zellkultur. Die Aufnahme von Fluoreszenzmarkierten MSN wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 4, 24 h) qualitativ mittels konfokaler Laser-Mikroskopie detektiert. Farbzuordnung: Rot= S400-NH₂, grün=S400-COOH, blau=DAPI zur Färbung des Zellkerns, weiß= Phalloidin-TRITC zur Färbung des Zytoskeletts. Für alle Tests wurde eine Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL verwendet. Für eine bessere Darstellung wurden einzelne Zellen in einem Zoom vergrößert dargestellt, um aufgenommene Partikel zu visualisieren. Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 20 µm. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission. 240
- Abbildung 108: Kalibriergeraden der Wirkstoffbeladungen mit a) Roscovitin in DCM, b) Wnt-Agonist in DCM und c) GW9662 in Cyclohexan..... 241

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Physiochemische Charakterisierung von sphärischen mesoporösen Silikananopartikeln mit einem Durchmesser von ca. 200 nm (S200) und ca. 400 nm (S400).	73
Tabelle 2:	Physiochemische Charakterisierung von Glukosefunktionalisierten MSN.	78
Tabelle 3:	Physiochemische Eigenschaften von S200-HS Partikeln.	84
Tabelle 4:	Bestimmung der Länge-Breite-Verhältnisse für unterschiedlich funktionalisierte stäbchenförmige Partikel.	86
Tabelle 5:	Physiochemische Charakterisierung von zylindrischen, stäbchenförmigen Partikeln mit unterschiedlichen Länge-Breite-Verhältnissen.	87
Tabelle 6:	Gesamtübersicht der physiochemischen Eigenschaften aller in dieser Arbeit synthetisierten Partikel.	90
Tabelle 7:	Auftragung des Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'') sowie des Verlustfaktors $\tan\delta$, berechnet bei einer Deformation von 0,1%.	114
Tabelle 8:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.	202
Tabelle 9:	Einsatzmengen für die Synthese sphärischer mesoporöser Silikananopartikel mit Durchmessern von ca. 200 nm (S200) und ca. 400 nm (S400).	207
Tabelle 10:	Eingesetzte Mengen für die Synthese stäbchenförmiger Partikel mit unterschiedlichen Länge-Breite-Verhältnissen.	209
Tabelle 11:	Einsatzmengen für die Funktionalisierung von S200-COOH Partikeln mit Glucosamin.	212
Tabelle 12:	Einsatzmengen für die Funktionalisierung von S200-NH ₂ Partikeln mit Glucuronsäure.	212
Tabelle 13:	Einsatz zur Herstellung von S200-HS Partikeln mit unterschiedlichen Mengen an HS.	213
Tabelle 14:	Zusammensetzung von auf RADA16-I basierenden hybriden Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen.	218
Tabelle 15:	Gewählte Parameter für durchgeführte rheologische Messungen.	219

Tabelle 16: Bestimmung des Zeta-Potentials von S200 und S400 Partikeln unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierungen vor und nach der Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs (ATTO647N). Die Bestimmung der Zeta-Potentiale erfolgte in 1 mM KCl-Lösung (aq.). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. 237

I Einleitung

1. Regenerative Medizin (*Tissue Engineering*)

Regenerative Medizin (auch bezeichnet als *Tissue Engineering*) bezeichnet die Herstellung eines neuen therapeutisch nutzbaren Gewebes mit Hilfe einer bewussten und kontrollierten Stimulation eines bestimmten Zelltyps durch eine Kombination aus molekularen und mechanischen Reizen.^[1]

Dabei ist es möglich, sowohl ein angestrebtes Zielgewebe innerhalb als auch außerhalb des Körpers eines Patienten herzustellen, wobei für das Wachstum außerhalb des Körpers ein zusätzlicher Implantationsschritt notwendig ist.^[2]

Bereits 1993 definierten R Langer *et al.* *Tissue Engineering* als ein interdisziplinäres Fachgebiet, welches die Prinzipien der Biowissenschaften mit denen des Ingenieurwesens vereint, um neuartige biologische Substitutionsgewebe zu entwickeln, welche spezifische Gewebefunktionen wiederherstellen, aufrechterhalten oder verbessern können.^[3]

Seit dieser Zeit wurden große Anstrengungen unternommen, neue Materialien und Kombinationen aus unterschiedlichen Materialien zu untersuchen, um passende Kandidaten für einen erfolgreichen Einsatz in der Geweberekonstruktion zu finden. Speziell seit dem Jahr 2000 konnte ein immenser Anstieg von ca. 1000 auf ungefähr 12000 Publikationen zum Thema Geweberekonstruktion verzeichnet werden. Dies unterstreicht eindrucksvoll die immense Bedeutung dieses Forschungsgebiets.

Wie Abbildung 1 zu entnehmen ist, wurden die größten Anstrengungen hierbei im Bereich Knochenregeneration unternommen. Ein Grund hierfür ist die große Anzahl an Knochenverletzungen auf Grund von Traumata, Tumoren oder anderen Knochenkrankheiten. Eine Situation, die durch den demografischen Wandel und die damit zunehmende Anzahl an älteren Menschen noch verstärkt wird.

Die Therapie entsprechender Verletzungen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Hierbei lässt sich allgemein zwischen Allotransplantaten (Transplantate von einem Spender), Autotransplantaten (Transplantate aus dem eigenen Körper) und künstlichen Transplantaten unterscheiden. All diese Methoden haben jedoch beträchtliche Nachteile. Beispielsweise kann bei der Anwendung von Autotransplantaten nicht eine beliebig große

Menge an Knochen entnommen werden, außerdem ist der zu entnehmende Knochen oftmals beeinträchtigt, zum Beispiel durch Osteoporose.

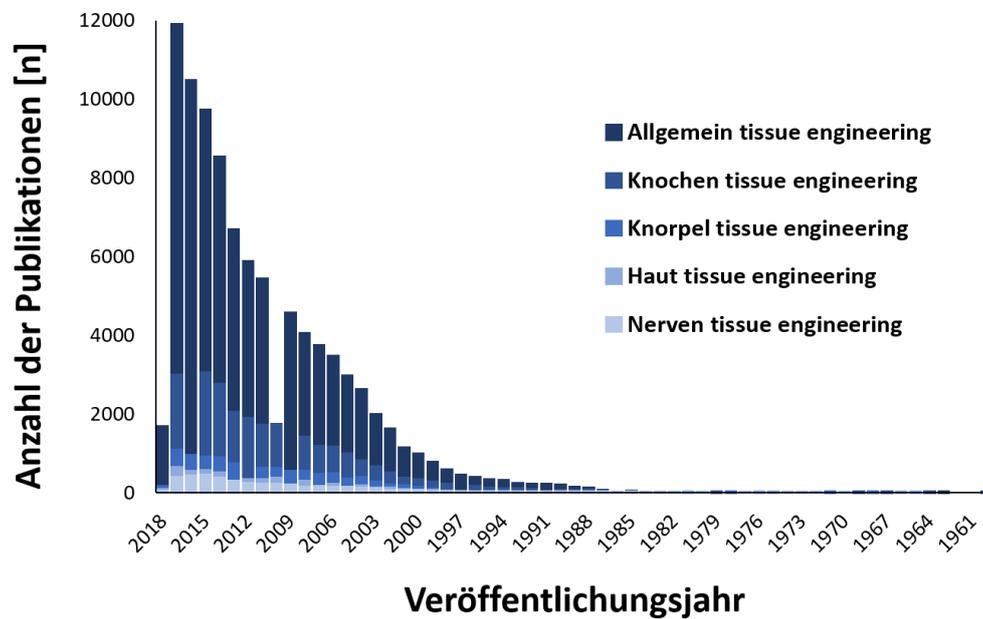


Abbildung 1: Anzahl an Veröffentlichungen zum Thema "Tissue Engineering" und unterschiedlichen Zielgeweben. Stand pubMed 06.02.18. Verwendete Suchbegriffe: »tissue engineering«, »bone tissue engineering«, »cartilage tissue engineering«, »skin tissue engineering« und »nerve tissue engineering«.

Bei der Verwendung von Alлотransplantaten kann es hingegen zu Immunreaktionen oder Virusinfektionen kommen. Für künstliche Transplantate, aus Titan oder Eisen, besteht die Gefahr der Korrosion und einer dadurch induzierten Infektion des gesunden Gewebes.^[2,4] Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl an Arbeiten im Bereich der Synthese neuartiger Materialien für die Geweberekonstruktion durchgeführt.

2. Allgemeine Eigenschaften der Materialien

Um ein geeignetes Material für die Geweberekonstruktion zu erzeugen, muss das natürliche Gewebe in Bezug auf physikalische, chemische und mechanische Eigenschaften bestmöglich nachgeahmt werden. Auf diese Weise sollen natürliche Interaktionen zwischen Zellen und ihrer natürlichen Umgebung bestmöglich wiedergegeben werden.^{[5],[6]}

In diesem Zusammenhang lässt sich die natürliche Umgebung von Zellen als die angrenzenden Zellen, die umgebende Gerüststruktur, welche extrazelluläre Matrix (EZM) genannt wird, und die darin ablaufenden chemischen und biologischen Signalwege beschreiben. Dabei ermöglicht die EZM eine mechanische Unterstützung der zellulären Adhäsion sowie zeitgleich eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Regulation von biologisch relevanten Signalmolekülen für die Proliferation, Differenzierung, Migration sowie Apoptose von Zellen.^[7]

Aus diesem Grund ist es für eine erfolgreiche Geweberekonstruktion von essentieller Bedeutung, eine entsprechende EZM nachzuahmen. Zu einigen grundlegenden Eigenschaften^{[8],[9],[10],[11],[12],[13]} solcher künstlich erzeugter EZM gehören:

- Biokompatibilität
- Bioaktivität
- Bioabbaubarkeit
- 3D-Wachstum
- Porosität
- Keine Toxizität
- Verwachsung mit dem ursprünglichen Gewebe
- Freie Nährstoffdiffusion
- kontrollierte Differenzierung von Zellen

Die aufgeführten Eigenschaften zielen auf die Bildung neuen Gewebes durch Verwendung einer künstlichen Matrix ab. Diese soll dabei möglichst eng mit dem bestehenden natürlichen Gewebe verbunden sein. Geeignete Biomaterialien, welche als Gerüst in der 3D-Zellkultur Anwendung finden, können dabei sowohl einen natürlichen Ursprung haben

(z.B. Kollagen^[14]), als auch synthetischer Natur sein (z.B. künstlich hergestellte Polymere^[15]).

Zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Materialien, welche in diesem Zusammenhang getestet wurden, gehören unter anderem:

- Mesoporöse bioaktive Gläser^[16]
- Hydrogele^[17]
- Graphen-basierte Materialien^[18]
- Kollagenbasierte Biopolymere^[19]
- Goldnanopartikel^[20] und -stäbchen^[21]

Bei dem zu ersetzenden natürlichen Gewebe handelt es sich um eine komplexe vielschichtige Zusammensetzung aus anorganischen sowie organischen Bestandteilen. Um dieser Komplexität Genüge zu tun, werden daher oftmals Kompositmaterialien aus unterschiedlichen Materialklassen verwendet, um sowohl der Struktur des natürlichen Gewebes als auch mechanischen Anforderungen Rechnung zu tragen.

3. Vorgehen bei der Geweberekonstruktion

Allgemein lässt sich das Vorgehen zur Erzeugung künstlichen Gewebes bzw. Materialien, welche als Gewebeersatz eingesetzt werden können, wie in Abbildung 2 dargestellt, beschreiben.

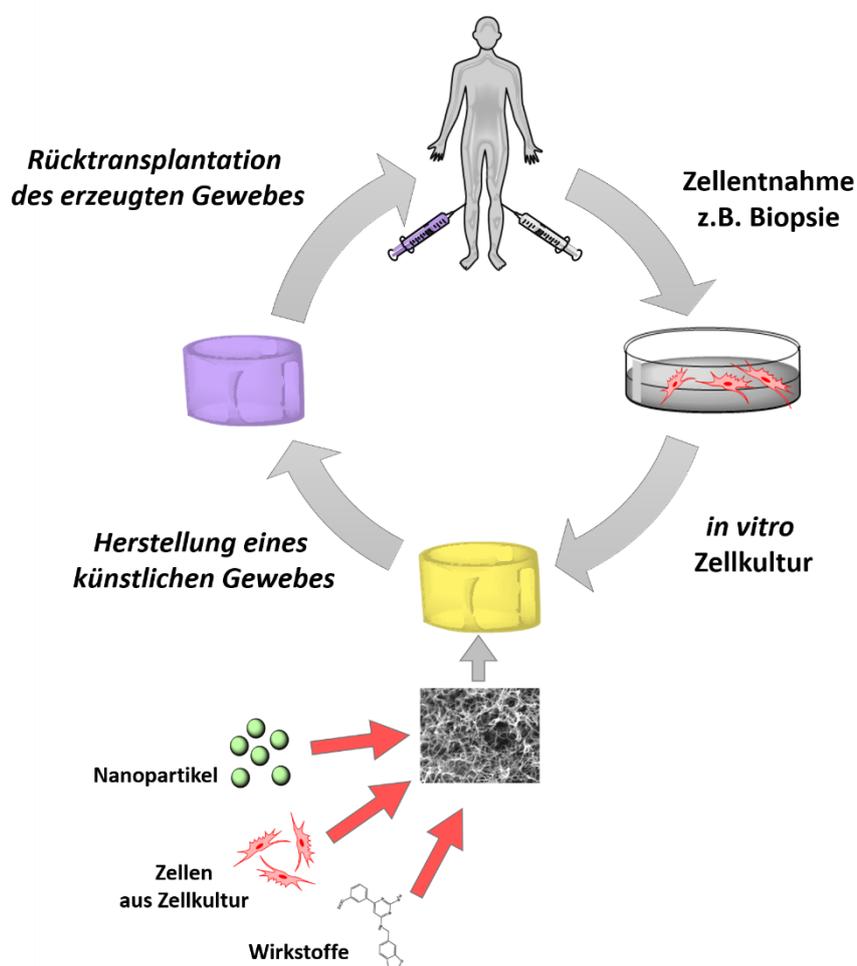


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Geweberekonstruktion. Nach „Nanotechnological strategies for engineering complex tissues“ *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 13–22.^[22]

Zellen, welche zur Vermeidung von Immunreaktionen idealerweise aus dem Körper eines Patienten entnommen wurden, werden zunächst in einer klassischen *in vitro* 2D-Zellkultur vermehrt. Die daraus erhaltenen Zellen werden anschließend mit einem künstlichen oder natürlichen Gerüstmaterial vereint, wodurch eine 3D-Umgebung für das künftige Zellwachstum generiert wird. Ein so erzeugtes Material kann anschließend entweder in Zellkultur gehalten werden, um so ein entsprechendes Testsystem zu erzeugen, oder es

folgt eine Transplantation des Materials in den Körper eines Patienten um dadurch schadhaftes Gewebe zu ersetzen.

Da es sich bei dem zu ersetzendem Gewebe um eine komplizierte Zusammensetzung anorganischer sowie organischer Bestandteile handelt, werden oftmals Kompositmaterialien aus verschiedenen Materialklassen genutzt, die der Struktur des natürlichen Gewebes entsprechen und den mechanischen Anforderungen Genüge tun.

Die größte Herausforderung bei der Anwendung eines entsprechenden künstlichen Gewebes *in vivo* ist jedoch sowohl eine Kontrolle über die Proliferation und Differenzierung von eingebrachten Zellen zu gewährleisten, als auch die Bildung von Blutgefäßen zur Versorgung des künstlichen Gewebes zu ermöglichen.^[23]

Aus diesem Grund ist es sinnvoll den erzeugten Matrizen entsprechende Wirkstoffe, Wachstumsfaktoren sowie zusätzliche Nanomaterialien zuzumischen, welche eine Kontrolle über das Zellwachstum sowie eine Aufrechterhaltung der Homöostase bewirken.^{[24],[25]}

4. Wirkstoffe in der Geweberekonstruktion

Die Einarbeitung entsprechender Wirkstoffe in eine 3D-Zellkultur kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Dabei lassen sich hauptsächlich zwei Möglichkeiten unterscheiden: Eine lokale oder systematische Verabreichung.^[26] Bei einer systematischen Applikation werden die jeweiligen Wirkstoffe oder Wachstumsfaktoren in freier Form in das Körpergewebe injiziert. Diese Anwendung birgt jedoch Risiken, da eingebrachte Wirkstoffmoleküle in diesem Fall frei und unkontrolliert durch das umliegende Körpergewebe diffundieren können. In Folge dessen kann es zu einer unkontrollierten Aufnahme dieser Wirkstoffe und damit verbundenen schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen.^{[27],[26],[28]} Bedingt durch eine entsprechende Diffusion der Wirkstoffe innerhalb des Körpers, ist es außerdem notwendig höhere Wirkstoffkonzentrationen einzusetzen, um eine therapeutisch relevante Konzentration innerhalb der Zielgewebes zu erzielen. Durch eine solche Erhöhung der Wirkstoffkonzentration kommt es im Umkehrschluss jedoch wiederum zu einer verstärkten Verteilung des Wirkstoffs innerhalb des Körpers und verstärkten Nebenwirkungen.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Verwendung freier Wirkstoffe stellt ein enzymatischer Abbau dieser Moleküle dar. Dabei werden durch chemische oder physikalische Deaktivierung und unterschiedliche Abbauprozesse (Hydrolyse, Oxidation, Isomerisierung oder Aggregation) die eingesetzten Wirkstoffe zerstört, wodurch die angestrebte Wirksamkeit dieser deutlich beeinträchtigt wird.^{[29],[30]}

Um eine Deaktivierung von Wirkstoffen für die Geweberekonstruktion zu unterbinden, kann alternativ eine lokale Anwendung, bei der therapeutisch notwendige Wirkstoffe direkt und gezielt in das zu ersetzende Gewebe eingebracht werden, erfolgen. Durch eine solche lokale Administration der Wirkstoffe ist es außerdem möglich, deutlich höhere Wirkstoffkonzentrationen innerhalb eines Zielgewebes zu erzielen.^{[26],[28]} Eine einfache Möglichkeit hierfür stellt der Einschluss von Wirkstoff innerhalb einer Polymermischung des verwendeten Gerüstmaterials dar. So konnte beispielsweise rhBMP-2 durch überkritische CO₂ Prozessierung von Schliephake *et al.* in PLA-Strängen eingebaut werden.^{[31],[32]} BMP (*bone morphogenic protein*) steht im Folgenden allgemein für knochensubstanzbildende Proteine.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verkapselung von Wirkstoffen in Hydrogelnetzwerken. Dabei werden entsprechende Wirkstoffe mit dem für die Herstellung des Hydrogels benötigten Polymer vermischt und anschließend durch chemische oder physikalische Vernetzung in das Polymernetzwerk eingeschlossen. Holloway *et al.*^[33] erzielten eine Verkapselung des Wachstumsfaktors BMP-2 in Hydrogelstrukturen. Für die Verkapselung wurde ein Hyaluronsäure-basiertes Hydrogelnetzwerk, welches mit Matrix-Metallproteinase versehen war, verwendet. Die Einführung entsprechender Matrix-Metallproteinase ermöglichte hierbei einen zellenbasierten enzymatischen Abbau des Hydrogelnetzwerks und eine dadurch eingeleitete Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs.

Neben der Verkapselung von Wirkstoffen innerhalb der Polymerstränge eines Netzwerks ist darüber hinaus auch eine kovalente Anbindung dieser Wirkstoffe an die Oberfläche der Matrixpolymerstränge denkbar. Beispielsweise beschrieben He *et al.* die Anbindung von knochenwachstumsauslösenden Proteinen mittels Azid-Alkin basierter „Click-Chemie“ an die Oberfläche eines auf Polyethylenglycol (PEG)-basierten Hydrogels.^[34] Außerdem konnte bereits durch eine Anbindung von Glykosaminoglykanen (z.B. Heparin) an ein

Polymernetzwerks gezeigt werden, dass eine weitere Anbindung von Wachstumsfaktoren wie BMP-2 an die zuvor angebotenen Heparinmoleküle zu einer verbesserten Beladung sowie Freisetzung führt.^[35]

Eine elegante Methode, welche den verwendeten Wirkstoff vor äußeren Einflüssen schützt, stellt dessen Beladung in Mikro- oder Nanopartikel dar. Dabei kann eine Beladung durch Verkapselung während der Herstellung der Partikel oder durch nachträgliches Vermischen mit den fertigen Partikeln erfolgen. Bei der Mischung mit bereits synthetisierten Partikeln sind zwei unterschiedliche Prozesse denkbar: Neben einer reinen Oberflächenadsorption von Wirkstoffmolekülen kann es bei Verwendung von porösen Strukturen auch zu einer Adsorption von Wirkstoffen in das Innere der Partikel kommen. Nach erfolgter Beladung können anschließend die beladenen Partikel mit einer 3D-Matrix vereint werden.

Xu *et al.*^[36] zeigten in diesem Zusammenhang die Beladung von Hyaluronsäure-basierten Partikeln (Durchmesser ca. 1 μm) mit Heparin und BMP-2. Dabei konnte eine verzögerte aber gleichmäßige Freisetzung des Wachstumsfaktors über zwei Wochen hinweg realisiert werden, wodurch eine verstärkte Bildung von EZM-Komponenten (wie z.B. Kollagen-II) erzielt werden konnte. Yu *et al.*^[37] hingegen verwendeten BMP-2 und mit vaskulär endothelialen Wachstumsfaktoren beladene anorganische Hydroxylapatit Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 3-5 μm . Die Herstellung erfolgte durch eine Mehrschichtbeschichtung, wodurch eine anhaltende Freisetzung der eingebrachten Wirkstoffe von bis zu 50 Tagen erzielt werden konnte.

Ungeachtet der unterschiedlichen Prozessierungsmethoden und Anwendungsbereiche müssen für eine optimale Wirksamkeit der beladenen Wirkstoffe einige grundlegende Einflussgrößen beachtet werden. So muss zunächst für jede Methode sichergestellt werden, dass eine native Konformation der eingesetzten Wirkstoffe/Proteine/Wachstumsfaktoren während der Beladung nicht geändert wird, da auf diese Weise die Wirksamkeit deutlich reduziert werden würde.^[38] Des Weiteren muss der Abgabezeitpunkt der verkapselten Wirkstoffe untersucht und an den für die jeweilige Anwendung optimalen Zeitpunkt angepasst werden.^{[39],[40],[41]}

5. Aufbau von Mehrkomponentensystemen

Knochenaufbau ist ein sehr komplexer Vorgang, bei dem ein mehrstufiges Freisetzungsprofil von Wirkstoffen, von einer Freisetzung in erster Minute bis hin zu einer Freisetzung über mehrere Wochen hinweg, benötigt wird.^[39] Bei den zuvor vorgestellten Materialien ist jedoch lediglich eine schnelle oder langsame Freisetzung des verwendeten Wirkstoffs realisierbar. Des Weiteren wurden die Materialien lediglich mit einem Wirkstoff beladen, wohingegen bei der Herstellung künstlichen Gewebes eine Vielzahl an Wirkstoffen benötigt wird, um sowohl Gefäße als auch das restliche Gewebe zu generieren. Für ein entsprechendes stufenweises Freisetzungsprofil unterschiedlicher Wirkstoffe sind somit neuartige Materialien oder Materialkombinationen sowie die Verwendung mehrerer Wirkstoffe in einem System notwendig.

Die Implementierung eines solchen Mehrkomponentensystems wurde bereits in einigen Arbeiten versucht. Ein Beispiel hierfür stellen Arbeiten von Yilgor *et al.* dar, in welchen eine Kombination aus zwei unterschiedlichen Nanopartikelsystemen (Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)- und Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV)- Nanopartikel) verwendet wurden. Zunächst konnte durch Beladung beider Partikelsysteme grundlegend unterschiedliche Freisetzungsprofile erzeugt werden. Dabei zeigten PLGA-Partikel eine Freisetzung über 20 Tage und PHBV-Partikel über 40 Tage hinweg. Die verwendeten Medikamente umfassten neben einem Modelprotein (BSA) auch unterschiedliche knochensubstanzbildungsfördernde Proteine (BMP-2 und BMP-7).^[42] Durch den Einbau beider, mit unterschiedlichen BMP beladenen, Partikeln in ein elektrogenesponnenes, Chitosan-basiertes Netzwerk konnte im Anschluss die Herstellung eines entsprechenden Mehrkomponentensystems gezeigt werden.^[43] Für den Einbau wurden dabei zwei unterschiedliche Präparierungsmethoden (Einbau innerhalb des elektrogenesponnenen Strangs oder adsorbiert auf der Oberfläche des Strangs) gewählt. Dabei konnte für beide Methoden in *in vitro* Zellexperimenten eine erhöhte alkalische Phosphatase-Aktivität, sowie eine stärkere Biomineralisierung innerhalb des Netzwerks, im Vergleich zu einem System mit lediglich einem der beiden Wirkstoffe, beobachtet werden. Unabhängig von der gewählten Präparierungsmethode basiert eine Verteilung des Wirkstoffs jedoch auch in diesem System auf einer Freisetzung des Wirkstoffs durch eine Auflösung der

eingebrachten Nanopartikel und einer anschließenden Diffusion der freigesetzten Wirkstoffmoleküle durch das gesamte umliegende Gewebe. Somit wäre an dieser Stelle eine gezielte, aktive Aufnahme von Partikeln und eine anschließende Freisetzung von eingebrachten Wirkstoffen innerhalb einer Zelle von großem Vorteil. Auf diese Weise lassen sich sowohl Nebenwirkungen als auch die verwendeten Wirkstoffmengen weiter reduzieren.

In Anlehnung an die Arbeit von Yilgor *et al.* wurde von Shokry *et al.* ein hybrides elektrogenesponnenes Netzwerk bestehend aus PLA-PANI Strängen, mit eingebrachten mesoporösen Silikananopartikeln (MSN), hergestellt.^[44] Shokry *et al.* verwendeten hierfür NH₂-funktionalisierte MSN, welche mit einem Modellmedikament (DiO) beladen wurden.

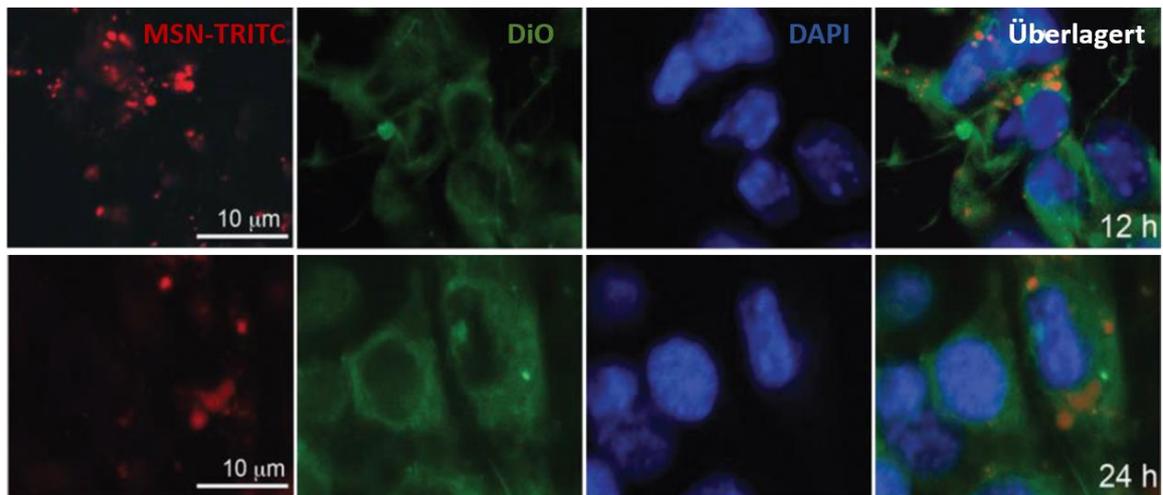


Abbildung 3: Aufnahme von DiO beladenen MSN-NH₂ (rot) in C2C12 Zellen (blau) nach zwölf sowie 24 h und Freisetzung des Modellwirkstoffs (grün) innerhalb der Zellen. „Mesoporous silica particle-PLA-PANI hybrid scaffolds for cell-directed intracellular drug delivery and tissue vascularization“^[44] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry. [10.1039/C5NR03983E](https://doi.org/10.1039/C5NR03983E)

Durch transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Querschnittsuntersuchungen sowie konfokaler Laser-Mikroskopie konnte im Folgenden eine aktive zelluläre Aufnahme von Partikeln aus dem Netzwerk und eine anschließende intrazelluläre Freisetzung des Modellwirkstoffs gezeigt werden (Abbildung 3). Zudem konnte, mittels Chorion-Allantois-Membran Eiermodell (CAM-Modell), in dieser Arbeit die Bildung neuer Blutgefäße innerhalb des elektrogenesponnenen Netzwerks gezeigt werden. Der Einsatz eines solchen Materialmix aus Polymernetzwerk und MSN als Wirkstoffträger scheint somit vielversprechend für einen weiteren Einsatz in der Geweberekonstruktion zu sein.

6. Verwendung von mesoporösen Silikananopartikeln als Wirkstoffträger

Das Ziel einer aktiven Aufnahme von wirkstoffbeladenen Trägermaterialien kann durch die Verwendung mesoporöser Silikananopartikel (MSN) erzielt werden. MSN repräsentieren hierfür eine vielversprechende neue Klasse an Nanoträgern, welche mit einer breiten Vielfalt an Wirkstoffen (z.B. Peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder kleine hydrophobe Moleküle) beladen werden können.

Ein immenser Vorteil, welcher für die Verwendung von MSN gegenüber anderen Partikelsystemen spricht, stellt ihre hohe interne Porosität dar. Diese ermöglicht eine Beladung mit sehr hohen Wirkstoffmengen.

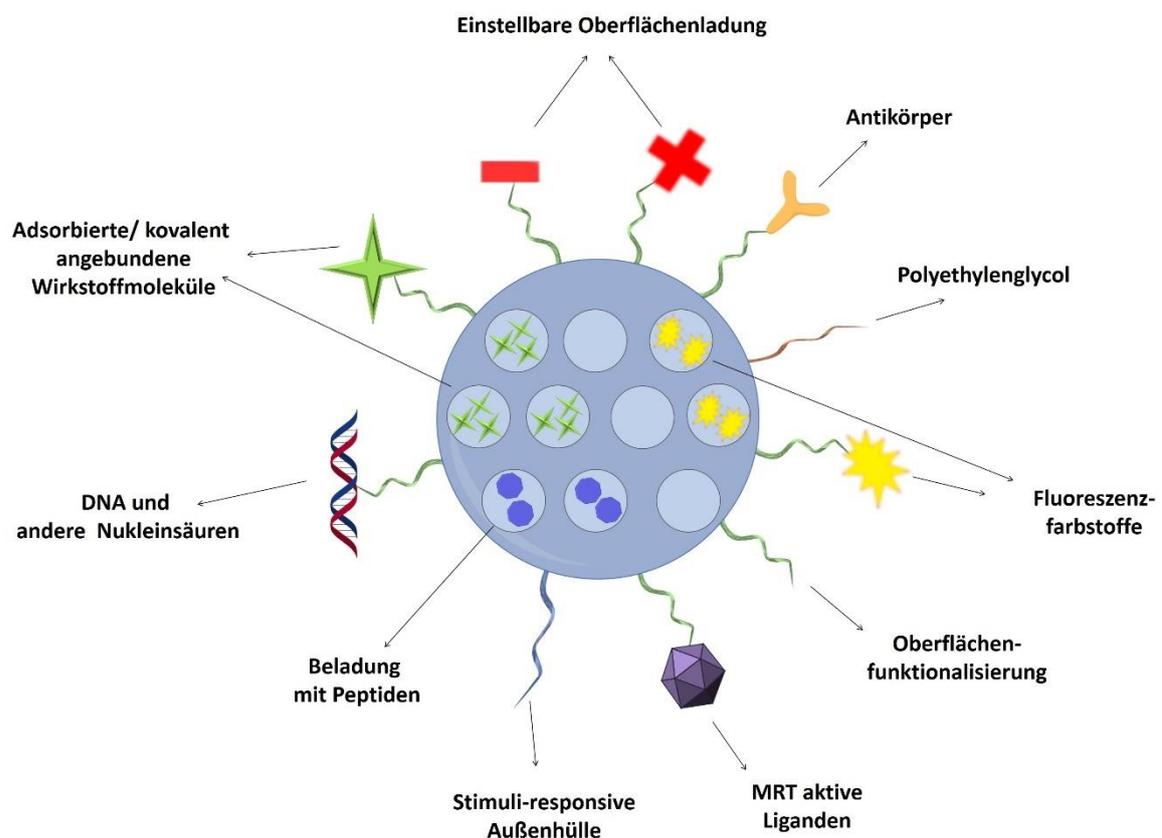


Abbildung 4: Funktionalisierungsmöglichkeiten und Beladung von mesoporösen Silikananopartikeln. Nach „Mesoporous silica nanoparticles for the design of smart delivery nanodevices“, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 114–134.^[45]

Darüber hinaus sind die Größe der Poren sowie die Oberflächenchemie der Partikel individuell an einen zu verwendenden Wirkstoff anpassbar. Zugleich können MSN bezüglich ihrer Partikelgröße sowie Partikelform stark variiert werden, um eine optimale Anpassung an einen speziellen Einsatzzweck zu ermöglichen.

Durch die Anpassung der Oberflächenchemie ist darüber hinaus eine Einstellung der physio-chemischen Eigenschaften von Partikeln, im Hinblick auf eine spätere Einsatzumgebung oder ein definiertes Freisetzungsverhalten, möglich.^{[46],[47]} Hierfür konnte bereits eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionalisierungen von Antikörpern über Gruppen zur Änderung der Oberflächenladung bis hin zu Fluoreszenzfarbstoffen auf der Oberfläche der Partikel durchgeführt werden (vergl. Abbildung 4). In Bezug auf die Stabilität von MSN kann, bedingt durch eine starke Si-O-Bindung, im Vergleich zu anderen Materialien wie Liposomen oder dendritischen Strukturen eine erhöhte Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Zersetzung oder mechanische Belastung, beobachtet werden. Auf diese Weise kann der Einsatz externer Stabilisatoren bei der Verwendung von Silika-basierten Partikeln ausbleiben, wodurch gleichzeitig eventuelle Einflüsse dieser Verbindungen auf die Zellkultur ausbleiben.^{[48],[49]}

Für einen Einsatz in der Geweberegeneration ist es, wie bereits zuvor beschrieben, darüber hinaus notwendig, biokompatible sowie bioabbaubare Materialien zu verwenden. Hierfür konnte in der jüngeren Vergangenheit die Biokompatibilität sowie Bioabbaubarkeit dieser Partikel bereits in *in vivo* Experimenten gezeigt werden.^{[50],[51]}

Das Verhalten von Partikeln in biologischen Systemen wurde bisher in *in vitro* Versuchen größtenteils durch Verwendung von 2D-Zellkulturmodellen nachgeahmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch Interaktion zwischen Partikeln und Proteinen des verwendeten Zellmediums eine entsprechende Protein-Corona auf der Partikeloberfläche ausgebildet werden kann. Um in späteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten eine möglichst geringe Aggregation und lange Zirkulation der Partikel im Blutkreislauf zu gewährleisten, konnten spezielle „Stealth“-Funktionalisierungen identifiziert werden. Die Wirkungsweise dieser Partikel basiert zumeist auf einer Reduktion der Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche. In Folge dessen kommt es zu einer erschwerten Identifizierung der Partikel durch das Immunsystem, wodurch eine schnelle Anreicherung in Leber, Milz und Niere vermieden werden kann. Das Ziel einer verlängerten Zirkulationszeit und erhöhten

Wirksamkeit entsprechender beladener Partikel scheint demnach durch Verwendung dieser „*Stealth*“-funktionalisierten Partikel erreichbar zu sein. In diesem Zusammenhang konnte jedoch von Beck *et al.*^[52] vor Kurzem gezeigt werden, dass eine vollständige Unterdrückung der Proteinadsorption nicht das anzustrebende Ziel sein sollte. Dabei untersuchten Beck *et al.* die Proteinadsorption von antikörperfunktionalisierten Partikeln und konnten eine, für die selektive Zellaufnahme dieser Partikel, optimale Menge an adsorbiertem Protein bestimmen. Bei einer zu hohen Menge an adsorbierten Proteinen konnte keine Selektivität in der zellulären Aufnahme beobachtet werden. Das selbe galt für eine zu stark gehemmte Adsorption von Proteinen. Als mögliche Begründung hierfür wurde eine sterisch stabilisierende Wirkung der adsorbierten Proteine für die Ausrichtung der angebundenen Antikörper aufgeführt. Bei einer zu geringen Proteinkonzentration auf der Oberfläche der Partikel kann eine entsprechende Stabilisierung nicht auftreten, wohingegen eine zu hohe Konzentration an adsorbierten Proteinen zu einer Überlagerung der Antikörper führen kann.

Die in entsprechenden 2D-Zellkulturexperimenten erzielten Ergebnisse können nicht direkt mit einer 3D-Zellkultur, wie sie in dieser Arbeit angestrebt wird, verglichen werden. Sie zeigen jedoch auf, dass die Interaktion von Partikeln mit umgebenden Verbindungen (Proteine, Peptide oder sonstige organische Moleküle) einen großen Einfluss auf das Verhalten der Partikel in dem untersuchten System hat und dadurch die Aufnahme in Zellen direkt beeinflusst werden kann.

Im Fall einer 3D-Zellkultur muss daher auf die Interaktion mit dem umgebenden Hydrogelnetzwerk in besonderem Maße geachtet und diese genau analysiert und eingestellt werden.

II Motivation und Zielsetzung

Gründe für Frakturen oder andere Gewebeschädigungen sind vielfältig. Neben simplen Traumata bedingt durch z.B. Sportverletzungen oder Verkehrsunfällen, kann eine steigende Anzahl an Verletzungen auf einen zunehmenden demografischen Wandel zurückgeführt werden. Die Herstellung neuartiger Materialien für die Rekonstruktion dieser Gewebe geriet daher in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung.

Durch eine möglichst detailgetreue Nachahmung der natürlichen Umgebung von Zellen soll dabei ein kontrolliertes Wachstum der Zellen innerhalb dieser Strukturen und in Folge dessen eine kontrollierte Differenzierung zu einem gewünschten Zelltyp erzielt werden. Neben der Herstellung geeigneter dreidimensionaler Strukturen ist es für ein kontrolliertes Wachstum weiterhin notwendig, entsprechende Wirkstoffe zu verwenden. Dabei ist eine lokal begrenzte sowie zeitlich gestaffelte zelluläre Aufnahme dieser Substanzen wünschenswert, da auf diese Weise unerwünschte Nebenwirkungen stark reduziert werden können. Durch eine gestaffelte zelluläre Aufnahme der Substanzen kann hierbei ein kontrolliertes Zellwachstum sowie anschließend eine kontrollierte Differenzierung zu einem erwünschten Gewebe ermöglicht werden.

Poröse Trägermaterialien, wie beispielsweise mesoporöse Silikananopartikel, konnten in diesem Zusammenhang bereits als geeignete Materialien für den Transport unterschiedlicher Wirkstoffe identifiziert werden. Dabei stellen Eigenschaften wie Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit, eine große innere Oberfläche oder die einfache Zugänglichkeit zu Funktionalisierungsmethoden der Partikeloberfläche weitere Gründe für einen potentiellen Einsatz dieser Materialien in der Geweberekonstruktion dar.

Im Kontext der Geweberekonstruktion ist es bei der Verwendung von MSN möglich, durch Variation der Form, Größe und Oberflächenbeschaffenheit die Interaktion dieser Partikel mit entsprechenden Wirkstoffen, eingebrachten Zellen sowie umgebenden Netzwerkkomponenten zu steuern, um eine kontrollierte Zellaufnahme von Partikeln sowie den enthaltenen Wirkstoffmolekülen zu ermöglichen.

So konnte bereits von Shokry *et al.*^[44] eine zelluläre Aufnahme von MSN aus einem elektrogenesponnen Polymernetzwerk gezeigt werden. Durch Anwendung eines Chorion-Allantois-Membran Eiermodells (CAM-Modell) konnte zudem die Bildung von Blutgefäßen innerhalb des elektrogenesponnenen Netzwerks visualisiert werden, wodurch eine generelle Eignung eines solchen Materials für die Geweberekonstruktion unterstrichen wurde.

In Anlehnung an diese Materialien ist das Ziel dieser Arbeit die Herstellung eines alternativen hybriden Materials, welches ebenfalls für die Geweberekonstruktion eingesetzt werden kann. Hierbei soll durch Kombination von mesoporösen Silikananopartikeln und hydrogelbasierten Netzwerkbildnern ein neuartiges hybrides 3D-Netzwerk erzeugt werden, welches ein dreidimensionales Wachstum von Zellen, sowie eine aktive Aufnahme von eingebrachten MSN ermöglicht. Die Verwendung von Hydrogelen als potentielle Netzwerkbildner ermöglicht dabei die Präparation von Konstrukten ohne den Einsatz von organischen Lösemitteln. Eine solche rein auf Wasser basierte Herstellung ohne die Verwendung von organischen Lösemitteln ermöglicht eine zellschonende sowie wirkstoffschonende Präparation von Materialien.

Wie bereits in 2D-Zellkultur gezeigt werden konnte, spielt die Interaktion von MSN mit umgebenden Komponenten wie beispielsweise Serumproteinen für die Aufnahme von Zellen eine zentrale Rolle. Da für ein 3D-Hydrogelnetzwerk ein vergleichbares Verhalten erwartet werden kann, stellt eine zentrale Fragestellung die Aufklärung der Interaktion von unterschiedlichen MSN mit den umgebenden Netzwerkkomponenten und Zellen dar. Hierfür soll daher zunächst eine Bibliothek aus unterschiedlich funktionalisierten sowie unterschiedlich geformten MSN aufgebaut werden. Dabei sollen neben der Einführung unterschiedlicher Oberflächenladungen (NH₂-und COOH-Funktionalitäten) auch Oberflächenmodifikationen mit unterschiedlichen Zuckerderivaten und größeren Polysaccharideinheiten (Hyaluronsäure) auf der Partikeloberfläche angebunden werden. Für die Variation der Partikelmorphologie sollen neben sphärischen Partikeln auch stäbchenförmige Partikel mit unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnissen synthetisiert werden. Eine erfolgreiche Charakterisierung der Funktionalisierung sowie eine Detektion der Partikelform soll hierbei durch geeignete Methoden erreicht werden. Beispiele hierfür sind die thermogravimetrische-Analyse zur Bestimmung der auf der Partikeloberfläche angebundenen Menge an funktionellen Gruppen, die Messung des

Zeta-Potentials zur Bestimmung der Oberflächenladung sowie elektronenmikroskopische Verfahren für die Visualisierung der Morphologie von gebildeten Partikeln (Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie).

Im Anschluss sollen zwei unterschiedliche hybride Systeme in Verbindung mit mesoporösen Silikananopartikeln untersucht werden. Hierbei handelt es sich zum einen um ein Hydrogelsystem auf Basis eines selbstassemblierenden Peptids und zum anderen um eine Kombination aus Hyaluronsäure und funktionalisierten Polyglycidolen zur Erstellung einer 3D-durchbaren Hydrogelformulierung.

Dabei soll zunächst untersucht werden in wie fern eingebrachte MSN die rheologischen Eigenschaften und dadurch bedingt die Applikationsmöglichkeiten der jeweiligen Formulierungen beeinträchtigen. Weiterhin soll nach der Ausbildung der Hydrogelnetzwerke die Verteilung von MSN innerhalb der Struktur mittels unterschiedlicher elektronenmikroskopischer Verfahren visualisiert werden. Im Idealfall sollte hierbei eine homogene Verteilung von MSN detektiert werden können, um eine gleichmäßige zelluläre Aufnahme dieser Partikel aus dem Hydrogel heraus zu ermöglichen.

Da, wie zuvor erwähnt, die Interaktion zwischen MSN und unterschiedlichen umgebenden Komponenten die zelluläre Aufnahme verändern kann, soll anschließend eine entsprechende Interaktion mit den umgebenden Netzwerkpeptiden bzw. -polymeren erfolgen. Auf diese Weise soll das Verständnis der in einem solchen 3D-System vorliegenden Wechselwirkungen verbessert und entscheidende Faktoren zur Beeinflussung der zellulären Aufnahme identifiziert werden. Auf Grundlage dieser Untersuchungen sollen zudem MSN mit einer verzögerten oder gestaffelten zellulären Aufnahme identifiziert werden, welche für einen späteren Wirkstofftransport notwendig sind.

Da bei der Geweberekonstruktion für die Administration von Wirkstoffen in freier Form mit erheblichen Nebenwirkungen zu rechnen ist, sollen diese in das Porensystem geeigneter Partikel adsorbiert werden. Dabei soll durch eine zellgerichtete Aufnahme dieser beladenen Partikel ein partikelmediierter Transport von Wirkstoffen erzielt werden, um so eine verbesserte Wirksamkeit dieser Wirkstoffe zu ermöglichen.

III Synthese mesoporöser Silikananopartikel

1. Theorie

1.1 Das Sol-Gel Verfahren

Das Sol-Gel-Verfahren, als ein Beispiel für eine „*bottom-up*“-Synthese, ist eine elegante Möglichkeit zur Herstellung poröser Nanomaterialien. Der strukturelle Aufbau dieser Materialien erfolgt aus kleineren Einheiten (in der Regel aus einzelnen Molekülen), welche als Präkursoren bezeichnet werden. Ein Vorteil des „*bottom-up*“-Verfahrens, im Gegensatz zu einer „*top-down*“-Synthese (Zerkleinerung größerer Einheiten), ist die Möglichkeit Partikel wohldefinierter Morphologie und Größe herzustellen.^[53]

Für die Herstellung von Silikananopartikeln kommen als Ausgangsverbindungen des Sol-Gel-Prozesses zumeist niedermolekulare metallische Alkoxy-Verbindungen (Präkursoren) in einem organisch-wässrigen Lösemittelgemisch (z.B. Ethanol oder Methanol) zum Einsatz. Einige der hierbei häufig verwendeten Präkursoren sind Tetramethoxysilan (TMOS) und Tetraethoxysilan (TEOS). Eine entsprechende Synthese zur Herstellung Silika-basierter Materialien kann dabei sowohl sauer als auch basisch katalysiert ablaufen. Ob es sich um eine sauer oder basisch katalysierte Reaktion handelt, wird hierbei durch die Lage des Ladungsnullpunktes (*point of zero charge*, PZC) definiert. Dieser stellt den pH-Wert dar, bei welchem die synthetisierte Spezies ungeladen vorliegt. Für pH-Werte unterhalb des PZC spricht man von einer sauer katalysierten Reaktion, wohingegen für Werte oberhalb des PZC von einer basisch katalysierten Reaktion die Rede ist.^{[54],[55],[56]} Da die in dieser Arbeit hergestellten Partikel ausschließlich mittels basisch katalysierter Reaktionsführung hergestellt wurden ($\text{pH} > 7$), soll im Folgenden auch lediglich auf diese Methode näher eingegangen werden.

Die Bildung eines Sols wird, wie in den Reaktionsgleichungen (Abbildung 5) dargestellt, durch fortschreitende Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen der eingesetzten Alkoxysilane hervorgerufen. Es ist anzumerken, dass diese an allen dargestellten Alkylresten (-R) zeitgleich stattfinden können. In der gewählten Darstellung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die Reaktionen an einer Gruppe dargestellt.^[54]

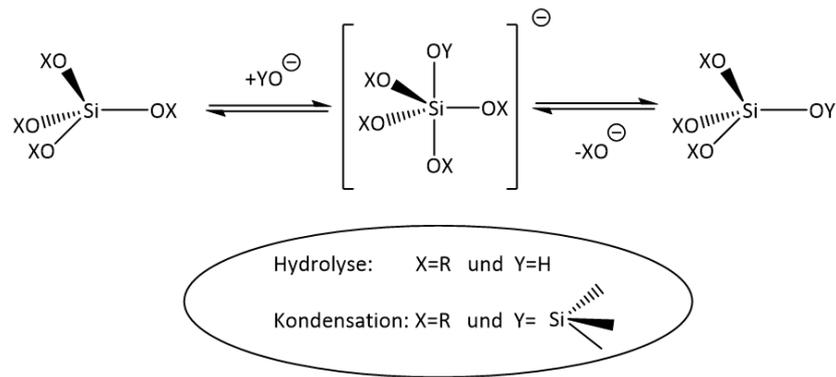


Abbildung 5: Reaktionen von Alkoxysilanen zur Bildung eines Silikanetzwerks unter basischen Bedingungen.^[54]

Durch Variation der Massenanteile von Präkursoren und Lösungsmittel können die Eigenschaften der erhaltenen Partikel während der Synthese der Silikananopartikel gezielt gesteuert werden. Voraussetzung hierfür ist eine niedrige Hydrolyse- und Kondensationsgeschwindigkeit.^[54] Unter basisch katalysierten Bedingungen läuft, wie Abbildung 5 zu entnehmen ist, die Bildung eines Silikanetzwerks über einen S_N2 -Mechanismus ab. Durch einen nukleophilen Angriff einer Hydroxylgruppe (im Falle einer Hydrolyse) oder durch Angriff einer SiO^- -Gruppe (im Falle einer Kondensation) kommt es zur Ausbildung eines fünffachkoordinierten Übergangszustands (ÜZ). Danach wird unter Abspaltung von Wasser oder des entsprechenden Alkohols aus dem ÜZ ein verknüpftes Silikanetzwerk gebildet.^{[55],[54]}

Neben dem Reaktionsmechanismus dirigiert vor allem der zugrundeliegende pH-Wert die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Reaktionsschritte. Wie in Abbildung 6 dargestellt, ist bei einem pH-Wert oberhalb von pH 7, welches dem Milieu der in dieser Arbeit synthetisierten Partikeln entspricht, die Hydrolysereaktion der reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Hydrolysereaktion läuft also langsamer ab, während hydrolysierte Monomere umgehend an bereits gebildete oligomere Strukturen reagieren. Die enthaltenen Silanolgruppen liegen zudem unter den gegebenen basischen Bedingungen deprotoniert vor. Dadurch kommt es zu einer elektrostatischen Abstoßung und in Folge dessen zu einer unterdrückten Aggregation und Gel-Bildung. Die daraus resultierende schnelle Bildung von Clustern und Nukleationskeimen führt zu einer bevorzugten Anbindung an diese hochkondensierte Spezies und in Folge dessen zu einer Bildung solider partikulärer Netzwerke.

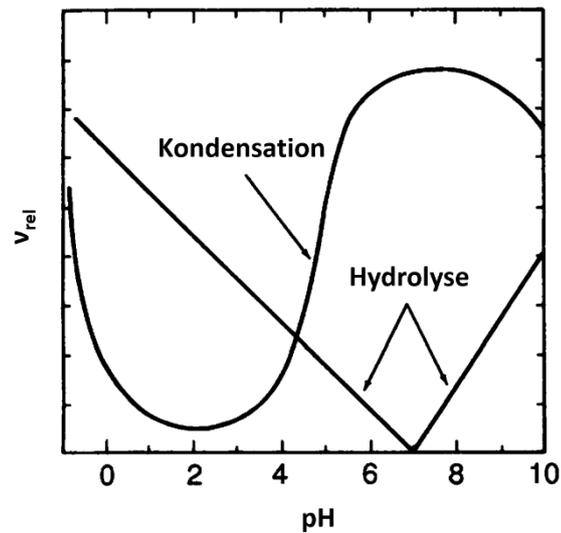


Abbildung 6: pH-Wert abhängige Hydrolyse- und Kondensationsreaktionsgeschwindigkeit. Aus D. Schaefer, "Polymers, Fractals, and Ceramic Materials" Science **1989**, 234,1023-1027 mit freundlicher Genehmigung von AAAS und Prof. D. Schaefer.^[57]

Das Wachstum bereits gebildeter Nanopartikel kann dabei durch die so genannte Ostwaldreifung beschrieben werden. Hierbei kommt es, bedingt durch die gute Löslichkeit von Silikaspezies im basischen Milieu, zu einer Auflösung von kleineren Partikeln zu Gunsten einer anschließenden Anlagerung an größere Partikel. In Folge dieses Auflösungsprozesses sinkt zwar die Anzahl an gebildeten Partikeln, die Größe der verbleibenden Partikel hingegen steigt.^{[54],[55]} So gebildete Strukturen können als massive Silikapartikel, ohne internes Porensystem, beschrieben werden. Ein Beispiel für eine entsprechende Partikelsynthese stellen stöberartige, nichtporöse Partikel dar.^[58]

1.2 Einführung von Mesoporen

Um die Bildung eines porösen Systems innerhalb der gebildeten partikulären Strukturen zu ermöglichen, können strukturdirrigierende Templatmoleküle eingeführt werden. Im Falle der in dieser Arbeit synthetisierten Partikel wurde dies durch Anwendung des Endotemplatverfahrens erzielt.^[59] Im Zuge dieses Verfahrens kommt es zu einem direkten Einschluss eines strukturdirrigierenden Agens in eine gebildete Silikamatrix, wobei hierfür häufig Tensidmoleküle eingesetzt werden. Da der isoelektrische Punkt (IEP) von Silikaspezies bei zwei liegt, müssen diese Tensidmoleküle, je nach Herstellungsmethode und dem dabei zugrundeliegenden pH-Wert, unterschiedliche Ladungen aufweisen, um eine bestmögliche Interaktion zwischen Silika- und Tensidmolekülen zu ermöglichen. Unter den gegebenen basischen Bedingungen liegen gebildete Silikaspezies negativ geladen vor,^[60] wodurch eine elektrostatische Anziehung mit positiv geladenen Tensidmolekülen (z.B. C₁₆TAB) erreicht werden kann.^[61] Dabei kommt es für Tensidkonzentrationen unterhalb der cmc (*critical micelle concentration*) zunächst zu einer Stabilisierung der Präkursoremulsion durch die Bildung sphärischer Mizellen. Durch die daraus resultierende Vergrößerung der Oberfläche wird die Hydrolysegeschwindigkeit der Silikaspezies erhöht, wodurch es zu einer fortlaufenden Kondensation der hydrolysierten Spezies kommt. Auf diese Weise bilden sich stark geladene Silika-Oligomere. Basierend auf einer anschließenden elektrostatischen Wechselwirkung mit den geladenen Kopfgruppen von Tensidmizellen wird die Repulsion zwischen diesen reduziert und die Bildung stäbchenförmiger Mizellen begünstigt. Dabei bildet sich, basierend auf einer weiterführenden Anlagerung der gebildeten stäbchenförmigen Mizellen, anschließend eine hexagonale Mesophase aus.^{[62],[63]} Der hierbei zugrundeliegende Bildungsmechanismus wird als „kooperativer Mechanismus“ bezeichnet.

1.3 Einführung von Oberflächenfunktionalisierungen

Wie bereits in Kapitel I.6 schematisch dargestellt, kann die Oberfläche von MSN durch Einführung unterschiedlicher funktioneller Gruppen hinsichtlich einer späteren Anwendung individuell angepasst werden.

Zwei grundlegend zu unterscheidende Synthesemethoden hierfür stellen die Co-Kondensation sowie die post-synthetische Anbindung organischer Gruppen dar.^[64]

Als Co-Kondensation wird eine Methode bezeichnet, bei welcher neben einem Tetraalkoxysilan auch ein Organoalkoxysilan bereits in die Syntheselösung zugefügt wird. Neben der Tatsache, dass bei dieser Synthesevariation eine Einsparung von Energie und Zeit erzielt werden kann, stellt eine gleichmäßige Verteilung der eingebrachten funktionellen Gruppen innerhalb des Silikanetzwerks einen weiteren entscheidenden Vorteil dieser Methode dar. Durch Anwendung der Co-Kondensation konnten somit bereits eine Vielzahl an funktionellen Gruppen (z.B. -NH_2 ^{[65],[53]}, -Phenyl ^[66] oder -Thiol ^[67]) an der Oberfläche von Silikapartikeln eingeführt werden.

Bei der Verwendung von Organoalkoxysilanen muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese, gegenüber den ebenfalls eingesetzten Tetraalkoxysilan, eine Bindungsstelle weniger aufweisen. Auf diese Weise kommt es zur Bildung von Fehlstellen innerhalb des Silikanetzwerks, was zu einer Reduktion der strukturellen Integrität des Netzwerks führen kann. Folglich muss für diese Funktionalisierungsmethode das Verhältnis aus Organoalkoxysilanen zu Tetraalkoxysilanen genau eingestellt werden, um einen vollständigen Verlust der Struktur zu verhindern. Sollen die eingeführten organischen Funktionen auch nach Entfernung des Templats auf der Oberfläche vorliegen, kann keine Entfernung der Templatmoleküle mittels Kalzinierung erfolgen. Unter einer Kalzinierung versteht man das starke Erhitzen einer erhaltenen Struktur und eine daraus resultierende Verbrennung der enthaltenen organischen Verbindungen. Vielmehr muss für den Erhalt der eingeführten funktionellen Gruppen eine schonende Extraktion der Templatmoleküle, mit einem geeigneten Lösungsmittel, durchgeführt werden. Dies stellt zwar einen präparativen Mehraufwand dar, führt jedoch zu einem Erhalt der zuvor eingebrachten funktionellen Gruppen auf der Silikaoberfläche.

Eine post-synthetische Funktionalisierung bedeutet eine nachträgliche Anbindung von funktionellen Gruppen auf der Oberfläche von kalzinierten sowie extrahierten Partikeln. Hierfür können ebenfalls Organoalkoxysilane eingesetzt werden, wobei eine Einführung im Falle einer post-synthetischen Funktionalisierung ohne Beeinträchtigung der strukturellen Integrität des Silikanetzwerks erfolgt.^[64] Ein Vorteil dieser post-synthetischen Funktionalisierung ist die dadurch entstehende Möglichkeit auch sterisch anspruchsvolle organische Reste, wie Peptide oder Antikörper, auf der Partikeloberfläche anzubinden.^{[68],[69],[70]} Da die Synthese entsprechend funktionalisierter Organoalkoxysilane sehr teuer sein kann, werden große Biomoleküle, wie Peptide, Polymere oder Antikörper oftmals auch durch geeignete Kupplungsreaktionen (z.B. EDC/NHS) direkt an die Oberfläche von Partikeln angebunden.

Sowohl bei der Verwendung geeigneter Organoalkoxysilane als auch bei der direkten Anbindung von Biomolekülen kann es, basierend auf einer diffusionsbedingt bevorzugten Anbindung an Poreneingängen, zu einer Reduktion der Porendurchmesser und Porenvolumina kommen. Aus diesem Grund ist die Größe und Menge an einzubringenden organischen Funktionalitäten limitiert.^[64]

2. Ergebnisse und Diskussion – Synthese und Charakterisierung funktionalisierter mesoporöser Silikananopartikel

2.1 Sphärische Partikel

2.1.1 Amino- und Carboxyfunctionalisierung von S200 und S400 MSN

Die in diesem Kapitel vorgestellten, sphärischen mesoporösen Silikananopartikel wurden in Anlehnung an eine Synthese nach Rosenholm *et al.* synthetisiert.^[70] Da die hierbei erhaltenen, sphärischen S200-NH₂ und S200-COOH Partikel im Verlauf dieser Arbeit als Basispartikel für weiterführende Oberflächenfunktionalisierungen verwendet wurden, soll an dieser Stelle eine detaillierte Charakterisierung dieser Partikel und entsprechend funktionalisierter S400 Partikel erfolgen.

Die Synthese der genannten Partikel erfolgte unter basisch katalysierten Reaktionsbedingungen, da unter diesen Bedingungen bevorzugt partikuläre Systeme erhalten werden. Durch Kombination des Sol-Gel-Prozesses mit einem Endotemplatverfahren können poröse Strukturen in das Silikanetzwerk der gebildeten Partikel eingeführt werden. Auf diese Weise können mesoporöse Silikananopartikel erhalten werden. Ein weiterer Vorteil der Synthese unter basischen Bedingungen stellen starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Silikapräkursoren und positiv geladenen, kationischen Tensidmolekülen dar. Das entsprechende Tensid wurde dabei als strukturdirigierendes Agens eingesetzt.

Um neben der Einführung von Mesoporen auch eine Kontrolle über die Größe der synthetisierten Partikel zu erhalten, kann durch Variation des verwendeten Methanol/Wasser Lösemittelverhältnisses eine gewünschte Partikelgröße eingestellt werden. Auf diese Weise war es möglich, Partikel mit einem Durchmesser von ca. 200 nm und 400 nm herzustellen. Dabei kommt es durch Variation des Methanol/Wasser Lösemittelverhältnisses zu einer erhöhten Löslichkeit des Präkursors und resultierend daraus zu einer verringerten Löslichkeit der gebildeten hydrolysierten Spezies. Die Folge

dieser Reduktion der Hydrolyserate ist die Bildung einer geringeren Anzahl an Nukleationskeimen, wodurch eine geringere Anzahl an Partikeln mit größeren Partikeldurchmessern gebildet wird.

Die in der Synthese eingesetzten Silikapräkursoren, Tetramethoxysilan (TMOS) und (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS), formen während der Synthese ein Silikanetzwerk um zuvor gebildete Mizellen des kationischen Tensids Cetyltrimethylammoniumbromid ($C_{16}TAB$). Durch die Verwendung von APTMS und TMOS kommt es dabei zu einer Co-Kondensation beider Silane, wobei eine gleichmäßige Einbringung von Aminofunktionen in das gebildete Silikanetzwerk ermöglicht wird. Eine Entfernung des enthaltenen Tensids erfolgte sowohl durch Kalzinierung als auch Extraktion mit saurem Ethanol. Dabei konnten im Fall einer Extraktion die zuvor über APTMS eingeführten Aminofunktionen erhalten bleiben, wodurch aminofunktionalisierte Partikel (Bsp.: S200-NH₂) generiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden bei einer Kalzinierung (bei einer Temperatur von 550 °C) alle eingebrachten organischen Gruppen vollständig entfernt. Auf diese Weise konnte zwar das enthaltene strukturdirigierende Tensid ($C_{16}TAB$) entfernt werden, jedoch wurden zusätzlich auch die zuvor eingeführten Aminofunktionalitäten vollständig verbrannt.

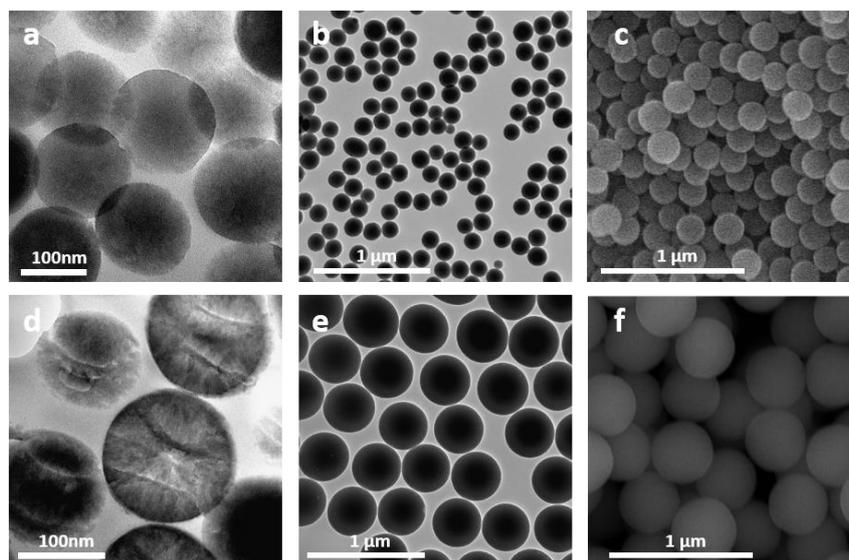


Abbildung 7: Exemplarische elektronenmikroskopische Darstellung der Porosität und Morphologie von NH₂-funktionalisierten, sphärischen Partikeln. A) Querschnitt von S200-NH₂ Partikeln zur Visualisierung der Porenstruktur, b) TEM Aufnahme von S200-NH₂ Partikeln und c) REM Aufnahme von S200-NH₂. d) Querschnitt von S400-NH₂ Partikeln zur Visualisierung der Porenstruktur, e) TEM Aufnahme von S400-NH₂ Partikeln und f) REM Aufnahme von S400-NH₂.

Die durch Kalzinierungen erhaltenen mesoporösen Silikananopartikel (MSN) können daher als unfunktionalisiert (S200-OH bzw. S400-OH) bezeichnet werden. Die Partikelgrößenverteilung der hergestellten, NH₂-funktionalisierten Partikel kann den elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 7 entnommen werden. Eine entsprechende Darstellung von COOH-funktionalisierten MSN ist in Abbildung 85 im Anhang zu finden.

Die anschließende Quantifizierung der mittels TEM bestimmten Partikeldurchmesser ist Tabelle 1, am Ende dieses Kapitels, zu entnehmen. Dabei lässt sich für alle synthetisierten Partikel eine relativ schmale Größenverteilung erkennen (Abbildung 8). Diese schmale Größenverteilung ist für spätere zelluläre Aufnahmen von essentieller Bedeutung, da nur durch vergleichbare Partikelgrößen ein aussagekräftiger Vergleich in zellulären Aufnahmeexperimenten zwischen unterschiedlich oberflächenfunktionalisierten Partikeln erfolgen kann.

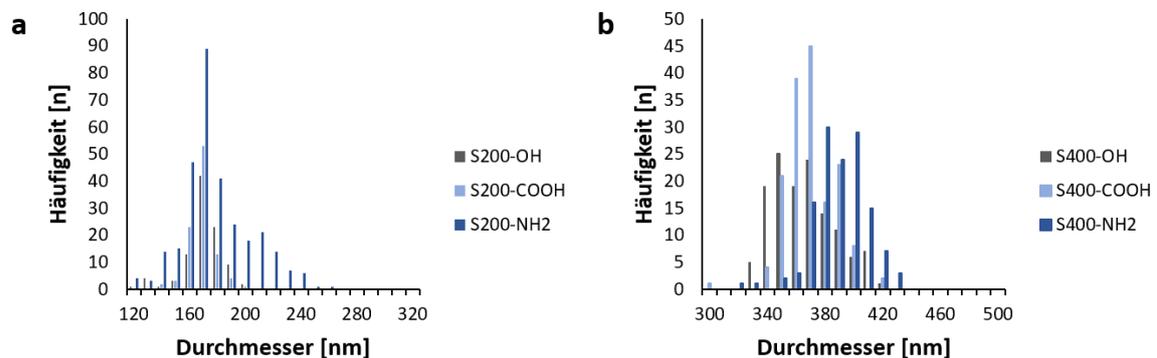


Abbildung 8: Größenverteilung unterschiedlich funktionalisierter S200 (a) und S400 (b) Partikel.

Dass es sich bei den hergestellten Partikeln in der Tat um mesoporöse Strukturen handelt, kann zunächst durch eine Visualisierung mittels TEM-Querschnittaufnahmen gezeigt werden. Wie in Abbildung 7 dargestellt, weisen sowohl S200-NH₂ (a), als auch S400-NH₂ Partikel (d) intrapartikuläre Poren auf. Eine hochgeordnete Porenstrukturierung ist jedoch erwartungsgemäß nicht zu erkennen.

Betrachtet man die Orientierung der gebildeten Poren in den TEM-Querschnitten, kann jedoch eine radiale Vorzugsrichtung erkannt werden. Eine entsprechende Vorzugsorientierung konnte dabei bereits von Yano *et al.*^[71], die ebenfalls ein

vergleichbares, kationisches Tensid (Cetyltrimethylammoniumchlorid CTAC) für die Synthese mesoporöser Silikapartikel verwendeten, gezeigt werden.

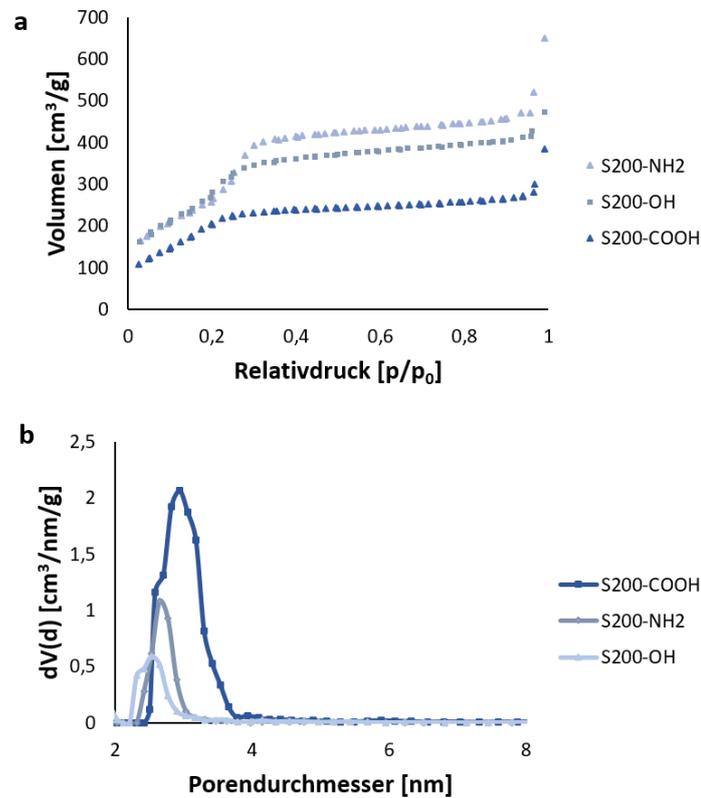


Abbildung 9: Exemplarische Stickstoffsorptionsmessung (a) und Bestimmung des Porendurchmessers mittels nicht-lokaler Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT- Methode) für sphärische S200 Partikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung.

Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Porendurchmesser sowie zur Bestimmung der inneren Oberflächen unterschiedlich funktionalisierter mesoporöser Silikananopartikel, wurden Stickstoffsorptionsmessungen durchgeführt. Diese sind für die unterschiedlich funktionalisierten S200 Partikel exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt. Eine vergleichbare Darstellung für S400 Partikel findet sich im Anhang in Abbildung 86. Wie Abbildung 9 a zu entnehmen ist, handelt es sich bei allen dargestellten Partikelsystemen um Typ IV Isothermen nach IUPAC. Ein steiler Verlauf der Isothermen im Bereich von 0,2-0,4 p/p₀ deutet auf eine enge Porenverteilung der untersuchten Partikel hin. Zusätzlich wurde die Verteilung der Porendurchmesser durch Anwendung der nicht-lokalen Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT) bestimmt. Hierfür wurden die Porendurchmesser mittels Equilibrium Kernel, für Silikamaterialien mit zylindrischen Poren, ausgewertet. Abbildung 9 b zeigt exemplarisch eine relativ enge Verteilung der Porendurchmesser für

unterschiedlich funktionalisierte MSN. Insgesamt liegen alle Porendurchmesser im Bereich von 3-4 nm, was in guter Übereinstimmung mit bisheriger Literatur für die Verwendung von C₁₆TAB, liegt.^[72] Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Stickstoffsorptionsmessungen ergab ebenfalls für alle Partikel vergleichbare Oberflächen im Bereich von 800-1000 m²/g (vgl. Tabelle 1).

