

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg
Leiter: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Gefrierstrukturierung von Biopolymer-Keramik-Kompositen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Julia Gruber
aus Mödling

Würzburg, September 2021

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

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2022

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	4
2.1 Alginat	4
2.1.1 Struktur	4
2.1.2 Hydrogel	5
2.2 Kollagen	5
2.3 Calciumphosphate und Bruschit	6
2.3.1 Calciumphosphate	6
2.3.2 Bruschit	8
2.4 Knochen	8
2.5 Osteochondrales Gewebe	9
2.6 Gefrierstrukturierung	12
2.7 Nachahmung von osteochondralem Gewebe durch Gefrierstrukturierung ..	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Herstellung von Bruschit	19
3.2 Herstellung der Alginat-Lösungen sowie der Alginat-Bruschit-Schlicker	20
3.3 Extraktion von Typ II Kollagen bovinen Ursprungs	21
3.4 Herstellung der Kollagen-Lösungen sowie der Kollagen-Bruschit-Schlicker...	24
3.5 Gefrierstrukturierung mit dem „Adjustable Cryostructuring Device“	24
3.5.1 Aufbau der Gefrierstrukturierungsanlage	24
3.5.2 Allgemeines Vorgehen bei der Gefrierstrukturierung	27
3.5.3 Gefrierstrukturierung mit Teflonkeilen	28
3.5.4 Gefrierstrukturierung zweischichtiger Alginat-Bruschit-Systeme	29
3.5.5 Gefrierstrukturierung zweischichtiger Kollagen-Bruschit-Systeme	30
3.6 Auswertung der Temperaturlaufzeichnung	31
3.7 Mikroskopie	34
3.8 Zugversuch	35
3.9 Untersuchung der bevorzugten Orientierung der Bruschitkristalle	37
4 Ergebnisse	38
4.1 Kühl- und Erstarrungsraten	38
4.2 Probenmorphologie	40
4.2.1 Bidirektionale Gefrierstrukturierung von Alginat 2 %-Proben	40
4.2.2 Alginat-Bruschit-Schichtsysteme	43
4.2.3 Kollagen-Bruschit-Schichtsysteme	47

4.3	Mechanische Eigenschaften der Biopolymer-Keramik-Komposite.....	49
4.4	Orientierung der Bruschitkristalle innerhalb der Lamellen.....	52
5	Diskussion	56
5.1	Bidirektionale Gefrierstrukturierung	56
5.2	Biopolymer-Keramik-Komposite	59
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis	69
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Veröffentlichungen	
	Anhang	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Chemische Struktur von Alginat.....	5
Abbildung 2:	Löslichkeitskurven verschiedener Calciumphosphate.....	7
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des zonalen Aufbaus von osteochondralem Gewebe.	10
Abbildung 4:	Stoffkonzentrationsverlauf vor einer planaren Eisfront bei der gerichteten Erstarrung.....	14
Abbildung 5:	Konstitutionelle Unterkühlung vor einer planaren Eisfront.	14
Abbildung 6:	Bidirektionale Gefrierstrukturierung.....	16
Abbildung 7:	Stereomikroskopische Oberflächenaufnahme einer gefrierstrukturierten, gefriergetrockneten Probe mit mehreren Domänen in der horizontalen Ebene.....	17
Abbildung 8:	Gewinnung von hyalinen Knorpelsplittern.....	22
Abbildung 9:	Gefrierstrukturierungsanlage „ACD“.....	25
Abbildung 10:	Prinzip der Gefrierstrukturierungsanlage.....	27
Abbildung 11:	Petrischale mit Silikonform und eingesetztem Teflonkeil.	29
Abbildung 12:	Aufbau des zweischichtigen Alginat-Bruscht-Systems.....	30
Abbildung 13:	Exemplarischer aufgezeichneter Temperaturverlauf während der Gefrierstrukturierung einer Probe.....	31
Abbildung 14:	Aufbau des Zugversuchs.....	36
Abbildung 15:	Kühlrate in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten.....	38
Abbildung 16:	Erstarrungsrate in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten.	39
Abbildung 17:	Exemplarische Stereomikroskopaufnahmen der Probenoberfläche unter Verwendung von Teflonkeilen in Abhängigkeit des verwendeten externen Temperaturgradienten.	41
Abbildung 18:	REM-Aufnahmen des Probenquerschnitts gefrierstrukturierter Proben zur Bestimmung der Porenorientierung in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten.....	42
Abbildung 19:	Porendurchmesser in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten.....	43
Abbildung 20:	REM-Aufnahmen zweischichtiger Alginat (2 %)-Bruscht-Systeme mit verschiedenen PLRs.	44
Abbildung 21:	REM-Aufnahmen zweischichtiger Alginat (4 %)-Bruscht-Systeme mit verschiedenen PLRs.	45
Abbildung 22:	Exemplarische REM-Aufnahme einer Probe ohne Verbund der oberen und unteren Schicht.	47
Abbildung 23:	REM-Aufnahmen zweischichtiger Kollagen (4 %)-Bruscht-Systeme mit verschiedenen PLRs.	48
Abbildung 24:	Exemplarische Spannungs-Dehnungs-Diagramme von Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruscht-Systemen.	49

Abbildung 25:	Zugfestigkeiten in Abhängigkeit des PLR der Alginat (2 % bzw. 4 %)- Bruschit-Systeme.	50
Abbildung 26:	Zugfestigkeiten in Abhängigkeit der Alginatkonzentration der Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturgradienten.....	51
Abbildung 27:	Zugfestigkeit in Abhängigkeit des PLR der Alginat (4 %)- und Kollagen (4 %)-Bruschit-Systeme.	52
Abbildung 28:	Graphische Darstellung der Ergebnisse der XRD-Messungen bezüglich der bevorzugten Orientierung der Bruschitkristalle.....	55
Abbildung 29:	IR-Spektren der Kollagenproben.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Molekulargewichte des Alginats A1112-2504, Sigma Life Science..	20
Tabelle 2:	Pulver-zu-Flüssigkeitsverhältnisse der verwendeten Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschi-Schlicker.....	21
Tabelle 3:	Eingestellte Temperaturen der PEs für den jeweiligen Temperaturgradienten.....	28
Tabelle 4:	Verschiedene PLRs für die Herstellung des Kollagen (4 %)-Bruschi-Schlickers.	31
Tabelle 5:	Ergebnisse der XRD-Messungen gefrierstrukturierter Alginat (2 % bzw. 4 %) Bruschi-Schlickers zur bevorzugten Orientierung der Bruschi-Kristalle	53
Tabelle 6:	Ergebnisse der XRD-Messungen gefrierstrukturierter Alginat (4 %)-Bruschi-Schlicker zur bevorzugten Orientierung der Bruschi-Kristalle	53
Tabelle 7:	Ergebnisse der XRD-Messungen gemörserter Alginat (4 %)-Bruschi-Schlicker zur bevorzugten Orientierung der Bruschi-Kristalle.....	54

Abkürzungsverzeichnis

ACD	„Adjustable Cryostructuring Device“, Gefrierstrukturierungsanlage
ATR	„attenuated total reflexion“, abgeschwächte Totalreflexion
BMP	„bone morphogenetic protein“, Knochenmorphogenetisches Protein
BSP	„bone sialoprotein“, Knochen-Sialoprotein
CaP	Calciumphosphat
DI-Wasser	Deionisiertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	α -L-Guluronsäure
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HCL	Chlorwasserstoff
HCl-Lösung	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
IR	Infrarotspektroskopie
M	β -D-Mannuronsäure
MALS	„multiangle light scattering“, Multiwinkel-Lichtstreuung
M_n	Zahlenmittlere Molmasse
M_w	Gewichtsmittlere Molmasse
M_z	Zentrifugenmittlere Molmasse
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglycol
PE	Peltier-Element
PLR	„Powder-liquid ratio“, Pulver/Flüssigkeits-Verhältnis
REM	Rasterelektronenmikroskop, Rasterelektronenmikroskopie
T_L	Liquidustemperatur
XRD	„X-ray diffraction“, Röntgendiffraktometrie, Röntgendiffraktion
Formelzeichen	
Γ	Gibb-Thomson-Koeffizient
v	Eisfrontgeschwindigkeit
k	Verteilungskoeffizient

D	Diffusionskoeffizient
c_{fest}	Stoffkonzentration der festen Phase
$c_{flüssig}$	Stoffkonzentration der flüssigen Phase
∇T	Externer Temperaturgradient
∇T_H	Horizontaler Temperaturgradient
∇T_L	Gradient der Liquidustemperatur
∇T_v	Vertikaler Temperaturgradient
T_o	Temperatur des oberen PEs
T_u	Temperatur des unteren PEs
c_{max}	Maximalkonzentration
c_0	Ausgangskonzentration
c_x	Ortsabhängige Konzentration
x	Ort
v	Geschwindigkeit

1 Einleitung

Viele in der Natur vorkommende Strukturen sind Komposite und zeichnen sich durch exzellente mechanische Eigenschaften aus, welche jene ihrer einzelnen Grundbestandteile weitaus überragen. [1] Dies beruht auf ihrem hierarchischen, räumlich anisotropen Aufbau, welcher von der makroskopischen bis hin zur atomaren Ebene vorhanden ist. [2-5] Als Beispiele für solche natürlichen Strukturen gelten Holz, Bambus, Muscheln oder Zähne. [1, 6]

Auch osteochondrales Gewebe zeichnet sich durch solch einen Aufbau aus. [3] Kommt es zu einem Defekt des Gewebes, kann dieser schlecht regeneriert werden, da Knorpelgewebe avaskulär ist und eine geringe Zelldichte besitzt. [7] Durch derzeitige Therapiemethoden entsteht oftmals ein Reparaturknorpel mit minderen mechanischen Eigenschaften, der den Anforderungen im Gelenkbereich langfristig nicht standhalten kann. [8]

Der Forschungsbereich des Tissue Engineerings sucht daher neue Strategien zur Regeneration von osteochondralem Gewebe. Hierbei werden unter anderem der Aufbau und die Zusammensetzung natürlicher Strukturen bis ins Detail untersucht und diese anschließend imitiert. [9, 10] Eine einfache und kostengünstige Methode zur Nachahmung der anisotropen Struktur von osteochondralem Gewebe ist die Gefrierstrukturierung. [11, 12] Hierbei wird eine Lösung oder ein Schlicker entlang eines externen Temperaturgradienten gerichtet erstarrt. [13] Nach anschließender Gefriertrocknung stellt sich ein Negativ der Eiskristallstruktur dar. [13]

Am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin (FMZ) in Würzburg wurde die Gefrierstrukturierungsanlage „Adjustable Cryostructuring Device“ entwickelt. [14] Diese Anlage erzeugt anhand von zwei Peltier-Elementen einen vertikalen, externen Temperaturgradienten. [14] Das Eiskristallwachstum erfolgt in die dem Temperaturgradienten entgegengesetzte Richtung. [14] Die Feststoffe werden zwischen die wachsenden Eiskristalle gedrängt. [14] Nach der Gefriertrocknung stellt sich ein lamellares Porensystem dar, welches eine räumliche Anisotropie aufweist. [13, 14] Mit diesem Verfahren konnten bereits mehrschichtige anisotrope Zellträgermatrices mit zonenspezifischer Zusammensetzung zur Nachahmung von osteochondralem Gewebe hergestellt werden. [14, 15]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, basierend auf der zuvor erwähnten Forschung [14, 15], zweischichtige anisotrope Kollagen-Keramik-Systeme zur Nachahmung von osteochondralem Gewebe herzustellen, wobei die eine Schicht Knorpel und die andere darunterliegenden Knochen nachahmen sollte. Hierfür sollte zunächst der Prozess der Gefrierstrukturierung optimiert werden. Als Material wurde Alginat gewählt, da es kostengünstig ist und aufgrund der einfachen Handhabung optimal für eine systematische Untersuchung geeignet erschien. [16] Die hiermit gefrierstrukturierten Proben waren zwar in der vertikalen Ebene geordnet, hatten jedoch in der horizontalen Ebene mehrere Domänen unterschiedlicher Ausrichtung. Dieser Effekt kann mithilfe der bidirektionalen Gefrierstrukturierung, bei der durch die Verwendung eines Teflonkeils ein zweiter, horizontaler Temperaturgradient erzeugt wird, umgangen werden, wodurch die hergestellten Systeme eine noch höhere Ordnung erhalten würden. [17] Somit könnte der Aufbau natürlicher Strukturen mit einzigartigen mechanischen Eigenschaften und hoch strukturiertem Aufbau, wie beispielsweise Perlmutter, nachgeahmt werden. Da osteochondrales Gewebe hohen Belastungen im Gelenkbereich ausgesetzt ist, sollten die mechanischen Eigenschaften durch bidirektionale Gefrierstrukturierung optimiert werden. [18] Somit wurde in Anlehnung an die von Bai *et al.* durchgeführten Studien [17] im ersten Teil der Arbeit systematisch untersucht, ob die Domänenanzahl durch die Verwendung eines Teflonkeils verringert werden kann. Dabei wurden die Steigung des Teflonkeils sowie der Temperaturgradient variiert. Die Auswirkungen der genannten Parameter auf die Morphologie der gefrierstrukturierten Proben wurden durch die Untersuchung der Porenorientierung sowie des Porendurchmessers beurteilt.

In Anlehnung an die von Stuckensen *et al.* [15] durchgeführten Versuche wurden anschließend zweischichtige Systeme hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden hierbei systematisch Parameter variiert und deren Auswirkung auf die Morphologie, sowie auf die Qualität des Verbundes an der Grenzfläche untersucht. Diese zweischichtigen Systeme bestanden zunächst aus dem Biopolymer Alginat und dem Calciumphosphat Brushit. Alginat diente hierbei, aufgrund der bereits genannten Eigenschaften als Modellsystem und wurde im späteren Verlauf der Arbeit durch Typ II Kollagen ersetzt, um die natürliche Zusammensetzung von osteochondralem Gewebe nachzuahmen. [19, 20] Das Calciumphosphat Brushit, welches aufgrund seiner vorwiegend schnell abbaubaren Eigenschaften vorteilhaft für eine Regeneration des Knochens erscheint [21, 22], wurde zur Nachahmung der anorganischen Phase

des Knochens gewählt. [23] Die erste, den Knochen imitierende, Schicht der Systeme bestand somit aus Alginat und Brushit. Die zweite Schicht, welche Knorpel imitieren sollte, bestand aus Alginat. Es wurden systematisch das Pulver-zu-Flüssigkeitsverhältnis des Schlickers, der Temperaturgradient und die Alginat-Konzentration variiert. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem Grenzflächenverbund zwischen den beiden Schichten. Die erste Schicht der Systeme wurde auf eine mögliche bevorzugte Orientierung der Brushitkristalle untersucht, um ein genaueres Verständnis des Aufbaus der hergestellten Proben zu erlangen.

Die durch zweischichtige Alginat-Brushit-Systeme gewonnenen Erkenntnisse wurden im Anschluss auf die Kollagen-Brushit-Systeme übertragen, um osteochondrales Gewebe nicht nur strukturell, sondern auch in der Zusammensetzung nachzuahmen. Im Fokus lag hier ebenfalls die Untersuchung der Grenzfläche der beiden Schichten.

2 Kenntnisstand

2.1 Alginat

Eines der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Biopolymere war Alginat, welches kommerziell aus der Braunalge gewonnen wird. [24] Es macht circa 40% des Trockengewichts der Pflanze aus und ist somit ein wichtiger struktureller Bestandteil. [25] Außerdem wird Alginat auch von den Bakterienarten *Pseudomonas* und *Azotobacter* produziert. [24, 26] Hier ist Alginat der Hauptbestandteil des bakteriellen Biofilms und dient als Schutz vor externen Einflüssen, wie dem Immunsystem des Wirts. [24, 26]

Alginat ist ein biokompatibles [27, 28], hydrophiles [29], nicht toxisches Material [30]. Es ist kostengünstig und einfach in der Handhabung. [16] Aufgrund dieser Eigenschaften ist der Einsatzbereich von Alginat, in Form von Hydrogelen, vielfältig. [25, 31, 32] Unter anderem wird es als Wundverband [29], irreversibles Abformmaterial in der Zahnheilkunde [16], Trägermaterial für Proteine [33], Trägermaterial für Zellen [34, 35] oder Arzneimittel [30], in der Lebensmittelindustrie [36], in Kosmetika [37] oder zur Behandlung der gastroösophagealen Refluxkrankheit [38, 39] verwendet.

2.1.1 Struktur

Alginat ist ein anionisches Polymer [40], welches aus den Monomeren, β -D-Mannuronsäure (M) und α -L-Guluronsäure (G) aufgebaut ist. [24] Diese sind 1,4-glykosidisch miteinander verknüpft. [31] Dadurch entsteht ein lineares Copolymer, welches sich entweder aus GG- bzw. MM-Blöcken, wie in Abbildung 1 dargestellt, oder sich abwechselnden MG- bzw. GM-Einheiten zusammensetzt. [30, 40] Die MM-Blöcke weisen diäquatoriale Bindungen auf, wohingegen die Monomere innerhalb der GG-Blöcke durch diaxiale Bindungen verknüpft sind. [31] Aus diesem Grund sind homopolymere GG-Blöcke steifer als MM-Blöcke. [31]

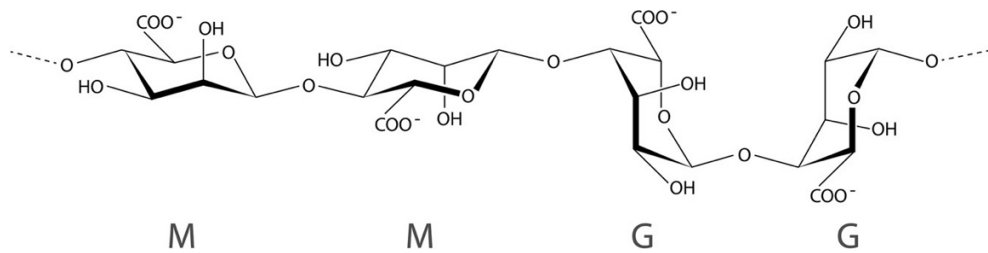


Abbildung 1: Chemische Struktur von Alginat. Dargestellt ist ein MM-Block, gefolgt von einem GG-Block. Übernommen aus [41]. Lizenziert unter Creative Commons Lizenz CC BY 3.0.

Je nachdem woraus das Alginat gewonnen wird, variiert die Länge der Blöcke sowie die Zusammensetzung aus M und G Monomeren. [41] Dies beeinflusst die physikalischen Eigenschaften des Alginats maßgeblich und somit auch die der, im Rahmen der Gefrierstrukturierung, hiermit hergestellten Systeme. [25] Zum Beispiel verringert ein hoher Anteil an M-Blöcken die Viskosität, wodurch ein Hydrogel mit hohem Alginat Anteil erzeugt werden kann. [28] Ein weiterer Faktor, mit welchem neben dem M/G-Verhältnis die Eigenschaften des Alginat-Hydrogels gesteuert werden kann, ist das Molekulargewicht von Alginat. [26] Dieses liegt zwischen 50 g/mol und 100.000 g/mol. [31]

2.1.2 Hydrogel

Eine einfache Methode, um ein Alginat-Hydrogel herzustellen ist, der Alginat-Lösung divalente Kationen beizufügen [25, 32]. Die divalenten Kationen, wie beispielsweise Calcium-Ionen, sollen als ionische Vernetzer dienen [31]. Dadurch können sich zwischen den GG-Blöcken benachbarter Polymerketten Ionen einlagern [42]. Durch die Vernetzung wird ein Gel-Netzwerk ausgebildet [42]. Dieser Vorgang wird von Grant, GT *et al.* durch das sogenannte „Eierschachtel-Modell“ beschrieben [43]. Da die Calcium-Ionen zwischen den gegenüberliegenden GG-Blöcken eingelagert werden, erinnert das Bild an eine Eierschachtel mit darin befindlichen Eiern [44].

Die ionisch vernetzten Gele lösen sich unter physiologischen Bedingungen auf, da die divalenten Ionen aufgrund der Interaktion mit monovalenten Kationen in Lösung gehen [25]. Dies hat eine mit der Zeit abnehmende Stabilität der Hydrogele zur Folge [25].

2.2 Kollagen

Ein weiteres, neben Alginat, in dieser Arbeit verwendete Biopolymer war Kollagen. Kollagen macht ein Drittel aller Proteine im menschlichen Körper aus und ist vorherrschender Bestandteil der extrazellulären Matrix. [45] Es wurden bisher 28 Isoformen beim Menschen entdeckt. [2] Kollagen ist biokompatibel und leicht biologisch abbaubar. [46]

Ein Kollagenmolekül besteht aus drei α -Ketten. [45] Diese können hetero- oder homotrimer sein. [45] Typ I Kollagen ist beispielsweise heterotrimer und verfügt über zwei identische α_1 -Ketten und eine α_2 -Ketten. [46] Jede α -Kette setzt sich aus circa 1000 Aminosäuren zusammen. [46] Diese sind in Domänen von sich wiederholenden Glycin(Gly)-X-Y-Einheiten organisiert. [47] Die X-Stelle ist häufig von Prolin, die Y-Stelle von 4-Hydroxyprolin besetzt. [45] Jede einzelne α -Kette formt sich zu einer linksgängigen Helix. [45] Alle drei α -Ketten formen dann gemeinsam eine rechtsgängige Tripel-Helix, das Tropokollagen. [45]

2.3 Calciumphosphate und Brushit

2.3.1 Calciumphosphate

Im menschlichen Körper sind Calciumphosphate (CaPs) der Hauptbestandteil der anorganischen Phase von Hartgewebe, wie Knochen und Zähnen [48, 49], wodurch in der vorliegenden Arbeit ein CaP als Bestandteil der Schicht, welche Knochen imitieren sollte, gewählt wurde. Darüber hinaus kommen CaPs auch in Sehnen [48] und pathologischen Verkalkungen, wie Urinsteinen [50], vor.

CaPs sind biokompatibel [51], bioaktiv [52] und wirken osteokonduktiv [53]. CaP-Biomaterialien sind per se nicht osteoinduktiv [54], jedoch kann eine osteoinduktive Wirkung durch eine entsprechende Geometrie sowie Makro- und Mikroporositäten im Biomaterial erzeugt werden. [53] Dadurch können sich Wachstumsfaktoren (BMPs) und Osteoprogenitor-Zellen aus dem Blut anheften. [53] Eine Osteoinduktivität kann auch erzielt werden, indem das CaP-Biomaterial als Trägermatrix von BMPs oder bioaktiven Proteinen, wie zum Beispiel Kollagen oder Knochen-Sialoprotein (BSP), eingesetzt wird. [53] Durch die genannten Methoden ist eine osteoinduktive Wirkung von CaP-Biomaterialien auch in nicht-knöchernen Geweben zu beobachten. [55]

Es gibt verschieden Arten von CaPs, die sich in ihrer Löslichkeit unterscheiden. (vgl. Abbildung 2) [48]

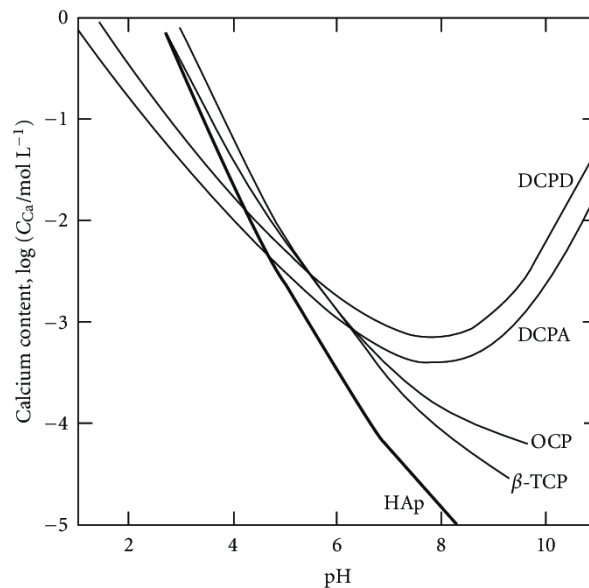


Abbildung 2: Löslichkeitskurven verschiedener Calciumphosphate. DCPA steht hierbei für Dicalciumphosphat-Anhydrat (Monetit), während DCPD für Dicalciumphosphat-Dihydrat (Bruschat) steht. HAp steht für Hydroxylapatit, β -TCP für Beta-Tricalciumphosphat und OCP steht für Octacalciumphosphat. Übernommen aus [56]. Lizenziert unter der Creative Commons Lizenz CC BY 3.0.

Unter normalen physiologischen Bedingungen sind CaPs stabil, weisen jedoch unter aziden Bedingungen, wie bei Osteoklastentätigkeit, eine deutlich höhere Löslichkeit auf. [51] Daher kommt es im menschlichen Körper mit der Zeit zum Abbau der CaP-Biomaterialien. [57]

Aufgrund ihrer Eigenschaften eignen sich CaPs als Biomaterialien zur Regeneration von Knochendefekten. [52] Hierbei werden sie als injizierbare Zemente [58-60], 3-D gedruckte Zellträgermatrices („Scaffolds“) [61-65] oder Beschichtung von metallischen Implantaten [66-68] verwendet. Sie können auch als Trägermatrix von Zellen [69], Proteinen [70], oder Medikamenten [63, 71] dienen. Da sie eine geringe Zugfestigkeit aufweisen [72], sind sie derzeit nur zur Behandlung von Knochendefekten in nicht lasttragenden Bereichen geeignet. [51, 73] CaP-Biomaterialien werden daher im medizinischen und zahnmedizinischen Bereich vor allem für Augmentationen im Bereich des Alveolarknochens [74, 75], zur Behandlung parodontaler Defekte [76], im Rahmen eines Sinus-Lifts [74], zur Behandlung von Knochendefekten nach Tumor-Operationen [53] und als Mittelohrimplantate [77] eingesetzt. Die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften, um das Einsatzgebiet zu erweitern, ist Gegenstand derzeitiger Forschung. [78-81]

2.3.2 Bruschit

Zur Nachahmung der anorganischen Phase des Knochens in der ersten Schicht der zweischichtigen Biopolymer-Keramik-Systemen wurde das CaP Bruschit gewählt. Bruschit (Dicalciumphosphat-Dihydrat, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [82]) gehört, wie Monetit (Dicalciumphosphat-Anhydrit), zu der Gruppe der Dicalciumphosphate. [83] Monetit ist die wasserfreie Form von Bruschit und kann durch Dehydratation aus Bruschit bei Temperaturen über 60 °C erzeugt werden. [83, 84] Bruschit entsteht durch Präzipitation aus einer basischen Calciumquelle, einer sauren Phosphatquelle und Wasser [83], wobei die Präzipitationsreaktion exotherm ist [85]. Bruschit gehört dem monoklinen Kristallsystem an. [82] Je nach pH-Wert und Konzentration der Lösung können die Bruschitkristalle verschiedene Morphologien aufweisen. [82]

Der Abbau von Bruschit im Körper erfolgt passiv über Dissoziation. [86] Der aktive Abbau erfolgt zellulär, zu Beginn vor allem durch Makrophagenaktivität. [21] Bei Langzeit-Implantation kommt es zur Repräzipitation des Bruschits zu Apatit. [21, 22] Der Abbau findet dann hauptsächlich über Osteoklastentätigkeit statt. [21, 57] Folglich kommt es zur Remodellierung des Knochens. [55] Da die Körperflüssigkeiten bezüglich Hydroxylapatit übersättigt sind, findet jedoch keine Dissoziation mehr statt, wodurch sich der Abbau des Biomaterials enorm verlangsamt. [21, 57, 87] In der Forschung gibt es bereits Ansätze, welche die Repräzipitation von Bruschit zu Hydroxylapatit verhindern sollen, um ein vollständig abbaubares Biomaterial zu erhalten. [22, 88]

2.4 Knochen

Die hergestellten zweischichtigen Biopolymer-Keramik-Systeme sollten Knorpel mit darunterliegenden Knochen imitieren, wodurch ein Verständnis des Aufbaus und der Zusammensetzung beider Strukturen von Bedeutung ist. Knochen ist ein anisotropes, hierarchisch aufgebautes Gewebe. [89] Dieses setzt sich aus einer organischen und anorganischen Phase zusammen. Die organische Phase besteht hauptsächlich aus Typ I Kollagen und Wasser. [90] Außerdem kommen kleine Mengen anderer Kollagentypen (III, VI) [20] sowie nicht-kollagene Proteine und Proteoglykane [23] vor. Der Hauptbestandteil der anorganischen Phase besteht aus Hydroxylapatit [23], welcher mit Carbonat- (4-5 %), Natrium- (0,9 %) und Magnesium- (0,5 %) Ionen verunreinigt ist [90]. Diese Verunreinigungen führen zu einem wenig kristallinen, Calcium-defizienten, carbonierten Hydroxylapatit. [90]

Auf atomarer Ebene ist Knochen aus Tropokollagen-Molekülen aufgebaut. [91] Sie sind jeweils 300 nm lang und haben einen Durchmesser von 1,5 nm. [90] Die Tropokollagen-Moleküle lagern sich zu einer Mikrofibrille zusammen [90], wobei der Abstand zwischen den einzelnen Molekülen die Einlagerung von Hydroxylapatit-Kristallen ermöglicht [92]. Diese Kristalle sind dünn (2-4 nm) [48] und ihre c-Achse richtet sich nach der Längsachse der Kollagenfibrille aus [92]. Mehrere in eine Richtung verlaufende Fibrillen lagern sich zu einer Kollagenfaser zusammen. [91] Diese Fasern lagern sich wiederum parallel zueinander an und bilden eine Lamelle, innerhalb derer die Ausrichtung der Fasern gleich ist [91]. Die jeweilige Faserorientierung zwischen benachbarten Lamellen kann sich hingegen voneinander unterscheiden. [93, 94]

Makroskopisch ist Knochen aus Kortikalis und Spongiosa aufgebaut. [23] Die Kortikalis setzt sich aus zylinderförmigen funktionellen Einheiten, den Osteonen, zusammen. [95] Jedes Osteon ist von einer Zementlinie umgeben, die es von der Umgebung abgrenzt. [91] Im Zentrum eines Osteons befindet sich der Havers-Kanal, der die vaskuläre Versorgung beinhaltet. [91] Dieser ist von 3-8 konzentrisch angeordneten Knochenlamellen, zwischen denen sich der Kollagenfaserverlauf ändert, umschlossen. [93]

Die Spongiosa besteht aus einem Trabekelnetzwerk, welches ebenso aus Lamellen aufgebaut ist. [94] Die Trabekel richten sich entlang der Trajektorien des Knochens aus. Innerhalb der Trabekel lagern sich Lamellen aneinander, deren Kollagenfasern in dieselbe Richtung verlaufen. [94] Zwischen den Trabekeln liegt das Knochenmark, welches reich an hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen ist. [96]

2.5 Osteochondrales Gewebe

Knorpelgewebe ist ein avaskuläres, aneurales und alymphatisches Gewebe mit einer niedrigen Zelldichte. [7, 97] Die Nährstoffversorgung erfolgt durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit und dem subchondralen Knochen. [98] Je nach Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Matrix wird zwischen hyalinem, fibrösem und elastischem Knorpel unterschieden. [7, 99] Hyaliner Knorpel ist die am häufigsten vorkommende Knorpelart im Körper. [7] Er ist auf den artikulierenden Flächen der Knochen [100], aber auch an der Nase, der Trachea und den Bronchien zu finden [7]. Im folgenden Absatz wird auf den artikulierenden Knorpel näher eingegangen, da

dieser, im Zuge der vorliegenden Arbeit, mit dem darunterliegenden Knochen imitiert werden sollte.

