

Biomaterialien auf der Basis von Terpyridin-koordinierten Metallionen



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

vorgelegt von

Janina Belka

aus VS-Villingen

Würzburg 2019

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter schriftliche Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2011 bis Dezember 2016 am Lehrstuhl für chemische Technologie der Materialsynthese der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dirk G. Kurth angefertigt

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

J. Belka, T. Weigel, A.-K. Berninger, D. G. Kurth, J. Nickel, Growth and Differentiation of Myoblastic Precursor Cells on Thin Films of Metallo-Supramolecular Coordination Polyelectrolyte (MEPE), *Adv. Mater. Interfaces* **2017**, 4, 1600272.

J. Belka, D.G. Kurth, J. Nickel, Growth on Metallo-Supramolecular Coordination Polymer (MEPE) Stimulate Osteogenic Differentiation of Human Osteosarcoma Cells (MG63) and Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, *Polymers* **2019**, 11 (7), 1090.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Metallionen in zellulären Systemen und biologische Grundlagen | 3 |
| 2.1 Wirkung von Metallionen auf Zellen | 3 |
| 2.2 Oberflächeneffekte | 4 |
| 2.3 Biologische Grundlagen | 6 |
| 2.3.1 Myogene Differenzierung | 6 |
| 2.3.2 Osteogene Differenzierung | 8 |
| 2.4 Knochenzemente | 12 |
| 2.5 Alginat-Gele | 15 |
| 2.6 Metallo-supramolekulare Koordinationspolyelektrolyte als Testsysteme | 16 |
| 2.6.1 Oberflächenfunktionalisierung | 22 |
| 3 Zielsetzung | 24 |
| 4 Ergebnisse und Diskussion | 27 |
| 4.1 MEPE Zell-Wechselwirkung | 27 |
| 4.1.1 Schichtcharakterisierung | 27 |
| 4.1.2 Zytotoxizität | 38 |
| 4.1.3 Einfluss von Fe-MEPE-Schichten auf C2C12-Zellen | 49 |
| 4.1.4 Einfluss von Fe-MEPE auf MG63-Zellen | 63 |
| 4.1.5 Einfluss von Fe-MEPE auf humane mesenchymale Stammzellen | 67 |
| 4.1.6 Einfluss von Fe-MEPE auf humane Endothelzellen | 83 |
| 4.2 Funktionalisierte Knochenzemente | 87 |
| 4.2.1 Funktionalisierung während Zementpräparation (Route A) | 89 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.2.2 | Funktionalisierung nach Zementpräparation (Route B) | 96 |
| 4.2.1 | Funktionalisierung mittels Metallionen dotiertem α -TCP (Route C) | 102 |
| 4.2.2 | Zelltests | 107 |
| 4.1 | Reversible Alginate | 112 |
| 4.1.1 | Funktionalisierung | 112 |
| 4.1.2 | Zelltests | 124 |
| 5 | Zusammenfassung | 127 |
| 6 | Summary | 129 |
| 7 | Experimentelles | 130 |
| 7.1 | Ligandensynthese | 130 |
| 7.2 | Synthese PhTerpy-Komplexe/Fe-MEPE | 130 |
| 7.3 | Schichtpräparation | 130 |
| 7.3.1 | Layer by Layer-Schichten | 131 |
| 7.3.2 | Tauchbeschichtungen | 131 |
| 7.3.3 | Poröse SiO ₂ -Schichten | 131 |
| 7.4 | Schichtcharakterisierung | 132 |
| 7.5 | Zellanalytik | 133 |
| 7.5.1 | Kultivierung | 134 |
| 7.5.2 | Zellzahlbestimmung | 134 |
| 7.5.3 | WST-1 Test (nach EN ISO 10993-5) | 134 |
| 7.5.4 | Fixierung von Zellen | 135 |
| 7.5.5 | Acridinorange-Färbung | 135 |
| 7.5.6 | Ferrozintest Zellen | 135 |
| 7.5.7 | Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase | 136 |
| 7.5.8 | qRT-PCR | 136 |
| 7.5.9 | Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 137 |
| 7.1 | Funktionalisierte Knochenzemente | 138 |

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | IX |
| <hr/> | |
| 7.1.1 Zementherstellung | 138 |
| 7.1.2 Herstellung von Metallionendotiertem α -TCP | 138 |
| 7.1.3 Charakterisierung | 138 |
| 7.1 Alginate | 139 |
| 7.1.1 Synthese des Terpy-DEG-NH ₂ -Liganden | 139 |
| 7.1.2 Synthese von funktionalisiertem Alginat | 140 |
| 7.1.3 Synthese von funktionalisierter Glucuronsäure | 142 |
| 7.1.4 Charakterisierung | 143 |
| 8 Abkürzungsverzeichnis | 144 |
| Anhang | 146 |
| Literaturverzeichnis | 153 |
| Danksagung | 166 |
| Ehrenwörtliche Erklärung | 171 |

1 Einleitung

Metallionen spielen seit über 2000 Jahren eine erhebliche Rolle in medizinischen Anwendungen. Den Römern war bereits die antibakterielle Wirkung von Kupfer- und Silberionen bekannt (1, 2). Ein beliebtes Therapeutikum um Sehschwächen bis hin zur beginnenden Blindheit zu heilen war eine Mischung aus Ammoniak, Grünspan und Gerbertinte in Essig (3). Im Mittelalter wandte Paracelsus Silberamalgam zur Ausleitung von Quecksilber in Bädern an (4). In sehr vielen grundlegenden Zellabläufen sind Metallionen involviert. Die Metallionen wirken als Katalysatoren, um etwa die Proteinstruktur aufrecht und den osmotischen Druck in der Zelle im Gleichgewicht zu halten. Metallionen, die für zelluläre Prozesse notwendig sind, werden auch als essenzielle Spurenelemente bezeichnet. Dazu gehören unter anderem Eisen, Kupfer, Kobalt, Zink, Nickel und Magnesium, um nur einige zu nennen (5). Die essenziellen Spurenelemente sind für eine geregelte Enzymaktivität verantwortlich. Fehlen diese Metalle kommt es zur Unterbrechung von verschiedenen Zellabläufen. Beispielsweise ist Eisen in Hämoglobin maßgeblich am Sauerstofftransport oder in Myoglobin zur Sauerstoffspeicherung im Muskel beteiligt (6). Somit liegt eine gezielte Einbringung von Metallionen in zelluläre Systeme nahe, um eine bestimmte Zellantwort zu generieren. Auch die Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen), Osteogenese (Knochenbildung) und antiinflammatorische Effekte (entzündungshemmend) sind mittels Metallionen beeinflussbar (7). Hohe Mengen an zellulärem Kupfer wurden während der Angiogenese in Endothelzellen detektiert (8). Außerdem stimulieren Kupfer-Ionen die Proliferation von humanen Endothelzellen und die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (9). Zink-Ionen zeigen antiinflammatorische Effekte und stimulieren die Knochenbildung *in vitro* (10). Hierbei kam die Frage auf, wie sich die Einbringung von Eisen, Cobalt und Nickel im Vergleich zu Zink Ionen auf die Differenzierungsfähigkeit verschiedener Zelltypen auswirkt. Literaturbekannt ist der Einfluss von Eisensalzen auf den Mineralisationsprozess der Knochen. Calcium, Zink, Magnesium, Strontium, Kupfer und Mangan Salze beeinflussen nachweislich die Differenzierung von Osteoblasten (11). Die Herausforderung hierbei stellt das Design eines Scaffold dar, welches sowohl kontrollierbare physikochemische Oberflächeneffekte als auch eine geeignete Oberflächentopografie und bioaktive Eigenschaften aufweist (12).

Die Angiogenese, Osteogenese und entzündungshemmende Eigenschaften haben wesentlichen Einfluss auf die Einheilung von Knochen- und Dentalimplantaten. Im Jahr 2015 wurden in Deutschland 200.000 künstliche Hüftgelenke und 150.000 künstliche Kniegelenke implantiert. Zusätzlich zu diesen 350.000 Operationen kamen die Eingriffe hinzu, die aufgrund von Infektionen, Lockerungen oder Materialfehlern wieder ausgetauscht werden mussten. Die Wechseloperationen lagen im Jahr 2015 bei 40.000 Operationen und betrug somit im

Schnitt 11% (13). Des Weiteren werden andere Gewebestrukturen durch die Operation verletzt. Beispielsweise werden Muskel- und Nervengewebe durchtrennt, um an das zu ersetzende Gelenk zu gelangen. Auch hierbei können Metallionen die Rehabilitation anregen (14). Da jede operative Implantation von körperfremden Materialien wiederum das Risiko birgt Infektion hervorzurufen, sind Forscher und Ärzte bestrebt die Implantationsmaterialien stetig weiterzuentwickeln (14). Ein Ansatz hierbei ist die selektive Integration von Metallionen in die Implantationsmaterialien, um die geförderte Einheilung zu begünstigen (15-17). Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Einheilung von Implantaten ist die Einbringung von immobilisierten Zellen in Defekte bzw. in die Kontaktareale von Implantat und körpereigenen Gewebe (18).

