

Synthese, Fabrikation und Charakterisierung eines
faserförmigen Zellträgermaterials auf Basis von
Titan-oxo-carboxo-Clustern

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Bastian Christ

aus Ansbach

Würzburg 2017



eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am
18.10.2017

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard SEXTL
2. Gutachterin: Prof. Dr. Heike Walles

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: Prof. Dr. Gerhard SEXTL
2. Prüferin: Prof. Dr. Heike Walles
3. Prüfer: Prof. Dr. Klaus Müller-Buschbaum

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums
17.05.2018

Doktorurkunde ausgehändigt am

Abkürzungsverzeichnis

16HBE	Zelllinie humaner Endothelzellen
A	Amper
AA	Essigsäure (acetic acid)
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie
a.u.	willkürliche Einheit
As	asymmetrisch
bzw.	beziehungsweise
Bu	Butyl
C	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHI	Chitosan
Cit	Citrat
cm	Zentimeter
cm ⁻¹	inverse Zentimeter
D	Tag
Δ	chemische Verschiebung
Δ	Deformationsschwingung
DIN	Deutsche Industrienorm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTA	Differential-Thermoanalyse
DSC	Dynamische Wärmekalorimetrie
ESEM	environmental electron scanning microscope
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
exo	exotherm
FA	Ameisensäure (formic acid)
FCS	fetales Kälberserum
FTIR	Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
GA	Glykolsäure (glycolic acid)
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTB94	Zelllinie humaner Chondrozyten

inkl.	Inklusive
IR	Infrarot
<i>i</i> Pr	iso-Propyl
k	Kilo
K	Kelvin
kV	Kilovolt
L	Liter
λ	Wellenlänge
L929	Zelllinie von Mausfibroblasten
LA	Milchsäure (lactic acid)
M	Molare Masse
m_0	Ursprungsmasse
m%	Massenprozent
MA	Mandelsäure (mandelic acid)
MalA	Äpfelsäure (malic acid)
mbar	Millibar
Me	Methyl
Mg	Milligramm
MG63	Zelllinie humaner Osteoblasten
μ g	Mikrogramm
min	Minute
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
MS	Massenspektrometrie
MV	Massenverluststufe
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
m/z	Masse-/Ladungsverhältnis
ν	Streckschwingung
Nm	Nanometer
NS	Niederschlag
PA	Propionsäure (propionic acid)
PBS	phosphatgepufferte Salszlösung
PE	Polyethylen

Pen	Penicillin
PGA	Polyglykolid
Phe	Phenylalanin
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-co-glykolid
ppm	parts per million
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	symmetrisch
Strep	Streptomycin
TEOT	Titantetraethylat
TGA	Thermogravimetrische Analyse
TiBALDH	Titan(IV)bis(ammoniumlactato)dihydroxid
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WST	wasserlösliches Tetrazoliumsalz
X	Gehalt
XRD	Röntgenpulverdiffraktometrie
z. B.	zum Beispiel

Inhalt

EINLEITUNG.....	1
GRUNDLAGEN	3
I) Synthese von Titan-oxo-alkoxo-carboxo-Cluster über die Sol-Gel-Route	3
II) Biokompatibilität von hybriden TiO ₂ -Materialien.....	11
ZIELSETZUNG.....	21
MATERIALIEN UND METHODEN	23
I) Materialien	23
II) Analytische Methoden.....	24
III) Versuchsdurchführungen.....	28
ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	37
I) Synthese und Charakterisierung von LA-Fasern.....	39
1) Synthese der Spinnmassen.....	40
2) Spinnprozess.....	41
3) Charakterisierung verschiedener Fasern.....	42
4) Degradationsverhalten	53
5) Integration von Gegenionen in die LA-Faser	60
5.1) Anorganische Basen.....	61
5.2) Ammonium	61
5.3) Amine und Aminosäuren	62
5.4) Chitosan.....	64
6) Zytotoxizitätstests.....	65
7) Untersuchung des Biegedurchmessers der Fasern.....	67
8) Zusammenfassung	68
II) Variation der mechanischen Eigenschaften	71
1) Tempern eines Fasermaterials	73

2) Verwendung weiterer α -Hydroxycarbonsäuren für die Herstellung eines TiO ₂ -basierten faserförmigen Zellträgermaterials.....	84
3) Verwendung der Dicarbonsäure Äpfelsäure für die Herstellung eines TiO ₂ - basierten faserförmigen Zellträgermaterials.....	96
4) Zusammenfassung.....	99
ZUSAMMENFASSUNG.....	103
SUMMARY.....	107
LITERATUR.....	110
ANHANG.....	115

EINLEITUNG

Die Regenerative Medizin nutzt bei der Therapie von Verletzungen und Erkrankungen die Selbstheilungskräfte des Körpers.^[1] Zusammen mit dem stetigen Wissensgewinn in den molekularen und zellulären Prozessen während des Heilungsvorgangs wird die Entwicklung neuer Biomaterialien Schritt für Schritt vorangetrieben.^[2]

Besonders die Entwicklung von biologisch abbaubare Materialsystemen steht im Fokus der Materialentwicklung.^[3] Derartige Materialien können beispielsweise *in vivo* implantiert und während des Degradationsprozesses durch zelluläres Gewebe ersetzt werden. Hierfür werden degradierbare, nicht toxische Zellträgermaterialien (Scaffolds) benötigt, die durch ihre Porosität zum einen das Einwachsen von Gewebezellen ermöglichen. Zum anderen muss die stetige Nährstoffversorgung der Zellen auch im Inneren des Scaffolds gewährleistet sein sowie eine mechanische Stützfunktion ähnlich der des zu ersetzendem Gewebes nachgeahmt werden. Des Weiteren finden derartige Zellträgerstrukturen auch Einsatz im Bereich des Tissue Engineerings. Das so kultivierte Gewebe kann anschließend ebenfalls in den menschlichen Organismus implantiert werden.^[4]

Der Bedarf an neuen Materialien und Materialkompositen mit einem optimierten Eigenschaftsprofil wächst zunehmend. Durch neuartige Entwicklungen können die mechanischen Eigenschaften und die Degradationseigenschaften der Materialien auf das Zielgewebe optimiert, Drug-Delivery-Systeme integriert und teilweise sogar durch eine bestimmte Oberflächenfunktionalisierung am Material Zelldifferenzierung induziert werden.^[5-6]

Auch für das Prozessieren von etablierten und neuartigen Biomaterialien zu dreidimensionalen Scaffolds werden vielfältige Verarbeitungsprozesse entwickelt und optimiert. Schließlich stellt auch die physikalische Material-Zell-Interaktion einen wichtigen Parameter für die Zellproliferation und -differenzierung dar. Eine Bandbreite an verschiedensten Verarbeitungsverfahren steht im Fokus der aktuellen Forschungslandschaft. Beispiele hierfür sind Methoden der Mikro- und Nanostrukturierung von Oberflächen, die Nachahmung der extrazellulären Matrix mit einem Nanofaser-Konstrukt oder die Entwicklung von porösen Knochenzementen.^[7-9]

Ein innovativer Ansatz für die Entwicklung eines resorbierbaren Scaffolds für die Regenerative Medizin wurde am Fraunhofer ISC in Kooperation mit Bayer Innovation GmbH verfolgt. Über den Sol-Gel-Prozess wurden Kieselgel-Mikrofasern zu einem degradierbaren dreidimensionalen

Faservlies versponnen (vgl. Abb. 1). Dieses Material stimuliert u. a. die Heilung von diabetischen Wunden und ist hierfür seit 2010 CE-zertifiziert.^[10-13]



Abb. 1 : Kieselgelfaservlies für die Therapie von diabetischen Wunden (© K. Dobberke für Fraunhofer ISC).

Aufbauend auf dieser Technologie besteht hohes Potential weitere innovative Materialien und Medizinprodukte zu entwickeln. Materialien aus Titan(IV)oxid (TiO_2) können nicht nur über Sol-Gel-Prozesse hergestellt werden, sondern bestechen auch durch eine hohe Biokompatibilität. Schließlich werden viele Biomaterialien, die ihren Einsatz *in-vivo* finden, mit einer TiO_2 -Schicht versehen, um die Zell-Material-Interaktion zu optimieren. Beispiele hierfür sind Oberflächen von Hüftgelenks- oder Zahnprothesen um das Einwachsen des Materials in den Knochen zu unterstützen oder eine TiO_2 -Beschichtung von Herniennetzen (TiO_2 Mesh™, BioCer GmbH) um das Einwachsen in den Gewebedefekt zu beschleunigen und eine Fremdkörperreaktion zu minimieren.

Aufbauend auf diesem bereits *in-vivo* eingesetzten Materials und der am Fraunhofer ISC entwickelten Technologie zum Verspinnen von Mikrofasern über Sol-Gel-Prozesse, sollen in dieser Arbeit erstmalig Mikrofasern basierend auf TiO_2 -Verbindungen versponnen werden. Bei dem zu erhaltenden Fasermaterial handelt es sich nicht wie in den erwähnten medizinisch zugelassenen TiO_2 -haltigen Systemen um ein beschichtetes Material. Vielmehr wird hier das komplette Material vom Kern bis zur Oberfläche aus TiO_2 -Bausteinen aufgebaut sein.

GRUNDLAGEN

Über den Sol-Gel-Prozess können hybride TiO_2 -haltige Materialien entwickelt werden, die Anwendung als Biomaterial finden können. Im Folgenden wird zuerst auf die Grundlagen der Sol-Gel-Chemie von Titanalkoxiden eingegangen und im Weiteren Aspekte der Biokompatibilität von hybriden TiO_2 -Materialien näher beleuchtet.

I) Synthese von Titan-oxo-alkoxo-carboxo-Cluster über die Sol-Gel-Route

Der Sol-Gel-Prozess ist in der Materialwissenschaft eine wichtige Methode, um anorganische oder hybride Schichten, Partikel und auch Fasern darzustellen.^[14-19] Als Ausgangssubstanzen werden dazu oft Metall- oder Nichtmetallalkoxide verwendet, die über Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen zu mehrkernigen Clustern oder einem dreidimensionalen Netzwerk überführt werden.^[14]

In dieser Arbeit soll das Titanalkoholat $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (TEOT) über die Sol-Gel-Route zu Fasern weiterverarbeitet werden. Dazu muss sich ein alkoholisches Sol aus Titanalkoholat, das sich wie eine newtonsche Flüssigkeit verhält, zu einem viskosen polynuklearen Netzwerk reagieren, welches zu Fasern druckversponnen werden kann. Durch Anlegen von Druck kann das viskose, fadenziehende Gel durch eine Düsenplatte gepresst werden. Aufgrund der daraus resultierenden Oberflächenvergrößerung entweichen Lösungsmittelreste schnell und die Spinnmasse verfestigt sich zu einem faserförmigen Feststoff.

Titanalkoxide reagieren mit Wasser schnell und unkontrolliert zu amorphem Titan(IV)oxid TiO_2 . Diese hohe Reaktivität wird vor allem durch zwei Faktoren bestimmt: Zum einen begünstigt die niedrige Elektronegativität von Titan ($\text{EN}_{\text{Ti}} = +1,32$)^[20] den Angriff von Nucleophilen. Die Hydrolyserate von Titanethylat $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ bei einem pH-Wert von 7 beträgt beispielsweise $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; die Hydrolyserate von $\text{Si}(\text{OEt})_4$ ($\text{EN}_{\text{Si}} = +1,74$)^[20] dagegen nur $5 \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[20] Zum anderen kann Titan aufgrund seiner besetzten d-Orbitale leicht höhere Koordinationszahlen eingehen. Dadurch können Titanalkoxide durch Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen über eine Vielzahl an günstigen Übergangszuständen zu stabilen mehrkernigen Titankomplexen oder zu reinem Titan(IV)oxid TiO_2 oder Titan(IV)oxidhydraten reagieren.

Unter streng kontrollierten Bedingungen, d. h. bei einer Synthese unter Schutzgasatmosphäre und einem bestimmten Verhältnis von titanhaltigem Präkursor und Wasser können auch mehrkernige Titanoxoalkoxide dargestellt werden.^[21-22] Beispiele für Titanoxoethoxide sind $[\text{Ti}_7\text{O}_4(\text{OEt})_{20}]$, $[\text{Ti}_8\text{O}_6(\text{OEt})_{20}]$, $[\text{Ti}_{10}\text{O}_8(\text{OEt})_{24}]$, $[\text{Ti}_{12}\text{O}_{16}(\text{OEt})_{16}]$ oder $[\text{Ti}_{16}\text{O}_{16}(\text{OEt})_{32}]$. Abbildungen der jeweiligen Strukturen des Titanoxo-Kerns (ohne terminale Ethoxyliganden) sind in Abb. 2 dargestellt.

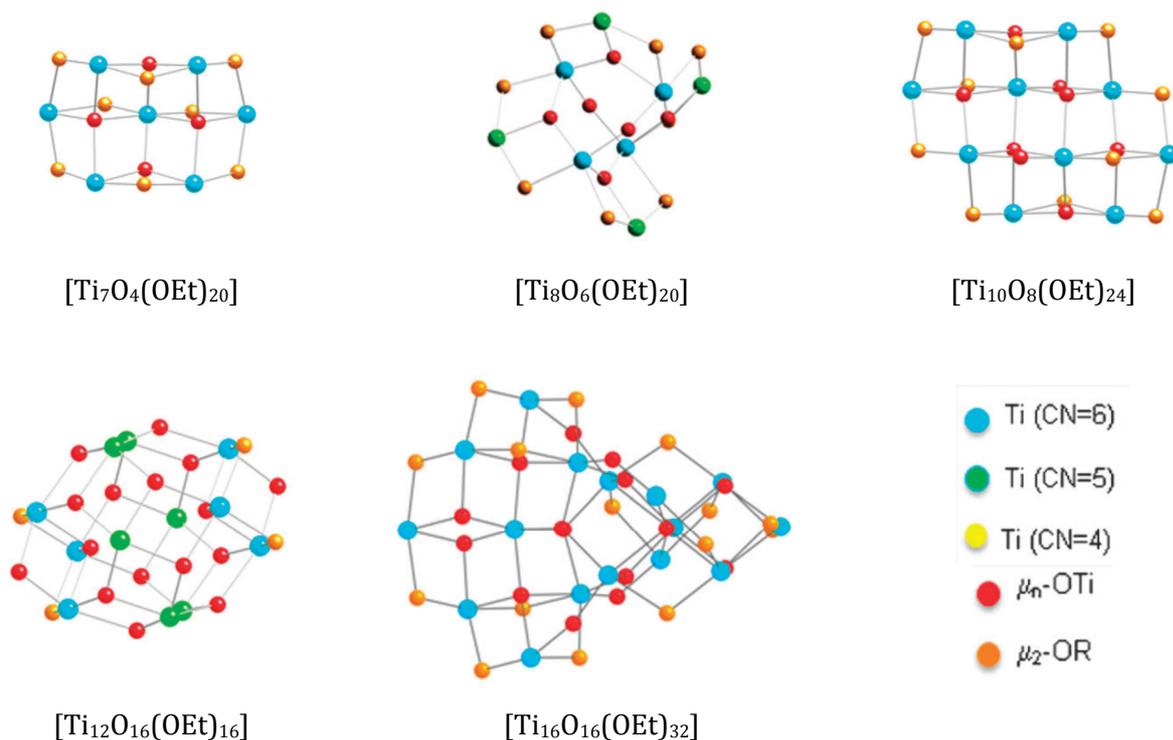


Abb. 2 : Summenformeln von literaturbekannten Titanoxoethoxiden, sowie Abbildungen der zugehörigen Titanoxo-Kerne, die aus Gründen der Übersichtlichkeit ohne der terminalen Ethoxyliganden dargestellt sind. In Anlehnung an ^[21] und mit freundlicher Genehmigung von der Royal Society of Chemistry.

Diese mehrkernigen Titan-oxo-alkoxo-Cluster können ebenfalls nicht zu viskosen, spinnbaren Gelen weiterverarbeitet werden.

Eine vielversprechende Variante zur Darstellung von polynuklearen Titankomplexen, die besser in viskose, fadenziehende Gele überführt werden können, ist die Einführung von Chelatliganden an Titanalkoholate. Durch den Chelateffekt gewinnen die jeweiligen Komplexe nicht nur an Stabilität gegenüber Hydrolysereaktionen und sind somit kontrollierter in polynukleare Komplexe überführbar,^[23] sondern sie haben noch weitere positive Eigenschaften für das Verspinnen von Fasern: Aufgrund der eingeführten Chelatliganden können die Komplexe zum einen besser intermolekular wechselwirken, was zu einer Erhöhung der viskosen Eigenschaften führt. Zum

anderen zeigen diese Komplexe eine höhere Löslichkeit in einem alkoholischen Lösungsmittel und fallen in der viskosen Spinnmasse nicht als Feststoff aus.^[20]

Als Chelatliganden dienen beispielsweise Carbonsäuren, β -Diketone, α -Aminosäuren oder 1,2-Dihydroxybenzole, wobei das Hauptaugenmerk liegt in dieser Arbeit auf den organischen Säuren, die deprotoniert als Carboxylate chelatisieren.^[24-25]

In einem Titankomplex kann ein Carboxylatligand auf zwei verschiedene Weisen koordinieren (vgl. Abb. 3): Zum einen über monodentate Koordination (η^1 -OOCR; „Ester-Typ“), d. h. ein Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe ist an der Koordination zu einem Titanatom beteiligt, zum anderen mit bidentater Koordination, bei der beide Sauerstoffatome der Carboxylateinheit an Titan koordiniert vorliegen. Die bidentate Koordination kann zudem unverbrückt (η^2 -OOCR) und verbrückt (μ -OOCR) erfolgen.^[26]

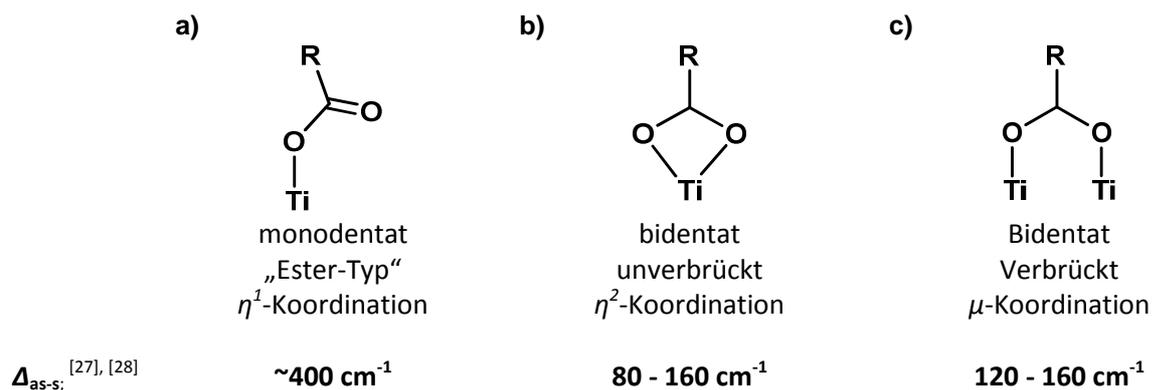


Abb. 3 : Schema möglicher Koordinationsmodi von Carboxylatliganden (R = H, CH₃) an Titan und deren Wellenzahldifferenzen Δ_{as-s} im FTIR-Spektrum: a) monodentat (η^1 -OOCR), b) bidentat unverbrückt (η^2 -OOCR) und c) bidentat verbrückt (μ -OOCR).

Mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie kann anhand der Differenz Δ_{as-s} der Bandenpositionen der asymmetrischen (ν_{as}) und symmetrischen (ν_s) C-O-Streckschwingung der Carboxylateinheit auf den vorliegenden Koordinationsmodus geschlossen werden. Diese Methode beruht auf einer experimentellen Arbeit von Deacon und Phillips^[29], die sämtliche Kristallstrukturen von Acetat- und Trifluoroacetatkomplexen mit ihren FTIR-Spektren verglichen haben. Dabei konnten sie folgende Schlussfolgerungen treffen: Ist Δ_{as-s} des koordinierten Carboxylats größer als bei dem unkoordinierten Carboxylat, so liegt eine monodentate Komplexierung vor. Ist der Wert von Δ_{as-s} kleiner als bei dem unkoordinierten Carboxylat, handelt es sich um bidentate Koordination.

Diese Methode wird mittlerweile in der Literatur häufig bei Titankomplexen eingesetzt. Hierbei liegt die Differenz $\Delta_{\text{as-s}}$ der beiden C-O-Streckschwingungen bei monodentater Komplexierung bei ca. 400 cm^{-1} . Bei bidentater Koordination ergibt die Differenz Werte von 80 bis 160 cm^{-1} , wobei bei verbrückten Carboxylatliganden der Wert meist bei höheren Wellenzahlen ($120\text{-}160 \text{ cm}^{-1}$) liegt.^{[27,}

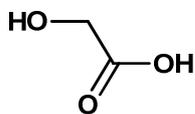
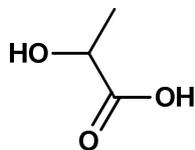
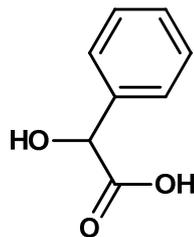
30]

In der Literatur sind verschiedene Titan-oxo-alkoxo-carboxo-Cluster bekannt. Tabelle 1 zeigt zusammenfassend die Summenformeln verschiedener bekannter Cluster.^[21] Auffallend bei den bekannten Clustern ist, dass als Alkoxoliganden meist sterisch anspruchsvolle Reste (= R) verwendet werden. Dies stellt in dieser Arbeit einen weiteren zu berücksichtigenden Aspekt dar. Aufgrund der Verwendung als Biomaterial wird sich in dieser Arbeit auf das Titanalkoxid TEOT beschränkt, so dass verbleibende Ethoxy-Gruppen *in-vivo* oder *in-vitro* als metabolisierbares Ethanol abgespalten werden. Dementsprechend können die Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen nicht über sterisch anspruchsvolle Alkoxyliganden reguliert werden.

Tabelle 1 : Überblick über bekannte Titan-oxo-alkoxo-carboxo-Cluster (Die Abkürzung „Ti:R'COO“ entspricht dem Verhältnis von Ti-Atomen zu Carboxylatliganden). In Anlehnung an [21] und mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Summenformel	R:	R':	Ti : R'COO
[Ti ₂ O(OR) ₂ (HOR) ₂ (OOCR') ₄]	<i>i</i> Pr	Cl ₃	0,5
[Ti ₃ O(OR) ₇ (OOCR') ₃]	<i>i</i> Pr	Cl ₃	1
[Ti ₃ O(OR) ₈ (OOCR') ₂]	CH ₂ CMe ₃	H, Me, CH ₂ CMe ₃	1,5
[Ti ₄ O ₂ (OR) ₆ (OOCR') ₆]	<i>i</i> Pr	CH=CH ₂	0,67
[Ti ₄ O ₂ (OR) ₁₀ (OOCR') ₂]	<i>i</i> Pr	<i>i</i> Pr, H	2
[Ti ₄ O ₄ (OR) ₄ (OOCR') ₂]	<i>i</i> Pr	CCo(Co) ₉	2
[Ti ₆ O ₄ (OR) ₈ (OOCR') ₈]	Et	Me, C(CH ₃)=CH ₂	0,75
	Pr	Ph, CH=CH ₂	
	<i>i</i> Pr	Me, Me ₂ Br	
[Ti ₆ O ₄ (OR) ₁₂ (OOCR') ₄]	<i>i</i> Pr	Me	1,5
	Et	CCo(Co) ₉	
[Ti ₆ O ₄ (OR) ₁₄ (OOCR') ₂]	Et	Ph	3
[Ti ₆ O ₆ (OR) ₂ (OOCR') ₁₀]	<i>i</i> Pr	Ph	0,6
[Ti ₆ O ₆ (OR) ₆ (OOCR') ₆]	Et	Me, PhOPh	1
	<i>i</i> Pr	Me, PhOPh, CHCl ₂ , H, <i>t</i> Bu	
	CH ₂ CMe ₃	Ph	
	SiMe ₃	<i>t</i> Bu, CH ₂ <i>t</i> Bu, C(Me) ₂ Et	
[Ti ₉ O ₈ (OR) ₄ (OOCR') ₆]	Pr	C(CH ₃)=CH ₂	1,5
[Ti ₁₂ O ₁₂ (OR) ₁₈ (OOCR') ₆]	Pr	Me	2
[Ti ₁₄ O ₁₉ (OH)(OR) ₁₃ (OOCR') ₄]	<i>t</i> Bu	Me	3,5
[Ti ₁₈ O ₂₅ (OR) ₁₂ (OOCR') ₁₀]	<i>t</i> Bu	Me	1,8
[Ti ₂₈ O ₄₀ (OR) ₂₀ (OOCR') ₁₂]	<i>t</i> Bu	Me	2,33

Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Koordination von Carboxylaten die α -Hydroxycarbonsäuren Glykolsäure (GA, glycolic acid), Milchsäure (LA, lactic acid) und Mandelsäure (MA, mandelic acid), die einfachen Carbonsäuren Essigsäure (AA, acetic acid), Propionsäure (PA, propionic acid) sowie die Dicarbonsäure mit einer α -Hydroxyeinheit Äpfelsäure (MalA, malic acid) verwendet. Ein Überblick der Strukturformeln ist in Abb. 4 dargestellt.

a) α -HydroxycarbonsäurenGlykolsäure
(GA)Milchsäure
(LA)Mandelsäure
(MA)

b) einfache Carbonsäuren

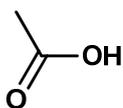
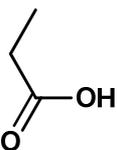
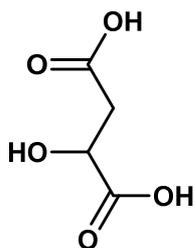
Essigsäure
(AA)Propionsäure
(PA)c) Dicarbonsäure mit einer α -HydroxyeinheitÄpfelsäure
(MalA)

Abb. 4 : Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten (a) α -Hydroxycarbonsäuren GA, LA und MA, (b) der einfachen Carbonsäuren AA und PA sowie (c) der Dicarbonsäure mit einer α -Hydroxyeinheit MalA.

Zum einfacheren Verständnis wird im Folgenden die Nomenklatur der Koordinationsmodi der α -Hydroxycarbonsäuren an die der einfachen Carbonsäuren angelehnt. D. h. die Begriffe mono- und bidentat beziehen sich nur auf die Anzahl der Sauerstoffatome der Carboxylatfunktion, die an der Chelatbindung beteiligt sind und nicht auf die allgemeine Zähigkeit des Liganden.

α -Hydroxycarbonsäuren können zusätzlich mit der α -Hydroxyeinheit an Titan koordinieren, so dass ein thermodynamisch stabiler Fünfring entsteht. Da hier nur ein Sauerstoffatom der Carboxylateinheit an der Koordination zu Titan beteiligt ist, wird diese Koordination in dieser Arbeit als monodentat bezeichnet. Abb. 5 zeigt die möglichen Koordinationsweisen von α -Hydroxycarbonsäuren.

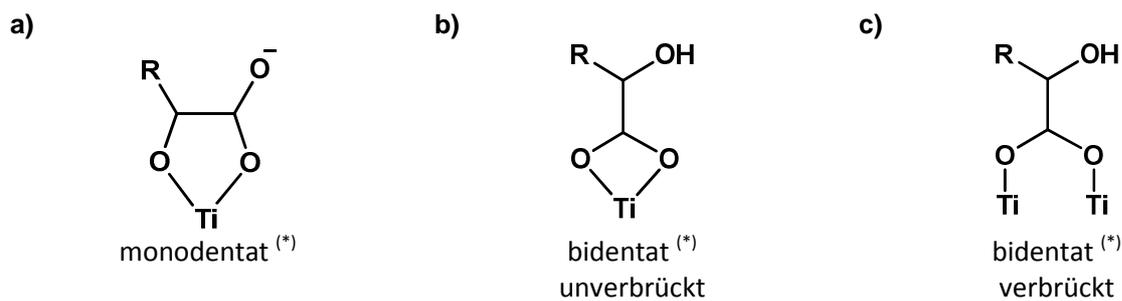


Abb. 5 : Schema möglicher Koordinationsmodi von α -Hydroxycarbonsäuren ($R = H, CH_3, C_6H_5$) an Titan: **a)** monodentat, **b)** bidentat unverbrückt und **c)** bidentat verbrückt. (*) Die Begriffe mono- und bidentat beziehen sich auf die Anzahl der Sauerstoffatome der Carboxylateinheit, die an der Koordination an Titan beteiligt sind und nicht auf die Zähnnigkeit des Chelatliganden.

In der Literatur sind nur wenige titanhaltige Systeme mit α -Hydroxycarbonsäuren bekannt. Das am weitesten verbreitete System ist der kommerziell erhältliche Komplex Titan(IV)-bis(ammoniumlactato)dihydroxid (TiBALDH). Dieser in wässriger Lösung stabile Komplex dient als Ausgangsstoff für z. B. die Synthese von phasenreinen Anatas- oder Rutil-Partikeln^[31-33]. Dennoch ist wenig über seine genaue Struktur bekannt. Eine Studie von Seisenbaeva *et al.*^[34] zeigt, dass sich die in Wasser gelöste Verbindung in einem Gleichgewicht aus dem vierkernigen Komplex $(NH_4)_8[Ti_4O_4(LA)_8]$ und dem einkernigen Komplex $(NH_4)_2[Ti(LA)_3]$, sowie TiO_2 -Nanopartikeln, an deren Oberfläche Lactatfunktionalitäten vorliegen, befindet (vgl. Abb. 6).

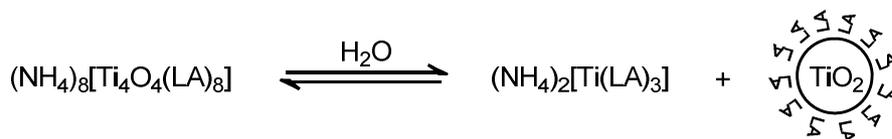


Abb. 6 : Chemisches Gleichgewicht der kommerziell erhältlichen Substanz TiBALDH in wässriger Lösung.^[34]

In wässriger Lösung ist zudem ein geladener Titankomplex mit Citratliganden (Cit) – einem Tricarboxylat mit α -Hydroxyeinheit – bekannt.^[35-37] Ein Strukturbeispiel hierfür mit bekannter Röntgeneinkristallstruktur ist das Kaliumsalz dieses Komplexes mit der Summenformel $K_5[Ti(Cit)_3] \cdot 4 H_2O$.^[35]

Des Weiteren können wasserlösliche Titankomplexe mit α -Hydroxycarboxylat-Liganden und Peroxo-Liganden ausgehend von Titanpulver synthetisiert werden. Hierzu wird Titanpulver in ammoniakalischer Wasserstoffperoxid-Lösung aufgelöst und das Gemisch anschließend mit z. B. GA bei 80 °C umgesetzt. Daraus resultieren Titanoxo-Cluster der Summenformel $(NH_4)_6[Ti_4(GA)_6(O_2)_4O_2] \cdot 4H_2O$.^[38] Aufgrund des Gehalts an Peroxo-Liganden wird dieser Weg in

dieser Arbeit nicht weiter zur Herstellung eines Fasermaterials verfolgt, da das zu entwickelnde Material als Biomaterial dienen soll.

Eine Verarbeitung zu Fasern ausgehend von einem Sol aus einem Titanalkoxid und einer α -Hydroxycarbonsäure ist dem Autor nicht bekannt. Derartige Sole wurden bisher nur zu (Nano)Partikeln^[39-42] und Sol-Gel-Schichten^[43-46] weiterverarbeitet.

Vielfach wurde das Adsorptionsverhalten verschiedener α -Hydroxycarbonsäuren auf TiO_2 -Oberflächen untersucht.^[47-50] Diese Informationen können zwar als Anhaltspunkte verwendet werden, sind aber nicht exakt auf die in dieser Arbeit herzustellenden Materialien übertragbar. In den Adsorptionsuntersuchungen wurden die Säuren auf kristallinen TiO_2 -Oberflächen (z. B. Rutil und Anatas) adsorbiert; in der vorliegenden Arbeit werden die Säuren *in situ* mit Titanalkoxiden zu amorphen hybriden TiO_2 -Materialien umgesetzt.

II) Biokompatibilität von hybriden TiO₂-Materialien

Begriffe wie Biomaterialien und Biodegradierbarkeit beziehen sich in dieser Arbeit ausschließlich auf die Verwendung im medizintechnischen Bereich und nicht auf natürliche Biomaterialien wie Holz und seine biologische Abbaubarkeit in der Umwelt.

Laut Definition der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien handelt es sich bei Biomaterialien um Materialien, die in einem medizinischen Anwendungsfeld in Interaktion mit biologischen Systemen stehen.^[51] Hierfür muss das eingesetzte Material eine Biokompatibilität aufweisen. D. h. das verwendete Material soll die einsetzende Fremdkörperreaktion möglichst minimieren und eine Abstoßungsreaktion des Körpers gegen das Material soll verhindert werden.^[51]

Die erste Generation an Biomaterialien ahmt die physikalischen Eigenschaften des zu ersetzenden Gewebes nach, verhält sich inert gegenüber dem umliegenden biologischen Gewebe und wird meist durch Bindegewebe eingekapselt.^[52] Beispielsweise werden Hüftprothesen aus Metalllegierungen gefertigt, die die Stützfunktion des Knochens übernehmen und eine möglichst geringe Abstoßungsreaktion zeigen.^[53]

Ab Mitte der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts kamen die ersten bioaktiven Materialien in die klinischen Studien (2. Generation). Dies bedeutet, dass diese Materialien zur besseren Heilung eine chemische Antwort im umliegenden Gewebe hervorrufen.^[52] Ein Beispiel hierfür sind Biogläser. Beispielsweise kann durch eine Oberflächenmodifizierung mit Silanolgruppen vom Körper Hydroxyapatit auf der Implantatoberfläche abgeschieden werden, was zu einer besseren Adhäsion von Knochenzellen (Osteoblasten) führt. Dadurch entsteht an der Grenzfläche zum Material neues Knochengewebe. Dieses Verwachsen resultiert letztendlich in einer höheren mechanischen Stabilität.^[54] Ein weiterer Fortschritt mit den Biomaterialien der zweiten Generation war die Entwicklung von biodegradierbaren Werkstoffen. Dies ermöglicht nach Applikation den physikalischen Ersatz des zu heilenden Gewebes. Nach Einwachsen der entsprechenden Zellen degradiert das Material allmählich und wird über die Zeit komplett durch neues Gewebe ersetzt.^[54] Die Polymere Polylaktid (PLA), Polyglykolid (PGA) oder das Co-Block-Polymer aus Polylaktid und Polyglykolid (PLGA) weisen diese Eigenschaft auf.^[55-56] Aus diesen Materialien werden beispielsweise Nahtmaterialien, Herniennetze oder Schrauben hergestellt.^[56]

In der dritten Generation von Biomaterialien werden vom Material molekulare Signale ausgesandt, welche spezifisch zelluläre Antworten stimulieren. Beispielsweise können durch die Freisetzung des Wachstumsfaktors BMP (knochenmorphogenetisches Protein) aus dem Biomaterial die Bildung von Knochenzellen stimuliert werden.^[52]

Die Biokompatibilität bzw. die Zytotoxizität (Zelltoxizität) der Materialien kann in Anlehnung an DIN EN ISO 10993 - 5 durchgeführt werden.

Hierfür wird z. B. der WST-1-Test mit verschiedenen Verdünnungen an Extrakten des Materials mit einer Zelllinie (z. B. Mausfibroblasten der Zelllinie L929) durchgeführt. Das zu untersuchende Material wird für einen bestimmten Zeitraum bei 37 °C in Zellkulturmedium eingelegt. In diesem Zeitraum kann das Material Stoffe an das Zellkulturmedium abgeben. Anschließend werden die ausgewählten Zellen mit diesem Zellkulturmedium-Extrakt für 24 h kultiviert. Danach wird die Morphologie der Zellen untersucht, die Zellzahl bestimmt und die WST-1-Aktivität (wasserlösliches Tetrazoliumsalz) gemessen.

Die WST-1-Aktivität ist ein Maß für die Vitalität und Stoffwechselaktivität der Zellen. Zellen mit einer intakten Atmungskette verstoffwechseln das WST-1-Reagenz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in ein Formazan (vgl. Abb. 7). Dieses wasserlösliche Formazan absorbiert Licht der Wellenlänge von 450 nm, so dass dessen Bildung über Messungen an einem Photometer nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Sowohl die Ergebnisse aus der Bestimmung der Zellzahl, als auch die Werte aus der WST-1-Aktivität werden auf die Werte von Zellen, die mit frischen Zellkulturmedium inkubiert wurden, bezogen.

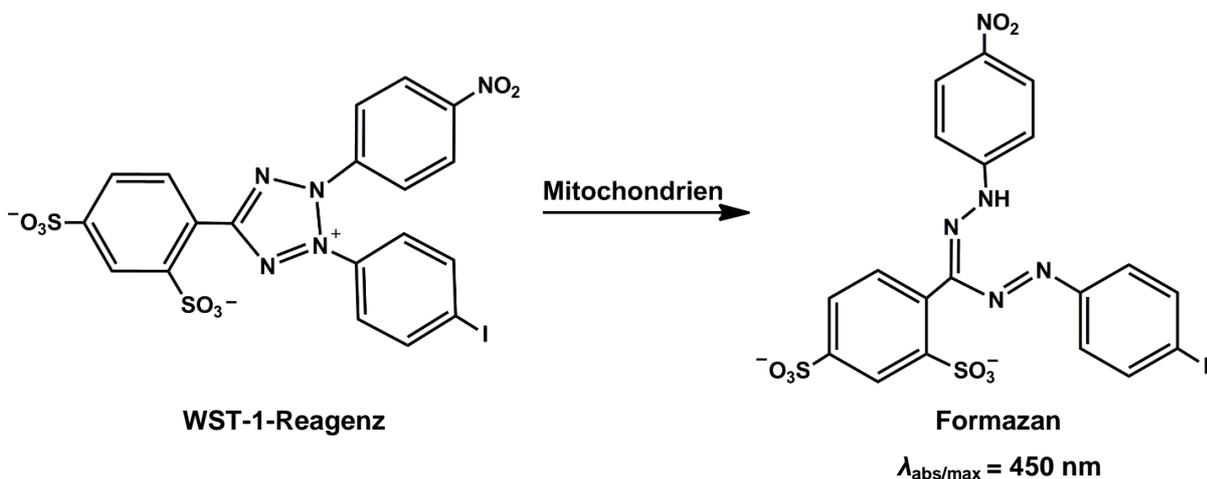


Abb. 7 : Reaktionsschema zur Verstoffwechslung des WST-1-Reagenzes zu einem Formazan.

Die Zytotoxizität des Materials kann in vier Grade eingeteilt werden (vgl. Tabelle 2). Bei Werten zwischen 100 und 81 % ist das Material als nicht zytotoxisch einzustufen. Werte zwischen 80 und

71 % gelten als schwach zytotoxisch, Werte zwischen 70 und 61 % als mäßig zytotoxisch und Werte von ≤ 60 % als stark zytotoxisch.

Tabelle 2 : Einteilung der Zytotoxizitätsskala.

Wert aus Zytotoxizitätstest *	Einstufung
100 – 81 %	keine Zytotoxizität
80 – 71 %	schwache Zytotoxizität
70 – 61 %	mäßige Zytotoxizität
≤ 60 %	starke Zytotoxizität

* bezogen auf Negativkontrolle

Einige biodegradierbare Biopolymere sind bereits medizinisch zugelassen.^[51, 57-58] Dabei sind für diese Arbeit die Polyester Polylaktid (PLA), Polyglykolid (PGA) und ein Coblockpolymer aus Polylaktid und Polyglykolid (PLGA), sowie das Polysaccharid Chitosan (CHI) von Interesse. In Abb. 8 sind die jeweiligen Strukturformeln zusammengefasst.

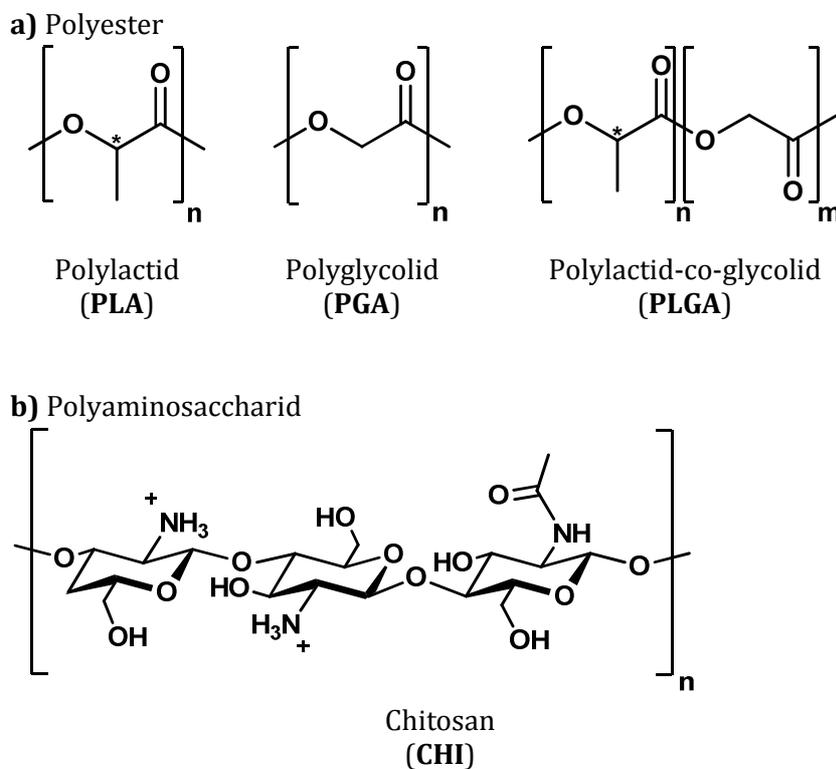


Abb. 8 : Strukturformeln verschiedener Biopolymere: **a)** Die Polyester: Polylaktid (PLA), Polyglykolid (PGA), Polylaktid-co-glykolid (PLGA) und **b)** ein Polyaminosaccharid: Chitosan (CHI). (* = Chiralitätszentrum).