Chondrozyten sind die Zellen des Knorpels, machen jedoch nur 1 – 5 % des Gewebesvolumens aus. [2, 3] Sie regulieren und synthetisieren die Matrixbestandteile. [3, 101] Das restliche Volumen setzt sich aus extrazellulärer Matrix zusammen, welche zu 80 % aus Wasser und 20 % aus fester Phase besteht. [2] Die feste Phase beinhaltet vor allem Typ II Kollagen und das Proteoglykan Aggrecan. [2, 97, 101] Typ II Kollagen macht 95% des gesamten Kollagens im artikulierenden Knorpel aus und ist der Grundbaustein des fibrillären Netzwerkes. [19] Die Struktur des Typ II Kollagens ist homotrimer, bestehend aus drei identischen $\alpha 1$ -Ketten. [102] Weitere im Knorpel vorhandene Kollagene sind die Typen XI, IX und X. [19] Aggrecan ist in das fibrilläre Netzwerk eingebettet. [2] Es besteht aus einem Proteinkern sowie Glykosaminoglykanen. [2] Diese sind vor allem Chondroitin- und Keratansulfat. [3] Viele Aggrecan-Moleküle binden mit Hilfe eines Verbindungsproteins an Hyaluronsäure, wodurch sich Aggregate bilden. [101, 103] Diese Aggregate binden Wasser, woraus eine Stoßdämpferwirkung resultiert. [99] Außerdem verfügt artikulierender Knorpel über eine zonale Gliederung (vgl. Abbildung 3) wobei die Kollagenfasern eine arkaden-ähnliche Struktur aufweisen. [19]

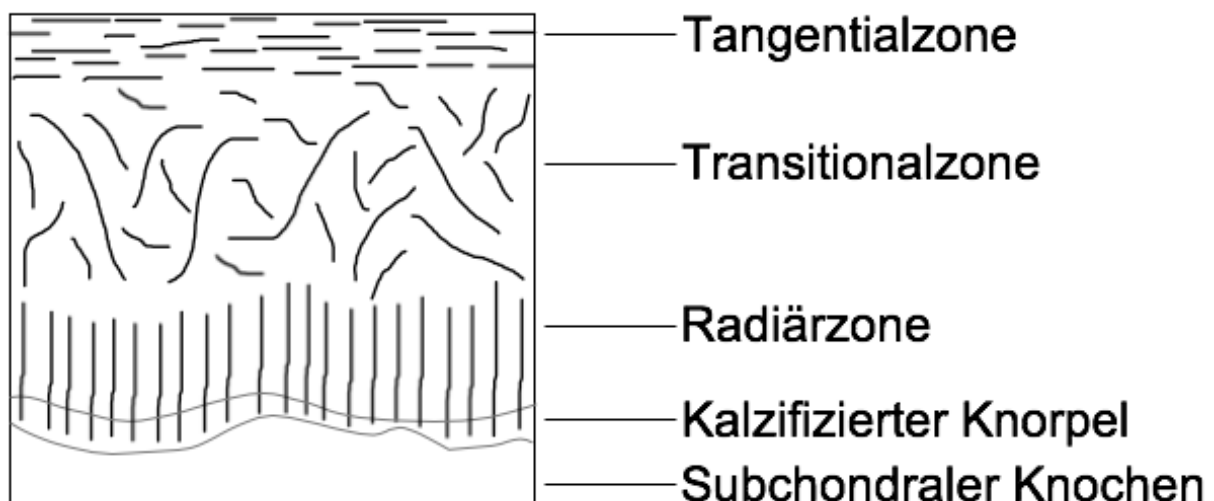


Abbildung 3: Schematische Darstellung des zonalen Aufbaus von osteochondralem Gewebe. Die Tangentialzone besteht aus parallel zur Oberfläche verlaufenden, dicht gepackten Kollagenfasern. In der Transitionalzone haben die Kollagenfasern keine bevorzugte Orientierung. In der Radiärzone und kalzifizierten Knorpelzone verlaufen die Kollagenfasern senkrecht zu ihrer Oberfläche. Zwischen Radiär- und kalzifizierter Knorpelzone befindet sich die Tide Mark (obere hellgraue Linie). Eine dünne Zementlinie (untere hellgraue Linie) befindet sich zwischen kalzifizierten Knorpel und subchondralem Knochen. Erstellt unter Verwendung von [104].

In der obersten Zone, der Tangentialzone verlaufen die Kollagenfasern dicht gepackt parallel zur Oberfläche. [2] Die flachen Chondrozyten liegen mit ihrer Längsachse ebenfalls parallel zur Oberfläche. [3] In der Transitionalzone bilden die Kollagenfasern ein weniger organisiertes Netzwerk aus. [105] Die Chondrozyten sind annähernd rund. [96] Ihre Längsachse hat keine bevorzugte Richtung. [104] Die tiefste Zone des nicht-mineralisierten Knorpels ist die Radiärzone. [99] In der Radiärzone und der darunter liegenden mineralisierten Knorpelzone sind die Kollagenfasern und Chondrozyten senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet. [2] Zwischen den beiden Zonen befindet sich eine gewellte basophile Grenzlinie, die sog. „Tide Mark“. [96] Sie grenzt das mineralisierte von dem nicht-mineralisiertem Gewebe ab. [106] Generell nimmt die Zelldichte von der Tangentialzone zu der Radiärzone hin ab, während die Konzentration an Proteoglykanen zunimmt. [3, 97] Die mineralisierte Knorpelzone enthält Hydroxylapatit und fungiert als Übergang zwischen dem Knorpel- und Knochengewebe. [2, 97] Darunter befindet sich, getrennt von einer dünnen Zementlinie, eine dünne kortikale, subchondrale Knochenplatte. [107, 108] Unter dieser liegt subchondraler Trabekelknochen. [107] Beide Strukturen werden in der vorliegenden Arbeit unter dem Begriff „subchondraler Knochen“ zusammengefasst.

Osteochondrales Gewebe kann durch traumatische und degenerative Ereignisse geschädigt werden. [106, 109] Eine Schädigung des Knorpelgewebes ist aufgrund der Avaskularität und niedrigen Zelldichte schlecht regenerationsfähig. [2, 110] Die Chondrozyten synthetisieren kurzzeitig vermehrt Matrixbestandteile. [111] Jedoch reicht dieser Mechanismus für eine Defektheilung nicht aus. [111, 112] Bei Kontinuitätsunterbrechungen, die bis zum subchondralen Knochen reichen, kommt es zur Einblutung und inflammatorischen Reaktion. [111] Nach Differenzierung der eingewanderten mesenchymalen Stammzellen synthetisieren diese im Bereich des Knorpeldefekts ein Reparaturgewebe. [111] Dieses Reparaturgewebe ist ein Mischgewebe aus hyalinem Knorpel und Faserknorpel. [113] Es füllt selten den gesamten Knorpeldefekt. [111] Außerdem hat es schlechtere mechanische Eigenschaften als rein hyalines Knorpelgewebe. [111]

Derzeitige Methoden um osteochondrale Defekte zu therapieren, sind unter anderem die Mikrofrakturierung [98, 100, 114], die autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) [115, 116], die Matrix-induzierte ACT (MACT) [117, 118] sowie osteochondrale autogene [119, 120] und allogene Transplantationen [8, 109, 121-123].

Die Mikrofrakturierung ist eine knochenmarkstimulierende Technik. [124] Es ist ein kostengünstiges und einfaches Verfahren. [124] Bei der Mikrofrakturierung erfolgt ein Debridement des Knorpeldefektes mit anschließender Perforation des subchondralen Knochens. [124] In Folge dessen kommt es zur Einblutung, wodurch auch mesenchymale Stammzellen in den Knorpeldefekt gelangen. [3, 124] Es bildet sich ein Reparaturgewebe, welches überwiegend aus Faserknorpel besteht. [124] Bei der ACT bildet sich Reparaturgewebe, welches dem hyalinen Knorpel ähnlicher ist. [125] Es handelt sich hierbei jedoch um eine sehr kostenintensive Technik und benötigt zwei operative Eingriffe. [126] Bei der ACT wird zunächst arthroskopisch hyaliner Knorpel aus weniger belasteten Knorpelarealen gewonnen. [115] Anschließend werden die darin enthaltenen Chondrozyten *in vitro* vermehrt und in einem zweiten operativen Eingriff in den Knorpeldefekt eingebracht. [126] Die MACT ist eine Weiterentwicklung der ACT. Hierbei werden die kultivierten Chondrozyten in eine Matrix eingebettet. [126] Im Vergleich zur ACT zeichnet sich die MACT durch eine einfachere intraoperative Handhabung, Verkürzung der Operationszeit und Verringerung der postoperativen Schmerzen und Komplikationen aus. [126] Bei der osteochondralen autogenen Transplantation wird körpereigener Knorpel mit dem darunterliegenden subchondralen Knochen „en bloc“ aus nicht lasttragenden Bereichen entnommen und anschließend in den Knorpeldefekt eingebracht. [98] Diese Technik hat jedoch auch Limitationen, da die Gefahr der Entnahmemorbidität besteht und Transplantatgewebe nur begrenzt vorhanden ist. [3] Außerdem ist es fraglich, ob Knorpelmaterial aus nicht lasttragenden Bereichen den mechanischen Anforderungen in lasttragenden Bereichen auf Dauer standhalten kann. [127] Eine weitere osteochondrale Transplantationstechnik ist die osteochondrale allogene Transplantation. Bei frischen osteochondralen allogenen Transplantaten wurde jedoch eine Immunreaktion beobachtet. [128, 129] Das Gefrieren der frischen osteochondralen allogenen Transplantate verringert die Immunreaktion, jedoch überlebt hierbei nur ein geringer Prozentsatz der Chondrozyten. [113, 130]

Die Wahl der Methode richtet sich letztendlich nach der Größe und Art des Defekts, ebenso wie nach patienten- und behandler-spezifischen Faktoren. [8]

2.6 Gefrierstrukturierung

Da die oben genannten Therapiemethoden kein vollständig zufriedenstellendes Ergebnis liefern und über einige Limitationen verfügen, ist die Regeneration von

osteocondralem Gewebe Gegenstand derzeitiger Forschung im Bereich des Tissue Engineering. Eine Methode, um das anisotrope osteochondrale Gewebe nachzuahmen, ist die Gefrierstrukturierung. Die Methode besteht im Wesentlichen aus zwei Prozessschritten. Zunächst wird die Probe gerichtet erstarrt. Anschließend werden die Eiskristalle mit Hilfe der Gefriertrocknung entfernt. Die resultierende Probenmorphologie stellt folglich ein Negativ der Eiskristallstruktur dar.

Die gerichtete Erstarrung erfolgt, wenn einer wässrigen Lösung während des Gefrierens ein zeitlich und örtlich konstanter Temperaturgradient, welcher die Richtung der Wärmeabfuhr festlegt, überlagert wird. [131, 132] Es resultiert ein Eiskristallwachstum in die dem Temperaturgradienten entgegengesetzte Richtung. [131] Um eine strukturierte Probe mit hochgradig geordneter, anisotroper lamellarer Porenmorphologie zu erhalten, ist das Wachstum einer nicht-planaren Eisfront von entscheidender Bedeutung. [133] Im vorliegenden Kapitel soll ein näheres Verständnis für das Gefrieren von Wasser im Allgemeinen sowie die Entstehung einer nicht-planaren Eisfront vermittelt werden.

Bei Temperaturen unterhalb 0 °C gefriert Wasser, d. h. es tritt bei Atmosphärendruck eine Phasenumwandlung von flüssig zu fest auf. [134] Hierbei findet eine initiale Keimbildung mit anschließendem Wachstum der Eiskristalle statt [134], wobei eine Volumenvergrößerung von circa 9 % [135] zu beobachten ist. Eispolymorphe stellen die feste Phase von Wasser dar. [134] Sie bestehen aus einem Wassermolekül, welches durch Wasserstoffbrückenbindungen mit vier weiteren Wassermolekülen verbunden ist. [134] Bei atmosphärischen Druckverhältnissen liegen sie in der hexagonalen Kristallstruktur vor. [135] Es sind noch über zehn weitere Kristallstrukturen bekannt, die jedoch bei anderen Druckverhältnissen vorherrschen. [135]

Bei der gerichteten Erstarrung einer wässrigen Lösung wächst die Eisfront anfangs planar. [136] Die gelösten Stoffe werden vor die Eisfront gedrängt. [136] Daher ist der Verteilungskoeffizient k , welcher durch die Gleichung (1) beschrieben wird, niedrig. [132] Er gibt das Verhältnis der Stoffkonzentration in der festen und flüssigen Phase wieder. [136]

$$k = \frac{c_{fest}}{c_{flüssig}} \quad (1)$$

Die Konzentration des gelösten Stoffes in der festen Phase ist als c_{fest} beschrieben, während $c_{flüssig}$ die Konzentration des gelösten Stoffes in der flüssigen Phase darstellt. Ist das Wachstum der Eisfront schneller als der beispielsweise durch Diffusion oder Konvektion bedingte Abtransport der gelösten Stoffe vor der Front, so kommt es zu einer erhöhten Stoffkonzentration direkt vor dieser. [137] Mit zunehmender Entfernung x nimmt die Stoffkonzentration c_x wieder in Richtung Ausgangskonzentration c_0 ab. (vgl. Abbildung 4) [137]

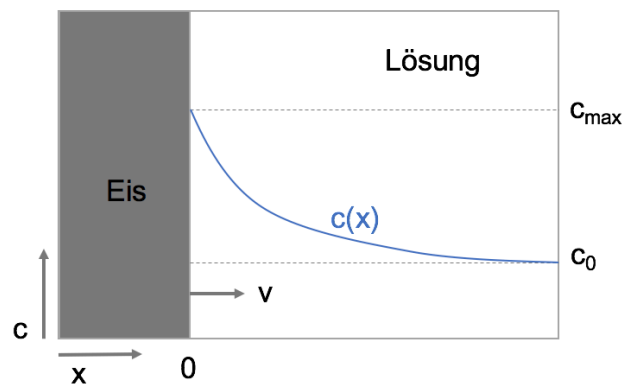


Abbildung 4: Stoffkonzentrationsverlauf vor einer planaren Eisfront bei der gerichteten Erstarrung. Die Eisfront wächst mit einer Geschwindigkeit v , wodurch die gelösten Stoffe vor die Front gedrängt werden. Die Stoffkonzentration c_x ist vor der Eisfront am höchsten c_{max} und nimmt mit zunehmender Entfernung wieder auf die Ausgangskonzentration c_0 ab. Erstellt unter Verwendung von [132].

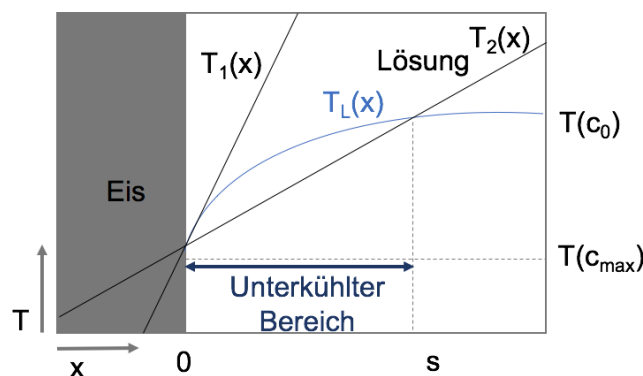


Abbildung 5: Konstitutionelle Unterkühlung vor einer planaren Eisfront. Bei dem Temperaturverlauf $T_2(x)$ kommt es zu einem Bereich der konstitutionellen Unterkühlung $0 < x < s$. Hier unterschreitet die ortsabhängige Temperatur die ortsabhängige Liquidustemperatur $T_L(x)$. Bei dem Temperaturverlauf $T_1(x)$ ist dies nicht der Fall. Die planare Eisfront ist somit stabil und es entstehen keine Störungen. Erstellt unter Verwendung von [132].

Die Stoffkonzentration beeinflusst die Liquidustemperatur $T_L(x)$. [137] Diese ist umso geringer, je höher die Stoffkonzentration ist. [136] Daher ist $T_L(x)$, ebenso wie die Konzentration, ortsabhängig und nahe der Eisfront am niedrigsten. [136] Mit

zunehmender Entfernung nimmt $T_L(x)$ wieder zu. [136] In Abbildung 5 sind zwei Temperaturverläufe, $T_1(x)$ und $T_2(x)$, dargestellt. Bei dem Temperaturverlauf $T_1(x)$ ist die ortsabhängige Temperatur immer größer als $T_L(x)$, weshalb es zum Wachstum einer planaren Eisfront kommt. [136] Bei dem Temperaturverlauf $T_2(x)$ kommt es vor der Eisfront zu einem Bereich der konstitutionellen Unterkühlung, da die ortsabhängige Temperatur unterhalb $T_L(x)$ liegt. [136] Dieser Bereich wird folgend als „unterkühlter Bereich“ bezeichnet. Hier können Störungen zu einem Aufbrechen der planaren Eisfront führen. [132] Für die Entstehung einer stabilen, nicht-planaren Eisfront muss das Stabilitätskriterium nach Mullins und Sekerka, welches durch die Formel (2) beschrieben wird, erfüllt sein. [132, 138]

$$\nabla T - \nabla T_L(x)|_{x \rightarrow 0^+} + \frac{\Gamma \cdot k \cdot v^2}{D^2} < 0 \quad (2)$$

Hierbei beschreibt ∇T den externen Temperaturgradienten, $\nabla T_L(x)$ den Gradienten der Liquidustemperatur, Γ den Gibbs-Thomson-Koeffizient, k den Verteilungskoeffizient, v die Eisfrontgeschwindigkeit und D den Diffusionskoeffizienten. [132] Das Stabilitätskriterium besagt, dass die Differenz von ∇T und $\nabla T_L(x)$, addiert mit einem Term, der die aufzuwendende Grenzflächenenergie berücksichtigt, kleiner Null sein muss. [132] Ist diese Bedingung erfüllt, bricht die planare Eisfront auf. [132] Folgend wachsen Eiskristalle in den unterkühlten Bereich ein. [132] Eine nicht-planare Eisfront kann unterschiedliche Morphologien aufweisen. Das Eiskristallwachstum muss zellular oder dendritisch sein, um eine Anisotropie zu erreichen. [14] Zellulare Eiskristalle haben eine glatte Oberfläche, während dendritische über Seitenäste verfügen. [137] Dendritische Eiskristalle bilden sich bevorzugt, wenn ein hoher Grad an Instabilität vorherrscht. [139] Welche Morphologie sich im Endeffekt ausbildet, hängt von der Zusammensetzung der Lösung, der Erstarrungsrate und dem überlagerten Temperaturgradienten ab. [136, 139] Das Eiskristallwachstum ist senkrecht zu der kristallographischen c-Achse sehr viel schneller als parallel dazu. [133] Die gelösten Stoffe diffundieren lateral zwischen die wachsenden Eiskristalle. [133] Es entsteht eine lamellare Probenmorphologie. [133] Ist ∇T nahezu null, kommt es zum Wachstum äquiaxialer Eiskristalle in der Lösung. [14] Hieraus entsteht eine isotrope Probenmorphologie. [14]

Durch die Gefrierstrukturierung mit anschließender Gefriertrocknung wird eine anisotrope, lamellare Porenstruktur in der Probe erzeugt. Diese Porenstruktur ist in der

vertikalen Ebene geordnet, da das Eiskristallwachstum in die dem Temperaturgradienten entgegengesetzte Richtung verläuft. ∇T_V beschreibt in Abbildung 6 den eben beschriebenen vertikal ausgerichteten Temperaturgradienten. In der horizontalen Ebene kommt es jedoch zur Ausbildung mehrerer Domänen unterschiedlicher Ausrichtung. (vgl. Abbildung 7) [17, 140]

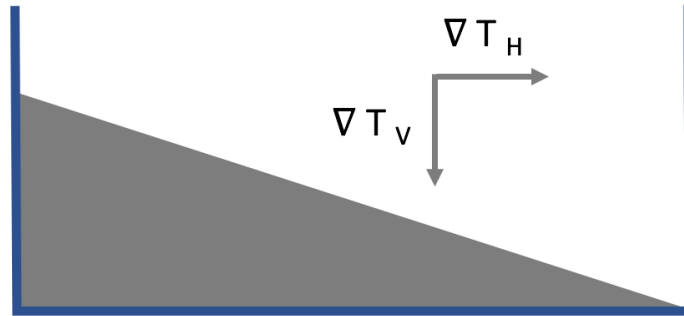


Abbildung 6: Bidirektionale Gefrierstrukturierung. Der Teflonkeil (grau) führt neben dem, durch die PEs erzeugten, vertikal ausgerichteten Temperaturgradienten ∇T_V zur Ausbildung eines horizontal ausgerichteten Temperaturgradienten ∇T_H . Erstellt unter Verwendung von [17].

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob mit Hilfe von Teflonkeilen eine einzelne Domäne in horizontaler Ausrichtung erhalten wird, wodurch die Probenmorphologie noch homogener werden sollte. Hiermit sollten natürliche Strukturen mit einer hohen Ordnung, woraus einzigartige mechanische Eigenschaften resultieren, bestmöglich in ihrem Aufbau nachgeahmt werden. [18] Nach Bai *et al.* [17] kommt es durch die Verwendung eines Teflonkeils am Boden der Probe während der Gefrierstrukturierung zur Ausbildung eines zweiten, horizontal ausgerichteten Temperaturgradienten ∇T_H , wodurch das Eiskristallwachstum in dieser Ebene ebenfalls geordnet abläuft. Diese Art der Gefrierstrukturierung wird als „bidirektionale Gefrierstrukturierung“ bezeichnet. (vgl. Abbildung 6)

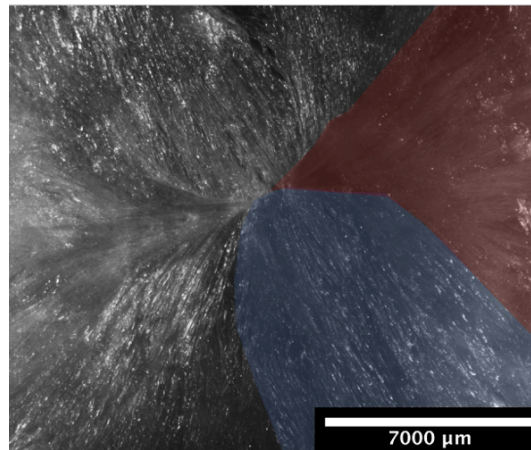


Abbildung 7: Stereomikroskopische Oberflächenaufnahme einer gefrierstrukturierten, gefriergetrockneten Probe mit mehreren Domänen in der horizontalen Ebene. Exemplarisch wurden zwei Domänen unterschiedlicher Ausrichtung angefärbt.

Pot *et al.* [141] gelang es ebenfalls mit Hilfe eines Keilsystems eine bidirektionale Gefrierstrukturierung durchzuführen. Außerdem wurde hierbei festgestellt, dass sich während dieses Prozesses zunächst horizontal ein planares Dendritennetzwerk über die Keiloberfläche, beginnend an dem kältesten Punkt des Keils, ausbildete. Als Grund hierfür wurde der horizontal ausgerichtete Temperaturgradient genannt. [141] Anschließend kam es, wenn die in diesem Kapitel bereits beschriebenen Kriterien zum Wachstum einer nicht-planaren Eisfront erfüllt waren, zum Vertikalwachstum der Eiskristalle. [141]

2.7 Nachahmung von osteochondralem Gewebe durch Gefrierstrukturierung

Im Bereich des Tissue Engineering wird Gefrierstrukturierung verwendet, um den Aufbau von leichtgewichtigen natürlichen Strukturen, welche sich durch sehr gute mechanische Eigenschaften auszeichnen, nachzuahmen. [6] Solche Eigenschaften sind zum Beispiel bei Knochen, Zähnen, Muscheln, Bambus, Holz oder Seide zu finden. [6] Viele dieser Strukturen sind lamellar oder geschichtet aufgebaut, weshalb sich die Methode der Gefrierstrukturierung zur Nachahmung eignet. [6] Außerdem handelt es sich um ein kostengünstiges und umweltfreundliches Verfahren, welches mit einer Vielfalt von Materialien angewendet werden kann. [6, 142-145]

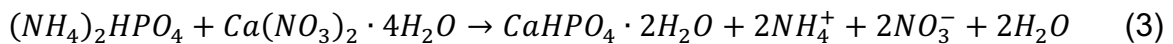
Zur Nachahmung von osteochondralem Gewebe mit Hilfe der Gefrierstrukturierung stellte Stuckensen, K. [14, 15] geschichtete monolithische Scaffolds her, wobei sich die Schichten durch unterschiedliche Zusammensetzungen auszeichneten. Die chondrale Schicht der zweischichtigen osteochondralen Scaffolds setzte sich aus Typ I und Typ II Kollagen sowie Chondroitinsulfat zusammen. [15] Die subchondrale

Schicht bestand aus Typ I Kollagen und Bruschit. [15] In einem *in vivo* Experiment konnte gezeigt werden, dass in den osteochondralen Scaffold eingewanderte Stammzellen ohne die Zugabe externer Wachstumsfaktoren zonenspezifische Matrix synthetisierten. [15] Diese regenerative Stammzellaktivität war auf die Morphologie und Zusammensetzung des eingesetzten Materials zurückzuführen. [14, 15] Feng *et al.* [140] beobachteten *in vivo* ebenfalls eine endogene Geweberegeneration unter Verwendung anisotroper, gefrierstrukturierter Scaffolds, ohne den Einsatz externer Zellen. Hierbei wurden zur Knorpelregeneration Scaffolds aus Seidenfibroin und Typ I Kollagen hergestellt. [140] Zusätzlich wurden Scaffolds durch nicht-gerichtete Erstarrung hergestellt, woraus eine isotrope Porenmorphologie resultierte. [140] 18 Wochen postoperativ kam es zur Bildung eines hyalinen Knorpels in der Gruppe der anisotropen Scaffolds, während sich bei der Gruppe der isotropen nur ein milderer Reparaturknorpel bildete. [140] Diese Studien verdeutlichen die Bedeutung einer anisotropen Materialmorphologie, wie sie durch die Gefrierstrukturierung erzeugt werden kann, für die Regeneration von osteochondralem Gewebe.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung von Brushit

Das in der Arbeit verwendete Brushit wurde durch Präzipitation aus Diammoniumhydrogenphosphat $H_9N_2O_4P$ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Calciumnitrat Tetrahydrat $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Die Präzipitationsreaktion von Brushit kann durch Gleichung (3) wie folgt beschrieben werden:



Das jeweilige Pulver wurde in Reinstwasser auf dem Magnetrührer „MR Hei Tec“ (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) aufgelöst und jeweils eine 1 M Lösung hergestellt. Anschließend wurde der Calciumnitrat Tetrahydrat-Lösung die Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Tropftrichters (Winzer Germany, Wertheim, Deutschland) zugetropft. Die Lösung wurde anschließend vakuumfiltriert und mehrmals gespült, um das hierbei ausgefällte Brushit herauszufiltern. Dafür kam ein Büchnertrichter, angeschlossen an eine Vakuumpumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland), zum Einsatz. Die Trockenzeit des Brushits im Trockenschrank (Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) bei 35 °C betrug 48 h.