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Oberflächenfunktionalisierung wurden Zeta-Potentialmessungen der hergestellten Partikel durchgeführt (vgl. Tabelle 1). Die mittels Co-Kondensation hergestellten, aminofunktionalisierten Partikel zeigten dabei, unabhängig von der Partikelgröße, ein deutlich positives Zeta-Potential im Bereich von 27-30 mV. Im Gegensatz dazu konnte nach einer Kalzinierung von Partikeln ein deutlich reduziertes Zeta-Potential von -22 bis -29 mV bestimmt werden. Dies lässt auf eine erfolgreiche Entfernung des Templats sowie der Aminofunktionalitäten schließen. Nach einer anschließenden, post-synthetischen Funktionalisierung der so erhaltenen OH-funktionalisierten Partikel, mittels Carboxyethyltriethoxysilan, konnte ebenfalls ein stark negatives Zeta-Potential bestimmt werden. Im Vergleich zu den unfunktionalisierten Ausgangspartikeln (OH-) konnte für COOH-funktionalisierte Partikel eine Reduktion der ermittelten Zeta-Potentialwerte (-33 bis -35 mV) beobachtet werden. Dies spricht somit für eine erfolgreiche Anbindung des COOH-funktionalisierten Silans auf der Oberfläche der Partikel.

Eine weitere Methode zum Nachweis der Einführung von NH₂- bzw. COOH-Funktionen stellen thermogravimetrische Messungen (*thermogravimetrische Analyse*, TGA) dar.

Zu diesem Zweck wurden definierte Mengen der hergestellten Partikel schrittweise bis 1000°C erhitzt (Heizrate: 10 °C/min) und die auftretende Massenreduktion detektiert. Die für die unterschiedlich funktionalisierten S200 und S400 Partikel erhaltenen TGA-Messkurven sind exemplarisch in Abbildung 10 dargestellt. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen zu ermöglichen, wurden diese jeweils auf eine Temperatur von 150 °C normiert. Massenverluste im Bereich von 150-600 °C können hierbei allgemein auf eine Zersetzung der kovalent gebundenen organischen Funktionalitäten zurückgeführt werden. Bei der Analyse kalzinierter Partikel konnte im Bereich von 150-600 °C erwartungsgemäß nahezu kein Massenverlust detektiert werden. Ein leichter Abfall bei sehr hohen Temperaturen ist auf zusätzliche Kondensationsreaktionen innerhalb des

ausgebildeten Silikanetzwerks und eine dadurch bedingte Abspaltung von H₂O-Molekülen zurückzuführen

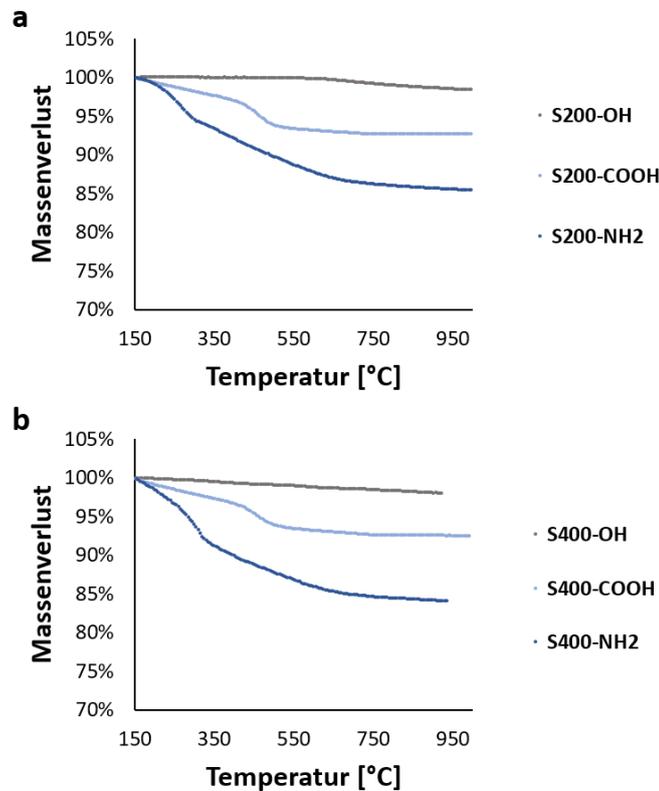


Abbildung 10: TGA-Messungen von sphärischen S200 a) und S400 b) Partikeln mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalitäten. Die erhaltenen Massenverluste wurden auf eine Temperatur von 150 °C normiert.

Unabhängig der untersuchten Partikelgröße konnten für Co-kondensierte (NH₂-funktionalisierte) MSN höhere Massenverluste wie für post-funktionalisierte (COOH-funktionalisierte) MSN beobachtet werden. Es lässt sich weiterhin erkennen, dass für Partikel, welche durch Co-Kondensation mit einem NH₂-funktionalisierten Silan (APTMS) synthetisiert wurden, bereits bei geringeren Temperaturen (ca. 200 °C) eine deutliche Reduktion der Masse detektiert werden kann. Partikel mit einer post-synthetisch eingeführten COOH-Funktionalität hingegen wiesen erst bei einer mehr als doppelt so hohen Temperatur (ca. 440 °C) eine deutliche Reduktion der Masse auf. Die Entfernung großer Mengen organischer Gruppen bei NH₂-funktionalisierten MSN ist dabei auf eine Abspaltung von Ethoxygruppen von der Oberfläche der Partikel, in Folge eines vorangegangenen Waschschrattes mit Ethanol, zurückzuführen.

Eine zusammenfassende physiochemische Charakterisierung der hergestellten sphärischen Partikel unterschiedlicher Größe ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Physiochemische Charakterisierung von sphärischen mesoporösen Silikananopartikeln mit einem Durchmesser von ca. 200 nm (S200) und ca. 400 nm (S400).

MSN	$S_{\text{BET}} /$ [m ² · g ⁻¹]	$V_{\text{Pore (NL-DFT)}}$ [cm ³ · g ⁻¹]	$d_{\text{Pore (NLDFT)}}$ [nm]	$\zeta\text{-Pot.}$ [mV]	TGA-Differenz (150-600 °C) [%]	$d_{\text{Partikel (TEM)}}$ [nm]
S200NH ₂	850 ± 100	0,5 ± 0,1	2,9 ± 0,5	27 ± 1,3	13,4	178 ± 29
S200OH	1080 ± 150	0,9 ± 0,3	3,0 ± 0,3	-29 ± 1,8	0,5	170 ± 15
S200COOH	750 ± 100	0,7 ± 0,1	3,2 ± 0,5	-33 ± 1,2	7,1	169 ± 10
S400NH ₂	880 ± 150	0,4 ± 0,2	2,9 ± 0,6	29 ± 0,5	14,0	390 ± 18
S400OH	950 ± 120	0,7 ± 0,2	3,1 ± 0,3	-22 ± 1,2	1,2	368 ± 21
S400COOH	780 ± 100	0,7 ± 0,1	3,1 ± 0,4	-35 ± 1,0	7,2	370 ± 16

2.1.2 Glukosefunktionalisierung von S200 MSN

Die Synthese glukosefunktionalisierter Partikel erfolgte in Anlehnung an eine Arbeit von Niemelä *et al.*^[68] auf Basis von S200-NH₂ bzw. S200-COOH. Durch Anwendung einer EDC/NHS Kupplung (Abbildung 83) wurden diese anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,01-0,28 mmol) an Glucuronsäure bzw. Glucosamin funktionalisiert. Hierfür wurde entweder eine Aktivierung der COOH-Funktionalität der MSN oder eine Aktivierung der COOH-Funktionalität der eingesetzten Glucuronsäure durchgeführt.

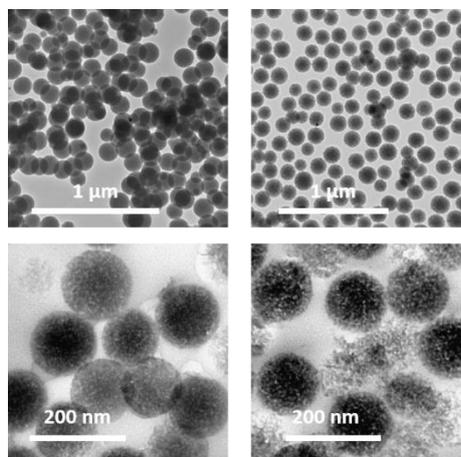


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Partikelmorphologie von a) S200-NH₂-Glu und b) S200-COOH-Glu Partikeln. Glukosederivatkonzentration jeweils 280 μmol/g Partikel.

Die Partikelmorphologie und Porosität wurde mittels TEM-Messungen und TEM-Querschnittsaufnahmen untersucht. Abbildung 11 zeigt eine exemplarische Darstellung der Partikelmorphologie von S200-NH₂-Glu-0,28 und S200-COOH-Glu-0,28 Partikeln, welche jeweils mit der höchsten gewählten Glukosekonzentration (280 μmol/g Partikel) funktionalisiert wurden. Es lassen sich somit auch bei der Verwendung hoher Konzentrationen an Glukosederivaten weiterhin homogen verteilte sphärische Partikel (a, b) mit einem ausgeprägten Porensystem (c, d) detektieren.

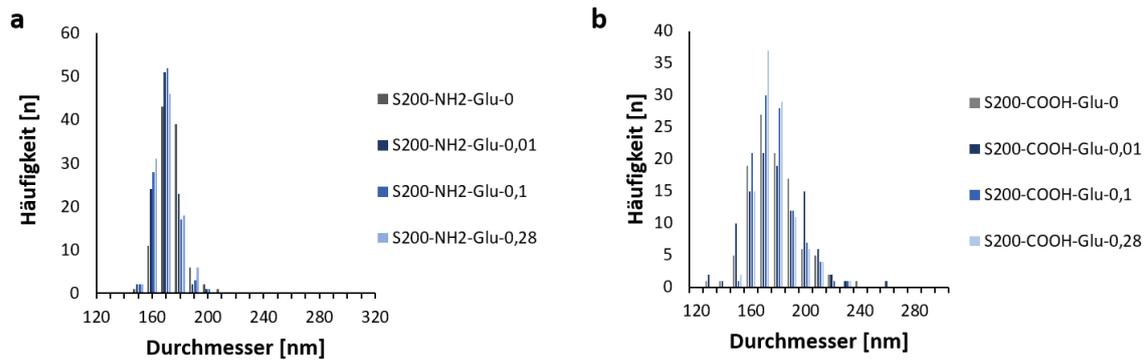


Abbildung 12: Partikelgrößenverteilung vor und nach der Anbindung unterschiedlicher Mengen an Glucuronsäure a) bzw. Glucosamin b).

Die Vermessung entsprechender TEM-Aufnahmen ergab für alle untersuchten Konzentrationen an Glukosederivaten zu den Ausgangspartikeln vergleichbare Partikelgrößen und Verteilungen (vergl. Abbildung 12).

Abbildung 13 zeigt exemplarische TGA-Messungen vor und nach der Anbindung unterschiedlicher Mengen an Glucuronsäure auf der Oberfläche von S200-NH₂ Partikeln. Die gemessenen Massenabnahmen wurden, für eine bessere Vergleichbarkeit, auf eine Temperatur von 150 °C normiert.

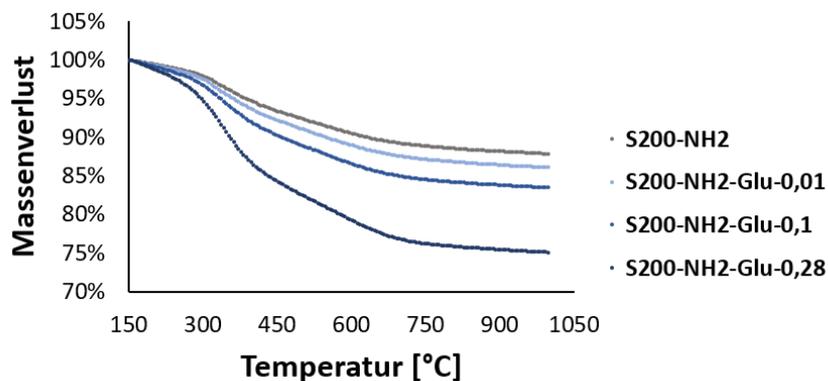


Abbildung 13: TGA Untersuchung von Glukose funktionalisierten MSN ausgehend von S200-NH₂ Partikeln mit steigendem Einsatz an Glucuronsäure. Normiert auf 150 °C.

Für die Massenreduktion im Bereich zwischen 150-600 °C konnte, in Übereinstimmung mit einer Arbeit von M. Beck^[72], mit steigendem Einsatz an Glucuronsäure qualitativ eine Zunahme der mittels TGA bestimmten Massenreduktion beobachtet werden. Dies lässt auf eine steigende Menge an auf der Oberfläche gebundener Glukosemoleküle und somit auf eine erfolgreich durchgeführte Funktionalisierung schließen.

Eine vergleichbare Abbildung der mittels TGA bestimmten Massenreduktion für S200-COOH-Glu ist im Anhang (Abbildung 87) zu finden. Dabei konnte für S200-COOH-Glu Partikel, welche mit unterschiedlichen Glucosamin-Konzentrationen funktionalisiert wurden, eine deutlich geringere Massenreduktion beobachtet werden, im Vergleich zu den S200-NH₂-Glu Partikeln, bei der Verwendung vergleichbarer Glucosekonzentrationen. Ein geringerer Massenverlust lässt sich hierbei durch einen geringeren Funktionalisierungsgrad der Partikeloberfläche erklären.

Stickstoffsorptionsmessungen der glukosefunktionalisierten Partikel zeigen, vergleichbar zu den entsprechenden Ausgangspartikeln S200-NH₂ und S200-COOH (Abbildung 9), weiterhin Typ IV Isothermen nach IUPAC. Im Vergleich zu den zugrundeliegenden Ausgangspartikeln bewirkt die Anbindung unterschiedlicher Mengen an Glucosamin (Abbildung 14 a) keinerlei Reduktion der ermittelten spezifischen Oberfläche.

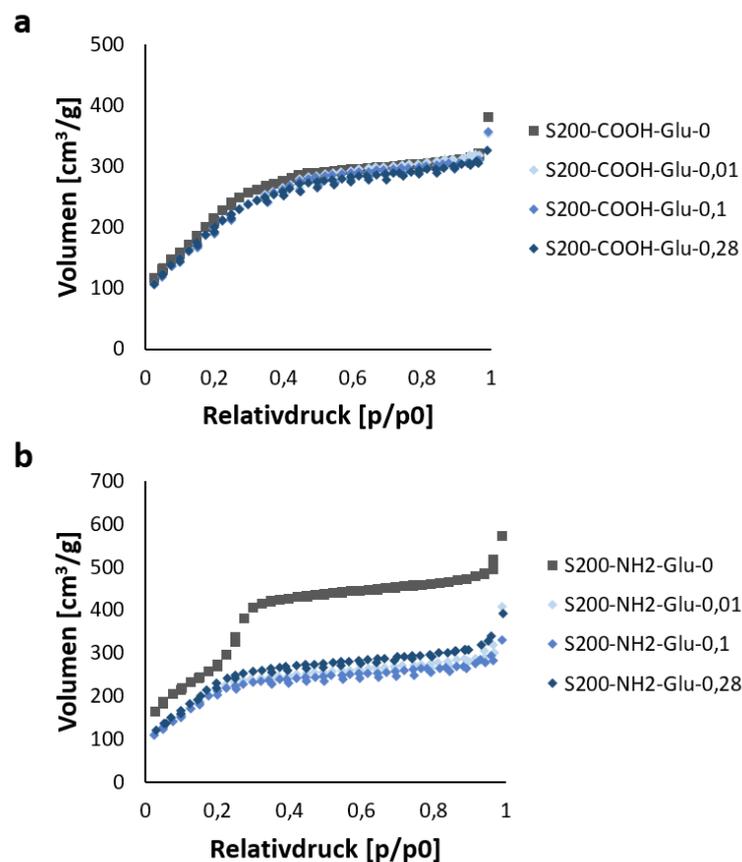


Abbildung 14: Stickstoffsorptionsmessungen von mesoporösen Silikananopartikeln, vor sowie nach der Anbindung unterschiedlicher Mengen an Glucosamin a) bzw. Glucuronsäure b). Die Suffixe 0-0,28 geben die jeweils verwendeten Mengen an Glucosederivaten in mmol/g an.

In Verbindung mit den zuvor gezeigten TGA-Messungen kann somit in der Tat von einer geringeren Funktionalisierung der Partikeloberfläche der S200-COOH Partikel mit Glucosamin ausgegangen werden.

Für die Funktionalisierung mit Glucuronsäure kann hingegen eine geringfügige Abnahme der Porendurchmesser und -Volumen (Abbildung 14 a, Abbildung 15 b und Tabelle 2) detektiert werden. Dies spricht für eine geringfügige Blockierung des Porensystems durch angebundene Glukosemoleküle und ist ebenfalls in einer Reduktion der spezifischen Oberfläche erkennbar.

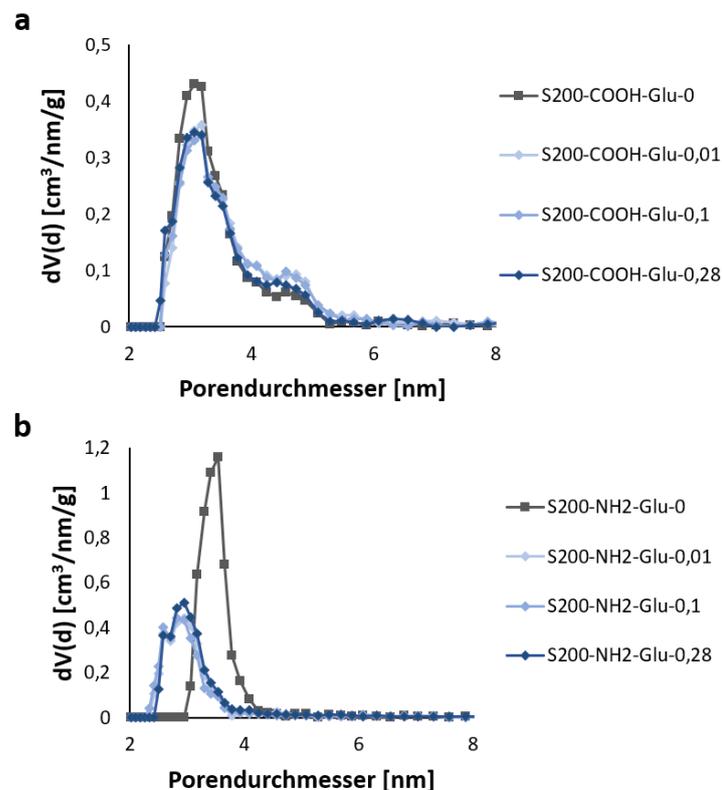


Abbildung 15: Darstellung der Porenverteilung vor und nach der Funktionalisierung von S200-COOH bzw. S200-NH₂ Partikeln mit Glucosamin a) bzw. Glucuronsäure b).

Eine erfolgreiche Anbindung von Glucuronsäure auf die Oberfläche von S200-NH₂ Partikeln kann weiterhin durch entsprechende Zeta-Potentialmessungen in 1 mM KCl-Lösung (aq.) bestätigt werden. Mit steigendem Einsatz an Glucuronsäure ist eine Reduktion des Zeta-Potentials von ursprünglich 29 mV auf bis zu 18 mV (Tabelle 2) detektierbar. Durch eine kovalente Anbindung von Glucuronsäuremolekülen an NH₂-Funktionen auf der Oberfläche von MSN kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl an

NH₂-Funktionalitäten, wodurch ein ursprünglich stark positives Zeta-Potential reduziert wird. Eine vergleichbare Abnahme ist für bereits negativ geladene S200-COOH-Glu Partikel (-35 mV), auch bei Verwendung einer sehr großen Glucosaminkonzentration, erwartungsgemäß nicht zu beobachten, da im Fall der COOH-funktionalisierten Ausgangspartikel bereits ein stark negatives Zeta-Potential bestimmt werden konnte (Tabelle 1).

Eine Zusammenfassung der Charakterisierung aller hergestellten glucosefunktionalisierten Partikel ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Physiochemische Charakterisierung von Glukosefunktionalisierten MSN.

MSN	$n_{\text{Glucosederivat}} / m_{\text{Partikel}}$ [μmol/g]	$S_{\text{BET}} /$ [m ² · g ⁻¹]	$V_{\text{Pore (NLDFT)}}$ [cm ³ · g ⁻¹]	$d_{\text{Pore (NLDFT)}}$ [nm]	ζ-Pot. [mV]	TGA-Differenz (150-600 °C) [%]	TGA-Differenz zu Ausgangs- partikeln [%]	$d_{\text{Partikel (TEM)}}$ [nm]
S200NH ₂ -Glu-0	0	990	0,8	3,5	29 ± 0,3	10,8	-	175 ± 9
S200NH ₂ -Glu-0,01	10	820	0,4	2,8	26 ± 0,3	10,8	1,7	170 ± 8
S200NH ₂ -Glu-0,1	100	780	0,4	2,8	20 ± 0,7	12,5	4,3	170 ± 8
S200NH ₂ -Glu-0,28	280	880	0,5	2,9	18 ± 0,2	23,2	12,4	170 ± 8
S200COOH-Glu-0	0	750	0,5	3,1	-35 ± 0,5	4,6	-	177 ± 18
S200COOH-Glu-0,01	10	690	0,5	3,2	-32 ± 1,0	6,9	2,3	178 ± 21
S200COOH-Glu-0,1	100	680	0,5	3,2	-35 ± 0,8	6,9	2,2	177 ± 15
S200COOH-Glu-0,28	280	700	0,5	3,1	-35 ± 0,6	7,6	3,0	177 ± 14

2.1.3 Hyaluronsäurefunktionalisierung von S200 MSN

Eine weitere untersuchte Oberflächenmodifikation stellt die Anbindung von Hyaluronsäuremolekülen auf der Oberfläche von S200-NH₂ Partikeln dar.

Hyaluronsäure (HS) ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid und zeichnet sich durch eine glycosidische $\beta(1\rightarrow3)$ Verknüpfung von Glucuronsäure mit N-Acetyl-D-glucosamin, gefolgt von einer weiteren glycosidischen $\beta(1\rightarrow4)$ Verknüpfung zu einem weiteren Glucuronsäuremolekül aus (vergl. Abbildung 16). Die so erzeugte Polysaccharidkette kann dabei aus bis zu 50.000 miteinander verknüpften Disaccharideinheiten aufgebaut sein.

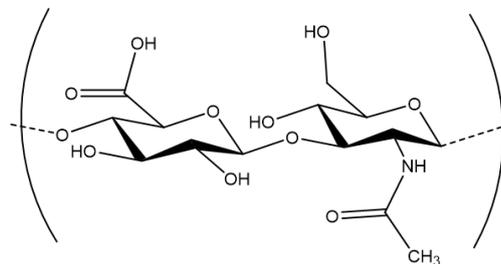


Abbildung 16: Ausschnitt aus der Strukturformel von Hyaluronsäure.

Das natürliche Vorkommen von HS umfasst, neben dem Glaskörper des Auges und der Synovialflüssigkeit von Gelenken, vor allem die extrazelluläre Matrix (EZM, vergl. Kapitel IV.1.1). Folglich handelt es sich bei HS um eine biokompatible Verbindung, welche sich durch eine biologische Abbaubarkeit und ausbleibende Immunogenität auszeichnet.^{[73],[74],[75],[76]}

Neben diesen Eigenschaften trägt HS zudem zu einer Vielzahl von Prozessen bei der Rekonstruktion natürlichen Gewebes bei. Hierzu zählen neben der Aktivierung von Entzündungszellen zur Verbesserung der Immunreaktion^{[77],[78],[79]} auch die Beteiligung beim Wiederaufbau von Fibroblasten^{[80],[81]} und Epithelzellen^{[82],[83],[84]} sowie die Bereitstellung eines Gerüstmaterials bei der Neubildung von Blutgefäßen.^{[85],[86]}

Auf Grundlage dieser Eigenschaften von HS soll in diesem Kapitel eine Anbindung von HS an die Oberfläche von MSN untersucht werden. Diese HS-funktionalisierten Partikel sollen dabei für einen späteren Einsatz innerhalb hybrider Hydrogelnetzwerke für die Geweberekonstruktion zur Verfügung gestellt werden.

Die in dieser Arbeit synthetisierten und HS-modifizierten Partikel werden im Folgenden als S200-HS-X bezeichnet, wobei X die für die Funktionalisierung eingesetzte Menge an HS in Gew% angibt. Für die Synthese wurde eine HS mit einer vergleichsweise geringen Größe von 1500-1800 kDa eingesetzt, da bei größeren HS-Molekülen bei einer Behandlung mittels Ultraschall eine leichtere Fragmentierung der längeren Polysaccharidketten auftreten kann.

Die Oberflächenmodifikation mit HS erfolgte in Anlehnung an eine Arbeit von Stile *et al.*^[87] Dabei wurden, ausgehend von S200-NH₂ Partikeln, unterschiedliche Mengen an HS kovalent an die Oberfläche der Partikel angebunden. Eine entsprechende Anbindung erfolgte mittels EDC/NHS Kupplung (Abbildung 83, Anhang). Hierfür wurden zunächst die COOH-Funktionalitäten der HS aktiviert und anschließend mit NH₂-Gruppen auf der Partikeloberfläche umgesetzt.

Betrachtet man die Molekülstruktur von HS, lässt sich erkennen, dass an dieser Stelle nicht eine definierte COOH-Funktion als Reaktionspartner eingesetzt werden kann, sondern eine Vielzahl an COOH-Funktionalitäten innerhalb der Molekülstruktur gleichzeitig reagieren können. Auf Grund dessen kann eine mehrfache Anbindung eines HS-Moleküls an die Oberfläche eines Partikels nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist auch eine überbrückende Anbindung der HS an die Oberfläche von zwei oder mehr Partikeln denkbar. Die eingesetzten Mengen an HS entsprachen 5, 10, 15 und 30 Gew%, in Bezug auf die verwendete Partikelmenge. Eine potentielle Bildung von Agglomeraten, speziell bei der Verwendung höherer HS-Mengen, sollte daher durch bildgebende Verfahren untersucht werden. Die Visualisierung der Partikelmorphologie, Porosität sowie potentielle Bildung von Agglomeraten erfolgte analog zu den zuvor gezeigten Partikeln mittels TEM-(Querschnitts-)Messungen (Abbildung 17). In Abbildung 17 werden Partikel, welche mit der geringsten (5 Gew%) und höchsten (30 Gew%) Menge an HS funktionalisiert wurden, exemplarisch dargestellt. Unabhängig von der gewählten HS-Menge lässt sich eine homogene Partikelverteilung ohne die Bildung von Agglomeraten erkennen.

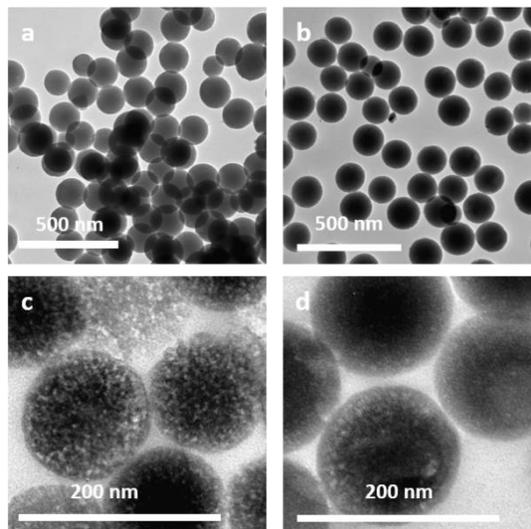


Abbildung 17: TEM- und TEM-Querschnittsaufnahmen von Hyaluronsäure-modifizierten S200 Partikeln. A und c) S200-HS-5 Partikel; b und d) S200-HS-30 Partikel. Die Suffixe 5 bzw. 30 stellen die Einsatzmenge von HS in Gew% dar.

Die Bestimmung der Partikeldurchmesser ergab eine relativ enge Größenverteilung (Abbildung 18), wobei lediglich eine geringfügige Reduktion des Partikeldurchmessers, gegenüber den zu Grunde liegenden Ausgangspartikeln, zu beobachten war. Eine entsprechende Reduktion der Partikeldurchmesser ist hierbei durch eine synthesebedingte Behandlung der Partikel im wässrigen Milieu (HEPES-Puffer) zu erklären. Wie TEM-Querschnittsaufnahmen in Abbildung 17 c und d zu entnehmen ist, weisen die Partikel jedoch auch nach der Funktionalisierung mit HS weiterhin ein poröses Partikelsystem auf.

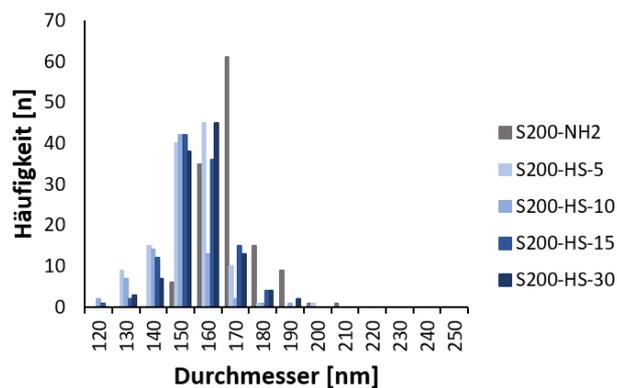


Abbildung 18: Partikelgrößenverteilung vor und nach der Anbindung unterschiedlicher Mengen an Hyaluronsäure.

Stickstoffsorptionsmessungen der HS-funktionalisierten Partikel zeigen, vergleichbar zu den entsprechenden Ausgangspartikeln (S200-NH₂, Abbildung 9), weiterhin Typ IV Isothermen nach IUPAC.

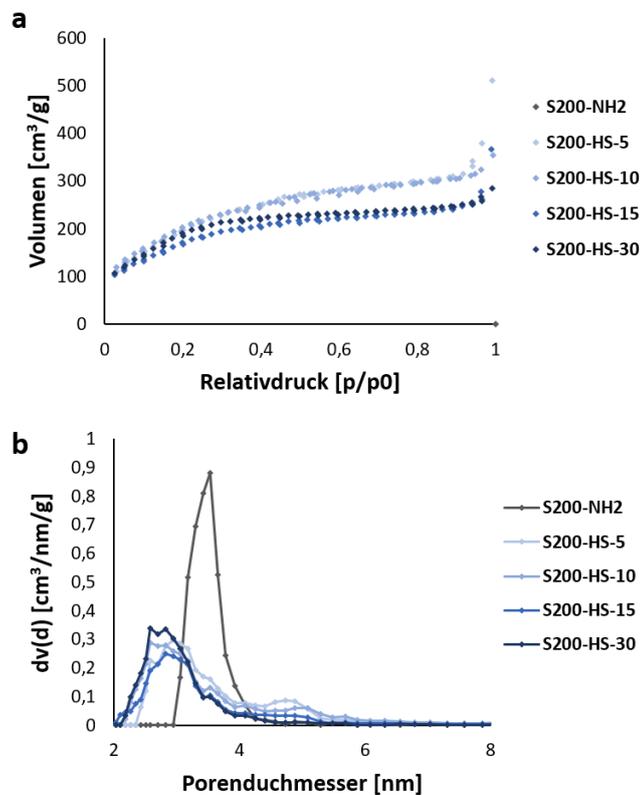


Abbildung 19: A) Exemplarische Stickstoffsorptionsmessung und b) Bestimmung des Porendurchmessers mittels nicht-lokaler Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT-Methode) für sphärische S200 Partikel, welche mit unterschiedlichen Mengen (5-30 Gew%) HS funktionalisiert wurden.

Verglichen zu den zugrundeliegenden Ausgangspartikeln bewirkt die Anbindung unterschiedlicher Mengen an HS eine geringe Reduktion der spezifischen Oberfläche, sowie eine Abnahme der Porendurchmesser und -volumina (vergl. Tabelle 3). Dies spricht für eine geringfügige Blockierung des Porensystems durch angebundene HS-Moleküle und ist ebenfalls in einer Reduktion der spezifischen Oberfläche erkennbar (Abbildung 19 a und b).

Für eine qualitative Bestimmung der angebondenen HS-Menge wurden TGA-Messungen durchgeführt (Abbildung 20). Dabei ist bereits bei Verwendung einer geringen Menge an HS (5 Gew%) ein starker Massenverlust in einem Temperaturbereich zwischen 150 und 600 °C detektierbar. Der Einsatz größerer Mengen an HS weist hingegen keine

deutliche Vergrößerung des Massenverlusts auf. Dies deutet auf eine Sättigung der Partikeloberfläche bzw. das Erreichen eines Funktionalisierungsmaximums hin.

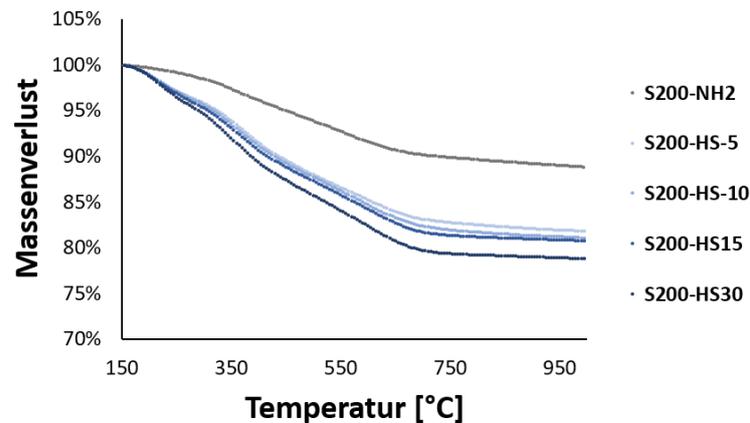


Abbildung 20: Darstellung exemplarischer TGA-Messungen von S200-HS-funktionalisierten Partikeln. Die Funktionalisierung erfolgte auf Basis von S200-NH₂ Partikeln mit unterschiedlichen Mengen an HS (5-30 Gew%). Die Messungen wurden normiert auf eine Temperatur von 150 °C.

Die in Abbildung 20 aufgetragenen Massenverluste wurden, für eine bessere Vergleichbarkeit, auf eine Temperatur von 150 °C normiert. Eine geringfügige Steigerung des Massenverlusts bei steigendem HS-Einsatz ist auf eine schlechte Kupplung zwischen Partikeloberfläche und HS zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine zunehmende sterische Hinderung bei der Anbindung dieser großen HS-Moleküle.

Betrachtet man entsprechende Zeta-Potentialmessungen von HS-funktionalisierten Partikeln, lässt sich mit zunehmender Menge an HS die Ausbildung eines Plateaus erkennen. Weisen S200-NH₂ noch ein stark positives Zeta-Potential (+27 mV) auf, wird dieses durch die Anbindung bereits geringer Mengen an HS stark reduziert. Eine entsprechende Reduktion des Zeta-Potentials ist durch eine Vielzahl an OH-Funktionalitäten, innerhalb der Molekülstruktur der angebondenen HS, erklärbar. Für eine Funktionalisierung mit 10 Gew% HS können nach außen hin neutral geladene Partikel erhalten werden. Durch eine weitere Erhöhung der verwendeten HS-Menge kann schließlich eine Erniedrigung des Zeta-Potentials auf einen Wert von ca. -12 mV erzielt werden. Dieser Wert konnte auch durch eine Verdopplung der verwendeten HS-Menge nicht weiter reduziert werden. Dies deutet ebenfalls auf die Ausbildung eines Belegungs- bzw. Funktionalisierungsmaximums hin. Ein Zeta-Potential von ca. -12 mV steht hierbei in Einklang mit einer Arbeit von Ma *et al.*^[88], in welcher für HS-funktionalisierte Partikel ein Zeta-Potential von -15 mV berichtet wurde.

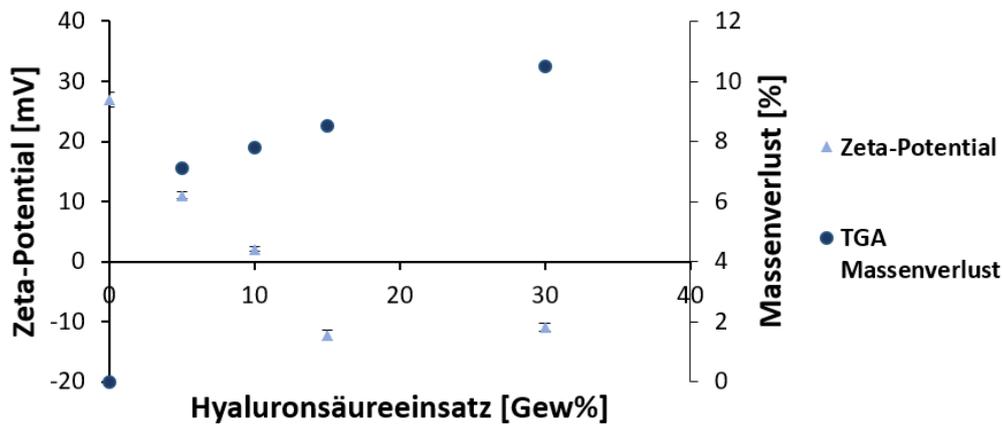


Abbildung 21: Darstellung der Abhängigkeit zwischen Oberflächenladung und verwendeter Hyaluronsäure-Menge. Die aufgeführten Massenverluste wurden in jeweiligen TGA-Messungen zwischen 150 °C und 600 °C bestimmt.

Die Untersuchung von Partikeln, welche mit HS-Konzentrationen über 30 Gew% funktionalisiert wurden, war an dieser Stelle nicht möglich, da die verwendete HS oberhalb dieser Konzentration ein stabiles Hydrogel ausbildete. Dadurch konnte eine Separation und Aufarbeitung der Partikel bei entsprechend hohen HS-Konzentrationen nicht durchgeführt werden.

Zusammenfassend sind in Tabelle 3 die physiochemischen Eigenschaften der in diesem Kapitel synthetisierten S200-HS Partikel aufgeführt.

Tabelle 3: Physiochemische Eigenschaften von S200-HS Partikeln.

MSN	$S_{\text{BET}} /$ [$\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$]	$V_{\text{Pore (NLDFT)}}$ [$\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$]	$d_{\text{Pore (NLDFT)}}$ [nm]	$\zeta\text{-Pot.}$ [mV]	TGA-Differenz (150-600 °C) [%]	TGA-Differenz zu Ausgangspartikeln [%]	$d_{\text{Partikel (TEM)}}$ [nm]
S200-NH ₂	810	0,7	3,5	27 ± 0,2	9,8	-	171 ± 11
S200-NH ₂ -HS-5 (5 gew%)	760	0,6	2,9	12 ± 0,6	16,9	7,0	153 ± 13
S200-NH ₂ -HS-10 (10 gew%)	740	0,5	2,6	2 ± 0,4	17,6	7,8	146 ± 19
S200-NH ₂ -HS-15 (15 gew%)	630	0,4	2,8	-12 ± 0,9	18,2	8,4	156 ± 12
S200-NH ₂ -HS-30 (30 gew%)	700	0,4	2,6	-12 ± 0,7	20,3	10,4	157 ± 10

2.2 Stäbchenförmige mesoporöse Silikapartikel mit unterschiedlichen Funktionalisierungen

Neben der Synthese von sphärischen MSN wurden in dieser Arbeit auch zylindrische, stäbchenförmige MSN hergestellt. Die Synthese erfolgte hierfür nach einer abgeänderten Vorschrift von Huang *et al.*^[89] Dabei konnten stäbchenförmige Partikel mit unterschiedlichen Länge-Breite-Verhältnissen von 2 (Z2) und 4 (Z4) erzeugt werden. Wie bereits von M. Beck in Ihrer Dissertation^[72] gezeigt, ist es außerdem möglich, durch Variation der Hydrophobizität der Lösung durch Zugabe von Ethylenglycol (EG), das Länge-Breite Verhältnis von Partikeln weiter zu reduzieren. Durch Variation der zugegebenen EG-Menge konnten auf diese Weise Stäbchen mit einem Verhältnis von 1,5 (Z1,5) sowie sphärische Stäbchen (Z1) mit einem Partikeldurchmesser von ca. 100 nm synthetisiert werden.

Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten sphärischen Partikeln, welche ein ungeordnetes Porensystem aufwiesen, kann für stäbchenförmige Partikel ein hochgeordnetes 2D-hexagonales Porensystem beobachtet werden (Abbildung 22 e-g).

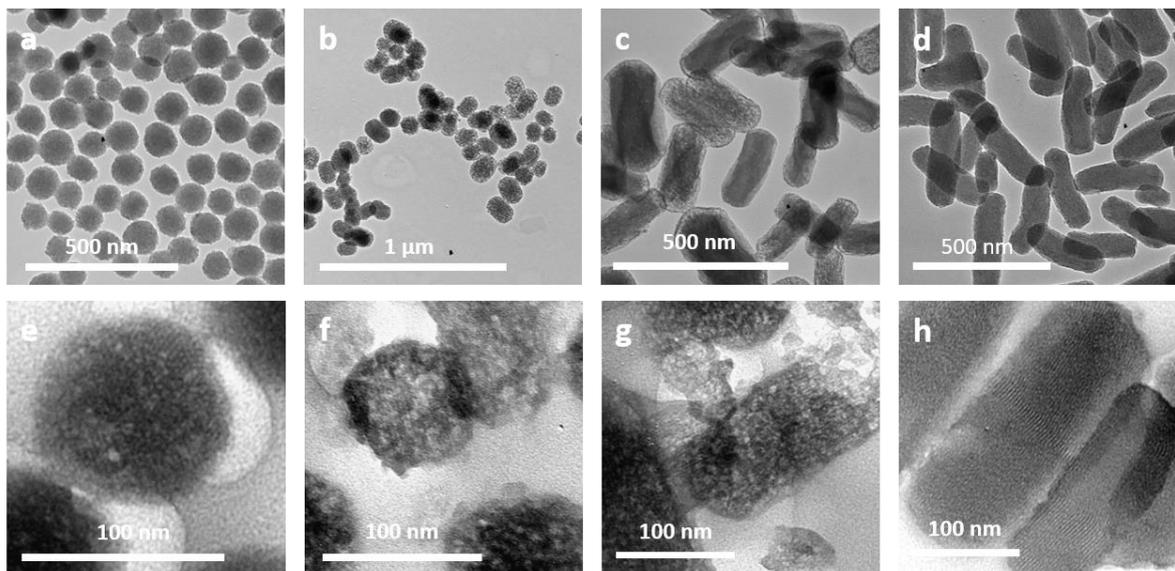


Abbildung 22: Darstellung der Morphologie von stäbchenförmigen, unfunktionalisierten Silikananopartikeln, a)-d) mit Länge-zu-Breite-Verhältnissen von Z1; Z1,5; Z2 sowie Z4. Die Visualisierung des Porensystems erfolgte anhand von Querschnittsaufnahmen der jeweiligen Partikel e)-h).

Die Morphologie der synthetisierten Partikel wurde mittels TEM-Messungen visualisiert (Abbildung 22). Ausgehend von diesen Visualisierungen und einer anschließenden Bestimmung der Längen und Breiten der Partikel, wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Verhältnisse für unterschiedlich funktionalisierte stäbchenförmige Partikel erhalten. Durch anschließende post-synthetische Funktionalisierung mit geeigneten Silanen konnten unterschiedliche Oberflächenfunktionalitäten (NH₂- und COOH-) eingeführt werden.

Tabelle 4: Bestimmung der Länge-Breite-Verhältnisse für unterschiedlich funktionalisierte stäbchenförmige Partikel.

Bezeichnung	Z1,5			Z2			Z4		
Funktionalität	-OH	-COOH	-NH ₂	-OH	-COOH	-NH ₂	-OH	-COOH	-NH ₂
Verhältnis	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,3	3,4 ± 0,4

Für die Bestimmung der spezifischen Oberfläche von stäbchenförmigen Partikeln wurden Stickstoffsorptionsmessungen vorgenommen. Hierbei lassen sich, vergleichbar zu den zuvor dargestellten S200 und S400 Partikeln (Abbildung 9), Typ IV Isothermen nach IUPAC erkennen. Da die Herstellung stäbchenförmiger Partikel lediglich unter Verwendung eines unfunktionalisierten Silikapräkursors (TEOS) erfolgte, mussten weitere funktionelle Gruppen mittels post-synthetischer Modifikation eingeführt werden. Durch eine nachträgliche Anbindung entsprechend funktionalisierter Silane konnte, wie in Abbildung 89 (Anhang) zu erkennen ist, eine leichte Reduktion der Porendurchmesser und Porenvolumina sowie schlussendlich eine Reduktion der spezifischen Oberfläche dieser funktionalisierten Partikel bestimmt werden. Exemplarische Stickstoffsorptionsmessungen dieser unterschiedlich funktionalisierten stäbchenförmigen Partikeln sind in Abbildung 88 (Anhang) aufgeführt.

Eine erfolgreiche Anbindung unterschiedlich funktionalisierter Silane lässt sich zudem mittels TGA-Messungen und durch Bestimmung der jeweiligen Zeta-Potentiale nachweisen. Wie Abbildung 90 (Anhang) zu entnehmen ist, kommt es, im Vergleich zu unfunktionalisierten Ausgangspartikeln (MSN-OH), für NH₂- und COOH-funktionalisierte Partikel während der TGA-Messungen zu einem erhöhten Massenverlust. Dies lässt, wie zuvor bereits für sphärische MSN unterschiedlicher Oberflächenmodifikation gezeigt, auf eine erfolgreiche post-synthetische Anbindung der verwendeten Silane schließen.

Zusätzlich weist die Erhöhung (für NH₂-funktionalisierte MSN) bzw. Erniedrigung (für COOH-funktionalisierte MSN) der jeweiligen Zeta-Potentiale eine erfolgreiche Anbindung der jeweiligen Funktionalität nach (vergl. Tabelle 5).

Eine vollständige physiochemische Charakterisierung aller in diesem Kapitel synthetisierten stäbchenförmigen Partikel ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Physiochemische Charakterisierung von zylindrischen, stäbchenförmigen Partikeln mit unterschiedlichen Länge-Breite-Verhältnissen.

MSN	$S_{\text{BET}} /$ [m ² · g ⁻¹]	$V_{\text{Pore (NLDFT)}}$ [cm ³ · g ⁻¹]	$d_{\text{Pore (NLDFT)}}$ [nm]	$\zeta\text{-Pot.}$ [mV]	TGA-Differenz (150-600 °C) [%]	Verhältnis Länge:Breite	$d_{\text{Partikel (TEM)}}$ [nm]
Z1-NH ₂ (∅ ~100 nm)	560	0,5	2,9	37 ± 2	11,7	1	102 ± 13
Z1,5-NH ₂	580	0,6	3,2	25 ± 1	11,0	1,4 ± 0,1	-
Z2-NH ₂	530	0,3	2,9	34 ± 1	9,6	2,2 ± 0,3	-
Z4-NH ₂	800	0,4	2,8	39 ± 2	11,0	3,4 ± 0,4	-
Z1-OH (∅ ~100 nm)	1020	0,8	2,8	-12 ± 0,3	2,3	1	103 ± 14
Z1,5-OH	1040	0,9	3,7	-18 ± 1	0,7	1,4 ± 0,1	-
Z2-OH	980	0,7	3,5	-30 ± 1	0,3	2,2 ± 0,3	-
Z4-OH	950	0,7	3,2	-22 ± 2	1,0	3,6 ± 0,4	-
Z1-COOH (∅ ~100 nm)	900	0,7	3,3	-14 ± 1	5,2	1	102 ± 13
Z1,5-COOH	800	0,8	3,5	-26 ± 1	5,7	1,4 ± 0,1	-
Z2-COOH	760	0,6	3,2	-16 ± 1	5,5	2,2 ± 0,2	-
Z4-COOH	780	0,5	3,2	-16 ± 1	4,8	3,5 ± 0,3	-

3. Zusammenfassung aller synthetisierten Partikel

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sphärische Partikel mit unterschiedlichen Partikeldurchmessern (200 nm sowie 400 nm) und einer homogenen Größenverteilung erfolgreich synthetisiert werden konnten. Eine schematische Darstellung der durchgeführten Synthesen, welche in Anlehnung an eine Synthese nach Rosenholm *et al.*^[70] durchgeführt wurden, ist in Abbildung 23 dargestellt.

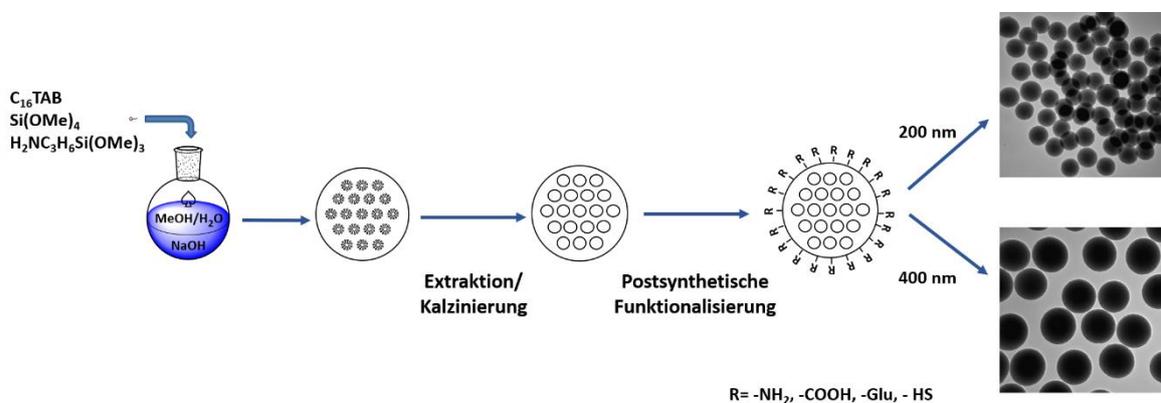


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Synthese sphärischer Silikananopartikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung.

Weiterhin konnten stäbchenförmige Partikel veränderter Länge-Breite-Verhältnisse (Z1; Z1,5; Z2 sowie Z4) auf Basis einer Synthese nach Huang *et al.*^[89], synthetisiert werden (Abbildung 24). Eine post-synthetische Funktionalisierung ermöglichte die Anbindung geeigneter Silane und in Folge dessen die Einführung unterschiedlicher ($-NH_2$ und $-COOH$) Oberflächenfunktionalitäten.

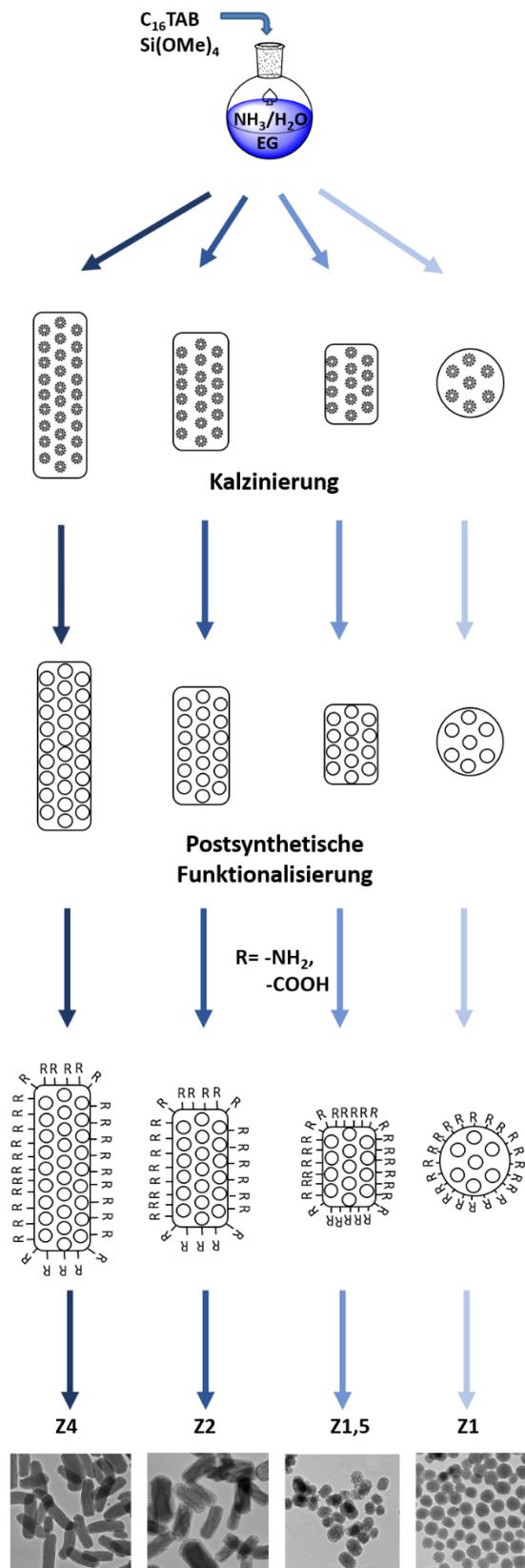


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Synthese stäbchenförmiger mesoporöser Silikananopartikel unterschiedlicher Länge-Breite-Verhältnisse und unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung.

Eine physiochemische Charakterisierung aller in dieser Arbeit synthetisierten MSN ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Gesamtübersicht der physiochemischen Eigenschaften aller in dieser Arbeit synthetisierten Partikel.

MSN	$S_{\text{BET}} /$ [m ² · g ⁻¹]	V_{Pore} (NLDFT) [cm ³ · g ⁻¹]	d_{Pore} (NLDFT) [nm]	ζ -Pot. [mV]	TGA- Differenz (150-600 °C) [%]	TGA-Differenz zu Ausgangs- partikeln [%]	d_{Partikel} (TEM) [nm]	Verhältnis Länge- Breite
S200NH ₂	850 ± 100	0,5 ± 0,1	2,9 ± 0,5	27 ± 1,3	13,4	-	178 ± 29	-
S200OH	1080 ± 150	0,9 ± 0,3	3,2 ± 0,3	-29 ± 1,8	0,5	-	170 ± 15	-
S200COOH	750 ± 100	0,7 ± 0,1	3,0 ± 0,5	-33 ± 1,2	7,1	-	169 ± 10	-
S400NH ₂	880 ± 150	0,4 ± 0,2	3,1 ± 0,6	29 ± 0,5	14,0	-	390 ± 18	-
S400OH	950 ± 120	0,7 ± 0,2	3,1 ± 0,3	-22 ± 1,2	1,2	-	368 ± 21	-
S400COOH	780 ± 100	0,7 ± 0,1	2,9 ± 0,4	-35 ± 1,0	7,2	-	370 ± 16	-
S200NH ₂ -Glu-0	0	990	0,8	3,5	29 ± 0,3	-	175 ± 9	-
S200NH ₂ -Glu-0,01	10	820	0,4	2,8	26 ± 0,3	1,7	170 ± 8	-
S200NH ₂ -Glu-0,1	100	780	0,4	2,8	20 ± 0,7	4,3	170 ± 8	-
S200NH ₂ -Glu-0,28	280	880	0,5	2,9	18 ± 0,2	12,4	170 ± 8	-
S200COOH-Glu-0	0	750	0,5	3,1	-35 ± 0,5	-	177 ± 18	-
S200COOH-Glu-0,01	10	690	0,5	3,2	-32 ± 1,0	2,3	178 ± 21	-
S200COOH-Glu-0,1	100	680	0,5	3,2	-35 ± 0,8	2,2	177 ± 15	-
S200COOH-Glu-0,28	280	700	0,5	3,1	-35 ± 0,6	3,0	177 ± 14	-
S200-NH ₂	810	0,7	3,5	27 ± 0,2	9,8	0	171 ± 11	-
S200-HS-5 (5 gew%)	760	0,6	2,9	12 ± 0,6	16,9	7,0	153 ± 13	-
S200-HS-10 (10 gew%)	740	0,5	2,6	2 ± 0,4	17,6	7,8	146 ± 19	-
S200-HS-15 (15 gew%)	630	0,4	2,8	-12 ± 0,9	18,2	8,4	156 ± 12	-
S200-HS-30 (30 gew%)	700	0,4	2,6	-12 ± 0,7	20,3	10,4	157 ± 10	-
Z1-NH ₂ (Ø ~100 nm)	560	0,5	2,9	37 ± 2	11,7	-	102 ± 13	1
Z1,5-NH ₂	580	0,6	3,2	25 ± 1	11,0	-	-	1,4 ± 0,1
Z2-NH ₂	530	0,3	2,9	34 ± 1	9,6	-	-	2,2 ± 0,3
Z4-NH ₂	800	0,4	2,8	39 ± 2	11,0	-	-	3,4 ± 0,4
Z1-OH (Ø ~100 nm)	1020	0,8	2,8	-12 ± 0,3	2,3	-	103 ± 14	1
Z1,5-OH	1040	0,9	3,7	-18 ± 1	0,7	-	-	1,4 ± 0,1
Z2-OH	980	0,7	3,5	-30 ± 1	0,3	-	-	2,2 ± 0,3
Z4-OH	950	0,7	3,2	-22 ± 2	1,0	-	-	3,6 ± 0,4
Z1-COOH (Ø ~100 nm)	900	0,7	3,3	-14 ± 1	5,2	-	102 ± 13	1
Z1,5-COOH	800	0,8	3,5	-26 ± 1	5,7	-	-	1,4 ± 0,1
Z2-COOH	760	0,6	3,2	-16 ± 1	5,5	-	-	2,2 ± 0,2
Z4-COOH	780	0,5	3,2	-16 ± 1	4,8	-	-	3,5 ± 0,3

IV Hybride Hydrogele für Anwendungen im Bereich der Geweberekonstruktion

1. Theorie

Wie bereits zuvor im Kapitel I.1 beschrieben, stellt ein Hauptziel der Geweberekonstruktion die möglichst exakte Nachahmung der natürlichen Umgebung eines zu ersetzenden Gewebes dar. In einer klassischen zweidimensionalen (2D)-Zellkultur kommt es, bedingt durch ein topologisches Wachstum auf einer Oberfläche, jedoch lediglich zu einem zweidimensionalen Kontakt zwischen benachbarten Zellen, sowie zu einem ausgedehnten Kontakt mit einem darunterliegenden, künstlichen Substrat. Dies ahmt somit eine natürliche zelluläre Umgebung, bei der Zell-Zell Kontakte in allen Raumrichtungen und Zellkontakte mit einem umgebenden dreidimensionalen (3D)-Netzwerk erfolgen, nicht hinreichend nach. Aus diesem Grund zählt, neben der Kontrolle von biochemischen Signalwegen durch Verwendung geeigneter Wirkstoffe, vor allem die Imitation der natürlichen dreidimensionalen Struktur des Gewebes zu einer der Hauptaufgaben bei dem Versuch geeignete Materialien für die Geweberekonstruktion zu generieren.^[90]

1.1 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Um eine möglichst genaue Nachbildung der zellulären Umgebung zu erzielen, muss zunächst die entsprechende Umgebung von Zellen untersucht werden. Die natürliche dreidimensionale Umgebung einer Zelle wird hierbei als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet. Allgemein lässt sich diese EZM als hierarchisch organisiertes Nanokompositmaterial beschreiben, welches mit umgebenden Zellen interagiert und dabei Zellfunktionen wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung reguliert.^[91] Die natürliche EZM setzt sich dabei aus einer Vielzahl an Glycoproteinen (u.a. Fibronectin, Laminin und unterschiedliche Kollagene) zusammen. Diese ermöglichen, infolge einer Interaktion mit Rezeptorproteinen auf der Zellmembran, eine Adhäsion von umliegenden

Zellen.^[92] Darüber hinaus reagieren Zellen, innerhalb der EZM, auf netzwerkinduzierte mechanische Reize und können diese in chemische Signale umwandeln.^[3] Basierend auf diesen Erkenntnissen erklärt sich das immense Interesse, die zuvor beschriebene natürliche Umgebung von Zellen möglichst genau nachzuahmen, um so eine kontrollierte Zellentwicklung realisieren zu können. Ein potentielles Material für die Nachbildung dieser natürlichen EZM stellen Hydrogele dar.^[93]

1.2 Hydrogele

Der Aufbau von Hydrogelen basiert auf der Verwendung von Polymer- oder Peptidketten, die unter definierten Bedingungen ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden. Die Verknüpfung von Polymersträngen kann dabei auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen, zum einen durch eine permanente chemische Vernetzung zwischen kompatiblen funktionellen Gruppen und zum anderen durch physikalische Vernetzung.

Entsprechende physikalische Vernetzungen können dabei sowohl durch Verstrickung von Polymerketten untereinander als auch durch Ausbildung physikalischer Wechselwirkungen, wie zum Beispiel elektrostatischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophoben Wechselwirkungen, zwischen einzelnen Polymersträngen erfolgen.^[94]

Die Gelierung bzw. Initiierung der Netzwerkbildung in Hydrogelen ist durch eine Vielzahl an äußeren Stimuli realisierbar. So konnte neben einer salzinduzierten Gelierung des Hydrogelnetzwerks auch durch Variation der Temperatur, des pH-Werts, durch die Anwesenheit von Enzymen oder die Hydrophilie des umgebenden Mediums eine Netzwerkbildung erzielt werden.^{[95],[96],[97],[98]}

Da durch diese Verknüpfung eine Unterscheidung einzelner Moleküle innerhalb der gebildeten Struktur unmöglich wird, werden Hydrogele oftmals auch als „unendlich lange Moleküle“ oder „Super-Makromoleküle“ bezeichnet.^[95] Durch die Variation der Menge an Verknüpfungspunkten lässt sich zudem der Abbau des Netzwerks sowie die mechanische Festigkeit der gebildeten Hydrogelstrukturen im Hinblick auf spätere Anwendungen steuern.

Auch wenn sich, wie zuvor beschrieben, einzelne Moleküle innerhalb eines gebildeten Hydrogelnetzwerks nur schwer unterscheiden lassen, können bei einer genaueren Betrachtung der gebildeten Polymerketten eine Vielzahl an funktionellen Gruppen (z.B. COOH-, NH₂- oder OH-Gruppen) auf der Oberfläche der gebildeten Polymerstränge detektiert werden. Diese hydrophilen Gruppen sind für die sehr gute Aufnahmefähigkeit von Wasser in die Hydrogelstrukturen verantwortlich, wodurch die Klasse der Hydrogele ihre Bezeichnung erhält. Dabei erfolgt durch den Einschluss großer Mengen an Wasser zwischen den Polymersträngen des Netzwerks ein Anschwellen der Struktur.^[17]

1.3 Selbstassemblierende Peptide

Für die Herstellung fibrillärer Hydrogelnetzwerke eignen sich sowohl synthetisch hergestellte als auch natürliche Polymere. Einige in diesem Zusammenhang bereits ausgiebig untersuchte Vertreter sind neben synthetischen Polymeren wie Poly(D,L-lactid) (PLLA), Poly[lactid-co-(glycolid)] (PLGA) auch Biomaterialien wie Alginat oder Kollagen.^{[99],[100],[101]} Betrachtet man die gebildeten faserartigen Strukturen bei der Verwendung dieser Polymere, fällt auf, dass diese aus Microfasern und Microporen mit mehreren µm Durchmessern aufgebaut sind. Somit bewegen sich die gebildeten Fasern in der Größenordnung von eingebrachten Zellen (ca. 5-10 µm). Dieses Größenverhältnis führt dazu, dass die gebildeten Strukturen von Zellen weiterhin lediglich wie eine 2D-Oberfläche wahrgenommen werden. Aus diesem Grund werden andere Polymere benötigt, welche ein fein strukturiertes, fibrilläres Netzwerk mit kleineren Fibrilldurchmessern und geringeren Porenweiten aufweisen.

Eine Möglichkeit, ein entsprechendes feinfibrilläres Netzwerk zu generieren, stellt die Verwendung von selbstassemblierenden Peptiden (SAP) dar. Ein erster Vertreter dieser Klasse, EAK16-II ((AEAEAKAKAEAEAKAK)₂), konnte bereits 1993 aus dem Hefeprotein Zuotin extrahiert werden.^[102] Durch eine alternierende Abfolge aus ionisch, hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren kommt es in Anwesenheit von monovalenten Kationen zur Bildung fibrillärer β-Faltblattstrukturen.^[103]

Das Prinzip der alternierenden hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren konnte in den darauffolgenden Jahren auf die Synthese einer Vielzahl an unterschiedlichen SAPs (z.B. RADA16, KLD12, KFE8) angewandt werden.^{[104],[105],[106],[107]}

Die mechanischen Eigenschaften, sowie die Geschwindigkeit der Fibrillbildung der SAPs, können dabei durch die Länge der Peptidsequenz sowie der Anzahl an hydrophoben Bereichen eingestellt werden. Allgemein gilt, dass je höher der Anteil an hydrophoben Bereichen und je länger die Peptidsequenz ist, desto einfacher findet eine Fibrillbildung statt und desto größer sind deren mechanischen Eigenschaften in Bezug auf Festigkeit und Steifheit der gebildeten Netzwerke.^[108]

Ein an dieser Stelle hervorzuhebender Vertreter der Gruppe von SAPs stellt RADA16 dar. Durch Substitution der zuvor in EAK16-II verwendeten Aminosäuren Lysin (K) und Glutaminsäure (E), durch Asparaginsäure (D) und Arginin (R), konnte eine entsprechend veränderte, alternierende Abfolge synthetisiert werden. Dabei wurden bereits unterschiedliche Sequenzen basierend auf den Aminosäuren R, A und D (Arginin, Alanin und Asparaginsäure) als SAPs identifiziert ^[109]. Speziell im Fall von RADA16-I (AcN-RADARADARADARADA-CNH₂) liegt eine, zu Seidenfibroin vergleichbare Anordnung der Alanineinheiten vor. Auf Grund dieser Anordnung kann das große Potential dieser Sequenz, im Kontext der selbstassemblierenden Peptide, mitunter erklärt werden.^[110]

Die Gelierung dieses Peptids erfolgt, vergleichbar zu EAK16-II, in Anwesenheit von monovalenten Kationen. Dabei kommt es zu einer Anlagerung dieser Ionen an geladene Seitenketten der Aminosäuren. In Folge dieser Abschirmung der geladenen Gruppen innerhalb der RADA16-I Sequenz kommt es zu einer anschließenden Anlagerung der hydrophoben Methylgruppen aus den Seitenketten des Alanins. Auf diese Weise entstehen fibrilläre β -Faltblattstrukturen mit sehr feinen Fibrillendurchmessern von ca. 10 -16 nm.^{[111],[112]} Die Dichte des gebildeten Netzwerks ist dabei abhängig von der eingesetzten Peptidkonzentration, wobei Wassermengen von bis zu >99% (1-10 mg/mL) innerhalb des Netzwerks aufgenommen werden können.^[109]

Zusätzlich konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Biokompatibilität und Zelltoxizität gezeigt werden, wohingegen eine Immunogenität und entzündungsbildende Wirkung von RADA16-I ausgeschlossen werden konnte.^{[113],[114],[115]}

Auf Grund der dargestellten Eigenschaften konnte die gute Eignung von RADA16-I im Bereich des *Tissue Engineerings* bereits *in vitro* sowie *in vivo* für die Rekonstruktion unterschiedlichster Gewebetypen (Knochen, Knorpel, Neuronen, Leber etc.), gezeigt werden.^{[115],[116],[117],[118],[119],[120],[106]}

Eine salzinduzierte Gelierung des RADA16-I Peptids ist, mit Hinblick auf die Herstellung einer injizierbaren Hydrogelformulierung, sehr interessant für die Geweberekonstruktion. Im Falle einer späteren *in vivo* Anwendung kann ein fibrilläres Netzwerk direkt nach der Injektion in das betroffene Gewebe gebildet werden, wodurch, induziert durch die Anwesenheit umgebender Körperflüssigkeiten, eine lokale Ausbildung dieses Peptidnetzwerks sowie eine Immobilisierung der darin eingebrachten zusätzlichen Komponenten ermöglicht wird.

Das nachfolgende Kapitel beschäftigt sich daher mit der Herstellung einer injizierbaren hybriden Hydrogelformulierung, basierend auf einer Kombination des selbstassemblierenden Peptids RADA16-I, mesoporösen Silikananopartikeln (MSN) und MC3T3-E1 Knochenvorläuferzellen.

Der Einsatz von MSN in Kombination mit synthetischen oder natürlichen Hydrogelen ist bisher noch nicht weit verbreitet. Die im Themengebiet der Geweberekonstruktion angefertigten Arbeiten umfassen bisher vor allem Hydrogelformulierungen, in denen partikuläre Strukturen als Verknüpfungspunkte für die Netzwerkbildung des Hydrogels verwendet wurden.^{[121],[122]} Ein Beispiel hierfür stellt eine kürzlich von Fiorini *et al.* veröffentlichte Arbeit dar, bei der durch die Kombination von NH₂-funktionalisierten MSN mit einem Hydrogel ein hybrides Material erzeugt wurde. Das hierbei verwendete Hydrogelgerüst bestand aus einer Kombination aus Methylenbisacrylamid, γ -Aminobuttersäure und Pentaethylenhexamin. Dabei wurde sowohl eine chemische Verknüpfung zwischen den Einzelbestandteilen des Hydrogelgerüsts, als auch eine zusätzliche Verknüpfung mit den NH₂-Funktionalitäten der eingebrachten MSN ausgebildet. Für das auf diese Weise synthetisierte hybride Material konnte dabei, gegenüber dem reinen Hydrogelgerüst, eine verbesserte Biokompatibilität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden.^[123]

Die Herstellung einer hybriden Hydrogelstruktur, basierend auf einer Kombination aus selbstassemblierenden Peptid und mesoporösen Silikananopartikeln, mit dem Ziel einer aktiven zellulären Aufnahme der eingebrachten MSN, wurde hingegen bisher noch nicht beschrieben.