Die Abbauprozesse von PLA, PGA und PLGA hängen von verschiedenen Parametern, wie der Kettenlänge, der Kristallinität, der Stereochemie (bei PLA) und anderen Faktoren ab.^[51] Neben enzymatischen und radikalischen Degradationsprozessen findet bei diesen Polyestern im Allgemeinen eine hydrolytische Spaltung der Estergruppe statt, so dass die Monomere Milchsäure und Glykolsäure als Abbauprodukte entstehen. Zudem handelt es sich bei der Degradation meist um eine sog. „bulk erosion“. D. h. das Polymer wird nicht gleichmäßig über die komplette Oberfläche hinweg abgebaut („surface erosion“). Vielmehr werden größere Teile von der Polymeroberfläche abgelöst.^[59]

Chitosan ist das einzig natürlich vorkommende positiv geladene Polysaccharid, was auf protonierbare Amingruppen zurückzuführen ist.^[60] Das Polymer kann in großem Maßstab durch Deacetylisierung von Chitin gewonnen werden.^[61] Je nach Grad der Deacetylisierung wird die Löslichkeit des Polymers in Wasser beeinflusst. Durch Protonierung der primären Amine löst sich das Polymer vollständig in wässriger Lösung. Demnach ist das Polymer in Essigsäure- oder Milchsäure-Lösung mit einem pH-Wert von < 6 löslich.^[62] Eine Herausforderung stellt die schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln dar, was zu vielen Problemen in der Verarbeitung des Materials führt.^[63-64] Auch in Ethanol ist Chitosan kaum löslich.^[65]

Dennoch ist Chitosan nicht nur aufgrund seiner blutungsstillenden^[66-67], antimikrobiellen^[68-69] Eigenschaften, sondern auch aufgrund der begünstigten Zelladhäsion durch den kationischen Charakter^[70], ein vielversprechendes Biomaterial.

In Rahmen dieser Arbeit werden als organische Komponente hauptsächlich die α -Hydroxycarbonsäuren Glykolsäure (GA), Milchsäure (LA) und Mandelsäure (MA), sowie Essigsäure (AA) und Propionsäure (PA) als Chelatliganden verwendet.

Lactat, das Salz der Milchsäure, ist ein körpereigenes Stoffwechselprodukt und wird im Muskel aus überschüssigem Pyruvat gebildet. Der Abbau von Lactat kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen über die Plasmamembranen von Zellen: Dort wird Lactat unter aeroben Bedingungen zu Pyruvat umgewandelt und schließlich über den Zitronensäurezyklus in energiereichere Verbindungen wie Fettsäuren oder Cholesterin verstoffwechselt oder über die Atmungskette komplett zu CO₂ und H₂O abgebaut. Zum anderen über den Corizyklus: Über die Gluconeogenese wird aus Lactat in der Leber Glucose erzeugt, die nach Abgabe an einen kontrahierenden Muskel wieder über Pyruvat zu Lactat unter ATP-Bildung abgebaut wird.^[71] Neuere Entwicklungen in der Forschung geben Lactat eine weitaus größere Bedeutung im Körper. Neben den oben beschriebenen Funktionen kann Lactat sowohl intra- als auch interzellulär weitergeleitet und an geeigneter Stelle metabolisiert werden. Dadurch fördert Lactat unter anderem auch die Wundheilung und -regeneration oder wirkt als mobiler Treibstoff für den aeroben Stoffwechsel.^[72]

Glykolsäure bzw. ihr Salz Glykolat ist ebenfalls wie Lactat ein Abbauprodukt eines biokompatiblen und medizinisch zugelassenen Biopolymers (in diesem Fall PGA bzw. PLGA. Die Verstoffwechslung von Glykolat erfolgt im Körper ebenfalls über den Zitronensäurezyklus.^[73]

Mandelsäure findet Verwendung in der topischen Anwendung, z. B. als Salbe gegen Akne^[74], und kann vom Körper über den Urin als Phenylglyoxylsäure und Hippursäure ausgeschieden werden.^[75]

Acetat und Propionat, die Salze der Essig- und Propionsäure, können über Anbindung an das Coenzym-A (CoA) aktiviert werden und über den Zitronensäurezyklus abgebaut werden.^[76] Acetyl-CoA ist das Endprodukt der Glykolyse und gelangt als selbiges direkt in den Zitronensäurezyklus.^[71] Propionat-CoA wird enzymatisch in Succinyl-CoA überführt und geht in dieser Form in den Zitronensäurezyklus ein.^[76]

Diese organischen Moleküle sollen im Rahmen dieser Arbeit mit dem anorganischen Material TiO₂ kombiniert werden.

Titan und Titanlegierungen finden aufgrund ihrer chemischen Inertheit, Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts Anwendung als Implantatmaterial.^[77] Diese Eigenschaften können auf die Bildung einer ca. 3 – 7 nm dicken passivierenden Titan(IV)oxidschicht auf der Metalloberfläche zurückgeführt werden, auf der neben an Titanionen koordinierte Hydroxygruppen auch Wasser und andere organische Moleküle wie Aminosäuren und Proteine anbinden bzw. adsorbieren können.^[78] Eine schematische Darstellung einer passivierenden Titanimplantatoberfläche ist in Abb. 9a dargestellt. Die Löslichkeit des Titan(IV)oxidfilms ist unter physiologischen Bedingungen sehr gering und liegt unterhalb der Toxizitätsgrenze. Laut einer Löslichkeitsstudie von Sugimoto *et al.*^[79] liegt die Sättigungskonzentration von amorphen Titan(IV)oxid bei physiologischem pH-Wert von 7.4 in wässriger Lösung bei ca. 1 μM (vgl. Abb. 9b). Dabei wird zuerst zum größten Teil Titan-tetrahydroxid Ti(OH)₄^[80] und Ti(O)(OH)₂^[81] freigesetzt, welche mit körpereigenen, organischen Molekülen wie Zitronensäure oder Proteinen zu metallorganischen Komplexen reagieren können. In Gegenwart beispielsweise eines Citratpuffers (pH = 6) können amorphe titanoxidbasierte Partikelsysteme aufgelöst werden.^{[82],[83]} Eine Chelatisierung von Titanionen erhöht demnach die Löslichkeit von Titan in Wasser, was eine Erklärung dafür darstellt, dass der Titangehalt im Meerwasser, als auch im menschlichen Serum (1 – 2 μM Ti bei Personen ohne titanhaltige Implantate und bis zu 73 μM Ti bei Personen mit titanhaltigen Implantaten)^[84] über dem Wert der Sättigungskonzentration von TiO₂ (~ 1 μM Ti) in Wasser bei Raumtemperatur liegt.

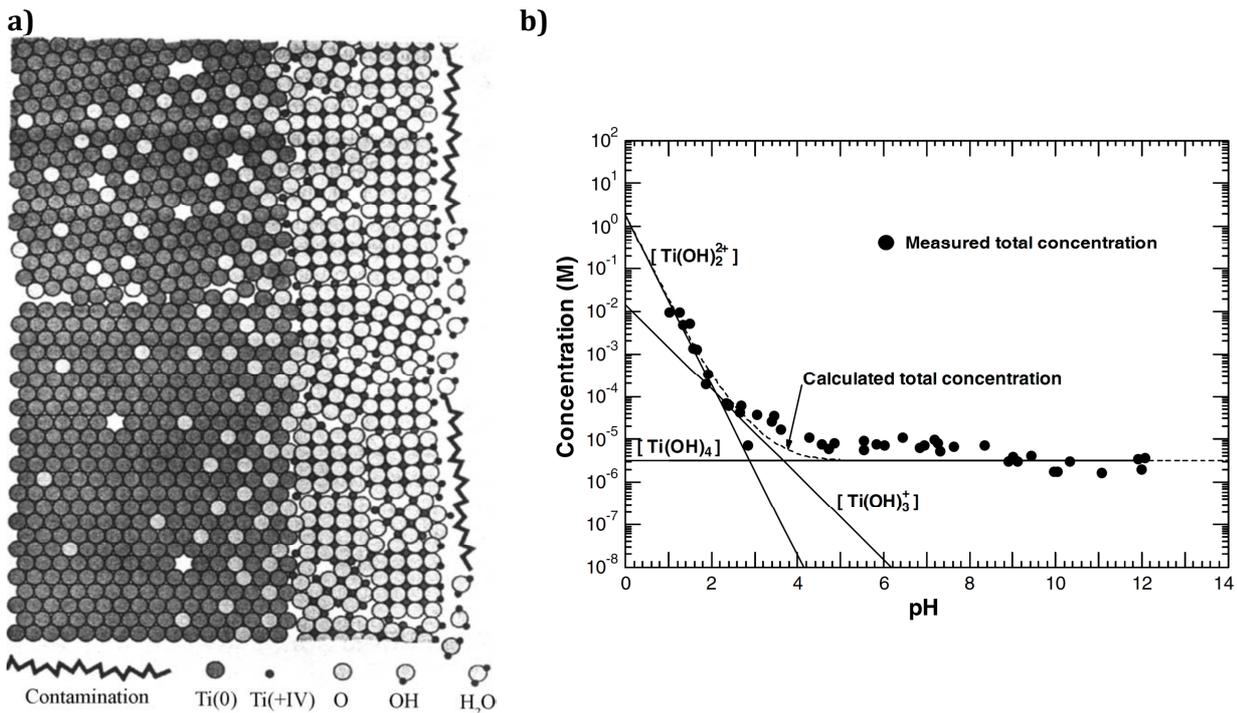


Abb. 9 : **a)** Schematische Darstellung eines Titanoxidfilms auf einem reinen Titanimplantat^[85] (mit freundlicher Genehmigung von Springer Science + Business Media); **b)** Löslichkeit von hydrolysiertem Titanisopropylat in wässriger Lösung über einen pH-Bereich von 1 bis 14. Eine 50 mM Suspension an Titanoxidniederschlag in Wasser wurde mit NaClO₄ auf eine Ionenstärke von 0.1 und den entsprechenden pH-Wert angepasst und für 72 h bei RT gealtert. Der Titan-Gehalt der überstehenden Lösung wurde mittels ICP-Analyse detektiert^[79] (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier).

Im Meerwasser liegt Titan höchstwahrscheinlich an Siderophore gebunden vor; das sind aus Bakterien und Pilzen stammende, eisenbindende niedermolekulare Verbindungen oder Oligomere.^[86] In einigen Meeresorganismen scheint Titan sogar eine wichtige Rolle zu spielen. Beispielsweise kann in Seescheiden, Schwämmen, Dinoflagellaten (Panzergeißlern) oder in den Zellwänden der Kieselalge eine Anreicherung von Titan erkannt werden.^[87] Auch Insekten wie die orientalische Hornisse verwenden Titan – höchstwahrscheinlich in Form von Ilmenit (FeTiO₃) - zum Bau ihrer Waben.^[88]

Die Auswirkungen von TiO₂ und die im Körper entstehenden Titankomplexe auf den Menschen sind momentan von großem Forschungsinteresse.^[89] Eine eindeutige biologische Funktion von Titan im menschlichen Körper konnte bisher nicht gefunden werden. Dennoch kann im menschlichen Organismus bedingt durch Ernährung, Kosmetikprodukte, Titanoxidnanopartikel in der Umwelt und auch durch Titanimplantate in jedem Organ ein gewisser Titangehalt detektiert werden.^[90-92]

Wie oben beschrieben können Ti⁴⁺-Ionen mit Citratliganden in einen wasserlöslichen, unter physiologischen Bedingungen stabilen Komplex überführt werden, so dass aufgrund der hohen Citratkonzentration im Blutplasma (~ 100 μM)^[93] auch dort freie Ti-Spezies von Citrat als

Komplexbildner abgefangen werden. Gerade Patienten mit titanhaltigen Implantaten weisen eine erhöhte Titankonzentration im Serum und Haaren auf.^{[94],[95]} Die Eisen(III)bindungsstellen im Eisentransportprotein Transferrin im menschlichen Serum sind nur zu 30 – 40 % mit Fe³⁺-Ionen besetzt. An die freien Bindungsstellen können einige Metallionen, darunter auch Ti⁴⁺, koordinieren.^{[96],[97]} Dabei kann nicht jeder im Serum lösliche und stabile Titancarboxylatkomplex Ti(IV) an Transferrin übertragen werden; Titan(IV)citratkomplexe übertragen ihr Ti⁴⁺-Ion an das Protein, Titan(IV)nitrilotriacetatkomplexe dagegen nicht.^[97] Aussagen über die biologische Aktivität von Titan können im Moment nur sehr begrenzt getätigt werden. Neben der Bildung von Titan(IV)citrat im Serum sollten ebenfalls Titan-Transferrin-Addukte entstehen, die über die bekannten Eisen(III)wege im Körper weitergeleitet werden.^[97] Die Tatsache, dass Ti⁴⁺-Ionen an Transferrin binden, scheint zudem eine Schlüsselrolle in der Wirkungsweise von titanhaltigen Zytostatika wie Cp₂TiCl₂ (Cp: Cyclopentadienyl) oder Budotitane zu spielen.^[98] Es gibt sogar Vermutungen, dass Patienten mit titanhaltigen Hüftimplantaten weniger an Magenkrebs erkranken als Menschen ohne Implantat.^[89]

In einer Arbeit von Suwalski *et al.*^[93] wurde der Effekt von Titan(IV)citrat auf rote Blutkörperchen (Erythrozyten) untersucht. Bei einer Konzentration von 100 µM an Titankomplex zeigten Erythrozyten eine sehr schwache Änderung in ihrer Form, Konzentrationen von 500 µM und 800 µM dagegen bewirken eine stärkere Verformung der Blutkörperchen. Unter Berücksichtigung, dass die Citratkonzentration im Blutplasma lediglich bei 100 µM liegt, sind die getesteten Komplexkonzentrationen als sehr hoch einzustufen und die tatsächliche Konzentration an Titan(IV)citratkomplexen im Körper sollte die Funktion der Erythrozyten nicht beeinträchtigen.

Ein Komplex, der den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Verbindungen sehr ähnlich ist, wurde hinsichtlich seines Umwelteinflusses untersucht. Dabei handelt es sich um TiBALDH, einen kommerziell erhältlichen, wasserlöslichen Titan(IV)lactat-Komplex. TiBALDH dient dabei als Modellabbauprodukt von Titanoxidnanopartikeln in Mensch und Umwelt. Das Pollenschwanzwachstum von Tabakpflanzen wurde bis zu einer Konzentration von 15 mM nicht gehemmt.^[99] Ebenfalls können Kieselalgen TiBALDH ohne zytotoxische Effekte aufnehmen.^[100]

Titan(IV)oxid etabliert sich als Biomaterial immer mehr. Seit vielen Jahren bereits finden Titan(IV)oxidbeschichtungen und Oberflächenstrukturierungen auf TiO₂-Basis Anwendung auf Implantaten für mineralisiertes Gewebe wie z. B. in der Hüftgelenkschirurgie^[101] oder Dentaltechnik^[102-103]. Neuerdings werden auch Biomaterialien für den Einsatz im Weichgewebe mit TiO₂ beschichtet, wie Herniennetze^[104] oder Stents^[105-106].

Diese Arbeit basiert auf dem Ziel ein neues faserförmiges Biomaterial zu generieren, dessen Materialbasis aus TiO₂ besteht. Um dieses TiO₂-haltige Material über Sol-Gel-Chemie darzustellen,

muss die Hydrolysefähigkeit des Titanalkoxy-Präkursors über Chelatliganden, wie z. B. Milchsäure, eingestellt werden. Daraus resultiert ein anorganisch-organisches Hybridmaterial.

In der Literatur sind viele Kompositmaterialien beschrieben, bei denen Biopolymere – wie PLA, PLGA etc. – mit TiO₂-Nanopartikeln modifiziert werden, um verschiedene Materialeigenschaften zu verbessern. Dabei konnten beispielsweise die mechanischen und thermischen Eigenschaften verbessert, die Kristallinität des Polymers erhöht, die Viskosität erniedrigt, die Barriereigenschaften von Schichten und das Degradationsverhalten von Scaffolds beeinflusst und die antibakteriellen Eigenschaften verbessert werden.^{[107],[108],[109],[110],[111]}

Hybridmaterialien, die aus einer Mischung eines Titanalkoxids und Biopolymeren wie PLA, CHI oder Polycaprolacton (PCL) hergestellt werden, sind ebenfalls bekannt und teilweise auch hinsichtlich ihrer Biokompatibilität geprüft.^[112-113]

Auch Nanofasern, die aus Titanalkoxiden hergestellt werden, sind bereits in der Literatur erwähnt. Diese werden in Kombination mit einem Biopolymer (z. B. Seide, PCL oder Polyvinylpyrrolidon (PVP)) über die Methode des Elektrosplennens hergestellt.^[114-119] Auch TiBALDH wurde bereits in Kombination mit Polyvinylalkohol (PVA) zu Nanofasern versponnen. Diese Fasern wurden anschließend getempert und sollen Anwendung in der Photokatalyse finden.^[120-121]

In elektroversponnenen Mikrofaserscaffolds ist oftmals die Maschenweite zwischen den Fasern derart gering, dass die Zellmigration nach Besiedlung des Scaffold-Materials schwierig ist.^[122] Beispielsweise hat ein Mausfibroblast der Zelllinie L929 eine Größe von etwa 20 µm (vgl. Abb. 10); die Maschenweiten von elektrogenesponnenen Fasern liegen meist im Submikrometer-Bereich.

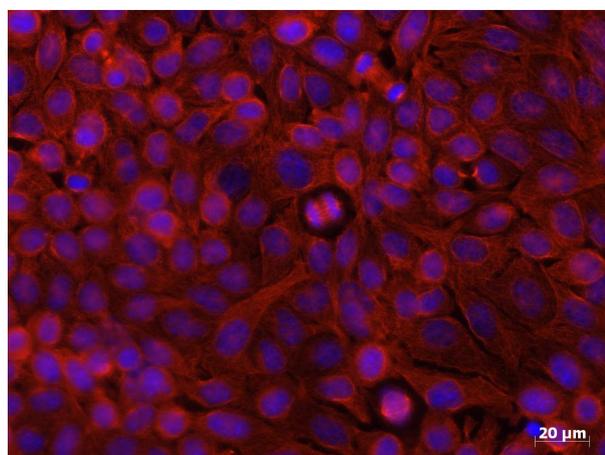


Abb. 10 : Mausfibroblasten der Zelllinie L929 auf einem Glassubstrat. Der Zellkern ist blau eingefärbt; das Zytoskelett rot.

Kurokawa *et al.* beschreibt eine Mikrofaser, die aus Titanisopropylat und Cellulose hergestellt wurde.^[123] Eine biokompatible hybride Mikrofaser, die zum Großteil aus anorganischem TiO₂ besteht und mit verschiedenen organischen Liganden – wie organische Säuren und Ethoxygruppen – modifiziert ist, wurde nach dem Kenntnisstand des Autors noch nicht veröffentlicht.

Eine hybride Faser, die aus einem TiO₂-Netzwerk mit metabolisierbaren organischen Funktionalitäten besteht, stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung eines faserförmigen, biokompatiblen Zellträgermaterials dar. Durch das Verspinnen des Materials zu einem Faservlies aus Mikrofasern analog zu einem von Glaubitt *et al.* entwickeltem Kieselgel-Faservlies^[10] kann man ein Scaffold erwarten, das eine genügend hohe Porosität im Faservlies zur Zellmigration besitzt. Zusätzlich soll hier als Lösungsmittel lediglich Ethanol eingesetzt werden und nicht wie oftmals bei der Methode des Elektrosplinnens üblich toxische organische Lösungsmittel.^[124]

ZIELSETZUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, erstmalig eine Mikrofasern aus einem Sol aus TEOT mit metabolisierbaren organischen Säuren zu generieren. Als Technologie für das Verspinnen der Fasern soll eine Anlage am Fraunhofer ISC in Würzburg verwendet werden. Mit dieser Anlage ist es möglich, viskose Gele über das Anlegen von Druck in Faserform zu überführen.

Demzufolge muss in dieser Arbeit zuerst eine geeignete Solzusammensetzung gefunden werden, die in eine viskose Spinnmasse überführt werden kann. Dabei soll schon während der Solsynthese berücksichtigt werden, dass keine toxischen Substanzen verwendet werden. Beispielsweise soll als Titanquelle nur das Titanalkoxid TEOT verwendet werden, so dass verbleibende Ethoxygruppen im Biomaterial als Ethanol und nicht als ein Alkohol mit höherer toxischer Wirkung auf Zellen abgespalten werden. Somit kann die Reaktivität des Titanalkoxids nicht über sterische anspruchsvollere Alkoxy-Liganden eingestellt werden.

Das erhaltene Fasermaterial wird im Rahmen der Arbeit näher charakterisiert. Beispielsweise soll u. a. auch geprüft werden, dass sich die eingesetzten organischen Säuren im Fasermaterial nicht in ein toxisches Produkt umlagern.

Des Weiteren soll die erhaltene Faser intrinsisch stabil sein und auch im Hinblick auf eine Handhabbarkeit als Zellträgermaterial geprüft werden. D. h. das erhaltene Fasermaterial soll nicht nur im Zytotoxizitätstest in Anlehnung an DIN ISO 10993-5 als nicht zytotoxisch eingestuft werden, sondern soll auch hinsichtlich seiner Degradationseigenschaften und -produkte untersucht werden.

MATERIALIEN UND METHODEN

Die experimentellen Arbeiten wurden in den Laboratorien am Lehrstuhl für Chemische Technologie der Materialsynthese der Universität Würzburg sowie am Fraunhofer ISC durchgeführt.

I) Materialien

Chemikalien zur Fasersynthese

Chemikalie	Hersteller	Reinheit
Titantetraethylat (TEOT)	Dorf Ketal	98 %
Ethanol absolut	Sigma Aldrich	99,8 %
Aceton	Sigma Aldrich	> 99 %
<i>n</i> -Butanol	Sigma Aldrich	> 99 %
<i>D,L</i> -Milchsäure (89 %)	Sigma Aldrich	89 %
<i>D,L</i> -Glykolsäure	Sigma Aldrich	99 %
<i>D,L</i> -Mandelsäure	Sigma Aldrich	99 %
Essigsäure	Sigma Aldrich	> 99,5 %
Propionsäure	Sigma Aldrich	> 99,5 %
Äpfelsäure	Sigma Aldrich	> 99 %
Ammoniakwasser (25 %)	Sigma Aldrich	25 %
Chitosan 85/800	Heppe	Aschegehalt < 1 %
Phenethylamin	Sigma Aldrich	99 %
Phenylalanin	Applichem	> 99 %
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich	> 99 %
Natriumcarbonat	Sigma	> 99 %
Kaliumhydroxid	Sigma Aldrich	> 99 %
Calciumhydroxid	Alfa Aesar	> 98 %
Kaliumbromid	Sigma Aldrich	Reinheit: „for IR spectroscopy“
PBS – Tabletten	Sigma Aldrich	Tabletten
deuteriertes Wasser	Sigma Aldrich	99,9 Atom%

Chemikalien und Materialien für die Zellkultur

Chemikalie / Material	Hersteller
Accutase	PAA
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies
HEPES	Gibco Life Technologies
DMEM	Gibco Life Technologies
Leibovitz's L-15 Medium	Gibco Life Technologies
T 75 Zellkulturflaschen	BD Biosciences
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies
Einmal-Pipetten	Greiner
Pipettenspitzen	Greiner
12-well-plate	NUNC
24-well-plate	NUNC
96-well-plate	NUNC
Zentrifugenröhrchen	Greiner
Deckgläschen (rund)	A. Hartenstein
Goat anti-mouse IgG+IgM (Cy3)	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Monoclonal β -Tubulin	Sigma-Aldrich
Objektträger (76 x 26 x 1 mm)	A. Hartenstein

II) Analytische Methoden

FTIR-Spektroskopie

2 mg einer Probe wurden mit 300 mg KBr zermörsert und mit einer hydraulischen Presse der Firma Specac (10 Tonnen für 5 min) zu einem transparenten Pressling gepresst. Die FTIR-Spektren dieser Presslinge wurden an einem FTIR-4100-Spektrometer der Firma JASCO in einem Wellenzahlbereich von $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ gemessen im Transmissionsmodus. Die Scanrate während der Messung betrug 16 Scans.

TGA-Messungen

Die TGA-Messungen wurden an einem Gerät TG209 IRIS der Firma Netzsch in einem Temperaturbereich von 30 bis 900 °C mit einer Aufheizrate von 10 K/min unter synthetischer Luftatmosphäre (Flussrate: 20 mL/h) in einem Aluminiumoxid-Tiegel durchgeführt. Als Schutzgas wurde Argon verwendet.

DSC-Messungen

DSC-Messungen wurden an einem Gerät DSC204 Phoenix der Firma Netzsch durchgeführt. Die Probe wurde in einen Aluminiumtiegel eingewogen. Anschließend wurde der Tiegel mit einer Presse der Firma Netzsch verschlossen und ein Loch in den Tiegeldeckel gestochen. Es wurde in Referenz zu einem leeren Aluminiumtiegel in einem Temperaturbereich von 30 bis 600 °C gemessen.

NMR-Messungen

NMR-Spektren wurden an einem Gerät Fourier 300 der Firma Bruker ¹H-breitbandenkoppelt mit ca. 70 mg Probensubstanz in D₂O gemessen. Die ¹H-NMR-Messung erfolgte mit einer Scanzahl von 256, die ¹³C-NMR-Messung mit 6144 Scans gemessen.

Festkörper-NMR-Messungen (¹³C-MAS-NMR)

Die ¹³C-VACP/MAS-NMR-Spektren wurden an einem Gerät DSX-400 der Firma Bruker mit dem externen Standard SiMe₄ ($\delta = 0$ ppm) ¹H-breitbandenkoppelt bei einer Frequenz von 100,6 MHz aufgenommen. Dabei wurde ca. 300 mg Probensubstanz eingesetzt.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

REM-Aufnahmen wurden an einem Gerät Supra® 25 der Firma Zeiss mit einem InLens-Detektor aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug 3 kV; der Probe-Detektorabstand 3 mm. Die Proben wurden auf leitfähigen Kohlefaserpads präpariert und mit einem Sputtergerät der Firma Balzers Union des Typs MED010 für 20 s bei einer Spannung von 30 mA und einen Probenabstand von 9 cm mit Platin besputtert.

Electron Scanning Electron Microscope (ESEM)

ESEM-Aufnahmen wurden an einem Niedervakuum Elektronenmikroskop des Gerätetyps EVO-LS10 der Fa. Zeiss erstellt. Die Probenuntersuchungen fanden im Feuchtmodus in einem Druckbereich zwischen 650-720 Pa bei einer maximalen Energie von 25 kV und einer Temperatur von ca. 5°C (druckabhängig) statt. Mit dem Detektor CZ BSD wurden die Rückstreuielektronen detektiert. Zur Darstellung der Topographie wurde ein EPSE-Detektor eingesetzt. Zur Kühlung der Probe wurde ein Deben-Kühltisch verwendet.

Die Fasern wurden auf runde Glas-Deckgläschen für die Mikroskopie geklebt und in einer Wellplatte mit den jeweiligen Zellen besiedelt. Die Zellen wurden für 3 Tage auf den Fasern im Brutschrank inkubiert.

Für die Fixierung der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die besiedelten Fasern zweimal in je 3 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mittels 6%-igem Glutaraldehyd. Die hierfür benötigte Verdünnung wurde aus 25%-igem Glutaraldehyd und PBS hergestellt. Um sämtliche Spuren der giftigen Chemikalie zu entfernen, wurden die Proben, nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten fünfmal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Für den Transport wurden die Proben in ca. 3 ml PBS bei 4 °C aufbewahrt.

Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Fasern wurden in einem Epoxidharz (G1) der Firma Gatan eingebettet und mit Hilfe von Cross-Section-Polishing (CSP) mit 4 kV für EDX-Untersuchungen präpariert. Der Einfallswinkel betrug 90°, der Ionenstrom an Argon-Ionen 90 µA.

Die mit Pt besputterte Probe wurde an einem Gerät der Firma Ametek/EDAX GmbH mit einem Si(Li)-Detektor mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV vermessen. Die Daten wurden mit der Software Genesis ausgewertet.

Gaschromatographie (GC)

Für die Probenpräparation wurden 100 mg Fasern in 100 mL VE-Wasser für 24 h bei RT eingelegt. Hiervon wurden 20 µL Probe in ein GC-Vial gegeben und an einem Gerät Clarus® 500 und einem Headspace-Sampler des Typs TurboMatrix40 der Firma Perkin Elmer vermessen. Das vermessene Probenvolumen betrug 1 µL.

Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

Röntgenpulverdiffraktogramme von zermörserten Fasern wurden an einem Gerät STADIP der Firma STOE mit einer Cu-K_α-Strahlenquelle aufgenommen. Die Messungen wurden im Bereich von 2° - 40° 2θ mit einer Schrittweite von 0.5° und einer Messdauer von 30 s in Transmissionsgeometrie durchgeführt.

Die pulverförmige Probe wurde zwischen zwei Folien aus Polyacetat präpariert. Diese Folie gibt kein Signal im Diffraktogramm.

Leitfähigkeitsmessung

Die Leitfähigkeit des Degradationsmediums wurde mit einem Digital-Leitwertmessgerät GMH 3410 der Firma Greisinger gemessen.

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

AFM-Aufnahmen wurden an einem Rasterkraftmikroskop Veeco Innova der Firma Bruker im Tapping Mode durchgeführt. Hierfür wurde ein Cantilever DP14/Hi'RES/AlBS mit einer Federkonstante von 5 N/m und einer Resonanzfrequenz von 160 kHz verwendet.

III) Versuchsdurchführungen

Herstellung der verschiedenen Fasern

Vorversuche zur Synthese einer viskosen Spinnmasse von LA-Fasern

In einem 10 mL Rollrandglas wurden 15 mmol TEOT (3,50 g) und mit 75 mmol Ethanol absolut (4,37 mL) vermischt und mit einem Magnetrührstäbchen bei RT und 350 rpm auf einem Magnetrührer gerührt. Zu dieser Mischung wurden verschiedene Mengen an 85 %iger LA gegeben. Das Gemisch erwärmte sich kurz und wurde weiterhin für 3 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von VE-Wasser wurde der Ansatz über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde geprüft, ob ein Niederschlag (NS) ausgefallen ist oder, ob das Sol noch klar war.

Synthese der viskosen Spinnmasse für LA-Fasern (LA8, LA14, LA27, LA31 und LA89)

In einem 2 L-Rundkolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Zu dieser Mischung wurde die gewünschte Menge an 85 prozentiger Milchsäure gegeben, wobei sich die Reaktionslösung leicht erwärmt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei RT wurde eine bestimmte Menge an Wasser zugegeben. Danach wurde der Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar).

Tabelle 3 zeigt die verschiedenen Molverhältnisse an TEOT, 85 %iger LA, VE-Wasser und dem Lösungsmittel Ethanol, die zur Herstellung der verschiedenen viskosen Spinnmassen zum Verspinnen der Fasern LA8, LA14, LA27, LA31 und LA89 eingesetzt wurden.

Tabelle 3 : Überblick über die verwendeten Stoffmengen an TEOT, 85 %iger LA, VE-Wasser und Ethanol zur Herstellung der viskosen Spinnmassen für die Fasern LA8, LA14, LA27, LA31 und LA89.

Formulierung	n(TEOT)	n(LA 85%ig)	n(H ₂ O)	n(EtOH)
LA8	1	1	18,5	5
LA14	1	0,5	0,5	5
LA27	1	1	0,5	5
LA31	1	0,75	0,5	5
LA89	1	0,25	0	5

Versuche zur Synthese einer viskosen Spinnmasse von LA-Fasern mit anorganischen Basen als Gegenionen

In einem 10 mL Rollrandglas wurden 15 mmol TEOT (3,50 g) und mit 75 mmol Ethanol absolut (4,37 mL) vermischt und mit einem Magnetrührstäbchen bei RT und 350 rpm auf einem Magnetrührer gerührt. Zu dieser Mischung wurden verschiedene Mengen an 85 %iger LA (3,75 mmol, 7,5 mmol, 11,25 mmol und 15 mmol) gegeben. Das Gemisch erwärmte sich kurz und wurde weiterhin für 3 h bei RT gerührt. Danach wurde im stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 eine anorganische Base als Feststoff zugegeben. Nach der Zugabe von VE-Wasser wurde der Ansatz über Nacht gerührt. Am nächsten Tag war in jedem Reaktionsgefäß eine Trübung zu beobachten. D. h. keiner der Ansätze kann in eine fadenziehende viskose Spinnmasse überführt werden.

Synthese der viskosen Spinnmasse der LA-Faser mit Phenethylamin als Gegenionen (LA_Phenethylamin)

In einem 1 L-Rundkolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Zu dieser Mischung wurde die 0,25 mol LA in Form von 85 %iger LA zugegeben, wobei sich die Reaktionslösung leicht erwärmt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde bei RT 0,25 mol Phenethylamin (30,3 g / 31,6 mL) zugegeben. Danach wurde der Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingeeengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar).

Synthese der viskosen Spinnmasse der LA-Faser mit Phenylalanin als Gegenionen (LA_Phe)

In einem 1 L-Rundkolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Zu dieser Mischung wurde die 0,25 mol LA in Form von 85 %iger LA zugegeben, wobei sich die Reaktionslösung leicht erwärmt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde zuerst 0,25 mol Phenylalanin (41,3 g) als Feststoff bei RT zugegeben. Der Feststoff löst sich allmählich und der Ansatz wurde für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingeeengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar).

Synthese der viskosen Spinnmasse der LA-Faser mit Chitosan als Gegenionen (LA8_CHI)

0,266 g Chitosan_{85/800} (Deacetylisierungsgrad: 85 %) wurde in 106 g 85 %iger LA in einem Becherglas bei RT über Nacht und leichtem Rühren gelöst.

In einem 1 L Kolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Hierzu wurde das Gemisch aus Chitosan und LA mit einer Spritze gespritzt. Während der Zugabe des Gemisches durch die Spritze wurde der Kolbeninhalt mit einem Ultra-Turrax® mit 10000 rpm dispergiert. Dieser leicht trübe Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar). Während des Einengens klarte der Ansatz auf.

Vorversuche zur Synthese von viskosen Spinnmassen für GA- und MA-Fasern

In einem 10 mL Rollrandglas wurden 15 mmol TEOT (3,50 g) und mit 75 mmol Ethanol absolut (4,37 mL) vermischt und mit einem Magnetrührstäbchen bei RT und 350 rpm auf einem Magnetrührer gerührt. Zu dieser Mischung wurden verschiedene Mengen pulverförmiger GA oder LA gegeben. Das Gemisch wurde für 3 h bei RT gerührt. Vor der Zugabe von VE-Wasser wurde der Ansatz im Eisbad abgekühlt und für eine weitere Stunde gekühlt. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde am nächsten Tag geprüft, ob ein Niederschlag (NS) ausgefallen ist oder, ob das Sol noch klar war.

Synthese der viskosen Spinnmasse der GA-Faser (GA07)

In einem 1 L-Rundkolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Zu dieser Mischung wurde 1 mol GA (77,6 g) als Feststoff zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei RT wurde der Kolben im Eisbad gekühlt und 2 mol VE-Wasser (36,0 g) zugegossen. Danach wurde der Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar).

Synthese der viskosen Spinnmasse der MA-Faser (MA05)

In einem 1 L-Rundkolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Zu dieser Mischung wurde 1 mol MA (153,7 g) als Feststoff zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei RT wurde der Kolben im Eisbad gekühlt und 2 mol VE-Wasser (36,0 g) zugegossen. Danach wurde der Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar).

Synthese der viskosen Spinnmasse der AA-Faser (AA5)

In einem 1 L-Rundkolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Zu dieser Mischung wurde 0,25 mol AA (4,50 g) zugegossen. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei RT wurde der Kolben im Eisbad gekühlt und 0,5 mol VE-Wasser (9,0 g) zugegossen. Danach wurde der Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar).

Synthese der viskosen Spinnmasse der PA-Faser (PA2)

In einem 1 L-Rundkolben wurde 1 mol TEOT (233,0 g) vorgelegt und mit 5 mol absolutem Ethanol (292 mL) zu einer homogenen gelblichen Lösung vermischt. Zu dieser Mischung wurde 1 mol PA (76,9 g) zugegossen. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei RT wurde der Kolben im Eisbad gekühlt und 1 mol VE-Wasser (18,0 g) zugegossen. Danach wurde der Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer zu einem fadenziehenden gelblichen Gel eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C, Druck: 120 - 40 mbar).

Spinnprozess

Aus den hergestellten viskosen Spinnmassen können über das Verfahren des Druckverspinnens Mikrofasern generiert werden. Eine schematische Zeichnung des Spinnturms befindet sich in Abb. 11. Für alle Spinnversuche wurde eine Düsenplatte mit sieben Düsen und einem Durchmesser von 150 µm verwendet.

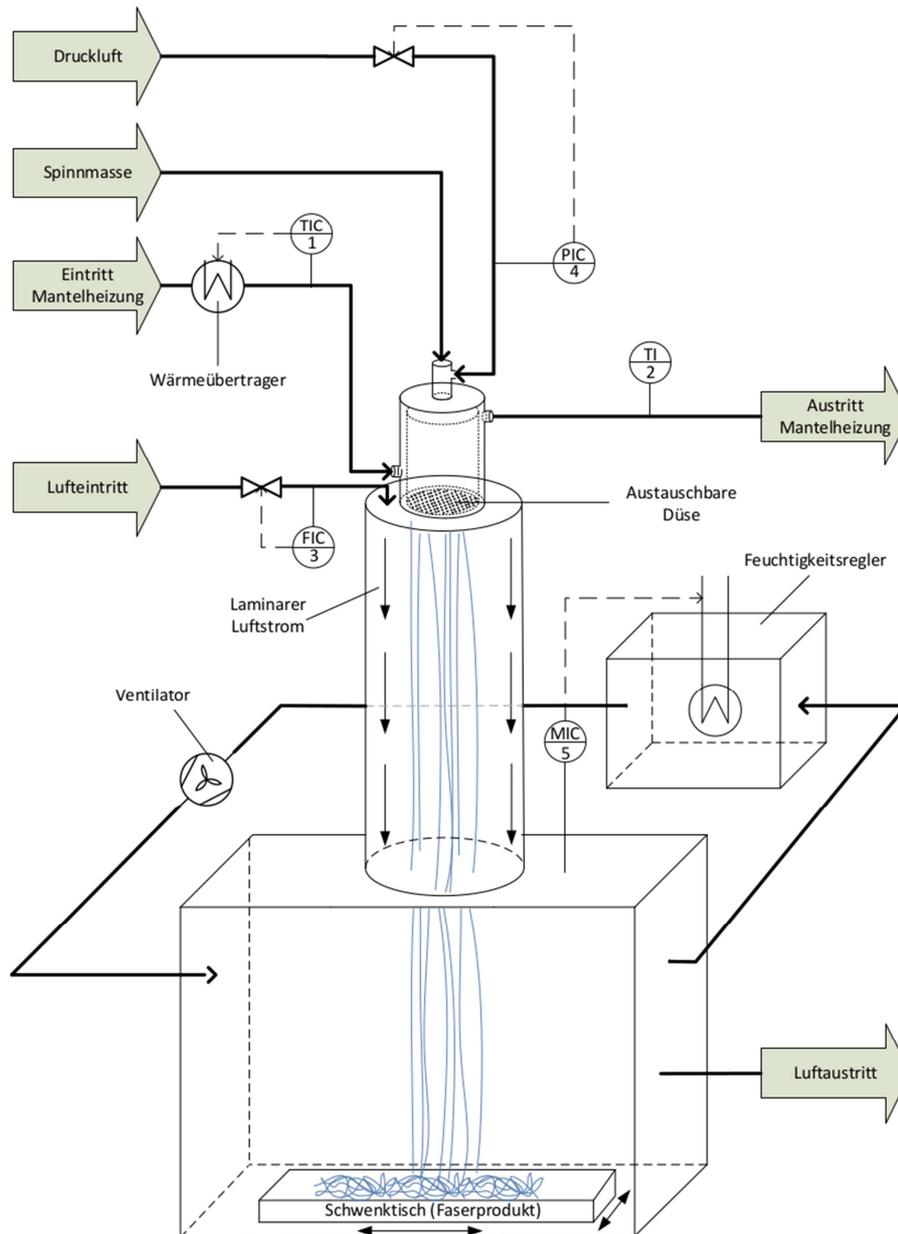


Abb. 11 : Schematische Zeichnung des Spinnsturms zur Herstellung von Mikrofasern aus viskosen Spinnmassen (© A. Islek, Fraunhofer ISC)

Die Spinnmassen werden in einen auf 15 °C temperierten Druckbehälter möglichst blasenfrei eingefüllt. Für das Anspinnen der Fasern wurde zuerst ein Druck von 40 bar angelegt, der langsam zu niedrigeren Drücken reguliert wird bis intrinsisch stabile Fasern auf dem Schwenktisch aufgefangen werden können. Teilweise wurde auch mit der Manteltemperatur des Druckbehälters nachreguliert: Wenn keine Fasern entstanden sind, sondern die Spinnmasse aus den Düsen tropfte, wurde die Temperatur nach unten reguliert. Wenn die Fasern zu langsam aus der Düsenplatte

gedrückt wurden und durch die lange Fallzeit im Fallturm (Höhe: ca. 2 m) abbrechen, wurde die Temperatur nach oben reguliert.

Lagerung der Fasern

Generell wurden die Fasern lichtgeschützt in Petrischalen bei RT gelagert. Der Lagerungsversuch bei 4 °C erfolgte in einem Kühlschrank.