Das gefällte Brushit wurde nach vollständiger Trocknung mittels eines Handmörser gemörsert, um ein Pulver zu erhalten. Die Phasenreinheit des Brushits konnte mit Hilfe einer Röntgendiffraktometrie (XRD)-Messung überprüft und bestätigt werden. Alle XRD-Messungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Röntgendiffraktometer „D8 Advance“ (Bruker Corporation, Massachusetts, USA) durchgeführt und mit der Software „DIFFRAC.EVA“ (Bruker Corporation, Massachusetts, USA) aufgezeichnet. Die Auswertung der aufgezeichneten Daten erfolgte mit der Software „TOPAZ“ (Bruker Corporation, Massachusetts, USA), welche nach der Rietveld-Methode arbeitet. Die Messung fand mit dem Scan-Typ „Coupled Two Theta/Theta“ statt. Als Röntgenstrahlung diente $Cu-K_{\alpha}$ -Strahlung. Die Beschleunigungsspannung betrug 40 kV, der Emissionsstrom 40 mA. Alle Proben wurden in einem 2θ Winkelbereich von $10^\circ - 60^\circ$ gemessen. Die Schrittgeschwindigkeit betrug 0,2 s pro Schritt bei einer Schrittweite von $0,02^\circ$.

3.2 Herstellung der Alginat-Lösungen sowie der Alginat-Bruschit-Schlicker

Zur Herstellung der Alginat-Lösungen wurden zunächst das Alginatpulver „A1112-2504“ (Sigma Life Science, Darmstadt, Deutschland) mit Reinstwasser gemischt und unter ständigem Rühren aufgelöst. Der Massenanteil an Alginatpulver in der Lösung betrug 2 % und 4 %. Anschließend wurde die Lösung 5 min bei 4500 rpm und Raumtemperatur in der Zentrifuge „MegaStar 1.6R“ (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Lösung mit 2 % Massenanteil als „Alginat (2 %)-Lösung“, jene mit 4 % Massenanteil als „Alginat (4 %)-Lösung“ bezeichnet.

Die Charakterisierung des Alginatpulvers erfolgte durch eine GPC-Messung. Hiermit konnten das Zahlenmittel M_n , das Gewichtsmittel M_w sowie das Zentrifugenmittel M_z der Molmasse bestimmt werden. (vgl. Tabelle 1) Für die Messung wurden 2 mg Alginatpulver in 2 ml GPC-Lösung, welche aus einem Gemisch aus Reinstwasser mit 8,5 g/l Natriumnitrat und 0,2 g/l Natriumazid bestand, gelöst, durch einen 0,45 μm Cellulose Membranfilter (Thermo Scientific, Tennessee, USA) gefiltert und über Nacht auf einem Rüttler gelagert. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines wässrigen GPC-Systems (Malvern Panalytical, Kassel, Deutschland). Dieses System beinhaltet unter anderem den „Viscotek GPC Max“, welcher ein Modul zur Bereitstellung von Lösungsmitteln und Proben ist. Außerdem enthalten sind ein Streudetektor „Viscotek SECMAALS 2.0“, zwei „A600M“ Viscotek A-Säulen (Länge: 300 mm, Breite 80 mm, poröses Polymethylmethacrylat), ein Brechungsindexdetektor (Viscotek VE3580 RI Detector) sowie ein Viskositätsdetektor (Dual Detector 270, 15 psi). Als Eluent diente die oben beschriebene GPC-Lösung, die Kalibrierung erfolgte mit PEG-Standards. Die Auswertung wurde mittels MALS-Kalibrierung durchgeführt.

Tabelle 1: Molekulargewichte des Alginats A1112-2504, Sigma Life Science.

Molekulargewicht	Wert [Da]
M_n	36,903
M_w	89,166
M_z	179,463

Zur Herstellung der Bruschit-Schlicker wurde zunächst eine Alginat (2 % bzw. 4 %)-Lösung hergestellt. Diese wurde im Anschluss auf einer Glasplatte in verschiedenen Pulver-zu-Flüssigkeitsverhältnissen (PLR) mit dem Bruschitpulver vermischt. (vgl. Tabelle 2)

Tabelle 2: Pulver-zu-Flüssigkeitsverhältnisse der verwendeten Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Schlicker.

PLR [g/ml]	Bruschitpulver [g]	Alginat-Lösung [ml]
0,03:1	0,1	3
0,06:1	0,2	3
0,1:1	0,3	3
0,13:1	0,4	3
0,16:1	0,5	3

3.3 Extraktion von Typ II Kollagen bovinen Ursprungs

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Typ II Kollagen war bovinen Ursprungs und wurde aus den Gelenkknorpeln frischer Kälberknie extrahiert. Diese wurden von der Firma „Brüninghoff Kalbfleisch“ (Bocholt, Deutschland) bezogen. Die Extraktion von Typ II Kollagen erfolgte in Anlehnung an das Patent Nummer DE10157182A1. [146]

Zunächst wurden die Sehnen und Bänder des Knies mit Hilfe eines chirurgischen Skalpell (B. Braun, Melsungen, Deutschland) durchtrennt. Umliegendes Gewebe sowie der Meniskus wurden entfernt, was zu einer Freilegung der Gelenkflächen von Patella, Femur und Tibia führte. Von diesen Flächen wurde mit Hilfe des Skalpell hyaliner Knorpel abgeschabt. (vgl. Abbildung 8) Die gewonnen Knorpelsplitter wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C zwischengelagert.

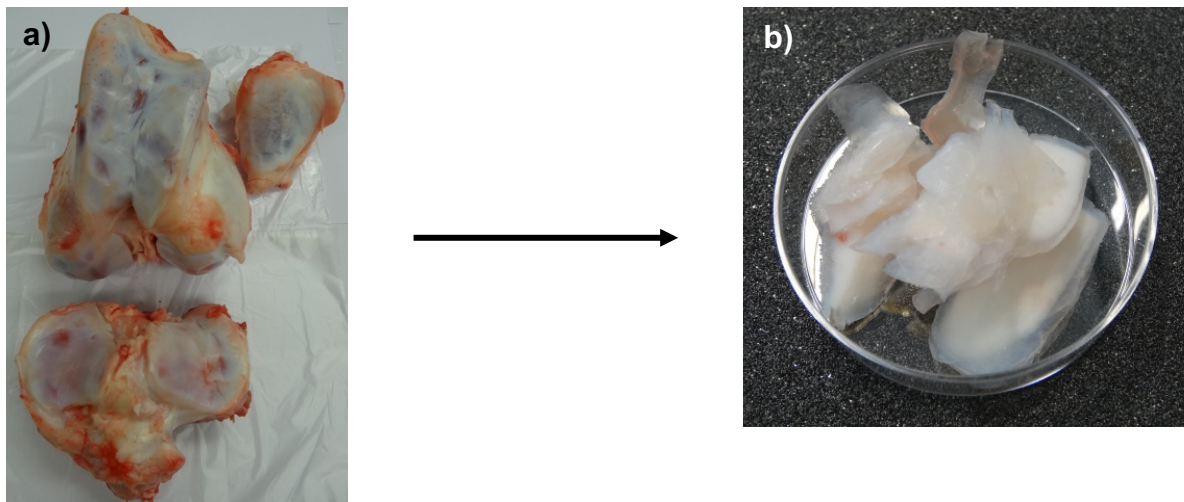


Abbildung 8: Gewinnung von hyalinen Knorpelsplittern. a) Abgeschabte Gelenkflächen von Femur (oben links), Patella (oben rechts) und Tibia (unten) eines Kälberknies. b) Hyaline Knorpelsplitter. Die Knorpelsplitter wurden durch Ausschabung der Gelenkfläche eines Kälberknies (siehe a)) gewonnen.

Zur Inaktivierung und Desinfektion des gewonnenen Materials wurden im nächsten Schritt jeweils 100 g Knorpelsplitter in 500 ml 0,5 mol/l NaOH-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) für 2 h bei 20 °C gelagert. Anschließend erfolgte unter ständigem Rühren die Neutralisation mit anfangs 5 mol/l HCl (EMSURE, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und zur Feinabstimmung des pH-Wertes mit 0,3 mol/l HCl für 30 min. Anschließend wurde das Material dreifach mit jeweils 1 l destilliertem Wasser (DI Wasser) für 30 min gewaschen und durch ein 125 µm Sieb (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) gesiebt. Dieses Vorgehen wird im Folgenden als „Waschung“ bezeichnet und dient dem Beseitigen von Rückständen.

Anschließend wurden die Knorpelsplitter unter Zugabe von 250 g Eis und 250 ml gekühltem destilliertem Wasser mit Hilfe eines Labormixers „Osterizer“ (Sunbeam Products, Florida, USA) fraktioniert. Die Fraktionierung erfolgte dreimal für 45 s bei langsamer Geschwindigkeit. Danach wurden dem Knorpelmaterial 60 g Eis beigefügt. Ein erneutes Fraktionieren erfolgte dreimal für 45 s bei hoher Geschwindigkeit. Das fraktionierte Material wurde durch das 125 µm Sieb gesiebt, um die Flüssigkeit von dem Knorpelmaterial zu trennen. Die noch folgenden Siebungen wurden ebenfalls mit dem beschriebenen Sieb durchgeführt. Anschließend wurden dem Knorpelmaterial 50 g Eis und 150 ml Reinstwasser beigefügt. Das Fraktionieren erfolgte diesmal für 45 s bei langsamer Geschwindigkeit und anschließend 5 min bei hoher Geschwindigkeit, wobei jede Minute 60 g Eis beigefügt wurden. Es erfolgte eine

weitere Siebung. Der zuletzt genannte Fraktionierungsschritt wurde wiederholt, gefolgt von einer weiteren Siebung des Knorpelmaterials.

Im nächsten Schritt wurden hydrophobe Begleitsubstanzen entfernt. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 0,5 ml Aceton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) für jeweils 45 min, gefolgt von einer Waschung. Hiernach wurden Calcium-Chelatbildner und Enzyminhibitoren hinzugefügt. Dies erfolgte durch dreimaliges Waschen mit jeweils 0,5 l aus 27 mmol/l HEPES-Puffer-Lösung (Sigma Life Science, Darmstadt, Deutschland) 50 mmol/l NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) und 7 mmol/l EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) für jeweils 45 min. Dann erfolgte eine Waschung.

Um durch Wasserstoffbrückenbindungen gebundene Verunreinigungen zu beseitigen, wurden der Kollagenmasse 250 ml einer 4 mol/l Urea-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Nach 45 min erfolgte eine Waschung.

Die Kollagenmasse wurde für 20 h in 500 ml einer 0,1 mol/l NaOH-Lösung belassen, um eine irreversible Spaltung der Peptidbindungen zu verhindern. Die NaOH-Lösung hatte einen pH-Wert zwischen 12 und 14. Danach erfolgte die Neutralisation anfangs mit einer 5 mol/l HCl-Lösung und zur Feinabstimmung des pH-Wertes mit einer 0,3 mol/l HCl-Lösung. Danach erfolgte eine Waschung. Die Kollagenmasse wurde anschließend in 500 ml einer 0,1 mol/l HCl-Lösung mit einem pH-Wert zwischen 0 und 3 für 24 h gelagert. Anschließend erfolgte eine Neutralisation anfangs mit einer 5 mol/l NaOH-Lösung und zur Feinabstimmung mit einer 0,5 mol/l NaOH-Lösung. Nach einer weiteren Waschung wurde der Überstand bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert („MegaStar 1.6R“, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Das durch das beschriebene Vorgehen extrahierte Typ II Kollagen wurde über Nacht im Gefrierschrank (Liebherr, Bulle, Schweiz) bei -20 °C gelagert. Hiernach erfolgte die Gefriertrocknung („Alpha 1-2 LD Plus“, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) bei -56 °C und 0,67 mbar für 4 Tage. Das gefriergetrocknete Kollagen wurde in der Schwingmühle „CryoMill MM400“ (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) unter Verwendung von Flüssigstickstoff gefriergebrochen, wodurch ein feines Pulver erhalten wurde, welches später für die Herstellung des Kollagen-Bruschit-Schlickers in Essigsäure gelöst wurde. Für das Vorgehen kam ein 25 ml Zirkonoxid Mahlbecher und eine Zirkonoxid Mahlkugel mit einem Durchmesser von 20 mm zum Einsatz. Zunächst erfolgte in der Schwingmühle eine Vorkühlung bei

5 Hz. Das Gefriergebrechen erfolgte anschließend durch 8 Mahlzyklen bei 25 Hz für 4 min. Zwischen den einzelnen Zyklen wurde eine Zwischenkühlung bei 5 Hz für 1 min durchgeführt. Nachdem der Vorgang abgeschlossen war, wurde das Typ II Kollagenpulver zum Auftauen für weitere 1,5 h in der Schwingmühle belassen. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -20 °C.

Es wurde eine Infrarotspektroskopie (IR)-Messung mit dem Fourier-Transform-Infrared (FTIR)-Spektrometer „Nicolet iS10 with Smart iTR diamond ATR“ (Thermo Scientific, Tennessee, USA) durchgeführt, um das extrahierte Typ II Kollagenpulver zu charakterisieren. Die Probenanalyse erfolgte mit der Technik der abgeschwächten Totalreflexion („attenuated total reflexion“, ATR) mit einem deuterierten Triglycerinsulfat-Potassiumbromid (DTGS-KBr) Detektor, welcher Wellenzahlen von 4000 cm⁻¹ bis 650 cm⁻¹ erfassen kann.

3.4 Herstellung der Kollagen-Lösungen sowie der Kollagen-Bruscht-Schlicker

Das, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, gewonnene Kollagenpulver wurde in 0,5 mol/l Essigsäure unter Rühren aufgelöst. Der Massenanteil an Kollagen in der Lösung betrug 2 % bzw. 4 %. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Lösung mit 2 % Massenanteil Kollagenpulver als „Kollagen (2 %)-Lösung“, die Lösung mit 4 % Massenanteil als „Kollagen (4 %)-Lösung“ bezeichnet.

Die Herstellung des Kollagen-Bruscht-Schlickers erfolgte wie die des Alginat-Bruscht-Schlickers. (vgl. Kapitel 3.2) Die hierfür verwendeten PLRs sind Tabelle 2 zu entnehmen.

3.5 Gefrierstrukturierung mit dem „Adjustable Cryostructuring Device“

3.5.1 Aufbau der Gefrierstrukturierungsanlage

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Gefrierstrukturierung die am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde in Würzburg entwickelte Gefrierstrukturierungsanlage „Adjustable Cryostructuring Device“ (ACD) verwendet. (vgl. Abbildung 9)

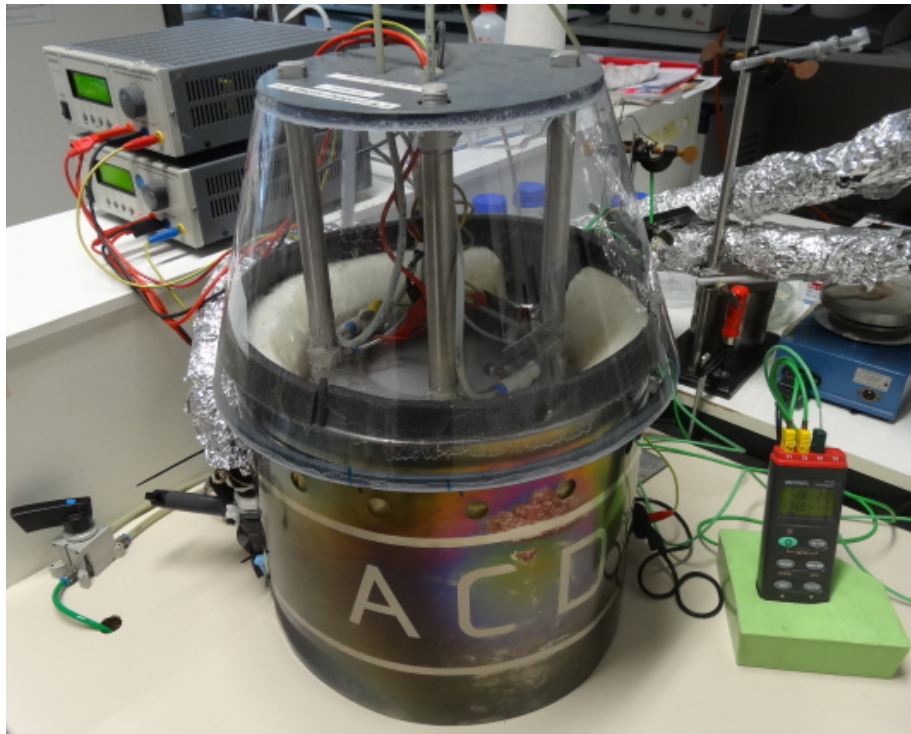


Abbildung 9: Gefrierstrukturierungsanlage „ACD“. Der untere Kupferblock ist durch Polyurethanschaumstoff und einen Edelstahlzylinder isoliert. Der Kupferdeckel ist durch eine Kunststoffhaube abgedeckt. Die beiden Labornetzgeräte sind auf einer Erhöhung links neben dem ACD platziert. Links neben der Anlage ist der Hebel für die pneumatische Öffnung und Schließung des ACD platziert. Rechts befindet sich der Datalogger mit den drei angeschlossenen Temperatursensoren.

Die Anlage besteht aus einem zylinderförmigen Kupferblock mit Kupferdeckel. Der Kupferblock steht mit dem „FP89-HL“ Tiefkälte-Umwälzthermostat (Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland) durch Zulaufschläuche in Verbindung. Das Tiefkälte-Umwälzthermostat durchspült den Kupferblock mit Kühlmittel („Thermal Hy 8940104“, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland). Das Kühlmittel sorgt dafür, dass sowohl die von zwei Peltier-Elementen (PEs) im Inneren der Anlage erzeugte als auch die von der Probe während der Gefrierstrukturierung freiwerdende, latente Wärme abgeführt wird. Außerdem trägt das Kühlmittel dazu bei, die Temperatur des Gesamtsystems herabzusetzen. Dies wiederum beeinflusst, welche maximal tiefe oder hohe Temperatur die beiden übereinander angeordneten PEs erreichen können. Die PEs können unterschiedlich temperiert werden, wodurch ein externer Temperaturgradient erzeugt wird, der entgegen des Wärmeflusses ausgerichtet ist. Jedes PE ist an ein Labornetzgerät „PSP 12010“ (Vollcraft, Wollerau, Schweiz) angeschlossen. Dadurch kann die Temperatur des jeweiligen PEs gesteuert werden. Die Polung ist so gewählt, dass das untere PE bei angelegtem Strom kühlt, während das obere PE heizt. Es entsteht ein Wärmefluss von dem wärmer zu dem kälter eingestellten PE. Dies entspricht auch der Richtung des externen Temperaturgradienten. Die entstehenden

Eiskristalle in der Probe, welche als Lösung bzw. Schlicker in das System injiziert wird, wachsen entgegen diesem Temperaturgradienten. (vgl. Kapitel 2.6) Dadurch kommt es zu einer strukturierten Probenmorphologie. Beim Gefrieren der Probe wird außerdem latente Wärme frei, welche den externen Temperaturgradienten überlagert. Deshalb wird zwischen dem externen Temperaturgradienten, welcher von den PEs erzeugt wird, und dem internen Temperaturgradienten unterschieden. Der interne Temperaturgradient kann in den beschriebenen Versuchen nicht bestimmt werden. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit der Temperaturgradient als der externe Temperaturgradient definiert. Er wird mit folgender Formel beschrieben: [14]

$$\vec{\nabla}T = \frac{\partial T}{\partial \vec{x}} \cong \frac{|T_o - T_u|}{\vec{x}_o - \vec{x}_u} \quad (4)$$

$\vec{\nabla}T$ beschreibt den externen Temperaturgradienten. T_o beschreibt die Temperatur des oberen und T_u jene des unteren PE-Elementes. \vec{x}_o und \vec{x}_u stellen die Ortsvektoren des oberen und unteren PE-Elementes dar. In der vorliegenden Arbeit wird der Term $\vec{x}_o - \vec{x}_u$ als Skalar angesehen und beträgt 14 mm, da dies der Abstand der beiden PE-Elemente im geschlossenen Zustand ist. Sowohl die Temperaturen der beiden PE-Elemente als auch die der Probe werden mit Hilfe von drei Temperatursensoren (B+B Thermo-Technik GmbH, Donaueschingen, Deutschland) T1, T2 und T3 aufgezeichnet. Die Sensoren sind an einen Datalogger „K204“ (Votcraft, Wollerau, Schweiz) angeschlossen, welcher auch die gemessenen Temperaturen aufzeichnet. Der Temperatursensor T1 misst die Temperatur des oberen PE, während T2 die des unteren PE misst. Der Temperatursensor T3 misst die Temperatur innerhalb der Probe. Er wird so gebogen, dass die Spitze des Temperatursensors Kontakt mit dem Boden, der während eines Versuches im ACD liegenden Petrischale hat.

Auf dem Kupferblock befindet sich das untere PE sowie die Probe. Das obere PE ist auf der Unterseite des Kupferdeckels angebracht. Der Kupferdeckel ist durch eine Kunststoffhaube abgedeckt. Diese soll verhindern, dass die Bauteile durch Kondensation von Wasser aus der Umgebungsluft vereisen. Zur Isolierung ist der Kupferblock von Polyurethanschaumstoff umgeben und befindet sich in einem Edelstahlzylinder. Auf dem Kupferblock befindet sich ein Kupferring mit einer Aussparung an der Rückseite. Die Aussparung dient als Kabelkanal für die Anschlüsse der PEs und die Temperatursensoren. Im geschlossenen Zustand hat der Kupferdeckel Kontakt mit dem Kupferring. Die PEs liegen jeweils in einem isolierenden

Ring mit Einschub aus Polyetheretherketon (PEEK). Der Einschub enthält Kabelkanäle für die Anschlüsse der PEs. Das obere und untere PE liegen sich gegenüber. Im geschlossenen Zustand beträgt ihre Entfernung 14 mm. Zwischen ihnen liegt die Petrischale, in welche während eines Versuchs eine Lösung bzw. ein Schlicker eingebracht werden kann. (vgl. Abbildung 10) Auf dem unteren PE liegt ein PEEK-Ring, welcher die Petrischale umgibt. Dieser hat auf der Oberseite einen Einschub für den Temperatursensor T1, welcher im geschlossenen Zustand Kontakt mit dem oberen PE hat. Auf der Unterseite des PEEK-Rings befindet sich ein weiterer Einschub für den Temperatursensor T2, welcher in direktem Kontakt mit dem unteren PE hat.

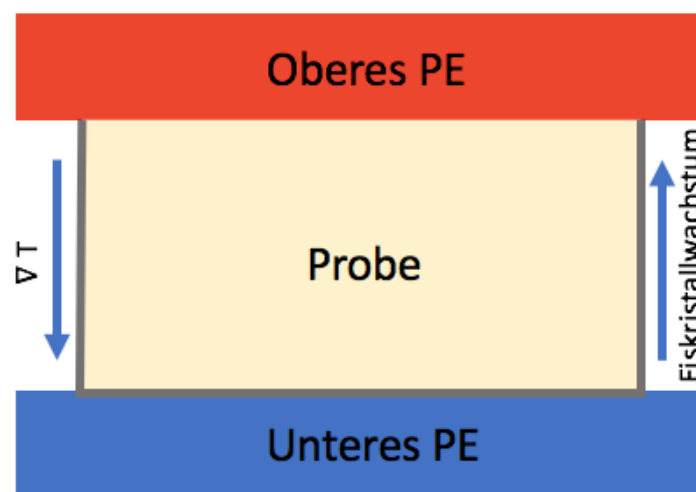


Abbildung 10: Prinzip der Gefrierstrukturierungsanlage. Das obere (rot) und untere (blau) PE liegen sich gegenüber. Dazwischen befindet sich eine Petrischale mit der Probenlösung (gelb). Der externe Temperaturgradient zeigt von dem oberen, wärmeren PE in Richtung des kälteren, unteren PEs. Das Eiskristallwachstum erfolgt in die ihm entgegengesetzte Richtung. Erstellt unter Verwendung von [14].

3.5.2 Allgemeines Vorgehen bei der Gefrierstrukturierung

Vor Beginn der Gefrierstrukturierung wurden die Temperaturen der PEs mit Hilfe der Labornetzgeräte eingestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde das obere PE konstant auf 0 °C gehalten. Die Temperatur des unteren PE wurde entsprechend dem gewünschten Temperaturgradienten angepasst. Die genauen Temperatureinstellungen der PEs für die in der Arbeit verwendeten Temperaturgradienten sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Eingestellte Temperaturen der PEs für den jeweiligen Temperaturgradienten.

∇T [K/mm]	Temperatur PE oben [°C]	Temperatur PE unten [°C]
1,5	0	-21
2	0	-28
2,5	0	-35
3	0	-42
3,5	0	-49

Nach Erreichen des thermischen Gleichgewichts wurde die Lösung mit Hilfe einer Einmalspritze in die Petrischale injiziert. Die von den Temperatursensoren gemessenen Temperaturen wurden während des gesamten Gefrierstrukturierungsprozesses aufgezeichnet. Die Probe galt als gefroren, wenn der Temperatursensor T3 am Boden der Probe 30 s dieselbe Temperatur anzeigte. [14] Die Proben wurden anschließend bei -20 °C zwischengelagert und am Ende eines Versuchstages mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-2 LDPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Deutschland) für 1-2 d bei -58 °C bei 1 mbar gefriergetrocknet.

3.5.3 Gefrierstrukturierung mit Teflonkeilen

Auf Basis der Untersuchungen von Bai, H. *et al.* [17] (vgl. Kapitel 2.6) wurde in dieser Arbeit überprüft, ob ebenfalls eine Reduktion der Domänenanzahl durch die Verwendung von Teflonkeilen unterschiedlicher Steigungen bei der Gefrierstrukturierung beobachtet werden kann. Hierdurch sollte eine noch homogenere Probenmorphologie erhalten werden, wodurch der Aufbau hoch geordneter mechanisch widerstandsfähiger natürlicher Strukturen nachgeahmt werden sollte. [17, 18]

Für die Untersuchung wurden einschichtige Proben aus einer Alginate (2 %)-Lösung mit den in Tabelle 3 angeführten Temperaturgradienten angefertigt, da das Ziel zunächst darin bestand mit Hilfe von Teflonkeilen eine einzelne Domäne in horizontaler Ebene zu erhalten. Sollte dies der Fall sein, wäre die Methode der bidirektionalen Gefrierstrukturierung auf die zweischichtigen Biopolymer-Keramik-Systeme

übertragen worden. Die Probenherstellung erfolgte in Petrischalen mit einem Durchmesser von 55 mm. In der Petrischale befand sich ein Silikonring aus A-Silikon („DUBLISIL 15“, Dreve Dentamid GmbH, Unna, Deutschland) mit einer quadratischen Aussparung in der Mitte. Wurden Proben ohne die Verwendung eines Teflonkeils hergestellt, dann wurde die Alginate (2 %)-Lösung direkt in die quadratische Aussparung injiziert. Bei der Verwendung von quadratischen Teflonkeilen, welche eine Kantenlänge von 24 mm hatten, wurden diese vor Versuchsbeginn in die quadratische Aussparung eingesetzt, um anschließend die Alginate (2 %)-Lösung injizieren zu können. (vgl. Abbildung 11) Nach Erreichen des thermischen Gleichgewichts wurde die Petrischale mit dem darin befindlichen Teflonkeil und der Lösung in das System eingebracht. Das Probenvolumen betrug 4 ml.

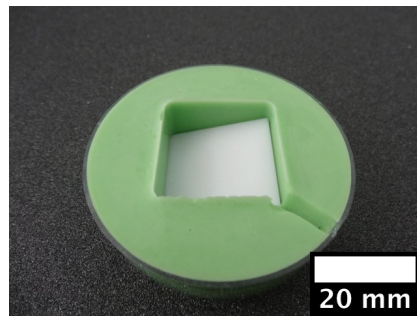


Abbildung 11: Petrischale mit Silikonform und eingesetztem Teflonkeil. In der Silikonform befindet sich eine quadratische Aussparung und darin ein Keil mit einer Steigung von 10°. Am Rand wurde eine Vertiefung für den Temperatursensor ausgeschnitten.

Zwischen dem Boden des Teflonkeils und der Petrischale wurde die Wärmeleitpaste „GC Extreme“ (Gelid Solution Ltd., Kwun Tong, Hong Kong) appliziert. Die verwendeten Teflonkeile hatten Steigungen von 5°, 10° und 15°. Zur Kontrolle wurden Proben ohne die Verwendung von Teflonkeilen als Referenz angefertigt. Der Versuch wurde mit einer Probenanzahl $n=3$ durchgeführt.

3.5.4 Gefrierstrukturierung zweischichtiger Alginate-Bruschart-Systeme

Anschließend wurden zweischichtige Alginate-Bruschart-Systeme durch Gefrierstrukturierung hergestellt, welche als Modell-System zur Nachahmung von osteochondralem Gewebe dienen.

Für die Herstellung der Alginate-Bruschart-Systeme wurde eine Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm verwendet. Das Probenvolumen jeder Schicht betrug jeweils 2 ml. Für die erste Schicht wurde ein Alginate (2 % bzw. 4 %)-Bruschart-Schlicker, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, hergestellt. Das PLR wurde, wie in Tabelle 2 dargestellt,

variiert. Die erste Schicht wurde bei jeder Probe mit einem Temperaturgradienten von 3,5 K/mm hergestellt. Die hierfür eingestellte Temperatur an den PE-Elemente ist Tabelle 3 zu entnehmen. Als die erste Schicht gefroren war, wurde die für die zweite Schicht gewünschte Temperatur an den PE-Elementen eingestellt und anschließend die zweite Schicht auf die erste injiziert. Für die zweite Schicht kam eine Alginat (2 % bzw. 4 %)-Lösung zum Einsatz. (vgl. Abbildung 12)

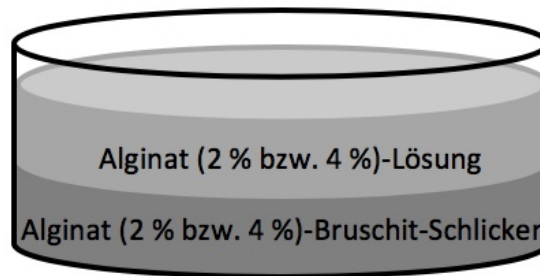


Abbildung 12: Aufbau des zweischichtigen Alginat-Bruschit-Systems. Die erste Schicht besteht aus 2 ml eines Alginat (2% bzw. 4%)-Bruschit-Schlicker. Darauf befindet sich eine zweite Schicht, welche aus 2 ml Alginat (2% bzw. 4%)-Lösung besteht.