Die in dieser Arbeit untersuchte hybride Hydrogelformulierung, die auf einer Kombination aus MSN und RADA16-I basiert, zielt auf die Herstellung einer injizierbaren Formulierung ab. Eine injizierbare Formulierung ermöglicht dabei eine lokale Applikation des hybriden Materials und in Folge dessen eine lokale und kontrollierte Kultivierung von Knochenzellen innerhalb des gebildeten Hydrogelnetzwerks. Eingebrachte MSN und Zellen (MC3T3-E1 Zellen) sollen hierfür idealerweise gleichmäßig innerhalb dieses Netzwerks verteilt vorliegen, um dadurch eine gleichmäßige zelluläre Aufnahme der MSN zu ermöglichen. Auf diese Weise könnten potentielle Wirkstoffe, welche zuvor in das Porensystem der MSN beladen wurden, kontrolliert von Zellen aufgenommen werden. Ein solches System zielt somit auf eine Partikel-medierte lokale Applikation von benötigten Wirkstoffen ab, was potentielle Nebenwirkungen dieser reduzieren würde.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Untersuchung der Bildung eines solchen hybriden Hydrogelnetzwerks sowie der damit einhergehenden Wechselwirkung zwischen verschiedenen Partikeln und Zellen mit dem umgebenden Peptidnetzwerk konzentriert. Eine Untersuchung von biologisch relevanten Effekten, in Bezug auf die kontrollierte Differenzierung in Folge der Wirkstoffbeladung von eingebrachten MSN, wurde hingegen nicht durchgeführt.

2. Ergebnisse und Diskussion – Injizierbare hybride Hydrogele

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse, in Bezug auf die Zellkultur von MC3T3-E1 und entsprechenden FACS-Messungen sowie konfokalen Laser-Mikroskopie-Messungen, wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Rainer Wittig (Institut für Lasertechnologien in der Medizin & Messtechnik (ILM), Universität Ulm) erzielt und teilweise in der Publikation „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“ veröffentlicht.

2.1 Allgemeine Machbarkeit eines injizierbaren hybriden-Hydrogels

Für die Herstellung injizierbarer hybrider Hydrogele musste zunächst ein für alle Komponenten geeignetes Lösemittel gefunden werden.

Dabei erwies sich eine 10 Gew%-ige Sucroslösung als geeigneter Kandidat, da das verwendete RADA16-I Peptid in einer entsprechenden Lösung eine sehr gute Löslichkeit zeigte. Des Weiteren weist eine 10 Gew%-ige Sucroslösung ein isoosmolares Verhalten gegenüber Zellen auf, wodurch lösemittelbedingte Zellschädigungen verhindert werden können. In Bezug auf einzubringende mesoporöse Silikananopartikel (MSN) musste daher abschließend geklärt werden, ob die Verwendung einer 10 Gew%-igen Sucroslösung für die Herstellung stabiler Partikeldispersionen in Frage kommt. Eine erneute Agglomeration nach einer Dispergierung der Partikel in Sucroslösung würde einen Einsatz dieser Dispersionen während der Herstellung hybrider Hydrogele verhindern.

Hierfür wurden sowohl S200 als auch S400 MSN mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ oder -COOH) in einer 10 Gew%-igen Sucroslösung dispergiert und die Größe der Partikel in dieser Dispersion über 24 h mittels DLS bestimmt (Abbildung 91, Anhang). Es wurde für keine der untersuchten Dispersionen ein starker Anstieg der Partikelgröße detektiert. In diesem Zusammenhang beschrieben

Frozza *et al.*^[124] für stark positiv geladene Partikel (>30 mV) eine erhöhte Stabilität der erhaltenen Partikeldispersionen. Als Grund für diese erhöhte Stabilität wurden elektrostatische Abstoßungen zwischen den Partikeln aufgeführt. Für die hier untersuchten Partikelsysteme kann daher von der Ausbildung stabiler Partikeldispersionen, unabhängig der Oberflächenladung, in einer Sucroselösung ausgegangen werden. Eine Bildung von Agglomeraten innerhalb der untersuchten Zeitspanne konnte hingegen nicht beobachtet werden. Eine leichte Reduktion der Größe von NH₂-funktionalisierten, extrahierten MSN kann auf eine partielle Auflösung der partikulären Systeme, innerhalb der untersuchten Zeitspanne, zurückgeführt werden. Dass hierbei die Größe von COOH-funktionalisierte MSN nicht im gleichen Maße reduziert wurde, kann durch einen höheren Kondensationsgrad des Silikanetzwerks und einer damit einhergehenden erhöhten Stabilität in wässrigem Milieu erklärt werden.

Um eine prinzipielle Machbarkeit dieses Hydrogelsystems und der hierbei notwendigen Detektion des zellulären Aufnahmeverhaltens in einem 3D-Hydrogelnetzwerk zu untersuchen, wurde zunächst ein geeignetes Modellexperiment durchgeführt. Hierfür wurden HeLa Zellen in einem hybriden RADA16-I Hydrogel, in Anwesenheit von S200-NH₂ Partikeln, kultiviert und deren Aufnahme nach 24 h mittels konfokaler Raman-Mikroskopie (KRM) detektiert.

Bei RADA16-I handelt es sich um ein selbstassemblierendes Peptid, dessen Gelierung durch die Anwesenheit von Salzen induziert wird, wobei sich bei Kontakt mit monovalenten Ionen ein Peptidnetzwerk ausbildet (vergleiche Kapitel IV.1.3).

Nach der Vermischung aller Komponenten wurde daher die Gelierung bzw. die Ausbildung des Peptidnetzwerks durch Injektion der hybriden Hydrogellösung im Zellkulturmedium initiiert. Diese Methode wurde der Überschichtung einer vorgelegten hybriden Hydrogellösung mit Zellkulturmedium, wie sie durch den Hersteller vorgeschlagen und beispielsweise auch von einer Gruppe um Kishimoto *et al.*^[116] verwendet wurde, vorgezogen. Mit der gewählten Methode konnte eine spätere *in vivo* Anwendung, bei der eine solche hybride Hydrogellösung mittels Spritzeninjektion verabreicht werden würde, realistischer nachgeahmt werden.

Um die Aufnahme von MSN in die 3D-Zellkultur mittels KRM detektieren zu können, musste zunächst untersucht werden, ob die Position der eingebrachten MSN innerhalb eines

RADA16-I Hydrogels mittels KRM visualisiert werden kann. Abbildung 25 zeigt eine entsprechende KRM Messung eines hybriden Hydrogels nach der Gelierung, basierend auf einer Mischung aus RADA16-I (0,25 Gew%) und S200-NH₂ (0,5 mg/mL) Partikeln. Für das untersuchte RADA16-I Hydrogel, welches naturgemäß einen sehr großen Anteil an Wasser aufweist, kann ein starkes Signal der OH-Schwingung im Bereich von 3000-3500 cm⁻¹ erhalten werden (Abbildung 25 b, blau).

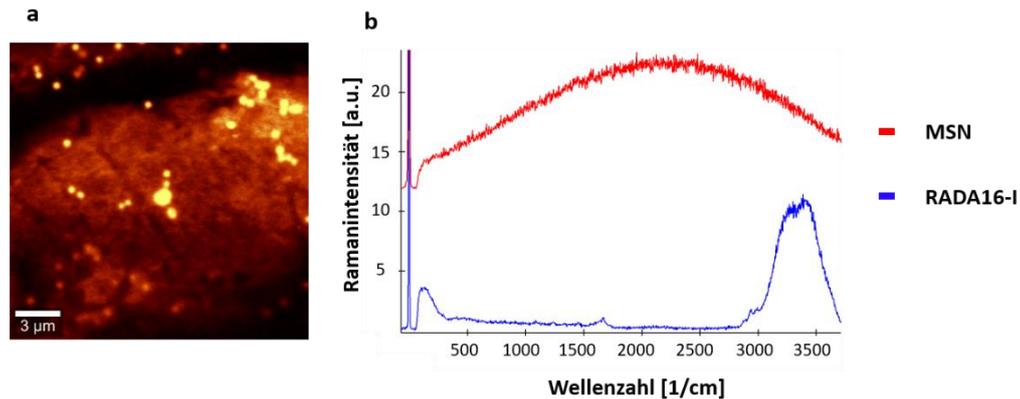


Abbildung 25: Konfokale Raman Mikroskopie zur Positionsbestimmung von MSN in einem hybriden RADA16-I Hydrogel. A) Hell-Dunkel Bild zur Detektion von S200-NH₂ (hellgelb) in einem RADA16-I Hydrogel (orange-rot). Schwarze Bereiche nicht im Fokus; b) Einzelspektren von im Hydrogel enthaltenem Wasser (blau) und Partikeln (rot) aus der Graph Basis Analyse.

Entsprechende Signale des enthaltenen RADA16-I Peptids, welches lediglich in einer sehr geringen Konzentration von 250 µg/mL vorlag, konnten hingegen nicht detektiert werden. Ebenfalls konnten keine charakteristischen Banden der entsprechenden Q-Spezies von Silizium beobachtet werden. Es war jedoch möglich, auf Grund einer starken Streuung des Laserstrahls an der Oberfläche der eingebrachten S200-NH₂ Partikel (rot), die Position der Partikel innerhalb des untersuchten Hydrogels zu bestimmen.

Darüber hinaus musste gezeigt werden, dass neben den eingebrachten Partikeln auch die in einem Hydrogel kultivierten Zellen mittels KRM detektiert werden können. Wie einem Hell-Dunkel Bild (Abbildung 26 a) zu entnehmen ist, war eine Visualisierung dieser Zellen sehr gut möglich. Zusätzlich konnte durch Anwendung einer Cluster-Analyse, bei welcher entsprechende Zellkompartimente mit vergleichbaren RAMAN-Spektren zusammengefasst (Abbildung 26 c) und entsprechend eingefärbt wurden (Abbildung 26 b), zwischen einzelnen Kompartimenten, wie dem Zytoplasma (grünes Spektrum) oder dem Zellkern (rotes Spektrum), unterschieden werden.

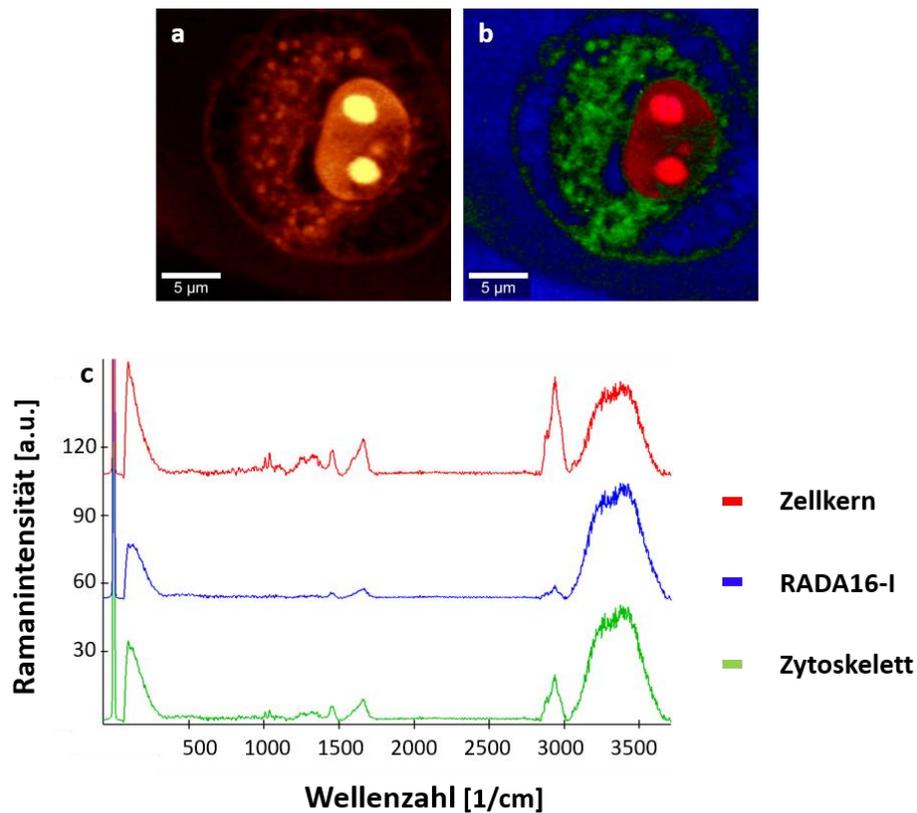


Abbildung 26: Konfokale Raman Mikroskopie zur Darstellung von HeLa Zellen in einem RADA16-I Hydrogel. A) Hell-Dunkel Bild einer Zelle innerhalb des Hydrogels. Schwarze Bereiche nicht im Fokus. B) Darstellung von einzelnen Zellbereichen nach Anwendung einer Cluster Analyse (rot= Zellkern, grün= Zytoplasma, blau= umgebendes Wasser innerhalb des Hydrogels). Die zugehörigen Spektren einzelner identifizierter Cluster sind in c) dargestellt.

Nachdem eine erfolgreiche Identifizierung beider Komponenten (Zellen und MSN) in einem RADA16-I basierten Hydrogel gezeigt werden konnte, wurde abschließend eine potentielle Aufnahme von eingebrachten MSN durch HeLa-Zellen in einer hybriden Hydrogelzellkultur untersucht.

Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h konnte die Position von MSN innerhalb der untersuchten HeLa Zellen detektiert werden (Abbildung 27). Die Illustration der Position von MSN konnte hierbei erneut durch Bestimmung des entsprechenden Streusignals vorgenommen werden. In der Darstellung eines erhaltenen KRM Hell-Dunkel-Bildes können, in der untersuchten Ebene, eindeutig einzelne Partikel innerhalb der Zellstruktur detektiert werden. Dies lässt auf eine erfolgreiche Aufnahme von Partikeln durch Zellen innerhalb dieses hybriden Hydrogels schließen (Abbildung 27 b).

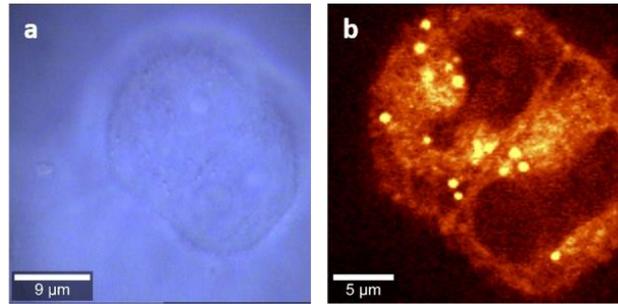


Abbildung 27: Konfokale Raman Mikroskopie zur Detektion der Aufnahme von MSN durch HeLa-Zellen innerhalb eines hybriden Hydrogels basierend auf RADA16-I (0,25 Gew%). A) Lichtmikroskopische Aufnahme einer entsprechenden Zelle innerhalb eines hybriden Hydrogelnetzwerks. B) Hell-Dunkel-Bild der selben Zelle. Dabei kann die Position der Partikel (hellgelbe Punkte) durch deren Streusignal innerhalb der Zelle detektiert werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass ein auf RADA16-I basierendes, hybrides Hydrogelsystem geeignet ist, eine 3D-Kultivierung von Zellen und Aufnahme der eingebrachten Partikel zu ermöglichen. Basierend auf diesen Ergebnissen sollen daher im Folgenden weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

Dabei werden sich die Experimente auf die Untersuchung der Ausbildung des Hydrogelnetzwerks in Anwesenheit von Partikeln, der Verteilung von Partikeln und Zellen in einem Hydrogelnetzwerk und des Aufnahmeverhaltens von Partikeln, abhängig von unterschiedlichen Parametern wie Partikelgröße, -form und Oberflächenfunktionalisierung innerhalb dieser hybriden Hydrogelstruktur, konzentrieren.

2.2 Hybride Hydrogele mit eingebrachten sphärischen amino- und carboxyfunktionalisierten MSN^[125]

2.2.1 Strukturuntersuchung

Für die Untersuchung der Struktur von partikelhaltigen, hybriden Hydrogelnetzwerken wurden zunächst -NH₂ und -COOH funktionalisierte Partikel mit Durchmessern von ca. 200 nm und 400 nm, welche teilweise als Ausgangspartikel für weiterführende Oberflächenfunktionalisierungen dienen (vergleiche Kapitel III.2.1.1), verwendet.

2.2.1.1 Untersuchung der Sekundärstruktur gebildeter Hydrogelnetzwerke in An- und Abwesenheit unterschiedlicher MSN

RADA16-I bildet, wie zuvor bereits beschrieben, fibrilläre Systeme, basierend auf β -Faltblatt-Strukturen, aus. In einer früheren Arbeit konnte für ein vergleichbares Hydrogelmaterial bereits ein Einfluss von Partikeln (z.B. Quantenpunkte oder Goldnanopartikel) mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen auf die Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen gezeigt werden.^[126] Bei der Herstellung hybrider Hydrogele musste daher zunächst sichergestellt werden, dass die Einbringung unterschiedlich oberflächenfunktionalisierter MSN die Ausbildung des fibrillären RADA16-I Netzwerks nicht beeinflusst.

Für die Färbung von β -Faltblatt-Fibrillen kann eine Vielzahl unterschiedlicher Farbstoffe, wie z.B. Kristallviolett, Kongorot oder ThioflavinT (ThT), eingesetzt werden. Jedoch konnte vor allem für die Färbung mit ThT eine spezifische Anbindung an β -Faltblatt-Strukturen gezeigt werden.^[127] Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein *ThT-Assay* zum Nachweis von β -Faltblatt-Fibrillen, in An- und Abwesenheit unterschiedlich funktionalisierter MSN, durchgeführt. Das Prinzip hinter einem *ThT-Assay* beruht auf der Bildung von ThT-Mizellen in wässriger Lösung, welche anschließend an die Oberfläche von Fibrillen mit β -Faltblatt-Motiven binden. In fluoreszenzspektroskopischen Messungen kann schließlich, als Nachweis für die Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen, eine charakteristische

Erhöhung des ThT-Signals (5 - 50-fach), bei einer Wellenlänge von 482 nm, herangezogen werden.^[128]

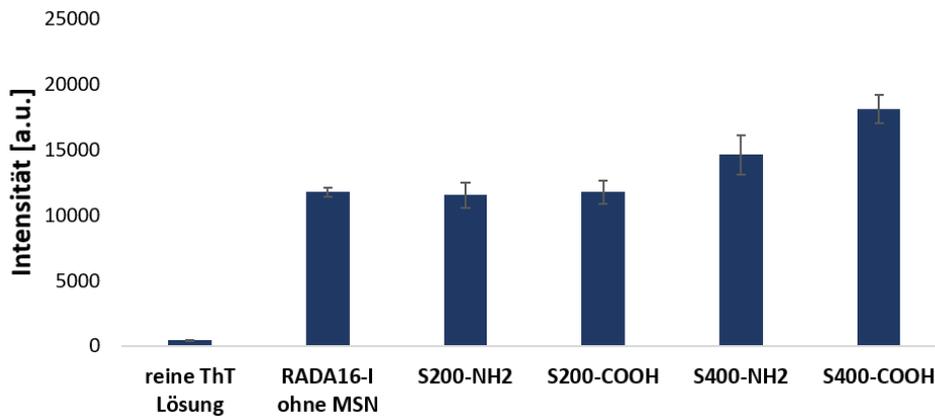


Abbildung 28: Nachweis von β -Faltblatt-Fibrillen in einem RADA16-I Hydrogel in An- und Abwesenheit von unterschiedlichen, oberflächenfunktionalisierten MSN. Die Konzentration an MSN beträgt in allen Messungen 0,5 mg/mL.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen, lässt sich in Folge der Ausbildung eines RADA16-I Hydrogelnetzwerks (ohne eingebrachte MSN) gegenüber der reinen ThT-Lösung ein ungefähr 25-fach erhöhtes Signal detektieren und spricht für die Ausbildung von auf RADA16-I basierenden Fibrillen, aufgebaut aus β -Faltblatt-Strukturen. Dies steht in Übereinstimmung zu bisheriger Literatur, in welcher mit unterschiedlichen Messmethoden (Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM), Circular dichroismus- (CD-) sowie Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)) bereits eine β -Faltblatt-Struktur für RADA16-I Netzwerke bestimmt werden konnte.^[112]

Hybride Hydrogele, welche in Kombination mit oberflächenfunktionalisierten MSN (\varnothing 200 nm) hergestellt wurden, zeigten, unabhängig von der gewählten Funktionalisierung und der dadurch geänderten Oberflächenladung der Partikel, ein ähnliches Fluoreszenzniveau im Vergleich zu reinen RADA16-I Hydrogelen. Dies lässt auf einen supprimierten Einfluss der zugegebenen Partikel auf die Bildung des Hydrogelnetzwerks schließen. Bei der Verwendung größerer MSN (\varnothing 400 nm) für die Herstellung eines hybriden Hydrogels kann eine bis zu 39-fache Steigerung des erhaltenen ThT-Signals, gegenüber einem reinen ThT-Signal, beobachtet werden. Dabei ist bei der Verwendung von negativ geladenen COOH-funktionalisierten MSN dieser Effekt zudem etwas stärker ausgeprägt als bei der Verwendung von positiv geladenen MSN. Eine entsprechende

Steigerung des ThT-Signals kann hierbei entweder auf eine verstärkte Anlagerung der gebildeten ThT-Mizellen an die Oberfläche der Partikel oder auf die Ausbildung einer erhöhten Menge an β -Faltblatt-Strukturen innerhalb des Hydrogelnetzwerks zurückgeführt werden. Zudem kann die Erhöhung des ThT-Signals in Gegenwart von negativ geladenen MSN durch eine in Kapitel IV.2.2.5 beschriebene Wechselwirkung zwischen negativ geladenen MSN und RADA16-I Peptid erklärt werden. Eine mögliche Folge der erhöhten Menge an β -Faltblatt-Strukturen kann eine geringfügig beschleunigte Gelierung eines solchen hybriden Hydrogelsystems darstellen, wodurch die Ausbildung eines fibrillären Netzwerks in Anwesenheit von S400-COOH Partikeln schneller ablaufen würde. Dieser Zusammenhang wurde jedoch nicht weiter untersucht, da alle (hybriden) Hydrogele für eine bessere Vergleichbarkeit gleichbehandelt wurden.

2.2.1.2 Verteilung von MSN in hybriden Hydrogelnetzwerken

Für eine spätere Anwendung im Bereich der Rekonstruktion von Gewebematerialien mit einem gezielten und gestaffelten Wirkstofftransport muss eine homogene Verteilung der eingebrachten Partikel innerhalb eines ausgebildeten fibrillären Netzwerks gewährleistet werden. Nur durch eine homogene Verteilung von MSN kann schlussendlich eine gleichmäßige zelluläre Aufnahme von Partikeln und den gegebenenfalls im Porensystem dieser Partikel befindlichen Medikamenten sichergestellt werden.

Aus diesem Grund wurde die Ausbildung des Hydrogelnetzwerks in An- und Abwesenheit von MSN, sowie die Verteilung von unterschiedlich funktionalisierten MSN innerhalb hybrider Hydrogele, mittels unterschiedlicher elektronenmikroskopischer Methoden untersucht. Für alle Untersuchungen wurde stets eine RADA16-I Konzentration von 0,5 Gew% in Kombination mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (1 mg/mL bzw. 20 mg/mL) für die Herstellung dieser hybriden Hydrogele verwendet. Durch eine äquivalente Mischung aus Peptidlösung und Partikeln konnte somit eine finale Partikelkonzentration innerhalb des Hydrogelnetzwerks (0,25 Gew%) von 0,5 bzw. 10 mg/mL erzielt werden. Für alle elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Hydrogele in An- und Abwesenheit von Partikeln nach der Gelierung fixiert, um weitere Änderungen innerhalb des Netzwerks auszuschließen. Das innerhalb des

Hydrogelnetzwerks enthaltene Wasser musste anschließend gegen Ethanol ausgetauscht werden. Dies stellte einen essentiellen Arbeitsschritt dar, da anderenfalls eine starke Agglomeration der Fibrillen stattfand. Ohne einen Austausch des Lösemittels konnten daher ausschließlich massive, säulenartige Strukturen mit mehreren μm Durchmesser erhalten werden, welche die Struktur des ausgebildeten Netzwerks nicht realistisch wiedergaben (siehe Anhang, Abbildung 92). Durch den Austausch des wässrigen Milieus gegen Ethanol konnte hingegen, vergleichbar der Literatur^{[111],[112]}, ein feinfibrilläres Hydrogelnetzwerk mit Fibrillendurchmessern von ca. 10-20 nm detektiert werden. Eine weiterführende Präparation der hergestellten hybriden Hydrogelproben für Untersuchungen mit unterschiedlichen elektronenmikroskopischen Methoden wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Elektronenmikroskopie an der Universität Ulm durchgeführt.

Die Ausbildung des fibrillären Peptidnetzwerks sowie die Verteilung von Partikeln in diesem Netzwerk wurde zunächst mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestimmt. Dabei ist an dieser Stelle hervorzuheben, dass durch diese Methode lediglich oberflächennahe Bereiche eines ausgebildeten Hydrogels und damit verbunden auch lediglich die auf der Oberfläche des Netzwerks vorliegenden Partikel visualisiert werden können.

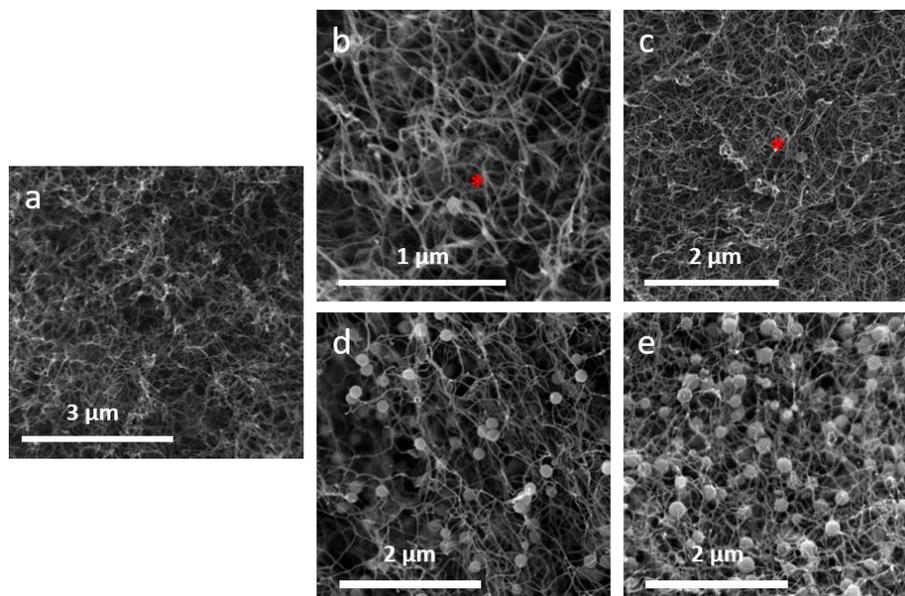


Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung von (hybriden) Hydrogelen mit eingebrachten MSN verschiedener Oberflächenfunktionalisierung. A) pures, feinfibrilläres RADA16-I Hydrogelnetzwerk, b) S200-NH₂ (0,5 mg/mL), c) S200-COOH (0,5 mg/mL), d) S200-NH₂ (10 mg/mL), e) S200-COOH (10 mg/mL). Die roten Sterne markieren einzelne Partikel auf der Oberfläche des Peptidnetzwerks.

Eine analoge Darstellung für die Verteilung von COOH-funktionalisierten Partikeln auf der Oberfläche von hybriden Hydrogelnetzwerken ist in Abbildung 94 (Anhang) dargestellt. Auch hier lässt sich eine vergleichbare, gleichmäßige Verteilung von Partikeln visualisieren.

Bei der Untersuchung hybrider Hydrogele mittels REM-Messungen konnte, im Vergleich zu reinen RADA16-I Hydrogelen, ein ähnlich ausgebildetes fibrilläres Netzwerk beobachtet werden (Abbildung 29). Dies bestätigt die mittels *ThT-Assay* erhaltenen Daten, wonach die Ausbildung der RADA16-I Fibrillen in hybriden Hydrogelen durch die Anwesenheit von MSN nicht essentiell verändert oder gar unterdrückt wird.

In hybriden Hydrogelnetzwerken mit sehr hohen Partikelkonzentrationen von 10 mg/mL konnte, unabhängig der Oberflächenfunktionalisierung (Abbildung 29 d und e) dieser Partikel, eine homogene Verteilung auf der Oberfläche des Hydrogelnetzwerks detektiert werden. Zwar scheint eine hierbei verwendete Partikelkonzentration von 10 mg/mL bedeutend zu hoch für spätere biologische Anwendungen, jedoch konnte durch Verwendung einer solch hohen Konzentration an Partikeln eine bessere Visualisierung der Verteilung innerhalb des Netzwerks sowie die Detektion eventuell gebildeter Agglomerate ermöglicht werden.

Für geringe, jedoch biologisch relevante, Konzentrationen an Partikeln (0,5 mg/mL) konnten lediglich partiell einzelne Partikel auf der Oberfläche des gebildeten Peptidnetzwerks beobachtet werden (Abbildung 29 b und c). Da während der Herstellung der Hydrogele längere Inkubationszeiten im Zellkulturmedium notwendig waren, wurden vor allem Partikel auf der Oberfläche des Netzwerks durch Auswaschung und Auflösung entfernt. Somit war es nicht möglich eine real vorliegende Menge an Partikeln, welche vergleichbar zu der Verteilung im Inneren des fibrillären Netzwerks wäre, mit dieser Methode wiederzugeben (Eine Untersuchung der Auswaschung von Partikeln aus hybriden Hydrogelen erfolgt genauer in Kapitel IV.2.2.1.3).

Für die Untersuchung der Partikelverteilung im Inneren des Hydrogelnetzwerks wurden im Anschluss weitere elektronenmikroskopische Methoden durchgeführt. Hierfür wurden Dünnschnitte von (hybriden) Hydrogelnetzwerken nach kritischer Punkttrocknung und Einbettung in ein Harz (EPON™) mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Dabei sollte sowohl die Ausbildung des fibrillären Netzwerks im Inneren eines Hydrogels, als auch die Verteilung von MSN innerhalb eines hybriden Hydrogelnetzwerks

untersucht werden. Wie in Abbildung 30 a und d zu erkennen ist, konnte das ausgebildete fibrilläre Hydrogelnetzwerk in Abwesenheit von Partikeln deutlich als dunkle Fasern visualisiert werden. Eine Färbung erfolgte durch Anlagerung von Osmium und Uranylacetat an die Oberfläche der Fibrillen, wodurch eine bessere Kontrastierung gegenüber dem umgebenden Harz erzielt wurde. Abbildung 30 b (0,5 mg/mL) und e (10 mg/mL) zeigen die Verteilung von S200-NH₂ Partikeln und Abbildung 30 c (0,5 mg/mL) und f (10 mg/mL) die Verteilung von S200-COOH Partikeln in einem hybriden Hydrogelnetzwerk. Hierbei ließ sich für alle untersuchten Proben, an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Netzwerks, eine homogene Verteilung der eingebrachten Partikel detektieren, wodurch auf eine homogene Verteilung innerhalb des gesamten hybriden Hydrogelvolumens geschlossen werden konnte. Durch die Verwendung unterschiedlich funktionalisierter Partikel konnte kein starker Einfluss der jeweiligen Oberflächenladungen auf die Verteilung der Partikel im Inneren eines hybriden Hydrogelnetzwerks festgestellt werden.

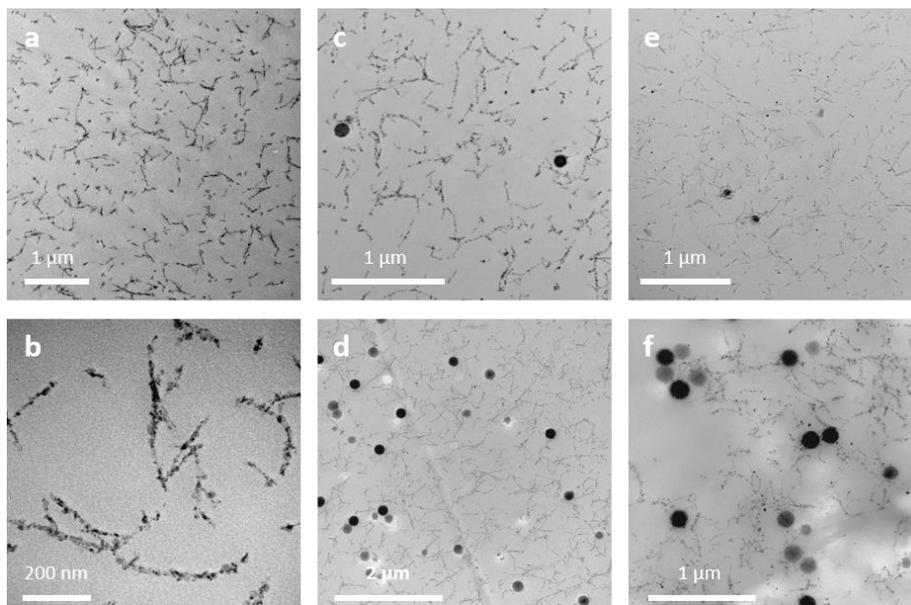


Abbildung 30: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen von RADA16-I Hydrogelen in An- und Abwesenheit von MSN mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen. A) pures RADA16-I Hydrogelnetzwerk ohne eingebrachte Partikel, b) Vergrößerung von ausgebildeten und gefärbten RADA16-I Fibrillen in einem reinen RADA16-I Hydrogel, c) 0,5mg/mL S200-NH₂-haltiges Hydrogel, d) 10 mg/mL S200-NH₂-haltiges Hydrogel, e) 0,5 mg/mL S200-COOH-haltiges Hydrogel, f) 10 mg/mL S200-COOH-haltiges Hydrogel.

Eine veränderte Größe der eingebrachten MSN zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Ausbildung des Peptidnetzwerks und deren Verteilung im Inneren des Netzwerks (siehe Abbildung 93, Anhang). Es muss jedoch erwähnt werden, dass bei der Verwendung einer

hohen Konzentration an COOH-funktionalisierten MSN eine schlechte Gelierung des Gels beobachtet werden konnte, wodurch die Präparation von Dünnschnitten deutlich erschwert wurde. Eine weiterführende Untersuchung dieses Verhaltens und der vorliegenden Wechselwirkungen zwischen MSN und umgebendem Peptid soll daher in Kapitel IV.2.2.5 vorgenommen werden.

Da sowohl in REM- als auch TEM-Untersuchungen, bezüglich der Verteilung unterschiedlicher Partikel innerhalb des Hydrogelnetzwerks, keine bedeutenden Unterschiede zu beobachten waren, wurde eine abschließende Ionenfeinstrahl-REM (FIB-REM) Untersuchung ausschließlich für S200-NH₂ Partikel durchgeführt. Dabei wurde ein mit EPON[®] fixiertes und getrocknetes Fragment des hybriden Hydrogels schrittweise mit einem fokussierten Ionenstrahl abgetragen, wodurch ein Einblick in die innere Struktur des hybriden Hydrogels erhalten werden konnte. Auch hier lässt sich, vergleichbar mit den zuvor gezeigten TEM-Aufnahmen, eine homogene Verteilung bei hohen Partikelkonzentrationen (Abbildung 31, b) feststellen, wohingegen bei geringen Partikelkonzentrationen (0,5 mg/mL) wiederum lediglich einzelne Partikel innerhalb des Netzwerks visualisiert werden können.

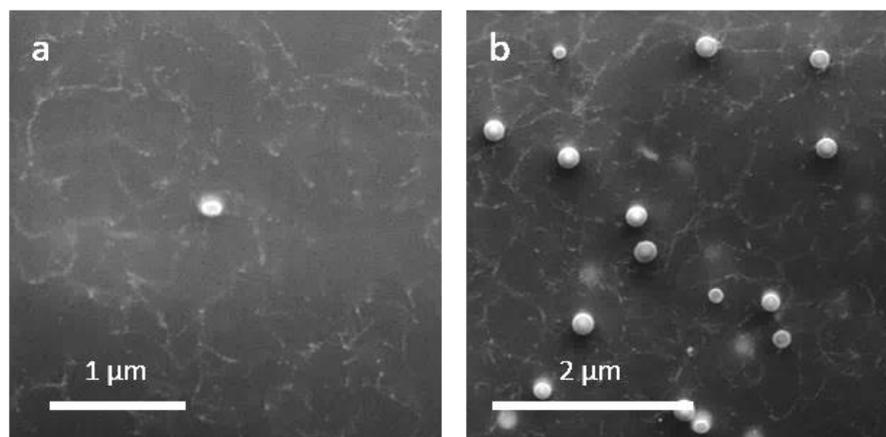


Abbildung 31: Ionenfeinstrahl-REM (FIB-REM) Messungen eines hybriden Hydrogelnetzwerks mit enthaltenen S200-NH₂ Partikeln der Konzentrationen a) 0,5 mg/mL und b) 10 mg/mL.

2.2.1.3 Auswaschung von Partikeln aus hybriden Hydrogelnetzwerken^[125]

Wie bereits zuvor bei der Untersuchung der Partikelverteilung in hybriden Hydrogelen erwähnt, mussten diese während der Herstellung in Zellmedium inkubiert und dieses mehrfach ausgetauscht werden. Infolge dessen kann es zu einer Auswaschung der eingebrachten Partikel aus der Netzwerkstruktur kommen. Um die Menge an ausgewaschenen Partikeln zu bestimmen, war es notwendig diese zunächst mittels Fluoreszenzfarbstoff (ATTO647N) zu markieren, um im Anschluss die Fluoreszenzintensität der entnommenen Zellmedien bestimmen zu können. Abbildung 32 zeigt die kumulierte Menge aller ausgewaschenen Partikel sowie deren prozentuale Reduktion bei Verwendung unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen an eingebrachten Partikeln innerhalb einer hybriden Formulierung.

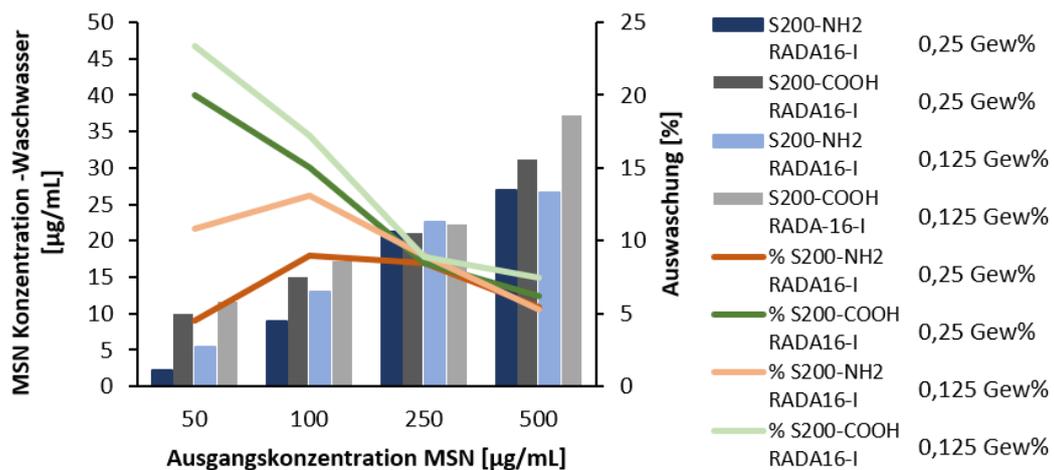


Abbildung 32: Auswaschung von MSN aus hybriden Hydrogelen bei deren Herstellung. Angegeben als absolut ausgewaschene Menge an Partikeln und prozentualer Verlust gegenüber der initial eingesetzten Menge an Partikeln. Die untersuchten Gelkonzentrationen betragen 0,125 Gew% und 0,25 Gew%. Es wurden Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm und unterschiedlich funktionalisierten (-NH₂ oder -COOH) Oberflächen untersucht. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Betrachtet man die prozentuale Auswaschung der Partikel, zeigt sich für geringe Konzentrationen an eingesetzten Partikeln bei unterschiedlich funktionalisierten MSN eine starke Schwankung der ausgewaschenen Partikelmenge. Positiv geladene, NH₂-funktionalisierte MSN weisen eine geringere Auswaschung im Vergleich zu negativ geladenen, COOH-funktionalisierten Partikeln auf. Für beide Funktionalisierungsmethoden

kann jedoch eine erhöhte Auswaschung bei der Verwendung einer geringeren Hydrogelkonzentration (0,125 Gew%) beobachtet werden. Auf Grund der reduzierten Peptidmenge kommt es in diesem Fall zu der Ausbildung eines Hydrogelnetzwerks mit weiteren Netzwerkmaschen.^[109] Diese ermöglichen folglich eine leichtere Auswaschung der Partikel aus diesem Netzwerk. Ein Grund für die verstärkte Auswaschung von S200-COOH Partikeln aus dem gebildeten Hydrogelnetzwerk könnten elektrostatische Abstoßungen darstellen. Diese können beispielsweise durch eine Abstoßung negativ geladener Domänen des Peptids und der negativ geladenen Partikeloberfläche auftreten. Außerdem ist es denkbar, dass es, bedingt durch eine Anziehung zwischen negativ geladenen Partikeln und positiv geladenen Domänen des Peptids, zu einer attraktiven elektrostatischen Wechselwirkung kommen kann, wodurch eine Peptidkorona auf der Oberfläche der Partikel ausgebildet wird. Die so nach außen hin wie ein Peptid geladenen Partikel werden anschließend, basierend auf einer elektrostatischen Abstoßung mit dem umgebenden Peptidnetzwerk, ebenfalls leichter aus dem Netzwerk ausgewaschen. Die hierfür zugrundeliegende Interaktion zwischen Partikeloberfläche und umgebenden RADA16-I Peptid wird im Detail in Kapitel IV.2.2.5 untersucht.

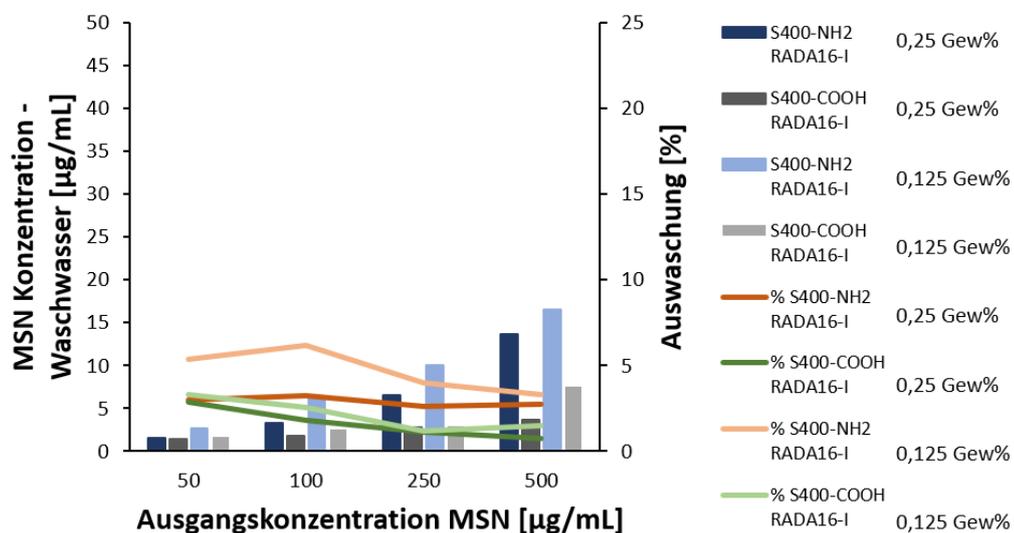


Abbildung 33: Auswaschung von MSN aus hybriden Hydrogelen bei deren Herstellung. Angegeben als absolut ausgewaschene Menge an Partikeln und prozentualer Verlust gegenüber der initial eingesetzten Menge an Partikeln. Die untersuchten Gelkonzentrationen betragen 0,125 Gew% und 0,25 Gew%. Es wurden Partikel mit einem Durchmesser von 400 nm und unterschiedlich funktionalisierten (-NH₂ oder -COOH) Oberflächen untersucht. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Größere S400 Partikel zeigten gegenüber den S200 Partikeln eine geringere Auswaschung aus den hergestellten Hydrogelnetzwerken (Abbildung 33). Diese Beobachtung lässt sich durch eine sterische Hinderung dieser größeren Partikel innerhalb des gebildeten Netzwerks erklären. Auf Grund des deutlich erhöhten Partikeldurchmessers kommt es zu einer Diffusionslimitierung der eingesetzten S400 Partikel innerhalb des engmaschigen Peptidnetzwerks, weshalb eine Auswaschung erschwert wird.

Ungeachtet dessen lässt sich dennoch, vergleichbar zu den zuvor gezeigten Ergebnissen mit S200 Partikeln, eine geringfügig höhere Auswaschung aus Hydrogelnetzwerken mit geringeren Peptidkonzentrationen (0,125 Gew%) beobachten. Dies lässt sich auch an dieser Stelle auf die Ausbildung eines fibrillären Netzwerks mit größeren Maschenweiten zurückführen. Dieser Effekt ist jedoch, auf Grund der größeren Partikeldurchmesser, deutlich schwächer ausgebildet.

2.2.2 Bestimmung rheologischer Eigenschaften von injizierbaren Hydrogelen

Die Bestimmung der rheologischen Eigenschaften unterschiedlicher hybrider Hydrogele wurden an einem Anton Paar MCR 301 Rheometer am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt.

Um eine Vergleichbarkeit der aufgenommenen Einzelmessungen zu gewährleisten, wurden alle Messungen bei einer definierten Temperatur von 23 °C und unter Verwendung einer Kegel-Platte Geometrie mit einer definierten Spaltbreite von 0,058 mm durchgeführt.

Da es sich bei dem vorliegenden System um ein injizierbares System handelt, musste zunächst die Viskosität der Hydrogelformulierungen in einem ungelierten Zustand untersucht werden, um eine potentielle Injizierbarkeit in späteren Anwendungen zu bestätigen. Hierbei konnte, unabhängig der Form der eingesetzten NH₂-funktionalisierten MSN, anhand nahezu deckungsgleicher Messkurven der hybriden Hydrogelformulierungen ein vergleichbares, scherverdünnendes Verhalten bei allen untersuchten Partikelkonzentrationen festgestellt werden (Abbildung 34).

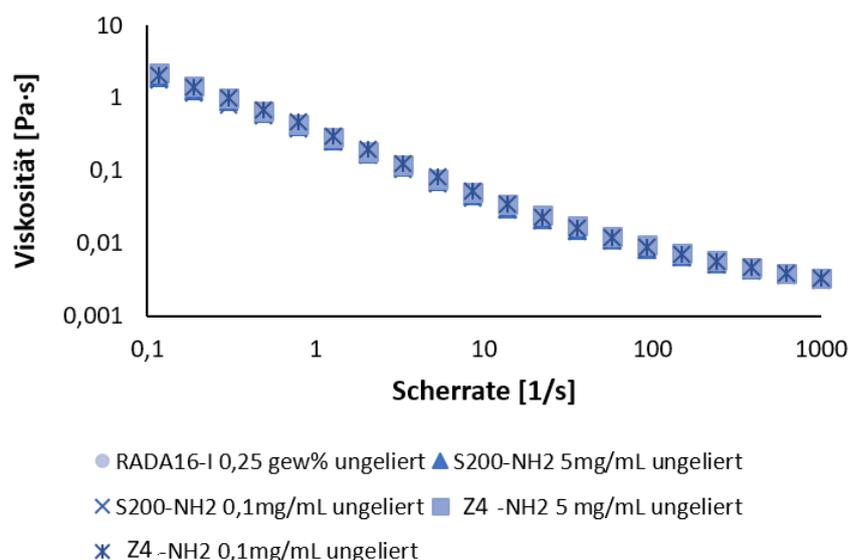


Abbildung 34: Auftragung der Viskosität gegen Scherrate für ungelierete (hybride) Hydrogele bei Verwendung NH₂-funktionalisierter MSN unterschiedlicher Geometrie (sphärisch=S200, stäbchenförmig=Z4) und Konzentration.

Die Absolutwerte der Viskosität aller untersuchten Proben hingegen sind sehr gering (<10 Pa·s), wodurch eine Injektion mittels Spritze für spätere *in vitro* und *in vivo* Anwendungen somit problemlos möglich sein sollte.

Auch bei Verwendung unterschiedlicher Oberflächenfunktionalitäten sowie unterschiedlicher Partikelmorphologien konnten nahezu deckungsgleiche Verläufe beobachtet werden. Ein partikelinduzierter Effekt auf das scherverdünnende Verhalten von hybriden Hydrogelformulierungen konnte somit nicht festgestellt werden (Abbildung 35).

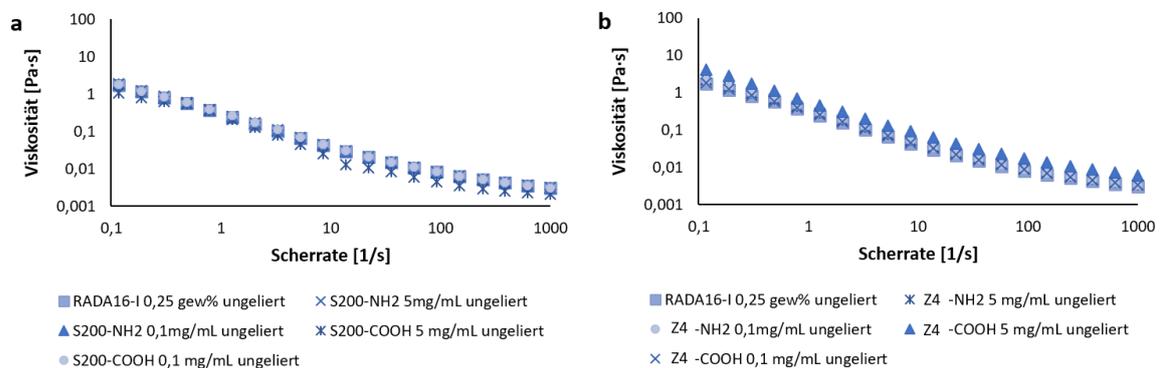


Abbildung 35: Auftragung der Viskosität gegen Scherrate für ungelierete Systeme bei Verwendung unterschiedlicher Partikeloberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ und -COOH) und -konzentrationen. A) Verwendung von sphärischen S200 Partikeln, b) Verwendung von stäbchenförmigen Z4 Partikeln.

Zur Bestimmung des linear viskoelastischen Bereichs (LVE-Bereich), welcher sich durch eine Integrität der Struktur des ausgebildeten Netzwerks auszeichnet, wurden sowohl das Speicher- (G') als auch Verlustmodul (G'') bei einer Auslenkung von 0,001% bis 100% und einer Anregungsfrequenz von 10 Hz aufgenommen. Zur besseren Übersicht wurde in Abbildung 36 lediglich das Speichermodul G' aufgetragen. Eine vollständige Darstellung inklusive des Verlustmoduls G'' findet sich im Anhang Abbildung 95.

Der LVE-Bereich kann unabhängig von Partikelgeometrie und der verwendeten Partikelkonzentration zwischen einer Verformung von 0,001% und ca. 0,3% bestimmt werden. Bei höheren Deformationen kommt es zu einer Änderung der Struktur der vermessenen Hydrogele, was an einem Abfall von G' und G'' zu erkennen ist.

Unabhängig von der Partikelgeometrie kommt es oberhalb des LVE-Bereichs, bei ca. 0,7%, schließlich zu einem Schnittpunkt zwischen G' und G'' . Dieser charakterisiert den Fließpunkt einer Probe und stellt eine vollständige Zerstörung des Peptidnetzwerks dar.

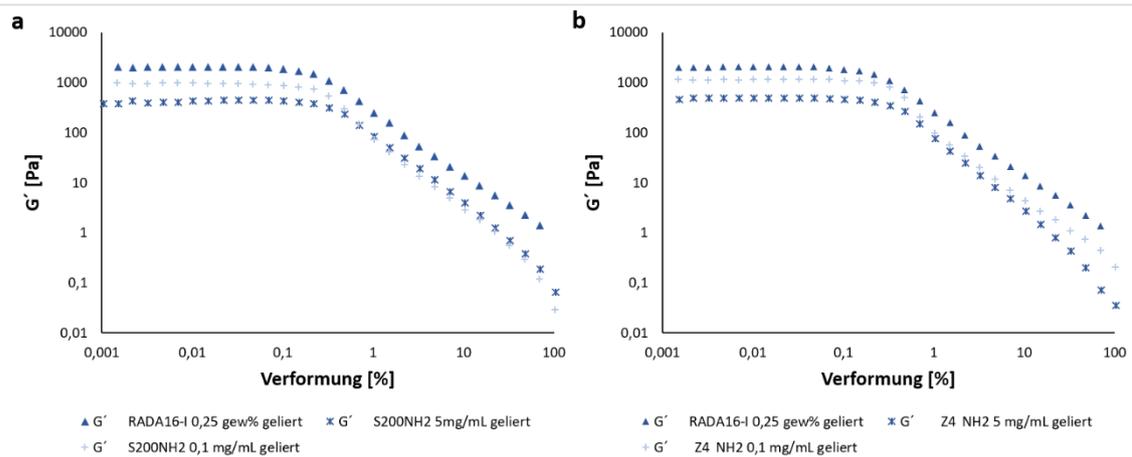


Abbildung 36: Amplituden-Sweep zur Bestimmung des LVE-Bereichs gelierter Proben bei Verwendung einer Anregungsfrequenz von 10 Hz. Die Messung erfolgte für hybride Hydrogele mit entweder sphärischen S200-NH₂ Partikeln a) oder stäbchenförmigen Z4 Partikeln b).

Bei einer solchen Zerstörung des RADA16-I Hydrogelnetzwerks handelt es sich jedoch, wie von Yokoi *et al.*^[129] gezeigt werden konnte, nicht um einen statischen Zustand, sondern vielmehr um einen reversiblen, dynamischen Prozess, bei dem es zu einer Rückbildung des zerstörten Netzwerkes kommen kann. Das gebildete Hydrogelnetzwerk zeigt somit eine selbstheilende Wirkung in Bezug auf die gebildete Netzwerkstruktur.

Betrachtet man die Module G' und G'' , lässt sich bei Verwendung sehr hoher Partikelkonzentrationen (5 mg/mL) innerhalb des gelierten Hydrogels eine starke Reduktion beider Module um bis zu 75% erkennen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Auftragung des Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'') sowie des Verlustfaktors $\tan\delta$, berechnet bei einer Deformation von 0,1%.

	MSN	RADA16-I	S200-NH ₂		S200-COOH		Z1:4-NH ₂		Z1:4-COOH	
Konzentration		0,25 gew%	5 mg/mL	0,1 mg/mL	5 mg/mL	0,1 mg/mL	5 mg/mL	0,1 mg/mL	5 mg/mL	0,1 mg/mL
G'		1744	463	902	-	1340	492	1140	409	873
G''		448,8	93,8	202	-	310	101	235	85,8	360
$\tan\delta$		0,26	0,20	0,22	-	0,23	0,21	0,21	0,21	0,41

Dass es sich bei den vermessenen Strukturen weiterhin um Gele und keine Sole handelt, kann an Hand des Verlustfaktors $\tan\delta$ bestimmt werden. Allgemein gilt, je niedriger der Verlustfaktor, desto mehr verhält sich eine untersuchte Probe wie ein ideal elastischer Festkörper.^[130] Der Verlustfaktor wurde hierfür bei einer Deformation von 0,1%, welche sich im LVE-Bereich der jeweiligen Formulierung befindet, als Quotient aus G'' und G' bestimmt. Für alle untersuchten, hybriden Hydrogele konnte ein Verlustfaktor zwischen 0,2

und 0,23 und damit sogar noch unterhalb des Wertes für ein reines RADA16-I Hydrogel (0,26) bestimmt werden. Somit reduzieren eingebrachte Partikel zwar G' und G'' , jedoch nicht in gleichem Maße, wodurch der elastische Anteil in hybriden Hydrogelformulierungen erhöht wird.

Im Hinblick auf spätere Anwendungen und der dabei notwendigen Festigkeiten ist somit auch die zu verwendende Menge an Partikeln und deren Effekt auf die Gelstärke stets zu berücksichtigen. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Oberflächenfunktionalitäten (-NH₂ und -COOH) der verwendeten sphärischen und stäbchenförmigen MSN konnten, unabhängig von der verwendeten Partikelform, vergleichbare Trends mit zunehmenden Partikelkonzentrationen beobachtet werden (Abbildung 37). Eine Ausnahme stellen hierbei Z4-COOH Partikel bei geringen Partikelkonzentrationen dar. Bei dieser Probe konnte eine deutlich geringere Reduktion des Verlustmoduls G'' , gegenüber anderen Proben mit der gleichen Partikelkonzentration, bestimmt werden (Tabelle 7). Dies lässt auf einen erhöhten viskosen Anteil in dieser Probe schließen und ist vermutlich auf eine Wechselwirkung der enthaltenen Partikel mit dem umliegenden Peptid zurückzuführen.

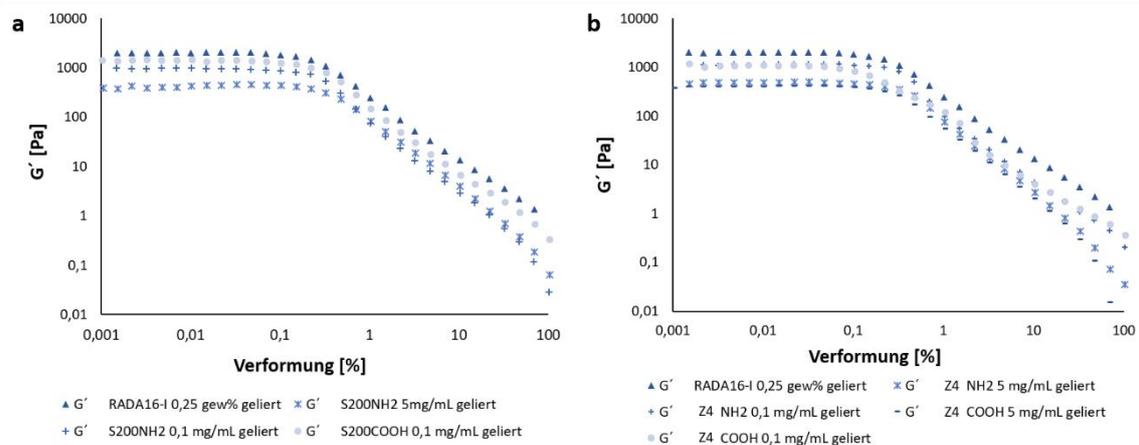


Abbildung 37: Amplituden-Sweep zur Bestimmung des LVE-Bereichs gelierter Proben bei Verwendung unterschiedlich funktionalisierter Partikel und einer Anregungsfrequenz von 10 Hz. Die Messung erfolgte für hybride Hydrogele mit a) sphärischen S200 Partikeln oder b) stäbchenförmigen Z4 Partikeln. (*Keine Gellierung für S200-COOH 5 mg/mL zu beobachten, daher wurde diese Kurve nicht aufgetragen.)

Eine genauere Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Partikeln und umgebenden Peptid wurde daher in Kapitel IV.2.2.5 vorgenommen.

Die vollständigen Darstellungen der Messungen, inklusive der Verlustmodule G'' , sind im Anhang (Abbildung 96) zu finden. Anzumerken ist für S200-COOH Partikel, dass bei Verwendung einer sehr hohen Partikelkonzentration von 5 mg/mL keine Ausbildung des Gels zu beobachten war, weshalb diese Messung nicht aufgetragen wurde.

Für die Bestimmung von Frequenz-Sweep Messungen, bei denen das Netzwerk nicht zerstört werden durfte, musste folglich eine Deformation im LVE-Bereich gewählt werden. Da es sich bei den vorliegenden RADA16-I basierten Hydrogelen um vergleichsweise weiche Netzwerkstrukturen handelt, wurde sich im Bereich des LVE für eine möglichst hohe Deformation (0,1%) entschieden, um potentielle Änderungen des Systems detektieren zu können.

In einem gelierten Zustand konnte für reine RADA16-I Hydrogele mittels Frequenz-Sweep Messung ein Gleichgewichtsplateau für G' von ca. 1000 Pa und für G'' von ca. 370 Pa bestimmt werden. Dies entspricht einem etwas verringerten Level gegenüber den zuvor durchgeführten Amplituden-Sweep Messungen. Eine Reduktion der einzelnen Speicher- und Verlustmodule bei Zugabe von Partikeln unterschiedlicher Form und Oberflächenladung, in hybriden Hydrogelformulierungen, lässt sich auch mittels Frequenz-Sweep Messungen bestätigen (Abbildung 97 sowie Abbildung 98, Anhang).

Die in diesem Kapitel erhaltenen Werte für Frequenz-Sweep- und Amplituden-Sweep Messungen sowie für das scherverdünnende Verhalten der untersuchten (hybriden) Hydrogele liegen in guter Übereinstimmung mit einer Arbeit von Zuidema *et al.*, welche unterschiedliche thermisch induzierbare Hydrogele, wie z.B. Agarose, Kollagen oder Matrigel, mit Hinblick auf einen Einsatz im Bereich der Geweberekonstruktion rheologisch charakterisierten.^[131]

2.2.3 Verteilung, Wachstum und Zytotoxizität von MC3T3-E1 Zellen in einem RADA16-I basierten Hydrogel^[125]

Bereits in früheren Arbeiten konnte die Biokompatibilität von RADA16-I Hydrogelen durch ein 2D-Wachstum auf der Oberfläche geliertes Hydrogele durch die Gruppe von Zhang bestätigt werden.^[111]

Jedoch dient diese Arbeit, wie bereits zuvor dargestellt, der Herstellung injizierbarer hybrider Hydrogelformulierungen, bei denen alle verwendeten Komponenten in einer Lösung gemischt und zeitgleich appliziert werden sollen. In dem so gebildeten 3D-Peptidnetzwerk kommt es daher, neben einer homogenen Verteilung der eingebrachten Partikel (siehe Kapitel IV.2.2.1.2), auch auf eine homogene Verteilung der verwendeten Knochenvorläuferzellen (MC3T3-E1 Zellen) und deren unveränderte Funktionsfähigkeit in Bezug auf Proliferation (Zellwachstum) und Differenzierungsvermögen (Fähigkeit zur Ausbildung des Zielgewebes) an. Um dies genauer zu untersuchen, wurden zellhaltige Hydrogele, ohne zusätzlich eingebrachte Partikel, hergestellt und analysiert.

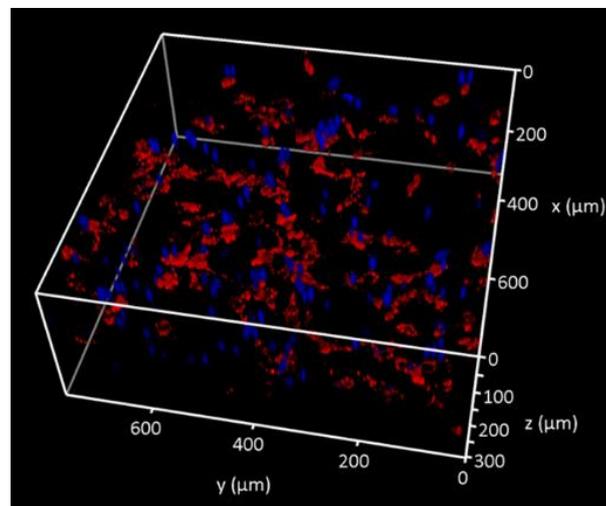


Abbildung 38: Visualisierung des Zellwachstums innerhalb eines 3D-Hydrogelnetzwerks mittels konfokaler Laser-Mikroskopie. Die Visualisierung erfolgte nach einer Zellkulturdauer von 24 h in einem 0,125 Gew% RADA16-I Hydrogel. Zellfärbung: Rot=Neutralrot zur Färbung der lebenden Zellen; blau= DAPI (Zellkern). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Die Verteilung der Knochenvorläuferzellen in einem ausgebildeten Hydrogelnetzwerk konnte durch konfokale Laser-Mikroskopie (KLM) dargestellt werden (Abbildung 38 a).

Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h konnte eine homogene Verteilung der eingebrachten Zellen über ein großes Gelvolumen visualisiert werden. Gleichzeitig konnte durch die gewählte Färbung mittels Neutralrot (rot) die Viabilität der eingebrachten MC3T3-E1 Zellen gezeigt werden. Dabei kommt es durch Anlagerung des schwach kationischen Farbstoffs an anionische Reste der Lysosomen zu einer selektiven Färbung von Zellen mit funktionfähigem Zellmetabolismus, wohingegen tote Zellen nicht angefärbt werden.^[132]

Neben der Verteilung von eingebrachten MC3T3-E1 Zellen wurde auch die Wachstumsrate der Zellen, innerhalb einer 3D-Zellkultur, mit unterschiedlichen Konzentrationen an RADA16-I untersucht. Die Verwendung unterschiedlicher RADA16-I Konzentrationen diente dabei der Simulation unterschiedlich steifer Hydrogelstrukturen.

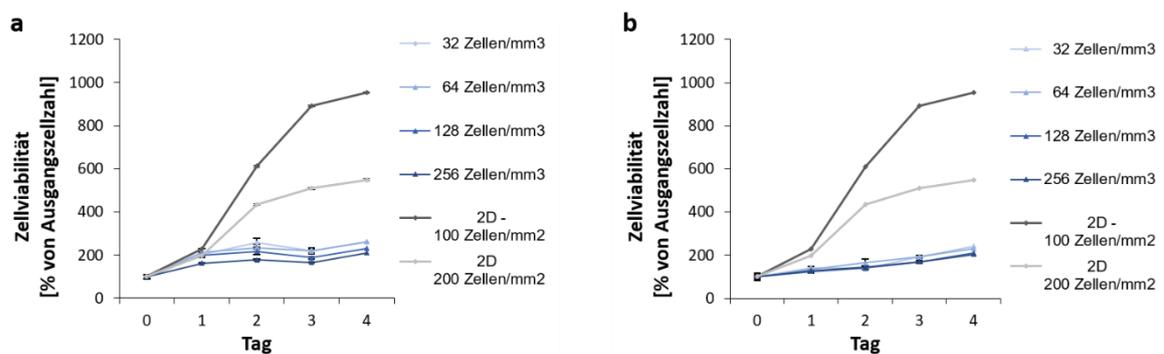


Abbildung 39: Bestimmung der Zellviabilität von MC3T3-E1 Zellen bei Verwendung unterschiedlicher Zellzahlen in 2D-Monolagen Zellkultur und 3D-Zellkultur in einem Hydrogelnetzwerk (a: 0,125 Gew% RADA16-I, b: 0,25 Gew% RADA16-I). Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten und die daraus bestimmte Standardabweichung. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Wie in Abbildung 39 b dargestellt, konnte in einer 3D-Zellkultur innerhalb der ersten vier Tage, unabhängig von der verwendeten RADA16-I Konzentration, ein gegenüber einer klassischen 2D-Zellkultur deutlich verlangsamtes Zellwachstum beobachtet werden. Dieser Effekt ist zudem unabhängig von der gewählten Zelldichte, da auch bei hohen Zellzahlen kein beschleunigtes Wachstum gegenüber geringeren Zellzahlen beobachtet werden konnte. So weisen 2D-Zellkulturen nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen eine nahezu zehnfache Menge an initial eingesetzten Zellen auf, wohingegen bei einer 3D-Zellkultur nach derselben Kultivierungsdauer lediglich maximal eine Verdopplung der eingesetzten Zellen beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung für dieses

Verhalten könnten, trotz der großen Anzahl an eingebrachten Zellen, fehlende Zellinteraktionen innerhalb des 3D-Netzwerkes darstellen. Die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und den daraus folgenden Interaktionsmöglichkeiten zwischen Zellen verbessert die Zellproliferation deutlich. Ein weiterer Grund für eine verringerte Zellproliferation könnten mechanische Einschränkungen auf Grund der vorliegenden Festigkeit und der gegebenen Maschenweiten des Hydrogelnetzwerkes sein. So konnte bereits durch eine Gruppe um Lee *et al.* gezeigt werden, dass die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen, welche in Alginate basierten Hydrogel Kapseln für bis zu 10 Tage kultiviert wurden, bei einer Vergrößerung der Maschenweite verbessert werden konnte.^[133] Dass dies auch bei einem RADA16-I Hydrogelnetzwerk der Fall sein könnte, ist wahrscheinlich, da bei einer geringeren Konzentration an RADA16-I (0,125 Gew%), welche zu größere Maschenweiten führt, eine leicht erhöhte Zellzahl zu allen Zeitpunkten beobachtet werden konnte.

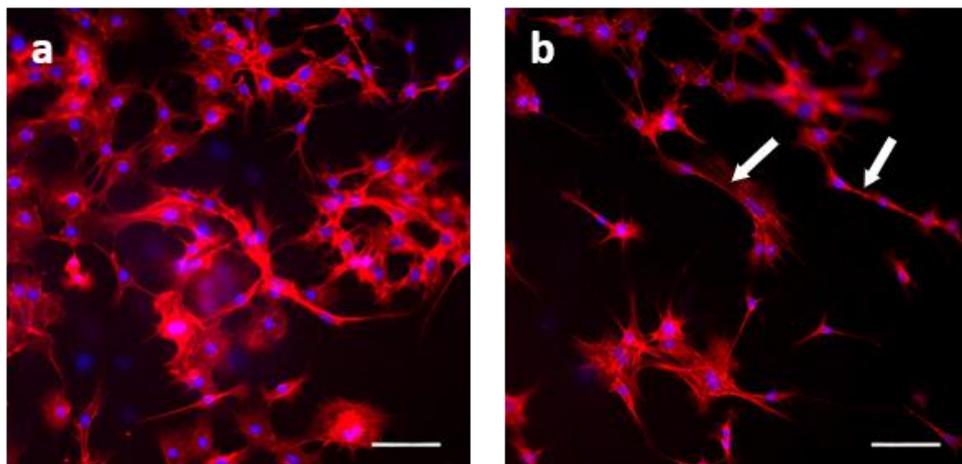


Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von MC3T3-E1 Zellen nach einer Zellkulturdauer von a) 7 und b) 14 Tagen (bzw. 11 Tage nach Einleitung der Zelldifferenzierung durch Zugabe von Ascorbinsäure und β -Glycerinphosphat.). Für die Aufnahme wurden die Zellen mittels Formaldehyd fixiert und angefärbt (rot = Aktinskelett, blau = Zellkern). Die weißen Pfeile zeigen dendritische Zellstrukturen an, die auf eine Differenzierung dieser Zellen zurückzuführen sind. Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 100 μ m. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Neben einer homogenen Verteilung und der Fähigkeit innerhalb des Hydrogelnetzwerkes zu proliferieren, ist es weiterhin notwendig, die Differenzierung der eingebrachten Zellen zu einem gewünschten Zelltyp innerhalb einer 3D-Zellkultur zu ermöglichen. Hierfür wurde eine Langzeitkultivierung eines MC3T3-E1 haltigen RADA16-I Hydrogels (0,25 Gew%) in Anwesenheit von Differenzierungsmedikamenten (Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat)

durchgeführt. Wie Abbildung 40 zu entnehmen ist, konnte auch nach einer Inkubationszeit von 7 (Abbildung 40 a) und 14 Tagen (beziehungsweise 11 Tage nach Zugabe der Differenzierungsmedikamente, Abbildung 40 b) eine Vielzahl lebender Zellen innerhalb des RADA16-I Hydrogelnetzwerks beobachtet werden. Daneben konnten nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen dendritische Zellfortsätze (gekennzeichnet mit Pfeilen) erkannt werden. Diese ähneln dendritischen Projektionen von Osteozyten, welche für einen terminalen Differenzierungszustand von Osteoblasten charakteristisch sind. Das lässt auf eine erfolgreiche Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen in RADA16-I-Langzeitkultur schließen.