2 Metallionen in zellulären Systemen und biologische Grundlagen

2.1 Wirkung von Metallionen auf Zellen

Metallionen in der klinischen Medizin werden hauptsächlich als therapeutisches Reagenz, als diagnostisches Reagenz, als Nahrungsergänzungsmittel oder zur Chelat-Therapie eingesetzt. Therapeutische Agenzien sind beispielsweise Cisplatin als Chemotherapeutikum oder eine Mischung aus cyclischen Arsenverbindungen (Salvarsan) zur Heilung von Syphilis. Als diagnostische Reagenzien werden Eisen, Mangan und Gadolinium als MRT Kontrastmittel verwendet. Bei der Chelat-Therapie werden Chelatbildner wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) in Infusionslösungen zur Ausleitung von Schwermetallen und zur Anregung der Durchblutung verabreicht (19). Bei therapeutischen Reagenzien auf Basis von Metallionen ist vor allem eine lokalisierte und definierte Freisetzung der Metallionen wichtig, denn beispielsweise Fe(III)- und Cu(II)-Ionen können bei Konzentrationen im Bereich von 0,1 - 1 μM aktive Sauerstoffspezies generieren und es kann zu Peroxidation der Lipidmembran, DNA Schäden und Proteinoxidation führen (20).

Bei der Betrachtung der Osseointegration kam man zu folgenden Ergebnissen: Metallionen spielen eine wichtige Rolle in der Angiogenese, dem Wachstum bzw. Knochenbildung (Osteogenese) und der Mineralisation von Knochengewebe. Mit Angiogenese wird die Neubildung von Blutgefäßen bezeichnet, ohne die eine Einheilung von Implantaten nicht erzielt werden kann. Vor allem Cu(II)- und Co(II)-Ionen wirken stimulierend auf die Sekretion bestimmter Wachstumsfaktoren (VEGF über HIF-1). Durch die erhöhte Endothelzellenproliferation kommt es zu einer Stimulierung der Blutgefäßneubildung, welche notwendig ist, um umliegendes Gewebe mit Nährstoffen zu versorgen (21). Fan et al. versetzten 70-80% konfluent gewachsener Stroma Zellen aus dem Knochenmark (bone marrow stroma cells, kurz BMSCs) für eine Woche vor der Implantation im Tiermodell mit 100 μM CoCl_2 . Die Zellen wurden via qRT-PCR auf die VEGF Genexpression getestet. Die mit CoCl_2 behandelten Zellen zeigten eine dreifach höhere VEGF Expression als die unbehandelten Zellen. Die Studie zeigt, dass durch die Vorbehandlung der BMSCs mit CoCl_2 eine Erhöhung der Vaskularisierung im künstlichen Perioostmodell *in vivo* erreicht werden kann (22). Feng et al. untersuchten den Einfluss von geringen Konzentrationen von CuSO_4 (100-1000 ng mL^{-1}) auf immobilisierte humane Endothelzellen *in vitro* und auf die Vaskularisierung eines Kollagens-Scaffolds *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 50 ng mL^{-1} CuSO_4 im Zellkulturmedium die Endothelzellen in einem 3D-Fibrin Gel stimuliert globuläre bzw. tubuläre Strukturen auszubilden. Für die

in vivo Studie wurde in PBS gelöstes CuSO_4 auf ein dreidimensionales, zylindrisches Kollagengerüst aufgebracht.

Durch die eingebrachten Cu(II) -Ionen resultierte eine signifikante Invasion von Mikrogefäßen innerhalb des Kollagengerüsts im Vergleich zu den Kontrollimplantaten. Implantiert wurden die Scaffolds an der Außenseite des Oberschenkels direkt unter die Haut von Mäusen (23).

Die Osteogenese erfolgt über Stimulation der knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten. Ebenso wichtig sind die Osteoklasten. Diese resorbieren die gebildete Knochensubstanz und fungieren somit als Osteoblasten-Antagonisten. Beispielsweise Zn(II) - und Sr(II) -Ionen stimulieren die Osteoblasten Proliferation und hemmen zugleich die Osteoklasten Aktivität. Diese Ionen haben somit eine stimulierende und gleichzeitig eine inhibierende Funktion im Knochenstoffwechsel (21). Zhu et al. untersuchten die Effekte von Strontiumranelat auf die Expression der drei Osteoblasten spezifischen Gene *RunX2*, Knochen Sialoprotein (BSP) und Osteocalcin von BMSCs. Die Zellen wurden mit SrCl_2 (0,1-3 mM) und Natriumranelat (1-3 μM) inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von Sr(II) - Ionen nach 21 Tagen von Kossa positive Zellen ausbilden und eine erhöhte *RunX2* und Knochen-Sialoprotein Expression aufweisen. Ein Effekt auf die Osteocalcin Expression wurde nicht beobachtet (24).

Die Kationen Ca(II) und Mg(II) stimulieren über osteogene Marker ebenfalls die Osteoblasten Proliferation. Magnesium stimuliert zudem die Zelladhäsion über die Bindungsstellen der Integrine. Unter dem Begriff Integrine versteht man membranständige Glykoproteine, die aus zwei assoziierten Ketten (je eine α - und eine β -Peptidkette) aufgebaut und für die Zelladhäsion zwischen Zellen bzw. an Proteine der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (25, 26).

Auch Silizium ist aktiv an metabolischen Prozessen beteiligt und erhöht die Knochendichte (21). Ebenso haben Ni(II) - und Fe(II) -Ionen einen Einfluss auf den Mineralisationsprozess. Es wurde zum Beispiel im Hinblick auf Metallimplantate beobachtet, dass diese durch die Abgabe von Metallionen bei den Patienten vermehrt zu Oberschenkelhalsbrüchen führten. Es wurde beobachtet, dass nicht nur wie bereits bekannt Strontium-, Aluminium- und Eisenionen während des Mineralisationsprozesses im Knochen eingebaut werden, sondern auch Cobalt-, Chrom- und Nickelionen.

Bei der Wechselwirkung von Oberflächen und Zellen sind es nicht nur die Metallionen, die die Zellen beeinflussen können. Im folgenden Kapitel werden die Effekte beschrieben.

2.2 Oberflächeneffekte

Betrachtet man die Grenzfläche zwischen einer funktionalisierten Oberfläche und einer adhären Zelle, so beeinflusst die Beschichtung die Zelle über physikalische Größen,

beispielsweise der Kontaktwinkel, das E-Modul, die Rauigkeit und die Oberflächenladung spielen eine erhebliche Rolle für Zelladhäsion und Proliferation (27). Dabei muss zwischen den einzelnen Zelltypen in den Zellkulturen unterschieden werden. Für Fibroblasten gilt beispielsweise je glatter die Oberfläche, desto besser ist die Zelladhäsion und auch die Proliferation ist abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit (28). Bei myoblastären C2C12-Zellen hat die Rauigkeit keinerlei Einfluss auf Zellanlagerung, Proliferation oder die ALP Expression (29). Für die Standardzellkultur werden Zellkulturoberflächen so entwickelt und funktionalisiert, dass ein weites Spektrum an Zellen adhären und proliferieren kann. Beispielsweise wird dies durch Einbringung von Oberflächenladungen generiert. Um eine positive geladene Oberfläche zu schaffen, kann man z.B. Amin-Gruppen und zur Generierung einer negativen Ladung Carboxy-Gruppen auf die Oberfläche anbringen (30). Ziel ist es eine Oberfläche zu generieren, auf der spezifische Zelladhäsion stattfinden kann. Dies kann realisiert werden, indem Modifikationen auf die Oberfläche eingebracht werden, beispielsweise, die Anbindung von bestimmten Peptiden, die selektiv von spezifischen Zelltypen erkannt werden (31). Es können Biomakromoleküle für eine spezifische Zell-Matrix Interaktion in Form von beispielsweise ECM Proteine wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin auf die Oberflächen ausgebracht bzw. angebunden werden.

Neben organischen Polymeren werden auch anorganische Substrate, wie zum Beispiel Kalziumphosphate speziell als Knochenimplantate verwendet. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich die Verwendung von Hydroxylapatit positiv auf die Proliferation von osteogenen Zellen und oder osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) auswirken kann (32-34). Weiterhin können Kalziumphosphate mit osteogenen Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise BMP-2 kombiniert werden, was in einer nachgewiesenen Heilung der Knochendefekte *in vivo* resultiert (35, 36). Trotz der hohen Anwendungspotentiale für die Verwendung von Wachstumsfaktoren bergen diese als therapeutisches Mittel auch Risiken. Während es bei physikalisch adsorbierter GFs zu einem nicht gewünschten Burst-Effekt kommt, zeigen kovalent angebundene GFs einen Verlust an Bioaktivität (37).

Auch bestimmte Metallionen zeigen ähnliche Effekte auf Zellen wie Wachstumsfaktoren. Zum Beispiel stimulieren Kupferionen die Angiogenese ebenso wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) (23, 38).