Degradationsversuche

In einem verschließbaren PE-Gefäß wurden 100 mL Lösungsmittel (VE-Wasser oder PBS) vorgelegt. 100 mg Fasern wurden in ein Zellsieb (Porengröße: 20 μm) eingewogen und in das vorbereitete Gefäß mit 100 mL Degradationsflüssigkeit bei RT gegeben. Das Zellsieb schwimmt auf der Wasseroberfläche. Das Lösungsmittel wurde in regelmäßigen Abständen in Zeitintervallen von 48 – 72 h komplett gewechselt. Zum Erstellen der Degradationsprofile wurde bei jedem Lösungsmittelwechsel das Zellsieb mit den zu untersuchenden Fasern unter einem IR-Trocknungsgerät bei 40 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Masse der verbleibenden Fasern bestimmt. Danach wurde das jeweilige Zellsieb mit den Fasern wieder in frisches Lösungsmittel gegeben.

Die Degradationsversuche der Fasern LA89 und LA89_Phe wurden sowohl in PBS, als auch in VE-Wasser jeweils drei Mal wiederholt.

Für REM-Aufnahmen und FTIR-Messungen wurden die im IR-Trocknungsgerät getrockneten Fasern verwendet.

Isolierung der weniger flüchtigen Degradationsprodukte

1 g Fasermaterial wurde bei RT in 1 L VE-Wasser für 48 h bei RT gegeben. Danach wurden die Fasern entfernt und die wässrige Lösung lyophilisiert. Der weiße Rückstand wurde für NMR-, FT/IR-Untersuchungen und ICP-Messungen verwendet.

Nachweis der weniger flüchtigen Degradationsprodukte

Für den Nachweis der weniger flüchtigen Degradationsprodukte über GC wurden 100 mg Fasern in 100 mL VE-Wasser für 48 h eingelegt. Die wässrige Lösung wurde direkt für die GC-Untersuchungen verwendet.

Für die Messungen der Leitfähigkeit wurden ebenfalls 100 mg Fasern in 100 mL VE-Wasser eingelegt. Von dieser Lösung wurde in bestimmten Zeitintervallen die Leitfähigkeit gemessen.

Bestimmung des Biegedurchmessers

Zur Bestimmung des Biegedurchmessers wurden ca. 5 cm lange, gerade Stücke einer Faser präpariert. Diese wurden um einen definierten zylinderförmigen Stab um 180° gewickelt. Die Durchmesser der Stäbe wurden zwischen 12 mm und 0,58 mm gewählt. In einem Versuch wurde von jeder Faser insgesamt 10 Faserstücke untersucht und die Anzahl der nach dem Versuch noch intakten Fasern notiert. Dieser Versuch mit 10 Faserstücken wurde pro Fasersystem/-behandlung mindestens 3 Mal wiederholt und die Standardabweichung bestimmt.

Tempern der Fasern

Für die Temperversuche wurden Fasern bzw. Chitosan in einer Glas-Petrischale bei 170 °C in einem Umluftofen der Firma Binder für definierte Zeitintervalle getempert.

Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe des WST-1-Assays

Die Zytotoxizität des Fasermaterials wurde in Anlehnung an DIN ISO 10993-5 mit der Zelllinie L929 durchgeführt.

Die Vorkonditionierung der γ -sterilisierten Fasern erfolgte, indem 3 Mal 60 mg Fasern in ein Well einer 12-Well-Platte gegeben und für 24 h mit 2 mL VE-Wasser behandelt wurden. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Fasern noch zwei Mal mit VE-Wasser gewaschen.

Die konditionierten Fasern wurden für 24 h mit 2 mL DMEM (+FCS) inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). 1 mL des Zellkulturmedium-Überstandes wurde zu 50000 Zellen in einem Well einer 12-Well-Platte gegeben und für weitere 24 h inkubiert.

Zur Bestimmung der WST-1-Aktivität wurde das WST-1-Reagenz analog zu den Vorgaben des Herstellers präpariert. In einer neuen Well-Platte wurden 1,5 mL des verdünnten WST-1-Reagenzes (DMEM + 1 V% WST-1-Reagenz) vorgelegt. In diese Wells wurde je ein zu vermessendes inkubiertes Faservlies überführt. Nach 30 min Inkubation wurde der Überstand für die Vermessung am Photometer bei 450 nm abgenommen. Pro Faservlies wurden je zwei Mal 200 µL vermessen und der Mittelwert gebildet.

Für die Auswertung wird zwei Mal 1 mL eines unverdünnten Extraktes und zwei Mal je 1 mL eines mit DMEM zu 50 % und zu 25 % verdünnter Extrakt herangezogen. Die Extrakte wurden an einem Plattenleser bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrische ausgelesen.

Als Negativkontrolle dienten L929-Zellen in einem Well ohne Fasern.

Präparation der auf Fasern adhärennten Zellen für ESEM-Untersuchungen

Fasern wurden auf einen Objektträger geklebt und vorkonditioniert. Hierzu wurden die Proben für 24 h in VE-Wasser eingelegt und anschließend nochmals zwei Mal mit VE-Wasser gewaschen. Auf die präparierten Fasern wurden je 50000 Zellen (L929, 16HBE, MG63 und HTB94) ausgesät. Die Zelllinien L929, 16HBE, MG63 und HTB94 wurden in Zellkulturmedium (Mischung: 500 mL DMEM + 57 mL FCS + 5,7 mL HEPES + 5,7 mL Pen/Strep) für 3 d bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert; die Zelllinie MG63 in Zellkulturmedium (Mischung: 500 mL Leibovitz's + 57 mL FCS + 5,7 mL Pen/Strep) ebenfalls für 3 d bei 37 °C ohne CO₂-Zufuhr.

Für die Fixierung der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die besiedelten Fasern zweimal in je 3 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mittels 6 %-igem Glutaraldehyd. Die hierfür benötigte Verdünnung wurde aus 25 %-igem Glutaraldehyd und PBS hergestellt. Um sämtliche Spuren der giftigen Chemikalie zu entfernen, wurden die Proben, nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten fünfmal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Für den Transport wurden die Proben in ca. 3 ml PBS bei 4 °C aufbewahrt.

Anfärben der auf Fasern adhärennten Zellen für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Fasern wurden auf einen Objektträger geklebt und vorkonditioniert. Hierzu wurden die Proben für 24 h in VE-Wasser eingelegt und anschließend nochmals zwei Mal mit VE-Wasser gewaschen. Auf die präparierten Fasern wurden je 50000 Zellen (L929, 16HBE, MG63 und HTB94) ausgesät. Die Zelllinien L929, 16HBE, MG63 und HTB94 wurden in Zellkulturmedium (Mischung: 500 mL DMEM + 57 mL FCS + 5,7 mL HEPES + 5,7 mL Pen/Strep) für 3 d bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die

Zelllinie MG63 wurde in Zellkulturmedium (Mischung: 500 mL Leibovitz's + 57 mL FCS + 5,7 mL Pen/Strep) ebenfalls für 3 d bei 37 °C ohne CO₂-Zufuhr kultiviert.

Die Objektträger mit Fasern und Zellen wurden schnell mit PBS gewaschen und erst für 10 Minuten in Methanol bei -20 °C und danach für 4 min in Aceton bei ebenfalls -20 °C eingelegt. Nach 30 min Ausdampfen bei RT an Luftatmosphäre konnten die Zellen wie folgt angefärbt werden:

Die Färbung des Zytoskeletts erfolgte über eine indirekte Antikörperbindung (AK). Der Primär-Antikörper (anti-Tubulin) wurde mit PBS 1 : 200 verdünnt und 100 µL aufgetropft. Nach 30 min wurden die Objektträger für 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde 80 µL des Sekundär-AKS aufgetropft (anti-Maus-Cy3). Nach 10 min wurden zwei Tropfen des DNA-Farbstoffs Hoechst zupipettiert. Nach weiteren 7 min wurde die Probe drei Mal für 5 min in PBS gewaschen und anschließend einmal für eine Minute in EtOH inkubiert. Nach 30 min Trocknen an Luft konnten die Proben am Fluoreszenzspektrometer vermessen werden.

Durchführung und Auswertung von Proliferationstests verschiedener Zelllinien auf getemperten LA8_CHI-Fasern

Die γ -sterilisierten Fasern wurden vorkonditioniert, indem sie in ein Well einer 12-Well-Platte gegeben wurden und für 24 h mit 2 mL VE-Wasser behandelt wurden. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Fasern noch zwei Mal mit VE-Wasser gewaschen.

Die Versuche wurden mit 50000 Zellen/mL durchgeführt. D. h. in einem Well mit einem Volumen an Zellkulturmedium von 2 mL wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Die Aussaat dieser Zellen (L929, 16HBE, MG63 und HTB94) erfolgte in einem Volumen von 500 µL Zellsuspension. Durch die hohe Konzentration konnte eine höhere Besiedlung auf den Fasern erzielt werden. Nach einer Inkubationszeit der Zellen von 2 h wurden die restlichen 1,5 mL Zellkulturmedium zugegeben.

Als Zellkulturmedium wurde bei L929, 16HBE und HTB94 das Zellkulturmedium DMEM mit einem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS), HEPES und einer Mischung aus Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugegeben (500 mL DMEM + 57 mL FCS + 5,7 mL HEPES + 5,7 mL Pen/Strep) eingesetzt. Diese Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Kultivierung der Zelllinie MG63 wurde das Zellkulturmedium Leibovitz's mit einem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) und einer Mischung aus Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugegeben (500 mL Leibovitz's + 57 mL FCS + 5,7 mL Pen/Strep) eingesetzt. MG63-Zellen wurden bei 37 °C ohne CO₂-Zufuhr kultiviert.

Während der Zellkultivierung wurde das Zellkulturmedium alle 2 - 3 d (montags, mittwochs und freitags) ausgetauscht. Nach der Kultivierung der Zellen für 3, 5 und 7 d wurden die Zellen auf den Fasern 2 Mal mit PBS gewaschen und danach mit 1 mL Accutase für 10 min inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese mit 1 mL DMEM-Zellkulturmedium vermischt. Die Zellzahl wurde mit 100 μ L dieser Zellsuspension mit Hilfe eines CASY-Zellzählers bestimmt.

Zur Bestimmung der WST-1-Aktivität wurde das WST-1-Reagenz analog zu den Vorgaben des Herstellers präpariert. In einer neuen Well-Platte wurden 1,5 mL des verdünnten WST-1-Reagenzes (DMEM + 1 V% WST-1-Reagenz) vorgelegt. In diese Wells wurde je ein zu vermessendes inkubiertes Faservlies überführt. Nach 30 min Inkubation wurde der Überstand für die Vermessung am Photometer bei 450 nm abgenommen. Pro Faservlies wurden je zwei Mal 200 μ L vermessen und der Mittelwert gebildet.

Als Negativkontrolle dienten Zellen in einem Well ohne Faser.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle Synthesen der Spinnmassen in dieser Arbeit beruhen auf einem ethanolischen Sol aus Titanetraethanolat $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (TEOT), dessen Hydrolyseaktivität durch die Einführung von verschiedenen Carboxylatliganden erniedrigt wird.

Im ersten Kapitel der Ergebnisse wurde Milchsäure (LA) verwendet um an dem Sol-Gel-Präkursor TEOT zu komplexieren. Milchsäure ist nicht nur eine organische Säure, die ein körpereigenes Stoffwechselprodukt darstellt, sondern wird bereits in großem Maßstab – komplexiert an Titan in Form des kommerziell erhältlichen Sol-Gel-Präkursors TiBALDH – eingesetzt. Daher scheint sie eine vielversprechende Säure für die Herstellung von TiO_2 -haltigen biokompatiblen Fasern, die über einen Sol-Gel-Prozess hergestellt werden, zu sein.

1) Synthese und Charakterisierung von LA-Fasern

TiBALDH wird für verschiedenste Anwendungen als Sol-Gel-Präkursor verwendet.^[31-33, 39, 125-127] Zur Herstellung von Spinnmassen mit fadenziehenden Eigenschaften, die für den hier vorliegenden Spinnprozess geeignet sind, war ihr Einsatz allerdings nicht zielführend. Es konnte keine verspinnbare Spinnmasse aus TiBALDH generiert werden. Daher wurde LA in verschiedenen Verhältnissen einer ethanolischen Lösung aus TEOT zugegeben um Sole herzustellen, die zu fadenziehenden Spinnmassen weiterverarbeitet werden konnten.

LA komplexiert dabei in Form von Lactat an den Sol-Gel-Präkursor, so dass dessen Hydrolyseempfindlichkeit erniedrigt wird. LA wird als 85 %ige wässrige Lösung zugegeben. Somit werden parallel zur Komplexierung von LA an Titan die Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen der Sol-Gel-Präkursoren katalysiert.

Während der Sol-Synthese in dieser Arbeit wurde nicht nur das stöchiometrische Verhältnis der Milchsäure bezogen auf den titanhaltigen Präkursor TEOT (LA : Ti), sondern auch der Wassergehalt variiert.

Um das entstehende Sol weiterverarbeiten zu können, darf im Sol kein Niederschlag ausfallen, sondern es muss klar und fließend bleiben. Abb. 12 zeigt die für eine Synthese verwendeten Verhältnisse von LA und Wasser, das zusätzlich zum Restwasser aus der 85 %igen LA zugegeben wurde, bezogen auf ein Äquivalent TEOT. Bei einem LA:Ti-Verhältnis von 1 ist das Sol bei allen Wassergehalten stabil. Dies steht im Einklang mit der hohen Stabilität von TiBALDH in Wasser –

ein hoher Gehalt an Lactat-Liganden scheint für eine gute Wasserlöslichkeit zu sprechen. Bei niedrigeren LA-Gehalten (< 1) verhält sich das Sol sensibler gegenüber einem höheren Wassergehalt, so dass vermehrt ein Niederschlag im Sol ausfällt.

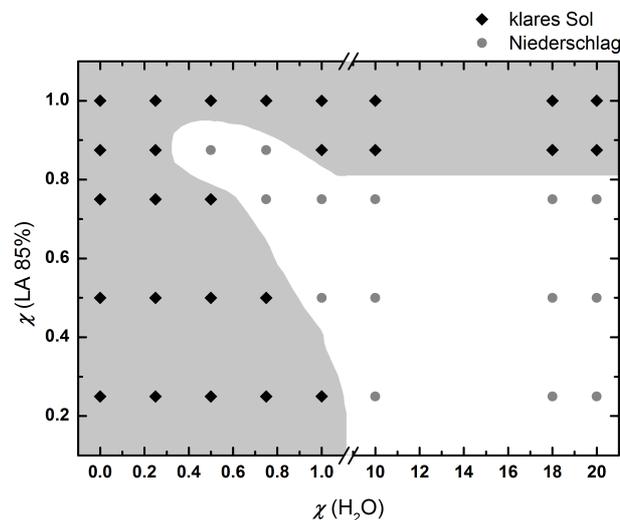


Abb. 12: Variation des LA- und Wassergehalts (χ) bei einer Solsynthese bezogen auf ein Äquivalent TEOT. Zusammensetzungen, die zu einem klaren fließenden Gel führten, sind mit schwarzen Vierecken markiert. Graue Kreise zeigen Zusammensetzungen des Sols an, bei denen ein Niederschlag ausgefallen ist.

Verhältnisse von Milchsäure zu Titan von größer als eins werden in dieser Arbeit nicht untersucht, da das zu entwickelnde Material im biologischen Bereich Anwendung finden soll und dabei der pH-Wert des Materials nicht zu sauer sein sollte.

1) Synthese der Spinnmassen

Die Spinnmassen werden über den Sol-Gel-Prozess hergestellt. Hierzu wird der Sol-Gel-Präkursor TEOT in Ethanol vorgelegt und 85 %ige LA zugegeben. Zuerst komplexiert LA in einer exothermen Reaktion an Titan. Nach Zugabe von weiteren Mengen an VE-Wasser laufen weiterhin Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen ab, die durch den sauren pH-Wert im Sol katalysiert werden. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wird das Sol am Rotationsverdampfer eingedunstet bis sich eine bei RT klare, fadenziehende Spinnmasse ausbildet. Die fadenziehenden Eigenschaften sind ein Indiz dafür, dass die Spinnmasse zu Fasern versponnen werden kann.

2) Spinnprozess

Die herzustellenden Fasern sollen an einer Spinnanlage (Abb. 13) unter Druck versponnen werden. Dazu wird ein Sol an einem Rotationsverdampfer zu einer klaren gelb-orangefarbenen fadenziehenden Spinnmasse eingengt. Die Spinnmasse wird in einen temperierbaren Spinnbehälter gefüllt und mit einem Druck von bis zu 40 bar durch eine Düsenplatte mit sieben runden Düsen mit einem Durchmesser von je $150\ \mu\text{m}$ gepresst. Aufgrund der fadenziehenden Eigenschaften der Spinnmasse bilden sich nach Passieren der Düse Fäden, die durch einen 2 m hohen Fallturm auf einen Changiertisch fallen. Aufgrund der starken Oberflächenvergrößerung bei der Bildung der Fäden entweichen Lösungsmittelreste während der Fallzeit durch den Fallturm und es können auf einem in x- und y-Richtung beweglichen Changiertisch feste Fasern aufgefangen werden.

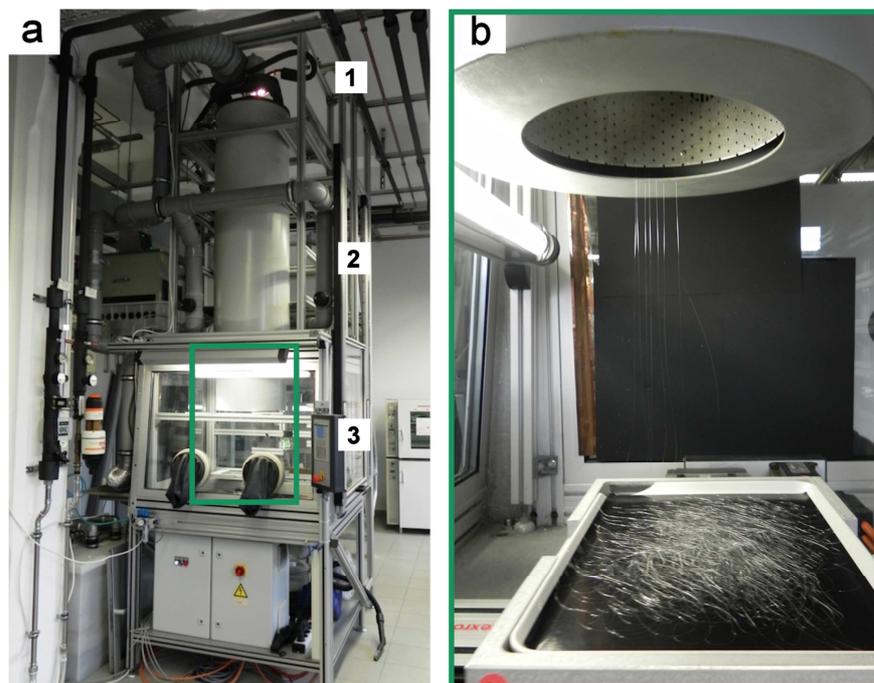


Abb. 13:a) Spinnanlage mit **(1)** Spinnbehälter und Düsenplatte, **(2)** Fallturm und **(3)** Changiertisch zur Vliesherstellung. **b)** Durch den Turm fallende Fasern werden auf einem in x- und y- Richtung bewegbaren Changiertisch aufgefangen. (Fotos: B. Christ, Fraunhofer ISC)

Der Faserdurchmesser wird hauptsächlich durch die Viskosität des verwendeten Gels und den angelegten Druck beeinflusst. In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk nicht auf der Optimierung der Spinnparameter, sondern auf der generellen Spinnfähigkeit eines Sols und der Charakterisierung der erhaltenen Fasern.

3) Charakterisierung verschiedener Fasern

Im Folgenden werden verschiedene LA-Fasern, die sich während der Synthese in ihrem Säure- und Wassergehalt unterscheiden, näher charakterisiert. Neben der Aufklärung der Fasermorphologie über REM- und AFM-Untersuchungen wird der Koordinationsmodus von Lactat an Titan über FTIR-Spektroskopie analysiert und ein Vergleich der verschiedenen Fasern durchgeführt. Zusätzlich konnten die Fasern über ¹³C-MAS-NMR- und TGA-MS-Messungen untersucht werden.

Tabelle 4 zeigt zusammenfassend die Bezeichnungen und die jeweiligen Zusammensetzungen der Sole der in diesem Kapitel untersuchten Fasern. Hierbei wurde in Bezug auf die Faserzusammensetzung LA8 sowohl der LA-, als auch der Wassergehalt in den verschiedenen Formulierungen erniedrigt.

Tabelle 4 : Zusammenfassung der verschiedenen Fasersysteme mit ihren Zusammensetzungen im Sol.

Bezeichnung	X(TEOT)	X(LA 85%ig)	X(H ₂ O)
LA8	1	1	18,5
LA14	1	0,5	0,5
LA27	1	1	0,5
LA31	1	0,75	0,5
LA89	1	0,25	0

Zuerst wird die Faser LA8 mit einem LA:Ti-Verhältnis von einem Äquivalent Ti und 18,5 Äquivalenten Wasser untersucht. Das Sol wurde zu einem fadenziehenden Gel mit einem Feststoffgehalt von 30 % eingengt und versponnen. Abb. 14 zeigt ein Foto der erhaltenen farblosen Fasern, eine REM-Aufnahme sowie eine AFM-Messung. Die Fasern weisen laut REM-Aufnahme einen konstanten Durchmesser von ca. 30 µm und eine sehr homogene Oberfläche auf. Die AFM-Aufnahme zeigt in höherer Auflösung die Topographie der Faseroberfläche. Hierbei können kleine Rillen längs der Faser in der Größenordnung von ca. 3 nm erkannt werden. Vermutlich sind diese Rillen durch die Form der Düsenbohrungen in der Düsenplatte bedingt. Des Weiteren konnte im Fasermaterial weder über N₂-, noch über Ar-Sorption Porosität festgestellt werden.

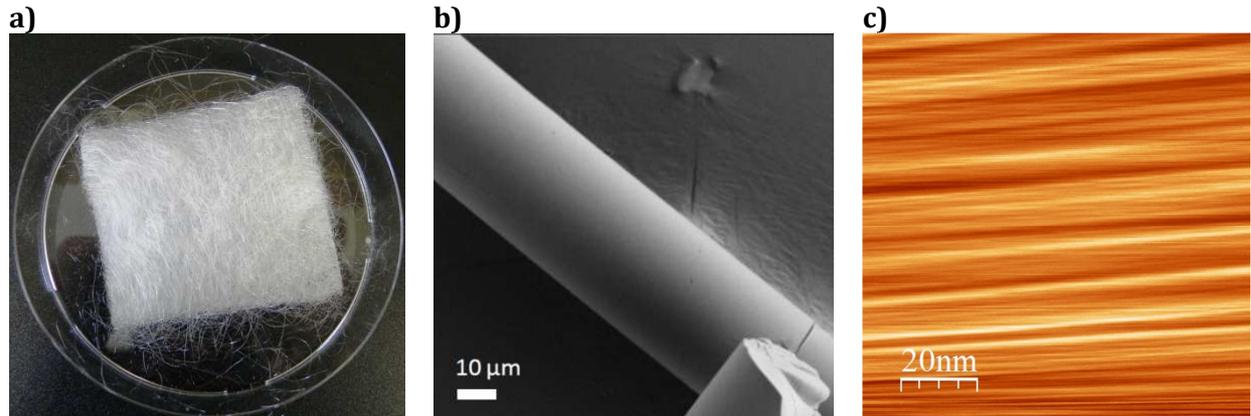


Abb. 14: **a)** LA-Fasern in einer Petrischale, **b)** REM-Aufnahme einer LA8-Faser mit einem Durchmesser von ca. $30\ \mu\text{m}$ (1000fache Vergrößerung, InLens-Detektor), **c)** AFM-Aufnahme der Oberfläche einer LA8-Faser.

Abb. 15 zeigt FTIR-Spektren einer zermörserten LA8-Faser und von 85 %iger Milchsäure.

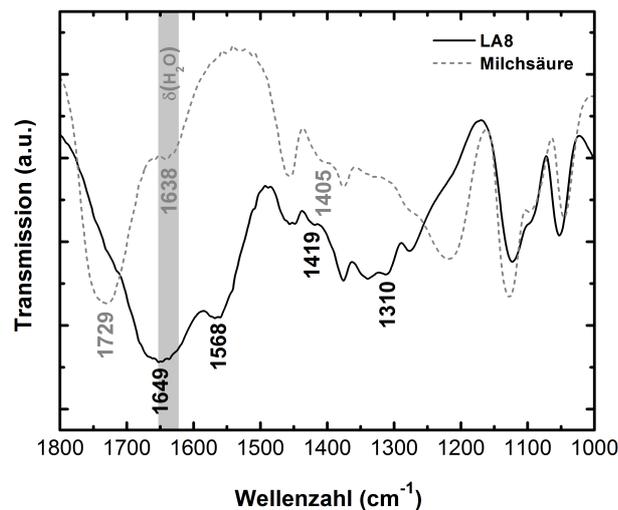


Abb. 15 : FTIR-Spektren der Faser LA8 (schwarz, durchgezogene Linie) und Milchsäure (grau, gestrichelt).

Im FTIR-Spektrum der Faser LA8 findet sich im Vergleich zum FTIR-Spektrum der freien Säure keine Schwingungsbande bei $1729\ \text{cm}^{-1}$. Dafür können Schwingungsbanden bei $1649\ \text{cm}^{-1}$ und $1568\ \text{cm}^{-1}$ detektiert werden, die im Bereich von asymmetrischen Streckschwingungen $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ von Carboxylaten liegen. Wasser zeigt eine Deformationsschwingung $\delta(\text{H}_2\text{O})$ bei $1638\ \text{cm}^{-1}$ [49], die auch im Spektrum von 85 %iger Milchsäure zu erkennen ist. Wie sich im Laufe der Arbeit noch genauer zeigt, enthält die LA8-Faser noch Wasser. Demzufolge resultiert die Schwingungsbande bei $1649\ \text{cm}^{-1}$ vermutlich aus einer Überlagerung von zwei Schwingungsbanden – zum einen $\delta(\text{H}_2\text{O})$ und zum anderen $\nu_{as}(\text{COO}^-)$. Die genaue Bandenposition von $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ kann daher nicht bestimmt

werden. Zudem zeigt LA8 eine weitere Schwingungsbande im Bereich der asymmetrischen Streckschwingung von Carboxylaten bei 1568 cm^{-1} . Die beiden zugehörigen symmetrischen Streckschwingungen $\nu_s(\text{COO}^-)$ können bei 1419 cm^{-1} und 1310 cm^{-1} gefunden werden. Bildet man die Differenzen $\Delta_{\text{as-s}}$ erhält man die Werte von $> 340\text{ cm}^{-1}$ und 149 cm^{-1} . Der Wert von $> 340\text{ cm}^{-1}$ ist größer als der Wert von Milchsäure und spricht für eine monodentate Komplexierung; der Wert von 149 cm^{-1} liegt im Vergleich zu Milchsäure bei einem kleineren Wert und spricht für bidentate Koordination.

In einer Studie von Lin *et al.*^[49] wurde unter anderem die Adsorption von Milchsäure auf einer TiO_2 -Oberfläche mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Bei Raumtemperatur können neben Signalen von freier Milchsäure auch Werte von $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$, die den Bandenpositionen in dieser Arbeit sehr ähnlich sind, bei 1679 cm^{-1} und 1569 cm^{-1} detektiert werden.

Auch die von Takahashi *et al.*^[128] erhaltenen Spektren gehen mit den Spektren dieser Arbeit konform. Sowohl im FTIR-Spektrum von TiBALDH als auch in den Spektren der Produkte aus den Umsetzungen von Titanisopropylat mit Milchsäure in den Verhältnissen 1:1 und 1:2 können die $\nu_{\text{as/s}}(\text{COO}^-)$ -Banden von monodentat koordiniertem Lactat bei ca. 1640 cm^{-1} und 1336 cm^{-1} detektiert werden. Bei TiBALDH scheint lediglich der monodentate Koordinationsmodus vorzuliegen. Bei den Produkten der Umsetzung dagegen sind auch $\nu_{\text{as/s}}(\text{COO}^-)$ -Banden einer bidentaten Komplexierung bei 1569 cm^{-1} und 1415 cm^{-1} nachweisbar.

Abb. 16 zeigt FTIR-Spektren von LA-Fasern verschiedener Zusammensetzungen. Alle Spektren sind sich sehr ähnlich. Neben den $\nu(\text{OH})$ -Banden bei 3391 und 3236 cm^{-1} können auch $\nu(\text{CH})$ -Banden bei 2985 , 2938 und 2870 cm^{-1} detektiert werden. Im Wellenzahlbereich von 1800 bis 1000 cm^{-1} sind sowohl Banden von Lactat-, als auch von Ethoxyliganden detektierbar. Auf Lactatliganden sind nicht nur die mono- und bidentaten $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_s(\text{COO}^-)$, sondern auch $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ bei 1464 cm^{-1} , $\delta_{\text{AL}}(\text{OH})$ bei 1376 cm^{-1} und $\delta(\text{CH})$ bei 1312 und 1277 cm^{-1} zurückzuführen. Die Schwingungsbanden bei 1448 und 1384 cm^{-1} sind $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ und $\delta_s(\text{CH}_3)$ der Ethoxyfunktionalität zuzuordnen. Die Banden bei 1122 cm^{-1} , 1094 cm^{-1} und 1052 cm^{-1} deuten alkoholische C–O-Streckschwingungen an, die entweder der α -Position des Lactats^[49] oder dem Ethoxyrest^[129] zuzuschreiben sind. Da das Spektrum von TiBALDH ebenfalls diese drei Banden zeigt^[128], müssten sie von der CO-Schwingung in α -Position des Lactats resultieren. Im Wellenzahlbereich von kleiner als 1000 cm^{-1} sind die Banden hauptsächlich Ti-O-Schwingungen zuzuschreiben.

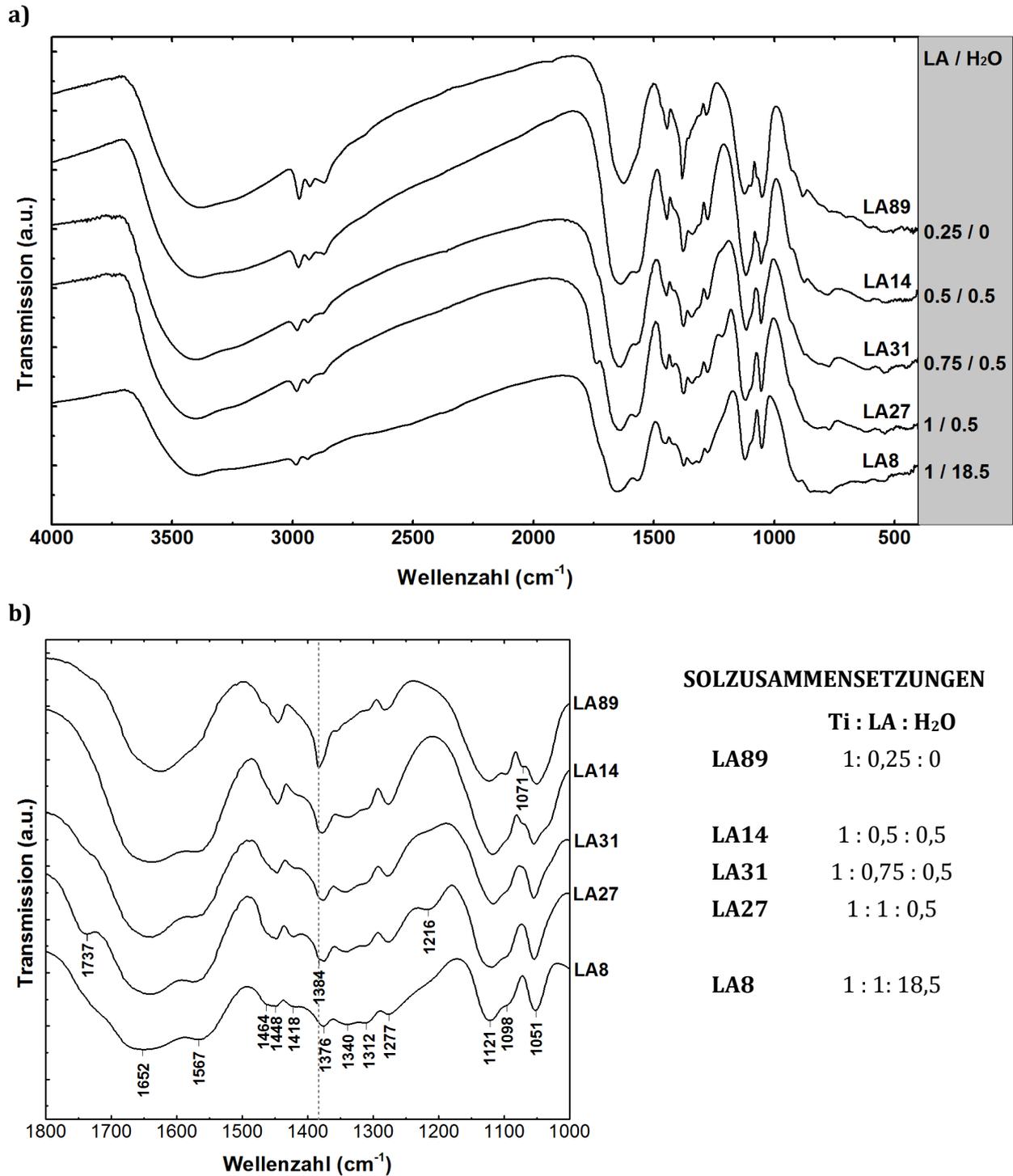


Abb. 16: FTIR-Spektren von LA-Fasern mit verschiedenen Zusammensetzungen (a) über den gesamten Wellenzahlenbereich und (b) ein Ausschnitt im Wellenzahlenbereich von 1800 bis 1000 cm⁻¹: Ti : LA : H₂O = 1 : 1 : 18,5 (LA8), 1 : 1 : 0,5 (LA27), 1 : 0,75 : 0,5 (LA31), 1 : 0,5 : 0,5 (LA14), 1 : 0,25 : 0 (LA89). Die Position von $\delta_s(\text{CH}_3)$ der Ethoxyliganden bei 1384 cm⁻¹ wurde zur Erleichterung für das Ablesen grau markiert.

Die Fasern LA8 und LA27 haben ein Ti:LA-Verhältnis von 1:1 und unterscheiden sich bei der Solherstellung nur im Wassergehalt. Bei LA8 wurde zur Hydrolyse bedeutend mehr Wasser

eingesetzt als bei LA27. Die $\delta_s(\text{CH}_3)$ -Bande der Ethoxygruppen bei 1384 cm^{-1} ist im Spektrum von LA8 nicht und bei LA27 als Schulter erkennbar. Auch $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ des Ethylrestes bei 1448 cm^{-1} ist bei LA27 stärker ausgeprägt. Alle weiteren Lactatschwingungen werden bei beiden Fasern detektiert. Im Spektrum von LA27 ist zusätzlich noch mit der Bande bei 1737 cm^{-1} eine geringe Menge an unkoordiniertem Lactat detektierbar.

Die Sole der Fasern LA27, LA31 und LA14 wurden mit der gleichen Menge an Wasser hydrolysiert, der Milchsäuregehalt nimmt in der Reihenfolge $\text{LA27} > \text{LA31} > \text{LA14}$ ab. Auch dies äußert sich in den Spektren mit einer Zunahme in der Intensität der OEt-Schwingungsbanden bei Verringerung des Milchsäuregehaltes. Aufgrund des geringen LA-Gehalts verbleibt ein höherer Gehalt an OEt-Gruppen in der Faser. Bei LA14 kann zudem eine Schulter bei 1071 cm^{-1} detektiert werden, die ebenfalls auf eine Ethoxygruppe zurückzuführen ist.^[129]

LA89 stellt in der Zusammensetzung einen Grenzfall dar. Es wurde nur eine geringe Menge an Milchsäure und kein zusätzliches Wasser zur Hydrolyse verwendet. Die Banden der Ethoxygruppen sind hier deutlich erkennbar. Die schärfsten Banden von Lactat – $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ der mono- und bidentaten Lactatkoordination – sind hier nur als Schultern detektierbar, da sie von $\delta(\text{H}_2\text{O})$ überlagert werden.

Die $\nu(\text{CH})$ -Banden im Bereich von 2985 bis 2870 cm^{-1} nehmen mit sinkendem Milchsäureanteil zu.

Bei allen LA-Fasern liegt Lactat sowohl im monodentaten, als auch im bidentaten Koordinationsmodus vor. Mit sinkendem Wassergehalt können Schwingungen von Ethoxyliganden detektiert werden, die an Intensität gewinnen je weniger Milchsäure im Sol verwendet wurde. Tabelle 5 zeigt zusammenfassend die Zuordnungen sämtlicher Schwingungsbanden von LA-Fasern.

Tabelle 5 : Übersicht und Zuordnung von FTIR-Schwingungsbanden in LA-Fasern.

Position der Schwingungsbande (cm ⁻¹)	Zuordnung der Schwingungsbanden	
	LA	OEt
3391	ν (OH)	
2985	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$	
2938		$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
2870		
1652	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$ monodentat	
1567	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$ bidentat	
1464	$\delta_{as}(\text{CH}_3)$	
1448		$\delta_{as}(\text{CH}_3)$
1418	$\nu_s(\text{COO}^-)$ bidentat	
1384		$\delta_s(\text{CH}_3)$
1376	$\delta_{AL}(\text{OH})$	
1340	$\nu_s(\text{COO}^-)$ monodentat	
1312	$\delta(\text{CH})$	
1277	$\delta(\text{CH})$	
1121	$\nu_{AL}(\text{CO})$	
1092	$\nu_{AL}(\text{CO})$	
1051	$\nu_{AL}(\text{CO})$	

Ramanmessungen konnten mit dem faserförmigen Material nicht durchgeführt werden, da sich das Probenmaterial im Laserstrahl zersetzt.

Weitere Hinweise über die Koordination von LA und das Vorliegen von OEt-Gruppen können am Beispiel der Faser LA8 über ¹³C-MAS-NMR-Untersuchungen erhalten werden. Ein ¹³C-MAS-NMR-Spektrum der LA8-Faser (Abb. 17) steht mit der Koordination von Lactat über zwei Koordinationsmodi, sowie der Anbindung von Ethoxyliganden im Einklang.

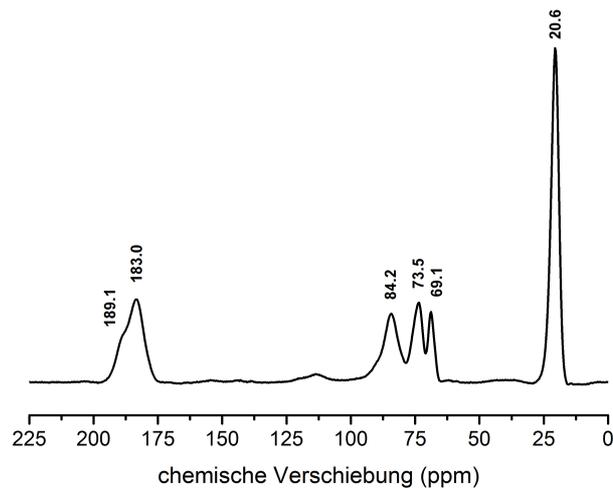


Abb. 17 : ^{13}C -MAS-NMR-Spektrum der Faser LA8.

Das ^{13}C -Signal bei 183,0 ppm und die Schulter bei 189,1 ppm zeigen zwei unterschiedliche C-Atome einer Carboxylat-Einheit an. Auch ein ^{13}C -MAS-NMR-Spektrum eines Titan-Citrat-Komplexes zeigt je nach Koordination von Citrat an Ti unterschiedliche Signale des C-Atoms in der Carboxylat-Funktion.^[130] Dies steht auch mit dem ^{13}C -MAS-NMR-Spektrum von Einkristallen des Komplexes $(\text{NH}_4)_2[\text{Ti}(\text{LA})_3]$ im Einklang. Laut Röntgenkristallstrukturanalyse dieser Substanz weisen alle drei Lactatliganden einen monodentaten Koordinationsmodus auf und zeigen im NMR-Spektrum ^{13}C -Signale bei 187,7 ppm, 81,5 ppm und 21,5 ppm.^[131] Die zwei Peaks im Spektrum aus Abb. 17 zeigen demnach mono- und bidentate Koordination von LA an Ti an. Im Bereich von 65 bis 90 ppm können in Abb. 17 drei Signale detektiert werden. Die Peaks bei 84,2 ppm und 69,1 ppm entsprechen dem C-Atom in α -Position des Lactats für mono- und bidentate Komplexierung. Das Signal bei 73,5 ppm deutet auf die CH_2 -Einheit von Ethoxygruppen hin.^[132] Der Peak der Methylgruppen der Lactat- und Ethoxygruppen befindet sich bei 20,6 ppm.^[132]

Eine thermogravimetrische Untersuchung des Materials LA8 unter synthetischer Luftatmosphäre zeigt unter Berücksichtigung einer DSC-Messung mehrere Massenverluststufen (Abb. 18). Die erste Massenverluststufe (MV) stellt einen endothermen Prozess dar und liegt in einem Bereich von 30 °C bis 170 °C. Die zweite Massenverluststufe liegt in einem Temperaturintervall von 170 °C bis 393 °C und beinhaltet zwei exotherme Vorgänge. Eine kleine Massenverluststufe, die zwischen 393 °C und 433 °C liegt, geht in die letzte, stark exotherm ablaufende Massenverluststufe über. Bei der Endtemperatur von 900 °C bleibt eine Restmasse m_{Rest} von 47,5 % der Ursprungsmasse m_0 zurück. Demnach beträgt der organische Anteil (inkl. der Anteil der Ti-OH-Gruppen, die zu Ti-O-Ti-Brücken kondensieren) in der Faser 52,5 %.