2.2.4 Aufnahme von Partikeln in 2D- und 3D-Zellkultur^[125]

MSN können auf Grund ihrer einzigartigen Eigenschaften als Wirkstoffträger für den Transport von unterschiedlichsten Medikamenten in Zellen eingesetzt werden. Vor der Verwendung von Partikeln als Wirkstoffträger innerhalb der vorgestellten injizierbaren Hydrogelformulierungen musste jedoch zunächst geklärt werden, inwiefern eingebrachte MSN von MC3T3-E1 Zellen aufgenommen werden können.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst Dünnschnitte von kultivierten Zellen, nach einer Kultivierungsdauer von 24 h und einer daraus folgenden potentiellen Partikelaufnahme, mittels TEM untersucht. Hierfür wurden MC3T3-E1 Zellen in einer klassischen 2D-Zellkultur für 24 h mit einer Partikeldispersion (0,1 mg/mL) inkubiert. Durch Vermessung der erhaltenen Dünnschnitte konnte eine Aufnahme von Partikeln in Zell-Vesikel bestätigt werden (Abbildung 41 b). Ein vergleichbares Verhalten konnte ebenfalls für negativ geladene S200-COOH Partikel beobachtet werden (siehe Abbildung 99, Anhang).

Zur Klärung des Aufnahmemechanismus von MSN durch die in diesem Projekt verwendete MC3T3-E1 Zelllinie wurde eine 2D-Zellkultur mittels Acridinorange-Färbung^[134] untersucht. Hierbei ergibt sich bei der Färbung mit Acridinorange eine unterschiedliche Fluoreszenz in unterschiedlichen Zellkompartimenten (Abbildung 41 c).

So zeigt Acridinorange innerhalb des Zellkerns durch Einlagerung in DNA-Stränge, eine gegenüber sauren Kompartimenten, wie z.B. Endosomen, veränderte Fluoreszenz.

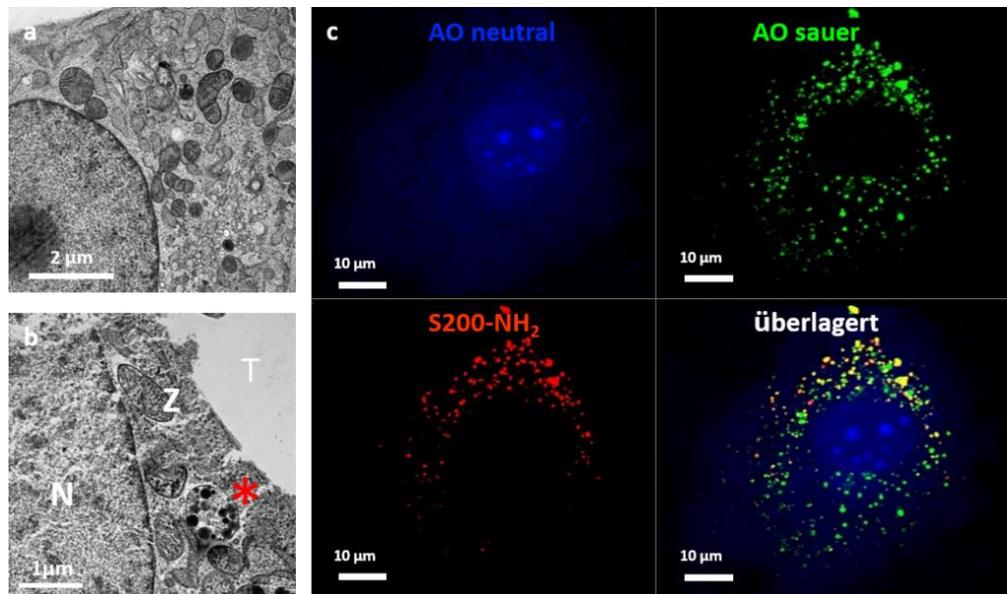


Abbildung 41: A) TEM-Querschnitt einer MC3T3-E1 Zelle ohne Inkubation mit einer Partikeldispersion, b) Visualisierung der Aufnahme von S200-NH₂ in MC3T3-E1 Zellen mittels TEM-Querschnitten nach Inkubation mit einer 100 µg/mL Partikeldispersion (N= Nukleus, Z= Zytoplasma, T= TEM-Träger Oberfläche, Stern= Aufgenommene S200-NH₂ Partikel), c) Aufklärung des Aufnahmemechanismus von Partikeln in MC3T3-E1 Zellen mittels Acridinorange-Färbung (blau= Interkalation in Nukleinsäuren (Zellkern), grün= saure Kompartimente, rot= S200-NH₂ Partikel, gelb= Überlagerung der Einzelbilder).

Durch anschließende Überlagerung des Signals der fluoreszenzmarkierten S200-NH₂ Partikeln mit dem Signal von sauren Kompartimenten innerhalb einer Zelle konnte eine deutliche Übereinstimmung dieser Signale festgestellt werden. Eine vergleichbare Darstellung bei der Verwendung von COOH-funktionalisierten MSN ist in Abbildung 99 (Anhang) dargestellt. Somit konnte, unabhängig der Oberflächenfunktionalisierung von MSN, eine endosomale Aufnahme der Partikel in MC3T3-E1 Zellen bestätigt werden. Dieses Verhalten stimmt zudem mit Ergebnissen anderer Gruppen überein, welche ebenfalls eine endosomale Aufnahme von MSN in weitere Zelllinien bestätigen konnten.^{[135],[136],[137],[138]} Eine weiterführende Unterscheidung zwischen unterschiedlichen endosomalen Aufnahmemechanismen (Pinozytose, Clathrin vermittelte Aufnahme, Caveolin vermittelte Aufnahme oder Clathrin bzw. Caveolin unabhängige Aufnahme)^[139] wurde an dieser Stelle nicht vorgenommen.

Speziell bei der zellulären Aufnahme großer Mengen an MSN können toxische Effekte auftreten. Eine solche partikelinduzierte Zelltoxizität ist abhängig von einer Vielzahl an Einflussfaktoren. Diese umfassen neben einer unterschiedlichen Oberflächenladung in Folge unterschiedlicher Partikelfunktionalisierungen auch die Verwendung verschiedener Partikelgrößen sowie unterschiedliche Partikelformen.^[140] Da die Zytotoxizität eine zellspezifische Größe darstellt, müssen für jede Zelllinie entsprechende Grenzwerte der maximal zu verwendenden Partikelkonzentrationen bestimmt werden. Als Richtwert konnte für eine Vielzahl an Zellen in diesem Zusammenhang in einer 2D-Zellkultur zumeist eine Partikelkonzentration unterhalb von 100 µg/mL als nicht toxisch bestimmt werden.^[141] In bisherigen klassischen 2D-Zellexperimenten adhärenter Zellen kann es dabei, nach Zugabe einer entsprechenden Partikeldispersion, zu einer Sedimentation der enthaltenen Partikel und folglich zu einer deutlich erhöhten Partikelaufnahme kommen. Im Gegensatz dazu liegen eingebrachte MSN innerhalb einer 3D-Matrix, wie z.B. in dem hier verwendeten RADA16-I basierten Hydrogelnetzwerk, homogen verteilt und im Hydrogel stabilisiert vor (vergleiche Kapitel IV.2.2.1.2), wodurch eine Agglomeration dieser Partikel erschwert wird. Somit ist ein Vergleich zwischen einer 3D-Zellkultur mit literaturbekannten Werten von 2D-Zellkulturen nur schwer möglich. Aus diesem Grund wurden entsprechende Zytotoxizitätsbestimmungen in hybriden Hydrogelen für die Verwendung von MC3T3-E1 Zellen durchgeführt, um auf diese Weise eine optimale Partikelkonzentration für spätere Aufnahmetests zu bestimmen (Abbildung 42).

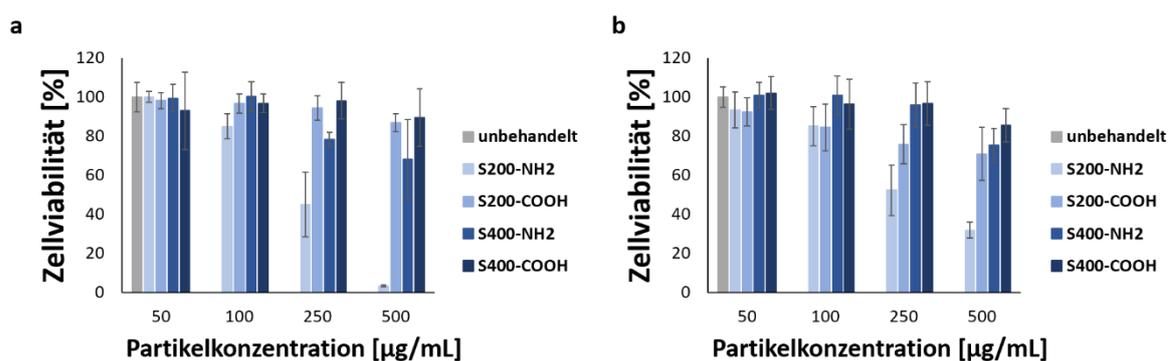


Abbildung 42: Zelltoxizität von MC3T3-E1 Zellen in hybrider 3D-Zellkultur in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an MSN. Hierfür wurden MSN unterschiedlicher Größe (S200 und S400) und veränderter Oberflächenfunktionalisierung (-NH₂ und -COOH) untersucht. Die Bestimmung der Zelltoxizität wurde in Triplikaten durchgeführt. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Betrachtet man die unterschiedlichen funktionalisierten Partikel, konnte eine starke Abhängigkeit der Toxizität von der Oberflächenfunktionalisierung und der damit verbundenen Oberflächenladung festgestellt werden. Für negativ geladene, COOH funktionalisierte S200-COOH und S400-COOH Partikel, konnte, unabhängig von der Größe der verwendeten MSN, lediglich eine geringfügige Zytotoxizität beobachtet werden. Selbst für sehr hohe Partikelkonzentrationen, von bis zu 500 µg/mL, konnte hierbei eine annehmbare Zellvitalität von über 75% erhalten bleiben. Ein vergleichbares Verhalten konnte zudem als unabhängig von der gewählten Gelkonzentration gezeigt werden, da auch bei größeren Netzwerkmaschen (auf Grund einer reduzierten Peptidkonzentration von 0,125 Gew%) und einer dadurch bedingten erleichterten Diffusion von Partikeln keine verstärkte Zelltoxizität detektiert werden konnte.

Im Vergleich hierzu zeigten positiv geladene, aminofunktionalisierte Partikel eine deutlich stärkere Zytotoxizität in hybrider 3D-Zellkultur. So konnte für S200-NH₂ Partikel eine zunehmende Toxizität mit ansteigender Partikelkonzentration festgestellt werden. Der stärkste Effekt konnte hierbei mit einer Kombination aus hoher Partikelkonzentration (500 µg/mL) und einer geringen Peptidkonzentration (0,125 Gew%) festgestellt werden, bei der es zu einem nahezu vollständigen Zelltod kam. Bezüglich der Partikelgröße konnte hingegen eine geringere Toxizität für größere S400-NH₂ Partikel festgestellt werden. Diese größenabhängige Toxizität von MSN steht im Einklang mit bereits zuvor veröffentlichten Arbeiten, bezogen auf 2D-Zellkulturen, bei denen vergleichbare Größeneffekte für unterschiedliche Zelllinien beobachtet werden konnten.^[142]

Auch eine erhöhte Toxizität von positiv geladenen MSN gegenüber negativ geladenen Partikeln konnte ebenfalls bereits in 2D-Zellkulturen von Mortensen *et al.* beobachtet werden.^[143]

In dem vorliegenden 3D-System kann ein möglicher Grund für eine gesteigerte Toxizität von positiv geladenen MSN die zuvor gezeigte schwächere Auswaschung dieser Partikel aus dem Hydrogelnetzwerk darstellen. Die dadurch erhöhte Menge an im System verbleibenden MSN kann folglich zu einer größeren Menge an zellulär aufgenommenen Partikeln führen. Durch diesen Effekt kann jedoch nur ein Teil der beträchtlich verstärkten Toxizität erklärt werden. Eine weitere mögliche Ursache des verstärkten Zelltods in Anwesenheit von NH₂-funktionalisierten MSN stellt zudem eine partikelinduzierte

Verletzung der Lipid-Doppelschicht dar.^[144] In Folge einer solchen Verletzung kommt es zu einer Auflösung der Zellmembran und folglich zu einer induzierten Apoptose. Die größte Ursache der gesteigerten Zelltoxizität von NH₂-funktionalisierten MSN innerhalb der 3D-Zellkultur ist jedoch vermutlich der so genannte „*Proton Sponge Effekt*“. Durch die Anwesenheit von Aminen im Zellinneren (in dem vorliegenden System stellen diese aufgenommene aminofunktionalisierte Partikel dar) kommt es zu einer konstanten Aufnahme von Protonen und Chlorid-Anionen in Lysosomen. Diese erhöhte Konzentration an Ionen innerhalb der Lysosomen führt zu einem Anschwellen und schlussendlich zu einem Durchbruch dieser Strukturen.^[145] Die Folge ist eine Freisetzung des Inneren der Lysosomen in das Zytoplasma, wodurch es zu einer interzellulären Ca²⁺ Freisetzung und daraufhin zu toxischen Effekten kommt.^[146] Des Weiteren werden bei der Ruptur der Lysosomen auch hydrolytische Enzyme ins Zellplasma freigesetzt, was ebenfalls eine Apoptose von Zellen begünstigt.^[147]

Um für sämtliche zu untersuchenden Partikel in beiden Gelkonzentrationen eine ausreichend große Anzahl an Partikeln innerhalb des gesamten Gelvolumens zu gewährleisten und gleichzeitig eine annehmbare Zellvitalität von über 80% zu erhalten, wurden alle weiteren Zellversuche in dieser Arbeit mit einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, ist ein zentrales Ziel dieser Arbeit das Aufnahmeverhalten unterschiedlicher MSN innerhalb eines hybriden Hydrogelnetzwerks zu analysieren, um dadurch Partikel mit einer verzögerten Zellaufnahme in einer solchen 3D-Zellkultur zu identifizieren. Eine qualitative Darstellung der zellulären Partikel Aufnahme soll hierbei mittels konfokaler Laser-Mikroskopie (KLM) erfolgen. Für eine quantitative Bestimmung der zellulär aufgenommenen Partikelmengen muss hingegen eine durchflusszytometrische (FACS)-Analyse vorgenommen werden. Um eine Detektion von Partikeln während dieser Messungen zu ermöglichen, ist es notwendig, Fluoreszenzfarbstoffe an die Oberfläche dieser Partikel anzubinden. Für die Anbindung eines entsprechend funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffes (ATTO-Farbstoff) an die Oberfläche von NH₂- oder COOH-funktionalisierten MSN wurde eine NHS/EDC-Kupplung, vergleichbar der Anbindung der Hyaluronsäure an NH₂-funktionalisierte MSN (Kapitel III.2.1.3), durchgeführt. Um nachzuweisen, dass bei der Anbindung dieser Farbstoffe keine Konformationsänderung oder Zerstörung des Farbstoffs auftritt, wurden entsprechende Fluoreszenzspektren vor

und nach der Anbindung bestimmt (Abbildung 101, Anhang). Die Aufnahme dieser Fluoreszenzspektren vor und nach der Anbindung des Farbstoffs an die Partikeloberfläche zeigte eine übereinstimmende Lage der jeweiligen Fluoreszenzmaxima, wodurch von keinerlei Konformationsänderung oder Zerstörung des Farbstoffs ausgegangen werden kann. Für die Detektion der gelabelten MSN wurde daher dieselbe Wellenlänge wie für den entsprechenden freien Farbstoff verwendet.

Da bis zum heutigen Tag nur eine sehr begrenzte Anzahl an Arbeiten im Bereich der hybriden 3D-Zellkultur und der darin notwendigen Bestimmung der zellulären Aufnahme vorliegen, sollte an dieser Stelle eine klassische 2D-Zellkultur mit MC3T3-E1 Zellen als Referenzexperiment dienen. Dadurch konnten die in der 3D-Zellkultur beobachteten Aufnahmemengen direkt mit einer entsprechenden Aufnahme in klassischer 2D-Zellkultur und entsprechender Literatur verglichen werden. Eine qualitative Visualisierung der Aufnahme von unterschiedlich funktionalisierten MSN in 2D-Zellkultur erfolgte mittels KLM-Messungen (Abbildung 43 b und c). Auch an dieser Stelle mussten fluoreszenzmarkierte MSN verwendet werden, um die Detektierbarkeit der Partikel innerhalb des biologischen Systems zu ermöglichen. Um den Einfluss der angebondenen Fluoreszenzfarbstoffe auf die jeweilige Oberflächenladung der farbstoffmarkierten Partikel auszuschließen, wurden zudem entsprechende Zeta-Potentialmessungen vor und nach Anbindung des Farbstoffs vorgenommen.

Wie in Tabelle 16 (Anhang) dargestellt, konnte jedoch keine bedeutende Änderung der Ladung für die jeweiligen Partikel, infolge einer Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs, detektiert werden. Somit kann in Bezug auf die Oberflächenladung unter physiologischen Bedingungen weiterhin von positiv ($S200-NH_2$) sowie negativ ($S200-COOH$) geladenen Partikeln ausgegangen werden.

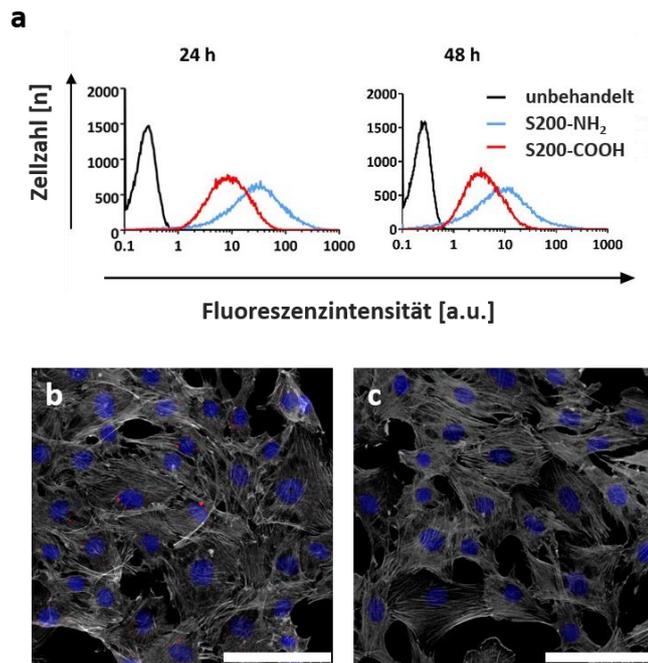


Abbildung 43: A) Quantitative Bestimmung der Aufnahmemenge von S200-NH₂ und S200-COOH Partikeln in MC3T3-E1 Zellen nach 24 h und 48 h in 2D-Zellkultur, b) und c) exemplarische Darstellung einer qualitativen Bestimmung der Aufnahme von Partikeln in MC3T3-E1 Zellen in 2D-Zellkultur mittels konfokaler Laser-Mikroskopie: b) S200-NH₂, c) S200-COOH. (Farbcode: weiß = Zytoskelett, blau = Zellkern, rot = MSN der entsprechenden Funktionalisierung). Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 100 µm. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

In der 2D-Zellkultur konnte, wie Abbildung 43 b und c zu entnehmen ist, eine verstärkte Aufnahme von positiv geladenen, NH₂-funktionalisierten MSN gegenüber negativ geladenen, COOH-funktionalisierten MSN beobachtet werden. Abbildung 43 a zeigt zudem die mittels FACS-Messungen quantifizierten Mengen an S200 bzw. S400 Partikeln, welche nach einer Kultivierungsdauer von 24 h bzw. 48 h von MC3T3-E1 Zellen aufgenommen wurden.

Dabei kann, vergleichbar zu den zuvor durchgeführten KLM-Messungen, eine deutlich verstärkte Aufnahme von positiv geladenen S200-NH₂ gegenüber negativ geladenen S200-COOH Partikeln in MC3T3-E1 Zellen eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 44). Eine deutliche Abhängigkeit der Aufnahmemengen von der Partikelgröße konnte an dieser Stelle hingegen nicht beobachtet werden.

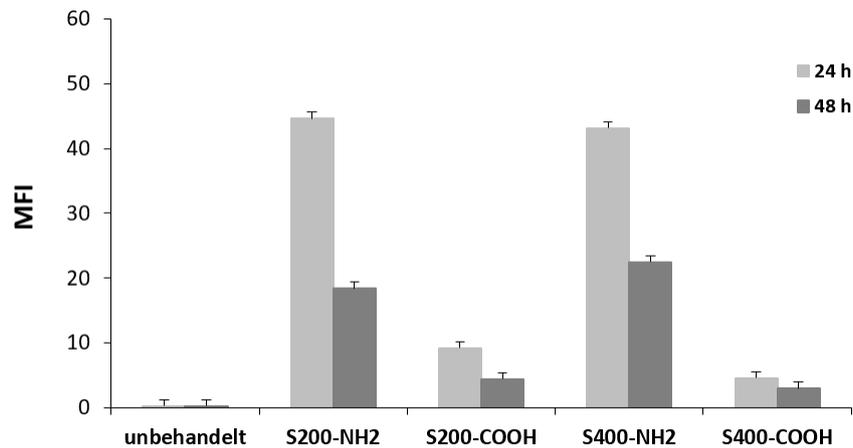


Abbildung 44: Quantifizierung der von M3T3-E1 Zellen aufgenommenen Partikel in 2D-Zellkultur mittels Durchflusszytometrie (FACS) Messungen. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Die verstärkte Aufnahme von positiv geladenen Partikeln konnte bereits für unterschiedliche Zelllinien in früheren Arbeiten beobachtet werden und steht somit in Einklang mit der Literatur.^[139] Bei einer Kultivierungsdauer von 48 h kann unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung und Partikelgröße eine Reduktion der jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitätswerte (MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität pro Event (Zelle)) beobachtet werden. Damit stellt der MFI ein indirektes Maß für die Anzahl an Teilchen pro Zelle dar. Diese reduzierte Partikelmenge lässt sich durch eine sehr schnelle Aufnahme eines Großteils der zellumgebenden Partikel erklären. Bedingt durch weitere Zellteilungen kann eine geringere Fluoreszenzintensität pro Zelle detektiert werden, da die zuvor aufgenommenen Partikel ebenfalls zwischen den geteilten Zellen aufgeteilt werden. Darüber hinaus ist zu beachten, dass es durch eine Behandlung in wässrigem Milieu zu einer partiellen Auflösung von MSN kommt. Auf diese Weise können zuvor angebundene Fluoreszenzfarbstoffe abgelöst werden, wodurch die Fluoreszenzintensität von Partikeln reduziert wird. Eine leichte Reduktion der erhaltenen MFI-Werte kann somit teilweise auch auf eine solche Farbstoffreduktion zurückgeführt werden.

Im Vergleich dazu kann für eine 3D-Zellkultur in einem hybriden Hydrogel ein stark verändertes Aufnahmeverhalten beobachtet werden (Abbildung 45). Wurden zuvor NH₂-funktionalisierte MSN noch deutlich am stärksten von MC3T3-E1 Zellen aufgenommen,

wiesen in einem hybriden Hydrogel COOH-funktionalisierte Partikel eine deutlich gesteigerte Aufnahme gegenüber NH₂-funktionalisierten Partikeln auf.

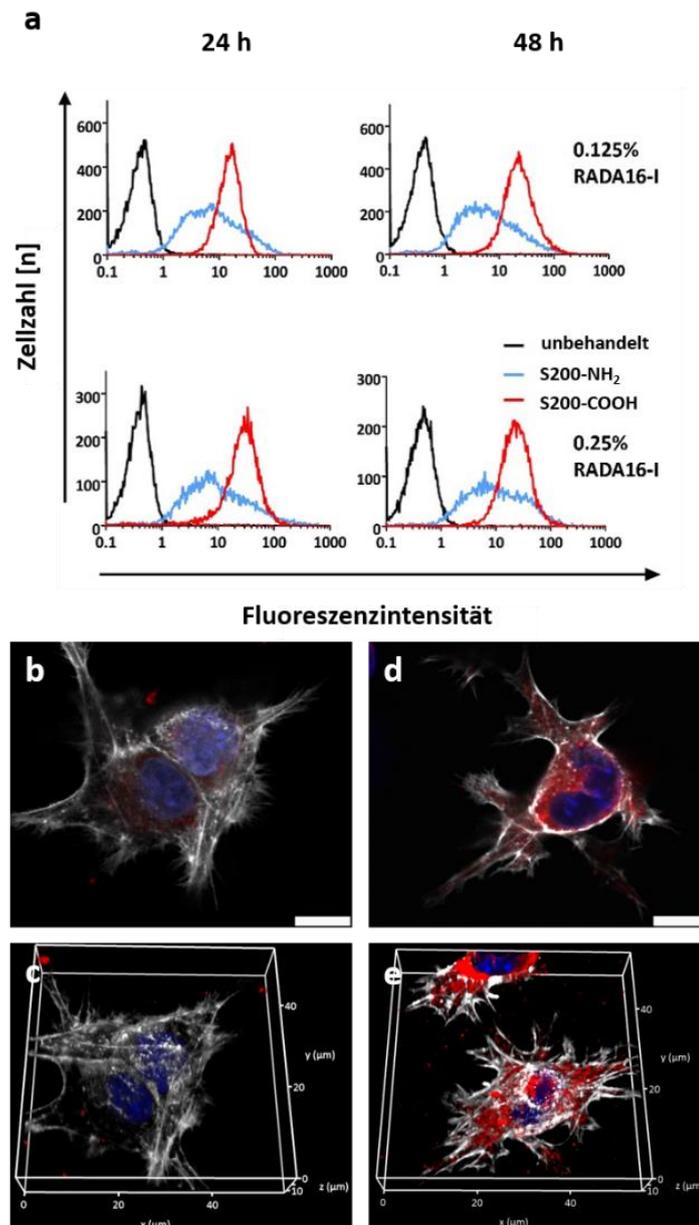


Abbildung 45: A) Quantitative Bestimmung der Aufnahme von S200-NH₂ und S200-COOH Partikeln in MC3T3-E1 Zellen in einer hybriden 3D-Hydrogelzellkultur nach einer Kultivierungsdauer von 24 h bzw. 48 h in hybriden Hydrogelzellkulturen mit einer RADA16-I Menge von 0,125 Gew% oder 0,25 Gew%. B) und c) sind exemplarische Darstellung der Aufnahme von S200-NH₂ Partikeln nach einer Kultivierungsdauer von 24 h mittels KLM. D) und e) visualisieren exemplarische Darstellung der Aufnahme von S200-COOH Partikeln nach einer Kultivierungsdauer von 24 h mittels KLM. Dabei stellen b) und d) einen Querschnitt durch eine exemplarische Zelle und c) sowie e) eine 3D-Rekonstruktion der jeweiligen Zellen, welche mittels „LAS-X 3D viewer software“ erzeugt wurde, dar. Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 10 μm. (Farbcode der KLM-Messungen: blau= DAPI zur Färbung des Zellkerns, weiß= Phalloidin-TRITC zur Färbung des Zytoskeletts, rot= Fluoreszenz gelabelte Partikel (b/c =S200-NH₂; d/e =S200-COOH). Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 10 μm. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Zu beachten ist jedoch, dass die verwendeten -NH₂ und -COOH funktionalisierten Partikel unterschiedliche Markierungseffizienzen für die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs und dadurch bei gleicher Partikelkonzentration unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten aufwiesen.

Um diesem Einfluss Rechnung zu tragen, wurden für eine bessere Vergleichbarkeit der Partikel die mittels FACS bestimmten MFI-Werte mit einem entsprechenden Faktor bewertet. Die aus Fluoreszenzmessungen bei einer Konzentration von 100 µg/mL erhaltenen, zugrundeliegenden Faktoren betragen S200-NH₂ : S200-COOH : S400-NH₂ : S400-COOH - 1 : 0,3 : 0,83 : 0,33. Die so erhaltenen „bewerteten MFI's“ können daher unabhängig von den jeweiligen Markierungseffizienzen betrachtet werden und lassen sich dadurch direkt untereinander vergleichen.

Bei einem entsprechenden Vergleich kann für eine 3D-Zellkultur, unabhängig von der untersuchten Partikelgröße und Gelkonzentration, weiterhin eine verstärkte Aufnahme von NH₂-funktionalisierten Partikeln, gegenüber COOH-funktionalisierten Partikeln, detektiert werden (Abbildung 46). Betrachtet man die Aufnahme von MSN nach 24 h und 48 h, kann neben einer erhöhten Aufnahme von negativ geladenen Partikeln in der 3D-Zellkultur auch eine etwas verlangsamte Aufnahme von Partikeln, im Vergleich zu einer klassischen 2D-Zellkultur, festgestellt werden.

Dies lässt sich durch eine vergleichbare Intensität der jeweiligen MFI-Werte der aufgenommenen Partikeln sowohl für eine Kultivierungsdauer von 24 h als auch von 48 h belegen.

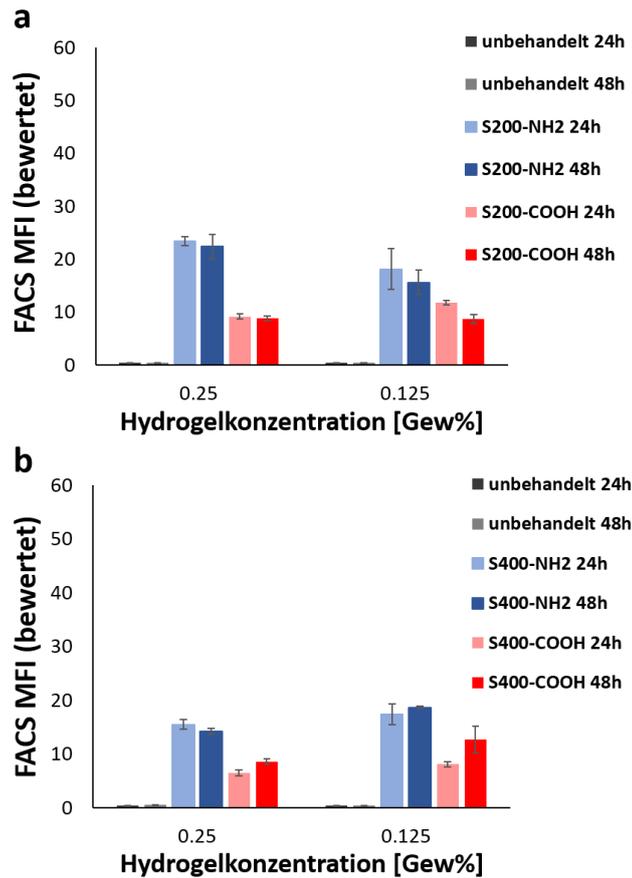


Abbildung 46: Bestimmung der in MC3T3-E1 aufgenommenen Menge an S200 bzw. S400 Partikeln in einer 3D-Zellkultur innerhalb eines hybriden Hydrogels. Die von Zellen aufgenommene Partikelmenge wurde nach 24 h bzw. 48 h mittels FACS-Messungen detektiert. A) Aufnahme von S200 Partikeln, b) Aufnahme von S400 Partikeln. Die Aufnahmemengen stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen dar. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse aus der 3D-Zellkultur mit einer klassischen 2D-Zellkultur muss berücksichtigt werden, dass die Proliferation von Zellen in einem 3D-Hydrogelnetzwerk verlangsamt abläuft (vergl. Abbildung 39). Dadurch kommt es zu einer geringeren Aufteilung der bereits zellulär aufgenommenen Partikel.

Daneben kann es, bedingt durch die Anwesenheit eines umgebenden Peptidnetzwerks, zudem zu einer sterischen Blockade der Aufnahme von Partikeln kommen. Außerdem kann eine entsprechende attraktive Wechselwirkung von Partikeln mit dem umgebenden Peptidnetzwerk zu einer Retention und somit zu einer leicht stagnierenden bis verzögerten (S400-COOH in 0,125 Gew% Hydrogel) Aufnahme von MSN in der 3D-Zellkultur führen. Ungeachtet dieser Unterschiede wurden für einen detaillierten Vergleich der

Partikel aufnehmen dieser unterschiedlichen Systeme die Verhältnisse aus den Aufnahmen in den 3D- und 2D-Zellkulturen bestimmt (Abbildung 47).

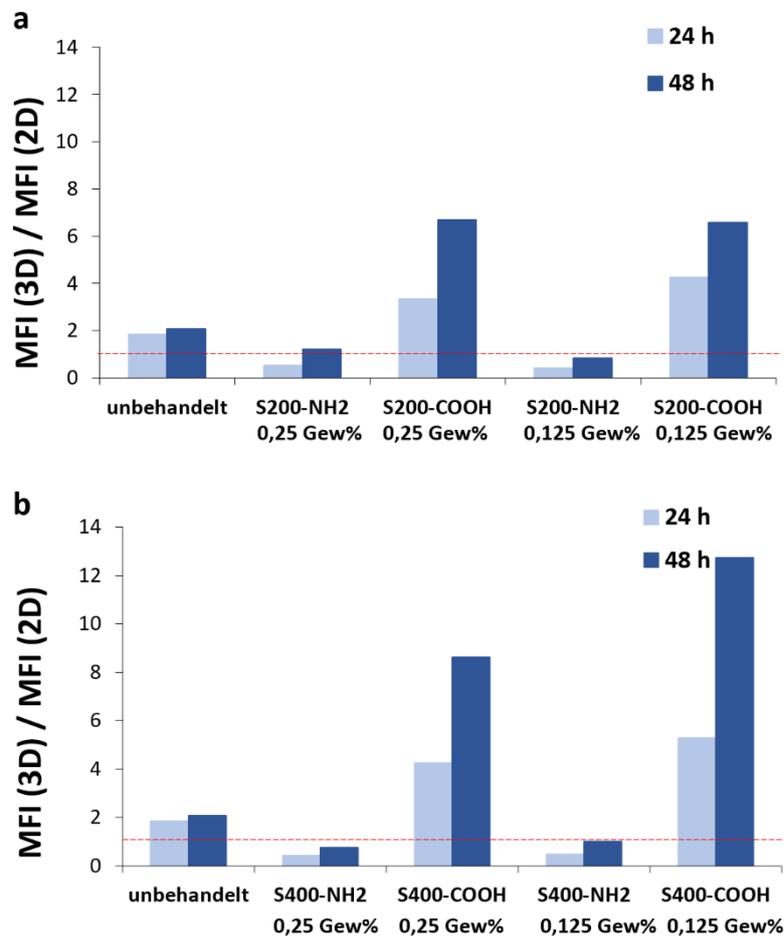


Abbildung 47: Darstellung des Verhältnisses aus der Aufnahme in 3D- vs. 2D-Zellkultur nach 24 h bzw. 48 h. Die bestimmten Aufnahmemengen (MFI) wurden mit der jeweiligen, partikelspezifischen Fluoreszenz bewertet. A) Verwendung von S200 Partikeln, b) Verwendung von S400 Partikeln. Die gestrichelte rote Linie gibt ein Verhältnis von 1 an, hier sind die Aufnahmen in 3D und 2D identisch. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Die hierbei eingezeichnete rote Linie veranschaulicht ein Verhältnis von 1, bei welchem die gleichen Partikelmengen in der 2D- und 3D-Zellkultur aufgenommen wurden. Für NH₂-funktionalisierte Partikel lässt sich unabhängig von der gewählten Partikelgröße und Gelkonzentration in allen Fällen ein Verhältnis von ungefähr 1 beobachten. Für COOH-funktionalisierte Partikel ist hingegen die Aufnahme in der 3D-Zellkultur deutlich erhöht. Dies lässt sich an 3D/2D-Verhältnissen > 1 erkennen. Zudem ist dieser Trend der erhöhten Aufnahme von COOH-funktionalisierten Partikeln unabhängig von der gewählten

Hydrogelkonzentration. Bei der Verwendung größerer Partikel (S400-COOH) ist dieser Effekt jedoch, mit einer bis zu dreizehnfach gesteigerten Aufnahme, nochmals deutlich ausgeprägter.

Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass innerhalb einer 3D-Zellkultur COOH-funktionalisierte Partikel unterschiedlicher Größe verstärkt in MC3T3-E1 Zellen aufgenommen werden. Es stellt sich daher die Frage, weshalb die Aufnahme speziell dieser Partikel derart drastisch erhöht wurde.

2.2.5 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und MSN in hybriden Hydrogelen^[125]

Um das veränderte Aufnahmeverhalten von COOH-funktionalisierten MSN in der 3D-Zellkultur gegenüber einer klassischen 2D-Zellkultur genauer zu untersuchen, muss zunächst allgemein betrachtet werden, welche Faktoren die Aufnahme von Partikeln in Zellen beeinflussen können: Neben der geometrischen Form und Größe^{[148],[149],[150]} konnte speziell für unterschiedliche Oberflächenladung ein Einfluss auf die zelluläre Aufnahme beobachtet werden.^{[136],[137],[151]} Auf Grund von Proteoglykanen, welche auf der Zellmembran ausgebildet werden, weisen Zelloberflächen eine negative Ladung auf.^[139] Somit kann eine verstärkte Aufnahme von positiv geladenen MSN durch elektrostatische Anziehungseffekte zwischen Partikeln und Zelloberfläche erklärt werden.

Weiterhin konnte in einer Vielzahl von 2D-Zellkulturstudien bereits eine Interaktion von Partikeln mit einem umgebenden, proteinhaltigen Zellkulturmedium gezeigt werden. Die durch Adsorption von Proteinen gebildete Proteinkorona auf der Oberfläche von Partikeln konnte dabei als entscheidende Triebkraft für eine Aufnahme in Zellen identifiziert werden.^[152]

Im Fall einer auf RADA16-I basierenden 3D-Zellkultur kann für MSN eine veränderte Interaktion festgestellt werden. Die in einer entsprechenden hybriden Hydrogelformulierung eingebrachten MSN kommen dabei, noch vor einer Kultivierung in Zellmedium, während des Mischvorgangs dieser Formulierungen mit den umgebenden RADA16-I Peptidmolekülen in Kontakt.

Da eine, gegenüber der klassischen 2D-Zellkultur, veränderte Proteinkorona eine Erklärung für eine veränderte Aufnahme von MSN in der 3D-Zellkultur sein könnte, wurde im Folgenden diese Wechselwirkung zwischen unterschiedlich funktionalisierten Partikeln und dem umgebenden Peptid genauer untersucht.

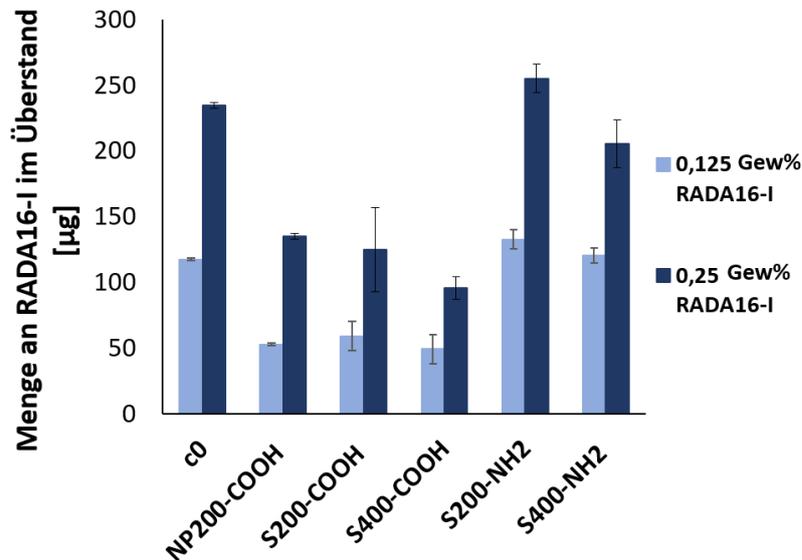


Abbildung 48: RADA16-I Adsorption auf NH₂- und COOH-funktionalisierten Nanopartikeln. Inkubation von 10 mg/mL Partikeln mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an RADA16-I (0,125 Gew% und 0,25 Gew%) für jeweils 15 min. Nach dem Abtrennen mittels Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der im Überstand verbliebenen Peptidkonzentration mittels *Fluorescamin-Assay*. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich jeweils auf Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Hierfür wurden unterschiedlich funktionalisierte MSN (-NH₂ und -COOH) unterschiedlicher Größe (S200 und S400) für 15 min mit einer RADA16-I Peptidlösung (0,125 Gew% oder 0,25 Gew%) inkubiert. Um eine Adsorption von Peptidmonomeren auf der Partikeloberfläche, vor der eigentlichen Gelierung, zu simulieren, wurde zudem unter salzfreien Bedingungen gearbeitet. Auf diese Weise konnte die Ausbildung eines entsprechenden Hydrogelnetzwerks unterbunden werden. Um potentielle Adsorptionseffekte detektieren zu können, musste darüber hinaus eine, gegenüber Zellexperimenten, stark erhöhte Partikelkonzentration von 10 mg/mL gewählt werden. Nach Separation der Partikel konnte anschließend durch Anwendung eines *Fluorescamin-Assays* die im Überstand verbleibende Menge an RADA16-I Peptid ermittelt werden (Abbildung 48). Eine beispielhafte Kalibriergerade des *Fluorescamin-Assays*, welche für die

Bestimmung der jeweiligen Konzentration im Überstand verwendet wurde, ist in Abbildung 100 im Anhang zu finden. Unabhängig der Partikelgröße und Peptidkonzentration konnten für NH₂-funktionalisierte Partikel keine starken Änderungen der im Überstand verbleibenden Mengen an Peptid gegenüber der Ausgangskonzentrationen ($c_0=125 \mu\text{g}$ für 0,125 Gew% und $c_0=250 \mu\text{g}$ für 0,25 Gew%) detektiert werden. Dies spricht für eine ausbleibende Adsorption von RADA16-I auf der Oberfläche dieser positiv geladenen Partikel.

Bei der Untersuchung der Wechselwirkung von COOH-funktionalisierten mesoporösen Nanopartikeln mit dem umgebenden RADA16-I Peptid konnte ein, ebenfalls von der untersuchten Partikelgröße und eingesetzten Peptidkonzentration unabhängiges, Verhalten beobachtet werden. Im Vergleich zu den zuvor untersuchten NH₂-funktionalisierten Partikeln konnte jedoch gegenüber der Ausgangskonzentration an RADA16-I (250 μg) eine starke Reduktion der im Überstand verbleibenden Peptidmenge um ca. 50% detektiert werden. Bei der Verwendung von COOH-funktionalisierten unporösen Partikeln mit einem Partikeldurchmesser von ca. 200 nm (NP200-COOH), welche nach einer Vorschrift von Sato-Berrú *et al.*^[58] hergestellt wurden und ein vergleichbares Zeta-Potential zu mesoporösen Partikeln aufwiesen (-43 mV), konnte eine ähnliche Reduktion der Peptidmenge beobachtet werden. Dies spricht für eine bevorzugte Adsorption der Peptide auf der Partikeloberfläche und eine vernachlässigbare Adsorption innerhalb des porösen Systems.

Wie bereits von Ye *et al.*^[153] bestimmt, besitzt RADA16-I einen isoelektrischen Punkt (IEP) von 7,2. Da eine käuflich erwerbliche RADA16-I Lösung einen pH-Wert von 2-3 aufweist, kommt es unter diesen Bedingungen zu einer Protonierung des Peptids, wodurch eine positive Partialladung innerhalb der Molekülstruktur generiert wird. Dies führt zu einer Anziehung zwischen positiv geladenen Peptidmolekülen und negativ geladenen, COOH-funktionalisierten Partikeln (IEP von 2,55, siehe Abbildung 50), wodurch eine Adsorption des Peptids auf der Partikeloberfläche erklärt werden kann.

Anschließend musste in einer weiterführenden Untersuchung geklärt werden, ob die reduzierte Menge an RADA16-I Peptid im Überstand in der Tat auf eine Oberflächenadsorption oder lediglich auf eine Reduktion, in Folge einer Peptidagglomeration und anschließender Entfernung durch Zentrifugation,

zurückzuführen ist. Hierfür wurden Partikel nach einer Inkubation mit RADA16-I mit MilliQ-Wasser gewaschen und getrocknet. Im Anschluss an diese Vorbehandlung wurden schließlich die Zeta-Potentiale der erhaltenen Partikel bestimmt. Das Waschen der inkubierten Partikel mit MilliQ-Wasser war hierbei essentiell, um eine Netzwerkbildung, bedingt durch eingebrachte Salze während der Zeta-Potential Bestimmung in KCL-Lösung, zu unterbinden. Außerdem konnte durch einen solchen Waschschrift sichergestellt werden, dass lediglich stark adsorbierte Peptide auf der Partikeloberfläche haften blieben. Auf diese Weise lässt sich der Einfluss der gebildeten „Peptid hard corona“ auf die Oberflächenladung der Partikel bestimmen.

Als Referenzwert wurde zunächst das Zeta-Potential des reinen RADA16-I Peptids unter den gegebenen Bedingungen, in 10 Gew%-iger Sucroslösung, bestimmt, wobei ein Wert von +35,9 mV erhalten wurde. Dieser stimmt mit einer Arbeit von Arosio *et al.* überein, welche für das Zeta-Potential von RADA16-I, bei einem pH Wert von 4,5, einen Wert von 36,2 mV berichten.^[112] Da die Oberflächenladungen sowohl von NH₂- als auch COOH-funktionalisierten Partikeln unterhalb des Zeta-Potentials von RADA16-I liegen, sollte folglich bei einer Adsorption von RADA16-I auf der Partikeloberfläche eine Erhöhung des jeweiligen Zeta-Potentials zu beobachten sein.

Abbildung 49 zeigt Zeta-Potential-Messungen der untersuchten Partikel vor und nach der Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an RADA16-I. Für NH₂-funktionalisierte MSN kann lediglich eine leichte Steigerung des Potentials um ca. +6 mV beobachtet werden. Dies stimmt mit den zuvor erhaltenen Werten des *Fluorescamin-Assays* überein, bei denen lediglich eine sehr geringe Reduktion der Peptidkonzentration und somit auch geringe Adsorption von RADA16-I auf die Partikeloberfläche beobachtet werden konnte.

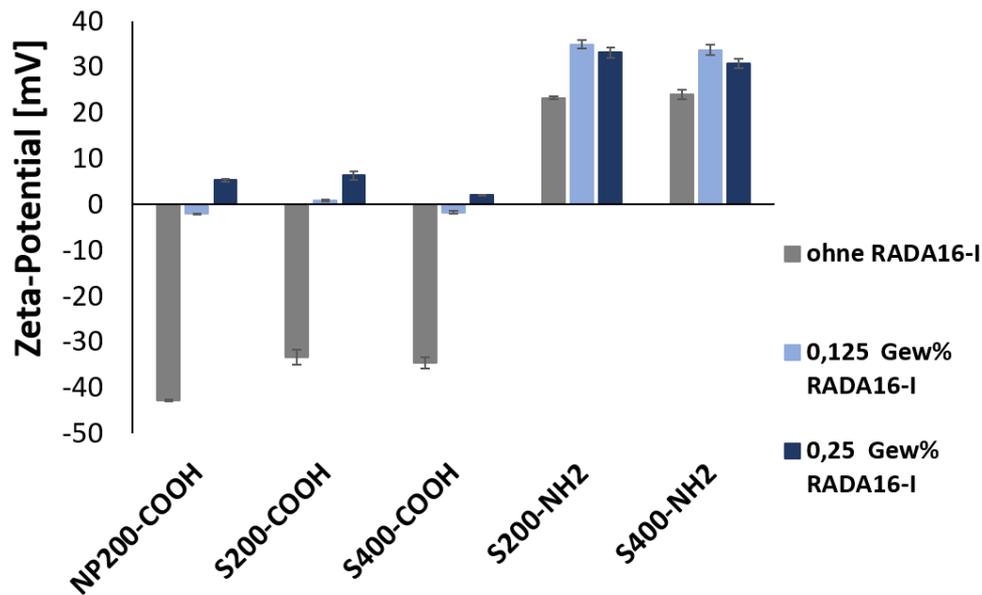


Abbildung 49: Bestimmung des Zeta-Potentials von unterschiedlich funktionalisierten Partikeln vor und nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an RADA16-I Peptid. Alle Messungen wurden mit einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL in 1 mM KCl-Lösung (aq) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Die Messung der Oberflächenladung stellt zudem die, im Vergleich zu einem *Fluorescamin-Assay*, empfindlichere Methode dar. Dabei können bereits geringe adsorbierte Mengen Peptid auf der Oberfläche detektiert werden, wohingegen bei der Durchführung eines *Fluorescamin-Assays* lediglich deutlich größere Änderungen eindeutig zu bestimmen sind.

Für COOH-funktionalisierte Partikel, bei denen eine starke Reduktion der Peptidkonzentration auftrat, konnte hingegen, bereits bei der Verwendung einer geringeren Konzentration von 0,125 Gew% RADA16-I, ausgehend von stark negativ geladenen Partikeln (zwischen -33 mV und -43 mV), ein deutlicher Anstieg des Zeta-Potentials zu ± 0 mV detektiert werden. Dieser Wert konnte auch durch Einsatz einer deutlich gesteigerten RADA16-I Konzentration (0,25 Gew%) nicht wesentlich gesteigert werden (max. +6 mV).

Durch die Veränderung der physiochemischen Eigenschaften in Folge der Inkubation mit einer RADA16-I Peptidlösung kann somit davon ausgegangen werden, dass die im Überstand detektierte Reduktion von RADA16-I in der Tat durch eine Adsorption auf der Partikeloberfläche verursacht wird.

Dies hat eine Veränderung des Zeta-Potentials zu positiveren Werten zur Folge. Das deutlich erhöhte Zeta-Potential dieser Partikel erklärt zudem eine wesentlich verbesserte Aufnahme der ursprünglich negativ geladenen MSN durch MC3T3-E1 Zellen. Auf Grund der Adsorption des Peptids werden negative Partialladungen auf der Partikeloberfläche abgeschirmt, wodurch es zu einer elektrostatischen Anziehung zwischen negativ geladener Zelloberfläche und den nun positiver geladenen Partikeln kommen kann.

Für S200 Partikel wurden neben der Bestimmung der Zeta-Potentiale zudem auch entsprechende isoelektrische Punkte (IEP) vor und nach der Inkubation mit RADA16-I bestimmt (Abbildung 50). Auch hier konnte im Fall der COOH-funktionalisierten Partikel, vergleichbar der zuvor gezeigten Zeta-Potential-Bestimmungen, ein deutlicher Anstieg des IEP, ausgehend von 2,55 zu einem pH-Wert von 5,93, detektiert werden. Für NH₂-funktionalisierte Partikel wurde hingegen ein ungefähr gleichbleibender IEP zwischen 6,2 und 7,2 erhalten.

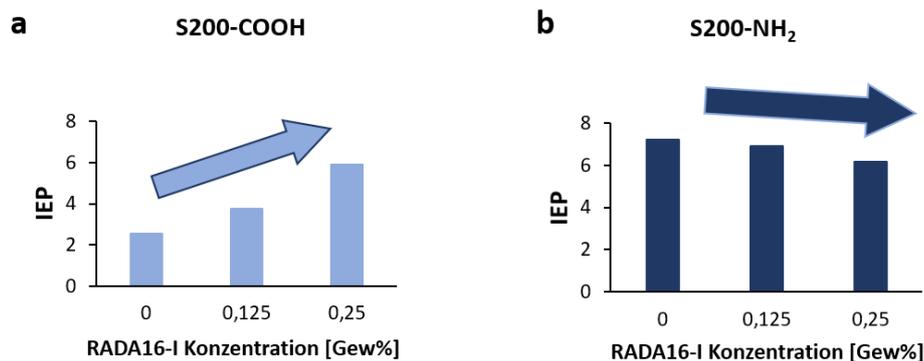


Abbildung 50: Bestimmung des IEP für a) S200-COOH und b) S200-NH₂ nach der Inkubation mit unterschiedlich konzentrierten RADA16-I Lösungen. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und die verbleibenden Partikel mit MilliQ gewaschen. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (IEP) erfolgte bei einer Partikelkonzentration von 0,2 mg/mL in 1 mM KCl-Lösung (aq).

Die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens erfolgte in einer ungelierten Peptidlösung, dieser Zustand liegt jedoch nur zu Beginn einer 3D-Zellkultur, vor der Injektion in ein salzhaltiges Zellkulturmedium, vor. Aus diesem Grund sollte abschließend geklärt werden, wie schnell ein entsprechender Adsorptionsprozess abläuft, um Rückschlüsse auf die Partikelcharakteristik der in *in vitro* Zellversuchen tatsächlich verwendeten Partikel ziehen zu können.

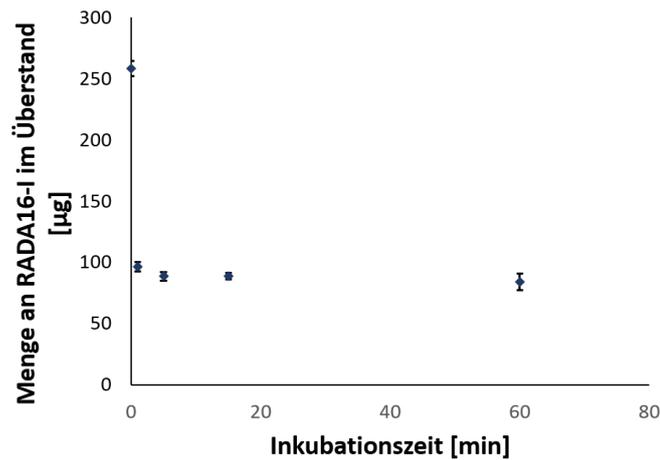


Abbildung 51: Variation der Inkubationszeit für die Adsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) auf S200-COOH Partikel. Die Detektion der im Überstand verbleibenden Peptidmenge erfolgte nach Abzentrifugation der Partikel mittels *Fluorescamin-Assay*. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

Hierfür wurden beispielhaft S200-COOH Partikel mit unterschiedlichen Inkubationszeiten behandelt und die jeweiligen Peptidkonzentration zu jedem Zeitpunkt im Überstand mittels *Fluorescamin-Assay* bestimmt.

Wie in Abbildung 51 dargestellt, findet eine sehr schnelle Adsorption des Peptids auf der Partikeloberfläche statt. Bereits nach einer Inkubationszeit von 1 min konnte ungefähr 90% der nach 60 min auf den Partikeln adsorbierten Menge an Peptid auf der Oberfläche bestimmt werden.

Somit kann bei der Herstellung von *in vitro* Proben in dieser Arbeit, ebenso wie bei späteren potentiellen *in vivo* Anwendungen, sofort nach Mischen der Einzelkomponenten, und noch bevor eine Applikation der Lösung stattfinden kann, von einer reproduzierbaren Peptidkorona ausgegangen werden.

2.2.6 Einfluss von Serumproteinen auf die Aufnahme von MSN durch MC3T3-E1 Zellen in hybrider Hydrogelzellkultur^[125]

Wie zuvor bereits beschrieben, konnte in einer klassischen 2D-Zellkultur bereits ein deutlicher Einfluss der Proteinadsorption auf die zelluläre Aufnahme gezeigt werden. In dem hier vorgestellten injizierbaren 3D-System ist eine drastisch verstärkte Aufnahme von COOH-funktionalisierten MSN in MC3T3-E1 Zellen zu beobachten. Als möglicher Grund für eine solch verstärkte zelluläre Aufnahme von COOH-funktionalisierten MSN in eine 3D-Zellkultur konnte zuvor bereits die starke Adsorption von umgebenden Peptidmolekülen und eine damit einhergehende Zeta-Potentialerhöhung genannt werden. An dieser Stelle soll daher geklärt werden, ob eine Interaktion der Peptidkorona mit umgebenden Proteinen eine veränderte Zusammensetzung der Korona hervorruft und inwiefern diese einen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme hat.

Hierfür wurden zunächst FACS-Messungen der zellulären Aufnahme von NH₂- und COOH-funktionalisierten Partikeln, in Gegenwart und Abwesenheit von Serumproteinen innerhalb des verwendeten Zellmediums, durchgeführt. Betrachtet man die zellulär aufgenommenen Partikelmengen, kann für COOH-funktionalisierte MSN kein Einfluss der Proteinadsorption beobachtet werden, da die aufgenommenen Mengen an Partikeln in An- und Abwesenheit von Serumproteinen nahezu identisch sind. Bei NH₂-funktionalisierten Partikeln, welche zuvor eine sehr geringe Adsorption von RADA16-I auf der Partikeloberfläche aufwiesen, kann hingegen in Abwesenheit von Serumproteinen eine verringerte Aufnahme von MSN in Zellen beobachtet werden.

Dies lässt sich auch an dieser Stelle durch eine, in Gegenwart von Serumproteinen, veränderte Proteinkorona erklären, welche für eine erhöhte Aufnahme von MSN in Zellen verantwortlich ist.^[154] Um eine Aussage über die Zusammensetzung der Proteinkorona, in Folge einer Adsorption von RADA16-I Peptidmolekülen und Serumproteinen in der 3D-Zellkultur, treffen zu können, wurde ein entsprechendes Experiment durchgeführt. Hierfür wurden NH₂- und COOH-funktionalisierte Ausgangspartikel (Probenbezeichnung F), im Vergleich zu RADA16-I prä-inkubierten NH₂- und COOH-funktionalisierten Ausgangspartikeln (Probenbezeichnung RF), mit einer Serumprotein-Lösung inkubiert. Für die Inkubation mit fötalem Kälberserum wurde eine, gegenüber Zelleexperimenten,

erhöhte Serumkonzentration von 80 Vol% gewählt, um eventuelle Adsorptionseffekte eindeutig erkennen zu können.

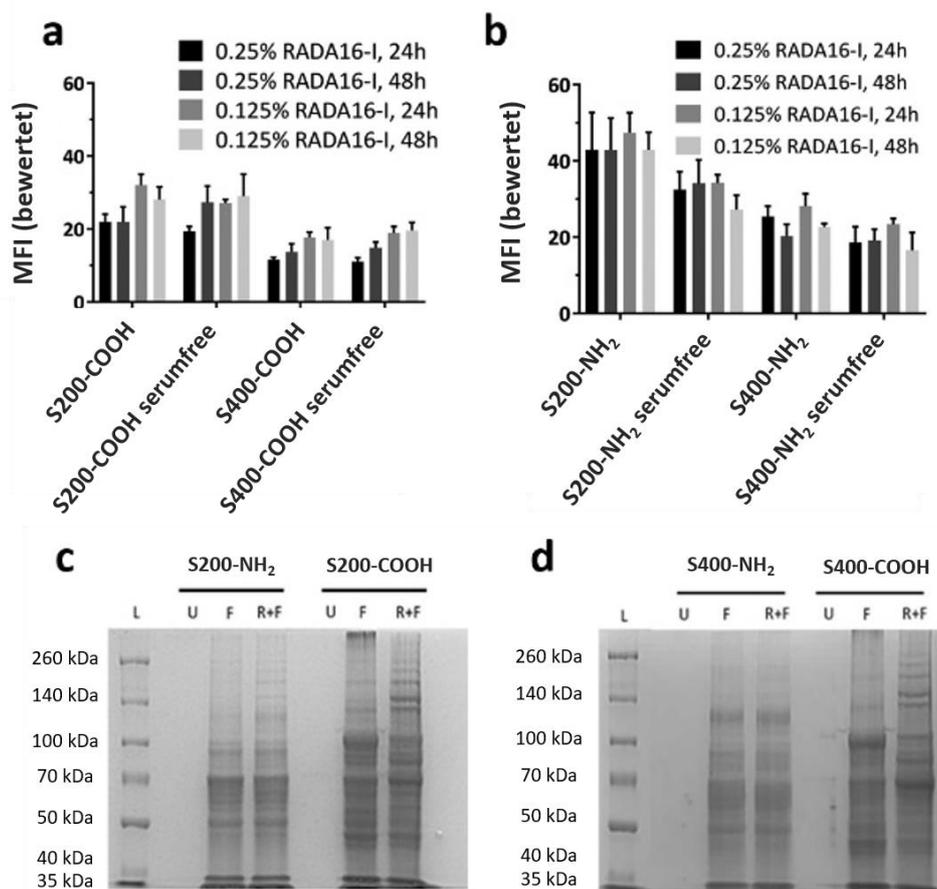


Abbildung 52: Einfluss von Serumproteinen auf die Aufnahme von MSN in hybriden Hydrogelen. A) Bestimmung der Aufnahme von S200-COOH und S400-COOH in hybriden Hydrogelen in An- und Abwesenheit von Serumproteinen (10 Vol%) im Zellkulturmedium mittels FACS-Messungen. B) Bestimmung der Aufnahme von S200-NH₂ und S400-NH₂ in hybriden Hydrogelen in An- und Abwesenheit von Serumproteinen im Zellkulturmedium mittels FACS-Messungen. SDS-Page von c) S200 Partikeln und d) S400 Partikeln mit und ohne Vorinkubation mit einer 0,25 Gew% RADA16-I Lösung. Die Seruminkubation erfolgte mit 80 Vol% fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS). (Zuordnung: U= unbehandelte, pure Partikeldispersion, ohne fötales Kälberserum, F= nach FCS-Inkubation, R+F= RADA16-I Präinkubation mit anschließender FCS-Inkubation, L= Proteinreferenzen - *Ladder*). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Nach Separation der Partikel und Entfernung von schwach gebundenen Proteinen („soft corona“) wurde die Zusammensetzung der zurückbleibenden Proteinkorona, bestehend aus stärker gebundenen Proteinen („hard corona“), mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) untersucht. Hierbei konnten deutliche Unterschiede zwischen NH₂- und COOH-funktionalisierten MSN

beobachtet werden. So zeigen mit RADA16-I vorinkubierte COOH-funktionalisierte Partikel im Vergleich zu reinen COOH-funktionalisierten Partikeln eine verstärkte Adsorption von Serumproteinen im Bereich von >140 kDa (Abbildung 52 c und d). Eine zuvor adsorbierte RADA16-I Peptidschicht ermöglicht demnach eine bevorzugte Anlagerung von schweren Proteinen. Die hier wirkenden Wechselwirkungen sind vielfältig (elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, etc.), wurden jedoch in diesem Zusammenhang nicht genauer untersucht.

Ein vergleichbarer Effekt kann für NH₂-funktionalisierte Partikel, für welche zuvor eine sehr geringe Adsorption von RADA16-I bestimmt werden konnte, nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde für NH₂-funktionalisierte MSN mit und ohne RADA16-I Vorinkubation eine vergleichbare Zusammensetzung der Proteinkorona erhalten.

Folglich kann in einem hybriden Hydrogelnetzwerk von einem dominierenden Effekt der RADA16-I Adsorption gegenüber der Proteinadsorption, in Bezug auf das Aufnahmeverhalten von MSN, ausgegangen werden. Interessanterweise konnte ein entsprechender Effekt ebenfalls von Bawa *et al* für die Aufnahme von EAK16-II basierten Partikeln in einer 2D-Zellkultur beobachtet werden.^[155] Wie bereits zuvor erwähnt, bildet dabei EAK16-II, welches als erstes selbstassemblierende Peptid identifiziert werden konnte, eine zu RADA16-I vergleichbare fibrilläre β -Faltblattstruktur aus.^[102]

Demzufolge war es in diesem Projekt möglich, die Interaktion zwischen einem umgebenden netzwerkbildenden Peptid und eingebrachten Partikeln als einen wichtigen Einflussfaktor für die Aufnahme von Partikeln in einer 3D-Zellkultur zu identifizieren. Die in einem solchen 3D-Hydrogelsystem ausgebildete Peptidkorona ist je nach Ladung der verwendeten Partikeloberfläche stark ausgeprägt und kann sogar dem Einfluss der Proteinadsorption, welcher in einer 2D-Zellkultur bedeutend für die Aufnahme von Partikeln in Zellen ist, überlegen sein.

In den gezeigten Ergebnissen für sphärische Partikel konnte jedoch keine verzögerte Aufnahme über einen längeren Zeitraum, wie es für eine entsprechende Anwendung im Bereich der Geweberekonstruktion notwendig wäre, ermöglicht werden. Lediglich für sphärische S400-COOH Partikel konnte eine leicht verzögerte Aufnahme in MC3T3-E1

Zellen erzielt werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der vergrößerte Durchmesser dieser Partikel darstellen. Bedingt durch die Größe der verwendeten Partikel ist es vorstellbar, dass die Beweglichkeit dieser innerhalb des Hydrogelnetzwerks eingeschränkt wird, wodurch umgebende Zellen diese Partikel schlechter aus dem Peptidnetzwerk aufnehmen können.

Um das Ziel einer deutlich verzögerten und daher auch verlängerten Aufnahme zu erreichen, ist es allerdings notwendig, weitere Anpassungen am System vorzunehmen. Die einfachste Möglichkeit hierfür stellte die Veränderung der Partikel in Bezug auf ihre Oberflächenfunktionalisierung dar. Durch eine entsprechend veränderte Interaktion mit dem umgebenden Peptid könnte eine Verzögerung der zellulären Aufnahme dieser Partikel ermöglicht werden.

2.3 Veränderung des zellulären Aufnahmeverhaltens durch Variation der Oberflächenmodifikation

Ein potentielles Mittel zur Beeinflussung der zellulären Aufnahme stellt die Einführung weiterer funktioneller Gruppen dar. Dabei ist eine Vielzahl an Modifikationen von Peptidsequenzen über Polysaccharide bis hin zu weiteren kleinen organischen Molekülen denkbar.

2.3.1 Glucosefunktionalisierungen von S200 Partikeln

Wie bereits in der 2D-Zellkultur gezeigt werden konnte, ist die Reduktion der auf der Partikeloberfläche adsorbierten Menge an Proteinen eine Möglichkeit die aufgenommene Partikelmenge zu variieren.^{[52],[156],[157]} Auch im Kontext einer hybriden Hydrogelzellkultur, bei Verwendung von COOH-funktionalisierten MSN, konnte eine starke Wechselwirkung des umgebenden Peptids mit der Partikeloberfläche festgestellt werden. Da diese Peptidadsorption in einer verstärkten Zellaufnahme der Partikel resultierte, könnte eine Unterdrückung der Peptidadsorption eine potentielle Möglichkeit zur Reduktion der zellulären Aufnahme darstellen. Eine solche Reduktion der adsorbierten Proteinmenge konnte in der 2D-Zellkultur durch die Anbindung spezieller Polymere auf der Partikeloberfläche erzielt werden. Der prominenteste Vertreter dieser Gruppe ist Polyethylenglycol (PEG), welches auf Grund einer starken Hydrophilie die Einlagerung von Wassermolekülen zwischen seinen Polymersträngen ermöglicht.^[158] Auf diese Weise bildet sich eine Hydratationsschicht um diese Partikel, welche einen Schutz gegen die Adsorption von Biomakromolekülen darstellt.^{[159],[160]}

In den letzten Jahren wurden jedoch, neben in *in vivo* Tierversuchen, auch im menschlichen Körper Antikörper gegen PEG-Moleküle identifiziert, welche einen Einsatz von PEGylierten Oberflächen in Zukunft deutlich erschweren.^[161] Alternativ zu einer PEGylierung von Partikeloberflächen konnte jedoch eine Glucosefunktionalisierung der Oberfläche bereits als Möglichkeit für die Reduktion von adsorbierten Proteinen identifiziert werden.

M. Beck konnte im Rahmen ihrer Dissertation bereits in einer 2D-Zellkultur, durch eine Partikeloberflächenmodifikation mit Glucosemolekülen, eine deutliche Reduktion der Proteinadsorption, vergleichbar mit PEGylierten Partikeln, bestätigen.^[72] Auf Basis dieser Ergebnisse soll daher eine Interaktion mit einem umgebenden 3D-Peptidnetzwerk und den entsprechenden Peptidmonomeren untersucht werden.

Für die Funktionalisierung von MSN mit Glucosemolekülen wurden sowohl S200-COOH als auch S200-NH₂ Partikel verwendet und entsprechend mit unterschiedlichen Mengen an Glucosamin bzw. Glucuronsäure umgesetzt (vergl. Kapitel III.2.1.2). Die dadurch erhaltenen Partikel werden im Folgenden als S200-COOH-Glu bzw. S200-NH₂-Glu bezeichnet.

2.3.1.1 Strukturuntersuchung hybrider Hydrogele

Zunächst musste auch für diese eingebrachten Partikel die Ausbildung eines hybriden Hydrogels und die Verteilung von eingebrachten MSN innerhalb eines solchen Hydrogelnetzwerks mittels TEM und REM untersucht werden (Abbildung 53).

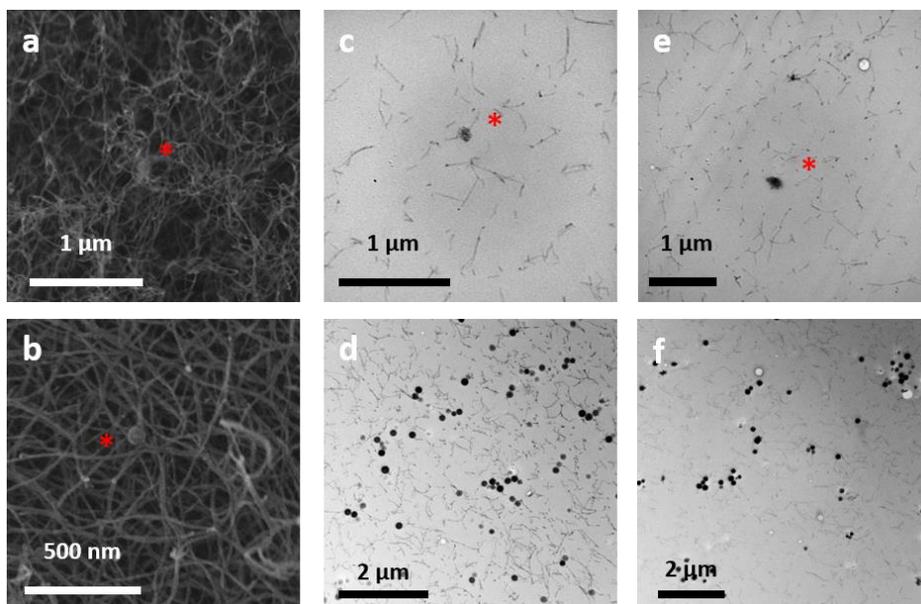


Abbildung 53: REM-Messungen zur Visualisierung der Verteilung von 0,5 mg/mL glucosefunktionalisierten MSN an der Oberfläche hybrider Hydrogelnetzwerke (a S200-NH₂-Glu-0,28, b S200-COOH-Glu-0,28). TEM-Querschnittsaufnahmen der Verteilung von c) 0,5 mg/mL sowie d) 10 mg/mL S200-NH₂-Glu-0,28 Partikeln im Inneren hybrider Hydrogelnetzwerke. TEM-Querschnittsaufnahmen der Verteilung von e) 0,5 mg/mL sowie f) 10 mg/mL von S200-COOH-Glu-0,28 Partikeln im Inneren hybrider Hydrogelnetzwerke.