Andere Metallionen wurden hinsichtlich ihres spezifischen Einflusses auf Zellen und spezifischen Zellreaktionen getestet. Beispielsweise wurde bei der Zugabe von Mn(II)-Ionen eine Aktivierung spezifischer Integrine beobachtet (39). Die Aktivierung wird durch eine Konformationsänderung der Integrin Untereinheit erreicht (21-22). Im Normalfall sind Ca(II)-Ionen in der Untereinheit der β_3 Untereinheit komplexiert. Wird Mn(II) zum System hinzugefügt, werden die Ca(II)-Ionen verdrängt und durch die Komplexbildung des Mn(II) sowie die Änderung der Konformation wird das System aktiviert. Diese Konformationsänderung wirkt sich auf die

Disulfidbrücken des Integrins aus. Ebenso können Fe(II)-Ionen die Untereinheit beeinflussen und über das Integrin β_3 in die Zelle gelangen. Für die C2C12-Zellen spielt die Rauigkeit und das E-Modul eine erhebliche Rolle in Bezug auf die Tendenz, myogen zu differenzieren. Die myogene Differenzierung wird im Fall der C2C12-Zellen durch geringe Rauigkeiten und hohe Steifigkeiten des Substrats gefördert (40).

Vorraussetzung für eine erfolgreiche Zellanlagerung ist zum einen die Proteinadsorption auf der zu besiedelnden Oberfläche. Proteine adsorbieren rasch auf Oberflächen welche den hydrophoben Kontakt mit der wässrigen Phase minimieren, somit ist die Adhäsion bei abnehmender Benetzbarkeit begünstigt (41). Zum anderen können geladene Proteine mit komplementär geladenen Oberflächen interagieren (42). Diese elektrostatischen Wechselwirkungen sind jedoch schwächer als die hydrophoben Effekte, da die Ladungen der Proteine durch Wassermoleküle und Ionen abgeschirmt werden (43).

Zusammenfassend sind sowohl die mechanischen Eigenschaften als auch die chemischen Eigenschaften der modifizierten Oberflächen relevant für die Adhäsion und Proliferation von Zellen. Beide Eigenschaften haben erheblichen Einfluss auf das Zellverhalten.

2.3 Biologische Grundlagen

Um die Anwendung für Materialien für zelluläre Systeme zu prüfen, muss zunächst sichergestellt werden, dass das zu testende Material nicht zytotoxisch auf den zu testenden Zelltyp wirkt. Laut DIN EN ISO 10993-5 werden für Zytotoxizitätsuntersuchungen ausschließlich etablierte Zelllinien verwendet. In dieser Arbeit wurden hierzu adhärente Mausfibroblasten der Zelllinie L929 verwendet (44). Um einen genauen Einblick auf den Einfluss auf zelluläre Systeme zu bekommen werden spezifischere Zellen verwendet. Zum einen werden myogene Vorläuferzellen (C2C12-Zellen) untersucht, welche fähig sind in Richtung Muskel zu differenzieren (myogene Differenzierung), zum anderen humane Osteosarcomzellen (MG63-Zellen) und humane mesenchymale Stammzellen hinsichtlich ihrer osteogenen Differenzierung.

2.3.1 Myogene Differenzierung

Die Muskulatur macht ungefähr 50% des Körpergewichtes aus und es wird deutlich welche Tragweite Defekte im Zusammenschluss von Myofibrillen auf den Bewegungsapparat haben (45). Die Skelettmuskulatur stellt ein sehr komplexes und heterogenes Gewebe dar. Die Muskulatur hat mehrere Funktionen im Körper. Muskelfasern sind in der Lage, via Kontraktion Bewegung und Kraft zu erzeugen. Zudem besitzt die Skelettmuskulatur eine erhebliche Stützfunktion für das Skelett (46). Die myogene Differenzierung unterliegt einer strengen Abfolge an Expression myogener Regulationsfaktoren (MRFs). Diese werden in primäre und

sekundäre MRFs unterteilt. Die primären MRFs detektieren einen frühen Zeitpunkt der myogenen Differenzierung. Im adulten Muskel dienen die Satellitenzellen zur Regeneration geschädigter Muskelpartien. Kommt es aufgrund eines Traumas zu einer Schädigung der Muskulatur, werden die in der Muskulatur vorhandenen Satellitenzellen aktiviert. Diese migrieren zum Ort der Verletzung, proliferieren zu Myoblasten und differenzieren im letzten Schritt zu Muskelfasern (siehe Abbildung 1).

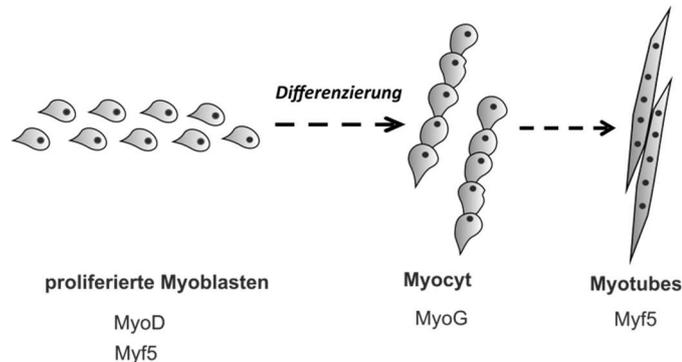


Abbildung 1. Übersicht der Expression der beteiligten primären und sekundären myogenen Regulationsfaktoren (MRFs) zu den jeweiligen Differenzierungsschritten von proliferierten Myoblasten hin zu Myotubes. Bei der Initiierung der Differenzierung werden MyoD und Myf5 hoch reguliert und es entstehen mehrkernige Myocyten. Final entstehen durch die MyoG und Myf-5 Expression Muskelfasern (47).

Nachdem die Satellitenzellen durch äußeren Stimulus aktiviert wurden und myoblastäre Zellen ausgebildet haben, beginnt die eigentliche Differenzierung. In diesem frühen Stadium der Differenzierung werden die primären MRFs, Myf5 und MyoD, hoch reguliert. Ist dies der Fall, entstehen mehrkernige Myocyten. Im späten und finalen Stadium der Differenzierung bilden sich mittels Expressieren der MRFs MyoG und Myf-6 Myotubes und somit Muskelfasern aus (47).

Eine etablierte Ziellinie, um den Einfluss von funktionalisierten Oberflächen auf die myogene Differenzierbarkeit von Zellen zu testen, sind C2C12-Zellen. Diese Zellen stammen aus C3H Mäusen und ähneln embryonalen Myoblasten (48). Hierbei handelt es sich um eine Inzuchtlinie, bei der die einzelnen Tiere durch lange Inzucht einen fast identischen Genotyp aufweisen (49).

Die Differenzierung der C2C12-Zellen *in vitro* erfolgt mittels Serumentzug. Hierzu werden die Zellen zunächst in Medium mit 10% FCS kultiviert und anschließend auf 1-2% FCS haltiges Medium reduziert. Diese Zugabe von sogenanntem Hungermedium führt bei C2C12-Zellen zur Initiierung der Differenzierung (50, 51). Die Zellaktivität kann ein erstes Indiz hin zur Differenzierung sein, denn wird MyoD-1 im frühen Differenzierungsstadiums hoch reguliert, kommt es zur Hemmung des Zellzyklus und die myogene Differenzierung der C2C12-Zellen *in vitro*

wird initiiert (50, 52). Um die Initiierung der Differenzierung bestätigen zu können, müssen die Expressionsraten der myogenen Regulationsfaktoren auf mRNA Basis analysiert werden. Zusätzlich ist die Bestimmung der Expression des β_3 Integrin wichtig, da dieses Protein zum einen eine wichtige Rolle bei der C2C12 Zelladhäsion und zum anderen bei der Fe(II)-Aufnahme und der Differenzierung spielt (39).

2.3.2 Osteogene Differenzierung

Die Bildung von Knochen erfolgt mittels spezialisierter Zellen, den Osteoblasten. Diese Zellen sind in der Lage, Calciumionen einzulagern und Apatit zu bilden. Knochen besteht zu 20% aus Wasser, aus 20% organischen und 60% mineralischen Bestandteilen (53, 54).

Die osteogene Differenzierung erfolgt ebenso wie die myogene Differenzierung schrittweise. Hierbei wird in der Literatur zum einen von einem dreistufigen Prozess ausgegangen. Im ersten Schritt proliferieren die Zellen. Anschließend bildet sich die extrazelluläre Matrix und abschließend folgt die Mineralisation. Während der Bildung der extrazellulären Matrix produzieren die Osteoblasten Kollagen Typ-I, Osteocalcin, Osteopontin und vermehrt alkalische Phosphatase (ALP). Durch die hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Phosphat, welches mit freien Calciumionen den mineralischen Teil des Knochens ausbildet (55). Dieser Effekt wird in der Literatur auch als „booster hypothesis“ bezeichnet (56).

Die Arbeitsgruppe um Collin et al. geht hingegen davon aus, dass die Differenzierung in vier Schritten abläuft. Zunächst erfolgt die Proliferation der Zellen. Anschließend lagern sich die Zellen zu Clustern bzw. zu Zellinseln zusammen und beginnen mit der Ausbildung der extrazellulären Matrix. Ist die Matrixbildung abgeschlossen, so beginnt die Mineralisation. Somit bezeichnen Collin et al. die Zusammenlagerung der einzelnen Zellen vor der Matrixbildung als separaten Schritt (57). Um nun die einzelnen Schritte detektieren zu können, werden die Differenzierungsmarker Osteocalcin und ALP betrachtet. Bei Beginn der osteogenen Differenzierung wird zunächst ALP hoch reguliert, wobei das Osteocalcin primär im Mineralisationsschritt exprimiert wird.