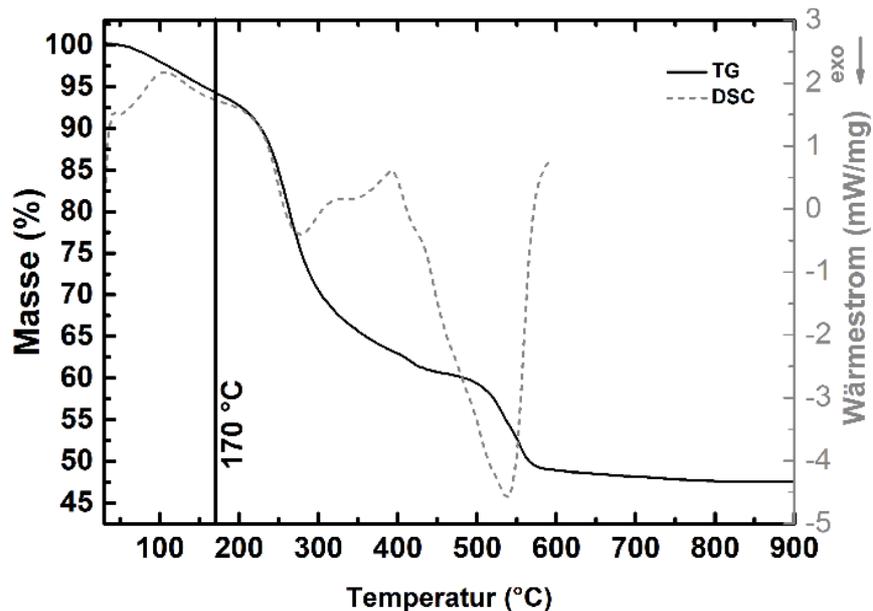


Abb. 18 : Thermogravimetrische Untersuchung der Faser LA8 unter synthetischer Luftatmosphäre mit zugehöriger DSC-Messung.

Eine Kopplung des Thermogravimeters mit einem Massenspektrometer (TGA-MS) gibt weitere Aufschlüsse über die Zersetzungsprozesse während des Temperns. Bedingt durch den Geräteaufbau werden im Massenspektrometer nicht nur Massenfragmente der Zersetzungsprodukte, sondern auch kontinuierlich Massenfragmente des Schutzgases (Argon) und des Prozessgases (synthetische Luft oder Argon) detektiert. Somit resultieren die Fragmente von $m/z = 40$ (Ar^+), 20 (Ar^{++}) und 36 ($^{36}\text{Ar}^+$) von Argon und die Fragmente von $m/z = 32$ (O_2^+), 28 (N_2^+), 16 (O^+), 14 (N_2^{++}) von synthetischer Luft. Unter synthetischer Luftatmosphäre können während des Aufheizens bis 900 °C die Massenfragmente $m/z = 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 41, 42, 43, 44$ und 45 detektiert werden.

In Tabelle 6 sind mögliche Zuordnungen der verschiedenen Massenfragmente aufgelistet:

Tabelle 6 : Auflistung und Zuordnung der Massenfragmente, die während der TGA-MS-Messung von LA8 unter synthetischer Luftatmosphäre detektiert wurden.

m/z	Fragment	m/z	Fragment	m/z	Fragment
12	C^+	20	Ar^{++}	32	O_2^+
13	CH^+	22	CO_2^{++}	41	$\text{O}=\text{(H)C}=\text{C}^+$
14	$\text{CH}_2^+, \text{N}^+$	25	$\text{C}\equiv\text{CH}^+$	42	$\text{HO}-\text{CH}=\text{C}^+$
15	CH_3^+	26	$\text{HC}\equiv\text{CH}^+$	43	$\text{HO}=\text{C}=\text{CH}_2^+$
16	O_2^{++}	27	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}^+$	44	CO_2^+
17	OH^+	28	$\text{N}_2^{++}, \text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2^+$	45	OC_2H_5^+
18	H_2O^+	29	$\text{O}=\text{CH}^+, \text{C}_2\text{H}_5^+$		
19	H_3O^+	30	$\text{O}=\text{CH}_2^+$		

In Abb. 19 sind die MS-Scans während der TGA-Messung abgebildet. Zur Übersichtlichkeit sind jeweils nur die m/z-Fragmente abgebildet, die in dieser Massenverluststufe eine Änderung zeigen.

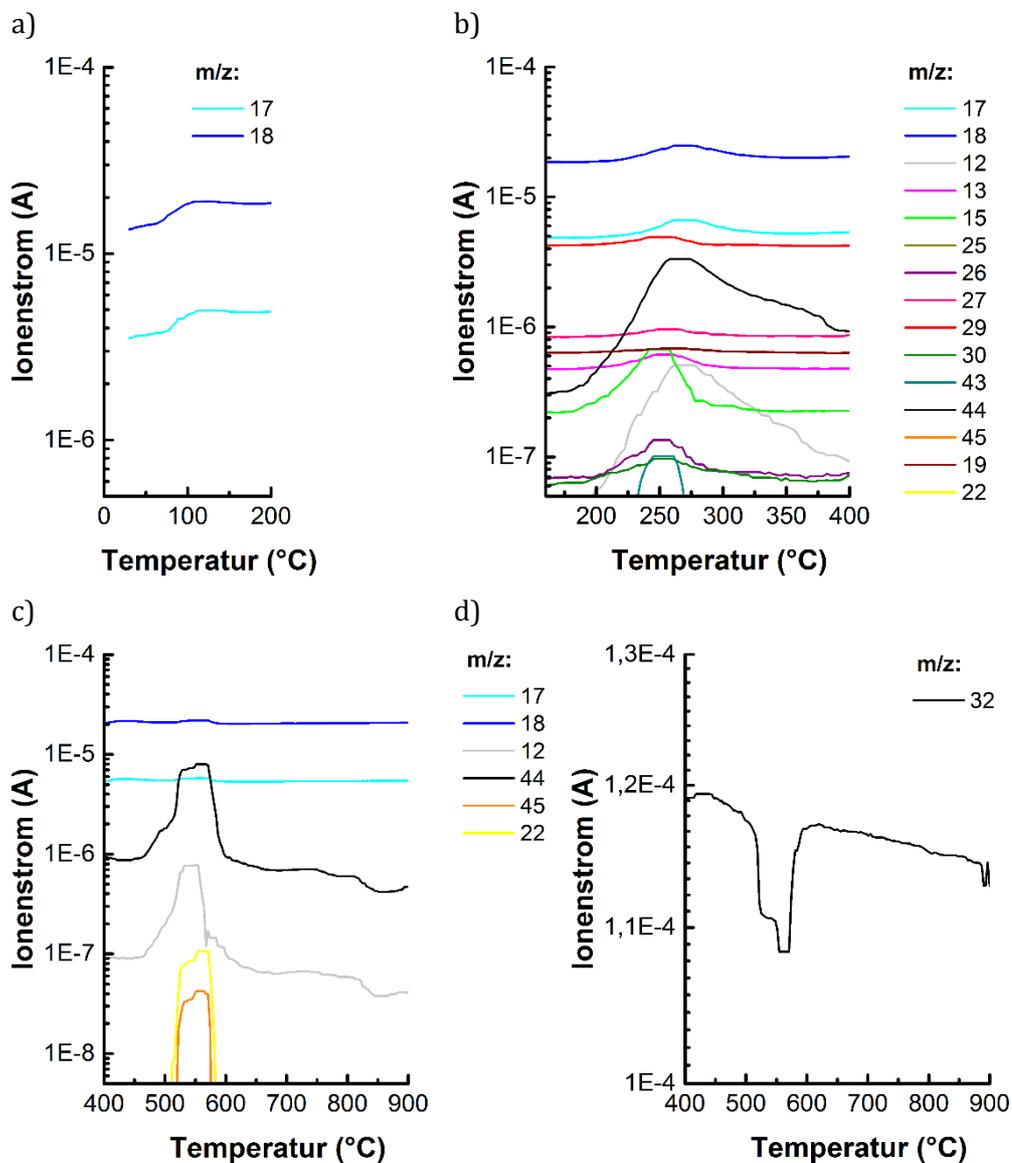


Abb. 19 : MS-Scans während einer TGA-Messung der Faser LA8 [a) MV1 b) MV 2 und 3, c) und d) MV4]. Die Messung fand unter synthetischer Luftatmosphäre statt.

In der ersten Massenverluststufe (0 - 170 °C) werden die Massenfragmente 17 (OH⁺) und 18 (H₂O⁺) freigesetzt. Demnach wird bis 170 °C physikalisch adsorbiertes Wasser oder Wasser, das durch Wasserstoffbrückenbindungen in der Faser integriert ist, freigesetzt.

In der zweiten Massenverluststufe (170 - 393 °C) können die Fragmente 12, 13, 15, 17, 18, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 43, 44 und 45 detektiert werden. Während dieser thermischen Zersetzung wird kein Sauerstoff (m/z = 32 und 16) verbraucht. Aufgrund der Freisetzung von CO₂⁺⁺ und CO⁺ ohne Verbrauch von Sauerstoff kann davon ausgegangen werden, dass sich die Carboxylatfunktion

während dieser Massenverluststufe zersetzt. Auch die Freisetzung von Fragmenten wie $O=CH_2^+$, $O=CH^+$ bestätigt die Zersetzung von Lactat.

In der geringen dritten Massenverluststufe (393 °C - 433 °C) können im MS nur die m/z -Fragmente 18 (H_2O^+) und 17 (OH^+) nachgewiesen werden. Hier scheint sich durch Kondensationsreaktionen das TiO_2 -Gerüst zu stabilisieren.

In der letzten, stark exothermen Massenverluststufe werden unter Sauerstoffverbrauch die Fragmente 12, 17, 18, 22, 43, 44 und 45 abgespalten. Dies deutet auf die Freisetzung restlicher Ethoxy-Gruppen hin, so dass bei 900 °C reines TiO_2 vorliegen sollte.

Ein weiterer Nachweis, dass das Carboxylat in der Massenverluststufe 2 zersetzt wurde und in Massenverluststufe 4 nur noch Alkoxy-Gruppen vorliegen, konnte mit FTIR-Spektroskopie erbracht werden. Hierzu wurde eine Probe mit einer Aufheizrate von 10 K/min unter Luftatmosphäre analog zur TGA-Messung auf 430 °C erhitzt. Ein Ausschnitt dieses FTIR-Spektrums ist in Abb. 20 gezeigt.

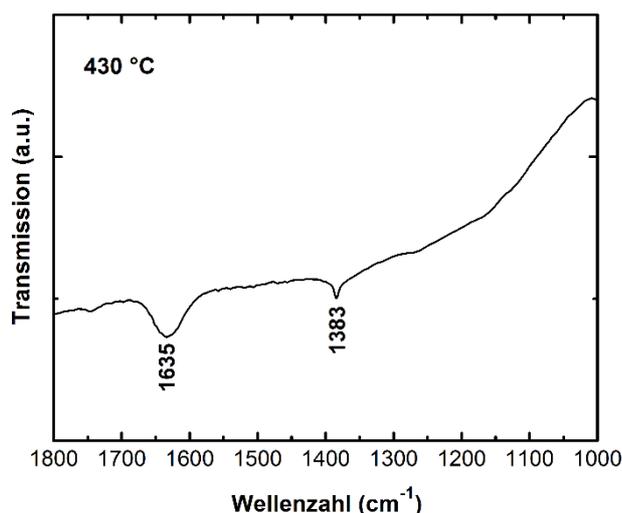


Abb. 20 : FTIR-Spektrum der Probe LA8, die vorher mit einer Heizrate von 10 K/min unter Luftatmosphäre auf 430 °C getempert wurde.

Hiermit wird die Theorie aus den TGA-MS-Messungen bestätigt, dass während der letzten Massenverluststufe keine Carboxy-, sondern nur noch Alkoxy-Gruppen im Fasermaterial vorliegen. Im FTIR-Spektrum der bis zu 430 °C getemperten Probe können keine COO -Schwingungen, sondern nur $\delta_s(CH_3)$ von Ethoxy-Gruppen bei 1383 cm^{-1} identifiziert werden. Bei der Schwingungsbande bei 1635 cm^{-1} handelt es sich um $\delta(H_2O)$ von adsorbierten Wassermolekülen.

Zur Bestimmung der bei 900 °C vorliegenden Modifikation von TiO_2 wurden XRD-Messungen durchgeführt. Dafür wurde die Faser LA8 analog der Bedingungen während einer TGA-Messung auf

eine bestimmte Temperatur erhitzt und von der verbleibenden Probe Röntgenpulver-Diffraktogramme (XRD) aufgenommen (Abb. 21).

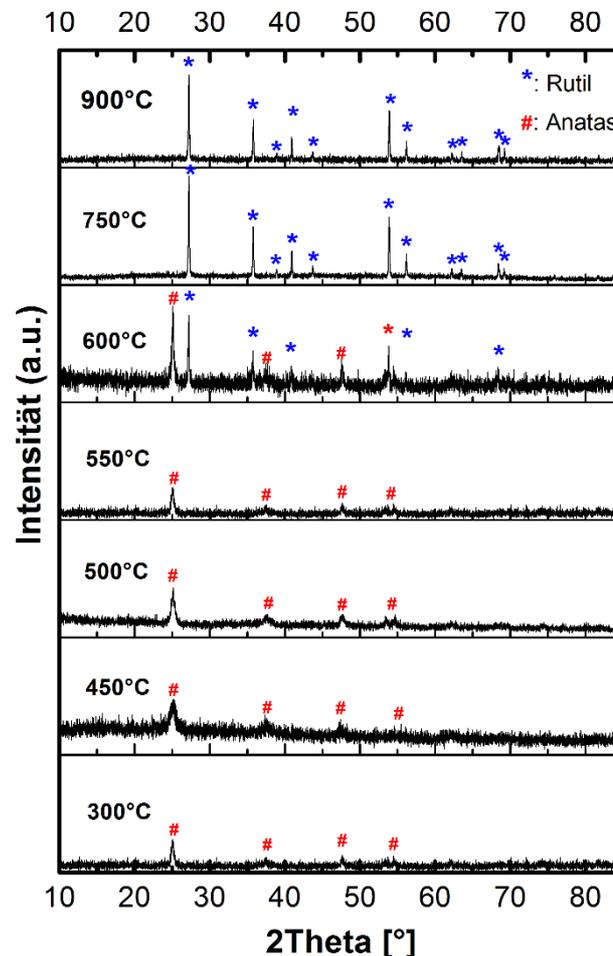


Abb. 21 : Röntgenpulverdiffraktogramme von LA8-Fasern, die mit einer Aufheizrate von 10 K/min unter Luftatmosphäre bis zu 300 °C, 450 °C, 500 °C, 550 °C, 750 °C und 900 °C getempert wurden. Reflexe von Anatas sind mit einem (#) gekennzeichnet, Reflexe von Rutil mit einem (*).

Ab einer Temperatur von 300 °C können erste Reflexe von Anatas erkannt werden. Anatas bleibt die einzig detektierte TiO_2 -Modifikation bis zu einer Temperatur bis 550°C. Bei 600 °C beginnt die Phasenumwandlung zu Rutil und es können sowohl Reflexe für die Modifikation Anatas als auch Rutil detektiert werden. Ab einer Temperatur von 700 °C liegt nur noch phasenreines Rutil vor. Der Vergleich mit der TGA-Messung zeigt, dass die Bildung von Anatas bereits während der zweiten Massenverluststufe (170 - 393 °C) beginnt. Während der letzten Massenverluststufe bilden sich erste Rutilreflexe im XRD aus, so dass ab 700 °C nur noch die Modifikation Rutil vorliegt.

4) Degradationsverhalten

Zur Untersuchung des Degradationsverhaltens der LA-Fasern wurden Degradationsprofile sowohl in VE-Wasser, als auch in PBS erstellt. Das Degradationsprofil in PBS liegt näher an der Degradation in Zellkultur oder an *in-vivo*-Anwendungen, da hier ein physiologischer pH-Wert und eine physiologische Osmolarität vorliegen. Die Degradationsuntersuchungen in Wasser dagegen erleichtern die Analytik für die Identifikation der Degradationsprodukte.

LA8-Fasern mit einem LA-Gehalt von 1 und einem hohen Wassergehalt von 18,5 während der Synthese werden in Kontakt mit Wasser/PBS innerhalb von wenigen Sekunden aufgelöst und wieder in den Solzustand überführt. Mit Spinnmassen mit einem Wassergehalt von ≤ 1 können Degradationsprofile erstellt werden. Das Degradationsprofil der Faser LA89 (Abb. 22) ist exemplarisch für alle anderen LA-Fasern gezeigt. Bei der LA89-Faser handelt es sich um die Faser mit dem niedrigsten LA-Gehalt und stellt somit den vielversprechendsten Kandidaten für spätere Versuche mit Fibroblasten dar. Die Degradationsprofile der Fasern LA14, LA27 und LA31 befinden sich im Anhang 1. Alle Degradationsprofile zeigen den gleichen Trend. Innerhalb der ersten Stunden verlieren die Fasern an Masse; danach bleibt die Kurve konstant bei einem Wert über den restlichen Verlauf der Degradationsdauer. Auffallend ist, dass der Massenverlust während der Degradation in VE-Wasser stärker ist, als der Massenverlust in PBS. Dies liegt an der Adsorption von Salzen aus der PBS-Lösung an die Faseroberfläche, die trotz zweimaligen Spülen nicht komplett entfernt werden konnten.

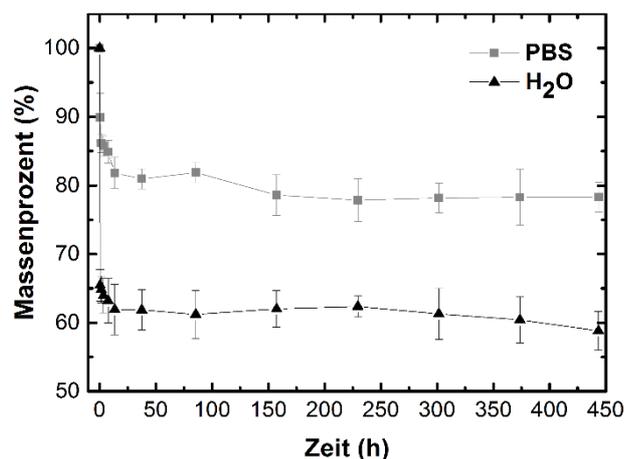


Abb. 22 : Degradationsprofile der Faser LA89 in Wasser (schwarze Dreiecke) und PBS (graue Vierecke). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Punkte miteinander verbunden.

Zudem wurden LA89-Fasern in VE-Wasser eingelegt und die Leitfähigkeit der Lösung im zeitlichen Verlauf über 10 h vermessen (Abb. 23). Innerhalb der ersten 4 h werden leitfähige Substanzen von den Fasern an die Degradationslösung abgegeben.

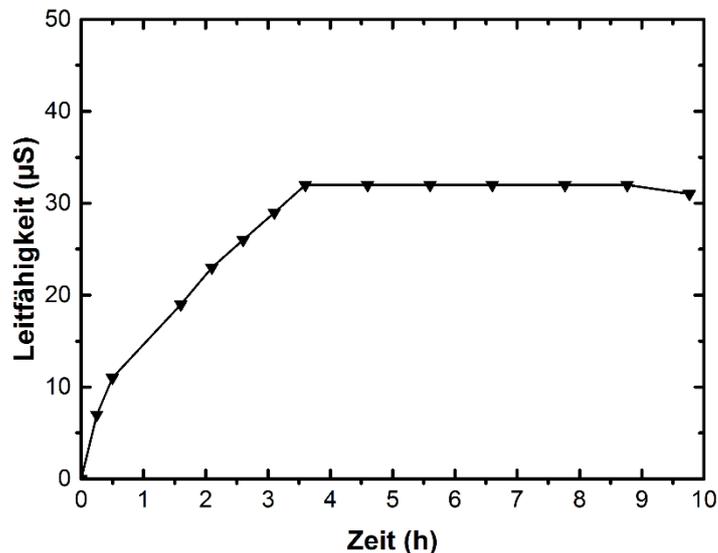


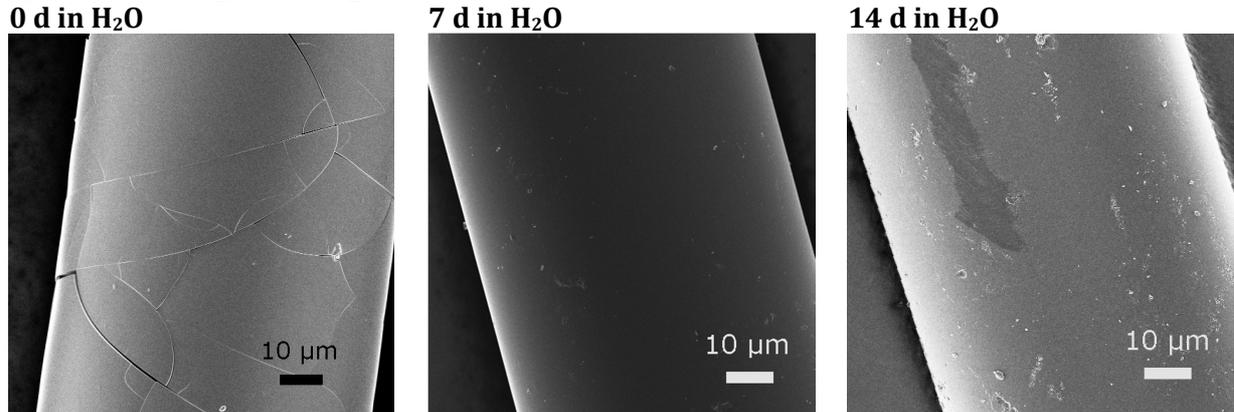
Abb. 23 : Bestimmung der Leitfähigkeit von VE-Wasser, in das LA89-Fasern über einen Zeitraum von 10 h eingelegt wurden.

Zur Aufklärung des Degradationsverhaltens wurden sowohl die degradierten Fasern, als auch die wässrige Lösung, in denen die Fasern degradiert wurden, näher untersucht. Dies geschieht wiederum am Beispiel der Faser LA89. Die degradierten und getrockneten Fasern wurden mittels REM-Untersuchungen und FTIR- und TGA-Messungen näher charakterisiert. Im Eluat wurden die flüchtigen Degradationsprodukte über GC-Messungen identifiziert. Zur Analyse der nicht flüchtigen Degradationsprodukte wurde das Eluat lyophilisiert und der Rückstand mit NMR-Messungen und ICP-Untersuchungen untersucht.

Die Oberflächenmorphologie der Fasern wurde während der Degradation in sterilem Wasser näher charakterisiert. Abb. 24 zeigt REM-Aufnahmen einer undegradierten LA89-Faser und von LA89-Fasern, die für 7 und 14 Tage in Wasser behandelt wurden. In den 1k-fachen Vergrößerungen (Abb. 24 a) erkennt man, dass der Faserdurchmesser konstant bleibt. Leichte Schwankungen sind auf den Spinnprozess zurückzuführen. Die unbehandelte Probe verhält sich gegenüber dem Elektronenstrahl äußerst sensitiv und bricht während der Messung im REM. Mit steigender Degradationszeit können vermehrt kleine Ablagerungen und leichte Kratzer (Probe: 14 d in H₂O) auf der Faseroberfläche erkannt werden.

Von den gleichen Fasern sind in Abb. 24 b 150k-fache Vergrößerungen von einer glatten Stelle der Faseroberfläche gezeigt. Die nicht degradierte Faser weist eine sehr glatte Topographie auf. Mit steigender Degradationszeit bildet sich allmählich eine granulare Oberfläche.

a) 1k-fache Vergrößerungen



b) 150k-fache Vergrößerungen

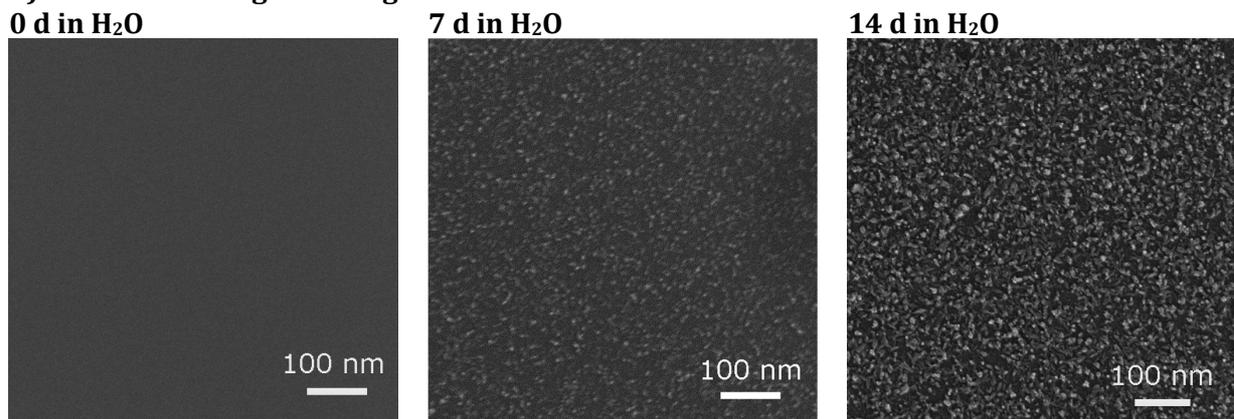


Abb. 24 : REM-Aufnahmen (InLens-Detektor) von einer undegradierten und von 7 bzw. 14 Tage in sterilem Wasser degradierten LA89-Fasern. a) 1000fache Vergrößerung; b) 150000fache Vergrößerung.

In Abb. 25 sind die FTIR-Spektren der undegradierten LA89 und einer für 14 d in VE-Wasser degradierten Faser dargestellt. Nach 14 Tagen Degradationszeit in VE-Wasser sind noch immer Schwingungsbanden von organischen funktionellen Gruppen (Lactat) detektierbar. Auffallend ist, dass während der Degradation vor allem die Schwingungsbande der Ethoxygruppen bei 1384 cm^{-1} nahezu komplett verschwindet. Dies steht mit der Theorie, dass Alkoxygruppen schneller hydrolysiert werden als mehrzählige Chelatliganden (wie Lactat), im Einklang.^[23]

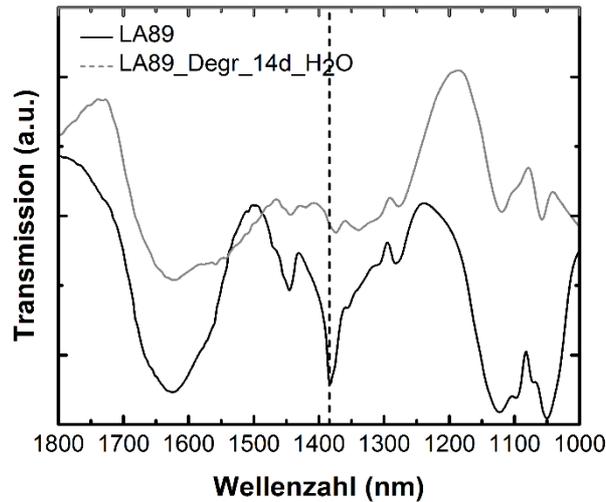


Abb. 25: FTIR-Spektren einer undegradierten LA89-Faser (schwarze Linie) und einer für 24 h in VE-Wasser degradierten LA89-Faser (graue Linie).

Somit liegt auch nach einer 14-tägigen Degradationsdauer noch immer Lactat in der Faser gebunden vor. Dies kann auch über TGA-Messungen (Abb. 26) nachgewiesen werden.

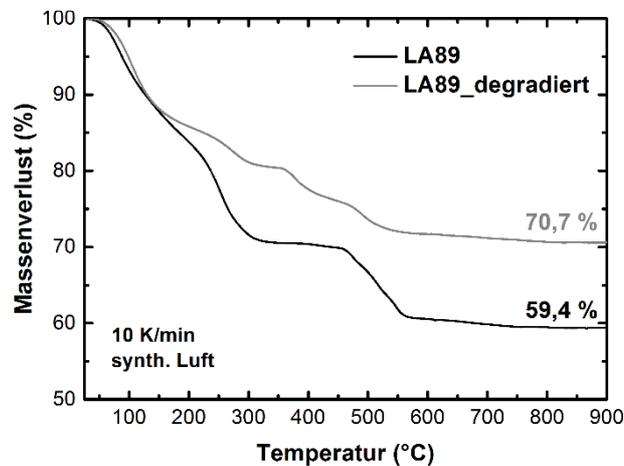


Abb. 26 : TGA-Untersuchung der LA89-Faser (schwarze Linie) und einer für 14 d in H₂O degradierten LA89-Faser (graue Linie). Die Messungen erfolgten unter synthetischer Luftatmosphäre.

m_{Rest} der undegradierten LA89-Faser liegt bei 59,4 %, m_{Rest} der für 14 d in Wasser degradierten LA89-Faser bei 70,7 %. Dies zeigt, dass während der Degradationsdauer organische Gruppen in der Faser abgespalten werden. Somit steigt der Feststoffgehalt an TiO₂ in der degradierten Faser. Des Weiteren fällt auch auf, dass die TGA-Kurve der undegradierten LA89-Faser drei Massenverluststufen besitzt. Diese stehen im Einklang mit der in Abb. 18 diskutierten LA8-Faser –

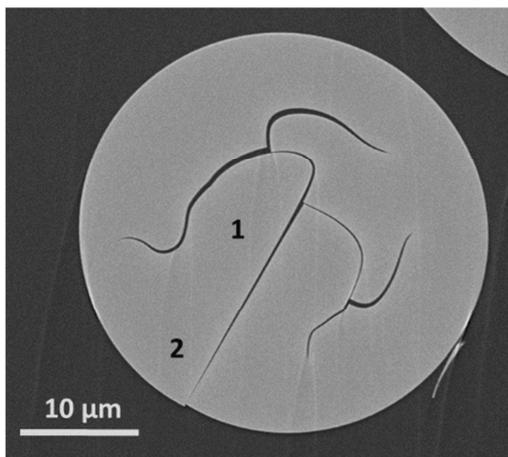
lediglich die kleine Massenverluststufe im Bereich von 393 - 433 °C kann bei der Faser LA89 nicht identifiziert werden. Diese ist vermutlich auf eine Umstrukturierung des Ti-O-Gerüsts zurückzuführen.

Die TGA-Kurve der degradierten LA89-Faser zeigt Massenverluststufen in den gleichen Temperaturbereichen wie die undegradierete Faser und zusätzlich eine weitere Massenverluststufe im Bereich von 300 - 420 °C. Diese zusätzliche Massenverluststufe deutet auf Umstrukturierungen der Faserstruktur während des Degradationsprozesses hin.

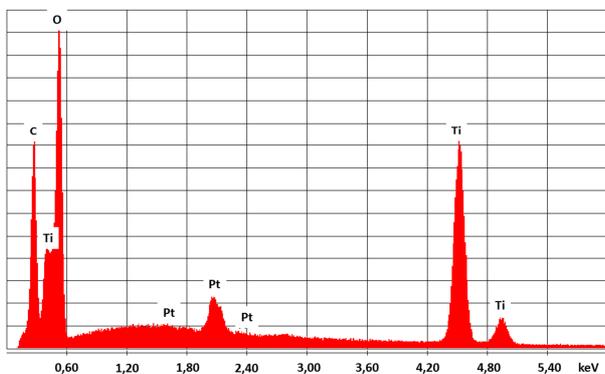
Der restliche organische Anteil scheint in der Faser eingeschlossen zu sein und kann nicht innerhalb von 400 h freigesetzt werden. Vermutlich bildet sich an der Faser während der Degradation eine Hülle aus TiO_2 , welche die hybride Komposition der Faser einschließt. Erst durch die langsame Degradation der TiO_2 -Hülle bedingt durch die Sättigungskonzentration von Ti(OH)_4 und Ti(O)(OH)_2 in wässriger Lösung kann der hybride Kern der Faser weiter abgebaut werden. Dies konnte durch EDX-Untersuchungen bekräftigt werden. Abb. 27 zeigt eine REM-Aufnahme eines Querschnitts einer LA89-Faser mit EDX-Messungen an zwei verschiedenen Positionen. Aus den EDX-Ergebnissen wird deutlich, dass der Gehalt an Organik (Kohlenstoff) relativ zum Gehalt an Ti im Kern der Faser (Position 1) bedeutend höher ist als im Faseräußeren (Position 2). Die Faser bricht während der REM- und EDX-Messung; eine Erklärung hierfür wird im Laufe der Arbeit gefunden.

Degradationsuntersuchungen in einer Durchflussapparatur, die das Erreichen der Sättigungskonzentrationen von Titan(IV)oxid und Titan(IV)oxidhydroxid im Degradationsmedium vermeidet, waren aufgrund der geringen mechanischen Eigenschaften der Faser LA89 nicht möglich. Während der Scherung des Degradationsmediums an der Faseroberfläche zerfielen die Fasern in kleine Partikel und wurden durch die poröse Membran der Durchflussapparatur (Poren: 11 μm) abtransportiert.

a)



b) Position 1



c) Position 2

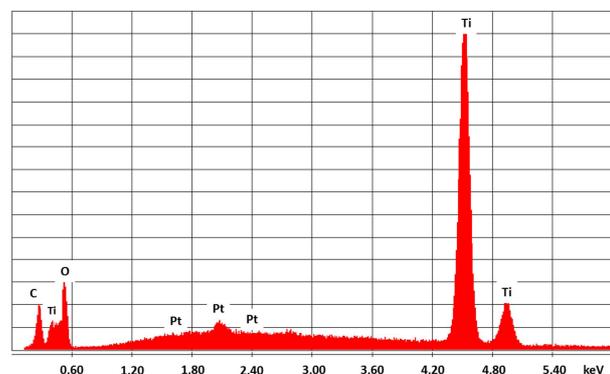


Abb. 27 : a) REM-Aufnahme des Querschnitts einer LA89-Faser. Die Faser wurde in einem Harz eingebettet und mit Hilfe von Cross-Section-Polishing (CSP) präpariert. b und c) EDX-Aufnahmen an den gekennzeichneten Positionen 1 und 2 in der REM-Aufnahme (a).

GC-Untersuchungen des Eluates zeigten nur ein flüchtiges Degradationsprodukt mit einem Peak bei einer Retentionszeit von 1,86 min. Eine Referenzmessung mit absoluten Ethanol bestätigte, dass es sich hierbei um Ethanol handeln muss. Das freigesetzte Ethanol kann auf zwei verschiedene Wege freigesetzt werden. In der Faser adsorbiertes EtOH kann durch Kontakt mit Wasser aus der Faser extrahiert werden. Zudem können durch Wasserkontakt auch vorliegende Ethoxy-Gruppen hydrolysiert werden und als EtOH freigesetzt werden.

Der Titan-Gehalt aller Eluate aus den Degradationsuntersuchungen konnte über ICP-Messungen nicht bestimmt werden, da er unter der Detektionsgrenze lag.

Für die weitere Identifizierung der nicht flüchtigen Degradationsprodukte wurde der erhaltene Extrakt lyophilisiert. Hierbei erhielt man einen farblosen Feststoff, der für eine ICP-Untersuchung wieder in Wasser überführt wurde. Die Konzentration der Lösung betrug 270 mg/L. Hier konnte über eine ICP-Untersuchung eine Titankonzentration von 0,075 mg/L detektiert werden.

Dementsprechend ist der Massenanteil an Titan in den nicht flüchtigen Degradationsprodukten 0,28 ‰.

Für NMR-Untersuchungen wurde der farblose Rückstand wieder in D₂O gelöst (Abb. 28). Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt ein Dublett bei 1,32 ppm und ein Quartett bei 4,24 ppm; das ¹³C-NMR Spektrum Signale bei 19,4 ppm, 66,9 ppm und 179,5 ppm. Dies deutet auf die Freisetzung von Lactat hin.^[133]

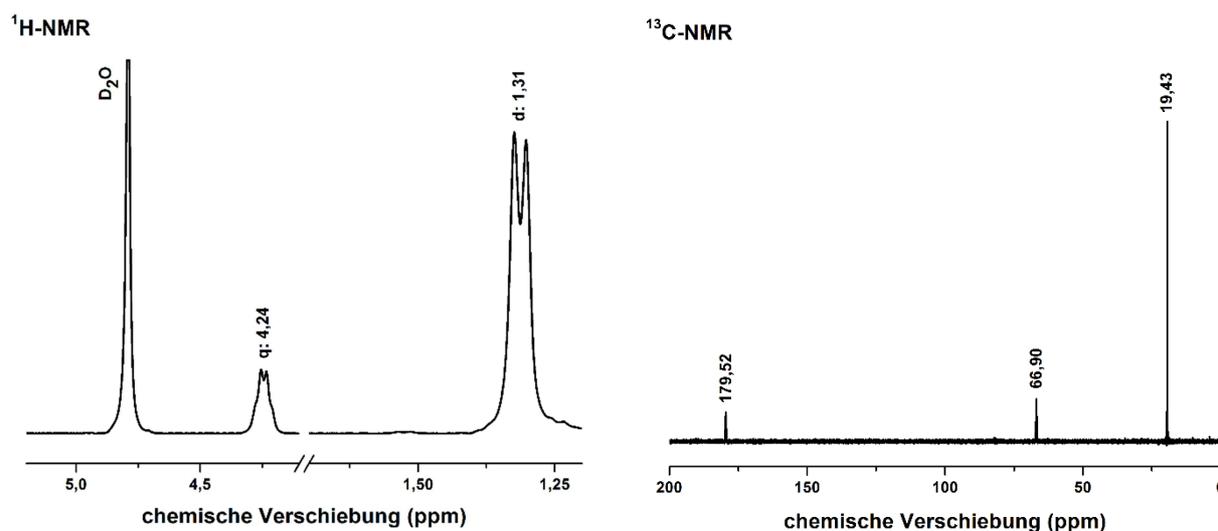


Abb. 28 : ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum in D₂O des lyophilisierten Degradationsrückstandes.

Das NMR-Röhrchen des Degradationsproduktes in D₂O wurde für eine Woche bei RT aufbewahrt und nochmals vermessen. Nun können zusätzlich zwei neue Signale im ¹H-NMR-Spektrum detektiert werden: Ein tieffeldverschobenes Quartett bei 4,97 ppm und ein hochfeldverschobenes Dublett bei 1,26 ppm. Der Vergleich mit der Literatur zeigt, dass Seisenbaeva *et al.*^[83] die gleichen Signale bei der Untersuchung von TiBALDH erhalten hatte.

Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt neben den Signalen von freiem Lactat auch drei zusätzliche Signale bei 19,1 ppm, 82,2 ppm und 188,4 ppm. Diese Signale konnten auch in einer ¹³C-MAS-NMR-Untersuchung von Einkristallen der wasserlöslichen Verbindung [(NH₄)₂Ti(LA)₃] in einer Studie von Kakihana *et al.*^[131] detektiert werden (vgl. Abb. 29).

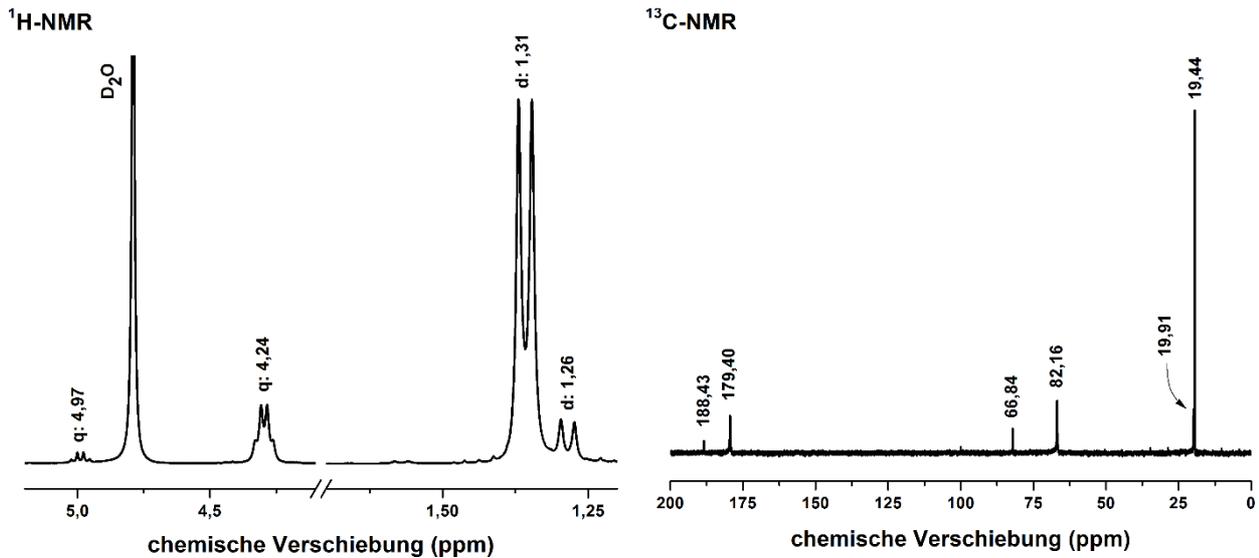


Abb. 29 : erneute Messung des lyophilisierten Degradationsrückstandes nach einer Woche Lagerung in D₂O
¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum (Lösungsmittel: D₂O).

Die gelösten Titan-Spezies komplexieren demzufolge wieder in Lösung zu einem wasserlöslichen Komplex und fallen nicht mehr aus. Das Röhrchen aus den NMR-Untersuchungen wurde für insgesamt 2 Monate bei RT aufbewahrt. Innerhalb dieser Zeit blieb die Lösung im NMR-Röhrchen klar. Ein nach 2 Monaten vermessenes Spektrum war noch mit dem Spektrum nach 2 Wochen identisch.

Hiermit konnte neben der Bestimmung über ICP-Untersuchungen zusätzlich indirekt die Freisetzung von titanhaltigen Stoffen aus der Faser während der Degradation nachgewiesen werden. Dies deutet stark darauf hin, dass das Fasermaterial über lange Zeit auch bei *in-vivo*-Anwendungen mit ständigem Austausch der Degradationsmedien, vermutlich in Form von Ti(OH)₄^[80] und Ti(O)(OH)₂^[81], abgebaut werden kann.

