

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Strukturierungsmethoden für Seidenfibroin-Scaffolds

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Katrin Baumann

aus Freudenstadt

Würzburg, Oktober 2017

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. med. Torsten Blunk

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19. März 2018

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Gewidmet
meiner geliebten Großmutter

Mit Geduld und Zeit
wird aus dem Maulbeerbaum ein
Seidenkleid.

Karl Simrock

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Kenntnisstand	4
2.1	Seide: Vorkommen, chemische Struktur und Eigenschaften.....	4
2.1.1	Vorkommen	4
2.1.2	Chemische Struktur	5
2.1.3	Eigenschaften	7
2.2	Seidenfibroin-Lösungen.....	10
2.2.1	Herstellung von Seidenfibroin-Lösungen.....	10
2.2.2	Mechanismus des Sol- zu Gelübergangs.....	12
2.3	Weiterverarbeitungsmethoden des Seidenfibroins	13
2.3.1	Biomaterialien aus Seidenfibroin-Lösungen	14
2.3.2	Seidenfibroin-Komposit-Scaffolds	15
2.4	Mineralisation von Seidenfibroin-Scaffolds	16
2.4.1	Calciumphosphate	16
2.4.2	Calciumphosphat-Zemente.....	18
2.5	Gefrierstrukturierung	20
2.5.1	Gerichtete Erstarrung wässriger Lösungen.....	21
2.5.2	Konstitutionelle Unterkühlung	21
2.5.3	Nicht-planare Erstarrungsfront	23
3	Material und Methoden	27
3.1	Herstellung der Seidenfibroin-Lösungen.....	27
3.2	Konzentrationsbestimmung und Aufkonzentrierung.....	28
3.3	Herstellung der Seidenfibroin-Scaffolds.....	29
3.3.1	MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds	29

3.3.2	Bruschi-Seidenfibroin-Scaffolds	30
3.4	pH-Wert Messung	30
3.5	Druckfestigkeitsmessung	31
3.6	Zugfestigkeitsmessung.....	33
3.7	Phasenanalyse mittels Röntgendiffraktometrie (XRD)	35
3.8	Gefrierstrukturierung	36
3.8.1	Manuelle Gefrierstrukturierung.....	36
3.8.2	Maschinelle Gefrierstrukturierung	37
3.8.3	Mineralisation von gefrierstrukturierten Seidenfibroin-Scaffolds	39
3.9	Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)	39
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Charakterisierung der Seidenfibroin-Chargen	41
4.2	Mechanische Charakterisierung I - Druckfestigkeit	42
4.2.1	Statische Druckfestigkeitsmessung	42
4.2.2	Dynamische Druckfestigkeitsmessung.....	44
4.3	Mechanische Charakterisierung II – Zugfestigkeit.....	46
4.4	Analytik der Phasenzusammensetzung.....	49
4.4.1	MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds	49
4.4.2	Bruschi-Seidenfibroin-Scaffolds	51
4.5	Morphologie der Seidenfibroin-Scffolds	53
4.5.1	Lyophilisierte Seidenfibroin-Lösungen.....	53
4.5.2	MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds	54
4.5.3	Bruschi-Seidenfibroin-Scaffolds	56
4.6	Generierung anisotroper Porenstrukturen im Seidenfibroin-Scaffold	58
4.6.1	Manuelle Gefrierstrukturierung.....	59
4.6.2	Maschinelle Gefrierstrukturierung (ACD)	60

4.6.3	Mineralisation der gefrierstrukturierten Seidenfibroin-Scaffolds	62
5	Diskussion	65
5.1	Charakterisierung der MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds	65
5.1.1	Einfluss der MCPA-Phosphorsäure-Lösung	65
5.1.2	Einfluss der Seidenfibroin-Konzentration	69
5.1.3	Einfluss der Lagerungszeit	73
5.2	Charakterisierung der Bruschi-Seidenfibroin-Scaffolds.....	75
5.2.1	Einfluss der Einlagemethode des Scaffolds	76
5.2.2	Einfluss des Ausgangszustands des Scaffolds.....	77
5.3	Charakterisierung der anisotropen Porenstruktur	77
5.3.1	Einfluss der Gefrierstrukturierungsmethode	78
5.3.2	Einfluss der Seidenfibroin-Konzentration	79
5.3.3	Einfluss der Mineralisation der gefrierstrukturierten Seidenfibroin-Scaffolds	80
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	82
7	Literaturverzeichnis	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	<i>Bombyx mori</i> – Darstellung der verschiedenen Stadien dieser Schmetterlingsart.	5
Abbildung 2-2:	Darstellung der Primär- und Sekundärstruktur von SF der Art <i>Bombyx mori</i>	7
Abbildung 2-3:	Schematische Darstellung der Herstellung von SF-Lösung.	11
Abbildung 2-4:	Schematische Darstellung der drei Phasen des Sol-Gel-Übergangs.	13
Abbildung 2-5:	Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus des dualhärtenden SF-Bruschit-Zements.	20
Abbildung 2-6:	Schematische Darstellung des Konzentrationsverlaufs des gelösten Stoffes vor der planaren Eisfront.	22
Abbildung 2-7:	Schematische Darstellung einer konstitutionell unterkühlten Zone vor einer fortschreitenden planaren Eisfront.	23
Abbildung 2-8:	Schematische Darstellung der möglichen Geometrien der nicht-planaren Eisfront.	25
Abbildung 2-9:	Abhängigkeit der Erstarrungsmorphologie von der Erstarrungsrate und des Temperaturgradienten.	25
Abbildung 3-1:	Getrocknetes und gereinigtes SF nach Lagerung bei 60 °C über Nacht im Trockenschrank.	27
Abbildung 3-2:	Druckfestigkeitsmessung.	32
Abbildung 3-3:	Zugfestigkeitsmessung.	34
Abbildung 3-4:	Versuchsaufbau der manuellen Gefrierstrukturierung.	37
Abbildung 3-5:	Versuchsaufbau der maschinellen Gefrierstrukturierung.	37
Abbildung 4-1:	Darstellung der durchschnittlichen SF-Konzentrationen und deren pH-Werte im Vergleich.	42
Abbildung 4-2:	Spannungs-Dehnungs-Diagramme und E-Moduln der statischen Druckfestigkeitsmessung.	43
Abbildung 4-3:	Spannungs-Dehnungs-Diagramme der dynamischen Druckfestigkeitsmessung.	45

Abbildung 4-4:	Spannungs-Dehnungs-Diagramme und E-Moduln der Zugfestigkeitsmessung.	47
Abbildung 4-5:	Röntgendiffraktogramme der MCPA-SF-Scaffolds.	50
Abbildung 4-6:	Röntgendiffraktogramme mit Intensitäten der Bruschit-SF- Scaffolds.	51
Abbildung 4-7:	REM Aufnahmen der gefriergetrockneten SF-Lösungen.	54
Abbildung 4-8:	REM-Aufnahmen der 4 % MCPA-SF-Scaffolds.	55
Abbildung 4-9:	REM-Aufnahmen eines Bruschit-SF-Scaffold.	57
Abbildung 4-10:	REM-Aufnahme eines zuvor lyophilisierten Bruschit-SF- Scaffold im Querschnitt.	58
Abbildung 4-11:	REM-Aufnahmen der manuell gefrierstrukturierten SF- Scaffolds.	59
Abbildung 4-12:	Temperaturverläufe in der ACD.	60
Abbildung 4-13:	REM-Aufnahmen der maschinell gefrierstrukturierten SF- Scaffolds.	62
Abbildung 4-14:	REM-Aufnahmen nach Mineralisation der gefrierstrukturierten SF-Scaffolds.	63

Abkürzungsverzeichnis

ΔT	Temperaturgradient
μS	Mikrosiemens
2 Ri	in zwei Richtungen gemahlen
α -TCP	α -Tricalciumphosphat
β -TCP	β -Tricalciumphosphat
ACD	Adjustable Cryostructuring Device 5.0
Ala	Alanin
BMP-2	Bone morphogenetic protein-2 (Induziert Knochen- und Knorpelbildung; Schlüsselfunktion in der Differenzierung von Osteoblasten)
Da	Dalton
DCPD	Dicalciumphosphat-Dihydrat
FDA	Food and Drug Administration
Gly	Glycin
h	Höhe
HA	Hydroxylapatit
MCPA	Monocalciumphosphatanhydrat
MCPM	Monocalciumphosphat
MWCO	Molecular Weight Cut Off (Engl.: Trennschärfe bei Membranverfahren anhand des Molekulargewichts einer Substanz)
PEG	Polyethylenglycol
PLGA	Polylactid-Co-Glycolid

REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SF	Seidenfibroin
T-Diff	Temperaturdifferenz
Tyr	Tyrosin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Signalmolekül, das hauptsächlich das vaskuläre Endothel stimuliert)
w/V %	Massen-Volumen-Prozent mit w in g und V in mL
XRD	Röntgendiffraktometrie

1 Einleitung und Problemstellung

Der Bereich Tissue Engineering beschäftigt sich mit der künstlichen Herstellung biologischer Gewebe durch gerichtete Kultivierung von Zellen, um damit krankes Gewebe zu ersetzen oder zu regenerieren. Tissue Engineering wird als Zukunftsalternative für die derzeit klinisch angewendeten Therapien gesehen [1, 2]. Aktuell rekonstruieren Mediziner Gewebe durch allogene, autogene oder xenogene Transplantate oder künstlich hergestellte Ersatzgewebe [3, 4]. Jedoch weist jedes Ersatzgewebe Einschränkungen auf wie zum Beispiel ein limitiertes Spenderangebot, eine geringe Zyto- und Biokompatibilität sowie sehr aufwendige Herstellungsprozesse [3, 5]. Im Gegensatz dazu können die neu entwickelten Gewebekonstrukte nicht nur als gewöhnliches Transplantat fungieren, sondern eröffnen den Weg für 3D-Gewebemodelle, womit Gewebefehlern auf zellulärer wie molekularer Ebene genauer erforscht und spezifiziert werden können [1, 2]. Ziel ist es, ein voll funktionelles Gewebe aus einer Kombination von Zellträgermatrix (Scaffold), gewebespezifischen Zellen und Wachstumsfaktoren oder mechanischen Stimuli zu generieren [6].

Die Neubildung von funktionellem Gewebe benötigt eine geeignete Mikroumgebung, die der des Ursprungsgewebes sehr ähnlich ist, um die gewünschten Zellantworten auszulösen. Solch eine Umgebung wird typischerweise durch 3D-Scaffolds bereitgestellt, die als architektonische Matrizes (Extrazellulärmatrix) fungieren [3, 7]. Außer der Biokompatibilität ist die Übereinstimmung der Degradationszeit mit der Geweberegeneration eine essentielle Voraussetzung, um als Biomaterial für Zellträgermatrizes geeignet zu sein. Zusätzlich sollte das gesuchte Biomaterial ohne Bildung toxischer Substanzen vom Körper abgebaut werden können [5].

Naturpolymere sind eine attraktive Option zur Herstellung solcher Konstrukte, da sie große Ähnlichkeit mit der Extrazellulär-Matrix aufweisen, eine chemische Vielseitigkeit bieten, gute biologische Eigenschaften besitzen und von Natur aus zelluläre Interaktionen induzieren [8]. Seidenfibroin (SF), isoliert aus den Kokons der Seidenraupe *Bombyx mori*, findet schon sehr lange Anwendung als Nahtmaterial im menschlichen Körper [9]. Zusätzlich besticht dieses Material mit besonders guten

Eigenschaften wie mechanischer Festigkeit, Elastizität, Biokompatibilität und kontrollierter Abbaubarkeit [9]. Aus diesen Gründen gilt SF als aussichtsreiches Ausgangsmaterial für Zellträgermatrizes zum Ersatz von Muskel-, Knorpel- sowie Knochengewebe. Letzteres ist eines der am ausführlichsten untersuchten Ansätze im Bereich Tissue Engineering [10, 11]. In einer Studie wurde demonstriert, dass SF-Scaffolds die Calciumphosphatablagerung *in vitro* induzieren können [12].

Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass das Einbringen von Calciumphosphaten, insbesondere das Einlagern von Brushit, in SF-Scaffolds die Knochenregeneration positiv beeinflusst. Brushit (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) wird *in vivo* bei physiologischem pH von 7,4 über Zwischenschritte zu schwer löslichem Hydroxylapatit (HA) umgewandelt oder direkt nach Biodegradation durch neuen Knochen ersetzt [13, 14]. HA weist chemische Ähnlichkeit mit der anorganischen Komponente von Hartgewebe wie Knochen, Sehnen und Zähnen auf. Brushit selbst ist biokompatibel, osteokonduktiv und biologisch abbaubar [15]. Bei der Kombination der mechanischen Eigenschaften und langsamen Degradation von SF mit der Bioaktivität und Osteokonduktivität von den meisten Calciumphosphaten besteht die Chance, ein Material mit einer einzigartigen Eigenschaftskombination herzustellen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung neuer Strukturierungsmethoden für SF-Scaffolds, die das Einlagern von Calciumphosphaten, insbesondere von Brushit, ermöglichen. Die erste Strukturierungsmethode basierte auf der Gelierung der SF-Scaffolds mittels einer sauren Calciumphosphat-Lösung (bestehend aus Phosphorsäure und $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$, MCPA). Anschließend wurde der Einfluss der SF-Konzentration, MCPA-Menge und Einlagedauer auf die mechanischen Eigenschaften und Scaffold-Morphologie analysiert. In einem zweiten Teil wurde β -Tricalciumphosphat (β -TCP) in die SF-Lösung eingearbeitet und anschließend die Gelbildung in Phosphorsäure induziert. Hierbei wurde genauer untersucht, wie sich die Einlagemethode und der Ausgangszustand der SF-Scaffolds auf die Calciumphosphatbildung auswirkten. Die Mineralisierung der SF-Scaffolds wurde bei beiden Methoden mittels Röntgendiffraktometrie (XRD) geprüft. Darüber hinaus weist menschliches Gewebe (Knochen, Sehnen) eine hierarchische Struktur mit ähnlicher chemischer Zusammensetzung und strukturellem Aufbau auf [16]. Zur Imitation dieser

Architektur können Lösungen gerichtet erstarrt und anschließend lyophilisiert werden. Als Folge bildet sich, je nach Ausgangsstoff und angelegtem Temperaturgradienten, eine spezifische Porenstruktur aus [17]. Anisotrope Poren senkrecht zur Scaffold-Oberfläche haben positiven Einfluss auf die Zelladhäsion und -proliferation und führen *in vivo* zu optimierten Heilungsvorgängen [18]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Generierung von anisotropen Poren senkrecht zur SF-Scaffold-Oberfläche, was einen vielversprechenden Fortschritt im Bereich Geweberegeneration auf Basis von SF-Biomaterialien bedeuten würde. So könnten SF-Scaffolds die Extrazellulär-Matrix des ursprünglichen Gewebes noch genauer imitieren. Hierfür wurden SF-Lösungen mittels einer speziell für gerichtete Erstarrung entwickelten Maschine (Adjustable Cryostructuring Device 5.0 (ACD)) und einem manuellen Verfahren per Kupferplatte und Flüssigstickstoff gefrierstrukturiert [18]. Dabei wurde die Einwirkung der Gefrierstrukturierungsmethode und der SF-Konzentration auf die Scaffold-Morphologie charakterisiert. Zum Schluss wurden die gerichtet erstarrten SF-Scaffolds in saurer Calciumphosphat-Lösung geliert und durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) im Hinblick auf Änderungen der Scaffold-Morphologie untersucht.

2 Kenntnisstand

2.1 Seide: Vorkommen, chemische Struktur und Eigenschaften

2.1.1 Vorkommen

Seidenproteine werden in den Seidendrüsen von Seidenraupen, Skorpionen, Spinnen, Milben und Bienen produziert und während deren Metamorphose zu Seidenfäden für den Seidenkokon gesponnen [9, 19, 20]. Der Seidenfaden besteht aus zwei Fibroin-Filamenten, die von einer scheinbar gemeinsamen Hülle aus Serizin, auch Seidenbast oder Seidenkleber genannt, umgeben sind (siehe **Abbildung 2-1 C**) [21, 22]. Dabei machen Fibroin-Filamente 70 % bis 75 % und Serizin 25 % bis 30 % des Molekulargewichts der Seidenfaser aus. Seidenproteine von unterschiedlichen Spezies zeigen Variationen in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften [22-25].

Seide findet vor allem in der Textilindustrie zur Herstellung von Steppjacken, Bettwäsche und Schirmen Anwendung, wird aber auch immer mehr in der Medizin, zum Beispiel als nicht resorbierbares Nahtmaterial oder Zahnseide, eingesetzt [26]. In der Textilindustrie wie auch überwiegend in der seidenbasierten Biomaterialienforschung wird Seide aus Seidenkokons der Art *Bombyx mori*, der auch als Maulbeer-Seidenspinner bekannt ist, bezogen (siehe **Abbildung 2-1 A, B**). Die Seidenkokons von *Bombyx mori* bestehen aus einem ununterbrochenem Seidenstrang (Endlosfaser) von 600 bis 1500 m Länge mit einem Durchmesser von 0,02 mm [21, 27]. Nur wenige Studien haben sich mit der biomedizinischen Anwendung von genetisch verändertem SF, wie zum Beispiel von nicht Maulbeer-Seidenspinnern (z.B. Pfauenspinner (Saturniidae), *Antheraea mylitta*) oder Spinnen (z.B. goldene Seidenspinne (Linnaeus), *Nephila clavipes*) auseinandergesetzt. Dies beruht vor allem auf der jahrelangen Erfahrung und den geringen Kosten im Produktionsprozess der Seide von *Bombyx mori*.

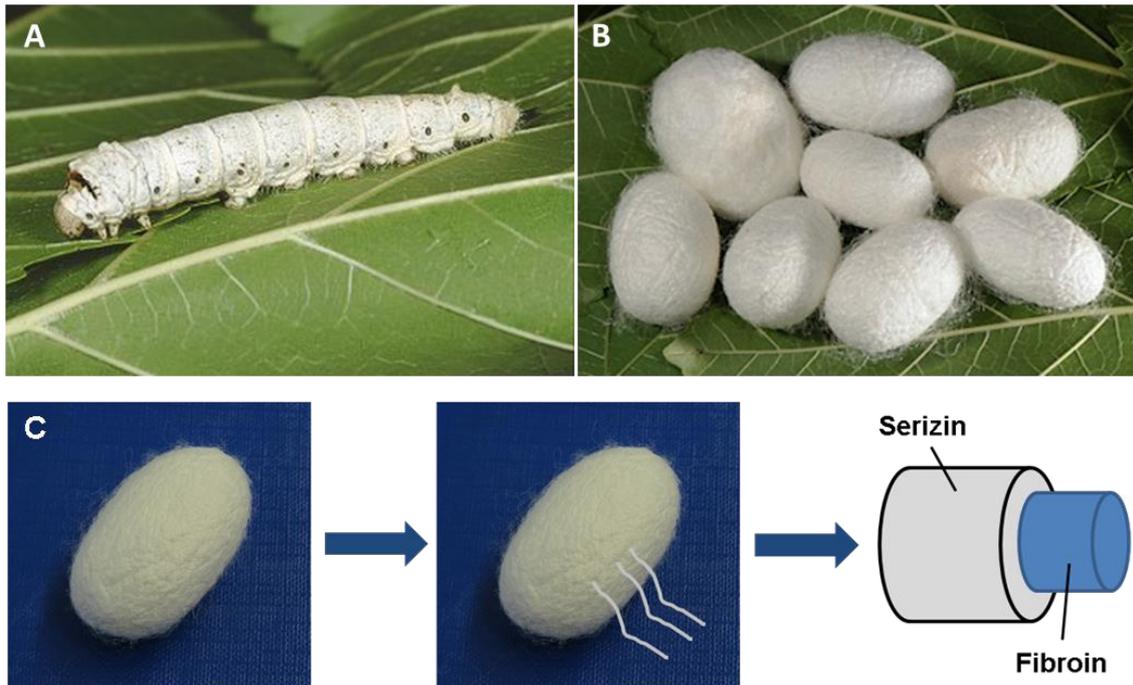


Abbildung 2-1: *Bombyx mori* – Darstellung der verschiedenen Stadien dieser Schmetterlingsart.
 A: *Bombyx mori*-Raupe; B: Seidenkokons (Abbildung aus [28] mit Genehmigung von Paolo Mazzei).
 C: Seidenfaden in schematischer Darstellung bestehend aus den zwei Seidenproteinen Fibroin und Serizin.

2.1.2 Chemische Struktur

Seide besitzt ein relativ großes Molekulargewicht von 200 bis 350 Kilodalton (kDa) und besteht aus einer großen polymeren Proteinstruktur mit großen, sperrigen, repetitiven, hydrophoben Domänen, die durch kleine hydrophile Gruppen unterbrochen werden [29]. Die verschiedenen Variationen in der chemischen Struktur von SF unterschiedlicher Insekten wirken sich auf die mechanischen Eigenschaften, auf die Bioaktivität wie auch auf das Abbauverhalten aus [30]. SF von *Bombyx mori* ist am weitesten verbreitet. Daher wird im Folgenden vor allem auf die chemische Struktur dieser Art eingegangen. SF vom Maulbeer-Seidenspinner *Bombyx mori* besteht aus schweren und leichten Ketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind [31]. Zudem enthält es das makromolekulare Glykoprotein P25, was nicht kovalent mit sechs schweren und leichten Ketten verbunden ist [32, 33].

Im Gegensatz dazu fehlen im SF des Pfauenspinners Saturniidae die leichten Ketten und das Glykoprotein P25 [7, 34]. SF dieser Art besteht aus Homo-Dimeren der schweren Kette, die auch durch eine Disulfidbrücke verbunden sind [35].

Der hydrophobe Teil der schweren Ketten des *Bombyx mori* ist aus sich repetierenden Blöcken der Aminosäuren Glycin (Gly), Alanin (Ala) und Serin (Ser) aufgebaut. Die Sequenz ist wie folgt angeordnet: Gly – Ala – Gly – Ala – Gly – Ser. Zudem kommt es zu Wiederholungen des Dipeptids Gly - Ala/Ser/Tyrosin (Tyr). Diese Aminosäuresequenz kann 12 kristalline Bereiche ausbilden. Der hohe Gly-Gehalt führt zu sehr dicht gestapelten, antiparallelen β -Faltblättern in den Nanokristallen, was durch Kaliumphosphat oder Methanol induziert werden kann. Im Vergleich dazu sind die nicht repetitiven, leichten Ketten überwiegend hydrophil und weisen elastisches Verhalten auf. Glykoprotein P25 ist für den Zusammenhalt des Komplexes zuständig [34, 36-38]. Das molare Verhältnis der schweren zu leichten Ketten zu Glykoprotein P25 beträgt 6:6:1 [33].

Im Vergleich dazu weist SF von Nicht-Maulbeer-Seidenspinnern ein höheres Verhältnis von Ala zu Gly und Poly-Ala-Blöcken auf, welche ebenso β -Faltblatt-Strukturen bilden. Auch sind vermehrt basische, polare, sperrige und hydrophile Aminosäuren in der Sequenz enthalten.

Die molekularen Wechselwirkungen zwischen β -Faltblättern innerhalb der kristallinen Strukturen von SF (Art: *Bombyx mori*) sind vor allem Wasserstoffbrückenbindungen. Obwohl sie zu den schwächsten Bindungen gehören, tragen sie einen großen Teil zur Reißfestigkeit und Steifigkeit von Seide bei. Durch den Platzmangel innerhalb der Nanokristalle kommt es zu Scherbewegungen und somit zum Bruch der Wasserstoffbrücken. Es folgt der Haft-Gleit-Effekt, wobei die Aminosäure-Stränge gleiten und die Wasserstoffbrücken sich an anderer Stelle neu ausbilden [39]. Dieser Haft-Gleit-Effekt führt dazu, dass sich SF selbst zu größeren Fibroinstrukturen zusammenlagern und bei Verletzung selbst heilen kann. Daraus resultieren ein hoher Grad an molekularer Ordnung und eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften [40-42].

Zwischen den hydrophoben Domänen der schweren Ketten befinden sich hydrophile Bereiche mit sperrigen, polaren Seitenketten. Die hydrophilen Abschnitte liegen als random-coil-Struktur vor und stellen den amorphen Part der Sekundärstruktur dar, worauf sich die Elastizität der Seide zurückführen lässt [43-46].

Die Parameter Größe, Anzahl, Verteilung, Orientierung und räumliche Anordnung von kristallinen zu nicht kristallinen Bereichen der SF-Struktur nehmen großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften [9, 39]. Defekte in der Mikrostruktur, wie beispielsweise Vakuolen und Hohlräume, haben hingegen einen negativen Einfluss [45, 47].

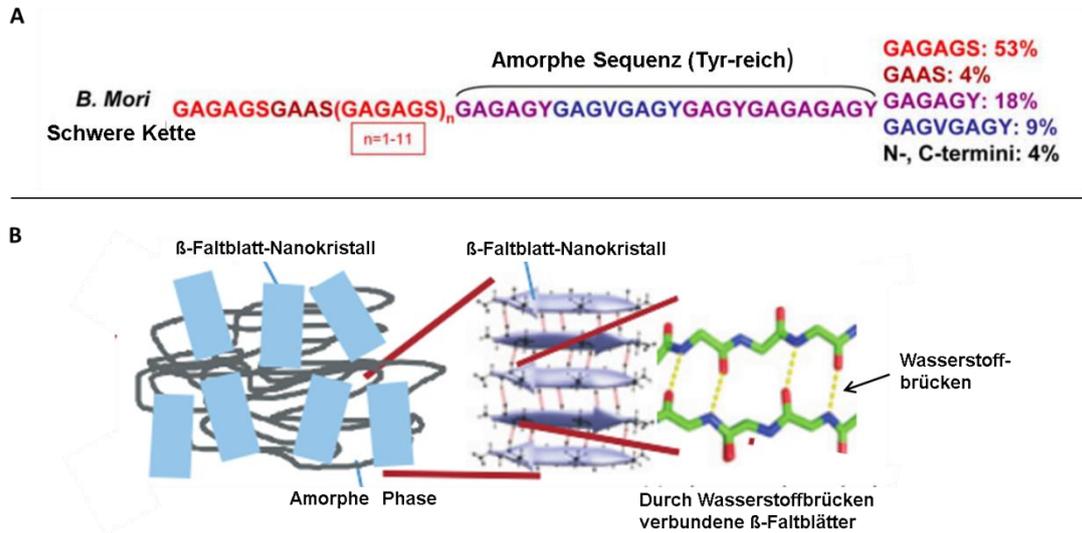


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Primär- und Sekundärstruktur von SF der Art *Bombyx mori*.

A: Aminosäuren-Sequenz der schweren Kette. Rot: hydrophober Part mit Gly – Ala – Gly – Ala – Gly - Ser, blau: hydrophiler Abschnitt mit sperrigen, polaren Seitenketten (amorphe Sequenz in Sekundärstruktur); (Abbildung aus [46] mit Genehmigung von Elsevier).

B: Dicht gepackte antiparallele β-Faltblatt-Strukturen (Nanokristalle) zwischen den hydrophoben Bereichen der schweren Kette (Amorphe Phase). Hierbei stellen die molekularen Wechselwirkungen zwischen den β-Faltblatt-Strukturen vorwiegend Wasserstoffbrückenbindungen dar (Abbildung aus [39] mit Genehmigung von Nature Publishing Group).

2.1.3 Eigenschaften

Seide zeichnet sich im Vergleich zu anderen Naturbiopolymeren durch extrem gute mechanische Eigenschaften aus. Dazu kommen weitere Vorteile wie die gute Biokompatibilität, wasserbasierte Verarbeitung, Bioabbaubarkeit sowie leicht zugängliche chemische Gruppen für funktionelle Modifikationen [10].

2.1.3.1 Mechanische Eigenschaften

Seide von Spinnen und Seidenraupen ist die Naturfaser mit höchster Festigkeit und Härte [48]. Darüber hinaus weisen die mechanischen Eigenschaften der Seidenfasern ein ausgewogenes Maß an Bruchfestigkeit, Elastizität und Dehnung auf, was auf der einen Seite zu einer gewissen Steifigkeit, zum anderen aber auch zu einer guten

Dehnbarkeit führt [10]. Der E-Modul der Seidenfasern von *Bombyx mori* liegt zwischen 12,4 und 17,9 GPa. Die Zugfestigkeit beträgt zwischen 360 und 530 MPa bei einer Dehnung von 18 bis 21 % [49]. Nach Auskochen des Serizins liegt eine veränderte SF-Struktur mit anderen Eigenschaften vor. Der E-Modul bleibt annähernd konstant, wobei die Zugfestigkeit auf 450 bis 700 MPa bei einer Dehnung von 12 bis 24 % ansteigt [50]. Diese mechanischen Eigenschaften und die hohe Resistenz gegen Deformation machen SF zu einem bevorzugten Biomaterial für lasttragende Kompositmaterialien im Bereich Tissue Engineering [10, 51].

Die meisten seidenbasierten Biomaterialien bestehen allerdings aus SF-Lösungen und nicht aus nativen Seidenfasern. Die Materialeigenschaften variieren abhängig von der Herstellungstechnik, Zusammensetzung des SFs, Matrix-Steifigkeit, dem β -Faltblatt-Gehalt aber auch von der Scaffold-Morphologie und Scaffold-Topologie [51]. Folglich liegt eine große Auswahl an möglichen mechanischen Eigenschaften vor, die den Anwendungsanforderungen angepasst werden können [10]. In der Regel sollen die Festigkeitseigenschaften der hergestellten Seidenprodukte durch Manipulation der Struktur während der Herstellung auf das Niveau von nativen Seidenfasern verbessert werden [52-54].

Tabelle 1: Vergleich der mechanischen Eigenschaften von seidenbasierten Materialien, dem Strukturprotein Kollagen und dem synthetischen Polymer PLA (Abwandlung von [55]).

Materialherkunft	Zugfestigkeit in MPa	E-Modul in GPa	Bruchdehnung in %
Seide von <i>B. mori</i> (mit Serizin)	500	5-12	19
Seide von <i>B. mori</i> (ohne Serizin)	610-690	15-17	4-16
Seide von <i>N. clavipes</i>	875-972	11-13	17-18
Kollagen	0,9-7,4	0,0018-0,046	24-68
Polymilchsäure (PLA)	28-50	1,2-3,0	2-6

2.1.3.2 Biokompatibilität

SF von Seidenraupen hat sich als hoch biokompatibel erwiesen [56]. Seit 1993 ist SF von der US Food and Drug Administration (FDA) als Biomaterial anerkannt worden und seitdem als Nahtmaterial weit verbreitet. Mittlerweile sind weitere SF-basierte Biomaterialien wie zum Beispiel SERI[®] Surgical Scaffold (Seri[®]Scaffold) als transitorische Scaffolds zur Weichgewebe-Unterstützung zugelassen [57].

SF ist eine geeignete Matrix für Zellwachstum. Auf SF-Filmen können sowohl humane als auch tierische Zelllinien ohne Probleme adhären und proliferieren, ohne dabei zelltoxisch zu wirken. Die Herkunft des SFs und die Herstellungsmethode haben folglich Einfluss auf die Zelladhäsion und das Zellwachstum [58-60]. Wie jedes andere nicht-autologe Biomaterial ruft auch SF, wenn auch in sehr geringem Maße, eine Fremdkörperreaktion hervor. Es liegen Fälle mit verzögert einsetzender Hypersensibilität auf das Nahtmaterial vor. Als Auslöser der Hypersensibilität werden Rückstände des Seidenleims Serizins vermutet [61, 62]. Diese Hypothese konnte jedoch bis jetzt nicht eindeutig bestätigt werden [63]. Viele Studien haben sich mit der immunen Aktivität und Antigenität von SF-Scaffolds auseinandergesetzt und kamen zu dem Ergebnis, dass sterilisierte Seide ohne Serizin eine gute Biokompatibilität aufweist und mit anderen Biomaterialien wie Kollagen oder Poly (lactid-co-glycolid) (PLGA) vergleichbar ist [64].

2.1.3.3 Biologisches Abbauverhalten

Das Abbauverhalten und dessen kontrollierte Beeinflussung ist eines der wichtigsten Kriterien in den Materialwissenschaften. Je nach Zielgewebe muss eine bestimmte Abbaugeschwindigkeit erreicht werden, um die Gewebeneubildung zu fördern. Verschiedene Enzyme wie Protease XIV, α -Chymotrypsin und Kollagenase A bauen SF proteolytisch ab [65, 66]. Jedoch spielen Fibroblasten im *in vivo* Degradationsprozess die wichtigste Rolle [67]. Beim Abbau von SF entstehen Aminosäuren, die *in vitro* und *in vivo* absorbiert werden können [51]. Der Abbauprozess dauert mehrere Tage bis Wochen, was von der Kristallinität bestimmt wird. Die Absorptionsrate ist abhängig vom Implantationsort, der mechanischen Beschaffenheit, dem Seidentyp, dem Durchmesser der Seidenfasern und der Sekundärstruktur [56, 68, 69]. Durch die vielen Einflussfaktoren ist es schwer, pauschal eine Prognose über das Abbauverhalten von

seidenbasierten Biomaterialien abzugeben. Im Vergleich dazu kann die Abbaurate von synthetischen Biomaterialien, die hydrolytisch degradiert werden, ziemlich genau vorausgesagt werden [70]. Die Abbauprodukte der synthetischen Biomaterialien werden ebenso resorbiert, jedoch entstehen säurehaltige Nebenprodukte. Dazu verlieren synthetische Biomaterialien sehr früh ihre mechanischen Eigenschaften. Im Gegensatz dazu sind die Abbauprodukte der Seide für den menschlichen Körper unbedenklich [10, 56]. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass Seidensysteme ihre Festigkeitseigenschaften für lange Zeit aufrechterhalten. Der langsame Degradationsprozess und die dabei lang erhaltenen mechanischen Eigenschaften machen Seide zu einem guten Biomaterial im Bereich Tissue Engineering [70, 71]. Aus diesen Gründen finden seidenbasierte Biomaterialien Anwendung in der Geweberegeneration mit langer Regenerationsdauer [56, 68]. Des Weiteren kann die Abbaugeschwindigkeit durch das Einbringen von Metalloproteinase oder Protease-Inhibitor reguliert werden. Dies eröffnet neue Wege für Biomaterialien aus Seide, sodass sie Anwendung im Bereich der kontrollierten Wirkstofffreisetzung finden [72, 73].