In Anwesenheit von S200-NH₂-Glu und S200-COOH-Glu Partikeln (0,5 mg/mL), welche mit einer hohen Glucosederivatkonzentration von 280 µmol/g funktionalisiert wurden, kann die Bildung eines ausgeprägten fibrillären Peptidnetzwerks beobachtet werden. Wie auch bei den entsprechenden Ausgangspartikeln (vergl. Kapitel IV.2.2.1.2) können zudem einzelne Partikel auf der Oberfläche des Peptidnetzwerks detektiert werden (markiert mit einem roten Stern).

Betrachtet man die Verteilung von MSN bei Verwendung einer hohen Partikelkonzentration von 10 mg/mL im Inneren eines ausgebildeten hybriden Hydrogels mittels TEM-Messungen von Hydrogelquerschnitten, kann unabhängig von der Oberflächenmodifikation mit Glucosamin oder Glucuronsäure ein fibrilläres Peptidnetzwerk mit einzelnen, nicht agglomerierten Partikeln detektiert werden (Abbildung 53, d und f).

2.3.1.2 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und eingebrachten MSN

Die Wechselwirkung von glucosefunktionalisierten MSN (10 mg/mL) mit den umgebenden Peptidmonomeren wurde wiederum durch Inkubation von Partikeldispersionen mit einer RADA16-I Peptidlösung (0,25 Gew%) untersucht. Dabei musste unter salzfreien Bedingungen gearbeitet werden, um die Ausbildung eines RADA16-I Peptidnetzwerks zu unterbinden. Auf diese Weise konnte gezielt die Adsorption von ungeladenen Peptidmonomeren auf der Partikeloberfläche untersucht werden.

Wie in Abbildung 54 a dargestellt, kann für S200-NH₂-Glu im Vergleich zu den zugrundeliegenden S200-NH₂ Ausgangspartikeln, unabhängig der eingesetzten Menge an Glucose (zunehmend von links nach rechts), eine gleichmäßige Reduktion der im Überstand verbleibenden Menge an RADA16-I detektiert werden. Dies steht im Gegensatz zu der zuvor postulierten abschirmenden Wirkung von Glucosemolekülen gegenüber der Adsorption des RADA16-I Peptids.

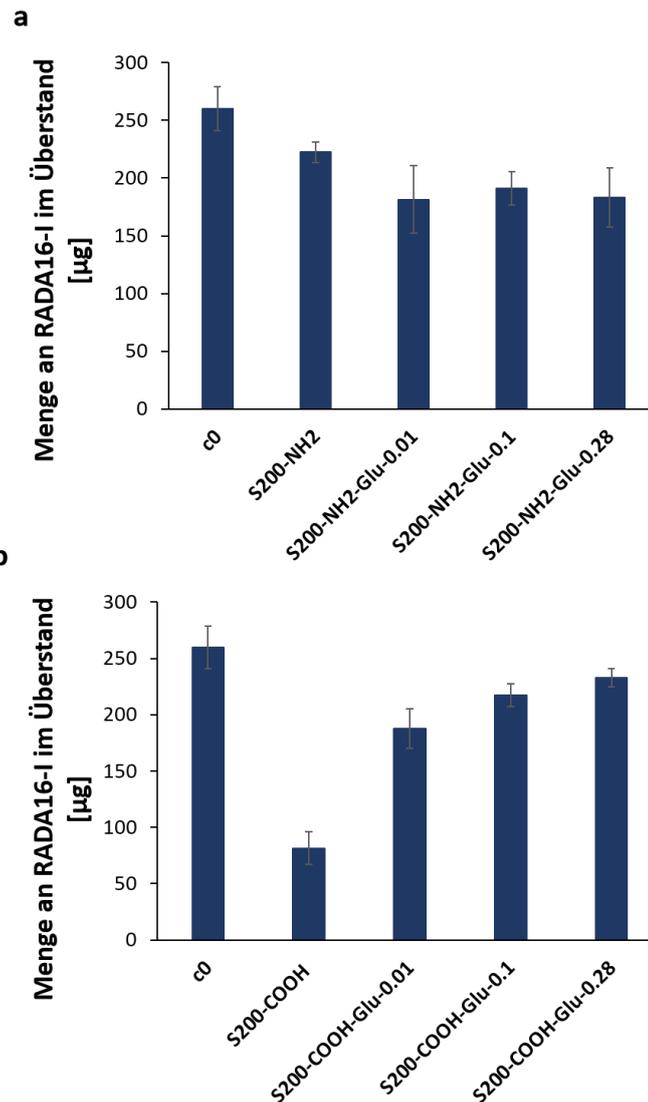


Abbildung 54: Adsorption des RADA16-I Peptids auf der Oberfläche von glucosefunktionalisierten Partikeln, welche auf der Basis von a) S200-NH₂ und b) S200-COOH hergestellt wurden. Die Inkubation mit einer 0,25 Gew% Peptidlösung erfolgte für 15 min. Eine anschließende Detektion der im Überstand verbleibenden Konzentration an RADA16-I wurde mittels *Fluorescamin-Assay* durchgeführt. In dem in der Nomenklatur enthaltenen Teil „Glu-X“ gibt das Suffix X die jeweilige, für die Funktionalisierung verwendete, Menge an Glucosederivat in µmol/g an. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen bestimmt.

Eine Erklärungsmöglichkeit dieses Verhaltens kann durch die Untersuchung der Zeta-Potentiale von MSN-NH₂-Glu gegeben werden. Mit steigenden Mengen an Glucosefunktionalisierung kommt es zu einer zunehmenden Reduktion der NH₂-Funktionalitäten auf der Oberfläche der Partikel und folglich zu einer Reduktion des Zeta-Potentials dieser Partikel (vergleiche Abbildung 55 a). Somit kann es nach der Anbindung von Glucose auf der Partikeloberfläche zu einer verstärkten elektrostatischen Anziehung zwischen positiv geladenem RADA16-I und den Glu-funktionalisierten MSN

kommen. Eine adsorptionsbedingte Erhöhung des Zeta-Potentials nach der Inkubation mit RADA16-I Peptidlösung (0,25 Gew%) ist somit durch eine verstärkte Peptidadsorption auf der Partikeloberfläche zu erklären (Zeta-Potential von RADA16-I = 36,2mV^[112]).

Für S200-COOH-Glu kann hingegen, verglichen zu einem lediglich COOH-funktionalisierten Ausgangspartikel, eine größere verbleibende Menge an RADA16-I im Überstand detektiert werden (Abbildung 54 b). Dabei konnte bereits bei sehr geringen Mengen an auf der Partikeloberfläche gebundenen Glucosemolekülen (0,01 mmol/g) eine 56%ige Reduktion der Adsorption von RADA16-I auf der Partikeloberfläche, gegenüber einem lediglich COOH-funktionalisierten Referenzpartikel, beobachtet werden.

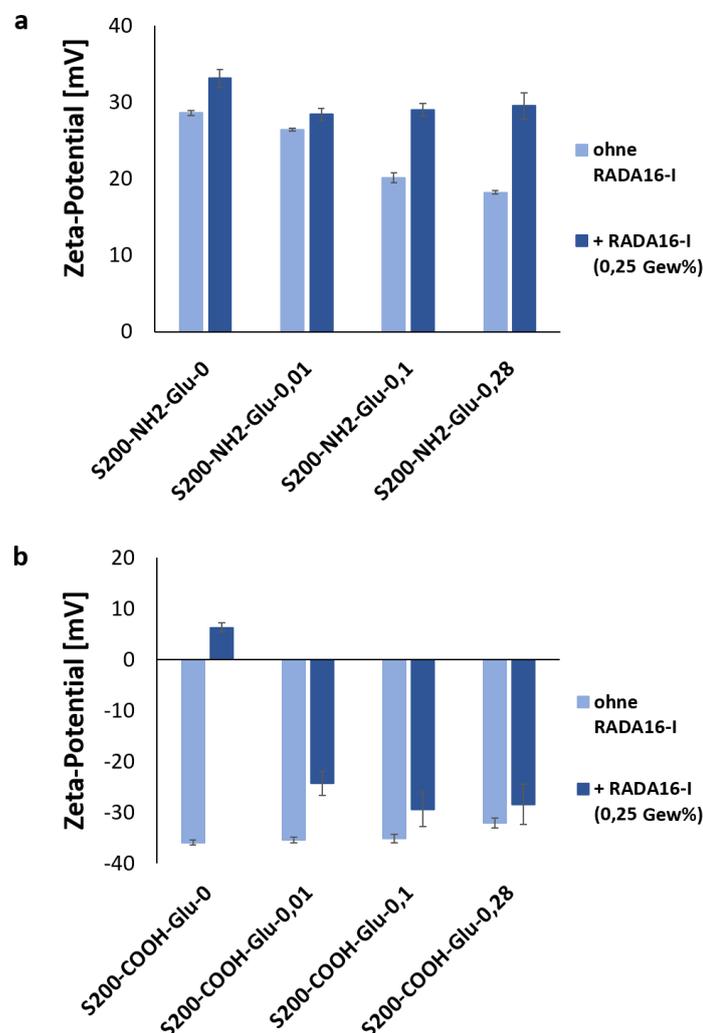


Abbildung 55: Bestimmung von Zeta-Potentialen nach Adsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) auf der Partikeloberfläche von a) S200-NH₂-Glu und b) S200-COOH-Glu. Messung in 1 mM KCl-Lösung (aq.) und einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL. In dem in der Nomenklatur enthaltenen Teil „Glu-X“ gibt das Suffix X die jeweilige, für die Funktionalisierung verwendete, Menge an Glucosederivat in µmol/g an. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen bestimmt.

Dies entspricht einer absoluten Menge an adsorbiertem RADA16-I von ca. 70 µg und somit lediglich 25% der gesamten zur Verfügung stehenden RADA16-I Menge. Durch Anbindung einer steigenden Menge an Glucose auf der Oberfläche der Partikel konnte die Menge an adsorbiertem RADA16-I nochmals weiter reduziert werden. Für die höchste eingesetzte Glucose-Konzentration (0,28 mmol/g) wurde dabei eine Reduktion, gegenüber einem COOH-funktionalisierten Partikel, von bis zu 66% erzielt. Bezogen auf die Menge an RADA16-I entspricht dies einer Adsorption von lediglich 7% der gesamten eingesetzten Menge an RADA16-I in der Inkubationslösung.

Eine Bestimmung der Zeta-Potentiale von MSN-COOH-Glu Partikeln vor und nach Adsorption mit RADA16-I ergab, unabhängig von der verwendeten Glucosemenge, eine weiterhin negative Oberflächenladung (Abbildung 55 b). Dies steht im Gegensatz zu einem reinen COOH-funktionalisierten Referenzpartikel, welcher eine starke RADA16-I Adsorption und dadurch bedingt eine Verschiebung der Oberflächenladung hin zu leicht positiven Werten aufwies. Die verringerte Menge an adsorbiertem RADA16-I bewirkt für MSN-COOH-Glu lediglich eine schwache Erhöhung der Oberflächenladung um maximal 10 mV.

Somit konnte für S200-COOH-Glu Partikel eine angestrebte Reduktion der Partikel-Peptid-Wechselwirkung gegenüber S200-COOH Ausgangspartikeln gezeigt werden.

2.3.1.3 Aufnahme von glucosefunktionalisierten MSN in MC3T3-E1 Zellen

Ob und inwiefern eine entsprechende Oberflächenmodifikation und die dadurch veränderte Wechselwirkung mit umgebenden RADA16-I Peptidmolekülen einen Einfluss auf die Zellaufnahme darstellt, soll im Folgenden untersucht werden. Hierfür wurden, wie zuvor bei der Detektion der entsprechenden Ausgangspartikel in Kapitel IV.2.2.4 beschrieben, Untersuchungen mit einer hybriden 3D-Zellkultur und eingebrachten MC3T3-E1 Zellen durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse zu gewährleisten, wurden auch an dieser Stelle die unterschiedlich stark farbstoffmarkierten MSN mit einem entsprechenden Faktor bewertet (S200-NH₂ : S200-NH₂-Glu-0,01 : S200-NH₂-Glu-0,1 : S200-NH₂-Glu-0,28 : S200-COOH-Glu-0,01 : S200-COOH-Glu-0,1 : S200-COOH-Glu-0,28 - 1 : 0,81 : 1,02 : 1,23 : 1,75 : 1,71 : 2,06)

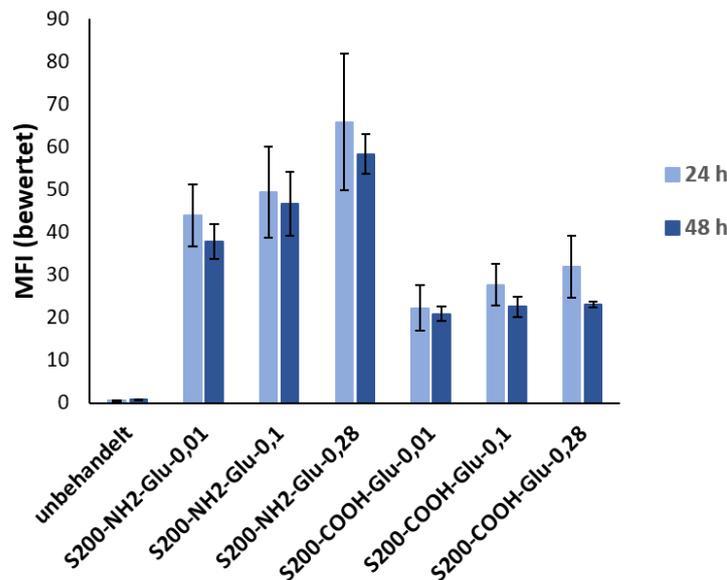


Abbildung 56: Zelluläre Aufnahme von glucosefunktionalisierten MSN in MC3T3-E1 Zellen innerhalb einer 3D-Zellkultur. Dargestellt sind glucosefunktionalisierte MSN ausgehend von sowohl S200-NH₂ als auch S200-COOH Partikeln mit aufsteigender Menge an verwendeter Glucuronsäure- bzw. Glucosaminkonzentration (0,01 = 10 µmol/g, 0,1 = 100 µmol/g und 0,28 = 280 µmol/g).

Betrachtet man die mittels FACS-Messungen erhaltenen zellulären Aufnahmen, kann ein deutlicher Zusammenhang zwischen zunehmender Glucosefunktionalisierung und steigender zellulärer Aufnahme festgestellt werden (Abbildung 56). Nahezu unabhängig zu den jeweiligen Ausgangspartikeln kann dabei eine vergleichbare, deutliche Steigerung der zellulären Aufnahme von ca. 50% (für S200-NH₂-0,28) bzw. ca. 40% (für S200-COOH-0,28) für hohe Glucosekonzentrationen gegenüber Partikeln mit der geringsten Glucosekonzentration detektiert werden.

Eine erhöhte zelluläre Partikelaufnahme von S200-NH₂-Glu lässt sich daher durch ein Zusammenspiel aus einer verstärkten Partikel – Peptidwechselwirkung und der Anwesenheit von Glucosefunktionalitäten auf der Oberfläche der Partikel erklären.

Für die Glucosefunktionalisierung von S200-COOH-Glu Partikeln konnte hingegen, wie zuvor in Abbildung 54 dargestellt, eine intendierte schwächere Adsorption des RADA16-I Peptids gegenüber reinen S200-COOH beobachtet werden. Folglich weisen diese Partikel, gegenüber den zugrundeliegenden S200-COOH Partikeln, ein vergleichbares Zeta-Potential auf, wodurch eine schwächere Aufnahme durch MC3T3-E1 Zellen erwartet werden konnte. Ungeachtet dessen lässt sich für diese Partikel jedoch ebenfalls eine erhöhte Aufnahme durch MC3T3-E1 beobachten. Ein Grund für diese erhöhte

Partikelaufnahme kann wiederum in der Anbindung von Glucosemolekülen gesehen werden. Durch eine verringerte Menge an adsorbierten RADA16-I Molekülen kann es zu einer verbesserten Zugänglichkeit der angebondenen Glucosemoleküle kommen, wodurch ein erleichterter Kontakt zwischen Zellmembran und Glucosefunktionalitäten erzielt werden kann. Die Folge ist eine erhöhte Aufnahme mit steigender Glucosekonzentration in MC3T3-E1 Zellen. Bereits von M. Beck konnte in ihrer Dissertation gezeigt werden, dass durch eine entsprechende Funktionalisierung mit Glucosederivaten eine erhöhte Zellaufnahme in der 2D-Zellkultur erzielt werden kann.^[72] Ein vergleichbares Verhalten scheint an dieser Stelle somit auch in einer 3D-Zellkultur vorzuliegen.

Im vorliegenden System kann also ein synergetischer Effekt zwischen verringerter RADA16-I Adsorption und daraus bedingter leichter Detektierbarkeit der Glucosemoleküle durch Zellen beobachtet werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es möglich war, hybride Hydrogele mit eingebrachten glucosefunktionalisierten MSN herzustellen. Nach der Injektion in Zellkulturmedium wiesen die Partikel eine homogene Verteilung innerhalb des Peptidnetzwerks auf. Im Vergleich zu NH_2 - oder COOH -funktionalisierten Ausgangspartikeln konnte durch Anbindung unterschiedlicher Konzentrationen an Glucosederivaten die Wechselwirkung zwischen Partikeln und umgebendem Peptid verändert werden. Speziell für S200-COOH Partikel, welche zuvor eine starke Adsorption aufwiesen, konnte eine deutliche Reduktion dieser Peptidadsorption erzielt werden. Eine ursprünglich angestrebte geringere zelluläre Aufnahme oder gar eine Retention konnte jedoch auch durch eine entsprechende Funktionalisierung mit Glucosederivaten nicht erreicht werden. Vielmehr kam es, bedingt durch eine erhöhte Zugänglichkeit der angebondenen Glucosemoleküle, zu einer erhöhten zellulären Aufnahme.

Um das Ziel einer verzögerten Aufnahme zu erreichen, müssen also weitere Anpassungen an das Partikelsystem durchgeführt werden.

2.3.2 Hyaluronsäure-Funktionalisierung von S200 Partikeln

Eine weitere Möglichkeit, die zelluläre Aufnahme innerhalb eines hybriden Hydrogelnetzwerks zu beeinflussen, ist die Funktionalisierung von MSN mit sehr großen Polysaccharidmolekülen. Ein möglicher Vertreter dieser Klasse ist Hyaluronsäure (HS).

In Kapitel III.2.1.3 konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden, dass bei einer Oberflächenmodifikation mit einer zunehmenden Menge an HS ein Funktionalisierungsmaximum erreicht wurde. Auf diese Weise konnte eine maximale Reduktion des Zeta-Potentials auf -12 mV erzielt werden. Bei geringen bis mittleren Konzentrationen konnten hingegen nach außen hin nahezu neutral geladene Partikel erhalten werden. Bei dem Einsatz höherer Konzentrationen an HS kann es zudem leichter zu einer überbrückenden Anbindung von HS-Molekülen auf die Oberfläche mehrerer Partikel kommen, wodurch eine Agglomeration dieser Partikel wahrscheinlicher wird. Aus diesen Gründen wurden für nachfolgende Untersuchungen in 3D-Hydrogelen lediglich Partikel mit geringeren angebondenen HS-Mengen untersucht (S200-HS-5 und S200-HS-10).

2.4.2.1 Strukturuntersuchung hybrider Hydrogele

Wie bereits zuvor für die zugrundeliegenden Ausgangspartikel S200-NH₂ beschrieben (Kapitel IV.2.2.1.2), konnten, bei der Untersuchung von HS modifizierten Partikeln, lediglich einzelne Partikel auf der Oberfläche der gebildeten Hydrogelnetzwerke beobachtet werden (Abbildung 57 a und d).

Bei der Verwendung sehr großer Partikelkonzentrationen (10 mg/mL) zur Herstellung hybrider Hydrogele konnte hingegen speziell für S200-HS-10 Partikel eine Agglomeration von Partikeln im Inneren des Hydrogelnetzwerks visualisiert werden (Abbildung 57 f).

Wie zuvor beschrieben, kann es bei der Funktionalisierung von MSN mit HS zu einer überbrückenden Anbindung von HS-Molekülen auf der Oberfläche mehrerer Partikel kommen.

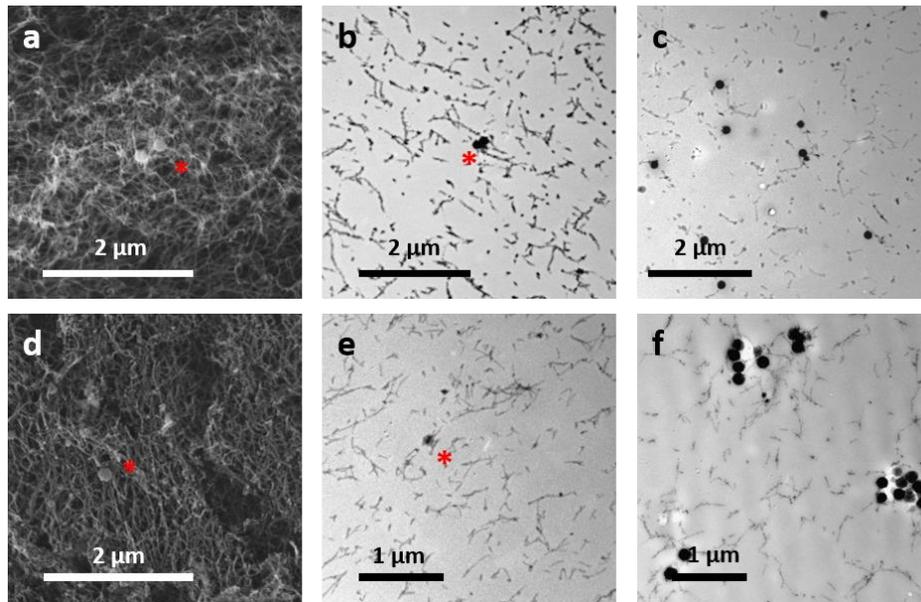


Abbildung 57: Darstellung der Verteilung von Partikeln auf der Oberfläche (REM, a und d) und im Inneren (TEM-Querschnitte b, c, e und f) von hybriden Hydrogelnetzwerken mit einer RADA16-I Konzentration von 0,25 Gew%. Dargestellt sind die Verteilungen für S200-HS-5 (a, b und c) sowie für S200-HS-10 (d, e, f) Partikel. Die verwendeten Partikelkonzentrationen betragen für REM-Messungen 0,5 mg/mL. Für TEM-Querschnittsuntersuchungen wurden die Partikelverteilungen für geringe (0,5 mg/mL – b und e) sowie für hohe (10 mg/mL – c und f) Partikelkonzentrationen untersucht. Die in der Partikelbezeichnung enthaltenen Suffixe 5 und 10 geben die für die Funktionalisierung eingesetzte Menge an HS in Gew% an.

Dieser Effekt konnte in den zuvor dargestellten TEM-Messungen für die Bestimmung der Partikelmorphologie sowie -größe (Abbildung 17) zwar nicht beobachtet werden, möglicherweise tritt dieser Effekt jedoch trotz allem bereits bei einer Konzentration von 10 Gew% HS (S200-HS-10) auf, wodurch die beobachteten Agglomerate innerhalb eines RADA16-I Netzwerks erklärt werden könnten.

2.3.2.2 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und eingebrachten MSN

Zur Bestimmung der Adsorption von RADA16-I Molekülen auf der Oberfläche von Partikeln wurde eine Inkubation von Partikeln mit Peptid im ungeliierten Zustand durchgeführt. Die Menge an im Überstand verbleibendem Peptid wurde hierbei ebenfalls mittels *Fluorescamin-Assays* bestimmt. Dabei lässt sich in Abbildung 58 a eine zu den Ausgangspartikeln S200-NH₂ vergleichbare, geringe Adsorption von RADA16-I Molekülen auf der Oberfläche von HS modifizierten Partikeln erkennen.

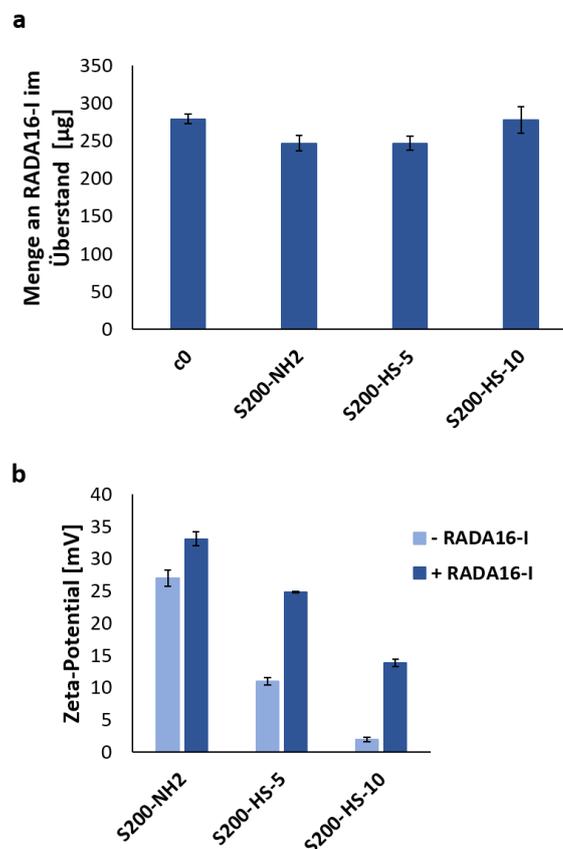


Abbildung 58: Bestimmung der Peptidadsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) auf die Partikeloberfläche von S200-NH₂, S200-HS-5 und S200-HS-10 Partikeln. Die während der Inkubation verwendete Partikelkonzentration innerhalb der hybriden Hydrogellösung betrug 10 mg/mL. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. Die Suffixe 5 und 10 in der Partikelbezeichnung geben die für die Funktionalisierung eingesetzte Menge an HS in Gew% an.

Trotz einer deutlichen Reduktion des Zeta-Potentials und der Anwesenheit einer Vielzahl von OH-Gruppen auf der Oberfläche der HS-modifizierten Partikel, kann keine verstärkte

Adsorption von RADA16-I, wie sie bei COOH-funktionalisierten Partikeln zu beobachten war, detektiert werden. Neben der elektrostatischen Anziehung, auf Grund einer Reduktion des Zeta-Potentials, zwischen negativ geladenen Partikeln und positiv geladenen RADA16-I Monomeren, scheint es an dieser Stelle noch eine weitere Triebkraft für eine unterdrückte Adsorption zu geben.

Betrachtet man die Zeta-Potential-Messungen vor und nach der Adsorption von RADA16-I (Abbildung 58 b), lässt sich, vergleichbar zu den zugrundeliegenden Ausgangspartikeln, ein leicht höheres Zeta-Potential für RADA16-I inkubierte MSN detektieren. Dies lässt sich auch an dieser Stelle teilweise durch eine geringfügige Adsorption von positiv geladenem RADA16-I auf die Oberfläche der HS-modifizierten Partikel erklären. Eine geringfügige Adsorption von RADA16-I auf HS-modifizierten MSN kann zudem auf eine zuvor beschriebene mehrfache Anbindung der HS-Moleküle auf der Partikeloberfläche zurückgeführt werden. Durch eine solche Anbindung kommt es zur Bildung von knäuelartigen Strukturen, welche eine sterische Hinderung für die Adsorption von RADA16-I darstellen. Innerhalb dieser Strukturen können zudem, vergleichbar zu PEG-Funktionalisierungen, größere Mengen an Wasser eingeschlossen werden, wodurch eine weitere abschirmende Wirkung erzielt und somit die Adsorption von RADA16-I zusätzlich unterdrückt werden kann.

2.3.2.3 Aufnahme von hyaluronsäurefunktionalisierten MSN in MC3T3-E1 Zellen

Zur Quantifizierung der zellulären Aufnahme der HS-funktionalisierten MSN in einer hybriden 3D-Hydrogelzellkultur wurden entsprechende FACS-Messungen durchgeführt. Um eine direkte Vergleichbarkeit der aufgenommenen Partikelmengen zu ermöglichen, wurden die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der funktionalisierten Partikel durch entsprechende Faktoren bewertet (Faktoren: S200-HS-5 : S200-HS-10 - 1,13 : 1,00).

Die nach Bewertung mit den jeweiligen Faktoren erhaltenen Mengen an aufgenommenen Partikeln sind in Abbildung 59 dargestellt.

Im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangspartikeln konnte eine starke Zunahme der zellulären Aufnahme durch MC3T3-E1 Zellen detektiert werden. Eine Abhängigkeit in Bezug

auf die verwendeten HS-Mengen konnte hingegen nicht festgestellt werden. Für beide Partikel konnte aber eine Abnahme der zellulären Aufnahme nach 48 h bestimmt werden.

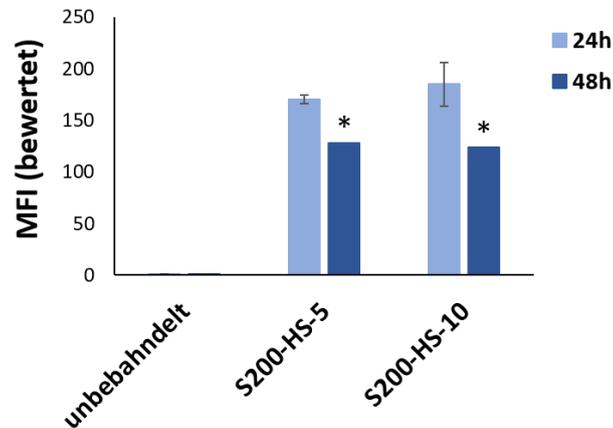


Abbildung 59: Quantifizierung der zellulären Aufnahme von HS-modifizierten MSN in 3D-Zellkultur nach einer Kultivierungsdauer von 24 h bzw. 48 h. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Partikel wurden mittels Bewertungsfaktoren korrigiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (24 h). Für eine Zellaufnahme von HS-modifizierten MSN nach 48 h wurde lediglich eine Einfachbestimmung durchgeführt (markiert mit einem Stern). Die Suffixe 5 und 10 der Partikelbezeichnung geben die für die Funktionalisierung verwendete Menge an HS in Gew% an.

Eine angestrebte Retention mit gleichbleibender bzw. leicht ansteigender Aufnahme von Partikeln nach 48 h konnte somit auch durch Verwendung einer HS-Funktionalisierung nicht erzielt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch Variation der Oberflächenfunktionalisierungen der verwendeten MSN die Interaktion mit den umgebenden Peptidmolekülen teilweise verändert werden konnte. Das Ziel einer verzögerten Aufnahme konnte hingegen auch durch Funktionalisierung mit HS und einer damit einhergehenden Veränderung der Oberflächenladung nicht realisiert werden.

Eine letzte Möglichkeit, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll, zur Anpassung des zellulären Aufnahmeverhaltens in injizierbaren 3D-Hydrogelzellkulturen besteht in einer Veränderung der Form der Partikel.

Auf diesem Weg kann möglicherweise eine entsprechende geometrische Hinderung oder veränderte Interaktion mit dem umgebenden Peptid ausgenutzt werden um eine Verzögerung der zellulären Aufnahme dieser Partikel zu erzielen.

2.4 Variation der zellulären Aufnahme durch Variation der Partikelmorphologie

Die Verwendung von stäbchenförmigen Partikeln stellt eine Möglichkeit der Anpassung der Partikel in Bezug auf ihre Form dar.

Die Charakterisierung dieser Partikel ist in Kapitel III.2.2 zu finden. Die Herstellung erfolgte nach einer abgeänderten Synthese von Huang *et al.*^[150], wobei der Bildungsmechanismus der synthetisierten Partikel bereits in der Dissertation von M. Beck ausführlich beschrieben wurde.^[72]

Die in diesem Kapitel verwendeten stäbchenförmigen Partikel weisen ein Länge-zu-Breite-Verhältnis von ungefähr 1,5:1 sowie 2:1 und 4:1 auf. Durch Erhöhung der Ethylenglykol- (EG)-Menge war es, unter Verwendung der gleichen Synthesemethode, außerdem möglich sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm herzustellen. Stäbchenförmige, zylindrische Partikel werden im Folgenden mit Z1,5; Z2 und Z4 abgekürzt. Die mit derselben Synthesemethode erhaltenen sphärischen Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm werden im Folgenden als Z1 abgekürzt.

Die grundlegende Idee hinter der Verwendung dieser Art von Partikel, im Kontext eines injizierbaren hybriden Hydrogels, beruht auf einer potentiellen Verankerung bzw. einer sterischen Hinderung dieser Partikel innerhalb des Hydrogelnetzwerks, welche mit steigenden Länge-Breite-Verhältnissen zunehmen könnte. Durch die Ausbildung eines entsprechenden mechanischen Widerstands wäre somit eine erschwerte und folglich verzögerte Aufnahme bzw. eine Aufnahme über einen längeren Zeitraum hinweg vorstellbar.

2.4.1 Strukturuntersuchung hybrider Hydrogele

REM-Messungen hybrider Hydrogele mit unterschiedlich langen, NH_2 -funktionalisierten stäbchenförmigen Partikeln zeigten bei Verwendung hoher Partikelkonzentrationen (10 mg/mL) eine homogene Verteilung der eingebrachten Partikel an der betrachteten Oberflächenregion des Netzwerks (Abbildung 60 d, e und f).

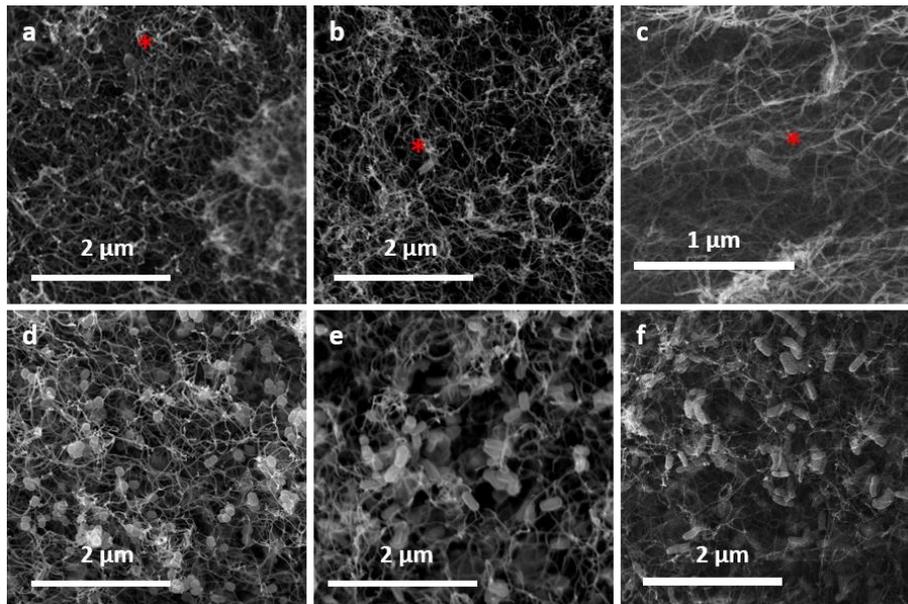


Abbildung 60: REM-Untersuchung der Verteilung stäbchenförmiger Partikel auf der Oberfläche ausgebildeter hybrider Hydrogelnetzwerke. Hierbei wurden NH_2 -funktionalisierte, stäbchenförmige Partikel unterschiedlicher Konzentration (0,5 mg/mL oder 10 mg/mL) und mit unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnissen eingesetzt. A) Z1,5 - 0,5 mg/mL, b) Z2 - 0,5 mg/mL, c) Z4 - 0,5 mg/mL, d) Z1,5 - 10 mg/mL, e) Z2 - 10 mg/mL, f) Z4 - 10 mg/mL.

Da für unterschiedlich funktionalisierte sphärische Partikel keine Unterschiede in Bezug auf die Verteilung an der Oberfläche des hybriden Hydrogelnetzwerks zu beobachten waren, wurde an dieser Stelle lediglich die Verteilung von NH_2 -funktionalisierten Partikeln untersucht.

Es zeigte sich eine, zu den sphärischen Partikeln vergleichbare, homogene Verteilung von NH_2 -funktionalisierten, stäbchenförmigen Partikeln. Die unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnisse der verwendeten Partikel verursachten dabei keine nennenswerten Unterschiede. Da bei der Herstellung hybrider Hydrogele ein mehrmaliger Austausch des umgebenden Zellmediums notwendig war, konnten, wie schon für sphärische Partikel, bei geringen Partikelkonzentrationen von 0,5 mg/mL lediglich einige

vereinzelte Partikel auf der Oberfläche des gebildeten Netzwerks detektiert werden (Abbildung 60 a, b und c).

Die Verteilung im Inneren der gebildeten hybriden Hydrogelnetzwerke wurde mittels TEM-Messungen entsprechender Querschnitte ermittelt.

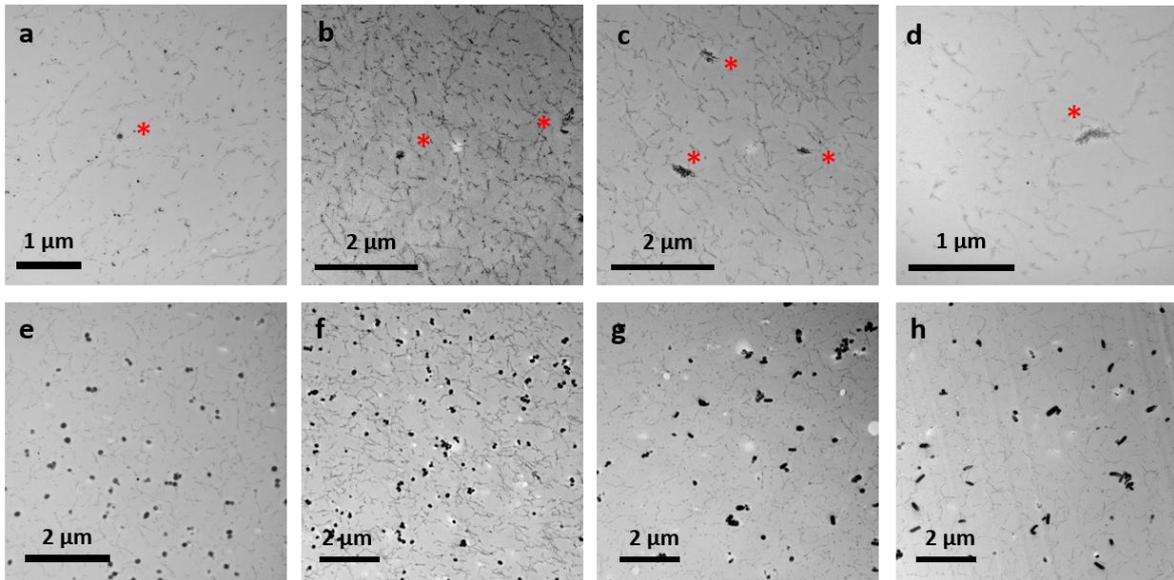


Abbildung 61: TEM-Untersuchung der Verteilung von NH₂-funktionalisierten, stäbchenförmigen Partikeln unterschiedlicher Konzentration (0,5 mg/mL oder 10 mg/mL) und mit unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnissen im Inneren von hybriden Hydrogelnetzwerken. A) Z1 100nm - 0,5 mg/mL, b) Z1,5 - 0,5 mg/mL, c) Z2 - 0,5 mg/mL, d) Z4 - 0,5 mg/mL, e) Z1 100nm - 10 mg/mL, f) Z1,5 - 10 mg/mL, g) Z2 - 10 mg/mL, h) Z4 - 10 mg/mL.

Hierbei zeigte sich für stäbchenförmige NH₂-funktionalisierte Partikel eine gleichmäßige Verteilung, auch in Anwesenheit sehr großer Partikelkonzentrationen von 10 mg/mL (Abbildung 61). Bei der Verwendung negativ geladener COOH-funktionalisierter Partikel konnte hingegen eine vermehrte Agglomeration der Partikel beobachtet werden (Abbildung 102, Anhang). Die vorliegenden kleinen Agglomerate lagen jedoch homogen über das gesamte untersuchte hybride Hydrogelnetzwerk verteilt, wodurch auch für diese Proben eine gleichmäßige Aufnahme von Partikeln in Zellen gegeben sein sollte.

2.4.2 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen RADA16-I und eingebrachten stäbchenförmigen MSN

In der 3D-Zellkultur konnte für sphärische Partikel die Adsorption von RADA16-I Peptidmolekülen auf der Oberfläche von MSN als entscheidendes Kriterium für deren veränderte Aufnahme, gegenüber einer klassischen 2D-Zellkultur, identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen soll daher für stäbchenförmige Partikel zunächst die auf der Partikeloberfläche adsorbierte Menge an RADA16-I bestimmt werden. Hierfür wurden Partikeldispersionen (10 mg/mL) mit einer RADA16-I Peptidlösung inkubiert und nach dem Abtrennen der Partikel die im Überstand verbleibende Peptidmenge mittels *Fluorescamin-Assay* bestimmt (Abbildung 62).

Da sich bei der Untersuchung von NH₂- und COOH-funktionalisierten S200 und S400 MSN (Abbildung 48) keine Effekte bezüglich der verwendeten Peptidkonzentration zeigten, soll an dieser Stelle lediglich die Peptidadsorption für eine höhere RADA16-I Konzentration von 0,25 Gew% untersucht werden.

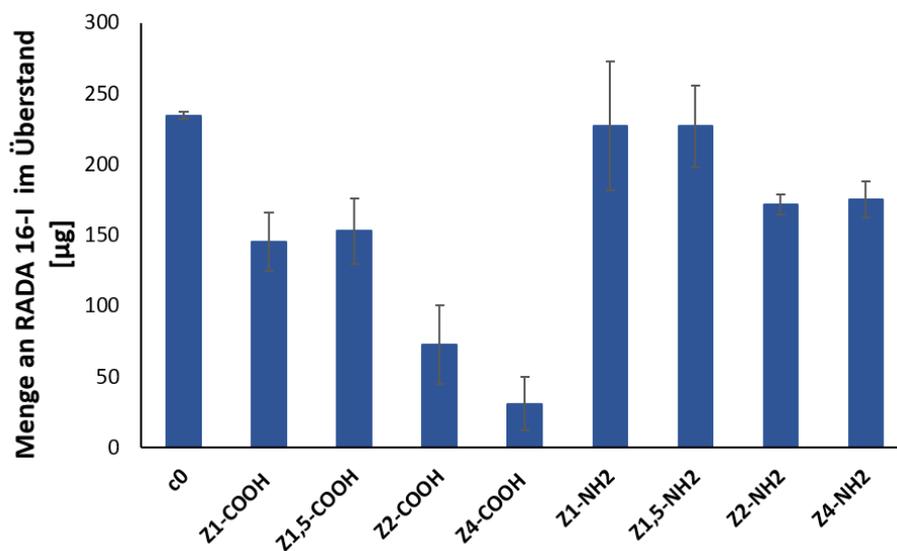


Abbildung 62: RADA16-I Adsorption auf NH₂- und COOH-funktionalisierten Nanopartikeln. Inkubation von 10 mg/mL Partikeln mit einer ungeladenen RADA16-I Peptidlösung (0,25 Gew%) für jeweils 15 min. Nach dem Abtrennen mittels Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der im Überstand verbleibenden Peptidkonzentration mittels *Fluorescamin-Assay*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Für COOH-funktionalisierte, stäbchenförmige Partikel konnte, wie zuvor für sphärische Partikel, eine deutlich geringere Konzentration an RADA16-I Molekülen im Überstand detektiert werden. Dies spricht wiederum für eine starke Wechselwirkung zwischen Peptid und negativ geladener Partikeloberfläche, wodurch es zu einer Adsorption von Peptidmolekülen kommt. Die im Überstand verbleibende Menge an RADA16-I konnte mit steigender Länge der COOH-funktionalisierten, stäbchenförmigen Partikel reduziert werden. Dabei konnte für Partikel mit dem größten Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1 eine maximale Reduktion der ursprünglich eingesetzten Menge an RADA16-I um bis zu 87 % detektiert werden. Im Vergleich konnte für sphärische S200-COOH Partikel eine Abnahme um gerade einmal 50% detektiert werden. Dabei enthielten die eingesetzten Partikelmengen, im Vergleich zu sphärischen Partikeln, eine vergleichbare Anzahl an MSN ($S200 = 2,14 \times 10^{14}$, $Z4 = 2,89 \times 10^{14}$), wodurch eine andere Triebkraft als die reine Partikelanzahl für diese deutlich erhöhte Adsorption von stäbchenförmigen Partikeln verantwortlich sein muss.

Eine Erklärungsmöglichkeit für eine erhöhte Peptidadsorption auf der Oberfläche längerer stäbchenförmiger Partikel, unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung, könnte in der veränderten Geometrie der Porenstruktur gegenüber sphärischen Partikeln liegen. So liegen im Fall der hier untersuchten sphärischen mesoporösen Partikel die Poren radial angeordnet vor,^[71] wohingegen in stäbchenförmigen Partikeln ein paralleles, horizontal zu der Partikeloberfläche orientiertes Wachstum von Poren beobachtet werden kann.^[89] Auf diese Weise kommt es zu einer geringeren Menge an Porenöffnungen auf der Längsseite von stäbchenförmigen Partikeln und somit zu einer erhöhten Anzahl an funktionellen Gruppen auf diesen Flächen. Dieser Effekt nimmt dabei mit steigenden Länge-zu-Breite-Verhältnissen weiter zu, da auf diese Weise größere äußere Oberflächen pro Teilchen generiert werden. Durch eine solche Erhöhung der Anzahl an funktioneller Gruppen ist eine verbesserte Wechselwirkung zwischen Peptid und Partikel möglich, wodurch es zu einer erhöhten Menge an adsorbiertem RADA16-I kommen kann. Die großen Mengen an adsorbiertem RADA16-I lassen zudem auf eine Adsorption in Multi-Lagen schließen. Eine solche mehrlagige Adsorption kann durch eine vergrößerte Längsseite und einer damit einhergehenden verringerten Krümmung der langen, stäbchenförmigen Partikel begünstigt werden. Durch einen solchen sterischen Effekt kann

es folglich zu einer verbesserten Peptid-Peptid-Wechselwirkung auf der Partikeloberfläche kommen, was eine weitere Triebkraft für eine erhöhte Peptidadsorption sein könnte.

Eine verbesserte Peptid-Peptid-Wechselwirkung auf stäbchenförmigen Partikeln würde die zuvor beobachtete Gelierung von hybriden Hydrogelformulierungen mit hohen Konzentrationen (5 und 10 mg/mL) an Z4-COOH Partikeln erklären. Als Folge dieser Agglomeration von Peptidmolekülen auf der Partikeloberfläche kann es zu einer lokal induzierten Ausbildung des Peptidnetzwerks kommen. Dabei können eingebaute stäbchenförmige Partikel als Vernetzungspunkte für die Ausbildung des restlichen Peptidnetzwerks dienen, wodurch trotz einer starken Peptidadsorption auf der Partikeloberfläche ein stabiles Peptidnetzwerk, mit Hilfe der partikulären Vernetzungspunkte, ausgebildet werden kann.

Um eine aggregationsbedingte Separation des RADA16-I Peptids während der Inkubation mit Partikeln auszuschließen und eine Adsorption auf der Partikeloberfläche nachzuweisen, wurden nach der Durchführung der Adsorptionsversuche die eingesetzten Partikel abgetrennt und das Zeta-Potential der erhaltenen Partikel bestimmt. Wie zuvor bereits in Kapitel IV.2.2.5 beschrieben, wurden die Partikel vor der Vermessung der Zeta-Potentiale mit MilliQ Wasser gewaschen um überschüssiges Peptid zu entfernen und eine lokale Netzwerkbildung zu unterbinden

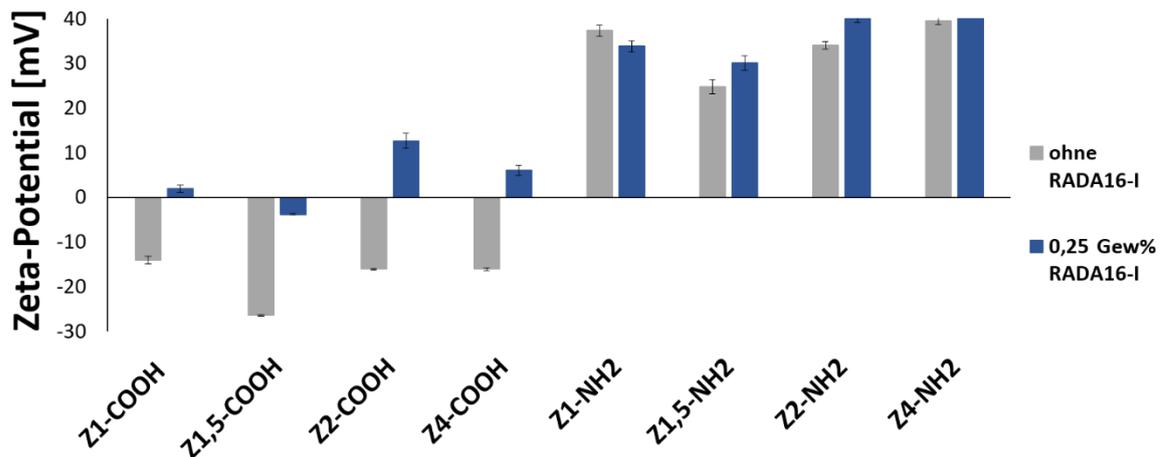


Abbildung 63: Bestimmung der Zeta-Potentiale vor und nach der Inkubation von stäbchenförmigen MSN mit einer 0,25 Gew% RADA16-I Peptidlösung. Für die Bestimmung des Zeta-Potentials wurden die Partikel nach dem Abtrennen von der Peptidlösung mit MilliQ Wasser gewaschen, um lose gebundene Peptide zu entfernen. Die Messung des Zeta-Potentials erfolgte bei einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL in 1 mM KCl-Lösung (aq). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Dabei konnte für alle stäbchenförmigen Partikel ein gegenüber sphärischen Partikeln vergleichbares Verhalten beobachtet werden. Unabhängig der Stäbchenlänge konnte für COOH-funktionalisierte MSN ein Anstieg des Zeta-Potentials, bedingt durch eine starke Adsorption des positiv geladenen RADA16-I Peptids, ermittelt werden. Für NH₂-funktionalisierte stäbchenförmige MSN konnte ebenfalls eine zu sphärischen Partikeln vergleichbare Änderung des Zeta-Potentials beobachtet werden. Da die Oberfläche von aminofunktionalisierten Partikeln bereits vor der Inkubation mit RADA16-I stark positiv geladen vorlag, konnte an dieser Stelle, in Folge einer Inkubation mit RADA16-I, lediglich ein geringer Anstieg des Zeta-Potentials beobachtet werden. Somit ist die zuvor mittels *Fluorescamin-Assay* detektierte, verstärkte Adsorption von RADA16-I auf längeren NH₂-funktionalisierten, stäbchenförmigen MSN durch entsprechende Zeta-Potential Messungen dieser Partikel nur schwer zu erkennen.

2.4.3 Aufnahme von stäbchenförmigen Partikeln in MC3T3-E1 Zellen

Die von MC3T3-E1 Zellen in einer hybriden Hydrogelzellkultur, unter Verwendung stäbchenförmiger Partikel, aufgenommenen Partikelmengen sind in Abbildung 64 dargestellt.

Auch die hier verwendeten stäbchenförmigen MSN weisen nach einer Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO647N) unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten auf. Um einen direkten Vergleich zwischen diesen Partikeln zu ermöglichen, wurden daher entsprechende Bewertungsfaktoren herangezogen (Z1-NH₂ : Z1,5-NH₂ : Z2-NH₂ : Z4-NH₂ : Z1-COOH : Z1,5-COOH : Z2-COOH : Z4-COOH - 1 : 1,3 : 1,5 : 1,5 : 1,6 : 1,1 : 1,8 : 1,5).

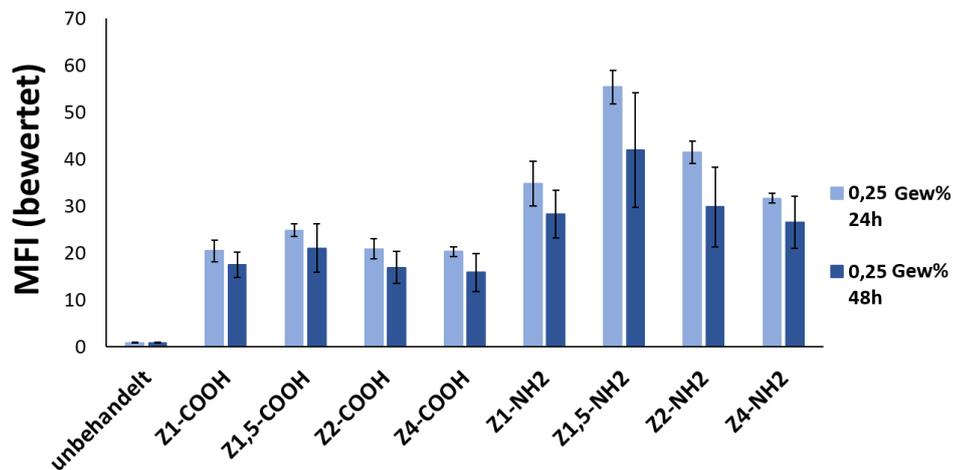


Abbildung 64: Darstellung der mittels FACS bestimmten Menge an MSN, welche in einer 3D-Zellkultur (Peptidkonzentration: 0,25 Gew%) von MC3T3-E1 Zellen nach 24 h bzw. 48 h aufgenommen wurden. Die verwendeten Partikel wiesen dabei unterschiedliche Länge-Breite-Verhältnisse (Z1 - Z4) sowie unterschiedliche Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ und -COOH) auf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Unabhängig des gewählten Länge-Breite-Verhältnisses lässt sich in einer 3D-Zellkultur für COOH-funktionalisierte MSN, gegenüber NH₂-funktionalisierten Partikeln, eine verringerte Aufnahme in MC3T3-E1 Zellen detektieren. Somit zeigen die stäbchenförmigen Partikel bezüglich der Oberflächenfunktionalisierung ein zu den sphärischen Teilchen vergleichbares Aufnahmeverhalten (Abbildung 64).

Für alle stäbchenförmigen Partikel, im Vergleich zu zuvor untersuchten sphärischen Partikeln, kann jedoch eine deutlich erhöhte zelluläre Aufnahme detektiert werden. Die

jeweiligen „bewerteten MFIs“ können hierfür qualitativ direkt mit den in Kapitel IV.2.2.4 erhaltenen Zellaufnahmen für sphärische Partikel verglichen werden, da die erhaltenen Bewertungsfaktoren zwischen Z1-NH₂ Partikeln und S200-NH₂ Partikeln ein Verhältnis von 1 : 1,1 aufweisen.

Das Verhalten einer verbesserten Aufnahme von stäbchenförmigen Partikeln konnte zuvor bereits für eine Zellaufnahme in einer klassischen 2D-Zellkultur von mehreren Gruppen nachgewiesen werden.^{[162],[163],[164]}

Besonders hervorzuheben sind an dieser Stelle Partikel mit einem mittleren Länge-zu-Breite-Verhältnis (Z1,5 und Z2). Unabhängig von der gewählten Oberflächenfunktionalisierung weisen diese Partikel in einer 3D-Zellkultur die höchste Aufnahme in MC3T3-E1 Zellen auf. Ein vergleichbares Ergebnis, in einer klassischen 2D-Zellkultur, wurde bereits von Meng *et al.*^[162] beschrieben. Für die Aufnahme von unterschiedlich langen Stäbchen in HeLa und A549 Zellen konnte dabei eine deutlich erhöhte Zellaufnahme für stäbchenförmige Partikel mit einem vergleichbaren, mittleren Länge-zu-Breite-Verhältnis beobachtet werden. Eine entsprechend erhöhte Zellaufnahme dieser Partikel konnte auf eine spezifische Aktivierung spezieller kleiner G-Proteine, wie beispielsweise Rac1, zurückgeführt werden. Eine vergleichbare Aktivierung dieser kleinen G-Proteine ist an dieser Stelle, unabhängig von der veränderten Zellkultur (3D), ebenfalls denkbar, wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Vergleicht man die von MC3T3-E1 Zellen in einer 3D-Zellkultur aufgenommenen Partikelmengen nach 24 h und 48 h, lässt sich, auch für stäbchenförmige Partikel, keine gesteigerte Aufnahme nach einer Inkubationsdauer von 48 h feststellen. Eine angedachte zunehmende geometrische Hinderung von stäbchenförmigen Partikeln mit zunehmenden Länge-Breite-Verhältnissen in einem Peptidnetzwerk konnte dadurch nicht belegt werden. Somit konnte zwar eine Steigerung der Aufnahme durch Variation der Partikellänge erreicht werden, eine angestrebte schrittweise Aufnahme sowie Aufnahme über einen längeren Zeitraum konnte hingegen auch durch Verwendung dieser Partikel nicht erzielt werden.

Bei der Synthese von stäbchenförmigen Partikeln war es durch Variation der zugefügten EG-Menge außerdem möglich, sphärische ca. 100 nm große Partikel zu synthetisieren. An

dieser Stelle soll daher die zelluläre Aufnahme dieser Partikel mit zuvor untersuchten sphärischen S200 und S400 (Kapitel IV.2.2.4) verglichen werden.

Um einen Einfluss des Zeta-Potentials auf die aufgenommene Partikelmenge auszuschließen, wurden die Zeta-Potentiale nach der Adsorption von RADA16-I auf der Partikeloberfläche bestimmt. Auf diese Weise sollten die real vorliegenden Zeta-Potentiale der jeweiligen Partikel in der 3D-Zellkultur simuliert werden.

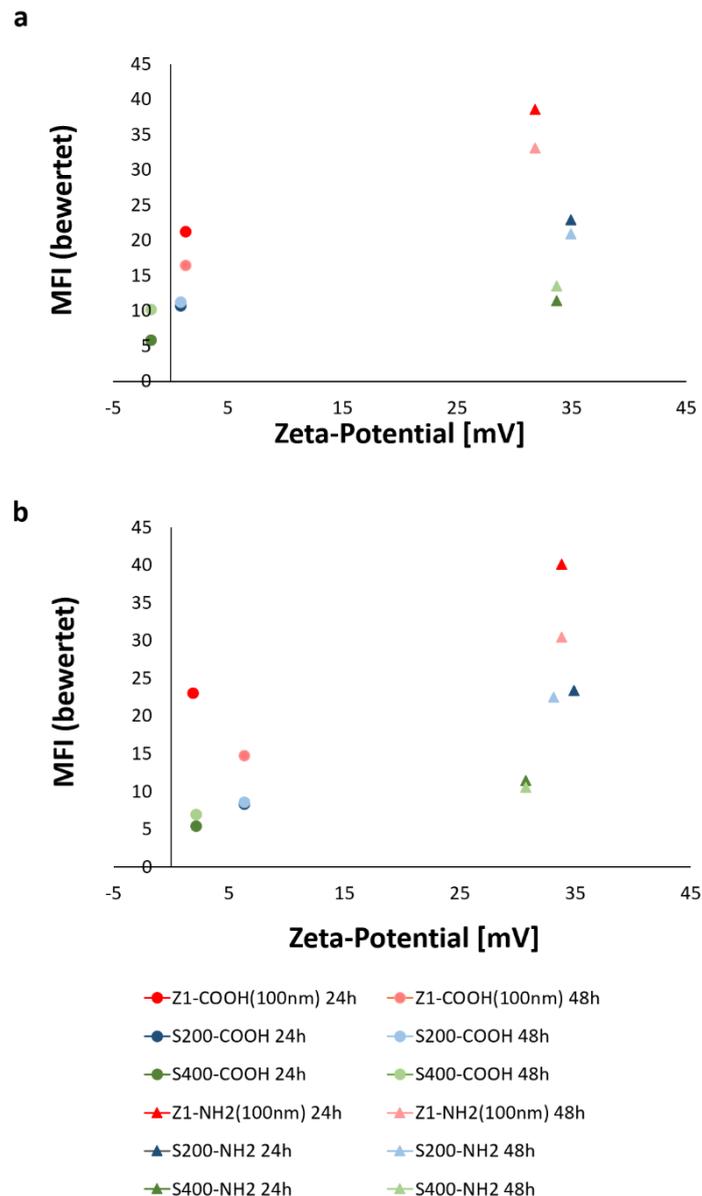


Abbildung 65: Vergleich der zellulären Aufnahme sphärischer Partikel mit unterschiedlichen Partikeldurchmessern (100, 200, 400 nm) und Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ und -COOH) in Abhängigkeit des Zeta-Potentials, welches in Folge der Adsorption von RADA16-I (0,25 Gew%) bestimmt wurde (1 mM KCl-Lösung (aq.)). Die jeweiligen aufgenommenen Partikelmengen wurden mit den Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden Partikel bewertet, wodurch unterschiedliche Markierungseffizienzen der Partikel ausgeglichen wurden.

Es lässt sich erkennen, dass für sämtliche COOH-funktionalisierte Partikel bzw. für die jeweiligen NH₂-funktionalisierten Partikel, vergleichbare Zeta-Potentiale, unabhängig von der Partikelgröße, erhalten wurden. Des Weiteren wurden die unterschiedlichen Markierungseffizienzen der einzelnen Partikel durch entsprechende Korrekturfaktoren berücksichtigt (Z1-NH₂ : S200-NH₂ : S400-NH₂ : Z1-COOH : S200-COOH : S400-COOH = 1 : 1,1 : 1,4 : 1,6 : 3,8 : 3,4). Auf Grund dieser Maßnahmen ist es möglich, einen qualitativen, direkten Vergleich der zellulären Aufnahme dieser Partikel vorzunehmen. Dabei kann für das Aufnahmeverhalten sphärischer MSN unterschiedlicher Größe ein klarer Zusammenhang zwischen aufgenommener Partikelmenge und Größe der verwendeten Teilchen festgestellt werden. Wie in Abbildung 65 dargestellt, nimmt die zelluläre Aufnahme sowohl für NH₂- als auch für COOH-funktionalisierte Partikel mit abnehmender Partikelgröße zu. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese erhöhte zelluläre Aufnahme, speziell sehr kleiner Partikel, ist in dem umgebenden Peptidnetzwerk zu finden. Das verwendete RADA16-I Peptid bildet, wie zuvor beschrieben, unter physiologischen Bedingungen ein Netzwerk mit definierter Maschenweite aus. Die Beweglichkeit von Z1 Partikel, welche den geringsten Partikeldurchmesser der untersuchten sphärischen Partikel aufwies, ist demnach innerhalb des Peptidnetzwerks am größten, wodurch eingebrachte MC3T3-E1 Zellen diese Partikel vermehrt aufnehmen können.

2.5 Zusammenfassung

Insgesamt kann somit konstatiert werden, dass es möglich war unterschiedliche injizierbare hybride Hydrogele auf Basis eines selbstassemblierenden Peptids (RADA16-I) in Kombination mit unterschiedlichen MSN herzustellen. Dadurch konnte eine für die Geweberekonstruktion angestrebte lokale Applikation dieses hydrogelbasierten Systems realisiert werden. In einer dreidimensionalen-hybriden Hydrogel-Zellkultur konnte jedoch, trotz der gezeigten veränderten Adsorption von Peptiden auf die Partikeloberfläche, eine Reduktion der zellulären Aufnahme nicht erzielt werden. Da für keinen der untersuchten stäbchenförmigen Partikel eine Retention oder erhöhte Aufnahme nach längerer Kultivierungsdauer beobachtet werden konnte, scheint eine sterische Verankerung dieser Partikel innerhalb des Hydrogelnetzwerks für die zelluläre Aufnahme dieser Partikel keine Rolle zu spielen.

Auf Grund dessen soll im Anschluss ein weiteres System, basierend auf einer 3D-druckbaren hybriden Hyaluronsäureformulierung mit eingebrachten MSN, untersucht werden. Möglicherweise kann, durch eine veränderte Zusammensetzung der Hydrogelformulierung und eine veränderte Interaktion der Einzelkomponenten eine deutlich verzögerte oder gestaffelte Aufnahme unterschiedlicher Partikel erzielt werden.

V 3D-Druck für die Gewebekonstruktion

1. Theorie

Für lange Zeit basierte die Herstellung von dreidimensionalen Werkstücken vor allem auf der Verwendung konventioneller Fertigungsverfahren wie beispielsweise Spritzguss, Metallguss, Ätztechnik oder Dreheln.^{[165],[166]} In den letzten Jahrzehnten rückte jedoch eine neue Fertigungstechnik, die so genannte „additive Fertigung“ (AF), immer weiter in den Fokus der Forschung.

Die additive Fertigung, oftmals auch als 3D-Druck bezeichnet, beschreibt allgemein ein Verfahren, bei dem durch Schicht-für-Schicht-Abscheidung eines Materials ein neues hierarchisch-strukturiertes Werkstück gebildet wird.^[167] Diese Technik weist dabei eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber konventionellen Fertigungstechniken auf. So ist durch Anwendung eines 3D-Druckverfahrens der Materialverlust stark reduzierbar, außerdem können unterschiedlichste Materialien, von Metallen bis hin zu Polymeren, verarbeitet und *in situ* kombiniert werden. Auf diese Weise lassen sich mittels AF neuartige Kompositmaterialien mit komplexen Strukturen erzeugen.^[166] Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass die mittels AF hergestellten Materialien in unterschiedlichen Industriebereichen (Automobilindustrie, Raumfahrt, Medizin, Textilindustrie, etc.) Anwendung finden und bereits große Fortschritte erzielt werden konnten.^{[166],[167]} Ein Beispiel hierfür ist die erste 3D-gedruckte und von der FDA zugelassene Tablette Spritam[®] aus dem Jahr 2015.^[168]

Speziell im Bereich der Medizintechnik findet der 3D-Druck großen Anklang, da durch Kombination unterschiedlicher druckbarer Formulierungen komplexe Gewebestrukturen nachgeahmt werden können.^[169] Auf Grund der zuvor in Kapitel IV.1.2 dargestellten Eigenschaften von Hydrogelen können diese ebenfalls vermehrt im Bereich des 3D-Drucks zum Einsatz kommen.^{[170],[171],[172]} Ein immenser präparativer Vorteil für den Einsatz der 3D-Druck-Technik bei der Verarbeitung von Hydrogelen ist die Tatsache, dass diese Hydrogelformulierungen unter „zell-freundlichen“ Bedingungen verarbeitet werden können. Zu diesen Bedingungen zählen neben der Verwendung von nicht toxischen

Initiatormolekülen für die Verknüpfung der Hydrogelstränge auch eine Verarbeitung bei moderaten Temperaturen und die Verwendung von Formulierungen ohne organische Lösemittel.^[171] Bei der eigentlichen Verdrückung von Hydrogelformulierungen müssen derzeit eine Vielzahl an Schlüsseleigenschaften berücksichtigt werden (Abbildung 66). Nur wenn ein ausgewogenes Zusammenspiel dieser Eigenschaften erzielt wird, ist es möglich ein optimales Ergebnis für den Druckprozess zu erreichen.

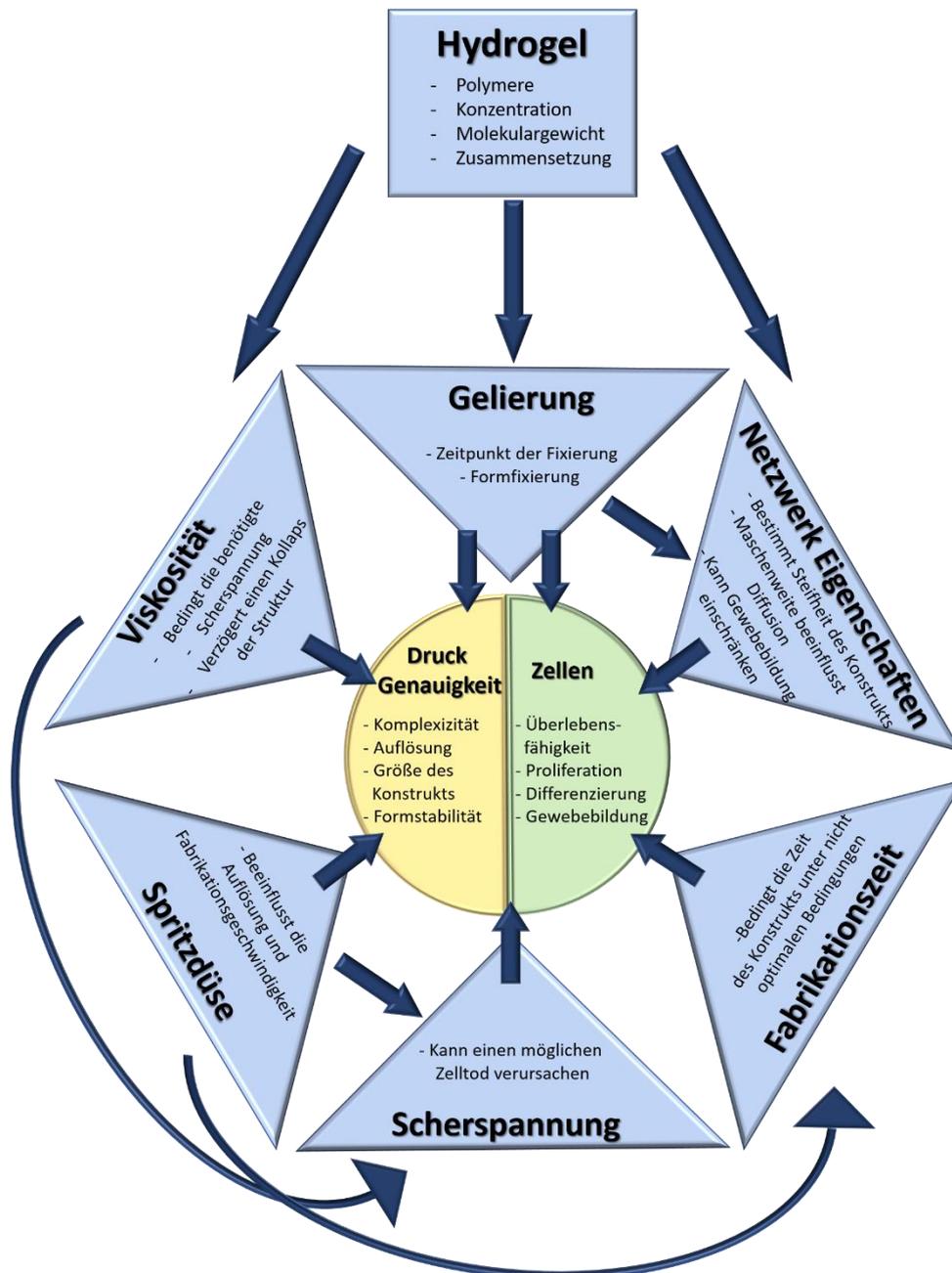


Abbildung 66: Schematische Darstellung der Schlüsseleigenschaften von Hydrogelformulierungen für den 3D-Druck. Nach „25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication“, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5011–5028.^[171]

Zu den hierbei zu beachtenden Einflussfaktoren zählen neben hydrogelspezifischen Kenngrößen, wie das Molekulargewicht und die Konzentration des verwendeten Polymers, auch verarbeitungsspezifische Faktoren wie die Größe der Spritzdüse zur Einstellung der Breite von gedruckten Hydrogelsträngen oder die Fabrikationszeit, in der eingebrachte Zellen unter nicht optimalen Bedingungen vorliegen. Darüber hinaus haben auch Eigenschaften wie beispielsweise die Viskosität einer gewählten Formulierung oder der Gelierungszeitpunkt einen entscheidenden Einfluss auf das Gelingen eines präzisen Druckprozesses von definierten Strukturen.