5) Integration von Gegenionen in die LA-Faser

Der pH-Wert eines Scaffold-Materials für die Besiedelung mit z. B. Hautzellen sollte bei einem Wert nahe des physiologischen pH-Wertes von 7,4 liegen. In dieser Arbeit werden Carbonsäuren als Chelatliganden verwendet, so dass die Sole mit Basen neutralisiert werden müssen.

Analog zu den nicht neutralisierten Solen soll sich zuerst das Sol-Gel-System nur durch die Chelatliganden selbst katalysiert ausbilden. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wird eine Base in stöchiometrischen Mengen zugegeben und das Sol anschließend am Rotationsverdampfer zu einem Gel eingeeengt.

5.1) Anorganische Basen

Der Einsatz von anorganischen Basen, wie beispielsweise NaOH, KOH, Ca(OH)₂, Na₂CO₃ etc., bei der Neutralisation des Sols führt zur spontanen Bildung eines farblosen Niederschlages. Diese Sole können nicht in ein fadenziehendes Gel überführt werden und sind demnach zur Herstellung von Titan(IV)oxid-haltigen Fasern über die Methode des Druckspinnens ungeeignet.

5.2) Ammonium

Eine vielversprechende Base zum Neutralisieren des Sols ist Ammoniak. Dieser wird als 28 %iges Ammoniakwasser zugegeben. Nach der Aufarbeitung kann ein fadenziehendes Gel erhalten und zu Fasern versponnen werden.

Abb. 30 zeigt ein FTIR-Spektrum der Fasern LA_NH₄⁺_11 und LA8. Das Sol dieser Fasern enthält die gleiche Zusammensetzung von TEOT : LA : H₂O (1 : 1 : 18,5); die Faser LA_NH₄⁺_11 wurde mit einer bezogen auf LA gleichen Stoffmenge Ammoniakwasser neutralisiert. Danach konnte ein pH-Wert des Sols von 7 ermittelt werden.

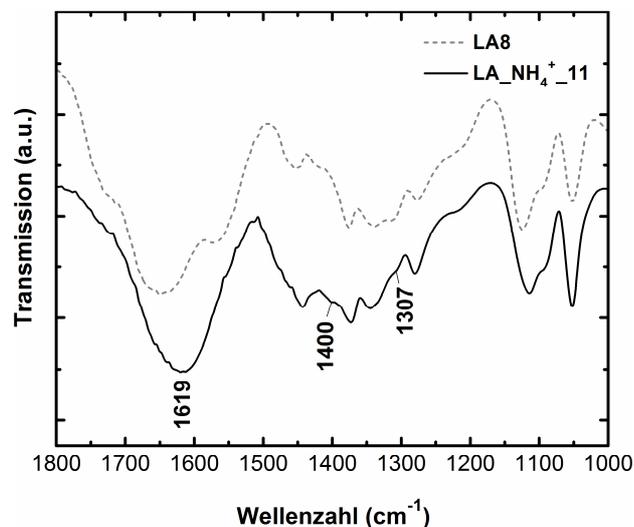


Abb. 30 : FTIR-Spektren der Fasern LA8 (grau, gestrichelt) und LA_NH₄⁺_11 (schwarz, durchgezogene Linie).

Im Spektrum der Faser LA_NH₄⁺_11 liegt eine NH₄⁺-Schwingung bei 1400 cm⁻¹ im Bereich von 1800 bis 1000 cm⁻¹. Weitere Ammoniumschwingungen im Bereich von 3000 bis 3200 cm⁻¹ sind nicht abgebildet.^[134]

Durch das Gegenion Ammonium ist die elektronische Umgebung des koordinierten Carboxylats verändert, so dass auch die Schwingungen $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ und $\nu_s(\text{COO}^-)$ leicht verschoben sein müssten.

Im Bereich von $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ kann nur eine Schwingungsbande beobachtet werden. Sie liegt bei 1619 cm^{-1} . Dieser Wert spricht für eine Koordination der Carboxylat-Gruppe an Titan, da die Bandenposition im Vergleich der Position von $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ von freier LA eindeutig zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben ist. Die Schulter bei 1307 cm^{-1} kann $\nu_s(\text{COO}^-)$ zugeordnet werden. Das resultierende Δ_{as-s} liegt bei 312 cm^{-1} und kann nicht eindeutig einer mono- oder bidentaten Chelatisierung zugeordnet werden. Ein Vergleich mit dem kommerziellen ammoniumhaltigen TiBALDH weist Ähnlichkeiten auf. Auch hier liegt nur ein Koordinationsmodus mit einem Δ_{as-s} von ca. 300 cm^{-1} vor.^[27] Die leichte Differenz der beiden Δ_{as-s} -Werte könnte an den unterschiedlichen Wassergehalten von beiden Systemen liegen. Demnach scheint $\delta(\text{H}_2\text{O})$ bei TiBALDH einen größeren Einfluss auf die Verschiebung der Bandenposition zu haben.

Die Faser LA_ NH_4^+ _11 weist ebenso wie die Faser LA8 einen sehr hohen Wassergehalt in der Synthese der Spinnmasse auf. Auch in ihren Degradationseigenschaften sind sie sich sehr ähnlich und lösen sich in Wasser innerhalb weniger Sekunden komplett auf.

5.3) Amine und Aminosäuren

Für die Degradationseigenschaften der Fasern scheint es von Vorteil zu sein, dass während der Synthese ≤ 1 mol Wasser bezogen auf TEOT verwendet wird. Daher sollen nun organische Basen als Feststoff zu den Spinnmassen zugegeben werden.

Als Base wurde zuerst das primäre Amin Phenethylamin (biogenes Amin) verwendet. Ein FTIR-Spektrum einer LA-Faser mit Phenethylamin als Gegenion, wie auch von reinem Phenethylamin sind exemplarisch in Abb. 31 dargestellt. Charakteristische Banden von Phenethylamin bei 1496 und 1454 cm^{-1} sind im Spektrum der Faserprobe gekennzeichnet.^[135]

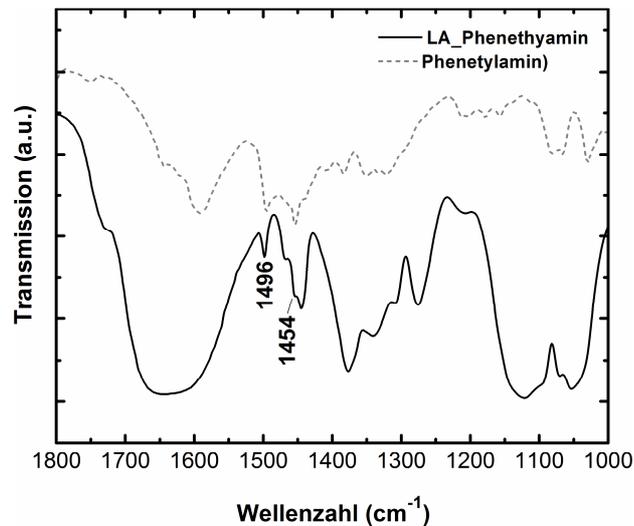


Abb. 31 : FTIR-Spektrum einer Faser mit Phenethylamin als Gegenion (schwarz, durchgezogene Linie) und Phenethylamin (grau, gestrichelte Linie).

Auch Aminosäuren können als organische Basen fungieren und stellen zusätzlich kein Risiko gegenüber Zellen bei dem Einsatz in einem Scaffold-Material dar. Auch hier konnten pH-neutrale, spinnfähige Gele erhalten werden. In diesen Versuchen wurde der Wassergehalt im Sol äußerst niedrig gehalten und eine Solzusammensetzung analog der Faser LA89 gewählt. Die Spektren der Fasern mit und ohne Aminosäuren unterscheiden sich kaum. Abb. 32 zeigt dies am Beispiel einer Faser mit Phenylalanin als Gegenion (LA89_Phe). Der Koordinationsmodus von Lactat an das Titanoxidgerüst ändert sich nicht im Vergleich zu LA89 ohne Base. Es können in beiden Fasern die Bande für $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ bei 1630 cm⁻¹ und eine Schulter bei 1583 cm⁻¹ ausgemacht werden.

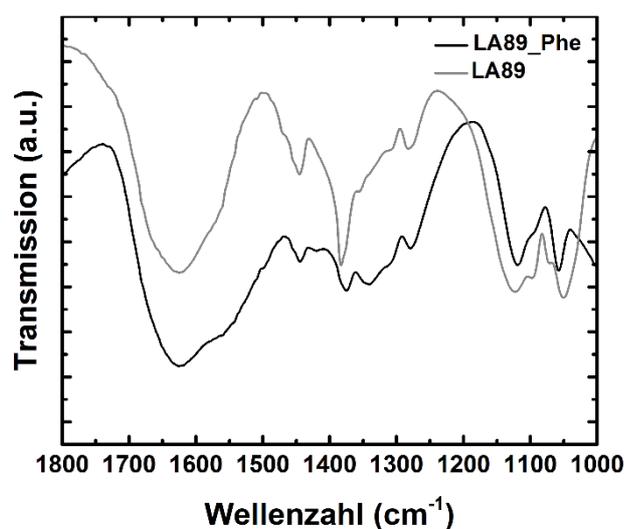


Abb. 32 : FTIR-Spektren der LA89 mit Phenylalanin als Gegenion (schwarze Linie) und ohne Gegenion (graue Linie).

Die Degradationsprofile beider Fasern in PBS verhalten sich sehr ähnlich (Abb. 33). Innerhalb der ersten Stunden findet ein Massenverlust statt. Danach fällt die Degradationskurve nicht weiter und pendelt sich bei einem konstanten m%-Wert ein. Der Massenverlust der Phenylalanin-haltigen Faser ist um ca. 5 % stärker.

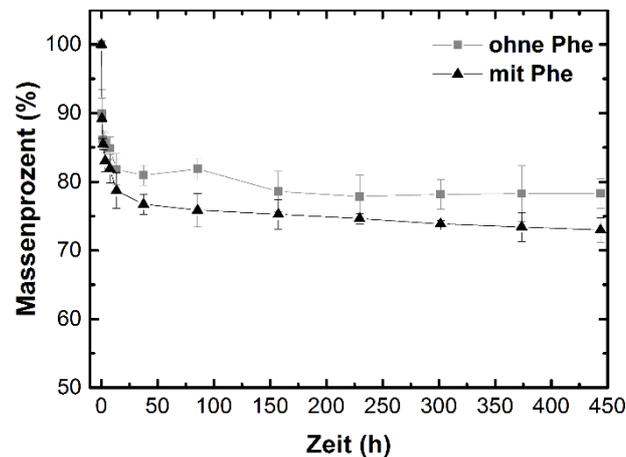


Abb. 33 : Degradationsprofile über 450 h von LA89 (graue Vierecke) und LA89_Phe (schwarze Dreiecke) in PBS.

5.4) Chitosan

Das protonierbare Biopolymer Chitosan sollte ebenfalls in eine Spinnmasse integriert werden. Chitosan löst sich beispielsweise in 5 %iger LA^[136], fällt allerdings in alkoholischer Lösung wieder aus^[65]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde eine Spinnmassenzusammensetzung verwendet, bei der vor dem Verspinnen der komplette Gehalt an Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt wurde. Eine solche Spinnmassenzusammensetzung stellt die Formulierung der Faser LA8 dar.

0,25 m% an Chitosan bezogen auf den Milchsäure-Gehalt wurden vor Zugabe zum Sol gelöst. Nach Zugabe dieser Mischung zum Sol fiel unter starkem Rühren ein feiner Niederschlag aus. Erst nach Entfernen von Ethanol aus dem Ansatz klarte dieser wieder auf und konnte in eine spinnfähige Spinnmasse überführt werden.

Diese Fasern werden im Folgenden als LA8_CHI bezeichnet, weisen eine sehr geringe mechanische Stabilität auf und müssen sehr sorgfältig gehandhabt werden, da sie sehr leicht in viele Bruchstücke zerfallen.

Die Form dieser Fasern ist jedoch sehr interessant. Im Gegensatz zu allen anderen hier untersuchten Fasern sind sie nicht rund im Querschnitt, sondern weisen eine Hantelform auf, die zusätzlich noch verdrillt vorliegt (Abb. 34). Die „Hantel“ ist ca. 70 μm breit und ca. 30 μm hoch.

Diese Hantelform ist auf einen Mantel-effekt zurückzuführen. Beim Verdampfen der Lösungsmittelreste aus der Faser während des Spinnvorgangs trocknet die Faser Oberfläche schneller als das Faserrinnere, so dass sich die Faser einschnürt und eine Hantelform ausgebildet wird. Dies kann beispielsweise auch bei Kieselgelfasern beobachtet, die mit der gleichen Technologie versponnen werden.^[137]

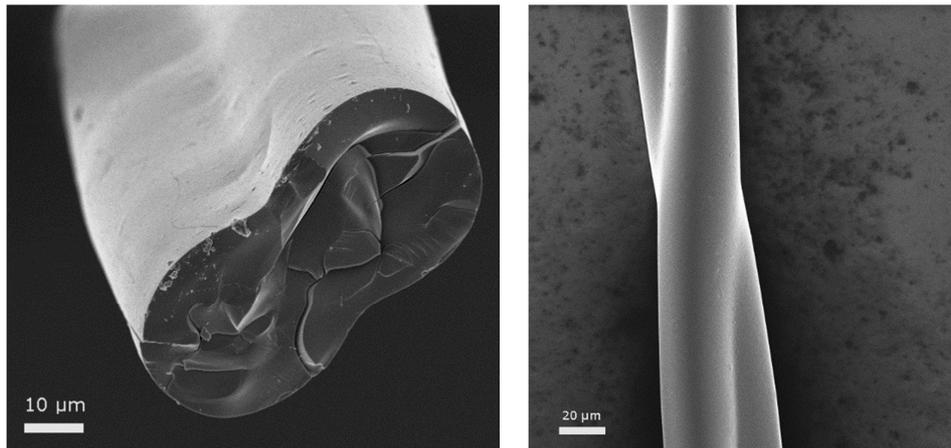


Abb. 34 : REM-Aufnahmen (InLens-Detektor) der Faser LA8_CHI.

Aufgrund dieser Eigenschaft und dem Gehalt an Biopolymer Chitosan wird diese Faser noch weiter in Kapitel II.1 verwendet.

6) Zytotoxizitätstests

Zur Überprüfung der Zytotoxizität kann ein WST-1-Tests in Anlehnung an die DIN-Norm DIN ISO 10993-5 durchgeführt werden. Die Fasern wurden für 48 h in Zellkulturmedium inkubiert und danach entfernt. Anschließend wurden Mausfibroblasten der Zelllinie L929 für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des inkubierten Extrakts (100 %, 50 % und 25 %) kultiviert und deren WST-1-Aktivität bestimmt.

Zuerst wurde LA89_Phe hinsichtlich ihrer Zytotoxizität getestet. Dieses Fasersystem wurde aufgrund des niedrigen LA-Gehaltes und des Einsatzes von Phenylalanin als Gegenion als das Vielversprechendste eingestuft. Die Ergebnisse der WST-Tests sind in Abb. 35 dargestellt.

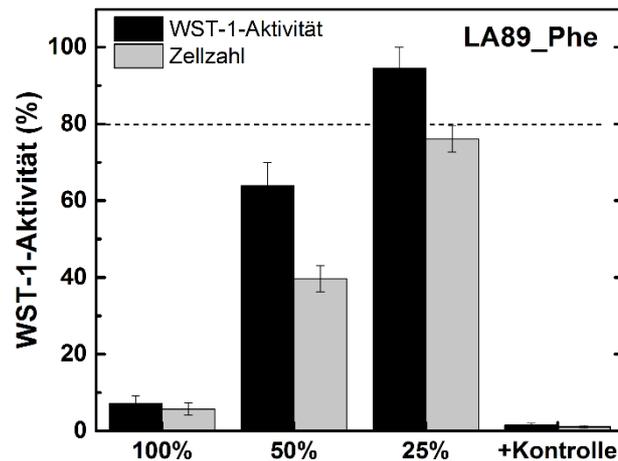


Abb. 35 : WST-1-Aktivität und Zellzahl der Extrakte der für 24 h inkubierten LA89_Phe-Faser (100 %, 50 % und 25 %) bezogen zur Negativkontrolle (Extrakt ohne Fasern).

Der 100 %ige sowie der zu 50 % verdünnte Extrakt wirken auf Mausfibroblasten der Zelllinie L929 zytotoxisch. In beiden Fällen liegen die WST-1-Aktivität sowie die Zellzahl bezogen auf die Negativkontrolle unter einem Wert von 81%. Die 25 %ige Verdünnung des Extraktes zeigt mit einem Wert der WST-1-Aktivität von 94,4 % keine Zytotoxizität gegenüber den Fibroblasten; die Zellzahl liegt hier allerdings mit einem Wert von 76,0 % knapp unter der Grenze von 81 %, was einer schwachen Zytotoxizität gleichzusetzen ist.

Demnach scheint eine zu hohe Konzentration der Degradationsprodukte – Milchsäure, Phenylalanin und Ethanol – in den Wells vorzuliegen. Daher wurden für erneute Zytotoxizitätstests die Fasern für die Zytotoxizitätstests vorkonditioniert. Die Fasern wurden für 24 h in VE-Wasser eingelegt und anschließend für 24 h in Zellkulturmedium inkubiert. Die Ergebnisse der Extrakte von LA89 und LA89_Phe sind in Abb. 36 dargestellt.^[138]

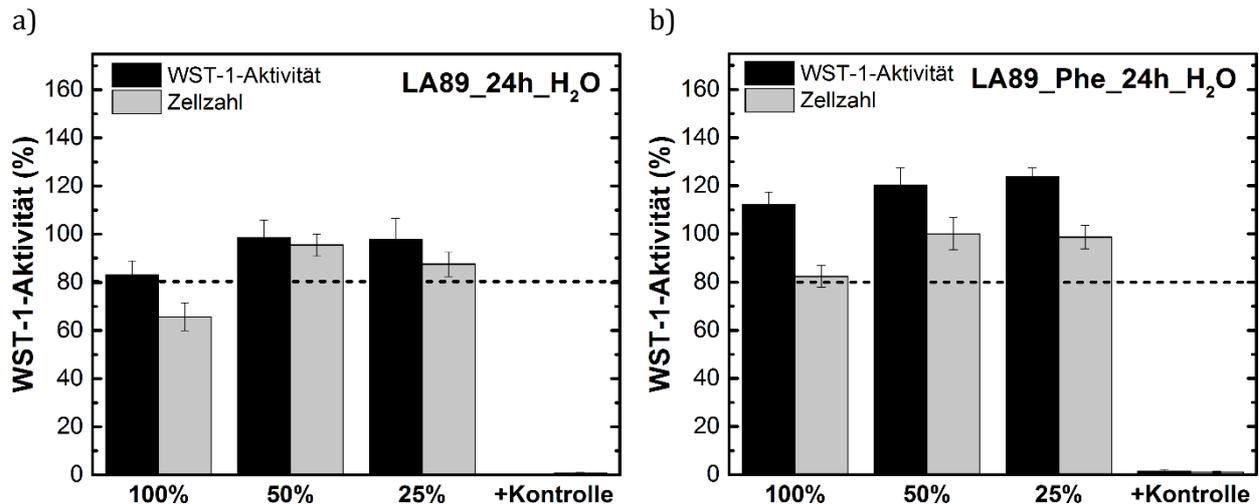


Abb. 36 : WST-1-Aktivität und Zellzahl der Extrakte (100 %, 50 % und 25 %) der für 24 h in Wasser vorkonditionierten a) LA89-Faser und b) LA89_Phe-Faser bezogen zur Negativkontrolle (Extrakt ohne Fasern).

Die vorkonditionierte Faser ohne Gegenion (LA89_24h_H₂O) zeigt in den Werten der WST-1-Aktivität keine Zytotoxizität. Alle Verdünnungen des Extrakts übersteigen die geforderten 81 %. Bei der Bestimmung der Zellzahl erreicht der 100 %ige Extrakt einen Wert bezogen auf die Negativkontrolle von 65,7 % und ist hier als mäßig zytotoxisch einzustufen. Die beiden Verdünnungen (50 % und 25 %) zeigen Werte von über 81 %.

Die vorkonditionierte Phenylalanin-haltige Faser (LA89_Phe_24h_H₂O) zeigt durchwegs in allen drei Verdünnungen in der WST-1-Aktivität, als auch in der Zellzahl keine zytotoxischen Eigenschaften auf Mausfibroblasten der Zelllinie L929. Alle Werte liegen oberhalb von 81 %.

7) Untersuchung des Biegedurchmessers der Fasern

Für eine Anwendung der Fasern als Zellträgermaterial müssen diese gut handhabbar sein. Beispielsweise soll das Material mit einer Pinzette in eine Well-Platte gegeben und daraus wieder entfernt werden können.

Alle LA-Fasern sind direkt nach dem Verspinnen intrinsisch stabil und verhalten sich äußerst flexibel. Zum Beispiel können aus der ca. ein DIN A4-Format großen Fasermatte, die beim Verspinnen auf dem Changiertisch entsteht, mit einem Stanzwerkzeug direkt nach dem Verspinnen runde Stücke passend für ein Well in einer Well-Platte gestanzt werden. Diese sind leicht handhabbar und können mit einer Pinzette in ein Well überführt werden.

Nach wenigen Minuten bei Raumtemperatur verspröden die Fasern stark und brechen während der Handhabung sehr leicht.

Die Durchführung von Zugversuchen mit einzelnen Fasern oder mit ganzen Faservliesen war nicht möglich, da diese nicht in die Vorrichtung der Zugmaschine eingespannt werden konnten. Daher wurde über den Biegedurchmesser der Fasern direkt nach Verspinnen und nach Lagerung von 3 d bei Raumtemperatur im Labor an Zylindern mit verschiedenen Durchmessern Informationen über die Sprödigkeit des Materials gewonnen. Je kleiner der Biegedurchmesser ist, desto flexibler und weniger spröde verhält sich die Faser. Abb. 37 zeigt die Ergebnisse dieser Biegeversuche am Beispiel der Faser LA8.

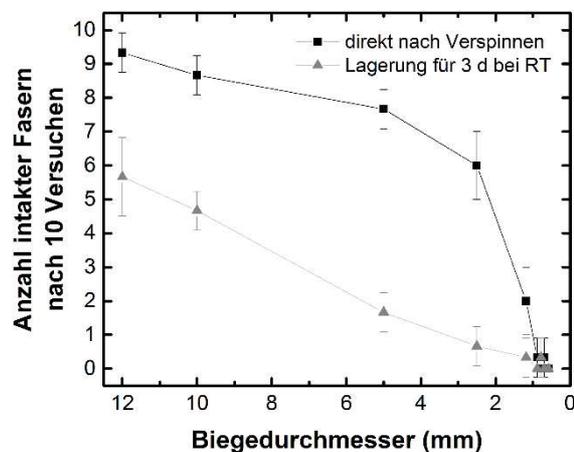


Abb. 37 : Ergebnisse der Biegeversuche von einer LA8-Faser direkt nach dem Verspinnen (schwarze Punkte) und einer LA8-Faser, die für 3 d bei RT gelagert wurde (graue Dreiecke). Zur besseren Nachverfolgung mit dem Auge wurden die einzelnen Punkte durch eine Linie verbunden.

In einem Bereich des Biegedurchmessers von 12,5 bis 2,5 mm verhält sich die Faser direkt nach dem Verspinnen eindeutig biegsamer und flexibler als eine bei Raumtemperatur gelagerte Probe.

8) Zusammenfassung

Die Ergebnisse aus Kapitel I lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass sich Mikrofasern aus einem Sol aus TEOT, LA, Ethanol und Wasser über Druckverspinnen generieren lassen. Hierzu wurde ein Sol hergestellt, das zu einer spinnbaren viskosen Masse weiterverarbeitet und zu Fasern verspinnen wurde. LA koordiniert dabei vollständig an Titan, sowohl in monodentater als auch in bidentater Koordinationsweise.

Da die Fasern Anwendung als Zellträgermaterial finden sollen, wurde hinsichtlich der Untersuchungen ihrer Degradationseigenschaften und der Zytotoxizität eine Faser gewählt, die in ihrer Formulierung wenig LA enthält (LA89).

Bei der Erstellung eines Degradationsprofils der Faser LA89 wurde gezeigt, dass innerhalb von wenigen Stunden ein Massenverlust von ca. 20 m% stattfindet. Danach bleibt die Masse der Fasern konstant. Als Degradationsprodukte konnte Ethanol, LA und eine titanhaltige Spezies – vermutlich $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ^[80] und $\text{Ti}(\text{O})(\text{OH})_2$ ^[81] – identifiziert werden. Mit der Zeit reagiert die titanhaltige Spezies mit ebenfalls degradiertem Lactat zu einem Komplex der Form $[(\text{X})_2\text{Ti}(\text{LA})_3]$, wobei X für ein einfach negatives Gegenion steht (z. B. OH^-). Dies geht mit der nachgewiesenen Bildung von Titan-Citrat-Komplexen im menschlichen Körper konform. Während der Faserdegradation wird zuerst eine titanhaltige Spezies freigesetzt. Diese reagiert erst allmählich mit zur Verfügung stehenden Säuren, wie Lactat aus der Degradationslösung zu einem wasserlöslichen Titan(IV)komplex. Im menschlichen Körper liegt eine Citrat-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ vor. Daher kann davon auszugehen werden, dass sich während der Faserdegradation bei *In-vivo*-Anwendungen auch ein unbedenklicher Titan(IV)citratkomplex bilden wird.

Eine für 24 h in wässriger Lösung degradierte Faser scheint in ihrer Oberfläche mit einer mit TiO_2 passivierten Titanimplantatoberfläche vergleichbar. Derartige Oberflächen sind seit Jahrzehnten in der Medizintechnik etabliert.

Zudem konnten die Spinnmassen durch den Einsatz von Ammoniakwasser oder organischen Basen (z. B. Amine, Aminosäuren) auf einen physiologischen pH-Wert eingestellt werden und zu Fasern versponnen werden. Hierdurch sollten positive Ergebnisse in den Zytotoxizitätstests erzielt werden. Zum anderen eröffnet die Integration von z. B. Aminen auch die Einarbeitung von Aminhaltigen medizinischen Wirkstoffen. Dadurch könnte das entwickelte Fasermaterial nicht nur als Zellträgermaterial Einsatz finden, sondern zeitgleich auch als Wirkstofftransportsystem fungieren.

Unter Berücksichtigung des Degradationsverhaltens wurden Zytotoxizitätstests in Anlehnung an DIN ISO 10993-5 durchgeführt. Nach Vorkonditionierung des Fasermaterials konnte die Faser LA89, die mit Phenylalanin neutralisiert wurde, als nicht zytotoxisch eingestuft werden.

Die Fasern zeigen direkt nach dem Verspinnen ein äußerst flexibles Verhalten. Sie können leicht verformt und zugeschnitten werden und ihre Faserform bleibt stets erhalten. Nach Lagerung bei Raumtemperatur beginnen die Fasern zu verspröden und brechen bei Berührungen. Dieser Effekt könnte auf eine sehr geringe Vernetzung des Titanoxid-Netzwerkes zurückzuführen sein und soll im nächsten Teil der Arbeit verstanden und für die Anwendung optimiert werden.

II) Variation der mechanischen Eigenschaften

In diesem Kapitel sollen die mechanischen Eigenschaften der Fasern verbessert werden, so dass das faserförmige Zellträgermaterial beispielsweise mit einer Pinzette in Wellplatten überführt werden kann.

Um Aufschlüsse über die Zusammensetzung der Faser zu bekommen wurden weitere Fasersysteme, bei denen andere organische Säuren als Milchsäure als Chelatliganden eingesetzt werden, hergestellt und mit LA-Fasern verglichen.

Als weitere Säuren werden die α -Hydroxycarbonsäuren Glykolsäure (GA) und Mandelsäure (MA) sowie die Carbonsäuren Essigsäure (AA) und Propionsäure (PA) für die Herstellung von Fasern verwendet.

Die TEOT-haltigen Sole mit den Säuren GA, MA, AA und PA verhalten sich verglichen mit LA deutlich anders hinsichtlich ihrer Hydrolyseempfindlichkeit. Im Gegensatz zu den Solen der LA-Fasern werden die verwendeten Säuren als Feststoff und nicht als 85 %ige Lösung eingesetzt und können nur mit einem Zusatz geringer Mengen an Wasser zu einer fadenziehenden Spinnmasse weiterverarbeitet werden. Zudem musste hier der Hydrolyseschritt unter Eiskühlung durchgeführt werden. Andernfalls fiel wiederum ein Niederschlag innerhalb von Sekunden aus.

Die Sonderrolle von LA scheint auf dem ersten Blick ungewöhnlich, steht aber im Einklang mit den Eigenschaften bekannter in Wasser stabiler Verbindungen. Es existieren zwar einige in Wasser lösliche und stabile Titan-carboxylat-Komplexe^[139], jedoch ist nur ein in Wasser stabiler Titan-alkoxo-carboxylat-Komplex bekannt. Dabei handelt es sich um TiBALDH mit Hydroxo-Liganden.^[34] Weitere Titan-carboxylat-Komplexe mit Alkoxo-Liganden können leicht unter Schutzgasbedingungen aus Titanalkoxiden dargestellt werden. Diese verhalten sich jedoch äußerst wasserempfindlich.^[139]

Abb. 38 zeigt zusammenfassend verschiedene Gehalte an GA bzw. MA und Wasser während der Solsynthesen bezogen auf 1 mol TEOT.^[140] Alle Ansätze mit einem $\chi(\text{H}_2\text{O}) \leq 2$ führten zu fadenziehenden Spinnmassen. Bei Einsatz von höheren Mengen an Wasser fiel stets ein Niederschlag im Kolben aus und der Ansatz konnte nicht zu Fasern versponnen werden.

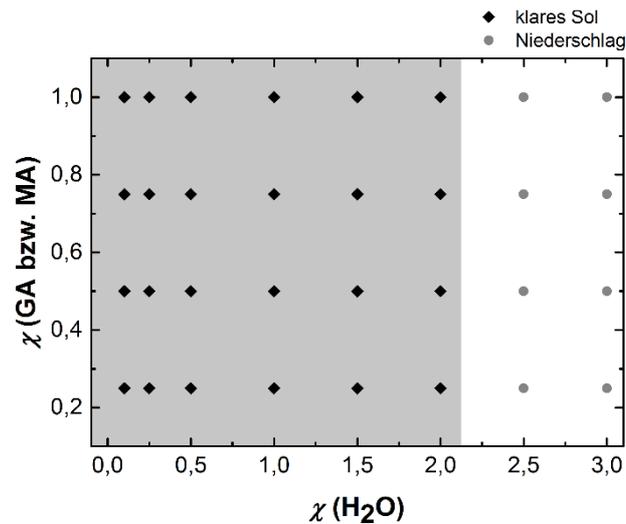


Abb. 38 : Variation des Carbonsäure- und Wassergehalts (χ) bei einer Solsynthese bezogen auf ein Äquivalent TEOT am Beispiel von GA bzw. MA.

Das Sol zur Spinnmassenherstellung ist bei Einsatz von einfachen Carbonsäuren wie AA und PA noch stärker hydrolyseempfindlich. Bei PA konnten nur fadenziehende Spinnmassen bei einem Einsatz von $\chi(\text{H}_2\text{O}) \leq 1$ erhalten werden; bei AA bei einem Einsatz von $\chi(\text{H}_2\text{O}) \leq 0,5$. Mit Ameisensäure (FA, formic acid) konnte in keinem Versuch eine spinnbare Masse erzeugt werden.

Im Folgenden werden drei Strategien verfolgt, um das Verspröden der Fasern zu vermeiden. Im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit wurde postuliert, dass die Fasern aus Titan-oxo-carboxo-Clustern bestehen, die untereinander nur wenig vernetzt sind.

Ein höherer Vernetzungsgrad zwischen den einzelnen Titan-oxo-carboxo-Clustern könnte die mechanische Stabilität der Fasern auch nach Lagerung bei RT verbessern. Folgende drei Strategien werden verfolgt:

- 1) Eine thermische Vernetzung der Titan-oxo-carboxo-Cluster,
- 2) die Änderung der intermolekularen Wechselwirkungen der Titan-oxo-carboxo-Cluster untereinander und
- 3) die chemische Vernetzung der Cluster untereinander durch den Einsatz einer Dicarbonsäure.

Zudem wird bei dem Versuch, die Faser thermisch zu vernetzen, auch die Chitosan-haltige Faser LA8_CHI untersucht. Diese polymerhaltige Faser wurde zusätzlich in Zellkulturversuchen näher charakterisiert.

1) Tempern eines Fasermaterials

Das Tempern der Fasern wurde exemplarisch am Fasersystem LA8 durchgeführt. Diese Fasern verhalten sich nicht nur äußerst spröde nach einer Lagerung von wenigen Minuten bei RT, sondern lösen sich zudem innerhalb weniger Sekunden vollständig in Wasser auf. Durch einen Tempersschritt sollte das Ti-O-Netzwerk stärker vernetzt werden, wodurch die Fasern stabiler und auch weniger löslich in Wasser werden sollten. Dies ist beispielsweise eine gängige Methode zum Aushärten von Sol-Gel-Schichten.^[141-142]

Das Tempern der LA8-Fasern erfolgt bei 170 °C. Diese Temperatur liegt in einer TGA-Messung unter synthetischer Luft zwischen der ersten und zweiten Massenverluststufe (Abb. 18). Für die Temperversuche wurde das Material für verschiedene Zeitspannen in einem Umluftofen getempert. Die Faserform bleibt während des Temperns bestehen; lediglich die Farbe des Materials ändert sich von farblos bis braun.

Strukturelle Änderungen der Faser während des Temperns können über FTIR-Spektroskopie verfolgt werden. Abb. 39 zeigt FTIR-Spektren von LA8-Fasern nach verschiedenen Temperintervallen bei 170 °C. Die Zeitspannen betragen 1, 3, 5, 7 Stunden und 1, 2, 5, 6, 7 Tage.

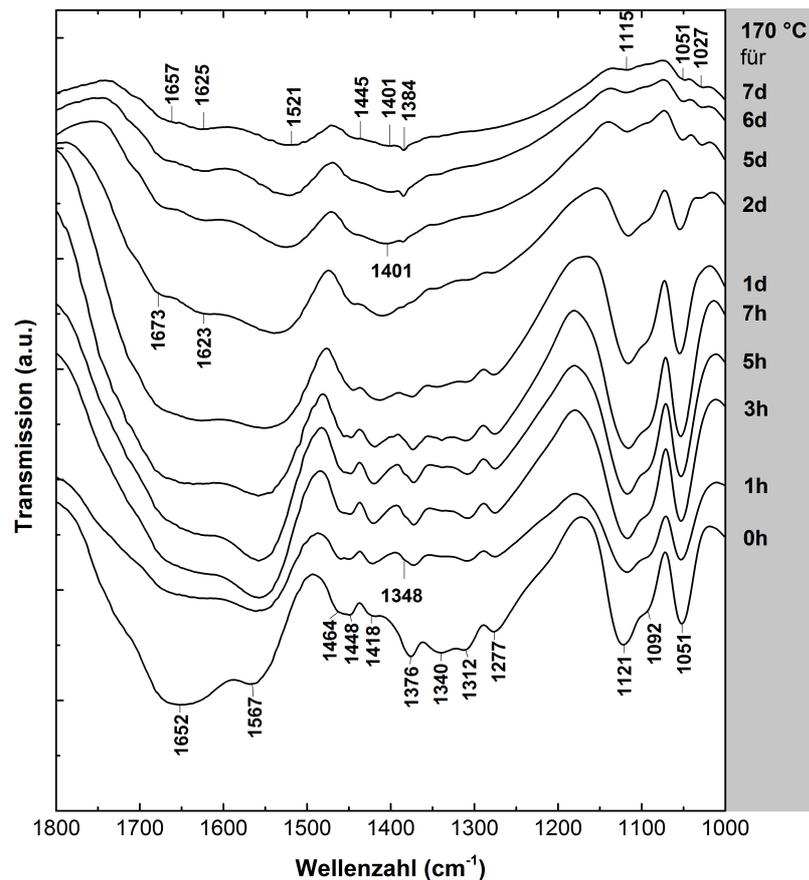


Abb. 39 : FTIR-Spektren von LA8-Fasern, die für verschiedene Zeitspannen bei 170 °C im Umluftofen getempert wurden.

Zwischen dem Spektrum der ungetemperten Faser und dem Spektrum der für sieben Tage bei 170 °C getemperten Faser können eindeutige Unterschiede erkannt werden. Die Bandenpositionen bei 1652 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} , 1121 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} und 1051 cm^{-1} bleiben auch während des Temperns konstant bzw. werden nur minimal verschoben. Die Banden bei 1652 cm^{-1} ($\nu_{as}(\text{COO}^-)$), 1121 cm^{-1} ($\rho(\text{CH}_3) + \nu_{AL}(\text{C}_\alpha\text{-O})$), 1092 cm^{-1} und 1051 cm^{-1} ($\nu_{AL}(\text{C}_\alpha\text{-O})$) stellen die Intensivsten von monodentat koordiniertem Lactat dar. Die Schwingungsbande bei 1448 cm^{-1} ist auf die asymmetrische Deformationsschwingung $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ von Ethoxygruppen zurückzuführen. Ein weiteres Anzeichen für Ethoxygruppen ist die Schwingungsbande bei 1348 cm^{-1} . Sie ist $\delta_s(\text{CH}_3)$ in Ethoxyresten zuzuordnen^[129] und lässt sich erst ab 1 h Temperaturbehandlung als Schulter detektieren und wächst mit steigender Temperaturdauer zu einer klaren Schwingungsbande heran. $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ und $\nu_s(\text{COO}^-)$ von bidentat koordiniertem Lactat verschieben sich während des Temperns hin zu niedrigeren Wellenzahlen. Nach sieben Tagen Temperaturbehandlung liegen sie bei 1521 cm^{-1} und 1401 cm^{-1} . Somit beträgt deren Differenz Δ_{as-s} 120 cm^{-1} , was auf eine bidentate Chelatisierung eines Carboxylats hindeutet. Alle weiteren Lactat-typischen Schwingungsbanden wie $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ bei

1464 cm^{-1} , $\delta_{AL}(\text{OH})$ bei 1376 cm^{-1} oder $\delta(\text{CH})$ bei 1312 cm^{-1} und 1277 cm^{-1} sind nach siebentägigem Tempern nicht mehr erkennbar.

In einer Studie von Chen *et al.*^[49] werden Umlagerungsprozesse von auf TiO_2 -Oberflächen adsorbierten Lactat-Molekülen untersucht. Unter oxidativen Bedingungen und einer Oberflächentemperatur von ca. 250 °C wird Lactat zu Propionat und kleineren Anteilen an Acetat umgelagert.

Um diesen Effekt zu prüfen wurden auch Spinnmassen mit Essigsäure (AA : Ti = 0,25) und Propionsäure (PA : Ti = 1) synthetisiert, die auch zu Fasern versponnen wurden. Die FTIR-Spektren von AA7- und PA2-Fasern zeigt Abb. 40.

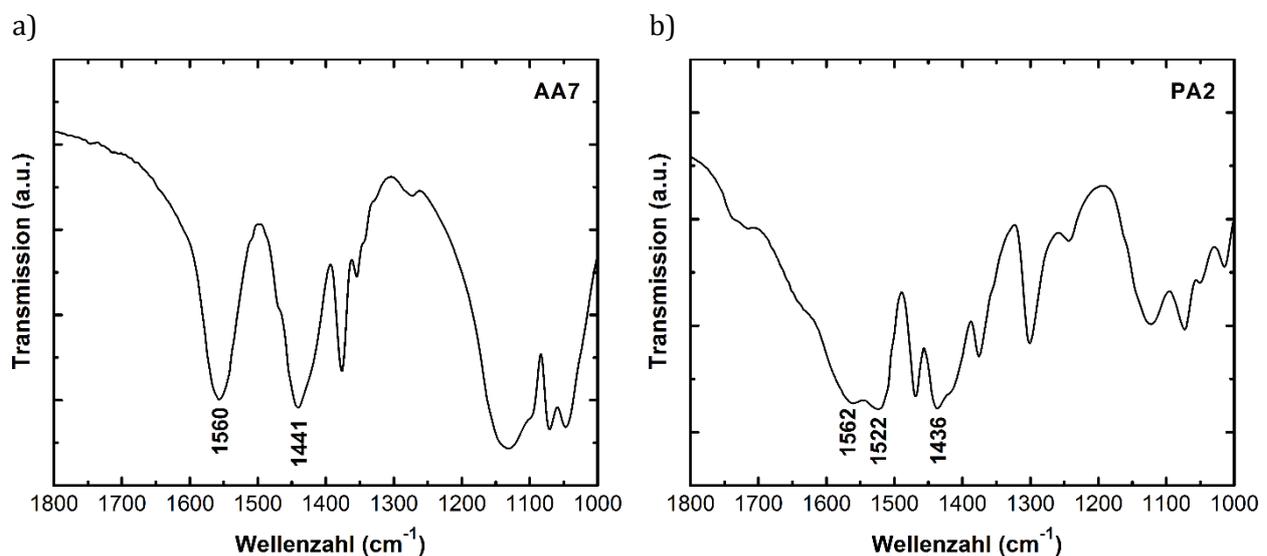


Abb. 40 : FTIR-Spektren a) einer AA- und b) einer PA-Faser.

Sowohl das FTIR-Spektrum der AA7-, als auch der PA2-Faser zeigen für $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ und $\nu_s(\text{COO}^-)$ im gleichen Bereich, wie die für 7 d bei 170 °C getemperte LA8-Faser. Die Hinweise von Chen *et al.*^[49], dass während der Umlagerung mehr Propionat als Acetat entsteht, könnten auch mit der Temperreihe der LA8-Faser übereinstimmen. Die sehr breite Schwingungsbande der für 7 d getemperten LA8-Faser hat im FTIR-Spektrum eine Bande bei 1521 cm^{-1} ; hier hat auch die PA2-Faser ihre stärkste Bande für $\nu_{as}(\text{COO}^-)$.