2.2 Seidenfibroin-Lösungen

SF-Lösungen stellen die Basiskomponente für die Weiterverarbeitung zu seidenbasierten Systemen wie Filmen, Hydrogelen und Scaffolds dar [55]. Ein großer Vorteil bietet sich durch ihr schonendes Herstellungsverfahren bei Raumtemperatur, neutralem pH-Wert und ohne Anwendung großer Scherkräfte. Diese Bedingungen werden ausgenutzt, um sensitive Medikamente in Seidenimplantate einzubringen [74]. Aber auch andere organische (Zellen, Proteine, Enzyme) und anorganische (Laserfarbstoff, Metallische Nanopartikel) Stoffe können SF-Lösungen untergemischt werden. So kann zum Beispiel die Biointegration von photonischen und elektronischen Geräten oder Biosensoren verbessert werden [10].

2.2.1 Herstellung von Seidenfibroin-Lösungen

Zu Beginn wird Seide von Serizin, dem Seidenleim, durch thermochemische Behandlung befreit. Dabei werden die Seidenkokons in heißes Wasser gegeben und teilweise Salze wie Natriumcarbonat oder andere Detergenzien dem Wasser zugefügt,

um die Effizienz der Abtrennung zu erhöhen. Dabei bleiben SF-Fasern zurück. Dieser Prozess wird auch Degummierung genannt [51]. Die Entfernung des Serizins beruht auf der Beobachtung von allergischen Reaktionen, wobei das Serizin alleine als biokompatibles Material anerkannt wurde. Es wird vermutet, dass die allergischen Reaktionen durch die Kombination von SF und Serizin hervorgerufen werden [75-77].

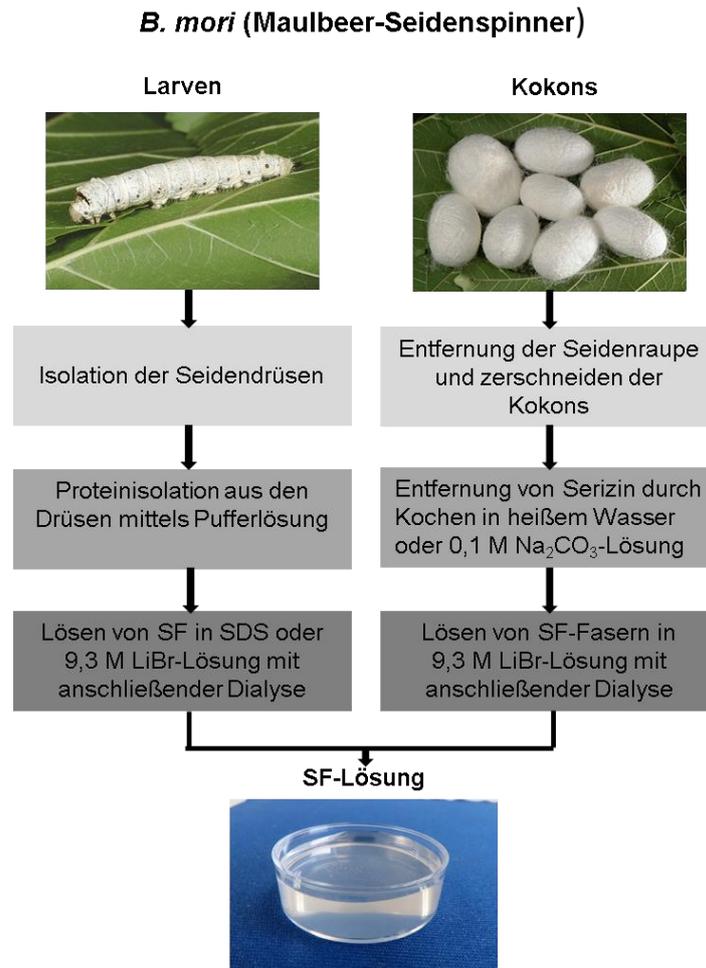


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Herstellung von SF-Lösung. Seidenkokons und Seidenraupen sind die Hauptquellen des SFs. SF von *Bombyx mori* wird im ersten Schritt isoliert, dann in Lösungen mit Salzen oder ionischen Detergenzien gelöst und zuletzt dialysiert (Bilder der Larve und Kokons von [28] mit Genehmigung von Paolo Mazzei).

Daraufhin folgt das Lösen der SF-Fasern in konzentrierten Lösungen aus chaotropen Salzen wie Lithiumbromid, Calciumchlorid/Ethanol/Wasser, Lithiumthiocyanat oder ionischen Flüssigkeiten wie Natriumdodecylsulfat (SDS) [78-82]. Die spätere Dialyse

befreit die Lösung von Salzen und führt somit zur Aufreinigung der SF-Lösungen [55]. Jedoch ist das Auflösen von Nicht-Maulbeer-SF-Fasern sehr schwierig, weshalb in diesen Fällen das SF meist direkt aus den Drüsen mittels geeigneter Pufferlösung gewonnen wird [10, 83].

2.2.2 Mechanismus des Sol- zu Gelübergangs

SF ist in seiner α -helikalen und random-coil-artigen Form wasserlöslich. Die Wasserlöslichkeit jedoch ist von der Lagertemperatur, dem pH-Wert und der Konzentration der SF-Lösung abhängig und kann über Tage bis Wochen aufrechterhalten werden [84]. Die Gelbildung ist ohne Geliermittel aufgrund der Dominanz der hydrophoben Aminosäuregruppen im SF möglich [85]. Während der Gelbildung ereignet sich im SF eine Konformationsänderung von random-coil-Bereichen und α -Helix zur extrem stabilen β -Faltblatt-Struktur. Dies führt zur Vernetzung und Stabilisation des Gels [86], aber auch zu einer Änderung der wesentlichen Eigenschaften wie einer guten Beständigkeit gegen Auflösung sowie thermalem und enzymatischem Abbau [10]. SF-Gele haben einen höheren β -Faltblatt Anteil als die SF-Lösung [87]. Die SF-Lösung enthält nach der Dialyse in Abhängigkeit der SF-Konzentration zwischen 10 % und 20 % β -Faltblatt-Strukturen. Während der initialen Gelbildung kommt es zu schwachen Wechselwirkungen zwischen den Proteinketten, jedoch zu keiner Änderung in der Sekundärstruktur. Daraus resultiert, dass der β -Faltblatt-Gehalt konstant bleibt und somit die Gelbildung bis zu diesem Zeitpunkt reversibel ist. Sobald in etwa 15 % der Gelbildung abgeschlossen sind, folgen starke Wechselwirkungen, was in einem Anstieg des β -Faltblatt-Gehalts resultiert [88]. Der β -Faltblatt-Anteil beträgt dann bis zu 50 % [86].

Der pH-Wert, die Temperatur und die Ionenstärke werden genutzt, um Einfluss auf die Gelbildungsrate zu nehmen. Die Struktur des SFs ist der Grund für die Abhängigkeit der Gelbildung vom pH-Wert. Seide ist ein amphiphiles Molekül bestehend aus hydrophilen N- und C-Termini und großen hydrophoben Domänen. Sobald der pH-Wert gesenkt wird, werden mehr Carboxylgruppen protoniert, was die Ladungsabstoßung reduziert und somit die Gelbildung beschleunigt. Die Protonierung der sauren Aminosäuren ruft eine Proteinfaltung in einen Zustand höherer Ordnung hervor, was mit einem Ausschluss von Wasser in Verbindung steht. Die Beeinflussung der

Gelbildung durch Temperaturerhöhung oder Anstieg der Ionenstärke führt ebenfalls zu einer Steigerung der hydrophoben Wechselwirkungen [86].

Folglich wird die Gelbildung von SF hauptsächlich durch die Transformation zu β -Faltblatt-Strukturen ausgelöst. Auch die Herstellungsmethode des SF-Gels spielt eine große Rolle im Ablauf des Gelierungsprozesses. Durch Ultraschallbehandlung, Gefrierdrying, Vortexen und dehydrierende Agenzien wird der Übergang zur β -Faltblatt-Struktur und damit die Gelbildung gefördert [10, 89-91].

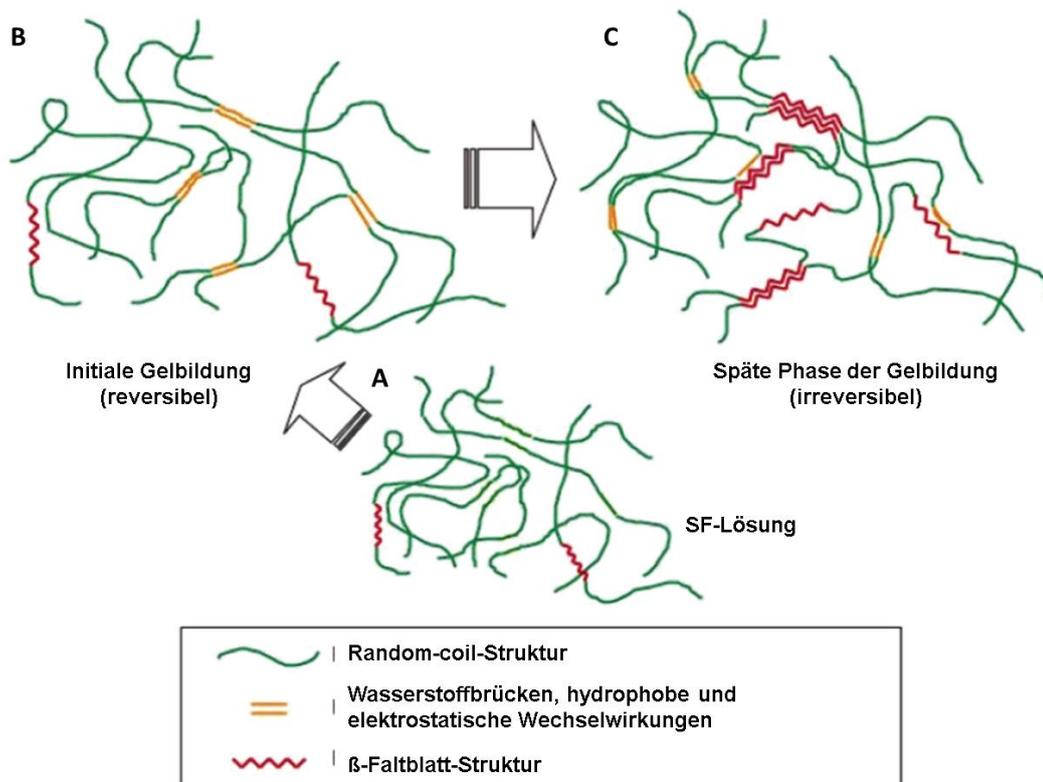


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der drei Phasen des Sol-Gel-Übergangs (Abbildung aus [86] mit Genehmigung von American Chemical Society).

A: SF-Lösung mit 10 % bis 20 % β -Faltblatt-Anteil und sehr schwachen intermolekularen Bindungen.

B: Initiale Gelbildung mit schwachen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen, aber keine Neubildung von β -Faltblatt-Strukturen.

C: Ausbildung von stabilen, irreversiblen β -Faltblatt-Strukturen.

2.3 Weiterverarbeitungsmethoden des Seidenfibroins

Nicht nur die Auswahl des Materials an sich, sondern auch die Materialmorphologie spielt im Bereich Tissue Engineering eine entscheidende Rolle. Je nach Anwendung

sind unterschiedliche Eigenschaften gewünscht. Aus diesem Grund gibt es eine ganze Bandbreite an Biomaterialien aus Seide [92]. Im Folgenden sind die Wichtigsten näher erläutert.

2.3.1 Biomaterialien aus Seidenfibroin-Lösungen

2.3.1.1 Seidenfibroin-Filme

SF-Filme werden mithilfe von Spin-Coating und Langmuir-Blodgett Systemen durch Austreiben der wässrigen, sauren und ionischen SF-Lösungen hergestellt [93-95]. Die Stabilität der Filme ist gering. Aus diesem Grund wird mit Wasserdampf, kontrollierter Trocknung oder Einlegen in Alkohol die β -Faltblatt-Bildung gefördert [69, 96]. Als Folge entsteht ein gehärtetes Seidenmaterial mit mechanischen Eigenschaften, Oberflächenqualität und Transparenz, welches optimal für die Anwendung als optisches Substrat in der Hornhaut des Auges (Corneal Tissue Engineering) geeignet ist [97].

2.3.1.2 Hydrogele

SF-Hydrogele sind mit Wasser aufgequollene, dreidimensionale Polymer-Netzwerke, die als Trägersubstanzen für Zellen und Zytokine dienen und zusätzlich injizierbar sind [98]. Die Herstellung erfolgt wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben durch den Übergang der SF-Lösung vom Sol- zum Gelzustand, was mittels Anwendung von Säuren, dehydrierenden Agenzien, Ionen, Ultraschall oder Gefriertrocknung induziert werden kann [89, 99-101]. Die mechanischen Eigenschaften der SF-Hydrogele ermöglichen die Herstellung von Scaffolds mit großer Tragfähigkeit, was als Ersatzmaterial im Bereich Knorpelregeneration wünschenswert ist [102]. Zudem zeigten Hydrogele mit integriertem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) eine deutliche Verbesserung der Angiogenese und Knochenbildung, was für die Knochenregeneration von Nutzen ist [103].

Eine besondere Produktionsart stellt die Gefrier-Gelbildungstechnik dar. In diesem Fall wird die gefrorene SF-Lösung in eine geeignete Lösung eingelegt und unter Gefrieretemperatur gehalten. Nach einigen Stunden haben sich vorgelierte Cryogele gebildet [104]. Diese Herstellungstechnik führt zu besonders interessanten mechanischen Eigenschaften wie einer sehr guten Elastizität oder einem Kompressionsmodul von 50 MPa [105].

2.3.1.3 3D-Scaffolds

Poröse, dreidimensionale Schwämme sind ideale Strukturen für Anwendungen im Bereich Tissue Engineering, da sie die physiologische Mikroumgebung *in vivo* gut imitieren. Ihre poröse 3D-Struktur ermöglicht Zellanlagerung, Zellproliferation und Zellmigration, aber auch den Transport von Nährstoffen und Abfallprodukten. Die Poren der SF-Scaffolds werden durch Gefriertrocknung, porenbildende Substanzen und Aufschäumen geformt [106, 107]. Nach der Gefriertrocknung weisen die Schwämme Porengrößen unter 100 µm auf, die mittels Variation der Gefriertemperatur, des pH-Werts und der Menge des Lösungsmittels beeinflusst werden können [108]. Aufgrund der guten Kontrollierbarkeit der Porosität und Porengröße finden 3D-Scaffolds, deren Poren durch porenbildende Strukturen erzeugt wurden, häufig Anwendung im Bereich Knochen- und Knorpelregeneration [109].

2.3.2 Seidenfibroin-Komposit-Scaffolds

SF-Komposit-Scaffolds sind SF-Scaffolds, in die, meist während der Scaffold-Herstellung, anorganische oder organische Füller eingebracht werden [110, 111]. Wichtig ist hierbei die Kompatibilität beider Komponenten. Ist das nicht der Fall, führt dies zu inhomogenen Gemischen, Phasentrennung und ungünstigen Gewebereaktionen [112]. Die mechanischen Eigenschaften der SF-Scaffolds werden durch das Einbringen von Füllern über ihre Grenzen hinaus verändert [113]. Zum Beispiel konnte durch das Einarbeiten von SF-Mikrofasern ein Kompressionsmodul im Bereich von 10 MPa erreicht werden, was vergleichbar mit erreichten Druckmoduln der knöchernen Spongiosa ist [114]. Zudem stellt es das bis jetzt härteste seidenbasierte Material dar [51]. Darüber hinaus wird von SF-HA-Scaffolds berichtet, die eine höhere Osteokonduktivität als unmodifizierte SF-Scaffolds aufweisen [115, 116]. Die Entwicklung weist auf großes Potenzial im Bereich der Knochenregeneration, aber auch in sonstigen Anwendungsgebieten wie die Bänderrekonstruktion mit hohen Anforderungen an die mechanischen Eigenschaften, hin [10].

2.4 Mineralisation von Seidenfibroin-Scaffolds

Die Mineralisation von Scaffolds ist ein wichtiges Forschungsgebiet, um die Anwendung im Bereich Knochenregeneration voran zu treiben. Der natürliche Knochen ist eine Kombination aus anorganischem HA und organischem Kollagen Typ I [117]. Diese Zusammensetzung verschafft dem Knochen seine spezifischen mechanischen Eigenschaften. Aus diesem Grund ist man seit geraumer Zeit auf der Suche nach einem geeigneten Material, das als Matrix für die Knochenzellproliferation oder Calciumphosphat-Einlagerung geeignet ist. SF bietet sich aufgrund der einzigartigen Eigenschaftskombinationen als Matrix an (siehe Kapitel 2.1.3) [12].

Im Jahr 2015 berichtete M. Ribeiro et. al. von einem Komposit-Hydrogel aus SF und HA-Nanopartikeln unter Verwendung von Ethanol als Geliertmittel. Dadurch konnte der Druckmodul erhöht und die Wasseraufnahme reduziert werden. Zudem wurde eine verbesserte Aktivität der alkalischen Phosphatase von Osteoblasten beobachtet [115]. Die Studie zeigte, dass sich die Einlagerung von Calciumphosphaten in SF-Scaffolds positiv auf die Scaffold-Eigenschaften, die im Bereich Knochenregeneration gewünscht sind, auswirkt.

2.4.1 Calciumphosphate

Die härteste Substanz im menschlichen Körper ist der Zahnschmelz. Diese Eigenschaft lässt sich auf seine anorganische Komponente, das Calciumphosphat in Form von HA, zurückführen [118]. Jedoch profitieren nicht nur Zähne von der Härte, Stabilität und Funktion des HAs, sondern auch Knochen und Sehnen.

Synthetisch können Calciumphosphate durch Ausfällen aus wässriger Lösung (Niedrigtemperatur-Calciumphosphate) oder durch thermische Behandlung (Hochtemperatur-Calciumphosphate) hergestellt werden, wobei die Calciumphosphat-Zemente zur Niedrigtemperatur-Gruppe gehören [119]. Außer HA kommen noch weitere biologisch interessante Ortho-Calciumphosphate vor, die aber nicht alle als Knochenzemente verwendet werden können. So stellt Monocalciumphosphat-Anhydrid ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, MCPA) die wasserfreie Form des Monocalciumphosphat-Monohydrat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MCPM) dar. Bei über 100 °C kristallisiert MCPM unter Wasserabgabe zu MCPA. MCPA ist nicht biokompatibel, stark sauer, hygroskopisch

und bei allen pH-Werten löslich [120]. Zur Herstellung von Bruschit-bildenden Calciumphosphat-Zementen wird MCPA verwendet. Aufgrund seiner fehlenden Biokompatibilität wird es jedoch nicht als alleiniger Knochensubstituten eingesetzt [121].

Calciumphosphat-Dihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, DCPD), auch als das Mineral Bruschit bekannt, ist das Produkt bei Bruschit-bildenden Calciumphosphat-Zementen. Es kristallisiert als Dihydrat des Calciumhydrogenphosphats aus wässriger Lösung. Die Synthese erfolgt durch Fällung aus leicht saurer Lösung (pH 4-5) [122]. Eigentlich ist Monetit (CaHPO_4) die thermodynamisch bevorzugte Dicalciumphosphat-Phase, da diese weniger löslich ist. Trotzdem ist Bruschit aufgrund einer schnelleren Kristallwachstumsrate und höherem Übersättigungsgrad die häufiger gebildete Phase während der Präzipitationsreaktion. Die Monetitbildung findet statt, wenn die Präzipitation durch tiefen pH-Wert oder Reduktion der Übersättigung der Flüssigkeit verlangsamt wird [123, 124]. *In vivo* wird Bruschit bei einem pH-Wert von 7,4 über Zwischenschritte zu Octacalciumphosphat und anschließend zu schwer löslichem HA umgewandelt oder direkt nach Biodegradation durch neuen Knochen ersetzt [13, 14]. Nach MCPA und MCPM ist Bruschit die instabilste Form der Calciumphosphate. Bruschit konnte in Knochen, Frakturkallus und Zahnstein nachgewiesen werden [125]. Aufgrund seiner guten Biokompatibilität, Osteokonduktivität und Biodegradierbarkeit findet Bruschit Anwendung als Knochenersatzmaterial [15].

Tricalciumphosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, TCP) stellen eine weitere wichtige Gruppe der Ortho-Calciumphosphate dar. Sie liegen in den zwei Phasen als α -TCP und β -TCP vor. α -TCP ist die Hochtemperaturmodifikation von β -TCP. β -TCP wird durch Sinterung oberhalb von 800 °C hergestellt, während α -TCP bei Temperaturen über 1125 °C entsteht [120]. Beide Formen sind biokompatibel. Das wesentlich stabilere β -TCP stellt eine der Hauptkomponenten der Bruschit-abbindenden Zemente dar. Zudem sind β -TCP-Knochenzemente die am häufigsten angewendeten Knochenzemente, da sie leichter als HA-Knochenzemente vom Körper abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt werden können [119]. β -TCP kommt in der Natur in Form von Whitlockit in pathologischen Verkalkungen wie Zahnstein, Speicheldrüsensteinen und der Kariesentstehung vor. Whitlockit ist jedoch kein reines β -TCP, sondern besitzt einen 15 prozentigen

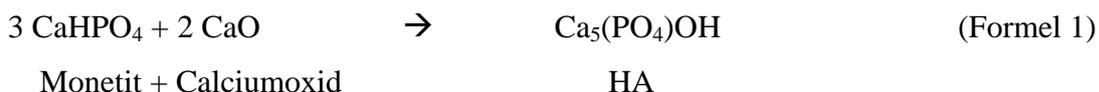
Magnesiumanteil. Im XRD weisen β -TCP und Whitlockit ein identisches Beugungsmuster auf.

2.4.2 Calciumphosphat-Zemente

Bei Calciumphosphat-Zementen handelt es sich um Niedrigtemperatur-Calciumphosphate (siehe Kapitel 2.4.1). Sie vereinen die Vorteile der Biokompatibilität und knochenähnlichen Mineralzusammensetzung der Calciumphosphate mit den mechanischen Eigenschaften und freien Formbarkeit der Zemente [126].

Calciumphosphat-Pulver bilden mit einer wässrigen Lösung eine Paste und können so mittels Spritze oder manuell in den Knochendefekt injiziert werden. Das Abbinden *in situ* durchläuft die Phasen der Auflösung, Ausfällung und Transformation zum Reaktionsprodukt [127]. Direkt nach Anmischung des Zements beginnen sich die Edukte aufzulösen und setzen Calcium- und Phosphat-Ionen frei. Es kommt zur Übersättigung der Zementflüssigkeit, was in der Keimbildung der neuen Phase resultiert. Durch die kontinuierliche Versorgung mit Calcium- und Phosphat-Ionen wachsen die Produktkristalle und bauen eine feste Matrix [128]. Das Reaktionsprodukt ist abhängig von den Edukten, der Temperatur und dem pH-Wert. In Folge dessen werden Calciumphosphat-Zemente in zwei Klassen unterteilt, die bei Raumtemperatur und wässrigem Milieu entstehen können: bei einem pH-Wert $> 4,2$ entsteht HA und bei einem pH-Wert $< 4,2$ Brushit [119].

Eine mögliche Reaktionsart für HA-bildende Calciumphosphate ist die Abbindung des Zements durch Säure-Base-Reaktion, die andere durch Zugabe von wässriger Lösung [119]. Im ersten Fall werden basische Calciumphosphate, wie Calciumoxide (CaO) mit leicht sauren Verbindungen wie Monetit oder Brushit kombiniert (siehe (Formel 1) [129]. Die andere Variante beinhaltet hauptsächlich α -TCP und bindet nach Zugabe einer wässrigen Lösung zu Calcium-armem HA ab [127].



Für die Brushit-Bildung wird durch Zugabe von Phosphorsäure oder sauren Calcium-Phosphaten wie MCPA oder MCPM ein pH-Wert unter 4,2 erzeugt. Als Edukte

Hydrolyse von DCPD zu HA ausgelöst, sobald das wässrige Medium, zum Beispiel durch fehlenden Flüssigkeitsaustausch, übersättigt ist [136]. *In vivo* wird Brushit zusätzlich durch zelluläre Aktivität resorbiert, weshalb der Brushit-Abbau etwas schneller als die Knochenregeneration abläuft [137]. Das Zementimplantat zeigt dann eine ansteigende Porosität, Massenverlust und abnehmende mechanischen Eigenschaften [138].

Aufgrund der mangelnden mechanischen Eigenschaften finden Brushit-Zemente bis jetzt nur in nicht-lasttragenden Bereichen Anwendung. Um diese Defizite zu beheben, wurde ein dualhärtendes Zementssystem auf Basis von Brushit-bildendem-Zement und wässriger SF-Lösung entwickelt. Die ablaufende Zementreaktion ruft einen sauren pH-Wert und einen Anstieg der Ca^{2+} -Ionen hervor, was eine Konformationsänderung des SFs induziert. Es resultiert ein interpenetrierendes SF-Brushit-Netzwerk mit verbesserten Festigkeiten (Anstieg um den Faktor 10) und reduzierter *in vitro* Degradation im Vergleich zu fibroinfreien Calciumphosphat-Zementen [139].

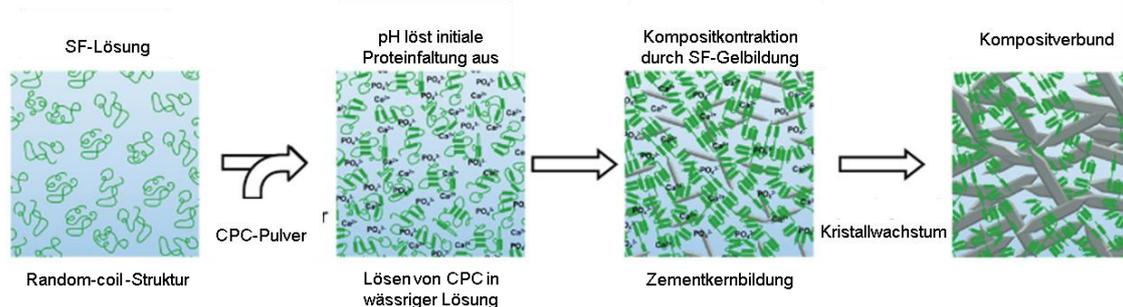


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus des dualhärtenden SF-Brushit-Zements (Abbildung aus [139] mit Genehmigung von John Wiley and Sons).

2.5 Gefrierstrukturierung

Der Mechanismus der Gefrierstrukturierung besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Ein sich in Lösung befindendes Material wird gefroren und anschließend lyophilisiert. Hierdurch entsteht eine poröse Struktur der Probe, die ein Negativ der Eiskristallmorphologie im gefrorenen Zustand darstellt [17]. Sie findet bereits Anwendung im Bereich Biomedizin und beeindruckt durch den positiven Einfluss auf

die Eigenschaften der Biomaterialien. K. Stuckensen berichtet über Kollagen-Scaffolds mit anisotroper Porenstruktur, die eine optimierte zelluläre Reaktion aufweisen. Dies hat in einer Studie zu vorteilhaften Heilungsergebnissen *in vivo* geführt [18].

2.5.1 Gerichtete Erstarrung wässriger Lösungen

Die gerichtete Erstarrung ist ein Einfrierprozess mit zeitlich und örtlich konstanter Temperaturführung. Diese Umstände ermöglichen eine homogene Eiskristallmorphologie. Die Probe ist einem stationären und linearen Temperaturfeld ausgesetzt, sodass sie mit einer bevorzugten Kristallwachstumsrichtung erstarrt [140].

Kurz und Fischer sowie Davis et al. haben sich genauer mit den theoretischen Grundlagen der gerichteten Erstarrung und Eisbildung auseinandergesetzt, wobei sich die Modelle nicht eins zu eins auf andere Systeme übertragen lassen [141, 142]. Variationen im Temperaturgradienten und der Zusammensetzung der Lösung können die Eiskristallmorphologie beeinflussen. Bei Anwesenheit eines Temperaturgradienten bildet sich in reinem Wasser eine planare-Eisfront aus. Die Wärme fließt in die entgegengesetzte Richtung der wachsenden Erstarrungsfront. Entstehende Ausbuchtungen schmelzen dadurch direkt wieder ab. Im Gegensatz dazu kommt es in wässrigen Lösungen zur Ausbildung einer konstitutionellen Unterkühlung direkt vor der Eisfront und damit zur Induktion des Aufbrechens der planaren-Eisfront [18, 141].

2.5.2 Konstitutionelle Unterkühlung

Die gerichtete Erstarrung beginnt in der wässrigen Probe mit der Eisbildung am Ort der tiefsten Temperatur. Die Eiskristalle wachsen so lange, bis sie die Gleichgewichtsgefrieretemperatur erreicht haben. Es bildet sich eine planare Eisfront mit konstanter Konzentration der gelösten Stoffe an der Grenzfläche aus (siehe **Abbildung 2-6 A**) [143].

Ist ein linearer Temperaturgradient angelegt, wächst die planare Eisfront unter Ausschluss der gelösten Stoffe. Es werden aufgrund des geringen Verteilungskoeffizienten k des gelösten Stoffes fast ausschließlich Wassermoleküle in die Eiskristalle eingebaut. Der Verteilungskoeffizient k gibt das Verhältnis der Konzentration eines gelösten Stoffes c auf der festen und flüssigen Seite der Eisfront an:

$$k = \frac{c(\text{fest})}{c(\text{flüssig})} \quad (\text{Formel 4})$$

Wächst die Eisfront schneller, als dass die gelöste Substanz durch Konvektion und Diffusion von der Grenzfläche abtransportiert wird, bildet sich lokal vor der Eisfront ein Bereich mit erhöhter Stoffkonzentration. In **Abbildung 2-6 B** ist der Konzentrationsverlauf der gelösten Substanz vor der mit der Geschwindigkeit v wachsenden planaren Eisfront dargestellt. Die Konzentration fällt von der maximalen Konzentration c_{max} direkt vor der Eisfront auf die Ausgangskonzentration c_0 ab [140].

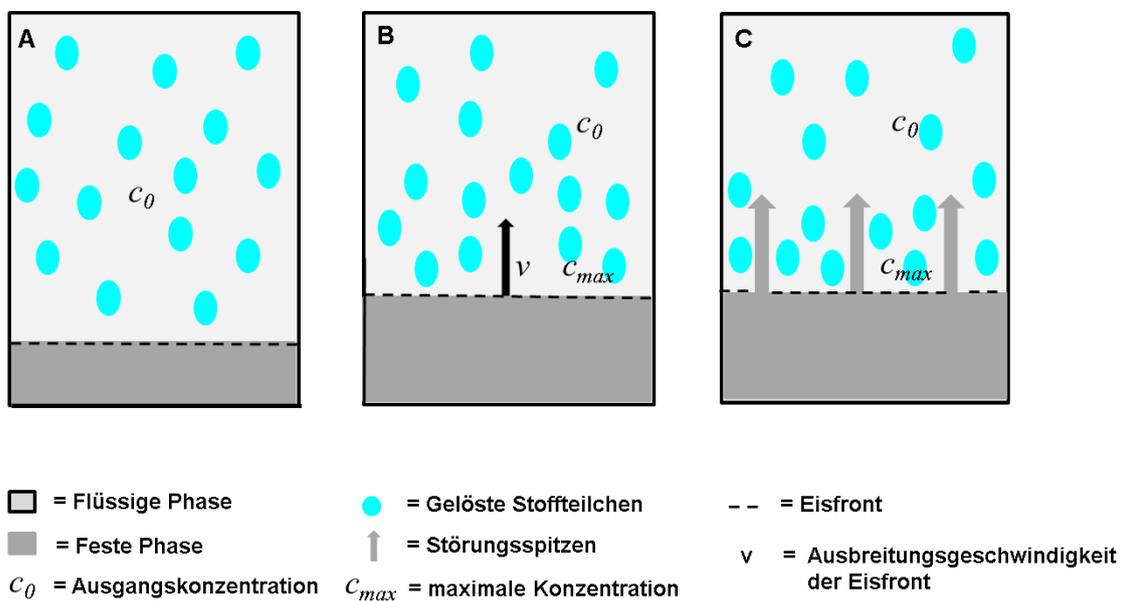
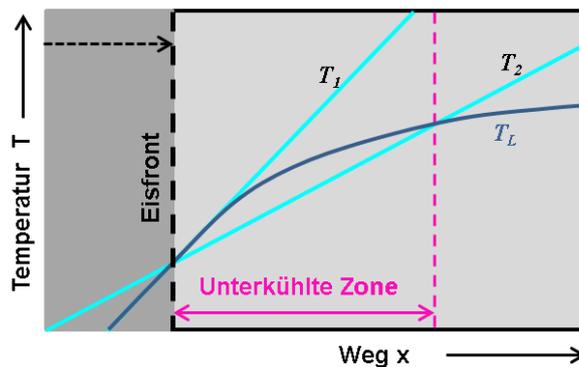


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des Konzentrationsverlaufs des gelösten Stoffes vor der planaren Eisfront. A: Zu Beginn der gerichteten Erstarrung bildet sich eine ruhende, planare Eisfront mit konstanten Konzentrationen der gelösten Stoffe. B: Die Wachstumsgeschwindigkeit v der Eisfront ist schneller als der Abtransport der gelösten Stoffe. Es bildet sich direkt vor der Eisfront eine maximale Stoffkonzentration c_{max} . C: Durch das Aufbrechen der planaren Eisfront werden die gelösten Stoffe mittels lateraler Diffusion zwischen die Störungsspitzen befördert.

Die Gleichgewichtsgefrieretemperatur nimmt mit steigender Konzentration der gelösten Stoffe ab. Direkt an der Eisfront entspricht die Liquidus-Temperatur T_L der durch den Temperaturgradienten aufgeprägten lokalen Temperatur. Sind die lokalen Temperaturen T_l überall höher als die Liquidus-Temperaturen, ist die Probe an keiner Stelle unterkühlt und damit die Eisfront morphologisch stabil. Fremdpartikeldefekte an der Eisfront schmelzen ohne weiteres ab.

Liegt jedoch die lokale Temperatur T_2 in Bereichen vor der planaren Eisfront unter der Liquidus-Temperatur T_L , nennt man diesen Bereich konstitutionell unterkühlt (siehe **Abbildung 2-7**). Die Unterkühlung wird durch die lokale Konzentrationserhöhung des Stoffes vor der Eisfront hervorgerufen. Darauf beruht die Bezeichnung konstitutionelle Unterkühlung. In dem unterkühlten Gebiet kristallisiert kein Wasser aus, da sich das System nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Die wässrige Lösung befindet sich in einem metastabilen Zustand, welcher Wachstumsinstabilitäten und Neukeimbildung hervorrufen kann [141, 144].



---> = Wachstumsrichtung der Eisfront

Abbildung 2-7: Schematische Darstellung einer konstitutionell unterkühlten Zone vor einer fortschreitenden planaren Eisfront. Der Temperaturgradient mit dem Temperaturverlauf T_1 ist stets höher als die Liquidus-Temperatur T_L der wässrigen Lösung. Der Temperaturverlauf T_2 liegt im Bereich vor der Eisfront unter der Liquidus-Temperatur T_L . In diesem Bereich bildet sich die konstitutionell unterkühlte Zone aus (Abwandlung von [140]).