Der Differenzierungsmechanismus der hMSCs mit seinen komplexen Signalwegen und Regulationsfaktoren ist noch nicht eindeutig geklärt. Dadurch herrschen in der gängigen Literatur verschiedene Herangehensweisen und Betrachtungsweisen der osteogenen Differenzierung. Beispielsweise gehen Collin et al. davon aus, dass es zwei Isoformen des ALP gibt. Somit wird ALP laut Collin am Anfang und am Ende der Differenzierung exprimiert (57). Wobei Owen et al. davon ausgehen, dass ALP linear während Differenzierung ansteigt und vor der Mineralisation drastisch abnimmt (58).

Unter alkalischer Phosphatase versteht man ein membranständiges Glykoprotein, welches zu Beginn der Mineralisation der Knochenmatrix seine Aktivität drastisch erhöht (59). Hierdurch kann die osteogene Differenzierung mittels Analyse der ALP-Aktivität charakterisiert werden. Die Aktivität dieses Enzyms kann durch Zugabe von 4-Nitrophenolphosphat zum Zelllysate kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405\text{nm}$ bestimmt werden. Hierbei spaltet ALP die vorhandene Phosphatgruppe ab und die Lösung verfärbt sich aufgrund der Bildung von 4-Nitrophenol gelb.

Über die p-Nitrophenolbildung kann die Enzymaktivität der Zellen bestimmt werden. Die Grundlage hierzu resultiert aus der Michaelis und Menton Gleichung. Die alkalische Phosphatase fungiert in der obigen Reaktion als Katalysator und man kann folgende Reaktionsgleichungen formulieren:



Aus (1) ergibt sich für die Geschwindigkeit v

$$v = \frac{dc_P}{dt} = k_2 c_{ES} \quad (2)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = -k_1 c_E c_S + k_{-1} c_{ES} \quad (3)$$

$$\frac{dc_E}{dt} = -k_1 c_E c_S + k_{-1} c_{ES} + k_2 c_{ES} \quad (4)$$

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E c_S - k_{-1} c_{ES} - k_2 c_{ES} \quad (5)$$

Ist die Substratkonzentration (c_S) im Überschuss und die Enzymsubstratkomplex Konzentration unverändert so erhält man aus Gleichung (5):

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E c_S - k_{-1} c_{ES} - k_2 c_{ES} = 0 \quad (6)$$

Stellt man Gleichung (6) um so erhält man die Michaeliskonstante K_M :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{c_E} = \frac{c_E c_S}{c_{ES}} \quad (7)$$

$$(8)$$

$$\text{mit } c_E(t) = c_E(0) - c_{ES}(t)$$

$$\text{und } K_M = \frac{(c_E(0) - c_{ES})c_S}{c_{ES}} \quad (9)$$

$$\text{folgt } \frac{dc_P}{dt} = k_2 \frac{c_E(0)c_S}{K_M + c_S} \quad (10)$$

Es gibt zwei Sonderfälle:

$$1. \quad c_S \ll c_E$$

Ist die Enzymkonzentration sehr viel größer als die Substratkonzentration, so ergibt sich für die Produktbildungsgeschwindigkeit v eine Proportionalität zur anfänglichen Substratkonzentration $c_S(0)$:

$$\frac{dc_P}{dt} = k_2 \frac{c_E(0)c_S(0)}{K_M} \quad (11)$$

$$2. \quad c_S \gg c_E$$

Ist die Substratkonzentration sehr viel größer als die Enzymkonzentration so ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} proportional zur Enzymkonzentration c_P :

$$\frac{dc_P}{dt} = k_2 c_E(0) = v_{max} \quad (12)$$

Die ALP-Aktivität ist zudem von der Zelldichte abhängig. Sind die Zellen konfluent, so zeigen 30% der Zellen ALP-Aktivität. Bei Subkonfluenz ist der Anteil an ALP aktiven Zellen deutlich geringer (55).

Osteocalcin hingegen erreicht sein Expressionsmaximum mit Beginn der Mineralisation. Laut Bronckers et al. findet man eine erhöhte Osteocalcin-Expression sowohl in Osteoblasten als auch in Osteozyten (60). Somit wird Osteocalcin frühestens im reifen Osteoblast exprimiert (61). Hierbei wird ALP auf mRNA Basis schrittweise wieder herunter reguliert.



Abbildung 2: Zusammenfassung der osteogenen Differenzierungsschritte der hMSCs mit Einteilung der ALP bzw. Osteocalcin-Genexpression.

Um die Clusterbildung der festgelegten hMSCs, d.h. Schritt 2 der Differenzierung nach Collin et al., detektieren zu können, wurden zu den Mikroskopie-Aufnahmen Färbungen der Zellkulturen durchgeführt. Hierbei können eingelagerte Ca(II)-Ionen, welche für die Mineralisation des Knochens notwendig sind, mit Alizarin komplexiert werden. Bei der Alizarin-Rot-Färbung werden die Zellen in Kultur zunächst fixiert und anschließend mit einer Alizarin-Rot Lösung behandelt. Während des Färbeprozesses werden Ca(II)-Ionen chelatisiert und stellen sich anschließend rot auf der Mikroskop Aufnahme dar.

Eine etablierte Zelllinie zur Untersuchung osteogenen Differenzierung sind MG63-Zellen. Die MG63-Zellen werden aus Knochentumoren gewonnen und haben somit ein 2-3 Fach höhere Teilungsrates als Osteoblasten. Des Weiteren unterscheidet sich die Zelllinie von primären Zellen durch ihre Größe. MG63-Zellen sind ca. 1/6 so groß wie primäre, humane Osteoblasten und verändern ihre Größe bei Konfluenz nicht. Ebenso unterscheiden sich die ALP-Aktivitäten der MG63-Zellen zu den primären Zellen. Die Arbeitsgruppe Pautke et al. konnte keinerlei ALP-Aktivität im Fall der MG63-Zellen detektieren (62).

Clover et al. beobachteten nach Zugabe von 10^{-8} M Calcitriol eine 10-fach höhere ALP-Aktivität der humanen Knochenzellen als bei der korrespondierenden MG63 Zelllinie (63).

Beide Arbeitsgruppen diskutierten die Vor- und Nachteile über Verwendung von MG63-Zellen als Modell für primäre humane Knochenzellen, die bei den jeweiligen Untersuchungen berücksichtigt werden müssen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass für den Nachweis der osteogenen Differenzierung im Gegensatz zur myogenen Differenzierung es nicht ausreicht, lediglich die Regulationsfaktoren zu betrachten. Es kann mittels der analysierten osteogenen Gene nachverfolgt werden, ob und in welchem Zellstadium sich die Mehrzahl der eingesetzten hMSCs befinden. Es kann jedoch nur ein Mittelwert der Zellen dargestellt werden.

Durch die Verwendung von primären Zellen besteht die Möglichkeit, dass sich nicht alle Zellen immer im gleichen Differenzierungsschritt befinden. Somit ist es möglich, dass sowohl ALP als auch Osteocalcin exprimiert werden. Weitere Faktoren wie der Entnahmeort, die Menge (64) sowie das Geschlecht des Spenders spielen ebenso eine Rolle wie die Entnahmetechnik und auch die Isolationsmethode haben Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen. So kann es zu unterschiedlichen Ergebnissen für verschiedene Entnahmeorte, -zeiten und auch für verschiedene Spender kommen.

Stand der Technik für die Knochengewebsherstellung *in vitro* aus multipotenten Stammzellen ist die Stimulierung der Differenzierung in Richtung Knochen mittels Zugabe von BMP-2, Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (65). Hierbei fördert Dexamethason primär die Proliferation und somit den ersten Differenzierungsschritt (66). Die zugegebene Ascorbinsäure aktiviert die ALP und unterstützt die Bildung von Osteocalcin (67).

2.4 Knochenzemente

Knochenzemente werden zur Heilung von Knochenverlusten eingesetzt. Knochenimplantate bzw. Knochenersatz wird dann benötigt, wenn der Knochenverlust einen kritischen Wert übersteigt. Dieser wird als „critical size defect“ bezeichnet und definiert die kleinste Knochenwunde, welche nicht mehr spontan abheilen kann, ohne dass Bindegewebe im Defekt einwächst und die Wiederherstellung des Knochens verhindert (68). Die Ursachen für Knochenverluste sind vielfältig. Sie können durch Traumata, pathologisch oder durch Resorption der Knochenmatrix erfolgen.

Der heutige Stand der Technik für Fixationen bzw. Knochenreparaturen sieht die Verwendung von Metalllegierungen wie Edelstahl, Titan oder ähnliche Metallzusammensetzungen vor. Bedenkt man, dass natürlicher Knochen aus 60% Mineral besteht so wird deutlich, dass der heutige Stand der Technik natürlichem Knochengewebe nicht gerecht werden kann.

Die Knochenverluste werden mit knochenfremdem Material ausgebessert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass aufgrund von Fremdkörperreaktionen, wie Einkapselung bzw. entzündliche Prozesse 11% der eingesetzten Implantate ersetzt werden müssen (13).

Anzumerken ist zudem, dass die Legierungen Metallionen abgeben und somit den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Zudem sind die eingesetzten Metallimplantate nicht biodegradierbar (69).