Doeuff *et al.*^[143] beschreibt ein Xerogel, welches aus einem Sol aus $\text{Ti}(\text{OBU})_4$ und Essigsäure synthetisiert wurde und bei 80 °C getrocknet wurde. Auch hier werden Schwingungsbanden von koordiniertem Acetat bei 1555 cm^{-1} und 1445 cm^{-1} identifiziert.

Um eine klare Aussage über die Umlagerung zu einer Säure zu erhalten wurde mit der für 7 d bei RT getemperten Probe einer ^{13}C -MAS-NMR-Untersuchung durchgeführt (Abb. 41). Hier können insgesamt zwei Peaks (183,3 und 23,1 ppm) detektiert werden. Dies bestätigt die Umlagerung zu

einem Carboxylat mit einem C₂-Körper. Die Reaktion von Essigsäure mit Ti(OⁱPr) zeigt Signale bei der gleichen chemischen Verschiebung.^[144] Demzufolge wird Lactat in der Faser während des Temperns über 7 d bei 170 °C zu Acetat umgelagert.

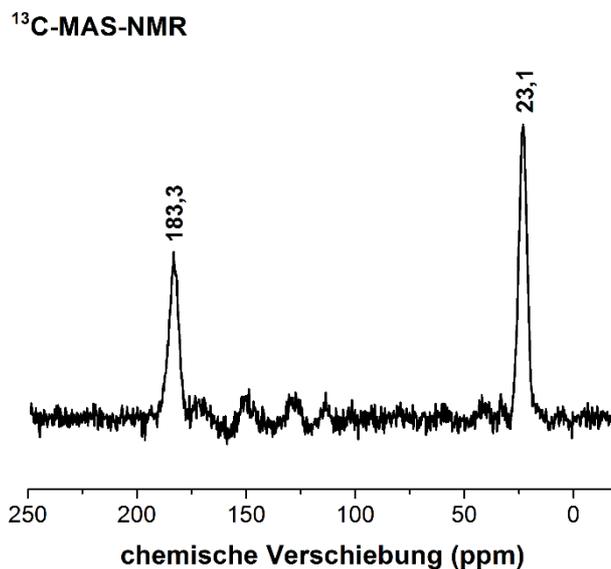


Abb. 41 : ¹³C-MAS-NMR-Spektrum einer LA8-Faser, die für 7 d bei 170 °C getempert wurde.

Auch die Faser LA8_NH₄⁺ wurde für verschiedene Zeitintervallen bei 180 °C getempert und FTIR-spektroskopisch untersucht. Abb. 42 zeigt FTIR-Spektren von Fasern, die für verschiedene Zeitintervalle bei 170 °C analog zu der in Abb. 40 beschriebenen Versuchsreihe mit der Faser LA8 in einem Umluftofen getempert wurden.

Die NH₄⁺-Schwingung bei 1400 cm⁻¹ nehmen schon nach 1 h Temperzeit deutlich ab. Nach dieser Zeit spaltet sich das Signal von $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ in zwei Signale auf. Diese Bandenpositionen liegen bei ca. 1652 und 1567 cm⁻¹ und entsprechen den gleichen Positionen wie bei der Faser ohne Ammoniumionen (LA8). Während des Temperns ändern sich die Schwingungsbanden analog zu dem Versuch in Abb. 39 und es können die für Ethoxy-Gruppen typischen Schwingungsbanden (1027 und 1051 cm⁻¹) und die breiten Schwingungen für $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ und $\nu_s(\text{COO}^-)$, die ebenfalls in Bereich von Propionat und Acetat liegen, ausgemacht werden.

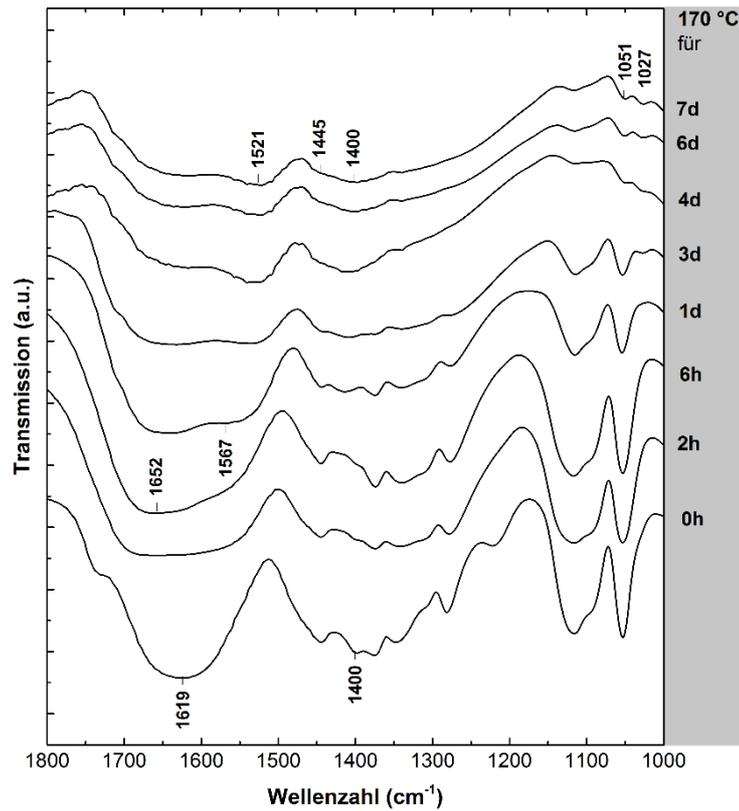


Abb. 42 : FTIR-Spektren von LA8_NH₄⁺-Fasern, die für verschiedene Zeitspannen bei 170 °C im Umluftofen getempert wurden.

Die Faser mit Chitosan als Gegenion (LA8_CHI) wurde ebenfalls bei 170 °C getempert. In Abb. 43 ist eine TGA- und eine DSC-Untersuchung des verwendeten Chitosans gezeigt.

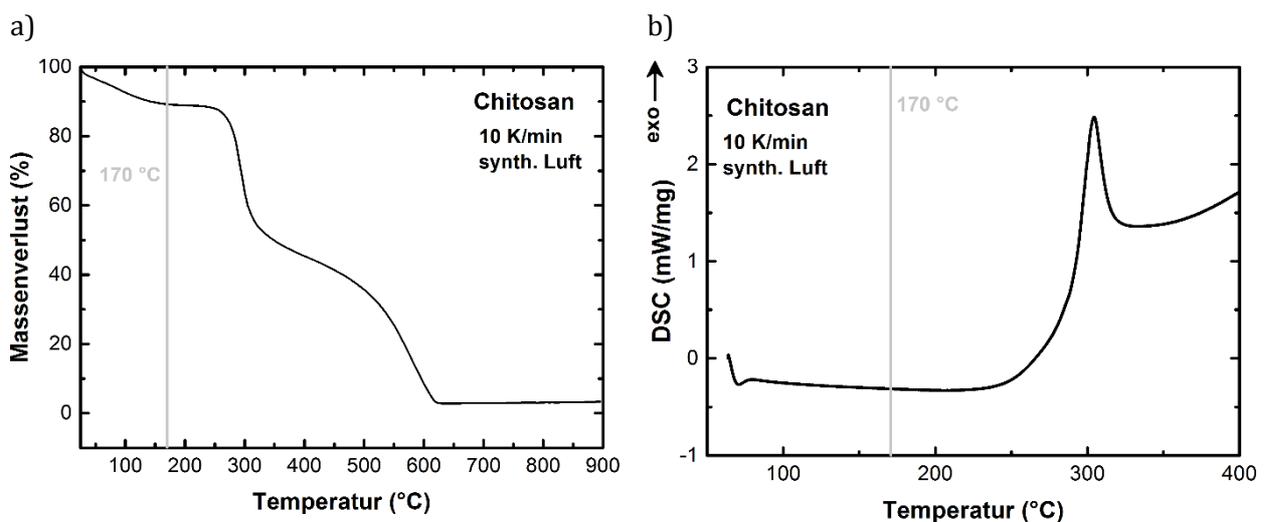


Abb. 43 : a) TGA-Messung und b) DSC-Messung von Chitosan unter synthetischer Luftatmosphäre. Die Aufheizrate beträgt 10 K/min.

Die TGA-Kurve von Chitosan zeigt insgesamt drei Massenverluststufen mit einem m_{Rest} bei $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ von 3 %. In der ersten Massenverluststufe (RT - $170\text{ }^{\circ}\text{C}$) werden physikalisch adsorbierte und durch Wasserstoffbrückenbindungen stärker angebundene Wassermoleküle desorbiert.^[145] Die Zersetzung von Chitosan startet bei einer Temperatur von ca. $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, so dass im Temperaturintervall von 170 - ca. $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ kein Massenverlust vorliegt. Dies wird durch die DSC-Messung bestätigt. Auch hier beginnt erst ab einer Temperatur von $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ der erste exotherme Zersetzungsprozess, der Deacetylisierungsprozessen und der Spaltung von glykosidischen Bindungen zuzuordnen ist.^[145-146]

Demzufolge kann das Tempern der LA8_CHI-Faser im Umluftofen auch bei $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden ohne das Biopolymer Chitosan zu zersetzen.

Das FTIR-Spektrum von LA8_CHI (Abb. 44) ist abgesehen von einer kleinen Bande ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) unkoordinierter Milchsäure bei 1735 cm^{-1} identisch mit dem Spektrum von LA8. Der Chitosan-Gehalt der Faser liegt bei 0,25 m% bezogen auf den LA-Gehalt und kann im FTIR-Spektrum nicht abgebildet werden. Die Umlagerung in der Faser zu koordinierten Monocarboxylaten (Acetat oder Propionat) kann wiederum mit den Schwingungsbanden bei 1532 und 1445 cm^{-1} detektiert werden. Ebenfalls können auch die Schwingungen der Ethoxy-Gruppen bei 1051 und 1027 cm^{-1} nachgewiesen werden. Auffallend ist, dass dieser Umlagerungsprozess bereits nach 3 d bei $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ beendet ist.

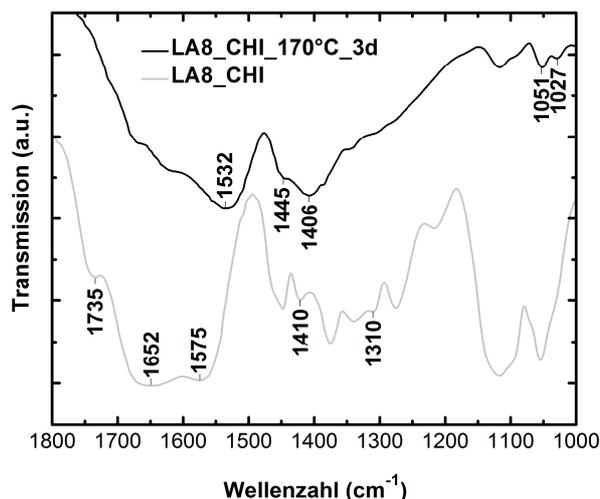


Abb. 44 : FTIR-Spektren von LA8_CHI (graue Linie) und LA8_CHI, die für 3 d bei $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Umluftofen getempert wurde (schwarze Linie).

Aufgrund des schnelleren Umlagerungsprozesses bei LA8_CHI wurde neben den TGA- und DSC-Messungen nochmals geprüft, ob sich Chitosan während des Temperns zersetzt. Hierzu wurde Chitosan für 3 d im Umluftofen bei 170 °C getempert und ein ^{13}C -MAS-NMR-Spektren vor und nach dem Temperschnitt aufgenommen (Abb. 45).

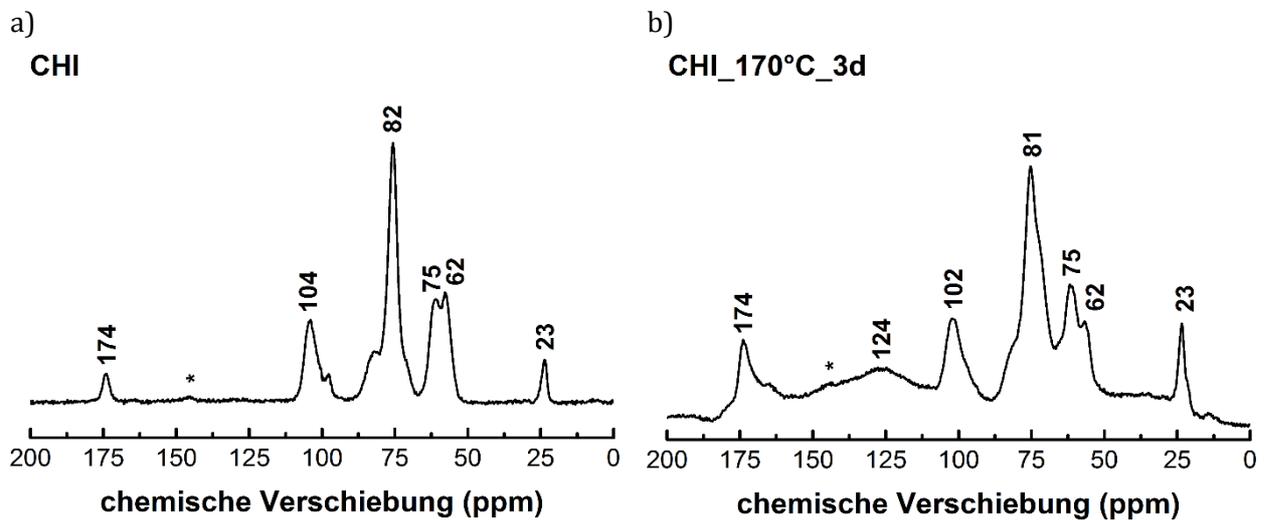


Abb. 45 : ^{13}C -MAS-NMR-Spektren von a) Chitosan und b) Chitosan, das für 3 d bei 170 °C im Umluftofen getempert wurde. Der Peak der Rotationsschwingungsbanden ist mit (*) markiert.

Die ^{13}C -MAS-NMR-Spektrum von Chitosan, das über 3 d getempert wurde, zeigt die gleichen Peaks wie das Spektrum des ungetemperten Chitosans und ist mit der Literatur übereinstimmend.^[147-148] In der getemperten Probe kann zusätzlich ein breites Signal bei 124 ppm detektiert werden, was der Entstehung von amorphem Kohlenstoff zuzuordnen ist.^[149-151] Dies geht mit der TGA-Messung des reinen Chitosans konform. Der verbleibende Wert von 3 % in m_{Rest} kann hier auch dem von Hersteller angegebenen Aschegehalt darstellen. Der Hersteller gibt den Aschegehalt mit ca. 1 m% an.

Da die Struktur des Biopolymers Chitosan während der Tempervorgangs intakt bleibt, wurde von dieser Faser Zytotoxizitätstests in Anlehnung an DIN ISO 10993-5 durchgeführt. Die Ammoniumhaltige Faser (LA8_NH₄⁺), die für 7 d bei 170 °C getempert wurde, wurde ebenfalls getestet. Die Inkubationszeit der Fasern und die Kultivierungsdauer mit L929-Zellen betrug jeweils 24 h.

Die Ergebnisse der WST-1-Assays sind in Abb. 46 dargestellt.

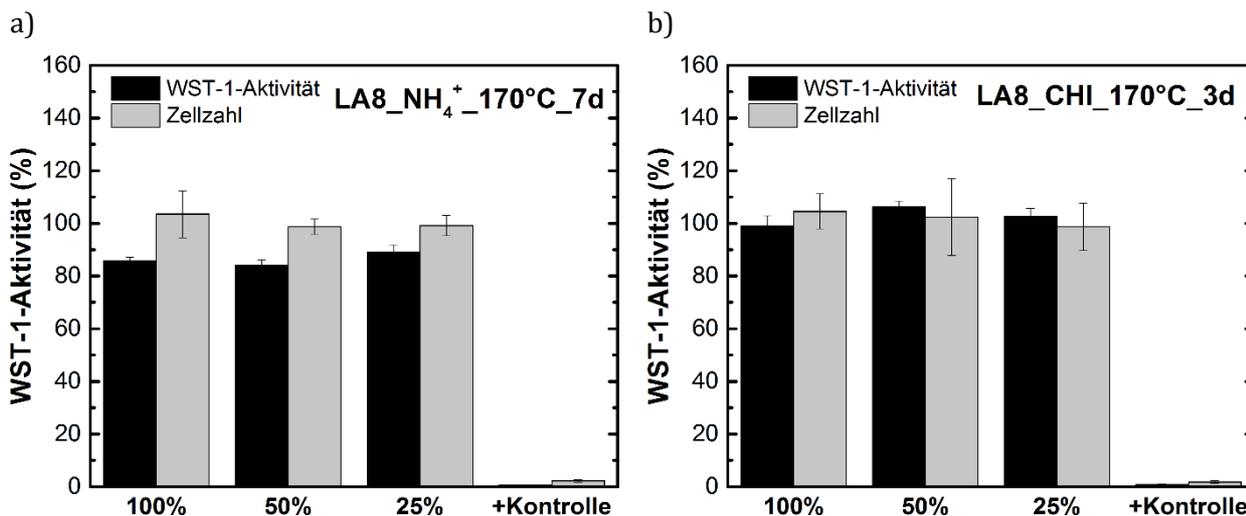


Abb. 46 : WST-1-Aktivität und Zellzahl der Extrakte (100 %, 50 % und 25 %) a) der für 7 d bei 170 °C getemperten LA8_NH₄⁺-Faser und b) der für 3 d bei 170 °C getemperten LA8_CHI-Faser. Alle Ergebnisse sind bezogen auf die Negativkontrolle.

Alle Extrakte der beiden Fasersysteme zeigen Werte von ≥ 81 %. Bei LA8_NH₄⁺ liegen die Werte der WST-1-Aktivität stets zwischen 81 und 90 %; die Werte der Zellzahl bei ca. 100 %. Bei der Chitosan-haltigen Faser liegen alle Werte bei ca. 100 %. Demzufolge scheint Chitosan einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation und -aktivität zu haben.

Wie die Degradationsprofile zeigen (Abb. 47) werden aus beiden Fasern keine Stoffe herausgelöst, die einen gravimetrisch bestimmbaren Massenverlust der Fasern anzeigen. Die Kurve im Degradationsprofil zeigt einen linearen Verlauf bei 100 %. In keinen der erhaltenen Extrakte konnten über GC-Messungen flüchtige Substanzen identifiziert oder nach Gefriertrocknung des Eluats ein Rückstand erhalten werden.

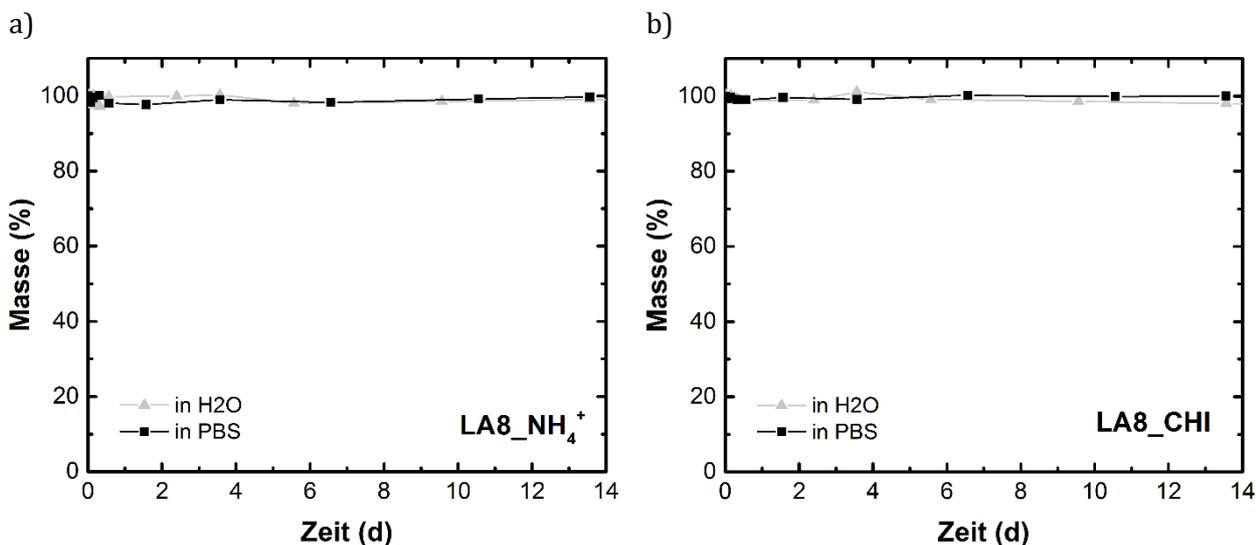


Abb. 47 : Degradationsprofile a) der LA8_NH₄⁺-Faser und b) der LA8_CHI-Faser über 14 d in Wasser und PBS.

Dennoch zeigen die Zytotoxizitätstest, dass es von Vorteil ist, Chitosan in die Faser zu integrieren.

Auf den für 7 d bei 170 °C getemperten LA8_CHI-Fasern wurden auch Zellbesiedlungsversuche über einen Zeitraum von 7 d mit vier verschiedenen Zelllinien – Mausfibroblasten (L929), Endothelzellen (16HBE), Chondrozyten (HTB94), Osteoblasten (MG63) – durchgeführt (Abb. 48).

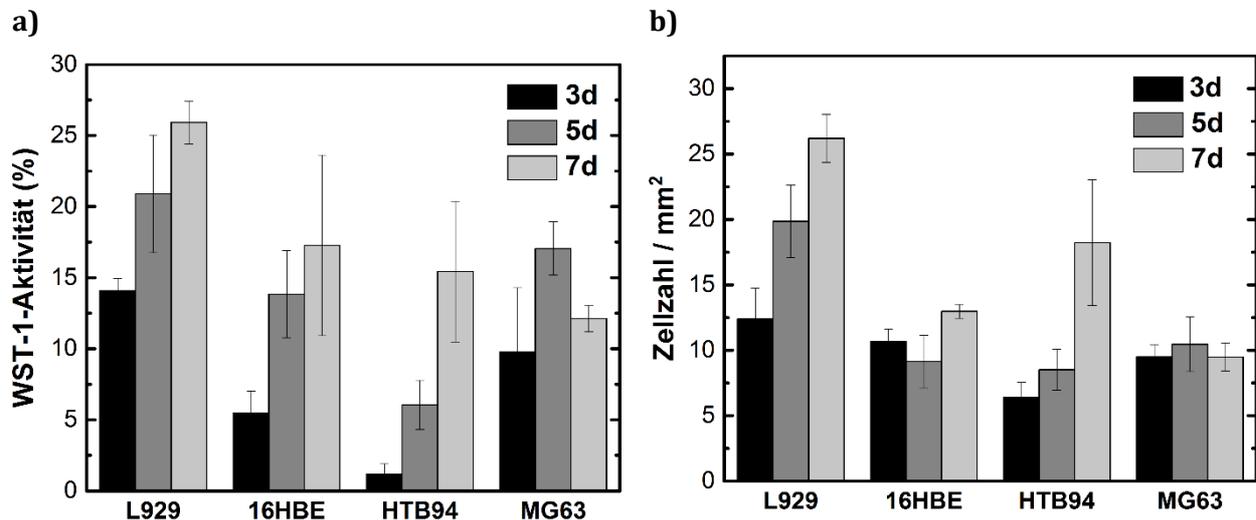


Abb. 48 : Zellbesiedlungsversuche auf für 7 d bei 170 °C getemperten LA8_CHI-Fasern. Dafür wurden die Zelllinien L929 (Mausfibroblasten), 16HBE (Endothelzellen), HTB94 (Chondrozyten) und MG63 (Osteoblasten) auf den Fasern ausgesät und über einen Zeitraum von 7 d kultiviert. An den Tagen 3, 5 und 7 wurde a) die WST-1-Aktivität und b) die Zellzahl der auf den Fasern adhärenierten Zellen bestimmt. Die Werte sind jeweils auf die Negativkontrolle (Zellen in Well ohne Fasern) bezogen.

Die prozentualen Werte in Abb. 48 können nur als Vergleichswert herangezogen werden, ob die Aktivität bzw. die Zellzahl über die Kultivierungsdauer der Zellen ansteigt, sinkt oder stagniert. Denn in der Negativkontrolle konnte kein faserförmiges Referenzsystem mit gleicher Maschenweite und gleichem Faserdurchmesser wie die zu testenden Proben verwendet, sondern nur die zwei-dimensionalen Böden der Well-Platten herangezogen werden. Demnach war die Initialbesiedlung in der Negativkontrolle um ein Vielfaches höher. Beim Aussäen der Zellen auf Fasern können diese durch die Maschen der Faserprobe auf den Well-Boden fallen, was zu einer niedrigen Initialbesiedlung auf den Fasern führt. Die nicht an Fasern adhärenierten Zellen wurden vor der Bestimmung der WST-1-Aktivität und der Zellzahl entfernt.

Die WST-1-Aktivität steigt bei den Zelllinien L929, 16HBE und HTB94 stetig über die drei Messtage hinweg an. Die Zelllinie MG63 zeigt über den Versuchszeitraum keinen signifikanten Anstieg in der WST-1-Aktivität.

Ein ähnlicher Trend lässt sich auch bei der Bestimmung der Zellzahl erkennen. Die Zelllinien L929 und HTB94 proliferieren über den Versuchszeitraum; die Zellzahl von 16HBE zeigt einen sehr geringen Anstieg an Tag 7 und MG63 zeigt keine Proliferation über 7 d.

Nach 3 d Kultivierungsdauer wurden zusätzlich von den besiedelten Fasern immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abb. 49) und Aufnahmen unter dem ESEM (Abb. 50) durchgeführt.^[152] In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde der Zellkern mit dem DNA Farbstoff Hoechst (blau) und die Mikrotubuli im Zytoskelett mit dem Farbstoff Cy3 (rot) angefärbt.

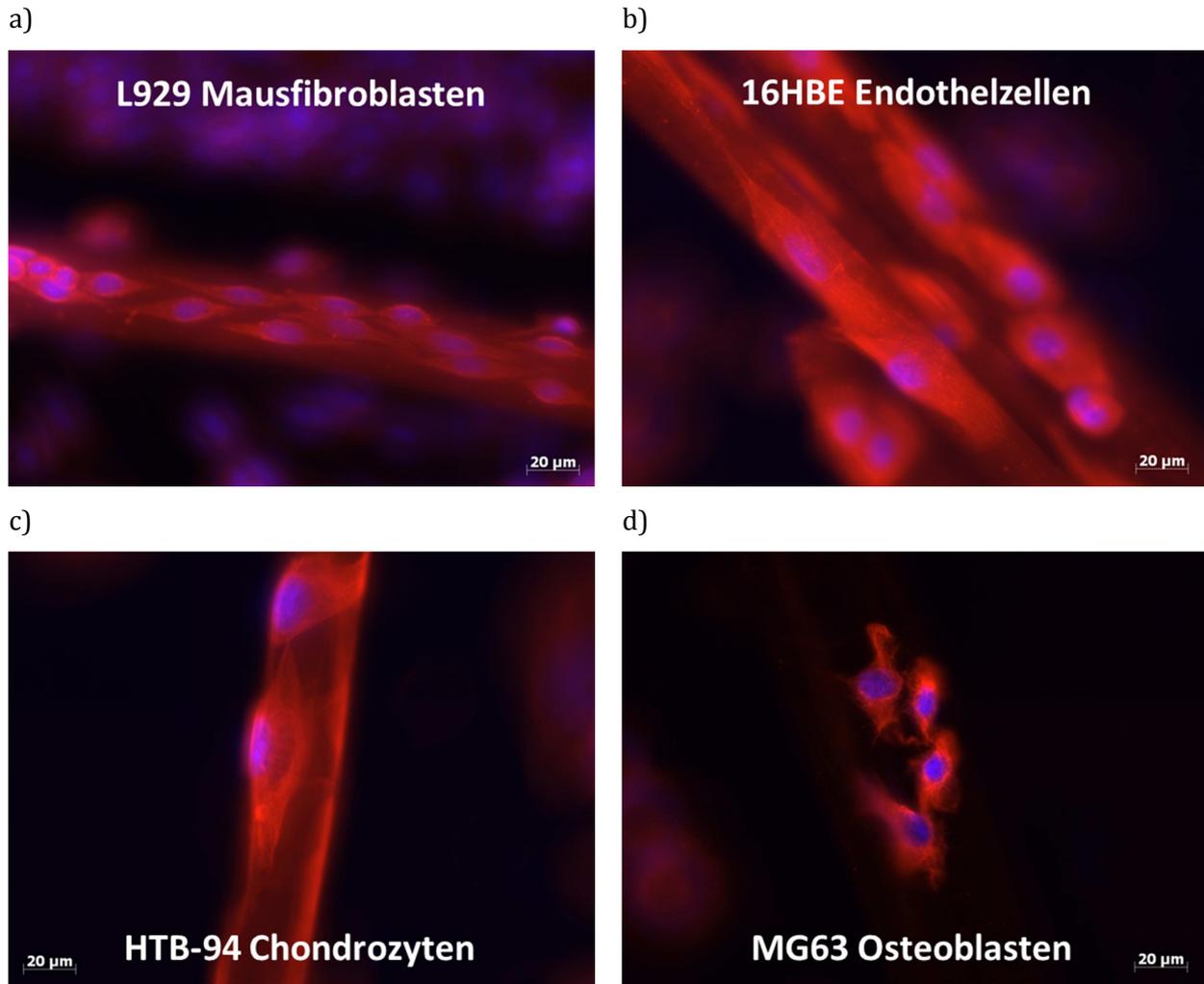


Abb. 49 : Aufnahmen angefarbter Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop von a) Mausfibroblasten (L929), b) Endothelzellen (16HBE), c) Chondrozyten (HTB94) und d) Osteoblasten (MG63) auf LA8_CHI-Fasern, die vorher für 3 d bei 170 °C getempert wurden. Jede Zelllinie wurde für 3 d auf den Fasern kultiviert. blau: Zellkern; rot: Mikrotubuli des Zytoskeletts.

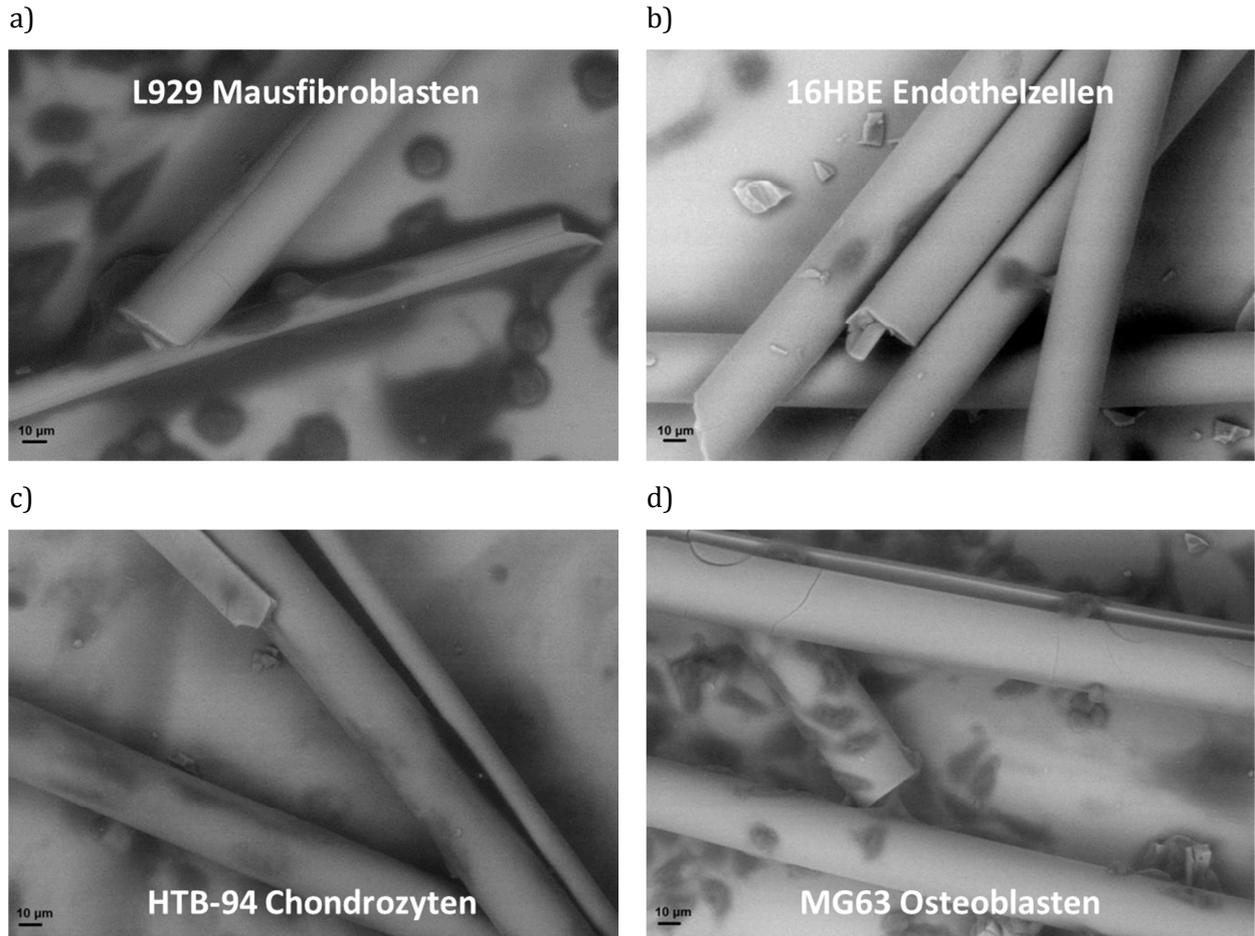


Abb. 50 : ESEM-Aufnahmen von a) Mausfibroblasten (L929), b) Endothelzellen (16HBE), c) Chondrozyten (HTB94) und d) Osteoblasten (MG63) auf LA8_CHI-Fasern, die vorher für 3 d bei 170 °C getempert wurden. Jede Zelllinie wurde für 3 d auf den Fasern kultiviert.

Die Aufnahmen beider bildgebenden Methoden zeigen die Adhäsion aller Zelllinien auf der getemperten LA8_CHI-Faser. Vor allem in den Immunfluoreszenz-Färbungen kann eine vitale, ausgestreckte Morphologie aller Zelltypen erkannt werden. Unter dem ESEM erkennt man eine höhere Tiefenschärfe und sieht zudem auch die Zellen auf dem Glasobjektträger. Ein Vergleich dieser Zellen mit den auf den Fasern adhären Zellen zeigt, dass sie sich in ihrer Morphologie nicht ändern. Dementsprechend können auch hier die Zellen als vital eingestuft werden. Die Chondrozyten strecken sich sehr flach aus und können unter dem ESEM nur als Schatten detektiert werden.

Vor allem die Zelllinie L929 zeigt eine hohe Proliferationsrate und die Zellen besiedeln das komplette Scaffold und erstrecken sich von Faser zu Faser (vgl. Abb. 51).

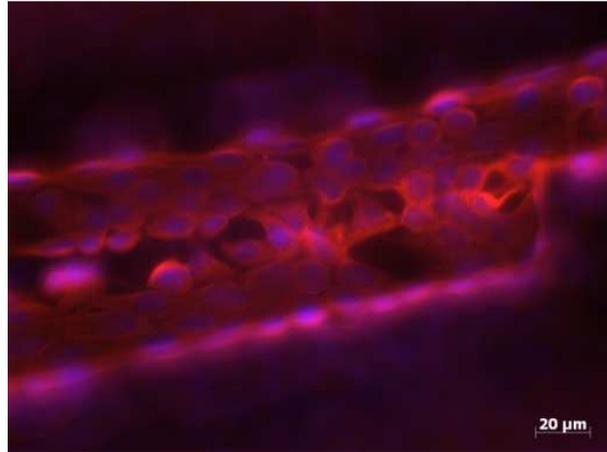


Abb. 51 : L929-Zellen auf getemperten LA8_CHI_Fasern. Der Zellkern ist blau eingefärbt; das Zytoskelett der Zellen in Rot.

Diese Ergebnisse gehen mit dem aktuellen Stand der Technik in der Literatur konform. Hier wurde bereits TiO_2 mit Chitosan zu einem Biomaterial kombiniert. Beispielsweise wurde gezeigt, dass ein poröses TiO_2 /Chitosan-Scaffold keinen toxischen Effekt auf Zellen der Zelllinien L929 und MG63, sowie auf humane mesenchymale Stammzellen haben.^[153] Ein weiteres Material – basierend auf TiO_2 , Chitosan und Pektin – zeigte ebenfalls bei der Zelllinie L929 keine Zytotoxizität.^[154] Die in dieser Arbeit erstmalig gezeigte Prozessierung eines Chitosan/ TiO_2 -haltigen Materials zu Mikrofasern ermöglicht den Einsatz dieses Hybridmaterials u. a. im Tissue Engineering.

2) Verwendung weiterer α -Hydroxycarbonsäuren für die Herstellung eines TiO_2 -basierten faserförmigen Zellträgermaterials

Die These, dass in den Fasern wenig untereinander vernetzte Titan-oxo-carboxo-Cluster vorliegen, wird in diesem Kapitel zum einen näher untersucht. Zum anderen werden Fasern mit anderen Säuren als Milchsäure betrachtet. Dies soll Einfluss auf die intermolekularen Wechselwirkungen der Cluster untereinander haben, was die aufgestellte Theorie verstärken könnte.

Als weitere Fasern werden die beiden α -Hydroxycarbonsäuren GA und MA verwendet. Die zugehörigen Faserformulierungen (GA05 und MA07) wurden in Anlehnung an das Fasersystem LA27 synthetisiert. GA05 und MA07 wurden aus einem Sol der Zusammensetzung von TEOT : Säure : Wasser von 1 : 1 : 2 hergestellt. Bei der Faser LA27 liegt der Gesamtwasseranteil, der sich aus dem Wasser-Gehalt der 85 %igen Milchsäurelösung und dem zusätzlich zugegebenen Wasser berechnet, bei 1,9 bezogen auf den TEOT-Gehalt.

Die Zusammensetzung der LA27, GA05 und MA07 sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7 : Überblick über die Zusammensetzung der Fasern LA27, GA05 und MA07 während der Solherstellung.

Bezeichnung	X(TEOT)	X(Säure)	X(H ₂ O)	verwendete Säure
LA27	1	1	1,9	Milchsäure
GA07	1	1	2	Glykolsäure
MA05	1	1	2	Mandelsäure

Auffallend war, dass alle in Kapitel I beschriebenen Faser-Zusammensetzungen direkt nach dem Verspinnen äußerst flexibel sind. Nach wenigen Minuten beginnen die Fasern bei RT spröde zu werden und zerfallen beispielsweise bei der Handhabung mit einer Pinzette zu einem Pulver.

Nun sollen die drei Faserarten anhand von TGA-MS-Messungen untereinander verglichen und Rückschlüsse auf deren Zusammensetzung geschlossen werden.

Abb. 52 zeigt eine TGA-Messung einer LA27-Faser direkt nach dem Verspinnen und nach Lagerung bei RT für 3 d.

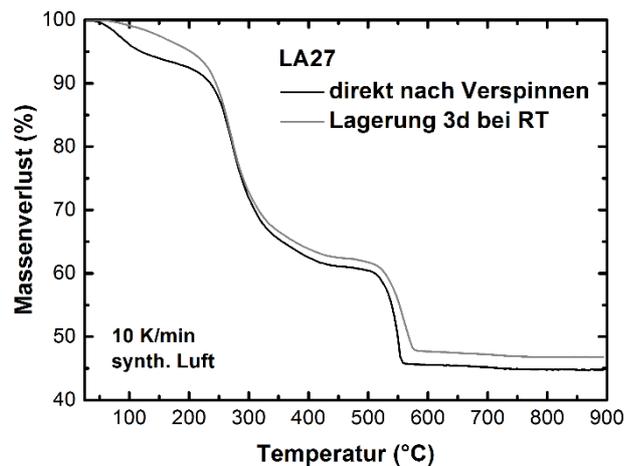


Abb. 52 : TGA-Messungen von LA27-Fasern, die direkt nach dem Verspinnen vermessen wurden (schwarze Linie) und von LA27-Fasern, die für 3 d bei RT gelagert wurden (graue Linie). Die Messungen erfolgten unter synthetischer Luftatmosphäre mit einer Aufheizrate von 10 K/min.

Es fällt auf, dass die für 3 d bei RT gelagerte Probe im Temperaturbereich von RT bis ca. 150 °C nur einen minimalen Abfall der Kurve auf 97,5 m% aufweist. Die direkt nach dem Verspinnen vermessene Probe zeigt eine Massenverluststufe mit Wendepunkt mit einem Massenverlust von 6,1 m%. Der restliche Verlauf der TGA-Kurven ist identisch, wobei die Kurve der direkt vermessenen Probe stets ungefähr um die Differenz der beiden Kurven aus der ersten

Massenverluststufe nach unten verschoben ist (um ca. 3,6 m%). Die prozentualen Massenverluste für jede Massenverluststufe sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Diese Werte sind nahezu identisch.

Tabelle 8 : Zusammenfassung der Massenverluststufen der Proben LA27_RT_0d und LA27_RT_7d während einer TGA-Messung unter synthetischer Luftatmosphäre.

MV	Temperaturbereich (°C)	Massenverlust	
		LA27_RT_0d (m%)	LA27_RT_7d (m%)
1	RT - 150	(2,5)	6,1
2	150 - 460	33,4	34,7
3	460 - 900	16,3	15,6

Dies deutet darauf hin, dass direkt nach dem Verspinnen noch flüchtige Lösungsmittel in der Faser vorliegen. Während der Lagerung scheinen diese Lösungsmittelreste zu großen Teilen zu evaporieren.

Dies konnte mittels MS-Messungen während der TGA-Messungen aus Abb. 52 nachgewiesen werden (Abb. 53). In diesem Temperaturbereich konnten nur m/z-Fragmente von Wasser (m/z = 17 (OH⁺), 18 (H₂O⁺)) und keine Fragmente von Ethanol nachgewiesen werden. Sowohl der Ionenstrom von m/z = 17, als auch von m/z = 18 ist in der direkt nach dem Verspinnen vermessenen Probe höher. Dies spricht für eine Desorption von Wasser während einer Lagerung bei RT.