2.5.3 Nicht-planare Erstarrungsfront

Kleine Störungen in der planaren Grenzfläche, die durch Korngrenzen und Partikel hervorgerufen werden, wachsen aufgrund von energetischen Vorteilen in die konstitutionelle Unterkühlung ein. Dieser Vorgang führt zum Aufbrechen der Eisfront. Das Einwachsen der Störungsspitzen löst eine laterale Diffusion der gelösten Stoffe zwischen zwei Störungsspitzen aus, was zu einer Abnahme der Stoffkonzentration direkt an der Eisfront führt (siehe **Abbildung 2-6 C**) [140]. Daraus resultiert eine Reduktion der konstitutionellen Unterkühlung. Dies wiederum fördert das Wachstum der Störungen, wodurch die Grenzfläche zwischen der flüssigen und festen Phase vergrößert wird. Aus diesem Grund muss mehr Grenzflächenenergie aufgebracht

werden. Durch diese Steigerung an benötigter Energie stabilisiert sich die planare Eisfront [140].

Zum einen muss der Temperaturgradient an der Eisfront kleiner sein als der Gradient der Liquidus-Temperatur. Zum anderen spielt die Grenzflächenenergie eine entscheidende Rolle beim Aufbrechen der Eisfront. Mullins und Sekerka haben einen Term aufgestellt, der das Gradienten-Kriterium und die Grenzflächenenergie berücksichtigt [145]. Gemäß dieser Aussage wird die planare-Eisfront instabil, sobald die Differenz von G und G_L addiert mit dem Term, der in Abhängigkeit zur benötigten Grenzflächenenergie steht, kleiner null ist [140].

$$G - G_L(x)|_{x \rightarrow 0} + \frac{\Gamma * k * v^2}{D^2} < 0 \quad (\text{Formel 5})$$

<p>G: aufgeprägter Temperaturgradient</p> <p>G_L: Gradient der Liquidus-Temperatur</p> <p>Γ: Gibbs-Thomson-Koeffizient</p>	<p>k: Verteilungskoeffizient (siehe (Formel 4))</p> <p>v: Eisfrontgeschwindigkeit</p> <p>D: Diffusionskoeffizient</p>
--	--

Der Gibbs-Thomson-Koeffizient Γ gibt das Verhältnis aus Grenzflächenenergie und volumenbezogener Schmelzentropie an.

Ist dieses Kriterium erfüllt, entsteht nach kurzer Einlaufphase eine stabile, gleichmäßige nicht-planare Eiskristallmorphologie [145]. Eiskristalle wachsen in die konstitutionell unterkühlte Zone ein. Abhängig von den Erstarrungsparameter und der Lösung bildet sich eine typische Form der Eisfront. Es werden zwei Geometrien der nicht-planaren Eisfront unterschieden: Dendriten wachsen baumartig mit vielen Verzweigungen entlang der kristallographischen Vorzugsrichtung. Die Zellen hingegen sind glatt ohne Verzweigungen und weisen ein Wachstum entlang der Hauptwärmestromrichtung auf (siehe **Abbildung 2-8**) [141]. Je größer der Grad der Instabilität ist, desto eher tritt dendritisches Wachstum auf [146]. Für die Charakterisierung der Morphologie der nicht-planaren Eisfront wird der primäre Zellabstand λ und die Zellbreite D bestimmt [141].

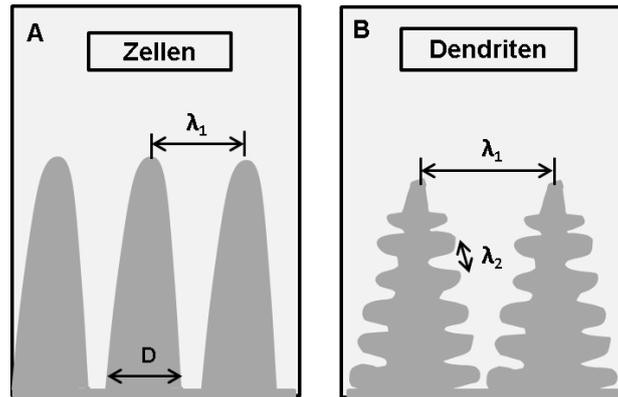


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung der möglichen Geometrien der nicht-planaren Eisfront. λ_1 = primärer Zell- bzw. Dendritenabstand, λ_2 = sekundärer Dendritenabstand D = Zellbreite.
 A: Zellförmiges Wachstum der Eiskristalle.
 B: Dendritisches Wachstum der Eiskristalle.

Der Temperaturgradient und die Erstarrungsrate haben einen bedeutenden Einfluss auf die entstehende Morphologie [18, 147]. K. Stuckensen stellte fest, dass mittels Variation des Temperaturgradienten die Porenmorphologie der Scaffolds relativ präzise eingestellt werden kann [18].

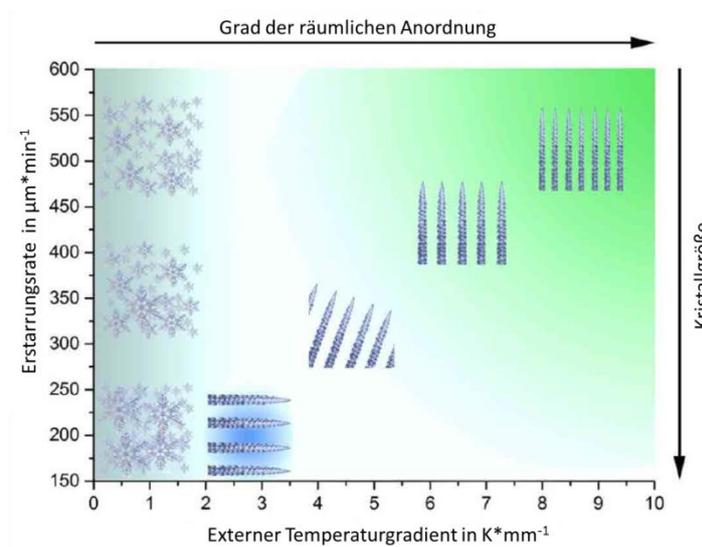


Abbildung 2-9: Abhängigkeit der Erstarrungsmorphologie von der Erstarrungsrate und des Temperaturgradienten für den Ausgangsstoff Kollagen. Die Kristallgröße nimmt mit zunehmender Erstarrungstemperatur ab, während die räumliche Anordnung mit steigendem Temperaturgradienten zunimmt. Für kleine Temperaturgradienten ist eine isotrope Erstarrung zu erwarten (grauer Bereich). Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung sind verschiedene Erstarrungsraten für den gleichen Temperaturgradienten möglich. Der Grenzfall der anisotropen Erstarrung tritt bei einer geringen Erstarrungsrate und kleinen bis mittleren Temperaturgradienten auf. Es kommt zu anisotropem Eiskristallwachstum nahezu orthogonal zum Temperaturgradienten (blauer Bereich). Mit weiterer Zunahme der Erstarrungsrate und des Temperaturgradienten erreicht die anisotrope räumliche Anordnung eine antiparallele Ausrichtung zum Temperaturgradienten mit Abnahme der Porengröße (grüner Bereich); (Abbildung aus [18] mit Genehmigung von Kai Stuckensen).

In **Abbildung 2-9** wird deutlich, dass bei sehr kleinen Temperaturgradienten für Kollagen äquiaxiale, globulistische Eiskristalle entstehen, die eine isotrope Morphologie der Proben nach sich ziehen. Es entsteht eine planare Eisfront [147]. Der Abtransport der Partikel durch Diffusion und Auftriebskonvektion vor der Eisfront ist schneller als deren Wachstum. Es tritt keine erhöhte Konzentration und somit keine konstitutionelle Unterkühlung vor der Eisfront auf [148]. Bei großen Temperaturgradienten und folglich höheren Kühlraten und Geschwindigkeiten der Erstarrungsfront existiert ein konstitutionell unterkühlter Bereich vor der Eisfront. Es wird eine nicht planare-Eisfront gebildet, was in einer anisotropen Porenmorphologie der Proben resultiert [141]. Die Kristallgröße nimmt mit zunehmender Erstarrungsrate ab, wohingegen die räumliche Anordnung mit steigendem Temperaturgradienten zunimmt. **Abbildung 2-9** visualisiert die Änderung der Porenmorphologie in Abhängigkeit des Temperaturgradienten und der Erstarrungsrate [18]. Die numerischen Werte können jedoch nicht direkt von Kollagen-Scaffolds auf SF-Scaffolds übertragen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung der Seidenfibroin-Lösungen

Für die Herstellung der SF-Lösungen wurde zunächst Serizin aus den Seidenkokon-Stücken herausgelöst. Die so entstandene gereinigte Seide wurde in Lithiumbromid-Lösung gelöst und anschließend per Dialyse gegen demineralisiertes Wasser gereinigt.

Zur Gewinnung von 20 g gereinigter Seide wurden Seidenkokons (Seidentraum, Leipzig, Deutschland) aufgeschnitten und die Raupen entfernt. Daraufhin wurden 3 g wasserfreies Natriumcarbonat (Na_2CO_3) (Chargen-Nr.: A0362793507, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 1,5 L demineralisiertem Wasser gelöst und mit Hilfe einer Heizplatte (IKA, C-MAG HS7, Burladingen, Deutschland) auf 80 °C erhitzt. Parallel dazu wurden zwei Bechergläser mit je 1,5 L demineralisiertem Wasser für den anschließenden Waschvorgang auf etwa 80 °C temperiert (IKA, RET Basic, Combimag REO, Burladingen, Deutschland). Sobald die Salzlösung eine Temperatur von 80 °C erreichte (Kontrolle mittels Thermometer), wurden 30 g aufgeschnittene Seidenkokons hinzugegeben. Die Temperatur wurde für 1 h bei 80 °C gehalten. Anschließend folgte die zweimalige Waschung in jeweils 1,5 L temperiertem, demineralisiertem Wasser. Die gereinigte Seide wurde über Nacht im Trockenschrank (Memmert, SLE 500, Schwabach, Deutschland) bei 60 °C getrocknet (siehe **Abbildung 3-1**).



Abbildung 3-1: Getrocknetes und gereinigtes SF nach Lagerung bei 60 °C über Nacht im Trockenschrank.

Am nächsten Tag wurde die gereinigte Seide in 200 mL 9,3 M Lithiumbromid-Lösung (LiBr., Chargen-Nr.: STBG5878V, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gelöst. Das Becherglas wurde mit Alufolie bedeckt und für 3 h bei 60 °C

im Trockenschrank gelagert. Grobe Verunreinigungen wie Reste der Seidenraupe wurden mit einem Löffel entfernt. Es folgte die Abfüllung in fünf 15 cm lange ZelluTrans-Dialyseschläuche aus trockener regenerierter Cellulose mit einem Molecular Weight Cut Off (MWCO) von 3500 Da (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Diese wurden zuvor für 30 min in Reinstwasser eingelegt. Die SF-Lösungen wurden unter Schütteln auf einer Rüttelplatte (Heidolph, Rotamax 120, Schwabach, Deutschland) gegen 9 L Reinstwasser dialysiert. Nach 30 min wurde die Leitfähigkeit mit dem ExStick TDS Meter (Extech, Hamburg, Deutschland) bestimmt, die Dialyseschläuche in einen zweiten mit 9 L Reinstwasser befüllten Behälter auf der Rüttelplatte umgelagert und erneut mit 9 L Reinstwasser befüllt. Der Vorgang des Wasserwechsels wurde so lange wiederholt, bis die elektrische Leitfähigkeit < 10 Mikrosiemens (μS) betrug. Die fertig dialysierte SF-Lösung wurde in Zentrifugenröhrchen (50 mL) bei 4500 rotations per minutes (rpm) für 10 min zentrifugiert (Sigma, 3-16K, Osterode am Harz, Deutschland), in eine Schottflasche gegeben und bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert. Durch diesen Prozess wurde eine circa 4 % SF-Lösung mit einem Volumen von etwa 390 mL erhalten.

3.2 Konzentrationsbestimmung und Aufkonzentrierung

Die SF-Konzentrationen wurden mittels Trocknungsverlust ermittelt. Dafür wurde das Gewicht von zwei kleinen Petrischalen ($\varnothing = 35\text{ mm}$, $h = 10\text{ mm}$) mit einer Feinwaage (Ohaus Explorer, Parsippany, USA) bestimmt, je 1 mL SF-Lösung in die Petrischalen pipettiert und über Nacht im Trockenschrank bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach vollständiger Trocknung der SF-Lösung wurde am nächsten Tag das Gesamtgewicht der Petrischale mit getrockneter SF-Lösung bestimmt.

Sei V das Volumen der SF-Lösung und w das Trockengewicht der SF-Lösung, dann bestimmt sich die SF-Konzentration c_{SF} wie folgt:

$$c_{SF} = \frac{w}{V} \cdot 100, \quad [c_{SF}] \text{ in } w/V \% \quad (\text{Formel 6})$$

Die Einheit w/V % wird im Folgenden nur noch als % angegeben. Die SF-Konzentration ergab sich als das arithmetische Mittel der beiden Probenkonzentrationen.

Um eine 2 % Konzentration der SF-Lösung zu produzieren, wurde die 4 % Ausgangslösung mit Reinstwasser verdünnt. Zur Kontrolle wurde die Konzentration durch Trocknungsverlust bestimmt (Formel 6). Die 8 % SF-Konzentration wurde mittels Dialyse gegen 20 Gew.-% Polyethylenglycol (PEG) 20000 Da-Lösung (PEG 20000, Charge S7200697622, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Dafür wurden drei 15 cm lange Dialyseschläuche aus trockener, regenerierter Cellulose mit einem MWCO von 3500 Da (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) für 30 min in Reinstwasser eingelegt, mit 4 % SF-Lösung befüllt und mit Dialyseklammern verschlossen. Diese wurden in einen 10 L Behälter mit 20 Gew.-% PEG 20000 Da-Lösung auf einer Rüttelplatte (Heidolph, Rotamax 120, Schwabach, Deutschland) für 7,5 h gegeben. Danach wurde die aufkonzentrierte SF-Lösung in eine Schottflasche gefüllt und die Konzentration bestimmt. Aus 275 mL 4 % SF-Lösung konnten circa 75 mL 8 % SF-Lösung gewonnen werden.

3.3 Herstellung der Seidenfibroin-Scaffolds

3.3.1 MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds

Von den verschieden konzentrierten SF-Lösungen wurden 6 mL in die kleine Petrischale ($\varnothing = 35$ mm, h = 10 mm) bzw. 30 mL in die große Petrischale ($\varnothing = 94$ mm, h = 16 mm) pipettiert, um daraus Scaffolds zu generieren. Die Petrischale wurde für mindestens 3 h waagrecht im Gefrierschank bei -25 °C gelagert.

Anschließend wurden 2,5 g (2,5 Gew.-%) oder 5 g (5 Gew.-%) MCPA (Budenheim, C11-01 MV5246, Budenheim, Deutschland) in ein Becherglas gegeben und ad 100 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Zu dieser Mischung wurden 2 mL Ortho-Phosphorsäure 85 % (Chargen-Nr.: K47168373542, Merck KGA, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Sobald die MCPA-Phosphorsäure-Lösung klar war, wurde der pH-Wert bestimmt. Die Prüfkörper aus gefrorener SF-Lösung wurden aus der Petrischale entformt, ausgemessen und in die MCPA-Phosphorsäure-Lösung gegeben. Nach einer

Einlagedauer von 3 d oder 6 d wurde der Prüfkörper entnommen, vermessen und der pH-Wert der MCPA-Phosphorsäure-Lösung bestimmt.

Für die großen Proben wurde die doppelte Menge an MCPA-Phosphorsäure-Lösung hergestellt. Ansonsten war die Durchführung identisch.

3.3.2 Bruschi-Seidenfibroin-Scaffolds

Zur Herstellung von SF-Scaffolds mit β -TCP wurden zunächst 4 mL 4 % SF-Lösung in eine kleine Petrischale ($\varnothing = 35$ mm, h = 10 mm) pipettiert. Anschließend wurde 1 g β -TCP (BaMe Charge 24102012 5 h 1050 °C < 355 μ m 1 h trocken gemahlen 2 Ri, 200 U/min) unter Rühren eines kleinen Rührfischs auf dem Magnetrührer (IKA, C-MAG HS7, Staufen, Deutschland) in die SF-Lösung gegeben. Die β -TCP-SF-Suspension wurde über Nacht waagrecht im Gefrierschrank bei -25 °C gelagert. Ein Teil der Proben wurde zusätzlich 3 d am Gefriertrockner (Alpha 1-2 LD, Christ, Osterode am Harz, Germany) lyophilisiert.

Danach wurden die gefrorenen wie auch zusätzlich lyophilisierten Prüfkörper aus β -TCP-SF-Suspension in 25 mL 20 %-iger Phosphorsäure (Charge K47168373542, Merck KGA, Darmstadt, Deutschland) für 3 h oder im Intervallprozess (1 min Phosphorsäure, 15 min Luft, 1 min Phosphorsäure, 15 min Luft, 1 min Phosphorsäure) eingelegt.

Anschließend erfolgte für alle Proben eine Lufttrocknung von 3 d und eine Trocknung im Trockenschrank (Mettler, ULE 500, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C für eine Stunde.

3.4 pH-Wert Messung

Die Messungen des pH-Werts der unterschiedlichen SF-Konzentrationen und der MCPA-Phosphorsäure-Lösung erfolgte durch das Präzisions-pH-Meter (InoLab Level 1, WTW, Weilheim, Deutschland) mit einer in 3 mol*L⁻¹ Kaliumchlorid (KCl)-Lösung gelagerten Elektrode (InLab Surface, Mettler Toledo, Gießen, Germany). Das pH-Meter wurde mit zwei Puffer-Lösungen im pH-Bereich 4-7 (Certipur[®], Pufferlösung pH 4.00 (20 °C), Charge HC399601 und Certipur[®], Pufferlösung pH 7.00 (20 °C), Charge HC301024 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) kalibriert.

Der pH-Wert wurde direkt nach Herstellung der verschiedenen SF-Konzentrationen bei Raumtemperatur bestimmt. Die MCPA-Phosphorsäure-Lösung wurde hinsichtlich pH-Wert direkt nach Herstellung sowie nach 3 d bzw. 6 d Einlagedauer gemessen.

3.5 Druckfestigkeitsmessung

Zur Testung der Druckfestigkeit der SF-Scaffolds wurden Prüfkörper der Konzentrationen 2 %, 4 % und 8 % wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben hergestellt und in kleine Petrischalen ($\varnothing = 35$ mm, $h = 10$ mm) gefüllt. Die Lösungen wurden eingefroren und in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung für 3 d und 6 d eingelegt. Aus den entstandenen SF-Scaffolds wurden mittels Ratiomed Biopsie Hautstanze (Charge BP488, Megro GmbH & CoKG, Wesel, Deutschland) jeweils sieben zylinderförmige Prüfkörper mit einem Durchmesser von 8 mm für den statischen Druckversuch aus dem Konstrukt ausgestochen. Die Höhe der Scaffolds war dabei konzentrationsabhängig (**Tabelle 4**). Die Prüfkörper wurden bis zur Messung in Reinstwasser gelagert.

Für den dynamischen Druckversuch wurden zwei 4 % SF-Scaffolds eingefroren und sowohl in 2,5 Gew.-% als auch in 5 Gew.-% MCPA-Lösung für 3 d eingelegt. Aus diesen Scaffolds wurden jeweils zwei Proben mit der Hautstanze für die dynamische Testung ausgestochen. Dabei betrug der Durchmesser 8 mm und die Höhe 4,5 mm. Die Proben wurden ebenso wie beim statischen Druckversuch in Reinstwasser gelagert.

Die Bestimmung der Druckfestigkeit erfolgte durch die Prüfmaschine Electro Force 5500 (Bose GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) mit einem 22 N-Kraftaufnehmer. Vor der Messung wurde von jedem Prüfkörper sowohl der Durchmesser als auch die Höhe mit der Schieblehre bestimmt. Daraufhin wurde die Probe mittig in einer kleinen Petrischale ($\varnothing = 35$ mm, $h = 10$ mm) auf der Kraftmessdose positioniert und mit 1 mL Reinstwasser benetzt (**Abbildung 3-2 A**). Die Probe wurde so positioniert, dass durch das Andrücken an die obere Messeinheit eine Kraft von 0,05 N erreicht wurde. Im Anschluss wurde die Kraft auf 0 N normiert.

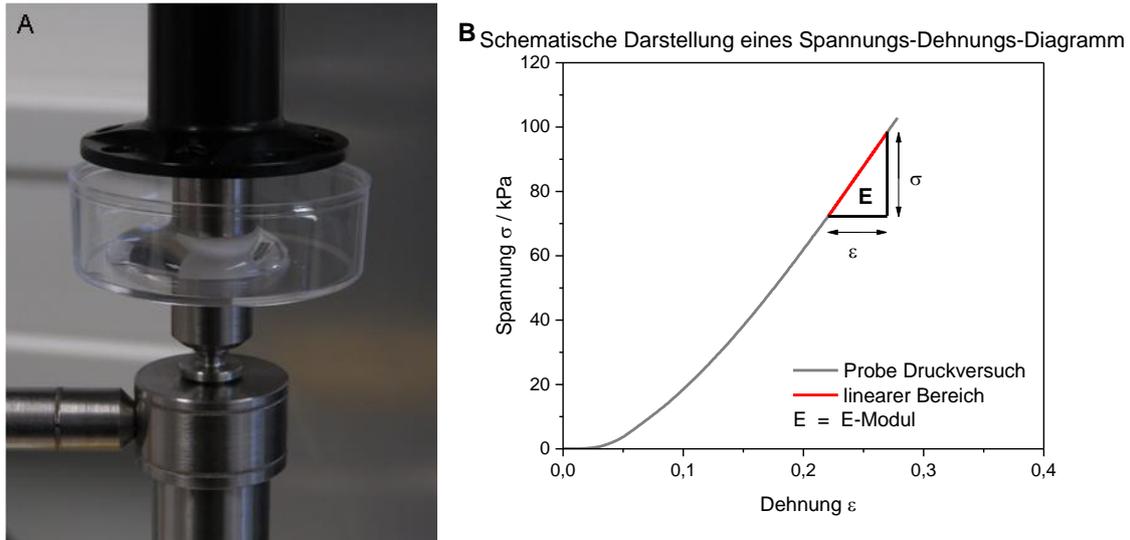


Abbildung 3-2: Druckfestigkeitsmessung.

A: Aufbau des Druckversuches. Der ausgestanzte Prüfkörper aus dem SF-Scaffold wurde unter feuchten Bedingungen hinsichtlich Druckfestigkeit mit einem 22 N Kraftaufnehmer vermessen.

B: Schematische Darstellung eines Spannungs-Dehnungs-Diagramms mit Steigungsdreieck zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls (E-Modul).

Bei der statischen Druckmessung betrug die Prüfgeschwindigkeit $0,01 \text{ mm} \cdot \text{sec}^{-1}$ und die Eindringtiefe in die Probe 1,5 mm. Bei der dynamischen Druckmessung, die mit über 1000 Messzyklen eine zyklische Langzeitdruckbelastung darstellte, bewegte sich der Stempel ebenfalls mit einer Geschwindigkeit von $0,01 \text{ mm} \cdot \text{sec}^{-1}$. Die Messgeometrie fuhr bis 0,1 mm in die Probe ein, komprimierte die Probe vor und hielt für 10 sec diese Kompression (Plateau-Phase). Im Anschluss startete die zyklische Messung mit 10-1010 Zyklen bei einer Eindringtiefe von 1,5 mm. Die Zyklen 0-10, 100-110, 500-510 und 1000-1010 wurden mit der Software Wintest 7 Controls aufgezeichnet. Dabei wurde der Prüfkörper bei beiden Messungen hochkant axial belastet. Aus den Messwerten wurden mit Hilfe der Software OriginPro 2016 Spannungs-Dehnungs-Diagramme erstellt und die jeweiligen E-Module gemäß (Formel 7), (Formel 8) und (Formel 9) berechnet.

Da das Material nur in eine Achse belastet wurde, ist die Dehnung ϵ in diesem Fall eine skalare Größe und definiert durch (Formel 7).

$$\epsilon = \frac{\Delta h}{h} \quad (\text{Formel 7})$$

Hierbei bezeichnet h die Probenhöhe und Δh den zurückgelegten Weg des Druckstempels.

Auf der kreisförmigen Probe mit Radius r lässt sich die Spannung σ aus der Fläche A und der auf ihr wirkenden Kraft F berechnen.

$$\sigma = \frac{F}{A} = \frac{F * (h - \varepsilon)}{\pi \cdot r^2 \cdot h} \quad (\text{Formel 8})$$

Der E-Modul ist über den gesamten Dehnungsbereich nicht konstant. Er wurde im nahezu linearen Dehnungsbereich von 0,22 bis 0,27 (**Abbildung 3-2 B**) als das arithmetische Mittel der sieben Messungen berechnet.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (\text{Formel 9})$$

3.6 Zugfestigkeitsmessung

Zur Ermittlung der Zugfestigkeit der SF-Scaffolds wurden jeweils zehn stäbchenförmige Prüfkörper aus einem Konstrukt hergestellt. Dafür wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben jeweils 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösung in einer großen Petrischale ($\varnothing = 94$ mm, $h = 16$ mm) eingefroren und in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung über einen Zeitraum von 3 d und 6 d eingelegt. Die entstandenen Scaffolds wurden mit einer Schere in 6 mm breite und mindestens 5 cm lange Stäbchen zu Recht geschnitten. Die Höhe der Prüfkörper entsprach dabei der Höhe des Scaffolds, welche von der Konzentration der SF-Lösungen abhängig war. Die Stäbchen wurden bis zur Vermessung in Reinstwasser gelagert.

Die Messung der Zugfestigkeit wurde mit einer statischen Prüfmaschine (Z1010, Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) unter Verwendung eines 200 N-Kraftaufnehmers durchgeführt. Dazu wurden von jeder Probe Höhe und Breite mit Hilfe einer elektronischen Schieblehre bestimmt, die Zugbacken mit doppelseitigem Klebeband (Tesa, Bastelband doppelseitig, Norderstedt, Deutschland) versehen und zusätzlich an

der Vorderkante der Zugbacken mit Sekundenkleber befestigt. Das Stäbchen wurde so in die Zugbacken eingespannt, dass der Abstand der Zugbacken immer 9 mm betrug.

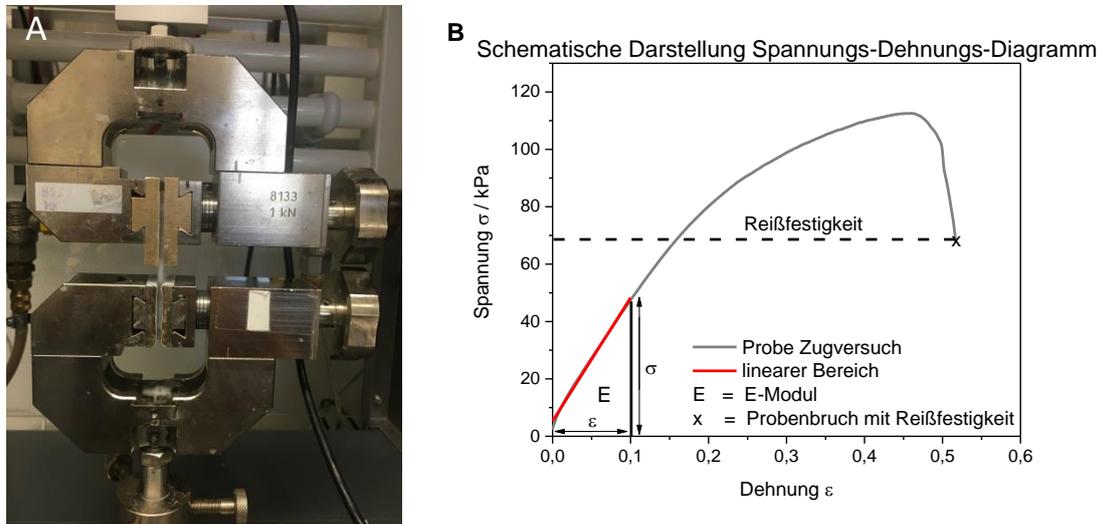


Abbildung 3-3: Zugfestigkeitsmessung.

A: Aufbau des Zugversuchs. Der Prüfkörper aus dem SF-Scaffold wurde in die Zugbacken eingespannt und hinsichtlich Zugfestigkeit mit einem 200 N-Kraftaufnehmer vermessen.

B: Schematische Darstellung eines Spannungs-Dehnungs-Diagramms mit Steigungsdreieck zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls (E-Modul) und Probenbruch mit Reißfestigkeit.

Nach dem Start wurde die Messung der Stäbchen axial auf Zug mit einer Geschwindigkeit von $12,5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer Vorkraft von 0,1 N durchgeführt. Die Software testXpert II zeichnete die benötigte Kraft F und den zurückgelegten Weg Δh auf. Daraus wurden ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm, der E-Modul sowie die Reißfestigkeit mit der Software OriginPro 2016 nach den (Formel 7), (Formel 9) und (Formel 10) berechnet.

Auch hier wurde das Material nur in eine Achse belastet. Daraus resultierte, dass die Dehnung ϵ der Zugfestigkeitsmessung gleich definiert wurde wie in (Formel 7) beschrieben, wobei h den Abstand der Zugbacken und Δh den zurück gelegten Weg der Zugbacken darstellt.

Für die rechteckige Probe mit der Probenhöhe h und der Probenbreite b lässt sich die Spannung σ aus der Fläche A und der auf ihr wirkenden Kraft F gemäß (Formel 10) berechnen.

$$\sigma = \frac{F}{A} = \frac{F}{b * h} \quad (\text{Formel 10})$$

Der E-Modul war über den gesamten Dehnungsbereich nicht konstant. Er wurde im nahezu linearen Dehnungsbereich von 0 bis 0,1 (**Abbildung 3-3 B**) als arithmetisches Mittel der zehn Messungen berechnet.

3.7 Phasenanalyse mittels Röntgendiffraktometrie (XRD)

Zum Nachweis von mineralischen Substanzen in den SF-Scaffolds wurden Röntgendiffraktogramme mittels Röntgendiffraktometer (D5005, Siemens, München, Deutschland) und der Software Diffrac Plus XRD Commander erstellt.

Dafür wurden die SF-Scaffolds zum einen direkt nach Entnahme aus der MCPA-Phosphorsäure-Lösung (feucht) mit Knete in den Messteller eingebracht und mit einer Glasplatte angepresst, damit der obere Rand der Probe plan mit dem Rand des Messtellers abschloss. Zum anderen wurden die Scaffolds nach der Entnahme über Nacht im Trockenschrank (Memmert, SLE 500, Schwabach, Deutschland) bei 60 °C gelagert und anschließend mit Reibschale und Pistille gemörsert. Zum Schluss wurden sie mit der Kaffeemühle (CLAtronic, KSW 3307, Kempen, Deutschland) zu noch feinerem Pulver gemahlen und der Grob- vom Feinanteil mit einem Edelstahl Prüfsieb (Partikelgröße 224 µm, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) abgetrennt. Beide Phasen wurden separat in einen Messteller eingebracht und mit einer Glasplatte plan gedrückt.

Die Proben wurden in das Röntgendiffraktometer eingespannt und mit CuK_α-Strahlung bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Emissionsstrom von 40 mA im Winkelbereich 2θ analysiert. Die qualitative Phasenzusammensetzung wurde bei den feuchten Proben im Winkelbereich von 10 °-60 ° bei einer Schrittgeschwindigkeit von 3 Sekunden pro Schritt und einer Schrittweite von 0,02 ° bestimmt. Die trockenen Proben wurden im Winkelbereich von 20 °-40 °, einer Schrittgeschwindigkeit von 1,5 Sekunden pro Schritt und einer Schrittweite von 0,02 ° vermessen.

Das resultierende Beugungsmuster wurde mit der Software EVA ausgewertet und mit Referenzmustern aus der Datenbank von International Centre for Diffraction Data (ICDD) verglichen. Die relevanten Referenzmuster sind im Folgenden gelistet.

Tabelle 2: Relevante Referenzmuster aus International Centre for Diffraction Data (ICDD)-Datenbanken.

Calciumphosphat	PDF-Nummer
Whitlockit (β -TCP)	09-0169
Monetit	09-0080
Bruschit	09-0077
MCPA	09-0347

3.8 Gefrierstrukturierung

Neben rein isotropem Gefrieren der SF-Lösungen im Tiefkühlschrank wurde der anisotrope Gefrierprozess mittels definiertem Temperaturgradienten hinsichtlich Strukturierung der SF-Scaffolds untersucht.

3.8.1 Manuelle Gefrierstrukturierung

Eine Gefrierstrukturierung der SF-Lösungen wurde manuell mit einer Kupferplatte ($\varnothing = 5$ cm, $h = 2$ cm), einer Styroporbox und Flüssigstickstoff durchgeführt. Dafür wurde die Kupferplatte in der Styroporbox platziert, mit Flüssigstickstoff bedeckt und für 30 min gekühlt. Anschließend wurde der Flüssigstickstoff abgeschüttet und eine kleine Petrischale ($\varnothing = 35$ mm, $h = 10$ mm) mit 4 mL SF-Lösung auf der gekühlten Platte positioniert. Nach 20 min wurde die Petrischale mit einer Holzklammer entnommen und sofort in einem vorgekühlten Lyophilisationsbehälter im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt. Nach Fertigstellung aller Proben wurde das Lyophilisationsgefäß in einer Styroporbox mit Kühlpackungen zum Gefriertrockner (Alpha 1-2 LD, Christ, Osterode am Harz, Deutschland) transportiert und umgehend an die Anlage angehängt. Nach 3 d wurde der Gefrierstrocknungsprozess beendet.

Zur Kontrolle der Porenstrukturierung der SF-Scaffolds wurden die Proben vorsichtig aus der Petrischale gelöst und mit einem Keramikmesser in feine Streifen geschnitten. Diese wurden unter dem Stereomikroskop (Stereo Discovery V20, Zeiss, Jena,

Deutschland) betrachtet. Daraufhin wurden einzelne Proben genauer unter dem Rasterelektronenmikroskop (siehe Kapitel 3.9) analysiert.