Durch die Kombination aus Biofabrikation und Nanotechnologie ist zudem der Druck neuartiger, hybrider Konstrukte möglich. Die Verbindung einer definierten Struktur von dreidimensionalen, gedruckten Konstrukten und den darin eingebrachten Wirkstoffträgern (z.B. mesoporöse Silikananopartikel (MSN)), welche für eine kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen innerhalb von Zellen eingesetzt werden können, bietet neue Möglichkeiten im Hinblick auf die Rekonstruktion von Gewebematerialien. So lassen sich, durch eine direkte Kontrolle der Druckgeometrie und -hierarchie, auf diese Weise sowohl geometrisch anspruchsvolle Fragestellungen bedienen, als auch eventuelle Nebenwirkungen von benötigten Wirkstoffen durch Verkapselung in eingebrachten Trägermaterialien reduzieren. Des Weiteren kann auf diese Weise durch einen lokal und zeitlich kontrollierten Transport dieser Wirkstoffe das Wachstum von eingebrachten Zellen kontrolliert werden.

In dem folgenden Kapitel soll ein MSN-haltiges gedrucktes hybrides Hydrogelsystem untersucht werden. Das Ziel hierbei ist die Herstellung eines 3D-gedruckten Konstrukts mit einer homogenen Verteilung von eingebrachten Wirkstoffträgern und einer variierbaren Freisetzung dieser Partikel.

Dabei kann bei einer späteren Verwendung wirkstoffbeladener MSN innerhalb des gedruckten Konstrukts möglicherweise eine kontrollierte Differenzierung zu einem bestimmten Gewebetyp erzielt werden.

2. Ergebnisse und Diskussion – 3D gedruckte hybride Hydrogele

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll (Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut am Universitätsklinikum Würzburg) erzielt und teilweise in der Publikation „*Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds*“^[173] veröffentlicht.

Die Durchführung rheologischer Untersuchungen sowie der Druckprozess wurden von Tomasz Jüngst vorgenommen, die Herstellung der funktionalisierten Polyglycidole erfolgte durch Simone Stichler und die Synthese von Goldnanopartikeln und deren Funktionalisierung durch Susanne Feineis.

2.1 Aufbau eines druckbaren Systems

Das in dieser Arbeit verwendete druckbare hybride Hydrogelsystem besteht aus vier Hauptkomponenten:

- I) Polyglycidole mit zwei unterschiedlichen Funktionalisierungen
- II) Fotoinitiator (Irgacure 2959)
- III) Hyaluronsäure
- IV) Mesoporöse Silikananopartikel oder Goldnanopartikel

Als Netzwerkbildner wurden zwei unterschiedlich funktionalisierte Polyglycidole, welche entweder eine Thiol- oder eine Alken-Funktionalität tragen, verwendet. Durch Zugabe eines geeigneten Fotoinitiators (Irgacure 2959) und anschließender Bestrahlung mit UV-Licht konnte mittels einer Thiol-en-Klickreaktion zwischen den unterschiedlich funktionalisierten Polyglycidolen ein 3D-Polymernetzwerk aufgebaut werden. Die Synthese und Charakterisierung der Polyglycidole wurde durch den Projektpartner, in Person von Simone Stichler, durchgeführt.^{[173],[174]}

Um eine druckbare hybride Hydrogelformulierung zu erzeugen, wurde zu den beiden Polyglycidolen in unverknüpftem Zustand Hyaluronsäure (HS, Länge: 1,36 MDa) zugefügt. Dadurch wurde die Viskosität des Systems erhöht, sodass die erhaltene Formulierung in einem 3D-Druckverfahren verarbeitet werden konnte. Bei der zu verwendenden Menge an HS wurde sich an einer zuvor veröffentlichten Arbeit von Stichler und Jüngst orientiert.^[174] In dieser Veröffentlichung wurde ein diesem Projekt zu Grunde liegendes System, welches auf der selben Kombination aus funktionalisierten Polyglycidolen und HS aufgebaut war, erstmals besprochen.

Die vierte Komponente zur Herstellung eines druckbaren, hybriden Hydrogels stellen mesoporeöse Silikananopartikel dar. Diese wurden auf Grund ihrer Eignung als potentielle Wirkstoffträger in späteren Anwendungen ausgewählt. Dabei wurden Partikel mit einem Durchmesser von ca. 400 nm verwendet, welche entweder NH₂- oder COOH-Funktionalitäten trugen (S400-NH₂ bzw. S400-COOH). Vor einer Vermischung der Partikel mit HS und Polyglycidolen wurden die jeweiligen Partikel in einem definierten Volumen an Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) dispergiert, um so eine gleichmäßige Verteilung von separierten Partikeln über das gesamte, verarbeitete Hydrogelvolumen zu ermöglichen.

PBS-Puffer wurde als Lösemittel gewählt, da dies bereits zuvor erfolgreich für die Herstellung des druckbaren Systems von Stichler und Jüngst verwendet worden war.^[174] Die entsprechenden unterschiedlich funktionalisierten Partikel wurden gewählt, um, unter den gegebenen Bedingungen im PBS-Puffer, ladungsbedingte Unterschiede der positiv bzw. negativ geladenen Partikel zu untersuchen. Dabei wiesen S400-NH₂ Partikel ein Zeta-Potential von +20 mV und S400-COOH Partikel ein Zeta-Potential von -21 mV in PBS-Puffer auf.

2.2 Rheologische Charakterisierung des hybriden Hydrogelsystems^[173]

Alle gezeigten rheologischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Tomasz Jüngst im Universitätsklinikum Würzburg, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut, erzielt.

Wie bereits in Kapitel IV.2.2.2 gezeigt, stellen rheologische Untersuchungen der (hybriden) Hydrogele eine zentrale Charakterisierungsmethode dieser Stoffklasse dar. Alle rheologischen Untersuchungen wurden hierbei ohne Zugabe des Fotoinitiators (Irgacure 2959) durchgeführt, um eine Quervernetzung des Materials während der Messungen zu unterbinden. Da in diesem Projekt eine druckbare hybride Hydrogelformulierung erzeugt werden soll, mussten zunächst die scherverdünnenden Eigenschaften dieser unterschiedlichen Formulierungen bestimmt werden. Dadurch war es möglich, den Einfluss der Partikel auf das scherverdünnende Verhalten und folglich deren Einfluss auf die Verarbeitbarkeit der Proben während des Druckprozesses zu untersuchen. Abbildung 67 ist zu entnehmen, dass die Zugabe von unterschiedlich funktionalisierten MSN keinen bedeutenden Einfluss auf die ermittelten Scherraten der untersuchten (hybriden) Hydrogele aufweisen.

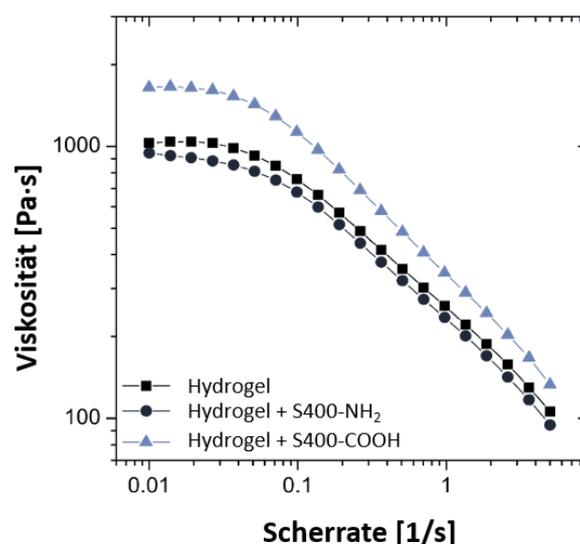


Abbildung 67: Bestimmung des scherverdünnenden Verhaltens druckbarer (hybrider) Hydrogelformulierungen. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Die lediglich geringfügigen Veränderungen der Viskosität können durch geringfügige Abweichungen bei der Einwaage von HS während des Präparationsprozesses erklärt werden. Beim Einmischen von HS in eine Partikeldispersion konnte die Bildung von Luftblasen innerhalb der Hydrogelformulierung nicht verhindert werden. Diese konnten im Folgenden nicht aus der Formulierung entfernt werden. Ein nachteiliger Einfluss auf das rheologische Verhalten der einzelnen Proben wurde jedoch nicht beobachtet. Bei der Verdrückung einer entsprechenden Formulierung ist es, für die Herstellung formstabiler Strukturen, von essentieller Bedeutung, dass die Lösungen nach dem Druckprozess ihre ursprüngliche Viskosität sehr schnell zurückerlangen, um so ein Zerfließen der gedruckten Stränge zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden Wiederherstellungstest durchgeführt (Abbildung 68).

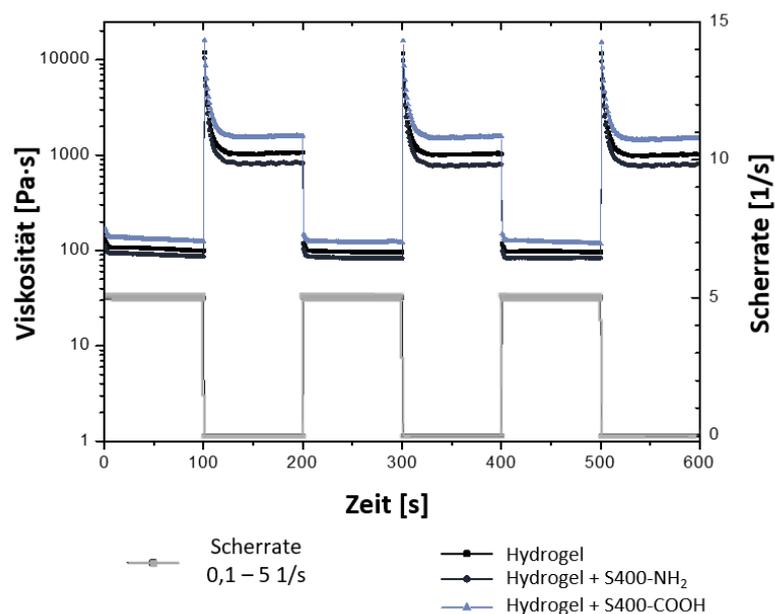


Abbildung 68: Wiederherstellungstest von (hybriden) Hydrogelformulierungen bei Anregung mit abwechselnd hoher (5 1/s) und niedriger (0,1 1/s) Scherrate zur Ermittlung der entsprechenden Viskositäten. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Für die Bestimmung der Wiederherstellungseigenschaften wurden die jeweiligen Formulierungen mit einer alternierenden Abfolge von hohen (5,0 1/s) und geringen Scherraten (0,1 1/s) behandelt. Eine hohe Scherrate simulierte dabei eine Belastung während des Druckprozesses, wohingegen eine geringe Scherrate eine Entspannung nach

dem Druckprozess simulieren sollte (Abbildung 68). Unabhängig von der Oberflächenladung der verwendeten MSN (S400-COOH und S400-NH₂) konnte hierbei eine sehr schnelle Wiederherstellung einer ursprünglich vorliegenden Viskosität beobachtet werden. Somit konnte eine, durch Einmischung der MSN erzeugte, strukturelle Änderung der Hydrogelformulierungen ausgeschlossen werden, wodurch präzise Hydrogelstränge druckbar sein sollten.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurden Amplituden- und Frequenztests durchgeführt. Auch bei diesen Messungen konnte kein deutlicher Einfluss der beigemischten Partikel auf die Lage oder den Verlauf des Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'') gegenüber der ursprünglichen partikelfreien Formulierung erkannt werden (Abbildung 104 und Abbildung 105, Anhang).

Da für alle gezeigten Messungen lediglich ein sehr geringfügiger Einfluss der beigemischten Partikel zu beobachten war, wurde die Verarbeitung der hybriden Hydrogelformulierungen unter Verwendung der selben Parameter wie für ein zugrundeliegendes nicht-hybrides System vorgenommen.^[174]

2.3 Verdruckung hybrider Hydrogel Formulierungen^[173]

Der eigentliche Druckprozess wurde anschließend an die rheologische Charakterisierung in Zusammenarbeit mit Tomasz Jüngst im Universitätsklinikum Würzburg, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut, durchgeführt.

Für die Herstellung der finalen Druckformulierung wurde die benötigte Menge an HS sowie der Fotoinitiator Irgacure 2959 in die jeweilige Partikeldispersion eingemischt. Auf Grund der erhöhten Viskosität der erhaltenen Lösungen konnte die Bildung von Luftblasen innerhalb dieser Druckformulierungen nicht verhindert werden. Diese zeigten jedoch, wie schon zuvor bei der Bestimmung der rheologischen Eigenschaften, keinen negativen Effekt auf die Druckbarkeit der einzelnen Formulierungen. Somit konnten auch in Anwesenheit dieser Luftblasen definierte Hydrogelstränge gedruckt werden (Abbildung 69 a).

Die Verdrückung aller Formulierungen erfolgte an einem 3D-Biodrucker (3DDiscovery, regenHU). Unter den gewählten Bedingungen^{[173],[174]} konnte ein Druck von bis zu 16 übereinanderliegenden Schichten realisiert werden, wodurch relativ große Konstrukte mit einer Fläche von bis zu 12x12 mm² und einer Gesamthöhe von bis zu 3 mm erhalten wurden (Abbildung 69 b). Im Anschluss an die Verdrückung erfolgte eine Verknüpfung des Polyglycidolnetzwerks durch Bestrahlung mit einem UV-Laser (bluepoint4, Dr. Hönle AG) bei einer Intensität von 60% der Maximalleistung. Somit konnten definierte Konstrukte mit einer durchschnittlichen Strangbreite von 627 ± 31 µm hergestellt werden.^[173]

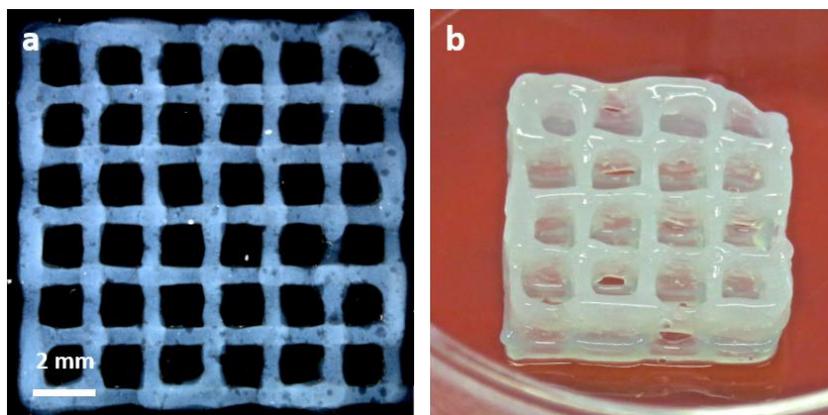


Abbildung 69: A) Stereomikroskopische Aufnahme eines 4-lagigen gedruckten hybriden Hydrogelkonstrukts.

B) Lichtbildaufnahme eines gedruckten hybriden Hydrogelkonstrukts mit 16 aufeinander gedruckten Strängen und einer Größe von 12 x 12 x 3 mm. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Um den Einfluss der UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensität der eingebrachten MSN zu untersuchen, wurden exemplarisch NH₂-funktionalisierte MSN, welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, für eine definierte Zeit bestrahlt. Trotz einer, gegenüber dem Druckprozess, deutlich erhöhten Bestrahlungszeit konnten lediglich geringe Abschwächungen von maximal ca. 23% gegenüber den Ausgangsintensitäten beobachtet werden (Abbildung 106, Anhang).

2.4 Strukturelle Aufklärung gedruckter hybrider Hydrogelstränge^[173]

Die Verteilung von Partikeln in gedruckten hybriden Hydrogelformulierungen konnte durch Vermessung von TEM-Querschnitten visualisiert werden. Hierbei konnte eine gleichmäßige Verteilung von Partikeln, unabhängig von der gewählten Oberflächenfunktionalisierung sowie bei Verwendung einer Mischung beider Partikelfunktionalitäten, über einen großen Bereich detektiert werden.

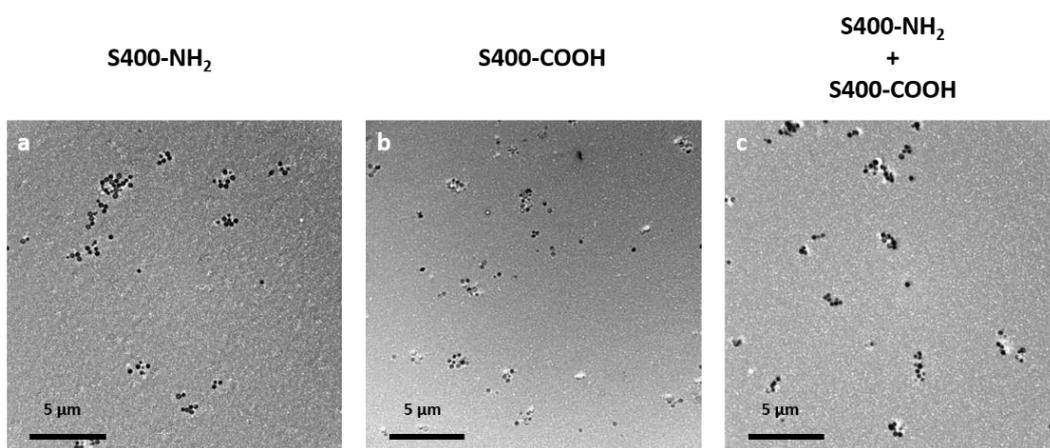


Abbildung 70: TEM-Querschnitte zur Bestimmung der Partikelverteilung innerhalb eines gedruckten hybriden Hydrogels. Dabei wurde sowohl a) die Verteilung von S400-NH₂, als auch von b) S400-COOH Partikeln untersucht sowie c) die Verteilung einer 1:1 Mischung dieser beiden Partikel. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Wie Abbildung 70 zu entnehmen ist, konnten jedoch innerhalb des 3D-Netzwerks kleinere gebildete Agglomerate der eingesetzten Partikel detektiert werden. Diese lassen sich auf die Verwendung von PBS-Puffer als Lösungsmittel zurückführen, liegen jedoch innerhalb des gesamten gedruckten Konstruktes gleichmäßig verteilt vor, weshalb kein negativer Einfluss auf eine spätere Aufnahme dieser Partikel durch Zellen zu erwarten ist. Eine Möglichkeit, die Agglomeration von MSN innerhalb der gedruckten Konstrukte zu unterbinden, könnte die Verwendung von Sucroslösung (10 Gew%) darstellen. Dabei konnte zuvor eine gute Stabilität der erhaltenen Dispersionen beobachtet werden. (vergl. Abbildung 91, Anhang).

Um den Einfluss einer veränderten Bestrahlungszeit auf die Dichte des gebildeten Netzwerks zu untersuchen, wurden gedruckte Hydrogele entweder für zwei oder 14 Sekunden bestrahlt.

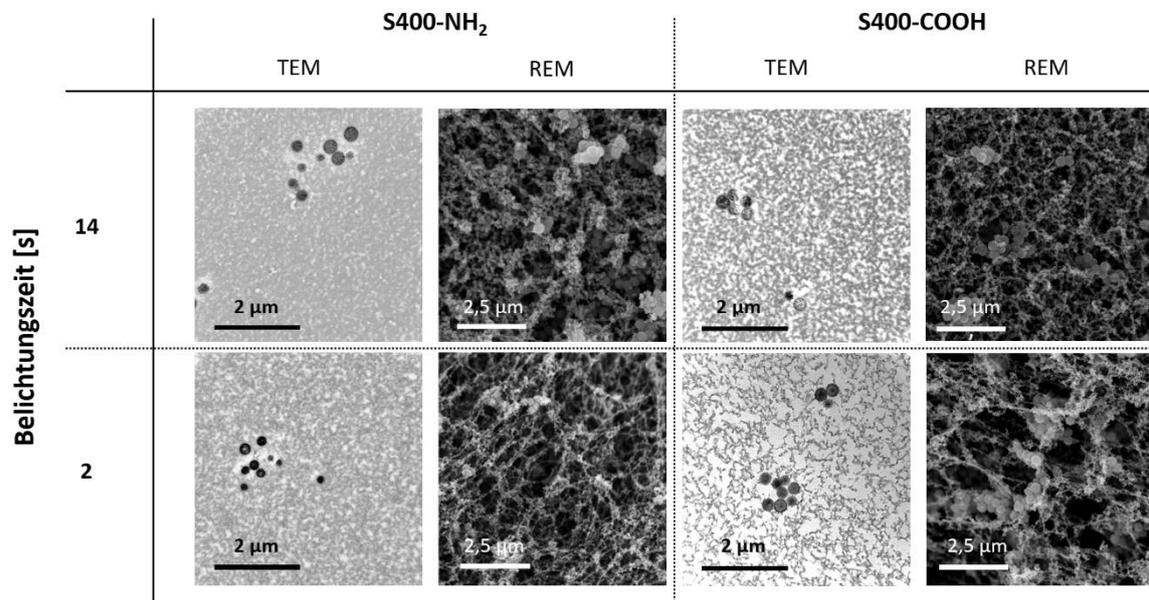


Abbildung 71: TEM-Querschnittsaufnahmen und REM-Messungen hybrider Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich funktionalisierten Partikeln (S400-NH₂ und S400-COOH), bestrahlt für 14 bzw. zwei Sekunden.

Bei kurzen Bestrahlungszeiten von zwei Sekunden ist für hybride Hydrogele, unabhängig von der gewählten Partikelfunktionalisierung, eine verstärkte Auswaschung von HS zu beobachten. Dies ist in entsprechenden TEM-Querschnittsaufnahmen (Abbildung 71) an einem weniger dicht ausgefüllten Netzwerk zu erkennen. Eine kürzere Bestrahlungszeit kann dabei zu einer unvollständigen Vernetzung des Polyglycidolnetzwerks führen. Die Folge sind größere Maschenweiten des Polymernetzwerks, welche, bei einer Lagerung der gedruckten Konstrukte in PBS-Puffer, zu einer beschleunigten Auswaschung der enthaltenen HS sowie zu einer beschleunigten Freisetzung der enthaltenen MSN führen können.

REM-Messungen, mit welchen speziell oberflächennahe Bereiche der hergestellten Proben visualisiert werden konnten, zeigten ein vergleichbares Ergebnis. Auch hier ließen sich bei geringen Belichtungszeiten fein fibrilläre Netzwerke detektieren, welche auf geringere Mengen an HS in den Zwischenräumen des Netzwerks zurückzuführen sind.

Im Fall von S400-COOH Partikeln ist dieser Effekt deutlich stärker ausgeprägt und kann sogar bei einer langen Belichtungszeit von 14 Sekunden beobachtet werden. Die verstärkte Auswaschung von HS aus diesen hybriden Konstrukten lässt sich durch eine elektrostatische Abstoßung zwischen negativ geladener HS und negativ geladenen S400-COOH Partikeln erklären. Um eine vollständige Ausbildung des Polyglycidolnetzwerks und dadurch eine möglichst geringe und vergleichbare Auswaschung von HS zu ermöglichen, wurde für die Herstellung aller gedruckten Hydrogelkonstrukte eine Bestrahlungszeit von 14 Sekunden gewählt.

Eine weitere Möglichkeit, die Verteilung von Partikeln innerhalb eines gedruckten Konstrukts zu visualisieren, ist die Messung mittels konfokaler Laser-Mikroskopie (KLM). Zur Ermöglichung eines solchen bildgebenden fluoreszenzmikroskopischen Verfahrens mussten zunächst Fluoreszenzfarbstoffe auf der Oberfläche der verwendeten MSN angebunden werden. Hierfür wurden S400-COOH Partikel mit einem ATTO488 (im Folgenden dargestellt in grün) und S400-NH₂ Partikel mit einem ATTO647N (im Folgenden dargestellt in rot) Farbstoff markiert.

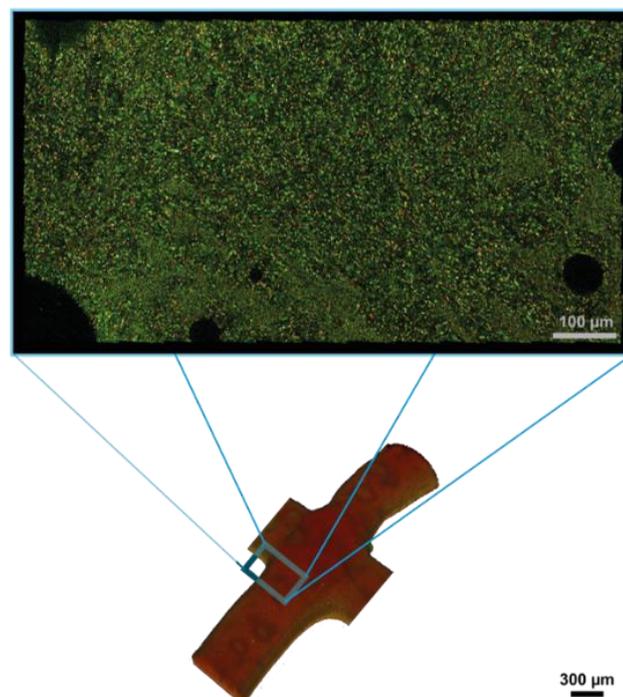


Abbildung 72: Untersuchung der Verteilung von Partikeln in einem gedruckten hybriden Hydrogelstrang mit einer Mischung aus S400-NH₂ (rot) und S400-COOH (grün) Partikeln. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Dass eine entsprechende Fluoreszenzfarbstoffmarkierung keinen Einfluss auf das Zeta-Potential der jeweils positiv oder negativ geladenen Partikel hat, konnte bereits in Kapitel IV.2.2.4 (Abbildung 101, Anhang) für Partikel mit einem kleineren mittleren Partikeldurchmesser von ca. 200 nm gezeigt werden.

Abbildung 72 zeigt eine KLM-Aufnahme zur Visualisierung der Verteilung von Partikeln in einem gedruckten hybriden Hydrogelstrang. Hierfür wurde ein Hydrogel, welches eine Mischung aus unterschiedlich funktionalisierten Partikeln (S400-NH₂ und S400-COOH im Verhältnis 1:1) enthielt, untersucht. Dabei lässt sich, vergleichbar zu den zuvor gezeigten TEM-Aufnahmen, über einen sehr großen Bereich von mehreren 100 µm eine gleichmäßige Verteilung der beiden enthaltenen Partikel detektieren. Zusätzlich können, neben grünen und roten Signalen der Partikel, auch Bereiche mit gelber Färbung detektiert werden. Diese Signale sind auf eine Überlagerung der beiden unterschiedlichen Floreszenzen von positiv bzw. negativ geladenen Partikeln, bedingt durch eine elektrostatische Anziehung zwischen diesen Partikeln, zurückzuführen.

2.5 Beweglichkeit von MSN innerhalb eines gedruckten Konstrukts^[173]

Neben der zuvor gezeigten Wechselwirkung zwischen unterschiedlich geladenen Partikeln innerhalb eines gedruckten hybriden Hydrogelstranges ist ebenfalls eine Wechselwirkung zwischen Partikeln und der umgebenden, negativ geladenen HS denkbar. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Hydrogelformulierungen, welche entweder S400-NH₂ oder S400-COOH Partikel enthielten, in paralleler Orientierung, ohne direkten Kontakt zwischen den beiden Strängen, gedruckt. Zusätzlich hierzu wurde eine zweite, senkrechte, Orientierung angefertigt, bei der auf einen S400-NH₂-haltigen Strang ein weiterer Strang mit S400-COOH Partikeln in senkrechter Orientierung gedruckt wurde. Durch diese gewählte Druckgeometrie entstand ein direkter Kontakt zwischen beiden Strängen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde anschließend die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Partikel, innerhalb der beiden gedruckten Konstrukte, mittels KLM detektiert.

Betrachtet man zunächst den Fall eines direkten Kontakts beider gedruckter Stränge (Abbildung 73 a), zeigte sich, bereits nach einer Lagerung für einen Tag in PBS-Puffer, eine Bewegung der positiv geladenen S400-NH₂ Partikel aus dem unteren Strang in das gesamte Volumen des oberen Strangs, welcher ursprünglich lediglich S400-COOH Partikel enthalten hatte. Für negativ geladene S400-COOH Partikel konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden, da diese Partikel weiterhin lediglich innerhalb des oberen Strangs detektiert werden konnten. Eine mögliche Erklärung des beobachteten bzw. nicht beobachteten Wanderverhaltens von positiv und negativ geladenen Partikel sind die im System vorherrschenden elektrostatischen Wechselwirkungen. Da der umgebende Hydrogelstrang zu einem überwiegenden Teil aus HS besteht, weist dieser eine negative Gesamtladung auf. Positiv geladene S400-NH₂ Partikeln werden somit von der negativen Ladung des darüberliegenden Strangs angezogen, wodurch es zu einer Einwanderung dieser Partikel in den Strang kommt.

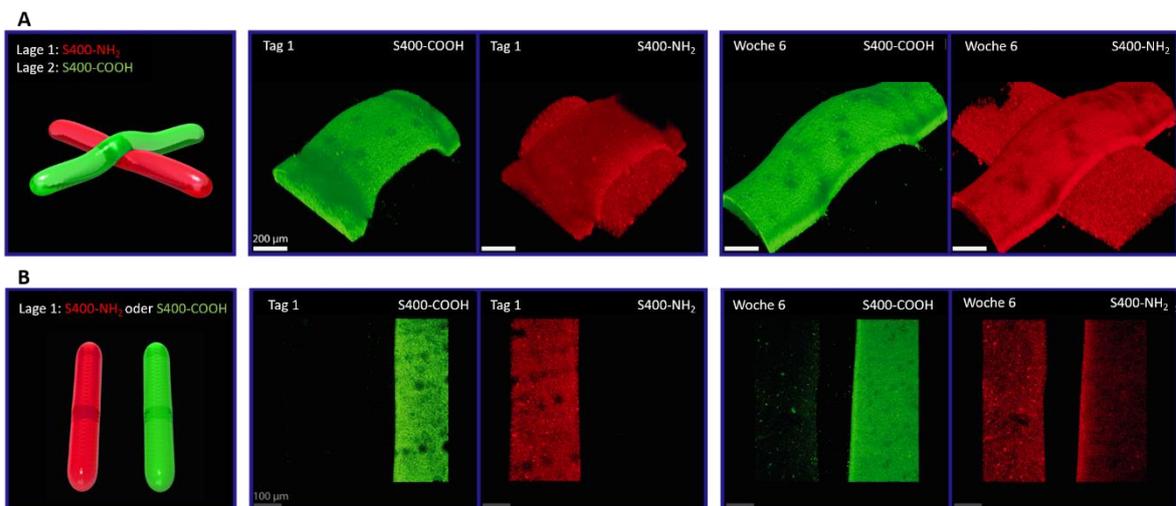


Abbildung 73: 3D-Druck hybrider Hydrogelformulierungen mit unterschiedlicher Ausrichtung: a) senkrecht zueinander (mit direktem Kontakt zwischen beiden Strängen), b) parallel zueinander (ohne direkten Kontakt zwischen beiden Strängen). Das linke Bild zeigt eine schematische Darstellung der gedruckten Stränge direkt nach dem Druckprozess.

Die restlichen Bilder zeigen die Verteilung der unterschiedlich Fluoreszenz-gelabelten Partikel (rot S400-NH₂, grün S400-COOH) innerhalb der gedruckten Konstrukte nach Lagerung in PBS-Puffer für einen Tag bzw. sechs Wochen. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Im Gegensatz dazu werden negativ geladene Partikel von der negativen Ladung des darunterliegenden Strangs stärker abgestoßen, weshalb eine Einwanderung dieser Partikel

unterdrückt wurde, wohingegen eine starke Freisetzung in das umgebende Medium beobachtet werden konnte. Die Lagerung der gedruckten Konstrukte in PBS-Puffer für sechs Wochen zeigte lediglich eine Verstärkung der beobachteten Trends.

In einer kontaktfreien Anordnung beider Stränge (Abbildung 73 b) ist ein direkter Übergang der enthaltenen Partikel in den benachbarten Hydrogelstrang nicht möglich. In einer solchen Anordnung müssen diese Partikel daher zunächst in das umgebende Medium freigesetzt werden, um anschließend von einem gegenüberliegenden Strang erneut aufgenommen zu werden. Eine entsprechend schnelle Aufnahme von positiv geladenen S400-NH₂ Partikeln in den gegenüberliegenden Strang, welcher ursprünglich lediglich S400-COOH Partikel enthielt, konnte nach einem Tag daher nicht beobachtet werden. Nach einer Lagerung in PBS-Puffer für sechs Wochen konnte hingegen eine leichte Aufnahme von positiv geladenen S400-NH₂ Partikeln in den gegenüberliegenden Strang detektiert werden. Dabei konnte eine erhöhte Intensität der aufgenommenen Partikel auf der dem anderen Strang zugewandten Seite beobachtet werden. Eine solche verzögerte Aufnahme von Partikeln in einen gegenüberliegenden Strang lässt sich daher durch eine gegebene räumliche Separation der beteiligten Hydrogelstränge erklären.

Vergleichbar zu dem zuvor untersuchten System mit direktem Kontakt zwischen den gedruckten Strängen konnte für eine kontaktfreie Anordnung der Druckstränge zwar erneut eine starke Freisetzung der enthaltenen negativ geladenen MSN in das umgebende Medium beobachtet werden, eine Einwanderung von S400-COOH Partikeln in einen gegenüberliegenden Strang konnte allerdings auch hier nicht beobachtet werden. Eine solche starke Freisetzung aus den gedruckten Hydrogelsträngen spricht auch hier für eine starke elektrostatische Abstoßung zwischen negativ geladenen Partikeln und negativ geladener HS. Eine erneute Aufnahme dieser Partikel in einen gegenüberliegenden Strang ist auf Grund der vorliegenden negativen Gesamtladung der gedruckten Stränge daher nicht favorisiert.

Basierend auf den beobachteten Ergebnissen wurden Zellexperimente durchgeführt, bei denen eine zelluläre Aufnahme durch Variation der Freisetzung von MSN aus dem Hydrogelnetzwerk gesteuert werden soll.

2.6 Zelluläre Aufnahme von freigesetzten MSN in C2C12 Zellen ^[173]

Für eine qualitative Untersuchung der Zellaufnahme wurden Zellexperimente mit C2C12 Zellen (Myoblasten) durchgeführt. Hierfür wurde ein gegossenes Hydrogel in einer Ecke einer Zellkammer (IBIDI μ slide 8-well) positioniert und C2C12 Zellen gleichmäßig um dieses gegossene Hydrogel herum kultiviert. Wie in dem vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben, erfolgt, je nach Oberflächenmodifikation der enthaltenen MSN, eine variierte Freisetzung der enthaltenen Partikel in das umgebende Zellmedium. Die Aufnahme dieser freigesetzten Partikel durch C2C12 Zellen wurde anschließend nach einem, drei und fünf Tagen mittels KLM detektiert. Während der Durchführung aller Zellexperimente wurde darauf geachtet, dass die gegossenen Hydrogele durchgehend in der selben Ecke der Zellkammer fixiert wurden. Anschließend wurde die Detektion der zellulären Aufnahme von MSN in einem zu dem gegossenen Hydrogel am weitesten entfernten Bereich durchgeführt (Abbildung 84, Experimentalteil). Auf diese Weise sollte ein direkter Kontakt zwischen den untersuchten Zellen und den MSN-haltigen Hydrogelen verhindert werden, um eine beschleunigte, unkontrollierte Aufnahme von Partikeln, welche nicht zuvor in das umgebende Medium freigesetzt wurden, zu unterbinden.

Um innerhalb des Zellmediums ein unterschiedliches Agglomerationsverhalten der freigesetzten NH₂- und COOH-funktionalisierten Partikel auszuschließen, wurden die jeweiligen Dispersionsstabilitäten von S400-NH₂ und S400-COOH Partikeln in Zellkulturmedium (inklusive 10 Vol% fötales Kälberserum (FCS)) untersucht (Abbildung 103, Anhang). Hierbei konnte, unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung, eine konstante Partikelgröße der erzeugten Partikeldispersionen über den gesamten untersuchten Zeitraum (24 h) detektiert werden. Geringe auftretende Größenschwankungen innerhalb der Messungen sind hierbei auf die Adsorption und Desorption von Proteinen innerhalb der gebildeten Proteinkorona zurückzuführen.^{[143],[175]} Eine stabilisierende Wirkung von Partikeldispersionen in Anwesenheit von Serumproteinen, im Gegensatz zu serumfreien Bedingungen, konnte für unterschiedlich funktionalisierte MSN bereits zuvor von Shahabi *et al.* gezeigt werden.^[151]

Aggregationsbedingte Aufnahmeunterschiede können somit für die Auswertung der Zellexperimente ausgeschlossen werden. Des Weiteren kann, wie bereits in Kapitel IV.2.2.4 gezeigt wurde, eine Veränderung des Zeta-Potentials, nach Anbindung eines für die Detektion der Partikel notwendigen Fluoreszenzfarbstoffs, ebenfalls ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund kann weiterhin von positiv bzw. negativ geladenen Partikeln ausgegangen werden.

Betrachtet man die mittels KLM detektierten Mengen an aufgenommenen Partikeln in C2C12 Zellen, kann für negativ geladene S400-COOH Partikel eine sehr schnelle Aufnahme bereits nach einem Tag festgestellt werden (Abbildung 74).

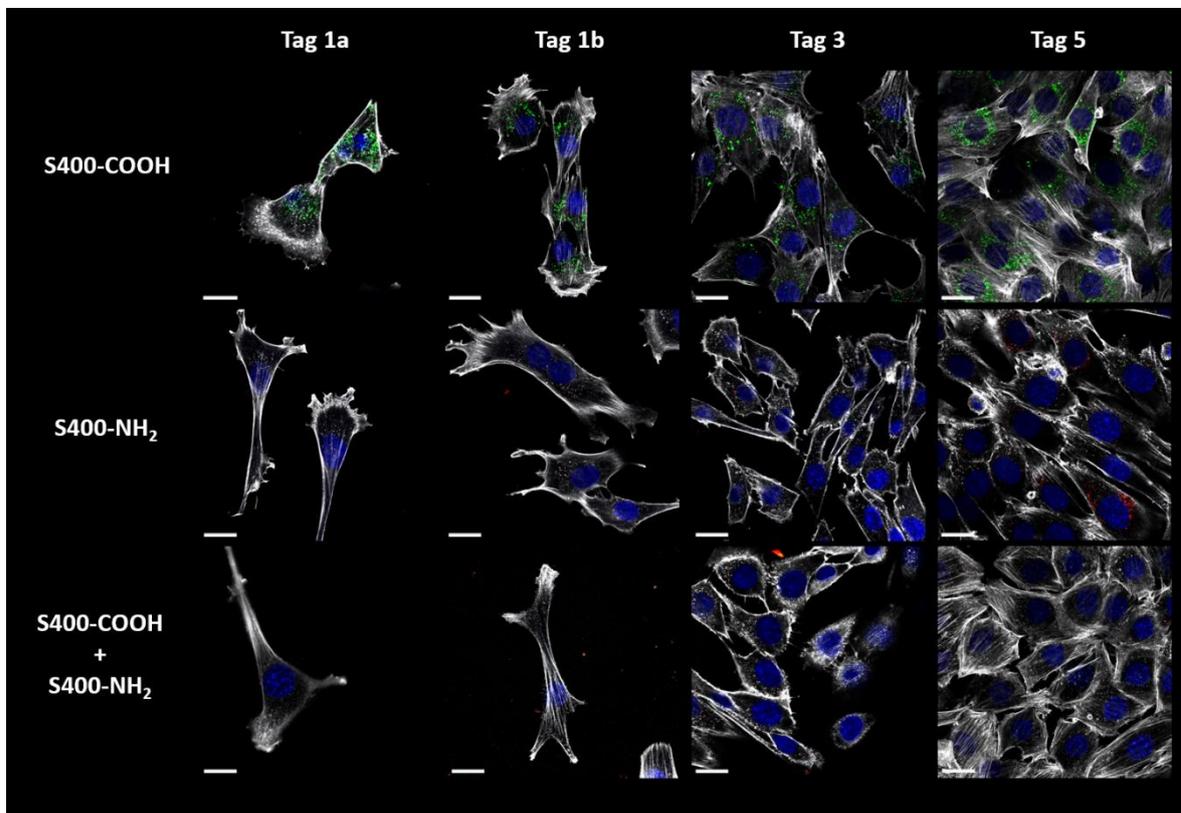


Abbildung 74: Bestimmung der zellulären Aufnahme mittels konfokaler Laser-Mikroskopie. Die Messungen erfolgten nach einer Kultivierungsdauer von einem, drei und fünf Tagen. Auf Grund der geringen Zellzahl wurden an Tag 1 zwei unabhängige Messpunkte dargestellt. Die zelluläre Aufnahme wurde für gegossene Hydrogele, welche entweder S400-COOH, S400-NH₂ Partikel oder eine Mischung aus beiden Partikeln enthielten, bestimmt. Die Färbung der Zelle erfolgte mittels Phalloidin-TRITC (weiß) für das Zytoskelett und DAPI (blau) für den Zellkern. S400-COOH Partikel sind in grün dargestellt und S400-NH₂ Partikel in rot. Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 10 µm. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Eine Aufnahme von positiv geladenen S400-NH₂ Partikeln konnte hingegen erst nach einer Kultivierungsdauer von ca. fünf Tagen beobachtet werden. Diese unterschiedlichen Aufnahmekinetiken stehen dabei in Einklang mit den zuvor gezeigten Mobilitäten und Freisetzungen der Partikel in/aus gedruckten hybriden Hydrogelen. So findet für negativ geladene S400-COOH Partikel eine starke elektrostatische Abstoßung zwischen Partikeloberfläche und umgebendem HS statt. In Folge dessen kommt es zu einer verstärkten Freisetzung dieser Partikel in das umgebende Medium und somit zu einer verstärkten und schnellen Aufnahme durch umgebende C2C12 Zellen.

In einer klassischen 2D-Zellkultur, bei der Zellen lediglich mit einer entsprechenden Partikeldispersion in freier Form inkubiert werden, weisen positiv geladene S400-NH₂ Partikel eine schnelle und starke Aufnahme in C2C12 Zellen bereits nach 24 h auf (Abbildung 107, Anhang). Durch attraktive elektrostatische Wechselwirkung, zwischen positiv geladenen Partikeln und negativ geladener HS, kommt es jedoch in einem gedruckten Konstrukt zu einer verzögerten Freisetzung der Partikel in das umgebende Zellmedium, was in einer verzögerten Aufnahme dieser Partikel in Zellen resultiert.

Die Aufnahme von MSN aus einem gegossenen hybriden Hydrogel, welches mit einem Mix aus S400-NH₂ und S400-COOH Partikeln hergestellt wurde, ist innerhalb des untersuchten Zeitraums gänzlich unterdrückt. Dies lässt sich durch eine starke Aggregation dieser Partikel, bedingt durch ihre unterschiedliche Oberflächenladung, erklären. Auf diese Weise wird die Migration der gebildeten Aggregate durch das dichte Hydrogelnetzwerk erschwert. Die Folge ist eine ebenfalls erschwerte Freisetzung der Partikel in das umgebende Zellmedium und eine dadurch stark verzögerte zelluläre Aufnahme.

2.7 Einbringung von Goldnanopartikeln in 3D-gedruckte hybride Hydrogelformulierungen^[173]

Um zu belegen, dass es sich bei den gezeigten Ergebnissen in der Tat um ladungsbedingte Effekte, auf Grund von elektrostatischer Anziehung bzw. Abstoßung zwischen Partikel/Hydrogel und Partikel/Partikel handelt, wurden hybride Hydrogele mit eingebrachten Goldnanopartikeln (AuNP), anstelle von Silikananopartikeln, untersucht.

Die verwendeten AuNP wurden hierfür mit den gleichen Oberflächenfunktionalitäten (-NH₂ und -COOH) wie zuvor verwendete Silikananopartikel funktionalisiert, wodurch die Oberflächenladungen beider Partikelsysteme vergleichbar waren. Die Herstellung der hybriden Hydrogele erfolgte analog zu den zuvor verwendeten hybriden Hydrogelen, wobei die bei der Herstellung eingesetzten Silikananopartikeldispersionen gegen Goldnanopartikeldispersionen ausgetauscht wurden.

Die erhaltenen hybriden Hydrogele wurden im Anschluss an den Druckprozess für mehrere Tage in PBS-Puffer gelagert und die dabei freigesetzte Menge an Partikeln innerhalb des Überstands bestimmt (Abbildung 75).

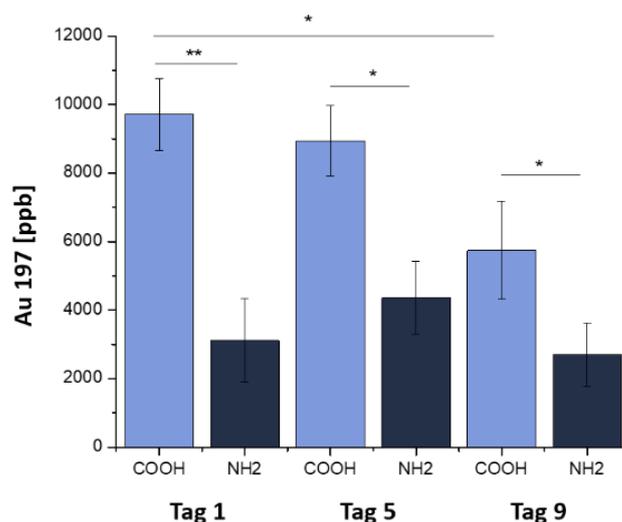


Abbildung 75: Freisetzung von unterschiedlich funktionalisierten Goldnanopartikeln (-NH₂ und -COOH) aus gegossenen hybriden Hydrogelnetzwerken, bestimmt mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Dabei erfolgte eine quantitative Bestimmung, der in das umgebende Zellmedium freigesetzten Goldnanopartikel, mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS). Bei allen analysierten Zeitpunkten (ein, fünf und neun Tage) konnte eine deutlich erhöhte Menge an freigesetzten, negativ geladenen AuNP-COOH, gegenüber positiv geladenen AuNP-NH₂ Partikeln, bestimmt werden. Weiterhin war erkennbar, dass die Menge an freigesetzten, negativ geladenen Partikeln mit längeren Inkubationszeiten abnahm, wohingegen die Freisetzung von positiv geladenen Goldnanopartikeln (auf einem niedrigeren Niveau) stagnierte. Da der Überstand für die Vermessung mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) zu jedem Zeitpunkt vollständig abgenommen werden musste, wurden die Proben anschließend mit frischem PBS-Puffer inkubiert. Dadurch lässt sich eine Reduktion der freigesetzten Menge an AuNP-COOH durch eine deutlich reduzierte, verbleibende Gesamtmenge an negativ geladenen Goldpartikeln innerhalb der gegossenen Hydrogele erklären. Weiterhin kann durch eine sinkende Menge an Partikeln innerhalb des Systems von einer reduzierten Diffusionsrate ausgegangen werden, wodurch ebenfalls eine geringere Freisetzung von Partikeln in das umgebende Medium erklärt werden kann.

Durch Verwendung entsprechend funktionalisierter Goldnanopartikel konnte eine ladungsbedingte Wechselwirkung zwischen Partikeln und dem umgebenden Netzwerk bestätigt werden. Zusätzlich kann an dieser Stelle von einem materialunabhängigen Verhalten ausgegangen werden, da für die Verwendung von Goldnanopartikeln ein zu MSN vergleichbares Freisetzungsverhalten detektiert werden konnte.

2.8 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der 3D-Druck einer hybriden Hydrogelformulierung, welche auf einer Kombination aus HS, unterschiedlich oberflächenfunktionalisierten MSN (bzw. AuNP) und funktionalisierten Polyglycidolen basiert, erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die eingebrachten MSN zeigten hierbei keinen Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften der Formulierung, sodass definierte Hydrogelstränge unterschiedlicher Zusammensetzung präzise gedruckt werden konnten.

Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen unterschiedlich geladenen Partikeln und der umgebenden HS war es weiterhin möglich, die Interaktion zwischen Partikeln und HS zu variieren. Hierbei konnten zwei Einflussfaktoren für die Steuerung der Beweglichkeit von Partikeln innerhalb eines gedruckten hybriden Hydrogelkonstrukts und deren Freisetzung in ein umgebendes Medium identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die Partikelladung sowie die Druckgeometrie. Durch einen Austausch von Silikananopartikeln gegen Goldnanopartikel, welche vergleichbar oberflächenfunktionalisiert waren, konnte ein übereinstimmendes Verhalten beobachtet werden. Somit kann an dieser Stelle von einer materialunabhängigen Freisetzung und zellulären Aufnahme ausgegangen werden.

Durch eine unterschiedliche Freisetzungskinetik der MSN aus 3D-gedruckten Hydrogelen, hervorgerufen durch die zuvor beschriebenen Interaktionsmöglichkeiten mit der umgebenden Hydrogelmatrix, war es auf diese Weise erstmals möglich eine um mehrere Tage gestaffelte zelluläre Aufnahme unterschiedlicher MSN aus einem Hydrogelnetzwerk zu erzielen.

VI Wirkstoffbeladung

Wie bereits zu Beginn in Kapitel I.6 beschrieben, besteht ein Vorteil der Verwendung von mesoporösen Silikananopartikeln (MSN) für die Geweberekonstruktion in ihrem potentiellen Einsatz als Wirkstoffträger. Dabei können auch hydrophobe Wirkstoffe, welche auf Grund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit unter physiologischen Bedingungen von Zellen nicht aufgenommen würden, in das Porensystem von Partikeln geladen werden.^[176] Auf diese Weise kann eine partikelmedierte Aufnahme dieser Wirkstoffe in Zellen erzielt werden.

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz hybrider Hydrogelformulierungen das Ziel einer lokalen sowie gestaffelten zellulären Aufnahme von MSN erreicht werden kann. Durch Variation des umgebenden Hydrogelnetzwerks konnte die Interaktion von Partikeln mit den umgebenden Materialien angepasst werden. Auf diese Weise wurde die Aufnahmemenge variiert sowie eine Retention des Aufnahmezeitpunkts erzielt. Durch Einsatz geeigneter Wirkstoffe innerhalb des Porensystems dieser Partikel könnte somit eine kontrollierte Proliferation und Differenzierung zu einem gewünschten Zielgewebe innerhalb solcher hybriden 3D-Zellkulturen möglich sein.

Abschließend soll daher die Beladung von drei exemplarischen Wirkstoffen in das Porensystem unterschiedlich funktionalisierter MSN (S200-NH₂ und S200-COOH) untersucht werden.

Die gewählten Wirkstoffe (Wnt-Agonist, GW9662 sowie Roscovitin (vergl. Abbildung 76)) wurden hierbei auf Grund ihrer potentiellen Eignung für einen Einsatz im Bereich der Geweberekonstruktion ausgewählt.

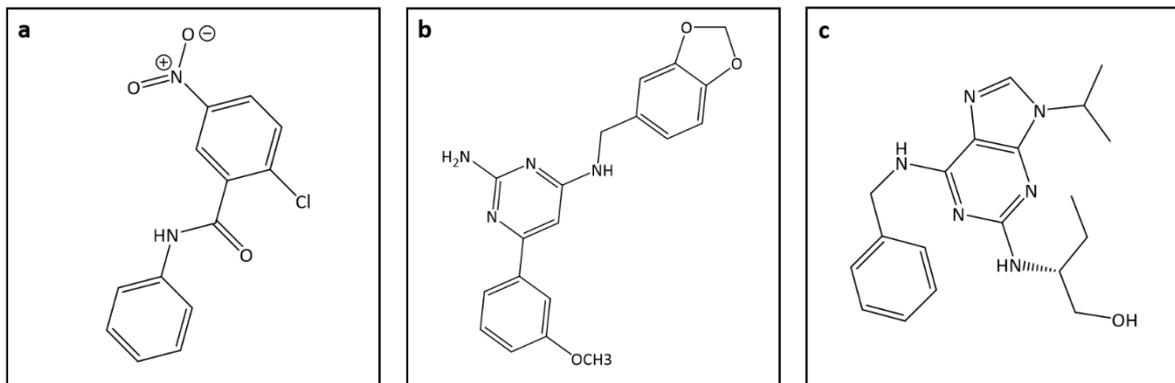


Abbildung 76: Strukturformeln der potentiellen Wirkstoffe für die Beladung von MSN.
A) GW9662, b) Wnt-Agonist, c) Roscovitin.

1. Beladung von MSN mit GW9662

Für die Beladung mit GW9662 wurden sowohl NH_2 - als auch COOH -funktionalisierte MSN verwendet. Dabei wurden unterschiedliche organische und wässrige Beladungsmedien (Dichlormethan (DCM), Toluol, Cyclohexan, Ethanol (EtOH) und 10 Gew% Sucroslösung) getestet, wobei die Verwendung von Cyclohexan die höchsten Beladungsmengen ermöglichte.

Um eine maximale Beladung zu erzielen, wurde eine schrittweise Inkubation mit jeweils ca. $17 \mu\text{g/mL}$ ($61 \mu\text{M}$) GW9662 durchgeführt. Es wurde mit diesen geringen Inkubationskonzentrationen gearbeitet, da eine Konzentration von $18,5 \mu\text{g/mL}$ (65 mM) als die maximal lösliche Menge an GW9662 in Cyclohexan bestimmt werden konnte.

Für diese schrittweise Beladung wurde eine definierte Menge an MSN (1 mg) in 1 mL Wirkstofflösung für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Separation der Partikel und erneute Inkubation mit einer frischen Wirkstofflösung. Die Bestimmung der im Überstand verbleibenden Menge an GW9662 erfolgte anschließend mittels UV/Vis Messungen bei einer Wellenlänge von 261 nm . Die hierfür verwendete Kalibriergerade ist in Abbildung 108 im Anhang aufgeführt. In der dargestellten Auftragung (Abbildung 77) der schrittweisen Beladungsexperimente stellt die Gleichgewichtskonzentration (c_{GG}) die nach jedem Beladungsschritt im Überstand verbleibende Wirkstoffmenge dar.

Die auf der x-Achse aufgetragene kumulierte Beladungsmenge ist hingegen eine kumulierte Gesamtmenge des, nach einer entsprechenden Anzahl an Beladungsschritten, in das Porensystem der mesoporösen Silikananopartikel beladenen Wirkstoffs.

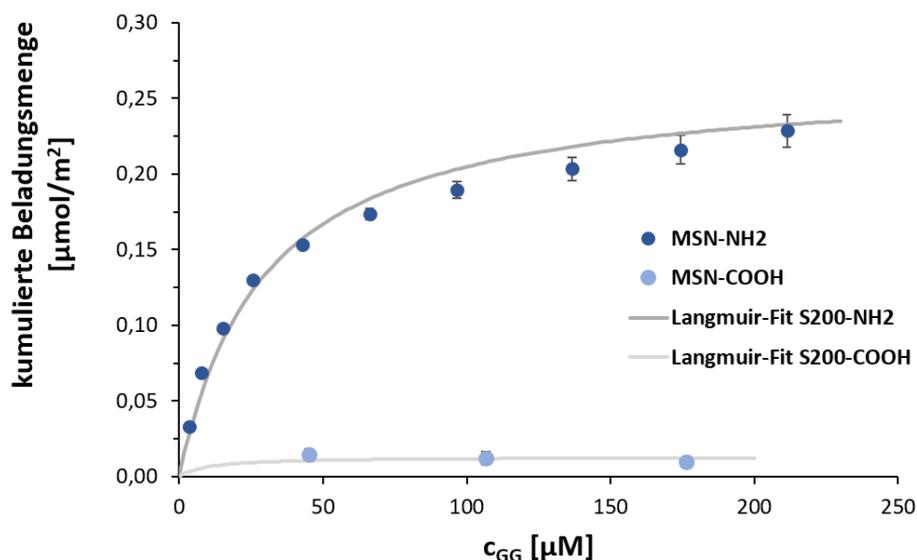


Abbildung 77: Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit GW9662 in Cyclohexan.

Hierbei kann für S200-COOH Partikel eine verschwindend geringe Beladung für alle Beladungsschritte detektiert werden, wobei die maximal mögliche Beladung $0,012 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ beträgt. Bei Untersuchung der Beladung von S200-NH₂ Partikeln konnte hingegen für eine steigende Anzahl an Beladungsschritten eine stetige Zunahme der beladenen Wirkstoffmenge detektiert werden. Für die ersten vier Beladungsschritte kann hierbei eine nahezu vollständige Aufnahme der eingesetzten Wirkstoffmoleküle bestimmt werden, da lediglich eine Restmenge von ca. 6 % GW9662 im Überstand der Inkubationslösung detektiert werden konnte. Mit zunehmender Anzahl an Beladungsschritten reduziert sich jedoch die jeweils aufgenommene Menge an GW9662. Dabei konnten für die letzten untersuchten Beladungsschritte über 60 % der initial für die Beladung verwendeten Menge an GW9662 im Überstand detektiert werden. Durch den beschriebenen zehnstufigen Beladungsprozess von S200-NH₂ Partikeln war es möglich eine Gesamtmenge von ca. $0,228 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ GW9662 in das Porensystem der Partikel zu beladen. Dabei lässt sich die Adsorptionsisotherme einer schrittweisen Beladung von S200-NH₂ mit GW9662 durch einen Verlauf nach Langmuir beschreiben. Die theoretisch bestimmte maximale Beladungsmenge (q_{max}) für S200-NH₂ ist dabei gegenüber dem gemessenen

Plateau minimal erhöht und beträgt $0,265 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Ein entsprechender Verlauf der Adsorptionsisothermen konnte bereits zuvor von Rosenholm *et al.* für die Beladung mesoporöser Strukturen mit Salicylsäure,^[177] sowie von Andersson *et al.* für die Beladung mit Ibuprofen gezeigt werden^[178]. Dabei liegt die hier erzielte maximale Beladungsmenge von GW9662 mit $0,228 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ deutlich unterhalb der durch Andersson *et al.* bestimmten maximalen Beladungsmenge von Ibuprofen, da je nach verwendetem Material und vorliegenden Porengrößen eine maximale Beladung von ca. $1-1,8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ Ibuprofen erzielt werden konnte.

Bei einer durch Langmuir beschriebenen Adsorption kann maximal eine Monolage der Wirkstoffmoleküle adsorbiert werden. Dass hierbei für die Adsorption von GW9662 in der Tat lediglich maximal eine Monolage ausgebildet wird, kann durch eine Auftragung des Raumbedarfs von adsorbierten Wirkstoffmolekülen auf der Partikeloberfläche bestätigt werden. Hierbei konnte, bezogen auf die spezifische Oberfläche der NH_2 -funktionalisierten Partikel, für steigende Wirkstoffkonzentrationen ein minimaler Raumbedarf von ca. $7,7 \text{ nm}^2$ pro Wirkstoffmolekül bestimmt werden (Abbildung 78). Die eingenommene Fläche eines einzelnen Moleküls wurde durch eine semiquantitative AM1-Methode abgeschätzt. Dabei konnte für ein GW9662-Molekül eine maximale Fläche von ca. $0,9 \text{ nm}^2$ bestimmt werden. Dieser Wert liegt weit unterhalb der Fläche die ein einzelnes adsorbiertes GW9662 Molekül auf der Partikeloberfläche von S200- NH_2 -Partikeln minimal einnimmt, weshalb bei der Adsorption keine Monolage erreicht werden kann. Auf Grund der geringen Adsorption von GW9662 auf der Oberfläche von S200-COOH Partikeln wurde dessen minimaler Raumbedarf (ca. $120-170 \text{ nm}^2$) aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

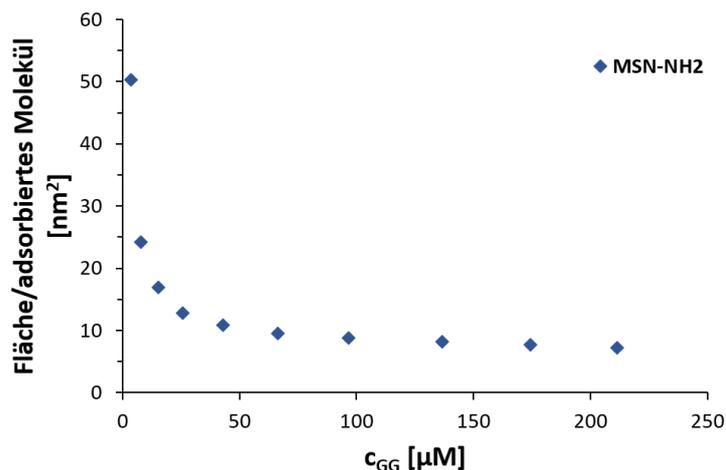


Abbildung 78: Bestimmung des minimalen Platzbedarfs von adsorbierten GW9662-Molekülen für steigende Beladungsschritte.

Die verstärkte Adsorption von GW9662 auf der Oberfläche von NH_2 -funktionalisierten MSN ist auf ein Zusammenspiel mehrerer unterschiedlicher Gründe zurückzuführen. So wurden die NH_2 - und $COOH$ -Funktionalitäten beispielsweise auf unterschiedliche Arten auf der Oberfläche von MSN angebunden. Die Einführung von Aminofunktionalitäten wurde durch eine Co-Kondensation mit einem NH_2 -funktionalisierten Silan durchgeführt, wohingegen die $COOH$ -Funktionen durch eine post-synthetische Modifikation erhalten wurden. Diese verschiedenen Präparationsmethoden bedingen eine unterschiedliche Verteilung der eingebrachten funktionellen Gruppen.^{[179],[180]} So konnte beispielsweise von Yokoi *et al.*, durch Anbindung von Mono-, Di- oder Triaminoalkoxysilanen und einer anschließenden Adsorption von Co^{2+} und Fe^{3+} -Ionen, im Fall einer post-synthetischen Modifikation, eine erhöhte Menge an funktionellen Gruppen an den Poreneingängen und auf der äußeren Oberfläche von mesoporösen MCM-41 bestimmt werden.^[181] In Übereinstimmung mit dieser Arbeit konnte Lim *et al.* ebenfalls eine erhöhte Konzentration post-synthetisch eingeführter Vinylreste an den Poreneingängen bestimmen, wohingegen durch Co-Kondensation eine gleichmäßige Verteilung der funktionellen Gruppen innerhalb der Struktur erhalten wurde.^[182]

Überträgt man diese Erkenntnisse auf die in dieser Arbeit hergestellten Materialien, so kann davon ausgegangen werden, dass durch eine post-synthetische Funktionalisierung mit einem $COOH$ -funktionalisierten Silan diffusionsbedingt eine vermehrte Anbindung dieses Silanes an Poreneingängen von mesoporösen Partikeln stattfindet, wohingegen die innere Porenstruktur einen geringeren Funktionalisierungsgrad aufweist. Mittels

Co-Kondensation kann hingegen eine gleichmäßige Verteilung des NH₂-funktionalisierten Silans über das gesamte Partikelvolumen erzielt werden. Auf diese Weise kann für NH₂-funktionalisierte MSN eine gleichmäßige Interaktion zwischen funktionellen Gruppen und Wirkstoffmolekülen erzielt werden, wohingegen für COOH-funktionalisierte MSN lediglich vermehrt eine Interaktion an Poreneingängen zu erwarten ist. In diesem Zusammenhang konnte zudem in TGA-Messungen ein erhöhter Funktionalisierungsgrad für S200-NH₂ gegenüber S200-COOH gezeigt werden (Abbildung 10). Somit sollte die Interaktionsmöglichkeit für NH₂-Funktionalitäten mit dem einzubringenden Wirkstoff über das gesamte Partikelvolumen begünstigt sein.

Zusätzlich weisen die verwendeten funktionalisierten Silane unterschiedliche Linkerkettenlängen auf. Ist eine COOH-Funktionalität bei der Verwendung von Carboxyethyltriethoxysilan noch mit einer Ethylkette an ein entsprechendes Siliziumatom gebunden, so weist APTMS ((3-Aminopropyl)trimethoxysilan) eine Propylkette für die Anbindung einer NH₂-Funktionalität an ein Siliziumatom auf. Auf diese Weise können zwischen Wirkstoffmolekülen und der längeren Propylkette stärkere hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden. Dies führt ebenfalls zu einer verbesserten Interaktionsmöglichkeit und schließlich zu einer verbesserten Adsorption der Wirkstoffmoleküle auf der Oberfläche der NH₂-funktionalisierten MSN.

Eine eingeführte Propylkette ermöglicht zudem eine gute Beweglichkeit dieser funktionellen Gruppe auf der Oberfläche eines mesoporösen Silikananopartikels. In diesem Zusammenhang konnte bereits von Calvo *et al.* in wässriger Lösung gezeigt werden, dass entsprechende NH₂-Funktionalitäten mit benachbarten OH-Gruppen wechselwirken können, um auf diese Weise eine R-NH₃⁺-O⁻-R Bindung auszubilden.^[183] Dabei konnte durch Calvo *et al.* in DFT-Kalkulationen (unter Vakuum) eine flache Anordnung der Aminopropylkette, im Anschluss an eine Interaktion mit benachbarten OH-Gruppen, auf der Oberfläche gezeigt werden, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen ebenfalls begünstigt werden. So können NH₂-Funktionalitäten bei dem durchgeführten Beladungstest zwar nicht direkt mit umgebenden Wirkstoffmolekülen interagieren, durch eine zuvor beschriebene homogene Verteilung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche und einer Erhöhung der Hydrophobizität dieser Partikel kann jedoch eine verstärkte Wechselwirkung mit umgebenden Wirkstoffmolekülen ermöglicht werden, wodurch eine stark erhöhte Beladungsmenge erklärt werden kann.

2. Beladung von MSN mit Wnt-Agonist

Die Beladung von MSN mit Wnt-Agonist erfolgte in DCM als Beladungsmedium, da alle weiteren überprüften Lösemittel (Cyclohexan, EtOH, Pentan, Sucroselösung 10 Gew%) eine geringere Adsorption aufwiesen.

Für die Bestimmung der maximalen Beladungsmenge von MSN erfolgte die Inkubation einer definierten Partikelmenge (1 mg) mit einem definierten Volumen (1 ml) unterschiedlich konzentrierter Wnt-Agonist-Lösungen. Die Bestimmung der im Überstand verbleibenden Wirkstoffkonzentration, nach einer Inkubationsdauer von 24 h, erfolgte durch UV/Vis Messungen bei einer Wellenlänge von 295 nm. Die für die Berechnung der im Überstand verbleibenden Konzentration an Wnt-Agonist verwendete Kalibriergerade ist in Abbildung 108 im Anhang aufgeführt.

Bei der Adsorption von Wnt-Agonist konnte, im Unterschied zu GW9662, für beide untersuchte Partikelsysteme die Bildung eindeutiger Plateaus beobachtet werden (Abbildung 79).

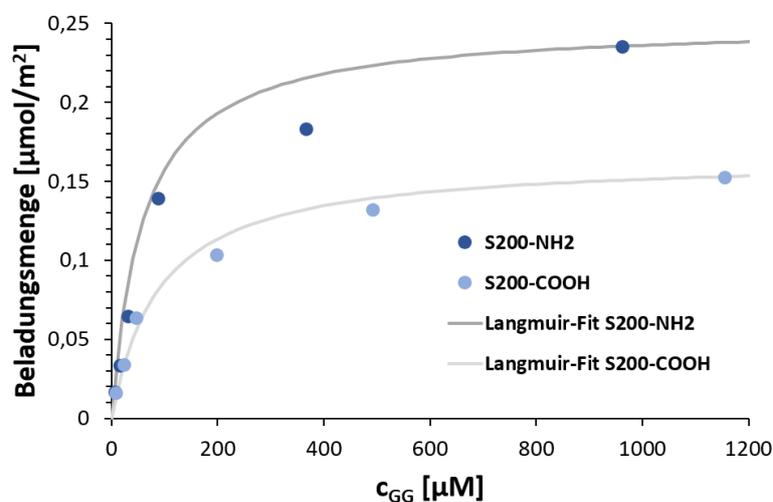


Abbildung 79: Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit Wnt-Agonist in DCM.

Aus diesen Plateaus konnte für S200-COOH Partikel eine maximal erzielte Beladung von ca. $0,152 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ bestimmt werden, wohingegen für S200-NH₂ Partikel eine deutlich erhöhte maximale Beladung von ca. $0,235 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ erzielt werden konnte. Die dargestellten Adsorptionsisothermen streben somit, wie zuvor bei der Adsorption von GW9662 dargestellt, einer maximalen Beladungsmenge entgegen.