Der „goldene Standard“ für ein ideales Ersatzmaterial ist körpereigener, spongiöser Knochen aus dem Beckenkamm. Leider ist spongiöser Knochen nicht in ausreichender Menge vorhanden, um Knochendefekte aufzufüllen. Durch die hohe Infektionsgefahr entfallen in diesem Fall auch humane bzw. tierische Fremdspender (70).

Um ein geeignetes künstliches Implantat Material herstellen zu können, muss man sich den natürlichen Knochen genauer betrachten. Dieser besteht zu ca. 20% aus einer Kollagen Matrix, zu 60% aus Mineral und zu 20% aus Wasser. Die Matrix verhilft dem Knochen zu seiner Zugfestigkeit. Das Mineral besteht aus Calcium-Phosphat, dem Hydroxylapatit, und ist verantwortlich für die enormen Druckstabilitäten, denen Knochen trotzen können (53, 54). Im Körper wird zwischen kortikalem und spongiösem Knochen unterschieden. Diese unterscheiden sich in Ihrer Struktur und dadurch auch in den Druckstabilitäten.

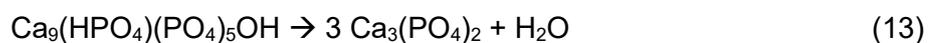
Knochenimplantate müssen folgende Anforderungen erfüllen: Zum einen sollte die Porosität einige 100µm betragen, damit eine Vaskularisierung problemlos möglich ist. Zum anderen muss das Material resorbierbar und somit biodegradierbar sein, damit der neugebildete Knochen das Implantat verdrängen kann. Diese Resorption sollte zwischen einigen Monaten und

Jahren liegen, abhängig vom Grad des Knochenverlusts. Zudem muss eine ausreichende mechanische Stabilität gewährleistet sein (70). Im Bereich Biomaterialien werden die degradierbaren von den nicht biodegradierbaren Materialien unterschieden. Meist muss jedoch ein Kompromiss aus degradierbar und mechanischer Stabilität eingegangen werden, denn die meisten degradierbaren Materialien zeigen geringe mechanische Stabilität, welche für Knochenersatzsysteme aber essenziell sind.

Zu den degradierbaren Biomaterialien zählen beispielsweise Kollagen, Chitosan und Polymilchsäure, um nur einige zu nennen. Die Druckstabilität von Kollagen beträgt 0,5 - 1 MPa, bei Chitosan 1,7 - 3,4 MPa und von Polymilchsäure 20 - 30 MPa. Hieraus ist ersichtlich, dass diese Materialien als Zusatz zu Knochenimplantaten verwendet werden können, jedoch nicht als Trägermaterial allein. Auch aus der natürlichen Knochenstruktur wird deutlich, dass Kollagen hierbei 30% der Knochensubstanz ausmacht. Dafür können diese Materialien in relativ kurzer Zeit vom Körper resorbiert werden. Kollagen hat eine Degradationszeit von 2-4 Monaten. Chitosan verbleibt zweimal bis dreimal solange im Körper (4-6 Monate). Die Degradationszeit für Polymilchsäure beträgt dagegen schon über 24 Monate. Diese besitzt auch in Bezug auf ihre mechanischen Eigenschaften eine um 10 Größenordnungen höhere Druckstabilität als Kollagen und Chitosan (71). Kollagen und Chitosan gehören zu den natürlich vorkommenden biodegradierbaren Polymeren, Polymilchsäure wird hingegen synthetisch hergestellt. Hydroxylapatit zählt zu den Biokeramiken. Die Vorteile von Biokeramiken bestehen in der guten Biokompatibilität, diese Materialien sind zudem enorm bioaktiv. Außerdem sind Keramiken im Vergleich zu Metalllegierungen korrosionsbeständiger. Durch die hohen Druckstabilitäten sind Keramiken sehr starr und dadurch sehr spröde (72, 73). Hydroxylapatit (HA) zählt ebenfalls zu den degradierbaren Biomaterialien und wird den Calcium-Phosphat Zementen zugeordnet. Diese werden in den schon genannten Hydroxylapatit, Monetit und Bruschit unterteilt.

Calcium-Phosphat Zemente können mittels Mischung von Orthophosphaten mit einer wässrigen Elektrolytlösung hergestellt werden. Hierbei spielen der pH-Wert und die Temperatur eine erhebliche Rolle für das Endprodukt. Unter physiologischen Bedingungen (37°C) und einem pH-Wert von > 4,2 entsteht nanokristalliner Hydroxylapatit. Sinkt der pH unter den Wert von 4,2 so entsteht Bruschit (74).

Die Orthophosphat Vorstufen für die Zementherstellung können nicht nasschemisch aus wässriger Lösung gefällt werden. Die Tricalciumphosphate (TCP) werden mittels Kalzinierens aus Hydroxylapatit gewonnen.



Im Fall des „echten Calciumorthophosphat“, dem β -TCP, erfolgt das Kalzinieren bei einer Temperatur von 800°C . Für die metastabile Hochtemperaturphase benötigt man Temperaturen von $T > 1125^\circ\text{C}$. Hierbei wird α -TCP erhalten, welches mittels einer 2,5%igen Na_2HPO_4 -Lösung zu HA aushärtet. Der gebildete Hydroxylapatit ist, vergleichbar mit biologischem Apatit, nanokristallin (70).

Die Hydroxylapatit-Bildung als Endprodukt der Abbinde-Reaktion von α -TCP mit NaHPO_4 -Lösung erfolgt durch die unterschiedlichen Löslichkeiten des Edukts bzw. des Produkts. Es kommt beim Mischen zur Übersättigung der Reaktionsphase und HA fällt aus. Die Bildung des Zements ist somit stark mit der Löslichkeit und daher mit der spezifischen Oberfläche der einzelnen Komponenten verknüpft. Somit haben Partikelgröße sowie die thermodynamische bzw. die kinetische Löslichkeit maßgeblich Einfluss auf das Abbinde-Verhalten und die Eigenschaften des abgebundenen Zements (75, 76). Das β -TCP ist die stabilere Form, was zu geringerer Reaktivität und geringerer Löslichkeit führt. Aus diesem Grund werden in der Biomedizin Mischungen von β -TCP und HA als Knochenersatz verwendet (70).

Knochenzemente werden seit den 1970er Jahren produziert und bereits seit den 1980ern in der Klinik angewandt (77). Die kommerziellen Knochenzemente erreichen Druckstabilitäten von bis zu 1000 MPa. Die Degradationsrate liegt bei über 24 Monaten. Betrachtet man andere Calciumphosphate wird deutlich, dass durch Variation des Calciumphosphats die Degradierbarkeit reduziert werden kann. Die Reduktion der Degradationsrate geht auf Kosten der mechanischen Stabilität (siehe Tabelle 1) (69).

Tabelle 1: Übersicht Druckstabilitäten und Degradationsraten von Calciumphosphaten nach (69).

| | Druckfestigkeit (MPa) | Degradationsrate (Monate) |
|-----------------|-----------------------|---------------------------|
| HA | 500-1000 | >24 |
| TCP | 154 | >24 |
| Bruschit | 35-60 | >24 |
| Monetit | 15-25 | 3-6 |

Funktionalisierte HA Knochenzemente sind vor allem im Hinblick auf durch Traumata erworbene Knochenverluste als Knochenersatzmaterial interessant. Diese können durch Tumore oder mechanische Einwirkungen oder Osteoporose entstehen. Eine weitere wichtige Methode ist die Einbringung von Metallionen, um die Einheilung von Implantaten zu begünstigen.

Der Stand der Technik ermöglicht hierbei zum einen das nachträgliche Aufbringen von Metallsalzlösungen auf den HA-Zement und zum anderen die Zugabe der Metallsalzlösungen vor dem Kalzinieren des α -TCPs (16, 17). Problematisch ist hierbei, dass es während der Synthese zum Einbau der Metallionen in die HA-Matrix und den Verlust der mechanischen Eigenschaften kommt.

2.5 Alginat-Gele

Alginat sind Salze der Alginsäure und gehören zur Substanzklasse der unverzweigten Polysaccharide. Die beiden Untereinheiten α -L-Glucuronsäure (**G**) und β -D-Mannuronsäure (**M**) sind 1,4-glykosidisch miteinander verknüpft (78). Diese Uronsäureuntereinheiten bilden Blockcopolymere mit **G**- und **M**-Blöcken, die homogen und alternierend aufgebaut sind. Das Verhältnis der **M**- zu **G**-Monomere schwankt innerhalb der Polymerkette, ist abhängig von der Alginatquelle und beeinflusst die Eigenschaften des resultierenden Hydrogels (79). Durch die vorhandenen Carboxylgruppen ist es möglich, die Polymerketten mithilfe zweiwertiger Kationen koordinativ zu vernetzen. Die daraus resultierende 3D-Struktur wird in der Literatur als „egg-box“ beschrieben (80). Beispielsweise bindet Ca(II) -Ionen an die **G**-Untereinheiten. Durch die Vernetzung von 4 **G**-Untereinheiten bilden die G-Blöcke Hohlräume, in denen das zugegebene multivalente Ion koordiniert ist. Das daraus resultierende 3D-Netzwerk ist in der Lage, Zellen zu organisieren, diese mechanisch abzuschirmen und die Zellen passiv durch Diffusion mit Nährstoffen zu versorgen. Es müssen zudem eine Sauerstoffversorgung und der Abtransport verstoffwechselte Abfallprodukte möglich sein. Alginat haben durch die Fähigkeit Hydrogele bei Metallionenzugabe auszubilden ein weites Anwendungsfeld. Im Bereich Biomaterialien sind die Hydrogele beispielsweise sehr interessant als Scaffolds für Tissue Engineering oder auch als passiver Wirkstofftransporteur für Medikamente oder als Modell einer extrazellulären Matrix (81).