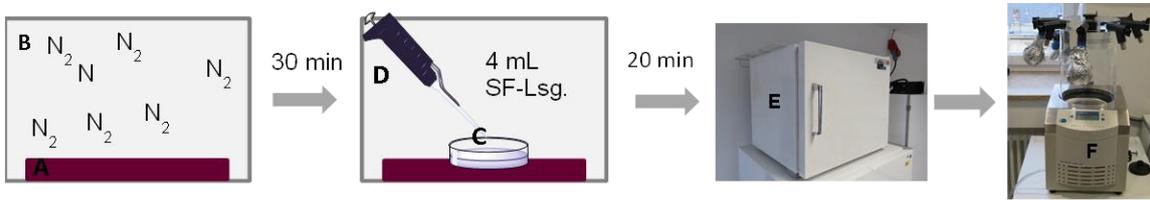


Abbildung 3-4: Versuchsaufbau der manuellen Gefrierstrukturierung. A = Kupfplatte, B = Styroporbox, C = Petrischale, D = Pipette, E = Gefrierschrank, F = Gefriertrocknungsanlage.

3.8.2 Maschinelle Gefrierstrukturierung

Mit dem Gerät für gerichtete Gefrierstrukturierung ACD (adjustable cryostructuring device 5.0, Würzburg, Deutschland) wurde maschinell eine Porenstruktur in SF Scaffolds generiert (siehe **Abbildung 3-5**).

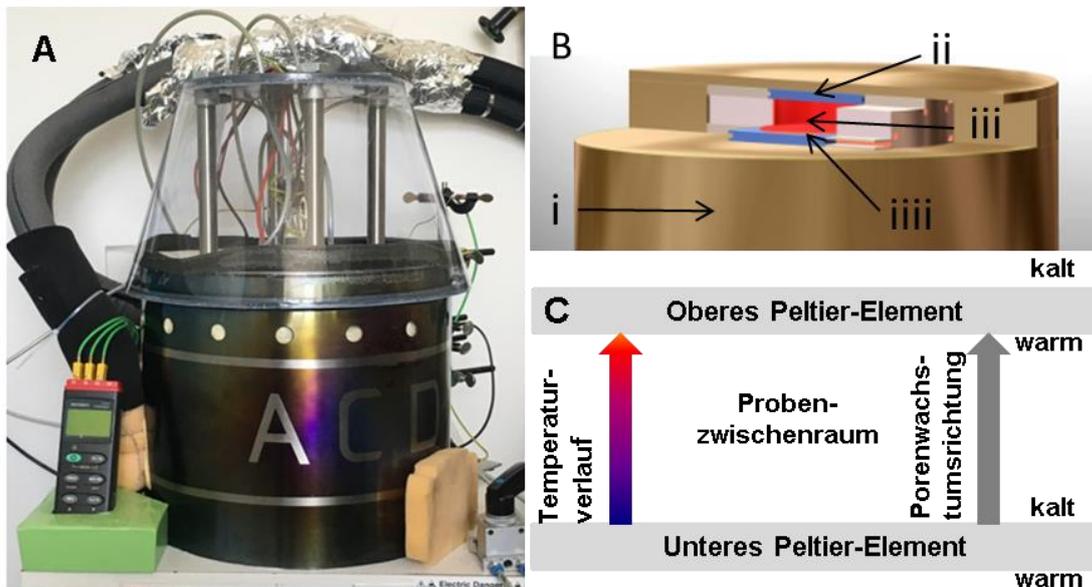


Abbildung 3-5: Versuchsaufbau der maschinellen Gefrierstrukturierung.

A: Foto der Apparatur für gerichtete Gefrierstrukturierung (ACD).

B: Schematischer Aufbau der ACD; i = Zylinder mit Kühlflüssigkeit, ii = Oberes Peltier Element, iii = Petrischale, iii = Unteres Peltier-Element (Abbildung aus [18] mit Genehmigung von Kai Stuckensen).

C: Schematische Darstellung der Temperatur der Peltier-Elemente (Abwandlung von [18]).

Dafür wurde die ACD auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, wobei der Cryostat (JulaboFPW 91, Julabo SL, Seelbach, Deutschland) für 4 h auf $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt wurde. An den Netzgeräten

(Voltcraft PSP 12010 und Voltcraft Plus PSP 12010, Hirschau, Deutschland) wurde für das obere Peltier-Element eine Spannung von 6,9 V und eine Stromstärke von 4,3 A eingestellt, wobei eine Leistung von 29,9 W erreicht wurde. Am unteren Peltier-Element lagen eine Spannung von 7,0 V sowie eine Stromstärke von 7,6 A an, wobei die Leistung 53,2 W betrug. Es stellte sich eine Temperatur von 27,5 °C am oberen Peltier-Element und -49,2 °C am unteren Peltier-Element ein. Daraus resultierte ein Temperaturgradient ΔT von 5,5 K*mm⁻¹. Nach Einstellung aller Parameter wurden 4 mL SF-Lösung der Konzentrationen 2 %, 4 % und 8 % in eine kleine Petrischale ($\varnothing = 35$ mm, $h = 10$ mm) eingebracht und nach Erreichen eines Plateaus (definiert als konstanter Temperaturwert innerhalb von 30 sec) aus der Gefrierstrukturierungsanlage entnommen.

Die Probe wurde mit Hilfe einer Styroporbox mit Kühlelementen sofort zum Gefrierschrank gebracht und in einem vorgekühlten Lyophilisationsgefäß bei -20 °C zwischengelagert. Sobald alle Proben gefrierstrukturiert waren, wurden sie für 4 d mit Hilfe der Gefriertrocknungs-Apparatur (Alpha 1-2 LD, Christ, Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert.

Zur Überprüfung des erfolgreichen, gerichteten Gefrierprozesses wurden die Proben zuerst unter dem Stereomikroskop (Stereo Discovery V20, Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet. Einzelne Proben wurden unter dem Rasterelektronenmikroskop (siehe Kapitel 3.9) bei besserem Auflösungsvermögen und höherer Schärfentiefe untersucht.

Die Temperaturaufnahme erfolgte sowohl für die Probe als auch das obere und untere Peltier-Element durch einen Datalogger (Voltcraft K204, Hirschau, Deutschland) im 5-Sekunden-Intervall. Der Datalogger wurde mit der Software SE309 ausgelesen und mit OriginPro 2016 wurde ein Temperatur-Zeit-Diagramm erstellt.

Der Temperaturgradient ΔT lässt sich aus der Temperaturdifferenz (T-Diff) des oberen und unteren Peltier-Elementes und dem Abstand h der beiden Peltier-Elemente berechnen. Der Abstand h entspricht hierbei der Höhe der Petrischale. T-Diff wurde als arithmetisches Mittel zum Zeitpunkt 0 °C in der Probe und des am Schluss sich einstellenden 30 sec-Temperaturplateaus bestimmt. Unter Annahme einer linearen

Temperaturänderung über die Höhe h der Petrischale gilt für den Temperaturgradienten ΔT der Zusammenhang wie in (Formel 11) beschrieben.

$$\Delta T = \frac{T - Diff}{h} \quad (\text{Formel 11})$$

3.8.3 Mineralisation von gefrierstrukturierten Seidenfibroin-Scaffolds

Nach manueller wie auch maschineller Gefrierstrukturierung wurden die gefrorenen, gefrierstrukturierten SF-Scaffolds direkt in MCPA-Phosphorsäure-Lösung für 3 d eingelegt und anschließend gefriergetrocknet. Zudem wurden auch lyophilisierte, gefrierstrukturierte SF-Scaffolds für 3 d in MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegt und am Ende der Inkubationszeit erneut gefriergetrocknet.

Die MCPA-Phosphorsäure-Lösung bestand aus 2,5 g (2,5 Gew.-%) MCPA (Budenheim, C11-01 MV5246, Budenheim, Deutschland), die in Reinstwasser auf 100 mL gelöst und anschließend mit 2 mL 85 %-iger Ortho-Phosphorsäure (Chargen-Nr.: K47168373542, Merck KGA, Darmstadt, Deutschland) angesäuert wurden.

Die hergestellten Proben wurden mittels REM hinsichtlich ihrer Porenstruktur analysiert.

3.9 Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die SF-Scaffolds gefriergetrocknet und mit einem Keramikmesser präpariert. Anschließend wurden die Proben durch eine Sputter-Beschichtungsanlage (K550, Emitech, Molfetta, Italien) mit einer 4 nm dicken Platinschicht besputtert. Die Aufnahmen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (DSM 940, Zeiss, Jena, Deutschland) angefertigt. Es wurden Bilder der lyophilisierten Proben und der gefriergetrockneten, in MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegten SF-Scaffolds aufgenommen. Die Strukturen wurden bei 100-, 500- und 1000-facher Vergrößerung analysiert. Zudem wurden Aufnahmen von β -TCP-SF-Scaffolds in 100-, 2000-, 5000- und 10 000-facher Vergrößerung angefertigt. Zur Untersuchung der Porenstruktur in manuell und maschinell

gefrierstrukturierten Scaffolds wurden REM-Bilder mit 50-, 100- und 200-facher Vergrößerung erstellt.

Mit der Bildverarbeitungssoftware Image J wurden Maßstabsbalken in die Aufnahmen eingebracht.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Seidenfibroin-Chargen

Zur Charakterisierung der SF-Chargen in Hinblick auf Konzentration und pH-Wert wurden elf SF-Chargen (KB-01-KB-11) direkt nach der Herstellung untersucht. Eine tabellarische Übersicht der Messwerte ist in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3: Konzentrationen und pH-Werte der elf SF-Chargen unmittelbar nach Herstellung.

SF-Charge	2 % Ist-Wert	4 % Ist-Wert	8 % Ist-Wert
KB-01	2,4 % pH = 7,2	5,1 % pH = 7,5	8,0 % pH = 7,5
KB-02	2,2 % pH = 7,1	4,1 % pH = 7,4	7,1 % pH = 7,4
KB-03	2,0 % pH = 7,1	3,5 % pH = 7,3	7,4 % pH = 7,4
KB-04	1,8 % pH = 7,0	3,0 % pH = 7,2	7,6 % pH = 7,3
KB-05	2,4 % pH = 7,1	3,9 % pH = 7,4	8,1 % pH = 7,4
KB-06	2,0 % pH = 7,1	3,8 % pH = 7,4	8,0 % pH = 7,5
KB-07	-	3,8 % pH = 7,3	7,4 % pH = 7,3
KB-08	Charge verworfen		
KB-09	1,88 % pH = 7,0	4,2 % pH = 7,4	8,6 % pH = 7,5
KB-10	1,4 % pH = 7,0	4,0 % pH = 7,4	-
KB-11	-	3,5 % pH = 7,2	7,8 % pH = 7,4

Trotz gleicher Herstellungsweise lagen Unterschiede in der SF-Konzentration und dem pH-Wert zwischen den elf Chargen vor, da es sich bei SF um ein Naturprodukt handelt, das gewissen Qualitätsschwankungen unterliegt.

Der pH-Wert aller SF-Chargen betrug zwischen 7 und 7,5. Darüber hinaus wurde deutlich, dass mit ansteigender SF-Konzentration der pH-Wert zunahm. Des Weiteren war eine Reproduktion der gewünschten SF-Konzentrationen gut möglich.

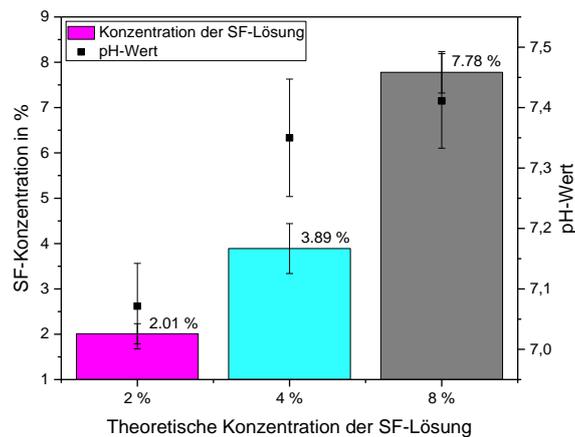


Abbildung 4-1: Darstellung der durchschnittlichen SF-Konzentrationen und deren pH-Werte im Vergleich.

4.2 Mechanische Charakterisierung I - Druckfestigkeit

4.2.1 Statische Druckfestigkeitsmessung

Beim Vermessen der Proben vor der statischen Druckfestigkeitsmessung fiel trotz gleicher Menge an SF-Lösung auf, dass die Höhe der Prüfkörper in Abhängigkeit von der Konzentration der Scaffolds schwankte. Die durchschnittliche Höhe der 2 %, 4 % und 8 % SF-Scaffolds (SF-Charge: KB-09 siehe **Tabelle 3**) nach 3 d und 6 d Einlagedauer in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung ist in **Tabelle 4** angegeben.

Tabelle 4: Durchschnittliche Probenhöhe der SF-Scaffolds in Abhängigkeit von SF-Konzentration, MCPA-Konzentration sowie Inkubationszeit im statischen Druckversuch.

	Inkubationszeit von 3 d		Inkubationszeit von 6 d	
	2,5 Gew.-% MCPA	5 Gew.-% MCPA	2,5 Gew.-% MCPA	5 Gew.-% MCPA
2 % SF	2,9 mm ± 0,20	3,0 mm ± 0,32	3,2 mm ± 0,15	3,4 mm ± 0,48
4 % SF	4,1 mm ± 0,28	4,1 mm ± 0,36	4,3 mm ± 0,16	4,3 mm ± 0,15
8 % SF	5,7 mm ± 0,34	5,8 mm ± 0,41	5,7 mm ± 0,09	5,8 mm ± 0,45

In **Tabelle 4** wird deutlich, dass die Probenhöhe mit steigender SF-Konzentration zunahm. Dabei lag die Höhe der 2 % SF-Scaffolds zwischen 2,9 und 3,4 mm. Die Probenhöhe der 4 % SF-Scaffolds befand sich im Bereich von 4,1 und 4,3 mm und die

Prüfkörper aus 8 % SF-Lösungen zeigten Werte im Bereich von 5,7 und 5,8 mm. Auffällig war zudem, dass eine Verdopplung der MCPA-Menge von 2,5 g auf 5 g MCPA pro 100 mL Reintwasser keinen Einfluss auf die Scaffoldhöhe hatte. Die Steigerung der Einlagedauer von 3 d auf 6 d führte bei den 2 % und 4 % SF-Proben zu einer Zunahme der Probenhöhe. Bei den 8 % Scaffolds wurde keine Änderung der Probenhöhe in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet.

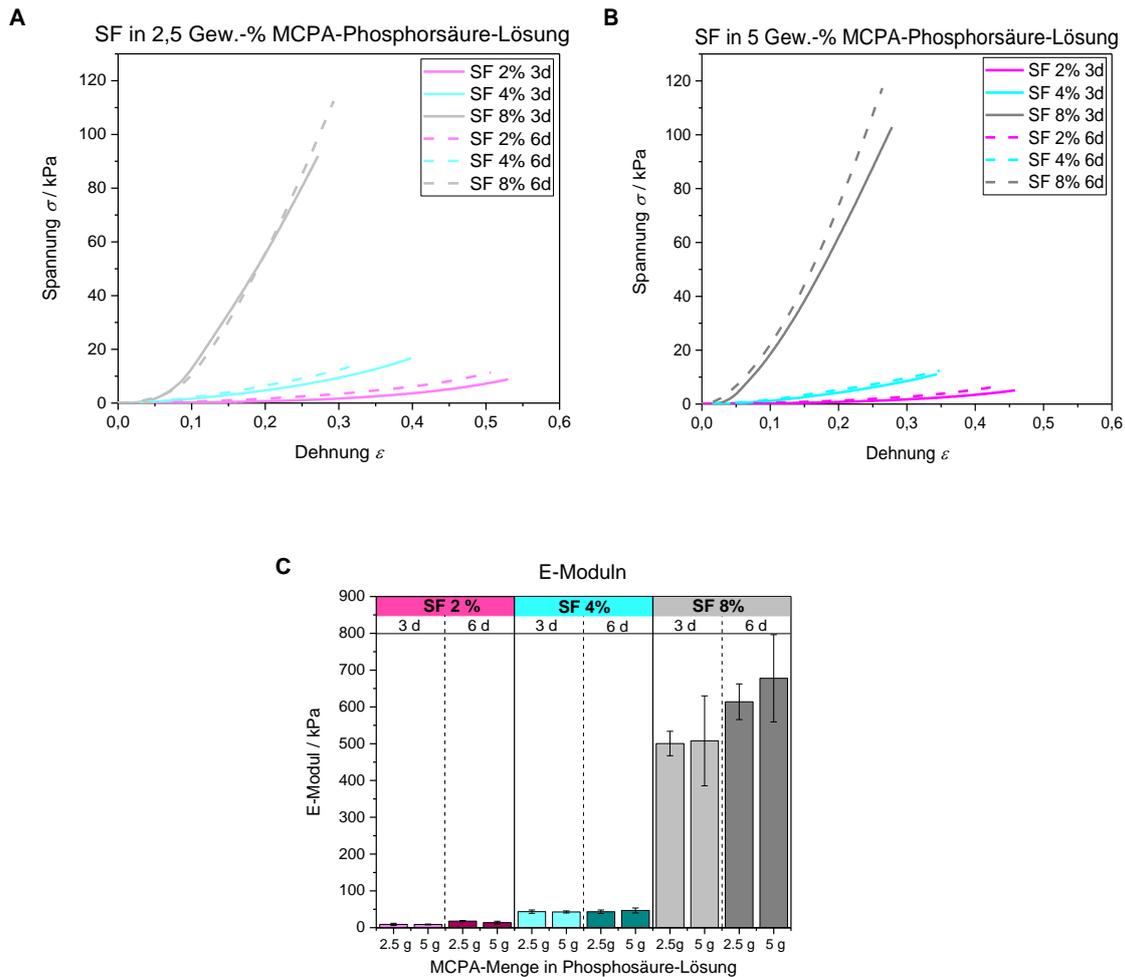


Abbildung 4-2: Spannungs-Dehnungs-Diagramme und E-Moduln der statischen Druckfestigkeitsmessung.
A: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der SF-Scaffolds in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung nach 3 d und 6 d.
B: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der SF-Scaffolds in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung nach 3 d und 6 d.
C: Durchschnittliche E-Moduln der 2 %, 4 % und 8 % SF-Scaffolds in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung nach 3 d und 6 d.

In den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen (**Abbildung 4-2 A, B**) konnte gezeigt werden, dass die Druckfestigkeit zwischen 5 und 120 kPa lag. Die Druckfestigkeit war

dabei abhängig von der SF-Konzentration. Die 2 % SF-Scaffolds wiesen eine Druckfestigkeit im Bereich von 5 und 10 kPa auf, während die 4 % SF-Scaffolds Werte zwischen 10 und 20 kPa erreichten und die 8 % SF-Scaffolds die höchsten Druckfestigkeiten von 90 bis 120 kPa aufwiesen. Mit Erhöhung der Einlagedauer von 3 d auf 6 d ließ sich ein Spannungsanstieg verzeichnen. Bei den 4 % SF-Scaffolds, die in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung gelagert wurden, blieb die Spannung bei einer Erhöhung der Einlagedauer von 3 d auf 6 d konstant. Die Zunahme der MCPA-Menge hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf die Druckfestigkeit. Allerdings ließ sich eine gewisse Abhängigkeit der MCPA-Menge auf die Dehnung der Prüfkörper feststellen. Diese verkleinerte sich mit Zunahme der MCPA-Menge von 2,5 g auf 5 g MCPA pro 100 mL Lösung. Eine erhöhte Dehnung trat jedoch bei den 8 % SF-Scaffolds in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung nach 3 d Einlagedauer auf.

Generell zeigten die Spannungs-Dehnungs-Diagramme, dass die Dehnung mit zunehmender SF-Konzentration ($2\% < 4\% < 8\%$) und Einlagedauer ($3\text{ d} < 6\text{ d}$) abnahm. Abweichend verhielt sich lediglich die 8 % SF-Konzentration nach 6 d Inkubation in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.

Der E-Modul der 2 % SF-Scaffolds betrug zwischen 8,7 und 17,8 kPa. Die 4 % SF-Proben wiesen ein durchschnittliches E-Modul zwischen 42,8 und 46,8 kPa auf. Die höchsten Werte erzielten die 8 % SF-Scaffolds mit Werten zwischen 500,5 und 677,8 kPa. Deutlich wurde hier, dass der E-Modul mit steigender SF-Konzentration zunahm. Beim Anstieg der SF-Konzentration von 2 % auf 4 % nahm der E-Modul um den Faktor 4 zu. Im Vergleich dazu lag eine deutlich größere Steigerung des E-Moduls um den Faktor 13 bei einer Erhöhung der Konzentration von 4 % auf 8 % vor. **Abbildung 4-2 C** weist darüber hinaus auf eine Erhöhung des E-Moduls mit einer Verlängerung der Einlagedauer von 3 d auf 6 d hin. Jedoch blieb der E-Modul der 4 % SF-Scaffolds bei einer verlängerten Einlagedauer konstant. Die Erhöhung der MCPA-Konzentration von 2,5 Gew.-% auf 5 Gew.-% zeigte keinen Effekt auf die E-Moduln.

4.2.2 Dynamische Druckfestigkeitsmessung

Für die dynamische Druckfestigkeitsmessung wurden 4 % SF-Scaffolds (SF-Charge: KB-06, siehe **Tabelle 3**) nach 3 d in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung

verwendet. Die Proben wurden über einen längeren Zeitraum in Reinstwasser gelagert, da jede zyklische Langzeitdruckmessung mehrere Stunden dauerte.

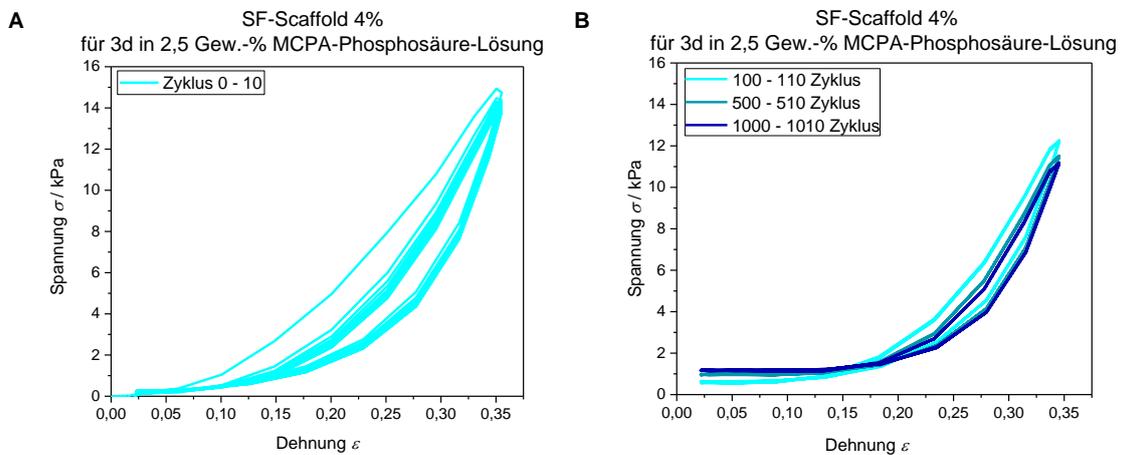


Abbildung 4-3: Spannungs-Dehnungs-Diagramme der dynamischen Druckfestigkeitsmessung.
 A: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der dynamischen Druckmessung mit den ersten zehn Zyklen eines 4 % SF-Scaffolds nach 3 d Einlagedauer in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.
 B: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der dynamischen Druckmessung mit 1010 Zyklen eines 4 % SF-Scaffolds nach 3 d in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung. Aufgezeichnet wurden die Messzyklen 100-110, 500-510 sowie 1000-1010.

In **Abbildung 4-3 A** ist ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines 4 % SF-Scaffolds nach 3 d Lagerung in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung nach den ersten zehn Zyklen der dynamischen Druckmessung dargestellt. Zu Beginn der Messung dauerte es in etwa zehn Zyklen, bis sich ein Gleichgewicht der inneren Struktur der Probe einstellte und deckungsgleiche Messkurven erhalten wurden. Ab dem zweiten Zyklus nahm die Spannung mit jeder weiteren Kompression kontinuierlich ab, wobei die Reduktion der Spannung von einem zum nächsten Zyklus immer geringer wurde und sich einer Endkurve annäherte.

Im Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines weiteren 4 % SF-Scaffolds, welcher ebenfalls für 3 d in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegt wurde, wurden die Zyklen 100-110, 500-510 sowie 1000-1010 dargestellt. Darin wurde die Reduktion des Spannungsverlustes mit steigender Zykluszahl bestätigt. **Abbildung 4-3 B** zeigt, dass bei hoher Zykluszahl zehn aufeinander folgende Zyklen so geringe Spannungsunterschiede aufweisen, dass sich eine deckungsgleiche Kurve ergibt (Hysteresis-ähnlicher Kurvenverlauf). Im Vergleich dazu wiesen die ersten zehn Zyklen

größere Spannungsunterschiede auf, so dass der Verlauf der einzelnen Messzyklen erkennbar ist (siehe **Abbildung 4-3 A**).

4.3 Mechanische Charakterisierung II – Zugfestigkeit

Vor dem Messen der Zugfestigkeit wurden die Höhe und die Breite der Probenkörper bestimmt. Hierbei fiel, wie auch bei der Druckfestigkeitsmessung, auf, dass die Höhe der SF-Scaffolds trotz gleicher Volumina an SF-Lösung unterschiedlich war. Die durchschnittliche Höhe der SF-Scaffolds (SF-Chargen: KB-10 und KB-11, siehe **Tabelle 3**) nach 3 d und 6 d Einlagedauer in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung ist in **Tabelle 5** dargestellt.

Tabelle 5: Durchschnittliche Probenhöhe der SF-Scaffolds in Abhängigkeit von SF-Konzentration, MCPA-Konzentration sowie Inkubationszeit im Zugversuch.

	Inkubationszeit von 3 d		Inkubationszeit von 6 d	
	2.5 Gew.-% MCPA	5 Gew.-% MCPA	2.5 Gew.-% MCPA	5 Gew.-% MCPA
2 % SF	2,9 mm ± 0,43	2,8 mm ± 0,47	2,3 mm ± 0,31	2,3 mm ± 0,17
4 % SF	3,8 mm ± 0,21	3,7 mm ± 0,21	3,9 mm ± 0,35	3,9 mm ± 0,26
8 % SF	4,7 mm ± 0,36	4,8 mm ± 0,38	4,5 mm ± 0,36	4,6 mm ± 0,44

Tabelle 5 zeigt die durchschnittlichen Probenhöhen der Prüfkörper für die Zugfestigkeitsmessung. Es konnte eine Zunahme der Scaffoldhöhe mit steigender SF-Konzentration beobachtet werden. Die Höhe lag zwischen 2,3 und 2,9 mm für die 2 % SF-Scaffolds, zwischen 3,7 und 3,9 mm für die 4 % SF-Scaffolds und zwischen 4,5 und 4,8 mm für die 8 % SF-Scaffolds. Die Erhöhung der MCPA-Menge von 2,5 g auf 5 g pro 100 mL mit Phosphorsäure angesäuerte Lösung wirkte sich nicht auf die Probenhöhe aus. Durch die Steigerung der Einlagedauer von 3 d auf 6 d kam es bei den 2 % und 8 % SF-Scaffolds zu einer Abnahme der Dicke des Prüfkörpers. Lediglich bei der 4 % SF-Konzentration nahm die Probenhöhe mit steigender Inkubationszeit zu.

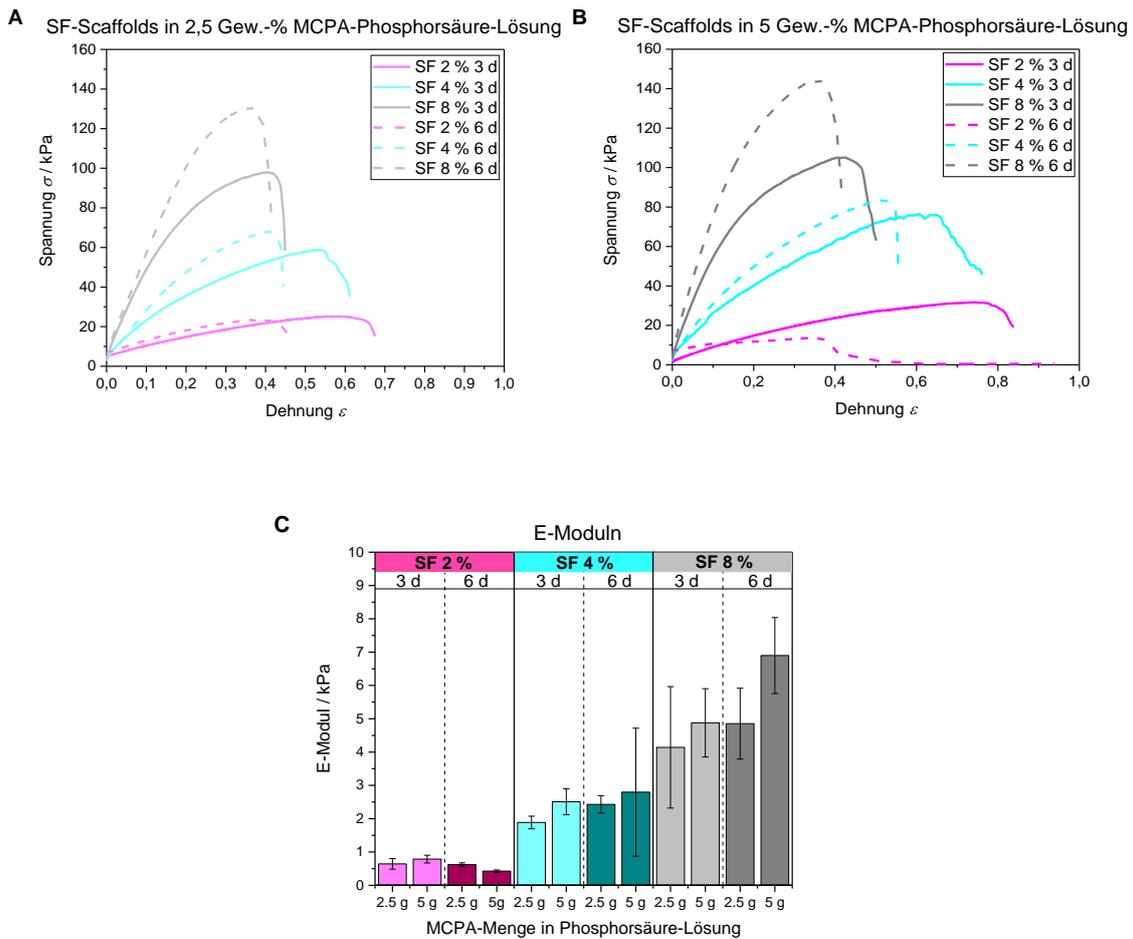


Abbildung 4-4: Spannungs-Dehnungs-Diagramme und E-Moduln der Zugfestigkeitsmessung.
 A: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der Zugfestigkeitsmessung der 2 %, 4 % und 8 % SF-Konzentrationen nach 3 d und 6 d Einlagedauer in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.
 B: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der Zugfestigkeitsmessung der 2 %, 4 % und 8 % SF-Scaffolds nach 3 d und 6 d in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.
 C: Durchschnittliche E-Moduln der 2 %, 4 % und 8 % SF-Scaffolds in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung nach 3 d und 6 d.

In **Abbildung 4-4 A** ist ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm der 2 %, 4 % und 8 % SF-Konzentrationen nach 3 d und 6 d Einlagedauer in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung dargestellt. Die Zugfestigkeit der SF-Proben lag zwischen 20 und 130 kPa. **Abbildung 4-4 B** zeigt ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm der Zugfestigkeitsmessungen nach 3 d und 6 d Einlagedauer in 5 Gew.-% mit Phosphorsäure angesauerter MCPA-Lösung. Die Spannung betrug unter letzteren Bedingungen 13 bis 144 kPa. Die 2 % SF-Scaffolds wiesen eine Zugfestigkeit im Bereich von 13 und 31 kPa auf, während die 4 % SF-Scaffolds Werte zwischen 58 und 83 kPa erreichten und die 8 % SF-Scaffolds die höchsten Zugfestigkeiten von 97 bis

144 kPa aufwiesen. Deutlich wird in beiden Abbildungen, dass die Spannung umso höhere Werte erzielte, je höher die SF-Konzentration der getesteten Proben war. Im Gegensatz dazu nahm die Dehnung mit steigender SF-Konzentration ab. Auch die Einlagedauer spielte eine entscheidende Rolle. Die Zugfestigkeit steigerte sich mit Erhöhung der Einlagedauer von 3 d auf 6 d. Die einzige Ausnahme stellte die 2 % SF-Konzentration nach Einlage in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung für 3 d und 6 d dar. Hier kam es bei einer Dehnung von 0,2 zu einer Reduktion der Zugfestigkeit mit zunehmender Einlagedauer. Die Dehnfähigkeit der Prüfkörper hingegen verkleinerte sich mit längerer Inkubationszeit in MCPA-Phosphorsäure-Lösung. Beim Vergleich beider Spannungs-Dehnungs-Diagramme fällt die höhere Spannung nach gleicher Einlagedauer in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung auf. Die Steigerung der MCPA-Menge von 2,5 g auf 5 g MCPA auf 100 mL angesäuerte wässrige Lösung führte sowohl zu einer erhöhten Spannung als auch Dehnung.

Abbildung 4-4 C zeigt die E-Moduln der verschiedenen SF-Konzentrationen nach 3 d und 6 d Einlagedauer in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung im Vergleich. Deutlich wird, dass auch der E-Modul mit zunehmender SF-Konzentration anstieg. Er lag für die 2 % SF-Konzentration zwischen 0,4 und 0,8 kPa, für die 4 % SF-Konzentration zwischen 1,8 und 2,8 kPa und für die 8 % SF-Konzentration im Bereich von 4,1 und 6,9 kPa. Mit Erhöhung der Einlagedauer von 3 d auf 6 d stieg der E-Modul an. Eine Unregelmäßigkeit stellte erneut die 2 % SF-Konzentration für beide Inkubationszeiträume (3 d und 6 d) in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung dar. In diesem Fall nahm der E-Modul mit höherer Einlagedauer von 3 d auf 6 d ab.

Die Steigerung der MCPA-Menge von 2,5 g auf 5 g MCPA pro 100 mL angesäuertes wässriges Lösung hatte einen größeren Einfluss auf die Erhöhung der Zugfestigkeit als die Zunahme der Einlagedauer. Die 2 % SF-Prüfkörper zeigten nach dem Einlegen für 6 d in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung einen geringeren E-Modul als nach dem Einlegen in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung für den gleichen Zeitraum (6 d).

4.4 Analytik der Phasenzusammensetzung

4.4.1 MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds

Um den Einfluss der (i) SF-Konzentration, der (ii) MCPA-Menge und der (iii) Einlagedauer auf die qualitative Phasenzusammensetzung der MCPA-SF-Scaffolds zu untersuchen, wurden die SF-Scaffolds (SF-Chargen: KB-01 und KB-02, siehe **Tabelle 3**) nach 3 d und 6 d Einlagedauer in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung (siehe Kapitel 3.3.1) vermessen. Darüber hinaus wurden die Scaffolds feucht (direkt nach Einlage in MCPA-Phosphorsäure-Lösung) oder nach Trocknung über Nacht im Trockenschrank untersucht (siehe Kapitel 3.7).