Betrachtet man den jeweils bestimmten minimalen Raumbedarf der adsorbierten Moleküle auf der Partikeloberfläche (Abbildung 80) so liegt dieser mit ca. $7,1 \text{ nm}^2$ (S200-NH₂) bzw. $10,9 \text{ nm}^2$ (S200-COOH) erneut weit oberhalb der Fläche eines einzelnen Wirkstoffmoleküls (ca. $1,7 \text{ nm}^2$, semiquantitativ bestimmt mittels AM1 Methode), weshalb auch die adsorbierte Menge an Wirkstoffmolekülen unterhalb der Bildung einer Monolage liegt. Dabei lassen sich auch die für die Beladung mit Wnt-Agonist erhaltenen Verläufe durch Adsorptionsisothermen nach Langmuir beschreiben. Die hierbei mittels Langmuir-Fit theoretisch bestimmten maximalen Beladungsmengen (q_{max}) sind für beide Systeme gegenüber dem gemessenen Plateaus wiederum minimal erhöht und betragen für S200-COOH Partikel $0,165 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, sowie für S200-NH₂ Partikel $0,250 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

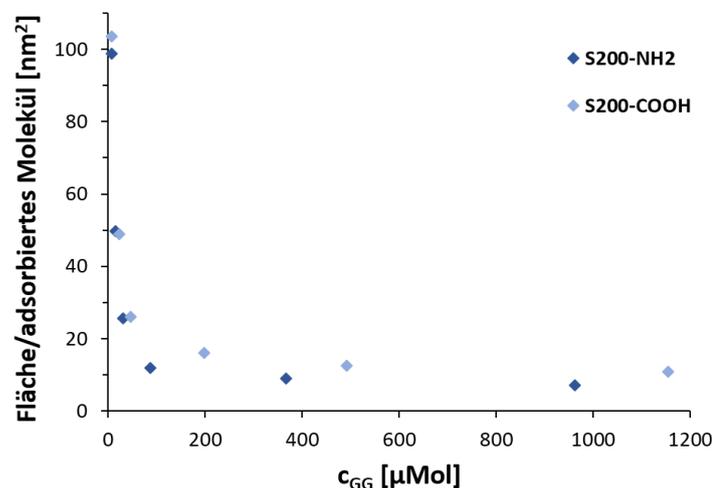


Abbildung 80: Bestimmung des minimalen Platzbedarfs von adsorbierten Wnt-Agonist-Molekülen für steigende Beladungsschritte.

Für die aus der Beladung von Wnt-Agonist in das Porensystem unterschiedlicher MSN resultierenden unterschiedlichen maximalen Beladungsmengen können verschiedene Gründe aufgeführt werden.

So konnten Rosenholm *et al.* bereits zuvor für die Beladung von Ibuprofen in das Porensystem unterschiedlicher Silikamaterialien unterschiedliche maximale Wirkstoffmengen detektieren.^[178] Dabei konnte durch Reduktion der Porendurchmesser dieser Silikamaterialien eine Reduktion der adsorbierten Wirkstoffmenge erzielt werden, wobei die erhaltenen Adsorptionsisothermen weiterhin einen Verlauf nach Langmuir aufwiesen. Durch die Anwesenheit von Mikroporen innerhalb der COOH-funktionalisierten

Partikel könnte somit eine partielle Reduktion der adsorbierten Wirkstoffmenge verursacht werden. Im Fall der Adsorption von Ibuprofen in das Porenvolumen von SBA-3 (Santa Barbara Amorphous-3, mesoporöses Silikamaterial), welche die kleinsten Porendurchmesser von ca. 1,8 nm aufwies, konnte durch Rosenholm *et al.* die geringste Adsorption bestimmt werden. Diese entspricht, mit ca. $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ jedoch immer noch einer ungefähr vierfach erhöhten Adsorptionsmenge im Vergleich zu Wnt-Agonist. Trotz der geringeren Molekülgröße von Ibuprofen entspricht dies einer erhöhten maximalen Beladungsmenge gegenüber der Beladung mit Wnt-Agonist, weshalb weitere Gründe für diese geringere maximal erhaltene Adsorption herangezogen werden müssen.

So ist darüber hinaus vorstellbar, dass die Adsorption von Wirkstoffmolekülen an bevorzugten Adsorptionsplätzen, wie z.B. in der Nähe von funktionellen Gruppen, abläuft. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten jedoch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Hierfür könnte beispielsweise die Adsorption von Wirkstoffmolekülen auf unfunktionalisierten Partikeln oder auf Partikeln mit unterschiedlichen Konzentrationen an funktionellen Gruppen durchgeführt werden, um deren Einfluss auf den Adsorptionsprozess einschätzen zu können.

Ebenfalls könnte auch an dieser Stelle, vergleichbar zu den zuvor gezeigten Beladungen mit GW9662, eine unterschiedliche Einführung der funktionellen Gruppen (post-synthetisch oder co-kondensiert) und eine daraus resultierende veränderte Verteilung dieser Gruppen innerhalb des Porensystems einen Einfluss auf die maximale Beladungsmenge haben. Abschließend kann zudem, wie für GW9662 ausführlich beschrieben, auch eine veränderte Kettenlänge sowie daraus resultierend eine geänderte Hydrophobizität der Partikeloberfläche eine verbesserte Adsorption von Wnt-Agonist auf der Oberfläche von S200-NH₂ Partikeln erklären.

3. Beladung von MSN mit Roscovitin

Vor kurzem wurde von der Gruppe um Prof. Tuckermann (Institut für allgemeine Zoologie und Endokrinologie, Universität Ulm) die Substanz Roscovitin, ein Inhibitor von zyklinabhängigen Kinasen, als Wirkstoffkandidat für die Gewebekonstruktion identifiziert. Da zyklinabhängige Kinasen im gesamten Körper Schlüsselfunktionen bei Zellwachstumsprozessen einnehmen, ist bei der Administration des freien Wirkstoffs mit erheblichen Nebenwirkungen zu rechnen. Aus diesem Grund ist eine Beladung von Roscovitin in Nanopartikel und eine möglichst zellgerichtete Aufnahme dieser Partikel für die beabsichtigte Wirkung von hoher Relevanz.

Die Beladung des Porensystems von MSN mit Roscovitin erfolgte in DCM, da weitere getestete Lösemittel (DMSO und Cyclohexan) geringere Beladungsmengen aufwiesen. Für die Beladung mit Roscovitin wurde, vergleichbar zu den zuvor beschriebenen Wirkstoffen, eine definierte Menge Partikel (1 mg/mL) mit ansteigender Konzentration an Roscovitin beladen. Die Bestimmung der im Überstand verbleibenden Wirkstoffkonzentration erfolgte mittels UV/Vis Messungen bei 291 nm nach einer Inkubationszeit von 24 h. Eine hierfür verwendete Kalibriergerade ist Abbildung 108 (Anhang) zu entnehmen.

Unabhängig von der gewählten Wirkstoffkonzentration konnte für S200-NH₂ jeweils eine gegenüber S200-COOH erhöhte Beladung erzielt werden (Abbildung 81).

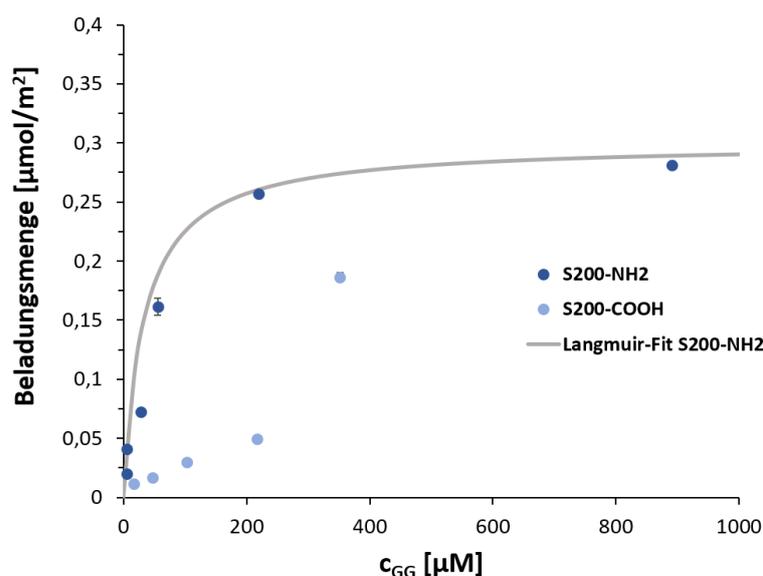


Abbildung 81: Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit Roscovitin in DCM.

Die ermittelte Beladungsisotherme strebt für S200-NH₂ Partikel, wie schon für die zuvor untersuchten Wirkstoffe, einer maximalen Beladungsmenge entgegen. Somit lässt sich auch die Adsorptionisotherme für diese Beladung durch einen Verlauf nach Langmuir beschreiben. Die gemessene maximale Beladungsmenge liegt mit ca. 0.281 μmol/m² in guter Übereinstimmung zu den zuvor dargestellten Beladungstests von GW9662 und Wnt-Agonist (0,228 μmol/m² sowie 0,250 μmol/m²). Hingegen liegt die mittels Langmuir-Fit bestimmte theoretische maximale Beladungsmenge (q_{\max}) für S200-NH₂ Partikel gegenüber einem praktisch ermittelten Plateau wiederum minimal erhöht vor (0,299 μmol/m²).

Die mittels AM1-Methode, semiquantitativ bestimmte Fläche eines einzelnen Roscovitin Moleküls beträgt ungefähr 1,5 nm². Da für die Adsorption von Roscovitin auf die Oberfläche von S200-NH₂ Partikeln ein minimaler Platzbedarf von ca. 6 nm² ermittelt wurde (Abbildung 82) kann auch an dieser Stelle von einer Adsorption unterhalb einer geschlossenen Monolage ausgegangen werden.

Interessanterweise konnte für die Beladung von S200-COOH Partikel kein entsprechender Verlauf der Adsorptionisotherme beobachtet werden. Vielmehr konnte bei Verwendung einer hohen Konzentration der Inkubationslösung (691 μM) eine starke Zunahme der Beladungsmenge dieser Partikel beobachtet werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Agglomeration der Wirkstoffmoleküle in Lösung darstellen. Ein vergleichbares Phänomen konnte bereits von Braun *et al.*^[184] für die Beladung von Partikeln mit Peptiden beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass mit zunehmender Konzentration der Peptidlösung die Bildung von Tri- und Tetrameren begünstigt wurde. In Folge dessen kam es zu einer starken Zunahme der adsorbierten Menge an Peptiden auf der Oberfläche der Partikel, wodurch ein vergleichbarer Verlauf zu den hier gezeigten Ergebnissen für die S200-COOH Partikel erhalten wurde. Da in der hier vorliegenden Untersuchung der Adsorption von Roscovitin jedoch bei der Beladung von S200-NH₂ Partikeln, trotz der Verwendung einer doppelt so hohen Konzentration an Wirkstoffmolekülen, kein vergleichbarer starker Anstieg der Beladungsmengen beobachtet werden konnte, ist eine Agglomeration in Lösung und eine daraus folgende erhöhte Adsorption eher unwahrscheinlich.

Betrachtet man die erhaltenen Adsorptionswerte genauer, so kann, wie Abbildung 81 zu entnehmen ist, für Inkubationen mit geringen Wirkstoffkonzentrationen eine relativ geringe Adsorption auf die Oberfläche der COOH-funktionalisierten Partikel beobachtet werden ($0,03 \mu\text{mol}/\text{m}^2$). Zudem konnte bei der Bestimmung des Platzbedarfs von adsorbierten Roscovitin Molekülen auf der Oberfläche von COOH-funktionalisierten MSN eine minimale Fläche von ca. $50 \text{ nm}^2/\text{Molekül}$ erhalten werden (Abbildung 82).

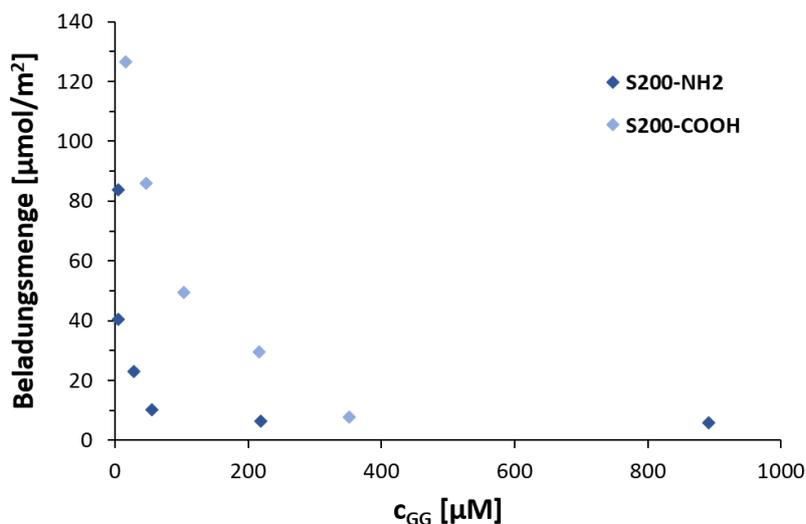


Abbildung 82: Bestimmung des minimalen Platzbedarfs von adsorbierten Roscovitin-Molekülen für steigende Beladungsschritte.

Die im Anschluss auftretende starke Zunahme der adsorbierten Roscovitin Menge führt zudem zu einer starken Reduktion der minimalen Fläche pro adsorbiertem Wirkstoffmolekül. Dies lässt auf das Vorliegen eines, gegenüber einer Adsorption nach Langmuir, veränderten Mechanismus schließen.

Dabei kann allgemein lediglich für die Adsorption nach Langmuir von einer Monolagenadsorption ausgegangen werden, wobei Moleküle unabhängig voneinander an jedem beliebigen freien Adsorptionsplatz auf der Oberfläche adsorbiert werden können. Für alle weiteren Modelle spielt eine Wirkstoff-Wirkstoff Interaktion zwischen bereits adsorbierten und noch nicht adsorbierten Wirkstoffmolekülen eine entscheidende Rolle für deren Adsorption auf der Oberfläche.

Das Adsorptionsverhalten von Roscovitin auf der Oberfläche von COOH-funktionalisierten MSN kann möglicherweise durch einen kooperativen Mechanismus beschrieben werden.

Im Gegensatz zu einer Langmuir Adsorption ist bei einem kooperativen Mechanismus die Adsorption von Wirkstoffmolekülen abhängig von bereits adsorbierten Molekülen. So erhöht die Bindung eines Moleküls die Wahrscheinlichkeit der Adsorption eines weiteren Moleküls in dessen räumlicher Nähe, wodurch eine starke Zunahme der auf der Oberfläche adsorbierten Moleküle detektiert werden kann.^{[185],[186],[187]} Hierbei konnten Rabe *et al.* eine Änderung des elektrostatischen Feldes am Beispiel von Rinderserumalbumin (BSA)-Molekülen in Folge ihrer Adsorption auf eine Oberfläche bestimmen. Diese Änderung konnte als Triebkraft für eine elektrostatische Selbstassemblierung weiterer BSA-Molekül identifiziert werden. Dies könnte auch auf die Adsorption von Roscovitin auf der Oberfläche von MSN übertragen werden. Da es unter Beteiligung der im Wirkstoff vorhandenen Amine sowie der OH-Gruppe mehrere Möglichkeiten gibt, intermolekulare Wasserstoffbrücken auszubilden, könnte der starke Anstieg der Adsorption von Wirkstoffmolekülen auf der Partikeloberfläche dadurch begünstigt werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es möglich war, unterschiedliche Wirkstoffe in das Porensystem von MSN zu beladen. Hierbei wurde eine starke Abhängigkeit der maximal beladbaren Wirkstoffmenge von der Oberflächenfunktionalisierung der Partikel festgestellt.

Ein partikelmediierter Transport dieser Wirkstoffe sollte somit im Kontext der Geweberekonstruktion möglich sein, um eine kontrollierte Aufnahme in Zellen zu ermöglichen und dadurch auftretende Nebenwirkungen zu reduzieren.

VII Experimentaltteil

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (vgl. Tabelle 13) wurden, wenn nicht anders vermerkt, ohne weitere Aufreinigungsschritte eingesetzt.

1. Verwendete Chemikalien

Tabelle 8: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
(3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) (≥ 98 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
(3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) (97 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) ($\geq 97,4$ %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES) Natrium-Salz (99,3 %)	Merck KGaA
Aceton (technisch)	VWR International GmbH
Ammoniak (28 % in Wasser)	VWR International GmbH
Ammoniak (32% in Wasser)	Merck KGaA
Ammoniumnitrat (99,0 %)	Merck KGaA
ATTO 488-Amin	ATTO-TEC GmbH
ATTO 488-NHS-Ester	ATTO-TEC GmbH
ATTO 647N-Amin	ATTO-TEC GmbH
ATTO 647N-NHS-Ester	ATTO-TEC GmbH
Carboxyethyltriethoxysilantriol-Natriumsalz (25 % in Wasser)	abcr GmbH
Cetyltrimethylammoniumbromid (C16TAB) (99,0 %)	Merck KGaA
Cyclohexan (wasserfrei, 99,5 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
D-Glucosamin Hydrochlorid (≥ 98 %)	Alfa Aesar
D-Glucuronsäure (zur Synthese)	Merck KGaA

4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid (DAPI dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dichlormethan ($\geq 99,9\%$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO) (wasserfrei)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Dulbecco's Phospatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Ethanol (absolut)	VWR International GmbH
Ethanol (technisch, Methylethylketon vergällt)	VWR International GmbH
Ethylenglykol (EG) (reinst)	Bernd Kraft GmbH
fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
GW9662	Santa Cruz Biotechnology
Hyaluronsäure (1500-1800 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol (technisch)	VWR International GmbH
<i>N,N'</i> -Methylen-bis-acrylamid ($\geq 98\%$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS) ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid (99,0 %)	VWR International GmbH
<i>N-Hydroxysuccinimid (NHS) (98 %)</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>n</i> -Pentan (technisch)	VWR International GmbH
Penicillin	Thermo Fisher Scientific, Inc
Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PuraMatrix®	Corning
Roscovitin	Santa Cruz Biotechnology
Salzsäure (32 %)	Merck KGaA
Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Sucrose, BioUltra ($\geq 99,5\%$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tetraethylorthosilikat (TEOS) ($\geq 99,0\%$)	Merck KGaA
Tetramethylorthosilikat (TMOS) ($\geq 98,0\%$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Toluol ($\geq 99,3\%$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wnt-Agonist	Santa Cruz Biotechnology

2. Messgeräte und Methoden

Stickstoffsorptionsmessungen

Stickstoffsorptionsmessungen wurden am Institut für Anorganische Chemie II (Universität Ulm) durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einem Quadrasorb-SI der Firma Quantachrome Instruments. Die Probenpräparation erfolgte durch Ausheizen der Proben für 24 h unter Vakuum bei 140 °C (Glucose- und Hyaluronsäure-funktionalisierte Partikel wurden bei 100 °C ausgeheizt). Die Bestimmung der spezifischen Oberflächen erfolgte durch eine Methode nach Brunauer, Emmett und Teller (BET). Für die Berechnung der Porendurchmesser sowie Porenvolumina wurde die nicht-lokale-Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT) angewendet. Die Berechnung erfolgte hierbei durch Anwendung des *equilibrium* Kernels für N₂ bei 77 K für Silika-basierte Materialien mit zylindrischen Poren.

Thermogravimetrische Analysen (TGA)

TGA-Messungen wurden an einem STA 449C Jupiter® und einem TG209 F1 Libra® der Firma Netzsch Gerätebau GmbH am Institut für Anorganische Chemie II (Universität Ulm) durchgeführt. Die Proben wurden standardmäßig mit einer Heizrate von 10 °C/min auf 1000 °C unter O₂-Atmosphäre erhitzt.

DLS- und Zetapotentialmessungen

DLS und Zetapotentialmessungen wurden an einem Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 der Firma Malvern Instruments am Institut für Anorganische Chemie II (Universität Ulm) durchgeführt. Für die Herstellung entsprechender Partikeldispersionen (0,1 mg/mL) wurde 1 mM KCl-Lösung (aq), HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) oder Zellkulturmedium mit enthaltenem FCS (10 Vol%) verwendet. Alle Dispersionen wurden in einem fokussierten Ultraschallbad (Typ S220) der Firma Covaris hergestellt. Die dargestellten Mittelwerte ergeben sich aus drei Messungen im Automatikmodus.

Im Falle von Zeta-Potentialtitrationen wurden Partikeldispersionen mit 2 mg/mL in 1 mM KCl-Lösung (aq.) hergestellt und unter Verwendung von 0,25 M NaOH-Lösung (aq.) sowie 0,25 M HCl-Lösung (aq.) vermessen. Für eine automatisierte Vermessung der Zeta-Potentiale in einem pH-Wert Bereich von 2,5 bis 9 wurde hierbei ein MPT-2 Titrator der Firma Malvern Instruments verwendet.

Elektronenmikroskopie

Die Vermessung von Partikeln und Harz-Dünnschnitten erfolgte an einem JEM-1400 der Firma Jeol. Alle Messungen wurden mit einer HT-Spannung von 120 kV und einem Strahlstrom von 65 μ A durchgeführt. Für die Präparation von Partikelproben wurden 2 mg Partikel in 1 mL Aceton dispergiert und 7 μ L dieser Dispersion auf ein kohlebedampftes Kupfernetz aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösemittels konnte die Morphologie und Partikelgrößenverteilung mittels TEM-Messungen bestimmt werden. Die Vermessung mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) erfolgte an einem Hitachi S-5200 bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV. Sowohl REM- als auch TEM-Messungen wurden am Institut für Elektronenmikroskopie (Universität Ulm) durchgeführt.

FIB-REM-Messungen erfolgten an einem Nanolab 600 der Firma Helios im Institut für Analytische und Bioanalytische Chemie (Universität Ulm) bei einer Spannung von 30 kV. Die Probenpräparation erfolgte analog zu der Herstellung zu Harz eingebetteten Proben in Kapitel VII.10.2.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Messungen wurden an einem Multiplate Reader Spark® 10M der Firma Tecan am Institut für Anorganische Chemie II (Universität Ulm) durchgeführt. Die Bestimmung von Intensitäten unterschiedlich funktionalisierter und farbstoffmarkierter Partikel erfolgte standardmäßig bei einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL in Sucrose (10 Gew%) Lösung.

UV/vis Spektroskopie

UV/vis spektroskopische Vermessungen von Wirkstoffen nach der Beladung von Partikeln erfolgten an einem SPECORD® 50 in einem Messbereich von 190-400 nm.

Konfokale Laser-Mikroskopie (KLM)

Eine konfokal-lasermikroskopische Visualisierung der zellulären Aufnahme in 2D- und 3D-Zellkulturen sowie eine Freisetzung von Partikeln aus Hydrogelsträngen erfolgte an einem Leica TCS SP8 unter Verwendung eines HP CL APO 63x/1.40 OILCS2 Ölimmersionsobjektiv. Hierfür wurden drei unterschiedliche Laser mit den Emissionswellenlängen 405 nm, 552 nm und 638 nm verwendet.

Konfokale Raman Mikroskopie (KRM)

KRM erfolgte an einem alpha300 R von WITec GmbH mit einem SHG Nd:YAG Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm. Für alle Messungen wurde ein Zeiss Objektiv mit einer 100-fachen Vergrößerung verwendet (Numerische Aperatur (NA) = 1,3).

3. Synthese unterschiedlicher Silikananopartikel

3.1 Synthese sphärischer, mesoporöser Silikananopartikel unterschiedlicher Größen (S200 und S400)

Die Synthese von sphärischen, mesoporösen Silikananopartikeln unterschiedlicher Partikeldurchmesser erfolgte anhand einer abgeänderten Synthesevorschrift nach Rosenholm *et al.*^[70]

Hierfür wurde zunächst Cetyltrimethylammoniumbromid (C₁₆TAB) in einem Gemisch aus Wasser (H₂O), Methanol (MeOH) und Natronlauge (NaOH) gelöst und die erhaltene Tensidlösung auf RT abgekühlt. Eine Mischung aus Tetramethylorthosilikat (TMOS) und (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS), welche zuvor unter Argon-Atmosphäre zusammengefügt worden waren, wurde anschließend unter ständigem Rühren (500 rpm) der Tensidlösung zugegeben. Die erhaltene Syntheselösung wurde 45 min bei 500 rpm und anschließend weitere 14 h bei 300 rpm gerührt. Für die Separation der Partikel wurden diese durch Zugabe von Ammoniumnitrat gefällt und mittels Zentrifugation (10.000 rpm für 10 min) abgetrennt. Eine anschließende Entfernung des verwendeten Tensids erfolgte durch Kalzinierung oder Extraktion mit saurem Ethanol (4 g HCl / L EtOH).

Die für die Synthese sphärischer Partikel unterschiedlicher Partikeldurchmesser verwendeten Chemikalien und Mengenangaben sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Einsatzmengen für die Synthese sphärischer mesoporöser Silikananopartikel mit Durchmessern von ca. 200 nm (S200) und ca. 400 nm (S400).

MSN \ Einsatz	n _{C16TAB} [mmol]	m _{MeOH} [g]	M _{H₂O} [g]	V _{NaOH (1 M)} [mL]	n _{TMOS} [mmol]	n _{APTMS} [mmol]	r _{MeOH/H₂O}
S200	21,6	657	938	4,56	14,65	2,06	0,700
S400	21,6	750	858,5	4,56	14,65	2,06	0,874

3.2 Templatentfernung

3.2.1 Extraktion

Für die Templatentfernung durch Extraktion wurden die Partikel nach Separation aus der Syntheselösung dreimal für jeweils 1 h mit salzsaurer Ethanol-Lösung (4 g HCl / L EtOH) inkubiert und während der gesamten Zeit im Ultraschallbad dispergiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die enthaltenen Partikel abzentrifugiert (10.000 rpm, 10 min), die saure Ethanol-Lösung entfernt und die separierten Partikel mit frischer saurer Ethanol-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Partikel zweimal mit Ethanol gewaschen und für 24 h bei 60 °C getrocknet.

3.2.2 Kalzinierung

Für die Templatentfernung durch Kalzinierung wurden die Partikel nach der Separation aus der Syntheselösung zweimal mit Ethanol gewaschen, bei 60°C getrocknet, gemörsert und 6 h auf 550 °C erhitzt.

4. Synthese nichtporöser Silikananopartikel (NP200-OH)

Für die Herstellung nichtporöser Silikananopartikel (NP) mit einem Durchmesser von ca. 200 nm wurde eine abgeänderte Synthesevorschrift nach Sato-Berrú *et al.* durchgeführt.^[58] Hierfür wurde eine Mischung aus H₂O (15,0 mL, 0,9 mol), EtOH (35,0 mL, 0,6 mol) und Ammoniak (NH₃) (28 % in Wasser, 3,0 mL, 37,8 mmol) vorgelegt. Anschließend wurde zu dieser Mischung tropfenweise Tetraethylorthosilikat (TEOS, 1,5 mL, 6,8 mmol) zugegeben und die Lösung für 24 h bei RT gerührt (200 rpm). Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min und dreimaligem Waschen mit EtOH wurden die Partikel bei 60 °C für 24 h getrocknet.

5. Synthese mesoporöser Silikananopartikel mit unterschiedlichen Länge-Breite-Verhältnissen (Z1- Z4)

Die Herstellung von zylindrischen, stäbchenförmigen Silikananopartikeln erfolgte basierend auf einer abgeänderten Synthesevorschrift nach Huang *et al.*^[89]

Hierfür wurde C16TAB in einer Mischung aus H₂O und NH₃ gelöst. Im Fall der Synthese von Z1,5 bzw. Z1 Partikeln erfolgte zusätzlich eine Zugabe von Ethylenglycol (EG) zur ammoniakalischen Tensidlösung. Für eine bessere Löslichkeit von CTAB wurde die Lösung anschließend für 5 min kurz erwärmt. Nach dem Abkühlen der Syntheselösung auf RT wurde diese für 10 min bei 600 rpm gerührt und eine entsprechende Menge an TEOS zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei RT (600 rpm) erfolgte die Separation der Partikel mittels Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min. Für eine anschließende Aufreinigung der Partikel wurden diese zweimal mit Ethanol gewaschen und abschließend bei 60 °C getrocknet. Die Entfernung des Templats erfolgte analog zu Kapitel VII.3.2.2 durch Kalzinierung.

Die für die jeweiligen Länge-Breite-Verhältnisse eingesetzten Chemikalien und Mengenangaben sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Eingesetzte Mengen für die Synthese stäbchenförmiger Partikel mit unterschiedlichen Länge-Breite-Verhältnissen.

	m_{C16TAB} [g]	n_{C16TAB} [mmol]	V_{TEOS} [mL]	n_{TEOS} [mmol]	m_{EG} [g]	n_{EG} [mmol]	V_{H2O} [mL]	n_{H2O} [mmol]	V_{NH3} [mL]	n_{NH3} [mmol]
Z1:1	1,1	3,0	4,7	21,2	100	1,61	270	15,0	5,7	93,8
Z1:1,5	1,1	3,0	4,7	21,2	50	0,81	270	15,0	5,7	93,8
Z1:2	1,1	3,0	4,7	21,2	-	-	270	15,0	5,7	93,8
Z1:4	2,2	6,0	9,4	41,0	-	-	270	15,0	5,7	93,8

6. Post-Funktionalisierung

6.1 Post-synthetische NH₂-Funktionalisierung

Für die Anbindung eines NH₂-funktionalisierten Silans an die Partikeloberfläche musste unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet werden. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Partikel zunächst für 3 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die getrockneten Partikel in Toluol (trocken) dispergiert (5 mg/mL) und (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) (2,5 µmol/mg) zugegeben. Während der gesamten Reaktion wurde unter Schutzgas (Argon) gearbeitet. Nach einer Reaktionszeit von 12 h bei 80 °C, während der die Partikel ständig bewegt wurden, erfolgte eine Separation der Partikel durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min. Die Aufarbeitung der funktionalisierten Partikel erfolgte durch einmaliges Waschen mit Toluol und anschließendem zweimaligen Waschen mit Ethanol bevor die Partikel bei 60 °C getrocknet wurden.

6.2 Post-synthetische COOH-Funktionalisierung

Nach der Kalzinierung von entsprechenden Partikeln wurden diese in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) dispergiert (7,5 mg/mL) und Carboxyethyltriethoxysilantriol-Natriumsalz (25 % in Wasser, 33 µmol/mg) zugegeben. Die Dispersion wurde während der dreistündigen Reaktionszeit ständig in Bewegung gehalten. Durch Zentrifugation wurden die Partikel separiert, zweimal mit Ethanol gewaschen und abschließend bei 60 °C getrocknet.

6.3 EDC/NHS Kupplungsreaktion

Für die Einführung weiterer funktioneller Gruppen oder die Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen muss eine EDC/NHS Kupplung an den jeweiligen zur Verfügung stehenden COOH-Funktionalitäten vorgenommen werden. Das entsprechende Reaktionsschema ist in Abbildung 83 dargestellt.

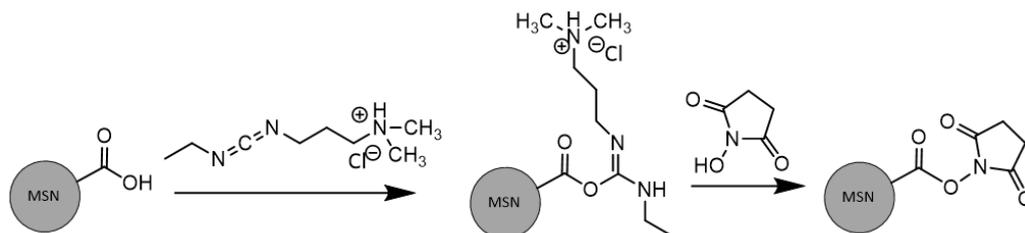


Abbildung 83: Schematische Darstellung der Aktivierung von COOH-Funktionalitäten auf der Oberfläche von MSN mittels EDC/NHS Kupplung.

Für die Aktivierung wurden COOH-funktionalisierte Partikel in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) dispergiert, wobei eine Partikelkonzentration von 2,5 mg/mL verwendet wurde. Im Anschluss wurde eine N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Lösung in HEPES-Puffer (1 mmol einer 50 mg/mL Lösung) sowie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (0,5 mmol) zugegeben und für 30 min bei RT bewegt. Nach Separation der Partikel mittels Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min wurden diese abschließend zweimal mit H₂O gewaschen und direkt im Abschluss weiter funktionalisiert.

6.4. Glucosefunktionalisierung unterschiedlicher S200 MSN

6.4.1 Glucosaminfunktionalisierung von S200-COOH

Nach Aktivierung von COOH-Funktionalitäten auf der Oberfläche von MSN mittels EDC/NHS-Kupplung (Kapitel VII.6.2) wurden die erhaltenen Partikel in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) dispergiert und unterschiedliche Mengen an Glucosamin-Hydrochlorid (gelöst in HEPES-Puffer) zugefügt (Einsatzmenge siehe Tabelle 11). Die erhaltenen Dispersionen wurden für 4 h bei RT bewegt und im Anschluss durch Zentrifugation (10.000

rpm für 10 min) separiert. Eine Aufarbeitung der Partikel erfolgte durch zweimaliges Waschen mit Ethanol und anschließender Trocknung bei 60 °C.

Tabelle 11: Einsatzmengen für die Funktionalisierung von S200-COOH Partikeln mit Glucosamin.

	S200-COOH-Glu-0,01	S200-COOH-Glu-0,1	S200-COOH-Glu-0,28
$n_{\text{Glucosamin-Hydrochlorid}}/m_{\text{Partikel}}$ [$\mu\text{mol/g}$]	10	100	280

6.4.2 Glucuronsäurefunktionalisierung

Zunächst wurden unterschiedliche Mengen an Glucuronsäure in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) gelöst (Tabelle 12). Zur Aktivierung der in Glucuronsäure enthaltenen COOH-Funktionalitäten wurden EDC (1,92 mmol) und NHS (50,0 mg/mL, 2 mmol in HEPES-Puffer, 25 mM, pH 7,2) zu den entsprechenden Glucuronsäurelösungen zugegeben und für 30 min bei RT bewegt. Währenddessen wurden Dispersionen von NH₂-funktionalisierten Partikeln (10 mg/mL) hergestellt und nach der Aktivierung zu den jeweiligen Glucuronsäurelösungen zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei RT, während der die Partikeldispersionen in ständiger Bewegung gehalten wurden, erfolgte eine Separation der Partikel durch Zentrifugation (10.000 rpm für 10 min). Eine Aufreinigung der erhaltenen Partikel erfolgte durch zweimaliges Waschen mit Ethanol und anschließender Trocknung bei 60 °C.

Tabelle 12: Einsatzmengen für die Funktionalisierung von S200-NH₂ Partikeln mit Glucuronsäure.

	S200-NH ₂ -Glu-0,01	S200-NH ₂ -Glu-0,1	S200-NH ₂ -Glu-0,28
$n_{\text{Glucuronsäure}}/m_{\text{Partikel}}$ [$\mu\text{mol/g}$]	10	100	280

6.5 Hyaluronsäure(HS)-Funktionalisierung

Zur Funktionalisierung von NH₂-funktionalisierten Partikeln mit HS wurden zunächst unterschiedliche Mengen an HS in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) gelöst (vergleiche Tabelle 13). Die verwendeten Angaben in Gew% beziehen sich dabei auf die eingesetzte Menge an MSN. Anschließend erfolgte eine Aktivierung der COOH-Funktionalitäten der HS-Moleküle durch EDC/NHS Kupplung für 30 min (siehe Kapitel VII.6.2). Zu den aktivierten HS-Lösungen wurden im Anschluss Partikeldispersionen (10 mg/mL) von NH₂-funktionalisierten Partikeln zugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Die Separation der Partikel erfolgte durch Zentrifugation (10.000 rpm für 10 min). Zur Aufarbeitung der HS-funktionalisierten Partikel wurden diese abschließend zweimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

Tabelle 13: Einsatz zur Herstellung von S200-HS Partikeln mit unterschiedlichen Mengen an HS.

	MSN [mg]	HS [gew%]	EDC [μmol]	NHS [μmol]
S200-HS-5	100	5	82,5	33,0
S200-HS-10	100	10	165,0	66,0
S200-HS-15	100	15	247,5	99,0
S200-HS-30	100	30	495,0	132,0

7. Fluoreszenzfarbstoffmarkierung von Partikeln

Um die Detektierbarkeit von Partikeln mittels konfokaler Laser-Mikroskopie sowie in den jeweiligen Durchflusszytometrie(FACS)-Messungen zu ermöglichen, wurden die Partikeloberflächen mit Fluoreszenzfarbstoffen funktionalisiert. Um eine Reduktion der Fluoreszenz des Farbstoffs möglichst gering zu halten, wurde während der Anbindung und anschließenden Aufarbeitung unter Lichtausschluss gearbeitet.

7.1 Fluoreszenzmarkierung mit ATTO-NH₂ Farbstoffen

Nach der Aktivierung von COOH-Funktionalitäten auf der Partikeloberfläche mittels EDC/NHS Kupplung (Kapitel VII.6.2) wurden diese anschließend erneut in HEPES-Puffer dispergiert (7,5 mg/mL).

Für die Herstellung einer ATTO-NH₂-Lösung wurden die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe (ATTO647N-NH₂ bzw. ATTO488-NH₂) in DMSO gelöst (1 mg/mL) und zu den Partikeldispersionen zugegeben (100 µL/100 mg). Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei RT erfolgte eine Separation der Partikel durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min. Während der Reaktionszeit wurden die Partikeldispersionen in ständiger Bewegung gehalten, um eine Sedimentation während dieser Zeit zu unterbinden. Nach zweimaligem Waschen mit Ethanol wurden die Partikel abschließend bei 60°C getrocknet.

7.2 Fluoreszenzmarkierung mit ATTO-NHS Farbstoffen

Zur Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs an NH₂-Funktionalitäten auf der Partikeloberfläche wurden diese in HEPES-Puffer dispergiert (7,5 mg/mL). Eine Aktivierung des Farbstoffs war an dieser Stelle nicht notwendig, da NHS-funktionalisierte Farbstoffe für die Anbindung an MSN verwendet wurden. Hierbei wurde ATT647N-NHS bzw. ATTO488-NHS in DMSO (wasserfrei) gelöst (1 mg/mL) und zu den Partikeldispersionen zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 1 h bei RT, wobei die Partikeldispersionen während der gesamten Zeit in ständiger Bewegung gehalten wurden. Eine anschließende Separation der Partikel erfolgte durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min. Nach zweimaligem Waschen mit Ethanol wurden die Partikel abschließend bei 60°C getrocknet.

8. Dispersionsstabilität in Sucrose

Für die Untersuchung der Dispersionsstabilitäten unterschiedlicher Partikel wurden diese in 10 Gew% Sucroslösung für 20 min im Ultraschallbad dispergiert. Eine anschließende

Bestimmung der hydrodynamischen Radien erfolgte mittels DLS-Messungen über einen Zeitraum von 24 h.

9. Funktionalisierung von Glasplättchen

Um eine Funktionalisierung von Glasplättchen mit unterschiedlichen Organoalkylsilanen durchzuführen mussten diese zunächst gereinigt werden.

Hierfür wurde jeweils ein vierstufiger Prozess durchgeführt:

- 1.) Inkubation in wässriger mucasol®-Lösung (5 Vol%) bei 40 °C für 30 min
- 2.) Inkubation in Peroxomonoschwefelsäure für 30 min im Ultraschallbad
- 3.) Inkubation in NaOH-Lösung (aq., 1 M) für 30 min im Ultraschallbad
- 4.) Inkubation in MilliQ-Wasser für 30 min im Ultraschallbad

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Glasplättchen ausgiebig mit MilliQ-Wasser gespült. Im Anschluss an den die letzte Inkubation mit MilliQ-Wasser wurden die Glasplättchen bei 60 °C getrocknet.

NH₂-Funktionalisierung

Für die Einführung von NH₂-Funktionen auf der Glasoberfläche wurden die getrockneten Glasplättchen mit APTES (8,5 µmol) in Methanol für 5 min inkubiert. Abschließend wurden die Glasplättchen zweimal mit Methanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

COOH-Funktionalisierung

Für die Einführung von COOH-Funktionalitäten auf der Glasoberfläche wurden die zuvor getrockneten Glasplättchen mit Carboxyethyltriethoxysilantriol-Natriumsalz (3,3 µmol) in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) für 5 min inkubiert. Abschließend wurden die Glasplättchen zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

10. RADA16-I basiertes hybrides Hydrogel

10.1 Herstellung hybrider Hydrogele

Für die Herstellung hybrider Hydrogele wurde eine käuflich erwerbliche RADA16-I Lösung (1 Gew%) mit einer Sucroslösung (20 und 10 Gew%) auf eine Konzentration von 0,5 gew % bzw. 0,25 Gew% verdünnt. Anschließend wurden Partikeldispersionen (1 mg/mL) in Sucroslösung (10 Gew%), sowie MC3T3-E1 Zellsuspensionen in Sucroslösung (10 Gew%) zu der jeweiligen RADA16-I Lösung zugefügt. Durch Mischen im Verhältnis 1:1 von RADA16-I Lösung und MSN-Dispersionen wurden hybride Hydrogellösungen ohne Zellen und durch Mischen im Verhältnis 1 : 0,8 (Zellen) : 0,2 (MSN) hybride Hydrogellösungen inklusive Zellen erhalten. Auf diese Weise wurden Hydrogellösungen mit RADA16-I Konzentrationen von 0,25 gew % bzw. 0,125 Gew% hergestellt. Um eine Aufnahme von Partikeln im ungelierten Zustand gering zu halten, wurden die hybriden Hydrogellösungen nach dem Mischen der einzelnen Komponenten möglichst schnell in ein vorgelegtes Zellmedium injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 60 und 90 min bei 37 °C wurde das enthaltene Zellmedium jeweils ausgetauscht um eine vollständige Gelierung sowie Erhöhung des pH-Werts zu ermöglichen.

10.2 Elektronenmikroskopische Analyse hybrider Hydrogelnetzwerke

Eine weiterführende Präparation der hergestellten hybriden Hydrogelproben, für Untersuchungen mit unterschiedlichen elektronenmikroskopischen Methoden, wurde in Zusammenarbeit mit verschiedenen Instituten an der Universität Ulm durchgeführt.

Im Anschluss an die zuvor beschriebene Herstellung hybrider Hydrogelproben (ohne die Einbringung von Zellen) und Lagerung für 12 h bei 37 °C, erfolgte eine Fixierung des Hydrogelnetzwerks durch Zugabe einer 2,5 Gew% Glutaraldehyd-Lösung. Nach Entfernung der Fixierlösung und anschließendem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte, zur besseren

Visualisierung des Peptidnetzwerks, eine Kontrastierung mit Osmium(VIII)-oxid- (2 Gew%) sowie Uranlyacetat-Lösung. Im Anschluss wurde das wässrige Medium der hybriden Hydrogele schrittweise gegen Ethanol ausgetauscht und die so erhaltenen wasserfreien Proben im Folgenden kritisch punktgetrocknet. Für REM-Aufnahmen wurde das getrocknete Hydrogelnetzwerk mit Hilfe eines doppelseitigen Klebebands auf einen REM Halter aufgebracht und zur Verbesserung der Leitfähigkeit mit einer 3 nm dicken Schicht Platin beschichtet. Für die Präparation von TEM-Proben hingegen wurde zusätzlich nach der kritischen Punkttrocknung eine Einbettung in Harz (EPON™) durchgeführt. Die Polymerisation des Harzes erfolgte bei 60 °C für 48 h. Nach der Aushärtung wurden ca. 80 nm dicke Dünnschnitte dieser Proben präpariert. Die Probenpräparation von REM- und TEM Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Elektronenmikroskopie (Universität Ulm).

Die Vermessung von FIB-REM-Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Gregor Neusser am Institut für Analytische und Bioanalytische Chemie (Universität Ulm) unter der Leitung von Prof. Dr. Boris Mizaikoff. Bei den hierbei untersuchten Proben handelt es sich um die zuvor für die Herstellung von TEM-Dünnschnitten angefertigten und in Harz eingebetteten Proben.

10.3 RADA16-I Adsorptionstests und anschließende Bestimmung des Zeta-Potentials

Zur Herstellung partikelhaltiger hybrider Hydrogellösungen wurde zunächst eine RADA16-I Lösung (1 Gew%) in einem Vortex-Schüttler behandelt um eine leichtere Pipettierbarkeit zu ermöglichen. Durch Mischen mit einer Sucroslösung (20 Gew%) wurde diese anschließend verdünnt, wodurch eine 0,5 Gew% RADA16-I Lösung erhalten wurde. Durch weiteres Mischen mit einer Partikeldispersion (20 mg/mL) und gegebenenfalls weiterer Zugabe von Sucroslösung (10 Gew%) wurde eine Lösung mit einer finalen RADA16-I Konzentration von 0,25 Gew% und einer definierten Partikelkonzentration erhalten. Die für die Herstellung von RADA16-I Lösungen, mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen, verwendeten Mengen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Um eine Agglomeration von

eingebraachten Partikeln zu unterbinden, wurden die erhaltenen Lösungen unter ständiger Bewegung inkubiert (Dauer: 15 min, Ausnahme: Analyse des Einflusses der Inkubationszeit, hierfür wurden Zeiten zwischen 1 min und 60 min variiert). Eine anschließende Separation der Partikel erfolgte durch Zentrifugation bei 15.000 rpm für 10 min. Vor der Analyse der im Überstand verbleibenden Menge an RADA16-I mittels des *Fluorescamin-Assays* wurden die Überstände ein weiteres Mal bei 15.000 rpm für 10 min zentrifugiert und anschließend durch Zugabe von Sucroslösung (10 Gew%) im Verhältnis 1:8 verdünnt. 90 µL der so erhaltenen RADA16-I Lösung wurde abschließend mit 10 µL einer Fluorescamin Lösung (5 mg/mL in DMSO) inkubiert und die erhaltene Fluoreszenz direkt nach der Zugabe mit einem Multiplate Reader Spark® 10M bei einer Wellenlänge von 562 nm analysiert.

Die in der Lösung enthaltenen Mengen an RADA16-I wurden durch Abgleich mit einer Kalibriergeraden (Abbildung 38, Anhang) bestimmt.

Tabelle 14: Zusammensetzung von auf RADA16-I basierenden hybriden Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen.

Zusammensetzung	Finale Partikelkonzentration			
	10 mg/mL	5 mg/mL	0,1 mg/mL	0 mg/mL
RADA16-I Lösung (1 gew%)	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Sucrose Lösung (20 gew%)	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Sucrose Lösung (10 gew%)	-	250 µL	495 µL	500 µL
Partikeldispersion - (20 mg/mL in Sucrose 10%)	500 µL	250 µL	5 µL	-

Für die Bestimmung des Zeta-Potentials nach der Inkubation mit RADA16-I Lösungen wurden die Partikel im Anschluss an die jeweiligen Adsorptionstests separiert und einmal mit 1 mL MilliQ-Wasser gewaschen, abzentrifugiert (15.000 rpm, 15 min) und unter Vakuum bei RT getrocknet. Die Bestimmung des Zeta-Potentials dieser Partikel erfolgte abschließend in 1 mM KCl-Lösung (aq., 0,1 mg/mL).

10.4 Rheologische Messungen

Die Bestimmung der rheologischen Kennwerte erfolgte sowohl im ungelierten als auch im gelierten Zustand. Für die Bestimmung im gelierten Zustand wurden alle Proben für eine definierte Dauer von 2 h in Zellmedium inkubiert, wobei ein Austausch des Zellmediums nach 1 h sowie 1,5 h erfolgte. Es wurde für jede Messung ein Probenvolumen von 2,5 ml hergestellt, um eine vollständige Ausfüllung des Spalts der Kegel-Platte-Geometrie zu gewährleisten. Die für die jeweiligen Messmethoden gewählten Parameter sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Gewählte Parameter für durchgeführte rheologische Messungen.

	Frequenz f [rad/s]	Amplitude γ [%]	$d(\gamma)/dt$ [1/s]	Temperatur [°C]
Viskositätsmessungen	-	-	0,001-1000	23
Amplituden Sweep	62,83	0,001-100	-	23
Frequenz Sweep	600-0,01	0,1	-	23

10.5 ThT-Färbung

Für die Färbung mittels *ThT-Assay* wurden neben einem reinen RADA16-I Hydrogel (0,25 Gew%) auch hybride Hydrogele mit jeweils 0,5 mg/mL Partikel (S200-NH₂, S200-COOH, S400-NH₂ und S400-COOH), vergleichbar zu Kapitel 10.1, hergestellt. Hierbei wurden alle Hydrogele mit einem definierten Volumen von 100 μ L präpariert.

Die Herstellung einer ThT-Lösung erfolgte durch Verdünnung einer konzentrierten ThT-Lösung (25 mM in MilliQ Wasser) in PBS-Puffer im Verhältnis 1:500, wodurch eine 50 μ M ThT-Lösung erhalten wurde. Anschließend wurde das Zellmedium, welches für die Inkubation von (hybriden) Hydrogelen verwendet wurde, entfernt und die

zurückbleibenden Hydrogele mit 60 μL ThT-Lösung (50 μM) für 10 min inkubiert. Nach dem Entfernen der ThT-Lösung und erneuten Überschichten des verbleibenden, gefärbten Hydrogels mit PBS-Puffer (60 μL) wurde abschließend die erhaltene Fluoreszenzintensität an einem Multiplate Reader Spark® 10M der Firma Tecan bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt.

10.6 Biologische Evaluation

10.6.1 Zellkultur und FACS-Messungen mit MC3T3-E1

Die Zellkultur und FACS-Messungen von MC3T3-E1 Zellen sowie hybriden, MC3T3-E1 haltigen, Hydrogelen erfolgte unter der Leitung von Dr. Rainer Wittig im Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik, (ILM) an der Universität Ulm. Die genaue experimentelle Vorgehensweise findet sich in der Publikation „*Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability*“.^[125]

10.6.2 Konfokale Laser-Mikroskopie (KLM)

Zur qualitativen Visualisierung der Aufnahme von MSN in Zellen (C2C12 und MC3T3) wurden diese nach einer entsprechenden Kultivierungsdauer sowohl in einer 2D- als auch in einer 3D-Zellkultur durch Zugabe von Paraformaldehyd-Lösung (4 Vol%) fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurde der Zellkern durch Zugabe von DAPI (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 5 min bei RT gefärbt. Überschüssige DAPI-Lösung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Im Anschluss wurde das Zytoskelett durch eine 30-minütige Inkubation mit Phalloidin-TRITC (50 nM) bei RT gefärbt. Auch nach dieser Inkubation wurde überschüssiges Phalloidin-TRITC durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Die gefärbten Proben wurden abschließend mit PBS-Puffer überschichtet und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

Die Detektion der unterschiedlichen Fluorophore in konfokalen Lasermikroskopischen Messungen erfolgte durch Verwendung unterschiedlicher Laser. Für die Detektion von DAPI wurde ein Laser der Emissionswellenlänge 405 nm, für Phalloidin-TRITC ein Laser der Emissionswellenlänge 552 nm und für ATTO647N markierte Partikel ein Laser der Emissionswellenlänge 638 nm verwendet.

10.6.3 Konfokale RAMAN-Mikroskopie (KRM) Parameter

Für die Probenpräparation wurde zunächst ein hybrides RADA16-I Hydrogel, bestehend aus RADA16-I und MSN oder RADA16-I und HeLa-Zellen bzw. RADA16-I, MSN und HeLa-Zellen, hergestellt (die Präparation erfolgte analog zu Kapitel VII.10.1). Die Konzentration der verwendeten S200-NH₂ Partikel innerhalb der finalen Hydrogellösung betrug 0,5 mg/mL. Die Zelldichte der verwendeten HeLa-Zellen betrug 6,25 Mio Zellen /1 mL Sucroselösung (aq., 10 Gew%). Nach einer Inkubationszeit von 12 h in Zellmedium (DMEM +10 % FCS + Penicillin + Streptavidin) wurden die gebildeten hybriden Hydrogele mit einem Spatel aus dem Zellmedium entfernt und auf einen Objektträger mit Vertiefung positioniert. Um ein Austrocknen der Proben während der KRM-Messungen zu verhindern, wurden diese mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack verschlossen.

11. 3D-Verdruckung eines HS basierten hybriden Hydrogels

11.1 Herstellung der Einzelkomponenten

11.1.1 Partikelsynthese

Die Durchführung der Partikelsynthese von S400-NH₂ und S400-OH Partikeln erfolgte analog zu Kapitel VII.3.1.

11.1.1.2 Post-synthetische Modifikation zur Herstellung von S400-COOH Partikeln

Die Durchführung der Oberflächenmodifikation zur Herstellung von S400-COOH Partikeln, ausgehend von S400-OH, erfolgte analog zu Kapitel VII.6.2.

11.1.1.3 Fluoreszenzfarbstoffmarkierung

Die Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs erfolgte analog zu Kapitel VII.7 mittels EDC/NHS Kupplung. Dabei wurden S400-NH₂ Partikel mit ATTO647N und S400-COOH Partikel mit ATTO488 funktionalisiert.

11.1.2 Synthese und Charakterisierung von P(AGE-co-G) und (PG-SH)

Die Synthese von P(AGE-co-G) und (PG-SH) erfolgte von Simone Stichler am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut (Universitätsklinikum Würzburg) unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Groll. Details sind

der Veröffentlichung *“Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds”*^[173] zu entnehmen.

11.1.3 Goldnanopartikel (AuNP) Synthese, Funktionalisierung und Charakterisierung

Die Synthese der verwendeten Goldnanopartikel wurde von Susanne Feineis am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut (Universitätsklinikum Würzburg) unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Groll durchgeführt. Details sind der Veröffentlichung *“Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds”*^[173] zu entnehmen.

11.2 Langzeitdispersionsstabilität in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)

Die Bestimmung der Dispersionsstabilität erfolgte analog zu Kapitel VII.8, wobei das verwendete Medium gegen PBS-Puffer getauscht wurde.

11.3 Rheologische Messungen

Die rheologischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Tomasz Jüngst am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut (Universitätsklinikum Würzburg) unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Groll durchgeführt. Die gewählten Druckparameter sind der Veröffentlichung *“Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds”*^[173] zu entnehmen.

11.4 Herstellung der Druckpaste

Für die Herstellung einer Druckpaste wurde zunächst das benötigte Volumen einer Partikeldispersion (20 mg/mL in PBS-Puffer) in zwei gleichgroße Teile aufgeteilt. Die eine Hälfte dieser Dispersion wurde anschließend mit einem Allyl-funktionalisierten Polyglycidol und 0,5 Gew% des Photoinitiators Irgacure 2959 vermischt. Die zweite Hälfte der Partikeldispersion wurde mit einem thioolfunktionalisierten Polyglycidol vermischt. Durch Vereinigung beider Partikeldispersionen konnte ein 1:1 Verhältnis der funktionellen Gruppen in beiden funktionalisierten Polyglycidolen (Thiol:Allyl) erzielt werden. In einem abschließenden Schritt wurden 3,5 Gew% Hyaluronsäure (HS, 1,36 MDa) zu der Partikeldispersion gemischt, wodurch die Viskosität der Lösung erhöht wurde und eine finale Polyglycidol-Konzentration von 17 Gew% innerhalb der Druckpaste erhalten wurde.^[173]

Zu beachten ist an dieser Stelle, dass bei der Einbringung der HS eine Bildung von Luftblasen innerhalb der Druckpaste nicht unterbunden werden konnte. Eine Entfernung dieser Luftblasen war nicht möglich.

11.5 3D-Verdruckung

Der Druckprozess wurde von Tomasz Jüngst am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut (Universitätsklinikum Würzburg) unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Groll durchgeführt. Die gewählten Druckparameter sind der Veröffentlichung *“Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds”*^[173] zu entnehmen.

11.6 Quantifizierung der Freisetzung von Goldnanopartikeln

Die Quantifizierung der Freisetzung von unterschiedlich funktionalisierten Goldnanopartikeln durch UV/Vis sowie ICP-MS-Messungen erfolgte durch Tomasz Jüngst und Susanne Feineis am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut (Universitätsklinikum Würzburg) unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Groll. Details sind der Veröffentlichung *“Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds”*^[173] zu entnehmen.

11.7 Biologische Evaluation

11.7.1 Zellkultur

Die Zellkultur von C2C12 Zellen (Myoblasten) erfolgte bei Standardbedingungen (37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit) unter Verwendung von Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM, Zellkulturmedium), welches mit 10 Vol% fötalem Kälberserum (FCS) und den Antibiotika Penicillin und Streptavidin versetzt wurde.

11.7.2 Konfokale Laser-Mikroskopie (KLM)

Die Bestimmung der zellulären Aufnahme von Partikeln, nach ihrer Freisetzung aus gegossenen Gelen, erfolgte in *IBIDI μ -Slide 8 wells*. Hierfür wurde ein gegossenes Gel in eine Ecke einer Zellkammer platziert und anschließend Zellen (3.300 Zellen/mL) um diese herum ausgesät. Während der Inkubationszeit wurde nach zwei Tagen das Zellmedium gewechselt, wobei darauf geachtet wurde, das gegossene Hydrogel nicht zu bewegen. Auf diese Weise sollte lediglich ein Kontakt mit dem Hydrogel und direkt benachbarten Zellen stattfinden, wodurch ein direkter Kontakt zwischen Hydrogel und den restlichen Zellen ausgeschlossen werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von einem, drei, und fünf Tagen wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die zelluläre Aufnahme mittels KLM detektiert (vergleiche Kapitel VII.10.5.2). Um eine Vergleichbarkeit der aufgenommenen Mengen zu ermöglichen, wurde bei allen KLM-Aufnahmen die Laserintensitäten nicht verändert.

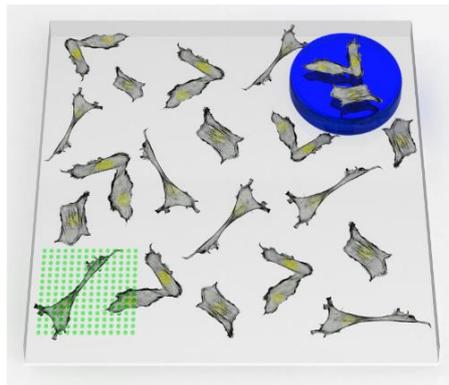


Abbildung 84: Schematische Darstellung der Zellaussaat um ein gegossenes Hydrogel (blau), sowie der zur Bestimmung der zellulären Aufnahme verwendete Detektionsbereichs (grün).

12. Beladung von MSN mit Wirkstoffen

12.1 GW9662

Die Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit GW9662 erfolgte in Cyclohexan. Hierfür wurde eine definierte Menge GW9662 in Cyclohexan gelöst (ca. 17 µg/mL) und jeweils 1 mg Partikel für 12 h bei 80 °C getrocknet. Die getrockneten Partikel wurden anschließend mit 1 mL dieser Lösung bei RT für 24 h inkubiert. Für die Beladung höherer Mengen an Wirkstoff wurde das Lösemittel nach dieser Inkubationszeit durch Zentrifugation entfernt und die zurückbleibenden Partikel erneut mit 1 mL einer frischen ca. 17 µg/mL GW9662 Lösung inkubiert. Während der gesamten Inkubation wurde unter Sauerstoffausschluss (Argon-Atmosphäre) gearbeitet. Abschließend wurden die Partikel durch Zentrifugation (6.000 rpm, 10 min) separiert. Die im Überstand befindliche Menge an Wirkstoff wurde mittels UV/Vis Messung bestimmt. Hierfür wurde durch Abgleich der ermittelten Absorption bei 261 nm mit einer zuvor aufgenommenen Kalibriergeraden die exakte Konzentration im Überstand bestimmt. Die zugrundeliegende Kalibriergerade ist in Abbildung 108 im Anhang dargestellt.

12.2 Wnt-Agonist

Die Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit Wnt-Agonist erfolgte in Dichlormethan (DCM). Nach dem Lösen definierter Mengen des Wirkstoffs in Cyclohexan wurden jeweils 1 mg getrocknete Partikel mit je 1 mL unterschiedlich konzentrierter Lösungen für 24 h inkubiert. Abschließend wurden die Partikel durch Zentrifugation (6.000 rpm, 10 min) separiert. Die im Überstand befindliche Menge an Wirkstoff wurde mittels UV/Vis Messung bestimmt. Hierfür wurde durch Abgleich der ermittelten Absorption bei 295 nm mit einer zuvor aufgenommenen Kalibriergeraden die exakte Konzentration im Überstand bestimmt. Die zugrundeliegende Kalibriergerade ist in Abbildung 108 im Anhang dargestellt.

12.3 Roscovitin

Die Beladung von S200-NH₂ sowie S200-COOH mit Roscovitin erfolgte ebenfalls in Dichlormethan (DCM). Nach dem Lösen definierter Mengen des Wirkstoffs in Cyclohexan wurden jeweils 1 mg getrocknete Partikel mit je 1 mL unterschiedlich konzentrierter Lösungen für 24 h bei RT inkubiert. Die Separation von Partikeln und Lösemittel erfolgte anschließend durch Zentrifugation (6.000 rpm, 10 min). Zur Bestimmung der im Überstand verbleibenden Menge an Roscovitin wurden UV/Vis Messungen durchgeführt. Hierfür wurde durch Abgleich der ermittelten Absorption bei 291 nm mit einer zuvor aufgenommenen Kalibriergeraden die exakte Konzentration im Überstand bestimmt. Die zugrundeliegende Kalibriergerade ist in Abbildung 108 im Anhang dargestellt.

VIII Anhang

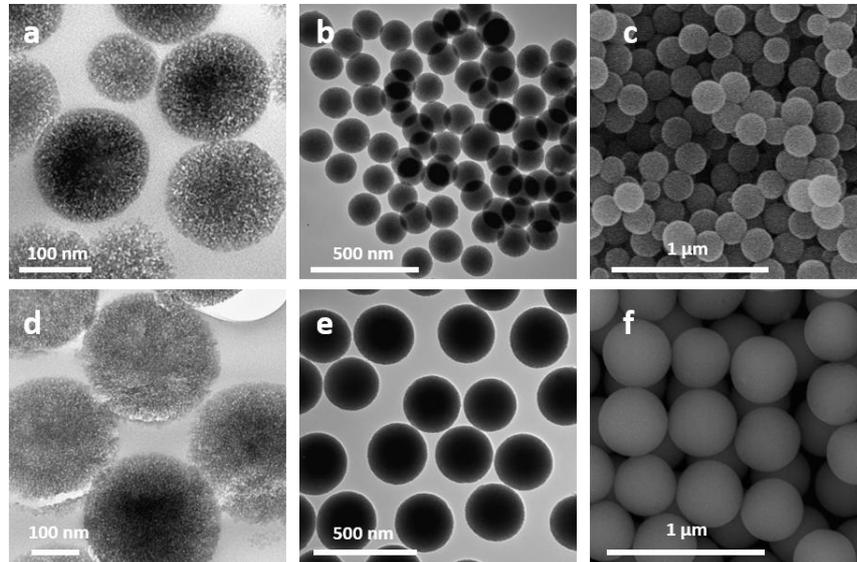


Abbildung 85: Elektronenmikroskopische Visualisierung der Porosität und Größenverteilung von eingesetzten, -COOH funktionalisierten Partikeln. A) Querschnitt von S200-COOH Partikeln, b) TEM-Aufnahme von S200-COOH Partikeln und c) REM-Aufnahme von S200-COOH. D) Querschnitt von S400-COOH Partikeln, e) TEM-Aufnahme von S400-COOH Partikeln und f) REM-Aufnahme von S400-COOH.

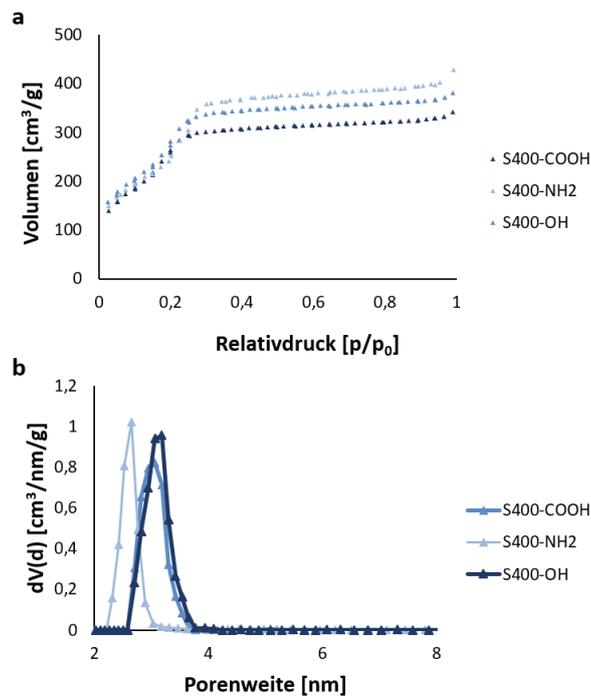


Abbildung 86: A) Stickstoffsorptionsmessung und b) Bestimmung des Porendurchmessers mittels NL-DFT-Methode für sphärische S400 Partikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung.

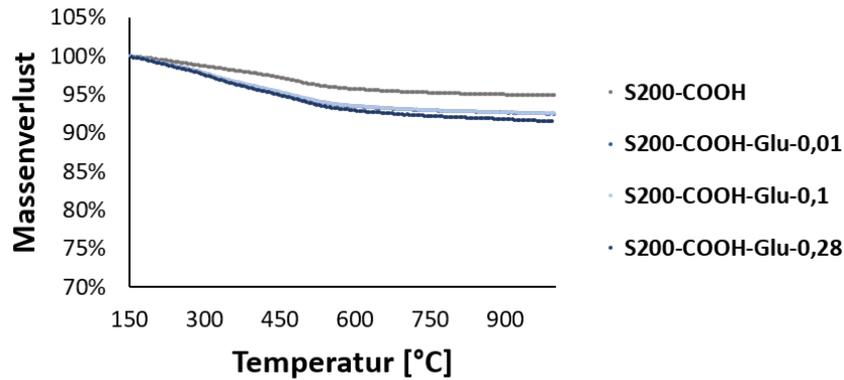


Abbildung 87: TGA-Untersuchung von glucosefunktionalisierten MSN ausgehend von S200-COOH Partikeln mit steigendem Einsatz an Glucosamin.

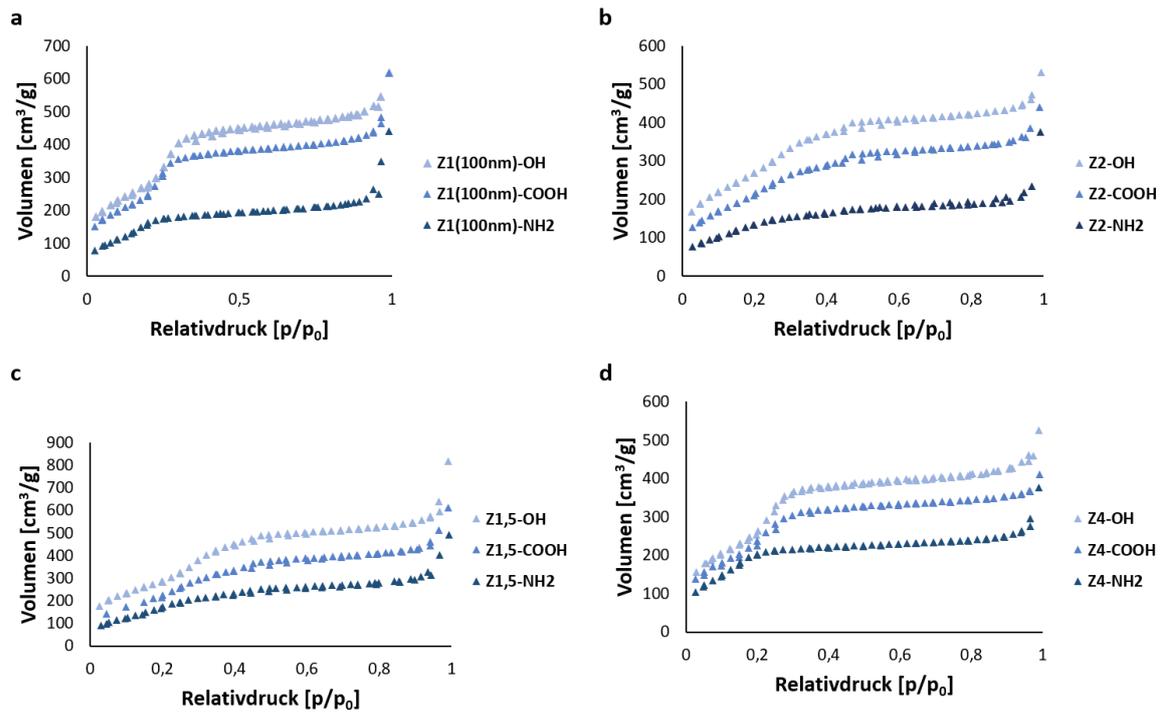


Abbildung 88: Darstellung der Stickstoffsorptionsmessungen mesoporer, sphärischer und stäbchenförmiger Partikel mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. A) sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm, b) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1, c) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 1,5:1, d) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1.

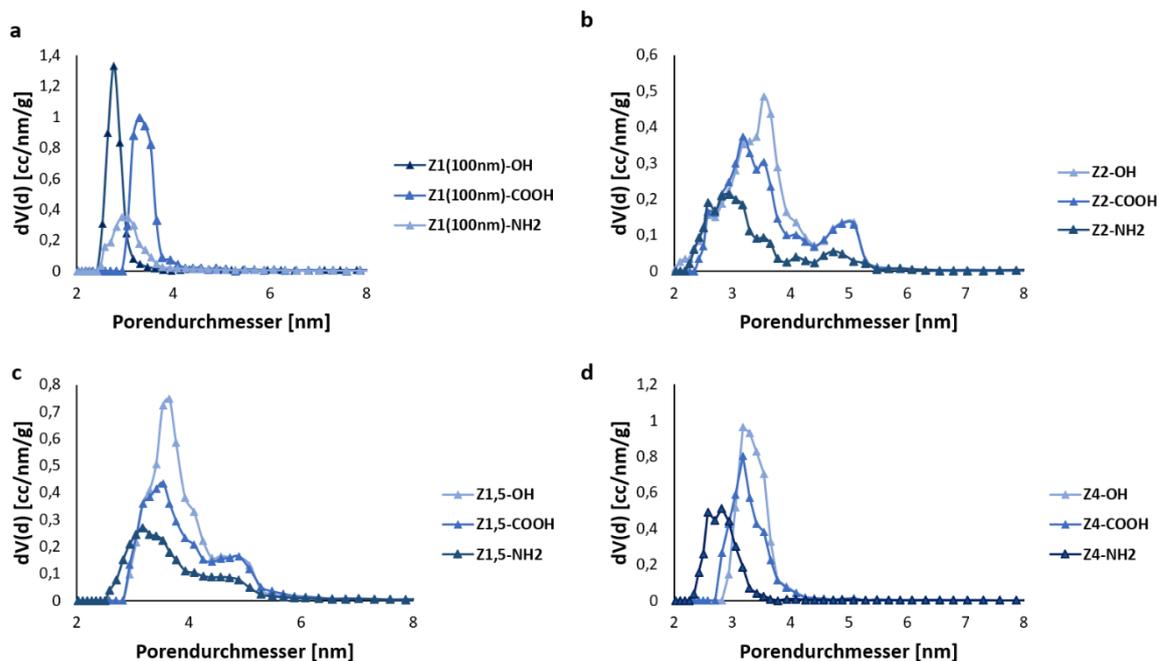


Abbildung 89: Darstellung der Porendurchmesser nach Anwendung der NL-DFT-Methode: a) sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm, b) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1, c) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 1,5:1, d) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1.