Hydrogele zeichnen sich dahingehen aus, dass sie Wasser adsorbieren und quellen ohne sich aufzulösen (82). Gele auf Alginat Basis können mit hydrophilen und hydrophoben Materialien wechselwirken, sind nicht zytotoxisch und können in ihren adhäsiven und mechanischen Eigenschaften variiert werden. Weiterhin sind Alginat-Hydrogele vor allem für Zellimmobilisierung und Zelltransplantation interessant. Somit können Zellen gezielt an die vorgesehene Stelle im Patienten injiziert bzw. eingebracht werden. Dazu müssen die Parameter wie Gelpunkt, Steifigkeit, Degradation und Zellwechselwirkungen kontrollierbar sein. Ein Einfluss auf die eben genannten Parameter ist chemisch bzw. physikalisch möglich (18).

Die meisten Zelltypen sind adhärente Zellen, das heißt um die Zellfunktionen wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose steuern zu können, müssen die Zellen auf einem festen Medium anhaften (83, 84). Für die Anheftung auf einer Oberfläche wechselwirken die Integrine mit den sogenannten Anheftungsproteinen wie Fibronectin und Laminin. Die Problematik bei hydrophilen Polymeren ist die geringe Proteinadsorption. Fibronectin kann nur minimal die Oberfläche benetzen und somit ist es den Zellen nur schwer möglich die Hydrogele zu besiedeln (85). In unfunktionalisierten Alginat Gelen ist eine Kultivierung der Zellen als multizelluläre Aggregate Voraussetzung für die Vitalität der Zellen (86). Durch die kovalente Funktionalisierung der Carboxylgruppen der Untereinheiten ist es somit möglich, die Zelladhäsion

zu steuern. Um eine Spezifität der Zell-Alginat Wechselwirkung zu generieren, haben Rowley et al. spezifische Adhäsionsmoleküle wie Peptide mit RGD Sequenzen mittels Carbodiimid Chemie koordinativ an das Alginat Grundgerüst gebunden (87). Außerdem ist es möglich durch andere Metallionen die Vernetzung und die Alginat-Zellwechselwirkung zu beeinflussen. Beispielsweise koordinieren Fe(III)-Ionen die G-Untereinheiten zu einem 3D-Hydrogel. Dies mit Fe(III)-Ionen gelierten Hydrogele zeichnen sich durch eine höhere Zelladhäsion aus (88, 89).

Es ist möglich Alginat-Hydrogele mithilfe einer Citratlösung wieder zu verflüssigen (90), um die Zellen auf ihre Vitalität zu untersuchen.

Es gibt mehrere Möglichkeiten für die Zelle mit dem funktionalisierten Alginat in Wechselwirkung zu treten. Zum einen ist es Metallionen möglich, Proteine zu binden, beispielsweise wird Lactoferrin selektiv von Fe(II)-Ionen gebunden (91). Des Weiteren können durch Koordination Proteine an das Alginat komplexiert und modifiziert werden. Außerdem ist es möglich, durch die Wahl des Metallions, welches für die Netzwerkbildung des Alginats verwendet wird, sowohl Einfluss auf die Gel-Eigenschaften als auch auf die zellulären Wechselwirkungen mit dem 3D-Alginat-Netzwerk zu nehmen.

2.6 Metallo-supramolekulare Koordinationspolyelektrolyte als Testsysteme

Koordinationspolymere stellen organisch-anorganische Hybridmaterialien dar. Diese Hybridmaterialien bestehen meist aus organischen Linkern, die eine Sauerstoff- oder Stickstoffdonor-Funktion beinhaltet, und Elektronenakzeptoren wie beispielsweise Metallionen. Während der Bindungsbildung gibt nicht nur der Elektronendonator (Ligand) Elektronen an die unbesetzten d-Orbitale des Metallions ab, es werden zudem Elektronen aus den d-Orbitalen in die unbesetzten π^* -Orbitale des Liganden abgegeben. Die Bindungsverhältnisse in metallo-supramolekularen Koordinationspolyelektrolyten (MEPE) als Ligand-Metallionen-System wird mit einer koordinativen Bindung beschrieben. Bei Bildung einer koordinativen Bindung wird ein Komplex gebildet, indem sich ein Metallion und der eingetretene Ligand ein Elektronenpaar teilen (92). Der Begriff Supramolekulare Chemie wurde primär durch Jean-Marie Lehn definiert und geprägt. Es beschreibt die Chemie des molekularen Zusammenschlusses und der intermolekularen Bindung, sozusagen die Chemie jenseits des Moleküls. So resultieren aus einer Assoziation von Molekülen durch Selbstorganisation supramolekulare Systeme, in denen

nichtkovalente intramolekulare Kräfte wirken. Zu den nichtkovalenten intramolekularen Kräften gehören elektrostatische und van der Waals Kräfte oder hydrophobe Effekte, Metallkoordination, π - π stacking und Wasserstoffbrückenbindungen (93).

Unter dem Begriff Polyelektrolyt versteht man wasserlösliche Polymere, welche ionische, dissoziierbare Gruppen tragen und deren Ladung durch Gegenionen im Lösemittel kompensiert wird. Die Konformation des Polyelektrolyten in der Lösung hängt von der freien Ladung am Kettengerüst ab. Handelt es sich um ein hochgeladenes Polymermolekül, kommt es zu elektrostatischer Abstoßung der einzelnen Kettensegmente und es resultiert eine stark gestreckte, stäbchenförmige Konformation. Werden der Lösung nun Ionen zur Abschirmung der Ladung zugegeben, kann es aufgrund der fehlenden abstoßenden Kräfte zu einer Knäuel-Bildung des Polymers kommen. Auch die Konzentration des Polyelektrolyten hat auf dessen Konformation und Konfiguration eine erhebliche Auswirkung. Bei geringen Konzentrationen befinden sich die ladungsausgleichenden Gegenionen primär im äußeren Bereich des Polymers. Dadurch kommt es zu repulsiven Wechselwirkungen der Kettensegmente und es liegt eine eher ausgedehnte, gestreckte Form des Polyelektrolyten vor (94).

In dieser Arbeit wurde primär der starre ditope 1,4-Bis(2,2':6',2''-terpyridin-4'-yl)benzen Ligand mit Phenylspacer zur MEPE Herstellung verwendet (siehe Abbildung 3). Die Herstellung dieser stäbchenförmigen Ketten erfolgt in essigsaurer Lösung via Selbstorganisation (self assembly). Der Liganden ist in Wasser nur gering löslich, die Koordinationspolymere sind aufgrund ihrer Ladung wasserlöslich. Lediglich 0,049 g L⁻¹ 2,2':6',2''-Terpyridin sind bei 21,5°C in Wasser löslich (95). Die gebildeten Koordinationspolyelektrolyte können geometrisch vereinfacht als Zylinder mit einem Durchmesser von ca. 1,5 nm betrachtet werden (96). Die Koordinationsgeometrie der Metall-Kationen ist pseudooktaedrisch angeordnet (siehe Abbildung 3) (97, 98).

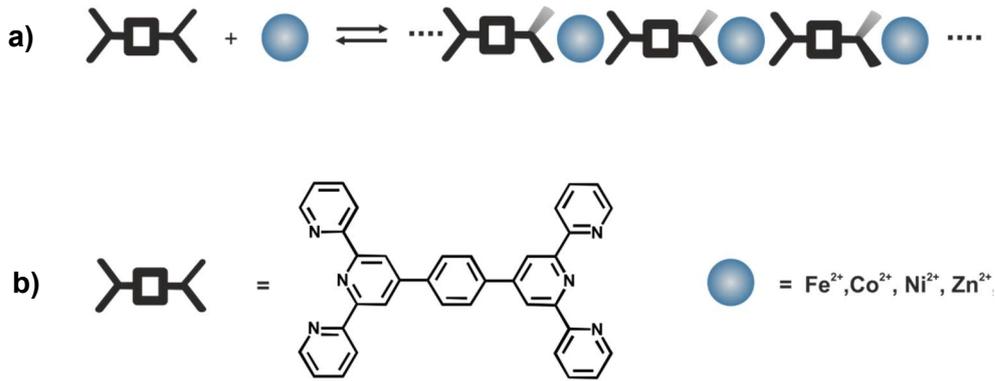


Abbildung 3: Schematische Darstellung von a) Polymerkettenbildung unter Metallionenzugabe und b) der in dieser Arbeit primär verwendeten starre ditope 4-Phenyl-2,2':6,2''-terpyridin-Ligand mit Phenylspacer und Metallzentrum.