In **Abbildung 4-5 A** sind die Röntgendiffraktogramme der feuchten 2 %, 4 % und 8 % MCPA-SF-Scaffolds dargestellt. Es konnten keine Beugungsreflexe erkannt oder zugeordnet werden. Nach Trocknung und Zerkleinerung der gleichen Scaffolds und erneuter XRD-Messung entstand **Abbildung 4-5 B**. Hier wurden Beugungsreflexe im Bereich von 22 bis 25 ° deutlich. Das Beugungsmuster konnte mit der Datenbank einem Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat Referenzmuster zugeordnet werden, was einer Einlagerung von MCPA in die Scaffolds entspricht. Anhand des Röntgendiffraktograms ließ sich darauf schließen, dass keine Abbindereaktion zu Brushit durch MCPA und Phosphorsäure stattfand, sondern lediglich eine MCPA-Ablagerung erfolgte.

Trockene 2 %, 4 % und 8 % MCPA-SF-Scaffolds nach 3 d in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung sind in **Abbildung 4-5 C** dargestellt. Die Beugungsreflexe lagen, wie auch nach 3 d in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung, zwischen 22 und 25 °, waren aber deutlich stärker ausgeprägt. Mit einer Steigerung der MCPA-Menge nahmen die Intensität und die Fläche unter den Beugungsreflexen zu. Diese wiesen im Bereich von 22,0 ° und 24,4 ° eine Größe von 532,2 nach Einlage in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung und 549,0 nach Inkubation in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung auf.

In **Abbildung 4-5 D** ist die Phasenzusammensetzung von 2 %, 4 % und 8 % MCPA-SF-Scaffolds nach 6 d in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung dargestellt. Auch hier ließ sich anhand der Beugungsreflexe Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) nachweisen. Beim Vergleich mit dem Beugungsmuster der Scaffolds nach 3 d in 5 Gew.-% MCPA-

Phosphorsäure-Lösung (siehe **Abbildung 4-5 C**) ließ sich kein Unterschied erkennen. Die Erhöhung der Einlagedauer spielte für die Phasenzusammensetzung keine Rolle. Eine Erhöhung der Intensität der Beugungsreflexe mit abnehmender SF-Konzentration ist in **Abbildung 4-5 B, C und D** erkennbar.

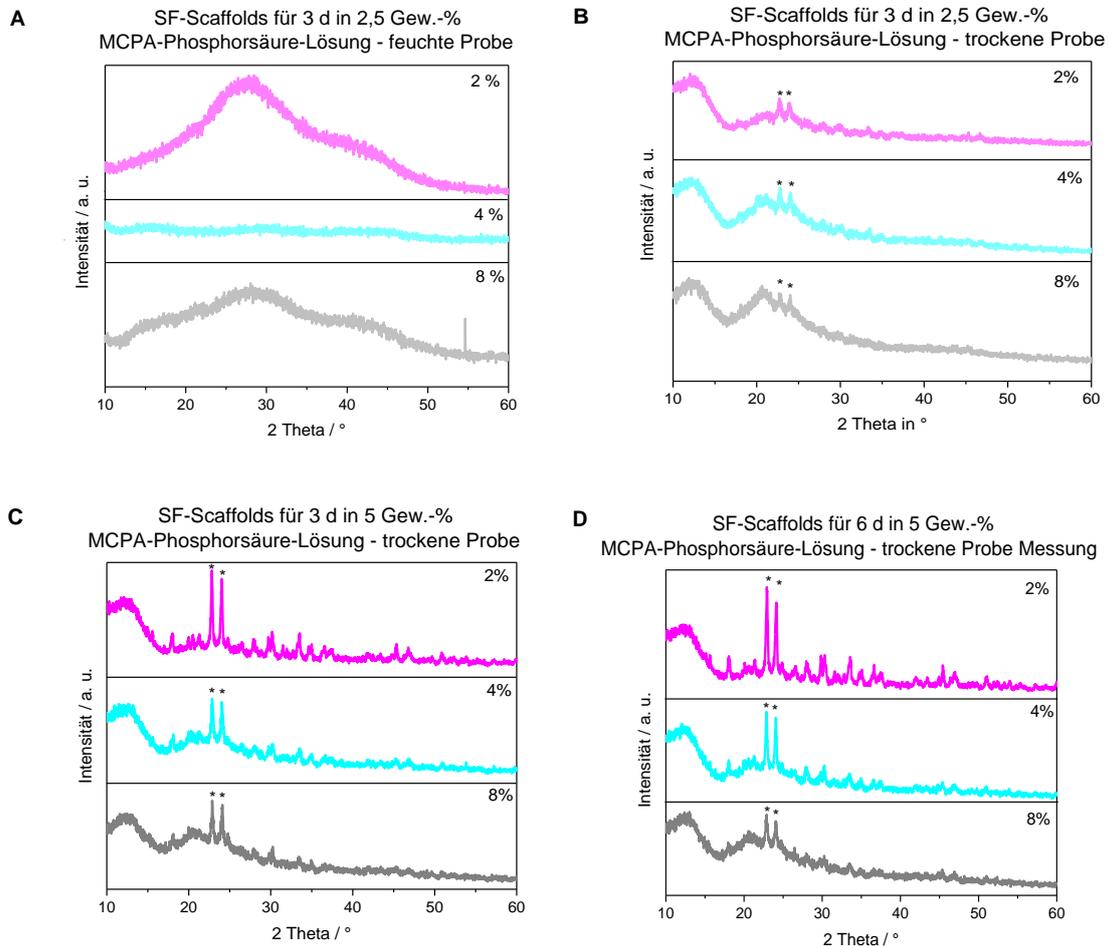


Abbildung 4-5: Röntgendiffraktogramme der MCPA-SF-Scaffolds im Überblick im Bereich von 10 bis 60 °; Zuordnung der Beugungsreflexe nach *: Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate (MCPA).

A: Phasenzusammensetzung von feuchten 2 %, 4 % und 8 % MCPA-SF-Scaffolds nach 3 d in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.

B: Phasenzusammensetzung von getrockneten 2 %, 4 % und 8 % MCPA-SF-Scaffolds nach 3 d in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.

C: Phasenzusammensetzung von getrockneten 2 %, 4 % und 8 % MCPA-SF-Scaffolds nach 3 d in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.

D: Phasenzusammensetzung von getrockneten 2 %, 4 % und 8 % MCPA-SF-Scaffolds nach 6 d in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung.

4.4.2 Bruscht-Seidenfibroin-Scaffolds

Zur Charakterisierung der Mineralisierung des SF-Scaffolds mit Bruscht und der Herstellungsmethode wurden Bruscht-SF-Scaffolds (SF-Charge: KB-10, siehe **Tabelle 3**) hinsichtlich Phasenzusammensetzung analysiert. Sowohl bei der (i) Einlage-Variante als auch der (ii) Intervall-Methode wurden gefrorene und gefriergetrocknete β -TCP-SF-Lösungen in 20 % Phosphorsäure eingelegt und anschließend hinsichtlich qualitativer Phasenzusammensetzung untersucht (siehe Kapitel 3.3.2).

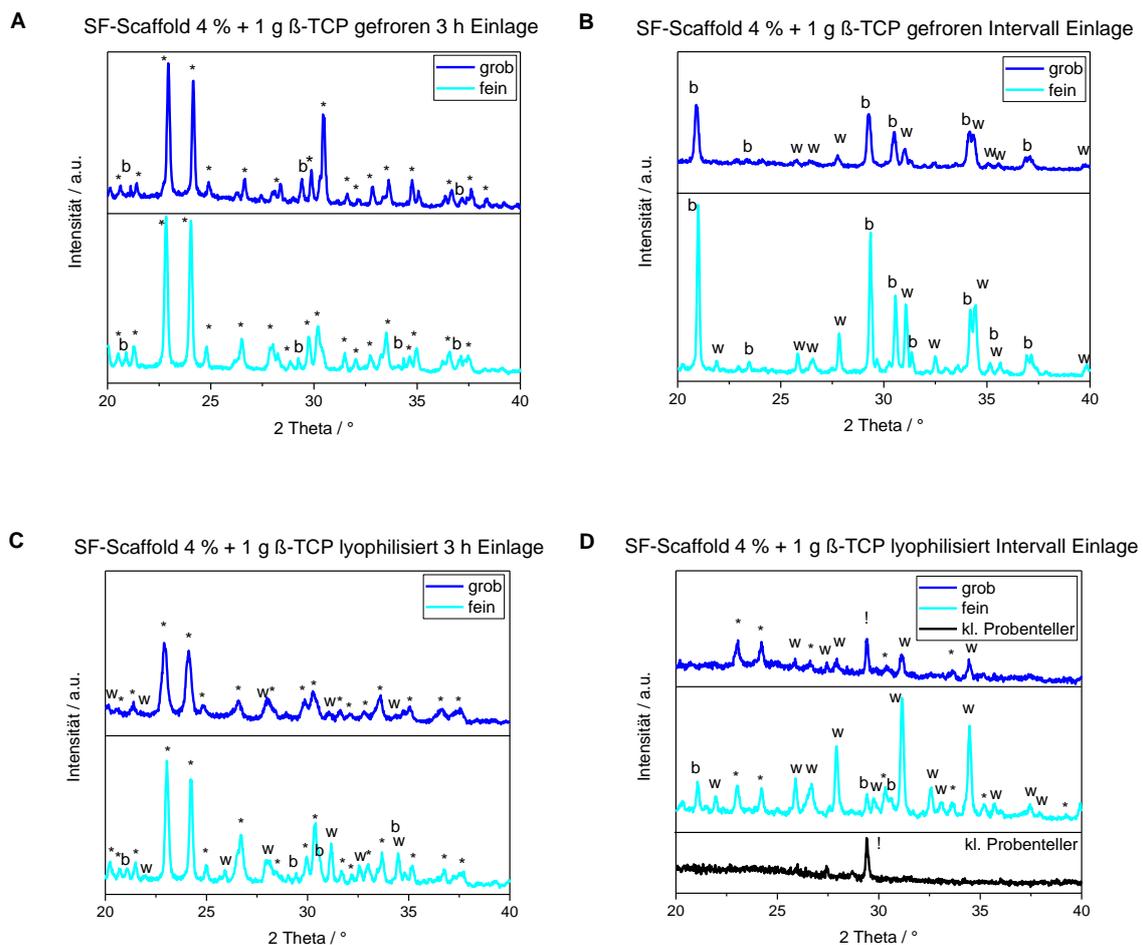


Abbildung 4-6: Röntgendiffraktogramme mit Intensitäten der Bruscht-SF-Scaffolds im Überblick im Bereich von 20 bis 40°. Zuordnung der Beugungsreflexe nach *: Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA), w: Whitlockit (β -TCP), b : Bruscht.

A: Phasenzusammensetzung einer gefrorenen β -TCP-SF-Lösung nach 3 h in 20 % Phosphorsäure.

B: Phasenzusammensetzung einer gefrorenen β -TCP-SF-Lösung nach Einlegen in 20 % Phosphorsäure im Intervall.

C: Phasenzusammensetzung einer lyophilisierten β -TCP-SF-Lösung nach 3 h in 20 % Phosphorsäure.

D: Phasenzusammensetzung einer lyophilisierten β -TCP-SF-Lösung nach Einlegen in 20 % Phosphorsäure im Intervall.

In **Abbildung 4-6** sind die Röntgendiffraktogramme mit Intensitäten über einen Winkelbereich von 20 bis 40 ° dargestellt. Jede Abbildung zeigt ein Beugungsmuster des Grob- und Feinanteils der getrockneten und zerkleinerten β -TCP-SF-Probe. Darüber hinaus beinhaltet der Graph D ein zusätzliches Beugungsmuster des kleinen Proben Tellers, um den Störreflex (!) der Probe im Grobanteil nachzuweisen.

Das Beugungsmuster der gefrorenen β -TCP-SF-Lösung, die für 3 h in 20 % Phosphorsäure eingelegt wurde, ist in **Abbildung 4-6 A** dargestellt. Es konnte Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) und Brushit in der groben sowie in der feinen Phase nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass keine β -TCP-Phase mehr gemessen werden konnte weist darauf hin, dass β -TCP im SF-Scaffold während der 3 h Inkubation in 20 % Phosphorsäure vollständig zu Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) und Brushit umgesetzt wurde.

In **Abbildung 4-6 B** ist das Röntgendiffraktogramm der gefroren und im Intervall eingelegten β -TCP-SF-Lösung dargestellt. Die Beugungsreflexe konnten Brushit und Whitlockit (β -TCP) zugeordnet werden, wobei die Brushit-Reflexe deutlich höhere Intensitäten als die Whitlockit-Reflexe aufwiesen. β -TCP wurde zu großem Teil zu Brushit umgesetzt. Weiterhin fällt auf, dass beide Phasen die gleichen Beugungsreflexe zeigen, jedoch in der feinen Phase die Intensität erhöht ist.

Das Röntgendiffraktogramm der gefriergetrockneten, 3 h in Phosphorsäure gelagerten β -TCP-SF-Lösung ist in **Abbildung 4-6 C** dargestellt. Beim Vergleich der Beugungsreflexe mit der ICDD-Datenbank konnte in der groben wie auch in der feinen Phase Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) und Whitlockit (β -TCP) nachgewiesen werden. Nur in der feinen Phase waren Brushit-zugehörige Beugungsreflexe mit geringer Intensität vorhanden. Das Beugungsmuster weist auf eine unvollständige Umsetzung von β -TCP zu Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) und eine geringe Menge an Brushit hin.

Abbildung 4-6 D zeigt die Beugungsmuster der gefriergetrockneten im Intervall eingelegten β -TCP-SF-Lösung. In der feinen Phase konnte Brushit, Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) und Whitlockit (β -TCP) nachgewiesen werden. Die Intensität der β -TCP-Beugungsreflexe war größer als die des Calcium Hydrogen Phosphat

Hydrats (MCPA). Dies könnte ein Hinweis auf eine geringe Umsetzung von β -TCP sein. In der groben Phase wurde kein Brushit, sondern lediglich Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) und β -TCP nachgewiesen. Zusätzlich war bei $29,5^\circ$ ein Signal des kleinen Probenellers zu erkennen.

Beim Vergleich aller Beugungsmuster fällt auf, dass bei jeder Einlegemethode Brushit gebildet wurde, jedoch die Intensität des Brushit-Beugungsreflexes bei dem gefrorenen im Intervall eingelegten Scaffolds am höchsten ist. Die Intensität des β -TCP-Beugungsreflexes ist bei den für 3 h eingelegten Scaffolds deutlich geringer als bei den im Intervall eingelegten Scaffolds. Genau umgekehrt verhalten sich die Signale von Brushit, wobei das Beugungsmuster für die im Intervall mineralisierten Scaffolds eine höhere Intensität aufwies.

4.5 Morphologie der Seidenfibroin-Scaffolds

4.5.1 Lyophilisierte Seidenfibroin-Lösungen

In rasterelektronischen Aufnahmen der 2 %, 4 % und 8 % gefriergetrockneten SF-Lösungen (SF-Charge: KB-01, siehe **Tabelle 3**) wurde sowohl die Oberfläche als auch die Innenfläche der Proben bei höheren Vergrößerungen dargestellt.

In **Abbildung 4-7** A, C und E sind die Oberflächen der gefrorenen SF-Lösungen der Konzentration 2 %, 4 % und 8 % in 100-facher Vergrößerung dargestellt. Die Aufnahmen B, D und F zeigen die Innenflächen der unterschiedlichen SF-Konzentrationen in ebenfalls 100-facher Vergrößerung. Die Oberflächen weisen eine glatte Struktur auf, die Kondensationssporen aufgrund des Gefriertrocknungsprozesses enthält. Die Porengröße und Porenanzahl nahm mit steigender SF-Konzentration von 2 % bis 8 % ab. Die Abbildungen B, D und F zeigen die Innenflächen der gefrorenen SF-Lösungen. Die Beschaffenheit auf der Innenseite ist schwammartig mit mehrschichtiger Struktur und vielen Hohlräumen. Die geschnittenen Proben zeigten im Inneren eine Abnahme der Hohlräume mit steigender SF-Konzentration.

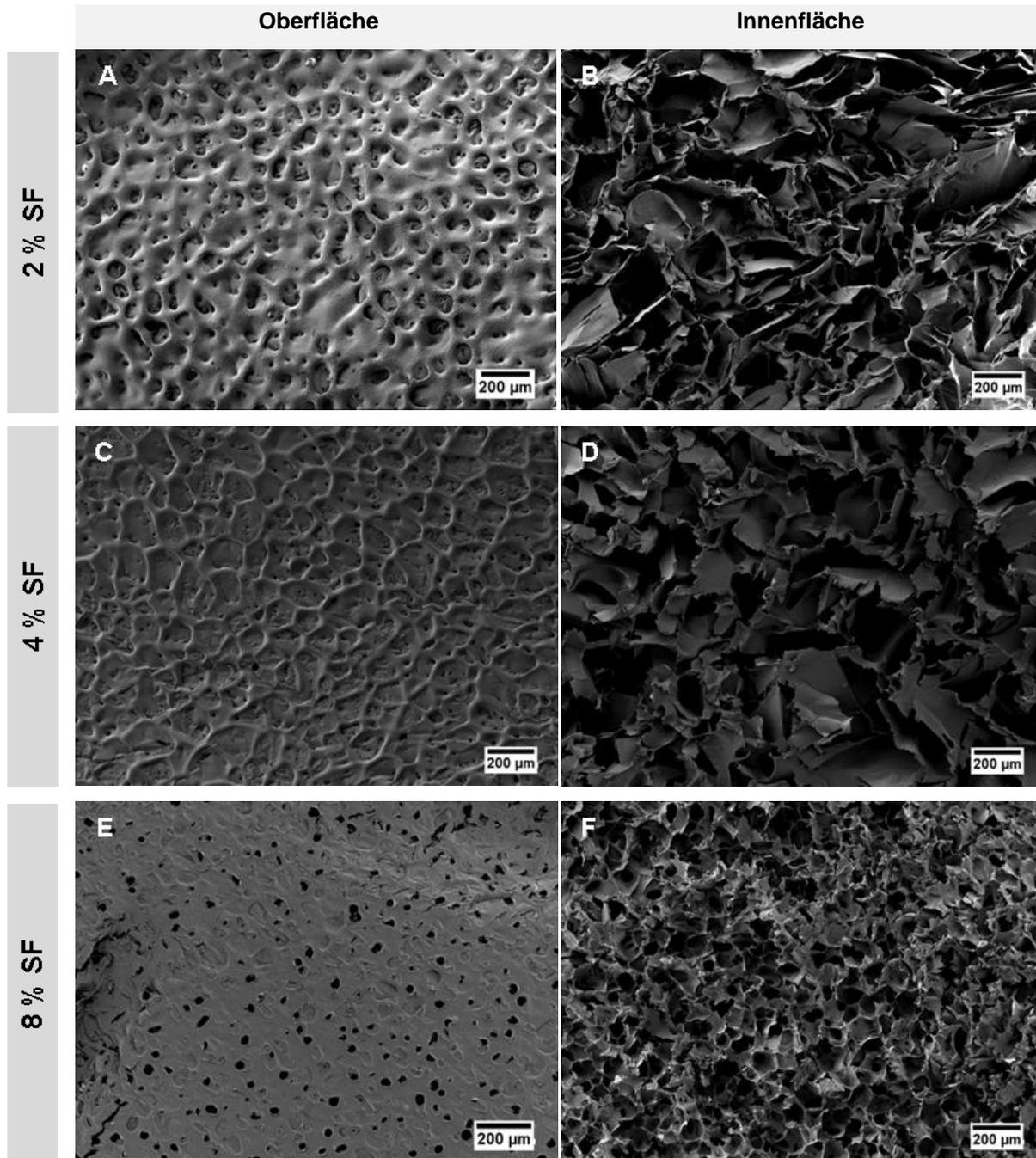


Abbildung 4-7: REM Aufnahmen der gefriergetrockneten SF-Lösungen in 100-facher Vergrößerung.

A: Oberfläche der 2 % SF-Lösung; B:Innenfläche der 2 % SF-Lösung.

C: Oberfläche der 4 % SF-Lösung, D: Innenfläche der 4 % SF-Lösung.

E: Oberfläche der 8 % SF-Lösung; F: Innenfläche der 8 % SF-Lösung.

4.5.2 MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds

Es wurde sowohl die Oberfläche als auch die Innenfläche gefriergetrockneter 4 % MCPA-SF-Scaffolds nach 3 d in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung (SF-

Charge: KB-02, siehe **Tabelle 3**) mittels rasterelektronischen Aufnahmen in höherer Vergrößerung untersucht.

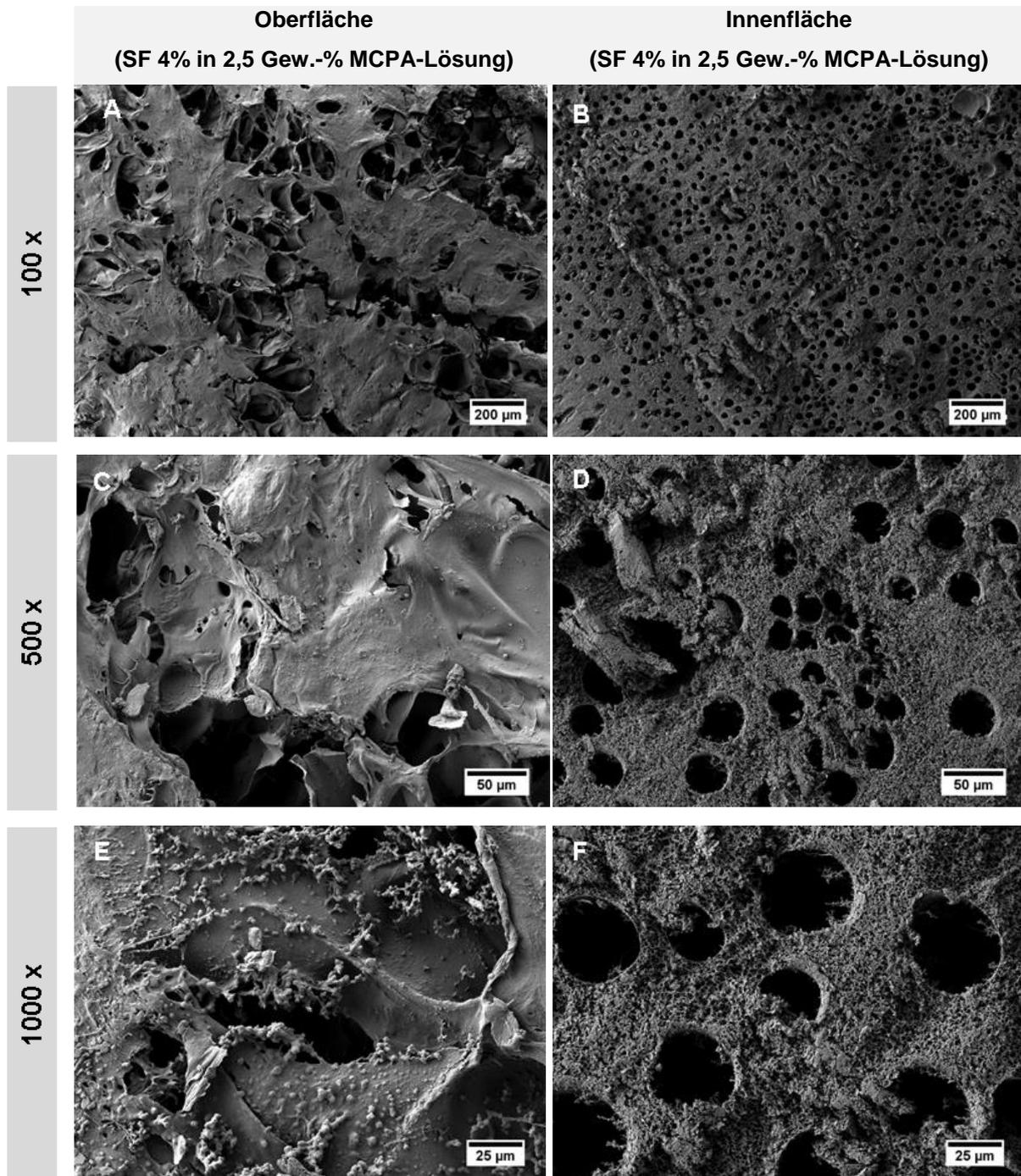
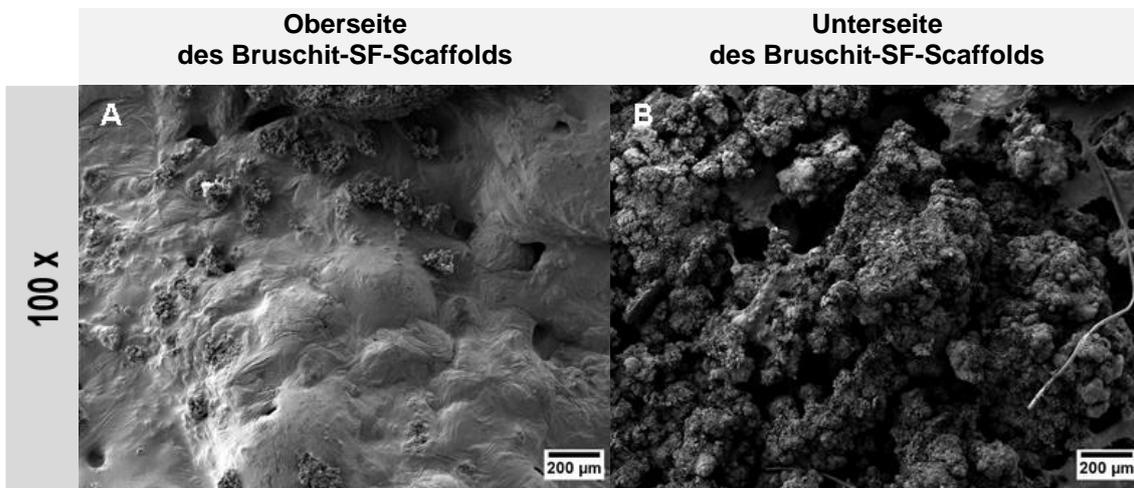


Abbildung 4-8: REM-Aufnahmen der 4 % MCPA-SF-Scaffolds nach 3 d in 2,5-Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung. A: Oberfläche in 100-facher Vergrößerung; B: Innenfläche in 100-facher Vergrößerung; C: Oberfläche in 500-facher Vergrößerung; D: Innenfläche in 500-facher Vergrößerung; E: Oberfläche in 1000-facher Vergrößerung; F: Innenfläche in 1000-facher Vergrößerung

In **Abbildung 4-8** sind in den Aufnahmen A, C und E die Oberfläche eines 4 % MCPA-SF-Scaffolds dargestellt. Die Bilder B, D und F zeigen die Innenfläche eines 4 % MCPA-SF-Scaffolds. Beide Proben wurden jeweils in 100-, 500- und 1000-facher Vergrößerung hinsichtlich Strukturierung charakterisiert. Die Oberfläche der MCPA-SF-Scaffolds zeigte sich als raue, inhomogene Fläche, wobei die Distribution der kleinen Mulden eher unregelmäßig war. Im Vergleich dazu wies die Innenfläche eine relativ gleichmäßig verteilte Porenstruktur auf. Bei 1000-facher Vergrößerung des MCPA-SF-Scaffolds (**Abbildung 4-8** E, F) waren mineralische MCPA-Ablagerungen auf der Oberfläche wie auch Innenfläche deutlich erkennbar.

4.5.3 Bruschit-Seidenfibroin-Scaffolds

Anhand der REM-Aufnahmen sollten die SF-Struktur, die Bruschitkristalle und deren Verteilung im Bruschit-SF-Scaffold (SF-Charge: KB-07, siehe **Tabelle 3**) bei höherer Vergrößerung untersucht werden. Dafür wurden Aufnahmen der mineralisierten Proben von oben bzw. unten in 100- (A, B), 2000- (C, D) und 10 000-facher (E, F) Vergrößerung aufgenommen.



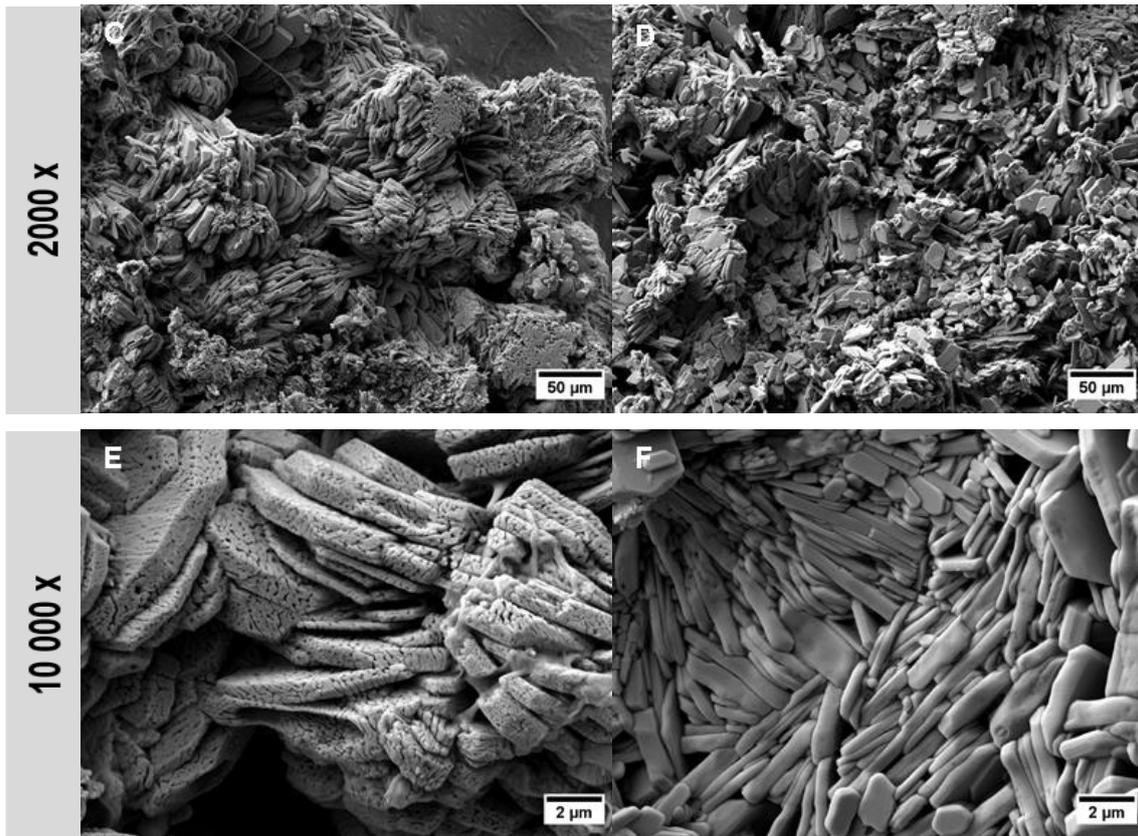


Abbildung 4-9: REM-Aufnahmen eines Brushit-SF-Scaffolds aus 4 % SF-Lösung, der vor Mineralisierung gefriergetrocknet war und anschließend im Intervall in Phosphorsäure eingelegt wurde. A: Oberfläche in 100-facher Vergrößerung; B: Unterseite in 100-facher Vergrößerung; C: Oberseite in 2000-facher Vergrößerung; D: Unterseite in 2000-facher Vergrößerung; E: Oberseite in 10 000-facher Vergrößerung; F: Unterseite in 10 000-facher Vergrößerung

In **Abbildung 4-9** sind die REM-Aufnahmen A, C und F der Brushit-SF-Scaffold-Oberfläche und -Unterseite (B, D, F) dargestellt. Auf Bild A ist eine glatte Oberfläche der Probe mit kleinen, inselartigen Bereichen kristalliner Strukturen zu erkennen. Im Gegensatz dazu bestand die Unterseite (B) hauptsächlich aus kristallinen Strukturen. In der 2000- und 10 000-fachen Vergrößerung (C-F) stellten sich die kristallinen Strukturen als plattenartige Schichtstrukturen dar, welche Kennzeichen für Brushitablagerungen sind. Brushit präzipitierte sowohl in geringerem Maße auf der Oberseite als auch der Unterseite der SF-Scaffolds.

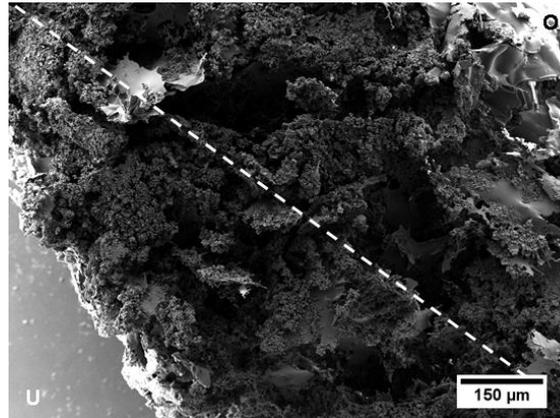


Abbildung 4-10: REM-Aufnahme eines zuvor lyophilisierten Bruschat-SF-Scaffold aus 4 % SF-Lösung, der im Intervall in Phosphorsäure eingelegt wurde. Dargestellt ist hier der Querschnitt der Probe in 70-facher Vergrößerung.

Nomenklatur: O = Oberseite; U = Unterseite, --- = Ausrichtung Prüfkörper.

In **Abbildung 4-10** ist ein lyophilisierter Bruschat-SF-Scaffold aus 4 % SF-Lösung, der im Intervall in Phosphorsäure eingelegt wurde, im Querschnitt in 70-facher Vergrößerung dargestellt. Es ist die Oberseite (O) sowie Unterseite (U) des Bruschat-SF-Scaffold gezeigt. Im Scaffoldinneren fällt auf, dass die kristallinen Strukturen von der Oberseite zur Unterseite zunehmen. Diese Tatsache lässt sich auf eine initial inhomogene β -TCP-SF-Suspension zurückführen. Das β -TCP-Pulver sedimentierte auf den Boden der Petrischale. Einzelne blattartige Strukturen waren zu erkennen, was der gefriergetrockneten SF-Lösung entspricht.

4.6 Generierung anisotroper Porenstrukturen im Seidenfibroin-Scaffold

Um Poren zu erzeugen, die senkrecht zur Scaffold-Oberfläche ausgerichtet sind, wurden SF-Lösungen einem Gefrierstrukturierungsprozess unterzogen. Zum einen wurde ein nicht kontrollierbarer Temperaturgradient durch manuelle Gefrierstrukturierung mittels Kupferplatte, Flüssigstickstoff und Styroporbox erzeugt. Zum anderen wurde ein gut kontrollierbarer Temperaturgradient während der maschinelle Gefrierstrukturierung mittels ACD angelegt (siehe Kapitel 3.8).