Der Temperaturgradient wurde in dieser Schicht, wie in Tabelle 3 dargestellt, variiert. Proben, bei denen der Temperaturgradient in der ersten und zweiten Schicht 3,5 K/mm betrug, wurden mit einer Probenanzahl $n=3$ hergestellt. Die restlichen Proben wurden mit einer Probenanzahl $n=1$ hergestellt. Nachdem die zweite Schicht gefroren war, wurde das gefrierstrukturierte zweischichtige System aus der Gefrierstrukturierungsanlage entnommen und gefriergetrocknet.

3.5.5 Gefrierstrukturierung zweischichtiger Kollagen-Bruschit-Systeme

Nach Herstellung und Untersuchung der zweischichtigen Alginat-Bruschit-Systeme wurden Kollagen-Bruschit-Systeme hergestellt, um hierdurch die Zusammensetzung von osteochondralem Gewebe näher nachzuahmen. Der Versuchsaufbau glich grundsätzlich dem in Kapitel 3.5.4 beschriebenen. Jedoch betrug der Temperaturgradient in der ersten und zweiten Schicht bei allen Proben 3,5 K/mm. Der Massenanteil an Kollagen in der Lösung betrug 4 %. Dieser Massenanteil wurde auf Basis der Ergebnisse des Zugversuchs mit den Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systemen gewählt. Das PLR wurde, wie in Tabelle 4 beschrieben, variiert.

Tabelle 4: Verschiedene PLRs für die Herstellung des Kollagen (4 %)-Bruschit-Schlickers.

PLR [g/ml]	Bruschitpulver [g]	Alginat-Lösung [ml]
0,03:1	0,1	3
0,1:1	0,3	3
0,16:1	0,5	3

Die Herstellung des Kollagen (4 %)-Bruschit-Schlickers und der Kollagen (4 %)-Lösung erfolgte wie in Kapitel 3.4 beschrieben.

3.6 Auswertung der Temperaturoaufzeichnung

Die Temperaturoaufzeichnungen wurden ausgewertet, um hieraus die Kühl- und Erstarrungsraten sowie die Temperaturgradienten der Proben zu berechnen. Hierfür wurden die mit dem Datalogger aufgezeichneten Temperaturverläufe mit der Software „SE309“ Version 3.4.1.0 (Omega Engineering, Connecticut, USA) ausgelesen und mit Hilfe der Software „OriginPro2017G“ (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA) geplottet. Anschließend wurden aus den geplotteten Daten die Kühl- und Erstarrungsraten sowie der Temperaturgradient berechnet.

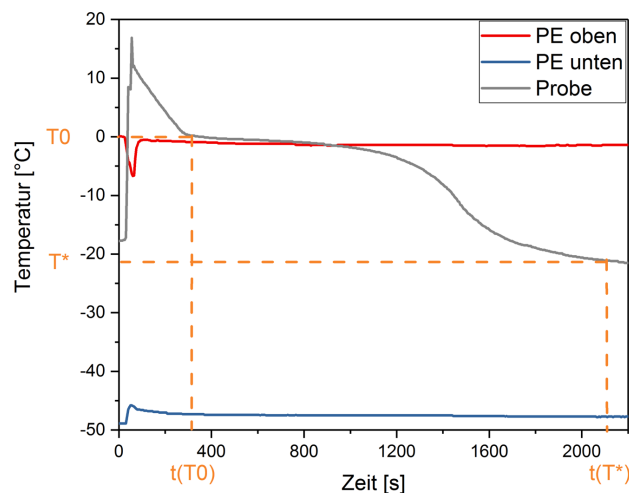


Abbildung 13: Exemplarischer aufgezeichneter Temperaturverlauf während der Gefrierstrukturierung einer Probe. Die rote Linie stellt den Temperaturverlauf des oberen PEs dar, während die blaue Linie die des unteren PEs darstellt. Die graue Linie zeigt den Temperaturverlauf der Probe an. T_0 zeigt an, dass die Temperatur der Probe 0 °C erreicht hatte. $t(T_0)$ gibt die Zeit an, zu der die Probe 0 °C hatte. T^* gibt die Temperatur an, welche die Probe hatte als sie gefroren war. Der Zeitpunkt zu dem die Probe gefroren war wird mit $t(T^*)$ beschrieben.

Der Temperaturgradient wurde nach Formel (4) für die Zeitpunkte als T_* und T_0 erreicht waren, berechnet. T_* beschreibt die Temperatur der gefrorenen Probe. (vgl. Abbildung 13) Es ist die Temperatur, die als Erstes für 30 s gehalten wird. [14] T_0 beschreibt, dass die Probe eine Temperatur von 0 °C hat. Anschließend wurde das arithmetische Mittel der Temperaturgradienten zu beiden Zeitpunkten gebildet sowie die Standardabweichung bestimmt.

Die Kühlrate v_K beschreibt die Wärmeabfuhr pro Zeiteinheit aus der Probe. [14] Die Berechnung der Kühlrate erfolgte nach folgender Formel: [14]

$$v_K = \frac{T_* - T_0}{t(T_*) - t(T_0)} \quad (5)$$

Der Zeitpunkt, zu dem T_* erreicht wurde, wird als $t(T_*)$ beschrieben. Im Vergleich dazu beschreibt $t(T_0)$ die Zeit, zu welcher T_0 erreicht wurde.

Die Erstarrungsrate v_E gibt die Geschwindigkeit der Eisfront an und wird nach folgender Formel berechnet: [14]

$$v_E = \frac{h \cdot 1,09}{t(T_*) - t(T_0)} \quad (6)$$

Hierbei beschreibt h die Höhe der Probe. Der Faktor 1,09 berücksichtigt die, durch das Gefrieren verursachte, Vergrößerung des Probenvolumens. Für Proben, welche unter Verwendung eines Teflonkeils hergestellt wurden, wurde die Höhe wie folgt berechnet:

$$h_{\text{mittel}} = \frac{h_{\text{max}} + h_{\text{min}}}{2} \quad (7)$$

Hierbei steht h_{mittel} für die mittlere Probenhöhe, h_{max} für die höchste Stelle der Probe und h_{min} für die niedrigste Stelle der Probe.

Bei dem in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Teflonkeil-Versuch, wurde für die Probenanzahl $n=3$ das arithmetische Mittel der Kühl- sowie der Erstarrungsrate gebildet. Die Ermittlung der dazugehörigen Fehler erfolgte anschließend anhand der Gaußschen Fehlerberechnung. (vgl. Formel 8 – 16)

Die Berechnung des Fehlers Δv_K der Kühlrate erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel: [147]

$$\Delta v_K = \sqrt{\left(\frac{\partial v_K}{\partial T_*}\right)^2 \cdot \Delta T_*^2 + \left(\frac{\partial v_K}{\partial T_0}\right)^2 \cdot \Delta T_0^2 + \left(\frac{\partial v_K}{\partial t(T_*)}\right)^2 \cdot \Delta t(T_*)^2 + \left(\frac{\partial v_K}{\partial t(T_0)}\right)^2 \cdot \Delta t(T_0)^2} \quad (8)$$

Dabei lassen sich die partiellen Ableitungen der Kühlrate nach den fehlerbehafteten Größen wie folgt beschreiben: [147]

$$\frac{\partial v_K}{\partial T_*} = \frac{1}{t(T_*) - t(T_0)} \quad (9)$$

$$\frac{\partial v_K}{\partial T_0} = -\frac{1}{t(T_*) - t(T_0)} \quad (10)$$

$$\frac{\partial v_K}{\partial t(T_*)} = -\frac{T_* - T_0}{(t(T_*) - t(T_0))^2} \quad (11)$$

$$\frac{\partial v_K}{\partial t(T_0)} = \frac{T_* - T_0}{(t(T_*) - t(T_0))^2} \quad (12)$$

Der Temperatursensor T3 wird beim Entnehmen der gefrorenen Probe aus dem ACD verbogen und muss anschließend händisch wieder in Position gebracht werden. Aus diesem Grund sind Variationen in der Position wahrscheinlich. Daher wurde der Fehler der Temperatur der gefrorenen Probe ΔT_* und der Probe bei 0 °C ΔT_0 mit ± 1 °C eingeschätzt. Der Fehler der dazugehörigen Zeiten $\Delta t(T_*)$ und $\Delta t(T_0)$ wurde auf ± 30 s geschätzt, da der Datalogger die Temperatur nur alle 5 s aufzeichnet, womit eine exakte Angabe nicht möglich ist.

Die Berechnung des Fehlers Δv_E der Erstarrungsrate erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Gaußschen Fehlerfortpflanzung anhand folgender Formel: [147]

$$\Delta v_E = \sqrt{\left(\frac{\partial v_E}{\partial h}\right)^2 \cdot \Delta h^2 + \left(\frac{\partial v_E}{\partial t(T_*)}\right)^2 \cdot \Delta t(T_*)^2 + \left(\frac{\partial v_E}{\partial t(T_0)}\right)^2 \cdot \Delta t(T_0)^2} \quad (13)$$

Die partiellen Ableitungen der Erstarrungsrate nach den fehlerbehafteten Größen lauten wie folgt. [147]

$$\frac{\partial v_E}{\partial h} = \frac{1,09}{t(T_*) - t(T_0)} \quad (14)$$

$$\frac{\partial v_E}{\partial t(T_*)} = - \frac{h \cdot 1,09}{(t(T_*) - t(T_0))^2} \quad (15)$$

$$\frac{\partial v_E}{\partial t(T_0)} = \frac{h \cdot 1,09}{(t(T_*) - t(T_0))^2} \quad (16)$$

Der Fehler der Zeiten $\Delta t(T_*)$ und $\Delta t(T_0)$ wurde, wie bei der Fehlerberechnung der Kühlrate, auf ± 30 s geschätzt. Die Messunsicherheit der Probenhöhe Δh wurde auf $\pm 0,2$ mm geschätzt.

3.7 Mikroskopie

Die Morphologie der gefrierstrukturierten, gefriergetrockneten Proben wurde unter anderem mit Hilfe des Stereomikroskops „Discovery V.20“ (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und der dazugehörigen Software „ZEN2012 pro“ (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) beurteilt. Für den Versuch, welcher in Kapitel 3.5.3 beschrieben ist, wurde jeweils eine Oberflächenaufnahme angefertigt, da hier die Domänen in horizontaler Ebene beurteilbar waren. Bei den zweischichtigen Systemen wurde eine Querschnittsaufnahme angefertigt, wofür die Proben mit einer Rasierklinge zugeschnitten wurden. Anhand dieser wurde untersucht, ob es zu einer Gefrierstrukturierung und einem Verbund beider Schichten kam.

Außerdem wurden Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen der Probenquerschnitte angefertigt, wodurch unter anderem die Porendurchmesser, -orientierung und die Morphologie der Lamellen sowie die der Grenzfläche zweier Schichten untersucht werden konnte, da diese Faktoren einen Einfluss auf die Zellmigration bei *in vivo* Versuchen haben könnten. Hierfür wurden die zugeschnittenen Proben mittels „Leit-C Conductive Carbon“ (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland)-Zement („Leit-C-Zement“) auf Probentellern (Agar Scientific Ltd., Essex, Vereinigtes Königreich) fixiert. Anschließend wurden die Proben in dem Sputtercoater „LEICA EM ACE 600“ (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) mit einer 4 nm dicken Platinschicht beschichtet.

Es wurde für jede Einstellung exemplarisch eine Probe zur Betrachtung unter dem REM „Zeiss Crossbeam 340“ (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) herangezogen. Anhand dieser REM-Aufnahmen wurde, wie bereits erwähnt, die Porenorientierung der Proben beurteilt. Für den in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Versuch wurden Aufnahmen in 30-facher, 50-facher und 100-facher Vergrößerung

angefertigt. Die Beschleunigungsspannung betrug hierbei 5 kV. Der Porendurchmesser wurde anschließend händisch mit Hilfe der Software ImageJ Version 1.25 (National Institutes of Health, Maryland, USA) vermessen. Es wurde der größte sichtbare Durchmesser jeder einzelnen Pore in der REM-Aufnahme einer Probe bei 100facher Vergrößerung bestimmt. Anschließend wurde das arithmetische Mittel gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Bei den zweischichtigen Alginat- bzw. Kollagen- Bruschit-Systemen lag der Fokus der Beurteilung der REM-Aufnahmen auf der Grenzfläche zwischen der ersten und zweiten Schicht. Die Beschleunigungsspannung betrug hierbei 2 kV. Für die Alginat-Bruschit-Systeme wurden Aufnahmen in 500-facher, 100-facher Vergrößerung angefertigt, während für die Kollagen-Bruschit-Systeme zusätzlich eine 50-fache Vergrößerung angefertigt wurde.

3.8 Zugversuch

Mit den zweischichtigen Alginat- bzw. Kollagen-Bruschit-Systemen wurden Zugversuche durchgeführt, um den Verbund der beiden Schichten zu untersuchen. Hierfür wurde aus den Proben mit einem 8 mm Biopsiestanzer (Pfm Medical AG, Köln, Deutschland) Probenmaterial entnommen. Das Probenmaterial wurde nochmals nach Augenmaß in der Mitte mit Hilfe einer Rasierklinge geteilt. Dies diente der Flächenverminderung, um einen sicheren Halt während des Zugversuches sicherzustellen. Die halbierte Probe wurde anschließend mit Leit-C-Zement (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) von oben und unten auf REM-Probenteller (Agar Scientific Ltd., Essex, Vereinigtes Königreich) geklebt und über Nacht getrocknet. Der zuvor beschriebene Aufbau ist in Abbildung 14 dargestellt.

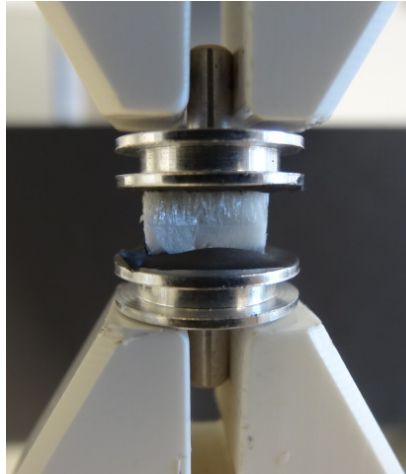


Abbildung 14: Aufbau des Zugversuchs. Oben und unten im Bild sind weiße Klemmen zu sehen, welche die präparierte Probe für den Zugversuch fixieren. Die Klemmen liegen an den Probentellern an, welche oben und unten mit Leit-C-Zement an die Probe geklebt sind. In der Mitte befindet sich die gefrierstrukturierte, gefriergetrocknete Probe in Form eines Halbkreises, welche in diesem Fall ein zweischichtiges Alginat-Bruschit-System ist. Die untere Hälfte ist aus einem Alginat-Bruschit-Schlicker, während die obere Hälfte aus Alginat-Lösung besteht.

Der Zugversuch wurde mit der Bose Electro Force 5500 (Bose Corporation ElectroForce Systems Group, TA Instruments, New Castle, USA) durchgeführt. Die Probenanzahl betrug $n=5$. Für den Zugversuch waren der 250 g und 22 N Kraftaufnehmer in Verwendung. Die Geschwindigkeit betrug 0,005 mm/sec. Die Software WINTEST 7 Version 7.2 2015-09-09 (Bose Corporation ElectroForce Systems Group, TA Instruments, New Castle, USA) zeichnete den zurückgelegten Weg Δh , die dabei aufgewendete Kraft F und die dazugehörige Zeit auf. Aus den aufgezeichneten Daten wurden anschließend, mit folgenden Formeln, die Spannung σ und Dehnung ε berechnet:

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h} \quad (17)$$

$$\sigma = \frac{F}{A} = \frac{F}{\pi \cdot r^2 \cdot 0,5} \quad (18)$$

h steht hierbei für die Höhe der Probe. Der Term $\pi \cdot r^2 \cdot 0,5$ beschreibt die Ober- bzw. Unterfläche A der Probe, wobei r den Radius des Kreises beschreibt. Aus den berechneten Werten konnte ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm erstellt und die maximale Zugfestigkeit ermittelt werden. Für die Angabe der maximalen Zugfestigkeit wurde von den jeweils fünf Proben derselben Einstellung das arithmetische Mittel gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms „SigmaPlot 12.5“ (Systat Software, Inc., Kalifornien, USA)

durchgeführt. Alle Messdaten wurden dem Test auf Normalverteilung nach Kolmogorow unterzogen. Für die Auswertung der Daten des Zugversuchs in Abhängigkeit des PLRs der Alginat-Bruscht-Systeme wurde eine Kruskal-Wallis Varianzanalyse, gefolgt von einem Tukey-Test, durchgeführt (vgl. Abbildung 25), während eine Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test für die Zugfestigkeiten in Abhängigkeit der Alginatkonzentration angewendet wurde. (vgl. Abbildung 26) Für die Analyse der Zugfestigkeiten der Alginat-Bruscht-Systeme im Vergleich zu den Kollagen-Bruscht-Systemen wurde ein t-Test durchgeführt. (vgl. Abbildung 27)

3.9 Untersuchung der bevorzugten Orientierung der Bruschtkristalle

Um eine eventuell vorhandene bevorzugte Orientierung („Preferred Orientation“, PO) der Bruschtkristalle in den gefrierstrukturierten Alginat-Bruscht-Proben zu untersuchen und somit ein näheres Verständnis über den Aufbau der hergestellten Biopolymer-Bruscht-Systeme zu erlangen, wurden XRD-Messungen durchgeführt. Der Alginat-Bruscht-Schlicker wurde mit den PLRs 0,03:1 g/ml bzw. 0,16:1 g/ml sowie den Alginatkonzentrationen 2 % und 4 % hergestellt. (vgl. Kapitel 3.2) Die Probenanzahl betrug $n=1$. Nach der Gefriertrocknung wurde eine XRD-Messung jeder Probe durchgeführt. Hierfür wurde die Unterseite der Probe, welche aus Alginat und Bruscht bestand, gemessen. Als Referenz wurde ebenfalls das lose Bruschtpulver gemessen. Hierbei wurde das Pulver mit Hilfe einer Glasplatte verdichtet und geglättet. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der XRD-Messungen wurden erneut Proben, mit einer Alginatkonzentration in der Lösung von 4 %, hergestellt. Es wurden jeweils zwei Proben mit einem PLR von 0,03:1 g/ml sowie zwei Proben mit einem PLR von 0,16:1 g/ml hergestellt. Die gefrierstrukturierten Proben wurde mit dem XRD dreimalig gemessen. Anschließend wurden die Proben dreimalig gemörsert und nach jedem Mal mörsern eine XRD Messung durchgeführt. Die Daten der XRD-Messungen wurden mit der Software „DIFFRAC.EVA“ (Bruker Corporation, Massachusetts, USA) ausgewertet. Anschließend wurden die Ergebnisse der Auswertung normiert und mit Hilfe der Software „OriginPro 2017G“ dargestellt. (vgl. Abbildung 28)

4 Ergebnisse

4.1 Kühl- und Erstarrungsraten

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Morphologie der gefrierstrukturierten Proben zu optimieren, da, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, bei der Gefrierstrukturierung mehrere Domänen in horizontaler Ebene entstanden. Hierfür kamen Teflonkeile zum Einsatz, die der Erzeugung eines zweiten, horizontal gerichteten Temperaturgradienten dienen sollten. Die hergestellten Proben wurden unter anderem bezüglich ihrer Kühl- und Erstarrungsraten untersucht, welche wie in Kapitel 3.6 beschrieben, berechnet wurden.

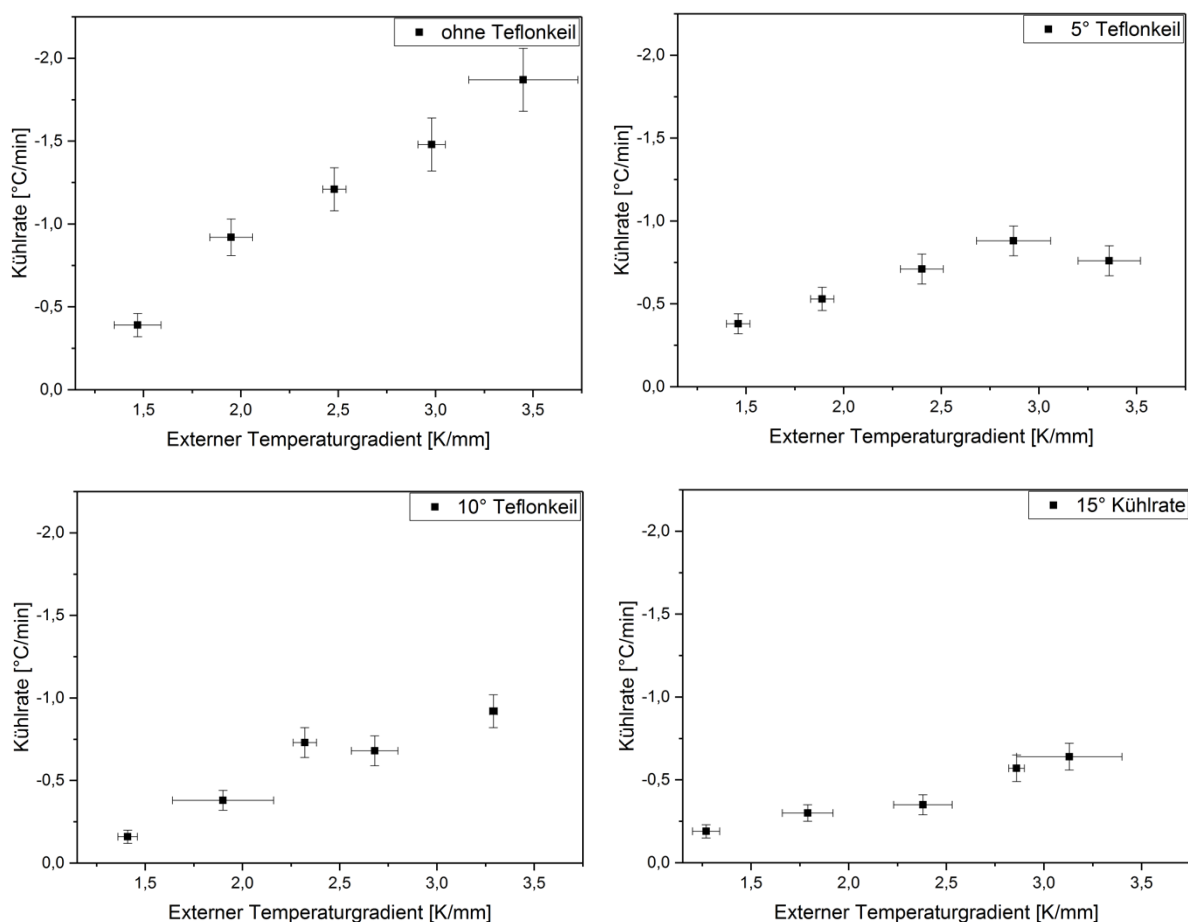


Abbildung 15: Kühlrate in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten. Dargestellt sind die Kühlraten der Proben, welche ohne Teflonkeil (oben links) sowie mit einem 5° (oben rechts), 10° (unten links) und 15° (unten rechts) Teflonkeil hergestellt wurden. Das Probenvolumen betrug $n=3$.

Abbildung 15 stellt die Kühlrate in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten dar. Die höchste Kühlrate war bei den Proben ohne Teflonkeil mit einem Temperaturgradienten von 3,5 K/mm zu beobachten und lag bei $-(1,87 \pm 0,19) \text{ } ^\circ\text{C/min}$. Diese sank mit absteigendem Temperaturgradienten und betrug somit bei 1,5 K/mm $-(0,39 \pm 0,07) \text{ } ^\circ\text{C/min}$. Die Tendenz zur Verringerung der Kühlrate mit absteigenden

4 Ergebnisse

Temperaturgradienten wurde bei allen Teflonkeilsteigungen beobachtet. Außerdem verringerte sich die Kühlrate tendenziell mit zunehmender Steigung des Teflonkeils. Bei einem Temperaturgradienten von beispielsweise 2 K/mm lag die Kühlrate bei den Proben, hergestellt mit 15° Teflonkeilen bei $-(0,30 \pm 0,05)$ °C/min, während diese bei den 10° bei $-(0,38 \pm 0,06)$ °C/min und mit dem von 5° Steigung bei $-(0,53 \pm 0,07)$ °C/min lag. Ohne die Verwendung eines Teflonkeils erhöhte sich die Kühlrate hierbei auf $-(0,92 \pm 0,11)$ °C/min. Der beschriebene Trend konnte bei allen untersuchten Temperaturgradienten festgestellt werden.

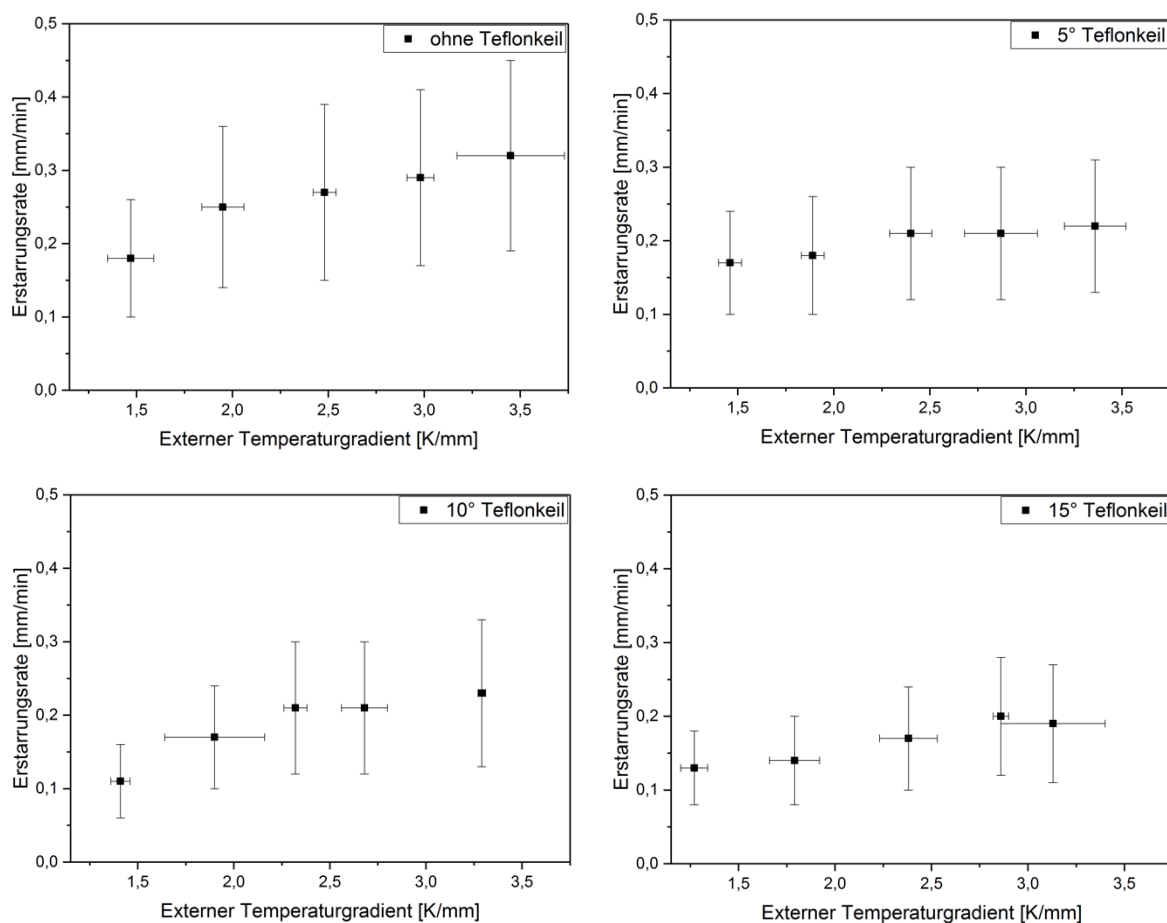


Abbildung 16: Erstarrungsrate in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten. Die Grafik zeigt die Erstarrungsraten von Proben, welche ohne Teflonkeil (oben links) und mit Teflonkeil hergestellt wurden. Die Teflonkeile hatten Steigungen von 5° (oben rechts), 10° (unten links) und 15° (unten rechts). Das Probenvolumen betrug $n=3$.

In Abbildung 16 ist die Erstarrungsrate in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten dargestellt. Ein höherer Temperaturgradient führte tendenziell zu einer Steigung der Erstarrungsrate. Dies konnte bei allen Teflonkeilsteigungen festgestellt werden. Beispielsweise lag die Erstarrungsrate der Proben ohne Teflonkeil und einem Temperaturgradienten von 3,5 K/mm bei $(0,32 \pm 0,13)$ mm/min. Bei einem Temperaturgradienten von 3 K/mm lag diese bei $(0,29 \pm 0,12)$ mm/min. Die

Erstarrungsrate bei dem Temperaturgradienten von 1,5 K/mm betrug $(0,18 \pm 0,08)$ mm/min. Der Vergleich der Erstarrungsraten bei verschiedenen Teflonkeilsteigungen zeigte, dass bei allen Temperaturgradienten eine zunehmende Steigung die Erstarrungsrate tendenziell verringerte. Bei einer Steigung des Teflonkeils von 5° mit einem Temperaturgradienten von 2 K/mm lag die Erstarrungsrate demnach bei $(0,18 \pm 0,08)$ mm/min, während sich diese bei einer Steigung des Teflonkeils von 15° auf $(0,14 \pm 0,06)$ mm/min verringerte.