Die in Abbildung 3 dargestellte Spacer der Terpyridin-Einheiten lässt sich variieren. Wird beispielsweise ein Ether anstelle des Phenylrings verwendet, resultiert ein flexibler Ligand. Hieraus entstehen durch Koordination mit Metallionen lineare Ketten und ringförmige Strukturen (99, 100). Möglich ist außerdem, ein bestehendes Ligandensystem nachträglich zu funktionalisieren. Beispielsweise können primäre Amine, Thiole, PEG oder Hydroxylgruppen hinzugefügt werden. Sowohl der Spacer im ditopen Fall als auch das 2,2':6,2''-Terpyridin, bzw. 4-Phenyl-2,2':6,2''-terpyridin können in verschiedenen Positionen mit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe versehen werden (101). Dies ist im Hinblick auf die Funktionalisierung der Alginat interessant (siehe Kapitel 2.5 Alginat-Gele). Die Funktionalisierung in 4-Position hat im Fall des ditopen Liganden keinen bzw. nur einen geringen Effekt in Bezug auf die Koordinationsgeometrie. Wird der Ligand in 6/6'-Position funktionalisiert, können die Koordination der Metallionen und somit die Redox Eigenschaften, die Ligandenfeldstärke, optische und magnetische Eigenschaften beeinflusst werden (102, 103).

Die Arbeitsgruppe um Holyer et al. (104) untersuchte die Kinetik und die Thermodynamik von Terpyridinkomplexen mittels stopped-flow Messungen. In Tabelle 2 sind die Komplexbildungskonstanten der Mono- und Bis-Komplexe von Fe(II)-, Co(II)-, Ni(II)-, Zn(II)- und Cu(II)-Ionen aufgelistet. Für Zn(II)- und Cu(II)-Ionen erhielten Holyer et al. nur die Bildungskonstante für die Mono-Komplexe, da hierbei die Bildungsrate des Mono-Komplexes (K_1) größer ist als die Bildungsrate der Bis-Komplexe (K_2) (104).

Die Stabilität dieser Komplexe kann durch die starke Metall-Ligand ($d-\pi^*$) Rückbindung und durch den Chelat-Effekt erklärt werden (105). Die Bildung der Mono-Komplexe (ML) von Zn(Terpy)^{2+} und Cu(Terpy)^{2+} gegenüber dem Bis-Komplex (ML_2) bevorzugt.

Tabelle 2: Bildungsraten der Komplexe bei Zugabe von 2,2':6,2''-Terpyridin bei 25°C und einem pH-Wert von 6,7 in Wasser (104).

| Metallion | $K_1 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ | $K_2 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Fe(II) | $5,6 \times 10^4$ | $1,1 \times 10^7$ |
| Co(II) | $2,4 \times 10^4$ | $5,0 \times 10^6$ |
| Ni(II) | $1,4 \times 10^3$ | $6,9 \times 10^5$ |
| Zn(II) | $1,1 \times 10^6$ | |
| Cu(II) | $2,0 \times 10^7$ | |

Anhand der Bildungsraten wird deutlich, dass die Ausbildung des $M(\text{Terpy})^{2+}$ Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Geschwindigkeit der ersten Komplexierung ist stark abhängig von der Wasseraustauschrate des jeweiligen Metallions (106). Die Wasseraustauschrate hängt von der Ligandenfeldstabilisierung ab. Je höher die Ligandenfeldstabilisierung, desto geringer ist die Wasseraustauschrate. Die Wasseraustauschrate bestimmt somit die Reaktivität und Redoxaktivität von Metallionen in wässriger Lösung (107). Für die Ausbildung metallo-supramolekularer Strukturen muss $K_2 > K_1$ sein. Zudem sollte die Komplexbildungskonstante der $[M(\text{Terpy})_2]^{2+}$ Bildung (K_2) über dem Wert 10^5 M^{-1} liegen um eine Polymerisierung zu ermöglichen (108, 109).

Die Thermodynamik der Komplexbildung kann mithilfe des Massenwirkungsgesetzes ausgedrückt werden (siehe Abbildung 4).

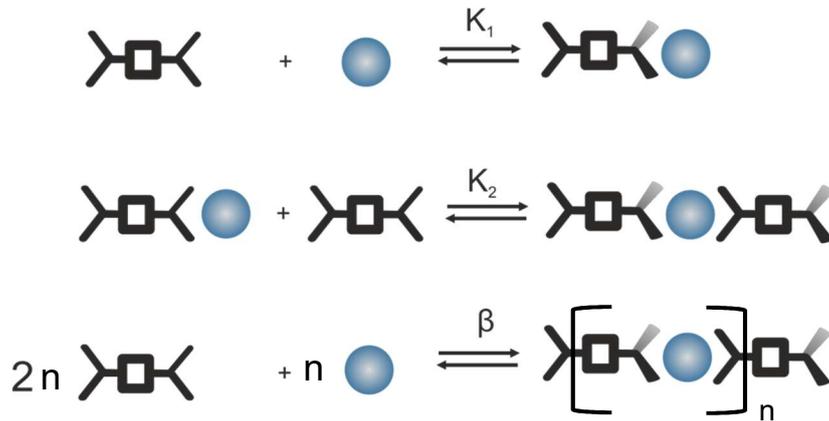


Abbildung 4: Schema des metallionen-induzierten Selbstaufbau ditoper Liganden. Thermodynamik der Komplexbildung über die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes. Bei Anwendung des Massenwirkungsgesetzes leiten sich folgende Gleichungen (1)-(3) ab, wobei K_1 , K_2 und β die Komplexbildungskonstanten der jeweiligen Zwischenstufen bzw. der gesamten Komplexbildung. Hierbei ist $[M]$ die Abkürzung für das verwendete Metallion und $[L]$ die Abkürzung für den eingesetzten Liganden.

$$K_1 = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (14)$$

$$K_2 = \frac{[ML_2]}{[ML][L]} \quad (15)$$

$$\beta = K_1 K_2 \quad (16)$$

Die Abhängigkeit von K_1 und K_2 kann mittels β beschrieben werden. Bei einem Überschuss an Metallionen ($M = \text{Fe(II)}, \text{Co(II)}, \text{Ni(II)}$) ist die Bildung des BisTerpy (ML_2) Komplex bevorzugt. Für die Bildungskonstanten (K_1) des Monokomplexes ist folgende Reihenfolge zu beobachten: $\text{Ni(II)} < \text{Co(II)} < \text{Fe(II)} \approx \text{Mn(II)} < \text{Zn(II)} < \text{Cu(II)}$ (100).

In dieser Arbeit wurde zur Oberflächenfunktionalisierung primär Fe-MEPE, also mit Fe(II)-Ionen koordiniertes 1,4-Bis(2,2':6,2''-terpyridin-4-yl)benzol verwendet. Dieser Ligand bildet bei Fe(II)-Zugabe starre, stäbchenförmige Ketten aus. Das System ist selbstorganisierend, das heißt bei Metallionenzugabe zur Ligandlösung kommt es zu einer spontanen Kettenbildung. Diese Kettenbildung ist dynamisch, es kommt somit spontan zur Assoziation und Dissoziation von Metallkationen durch Terpyridin-Liganden (98, 110).

Die Komplexierung kann durch die gebildete Metall-Ligand-Charge Transfer (MLCT) Bande im sichtbaren Bereich optisch verfolgt werden. Während der Bildung von Metallionenkomplexverbindungen können Elektronen vom Metall zum Ligand (ML), vom Ligand zum Metall (LM), vom Ligand zu einem anderen Liganden (LL) und von Metall zu Metall (MM) übertragen werden (111-113). Im Fe-MEPE werden d-Elektronen des Fe(II)-Metallzentrums in die freien π^* Orbitale des Liganden übertragen und daher es kommt zu der charakteristischen tiefblauen Farbe (114). In Abbildung 5 sind UV/VIS-Spektren von tauchbeschichteten Proben von Fe-MEPE auf Borosilikatglas gezeigt. Im Bereich von 300 bis 700nm sind 3 signifikante Banden zu sehen. Die ersten beiden Banden unterteilen sich in den $\pi-\pi^*$ Übergang des Liganden ($\lambda=240-320$ nm) (100) und den d-d Übergang des Liganden ($\lambda= 350-450$ nm) (115). In Ethanol liegt die MLCT Bande von Fe-MEPE bei 595 nm und ist verantwortlich für die intensiv blaue Farbe der Lösung (116). Bei gelöstem Fe-MEPE in Ethanol ist eine zusätzliche Bande bei 280 nm zu sehen. Diese rührt von unkoordiniertem Terpyridin her, welches durch einen Überschuss an Liganden zu erklären ist. In den UV/VIS-Spektren der Fe-MEPE tauchbeschichteten Glassubstraten ist keine Bande bei 280nm mehr detektierbar, denn die elektrostatischen Wechselwirkungen der Fe-MEPE Ketten mit der Glasoberfläche sind durch die auf der Kette verteilten Ladungen stärker als die des Liganden (117).