Nach dem Gefrierstrukturierungsprozess mussten die Proben sofort im Gefrierschrank gelagert werden. Ansonsten kann es zum Antauen der Proben kommen, was in den meisten Fällen zu einer Zerstörung der Porenstruktur führt.

4.6.1 Manuelle Gefrierstrukturierung

Der Temperaturgradient wurde in der Styroporbox durch eine 30 minütige Kühlung der Kupferplatte mit Flüssigstickstoff erreicht. Trotz gleicher Ausführung der Methode konnte der Temperaturgradient weder konstant gehalten noch kontrolliert werden.

Für die Gefrierstrukturierung wurde 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösung (SF-Charge: KB-05, siehe **Tabelle 3**) verwendet. Zur Darstellung der Porenstruktur wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen manuell gefrierstrukturierten SF-Konzentrationen in 50-, 100- und 200-facher Vergrößerung angefertigt.

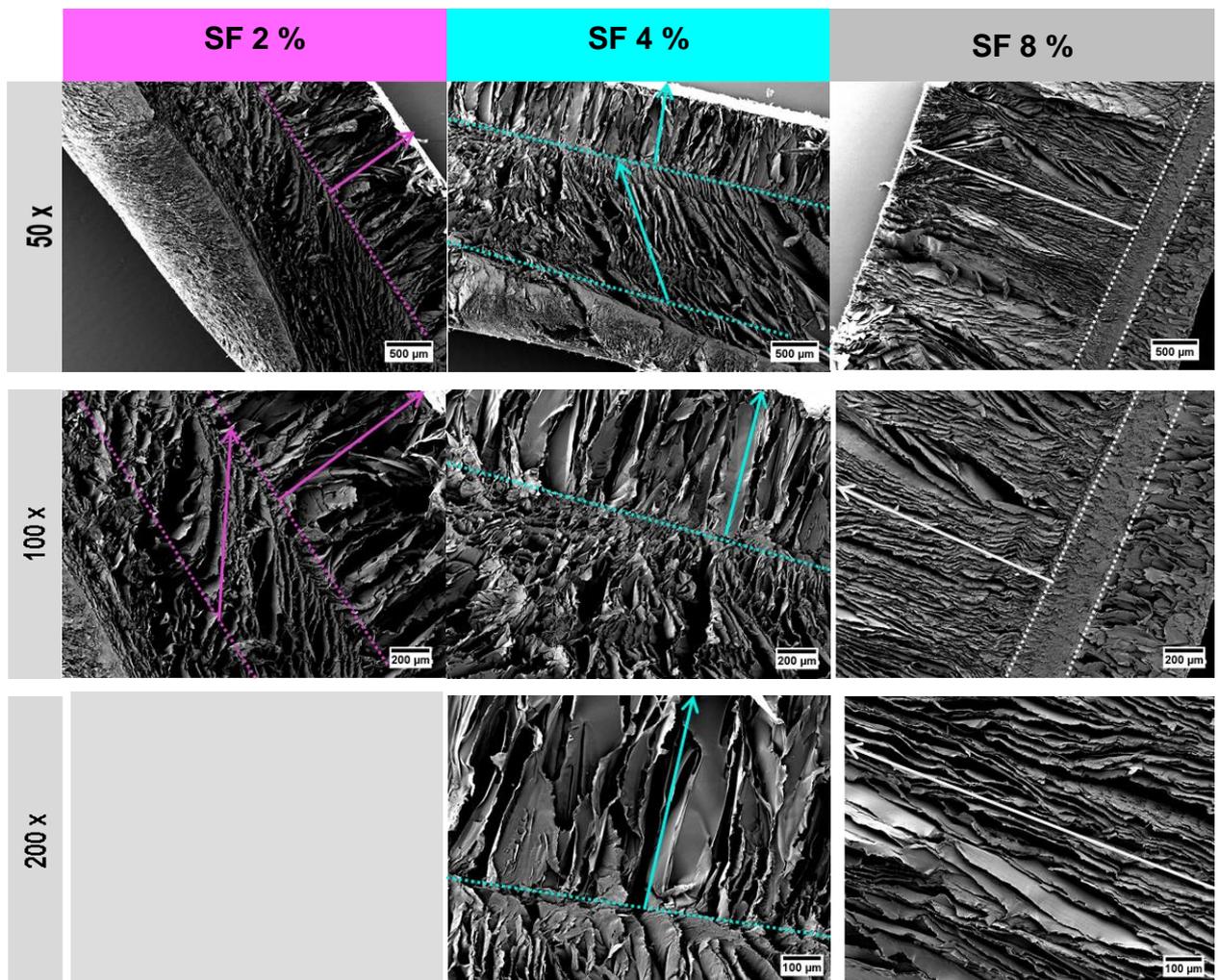


Abbildung 4-11: REM-Aufnahmen der manuellen Gefrierstrukturierung von 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösungen bei 50-, 200- und 500-facher Vergrößerung.

In **Abbildung 4-11** ist eine Übersicht der REM-Aufnahmen der manuellen Gefrierstrukturierung von 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösungen dargestellt. Es zeigte sich in jedem Scaffold eine Porenstruktur, die jedoch nicht durchgängig senkrecht von der Unterseite zur Oberseite verlief. Auffallend ist, dass drei Schichten mit unterschiedlicher Struktur entstanden. An der Unterseite kam es zur Bildung isotroper Struktur. Die mittlere Schicht wies eine Porenstruktur in circa 45° zur Oberfläche auf und die oberste Schicht zeigte sich als Porenstruktur senkrecht zur Oberfläche. Diese verschiedenen Scaffoldsschichten können auf den nicht konstanten Temperaturgradienten zurückgeführt werden. Auch lässt sich beim Vergleich der Porenstrukturen der drei SF-Konzentrationen eine Abnahme der Porengröße mit steigender SF-Konzentration feststellen.

4.6.2 Maschinelle Gefrierstrukturierung (ACD)

Die maschinelle Gefrierstrukturierung wurde mittels ACD durchgeführt. Der Vorteil dieser Gefrierstrukturierungsmethode ist, dass der Temperaturgradient konstant gehalten und kontrolliert werden kann.

4.6.2.1 Der Temperaturgradient

Es wurde beobachtet, dass sich bei einer konstanten Kühltemperatur von -47°C des Cryostats am unteren Peltier-Element eine relativ stabile Temperatur von -49°C und am oberen Peltier-Element von $+28^\circ\text{C}$ einstellte. Daraus resultierte ein konstanter Temperaturgradient von etwa $5,5\text{ K}\cdot\text{mm}^{-1}$.

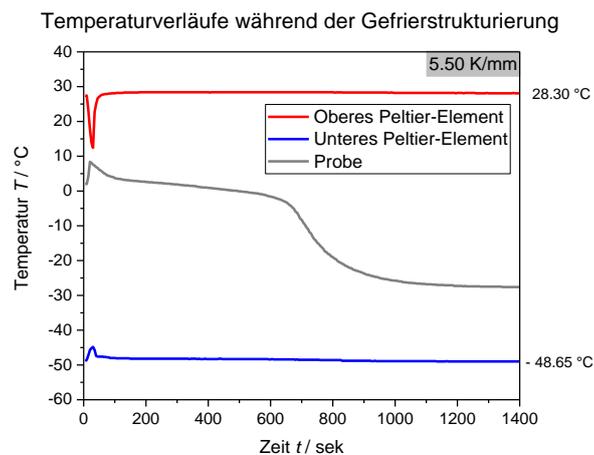


Abbildung 4-12: Temperaturverläufe der Probe sowie des unteren und oberen Peltier-Elements während der Gefrierstrukturierung einer 2 % SF-Lösung in der ACD.

In **Abbildung 4-12** sind die Temperaturverläufe der Probe sowie des unteren und oberen Peltier-Elements während der Gefrierstrukturierung einer 2 % SF-Lösung in der ACD dargestellt. Der rote Graph zeigt die konstante Temperatur von 28,30 °C des oberen Peltier-Elements und der blaue Graph die ebenso konstante Temperatur von -48,65 °C des unteren Peltier-Elements. Der anfängliche Temperaturanstieg lässt sich auf das Öffnen des Geräts und Einbringen der SF-Lösung in die Petrischale zurückführen. Der Temperaturverlauf der 2 % SF-Lösung ist in grau dargestellt. Danach blieb die Proben temperatur im Bereich von 200 und 600 sec auf einem Plateau mit circa 0 °C. In Folge dessen kam es erneut zu einem Abfall der Proben temperatur und einem finalen Plateau bei -47 °C. Aus diesen Daten ließ sich der Temperaturgradient von $5,50 \text{ K} \cdot \text{mm}^{-1}$ berechnen.

4.6.2.2 Die Porenstruktur

Mittels ACD wurde die maschinelle Gefrierstrukturierung von 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösungen (SF-Charge: KB-05, siehe **Tabelle 3**) durchgeführt. Die entstandenen Scaffoldstrukturen wurden mittels rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bei 50-, 200- und 500-facher Vergrößerung untersucht. **Abbildung 4-13** zeigt REM-Aufnahmen der maschinellen Gefrierstrukturierung von 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösungen in 50-, 200- und 500-facher Vergrößerung. Es entstand bei allen drei SF-Konzentrationen eine durchgängige Porenstruktur von der Unterseite bis zur Oberseite der Scaffolds. In den Aufnahmen ist erkennbar, dass die Porenstruktur der 4 % und 8 % SF-Konzentrationen senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet war. Die Porenstruktur des 2 % SF-Scaffolds wies jedoch leichte Abweichungen bezüglich der vertikalen Ausrichtung der Poren zur Oberfläche auf. Beim Vergleich der 4 % Probe ($\varnothing = 60,2 \mu\text{m}$) mit den 8 % SF-Scaffolds ($\varnothing = 28,5 \mu\text{m}$) zeigte erstere größere Porendurchmesser. Die Porengröße der 2 % SF-Scaffolds ließ sich aufgrund des extrem feinen SF-Geflecht zwischen den Poren schwer beurteilen. Bei der Probenpräparation wurde beobachtet, dass die 2 % SF-Scaffolds deutlich schwieriger als die anderen SF-Konzentrationen zu schneiden waren, ohne diese zu zerdrücken. Dies könnte die etwas schräge Ausrichtung der Porenstruktur im 2 % SF-Scaffold erklären.

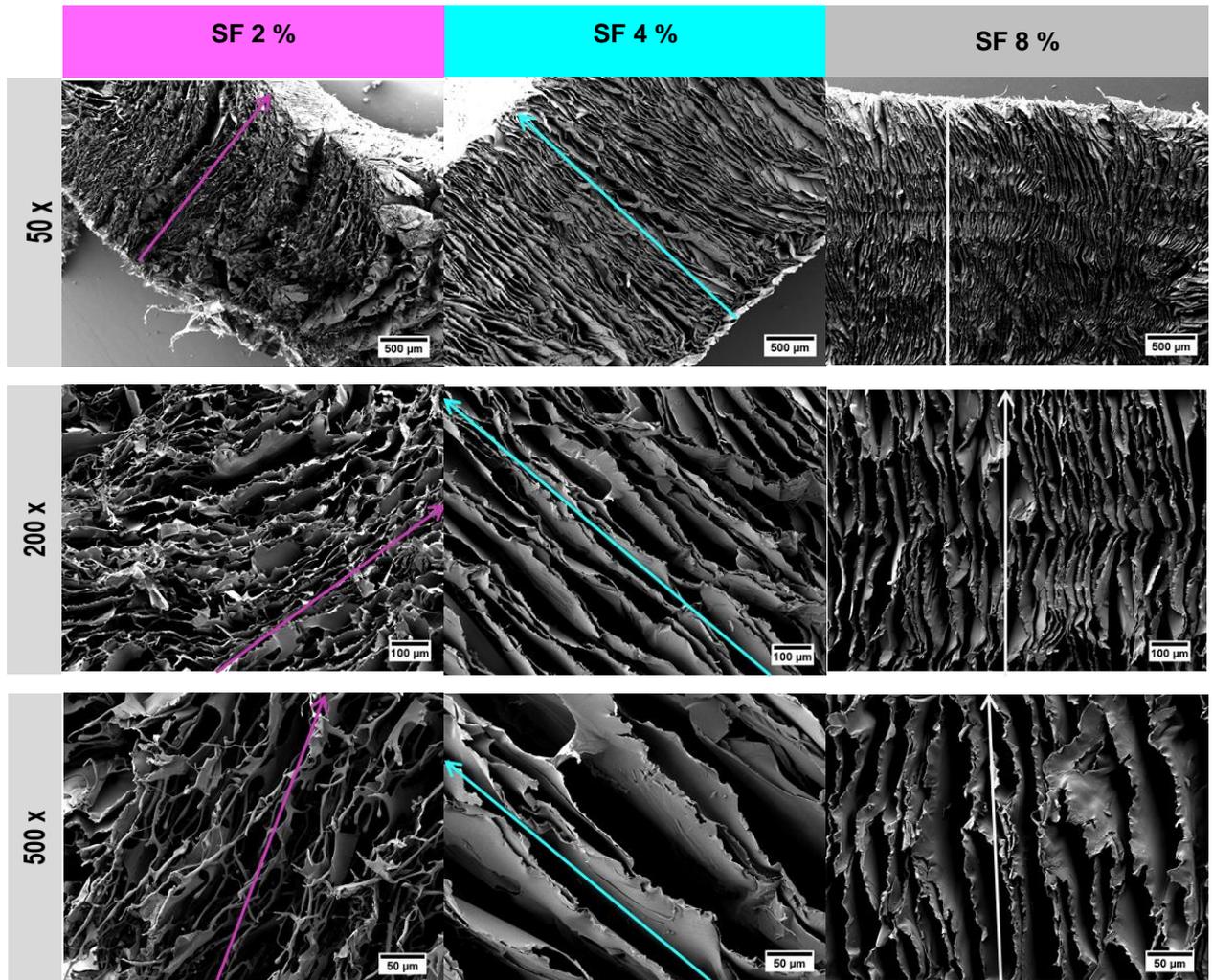


Abbildung 4-13: REM-Aufnahmen der maschinellen Gefrierstrukturierung von 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösungen bei 50-, 200- und 500-facher Vergrößerung.

4.6.3 Mineralisation der gefrierstrukturierten Seidenfibroin-Scaffolds

Es wurde 4 % SF-Lösungen manuell oder maschinell gefrierstrukturiert und im Anschluss (i) gefroren oder (ii) lyophilisiert in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung für 3 d eingelegt. Mit Hilfe von rasterelektronischen Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung wurde geprüft, ob die Porenstruktur nach Gelierung in MCPA-Phosphorsäure-Lösung noch erhalten blieb.

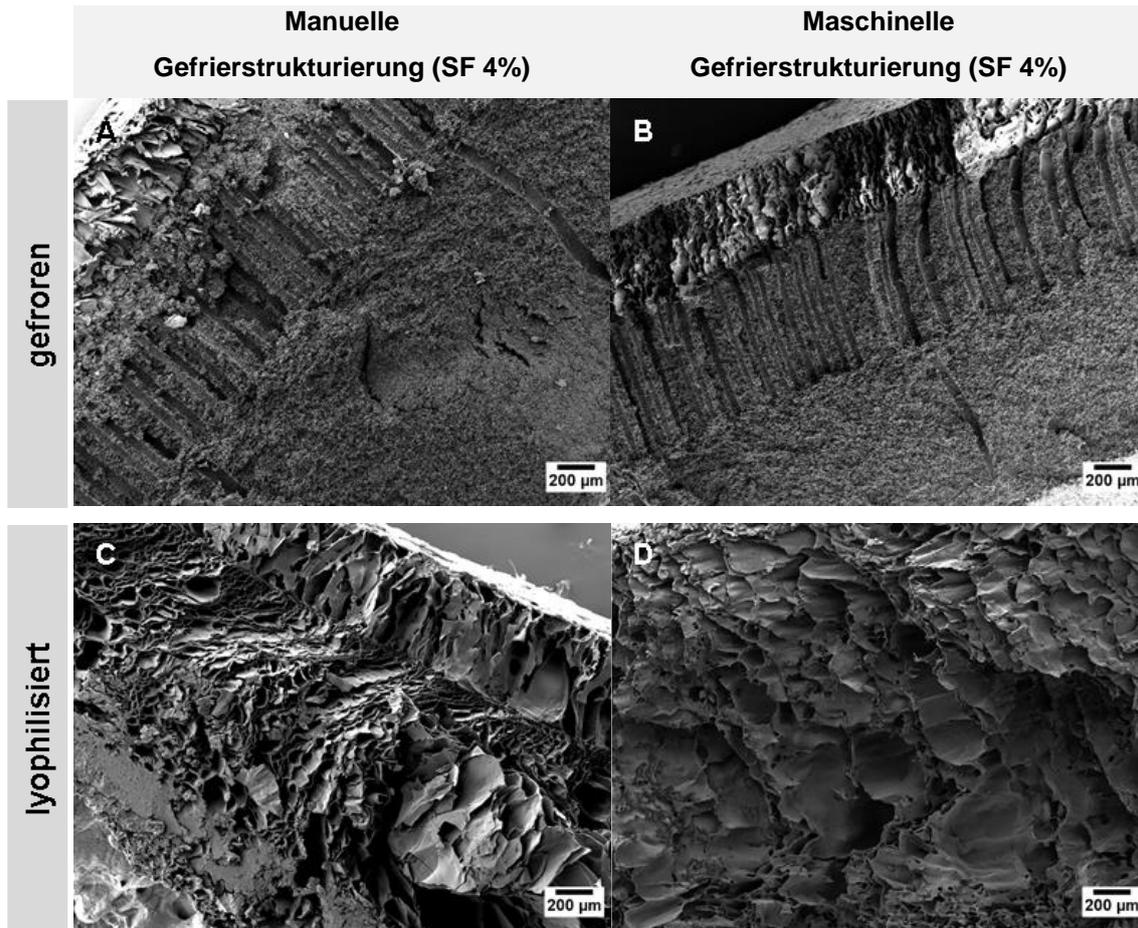


Abbildung 4-14: REM-Aufnahmen nach Einlegen der manuell oder maschinell gefrierstrukturierten SF-Lösungen in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung für 3 d bei 100-facher Vergrößerung.

A: Manuell gefrierstrukturierte SF-Lösung wurde gefroren in MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegt.

B: Maschinell gefrierstrukturierte SF-Lösung wurde gefroren in MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegt.

C: Manuell gefrierstrukturierte SF-Lösung, die vor dem Einlegen in MCPA-Phosphorsäure-Lösung lyophilisiert wurde.

D: Maschinell gefrierstrukturierte SF-Lösung, die vor dem Einlegen in MCPA-Phosphorsäure-Lösung lyophilisiert wurde.

In **Abbildung 4-14** sind REM-Aufnahmen der manuell und maschinell gefrierstrukturierten SF-Lösungen nach dem Einlegen in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung für 3 d bei 100-facher Vergrößerung dargestellt. **Abbildung 4-14** A und B zeigt gefrierstrukturierte SF-Lösungen die gefroren und direkt nach Gefrierstrukturierung, in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegt wurden. Dahingegen stellen die **Abbildung 4-14** C und D SF-Lösungen dar, die nach Gefrierstrukturierung zuerst lyophilisiert und dann in MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegt wurden. Es fällt auf, dass sich in den gefroren eingelegten, gefrierstrukturierten SF-Lösungen manuell wie maschinell drei Schichten bildeten. In

der unteren Hälfte entstand ein Bereich mit homogener Struktur ohne Poren. Dem folgte eine Schicht mit definierter Porenstruktur senkrecht zu Oberfläche und eine Oberflächenschicht mit Poren, die jedoch wesentlich größere Hohlräume enthielt. Die gefriergetrocknet eingelegte manuell gefrierstrukturierte SF-Lösung wies ebenso drei Schichten auf. Die untere Schicht war sehr kompakt ohne Poren, die zweite Schicht zeigte sich schwammartig mit vielen Hohlräumen und die oberste Schicht wies eine Porenstruktur senkrecht zur Oberfläche auf. Jedoch zeigt die lyophilisiert eingelegte maschinell gefrierstrukturierte SF-Lösung in der REM-Aufnahme keine geordnete Porenstruktur. Es war eine schwammartige Struktur mit vielen Hohlräumen erkennbar.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Porenstruktur in keinem Fall weder maschinell oder manuell gefrierstrukturiert noch gefroren oder lyophilisiert eingelegt vollständig erhalten blieb. Am formstabilsten ist die Porenstruktur bei der maschinell gefrierstrukturierten SF-Lösung, die gefroren in MCPA-Phosphorsäure-Lösung eingelegt wurde. Im Mittelteil war eine Porenstruktur vorhanden, die starke Veränderungen im Vergleich zur Porenstruktur direkt nach Gefrierstrukturierung zeigte (vgl. **Abbildung 4-13**).

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der MCPA-Seidenfibroin-Scaffolds

Durch Einlegen der gefrorenen SF-Lösung in MCPA-Phosphorsäure-Lösung sollte die Bildung von Brushit in den Prüfkörpern induziert werden. Diese Methode mit parallel ablaufender Gelierung und Mineralisierung führte jedoch zur Einlagerung von MCPA und nicht zur Generierung von Brushit in den SF-Scaffolds (siehe Kapitel 4.4.1). Die Hypothese, dass MCPA in der Phosphorsäurelösung zu Brushit abbindet und sich im Scaffold einlagert, wurde somit nicht bestätigt. Vermutlich waren die pH-Werte der MCPA-Phosphorsäure-Lösungen (2,5 Gew.-% MCPA: 1,7-1,9 und 5 Gew.-% MCPA: 2,0-2,2) zu niedrig, da eine Kristallisation zu Brushit bei pH-Werten zwischen 4 und 5 bevorzugt stattfindet [122]. Auch könnte ein fehlerhaftes Calcium-Phosphat-Verhältnis eine Rolle gespielt haben. Nach aktuellem Wissensstand liegt bis jetzt keine Literatur vor, die sich mit der Einlagerung von Brushit in SF-Scaffolds auseinandersetzt, obwohl die Kombination deren Eigenschaften vielversprechende Aussichten im Bereich Tissue Engineering mit sich bringt. Das Problem der MCPA-SF-Scaffolds liegt in der fehlenden Biokompatibilität von MCPA, weshalb eine Anwendung im menschlichen Körper eher schwierig ist [120, 121]. Jedoch lassen sich wichtige Erkenntnisse über die Einflüsse der MCPA-Phosphorsäure-Lösung, der SF-Konzentration und der Lagerungszeit auf die Eigenschaften von SF-Scaffolds aus den Forschungsergebnissen ableiten.

5.1.1 Einfluss der MCPA-Phosphorsäure-Lösung

Im Folgenden wird analysiert, wie sich das Einlegen von gefrorenen SF-Lösungen in MCPA-Phosphorsäure-Lösungen auf die Morphologie, Struktur und mechanischen Eigenschaften der MCPA-SF-Scaffolds auswirkt.

Morphologisch fiel auf, dass die Oberflächen-REM-Aufnahmen von lyophilisierter SF-Lösung (siehe **Abbildung 4-7**) eine homogene, glatte Struktur mit regelmäßigen Einbuchtungen ins Innere der Scaffolds aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Oberfläche der MCPA-SF-Scaffolds als raue, inhomogene Fläche, wobei die Distribution der kleinen Mulden eher unregelmäßig war (siehe **Abbildung 4-8**). Zudem waren auf den REM-Bildern der Innenflächen (siehe **Abbildung 4-7**) der lyophilisierten

SF-Lösung eher blattartigen Strukturen erkennbar. Im Vergleich dazu wiesen die MCPA-SF-Scaffolds definierte, miteinander verbundene Poren auf, die von mineralischen Ablagerungen umgeben waren (siehe **Abbildung 4-8**). Die blattartigen Formen stellen SF-Strukturen dar, die in der SF-Lösung von Wasser umgeben sind. Nach Einlegen in MCPA-Phosphorsäure-Lösung wandeln sich diese Konstrukte zu definierten Porenstrukturen um. Dieser Vorgang wird durch die Gelierung der Scaffolds bei niedrigem pH-Wert und vorhandenen Calcium-Ionen in der MCPA-Phosphorsäure-Lösung ausgelöst. Hierbei kommt es zu vermehrten hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, was auf Konformationsänderung der random-coil zur β -Faltblatt-Struktur beruht und mit einem Wasserausschluss in Verbindung steht [86]. Das Wasser bahnt sich zwischen den neugebildeten kristallinen Strukturen seinen Weg nach außen. So lässt sich auch die Inhomogenität der Poren erklären. Die Rauheit der Oberfläche und die erkennbaren mineralischen Ablagerungen in höherer Vergrößerung veranschaulichen die MCPA-Einlagerungen. In der Literatur wird eine blattartige Morphologie der lyophilisierten SF-Lösung und ein schwammartiges Porennetzwerk von SF-Hydrogelen beschrieben, was unsere Ergebnisse bestätigen [98]. Das Einlegen der gefrorenen SF-Lösung in MCPA-Phosphorsäure-Lösung führt zu einem dichten SF-Netzwerk, das mit Poren durchsetzt ist. Das Ergebnis deutet an, dass SF-basierte Materialien aufgrund ihrer porösen Morphologie gute Matrices für Zelladhäsion und Zellexpansion darstellen und so gut geeignet wären, um als Trägermaterial Anwendung zu finden. Darüber hinaus wird bestätigt, dass eine Mineralisierung der SF-Scaffolds stattgefunden hat.

Des Weiteren fiel bei der Analytik der Phasenzusammensetzung mittels XRD auf (siehe Kapitel 4.4.1), dass die SF-Scaffolds direkt nach Entnahme aus der MCPA-Phosphorsäure-Lösung im feuchten Zustand keine Beugungsreflexe aufwiesen. Nach Trocknung und Zerkleinerung der gleichen Scaffolds und erneuter XRD-Messung wurden Beugungsreflexe von Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) deutlich. Aufgrund des vorhandenen Background-Signals (keine lineare Basislinie) ist es möglich, dass diffuse Streuung oder Beugung durch den Probenhalter aufgetreten ist. Eine weitere Vermutung wäre das Vorhandensein von amorpher Phase in den feuchten Proben. Die Beugungsreflexe der getrockneten SF-Scaffolds sind eher breit, was auf eine geringe Kristallinität hindeutet und das Vorliegen amorpher Phasen vor Trocknung

untermauert. Darüber hinaus lässt sich mit Erhöhung der MCPA-Menge von 2,5 Gew.-% auf 5 Gew.-% eine Zunahme der MCPA-Beugungsreflexflächen erkennen. Folglich führte eine Steigerung der MCPA-Menge in der MCPA-Phosphorsäure-Lösung zu einer Zunahme der MCPA-Einlagerung in den SF-Scaffolds. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass beim Auftauen der SF-Lösung die MCPA-Phosphorsäure-Lösung immer weiter zum Kern der gefrorenen SF-Scaffolds vordrang und dabei die Gelbildung des SFs von außen nach innen induzierte. Dabei lag MCPA in der flüssigen Phase gelöst vor und durchdrang in diesem Zustand den angetauten, teilweise schon gelierten SF-Prüfkörper. Erst beim Trocknen der feuchten SF-Scaffolds bildete sich MCPA aus der noch im SF-Scaffold enthaltenen MCPA-Phosphorsäure-Lösung. Der Nachweis von MCPA in den SF-Scaffolds bestätigt, dass das Einbringen von Calciumphosphaten generell mit dieser Gelierungsmethode möglich ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich die eingelagerte MCPA-Menge durch die MCPA-Konzentration der MCPA-Phosphorsäure-Lösung leicht steuern lässt. So gilt diese Gelierungsmethode als vielversprechender Ansatz, um SF-Scaffolds mit weiteren biokompatiblen Calciumphosphaten, wie beispielsweise Brushit, zu mineralisieren.

Der Druckmodul der 2 % SF-Scaffolds betrug zwischen 8,7 und 17,8 kPa. Die 4 % SF-Proben wiesen ein durchschnittliches E-Modul im Bereich von 42,8 bis 46,8 kPa auf. Die höchsten Werte erzielten 8 % SF-Scaffolds mit Werten zwischen 500,5 und 677,8 kPa. Auffällig war, dass eine Verdopplung der MCPA-Menge von 2,5 g auf 5 g MCPA pro 100 mL Reintwasser weder einen Einfluss auf die Druckfestigkeiten noch auf die E-Moduln hatte. Dies spricht dafür, dass MCPA die hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken des SFs während der Kompression nicht wesentlich beeinflusst und bestätigt die Hypothese, dass MCPA erst nach Gelierung des Scaffolds präzipitiert. Die Literatur berichtet über HA-SF-Hydrogele mit einem Druckmodul zwischen 92,2 kPa und 109,8 kPa für Proben mit einer SF-Konzentration von 4 %. Im Vergleich dazu lag der Druckmodul reiner SF-Hydrogele ohne HA bei einem Wert von 125 kPa. Begründet wurde der reduzierte Druckmodul der HA-SF-Hydrogele mit der größeren Porenstruktur der HA-SF-Scaffolds und dem geringeren SF-Gehalt [115]. Der Druckmodul der 4 % MCPA-SF-Scaffolds ohne mineralische Phase (46,8 kPa) ist um mehr als 50 % kleiner als der Druckmodul der HA-SF-Hydrogele. Ein Grund liegt vermutlich in den unterschiedlichen Gelierungsmethoden.

Die Herstellung der HA-SF-Scaffolds erfolgte durch Vermischen der HA-Nanopartikel mit Ethanol, wobei der Alkohol der SF-Lösung langsam zugefügt wurde. Ethanol löste die Gelbildung im SF aus [115]. Im Gegensatz dazu erfolgte die Gelbildung in den MCPA-SF-Scaffolds durch Einlegen von gefrorener SF-Lösung in MCPA-Phosphorsäure-Lösung. Die Gelierungsmethode hat einen großen Einfluss auf das Ausmaß der Ausbildung an β -Faltblatt-Strukturen, die Ausbildung der Porengröße und damit auf den Druckmodul [107]. Neben oben genannten Faktoren spielte auch das Einfrieren und Gelieren der SF-Lösung in gefrorenem Zustand eine große Rolle. Ribeiro et al. berichtete über eine Zunahme der Porengröße und stark abnehmenden Druckmodul von Hydrogelen, die nach der Gelbildung eingefroren werden [115]. Ein zusätzlicher Parameter in der Größenordnung der Kompressionsmoduln sind die unterschiedlichen Aufbauten zur Druckfestigkeitsmessung. Während die Proben der HA-SF-Hydrogele vor der Messung in dicht verschlossenen Plastikbeuteln gelagert und durch einen 9,81 N (1 kg)-Kraftaufnehmer mit einer Geschwindigkeit von $0,2 \text{ mm} \cdot \text{sec}^{-1}$ komprimiert wurden, wurde die Druckfestigkeit der Proben der MCPA-SF-Scaffolds vorher in Reinstwasser gelagert und anschließend mit einem 22 N Kraftaufnehmer bei $0,01 \text{ mm} \cdot \text{sec}^{-1}$ gemessen. In der Literatur wird beschrieben, dass eine längere Lagerung in Wasser zur Reduktion der mechanischen Eigenschaften von Spinnenseide führt [149], weshalb sich die Lagerung der Proben in Reinstwasser als nachteilig erweisen könnte. Der Druckmodul von künstlichen Knochenersatzmaterialien liegt zwischen 0,2 und 3 GPa, je nach Anwendungsbereich und Größe des Defekts [150]. Von Werten in dieser Größenordnung sind die MCPA-SF-Scaffolds noch weit entfernt. Jedoch könnten sie in Kombination mit Trägermaterial für Zell- und Gewebekulturen zur Herstellung von Implantat-Materialien, wie insbesondere Knochen-, Knorpel- oder Hautersatz oder extrakorporalen Organersatz, mithalten. Ohne Zusatz weisen die MCPA-SF-Scaffolds lediglich ein Druckmodul im Bereich von 0,25 MPa auf [151].

Die Spannungswerte der Zugfestigkeitsmessung lagen zwischen 15 und 150 kPa. Der E-Modul lag für die 2 % SF-Konzentration zwischen 0,4 und 0,8 kPa, für die 4 % SF-Konzentration zwischen 1,8 und 2,8 kPa und für die 8 % SF-Konzentration im Bereich von 4,1 und 6,9 kPa. Auffällig war eine Zunahme der Zugfestigkeitswerte mit Steigerung der MCPA-Menge von 2,5 Gew.-% auf 5 Gew.-%. Eine Unregelmäßigkeit stellte die 2 % SF-Konzentration dar, deren Prüfkörper in 5 Gew.-% MCPA-

Phosphorsäure-Lösung gelagert wurde (siehe Kapitel 4.3). Der Mechanismus der elastischen Verformung beruht auf einer Veränderung der Atomabstände. Die Bindungsverhältnisse der Atome werden durch die äußere Kraft gestört. Während der plastischen Verformung kommt es zu einem Bruch der Wasserstoffbrücken und einem Gleiten der Aminosäurestränge mit großem Platzdefizit, wenn eine kritische Schubspannung in diese Richtung überschritten wird. Träger der plastischen Verformung sind die Versetzungen, die sich in den Gleitsystemen (sowohl Gleitebene als auch Gleitrichtung) bewegen. Jede Behinderung dieser Versetzungsbewegung bewirkt eine Verfestigung des Werkstoffs [39, 152]. Mit der Erhöhung der MCPA-Konzentration lagen mehr Ionen in der MCPA-Phosphorsäure-Lösung vor. Die Ionen behindern die Versetzungsbewegung, was zu einer höheren Zugfestigkeit führt. Beim Vergleich der Zugfestigkeitswerte der MCPA-SF-Scaffolds mit anderen Biomaterialien fällt ein deutlicher Unterschied auf. Die Zugfestigkeit von Kollagen liegt zwischen 0,9 und 7,4 MPa und von PLA im Bereich von 28 und 50 MPa (siehe **Tabelle 1**) [20]. Die Zugfestigkeit der MCPA-SF-Scaffolds liegt deutlich darunter und könnte keine Anwendung in zugbelasteten Bereichen finden.

Das Einlegen von gefrorener SF-Lösung in MCPA-Phosphorsäure-Lösung führte zur Gelierung der SF-Lösung mit einem Konformationswechsel von random-coil- zu β -Faltblatt-Strukturen. Dadurch kam es zu einer Änderung der Morphologie von blattartigen zu porösen Strukturen. Zudem wurde deutlich, dass sich mit dieser Gelierungsmethode Calciumphosphate, in dieser Form als MCPA einlagern lassen, jedoch nicht wie erwartet eine Umsetzung zu Brushit stattfindet. Die mechanischen Eigenschaften wiesen geringere Festigkeiten als andere SF-Komposit-Scaffolds auf, allerdings sind sie ausreichend, um als Trägermaterial für Zell- und Gewebematerial zur Herstellung von Implantat-Materialien Anwendung zu finden.