4.2 Probenmorphologie

4.2.1 Bidirektionale Gefrierstrukturierung von Alginat 2 %-Proben

Zu Beginn der Arbeit wurden, durch bidirektionale Gefrierstrukturierung mit Hilfe von Teflonkeilen, einschichtige Alginat 2 %-Proben hergestellt. Hierdurch sollte, mit dem Ziel einer noch homogeneren Probenmorphologie, wodurch noch bessere mechanische Eigenschaften erhofft wurden, eine einzelne Domäne in horizontaler Ebene ausgebildet werden. [17, 18] Die Probenmorphologie wurde anhand von Stereomikroskopaufnahmen der Oberfläche beurteilt. In der folgenden Abbildung werden exemplarische Oberflächenaufnahmen dargestellt.

4 Ergebnisse

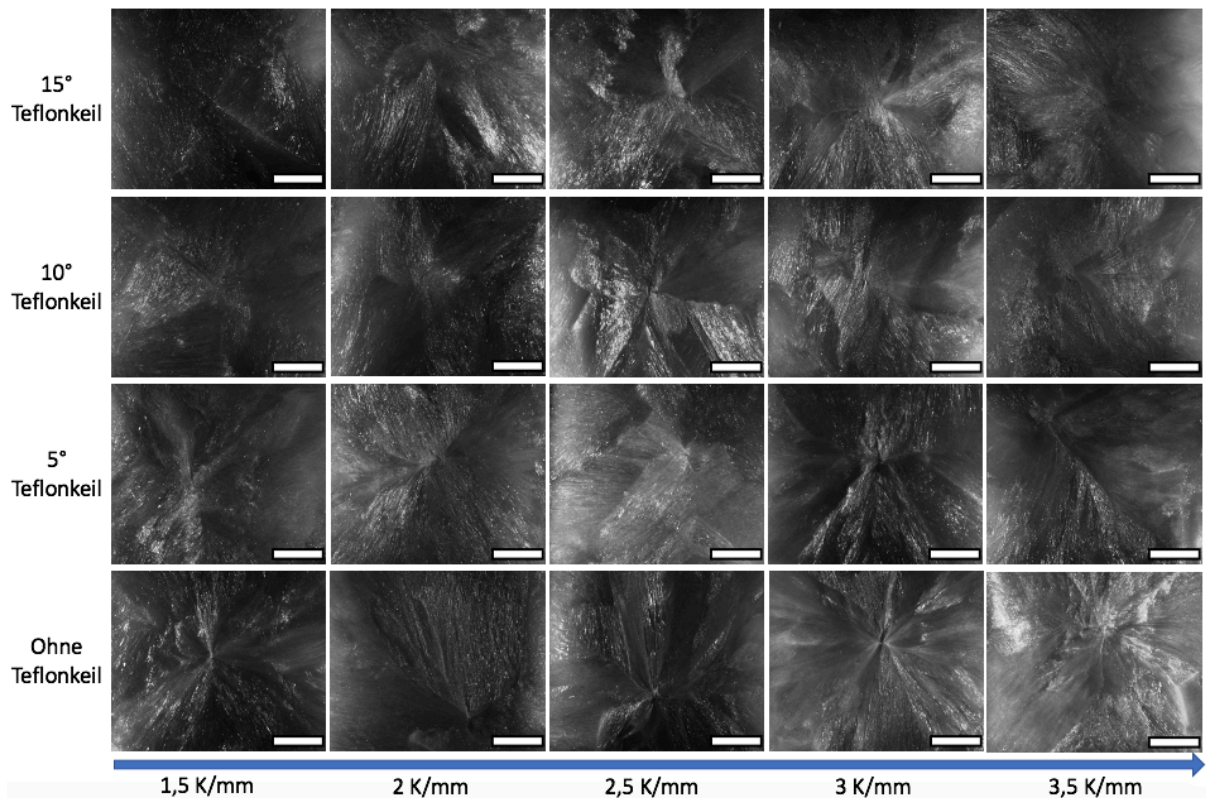


Abbildung 17: Exemplarische Stereomikroskopaufnahmen der Probenoberfläche unter Verwendung von Teflonkeilen in Abhängigkeit des verwendeten externen Temperaturgradienten. Die erste Zeile zeigt Proben, welche mit einem 15° Teflonkeil hergestellt wurden. Die Proben der zweiten Zeile wurden mit einem 10° Teflonkeil hergestellt. In der dritten Zeile sind Proben dargestellt, bei deren Herstellung ein 5° Teflonkeil verwendet wurde, während bei den Proben der vierten Zeile kein Teflonkeil in Verwendung war. Der Maßstab entspricht 4 mm.

In Abbildung 17 sind die Oberflächen von Proben dargestellt, welche aus Alginat (2 %)-Lösung hergestellt wurden. Der Temperaturgradient wurde von 1,5 K/mm bis 3,5 K/mm in 0,5 K/mm-Schritten variiert. Für die Herstellung wurden Teflonkeile mit den Steigungen 5°, 10° und 15° verwendet. Als Referenz dienten Proben, welche ohne zusätzlichen Teflonkeil gefrierstrukturiert wurden. Bei allen untersuchten Proben waren mehrere horizontale Domänen sichtbar.

Zusätzlich zur Oberflächenmorphologie wurde der Probenquerschnitt zur Bestimmung der Porenorientierungen und -durchmessern mittels REM-Aufnahmen untersucht.

4 Ergebnisse

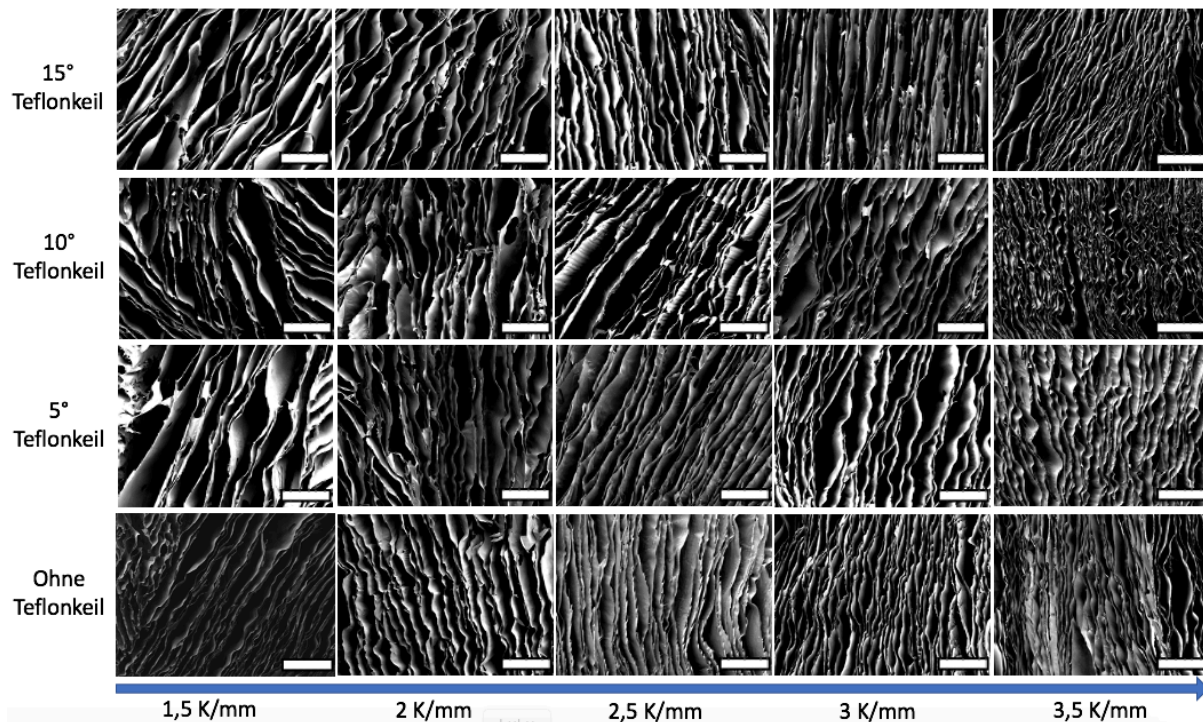


Abbildung 18: REM-Aufnahmen des Probenquerschnitts gefrierstrukturierter Proben zur Bestimmung der Porenorientierung in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten. Die erste Zeile zeigt Proben, welche unter Verwendung eines 15° Teflonkeils hergestellt wurden. Für die Herstellung der Proben der zweiten Zeile wurde ein 10° Teflonkeil, während für die in der dritten Zeile ein 5° Teflonkeil verwendet wurde. In der vierten Zeile sind Proben dargestellt, welche ohne die Verwendung eines Teflonkeils hergestellt wurden. Der Maßstab entspricht 500 µm.

Die in Abbildung 18 dargestellten REM-Aufnahmen zeigen den Querschnitt der Proben. Mit zunehmendem externen Temperaturgradienten richteten sich die Poren tendenziell senkrechter zur Oberfläche aus.

Der Porendurchmesser wurde wie in Kapitel 3.7 beschrieben bestimmt.

4 Ergebnisse

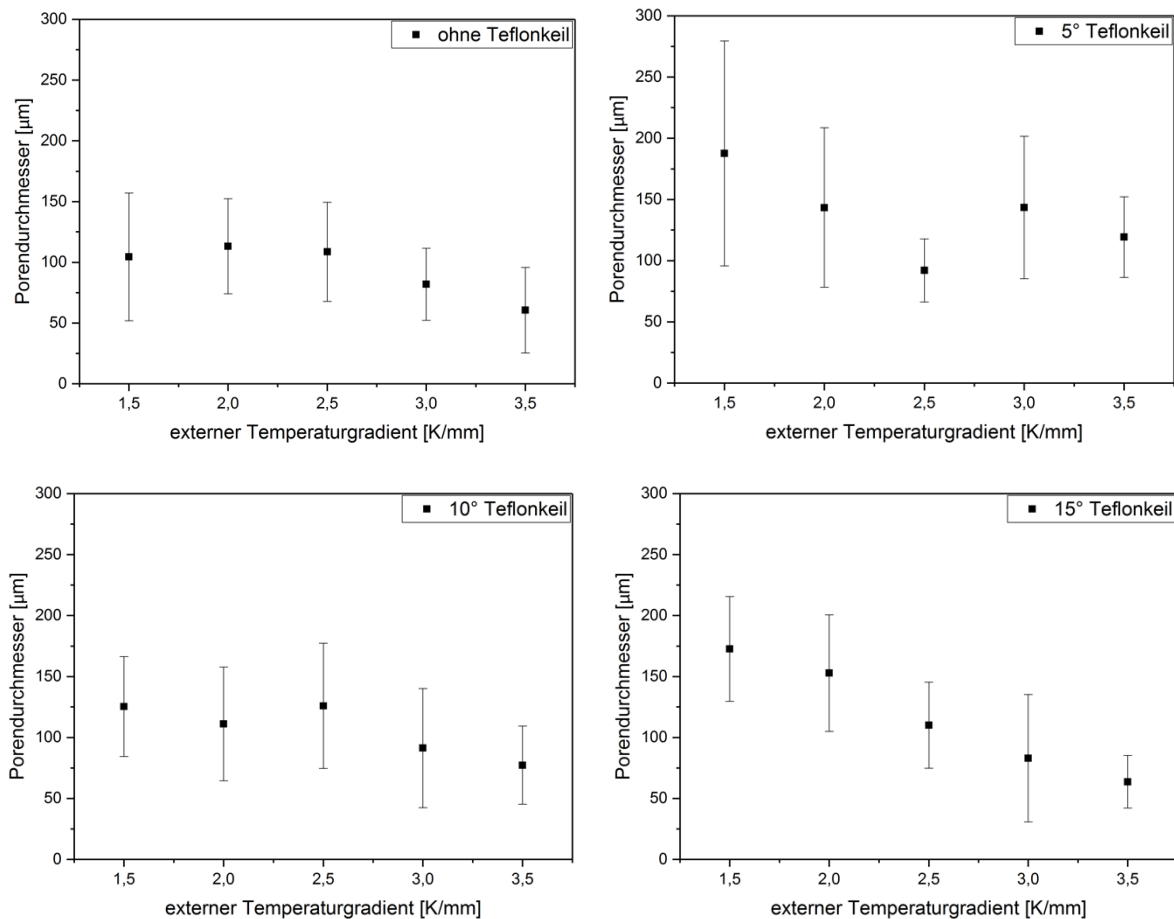


Abbildung 19: Porendurchmesser in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten. Es sind die Porendurchmesser der Proben, welche ohne Teflonkeil (oben links) sowie mit einem 5° (oben rechts), 10° (unten links) bzw. 15° Teflonkeil (unten rechts) hergestellt wurden, dargestellt.

In Abbildung 19 ist der Porendurchmesser in Abhängigkeit des externen Temperaturgradienten dargestellt. Hier zeigte sich, dass sich der Porendurchmesser tendenziell verringerte, je höher der für die Herstellung verwendete Temperaturgradient war. Die Porendurchmesser der untersuchten Poren bewegten sich zwischen etwa 12 μm und 378 μm . Es konnte keine Abhängigkeit des Porendurchmessers von der Steigung der Teflonkeile erkannt werden.

4.2.2 Alginate-Bruschit-Schichtsysteme

Nachdem die Teflonkeile im Herstellungsprozess der Proben nicht zur Ausbildung einer einzelnen Domäne in horizontaler Ebene geführt hatten, wurden die zweischichtigen Biopolymer-Keramik-Systeme ohne die Verwendung von Teflonkeilen gefrierstrukturiert. Zunächst wurden zweischichtige Alginate-Bruschit-Systeme hergestellt, wobei die Alginatkonzentration, das PLR und der Temperaturgradient der zweiten Schicht variiert wurden. (vgl. Kapitel 3.5.4)

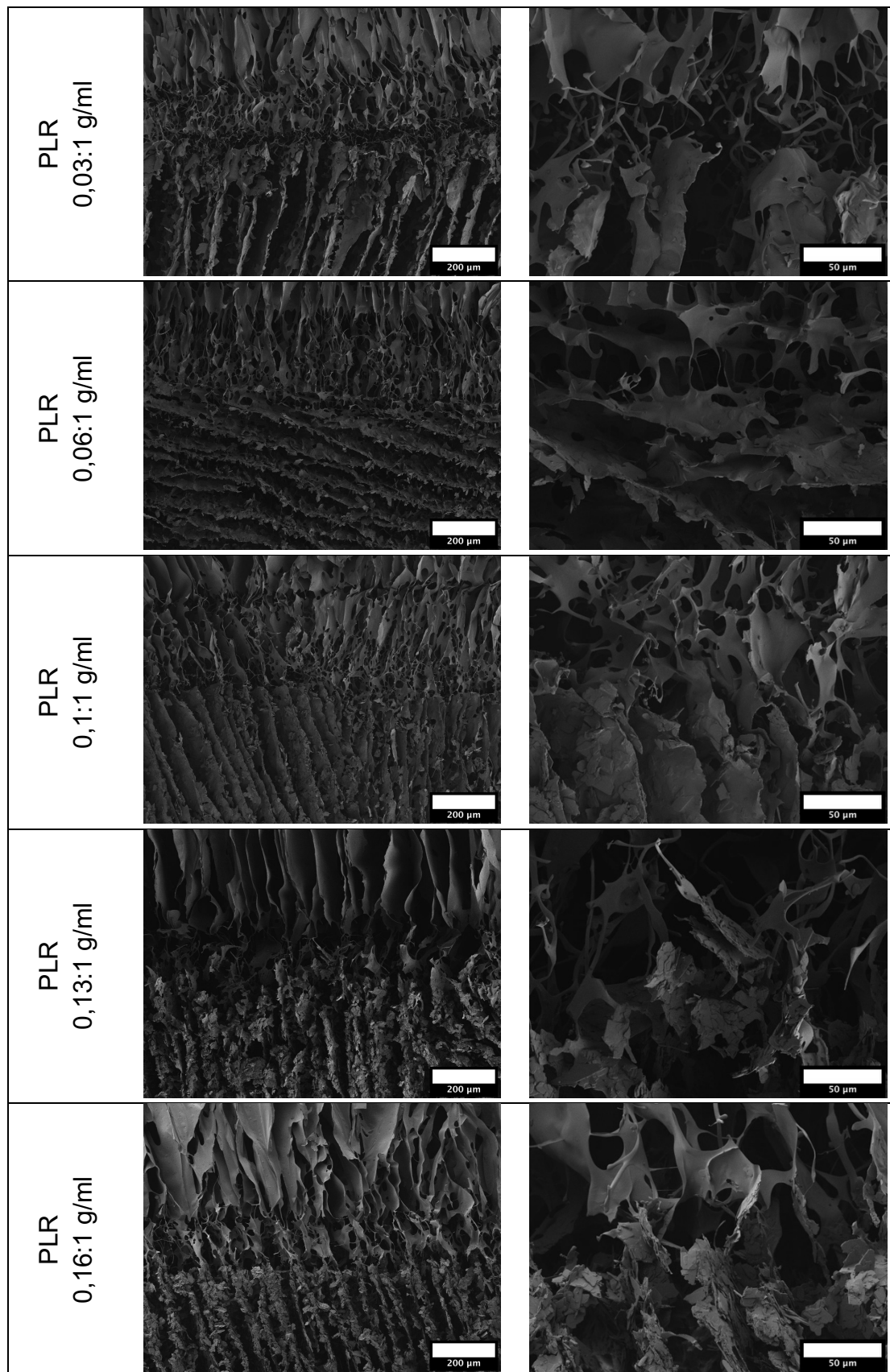


Abbildung 20: REM-Aufnahmen zweischichtiger Alginat (2 %)-Bruscht-Systeme mit verschiedenen PLRs. Der Temperaturgradient betrug während der Gefrierstrukturierung für beide Schichten 3,5 K/mm. In der linken Spalte ist die 100-fache Vergrößerung der Grenzfläche beider Schichten dargestellt, während die rechte Spalte die 500-fache Vergrößerung zeigt. Der Maßstab beträgt 200 µm (linke Spalte) bzw. 50 µm (rechte Spalte).

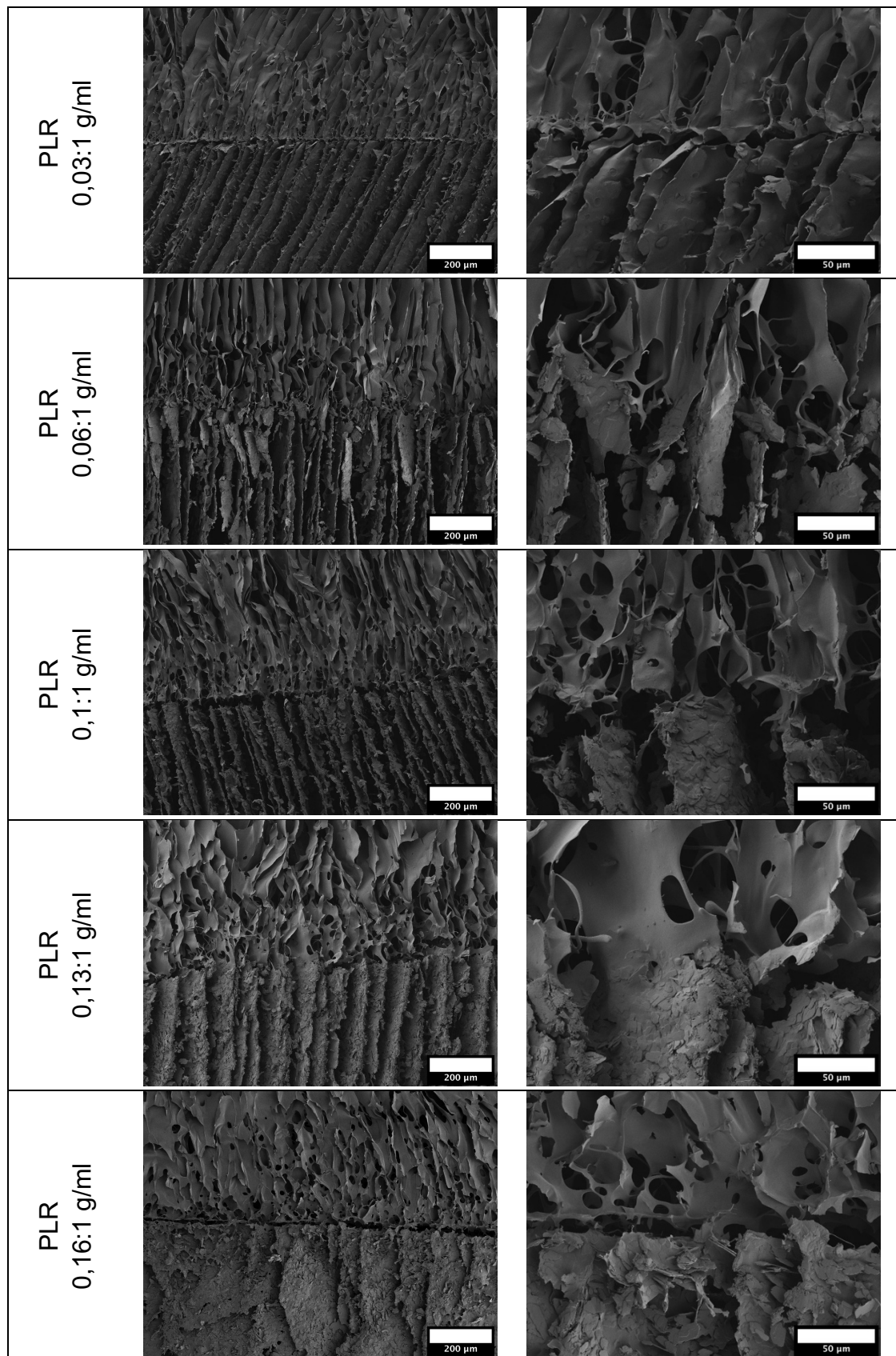


Abbildung 21: REM-Aufnahmen zweischichtiger Alginate (4 %)-Bruscite-Systeme mit verschiedenen PLRs. Der Temperaturgradient betrug während der Gefrierstrukturierung für beide Schichten 3,5 K/mm. Die linke Spalte zeigt die 100-fache Vergrößerung der Grenzfläche der Schichten, während in der rechten Spalte die 500-fache Vergrößerung dargestellt ist. Der Maßstab beträgt 200 µm (linke Spalte) bzw. 50µm (rechte Spalte).

Abbildung 20 bzw. Abbildung 21 zeigen REM-Aufnahmen von Proben, bei denen die untere Schicht aus Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruscht-Schlicker bestand. Das PLR des Schlickers wurde hierbei zwischen 0,03:1 g/ml und 0,16:1 g/ml variiert. In den dargestellten REM-Aufnahmen waren die Bruscht-kristalle in dieser Schicht erkennbar. Für die obere Schicht wurde Alginat (2 % bzw. 4 %)-Lösung verwendet. Hier wiesen die Lamellen eine glatte Oberflächenstruktur auf, wobei teilweise kreisförmige Löcher sichtbar waren. Der Temperaturgradient betrug in beiden Schichten 3,5 K/mm. Die Grenzfläche der beiden Schichten stand im Zentrum der REM-Aufnahmen. Die linke Spalte zeigt die 100-fache und die rechte Spalte die 500-fache Vergrößerung der Grenzflächen. Alle Proben zeigten anisotrop gerichtete Poren und ein Verbund beider Schichten war unabhängig von der verwendeten Alginat-Konzentration gegeben. Dies konnte sowohl in den stereo- als auch rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden. Zudem konnte kein deutlicher Unterschied in der Morphologie der Grenzfläche bei Variation des PLR festgestellt werden. Die Grenzfläche erschien auf den REM-Aufnahmen durchgängig von Lamellen durchzogen. Die Proben der Alginat (2 %)-Bruscht-Systeme zeigten jedoch im Unterschied zu den Alginat (4 %)-Bruscht-Systemen eine Grenzfläche, welche fädiger durchzogen war. Bei den Alginat (4 %)-Bruscht-Systemen war die Grenzfläche weniger fädig und eher durch lamellare Strukturen verbunden.

Zusätzlich wurden Proben hergestellt, bei denen der Temperaturgradient in der unteren Schicht 3,5 K/mm betrug und in der oberen Schicht zwischen 1,5 K/mm und 3,5 K/mm in 0,5 K/mm-Schritten variiert wurde. Bei Variation des Temperaturgradienten in der oberen Schicht kam es bei einigen Proben zu keinem Verbund zwischen den Schichten. Dieses Phänomen konnte bei den Alginat (2 %)-Schichtsystemen etwas häufiger beobachtet werden als bei Alginat (4 %)-Proben und war unabhängig vom PLR sowie dem Temperaturgradienten der oberen Schicht. Bei den Alginat (4 %)-Schichtsystemen wurde ein fehlender Schichtverbund nur bei einer einzigen Probe beobachtet. (vgl. Abbildung 22) Hier lag das PLR bei 0,16:1 g/ml und die obere Schicht wurde bei einem Temperaturgradienten von 1,5 K/mm gefrierstrukturiert. Es war außerdem keine veränderte Porenorientierung zwischen erster und zweiter Schicht bei Variation des Temperaturgradienten zu erkennen. Die Morphologie glich somit tendenziell den Proben, bei denen der Temperaturgradient in beiden Schichten 3,5 K/mm lag.

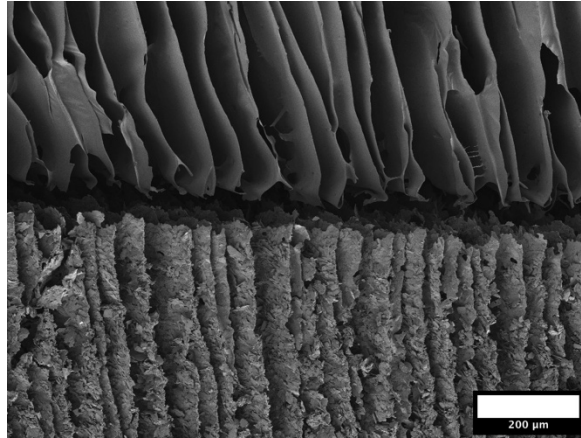


Abbildung 22: Exemplarische REM-Aufnahme einer Probe ohne Verbund der oberen und unteren Schicht. Für die untere Schicht der dargestellten Probe wurde Alginat (4 %)-Bruscht-Schlicker mit einem PLR von 0,16:1 g/ml gefrierstrukturiert. Der Temperaturgradient betrug hierbei 3,5 K/mm. Für die obere Schicht der Probe wurde Alginat (4 %)-Lösung bei einem Temperaturgradienten von 1,5 K/mm gefrierstrukturiert. Der Maßstab entspricht 200 µm.

4.2.3 Kollagen-Bruscht-Schichtsysteme

Nach der gerichteten Gefrierstrukturierung zweischichtiger Alginat-Bruscht-Systeme als Modellsystem, wurde auf Basis der ermittelten Ergebnisse auf zweischichtige Kollagen-Bruscht-Systeme übergegangen. Hierbei wurde für die erste Schicht ein Kollagen (4 %)-Bruscht-Schlicker verwendet. Die zweite Schicht bestand aus einer Kollagen (4 %)-Lösung.

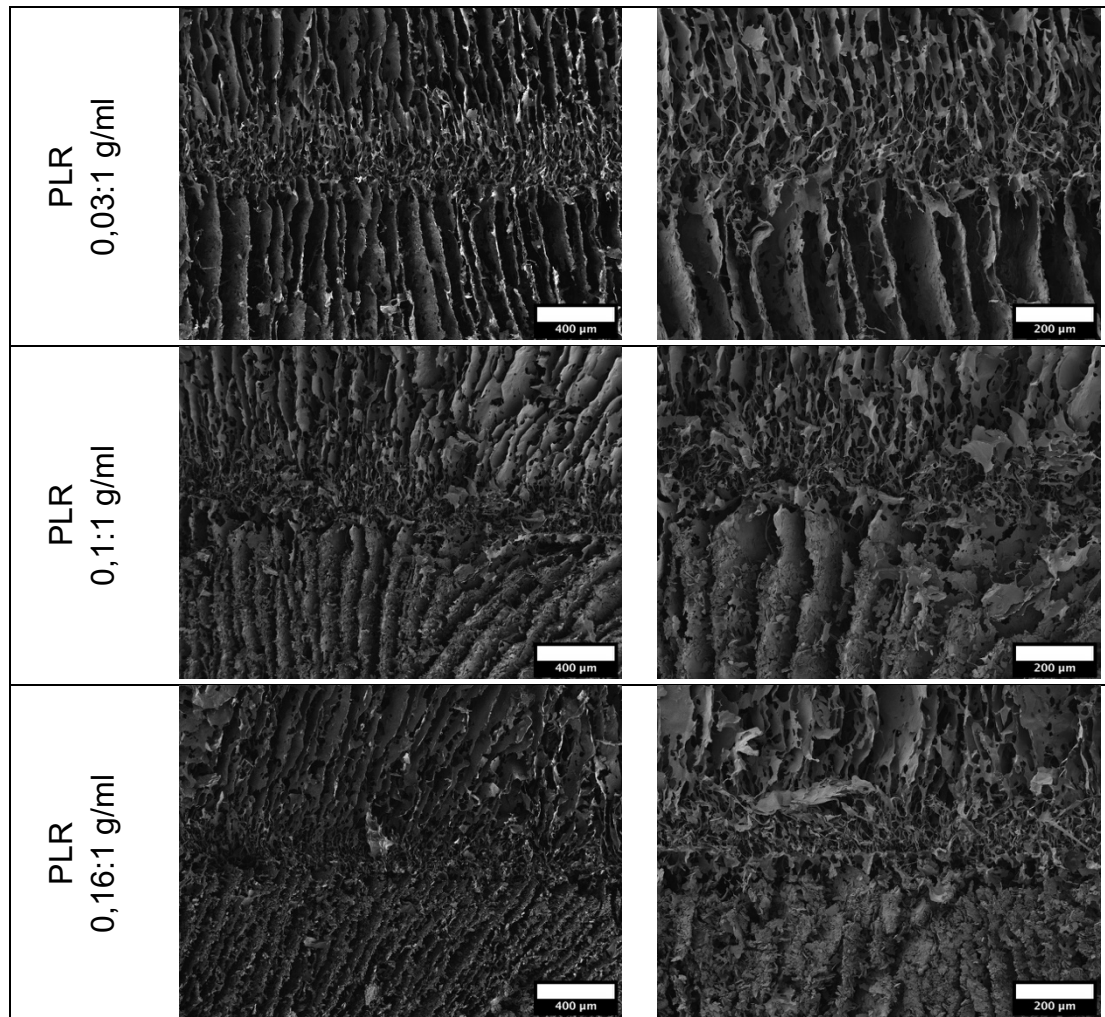


Abbildung 23: REM-Aufnahmen zweischichtiger Kollagen (4 %)-Bruschit-Systeme mit verschiedenen PLRs. Der Temperaturgradienten betrug für beide Schichten 3,5 K/mm. Die erste Zeile zeigt Proben mit einem PLR von 0,03:1 g/ml. Für den Schlicker der Probe in der zweiten Zeile wurde ein PLR von 0,1:1 g/ml gewählt. In der dritten Zeile ist eine Probe mit einem PLR von 0,16:1 g/ml zu sehen. Auf der jeweils linken Seite wird die 100-fache Vergrößerung der Grenzfläche beider Schichten in der Probe dargestellt, während auf der rechten Seite die 500-fache Vergrößerung dieser zu sehen ist. Der Maßstab entspricht 400 µm (linke Spalte) bzw. 200 µm (rechte Spalte).