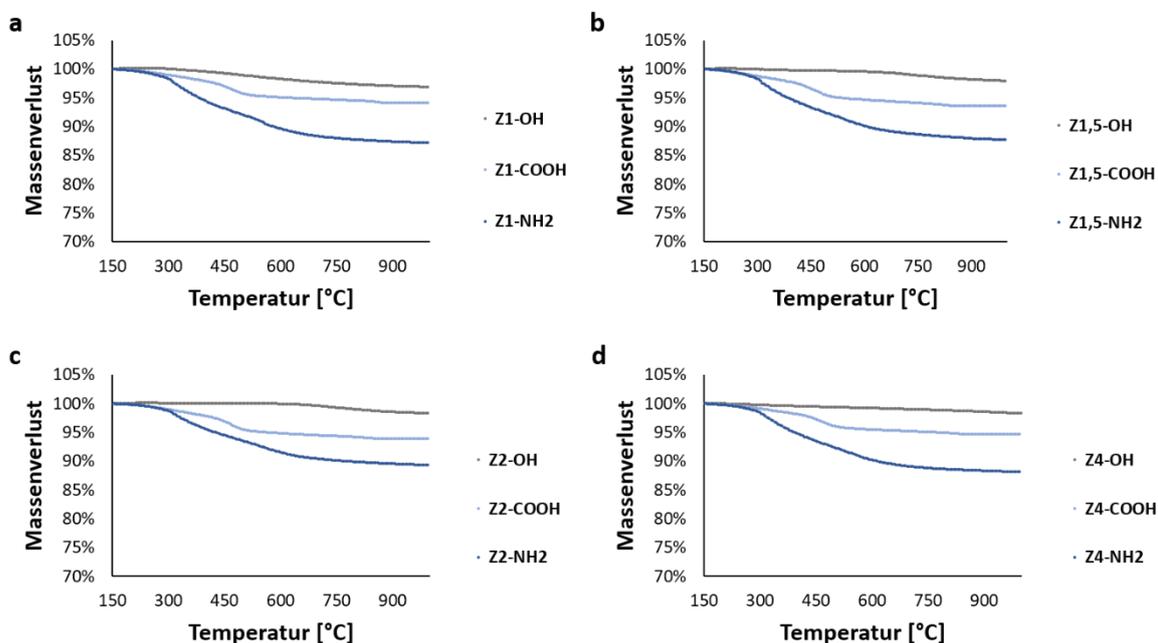


Abbildung 90: Darstellung der mittels TGA bestimmten Massenverluste mesoporöser, sphärischer und stäbchenförmiger Partikel mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. A) sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm, b) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 1,5:1, c) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 2:1, d) stäbchenförmige Partikel mit einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von 4:1.

Alle Messkurven wurden auf eine Temperatur von 150 °C normiert.

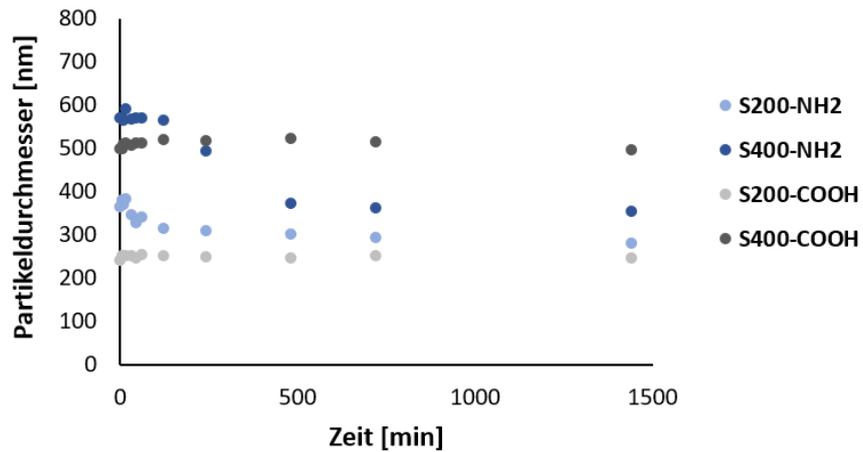


Abbildung 91: Messung der Langzeitdispersionsstabilität für S200 und S400 Partikel unterschiedlicher Partikeloberflächenfunktionalisierung in Sucrose 10 Gew% über einen Zeitraum von 24 h mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS).

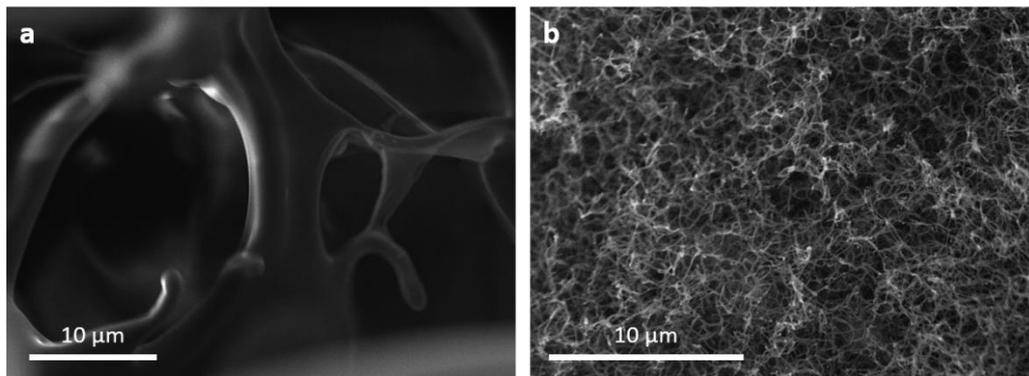


Abbildung 92: REM-Untersuchung von RADA16-I Hydrogelnetzwerken a) ohne und b) mit Austausch des innerhalb des Netzwerks enthaltenen Wassers gegen Ethanol.

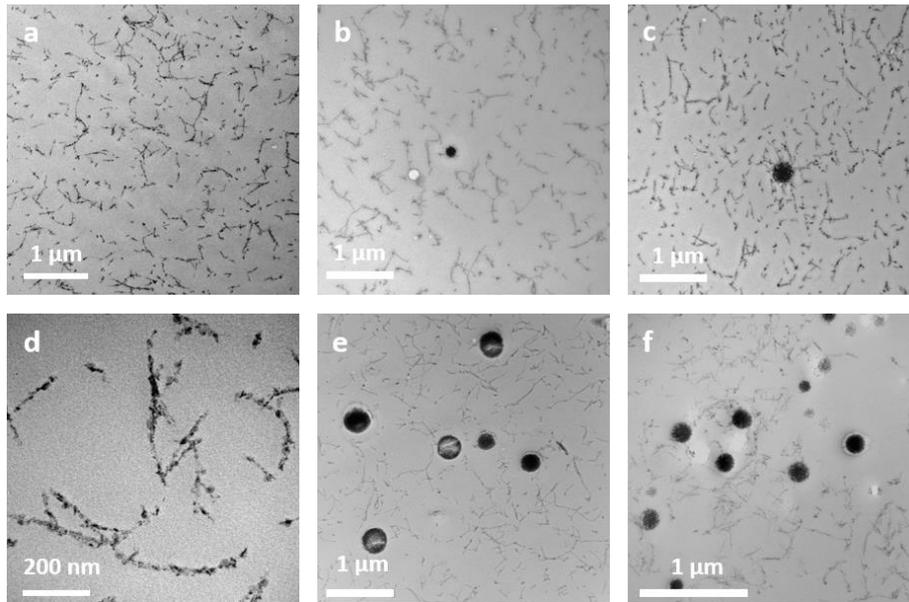


Abbildung 93: TEM-Untersuchungen von RADA16-I Hydrogelen in An- und Abwesenheit von MSN unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierungen. A) pures RADA16-I Hydrogelnetzwerk ohne eingebrachte Partikel, b) 0,5mg/mL S400-NH₂-haltiges Hydrogel, c) 0,5mg/mL S400-COOH-haltiges Hydrogel d) Vergrößerung von ausgebildeten und gefärbten RADA16-I Fibrillen in einem reinen RADA16-I Hydrogel, e) 10 mg/mL S400-NH₂-haltiges Hydrogel, f) 10 mg/mL S400-NH₂-haltiges Hydrogel.

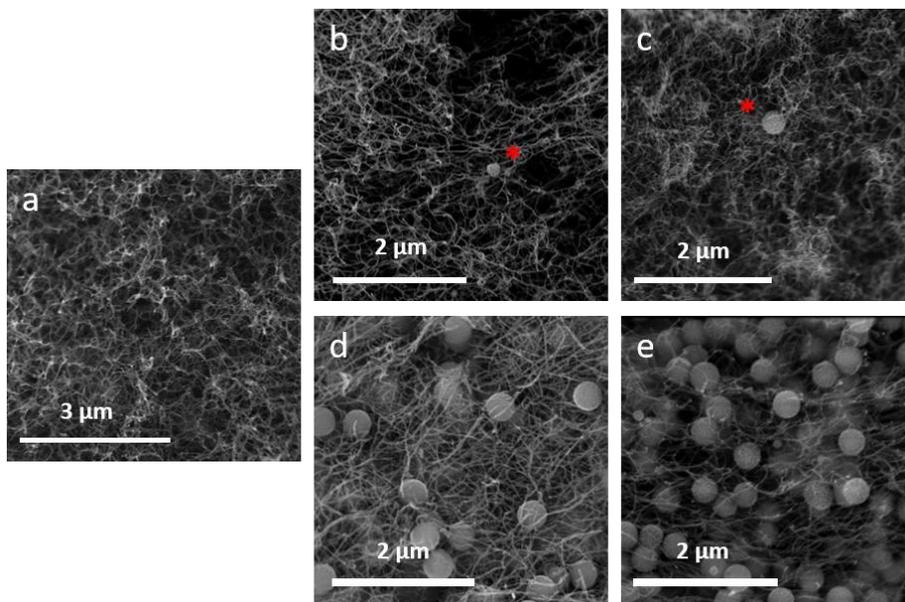


Abbildung 94: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung von (hybriden) Hydrogelen mit eingebrachten MSN verschiedener Oberflächenfunktionalisierung. A) pures RADA16-I Hydrogelnetzwerk, b) S200-NH₂ (0,5 mg/mL), c) S200-COOH (0,5 mg/mL), d) S200-NH₂ (10 mg/mL), e) S200-COOH (10 mg/mL). Die roten Sterne markieren einzelne Partikel auf der Oberfläche des Peptidnetzwerks.

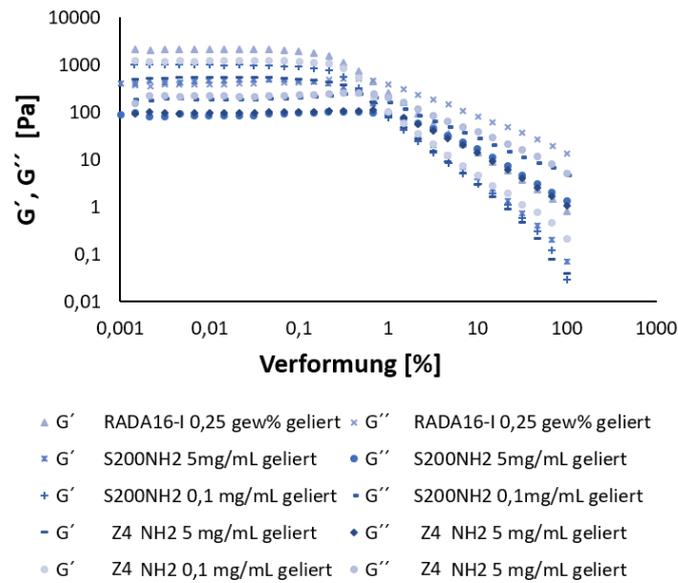


Abbildung 95: Vollständige Darstellung von Amplituden-Sweep Messungen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit NH_2 -funktionalisierten Partikeln unterschiedlicher Form (sphärisch (S200) oder stäbchenförmig (Z4)) im gelierten Zustand.

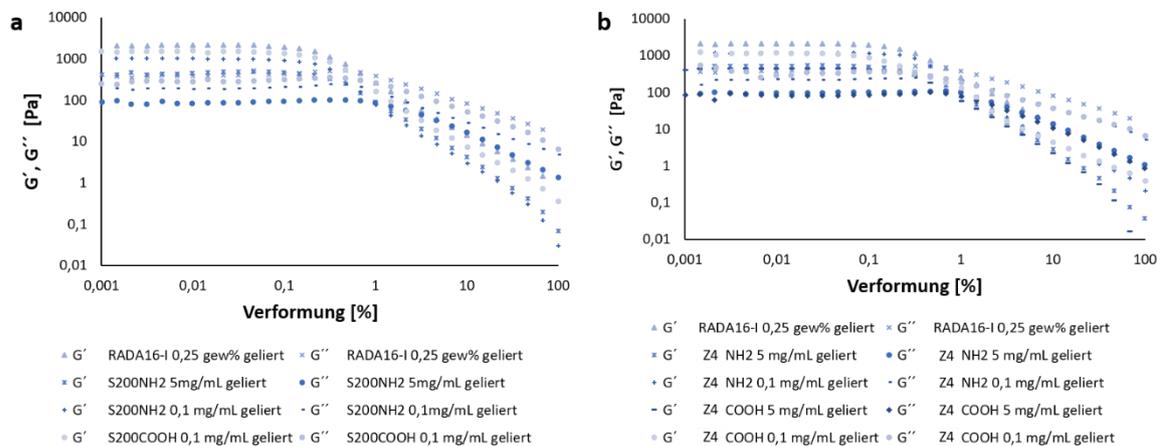


Abbildung 96: Vollständige Darstellung von Amplituden-Sweep Messungen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich geformten Partikeln und unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen ($-\text{NH}_2$ oder $-\text{COOH}$). A) Messungen mit sphärischen S200 Partikeln und b) mit stäbchenförmigen Z4 Partikeln. Alle Messungen erfolgten im gelierten Zustand. * Bei Verwendung einer Konzentration von 5 mg/mL S200-COOH konnte kein stabiles Hydrogel gebildet werden, weshalb diese Messung nicht aufgeführt ist.

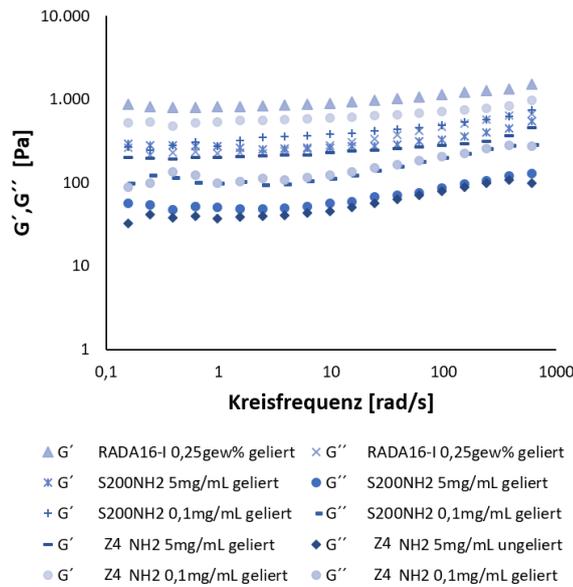


Abbildung 97: Vollständige Darstellung von Frequenz-Sweep Messungen bei einer konstanten Deformation von 0,1% inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich geformten Partikeln (sphärisch (S200) oder stäbchenförmig (Z4)) im gelierten Zustand.

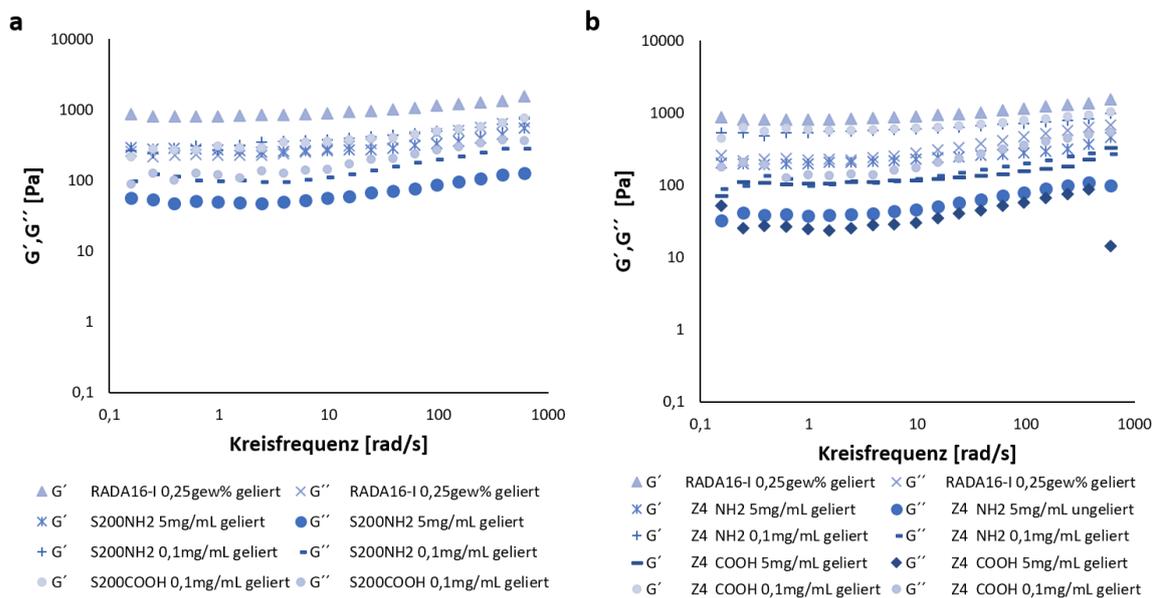


Abbildung 98: Vollständige Darstellung von Frequenz-Sweep Messungen bei einer konstanten Deformation von 0,1% inklusive G' und G'' von injizierbaren hybriden Hydrogelformulierungen mit unterschiedlich geformten Partikeln und unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen (-NH₂ oder -COOH). A) Messungen mit sphärischen S200 Partikeln und b) mit stäbchenförmigen Z4 Partikeln. Alle Messungen erfolgten im gelierten Zustand. * Bei Verwendung einer Konzentration von 5 mg/mL S200-COOH konnte kein stabiles Hydrogel gebildet werden, weshalb diese Messung nicht aufgeführt ist.

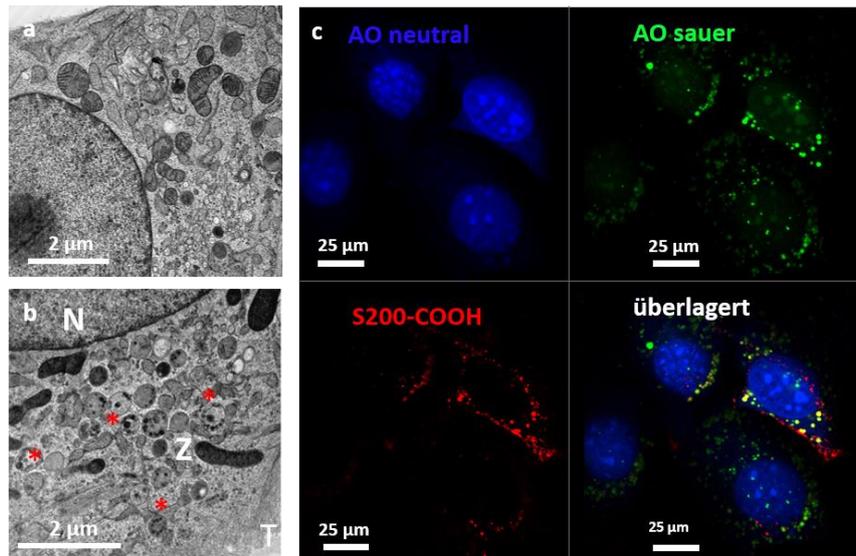


Abbildung 99: A) TEM-Querschnitt einer MC3T3-E1 Zelle ohne Inkubation mit einer Partikeldispersion, b) Visualisierung der Aufnahme von S200-COOH in MC3T3-E1 Zellen mittels TEM-Querschnitten nach Inkubation mit einer 100 µg/mL Partikeldispersion (N= Nucleus, Z= Zytoplasma, T= TEM-Träger Oberfläche, Stern= Aufgenommene S200-COOH Partikel), c) Aufklärung des Aufnahmemechanismus von Partikeln in MC3T3-E1 Zellen mittels Acridiorange-Färbung (blau= Einlagerung in DNA (Zellkern), grün= saure Kompartimente, rot= S200-NH₂ Partikel, gelb= Überlagerung von sauren Kompartimenten und S200-COOH Partikeln). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

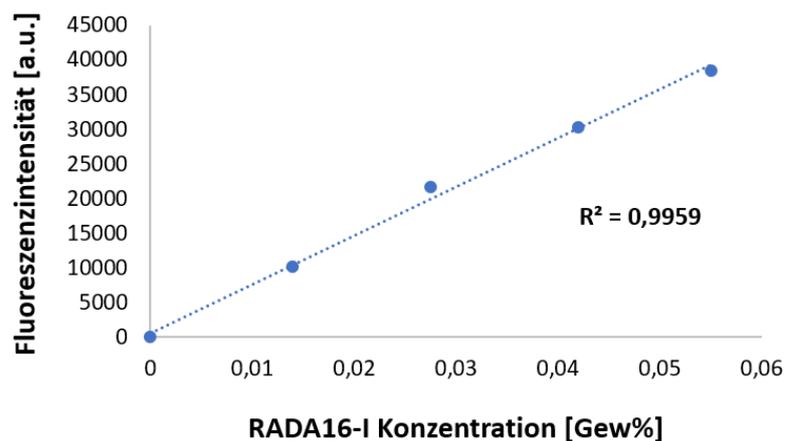


Abbildung 100: Beispielhafte Kalibriergerade zur Auswertung der im Überstand befindlichen Menge an RADA16-I Peptid mittels *Fluorescamin*-Assay.

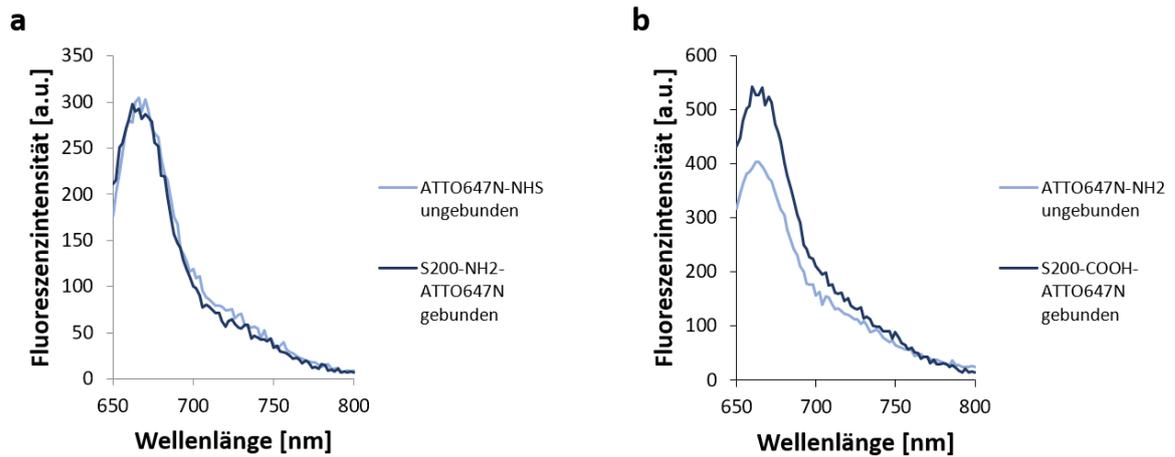


Abbildung 101: Bestimmung der Fluoreszenzspektren vor und nach der Anbindung unterschiedlich funktionalisierter ATTO647N Farbstoffe an die Oberfläche von NH_2 -(a), sowie COOH -funktionalisierter MSN (b). Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Partikelkonzentration von 100 mg/mL in Sucroslösung (10 Gew%).

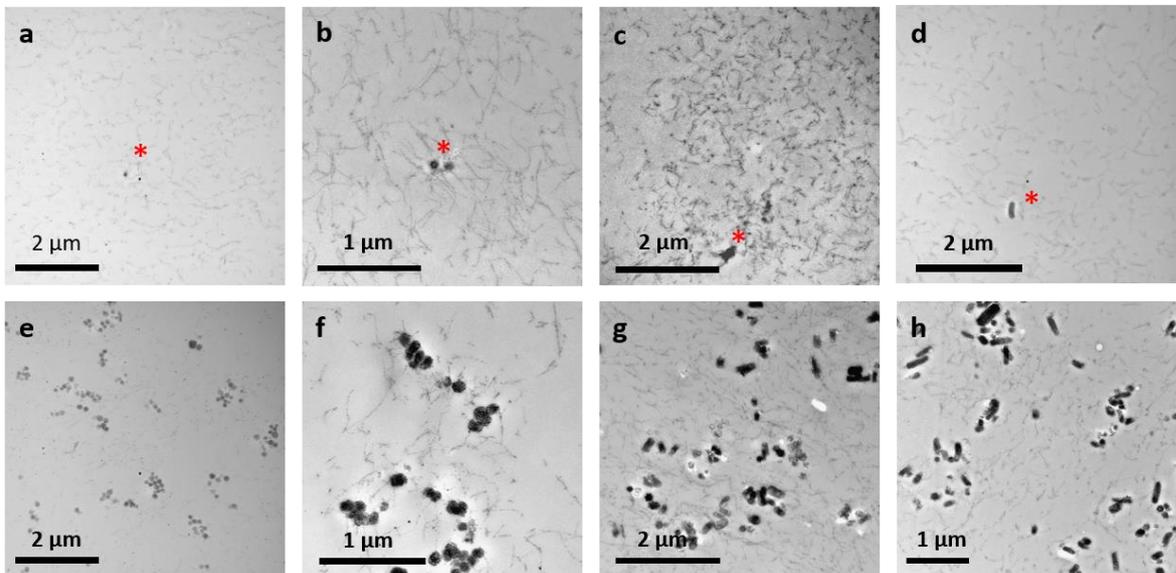


Abbildung 102: TEM-Untersuchung der Verteilung von COOH -funktionalisierten, stäbchenförmigen Partikeln unterschiedlicher Konzentration (0,5 mg/mL oder 10 mg/mL) und unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnissen im Inneren von hybriden Hydrogelnetzwerken.

A) Z1 100nm - 0,5 mg/mL, b) Z1,5 - 0,5 mg/mL, c) Z2 - 0,5 mg/mL, d) Z4 - 0,5 mg/mL,
e) Z1 100nm - 10 mg/mL, f) Z1,5 - 10 mg/mL, g) Z2 - 10 mg/mL, h) Z4 - 10 mg/mL.

Tabelle 16: Bestimmung des Zeta-Potentials von S200 und S400 Partikeln unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierungen vor und nach der Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs (ATTO647N). Die Bestimmung der Zeta-Potentiale erfolgte in 1 mM KCl-Lösung (aq.). Aus „Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: factors influencing cellular uptake and viability“.^[125] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

	S200-NH ₂	S200-COOH	S400-NH ₂	S400-COOH
- ATTO647N	27 ± 1	-33 ± 1	29 ± 1	-35 ± 1
+ ATTO647N	27 ± 1	-30 ± 1	18 ± 1	-30 ± 1

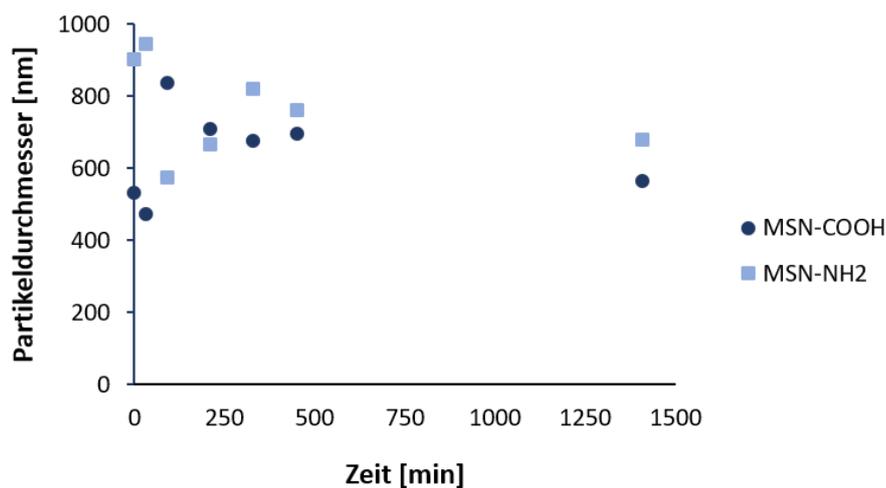


Abbildung 103: Langzeitdispersionsstabilitätsmessungen für S400 Partikel unterschiedlicher Partikeloberflächenfunktionalisierung in Zellkulturmedium mit 10 Vol% fötalem Kälberserum (FCS) über einen Zeitraum von 24 h. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

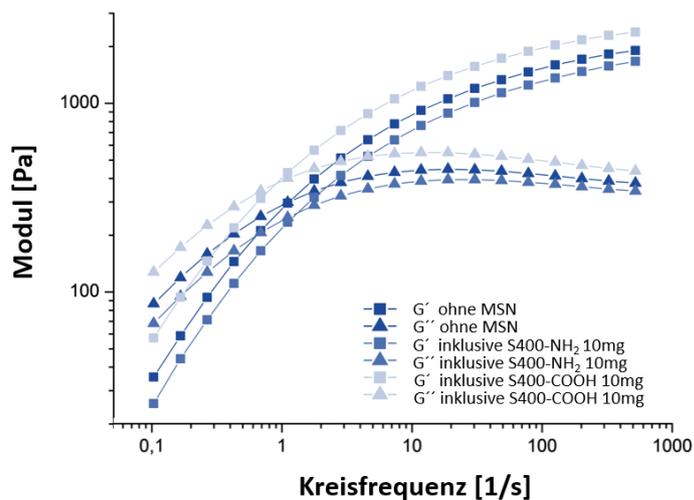


Abbildung 104: Frequenz-Sweep Messungen bei einer konstanten Deformation von 0,1% inklusive G' und G'' von hybriden 3D-druckbaren Hydrogelformulierungen mit und ohne sphärischen Partikeln unterschiedlicher Funktionalisierungen (S400-NH₂ und S400-COOH). Alle Messungen erfolgten im ungelierten Zustand. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

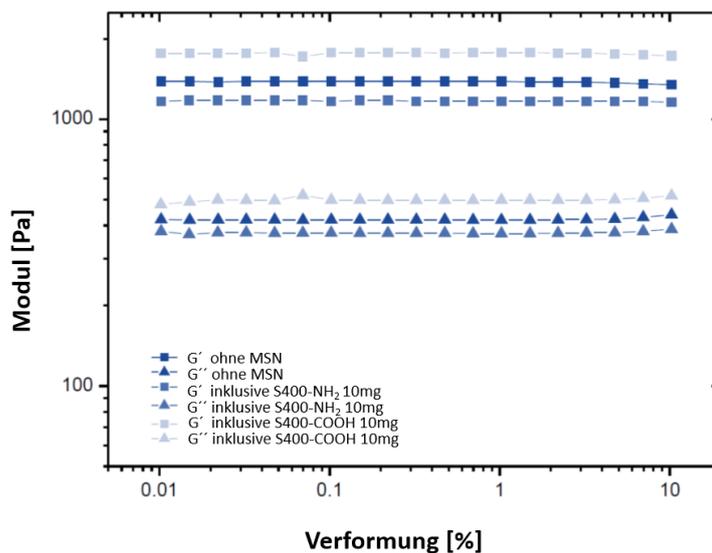


Abbildung 105: Amplituden-Sweep Messungen von hybriden 3D druckbaren Hydrogelformulierungen mit und ohne sphärischen Partikeln unterschiedlicher Funktionalisierungen (S400-NH₂ und S400-COOH) bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz. Alle Messungen erfolgten im ungelierten Zustand. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

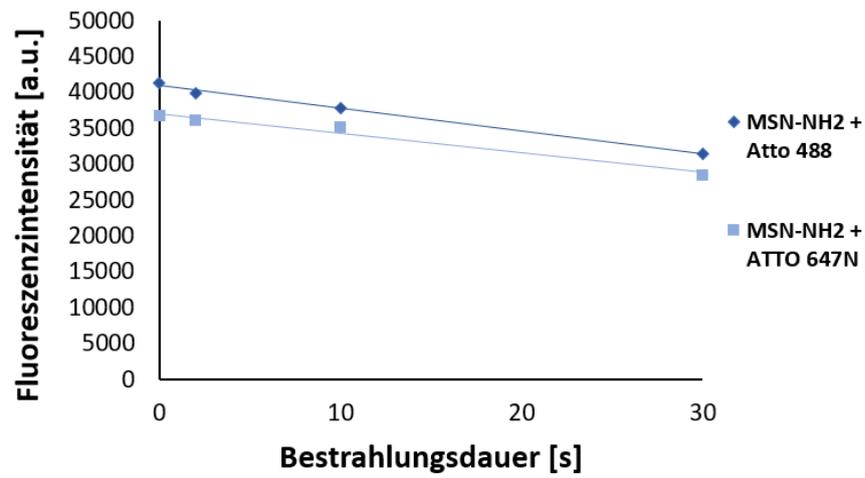


Abbildung 106: Detektion der Fluoreszenzintensität von NH_2 -funktionalisierten Partikeln, welche mit zwei unterschiedlichen ATTO Farbstoffen funktionalisiert wurden. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgte nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten mit einem UV-Laser (bluepoint 4, Dr. Hönle AG), bei 60% Intensität der Maximalleistung.

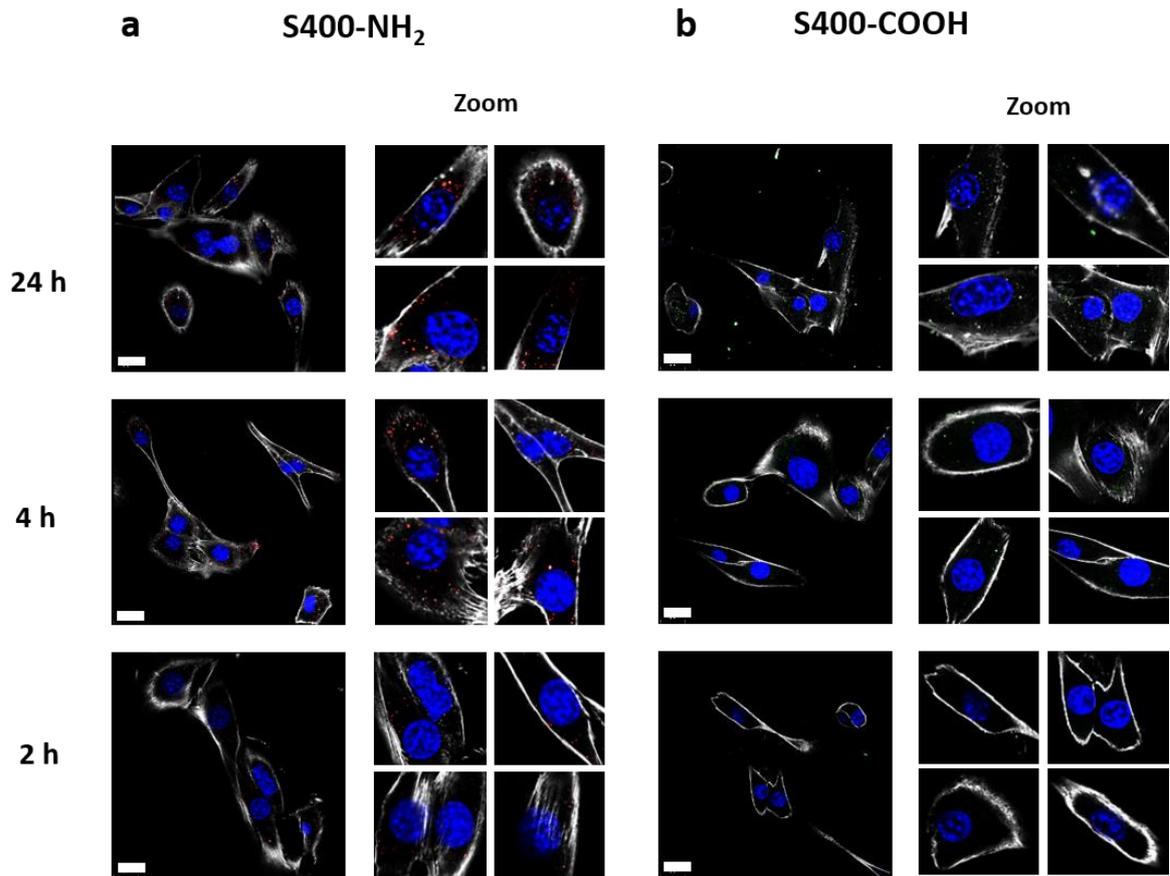


Abbildung 107: A) Aufnahme von S400-NH₂ und b) S400-COOH Partikeln durch C2C12-Zellen in einer klassischen 2D-Zellkultur. Die Aufnahme von Fluoreszenzmarkierten MSN wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 4, 24 h) qualitativ mittels konfokaler Laser-Mikroskopie detektiert. Farbuordnung: Rot=S400-NH₂, grün=S400-COOH, blau=DAPI zur Färbung des Zellkerns, weiß= Phalloidin-TRITC zur Färbung des Zytoskeletts. Für alle Tests wurde eine Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL verwendet. Für eine bessere Darstellung wurden einzelne Zellen in einem Zoom vergrößert dargestellt, um aufgenommene Partikel zu visualisieren. Alle Maßstabsbalken beziehen sich auf 20 µm. Baumann *et al.*, Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, 56, 4623–4628.^[173]
Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

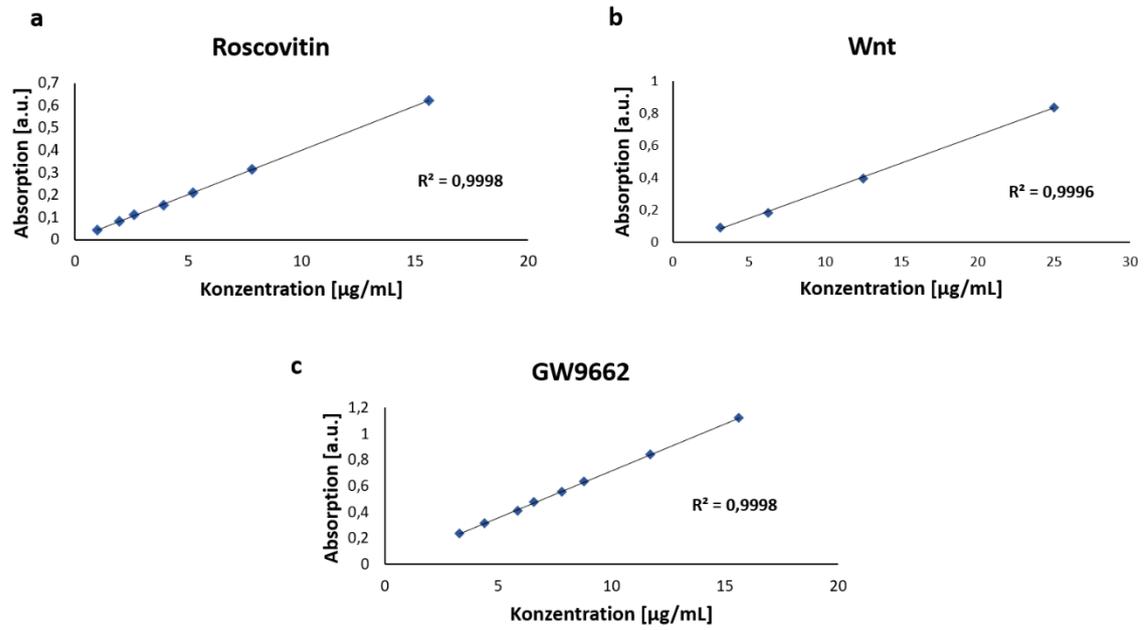


Abbildung 108: Kalibriergeraden der Wirkstoffbeladungen mit a) Roscovitin in DCM, b) Wnt-Agonist in DCM und c) GW9662 in Cyclohexan.

IX Literaturverzeichnis

- [1] D. F. Williams, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5897–5909.
- [2] C. Zhao, A. Tan, G. Pastorin, H. K. Ho, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 654–668.
- [3] R. Langer, J. P. Vacanti, *Science*. **1993**, *260*, 920–926.
- [4] A. S. Mistry, A. G. Mikos, *Regen. Med. II. Adv. Biochem. Eng.* **2005**, *94*, 1–22.
- [5] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 47–55.
- [6] D. O. Freytes, L. Q. Wan, G. Vunjak-Novakovic, *J. Cell. Biochem.* **2009**, *108*, 1047–1058.
- [7] S. Sant, M. J. Hancock, J. P. Donnelly, D. Iyer, A. Khademhosseini, *Can. J. Chem. Eng.* **2010**, *88*, 899–911.
- [8] S. J. Hollister, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 518–524.
- [9] B. Balakrishnan, R. Banerjee, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4453–4474.
- [10] C. C. Huang, S. Ravindran, Z. Yin, A. George, *Biomaterials* **2014**, *35*, 5316–5326.
- [11] Y. Wang, S. Shang, C. Li, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *11*, 3–18.
- [12] K. Ren, C. He, C. Xiao, G. Li, X. Chen, *Biomaterials* **2015**, *51*, 238–249.
- [13] C. Romagnoli, F. D. Asta, M. L. Brandi, *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2013**, *10*, 155–161.
- [14] D. D. Dewitt, S. N. Kaszuba, D. M. Thompson, J. P. Stegemann, *Tissue Eng. Part A* **2009**, *15*, 2785–2793.
- [15] P. Gunatillake, R. Mayadunne, R. Adhikari, *Biotechnol. Annu. Rev.* **2006**, *12*, 301–347.
- [16] A. Bari, N. Bloise, S. Fiorilli, G. Novajra, M. Vallet-Regí, G. Bruni, A. Torres-Pardo, J. M. González-Calbet, L. Visai, C. Vitale-Brovarone, *Acta Biomater.* **2017**, *55*, 493–504.
- [17] I. M. El-Sherbiny, M. H. Yacoub, *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2013**, *38*, 317–342.
- [18] S. R. Shin, Y.-C. Li, H. L. Jang, P. Khoshakhlagh, M. Akbari, A. Nasajpour, Y. S. Zhang, A. Tamayol, A. Khademhosseini, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *105*, 255–274.
- [19] I. V. Yannas, *J. Cell. Biochem.* **1994**, *56*, 188–191.
- [20] D. Lee, W.-K. Ko, D.-S. Hwang, D. N. Heo, S. J. Lee, M. Heo, K.-S. Lee, J.-Y. Ahn, J. Jo, I. K. Kwon, *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 381–386.
- [21] L. Zhang, K. Xia, Z. Lu, G. Li, J. Chen, Y. Deng, S. Li, F. Zhou, N. He, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 1794–1798.
- [22] T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 13–22.

- [23] G. F. Muschler, C. Nakamoto, L. G. Griffith, *J. Bone Joint Surg. Am.* **2004**, *86*, 1541–1558.
- [24] B. Klenkler, H. Sheardown, *Exp. Eye Res.* **2004**, *79*, 677–688.
- [25] J. Imanishi, K. Kamiyama, I. Iguchi, M. Kita, C. Sotozono, S. Kinoshita, *Prog. Retin. Eye Res.* **2000**, *19*, 113–129.
- [26] B. V. Somayaji, U. Jariwala, P. Jayachandran, K. Vidyalakshmi, R. V. Dudhani, *J. Periodontol.* **1998**, *69*, 409–413.
- [27] J. S. Price, A. F. Tencer, D. M. Arm, G. A. Bohach, *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 281–286.
- [28] Z. Ruszczak, W. Friess, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1679–1698.
- [29] W. M. Saltzman, *MRS Bull.* **1996**, *21*, 62–65.
- [30] A. Zieris, S. Prokoph, K. R. Levental, P. B. Welzel, M. Grimmer, U. Freudenberg, C. Werner, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7985–7994.
- [31] R. Gruber, H. A. Weich, C. Dullin, H. Schliephake, *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20*, 24–30.
- [32] H. Schliephake, H. A. Weich, J. Schulz, R. Gruber, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, *83*, 455–462.
- [33] J. L. Holloway, H. Ma, R. Rai, J. A. Burdick, *J. Control. Release* **2014**, *191*, 63–70.
- [34] X. He, J. Ma, E. Jabbari, *Langmuir* **2008**, *24*, 12508–12516.
- [35] O. Jeon, S. J. Song, S.-W. Kang, A. J. Putnam, B.-S. Kim, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2763–2771.
- [36] X. Xu, A. K. Jha, R. L. Duncan, X. Jia, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 3050–3059.
- [37] X. Yu, A. Khalil, P. N. Dang, E. Alsberg, W. L. Murphy, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 3082–3093.
- [38] S. K. Lopac, M. P. Torres, J. H. Wilson-Welder, M. J. Wannemuehler, B. Narasimhan, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *91*, 938–947.
- [39] K. V. Brown, B. Li, T. Guda, D. S. Perrien, S. A. Guelcher, J. C. Wenke, *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17*, 1735–1746.
- [40] Y. Chen, R. K. McCulloch, B. N. Gray, *J. Control. Release* **1994**, *31*, 49–54.
- [41] P. Calvo, C. Remunan-López, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1431–1436.
- [42] P. Yilgor, N. Hasirci, V. Hasirci, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *93*, 528–536.
- [43] P. Yilgor, K. Tuzlakoglu, R. L. Reis, N. Hasirci, V. Hasirci, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3551–3559.
- [44] H. Shokry, U. Vanamo, O. Wiltschka, J. Niinimäki, M. Lerche, K. Levon, M. Lindén, C. Sahlgren, *Nanoscale* **2015**, *7*, 14434–14443.

- [45] M. Colilla, B. González, M. Vallet-Regí, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 114–134.
- [46] M. C. Gomes, Â. Cunha, T. Trindade, J. P. C. Tomé, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **2016**, *9*, 1630005.
- [47] A. Mehmood, H. Ghafar, S. Yaqoob, U. F. Gohar, B. Ahmad, *J. Dev. Drugs* **2017**, *6*, 174–187.
- [48] S. Kwon, R. K. Singh, R. A. Perez, E. A. A. Neel, H.-W. Kim, W. Chrzanowski, *J. Tissue Eng.* **2013**, *4*, 1–18.
- [49] M. Liong, J. Lu, M. Kovoichich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi, J. I. Zink, *ACS Nano* **2008**, *2*, 889–896.
- [50] T. Liu, L. Li, X. Teng, X. Huang, H. Liu, D. Chen, J. Ren, J. He, F. Tang, *Biomaterials* **2011**, *32*, 1657–1668.
- [51] V. Mamaeva, J. M. Rosenholm, L. T. Bate-Eya, L. Bergman, E. Peuhu, A. Duchanoy, L. E. Fortelius, S. Landor, D. M. Toivola, M. Lindén, Cecilia Sahlgren, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1538–1546.
- [52] M. Beck, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 18566–18574.
- [53] I. A. Rahman, V. Padavettan, *J. Nanomater.* **2012**, Article ID 132424, DOI 10.1155/2012/132424.
- [54] U. Schubert, N. Hüsing, *Synthesis of Inorganic Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [55] C. J. Brinker, G. W. Scherer, *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Inc, New York, **1990**.
- [56] M. Kosmulski, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *337*, 439–448.
- [57] D. W. Schaefer, *Science* **1989**, *243*, 1023–1027.
- [58] R. Sato-Berrú, J. M. Saniger, J. Flores-Flores, M. Sanchez-Espíndola, *J. Mater. Sci. Eng. A* **2013**, *3*, 237–242.
- [59] F. Schüth, *Angew. Chemie* **2003**, *115*, 3730–3750.
- [60] L. Han, S. Che, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3740–3752.
- [61] H.-P. Lin, C.-Y. Mou, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 927–935.
- [62] Y. S. Lee, D. Surjadi, J. F. Rathman, *Langmuir* **1996**, *12*, 6202–6210.
- [63] A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka, *Science* **1993**, *261*, 1299–1303.
- [64] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chemie* **2006**, *118*, 3290–3328.
- [65] D. Böcking, O. Wiltschka, J. Niinimäki, H. Shokry, R. Brenner, M. Lindén, C. Sahlgren, *Nanoscale* **2014**, *6*, 1490–1498.

- [66] J. Kobler, T. Bein, *ACS Nano* **2008**, *2*, 2324–2330.
- [67] C. Lesaint, F. Frébault, C. Delacôte, B. Lebeau, C. Marichal, A. Walcarius, J. Patarin, *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2005**, *156*, 925–932.
- [68] E. Niemelä, D. Desai, Y. Nkizinkiko, J. E. Eriksson, J. M. Rosenholm, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *96*, 11–21.
- [69] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res.* **2008**, *1*, 99–115.
- [70] J. M. Rosenholm, A. Meinander, E. Peuhu, R. Niemi, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Lindén, *ACS Nano* **2009**, *3*, 197–206.
- [71] K. Yano, Y. Fukushima, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1579–1584.
- [72] M. Beck, Mesoporöse Silikananopartikel als Transportsysteme für miRNA und Wirkstoffmoleküle für die Therapie von Krebsstammzellen, Universität Ulm, Dissertation, **2018**.
- [73] B. P. Toole, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 528–539.
- [74] B. P. Toole, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7462–7468.
- [75] X. Xu, A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-Carson, X. Jia, *Soft Matter* **2012**, *8*, 3280–3294.
- [76] R. Stern, *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 317–325.
- [77] C. M. McKee, M. B. Penno, M. Cowman, M. D. Burdick, R. M. Strieter, C. Bao, P. W. Noble, *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 2403–2413.
- [78] M. R. Horton, C. M. McKee, C. Bao, F. Liao, J. M. Farber, J. Hodge-Dufor, E. Puré, B. L. Oliver, T. M. Wright, P. W. Noble, *J Biol Chem* **1998**, *273*, 35088–35094.
- [79] P. Teriete, S. Banerji, M. Noble, C. D. Blundell, A. J. Wright, A. R. Pickford, E. Lowe, D. J. Mahoney, M. I. Tammi, J. D. Kahmann, I. D. Campell, A. J. Day, D. G. Jackson, *Mol. Cell* **2004**, *13*, 483–496.
- [80] N. Itano, F. Atsumi, T. Sawai, Y. Yamada, O. Miyaishi, T. Senga, M. Hamaguchi, K. Kimata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 3609–14.
- [81] K.-J. Bai, A. P. Spicer, M. M. Mascarenhas, L. Yu, C. D. Ochoa, H. G. Garg, D. A. Quinn, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, *172*, 92–98.
- [82] B. Beck-Schimmer, B. Oertli, T. Pasch, R. P. Wüthrich, *J. Am. Soc. Nephrol.* **1998**, *9*, 2283–2290.
- [83] A. Zoltan-Jones, L. Huang, S. Ghatak, B. P. Toole, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45801–45810.
- [84] J. M. Jameson, G. Cauvi, L. L. Sharp, D. A. Witherden, W. L. Havran, *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 1269–1279.
- [85] M. Slevin, J. Krupinski, J. Gaffney, S. Matou, D. West, H. Delisser, R. C. Savani, S. Kumar, *Matrix Biol.* **2007**, *26*, 58–68.
- [86] M. Slevin, S. Kumar, J. Gaffney, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41046–41059.

- [87] R. A. Stile, T. A. Barber, D. G. Castner, K. E. Healy, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *61*, 391–398.
- [88] M. Ma, H. Chen, Y. Chen, K. Zhang, X. Wang, X. Cui, J. Shi, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 5615–5621.
- [89] X. Huang, L. Li, T. Liu, N. Hao, H. Liu, D. Chen, F. Tang, *ACS Nano* **2011**, *5*, 5390–5399.
- [90] J. Thiele, Y. Ma, S. M. C. Bruekers, S. Ma, W. T. S. Huck, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 125–148.
- [91] N. Zagris, *Micron* **2001**, *32*, 427–438.
- [92] D. Gullberg, P. Ekblom, *Int. J. Dev. Biol.* **1995**, *39*, 845–54.
- [93] P. S. Shetye, A. Godbole, S. Bhilegaokar, P. Gajare, *Int. J. Res. Methodol.* **2015**, *1*, 47–71.
- [94] E. M. Ahmed, *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 105–121.
- [95] N. Das, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5*, 112–117.
- [96] M. McKenzie, D. Betts, A. Suh, K. Bui, L. D. Kim, H. Cho, *Molecules* **2015**, *20*, 20397–20408.
- [97] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267.
- [98] T. R. Hoare, D. S. Kohane, *Polymer* **2008**, *49*, 1993–2007.
- [99] R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*, Academic Press Inc, New York, **2000**.
- [100] A. Atala, P. L. Robert, *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press Inc, New York, **2001**.
- [101] B. Palsson, J. A. Hubbell, R. Plonsey, J. D. Bronzino, *Tissue engineering*, CRC Press, Boca Raton, **2003**.
- [102] S. Zhang, T. Holmes, C. Lockshin, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 3334–3338.
- [103] S. Zhang, F. Gelain, X. Zhao, *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15*, 413–420.
- [104] S. Zhang, *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 321–339.
- [105] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1171–1178.
- [106] J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, A. J. Grodzinsky, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 9996–10001.
- [107] D. M. Marini, W. Hwang, D. A. Lauffenburger, S. Zhang, R. D. Kamm, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 295–299.
- [108] F. Gelain, D. Bottai, A. Vescovi, S. Zhang, *PLoS One* **2006**, *1*, 119–129.
- [109] C. A. E. Hauser, S. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2780–2790.

- [110] L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry*, New York, **1960**.
- [111] A. Horii, X. Wang, F. Gelain, S. Zhang, *PLoS One* **2007**, *2*, 190–198.
- [112] P. Arosio, M. Owczarz, H. Wu, A. Butté, M. Morbidelli, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 1617–1626.
- [113] S. Zhang, R. Ellis-Behnke, X. Zhao, *PuraMatrix: Self-assembling Peptide Nanofiber Scaffolds*, **o. J.**, http://www.3d-matrix.co.jp/dl_file/PuraMatrix_Introduction.pdf. Stand 18.07.18.
- [114] R. G. Ellis-Behnke, Y.-X. Liang, S.-W. You, D. K. C. Tay, S. Zhang, K.-F. So, G. E. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 5054–5059.
- [115] T. C. Holmes, S. de Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 6728–6733.
- [116] N. Kishimoto, Y. Momota, Y. Hashimoto, T. Omasa, J. Kotani, **2011**, *8*, 151–161.
- [117] T. Matsumoto, M. Tadokoro, K. Hattori, H. Ougushi, J. Satou, *Bioceram. Dev. Appl.* **2011**, *1*, 1–4.
- [118] R. Yoshimi, Y. Yamada, K. Ito, S. Nakamura, A. Abe, T. Nagasaka, K. Okabe, T. Kohgo, S. Baba, M. Ueda, *J. Craniofac. Surg.* **2009**, *20*, 1523–1530.
- [119] R. G. Ellis-Behnke, Y.-X. Liang, D. K. C. Tay, P. W. F. Kau, G. E. Schneider, S. Zhang, W. Wu, K.-F. So, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2006**, *2*, 207–215.
- [120] C. E. Semino, J. R. Merok, G. G. Crane, G. Panagiotakos, S. Zhang, *Differentiation* **2003**, *71*, 262–270.
- [121] X. Ji, J. E. Hampsey, Q. Hu, J. He, Z. Yang, Y. Lu, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3656–3662.
- [122] N. Buchtová, G. Réthoré, C. Boyer, J. Guicheux, F. Rambaud, K. Vallé, P. Belleville, C. Sanchez, O. Chauvet, P. Weiss, J. L. Bideau, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 1875–1884.
- [123] F. Fiorini, E. A. Prasetyanto, F. Taraballi, L. Pandolfi, F. Monroy, I. López-Montero, E. Tasciotti, L. De Cola, *Small* **2016**, *12*, 4881–4893.
- [124] R. L. Frozza, A. Bernardi, K. Paese, J. B. Hoppe, T. Da Silva, A. M. Battastini, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, C. Salbego, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2010**, *6*, 694–703.
- [125] B. Baumann, R. Wittig, M. Lindén, *Nanoscale* **2017**, *9*, 12379–12390. [10.1039/C7NR02015E](https://doi.org/10.1039/C7NR02015E). Stand 26.07.18.
- [126] H.-M. Chan, L. Xiao, K.-M. Yeung, S.-L. Ho, D. Zhao, W.-H. Chan, H.-W. Li, *Biomaterials* **2012**, *33*, 4443–4450.
- [127] P. S. Vassar, C. F. A. Culling, *Arch. Pathol.* **1959**, *68*, 487 – 494.
- [128] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy, S. Singh, *J. Struct. Biol.* **2005**, *151*, 229–238.
- [129] H. Yokoi, T. Kinoshita, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 8414–8419.

- [130] T. G. Mezger, *Das Rheologie Handbuch*, Vincentz Network, Hannover, **2016**.
- [131] J. M. Zuidema, C. J. Rivet, R. J. Gilbert, F. A. Morrison, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 1063–1073.
- [132] G. Repetto, A. del Peso, J. L. Zurita, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131.
- [133] B.-H. Lee, B. Li, S. A. Guelcher, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1693–1702.
- [134] R. Matteoni, T. E. Kreis, *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 1253–1265.
- [135] W. Walker, M. Tarannum, J. Vivero-Escotoa, *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* **2016**, *21*, 1254–1262.
- [136] I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14792–14793.
- [137] T.-H. Chung, S.-H. Wu, M. Yao, C.-W. Lu, Y.-S. Lin, Y. Hung, C.-Y. Mou, Y.-C. Chen, D.-M. Huang, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2959–2966.
- [138] M. Fisichella, H. Dabboue, S. Bhattacharyya, G. Lelong, M.-L. Saboungi, F. Warmont, P. Midoux, C. Pichon, M. Guérin, T. Hevor, J. P. Salvetat, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 2314–24.
- [139] E. Fröhlich, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577–5591.
- [140] Y. Shi, M. L. Miller, A. J. Di Pasqua, *Comments Inorg. Chem.* **2016**, *36*, 61–80.
- [141] D. Tarn, C. E. Ashley, M. Xue, E. C. Carnes, J. I. Zink, C. J. Brinker, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 792–801.
- [142] T. Asefa, Z. Tao, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2265–2284.
- [143] N. P. Mortensen, G. B. Hurst, W. Wang, C. M. Foster, P. D. Nallathamby, S. T. Retterer, *Nanoscale* **2013**, *5*, 6372–6380.
- [144] P. R. Leroueil, S. A. Berry, K. Duthie, G. Han, V. M. Rotello, D. Q. McNerny, J. R. Baker Jr., B. G. Orr, M. M. B. Holl, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 420–424.
- [145] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- [146] T. Xia, M. Kovochich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J. I. Yeh, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2008**, *2*, 2121–2134.
- [147] S. Aits, M. Jaattela, *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 1905–1912.
- [148] F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung, C.-Y. Mou, *Small* **2009**, *5*, 1408–1413.
- [149] N. Hao, L. Li, F. Tang, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 2508–2538.
- [150] X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, J. He, *Biomaterials* **2010**, *31*, 438–448.
- [151] S. Shahabi, S. Döscher, T. Bollhorst, L. Treccani, M. Maas, R. Dringen, K. Rezwan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 26880–26891.
- [152] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786.

- [153] Z. Ye, H. Zhang, H. Luo, S. Wang, Q. Zhou, X. Du, C. Tang, L. Chen, J. Liu, Y. K. Shi, R. Ellis-Behnke, X. Zhao, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 152–162.
- [154] S. Shahabi, L. Treccani, R. Dringen, K. Rezwani, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 13821–13833.
- [155] R. Bawa, S.-Y. Fung, A. Shiozaki, H. Yang, G. Zheng, S. Keshavjee, M. Liu, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8*, 647–654.
- [156] Q. He, J. Zhang, J. Shi, Z. Zhu, L. Zhang, W. Bu, L. Guo, Y. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1085–1092.
- [157] A. Yildirim, E. Ozgur, M. Bayindir, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1909.
- [158] O. Tirosh, Y. Barenholz, J. Katzhendler, A. Prieval, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1371–1379.
- [159] D. D. Lasic, F. J. Martin, A. Gabizon, S. K. Huang, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1070*, 187–192.
- [160] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149–158.
- [161] R. P. Garay, R. El-Gewely, J. K. Armstrong, G. Garratty, P. Richette, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 1319–1323.
- [162] H. Meng, S. Yang, Z. Li, T. Xia, J. Chen, Z. Ji, H. Zhang, X. Wang, S. Lin, C. Huang, Z. H. Zhou, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2011**, *5*, 4434–4447.
- [163] D. Sen Karaman, S. Sarwar, D. Desai, E. M. Björk, M. Odén, P. Chakrabarti, J. M. Rosenholm, S. Chakraborti, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 3292–3304.
- [164] K. K. Jain, *Nanomedicine* **2012**, *7*, 1225–1233.
- [165] K. H. Grote, J. Feldhusen, *Taschenbuch für den Maschinenbau*, Springer, Heidelberg, **2011**.
- [166] H. Cho, U. Jammalamadaka, K. Tappa, *Materials (Basel)*. **2018**, *11*, 1–15.
- [167] H.-S. Yoon, J.-Y. Lee, H.-S. Kim, M.-S. Kim, E.-S. Kim, Y.-J. Shin, W.-S. Chu, S.-H. Ahn, *Int. J. Precis. Eng. Manuf. - Green Technol.* **2014**, *1*, 261–279.
- [168] *Apprecia Pharmaceuticals* **2015**, NDA Freigabe, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2015/207958Orig1s00ltr.pdf. Stand 18.07.18.
- [169] B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang, J. T. Butcher, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101*, 1255–1264.
- [170] T. Billiet, M. Vandenhoute, J. Schelfhout, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, *Biomaterials* **2012**, *33*, 6020–6041.
- [171] J. Malda, J. Visser, F. P. Melchels, T. Jüngst, W. E. Hennink, W. J. A. Dhert, J. Groll, D. W. Huttmacher, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5011–5028.
- [172] T. Jungst, W. Smolan, K. Schacht, T. Scheibel, J. Groll, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1496–1539.

- [173] B. Baumann, T. Jungst, S. Stichler, S. Feineis, O. Wiltshka, M. Kuhlmann, M. Lindén, J. Groll, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*, 4623–4628. <https://doi.org/10.1002/anie.201700153>. Stand 26.07.18.
- [174] S. Stichler, T. Jungst, M. Schamel, I. Zilkowski, M. Kuhlmann, T. Böck, T. Blunk, J. Teßmar, J. Groll, *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 273–285.
- [175] S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer, R. H. Stauber, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 772–781.
- [176] J. M. Rosenholm, E. Peuhu, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Lindén, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3308–3311.
- [177] J. M. Rosenholm, M. Lindén, *J. Control. Release* **2008**, *128*, 157–164.
- [178] J. Andersson, J. Rosenholm, S. Areva, M. Lindén, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4160–4167.
- [179] L. Nicole, C. Boissière, D. Grosso, A. Quach, C. Sanchez, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3598–3627.
- [180] D. S. Shephard, W. Zhou, T. Maschmeyer, J. M. Matters, C. L. Roper, S. Parsons, B. F. G. Johnson, M. J. Duer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1998**, *37*, 2719–2723.
- [181] T. Yokoi, H. Yoshitake, T. Tatsumi, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 951–957.
- [182] M. H. Lim, A. Stein, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3285–3295.
- [183] A. Calvo, P. C. Angelomé, V. M. Sánchez, D. A. Scherlis, F. J. Williams, G. J. A. A. Soler-Illia, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4661–4668.
- [184] K. Braun, A. Pochert, M. Gerber, H. F. Raber, M. Lindén, *Mol. Syst. Des. Eng.* **2017**, *2*, 393–400.
- [185] V. Z. Prokopovic, A. S. Vikulina, D. Sustr, E. M. Shchukina, D. G. Shchukin, D. V. Volodkin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 38908–38918.
- [186] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87–106.
- [187] M. Rabe, D. Verdes, J. Zimmermann, S. Seeger, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13971–13980.

Danksagung

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Curriculum Vitae

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden zuvor bereits veröffentlicht in:

Zeitschriftenbeiträge:

- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Lindén,
Nanoscale **2017**, 9, 12379-12390.

– Auswahl als Backcover dieser Ausgabe –

[10.1039/C7NR02015E](https://doi.org/10.1039/C7NR02015E). Stand 26.07.18.



- Bernhard Baumann*, Tomasz Jungst*, Simone Stichler, Susanne Feineis, Oliver Wiltschka, Matthias Kuhlmann, Mika Lindén, Jürgen Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 4623–4628.
(*contributed equally)

<https://doi.org/10.1002/anie.201700153>. Stand 26.07.18

Fachvorträge:

- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden –

“A 3D printable hybrid hydrogel formulation with tunable particle release”, Doktoranden-
unter-sich-Seminar, 2017, 15. Statusworkshop der Baden-Württemberg-Stiftung,
Bad Herrenalb (Deutschland).

3. Vortragspreis

- Bernhard Baumann*, Tomasz Jungst*, Simone Stichler, Susanne Feineis, Oliver Wiltschka,
Matthias Kuhlmann, Mika Lindén, Jürgen Groll –

“3D Printing of hybrid hydrogel containing mesoporous silica nanoparticles enabling a
tunable particle release”, 5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and
Nanomaterials, Lissabon (Portugal).

- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden –

“Injectable hybrid-hydrogelmaterial with functionalized mesoporous silica nanoparticles
for tissue engineering”, Doktoranden-unter-sich-Seminar, 2014, 12. Statusworkshop der
Baden-Württemberg-Stiftung, Bad Herrenalb (Deutschland).

Posterbeiträge:

- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden - “A mesoporous silica nanoparticles containing injectable Hybrid Hydrogel for tissue engineering applications”, Doktoranden-
unter-sich-Seminar, 2017, 15. Statusworkshop der Baden-Württemberg-Stiftung,
Bad Herrenalb (Deutschland).

1. Posterpreis

- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden - “A new hybrid hydrogel for tissue
engineering applications based on a combination of mesoporous silicananoparticles and a
self-assembling peptide”, 2017, 15. Statusworkshop der Baden-Württemberg-Stiftung,
Bad Herrenalb (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden - “Preparation and characterization of a
new hybrid hydrogel for tissue engineering”, 2017, 6. Forschungstag der Baden-
Württemberg-Stiftung, Stuttgart (Deutschland).
- Bernhard Baumann*, Tomasz Jungst*, Simone Stichler, Susanne Feineis, Oliver Wiltchka,
Matthias Kuhlmann, Mika Lindén, Jürgen Groll – “Preparation of a mesoporous silica
nanoparticles containing hybrid hydrogel by 3D printing technique”, 2017, 29. Deutsche
Zeolith-Tagung, Frankfurt am Main (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden – “Injectable hybrid hydrogel – a
combination of RADA16-I and mesoporous silica nanoparticles with different size and
shape”, Doktoranden-unter-sich-Seminar, 2016, 14. Statusworkshop der Baden-
Württemberg-Stiftung, Bad Herrenalb (Deutschland)

2. Posterpreis

- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden – “Injectable Hybrid Hydrogel for tissue
engineering applications”, 2016, 14. Statusworkshop der Baden-Württemberg-Stiftung,
Bad Herrenalb (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden – “A injectable hybrid hydrogel as a new
material for tissue engineering applications”, 2015, Crossing Biological Barriers – Advances
in Nanocarrier Design for Targeted Drug Delivery, Dresden (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden – “Mesoporous silica nanoparticles as drug
carriers”, Doktoranden-unter-sich-Seminar, 2015, 13. Statusworkshop der Baden-
Württemberg-Stiftung, Bad Herrenalb (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden - “HyPeSite- Hybrid peptide silica hydrogel
for tissue engineering“, 2015, 13. Statusworkshop der Baden-Württemberg-Stiftung,
Bad Herrenalb (Deutschland)

- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden - “Mesoporous silica nanoparticle containing injectable hybrid hydrogel for drug delivery and tissue engineering”, 2015, NanoBioMater Summerschool, Bad Herrenalb (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden - “Injectable hybrid hydrogel with surface-functionalized mesoporous silica nanoparticles as drug delivery system for tissue engineering”, 2015, 5. Forschungstag der Baden-Württemberg-Stiftung, Stuttgart (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden – “Surface-functionalized mesoporous silica nanoparticles as drug delivery system for tissue engineering applications”, 2015, 27. Deutsche Zeolith-Tagung, Oldenburg (Deutschland).
- Bernhard Baumann, Rainer Wittig, Mika Linden – “Towards cell-directed drug delivery within injectable hydrogels for tissue engineering”, 2014, Doktoranden-unter-sich-Seminar, 12. Statusworkshop der Baden-Württemberg-Stiftung, Bad Herrenalb (Deutschland).

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Synthese und Charakterisierung hybrider Hydrogele für die Geweberekonstruktion“

selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten, gegebenenfalls auch elektronischen Medien, entnommen sind, wurden durch eine Quellenangabe kenntlich gemacht. Alle mit dieser Arbeit unmittelbar im Zusammenhang stehenden praktischen Leistungen wurden von mir selbständig erbracht. Diese Arbeit hat in dieser oder einer ähnlichen Form noch nicht im Rahmen einer anderen Prüfung vorgelegen.

(Ort, Datum)

(Bernhard Harry Baumann)