5.1.2 Einfluss der Seidenfibroin-Konzentration

Die hergestellten SF-Lösungen lagen in 2 %, 4 % und 8 % SF-Konzentration vor (siehe Kapitel 3.1 und 3.2). Auffällig war, dass sich die Konzentrationsänderung sehr deutlich in der Morphologie, Struktur und den mechanischen Eigenschaften der MCPA-SF-Scaffolds niederschlug.

In Kapitel 4.1 wurden die pH-Werte und die Konzentration direkt nach Herstellung der SF-Lösungen bestimmt. Die Konzentrationen hatten nicht immer gleich bleibende Werte, was auf die Qualitätsschwankungen des Naturproduktes Seide zurückzuführen ist. Jedoch wird deutlich, dass die unterschiedlichen SF-Lösungen der Konzentrationen 2 %, 4 % und 8 % in der Herstellung gut reproduzierbar sind (siehe **Abbildung 4-1**). Die pH-Werte lagen im Bereich von 7,0 bis 7,5 und wiesen eine gewisse Abhängigkeit von der SF-Konzentration auf. Je höher die SF-Konzentration, desto alkalischer waren die pH-Werte der Lösungen. Kapoor et. al. berichtet über 2 % SF-Lösungen mit pH-Werten zwischen 6,4 und 6,8 bei 37 °C [98]. Des Weiteren sind in der Literatur 25 % SF-Lösungen mit pH-Werten im Bereich von 7,5 zu finden [153]. Darüber hinaus wurden die SF-Lösungen in der Literatur bei 37 °C und nicht direkt nach Entnahme aus dem Kühlschrank bei 5 °C bzw. Raumtemperatur gemessen. Dies könnte die Ursache für etwas niedrigere pH-Werte in der Literatur im Gegensatz zu den hier ermittelten Werten darstellen. Die 2 % SF-Lösung in der Literatur weist einen pH im Bereich von 6,4 bis 6,8 auf und liefert nicht, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, Werte von 7,0 bis 7,2. Die Abnahme des pH-Wertes mit sinkender SF-Konzentration wurde durch einen höheren Anteil an demineralisiertem Wasser mit einem pH von 4,5 bis 5,0 in der SF-Lösung hervorgerufen. Insgesamt liegen die pH-Werte von 7,0 bis 7,5 nahe dem physiologischen pH von 7,4. Folglich sind hinsichtlich des pH-Wertes gute Ausgangsbedingungen für die Biointegration von seidenbasierten Materialien *in vivo* geschaffen.

Aus den SF-Lösungen wurden die MCPA-SF-Scaffolds hergestellt und unter dem Elektronenmikroskop analysiert. Dabei war auffällig, dass Porengröße und -zahl mit steigender SF-Konzentration abnahm (siehe **Abbildung 4-8**). Dies lässt sich auf die höhere SF-Konzentration und den damit einhergehenden sinkenden Wassergehalt zurückführen. Kim et al. bestätigt diese Beobachtung, dass eine Abnahme der Porengröße mit steigender SF-Konzentration erfolgt. Die in dieser Studie verwendeten Hydrogele bestanden aus SF-Lösung, die durch Änderung der Temperatur geliert wurden [98]. Das Ende der Gelierung wurde durch eine Farbänderung der Hydrogele zu weiß-opak bzw. das Haften am Zentrifugenröhrchen für mind. 30 sec festgelegt. Diese Definition scheint nur schwer reproduzierbar. Die hier angewendete Methode, das Einlegen der gefrorenen Scaffolds in einer definierten Menge an MCPA-Phosphorsäure-

Lösung für einen bestimmten Zeitraum lässt aus dieser Sicht wenig Spielraum für Fehlerquellen. Im Bereich Tissue Engineering spielt die Porengröße und -zahl in den SF-Scaffolds eine wichtige Rolle für das Einwachsen von Zellen. Durch Einstellung der Konzentration der SF-Lösung sowie reproduzierbare Herstellungstechniken und angewendete Methoden kann dies in weiteren Untersuchungen auf Basis dieser Ergebnisse für Zellversuche genutzt werden.

Mit Zunahme der Porengröße und folglich sinkender SF-Konzentration nimmt die Intensität und Peakfläche der XRD-Beugungsreflexe von Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) zu. Vermutlich nehmen die 2 %-SF-Scaffolds aufgrund der höheren Porosität und geringerer intermolekularer Wechselwirkungen mehr MCPA-Phosphorsäure-Lösung auf als die 4 % und 8 % SF-Scaffolds. Somit kann beim Trocknungsprozess mehr MCPA ausfallen. Nach unserem Wissensstand liegt keine Literatur vor, die sich mit der Einlagerung der Calciumphosphat-Menge abhängig von der SF-Konzentration oder Porengröße der SF-Scaffolds auseinandersetzt. Dieser Zusammenhang kann vor allem für den Anwendungsbereich Knochen- und Knorpelregeneration von großem Interesse sein.

Der Einfluss der SF-Konzentration auf die Anzahl der physikalischen Wechselwirkungen zwischen den SF-Molekülen [86] wirkt sich zudem auf die Höhe der Prüfkörper aus. In **Tabelle 4** und **Tabelle 5** wird deutlich, dass die Probenhöhe mit steigender SF-Konzentration bei gleicher Menge an SF-Lösung zunahm. Matsumoto et al. konnte zeigen, dass eine pH-Wert-Senkung zu einer Protonierung der Carboxylgruppen führte. Somit wurde die Ladungsabstoßung reduziert und eine Proteinfaltung zu β -Faltblatt-Strukturen induziert. Dieser Vorgang steht mit einer Kontraktion und dem Ausschluss von Wasser in Verbindung [86]. In den hochkonzentrierten Scaffolds ist mehr SF und weniger Wasser enthalten, was zur Ausbildung von hydrophoberen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen führt. Dies wiederum geht mit einer Kontraktion einher. Allerdings wird diese Kontraktion ab einer bestimmten Moleküldichte sterisch gehindert, was zur Folge hat, dass niedrigkonzentrierte SF-Scaffolds eine höhere Schrumpfung als höher konzentriertere aufweisen. Muthumanickham et al. führte Untersuchungen mit elektrogewebten Eri- und Tasar-SF-Scaffolds durch. Diese wurden zur Erhöhung der

Kristallinität des SFs in Ethanol getaucht. Die Ethanol-Behandlung resultierte in einer relativen Schrumpfung der Scaffolds [154, 155]. Diese Studie untermauert die Vermutung, dass die Abnahme der Scaffoldhöhe durch die Gelierung der SF-Lösung ausgelöst wurde. Mögliche Fehlerquellen in diesem Studiendesign könnten das waagrechte Positionieren der SF-Lösung im Gefrierschrank sein, was in einer leicht schrägen Oberfläche und damit nicht konstanten Scaffold-Höhe resultierte. Auch könnte die Probenhöhe durch Lagerung der Prüfkörper in Reinstwasser vor Durchführung der Messungen verfälscht worden sein, was zum Anschwellen der Scaffolds führen kann [149]. Die unterschiedliche Probenhöhe führt zu einem nicht konstanten Probenvolumen bei der mechanischen Prüfung der Druck- und Zugfestigkeit. Jedoch wird dies bei der Berechnung der Spannung und Dehnung berücksichtigt, weshalb es keinen bedeutenden Einfluss auf die Genauigkeit der Messungen hat.

Die Druck- und Zugfestigkeit der MCPA-SF-Scaffolds nahm ebenfalls mit steigender SF-Konzentration zu (siehe Kapitel 4.2.1), was sich erneut auf die Erhöhung der Wechselwirkungen zwischen den SF-Molekülen zurückführen lässt. Das gleiche Ergebnis lag bei den Forschungen von Un-Jin Kim et al. mit SF-Hydrogelen von *Bombyx mori* vor. Hier wurde die Gelbildung durch Aufbewahren der SF-Lösung bei Raumtemperatur und bei 60 °C induziert [98]. Der ansteigende Gehalt an hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit zunehmender Konzentration führte zu einer abnehmenden Dehnfähigkeit der MCPA-SF-Scaffolds, was in **Abbildung 4-2** und **Abbildung 4-4** deutlich wird. Das Ergebnis kann anhand des Haft-Gleit-Effekts erklärt werden. Zu Beginn der Dehnung kommt es zu Schwebbewegungen und zum Bruch der Wasserstoffbrücken. Der Haft-Gleit-Effekt führt dazu, dass der Aminosäurestrang gleitet und sich an einer anderen Stelle die Wasserstoffbrücken neu ausbilden [39]. Nimmt der Platzmangel weiter zu, wird das Gleiten des Aminosäurestrangs sterisch gehindert und es kommt zum Zerreißen der Probe. Je mehr hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen bestehen, desto schneller kommt es zum Platzmangel innerhalb der Nanokristalle. Folglich ist die Dehnfähigkeit von SF-Scaffolds mit hoher Konzentration geringer. Kim et al. beschrieb in seiner Publikation 2004 eine Zunahme der Dehnfähigkeit bei der Druckfestigkeitsmessung seiner Hydrogele mit Erhöhung der SF-Konzentration. Er begründete das Ergebnis damit, dass die kleineren Porengröße die Kraft besser verteilen und bei Rissentstehung eine

Ausbreitung besser verhindert werden würde [98]. Dies würde bedeuten, dass der Aminosäurestrang in höher konzentrierten SF-Scaffolds besser gleitet, obwohl weniger Platz zu Verfügung steht. Rein strukturell gesehen ist dieses Ergebnis fragwürdig. Auch stellen die Terminierungs-Kriterien der Gelierung Farbe und Haftung am Zentrifugenröhrchen-Deckel in der Studie von Kim et al. keine geeigneten Parameter dar, um den Grad der Gelbildung in jeder Probe zu reproduzieren. Die gewünschten mechanischen Eigenschaften der SF-Scaffolds sind je nach Anwendungsgebiet unterschiedlich. So ist es von Vorteil, diese durch einfache SF-Konzentrationsänderung beeinflussen zu können.

Die SF-Konzentration hat Einfluss auf den pH-Wert, die Porosität, den MCPA-Gehalt, die Schrumpfung, die Spannung und Dehnung von Druck- und Zugfestigkeit. Folglich bestimmt die SF-Konzentration die Scaffold-Eigenschaften wesentlich mit, weshalb die Berücksichtigung der Konzentration bei der Scaffold-Planung für bestimmte Anwendungsbereiche sinnvoll ist.

5.1.3 Einfluss der Lagerungszeit

Im Folgenden wird der Einfluss der zwei verschiedenen Lagerungszeiten 3 d und 6 d der gefrorenen SF-Lösung in MCPA-Phosphorsäure-Lösung diskutiert.

Hierbei wird deutlich, dass zum einen die Spannung und zum anderen der E-Modul der Druckfestigkeits- sowie Zugfestigkeitsmessung der MCPA-SF-Scaffolds bei einer Verlängerung der Inkubationszeit von 3 d auf 6 d anstieg (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.3). Vermutlich ist dieser Zusammenhang auf die zunehmende Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen im SF-Scaffold nach 3 d in der sauren MCPA-Phosphorsäure-Lösung (pH-Wert: $\sim 2,0$) zurückzuführen. Dies würde auch den Spannungsanstieg sowohl beim Druck- als auch Zugversuch bestätigen. Matsumoto et al. fand mittels optischer Dichtemessung und Infrarotspektroskopie heraus, dass die Gelbildung einer 3,6 % SF-Lösung bei Raumtemperatur ohne äußere Einwirkung nach 7 d einen deutlichen Anstieg des β -Faltblatt-Gehalts von 20 % auf 52 % aufweist. Jedoch stellte er auch fest, dass die Ausbildung der β -Faltblatt-Struktur noch bis zum Tag 12, dem hier gewählten Endpunkt der Messung, leicht zunahm [86]. Wie zuvor in Kapitel 5.1.2 erwähnt, führte ein höherer Gehalt an β -Faltblatt-Strukturen zu einer Verbesserung der mechanischen Festigkeit [98]. Eine Ausnahme stellten die 4 % SF-Scaffolds bei der

Druckfestigkeitsmessung dar, welche in 2,5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung gelagert wurden. In diesem Fall blieb die Spannung bei einer Einlegedauer von 3 d bzw. 6 d konstant. Ebenso fiel eine abfallende Spannung der Zugfestigkeit der 2 % SF-Konzentration nach Einlage in 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung bei Erhöhung der Einlegedauer von 3 d auf 6 d auf. Diese Abweichungen sind vermutlich fehlerhaftem Positionieren unter dem Druckstempel, nicht korrektem Festkleben zwischen den Zugbacken oder einem Materialfehler der Probe geschuldet.

Darüber hinaus hat die Lagerungszeit Einfluss auf die Probenhöhe (siehe **Tabelle 4** und **Tabelle 5**). Die Probenhöhe der 2 % SF-Prüfkörper des Druckversuchs nahm mit verlängertem Inkubationszeitraum zu, während die Höhe der 2 % Zugproben geringer wurde. Die 4 % und 8 % SF-Scaffolds der Druck- und Zugmessung wiesen Abweichungen der Probenhöhe von weniger als 0,3 mm auf, was als konstante Probenhöhe angesehen wird. Da die Gelierungsdauer, mit zunehmender SF-Konzentration abnimmt [86], liegt die Vermutung nahe, dass die β -Faltblatt-Bildung der 2 % Proben nach 3 d noch mehr ansteigt, während sie bei den 4 % und 8 % Prüfkörper schon fast abgeschlossen ist. Dazu kommt, dass die Schrumpfung mit zunehmender SF-Konzentration abnimmt. Folglich muss die Zunahme der Höhe der 2 % Probe des Druckversuchs ein Messfehler sein, was durch die falsche Kalibrierung oder das unterschiedliche Andrücken der Schieblehre hervorgerufen werden konnte. Das Resultat war eine Abweichung der Geometrie der Druck- und Zugfestigkeitsmessung. Die Geometrie wurde aber bei jeder Messung individuell berücksichtigt und bei Ermittlung der Spannung und Dehnung mit einbezogen. Durch die Einlegedauer ließ sich die molekulare SF-Struktur und damit die mechanischen Eigenschaften gut steuern. SF-basierte Biomaterialien lassen sich so leicht auf individuelle Anforderungen anpassen.

Bei einer Verlängerung der Lagerungszeit von 3 d auf 6 d kam es vermutlich zu einem weiteren Anstieg des β -Faltblatt-Gehalts der MCPA-SF-Scaffolds, wobei der Anstieg bei der 2 % SF-Konzentration am größten ausfiel. Dies resultierte in einer Erhöhung der mechanischen Festigkeit und einer Abnahme der Höhe der MCPA-SF-Scaffolds mit zunehmender Einlegedauer.

5.2 Charakterisierung der Brushit-Seidenfibroin-Scaffolds

Das Einlegen von gefrorener und gefriergetrockneter β -TCP-SF-Lösung in 20 % Phosphorsäure (siehe Kapitel 3.3.2) verfolgte ebenso das Ziel, Brushit in SF-Scaffolds einzulagern.

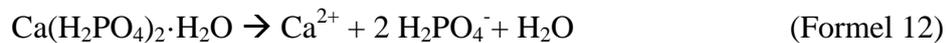
Abbildung 4-9 und **Abbildung 4-10** zeigen REM-Aufnahmen der getrockneten Brushit-SF-Scaffolds mit der für Brushit typischen plattenartigen Schichtstruktur. Außerdem fällt eine deutliche Zunahme der Brushit-typischen Struktur von der Oberseite zur Unterseite auf. Diese Tatsache lässt sich auf eine inhomogene β -TCP-SF-Suspension zurückführen. Das β -TCP-Pulver sedimentierte auf den Boden der Petrischale. In der Literatur wird beschrieben, dass durch die inhomogene Verteilung von Calciumphosphaten in SF-Scaffolds die Materialeigenschaften beeinflusst werden können [115].

Darüber hinaus wird in Kapitel 4.4.2 deutlich, dass ein Brushit-Beugungsmuster in allen XR-Diffraktogrammen der SF-Scaffolds vorliegt. Vermutlich wurde durch die 20 % Phosphorsäure-Lösung der pH-Wert auf unter 4,2 gesenkt, was die Kristallisation von Brushit aus β -TCP und Phosphorsäure [123] sowie die SF-Gelbildung induzierte [86]. Somit konnte mit dieser Gelierungsmethode Brushit, wenn auch inhomogen verteilt, in die SF-Scaffolds eingelagert werden. Wie schon in Kapitel 5.1.1 erwähnt, ist ein weiteres mineralisiertes SF-System bekannt. Es handelt sich um HA-SF-Hydrogele [115]. Das Knochen-Remodeling ist von der Materialresorption durch Osteoklasten und anschließender neuer Knochenbildung von Osteoblasten abhängig. HA zeigt *in vivo* eine sehr langsame Resorptionsrate, was in die neue Knochenformation störend eingreift [156]. Im Vergleich dazu zeigt Brushit eine höhere Resorptionsrate, was eine gleichzeitige Materialresorption und Knochenformation auf Kosten der Stabilität an der Operationsstelle ermöglicht [157]. Die mangelnde Stabilität des eingelagerten Brushits könnte durch die sehr guten mechanischen Eigenschaften des SFs aufgefangen werden [48]. Aus diesem Grund ist die Einlagerung von Brushit in SF-Scaffolds für den Bereich Knochen- und Knorpelregeneration sehr vielversprechend.

5.2.1 Einfluss der Einlagemethode des Scaffolds

Die Einlagemethodik wirkte sich wesentlich auf die Mineralisierung der SF-Scaffolds aus. Die für 3 h eingelegte β -TCP-SF-Lösung zeigte im Vergleich zur Intervall-Methode deutlich kleinere Flächen unter den Bruschit-Beugungsmustern, was auf eine höhere Bruschit-Bildung während der Intervall-Methode schließen lässt. Zudem wird in den XR-Diffraktogrammen (siehe **Abbildung 4-6**) deutlich, dass sich die Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) Bildung genau gegensätzlich zur Bruschit Bildung verhält. Folglich lag eine höhere Calcium Hydrogen Phosphat Hydrat (MCPA) Bildung bei der 3 h Einlagemethode vor. Hierbei wurde die gefrorene β -TCP-SF-Lösung 3 h der 20 % Phosphorsäure ausgesetzt. Bei der Intervall-Methode waren es insgesamt 3 min. Dieser Zusammenhang lässt die Vermutung zu, dass sich zuerst Bruschit bildete, was nach längerer Einlagedauer zu MCPM oder MCPA umgesetzt wurde. MCPM und MCPA weisen ein Calcium-Phosphat-Verhältnis von 0,5 auf, während bei Bruschit ein Calcium-Phosphat-Verhältnis von 1,0 vorliegt. Zur MCPM und MCPA Bildung wird mehr Phosphat benötigt. Aufgrund des stetigen Phosphor-Ionen-Nachschubs aus der Phosphorsäure-Lösung könnte Bruschit nach längerer Einlagedauer in 20 % Phosphorsäure zu MCPM oder MCPA zurück reagieren.

MCPM-Lösung: [123]



β -TCP-Lösung: [123]



Bruschit-Präzipitation: [123]



Folglich ist die Intervall-Methode besser geeignet, um Bruschit einzulagern. Jedoch trat eine komplette oder deutlich bessere β -TCP-Umsetzung im SF-Scaffold während der 3 h-Einlage auf. Vermutlich reichte die Intervall-Methode zeitlich nicht aus, um den pH-Wert in den Bruschit-SF-Scaffolds ausreichend abzusenken. Es wäre denkbar, dass die Einlagedauer der Intervallmethode, die insgesamt nur 3 min betrug, nicht ausreichend war, um die β -TCP-Phase komplett umzusetzen. Bohner et al. konnte zeigen, dass der pH-Wert einer Lösung aus 1,2 g β -TCP und 0,171 M Phosphorsäure in den ersten Minuten ansteigt, es dann zu einem pH-Wert-Abfall und zuletzt zu einem

kontinuierlichen pH-Wert-Anstieg kommt. Das pH-Minimum trat nach $10,8 \pm 2,6$ min auf und stellt den Zeitpunkt der Brushit Präzipitation dar [123]. Trotz anderem β -TCP/Phosphorsäure-Verhältnis wird klar, dass eine Einlagedauer von insgesamt drei Minuten zu kurz sein kann, um die komplette β -TCP-Menge umzusetzen. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass die SF-Strukturen das Erreichen der β -TCP-Partikel erschweren.

5.2.2 Einfluss des Ausgangszustands des Scaffolds

Die gefroren eingelegte β -TCP-SF-Lösung zeigte im Vergleich zur gefriergetrockneten β -TCP-SF-Lösung deutlich geringer ausgeprägte β -TCP Beugungsreflexe, was mit geringeren Peakflächen einhergeht (siehe Kapitel 4.4.2). Folglich wurde mehr β -TCP in der Scaffold-Struktur umgesetzt. Vermutlich ist das Resultat auf die verminderte Benetzbarkeit der gefriergetrockneten Brushit-SF-Scaffolds durch die 20 % Phosphorsäure zurückzuführen. Die gefrorene β -TCP-SF-Lösung enthält noch Wasser, was durch die polare Eigenschaft die Benetzbarkeit deutlich verbesserte. Somit konnte die Phosphorsäure wesentlich schneller in die Mitte der gefrorenen als in die Mitte der lyophilisierten Proben vordringen. Folglich wurden einige β -TCP Partikel aufgrund ihrer Lage in der Probenmitte teilweise gar nicht oder zu kurz mit Phosphorsäure benetzt..

Die gefrorene im Intervall eingelegte β -TCP-SF-Lösung stellte die effektivste Methode dar, um Brushit in die SF-Scaffolds einzulagern. Mit dieser Methode konnte die größte Menge an Brushit im SF-Scaffold mineralisiert werden, obwohl noch β -TCP Rückstände vorhanden waren. Die β -TCP-Rückstände stellen in der Anwendung als Knochenregenerationsmaterial kein Problem dar. Durch die geringere Löslichkeit kann der Abbau reguliert werden und die übrigen β -TCP-Partikel können als Ankerpunkte zur Anregung der natürlichen Knochenregeneration dienen [135, 158].

5.3 Charakterisierung der anisotropen Porenstruktur

Die Gefrierstrukturierung verfolgte das Ziel, durchgängige Poren von der SF-Scaffold-Unterseite senkrecht zur SF-Scaffold-Oberfläche zu generieren. Eine anisotrope Porenstruktur fördert die Zelladhäsion. Dies wurde bereits bei Kollagen-Scaffolds

beobachtet und führte *in vivo* zu optimierten Heilungsvorgängen [18]. Die SF-Lösungen lagen in den Konzentration 2 %, 4 % und 8 % vor und wurden manuell sowie maschinell gefrierstrukturiert. Dies hatte entscheidenden Einfluss auf die entstehende Scaffold-Morphologie.

5.3.1 Einfluss der Gefrierstrukturierungsmethode

In Kapitel 4.6.1 und 4.6.2 wird gezeigt, dass anisotrope Poren in SF-Scaffolds verschiedener Konzentrationen durch manuelle sowie maschinelle Gefrierstrukturierung hergestellt werden konnten. Jedoch lagen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gefrierstrukturierungsmethoden in Bezug auf die Porenmorphologie vor. Während die Poren der manuellen Gefrierstrukturierung nicht durchgängig von der Scaffold-Unterseite zur Scaffold-Oberseite verliefen und drei Bereiche mit unterschiedlicher Porenausrichtung deutlich wurden, konnte in den REM-Aufnahmen der maschinellen Gefrierstrukturierung (siehe **Abbildung 4-13**) eine durchgängige Porenstruktur im 90° -Winkel zur Oberfläche nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellte die 2 % SF-Lösung der maschinellen Gefrierstrukturierung dar. Sie wies ebenso eine durchgängige Porenmorphologie auf, zeigte aber, im Bezug zur Scaffold-Oberfläche keine senkrecht ausgerichteten Porengänge. Während der manuellen Gefrierstrukturierung konnte der Temperaturgradient nicht kontrolliert werden. Nach **Abbildung 4-11** zu urteilen wurde der Temperaturgradient über den Gefrierstrukturierungszeitraum von 20 min nicht konstant gehalten, woraus die drei Bereiche mit unterschiedlicher Porenmorphologie resultierten. Am Scaffold-Boden lag ein zu geringer Temperaturgradient an, um eine anisotrope Porenmorphologie zu generieren, weshalb sich eine isotrope Scaffold-Struktur bildete. Zur Scaffold-Oberfläche hin nahm der Temperaturgradient zu. Es bildete sich eine anisotrope Porenstruktur, die im mittleren Bereich 45° zur Oberfläche aufwies. Erst im oberen Drittel war der Temperaturgradient ausreichend, um die Poren senkrecht zur Oberfläche auszurichten.

Im Gegensatz dazu konnte mittels ACD der Temperaturgradient genau eingestellt und kontrolliert werden. Der Temperaturverlauf wurde über den gesamten Gefrierprozess aufgezeichnet (siehe **Abbildung 4-12**). Der Temperaturgradient von $5,5 \text{ K} \cdot \text{mm}^{-1}$ war hoch genug, um eine anisotrope Porenmorphologie senkrecht zur Scaffold-Oberfläche hervorzurufen. Wegen des stationären Werts von $5,5 \text{ K} \cdot \text{mm}^{-1}$ über den kompletten

Zeitraum der maschinellen Gefrierstrukturierung entstanden durchgängige Poren von der Scaffold-Unterseite zur Scaffold-Oberseite. Stuckensen et al. stellte fest, dass mittels Variation des Temperaturgradienten die Porenmorphologie der Scaffolds präzise eingestellt werden kann. In **Abbildung 2-9** ist dargestellt, wie sich der Temperaturgradient und die Erstarrungsrate auf die Kristallmorphologie der Kollagen-Scaffolds auswirkten. Es wird deutlich, dass die Kristallgröße mit zunehmender Erstarrungsrate abnimmt, wohingegen die räumliche Anordnung mit steigendem Temperaturgradienten zunimmt. Mit zunehmendem Temperaturgradienten werden die Poren senkrechter zur Probenoberfläche ausgerichtet [18]. Die Vermutung, dass der Temperaturgradient in den manuell gefrierstrukturierten Scaffolds nicht konstant war und deshalb unterschiedliche Porenstrukturen entstanden, wird untermauert. Die 2 % SF-Probe wies eine etwas schräge Ausrichtung der Poren auf, was wahrscheinlich durch die schwierige Probenpräparation und dem Schneiden mit dem Keramikmesser hervorgerufen wurde.

Die Porenstruktur der manuellen Gefrierstrukturierung ließ sich aufgrund der mangelnden Kontrolle des Temperaturgradienten schlecht steuern. Im Gegensatz dazu hatte die maschinelle Gefrierstrukturierung den Vorteil, dass der Temperaturgradient individuell auf den Ausgangsstoff und die gewünschte Porenausrichtung angepasst werden und bis zum Ende des Gefrierprozesses konstant gehalten werden konnte. Deswegen ist die Gefrierstrukturierung mittels ACD der manuellen Gefrierstrukturierung deutlich überlegen. Durch die Wahl des entsprechenden Temperaturgradienten und der SF-Konzentration können die SF-Scaffolds der ursprünglichen zellulären Umgebung angepasst werden und so Anwendung als künstliche Extrazellulär-Matrix für Knochen oder Knorpel finden.

5.3.2 Einfluss der Seidenfibroin-Konzentration

Beim Vergleich der Porenmorphologie der unterschiedlich konzentrierten, gefriergetrockneten SF-Lösungen (2 %, 4 % und 8 %) wurde eine Abnahme der Porengröße mit zunehmender SF-Konzentration sowohl bei den manuell wie auch maschinell gefrierstrukturierten SF-Scaffolds festgestellt. Über ähnliche Ergebnisse für Kollagen-Scaffolds berichtete Schoof et al. Die Porengröße von gerichtet erstarrten Kollagenschwämmen stieg mit Zunahme des Lösungsmittels an [140], wobei beachtet

werden muss, dass hier Essigsäure und nicht Wasser als Lösungsmittel verwendet wurde. Vermutlich lässt sich der Einfluss der SF-Konzentration auf die Porengröße auf den geringeren Wasser- und den daraus resultierenden größeren SF-Anteil der höher konzentrierten Lösungen zurückführen. Somit sind die Eiskristalle bei höher konzentrierten Lösungen kleiner und das Volumen der zwischen die Eisspitzen gedrängten SF-Moleküle größer als bei niedrigeren Konzentrationen. Folglich entstehen nach der Gefriertrocknung kleinere Poren und größere SF-Lamellen. Ein weiterer Grund dafür könnte die vermehrte Ausbildung von Störungsspitzen in der konstitutionell unterkühlten Zone bei höherer SF-Konzentration sein. Diese führt zu einer vermehrten Bildung von Eiskristallen und könnte im Zusammenhang mit der erhöhten Viskosität der konzentrierteren SF-Lösungen und der damit einhergehenden langsameren Diffusion der SF-Moleküle stehen.

Die Porengröße lässt sich durch Konzentrationsänderung der SF-Lösung direkt beeinflussen, was im medizinischen Bereich sehr hilfreich ist, da die Porengröße ein ausschlaggebendes Kriterium für das Einwachsen von Zellen und Kapillaren darstellt.[140]

5.3.3 Einfluss der Mineralisation der gefrierstrukturierten Seidenfibrin-Scaffolds

Nach 3-tägigem Einlegen der manuell oder maschinell gefrierstrukturierten SF-Scaffolds in MCPA-Phosphorsäure-Lösung blieb weder die Porenstruktur der zuvor lyophilisierten noch der gefroren eingelegten SF-Scaffolds erhalten. Der saure pH-Wert der MCPA-Phosphorsäure-Lösung induzierte die Gelbildung, die mit einer Konformationsänderung von random-coil- zur β -Faltblatt-Struktur einherging. Dabei kommt es zu einer Kontraktion und dem Ausschluss von Wasser [86]. Vermutlich war damit eine Änderung der Porenmorphologie der gefrierstrukturierten SF-Scaffolds verbunden. Die gefroren eingelegten SF-Scaffolds wiesen unter den drei Schichten in **Abbildung 4-14** eine homogene unterste Schicht auf. Die mittlere und obere Schicht zeigten jeweils eine Porenstruktur, die jedoch sehr viel kleiner als die Ausgangsporenstruktur war. Offensichtlich schwimmen die gefrorenen SF-Scaffolds auf der MCPA-Phosphorsäure-Lösung. So wurden die Scaffolds ausgehend vom Boden benetzt, weshalb die effektive Benetzungszeit mit der Flüssigkeit von der Scaffold-

Unterseite bis zu deren Oberfläche abnahm. Da die Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen mit der Einlagedauer zunimmt [86], ist vermutlich die abnehmende Änderung der Porenmorphologie vom Boden zur Oberfläche der Scaffolds auf die unterschiedliche Inkubationsdauer in MCPA-Phosphorsäure-Lösung zurückzuführen. Die zuvor lyophilisierten manuell gefrierstrukturierten Scaffolds wiesen ebenfalls drei Schichten auf. Im Vergleich dazu besitzen die zuvor lyophilisierten maschinell gefrierstrukturierten SF-Scaffolds nur eine von der Unterseite bis zur Oberseite durchgehende Scaffold-Morphologie. Darüber hinaus zeigten die zuvor lyophilisierten SF-Scaffold deutlich mehr Hohlräume als die gefroren eingelegten SF-Scaffolds. Bei der Gefriertrocknung von SF-Lösung wird die Bildung von β -Faltblatt-Strukturen begünstigt, weshalb schon ein geringer Anteil zu β -Faltblatt-Strukturen umgesetzt wird [159]. Da dieser Prozess an allen Seiten des SF-Scaffolds gleich angreift, wird nach der Lyophilisation die drei Schichteneinteilung der manuellen Gefrierstrukturierung und die durchgehende Schicht der zuvor maschinellen Gefrierstrukturierung beibehalten. Darüber hinaus sind die lyophilisierten SF-Scaffolds wesentlich schlechter mit MCPA-Phosphorsäure-Lösung benetzbar als gefrorene SF-Scaffolds. Dies führt dazu, dass gefriergetrocknetes SF deutlich kürzer mit MCPA-Phosphorsäure-Lösung in Kontakt stand als eine gefrorene SF-Lösung. Folglich werden weniger β -Faltblatt-Strukturen ausgebildet und es kommt zu einer geringeren Kontraktion, woraus die vermehrten Hohlräume im SF-Scaffold resultieren.

Durch das Einlegen gefrierstrukturierter SF-Scaffolds in MCPA-Phosphorsäure-Lösung kommt es zur SF-Gelbildung, die mit einer Konformationsänderung zu β -Faltblatt-Strukturen einhergeht. Dabei wird die generierte Porenstruktur komplett zerstört oder zumindest stark verändert. Somit eignet sich die Gelierungsmethode nicht, um SF-Scaffolds mit anisotroper Porenstruktur zu generieren.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von Strukturierungsmethoden für SF-Scaffolds, die eine Mineralisation mit Calciumphosphaten, insbesondere Brushit, ermöglichen. Zudem sollte untersucht werden, ob die Herstellung einer anisotropen Porenstruktur senkrecht zur SF-Scaffold-Oberfläche möglich ist.

Im Rahmen der ersten Strukturierungsmethode wurden 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösungen eingefroren. Durch die anschließende Lagerung in 2,5 Gew.-% und 5 Gew.-% MCPA-Phosphorsäure-Lösung für 3 d und 6 d konnte die Gelbildung induziert werden. Anstelle der gewünschten Bildung von Brushit, kam es zur Ablagerung von MCPA in den entstandenen SF-Scaffolds. Die Konstrukte wiesen eine definierte, verbundene Porenstruktur auf, die von mineralischen MCPA-Ablagerungen umgeben war. Allerdings traten diese Präzipitate erst nach Trocknung der Scaffolds auf. Mit zunehmender SF-Konzentration nahm sowohl die Porenanzahl als auch Porengröße, aber auch die eingelagerte MCPA-Menge ab. Des Weiteren hatte die SF-Konzentration großen Einfluss auf die Druck- und Zugfestigkeiten der MCPA-SF-Scaffolds. Mit Steigerung der SF-Konzentration von 4 % auf 8 % kam es zu einer Zunahme der Druckfestigkeit von 46,8 kPa auf 677,8 kPa.