Abbildung 23 zeigt REM-Aufnahmen eines zweischichtigen Kollagen (4 %)-Bruschit-Systems. Die erste Schicht bestand aus einem Kollagen (4 %)-Bruschit-Schlicker mit den PLRs von 0,03:1 g/ml, 0,1:1 g/ml bzw. 0,16:1 g/ml, die zweite Schicht aus einer Kollagen (4 %)-Lösung. Der Temperaturgradient betrug in beiden Schichten 3,5 K/mm. In Abbildung 23 ist in der linken Spalte die Grenzfläche der jeweiligen Probe zu sehen, welche in vergrößerter Darstellung in der rechten Spalte dargestellt ist. Bei Betrachtung der REM-Aufnahmen wurde deutlich, dass alle hergestellten Systeme einen Verbund beider Schichten aufwiesen. Die lamellare Porenstruktur war durch beide Schichten hinweg zu erkennen. Die erste Schicht erschien aufgrund der in den Lamellen liegenden Bruschitkristalle deutlich dichter. Die Lamellen der oberen Schicht hatten eine glattere Oberfläche und waren mit Löchern, welche aufgrund von

Luftblasen in der Lösung entstanden, unterschiedlicher Größe durchzogen. Direkt an der Grenzfläche der beiden Schichten erschien die Struktur porös und tendenziell wenig strukturiert.

4.3 Mechanische Eigenschaften der Biopolymer-Keramik-Komposite

Der Grenzflächenverbund der zweischichtigen Biopolymer-Keramik-Komposite wurde mit Hilfe von Zugversuchen beurteilt. (vgl. Kapitel 3.8) Zunächst wurden zweischichtige Alginat-Bruschit-Systeme herangezogen, welche mit Alginat (2 % bzw 4 %)-Lösung und den PLRs von 0,03:1 g/ml, 0,1:1 g/ml und 0,16:1 g/ml hergestellt wurden. Hierbei wurden Proben gewählt, welche mit einem Temperaturgradient von 3,5 K/mm in beiden Schichten hergestellt wurden.

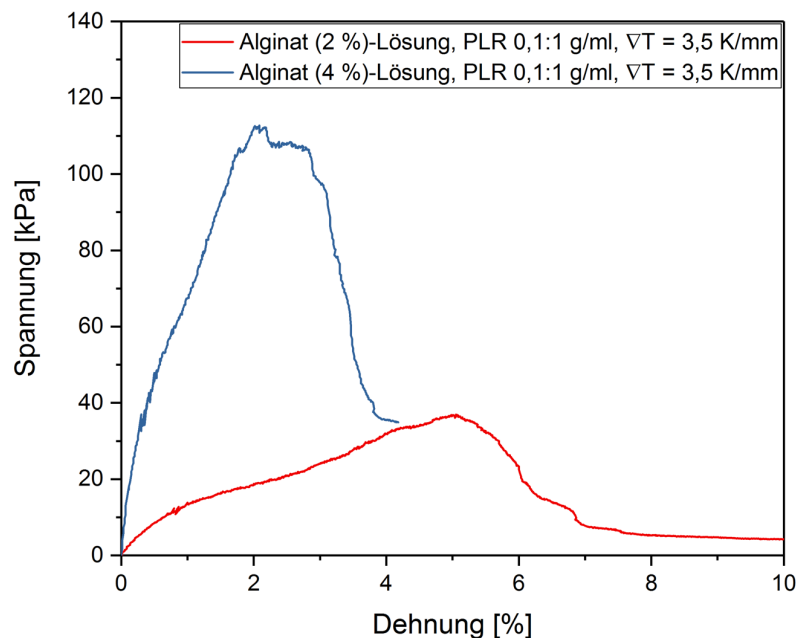


Abbildung 24: Exemplarische Spannungs-Dehnungs-Diagramme von Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systemen. Das PLR betrug 0,1:1 g/ml und der Temperaturgradient lag bei 3,5 K/mm. In blau ist das Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines Alginat (4 %)-Bruschit-Systems dargestellt, wobei das eines Alginat (2 %)-Bruschit-Systems in rot dargestellt ist.

Der Grenzflächenverbund einiger Proben versagte früher und bei höherer Spannung als dies bei anderen Proben der Fall war. Es konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Bruchverhalten und dem PLR bzw. der Alginatkonzentration gefunden werden, weshalb Abbildung 24 rein exemplarische Spannungs-Dehnungs-Diagramme bei einem PLR von 0,1:1 g/ml darstellt.

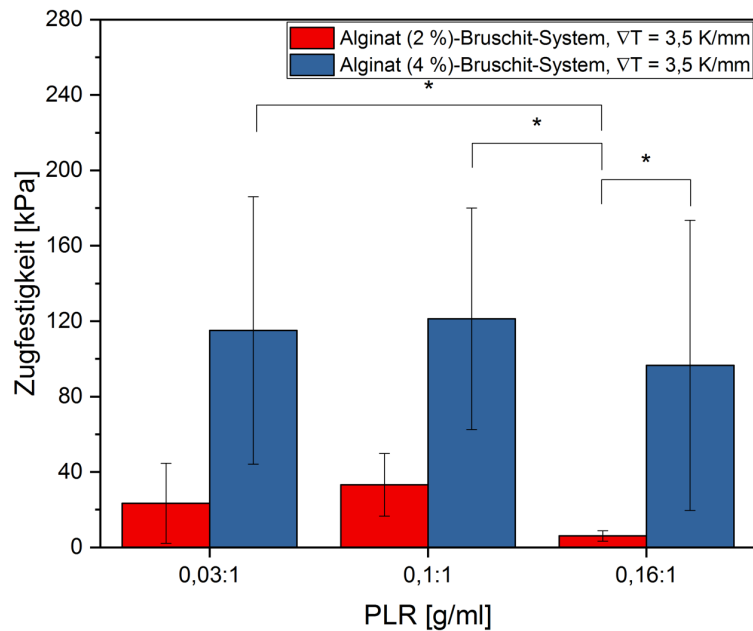


Abbildung 25: Zugfestigkeiten in Abhängigkeit des PLR der Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systeme. Die blauen Balken entsprechen den Zugfestigkeiten der Alginat (4 %)-Bruschit-Systeme, die roten Balken jenen der Alginat (2 %)-Bruschit-Systeme. Beide Schichten wurden mit einem Temperaturgradienten von 3,5 K/mm und den PLRs von 0,03:1 g/ml, 0,1:1 g/ml und 0,16:1 g/ml hergestellt. Das Probenvolumen betrug n=5. *: p<0,001.

Abbildung 25 zeigt die Zugfestigkeiten von zweischichtigen Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systemen mit unterschiedlichen PLRs. Die Zugfestigkeiten der Alginat (2 %)-Bruschit-Systeme waren für alle PLRs kleiner als jene der mit 4 % Alginatkonzentration, wobei ein signifikanter Unterschied (p<0,001) nur bei einem PLR von 0,16:1 g/ml beobachtet wurde. Die Proben mit einem PLR von 0,1:1 g/ml zeigten sowohl bei den Alginat (2 %)- als auch bei den Alginat (4 %)-Bruschit-Systemen tendenziell die höchsten Zugfestigkeiten. Die Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systeme mit dem PLR 0,16:1 g/ml zeigten tendenziell die geringsten Zugfestigkeiten. Die Zugfestigkeit der Alginat (2 %)-Bruschit-Systeme mit einem PLR von 0,16:1 g/ml war signifikant geringer (p<0,001) als die der Alginat (4 %)-Bruschit-Systeme.

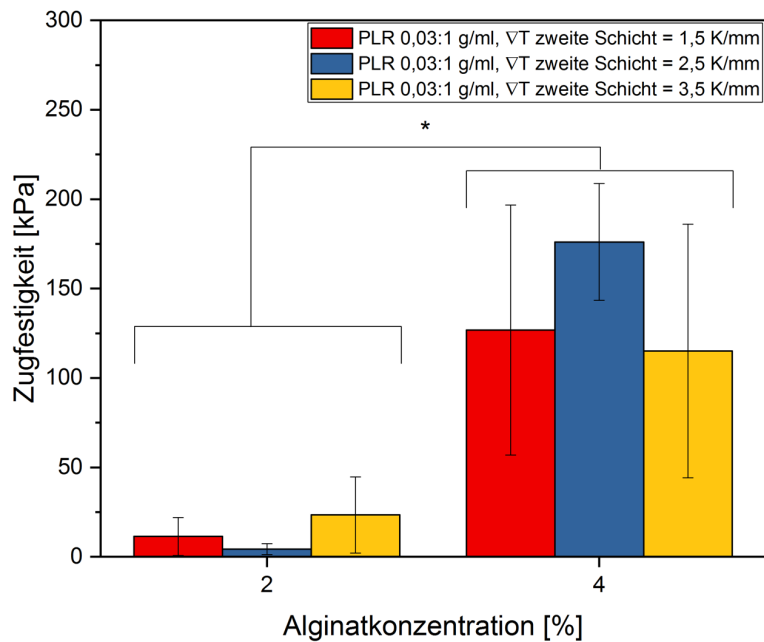


Abbildung 26: Zugfestigkeiten in Abhängigkeit der Alginatkonzentration der Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturgradienten. Das PLR der ersten Schicht betrug 0,03:1 g/ml. Die roten Balken entsprechen Zugfestigkeiten von Proben, bei denen die zweite Schicht mit einem Temperaturgradienten von 1,5 K/mm hergestellt wurde. Der Temperaturgradient der Proben des blauen Balkens war 2,5 K/mm, die des gelben 3,5 K/mm. Das Probenvolumen betrug n=5. *: $p < 0,001$.

Abbildung 26 zeigt die Zugfestigkeiten von zweischichtigen Alginat (2 % bzw. 4 %)-Bruschit-Systemen, bei welchen in der zweiten Schicht der Temperaturgradient zwischen 1,5 K/mm, 2,5 K/mm und 3,5 K/mm variiert wurde. In der ersten Schicht wurde in allen Fällen ein Temperaturgradient von 3,5 K/mm gewählt. Es wird deutlich, dass die Zugfestigkeiten der Alginat (2 %)-Bruschit-Systeme signifikant geringer ($p < 0,001$) als jene der Alginat (4 %)-Bruschit-Systeme, waren. Sowohl bei den Alginat (2 %)- als auch den Alginat (4 %)-Bruschit-Systemen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Temperaturgradienten ermittelt werden.

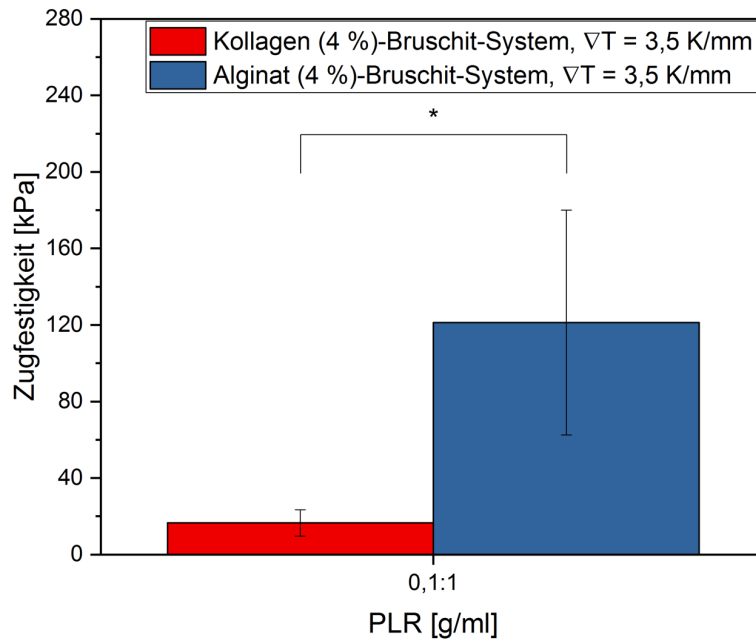


Abbildung 27: Zugfestigkeit in Abhängigkeit des PLR der Alginate (4 %)- und Kollagen (4 %)-Bruschat-Systeme. Der blaue Balken stellt die Zugfestigkeiten der Alginate (4 %)-Bruschat-Systeme dar, der rote Balken hingegen die der Kollagen (4 %)-Bruschat-Systeme. Die Proben wurden mit einem Temperaturgradienten von 3,5 K/mm hergestellt. Der Zugversuch wurde mit einem Probenvolumen von $n=5$ durchgeführt. *: $p < 0,001$

In Abbildung 27 sind die Zugfestigkeiten der Alginate (4 %)-Bruschat-Systeme und der Kollagen (4 %)-Bruschat-Systeme mit einem PLR von 0,1:1 g/ml in der ersten Schicht dargestellt. Die Proben wurden in beiden Schichten mit einem Temperaturgradienten von 3,5 K/mm hergestellt. Die Zugfestigkeit der Kollagen (4 %)-Bruschat-Systeme war mit 16,5 kPa um etwa den Faktor 8 geringer als die der Alginate (4 %)-Bruschat-Systeme.

4.4 Orientierung der Bruschatkristalle innerhalb der Lamellen

Um eine eventuell vorhandene bevorzugte Orientierung (PO) der Bruschatkristalle in den Lamellen der gefrierstrukturierten Proben zu untersuchen, wurden XRD-Messungen (siehe Kapitel 3.9) durchgeführt. Zunächst wurde jeweils eine Probe aus einem Alginate-Bruschat-Schlicker, mit einer Alginate (2% bzw. 4 %)-Lösung und einem PLR von 0,03:1 g/ml bzw. 0,16:1 g/ml, hergestellt. Die Auswertung der XRD-Messungen zeigte, dass die Kristalle in Proben mit Alginate (2 %)-Lösung bei beiden PLRs statistisch orientiert waren, jene der Alginate (4 %)-Proben jedoch nicht. (vgl. Tabelle 5)

4 Ergebnisse

Tabelle 5: Ergebnisse der XRD-Messungen zur bevorzugte Orientierung der Bruschitkristalle von Alginat (2 %)- bzw. (4 %)-Bruschit-Schlickern.

PLR [g/ml]	Alginat (2 %)-Lösung	Alginat (4 %)-Lösung
0,03:1	Statistisch orientiert	Nicht statistisch orientiert
0,16:1	Statistisch orientiert	Nicht statistisch orientiert

Um die nicht statistische Orientierung der Bruschitkristalle bei den Proben mit Alginat (4 %)-Lösung näher zu untersuchen, wurden erneut gefrierstrukturierte Proben mit einem Alginat (4 %)-Bruschit-Schlicker mit den in Tabelle 5 genannten PLRs hergestellt. Die Probenanzahl betrug $n=2$. Die Auswertung der XRD-Messungen zeigte, dass die Bruschitkristalle bei einem PLR von 0,03:1 g/ml keine bevorzugte Orientierung in der (0 2 0)-Kristallebene hatten, dafür eine leichte in der (1 4 -1)- und eine starke in der (1 2 -1)-Kristallebene. Bei einem PLR von 0,16:1 g/ml war hingegen eine starke bevorzugte Orientierung in der (0 2 0)-Kristallebene vorhanden. (vgl. Tabelle 6)

Tabelle 6: Ergebnisse der XRD-Messungen zur bevorzugten Orientierung der Bruschitkristalle von Alginat (4 %)-Bruschit-Schlickern.

Gefrierstrukturierte Proben, Alginat (4 %)-Lösung		
PLR [g/ml]	Probennummer	Ergebnis
0,03:1	1	Keine PO bei (0 2 0) Leichte PO bei (1 4 -1) & starke PO bei (1 2 -1)
	2	Keine PO bei (0 2 0) Leichte PO bei (1 4 -1) & starke PO bei (1 2 -1)
0,16:1	1	Starke PO bei (0 2 0)
	2	Starke PO bei (0 2 0)

Die Orientierung der Bruschitkristalle aller gemörserten Proben war statistisch orientiert. (vgl. Tabelle 7) Die Gefrierstrukturierung der Alginat (4 %)-Bruschit-Schlicker hatte somit zur Folge, dass eine bevorzugte Orientierung der Kristalle zu beobachten war.

4 Ergebnisse

Tabelle 7: Ergebnisse der XRD-Messungen gemörserter Alginat (4 %)-Bruschat-Schlicker zur bevorzugten Orientierung der Bruschatkristalle.

Gemörserte Proben, Alginat 4 %-Lösung		
PLR [g/ml]	Probennummer	Ergebnis
0,03:1	1	Statistisch orientiert
	2	Statistisch orientiert
0,16:1	1	Statistisch orientiert
	2	Statistisch orientiert

Abbildung 28 stellt die gemessenen XRD-Spektren dar. Das Spektrum des losen Bruschatpulvers (schwarze Linie) und das einer gemörserter Probe aus Alginat (4 %) (rote Linie) mit einem PLR von 0,03:1 g/ml dienten als statistisch orientierte Referenz. Hier lag die höchste Intensität bei der (0 2 0)-Kristallebene, gefolgt von der (1 4 -1)- und der (1 2 -1)-Kristallebene.

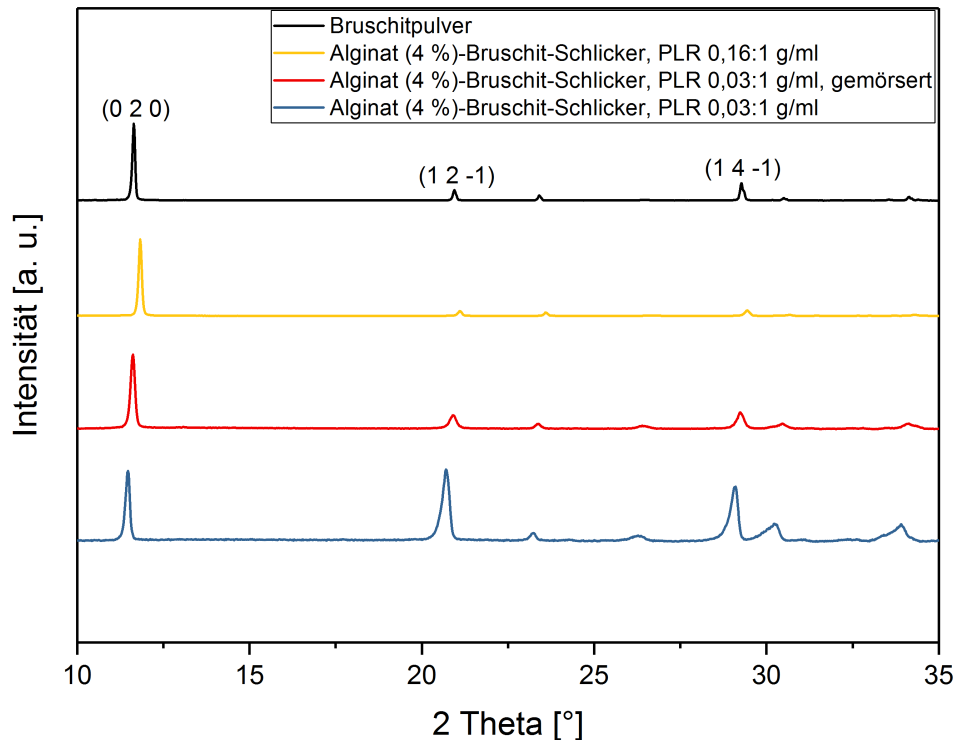


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Ergebnisse der XRD-Messungen bezüglich der bevorzugten Orientierung der Brushitkristalle. Die schwarze Linie entspricht dem XRD-Spektrum des hergestellten Brushitpulvers. Die gelbe Linie zeigt exemplarisch das Spektrum einer Probe, welche mit Alginat (4%)-Lösung und einem PLR von 0,16:1 g/ml hergestellt wurde. Das der blauen Linie entspricht einer Probe, welche mit Alginat (4 %)-Lösung und einem PLR von 0,03:1 g/ml hergestellt wurde. Exemplarisch für die gemörserten Proben wurde das XRD-Spektrum einer gemörserten Probe, welche mit Alginat (4 %)-Lösung und einem PLR von 0,03:1 g/ml hergestellt wurde, dargestellt (rote Linie).

Im Vergleich dazu war bei den Alginat (4 %)-Brushit-Schlickern mit einem PLR von 0,03:1 g/ml (blaue Linie) eine höhere Intensität in der (1 2 -1)- und (1 4 -1)-Kristallebene zu sehen und eine schwächere in der (0 2 0)-Kristallebene. Die Alginat (4 %)-Brushit-Schlicker mit dem PLR 0,16:1 g/ml (gelbe Linie) hatten eine sichtbar niedrigere Intensität in der (1 4 -1)- bzw. (1 2 -1)-Kristallebene als die Referenz-Proben, da hier eine starke bevorzugte Orientierung der Brushitkristalle in der (0 2 0)-Kristallebene vorlag.

5 Diskussion

5.1 Bidirektionale Gefrierstrukturierung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht mittels Teflonkeilen die Ausbildung eines zweiten, horizontal ausgerichteten Temperaturgradienten zu erzeugen, welcher zur Ausbildung nur einer Domäne in horizontaler Ebene führen sollte. [17, 18] Als Basis diente eine Studie von Bai H. *et al.* [17] In der genannten Studie kam es unter Verwendung von Teflonkeilen zur Ausbildung einer einzelnen Domäne in horizontaler Ebene bei den Kühlraten 5 °C/min und 10 °C/min, wenn die Steigung der Teflonkeile 10° und 20° betrug. [17] In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls die Steigungen der Teflonkeile und der Temperaturgradient variiert. Die Steigung der Keile wurde mit 5°, 10° und 15° variiert. Eine höhere Steigung des Teflonkeils war nicht möglich, da die Höhe der verwendeten Petrischale nicht ausreichte, um anschließend noch ausreichend Lösung zur Gefrierstrukturierung darauf zu injizieren. Nach stereomikroskopischer Untersuchung waren jedoch bei allen hergestellten Proben mehrere Domänen in horizontaler Ebene sichtbar. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine zu geringe Kühlrate gewesen sein. In der vorliegenden Arbeit lag die maximal erreichte Kühlrate bei Verwendung von Teflonkeilen bei 1,27 °C/min. Durch die Wahl tieferer Temperaturen bzw. eines kälteren Gesamtsystems hätte die Kühlrate erhöht werden können. (vgl. Abbildung 15) Ebenso hätte in der vorliegenden Arbeit die Wahl eines höheren Temperaturgradienten zu einem Anstieg der Kühlrate geführt. Da das obere PE stetig auf 0 °C eingestellt und lediglich das untere PE an den gewünschten Temperaturgradienten angepasst wurde, wären hier niedrigere Temperaturen als in der Arbeit gewählt notwendig gewesen. Beispielsweise hätte das untere PE für einen Temperaturgradienten von 4 K/mm auf -56 °C eingestellt werden müssen. Solch eine niedrige Temperatur an dem unteren PE war, selbst bei maximaler Leistung des Netzstromgeräts, mit der gewählten Kühlmitteltemperatur von -35 °C schwer erreichbar. Eine Möglichkeit, um tiefere Temperaturen am unteren PE zu erhalten, wäre das Herabsetzen der Temperatur des Gesamtsystems, also der des Kühlmittels, welches durch die Anlage fließt, gewesen. Dies war allerdings aus technischen Gründen nicht möglich, weswegen die Kühlmitteltemperatur nicht frei wählbar und limitiert war. Bai H. *et al.* [17, 18] verwendeten außerdem eine andere Methode zur Gefrierstrukturierung der Proben. Hierbei wurden die Proben mit Hilfe von Flüssigstickstoff auf einer Kupferplatte gefroren, wodurch höhere Kühlraten, mit bis zu -10 °C/min, erreicht wurden. [17] Mit derselben Methode der Gefrierstrukturierung

konnte in einer Studie von Pot, M. W. *et al.* [141] bei einer geringeren Kühlrate von $(0,3 \pm 0,1)$ °C/min die Ausbildung einer einzelnen Domäne in horizontaler Ebene beobachtet werden. Die hergestellten Proben wurden bei unter -78 °C gefroren. Hierbei wurde jedoch ein anderes Keilsystem verwendet, welches aus zwei aufeinanderliegenden Keilen bestand. [141] Der untere Keil bestand aus Obomodulan mit einer niedrigen Wärmeleitfähigkeit, wodurch die Gefrierstrukturierung verlangsamt und ein zweiter Temperaturgradient erzeugt wurde. [141] Darauf lag ein gut wärmeleitfähiger Aluminiumkeil, durch welchen die verwendete Typ I Kollagen-Suspension zur Gefrierstrukturierung auf eine plane Oberfläche injiziert werden konnte. [141] Die Ergebnisse der Studie könnten darauf hinweisen, dass zur Ausbildung einer einzelnen horizontalen Domäne ein kälteres Gesamtsystem als in der vorliegenden Arbeit realisierbar war, notwendig gewesen wäre. Die Ergebnisse der Studie von Pot, M. W. *et al.* [141] konnten jedoch aufgrund des anderen Versuchsaufbaus nicht direkt auf den Versuch zur bidirektionalen Gefrierstrukturierung in der vorliegenden Arbeit übertragen werden. Die in dieser Arbeit hergestellten Proben hatten trotz mehrerer Domänen in horizontaler Ebene einen hoch geordneten sowie anisotropen Aufbau. Ob nun eine einzelne Domäne in horizontaler Ebene, im Gegensatz zu mehreren, einen wesentlich positiveren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften oder die Geweberegeneration hätte, sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Die zur Untersuchung der bidirektionalen Gefrierstrukturierung hergestellten monolithischen Alginat (2 %)-Proben wurden unter anderem bezüglich ihres Porendurchmessers und der Porenorientierung untersucht. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Temperaturgradienten und somit zunehmender Kühlrate der Porendurchmesser sank und sich die Poren tendenziell senkrechter zur Oberfläche ausrichteten. Diese Ergebnisse stimmten mit der Literatur überein, worin eine höhere Kühlrate ebenfalls zu einem niedrigerem Porendurchmesser und senkrechteren Poren führte. [14, 141, 148, 149] Der Porendurchmesser in der vorliegenden Arbeit war etwas niedriger als aufgrund vergleichbarer Literatur erwartet. [15] Hierbei wurde beispielsweise bei einem Temperaturgradienten von $1,5$ K/mm ein durchschnittlicher Porendurchmesser von circa 200 μm [15] angegeben, während dieser in der vorliegenden Arbeit ohne die Verwendung eines Teflonkeils bei circa 104 μm lag. In der genannten Studie wurde dieselbe Gefrierstrukturierungsanlage wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, wobei das Kühlmittel auf -25 °C abgekühlt wurde. Das

hierdurch resultierende wärmere Gesamtsystem könnte ein Grund für den größeren Porendurchmesser sein. [149] Die Kühlraten lagen im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit bei denselben Temperaturgradienten jedoch höher, wodurch ein niedrigerer Porendurchmesser zu erwarten gewesen wäre. Weitere Faktoren, welche den Unterschied der Porendurchmesser erklären könnten, sind die Konzentration an Feststoffen in der Lösung sowie die Größe und Form dieser. [13, 14, 150] Somit könnte die Verwendung eines anderen Alginatpulvers und die Konzentration dessen in Lösung von 5,5 % ebenfalls Gründe für die Abweichungen darstellen. [14] Außerdem erfolgte die Errechnung des Porendurchmesser auf andere Weise als in der vorliegenden Arbeit, wobei die Poren als Ellipsen angesehen wurden. [14] Die Durchmesser der Poren wurden im Programm „Image J 1.43m“ mit Hilfe einer sogenannten Maske ermittelt und somit nicht einzeln händisch vermessen. [14] Anschließend wurden die Porenflächen errechnet, normalisiert und darauffolgend in Abhängigkeit der gemessenen Porendurchmesser dargestellt. [14] Bei einem normalisierten Flächenwert von 0,5 wurden die dazugehörigen Porendurchmesser ermittelt und in Folge verglichen. [14] Aufgrund der genannten Faktoren ist der direkte Vergleich der Porendurchmesser, mit denen im Zuge dieser Arbeit ermittelten, bedingt aussagekräftig.