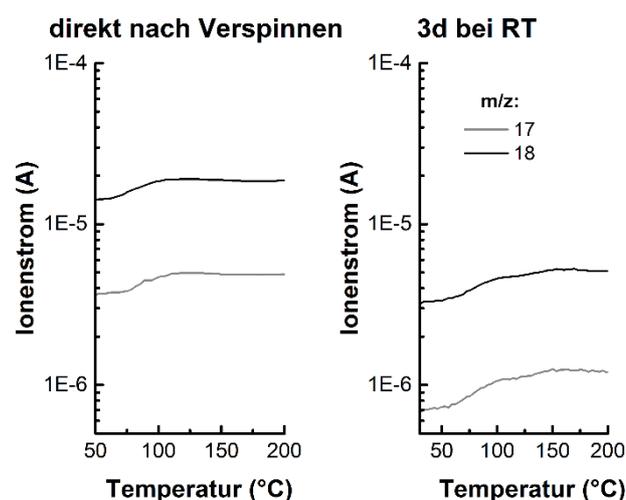


Abb. 53 : Über MS detektierte Ionenströme der Massenfragmente m/z = 17 (graue Linie) und 18 (schwarze Linie) während einer TGA-MS-Messung der LA27-Faser, die direkt nach dem Verspinnen vermessen wurde (links), und einer LA27-Faser, die vor der Messung für 3 d bei RT gelagert wurde (rechts). Es ist der Temperaturbereich der ersten MV in der TGA-Kurve abgebildet.

In den beiden Massenverluststufen 2 und 3 werden analog zur TGA-MS-Untersuchung des Fasersystems LA8 in Abb. 18 die m/z-Fragmente von 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 41, 42, 43, 44 und 45 detektiert. Die weiteren Massenspektren der Faser LA27 befinden sich in Anhang 2.

Um die chemische Zusammensetzung der LA27-Faser abzuschätzen wurde die Probe LA27 herangezogen, die 3 d bei RT gelagert wurde.

Vorab zu erwähnen ist, dass die Faser definitiv nicht aus einer geordneten Struktur von Titanoxo-Clustern besteht. Schließlich erhält man mit einer XRD-Messung nur einen sehr breiten Reflex bei $6^\circ 2\theta$ (vgl. Abb. 54). Vielmehr könnte es sich um eine Grundstruktur an Titanoxo-Clustern handeln, die ungeordnet in der Faser vorliegen und teilweise über Titanoxo-Brücken untereinander verknüpft sind. Eine derartige Anordnung von SiO_2 -Clustern und ein breiter Reflex bei niedrigen Winkeln liegt auch in der von Glaubitt *et al.*^[10] entwickelten Kieselgelfaser vor.

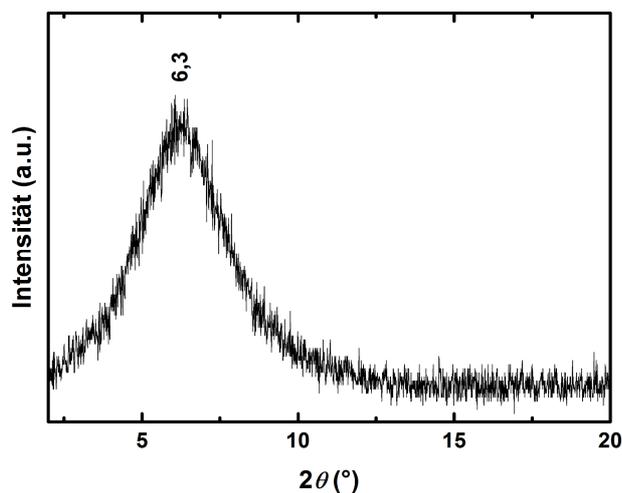


Abb. 54 : Röntgenpulverdiffraktogramm von LA27.

Anhand der TGA-Kurve der für 3 d bei RT gelagerten LA27-Faser wird die Berechnung der Faserzusammensetzung im Folgenden exemplarisch durchgeführt. Diese TGA-Kurve ist nochmals in Abb. 55 gezeigt.

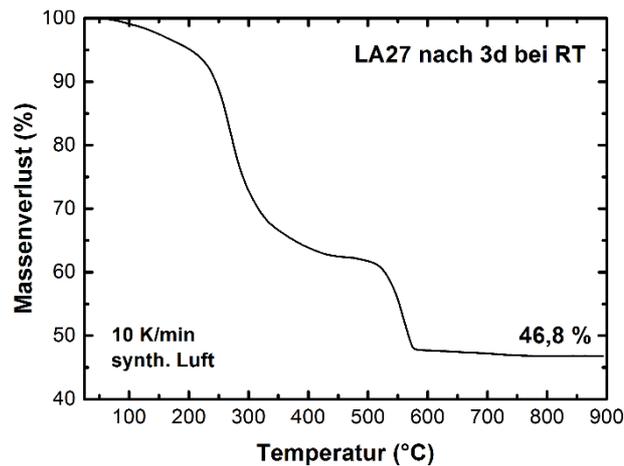


Abb. 55 : TGA-Kurve einer LA27-Faser, die für 3 d bei RT gelagert wurde. Die verbleibende Restmasse beträgt 46,8 % der Ursprungsmasse m_0 .

Die Abschätzung der Faserzusammensetzung berücksichtigt die Solzusammensetzung (TEOT : LA = 1 : 1) und die Bedingungen während der verschiedenen Prozessierungsschritte. Weder bei der Solherstellung, dem Einengen des Sols zur Spinnmasse am Rotationsverdampfer, noch während des Spinnprozesses kann Milchsäure entweichen. Dementsprechend sollte das Verhältnis von Ti : LA auch in der Faser bei 1 : 1 liegen.

Der einzige Wert, der in der TGA-Kurve eindeutig einer Verbindung zugeordnet werden kann, ist der Wert von m_{Rest} , der bei 46,8 m% liegt. Hier handelt es sich um die TiO_2 -Modifikation Rutil, die auch über XRD-Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Abb. 56). Das Diffraktogramm zeigt die für Rutil typischen Reflexe.^[155-156]

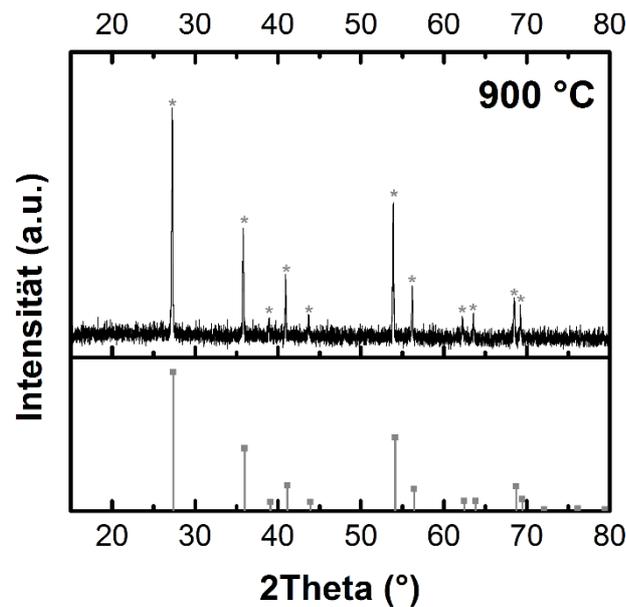


Abb. 56 : oben: XRD-Untersuchung des Rückstandes einer TGA-Messung von RT bis 900 °C der Faser LA27 unter synthetischer Luftatmosphäre; unten: Referenzdiffraktogramm von Rutil aus der RRUF-Datenbank (Downs et al. (1993) American Mineralogist 78, 1104-1107.). Der Reflex bei 27,39° 2θ entspricht im Referenzdiffraktogramm 100 %.

Ausgehend von dieser Erkenntnis kann die Ursprungsmasse m_0 der Faserzusammensetzung berechnet werden. Um die Ergebnisse aus den Rechnungen leichter mit Molekülstrukturen in Verbindung setzen zu können, wird bei der Berechnung davon ausgegangen, dass die Restmasse m_{Rest} im TGA-Tiegel bei 900 °C der molaren Masse von TiO_2 von 79,9 g/mol (= M_{TiO_2}) entspricht. M_0 entspricht daher der Masse von 1 mol der Ausgangsverbindung, $m\%_{\text{Rest}}$ dem Gesamtmassenverlust in % der TGA-Kurve im Temperaturintervall von RT bis 900 °C (hier: $m\%_{\text{Rest}} = 46,8 \%$).

$$M_0 \cdot \frac{m\%_{\text{Rest}}}{100} = M_{\text{TiO}_2} \quad \text{Formel 1}$$

$$M_0 = \frac{M_{\text{TiO}_2} \cdot 100}{m\%_{\text{Rest}}} \quad \text{Formel 2}$$

Für M_0 der Faser LA27_RT_3d kann anhand Formel 2 der Wert 171 g/mol berechnet werden. Dies bedeutet, dass 1 mol dieser Verbindung die Masse von 171 g besitzt.

Anhand Tabelle 1^[21], erkennt man, dass es nur zwei bekannte Summenformel eines Titan-oxo-carboxo-alkoxid-Clusters gibt, in der das Verhältnis von Ti : RCOO- bei 1 liegt. Dabei handelt es sich

um die viel veröffentlichte Verbindung $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{RCOO}^-)_6(\text{OR}')_6]$ mit z. B. $\text{R} = \text{Et}$ und $\text{R}' = \text{Me}$ und $[\text{Ti}_3\text{O}(\text{OR})_7(\text{OOCR}')_3]$ mit $\text{R} = i\text{Pr}$ und $\text{R}' = \text{CCl}_3$.

Die Bildung des Clusters $[\text{Ti}_3\text{O}(\text{OR})_7(\text{OOCR}')_3]$ mit LA als Carboxy-Ligand kann ausgeschlossen werden, da dieser Cluster einen für die in Abb. 55 dargestellte TGA-Messung einen zu großen organischen Anteil erhält. Bezogen auf 1 mol Ti erhält man die Summenformel $[\text{TiO}_{0,33}(\text{OR})_{2,3}(\text{LA})]$. Dieser Cluster müsste laut TGA-Messung eine M von 171 g aufweisen. Durch Einsetzen der Werte von 48 g/mol für $\text{M}(\text{Ti})$, 16 g/mol für $\text{M}(\text{O})$ und 89 g/mol für $\text{M}(\text{RCOO}^-)$ - entspricht hier Lactat) erhält man einen Wert von 142 g/mol. Demnach blieben für 2,3 mol des Alkoxyliganden nur eine Restmasse M von 29 g/mol. Allein der kleinstmögliche Rest ($\text{R} = \text{H}$) im Alkoxyliganden (OR) würde diesen Wert mit $\text{M}(\text{OR}) = 2,3 \text{ mol} \cdot 18 \text{ g} = 41,4 \text{ g/mol}$ übersteigen.

Im Fall von $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{RCOO}^-)_6(\text{OR}')_6]$ erhält man bezogen auf 1 mol Ti die vereinfachte Summenformel $\text{TiO}(\text{RCOO}^-)(\text{OR}')$, die laut der TGA-Messung von LA27 einer M_0 von 171 g entsprechen soll. Durch Einsetzen der Werte von 48 g/mol für $\text{M}(\text{Ti})$, 16 g/mol für $\text{M}(\text{O})$ und 89 g/mol für $\text{M}(\text{RCOO}^-)$ - entspricht hier Lactat) erhält man einen Wert von 153 g/mol. Dementsprechend verbleiben für $\text{M}(\text{OR}')$ ein Wert von 18 g/mol, was Hydroxy-Gruppen mit einer M von 17 g/mol sehr nahe kommt.

Die Differenz von 1 g/mol kann zum einem durch Wasserreste, die auf der Faseroberfläche adsorbieren, erklärt werden. Dies geht mit den MS-Messungen aus Abb. 53 konform, denn auch in der gelagerten Probe konnten noch Spuren an entweichendem Wasser detektiert werden. Zum anderen ist auch ein gewisser Gehalt an OEt-Gruppen am Ti-O-Cluster wahrscheinlich. In den FTIR-Studien in Abb. 16 tritt im Spektrum der Faser LA27 zumindest eine kleine Schulter bei 1384 cm^{-1} auf, die für das Vorliegen von Ethoxy-Gruppen spricht.

Des Weiteren wird die Faser aus einem sauren Sol hergestellt, das während des Prozessierens zu Fasern nicht neutralisiert wird. Nach Koordination der Milchsäure in Form von Lactat an Titan, steht insgesamt ein Proton pro Titanatom bzw. Lactatligand zur Verfügung. Im postulierten Cluster $\text{TiO}(\text{RCOO}^-)(\text{OR}')$ mit $\text{R}' = \text{H}$ beläuft sich das Verhältnis von $\text{Ti} : \text{OH}$ ebenfalls auf einen Wert von 1. Dementsprechend können auch die Hydroxy-Gruppen im Cluster protoniert vorliegen, so dass der Cluster als $\text{TiO}(\text{RCOO}^-)(\text{OR}')$ mit $\text{R}' = \text{H}_2^+$ und $\text{RCOO}^- = \text{Lactat}$ postuliert werden kann.

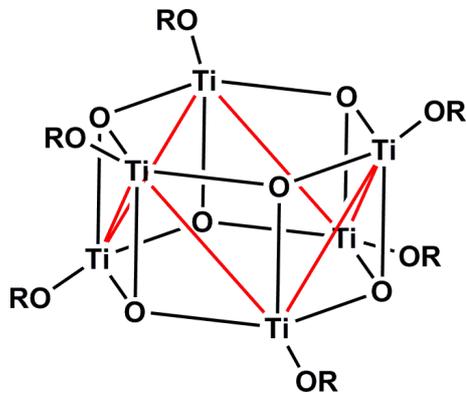
Unter Einbeziehung von Tabelle 1 könnte demnach die Summenformel eines Titanoxo-Clusters, der in der Faser vorliegt, in der protonierten Form $\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{LA})_6(\text{OH}_2^+)_6$ mit $\text{M} = 1020 \text{ g/mol}$ postuliert werden. Dies entspricht dem 6-fachen Vielzähligen von $\text{TiO}(\text{RCOO}^-)(\text{OR}')$ mit $\text{R}' = \text{H}_2^+$.

Dennoch wird davon ausgegangen, dass dieser 6-kernige Titan-oxo-carboxo-Cluster nicht in Reinform in der Faser vorliegt. Einige dieser Cluster werden vermutlich über Kondensationsreaktionen verbrückt. Aufgrund der Sprödigkeit des Materials scheint diese

Vernetzung der Cluster untereinander jedoch nicht sehr hoch zu sein. Für diese geringe Vernetzung spricht auch das Vorliegen protonierter OH-Gruppen. OH_2^+ -Gruppen können nur in Anwesenheit eines Nucleophils abgespalten werden. Das einzige der in dieser Theorie vorhandene Nucleophil stellt die α -Hydroxyeinheit von bidentat koordinierter LA dar. Eine Kondensationsreaktion mit einer Ti-OH_2^+ -Gruppe könnte zudem aufgrund sterischer Hinderung unterbunden werden. Abb. 57 zeigt schematisch den Aufbau von $\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{LA})_6(\text{OH}_2^+)_6$. Die verbrückenden Lactatliganden sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur als rote Linien dargestellt.

Die Hydroxy- bzw. protonierten Hydroxy-Gruppen zeigen im Cluster zwar nach außen, anhand der Kristallstruktur von $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OEt})_6(\mu\text{-O}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{OPh})_6]^{[157]}$ wird jedoch klar, dass diese Gruppen sterisch durch die Carboxylatliganden abgeschirmt sind (vgl. Abb. 57 b). Auch bei Lactat als Carboxylatligand kann dies ein Grund sein, warum es zu wenig Vernetzung der Cluster untereinander kommen kann.

a)



b)

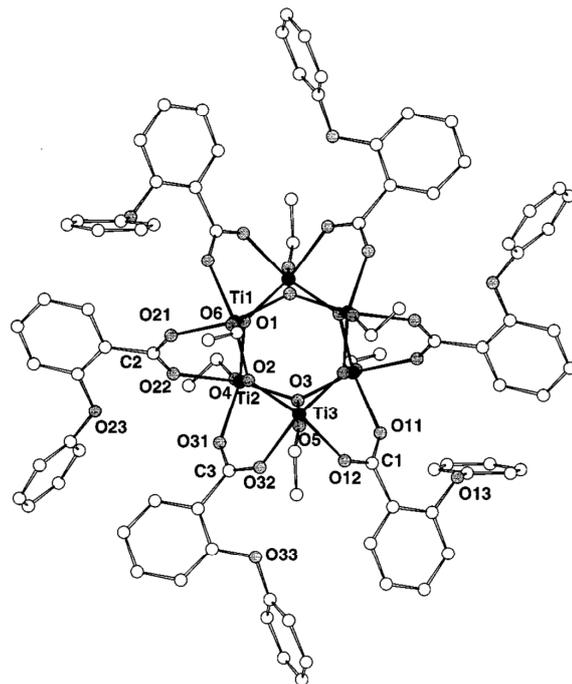


Abb. 57 : a) Schema des postulierten Titan-oxo-carboxo-Clusters $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_6(\text{LA})_6]$ mit $\text{R} = \text{H}_2^+, \text{H}, \text{Et}$ oder „ $\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_5(\text{LA})_6$ “. Die LA-Liganden sind zur besseren Übersicht lediglich als rote Striche dargestellt. b) Einkristall-Röntgenstrukturanalyse von $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OEt})_6(\mu\text{-O}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{OPh})_6]^{[157]}$. Anhand dieser Struktur wird deutlich, dass die sterisch anspruchsvollen Reste der Carboxylat-Liganden im Cluster nach außen gerichtet sind (mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry).

Titanoxo-Cluster dieser Grundstruktur können beispielsweise durch Umsetzen von TEOT mit der entsprechenden Säure gewonnen werden.^[157]

Direkt nach dem Spinnprozess sind die Fasern äußerst flexibel. Hier könnten die Cluster noch von restlichen Wassermolekülen aus der Spinnmasse umgeben sein. Sobald diese Wassermoleküle verdampfen (z. B. bei Lagerung der Fasern bei RT), beginnt die Faser zu verspröden.

Um diese These zu stärken werden die Fasern GA07 und MA05, näher untersucht. Auch hier wird die Bildung der gleichen Clusterstrukturen erwartet, die aufgrund einer unterschiedlichen Seitenkette in der Säure auf unterschiedliche Art und Weise wechselwirken müssten und somit Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Faser haben.

Das Sol der beiden Fasersysteme GA07 und MA05 wurde mit einem Verhältnis von TEOT : Säure : H₂O von 1 : 1 : 2 synthetisiert (vgl. Tabelle 7).

Die FTIR-Spektren der Fasern GA07 und MA05 (Abb. 58) zeigen keine Bande für $\nu_{as}(\text{COOH})$ einer freien Säure. Auch hier liegen beide α -Hydroxycarbonsäuren an Titan koordiniert vor. GA07 zeigt bei 1576 cm⁻¹ eine Bande für $\nu_{as}(\text{COO}^-)$.^[47] Diese Bande entspricht vermutlich $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ des bidentaten Koordinationsmodus. Die $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ der monodentaten Chelatisierung ist vermutlich analog zu den LA-Fasern von $\delta(\text{H}_2\text{O})$ überlagert. Im FTIR-Spektrum der MA05-Faser können beide $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ eindeutig identifiziert werden. Sie liegen bei 1655 und 1572 cm⁻¹.

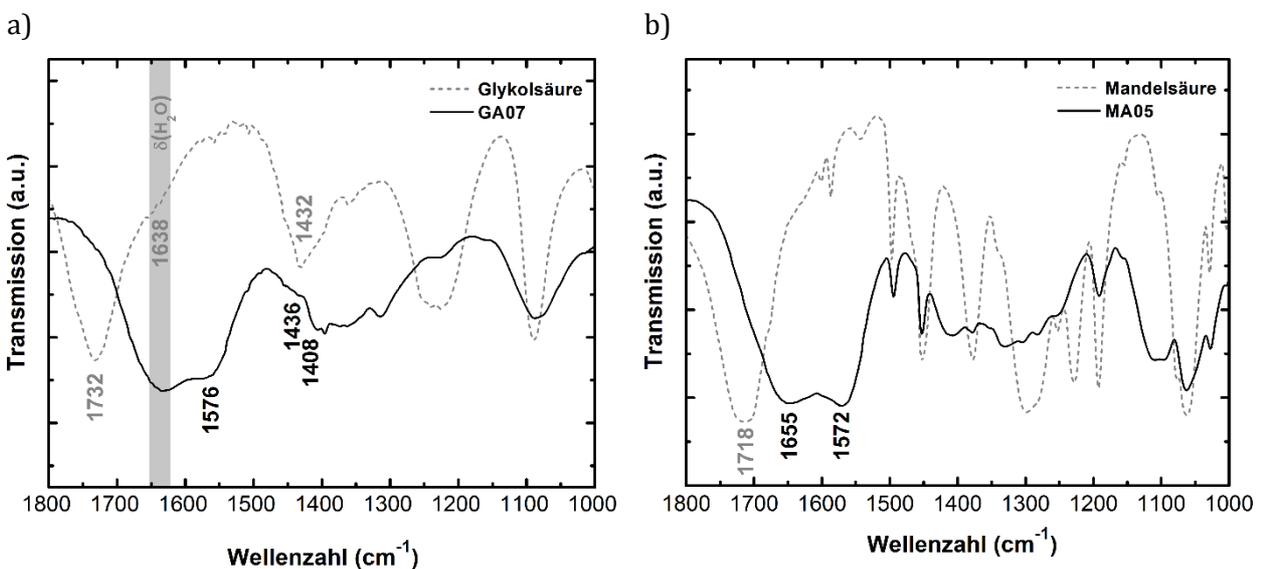


Abb. 58 : FTIR-Spektren von a) Glykolsäure (gestrichelte Linie) und der Faser GA07 (durchgezogene Linie) und b) Mandelsäure (gestrichelte Linie) und der Faser MA05 (durchgezogene Linie).

TGA-Messungen der für 3 d bei RT gelagerten Fasern GA07 und MA05 sind in Abb. 59 zu finden. Die Untersuchung von GA07 ergibt einen Wert für m_{Rest} von 51,9 %; die Untersuchung von MA05 einen Wert von 33,9 %. Auffallend ist, dass GA07 einen Massenverlust von ca. 6,5 m% im Temperaturintervall von RT bis 150 °C aufweist. Dies kann an der Zersetzung von Glykolsäure bei bereits 100 °C liegen. Beispielsweise spaltet Glykolsäure, die auf TiO₂ adsorbiert ist, Wasser bei

einer Temperatur von 100 °C ab.^[47] Eine Abgabe von Wasser ($m/z = 17$ und 18) konnte auch in TGA-MS-Messungen in diesem Temperaturbereich ermittelt werden (vgl. Anhang 3). Bei Temperaturen ab 150 °C verläuft die Kurve bei beiden Fasern wieder über zwei Massenverluststufen bis zu einem konstanten Wert – m_{Rest} . Bei 900 °C liegt schließlich wieder die TiO_2 -Modifikation Rutil vor.

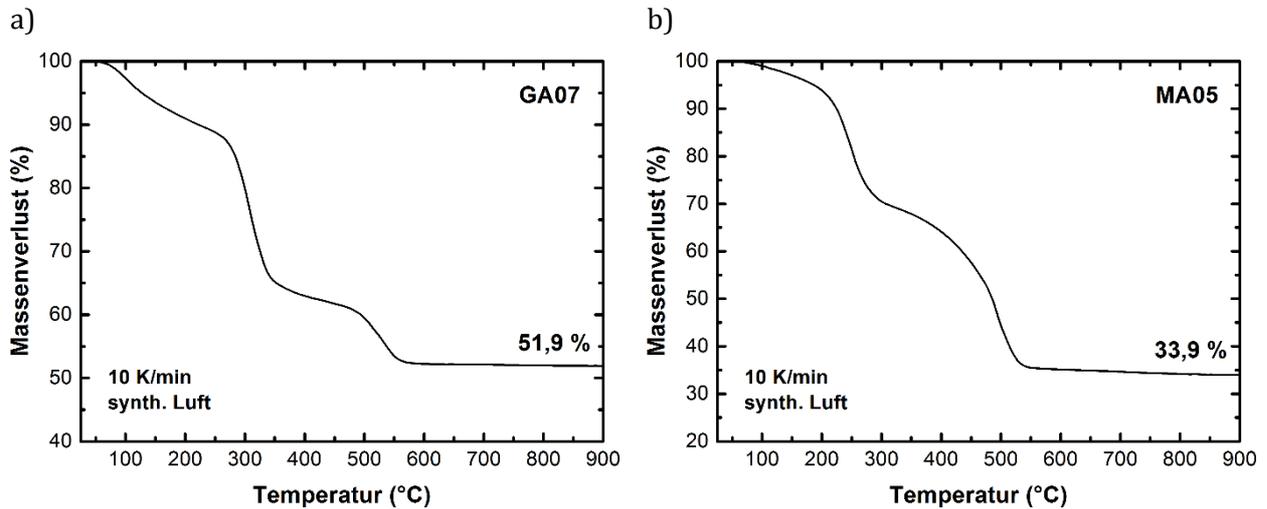


Abb. 59 : TGA-Untersuchungen unter synthetischer Luftatmosphäre mit einer Aufheizrate von 10 K/min der Fasern a) GA07 und b) MA05.

Wie TGA-MS-Untersuchungen zeigen scheinen auch hier die Säuren analog zu der LA-Faser ab ca. 150 °C zu einem Alkoxid zu zerfallen (vgl. Anhang 4). Ab ca. 300 bzw. 350 °C beginnt eine neue Massenverluststufe, bis sich letztendlich Rutil bildet.

Anhand von Formel 2 kann wiederum die Ursprungsmasse m_0 bzw. M_0 bestimmt werden. Bei der Faser GA07 liegt M_0 bei 154 g/mol; bei der Faser MA05 bei 236 g/mol.

Unter der Annahme der Bildung des Titanoxo-Clusters $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{RCOO}^-)_6(\text{OH}_2^+)_6]$ bzw. bezogen auf 1 Mol-Äquivalent Titan $[\text{TiO}(\text{RCOO}^-)(\text{OH}_2^+)]$ ergibt sich im Fall von GA07 ein Wert für M_0 von 157 g/mol und im Fall von MA05 ein Wert für M_0 von 233 g/mol. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 : Vergleich der anhand der postulierten Summenformel berechneten molaren Masse für $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{RCOO}^-)_6(\text{OH}_2^+)_6]$ und der nach Formel 2 anhand der TGA-Messungen errechneten M_0 . Die Daten sind für die Fasersysteme LA27, GA07 und MA05 gezeigt.

Faser	$M_0[\text{TiO}(\text{RCOO}^-)(\text{OH}_2^+)]$ (g/mol)	M_0 nach Formel 2 (g/mol)	verwendete Säure
LA27	171	171	Milchsäure
GA07	157	154	Glykolsäure
MA05	233	236	Mandelsäure

Der theoretisch anhand der postulierten Summenformel berechnete Wert für M_0 der postulierten TiO-Cluster geht mit dem durch Formel 2 berechneten Wert für M_0 in allen drei Fasersystemen konform. Die Abweichungen zwischen den beiden Werten liegen bei den Fasern GA07 und MA05 lediglich bei 1 %.

Demzufolge wird das Postulat, dass die Fasern aus wenig untereinander vernetzten, protonierten Titan-oxo-carboxo-hydroxid-Clustern mit den Summenformeln $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{LA}^-)_6(\text{OH}_2^+)_6]$, $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{GA}^-)_6(\text{OH}_2^+)_6]$ und $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{MA}^-)_6(\text{OH}_2^+)_6]$ bestehen, nochmals bekräftigt.

Laut diesem Postulat ist es wahrscheinlich, dass die für 3 d bei RT gelagerten Fasern aufgrund unterschiedlicher molekularer Wechselwirkung unterschiedlich stark verspröden. Dies wurde wiederum mit Biegeversuchen an den für 3 d bei RT gelagerten Proben näher untersucht (Abb. 60).

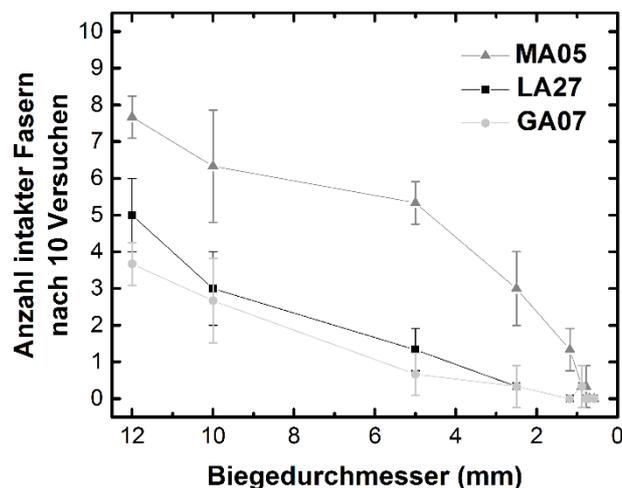


Abb. 60 : Ergebnisse der Biegeversuche von den Fasern LA27 (Vierecke), GA07 (Kreise) und MO05 (Dreiecke). Alle Fasern wurden vor den Biegeversuchen für 3 d bei RT aufbewahrt. Zur besseren Nachverfolgung mit dem Auge wurden die einzelnen Punkte durch eine Linie verbunden.

Bei den beiden Fasern LA27 und GA05 kann man keinen Unterschied im Verhalten während der Biegeversuche feststellen. GA besitzt in α -Position nur zwei Protonen, LA eine Methyl-Gruppe und

ein Proton. Dieser Unterschied in der Seitenkette scheint keinen signifikanten Einfluss auf die makroskopischen Fasereigenschaften zu haben. Der Phenylrest von MA dagegen zeigt vermutlich durch die Ausbildung von intermolekularen π - π -Wechselwirkungen einen Einfluss auf die makroskopischen Eigenschaften der Faser. Die Faser MA05 ist nach 3 d Lagerung bei RT flexibler und biegsamer als die Fasern mit GA und LA. Abb. 61 zeigt die Strukturformeln von GA, LA und MA.

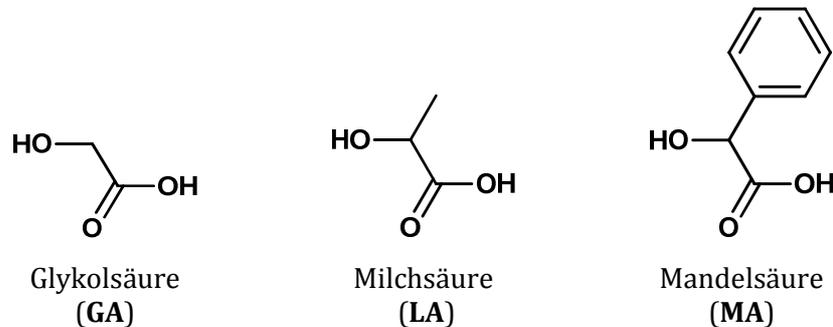


Abb. 61 : Strukturformeln von GA, LA und MA.

Um die Theorie, dass die Fasern aufgrund von verdampfenden Wassermolekülen verspröden, nochmals zu bekräftigen wurden Fasern der Zusammensetzung MA05 für einen Monat im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Nach diesem Lagerungszeitraum wurden Biegeversuche durchgeführt (vgl. Abb. 62).

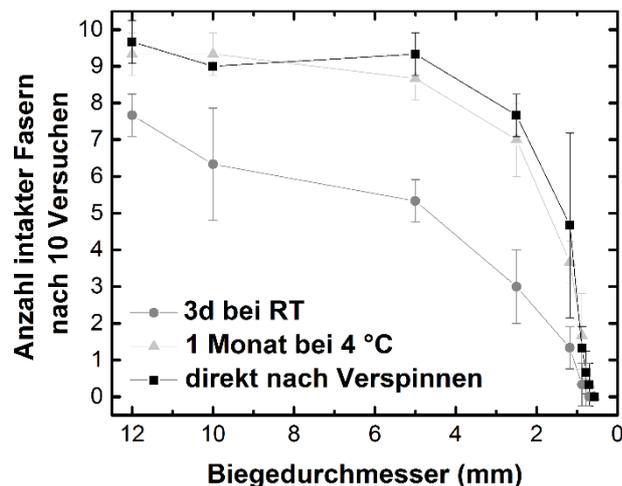


Abb. 62 : Ergebnisse der Biegeversuche der Faser MA05, die bei verschiedenen Bedingungen gelagert wurden: direkt nach dem Verspinnen (schwarze Vierecke), Lagerung für 3 d bei RT (graue Kreise), Lagerung für einen Monat bei 4 °C (hellgraue Dreiecke). Zur besseren Nachverfolgung für das Auge wurden die einzelnen Punkte jeder Messung durch eine Linie verbunden.

Fasern, die für einen Monat bei 4 °C gelagert wurden zeigen den gleichen Trend wie Fasern, die direkt nach dem Verspinnen getestet wurden. Bis zu einem Biegedurchmesser von ca. 5 mm bleiben

die Fasern intakt. Bei kleineren Biegedurchmessern treten häufiger Faserbrüche auf. Die für 3 d bei RT gelagerte Faser zeigt über alle getesteten Biegedurchmessern eine geringere Stabilität und bricht häufiger.

Demzufolge wird die aufgestellte These bekräftigt. Bei einer Lagerung bei 4 °C verdunstet weniger Wasser aus den Fasern und sie behalten ihre flexiblen Eigenschaften – ähnlich zu den Eigenschaften direkt nach dem Verspinnen. Bei einer Lagerung bei Raumtemperatur kann Wasser aus der Faser entweichen und sie beginnt zu verspröden.

3) Verwendung der Dicarbonsäure Äpfelsäure für die Herstellung eines TiO₂-basierten faserförmigen Zellträgermaterials

Ausgehend von diesen Erkenntnissen soll in der Solsynthese eine Dicarbonsäure verwendet werden, die aufgrund ihrer Mehrzähigkeit TiO-Cluster stärker miteinander vernetzen kann.^[158] Durch den zu erwartenden höheren Vernetzungsgrad sollte auch die Sprödigkeit der Fasern nach Lagerung bei RT geringer werden.

Als Säure wurde Äpfelsäure (MalA) gewählt (vgl. Abb. 63). Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine α -Hydroxycarbonsäure mit einer zweiten Carboxylateinheit.

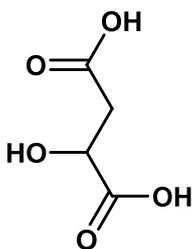


Abb. 63 : Strukturformel von MalA.

Aufbauend auf den Ergebnissen aus Kapitel II.2 wird eine Zusammensetzung für die MalA-Faser gewählt, die einen Vergleich mit LA27, GA07 und MA05 erlaubt. Aufgrund der Zähigkeit von zwei wird die Säure MalA in der halben stöchiometrischen Menge im Vergleich zu LA, GA bzw. MA eingesetzt.

Die Zusammensetzung des Sols der Faser Mala04 ist im Vergleich zu den Zusammensetzung der Fasersysteme LA27, GA07 und MA05 in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 : Zusammenfassung über die Zusammensetzungen der Sole der Fasern LA27, GA07, MA05 und Mala04.

Bezeichnung	X(TEOT)	X(Säure)	X(H ₂ O)	verwendete Säure	Zähigkeit der Säure
LA27	1	1	1,9	Milchsäure	1
GA07	1	1	2	Glykolsäure	1
MA05	1	1	2	Mandelsäure	1
Mala04	1	0,5	2	Äpfelsäure	2

Das FTIR-Spektrum der Faser zeigt, dass $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ im Fasermaterial zu niedrigen Wellenzahlen verschoben ist. In der Faser Mala04 liegen dieses Banden bei 1642 cm^{-1} und 1551 cm^{-1} , bei unkoordinierter Äpfelsäure liegen diese Banden bei 1737 und 1684 cm^{-1} .

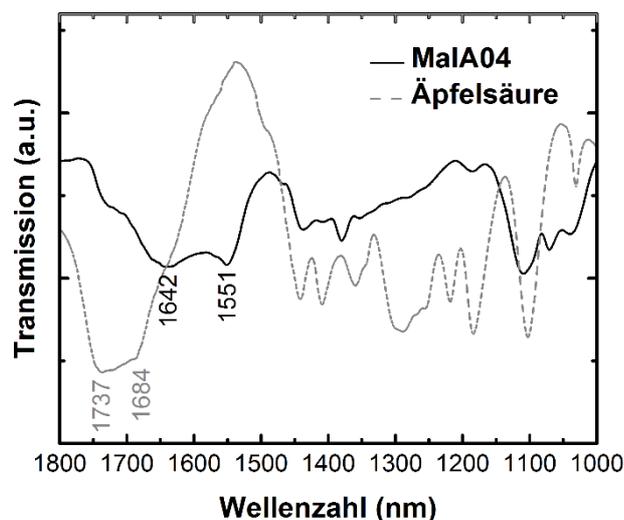


Abb. 64 : FTIR-Spektren der Faser Mala04 (schwarze Linie) und Äpfelsäure (graue Linie).

An den beiden Bandenpositionen von $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ von unkoordinierter Säure können ebenfalls im Spektrum der Faser Mala04 Schultern identifiziert werden. Diese Banden konnten auch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu 2 d nicht weiter minimiert werden. Eine vollständige Koordination der Äpfelsäure an Titan in den Fasern ist nicht zu erwarten. Bei einer derartig hohen Vernetzung im Hybridmaterial würde das Sol während des Einengens am Rotationsverdampfer nicht in eine fadenziehende, spinnbare Masse übergehen.

Die Fasern Mala04 zeigen deutlich flexiblere Eigenschaften in den Biegeversuchen (Abb. 65). Nach 3 d Lagerung bei RT bleibt mindestens die Hälfte der getesteten Fasern intakt während man sie um einen Zylinder des Durchmessers $\geq 1,2$ mm windet.

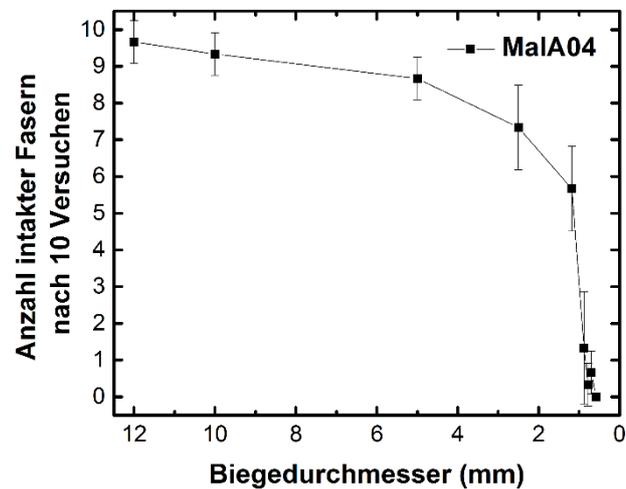


Abb. 65 : Ergebnisse der Biegeversuche der Faser Mala04 nach einer Lagerung von 3 d bei RT.

Somit stellt Mala04 die Faser im Rahmen dieser Arbeit dar, die am wenigsten nach Lagerung bei RT versprödet.

4) Zusammenfassung

Im ersten Kapitel dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Fasern, bei deren Synthese Milchsäure verwendet wurde, vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich ihrer Biokompatibilität zeigen. Diese Fasern sind aber nur sehr schwer handhabbar, da sie bei geringen Berührungen zu einem Pulver zerfallen. Dieser Effekt wird bei der Lagerung der Fasern bei Raumtemperatur verstärkt. Um die mechanischen Eigenschaften der Fasern zu verbessern, wurden in diesem Kapitel verschiedene Strategien verfolgt.

Zum einen wurden die Fasern getempert um das in der Faser enthaltene TiO_2 -Netzwerk stärker zu vernetzen. Dabei konnte keine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften erzielt werden. Eine weitere Variante – die Einarbeitung des Biopolymers Chitosan und das anschließende Tempern – führte ebenfalls zu keinen stabileren Fasern. Dafür zeigten diese Fasern sehr gute Eigenschaften bei *in-vitro*-Experimenten. Die Fasern sind biokompatibel und auf deren Oberfläche proliferieren Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und Osteoblasten.

Ein anderer Weg zur Verbesserung der mechanischen Fasereigenschaften war die Verwendung anderer α -Hydroxycarbonsäuren in der Synthese der Spinnmassen. Hiermit konnten Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung im Fasermaterial geschlossen werden. Die Faser scheint aus nur wenig untereinander vernetzen Titan-oxo-carboxo-Clustern der Summenformel $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_6(\text{LA})_6]$ (mit $\text{R} = \text{H}_2^+, \text{H}, \text{Et}$ oder „ $\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_5(\text{LA})_6$ “) zu bestehen. Nach dem Verspinnen liegen Lösungsmittelreste adsorptiv gebunden zwischen den verschiedenen Clustern vor, so dass die Faser flexible Eigenschaften aufweist. Verdampfen die Lösungsmittelreste, beginnt das Fasermaterial zu verspröden. Eine Lagerung bei 4 °C konnte das Verdampfen des Lösungsmittels verhindern und die Faser behält während der Lagerung ihre flexiblen Eigenschaften. Abb. 66 fasst den Zusammenhang der Lagerungstemperatur und der damit zusammenhängenden mechanischen Eigenschaften der Fasern zusammen. Im medizinischen Bereich stellt eine Lagerung von Medizinprodukten bei 4 °C kein Problem dar.

a) Lagerung bei RT



b) Lagerung bei 4 °C



Abb. 66 : Schema über den Zusammenhang der Lagerungstemperatur (a: bei RT; b) bei 4 °C) und den daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften der Fasern. Ein Ausschnitt stellt jeweils schematisch den Aufbau einer Faser dar. Zu Beginn (jeweils links) liegen Titan-oxo-carboxo-Cluster wenig verbrückt in der Faser vor uns sind von Wasserresten umgeben. Bei einer Lagerung der Fasern bei RT verdampfen diese Wasserreste schneller als bei einer Lagerung bei 4 °C, so dass die Faser bei einer Lagerung bei RT schneller versprödet.