Eine Erklärung für das Ausbleiben der Brushit-Präzipitation in den SF-Scaffolds könnte der zu saure pH-Wert der MCPA-Phosphorsäure-Lösung sein. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang der Charakterisierungsergebnisse anhand folgender These bezüglich der Gelierung der SF-Lösung in MCPA-Phosphorsäure erklärt werden: Die gefrorene SF-Lösung taute auf, während dessen wurde das SF von außen nach innen mit MCPA-Phosphorsäure-Lösung benetzt und löste eine Konformationsänderung von random-coil- zur β -Faltblatt-Struktur aus. Dieser Vorgang ging mit einer Kontraktion und dem Ausschluss von Wasser einher. Das gelierte SF-Scaffold absorbierte abhängig von seiner Porosität einen Teil der MCPA-Phosphorsäure-Lösung. Nach Trocknung präzipitierte MCPA in den SF-Scaffolds. Die Ergebnisse der Einflussfaktoren SF-Konzentration, MCPA-Menge und Einlagedauer untermauern diese Theorie.

Die zweite Strukturierungsmethode begann mit der Herstellung einer β -TCP-SF-Suspension. Diese wurde gefroren oder gefriergetrocknet in 20 % Phosphorsäure für 3 h oder in verschiedenen Intervallschritten eingelegt. Währenddessen kam es zu einer Konformationsänderung des SFs und Umsetzung von β -TCP zu Brushit. Die Scaffold-Morphologie wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Dabei wurde eine deutliche Brushit-Zunahme von der Oberseite zur Unterseite festgestellt, was auf eine Sedimentation von β -TCP in der SF-Lösung zurückgeführt wurde. Mittels XRD-Analyse wurde der Einfluss der Einlagemethode und des Ausgangszustands der β -TCP-SF-Lösung untersucht. Dabei erzielte die Methode mit gefrorener β -TCP-SF-Lösung die in Intervall-Schritten eingelegt wurde das gewünschte Ergebnis.

Am Ende dieser Arbeit wurden 2 %, 4 % und 8 % SF-Lösungen manuell sowie maschinell gefrierstrukturiert. Bei beiden Verfahren ließen sich anisotrope Porenstrukturen generieren. Die manuell gefrierstrukturierten SF-Lösungen wiesen drei Bereiche mit unterschiedlicher Morphologie auf, wobei die maschinell strukturierten Proben durchgängige Poren mit senkrechter Ausrichtung zur SF-Scaffold-Oberfläche aufwiesen. Diese Struktur wurde nach anfänglich zu geringem und während der manuellen Gefrierstrukturierung nicht konstanten Temperaturgradienten erhalten. Außerdem konnte eine Abnahme des Porendurchmessers mit steigender SF-Konzentration mittels REM-Aufnahmen analysiert werden. Im Anschluss wurde eine Gelierung der gefrierstrukturierten SF-Lösungen in MCPA-Phosphorsäure-Lösung durchgeführt, was zu einer Zerstörung der anisotropen Porenstruktur führte.

Die gerichtete Erstarrung von SF-Lösungen eröffnet neue Möglichkeiten im Bereich Geweberegeneration mittels SF-basierten Biomaterialien. So ist es möglich, hierarchische Strukturen von menschlichem Gewebe zu imitieren. Um die guten Eigenschaften des SFs auch in gefrierstrukturierten SF-Scaffolds gewinnbringend einzusetzen, ist es zwingend notwendig, eine Gelierungsmethode zu entwerfen, die den Erhalt der anisotropen Porenstruktur ermöglicht. Des Weiteren sollten *in vitro* Tests durchgeführt werden, um die Adhäsion von Zellen in SF-Scaffolds mit anisotroper Porenstruktur bewerten zu können.

Für die Zukunft stellen Brushit-SF-Scaffolds einen vielversprechenden Ansatz für den Einsatz im Bereich Knochenregeneration dar. Die Kombination der guten mechanischen

Eigenschaften sowie der langsamen Degradation von SF mit der Bioaktivität und Osteokonduktivität von Brushit erfüllt genau die gewünschten Anforderungen. Jedoch muss ein Verfahren entwickelt werden, das eine homogene Brushit-Distribution ermöglicht. Der nächste Forschungsschritt ist die Integration der anisotropen Porenstruktur in Brushit-SF-Scaffolds..

7 Literaturverzeichnis

- [1] L.G. Griffith, M.A. Swartz, Capturing complex 3D tissue physiology in vitro, *Nature reviews Molecular cell biology* 7(3) (2006) 211-225.
- [2] N.T. Elliott, F. Yuan, A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies, *Journal of pharmaceutical sciences* 100(1) (2011) 59-74.
- [3] R. Langer, J.P. Vacanti, May 14, 1993.", *Tissue Engineering.*" *Science* 260(5110) 920-926.
- [4] Y.-G. Yang, M. Sykes, Xenotransplantation: current status and a perspective on the future, *Nature reviews. Immunology* 7(7) (2007) 519.
- [5] B. Seal, T. Otero, A. Panitch, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 34(4) (2001) 147-230.
- [6] M. Farokhi, F. Mottaghitalab, M.A. Shokrgozar, K.-L. Ou, C. Mao, H. Hosseinkhani, Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering, *Journal of Controlled Release* 225 (2016) 152-169.
- [7] B. Kundu, S.C. Kundu, Osteogenesis of human stem cells in silk biomaterial for regenerative therapy, *Progress in Polymer Science* 35(9) (2010) 1116-1127.
- [8] A.R. Costa-Pinto, R.L. Reis, N.M. Neves, Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 17(5) (2011) 331-347.
- [9] F.G. Omenetto, D.L. Kaplan, New Opportunities for an Ancient Material, *Science (New York, N.Y.)* 329(5991) (2010) 528-531.
- [10] B. Kundu, R. Rajkhowa, S.C. Kundu, X. Wang, Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(4) (2013) 457-470.
- [11] P. Bhattacharjee, B. Kundu, D. Naskar, H.-W. Kim, T.K. Maiti, D. Bhattacharya, S.C. Kundu, Silk scaffolds in bone tissue engineering: an overview, *Acta Biomaterialia* (2017).
- [12] G.M. Nogueira, C.G. Aimoli, R.F. Weska, L.S. Nascimento, M.M. Beppu, In vitro calcification of silk fibroin hydrogel, *Key Engineering Materials, Trans Tech Publ* (2008) pp. 503-506.
- [13] B.R. Constantz, B.M. Barr, I.C. Ison, M.T. Fulmer, J. Baker, L. McKinney, S.B. Goodman, S. Gunasekaran, D.C. Delaney, J. Ross, Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 43(4) (1998) 451-461.
- [14] E. Munting, A. Mirtchi, J. Lemaitre, Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 4(3) (1993) 337-344.
- [15] F. Tamimi, B. Kumarasami, C. Doillon, U. Gbureck, D. Le Nihouannen, E.L. Cabarcos, J.E. Barralet, Brushite–collagen composites for bone regeneration, *Acta biomaterialia* 4(5) (2008) 1315-1321.
- [16] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Medical engineering & physics* 20(2) (1998) 92-102.
- [17] S. Deville, E. Saiz, R.K. Nalla, A.P. Tomsia, Freezing as a path to build complex composites, *Science* 311(5760) (2006) 515-518.
- [18] K. Stuckensen, Fabrication of hierarchical cell carrier matrices for tissue regeneration by directional solidification, PhD thesis (2016).

- [19] B. Kundu, N.E. Kurland, V.K. Yadavalli, S.C. Kundu, Isolation and processing of silk proteins for biomedical applications, *International journal of biological macromolecules* 70 (2014) 70-77.
- [20] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nature protocols* 6(10) (2011).
- [21] O. Zethner, *Naturprodukt Seide*, Arena (1982).
- [22] T.D. Sutherland, J.H. Young, S. Weisman, C.Y. Hayashi, D.J. Merritt, Insect silk: one name, many materials, *Annual review of entomology* 55 (2010) 171-188.
- [23] C.L. Craig, C. Riekel, Comparative architecture of silks, fibrous proteins and their encoding genes in insects and spiders, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 133(4) (2002) 493-507.
- [24] C. Fu, Z. Shao, V. Fritz, Animal silks: their structures, properties and artificial production, *Chemical Communications* (43) (2009) 6515-6529.
- [25] C.L. Craig, M. Hsu, D. Kaplan, N. Pierce, A comparison of the composition of silk proteins produced by spiders and insects, *International Journal of Biological Macromolecules* 24(2) (1999) 109-118.
- [26] S. Kurosaki, H. Otsuka, M. Kunitomo, M. Koyama, R. Pawankar, K. Matumoto, Fibroin allergy IgE mediated hypersensitivity to silk suture materials, *Journal of Nippon Medical School* 66(1) (1999) 41-44.
- [27] R. Lewis, Unraveling the Weave of Spider Silk, *BioScience* 46(9) (1996) 636-638.
- [28] P. Mazzei, <https://www.vinz-naturtex.ch/seide/gewinnung/>. (Accessed 12.07.2017).
- [29] N.A. Ayoub, J.E. Garb, R.M. Tinghitella, M.A. Collin, C.Y. Hayashi, Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes, *PloS one* 2(6) (2007) e514.
- [30] R. Rajkhowa, V. Gupta, V. Kothari, Tensile stress-strain and recovery behavior of Indian silk fibers and their structural dependence, *Journal of applied polymer science* 77(11) (2000) 2418-2429.
- [31] K. Shimura, A. Kikuchi, K. Ohtomo, Y. KATAGATA, A. Hyodo, Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland, *The Journal of Biochemistry* 80(4) (1976) 693-702.
- [32] K. Tanaka, S. Inoue, S. Mizuno, Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the HL complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*, *Insect biochemistry and molecular biology* 29(3) (1999) 269-276.
- [33] S. Inoue, K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, S. Mizuno, Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6: 1 molar ratio, *Journal of Biological Chemistry* 275(51) (2000) 40517-40528.
- [34] F. Sehnal, M. Žurovec, Construction of silk fiber core in Lepidoptera, *Biomacromolecules* 5(3) (2004) 666-674.
- [35] S.-i. Inoue, H. Tsuda, T. Tanaka, M. Kobayashi, Y. Magoshi, J. Magoshi, Nanostructure of Natural Fibrous Protein: In Vitro Nanofabric Formation of *Samia cynthia ricini* Wild Silk Fibroin by Self-Assembling, *Nano Letters* 3(10) (2003) 1329-1332.
- [36] C.Z. Zhou, F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z.G. Li, J. Janin, Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 44(2) (2001) 119-122.

- [37] D. Huemmerich, U. Slotta, T. Scheibel, Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins, *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 82(2) (2006) 219-222.
- [38] C.Y. Hayashi, N.H. Shipley, R.V. Lewis, Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins, *International Journal of Biological Macromolecules* 24(2) (1999) 271-275.
- [39] S. Ketten, Z. Xu, B. Ihle, M.J. Buehler, Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of [beta]-sheet crystals in silk, *Nature materials* 9(4) (2010) 359.
- [40] J. Gosline, P. Guerette, C. Ortlepp, K. Savage, The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function, *Journal of Experimental Biology* 202(23) (1999) 3295-3303.
- [41] M. Hedhammar, A. Rising, S. Grip, A.S. Martinez, K. Nordling, C. Casals, M. Stark, J. Johansson, Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthenoops australis*: implications for fiber formation, *Biochemistry* 47(11) (2008) 3407-3417.
- [42] A. Spohner, W. Vater, S. Monajembashi, E. Unger, F. Grosse, K. Weisshart, Composition and hierarchical organisation of a spider silk, *PloS one* 2(10) (2007) e998.
- [43] F. Vollrath, Strength and structure of spiders' silks, *Reviews in Molecular Biotechnology* 74(2) (2000) 67-83.
- [44] F. Vollrath, D.P. Knight, Liquid crystalline spinning of spider silk, *Nature* 410(6828) (2001) 541.
- [45] F. Vollrath, D. Porter, Spider silk as a model biomaterial, *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 82(2) (2006) 205-212.
- [46] T. Lefèvre, M.-E. Rousseau, M. Pézolet, Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy, *Biophysical journal* 92(8) (2007) 2885-2895.
- [47] S. Frische, A. Maunsbach, F. Vollrath, Elongate cavities and skin-core structure in *Nephila* spider silk observed by electron microscopy, *Journal of Microscopy* 189(1) (1998) 64-70.
- [48] C. Vepari, D.L. Kaplan, Silk as a biomaterial, *Progress in polymer science* 32(8) (2007) 991-1007.
- [49] J. Pérez-Rigueiro, M. Elices, J. Llorca, C. Viney, Tensile properties of silkworm silk obtained by forced silking, *Journal of Applied Polymer Science* 82(8) (2001) 1928-1935.
- [50] J. Pérez-Rigueiro, M. Elices, J. Llorca, C. Viney, Effect of degumming on the tensile properties of silkworm (*Bombyx mori*) silk fiber, *Journal of Applied Polymer Science* 84(7) (2002) 1431-1437.
- [51] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, S. Hofmann, Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering, *Acta biomaterialia* 31 (2016) 1-16.
- [52] C. Jiang, X. Wang, R. Gunawidjaja, Y.H. Lin, M.K. Gupta, D.L. Kaplan, R.R. Naik, V.V. Tsukruk, Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films, *Advanced functional materials* 17(13) (2007) 2229-2237.
- [53] S.-W. Ha, A.E. Tonelli, S.M. Hudson, Structural Studies of *Bombyx mori* Silk Fibroin during Regeneration from Solutions and Wet Fiber Spinning, *Biomacromolecules* 6(3) (2005) 1722-1731.
- [54] B. Zuo, L. Dai, Z. Wu, Analysis of structure and properties of biodegradable regenerated silk fibroin fibers, *Journal of materials science* 41(11) (2006) 3357-3361.

- [55] H. Tao, D.L. Kaplan, F.G. Omenetto, Silk materials—a road to sustainable high technology, *Advanced materials* 24(21) (2012) 2824-2837.
- [56] Y. Cao, B. Wang, Biodegradation of silk biomaterials, *International journal of molecular sciences* 10(4) (2009) 1514-1524.
- [57] A.R. Padol, K. Jayakumar, N. Shridhar, H.N. Swamy, M.N. Swamy, K. Mohan, Safety evaluation of silk protein film (a novel wound healing agent) in terms of acute dermal toxicity, acute dermal irritation and skin sensitization, *Toxicology international* 18(1) (2011) 17.
- [58] N. Minoura, S.I. Aiba, Y. Gotoh, M. Tsukada, Y. Imai, Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 29(10) (1995) 1215-1221.
- [59] K. Inouye, M. Kurokawa, S. Nishikawa, M. Tsukada, Use of Bombyx mori silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells, *Journal of biochemical and biophysical methods* 37(3) (1998) 159-164.
- [60] Y. Gotoh, M. Tsukada, N. Minoura, Effect of the chemical modification of the arginyl residue in Bombyx mori silk fibroin on the attachment and growth of fibroblast cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 39(3) (1998) 351-357.
- [61] N. Du, Z. Yang, X.Y. Liu, Y. Li, H.Y. Xu, Structural Origin of the Strain-Hardening of Spider Silk, *Advanced Functional Materials* 21(4) (2011) 772-778.
- [62] T. Giesa, M. Arslan, N.M. Pugno, M.J. Buehler, Nanoconfinement of spider silk fibrils begets superior strength, extensibility, and toughness, *Nano letters* 11(11) (2011) 5038-5046.
- [63] Y. Zhang, H. Yang, H. Shao, X. Hu, Antheraea pernyi silk fiber: a potential resource for artificially biospinning spider dragline silk, *BioMed Research International* 2010 (2010).
- [64] L. Meinel, D.L. Kaplan, Silk constructs for delivery of musculoskeletal therapeutics, *Advanced drug delivery reviews* 64(12) (2012) 1111-1122.
- [65] M. Li, M. Ogiso, N. Minoura, Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets, *Biomaterials* 24(2) (2003) 357-365.
- [66] R.L. Horan, K. Antle, A.L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J.E. Moreau, V. Volloch, D.L. Kaplan, G.H. Altman, In vitro degradation of silk fibroin, *Biomaterials* 26(17) (2005) 3385-3393.
- [67] B. Liu, Y.-w. Song, L. Jin, Z.-j. Wang, D.-y. Pu, S.-q. Lin, C. Zhou, H.-j. You, Y. Ma, J.-m. Li, Silk structure and degradation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 131 (2015) 122-128.
- [68] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials* 24(3) (2003) 401-416.
- [69] Y. Hu, Q. Zhang, R. You, L. Wang, M. Li, The relationship between secondary structure and biodegradation behavior of silk fibroin scaffolds, *Advances in Materials Science and Engineering* 2012 (2012).
- [70] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in polymer science* 32(8) (2007) 762-798.
- [71] P.A. Gunatillake, R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *Eur Cell Mater* 5(1) (2003) 1-16.
- [72] G. Huang, D. Yang, C. Sun, J. Huang, K. Chen, C. Zhang, H. Chen, Q. Yao, A quicker degradation rate is yielded by a novel kind of transgenic silk fibroin consisting of shortened silk fibroin heavy chains fused with matrix metalloproteinase cleavage sites, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25(8) (2014) 1833-1842.

- [73] E.M. Pritchard, T. Valentin, D. Boison, D.L. Kaplan, Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release, *Biomaterials* 32(3) (2011) 909-918.
- [74] V. Karageorgiou, M. Tomkins, R. Fajardo, L. Meinel, B. Snyder, K. Wade, J. Chen, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78(2) (2006) 324-334.
- [75] H.K. Soong, K.R. Kenyon, Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery, *Ophthalmology* 91(5) (1984) 479-483.
- [76] T.V. Chirila, S. Suzuki, L.J. Bray, N.L. Barnett, D.G. Harkin, Evaluation of silk sericin as a biomaterial: in vitro growth of human corneal limbal epithelial cells on Bombyx mori sericin membranes, *Progress in biomaterials* 2(1) (2013) 14.
- [77] P. Aramwit, S. Kanokpanont, W. De-Eknamkul, T. Srichana, Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin, *Journal of bioscience and bioengineering* 107(5) (2009) 556-561.
- [78] N. Bhat, S. Ahirrao, Investigation of the structure of silk film regenerated with lithium thiocyanate solution, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 21(5) (1983) 1273-1280.
- [79] R. Ahmad, A. Kamra, S.E. Hasnain, Fibroin silk proteins from the nonmulberry silkworm *Philosamia ricini* are biochemically and immunochemically distinct from those of the mulberry silkworm *Bombyx mori*, *DNA and cell biology* 23(3) (2004) 149-154.
- [80] C. Acharya, B. Hinz, S.C. Kundu, The effect of lactose-conjugated silk biomaterials on the development of fibrogenic fibroblasts, *Biomaterials* 29(35) (2008) 4665-4675.
- [81] D.M. Phillips, L.F. Drummy, R.R. Naik, C. Hugh, D.M. Fox, P.C. Trulove, R.A. Mantz, Regenerated silk fiber wet spinning from an ionic liquid solution, *Journal of Materials Chemistry* 15(39) (2005) 4206-4208.
- [82] N. Goujon, X. Wang, R. Rajkova, N. Byrne, Regenerated silk fibroin using protic ionic liquids solvents: towards an all-ionic-liquid process for producing silk with tunable properties, *Chemical Communications* 48(9) (2012) 1278-1280.
- [83] B.B. Mandal, S. Kundu, A novel method for dissolution and stabilization of non-mulberry silk gland protein fibroin using anionic surfactant sodium dodecyl sulfate, *Biotechnology and bioengineering* 99(6) (2008) 1482-1489.
- [84] T.T. Le, Y. Park, T.V. Chirila, P.J. Halley, A.K. Whittaker, The behavior of aged regenerated *Bombyx mori* silk fibroin solutions studied by ^1H NMR and rheology, *Biomaterials* 29(32) (2008) 4268-4274.
- [85] A. Fournier, Quantitative data on the *Bombyx mori* L. silkworm: a review, *Biochimie* 61(2) (1979) 283-320.
- [86] A. Matsumoto, J. Chen, A.L. Collette, U.-J. Kim, G.H. Altman, P. Cebe, D.L. Kaplan, Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions, *The Journal of Physical Chemistry B* 110(43) (2006) 21630-21638.
- [87] Z.A. Haider, M. Arai, K. Hirabayashi, Mechanism of the gelation of fibroin solution, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 57(11) (1993) 1910-1912.
- [88] S. Nagarkar, A. Patil, A. Lele, S. Bhat, J. Bellare, R. Mashelkar, Some mechanistic insights into the gelation of regenerated silk fibroin sol, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48(17) (2009) 8014-8023.

- [89] N. Guziewicz, A. Best, B. Perez-Ramirez, D.L. Kaplan, Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies, *Biomaterials* 32(10) (2011) 2642-2650.
- [90] T. Yucel, P. Cebe, D.L. Kaplan, Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels, *Biophysical journal* 97(7) (2009) 2044-2050.
- [91] X. Wang, J.A. Kluge, G.G. Leisk, D.L. Kaplan, Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation, *Biomaterials* 29(8) (2008) 1054-1064.
- [92] D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials* 21(24) (2000) 2529-2543.
- [93] I.C. Um, H. Kweon, Y.H. Park, S. Hudson, Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid, *International Journal of Biological Macromolecules* 29(2) (2001) 91-97.
- [94] M.K. Gupta, S.K. Khokhar, D.M. Phillips, L.A. Sowards, L.F. Drummy, M.P. Kadakia, R.R. Naik, Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth, *Langmuir* 23(3) (2007) 1315-1319.
- [95] A. Higuchi, M. Yoshida, T. Ohno, T. Asakura, M. Hara, Production of interferon- β in a culture of fibroblast cells on some polymeric films, *Cytotechnology* 34(1) (2000) 165-173.
- [96] Q. Lu, X. Hu, X. Wang, J.A. Kluge, S. Lu, P. Cebe, D.L. Kaplan, Water-insoluble silk films with silk I structure, *Acta biomaterialia* 6(4) (2010) 1380-1387.
- [97] B.D. Lawrence, J.K. Marchant, M.A. Pindrus, F.G. Omenetto, D.L. Kaplan, Silk film biomaterials for cornea tissue engineering, *Biomaterials* 30(7) (2009) 1299-1308.
- [98] U.-J. Kim, J. Park, C. Li, H.-J. Jin, R. Valluzzi, D.L. Kaplan, Structure and properties of silk hydrogels, *Biomacromolecules* 5(3) (2004) 786-792.
- [99] Y. Wang, D.D. Rudym, A. Walsh, L. Abrahamsen, H.-J. Kim, H.S. Kim, C. Kirker-Head, D.L. Kaplan, In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds, *Biomaterials* 29(24) (2008) 3415-3428.
- [100] X. Chen, W. Li, W. Zhong, Y. Lu, T. Yu, pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network, *Journal of Applied Polymer Science* 65(11) (1997) 2257-2262.
- [101] A. Motta, C. Migliaresi, F. Faccioni, P. Torricelli, M. Fini, R. Giardino, Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies, *Journal of biomaterials science, Polymer edition* 15(7) (2004) 851-864.
- [102] P.H.G. Chao, S. Yodmuang, X. Wang, L. Sun, D.L. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic, Silk hydrogel for cartilage tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 95(1) (2010) 84-90.
- [103] W. Zhang, X. Wang, S. Wang, J. Zhao, L. Xu, C. Zhu, D. Zeng, J. Chen, Z. Zhang, D.L. Kaplan, The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF 165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor, *Biomaterials* 32(35) (2011) 9415-9424.
- [104] N. Bhardwaj, S. Chakraborty, S.C. Kundu, Freeze-gelled silk fibroin protein scaffolds for potential applications in soft tissue engineering, *International journal of biological macromolecules* 49(3) (2011) 260-267.
- [105] F. Ak, Z. Oztoprak, I. Karakutuk, O. Okay, Macroporous silk fibroin cryogels, *Biomacromolecules* 14(3) (2013) 719-727.
- [106] Y. Tamada, New process to form a silk fibroin porous 3-D structure, *Biomacromolecules* 6(6) (2005) 3100-3106.

- [107] R. Nazarov, H.-J. Jin, D.L. Kaplan, Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin, *Biomacromolecules* 5(3) (2004) 718-726.
- [108] M. Tsukada, G. Freddi, N. Minoura, G. Allara, Preparation and application of porous silk fibroin materials, *Journal of Applied Polymer Science* 54(4) (1994) 507-514.
- [109] L. Meinel, R. Fajardo, S. Hofmann, R. Langer, J. Chen, B. Snyder, G. Vunjak-Novakovic, D. Kaplan, Silk implants for the healing of critical size bone defects, *Bone* 37(5) (2005) 688-698.
- [110] A. Hokugo, T. Takamoto, Y. Tabata, Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber, *Biomaterials* 27(1) (2006) 61-67.
- [111] V.V. Seregin, J.L. Coffey, Biomaterialization of calcium disilicide in porous polycaprolactone scaffolds, *Biomaterials* 27(27) (2006) 4745-4754.
- [112] M. Wang, Developing bioactive composite materials for tissue replacement, *Biomaterials* 24(13) (2003) 2133-2151.
- [113] S. Kapoor, S.C. Kundu, Silk protein-based hydrogels: promising advanced materials for biomedical applications, *Acta biomaterialia* 31 (2016) 17-32.
- [114] B.B. Mandal, A. Grinberg, E.S. Gil, B. Panilaitis, D.L. Kaplan, High-strength silk protein scaffolds for bone repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(20) (2012) 7699-7704.
- [115] M. Ribeiro, M.A. de Moraes, M.M. Beppu, M.P. Garcia, M.H. Fernandes, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering, *European Polymer Journal* 67 (2015) 66-77.
- [116] S. Behera, D. Naskar, S. Sapru, P. Bhattacharjee, T. Dey, A.K. Ghosh, M. Mandal, S.C. Kundu, Hydroxyapatite reinforced inherent RGD containing silk fibroin composite scaffolds: Promising platform for bone tissue engineering, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2017).
- [117] L.G. Griffith, G. Naughton, Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities, *Science* 295(5557) (2002) 1009-1014.
- [118] K.M.L.E. Hellwig, *Zahnärztliche Prothetik*, Elsevier Urban & Fischer, München (2005).
- [119] M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury* 31 (2000) D37-D47.
- [120] S.V. Dorozhkin, M. Epple, Biological and medical significance of calcium phosphates, *Angewandte Chemie International Edition* 41(17) (2002) 3130-3146.
- [121] B.R. Constantz, I.C. Ison, M.T. Fulmer, R.D. Poser, S.T. Smith, M. Van Wagoner, J. Ross, S.A. Goldstein, J.B. Jupiter, D.I. Rosenthal, Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone, *Science New York-Washington* (1995) 1796-1796.
- [122] M. Neumann, *Synthese und Charakterisierung von Calciumcarbonat-Phasen und Calciumphosphat-basierter Knochenersatzmaterialien*, Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie» Anorganische Chemie (2009).
- [123] M. Bohner, P. Van Landuyt, H. Merkle, J. Lemaitre, Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8(11) (1997) 675-681.
- [124] M. Bohner, H. Merkle, J. Lemai, In vitro aging of a calcium phosphate cement, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 11(3) (2000) 155-162.

- [125] G. Lenart, G. Bidló, J. Pinter, Some basic problems in the examination of the calcium hydrogen phosphates of bone, *Clinical orthopaedics and related research* 83 (1972) 263-272.
- [126] W. Linhart, D. Briem, A. Peters, W. Lehmann, J. Windolf, J. Rueger, Resorbierbare Kalziumphosphatzemente, *Trauma und Berufskrankheit* 6(4) (2004) 277-284.
- [127] F. Driessens, M. Boltong, O. Bermudez, J. Planell, Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 4(5) (1993) 503-508.
- [128] W.C. Chen, J.H.C. Lin, C.P. Ju, Transmission electron microscopic study on setting mechanism of tetracalcium phosphate/dicalcium phosphate anhydrous-based calcium phosphate cement, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 64(4) (2003) 664-671.
- [129] M. Kouassi, P. Michailesco, A. Lacoste-Armynot, P. Boudeville, Antibacterial effect of a hydraulic calcium phosphate cement for dental applications, *Journal of endodontics* 29(2) (2003) 100-103.
- [130] A.A. Mirtchi, J. Lemaitre, N. Terao, Calcium phosphate cements: Study of the β -tricalcium phosphate—monocalcium phosphate system, *Biomaterials* 10(7) (1989) 475-480.
- [131] M. Bohner, U. Gbureck, Thermal reactions of brushite cements, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 84(2) (2008) 375-385.
- [132] U. Gbureck, S. Dembski, R. Thull, J.E. Barralet, Factors influencing calcium phosphate cement shelf-life, *Biomaterials* 26(17) (2005) 3691-3697.
- [133] P. Van Landuyt, B. Peter, L. Beluze, J. Lemaitre, Reinforcement of osteosynthesis screws with brushite cement, *Bone* 25(2) (1999) 95S-98S.
- [134] M. Bohner, Reactivity of calcium phosphate cements, *Journal of Materials Chemistry* 17(38) (2007) 3980-3986.
- [135] K. Ohura, M. Bohner, P. Hardouin, J. Lemaître, G. Pasquier, B. Flautre, Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: An in vivo study, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 30(2) (1996) 193-200.
- [136] S. Rousseau, J. Lemaitre, Long-term aging of brushite cements in physiological conditions: an in vitro study, *European Cells and Materials* 5(2) (2003) 83.
- [137] P. Frayssinet, L. Gineste, P. Conte, J. Fages, N. Rouquet, Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement, *Biomaterials* 19(11-12) (1998) 971-977.
- [138] L.M. Grover, U. Gbureck, A.J. Wright, M. Tremayne, J.E. Barralet, Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro, *Biomaterials* 27(10) (2006) 2178-2185.
- [139] M. Schamel, J.E. Barralet, M. Gelinsky, J. Groll, U. Gbureck, Intrinsic 3D Prestressing: A New Route for Increasing Strength and Improving Toughness of Hybrid Inorganic Biocements, *Advanced Materials* (2017).
- [140] H. Schoof, Verfahren zur Herstellung gefriergetrockneter Kollagenschwämme mit definierter Porenstruktur, *Bibliothek der RWTH Aachen* (2000).
- [141] W. Kurz, D. Fisher, *Fundamentals of solidification*, Trans Tech Publications, Switzerland (1986).
- [142] S.H. Davis, *Theory of solidification*, Cambridge University Press (2001).
- [143] B. Nunner, *Gerichtete Erstarrung wässriger Lösungen und Zellsuspensionen*, Mainz (1993).

-
- [144] J.W. Rutter, B. Chalmers, A prismatic substructure formed during solidification of metals, *Canadian Journal of Physics* 31(1) (1953) 15-39.
- [145] W.W. Mullins, R. Sekerka, Stability of a planar interface during solidification of a dilute binary alloy, *Journal of applied physics* 35(2) (1964) 444-451.
- [146] S.R. Coriell, G.B. McFadden, R.F. Sekerka, Cellular growth during directional solidification, *Annual Review of Materials Science* 15(1) (1985) 119-145.
- [147] S.S. Peppin, M.G. Worster, J. Wettlaufer, Morphological instability in freezing colloidal suspensions, *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, The Royal Society (2007), pp. 723-733.
- [148] J. Hunt, Steady state columnar and equiaxed growth of dendrites and eutectic, *Materials science and engineering* 65(1) (1984) 75-83.
- [149] Z. Shao, F. Vollrath, The effect of solvents on the contraction and mechanical properties of spider silk, *Polymer* 40(7) (1999) 1799-1806.
- [150] F. Liska, Vergleich der mechanischen Eigenschaften von spongiösem Knochen verschiedener Spezies mit künstlichem Knochen (2012).
- [151] M.D. Gelinsky, G.D. Hoffmann, U. Köckritz, P.P.D. Offermann, W.P.D. Pompe, G.D. Schmack, H.P.D. Worch, Trägermaterial für die Gewebe- und Zellkultur, zur Herstellung von Implantaten oder Implantatmaterialien, und ein mit dem Trägermaterial hergestelltes Implantat, Google Patents (2004).
- [152] T. Darmstadt, *Praktikum Massivwerkstoffe* (2017).
- [153] A.E. Terry, D.P. Knight, D. Porter, F. Vollrath, pH Induced Changes in the Rheology of Silk Fibroin Solution from the Middle Division of *Bombyx mori* Silkworm, *Biomacromolecules* 5(3) (2004) 768-772.
- [154] A. Muthumanickam, E. Elankavi, R. Gayathri, S.K. Sampathkumar, G. Vijayakumar, K. Muthukumar, S. Subramanian, Tensile and in-vitro degradation study of electro spun fibrous mat produced from eri silk fibroin, *International Journal of Materials Research* 101(12) (2010) 1548-1553.
- [155] M. Andiappan, T. Kumari, S. Sundaramoorthy, G. Meiyazhagan, P. Manoharan, G. Venkataraman, Comparison of eri and tasar silk fibroin scaffolds for biomedical applications, *Progress in biomaterials* 5(2) (2016) 81-91.
- [156] A.F. Schilling, W. Linhart, S. Filke, M. Gebauer, T. Schinke, J.M. Rueger, M. Amling, Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts, *Biomaterials* 25(18) (2004) 3963-3972.
- [157] L.C. Chow, M. Markovic, S. Takagi, A dual constant-composition titration system as an in vitro resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 65(2) (2003) 245-251.
- [158] B. Flautre, C. Maynou, J. Lemaitre, P. Van Landuyt, P. Hardouin, Bone colonization of β -TCP granules incorporated in brushite cements, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 63(4) (2002) 413-417.
- [159] M. Li, S. Lu, Z. Wu, H. Yan, J. Mo, L. Wang, Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin, *Journal of applied polymer science* 79(12) (2001) 2185-2191.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Michaela Rödel für die hervorragende Betreuung während dem experimentellen Teil als auch der folgenden Niederschrift. Durch ihre kompetenten Ratschläge, konstruktive Kritik und ihre ständige Motivation trug sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Uwe Gbureck für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll danke ich für die Möglichkeit der Promotion an seinem Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde.

Danke an alle FMZ-Mitarbeiter für die Hilfe bei der Versuchsdurchführung und Ergebnisauswertung sowie das nette Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Isabell Biermann für ihre geduldige Einweisung in die Prüfmaschinen und hilfsbereite Art bei Problemen jeglicher Form.

Abschließend möchte ich meinen ganz besonderen Dank an meine Familie und Freunde richten. Vor allem danke ich meinen Eltern Doris und Josef Baumann, meinem Bruder Markus Baumann, Jan-Eric Wurst und Rebekka Moser. Sie hatten für alle Probleme ein offenes Ohr und gaben mir durch ihre Ratschläge oft einen neuen Blickpunkt auf die Dinge.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Katrin Baumann

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Studium:

2017: Promotion in der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin der Universität Würzburg

2016: Approbation zur Zahnärztin
Zahnärztliches Staatsexamen

2011-2016: Studium der Zahnmedizin, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

Schulbildung:

2011: Allg. Hochschulreife

2002-2011: Heimschule St. Landolin, Ettenheim

1998-2002: August-Ruf-Bildungszentrum, Ettenheim

Würzburg, den 26. Oktober 2017

Katrin Baumann