Laut der Literatur liegt der empfohlene Porendurchmesser für die Zellmigration im Rahmen der Knochenregeneration zwischen 100 μm und 500 μm [151, 152], während der für die Knorpelregeneration zwischen 40 μm und 300 μm liegen sollte. [132, 153] Das Minimum für die Knochenregeneration wurde bei den Proben mit einem Temperaturgradienten von 3,5 K/mm bzw. 3 K/mm teilweise unterschritten, weshalb unter diesem Aspekt die Wahl eines niedrigeren Temperaturgradienten als vorteilhaft erscheint. Allerdings ist zu erwähnen, dass in der vorliegenden Arbeit der Porendurchmesser von Alginat-Proben untersucht wurde, während für die Knochenregeneration eventuell keramische Ausgangsmaterialien eingesetzt werden würden. Dies hätte je nach Partikelgröße zur Folge, dass der Temperaturgradient zum Erhalt eines geeigneten Porendurchmessers nochmals deutlich niedriger sein müsste. [133] In Anbetracht der Knorpelregeneration lagen alle Porendurchmesser der hergestellten Proben im empfohlenen Bereich. Aufgrund der Ergebnisse der Analyse zum Porendurchmesser war außerdem anzunehmen, dass der externe Temperaturgradient durch den Teflonkeil abgeschwächt wird, wodurch die Kühlrate geringer wird und der Porendurchmesser steigt. Die Kühlrate sank tatsächlich je höher

die Steigung des Teflonkeils war, jedoch konnte hierbei keine eindeutige Auswirkung auf den Porendurchmesser beobachtet werden.

5.2 Biopolymer-Keramik-Komposite

Da die Teflonkeile nicht zu dem erwünschten Effekt führten, wurden die weiteren Untersuchungen ohne die Verwendung von Teflonkeilen durchgeführt. Zunächst wurden zweischichtige Alginat-Bruskit-Systeme als Modellsysteme hergestellt. Die gewählten Alginatkonzentrationen, Temperaturgradienten und PLRs wurden aufgrund von den Ergebnissen durchgeführter Vorversuche gewählt. Hierbei zeigte sich eine gut sichtbare lamellare Struktur der Proben bei Alginatkonzentration von 2 % und 4 % in der Lösung und bei PLRs zwischen 0,03:1g/ml und 0,16:1 g/ml. Der maximal und minimal einstellbare Temperaturgradient lag bei 1,5 K/mm und 3,5 K/mm. Die Ober- und Untergrenze des Temperaturgradienten wurde anhand von technischen Limitationen gewählt. Anschließend wurden Kollagen-Bruskit-Systeme hergestellt, um die native Zusammensetzung von osteochondralem Gewebe nachzuahmen. Die Kollagenkonzentration in der Lösung betrug hier 4 %, da eine geringere Konzentration zu einer mechanisch instabilen Probe führte, welche schon beim Herausnehmen aus der Petrischale zerfiel und somit nicht mehr analysiert werden konnte. Auf eine Variation des Temperaturgradienten zwischen unterer und oberer Schicht wurde verzichtet, da auf Basis der durchgeführten Vorversuche kein vorteilhafter Effekt zu erwarten war. Es wurde ein maximaler Temperaturgradient von 3,5 K/mm in beiden Schichten gewählt, da hierbei die Probe am schnellsten gefror, was für eine systematische Untersuchung mehrerer Parameter praktikabel erschien.

Bei Herstellung der ersten Schicht der Systeme, welche Knochen imitieren sollte, wurde, neben einem Biopolymer, das CaP Bruskit verwendet. Die anorganische Phase des nativen Knochens besteht jedoch überwiegend aus dem CaP Hydroxylapatit (HA). [23] Das in der derzeitigen Forschung zur Regeneration von osteochondralem Gewebe am häufigsten verwendete CaP ist daher HA, aber auch Tricalciumphosphat (TCP). [154-158] In der vorliegenden Arbeit wurde dennoch das überwiegend schnell abbaubare CaP Bruskit gewählt, da diese Eigenschaft einen günstigen Einfluss auf die Remodellierung des Knochens haben könnte. [14, 159] Es wird davon ausgegangen, dass durch den schnelleren Abbau, als dies beispielsweise bei HA der Fall ist, der Regenerationsprozess schneller von statten geht. [14, 159] Typ II Kollagen wurde gewählt, da hyaliner Gelenknorpel hauptsächlich daraus aufgebaut

ist. [19] Den Kollagen-Bruscht-Systemen hätte zusätzlich Chondroitinsulfat beigefügt werden können, um die native Zusammensetzung von osteochondralem Gewebe nachzuahmen. [14] Es ist das hauptsächlich vorkommende Proteoglykan in der extrazellulären Matrix des Knorpels und diese sind insbesondere für die Druckfestigkeit, aufgrund der Fähigkeit zur Wasserretention, von Bedeutung. [160, 161] Zhou F, *et al.* [162] zeigten außerdem in einer *in vivo* Studie, dass Zellträgermatrices aus Seidenfibroin unter Zugabe von Chondroitinsulfat zu einer vermehrten und besseren Geweberegeneration in osteochondralen Defekten führten als Zellträgermatrices, welche rein aus Seidenfibroin bestanden. Stuckensen K. [14] gefrierstrukturierte mehrschichtige Kollagen-Keramik-Systeme unter Zugabe von Chondroitinsulfat. Hierbei konnte in einem *in vivo* Versuch gezeigt werden, dass diese Systeme ohne die Zugabe externer Wachstumsfaktoren zu einer Typ II Kollagen und Aggrecan Expression im Gewebe führten. [14] Die Zugabe von Chondroitinsulfat zu den Kollagen-Bruscht-Systemen der vorliegenden Arbeit könnte ebenfalls diesen Effekt bewirken. Außerdem stellte Semyari *et al.* [151] im Rahmen einer Studie zur Knochenregeneration einschichtige Kollagen I-HA-Doxycyclin-Systeme mittels Gefrierstrukturierung her. Hierbei zeigte sich *in vivo*, dass das Antibiotikum Doxycyclin in den Systemen zu einer besseren Knochenheilung führte als dies bei Systemen ohne diesem der Fall war. Somit wäre es ebenfalls möglich, dass Doxycyclin in zweischichtigen osteochondralen Systeme zu einer besseren Regeneration des Gewebes führen würde, weshalb dies ein weiterer Ansatz zukünftiger Forschung sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die genannten möglichen Modifikationen der Zusammensetzung der Systeme jedoch verzichtet, da mit den hergestellten Kollagen-Bruscht-Systemen keine *in vitro* oder *in vivo* Versuche geplant waren. Zudem lag der Fokus auf der systematischen Untersuchung des Einflusses verschiedener Parameter, wie der Kollagen-Konzentration in der Lösung oder des PLRs im Schlicker auf die Probenmorphologie. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Beurteilung des Grenzflächenverbundes.

Die Herstellung der zweischichtigen Biopolymer-Keramik-Systeme erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die erste Schicht, welche aus Alginat- bzw. Kollagen-Bruscht-Schlicker bestand, gefrierstrukturiert. Als diese gefroren war wurde die zweite Schicht, welche aus Alginat- bzw. Kollagen-Lösung bestand, gefrierstrukturiert. Da die für die zweite Schicht verwendete Alginat- bzw. Kollagen-Lösung Raumtemperatur hatte, ist davon auszugehen, dass die Oberfläche der ersten Schicht bei Kontakt mit

dieser leicht antaute, wodurch es zu einem Verbund beider Schichten kam. Einen weiteren Ansatz zur Herstellung zweischichtiger monolithischer Systeme, welcher jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, könnte die Gefrierstrukturierung beider Schichten auf einmal darstellen. Hierfür würde der Schlicker, welcher die erste Schicht darstellt, in die Petrischale injiziert werden und unmittelbar darauf die Lösung, welche die zweite Schicht darstellt. Aufgrund der hohen Viskosität des Schlickers bzw. der Lösung ist nicht mit einem Vermischen der Schichten über die Grenzfläche hinaus zu rechnen. Diese Methode erscheint effizienter, da die Gefrierstrukturierungsanlage nur einmalig geöffnet werden muss. Außerdem könnte es zu einem Grenzflächenverbund führen, welcher durchgängig von Lamellen durchzogen ist und nicht wie beispielsweise bei den Kollagen-Bruschi-Systemen einen tendenziell isotrop porösen Übergang aufweist. (vgl. Abbildung 23) In der vorliegenden Arbeit wurden die Systeme jedoch nicht auf diese Weise hergestellt, da im Rahmen der systematischen Untersuchung unter anderem der Temperaturgradient zwischen erster und zweiter Schicht variiert werden sollte, was unter Anwendung der zuvor beschriebenen alternativen Methode nur schwer zu realisieren gewesen wäre.

Zur morphologischen Beurteilung der Grenzflächen der zweischichtigen Systeme wurden unter anderem REM-Aufnahmen herangezogen. Bei einigen Proben schienen die Lamellen nicht durchgängig geschlossen zu sein, sondern wiesen homogen verteilt Löcher auf, während dies bei anderen Proben nicht beobachtet werden konnte. Dies könnte eventuell dadurch bedingt sein, dass beim Aufnehmen der Lösung in die Einmalspritze oder beim Injizieren der Lösung in die Petrischale Luft miteingeschlossen wurde. Außerdem zeigten sich die Lamellen der Alginat-Bruschi-Systeme geschlossener als jene der mit Kollagen-Systeme. Hierbei wurde ein Massenanteil von Typ II Kollagen in der Lösung von 4 % verwendet. Zur Herstellung der Kollagen-Lösung wurde das extrahierte Kollagenpulver in 0,5 M Essigsäure gelöst. Die Kollagen (4 %)-Lösung wurde anschließend nicht zentrifugiert, da dies zu einer kleinen Menge eines gelierten Bodensatzes aus Kollagen in dem Zentrifugenröhrchen führte. Ein längeres Rühren der Kollagenlösung hätte die Bildung des Bodensatzes verhindern können, wodurch ein Zentrifugieren der Lösung zur Elimination von Lufteinschlüssen möglich gewesen wäre. [46, 163] Außerdem wäre es möglich durch eine Erhöhung der Konzentration der Essigsäure eine noch geschlossener Wandstruktur der Poren in der Probe zu erhalten, wodurch sich jedoch auch der

Porendurchmesser verringern würde. [141] Somo *et al.* [164] zeigte, dass eine erhöhte Interkonnektivität innerhalb von Hydrogel-Systemen zur Geweberegeneration *in vivo* eine schnellere Vaskularisierung zur Folge hatte, weshalb die homogen verteilten Löcher in den Lamellen der in der vorliegenden Arbeit generierten Kollagen-Bruschi-Systeme auch einen positiven Einfluss auf die Geweberegeneration haben könnten.

Bei der morphologischen Beurteilung der Alginat-Bruschi-Systeme war bei wenigen Proben kein Verbund beider Schichten vorhanden. Die einzige Gemeinsamkeit dieser Proben war, dass hierbei die erste und zweite Schicht mit unterschiedlichen Temperaturgradienten gefrierstrukturiert wurden. Außerdem kam es vermehrt zu keinem Verbund, wenn die zweite Schicht bei eher niedrigeren Temperaturgradienten gefrierstrukturiert wurde. Es konnte keine Abhängigkeit vom PLR beobachtet werden. Der Umfang der Proben, welche keinen Verbund beider Schichten aufwiesen, war jedoch gering, weshalb es möglich ist, dass es sich hierbei um Zufall handelte.

Die Schichten der Kollagen-Bruschi-Systeme wurden bei einem externen Temperaturgradient von 3,5 K/mm gefrierstrukturiert. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass trotz desselben Temperaturgradienten die Kühlrate der zweiten Schicht geringer war als die der ersten. Da die zweite Schicht nicht in direktem Kontakt mit dem kalten PE war, wie dies bei der ersten der Fall ist, erfolgte eine langsamere Wärmeabfuhr, wodurch diese Schicht auch länger brauchte bis sie gefroren war. Ob die Dichte der ersten Schicht einen Einfluss auf die Wärmeabfuhr der oberen Schicht hatte wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es ist jedoch möglich, dass die Wärmeabfuhr aus der zweiten Schicht durch einen hohen PLR in der ersten langsamer stattfindet als dies bei niedrigem der Fall wäre.

Außerdem wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Bruschi-Kristalle im gefrierstrukturierten Alginat-Bruschi-Schlicker eine bevorzugte Orientierung hatten. Mit Hilfe der XRD-Messungen wurde festgestellt, dass die Bruschi-Kristalle im gefrierstrukturierten Alginat (2 %)-Bruschi-Schlicker statistisch orientiert waren, im gefrierstrukturierten Alginat (4 %)-Bruschi-Schlicker jedoch nicht. Bei einem PLR von 0,16:1 g/ml war hier eine starke bevorzugte Orientierung in der (0 2 0)-Kristallebene vorhanden. [82] Diese Kristallebene entspricht der planen Ebene des Bruschi-Kristalls. Bei einem PLR von 0,03:1 g/ml war eine starke bevorzugte Orientierung in der (1 2 -1)-Kristallebene und eine leichte bevorzugte Orientierung in der (1 4 -1)-Kristallebene vorhanden. Diese beiden Ebenen stellen entsprechend Seitenflächen des

Bruschitkristalls dar. Eine mögliche Begründung für diese Ergebnisse ist, dass sich bei einem größeren PLR mehr Bruschitkristalle in den Lamellen befanden, wodurch diese bei deren Wachstum aus den Lamellen hinausgedrückt wurden. Dadurch stellten sie sich auf, weshalb mehr Seitenflächen in der XRD-Messung registriert wurden. Bei einem kleineren PLR befanden sich weniger Bruschitkristalle in den Lamellen und diese hatten somit genügend Platz sich mit ihrer (0 2 0)-Kristallebene parallel zum Boden auszurichten. In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass bei einer richtigen Wahl der Parameter, wie dem PLR, eine bevorzugte Ausrichtung der Bruschit-Kristalle mit gleichzeitig vorhandener lamellarer Porenstruktur erreicht werden konnte.

Zur mechanischen Untersuchung der Grenzfläche der gefrierstrukturierten zweischichtigen Biopolymer-Keramik-Systeme wurden Zugversuche durchgeführt. Hierbei wurden die Proben auf Probentellern mit Leit-C-Zement festgeklebt. (vgl. Abbildung 14) Einige Proben bei dem Zugversuch rissen bzw. brachen innerhalb der Schichten und nicht an der Grenzfläche. Solche Proben wurden verworfen und nicht in der Statistik berücksichtigt. Es ist anzunehmen, dass die Handhabung der Proben vor dem Zugversuch einen entscheidenden Einfluss auf das Bruchverhalten und die Zugfestigkeiten hatte. Trotz sehr vorsichtigem Präparieren der Proben könnte dieses Vorgehen in einigen Fällen zu einer leichten Vorschädigung der Grenzfläche geführt haben, welche mit bloßem Auge nicht sichtbar war. Außerdem variierte die Menge an Leit-C Zement, mit dem die Proben an den Probentellern fixiert wurden, geringfügig, wodurch manche Proben eventuell fester gehalten wurde als andere. Ein weiterer Grund für Abweichungen könnte das Teilen der ausgestanzten Proben nach Augenmaß sein, wodurch es zu minimalen Flächenvariationen der Proben für den Zugversuch kam. Die erläuterten Faktoren sind auch mögliche Begründungen für die relativ hohen Standardabweichungen der ermittelten Zugfestigkeiten (siehe Abbildung 25 - Abbildung 27). Die ermittelten Spannungs-Dehnungs-Diagramme sind exemplarisch in Abbildung 24 dargestellt. Hierdurch war ersichtlich, dass manche Proben ein eher sprödes Bruchverhalten, während andere ein eher duktiler Bruchverhalten zeigten.

Sherwood *et al.* [165] führten ebenfalls Zugversuche mit durch CAD/CAM (computer-aided design/computer-aided manufacturing)-Verfahren hergestellten porösen osteochondralen Systemen durch. Bei diesem Herstellungsverfahren wird ein

gewünschtes Konstrukt digital entworfen und anschließend computerunterstützt, durch beispielsweise 3D-Druck, erzeugt. [165, 166] Die knorpelimitierende Schicht bestand aus PLGA (Polylactid-co-glycolid) und PLA (Polylactid), die knochenimitierende aus PLGA und TCP. [165] Es wurden die mechanischen Eigenschaften der Schicht, welche Knochen imitieren sollte untersucht. [165] Dabei konnte unter anderem beobachtet werden, dass ein höheres PLR zu einem eher spröden Bruchverhalten und ein niedriges zu einem eher duktilen führte. [165] Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Da jedoch die jeweiligen Zugfestigkeiten, aufgrund der weiter oben genannten Gründe, hohe Standardabweichungen aufwies ist es möglich, dass in einem Versuch mit größerem Probenvolumen ein Schema erkennbar wäre, wann Proben spröde bzw. duktil reißen. Außerdem konnte in der eben genannten Studie [165] gezeigt werden, dass eine höhere Porosität zu einer Verringerung der mechanischen Eigenschaften, wie der Zugfestigkeit, führte. Die Zugfestigkeiten schwankten je nach Wahl der Versuchsparameter zwischen $(1,6 \pm 0,2)$ MPa und $(5,7 \pm 1,0)$ MPa. [165] Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Alginat 2 %-Bruscht-Systeme enthielten mehr Wasser als die Alginat 4 %-Bruscht-Systeme, wodurch davon auszugehen ist, dass diese nach der Gefriertrocknung eine höhere Porosität hatten, welche jedoch nicht gemessen wurde. Dies könnte begründen, weshalb die Zugfestigkeit der Alginat 2 %-Bruscht-Systeme, im Gegensatz zu denen mit 4 %, um das 3- bis 15-fache verringert war. Eine Studie von Kumar *et al.* [167] untersuchte die Zugfestigkeit des Grenzflächenverbundes zwischen Knochen und Knorpel von humanem osteochondralen Gewebe. Die Zugfestigkeit lag bei $(3,75 \pm 0,75)$ MPa [167] und somit weit über der, im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten, Kollagen-Bruscht-Systeme, welche bei $(16,51 \pm 6,83)$ kPa lag. Die hergestellten Systeme sollen zu der Regeneration von osteochondralem Gewebe führen und nicht dieses ersetzen. Es wäre deshalb nicht zwingend erforderlich, dass diese bereits bei Implantation dieselbe Zugfestigkeit wie das native Gewebe aufweisen. Die Zugfestigkeiten von durch diese Systeme regeneriertem osteochondralen Gewebe wurden noch nicht erforscht.

Eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit hergestellten Kollagen-Bruscht-Systeme ist durch Quervernetzung möglich. [168] Es ist deshalb anzunehmen, dass hierdurch die Zugfestigkeit erhöht werden könnte. Stuckensen *et al.* [14] untersuchten mehrere Methoden zur Quervernetzung von gefrierstrukturierten mehrschichtigen Kollagen-Keramik-Systemen. Die Methode,

welche sich am geeignetsten herausstellte, war eine nasschemische Quervernetzung unter Verwendung von Carbodiimiden. [15] Nach der Quervernetzung wäre es zudem sinnvoll, weitere Untersuchungen mit den zweischichtigen Kollagen-Bruschi-Systemen in hydriertem Zustand vorzunehmen, da diese bei einer Implantation ins Gewebe ebenfalls vollständig hydriert werden würden. [148]

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Herstellung zweischichtiger, monolithischer sowie anisotrop poröser Biopolymer-Keramik-Systeme zur Nachahmung von osteochondralem Gewebe. Die Forschung an neuen Strategien zur Regeneration dessen ist notwendig, da durch derzeitige Therapien oftmals nur ein minderwertiger Reparaturknorpel gebildet wird und keine langfristigen Erfolge erzielt werden. [8]

In der vorliegenden Arbeit kam die Methode der gerichteten Erstarrung mit Hilfe der Gefrierstrukturierungsanlage „ACD“, welche am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin in Würzburg entwickelt wurde, zum Einsatz. Bei der Gefrierstrukturierungsanlage wird durch zwei Peltier-Elemente ein externer Temperaturgradient erzeugt, welcher durch die Wahl der Temperaturen an den Peltier-Elementen eingestellt werden kann. Diese Art der Gefrierstrukturierung wird auch „unidirektionale Gefrierstrukturierung“ genannt. Eine Lösung oder ein Schlicker befindet sich zwischen den Peltier-Elementen und wird gerichtet erstarrt. Hierbei wachsen Eiskristalle entgegen des Temperaturgradienten und drängen die in Lösung befindlichen Feststoffe zwischen sich. Durch eine anschließende Gefriertrocknung erhält man ein Negativ der Eiskristallstruktur, welche sich durch ein lamellares, anisotropes Porensystem auszeichnet.

Bei dieser Art der Gefrierstrukturierung beginnt das Eiskristallwachstum an mehreren Orten am Boden der Probe gleichzeitig, wodurch mehrere Domänen unterschiedlicher horizontaler Ausrichtung erhalten werden. Bai *et al.* [17, 18] erzeugten mit Hilfe eines Teflonkeils am Boden der Probe einen zweiten, horizontalen Temperaturgradienten, weshalb diese Art der Gefrierstrukturierung auch als „bidirektionale Gefrierstrukturierung“ bezeichnet wird. Dieser Temperaturgradient verläuft vom höchsten und somit wärmsten Punkt des Teflonkeils zu dessen Fuße, da hier die kälteste Temperatur vorliegt. Bei der bidirektionalen Gefrierstrukturierung erfolgt das Eiskristallwachstum somit zunächst entlang des Teflonkeils und anschließend entgegen des externen, vertikalen Temperaturgradienten. Dies führt zur Ausbildung einer einzelnen Domäne in horizontaler Ausrichtung, wodurch eine noch homogenere Probenmorphologie, zur Nachahmung des hoch geordneten Aufbaus natürlicher Strukturen mit einzigartigen mechanischen Eigenschaften, erhalten wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Methode der bidirektionalen Gefrierstrukturierung untersucht, um die Morphologie der gefrierstrukturierten Proben

zu optimieren. Im Rahmen einer systematischen Untersuchung wurden hierfür Proben, welche aus Alginat (2 %)-Lösung bestanden, hergestellt. Es wurden die Steigungen der Teflonkeile sowie der Temperaturgradient variiert. Zur Beurteilung der horizontalen Domänen wurden stereomikroskopische Oberflächenaufnahmen angefertigt. Anschließend wurde der Porendurchmesser und die Porenorientierung anhand von rasterelektronenmikroskopischen Querschnittsaufnahmen untersucht. Die Kühl- und Erstarrungsraten wurden anhand von aufgezeichneten Temperaturverläufen der Proben ausgewertet. Es wurde festgestellt, dass die Kühl- und Erstarrungsraten tendenziell steigen, je höher der externe Temperaturgradient und je niedriger die Steigung des Teflonkeils ist. Außerdem wurde die Porenorientierung tendenziell senkrechter zur Probenoberfläche und der Porendurchmesser sank, je höher der externe Temperaturgradient war. In den stereomikroskopischen Oberflächenaufnahmen waren bei allen Steigungen der Teflonkeile und bei allen externen Temperaturgradienten weiterhin mehrere Domänen in horizontaler Ebene zu sehen. Aufgrund dessen wurde für das weitere Vorgehen die Methode der unidirektionalen Gefrierstrukturierung angewendet.

Hierbei wurden zweischichtige Alginat- bzw. Kollagen-Bruscht-Systeme gefrierstrukturiert. Zur Herstellung dieser wurde zunächst eine erste Schicht gefrierstrukturiert. Als diese gefroren war wurde eine zweite Schicht auf die erste injiziert. Die erste Schicht, für welche Alginat- bzw. Kollagen-Bruscht-Schlicker gefrierstrukturiert wurde, imitierte Knochen, während die zweite Schicht, für welche Alginat- bzw. Kollagen-Lösung gefrierstrukturiert wurde, Knorpel nachahmte. Alginat diente hierbei als Modellsystem. Es folgte eine systematische Untersuchung, bei welcher mehrere Parameter variiert wurden. Unter dem Stereo- und Rasterelektronenmikroskop wurde beurteilt, ob es zu einem Verbund beider Schichten kam. Anschließend wurden Zugversuche durchgeführt, um die mechanische Stabilität der Grenzflächen beurteilen zu können. Hierbei wurde festgestellt, dass die Alginat (4 %)-Bruscht-Systeme, abhängig vom verwendeten PLR, um das 3- bis 15-fache höhere Zugfestigkeiten aufwiesen als die Alginat (2 %)-Bruscht-Systeme. Bei der mikroskopischen Auswertung war bei allen Proben, bei welchen der Temperaturgradient der ersten und zweiten Schicht gleich war, ein sichtbarer Verbund beider Schichten gegeben.

Bei den Alginat-Bruschit-Systeme wurde der Massenanteil an Alginat in der Lösung, der externe Temperaturgradient der zweiten Schicht und das Pulver-zu-Flüssigkeitsverhältnis des Alginat-Bruschit-Schlickers, welcher die erste Schicht darstellt, variiert. Außerdem wurde untersucht, ob die Bruschitkristalle des Alginat-Bruschit-Schlickers eine bevorzugte Orientierung vorwiesen. Die Orientierung der Bruschitkristalle der Alginat-Bruschit-Systeme, mit einem Massenanteil an Alginat in der Lösung von 2 %, war statistisch orientiert. Die Orientierung der Bruschitkristalle der Alginat-Bruschit-Systeme, mit einem Massenanteil an Alginat in der Lösung von 4 %, war hingegen nicht statistisch orientiert, weshalb diese anschließend näher untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer geeigneten Wahl der Parameter, wie zum Beispiel des PLRs, eine bevorzugte Orientierung der Bruschitkristalle stattfindet. Die Kristalle hatten bei geringem PLR eine starke bevorzugte Orientierung in der $(1\ 2\ -1)$ -Kristallebene und eine leichte bevorzugte Orientierung in der $(1\ 4\ -1)$ -Kristallebene, während bei hohem PLR eine bevorzugte Orientierung in der $(0\ 2\ 0)$ -Kristallebene vorhanden war.

Für die zweischichtigen Kollagen-Bruschit-Systeme wurde ein Massenanteil an Kollagen in der Lösung von 4 % gewählt. Der Temperaturgradient betrug bei der Herstellung beider Schichten 3,5 K/mm. Durch Zugversuche konnte festgestellt werden, dass die Kollagen-Bruschit-Systeme um den Faktor 8 geringere Zugfestigkeiten aufwiesen als die Alginat-Bruschit-Systeme. Durch eine nasschemische Quervernetzung der Kollagen-Bruschit-Systeme könnten ihre mechanischen Eigenschaften jedoch verbessert werden [15], wodurch vermutlich auch höhere Zugfestigkeiten erreicht werden würden. Bei der mikroskopischen Auswertung war sichtbar, dass es bei allen Proben zu einem Verbund beider Schichten kam.