Die Theorie, dass Wasserreste in der Faser vorliegen, geht auch mit den Beobachtungen während der REM-Messungen konform. Ungetemperte Fasern brachen während einer REM-Messung – vermutlich bedingt durch Entweichen von Wasser während des Fokussierens mit dem Elektronenstrahl auf die Probe. Getemperte Fasern zeigten dieses Verhalten nicht.

In den Titan-oxo-carboxo-Clustern der Summenformel $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_6(\text{Carboxylat})_6]$ (mit $\text{R} = \text{H}_2^+, \text{H}, \text{Et}$ oder „ $\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_5(\text{LA})_6$ “) sind die Carboxylat-Liganden nach außen gerichtet. Durch die Verwendung unterschiedlicher Säuren als Liganden sollten sich auch die intermolekularen Wechselwirkungen der Cluster untereinander verändern und somit die mechanischen Eigenschaften der Fasern

beeinflussen. Neben LA wurden die α -Hydroxycarbonsäuren GA und MA getestet. Fasern mit GA und LA zeigen in den Biegeversuchen ähnliche Ergebnisse. Fasern, in die MA als Chelatligand integriert ist, verhalten sich dagegen bedeutend flexibler. Dies kann auf den aromatischen Rest zurückgeführt werden, der die Cluster zusätzlich durch π - π -Wechselwirkungen untereinander stabilisieren kann.

Zusätzlich wurde die Dicarbonsäure Äpfelsäure in der Spinnmassensynthese verwendet. Äpfelsäure ist in der Zellkultur in Maßen unbedenklich. Beispielsweise findet sie als Puffer-Zusatz in Zellkulturmedien Verwendung.^[159] Durch die Zweizähnnigkeit der Säure sollte sie eine höhere Vernetzung der Cluster untereinander bewirken. Biegeversuche bekräftigten dies und die Faser mit Äpfelsäure zeigte in den Biegeversuchen die flexibelsten Eigenschaften (vgl. Abb. 67).

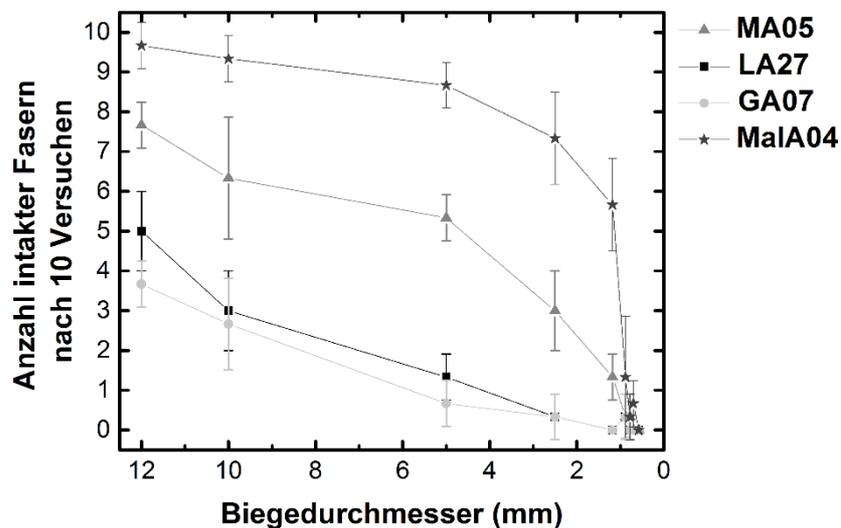


Abb. 67 : Zusammenfassung der Ergebnisse aller untersuchter Fasern, die für 3 d bei RT gelagert wurden: MA05 (Dreiecke), LA27 (Vierecke), GA07 (Kreise) und MalA04 (Sterne). Zur besseren Nachverfolgung für das Auge wurden die einzelnen Punkte jeder Messung durch eine Linie verbunden.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nur eine viskose Spinnmasse aus TEOT und verschiedener metabolisierbarer Carbonsäuren erzeugt werden. Diese Spinnmassen konnten auch zu einem faserförmigen und biokompatiblen Scaffold-Material weiterverarbeitet werden. Durch Variation der Carboxylat-Liganden konnten die mechanischen Fasereigenschaften bedeutend verbessert werden, so dass diese auch geeignete mechanische Eigenschaften aufweisen für eine Handhabung der Materialien im Bereich des Tissue Engineerings.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnten ethanolische Sole aus TEOT und der metabolisierbaren α -Hydroxycarbonsäure LA in spinnfähige viskose Spinnmassen überführt werden und erstmalig über die Methode des Druckspinnens zu Mikrofasern prozessiert werden.

Die hybriden Fasern sind intrinsisch stabil. Über FTIR- und ^{13}C -MAS-NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in der Faser der Koordinationsmodus von LA an Ti sowohl im mono- als auch im bidentaten Modus (Nomenklatur bezogen auf die Säureeinheit) vorliegt.

Die nähere Untersuchung des Degradationsverhaltens einer LA-Faser zeigte hauptsächlich die Freisetzung von Lactat und Ethanol innerhalb weniger Stunden. Danach kann kaum noch ein Massenverlust der Fasern nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Degradationsgeschwindigkeit abhängig von der Sättigungskonzentration der wasserlöslichen Titanoxid-Spezies $\text{Ti}(\text{OH})_4$ und $\text{Ti}(\text{O})(\text{OH})_2$. Die Löslichkeit dieser Verbindungen beträgt ca. $1 \mu\text{mol/L}$.^[79] Die Freisetzung von Titanverbindungen an das Degradationsmedium konnte über ICP-Messungen und indirekt auch über NMR-Messungen der Degradationsprodukte in Lösung nachgewiesen werden. Nach ca. einer Woche in Lösung bildet sich der wasserlösliche metallorganische Komplex TiBALDH. Dieser Komplex zeigt keinen negativen Einfluss auf die Umwelt^[99-100], so dass Zellkulturmedien, die in Kontakt mit den Fasermaterialien getreten sind, in Zukunft nach dem Autoklavieren gefahrlos entsorgt werden können.

Zudem sollte keines der detektierten Abbauprodukte in den abgegebenen Mengen toxisch auf den humanen Organismus bei *in-vivo*-Anwendungen wirken. Lactat und Ethanol können im menschlichen Organismus verstoffwechselt werden. TiBALDH ist dem im menschlichen Serum nachweisbaren Titan(IV)citrat-Komplex strukturell sehr ähnlich. Aufgrund der Tatsache, dass die Bildung von TiBALDH ca. 1 Woche dauert, ist die vorherige Bildung des Titan(IV)citrat-Komplexes im humanen Organismus wahrscheinlich.

Weiterhin konnte das hybride Fasermaterial durch den Zusatz von basischen Stoffen neutralisiert werden und nach Vorkonditionierung der Fasern als nicht zytotoxisch eingestuft werden. Als Gegenionen wurde Ammonium, das biogene Amin Phenethylamin, die Aminosäure Phenylalanin und das Biopolymer CHI getestet. Für zukünftige Weiterentwicklungen können auch basische Wirkstoffe als Gegenionen herangezogen werden. Somit könnte das hybride Zellträgermaterial zusätzlich eine Drug-Delivery-Funktion erhalten.

Die LA-Fasern verhalten sich nach dem Verspinnen sehr flexibel. Bei einer Lagerung bei RT jedoch verspröden diese sehr schnell innerhalb von 3 d. Diese Materialeigenschaft wurde im zweiten Teil der Arbeit näher untersucht und optimiert.

Tempern des Fasermaterials bei 170 °C bewirkte eine Umlagerung der LA-Liganden zu AA-Liganden, aber keine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften. Versuche einer getemperten LA-Faser mit CHI als Gegenion zeigte durchwegs positive Eigenschaften in den Zytotoxizitätstests und auf deren Oberfläche konnten Zellen der Zelllinien L929, 16HBE, HTB94 und MG63 erfolgreich kultiviert werden. Abb. 68 zeigt L929-Zellen, welche die komplette Oberfläche von getemperten LA8_CHI_Fasern besiedeln.

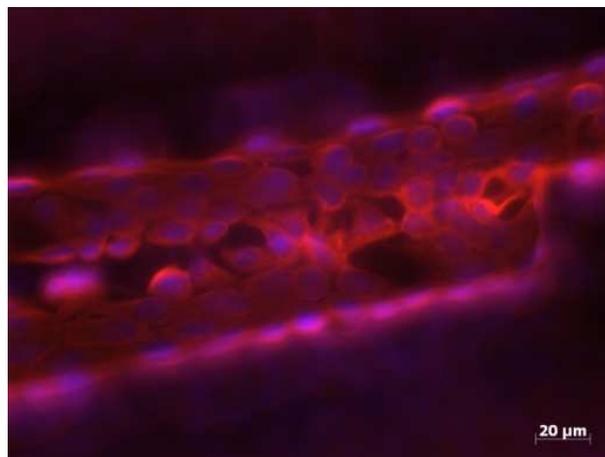


Abb. 68 : L929-Zellen auf getemperten LA8_CHI_Fasern. Der Zellkern ist blau eingefärbt; das Zytoskelett der Zellen in Rot.

Durch die Verwendung anderer metabolisierbarer α -Hydroxycarbonsäuren konnten Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Fasern gezogen werden. Die Fasern scheinen aus wenig untereinander vernetzten Titan-oxo-carboxo-Clustern der Summenformel $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_6(\text{Carboxylat})_6]$ (mit $\text{R} = \text{H}_2^+$, H , Et oder „ $\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_5(\text{Carboxylat})_6$ “) zu bestehen. Durch Variation der verwendeten Säuren konnten die Wechselwirkungen der Cluster untereinander verstärkt werden, so dass beispielsweise eine Faser mit MA bedeutend flexiblere Eigenschaften – auch bei einer Lagerung für 3d bei RT aufweist. Des Weiteren konnte durch Lagerung dieser Faser bei 4 °C der Versprödungsprozess für mind. 1 Monat gestoppt werden. Eine Lagerung von Medizinprodukten bei 4 °C stellt in Ländern mit ausreichender Infrastruktur kein Problem dar.

Aufbauend auf diesen Tatsachen und TGA-MS-Messungen konnte die These aufgestellt werden, dass sich zwischen den wenig untereinander vernetzten Titan-oxo-carboxo-Cluster direkt nach dem Verspinnen noch Wassermoleküle befinden. Diese Reste an Wasser verleihen – vermutlich aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen – der Faser flexible Eigenschaften. Bei

einer Lagerung bei RT entweichen diese Wasserreste und die Faser versprödet; bei einer Lagerung bei 4°C wird das Verdampfen des restlichen Wassers bedeutend verlangsamt.

Die Faser mit den flexibelsten Eigenschaften konnte letztendlich durch die Verwendung des zweizähligen Carboxylat-Liganden MalA erhalten werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein neuartiges faserförmiges Material auf Basis von Titan-oxo-carboxo-Clustern produziert werden, welches großes Potential besitzt als Zellträgermaterial Anwendung zu finden. Aufbauend auf den hier gewonnenen Ergebnissen können die mechanischen Eigenschaften weiter optimiert und die Anforderungen des gewünschten Zielgewebes feinjustiert werden. Zudem besteht die Möglichkeit dem Material Drug-Delivery-Eigenschaften zu verleihen. Somit könnte das Scaffold aus Mikrofasern neben den bereits integrierten chemischen und physikalischen Stimuli (die Oberflächenfunktionalitäten und die Oberflächentopographie der Fasern) auch durch freigesetzte Wirkstoffe Zellen zur gewünschten Differenzierung anregen.

SUMMARY

In this thesis ethanolic sols out of the liquid sol gel precursor TEOT and metabolizable α -hydroxy carboxylic acids (e. g. LA) were transformed into spinnable viscous fluids and were processed for the first time to microfibers.

These hybrid microfibers are intrinsic stable. FTIR- and ^{13}C -MAS-NMR-measurements of the fibers show a monodentate as well as a bidentate coordination mode (with regard to the carboxylic unit) of LA to Ti.

Degradation experiments show the release of lactate and ethanol within less hours. Afterwards no mass lost is detected anymore. The kinetics of fiber degradation might depend on the saturation concentration of the titanium oxide species $\text{Ti}(\text{OH})_4$ and $\text{Ti}(\text{O})(\text{OH})_2$ in water. Their solubility in water is $1 \mu\text{mol/L}$. The release of titanium containing compounds is detected indirectly by ICP- and NMR-measurements. This compound was identified as TIBALDH, which was shown having no negative impact on environment.^[99, 160] Additionally the pH value of the hybrid fibers can be neutralized by adding basic compounds (ammonium, phenethylamine, phenylalanine or chitosan) to be classified as a non-cytotoxic material.

LA fibers are very flexible after spinning. After storage at RT the fibers turn into a brittle material within 3 days. This property was investigated in the second part of the thesis.

Fiber annealing at a temperature of $170 \text{ }^\circ\text{C}$ doesn't result in an improvement of the mechanically properties. Nonetheless cytotoxicity assays of the annealed fibers show promising results and cell proliferation experiments show the proliferation of L929, 16HBE and HTB94 on the fibrous surface.

Conclusion of the fiber composition can be drawn by using different metabolizable α -hydroxy carboxylic acids in fiber synthesis. Fibers seem to consist out of less crosslinked titanium-oxo-carboxo-clusters of the molecular formula $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_6(\text{carboxylate})_6]$ (with $\text{R} = \text{H}_2^+, \text{H}, \text{Et}$ or „ $\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_5(\text{carboxylate})_6$ “). By varying the carboxylates the interaction of the clusters can be enhanced. For instance a fibers with the acid MA shows better flexibility – even after storage at RT for 3 days. Additionally the brittling of fibers can be stopped for at least one months by a storage temperature of $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Referring to these results and TGA-measurements following hypothesis was put forward: Directly after fiber spinning water molecules are present in the small pores between different titanium-oxo-carboxo-clusters. These water residuals reinforce fiber flexibility due to hydrogen bonds. After storing the fibers at RT residual water molecules will evaporate out of the fibers. Consequently the

SUMMARY

fibers are brittle. At a storage temperature of 4 °C the evaporation of water molecules is slowed down.

Fibers containing MalA – an α -hydroxy carboxylic acid with two coordinating carboxylic groups – were determined as the most flexible fiber.

LITERATUR

- [1] A. S. Mao, D. J. Mooney, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 14452-14459.
- [2] M. F. Griffin, P. E. Butler, A. M. Seifalian, D. M. Kalaskar, *World Journal of Stem Cells* **2015**, *7*, 37-50.
- [3] M. Patel, J. P. Fisher, McGraw-Hill Education, **2008**.
- [4] F. J. O'Brien, *Materials Today* **2011**, *14*, 88-95.
- [5] in *Biomaterials Science (Third Edition)* (Eds.: A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons), Academic Press, **2013**, p. iii.
- [6] J. Park, R. S. Lakes, 3 ed., Springer-Verlag New York, **2007**.
- [7] H.-J. Bullinger, *Technologieführer*, 1 ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2007**.
- [8] *International Journal of Polymer Science* **2011**, *2011*.
- [9] P. X. Ma, *Materials Today* **2004**, *7*, 30-40.
- [10] M. Kursawe, W. Glaubitt, A. Thierauf, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **1998**, *13*, 267-271.
- [11] T. Czuryzkiewicz, J. Ahvenlammi, P. Korteso, M. Ahola, F. Kleitz, M. Jokinen, M. Lindén, J. B. Rosenholm, *Journal of Non-Crystalline Solids* **2002**, *306*, 1-10.
- [12] V. Grotheer, M. Goergens, P. C. Fuchs, S. Dunda, N. Pallua, J. Windolf, C. V. Suschek, *Biomaterials* **2013**, *34*, 7314-7327.
- [13] T. Peltola, M. Jokinen, S. Veittola, H. Rahiala, A. Yli-Urpo, *Biomaterials* **2001**, *22*, 589-598.
- [14] A. E. Danks, S. R. Hall, Z. Schnepf, *Materials Horizons* **2016**, *3*, 91-112.
- [15] R. I. Zinifer, L. T. Tsikoza, N. V. Shikina, V. F. Zarytova, V. V. Zinoviev, N. Z. Stanislav, *Russian Chemical Reviews* **2009**, *78*, 873.
- [16] D. P. Macwan, P. N. Dave, S. Chaturvedi, *Journal of Materials Science* **2011**, *46*, 3669-3686.
- [17] C. Sanchez, B. Julian, P. Belleville, M. Popall, *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 3559-3592.
- [18] G. J. Owens, R. K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C.-M. Han, C. Mahapatra, H.-W. Kim, J. C. Knowles, *Progress in Materials Science* **2016**, *77*, 1-79.
- [19] W. Jin, J. D. Brennan, *Analytica Chimica Acta* **2002**, *461*, 1-36.
- [20] J. Livage, C. Sanchez, *Journal of Non-Crystalline Solids* **1992**, *145*, 11-19.
- [21] L. Rozes, C. Sanchez, *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 1006-1030.
- [22] L. Rozes, N. Steunou, G. Fornasieri, C. Sanchez, *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **2006**, *137*, 501-528.
- [23] E. V. Salomatina, N. M. Bityurin, M. V. Gulenova, T. A. Gracheva, M. N. Drozdov, A. V. Knyazev, K. V. Kir'yanov, A. V. Markin, L. A. Smirnova, *Journal of Materials Chemistry C* **2013**, *1*, 6375-6385.
- [24] U. Schubert, *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 3701-3715.
- [25] U. Schubert, S. Tewinkel, R. Lamber, *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, 2047-2055.
- [26] F. P. Rotzinger, J. M. Kesselman-Truttman, S. J. Hug, V. Shklover, M. Grätzel, *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 5004-5017.
- [27] M. Camail, M. Humbert, A. Margailan, A. Riondel, J. L. Vernet, *Polymer* **1998**, *39*, 6525-6531.
- [28] S. Doueff, M. Henry, C. Sanchez, J. Livage, *Journal of Non-Crystalline Solids* **1986**, *89*, 206-216.
- [29] G. B. Deacon, R. J. Phillips, *Coordination Chemistry Reviews* **1980**, *33*, 227-250.
- [30] R. Urlaub, U. Posset, R. Thull, *Journal of Non-Crystalline Solids* **2000**, *265*, 276-284.
- [31] N. M. Kinsinger, A. Wong, D. Li, F. Villalobos, D. Kisailus, *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 5254-5261.
- [32] T. A. Kandiel, A. Feldhoff, L. Robben, R. Dillert, D. W. Bahnemann, *Chemistry of Materials* **2010**, *22*, 2050-2060.
- [33] H. Mockel, M. Giersig, F. Willig, *Journal of Materials Chemistry* **1999**, *9*, 3051-3056.
- [34] G. A. Seisenbaeva, G. Daniel, J.-M. Nedelec, V. G. Kessler, *Nanoscale* **2013**.
- [35] Y.-F. Deng, Y.-Q. Jiang, Q.-M. Hong, Z.-H. Zhou, *Polyhedron* **2007**, *26*, 1561-1569.

- [36] E. T. Kefalas, P. Panagiotidis, C. P. Raptopoulou, A. Terzis, T. Mavromoustakos, A. Salifoglou, *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 2596-2605.
- [37] J. M. Collins, R. Uppal, C. D. Incarvito, A. M. Valentine, *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 3431-3440.
- [38] K. Tomita, V. Petrykin, M. Kobayashi, M. Shiro, M. Yoshimura, M. Kakihana, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 2378-2381.
- [39] N. G. M. Palmqvist, S. Bejai, J. Meijer, G. A. Seisenbaeva, V. G. Kessler, *Scientific Reports* **2015**, *5*, 10146.
- [40] M. Kobayashi, H. Kato, M. Kakihana, *Nanomaterials and Nanotechnology* **2013**, *3*.
- [41] M. Kobayashi, M. Osada, H. Kato, M. Kakihana, *Polym J* **2015**, *47*, 78-83.
- [42] K. Tomita, M. Kobayashi, V. Petrykin, S. Yin, T. Sato, M. Yoshimura, M. Kakihana, *Journal of Materials Science* **2008**, *43*, 2217-2221.
- [43] C. De Dobbelaere, J. Mullens, A. Hardy, M. K. Van Bael, *Thermochimica Acta* **2011**, *520*, 121-133.
- [44] B. Hatton, L. Mishchenko, S. Davis, K. H. Sandhage, J. Aizenberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 10354-10359.
- [45] K.-i. Katsumata, Y. Ohno, K. Tomita, M. Sakai, A. Nakajima, M. Kakihana, A. Fujishima, N. Matsushita, K. Okada, *Photochemistry and Photobiology* **2011**, *87*, 988-994.
- [46] T. Ohya, A. Nakayama, Y. Shibata, T. Ban, Y. Ohya, Y. Takahashi, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2003**, *26*, 799-802.
- [47] C.-H. Ho, C.-Y. Shieh, C.-L. Tseng, Y.-K. Chen, J.-L. Lin, *Journal of Catalysis* **2009**, *261*, 150-157.
- [48] K. Liu, A. Litke, Y. Su, B. G. van Campenhout, E. A. Pidko, E. J. M. Hensen, *Chemical Communications* **2016**, *52*, 11634-11637.
- [49] Y.-K. Chen, Y.-F. Lin, Z.-W. Peng, J.-L. Lin, *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 17720-17727.
- [50] U. Diebold, *Surface Science Reports* **2003**, *48*, 53-229.
- [51] E. Wintermantel, S. W. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering*, Springer Berlin Heidelberg, **2009**.
- [52] L. L. Hench, J. M. Polak, *Science* **2002**, *295*, 1014-1017.
- [53] M. Balazic, J. Kopac, M. J. Jackson, W. Ahmed, *International Journal of Nano and Biomaterials* **2007**, *1*, 3-34.
- [54] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee, *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, *5*, 117-141.
- [55] S. Singh, S. S. Ray, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2007**, *7*, 2596-2615.
- [56] L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 762-798.
- [57] S. L. V. Cooper, S. A.; Hergenrother, R. W.; Lamba, N. M. K., in *Biomaterials Science - An introduction to materials in medicine*, 2 ed. (Eds.: B. D. Ratner, A. S. Hoffmann, F. J. Schoen, J. E. Lemons), Elsevier, London, **2004**, pp. 67-79.
- [58] in *Biomaterials - an introduction* (Eds.: J. Park, R. S. Lakes), Springer New York, **2007**, pp. 173-205.
- [59] F. v. Burkersroda, L. Schedl, A. Göpferich, *Biomaterials* **2002**, *23*, 4221-4231.
- [60] F. J. Pavinatto, L. Caseli, O. N. Oliveira, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1897-1908.
- [61] M. N. V. Ravi Kumar, *Reactive and Functional Polymers* **2000**, *46*, 1-27.
- [62] F. Croisier, C. Jérôme, *European Polymer Journal* **2013**, *49*, 780-792.
- [63] C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma, *Progress in Polymer Science* **2009**, *34*, 641-678.
- [64] M. H. Periyah, A. S. Halim, A. Z. M. Saad, *Pharmacognosy Reviews* **2016**, *10*, 39-42.
- [65] M. Sano, O. Hosoya, S. Taoka, T. Seki, T. Kawaguchi, K. Sugibayashi, K. Juni, Y. Morimoto, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1999**, *47*, 1044-1046.
- [66] Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shigemasa, S. Minami, *Carbohydrate Polymers* **2003**, *53*, 337-342.
- [67] R. Millner, A. S. Lockhart, R. Marr, *Annals of The Royal College of Surgeons of England* **2010**, *92*, 559-561.
- [68] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, H. J. Park, *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *144*, 51-63.

- [69] R. C. Goy, S. T. B. Morais, O. B. G. Assis, *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2016**, *26*, 122-127.
- [70] T. Freier, H. S. Koh, K. Kazazian, M. S. Shoichet, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5872-5878.
- [71] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, in *Biochemie, Vol. 6*, Heidelberg, **2007**.
- [72] L. B. Gladden, *The Journal of Physiology* **2004**, *558*, 5-30.
- [73] X. Garric, J.-P. Molès, H. Garreau, C. Braud, J.-J. Guilhou, M. Vert, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2002**, *13*, 1189-1201.
- [74] B. A. Green, R. J. Yu, E. J. Van Scott, *Clinics in Dermatology* **2009**, *27*, 495-501.
- [75] K. C. Leibman, *Environ. Health Perspect.* **1975**, *11*, 115-119.
- [76] S. a. H. Al-Lahham, M. P. Peppelenbosch, H. Roelofsen, R. J. Vonk, K. Venema, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2010**, *1801*, 1175-1183.
- [77] S.-W. Ha, E. Wintermantel, in *Medizintechnik* (Eds.: E. Wintermantel, S.-W. Ha), Springer Berlin Heidelberg, **2009**, pp. 191-217.
- [78] X. Liu, P. K. Chu, C. Ding, *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2004**, *47*, 49-121.
- [79] T. Sugimoto, X. Zhou, A. Muramatsu, *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *252*, 339-346.
- [80] S. G. Steinemann, *Periodontology 2000* **1998**, *17*, 7-21.
- [81] C. M. G. van den Berg, M. Boussemart, K. Yokoi, T. Prartono, M. L. A. M. Campos, *Marine Chemistry* **1994**, *45*, 267-282.
- [82] V. G. Kessler, G. A. Seisenbaeva, M. Unell, S. Håkansson, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 8506-8509.
- [83] G. A. Seisenbaeva, M. P. Moloney, R. Tekoriute, A. Hardy-Dessources, J.-M. Nedelec, Y. K. Gun'ko, V. G. Kessler, *Langmuir* **2010**, *26*, 9809-9817.
- [84] A. D. Tinoco, C. D. Incarvito, A. M. Valentine, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3444-3454.
- [85] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, D. Brunette, in *Titanium in Medicine*, Springer Berlin Heidelberg, **2001**, pp. 171-230.
- [86] T. Baramov, K. Keijzer, E. Irran, E. Mösker, M.-H. Baik, R. Süßmuth, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 10536-10542.
- [87] P. L. Croot, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 6395-6400.
- [88] I. Stokroos, L. Litinetsky, J. J. L. van der Want, J. S. Ishay, *Nature* **2001**, *411*, 654-654.
- [89] K. M. Buettner, A. M. Valentine, *Chemical Reviews* **2011**, *112*, 1863-1881.
- [90] A. Sarmiento-González, J. R. Encinar, J. M. Marchante-Gayón, A. Sanz-Medel, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *393*, 335.
- [91] L. Geraets, A. G. Oomen, P. Krystek, N. R. Jacobsen, H. Wallin, M. Laurentie, H. W. Verharen, E. F. A. Brandon, W. H. de Jong, *Particle and Fibre Toxicology* **2014**, *11*, 30-30.
- [92] M. Golasik, P. Wrobel, M. Olbert, B. Nowak, M. Czyzycki, T. Librowski, M. Lankosz, W. Piekoszewski, *Biomaterials* **2016**, *29*, 487-494.
- [93] M. Suwalsky, F. Villena, B. Norris, M. A. Soto, C. P. Sotomayor, L. Messori, P. Zatta, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005**, *99*, 764-770.
- [94] J. J. Jacobs, A. K. Skipor, L. M. Patterson, N. J. Hallab, W. G. Paprosky, J. Black, J. O. Galante, *J. Bone Joint Surg. Am., Vol. 80*, **1998**.
- [95] Y. Kasai, R. Iida, A. Uchida, *Spine* **2003**, *28*, 1320-1326.
- [96] H. Sun, H. Li, R. A. Weir, P. J. Sadler, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 1577-1579.
- [97] L. Messori, P. Orioli, V. Banholzer, I. Pais, P. Zatta, *FEBS Letters* **1999**, *442*, 157-161.
- [98] E. Y. Tshuva, D. Peri, *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 2098-2115.
- [99] N. Groenke, G. A. Seisenbaeva, V. Kaminsky, B. Zhivotovsky, B. Kost, V. G. Kessler, *RSC Advances* **2012**, *2*, 4228-4235.
- [100] Y. Lang, F. d. Monte, B. J. Rodriguez, P. Dockery, D. P. Finn, A. Pandit, *Scientific Reports* **2013**, *3*, 3205.
- [101] J.-X. Liu, D.-Z. Yang, F. Shi, Y.-J. Cai, *Thin Solid Films* **2003**, *429*, 225-230.
- [102] J.-K. Lee, D.-S. Choi, I. Jang, W.-Y. Choi, *International Journal of Nanomedicine* **2015**, *10*, 1145-1154.

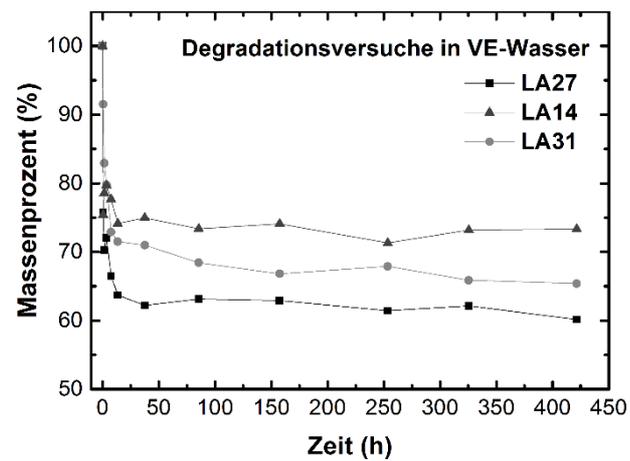
- [103] G. Mendonça, D. B. S. Mendonça, F. J. L. Aragão, L. F. Cooper, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3822-3835.
- [104] F. Köckerling, C. Schug-Pass, *Hernia* **2013**, 1-13.
- [105] K. S. Lim, M. H. Jeong, I. H. Bae, J.-K. Park, D. S. Park, J. M. Kim, J. H. Kim, H.-S. Kim, Y. S. Kim, H.-Y. Jeong, S.-J. Song, E. J. Yang, D. L. Cho, D. S. Sim, K.-H. Park, Y. J. Hong, Y. Ahn, *Journal of Cardiology* **2014**, *64*, 409-418.
- [106] S.-J. Song, Y. J. Park, J. Park, M. D. Cho, J.-H. Kim, M. H. Jeong, Y. S. Kim, D. L. Cho, *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20*, 4792-4801.
- [107] A. Buzarovska, A. Grozdanov, *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, *123*, 2187-2193.
- [108] W. Zhuang, J. Liu, J. H. Zhang, B. X. Hu, J. Shen, *Polymer Composites* **2009**, *30*, 1074-1080.
- [109] Y.-B. Luo, X.-L. Wang, D.-Y. Xu, Y.-Z. Wang, *Applied Surface Science* **2009**, *255*, 6795-6801.
- [110] Y. Zhu, G. G. Buonocore, M. Lavorgna, L. Ambrosio, *Polymer Composites* **2011**, *32*, 519-528.
- [111] V. Maquet, A. R. Boccaccini, L. Pravata, I. Notingher, R. Jérôme, *Biomaterials* **2004**, *25*, 4185-4194.
- [112] Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *44*, 65-73.
- [113] A. E. Kadib, K. Molvinger, T. Cacciaguerra, M. Bousmina, D. Brunel, *Microporous and Mesoporous Materials* **2011**, *142*, 301-307.
- [114] W.-C. Jao, M.-C. Yang, C.-H. Lin, C.-C. Hsu, *Polymers for Advanced Technologies* **2012**, *23*, 1066-1076.
- [115] S. J. Chen, H. Y. Yu, B. C. Yang, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2013**, *101A*, 64-74.
- [116] D. Li, Y. Xia, *Nano Letters* **2003**, *3*, 555-560.
- [117] J. I. Lim, B. Yu, K. M. Woo, Y.-K. Lee, *Applied Surface Science* **2008**, *255*, 2456-2460.
- [118] C. Tekmen, A. Suslu, U. Cocen, *Materials Letters* **2008**, *62*, 4470-4472.
- [119] K. K. Gupta, A. Kundan, P. K. Mishra, P. Srivastava, S. Mohanty, N. K. Singh, A. Mishra, P. Maiti, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14*, 12844-12853.
- [120] K. Nakane, K. Yasuda, T. Ogihara, N. Ogata, S. Yamaguchi, *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *104*, 1232-1235.
- [121] K. Nakane, N. Ogata, in *Nanofibers*, InTech, Rijeka, **2010**, p. Ch. 0.
- [122] A. Guimarães, A. Martins, E. D. Pinho, S. Faria, R. L. Reis, N. M. Neves, *Nanomedicine* **2010**, *5*, 539-554.
- [123] Y. Kurokawa, T. Sano, H. Ohta, Y. Nakagawa, *Biotechnology and Bioengineering* **1993**, *42*, 394-397.
- [124] Q. L. Loh, C. Choong, *Tissue Engineering. Part B, Reviews* **2013**, *19*, 485-502.
- [125] W. E. G. Muller, T. Link, Q. Li, H. C. Schroder, R. Batel, M. Blazina, V. A. Grebenjuk, X. Wang, *RSC Advances* **2014**, *4*, 48267-48275.
- [126] V. G. Kessler, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2013**, *68*, 464-470.
- [127] T. Moreau, C. Depagne, G. Suissa, H. Gouzi, T. Coradin, *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 1235-1240.
- [128] T. Ohya, M. Ito, K. Yamada, T. Ban, Y. Ohya, Y. Takahashi, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2004**, *30*, 71-81.
- [129] W.-C. Wu, C.-C. Chuang, J.-L. Lin, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 8719-8724.
- [130] M. Kakihana, M. Tada, M. Shiro, V. Petrykin, M. Osada, Y. Nakamura, *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 891-894.
- [131] M. Kakihana, K. Tomita, V. Petrykin, M. Tada, S. Sasaki, Y. Nakamura, *Inorganic Chemistry* **2004**, *43*, 4546-4548.
- [132] F. Perineau, S. Pensec, C. Sassoie, F. Ribot, L. van Lokeren, R. Willem, L. Bouteiller, C. Sanchez, L. Rozes, *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 4470-4475.
- [133] S. G. Lloyd, H. Zeng, P. Wang, J. C. Chatham, *Magnetic Resonance in Medicine* **2004**, *51*, 1279-1282.
- [134] F. A. Miller, C. H. Wilkins, *Analytical Chemistry* **1952**, *24*, 1253-1294.
- [135] A. Reising, Würzburg **2012**.

- [136] G. Romanazzi, F. M. Gabler, D. Margosan, B. E. Mackey, J. L. Smilanick, *Phytopathology* **2009**, 99, 1028-1036.
- [137] M. Kursawe, University Würzburg - Faculty for Chemistry and Pharmacy (Würzburg), **Disseration**.
- [138] S. Breitenbach, Würzburg **2013**.
- [139] M. Kakihana, M. Kobayashi, K. Tomita, V. Petrykin, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2010**, 83, 1285-1308.
- [140] M. Oppmann, Würzburg **2013**.
- [141] B.-H. Moon, Y.-M. Sung, C.-H. Han, *Energy Procedia* **2013**, 34, 589-596.
- [142] X. Wang, F. Shi, X. Gao, C. Fan, W. Huang, X. Feng, *Thin Solid Films* **2013**, 548, 34-39.
- [143] S. Doeuff, M. Henry, C. Sanchez, J. Livage, *Journal of Non-Crystalline Solids* **1987**, 89, 206-216.
- [144] D. P. Birnie Iii, N. J. Bendzko, *Materials Chemistry and Physics* **1999**, 59, 26-35.
- [145] I. Corazzari, R. Nisticò, F. Turci, M. G. Faga, F. Franzoso, S. Tabasso, G. Magnacca, *Polymer Degradation and Stability* **2015**, 112, 1-9.
- [146] H. Moussout, H. Ahlafi, M. Aazza, M. Bourakhouadar, *Polymer Degradation and Stability* **2016**, 130, 1-9.
- [147] L. Heux, J. Brugnerotto, J. Desbrières, M. F. Versali, M. Rinaudo, *Biomacromolecules* **2000**, 1, 746-751.
- [148] J. Kumirska, M. Czerwicka, Z. Kaczyński, A. Bychowska, K. Brzozowski, J. Thöming, P. Stepnowski, *Marine Drugs* **2010**, 8, 1567-1636.
- [149] M. J. Simpson, P. G. Hatcher, *Organic Geochemistry* **2004**, 35, 923-935.
- [150] E. H. Novotny, M. H. B. Hayes, E. R. deAzevedo, T. J. Bonagamba, *Naturwissenschaften* **2006**, 93, 447-450.
- [151] C.-H. Cheng, J. Lehmann, J. E. Thies, S. D. Burton, M. H. Engelhard, *Organic Geochemistry* **2006**, 37, 1477-1488.
- [152] C. Blum, Würzburg **2012**.
- [153] R. Jayakumar, R. Ramachandran, V. V. Divyarani, K. P. Chennazhi, H. Tamura, S. V. Nair, *International Journal of Biological Macromolecules* **2011**, 48, 336-344.
- [154] D. Archana, J. Dutta, P. K. Dutta, *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, 57, 193-203.
- [155] H. Yin, Y. Wada, T. Kitamura, S. Kambe, S. Murasawa, H. Mori, T. Sakata, S. Yanagida, *Journal of Materials Chemistry* **2001**, 11, 1694-1703.
- [156] H. Cheng, J. Ma, Z. Zhao, L. Qi, *Chemistry of Materials* **1995**, 7, 663-671.
- [157] R. Papiernik, L. G. Hubert-Pfalzgraf, J. Vaissermann, M. C. Henriques Baptista Goncalves, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1998**, 2285-2288.
- [158] B. S. Buyuktas, *Transition Metal Chemistry* **2006**, 31, 786-791.
- [159] H. J. Morton, *In Vitro* **1970**, 6, 89-108.
- [160] Y. Lang, F. d. Monte, B. J. Rodriguez, P. Dockery, D. P. Finn, A. Pandit, **2013**, 3, 3205.

ANHANG

Anhang 1:

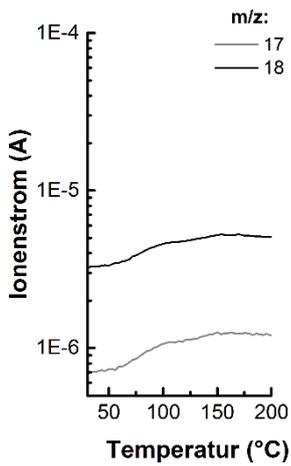
Degradationsprofile der Fasern LA14, LA27 und LA31 in VE-Wasser: LA27 (Vierecke), LA14 (Dreiecke), LA31 (Kreise). Die Messpunkte sind aus Gründen der Übersicht miteinander verbunden.



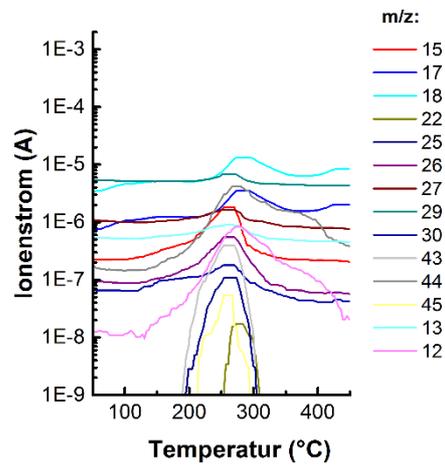
Anhang 2:

MS-Spektren aus der TGA-MS-Messung der Faser LA27 unter synthetischer Luftatmosphäre mit einer Aufheizrate von 10 K/min. Dargestellt sind die detektierten m/z-Fragmente während a) der Massenverluststufe 1, b) der Massenverluststufe 2 und c) der Massenverluststufe 3.

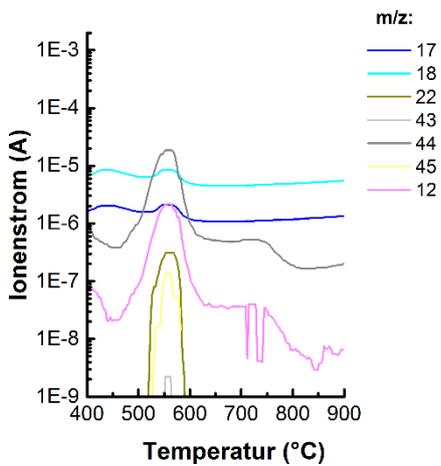
a)



b)

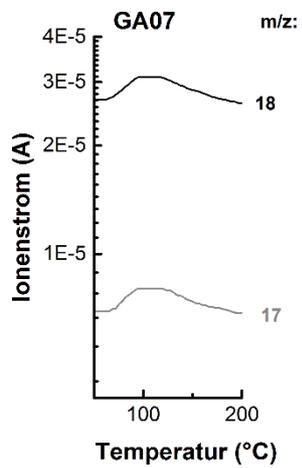
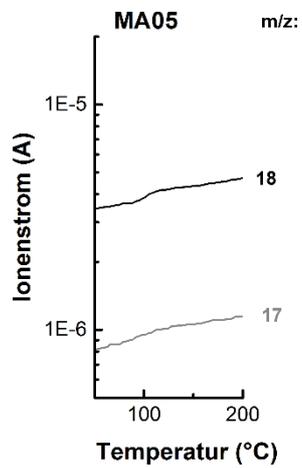


c)



Anhang 3:

MS-Messungen während einer TGA-Messung der Fasen GA07 und MA05. Dargestellt sind die m/z-Fragmente 17 und 18 in einem Temperaturbereich von RT bis 200 °C.

a)**b)**

Anhang 4:

MS-Messungen während einer TGA-Messung der Faser GA07. Aus Gründen der besseren Übersicht sind in jeder Massenverluststufe nur die freigesetzten m/z -Fragmente dargestellt. Auffallend ist die Freisetzung des Fragments von $m/z = 77$. Dies spricht für die Freisetzung von GA in Gasphase. Wie in Kapitel II.2 vermutet, wird GA bereits bei ca. 100 °C freigesetzt.