In der vorliegenden Arbeit konnten zweischichtige, monolithische und anisotrope Kollagen-Bruschit-Systeme mit Hilfe der unidirektionalen Gefrierstrukturierung, zur Nachahmung von osteochondralem Gewebe, erfolgreich hergestellt werden. Die hergestellten Systeme könnten einen wichtigen Ansatz zur Entwicklung neuer Therapien für die Regeneration osteochondraler Defekte darstellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Yaraghi, N.A. and D. Kisailus, *Biomimetic Structural Materials: Inspiration from Design and Assembly*. Annu Rev Phys Chem, 2018. **69**: p. 23-57.
2. Camarero-Espinosa, S., et al., *Articular cartilage: from formation to tissue engineering*. Biomaterials Science, 2016. **4**(5): p. 734-767.
3. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. British Medical Bulletin, 2008. **87**(1): p. 77-95.
4. Nair, A.K., et al., *Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone*. Nature Communications, 2013. **4**(1): p. 1724.
5. Gadjanski, I., *Mimetic Hierarchical Approaches for Osteochondral Tissue Engineering*, in *Osteochondral Tissue Engineering: Nanotechnology, Scaffolding-Related Developments and Translation*, J.M. Oliveira, et al., Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 143-170.
6. Cheng, Q., C. Huang, and A.P. Tomsia, *Freeze Casting for Assembling Bioinspired Structural Materials*. Adv Mater, 2017. **29**(45).
7. Krishnan, Y. and A.J. Grodzinsky, *Cartilage diseases*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2018. **71-72**: p. 51-69.
8. Kwon, H., et al., *Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair*. Nat Rev Rheumatol, 2019. **15**(9): p. 550-570.
9. Jeon, J.E., et al., *Perspectives in Multiphasic Osteochondral Tissue Engineering*. The Anatomical Record, 2014. **297**(1): p. 26-35.
10. Clearfield, D., A. Nguyen, and M. Wei, *Biomimetic multidirectional scaffolds for zonal osteochondral tissue engineering via a lyophilization bonding approach*. J Biomed Mater Res A, 2018. **106**(4): p. 948-958.
11. Wang, C., et al., *Freeze-Casting Produces a Graphene Oxide Aerogel with a Radial and Centrosymmetric Structure*. ACS Nano, 2018. **12**(6): p. 5816-5825.
12. Longley, R., A. Ferreira, and P. Gentile, *Recent Approaches to the Manufacturing of Biomimetic Multi-Phasic Scaffolds for Osteochondral Regeneration*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**: p. 1755.
13. Deville, S., E. Saiz, and A.P. Tomsia, *Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(32): p. 5480-9.
14. Stuckensen, K., *Fabrication of hierarchical cell carrier matrices for tissue regeneration by directional solidification*, in *Department for Functional Materials in Medicine and Dentistry (FMZ)*. 2016, Universität Würzburg.
15. Stuckensen, K., et al., *Tissue Mimicry in Morphology and Composition Promotes Hierarchical Matrix Remodeling of Invading Stem Cells in Osteochondral and Meniscus Scaffolds*. Adv Mater, 2018. **30**(28): p. e1706754.
16. Cervino, G., et al., *Alginate Materials and Dental Impression Technique: A Current State of the Art and Application to Dental Practice*. Mar Drugs, 2018. **17**(1).
17. Bai, H., et al., *Bioinspired large-scale aligned porous materials assembled with dual temperature gradients*. Sci Adv, 2015. **1**(11): p. e1500849.
18. Bai, H., et al., *Bioinspired Hydroxyapatite/Poly(methyl methacrylate) Composite with a Nacre-Mimetic Architecture by a Bidirectional Freezing Method*. Adv Mater, 2016. **28**(1): p. 50-6.
19. Eyre, D.R., *The collagens of articular cartilage*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1991. **21**(3, Supplement 2): p. 2-11.
20. Keene, D.R., L.Y. Sakai, and R.E. Burgeson, *Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to*

- calcified bone cortex*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1991. **39**(1): p. 59-69.
21. Constantz, B.R., et al., *Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites*. J Biomed Mater Res, 1998. **43**(4): p. 451-61.
 22. Sheikh, Z., et al., *In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts*. Acta Biomaterialia, 2015. **26**: p. 338-346.
 23. Reznikov, N., R. Shahr, and S. Weiner, *Bone hierarchical structure in three dimensions*. Acta Biomaterialia, 2014. **10**(9): p. 3815-3826.
 24. Sabra, W., A.P. Zeng, and W.D. Deckwer, *Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **56**(3-4): p. 315-25.
 25. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. Prog Polym Sci, 2012. **37**(1): p. 106-126.
 26. Xu, X., D. Bi, and M. Wan, *Characterization and Immunological Evaluation of Low-Molecular- Weight Alginate Derivatives*. Curr Top Med Chem, 2016. **16**(8): p. 874-87.
 27. Finotelli, P., et al., *Nanostructured magnetic alginate composites for biomedical applications*. Polímeros, 2017. **27**.
 28. Klock, G., et al., *Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates*. Biomaterials, 1997. **18**(10): p. 707-13.
 29. Dumville, J.C., et al., *Alginate dressings for treating pressure ulcers*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2015(5).
 30. Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in drug delivery systems*. Drug Dev Ind Pharm, 2002. **28**(6): p. 621-30.
 31. Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate Hydrogels as Biomaterials*. Macromolecular Bioscience, 2006. **6**(8): p. 623-633.
 32. Zhang, J., et al., *Influence of divalent cations on the biofouling behaviors of alginate hydrogels*. Biomed Mater, 2019. **15**(1): p. 015003.
 33. Rahmani, V. and H. Sheardown, *Protein-alginate complexes as pH-/ion-sensitive carriers of proteins*. Int J Pharm, 2018. **535**(1-2): p. 452-461.
 34. Al-Jaibaji, O., et al., *Alginate encapsulated multipotent adult progenitor cells promote corneal stromal cell activation via release of soluble factors*. PLoS One, 2018. **13**(9): p. e0202118.
 35. Smidsrod, O. and G. Skjak-Braek, *Alginate as immobilization matrix for cells*. Trends Biotechnol, 1990. **8**(3): p. 71-8.
 36. Nestic, A., et al., *Prospect of Polysaccharide-Based Materials as Advanced Food Packaging*. Molecules, 2019. **25**(1).
 37. Bährle-Rapp, M., *Alginat*, in *Springer Lexikon Kosmetik und Körperpflege*. 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 19-19.
 38. Siegmund-Schultze, N., *Alginat verbessert Symptomkontrolle*. MMW - Fortschritte der Medizin, 2016. **158**(11): p. 76-76.
 39. Salvatore, S., et al., *The Effect of Alginate in Gastroesophageal Reflux in Infants*. Paediatr Drugs, 2018. **20**(6): p. 575-583.
 40. Xing, M., et al., *Advances in Research on the Bioactivity of Alginate Oligosaccharides*. Mar Drugs, 2020. **18**(3).
 41. Hay, I.D., et al., *Microbial alginate production, modification and its applications*. Microb Biotechnol, 2013. **6**(6): p. 637-50.
 42. Plazinski, W., *Molecular basis of calcium binding by polyguluronate chains. Revising the egg-box model*. J Comput Chem, 2011. **32**(14): p. 2988-95.

43. Grant, G.T., et al., *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model*. FEBS Letters, 1973. **32**(1): p. 195-198.
44. Braccini, I. and S. Pérez, *Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited*. Biomacromolecules, 2001. **2**(4): p. 1089-1096.
45. Shoulders, M.D. and R.T. Raines, *Collagen structure and stability*. Annual review of biochemistry, 2009. **78**: p. 929-958.
46. Liu, D., et al., *Collagen and Gelatin*. Annual Review of Food Science and Technology, 2015. **6**(1): p. 527-557.
47. Al-Jawoosh, S., A. Ireland, and B. Su, *Fabrication and characterisation of a novel biomimetic anisotropic ceramic/polymer-infiltrated composite material*. Dent Mater, 2018. **34**(7): p. 994-1002.
48. Dorozhkin, S. and M. Epple, *Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate*. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2002. **41**: p. 3130-46.
49. Eliaz, N. and N. Metoki, *Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications*. Materials (Basel), 2017. **10**(4).
50. Siener, R., L. Netzer, and A. Hesse, *Determinants of brushite stone formation: a case-control study*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78996.
51. Chow, L.C., *Calcium phosphate cements*. Monogr Oral Sci, 2001. **18**: p. 148-63.
52. Jeong, J., et al., *Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration*. Biomaterials Research, 2019. **23**(1): p. 4.
53. LeGeros, R.Z., *Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials*. Chemical Reviews, 2008. **108**(11): p. 4742-4753.
54. LeGeros, R.Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*. Clin Orthop Relat Res, 2002(395): p. 81-98.
55. Yuan, H., et al., *Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs*. Biomaterials, 2000. **21**(12): p. 1283-90.
56. Kuroda, K. and M. Okido, *Hydroxyapatite Coating of Titanium Implants Using Hydroprocessing and Evaluation of Their Osteoconductivity*. Bioinorganic chemistry and applications, 2012. **2012**: p. 730693.
57. Sheikh, Z., et al., *Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials*. Materials (Basel), 2015. **8**(11): p. 7913-7925.
58. Rattanachan, S.T., et al., *Development of injectable chitosan/biphasic calcium phosphate bone cement and In Vitro and In Vivo evaluation*. Biomed Mater, 2020.
59. Heng, S., et al., *Injectable calcium phosphate ceramics prevent osteoclastic differentiation and osteoporotic bone loss: Potential applications for regional osteolysis*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **110**: p. 110691.
60. Gbureck, U., et al., *Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement*. Biomaterials, 2004. **25**(11): p. 2187-2195.
61. He, F. and J. Ye, *Bi-layered calcium phosphate cement-based composite scaffold mimicking natural bone structure*. Sci Technol Adv Mater, 2013. **14**(4): p. 045010.
62. Habraken, W., et al., *Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?* Materials Today, 2016. **19**(2): p. 69-87.

63. Trombetta, R., et al., *3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery*. Ann Biomed Eng, 2017. **45**(1): p. 23-44.
64. Habibovic, P., et al., *Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants*. Biomaterials, 2008. **29**(7): p. 944-953.
65. Gbureck, U., et al., *Resorbable Dicalcium Phosphate Bone Substitutes Prepared by 3D Powder Printing*. Advanced Functional Materials, 2007. **17**(18): p. 3940-3945.
66. Su, Y., et al., *Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings*. Bioactive Materials, 2019. **4**: p. 196-206.
67. Wolf-Brandstetter, C., et al., *Multifunctional calcium phosphate based coatings on titanium implants with integrated trace elements*. Biomedical Materials, 2020. **15**(2): p. 025006.
68. Bose, S., et al., *Calcium phosphate coated 3D printed porous titanium with nanoscale surface modification for orthopedic and dental applications*. Mater Des, 2018. **151**: p. 102-112.
69. Sokolova, V., et al., *Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono- and co-culture cell models*. Acta Biomater, 2019. **84**: p. 391-401.
70. Akkineni, A.R., et al., *3D plotting of growth factor loaded calcium phosphate cement scaffolds*. Acta Biomater, 2015. **27**: p. 264-274.
71. Montazerolghaem, M., et al., *Simvastatin-doped pre-mixed calcium phosphate cement inhibits osteoclast differentiation and resorption*. J Mater Sci Mater Med, 2016. **27**(5): p. 83.
72. Chow, L.C., et al., *Diametral tensile strength and compressive strength of a calcium phosphate cement: effect of applied pressure*. J Biomed Mater Res, 2000. **53**(5): p. 511-7.
73. Dorozhkin, S.V., *Calcium Orthophosphate Cements and Concretes*. Materials, 2009. **2**(1): p. 221-291.
74. Guillaume, B., *Filling bone defects with β -TCP in maxillofacial surgery: A review*. Morphologie, 2017. **101**(334): p. 113-119.
75. Davies, J.E., et al., *Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery*. Organogenesis, 2010. **6**(3): p. 161-166.
76. Shi, H., et al., *Improved biphasic calcium phosphate combined with periodontal ligament stem cells may serve as a promising method for periodontal regeneration*. American journal of translational research, 2018. **10**(12): p. 4030-4041.
77. Geyer, G., *Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparats*. HNO, 1999. **47**(2): p. 77-91.
78. Hettich, G., et al., *Calcium Phosphate Bone Graft Substitutes with High Mechanical Load Capacity and High Degree of Interconnecting Porosity*. Materials (Basel), 2019. **12**(21).
79. Boehm, A.V., et al., *The Mechanical Properties of Biocompatible Apatite Bone Cement Reinforced with Chemically Activated Carbon Fibers*. Materials (Basel), 2018. **11**(2).
80. Schamel, M., J. Groll, and U. Gbureck, *Reinforcement Strategies for Load-Bearing Calcium Phosphate Biocements*. Materials, 2015. **8**: p. 2700.
81. No, Y.J., et al., *Effect of Baghdadite Substitution on the Physicochemical Properties of Brushite Cements*. Materials (Basel), 2019. **12**(10).

82. Abbona, F., et al., *Crystal habit and growth conditions of brushite, CaHPO₄ · 2H₂O*. Journal of Crystal Growth, 1993. **131**(3): p. 331-346.
83. Tamimi, F., Z. Sheikh, and J. Barralet, *Dicalcium phosphate cements: brushite and monetite*. Acta Biomater, 2012. **8**(2): p. 474-87.
84. Bohner, M., et al., *In vitro aging of a calcium phosphate cement*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000. **11**(3): p. 155-162.
85. Bohner, M. and U. Gbureck, *Thermal reactions of brushite cements*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. **84**(2): p. 375-85.
86. Kanter, B., et al., *Control of in vivo mineral bone cement degradation*. Acta Biomater, 2014. **10**(7): p. 3279-87.
87. Großardt, C., et al., *Passive and Active In Vitro Resorption of Calcium and Magnesium Phosphate Cements by Osteoclastic Cells*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(12): p. 3687-3695.
88. Grover, L.M., et al., *Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro*. Biomaterials, 2006. **27**(10): p. 2178-2185.
89. Wegst, U.G., et al., *Bioinspired structural materials*. Nat Mater, 2015. **14**(1): p. 23-36.
90. Liu, Y., D. Luo, and T. Wang, *Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering*. Small, 2016. **12**(34): p. 4611-4632.
91. Zimmermann, E.A. and R.O. Ritchie, *Bone as a Structural Material*. Advanced Healthcare Materials, 2015. **4**(9): p. 1287-1304.
92. Landis, W.J., et al., *Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging*. J Struct Biol, 1996. **117**(1): p. 24-35.
93. Rho, J.-Y., L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone*. Medical Engineering & Physics, 1998. **20**(2): p. 92-102.
94. Reznikov, N., et al., *The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: relation to trabecular organization*. Bone, 2015. **71**: p. 189-95.
95. Heřt, J., P. Fiala, and M. Petrýl, *Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man*. Bone, 1994. **15**(3): p. 269-277.
96. Alexander, P.G., et al., *Three-dimensional osteogenic and chondrogenic systems to model osteochondral physiology and degenerative joint diseases*. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 2014. **239**(9): p. 1080-1095.
97. Huber, M., S. Trattnig, and F. Lintner, *Anatomy, Biochemistry, and Physiology of Articular Cartilage*. Investigative Radiology, 2000. **35**(10).
98. Gracitelli, G.C., et al., *Surgical interventions (microfracture, drilling, mosaicplasty, and allograft transplantation) for treating isolated cartilage defects of the knee in adults*. The Cochrane database of systematic reviews, 2016. **9**(9): p. CD010675-CD010675.
99. Wachsmuth, L., et al., *Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes*. Histol Histopathol, 2006. **21**(5): p. 477-85.
100. Schulz, R.M. and A. Bader, *Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes*. European Biophysics Journal, 2007. **36**(4): p. 539-568.
101. Buckwalter, J.A. and L.C. Rosenberg, *Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans*. Electron Microsc Rev, 1988. **1**(1): p. 87-112.
102. Bruckner, P. and M. van der Rest, *Structure and function of cartilage collagens*. Microscopy Research and Technique, 1994. **28**(5): p. 378-384.

103. Zhu, W., et al., *Determination of collagen-proteoglycan interactions in vitro*. Journal of Biomechanics, 1996. **29**(6): p. 773-783.
104. Mow, V.C., A. Ratcliffe, and A. Robin Poole, *Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures*. Biomaterials, 1992. **13**(2): p. 67-97.
105. Martins, A.e.a., *The Multiscale Organization of the Osteochondral Extracellular Matrix*, in *Osteochondral Tissue Engineering: Nanotechnology, Scaffolding-Related Developments and Translation*, J.M. Oliveira, et al., Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 127.
106. Sharma, A.R., et al., *Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(10): p. 19805-19830.
107. Li, G., et al., *Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes*. Arthritis research & therapy, 2013. **15**(6): p. 223-223.
108. Aho, O.-M., et al., *Subchondral bone histology and grading in osteoarthritis*. PloS one, 2017. **12**(3): p. e0173726-e0173726.
109. Hess, D.E., B.C. Werner, and D.N. Deal, *Use of Particulated Juvenile Articular Cartilage Allograft for Osteochondral Lesions of the Wrist*. Hand (New York, N.Y.), 2017. **12**(5): p. NP62-NP67.
110. Makris, E.A., et al., *Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage*. Nature reviews. Rheumatology, 2015. **11**(1): p. 21-34.
111. Buckwalter, J.A., *Chondral and osteochondral injuries: mechanisms of injury and repair responses*. Operative Techniques in Orthopaedics, 1997. **7**(4): p. 263-269.
112. Suh, J.-K., et al., *Basic science of articular cartilage injury and repair*. Operative Techniques in Sports Medicine, 1995. **3**(2): p. 78-86.
113. Frenkel, S.R. and P.E. Di Cesare, *Degradation and repair of articular cartilage*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D671-85.
114. Frehner, F. and J.P. Benthien, *Microfracture: State of the Art in Cartilage Surgery?* Cartilage, 2018. **9**(4): p. 339-345.
115. Krill, M., et al., *Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Knee Cartilage Defects: A Review of Indications, Technique, and Outcomes*. JBJS Rev, 2018. **6**(2): p. e5.
116. Krueger, D.R., et al., *Injectable autologous chondrocyte implantation (ACI) in acetabular cartilage defects-three-year results*. Journal of hip preservation surgery, 2018. **5**(4): p. 386-392.
117. Erickson, B., et al., *Surgical management of large talar osteochondral defects using autologous chondrocyte implantation*. Foot and Ankle Surgery, 2018. **24**(2): p. 131-136.
118. Niethammer, T.R., et al., *Analysis of the autologous chondrocyte quality of matrix-based autologous chondrocyte implantation in the knee joint*. International Orthopaedics, 2016. **40**(1): p. 205-212.
119. Ho, P.-c., W.-l. Tse, and C.W.-y. Wong, *Arthroscopic Transplantation of Osteochondral Autograft for Treatment of Cartilage Defects in the Wrist*. Hand Clinics, 2017. **33**(4): p. 755-767.
120. Richter, D.L., J.A. Tanksley, and M.D. Miller, *Osteochondral Autograft Transplantation: A Review of the Surgical Technique and Outcomes*. Sports Med Arthrosc Rev, 2016. **24**(2): p. 74-8.
121. Theodoulou, M.H. and L. Bohman, *Allograft Cartilage Replacements*. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery, 2018. **35**(3): p. 281-293.

122. Ng, A. and K. Bernhard, *The Use of Particulated Juvenile Allograft Cartilage in Foot and Ankle Surgery*. Clin Podiatr Med Surg, 2018. **35**(1): p. 11-18.
123. Nikolaou, V.S. and P.V. Giannoudis, *History of osteochondral allograft transplantation*. Injury, 2017. **48**(7): p. 1283-1286.
124. Bernholt, J. and J. Höher, *Knorpelersatzgewebe durch Mikrofrakturierung*, in *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2003. p. 218-221.
125. Saris, D.B.F., et al., *Characterized Chondrocyte Implantation Results in Better Structural Repair when Treating Symptomatic Cartilage Defects of the Knee in a Randomized Controlled Trial versus Microfracture*. The American Journal of Sports Medicine, 2008. **36**(2): p. 235-246.
126. Niethammer, T., *Matrix gestützte Autologe Chondrozyten Transplantation (MACT) am Kniegelenk - klinische, histologische und radiologische Einjahresergebnisse*, in *Medizinische Fakultät*. 2010, Ludwig-Maximilians-Universität München.
127. Hunziker, E.B., *Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?* Osteoarthritis and Cartilage, 1999. **7**(1): p. 15-28.
128. O'Driscoll, S.W., *The healing and regeneration of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(12): p. 1795-812.
129. Cavendish, P.A., et al., *Osteochondral Allograft Transplantation for Knee Cartilage and Osteochondral Defects: A Review of Indications, Technique, Rehabilitation, and Outcomes*. JBJS Reviews, 2019. **7**(6): p. e7.
130. Chui, K., L. Jeys, and M. Snow, *Knee salvage procedures: The indications, techniques and outcomes of large osteochondral allografts*. World journal of orthopedics, 2015. **6**(3): p. 340-350.
131. Mangers, H. and E. Blank, *Gerichtete Erstarrung. Verfahren zur Herstellung anisotroper Werkstoffe mit hoher Gefügeperfektion*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 1980. **11**(10): p. 367-373.
132. Schoof, H., *Verfahren zur Herstellung gefriergetrockneter Kollagenschwämme mit definierter Porenstruktur*, in *Fakultät für Maschinenwesen*. 2000, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
133. Deville, S., *Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues*. Advanced Engineering Materials, 2008. **10**(3): p. 155-169.
134. Zhang, Z. and X.-Y. Liu, *Control of ice nucleation: freezing and antifreeze strategies*. Chemical Society Reviews, 2018. **47**(18): p. 7116-7139.
135. Fellin, W., *Einführung in Eis-, Schnee- und Lawinenmechanik*. 2013, Berlin Heidelberg: Springer Vieweg.
136. Stefanescu, D. and R. Ruxanda, *Fundamentals of Solidification*. 2004. p. 71-92.
137. Bargel, H.-J. and G. Schulze, *Grundlagen der Metall- und Legierungskunde*, in *Werkstoffkunde*, H.-J. Bargel and G. Schulze, Editors. 2008, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-66.
138. Mullins, W.W. and R.F. Sekerka, *Stability of a Planar Interface During Solidification of a Dilute Binary Alloy*, in *Dynamics of Curved Fronts*, P. Pelcé, Editor. 1988, Academic Press: San Diego. p. 345-352.
139. Coriell, S.R., G.B. McFadden, and R.F. Sekerka, *Cellular Growth During Directional Solidification*. Annual Review of Materials Science, 1985. **15**(1): p. 119-145.

140. Feng, X., et al., *Influence of pore architectures of silk fibroin/collagen composite scaffolds on the regeneration of osteochondral defects in vivo*. J Mater Chem B, 2020. **8**(3): p. 391-405.
141. Pot, M.W., et al., *Versatile Wedge-Based System for the Construction of Unidirectional Collagen Scaffolds by Directional Freezing: Practical and Theoretical Considerations*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(16): p. 8495-8505.
142. Asuncion, M.C.T., J.C. Goh, and S.L. Toh, *Anisotropic silk fibroin/gelatin scaffolds from unidirectional freezing*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **67**: p. 646-656.
143. Flauder, S., R. Sajzew, and F.A. Muller, *Mechanical properties of porous beta-tricalcium phosphate composites prepared by ice-templating and poly(epsilon-caprolactone) impregnation*. ACS Appl Mater Interfaces, 2015. **7**(1): p. 845-51.
144. Landi, E., F. Valentini, and A. Tampieri, *Porous hydroxyapatite/gelatin scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications*. Acta Biomater, 2008. **4**(6): p. 1620-6.
145. Ko, Y.G., et al., *Preparation of collagen-glycosaminoglycan sponges with open surface porous structures using ice particulate template method*. Macromol Biosci, 2010. **10**(8): p. 860-71.
146. Damink, L.O. and I. Heschel, *Verfahren zur Behandlung von Materialien biologischen Ursprungs und Elastin-Produkt*. 2003.
147. Seifert, A., *Korrelation von Verfahrensparametern und resultierender Morphologie bei der gerichteten Erstarrung von Eiskristallen in Hydrogelen*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde*. 2017, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
148. Divakar, P., K. Yin, and U.G.K. Wegst, *Anisotropic freeze-cast collagen scaffolds for tissue regeneration: How processing conditions affect structure and properties in the dry and fully hydrated states*. J Mech Behav Biomed Mater, 2019. **90**: p. 350-364.
149. Deville, S., *Freeze-Casting of Porous Biomaterials: Structure, Properties and Opportunities*. J. Materials, 2010. **3**: p. 1913-1927.
150. Nelson, I. and S.E. Naleway, *Intrinsic and extrinsic control of freeze casting*. Journal of Materials Research and Technology, 2019. **8**(2): p. 2372-2385.
151. Semyari, H., et al., *Fabrication and characterization of collagen-hydroxyapatite-based composite scaffolds containing doxycycline via freeze-casting method for bone tissue engineering*. J Biomater Appl, 2018. **33**(4): p. 501-513.
152. Pan, Z., et al., *Effect of porosities of bilayered porous scaffolds on spontaneous osteochondral repair in cartilage tissue engineering*. Regenerative Biomaterials, 2015. **2**: p. 9-19.
153. Schoof, H., et al., *Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges*. Journal of Biomedical Materials Research, 2001. **58**(4): p. 352-357.
154. Deng, C., J. Chang, and C. Wu, *Bioactive scaffolds for osteochondral regeneration*. Journal of orthopaedic translation, 2018. **17**: p. 15-25.
155. Tamai, N., et al., *A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)*. Osteoarthritis and Cartilage, 2005. **13**(5): p. 405-417.

156. Lv, Y.M. and Q.S. Yu, *Repair of articular osteochondral defects of the knee joint using a composite lamellar scaffold*. Bone & Joint Research, 2015. **4**(4): p. 56-64.
157. Deng, C., et al., *Retracted: 3D Printing of Bilineage Constructive Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration*. Advanced Functional Materials, 2017. **27**(36): p. 1703117.
158. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2529-2543.
159. Rodel, M., et al., *Simultaneous structuring and mineralization of silk fibroin scaffolds*. J Tissue Eng, 2018. **9**: p. 2041731418788509.
160. Tamaddon, M., et al., *Characterisation of freeze-dried type II collagen and chondroitin sulfate scaffolds*. J Mater Sci Mater Med, 2013. **24**(5): p. 1153-65.
161. Oliveira, I., et al., *Promising Biomolecules, in Osteochondral Tissue Engineering: Challenges, Current Strategies, and Technological Advances*, J.M. Oliveira, et al., Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 189-205.
162. Zhou, F., et al., *Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage repair*. Acta Biomaterialia, 2017. **63**: p. 64-75.
163. Campbell, J.J., et al., *Development of three-dimensional collagen scaffolds with controlled architecture for cell migration studies using breast cancer cell lines*. Biomaterials, 2017. **114**: p. 34-43.
164. Somo, S.I., et al., *Pore Interconnectivity Influences Growth Factor-Mediated Vascularization in Sphere-Templated Hydrogels*. Tissue engineering. Part C, Methods, 2015. **21**(8): p. 773-785.
165. Sherwood, J.K., et al., *A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair*. Biomaterials, 2002. **23**(24): p. 4739-4751.
166. Miyazaki, T., et al., *A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience*. Dental Materials Journal, 2009. **28**(1): p. 44-56.
167. Kumar, P., et al., *Mechanical strength of osteochondral junction*. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1991. **65**(11): p. 1070-7.
168. Soroushanova, A., et al., *The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development*. Advanced Materials, 2019. **31**(1): p. 1801651.
169. Yannas, I.V., *Collagen and Gelatin in the Solid State*. Journal of Macromolecular Science, Part C, 1972. **7**(1): p. 49-106.

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. Uwe Gbureck für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die Betreuung im Zuge dieser Arbeit recht herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich Annika S. besonders danken. Sie ist mir jederzeit mit Rat und Tat beiseite gestanden, hat mich mit Geduld in das Thema der Gefrierstrukturierung eingeführt und mich beim Schreiben dieser Arbeit intensiv durch ihre Korrekturen unterstützt. Danke für all die investierte Zeit und die tolle Betreuung.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Lehrstuhls der Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, die stets hilfsbereit und sehr freundlich waren. Danke insbesondere an Jan W. für die Unterstützung bei den Arbeiten mit dem XRD und an Isabell B., die bei Fragen jeglicher Art immer ein offenes Ohr hatte.

Abschließend möchte ich einen großen Dank an meine Eltern richten, durch deren finanzielle und emotionale Unterstützung mir diese Arbeit ermöglicht wurde.

Lebenslauf

Veröffentlichungen

Seifert, A., Gruber, J., Gbureck, U. and Groll, J. (2021), Morphological Control of Freeze-Structured Scaffolds by Selective Temperature and Material Control in the Ice-Templating Process. *Adv. Eng. Mater.* 2100860. (DOI: 10.1002/adem.202100860)

Anhang

Charakterisierung des extrahierten Typ II Kollagenpulvers

Zur Charakterisierung des extrahierten bovinen Typ II Kollagenpulvers, welches bovinen Ursprungs ist, wurde eine IR-Messung durchgeführt. Hierfür wurden drei Pulverproben gemessen. Nach Yannes, I. V. [169] hat das IR-Spektrum von Kollagen eine N-H Streckschwingung bei einer Wellenzahl von $3290 - 3330 \text{ cm}^{-1}$. Außerdem ist ein Signal, welches einer C=O Streckschwingung entspricht (Amid I) zwischen $1640 - 1660 \text{ cm}^{-1}$ vorhanden. [169] Ein weiteres Signal, welches dem Amid II entspricht, ist zwischen den Wellenzahlen $1535 \text{ cm}^{-1} - 1550 \text{ cm}^{-1}$ zu finden. [169] Das Signal des Amid III befindet sich zwischen den Wellenzahlen $1230 - 1270 \text{ cm}^{-1}$. [169]

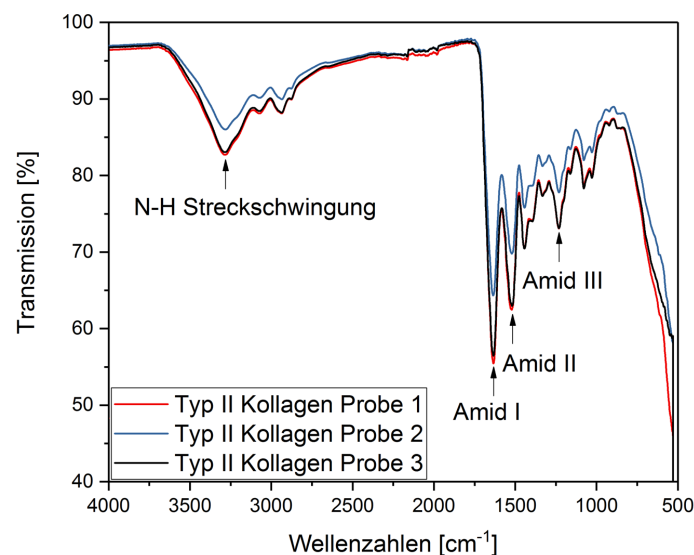


Abbildung 29: IR-Spektren der Kollagenproben. Es wurden drei Proben (Probe 1, Probe 2, Probe 3) aus dem Typ II Kollagenpulver entnommen und gemessen.

Die gemessenen IR-Spektren (vgl. Abbildung 29) der Kollagenproben wurden analysiert und mit der oben genannten Literatur verglichen. Die einzelnen IR-Spektren haben relativ zueinander die gleichen Intensitäten. Das Signal bei der Wellenzahl von $3289,9 \text{ cm}^{-1}$ gleicht einer N-H Streckschwingung. Außerdem ist das Amid I bei einer Wellenzahl von $1635,34 \text{ cm}^{-1}$, das Amid II bei einer Wellenzahl von 1523 cm^{-1} und das Amid III bei einer Wellenzahl von $1231,3 \text{ cm}^{-1}$ vorhanden, was in die jeweiligen in der Literatur [169] beschriebenen oder ähnlichen Wertebereiche fällt.