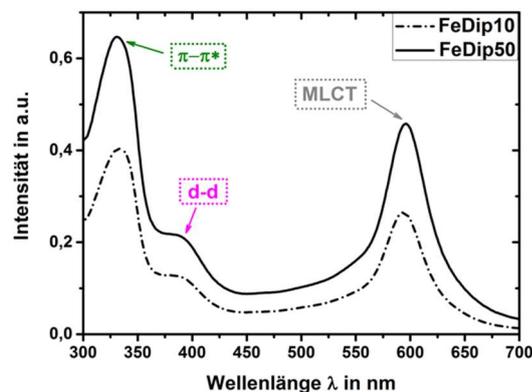


Abbildung 5: UV/VIS-Absorptionsspektren von tauchbeschichteten Fe-MEPE-Proben auf Borosilikatglas mit den zugehörigen spektralen Übergängen (105, 120).

Vergleicht man die beiden UV/VIS-Spektren der Beschichtung mit der Fe-MEPE Lösung in Ethanol so kommt es zu einer Verschiebung der Banden. Diese Verschiebung, primär der $\pi-\pi^*$ Bande, lässt sich auf die veränderte Polarität in Ethanol erklären (118).

2.6.1 Oberflächenfunktionalisierung

Die hohe Ladungsdichte der MEPE Ketten macht es möglich, mit negativ geladenen Ionen (vgl. Aufbau LbL-Schicht), Polyelektrolyten, geladenen Oberflächen, Kolloiden, Zelloberflächen (119, 120) zu interagieren bzw. dünne Filme mithilfe der Layer-by-Layer (kurz LbL) Technik herzustellen (121-123).

Die Abscheidung des positiv geladene MEPE kann nun durch alternierende Adsorption mit negativ geladenen Polyelektrolyten, wie beispielsweise Polystyrolsulfonat (PSS) in nm dicken Schichten abgeschieden werden (110). Hierbei ist es möglich, homogene und defektfreie Monolagen aus wässriger Lösung abzuscheiden (124, 125).

Durch die Möglichkeit, homogene und defektfreie Monolagen aufzubringen, ergibt sich ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten für Biomaterialien. Seit den frühen 1990er wird bereits an scaffoldfreien Möglichkeiten für die Herstellung dreidimensionaler Gewebestrukturen geforscht. Dies wird durch ein thermoresponsives Polymer realisiert, welches durch Variation der Temperatur die Hydrophilie verändert. Beispielsweise führt die Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit Poly-N-isopropylacrylamid (PNIPAM) bei Standard Zellkulturbedingungen von 37°C zu einer hydrophoben Oberfläche und erlaubt damit Zelladhäsion. Wird die Temperatur unter 32°C gesenkt, wird die Oberfläche hydrophil und die proliferierten Zellen werden abgelöst, ohne diese enzymatisch behandeln zu müssen. Diese Methode erlaubt es die Zellen, sich als zusammenhängende Schicht abzulösen. Diese Zellschichten wiederum können zur Rekonstruktion von Zellgewebe aufeinandergestapelt werden. Beispielsweise sind an der Rekonstruktion von Blutgefäßen drei verschiedene Zelltypen beteiligt: glatte Muskulatur, Fibroblasten und Endothelzellen. Dazu ist es notwendig verschiedene Zelltypen aufeinander auszusäen. Die LbL Technik ermöglicht eine selektive Herstellung von 3D-Gewebestrukturen. Hierbei werden die einzelnen Zellschichten mit einem Polymer beschichtet, welches selektiv die Anbindung der gewünschten Zellart ermöglicht. So entstehen zelluläre Co-Kulturen unter Verwendung von ECM Proteinen, Hyaluronsäure, Fibronectin und Kollagen (126).

Eine weitere Möglichkeit Oberflächen mit supramolekularen Polyelektrolyten zu funktionalisieren ist die Tauchbeschichtung (engl. dip-coating, kurz Dip). Hierbei wird das zu funktionalisierende Substrat in die MEPE Lösung getaucht und mit definierter Ziehgeschwindigkeit wieder herausgezogen. Der Tauchbeschichtungsprozess unterteilt sich in 4 Schritte (siehe Abbildung 6). Nach dem Eintauchen des Glassubstrats in die Tauchbeschichtungslösung (Schritt 1) stellt sich zunächst ein thermisches Gleichgewicht ein (Schritt 2). Anschließend wird der Film gezogen (Schritt 3), die überschüssige Beschichtungslösung läuft ab, während das Lösemittel verdunstet und der Film auf dem Substrat zurückbleibt (Schritt 4).

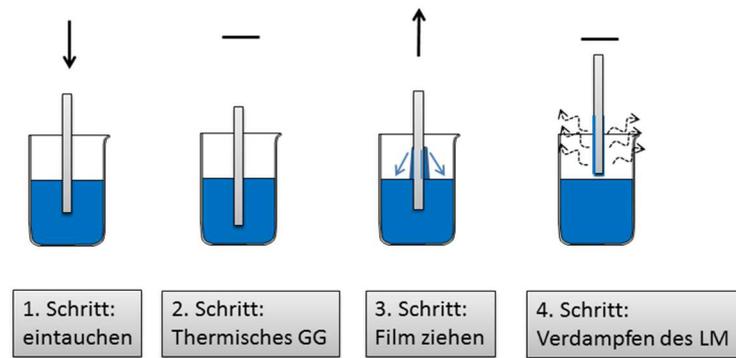


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Tauchbeschichtungsprozesses.

Durch die Änderung der Konzentration der Tauchbeschichtungslösung und der Ziehgeschwindigkeit v kann die Schichtdicke eingestellt werden. Diese Zusammenhänge wurden von Landau und Levich in folgender Formel ausgedrückt:

$$d = 0,94(\mu \cdot v)^{\frac{2}{3}} \cdot \gamma^{-\frac{1}{6}} \cdot (\rho \cdot g)^{-\frac{1}{2}} \quad (17)$$

Hierbei hängt die Schichtdicke von der dynamischen Viskosität μ , der Ziehgeschwindigkeit v , der Oberflächenspannung γ und von der Dichte ρ ab. Zudem ist die Erdanziehung g ebenfalls berücksichtigt (127). Fasst man alle Konstanten zusammen, so kommt man auf eine Abhängigkeit von ungefähr $d \approx 2/3 v$, bei konstanter Temperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit. Durch die positive Ladung des Polymers ist es zudem möglich, poröse Systeme zu infiltrieren und somit zusätzlich chemisch zu modifizieren.

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es ein Ionenrelease-System mit kontrollierter Freisetzung von 3d-Metallionen im nanomolaren Konzentrationsbereich in 2D und 3D herzustellen, zu charakterisieren und auf die Biokompatibilität und -aktivität hin zu testen. Zu Grunde lag die Annahme, dass Zellen durch den externen Stimulus von freigesetzten Metallionen zur Differenzierung angeregt werden können.

Der Komplexbildner sollte eine ausreichend hohe Komplexbildungskonstante aufweisen und Polymere ausbilden, um die koordinierten Metallionen auf Substrate anbinden zu können. Die Wahl fiel auf Bisterpyridin-Komplexe, die sogenannten metallo-supramolekularen Polyelektrolyte, kurz MEPE. Die Anbindung an die Oberfläche erfolgte über zwei verschiedene Beschichtungsverfahren. Zum einen wurden Borosilikatgläser mittels Tauchbeschichtung und zum anderen durch LbL-Beschichtung modifiziert. Außerdem wurden poröse SiO₂-Schichten hergestellt und mittels MEPE infiltriert.

Die Schichtdicke der hergestellten Substrate wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Des Weiteren wurden Daten zur Hydrophilie über die Bestimmung des Kontaktwinkels generiert und die Oberflächenbeschaffenheit sowie die Rauigkeit mit AFM gemessen. Hierbei ist das Ziel eine optimale Proteinadsorption und somit eine Zellansiedelung zu gewährleisten.

Zum grundlegenden Verständnis des Einflusses von MEPE auf Zellen wurden zunächst Zelltests auf MEPE beschichteten Glassubstraten durchgeführt, um die Zellantwort der verschiedenen Zelltypen zu analysieren. Hierbei wurden Fibroblasten (L929), myogene Vorläuferzellen (C2C12), Osteosarkom Zellen (MG63), primäre Endothelzellen und humane mesenchymale Stammzellen auf ihr Vitalität und ihre Differenzierungsfähigkeit getestet.

Dazu wurde die Biokompatibilität via WST-1 und Zellzahl charakterisiert. Die Vorversuche zur Biokompatibilität zeigten hohe Zellaktivitäten auf den mit Fe-MEPE tauchbeschichteten Substraten, was auf einen Rückgang der Proliferation zugunsten der Differenzierung hinweist. Zudem wurden Morphologie und Migration der Zellen untersucht. Zur Bestätigung der initiierten Differenzierung der C2C12, MG63 und humanen mesenchymalen Stammzellen wurde die Differenzierung auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR bestimmt.

Um die Zelldifferenzierung gezielt einsetzen und lokal begrenzen zu können, wurden 3D-Modelle aus HA-Knochenzementen und Alginaten mit Terpyridinen funktionalisiert. Da es unzählige Variationsmöglichkeiten in der Zusammensetzung von Knochenersatzstoffen gibt, werden diese innerhalb dieser Arbeit auf Hydroxylapatit-Zemente als Träger der Funktionalisierung beschränkt. Es handelt sich um eine „proof of principle“ Studie. Ziel ist es, eine stufenweise Freisetzung von Metallionen zu generieren ohne Verlust der hohen Druckstabilitäten des Zementes. Durch die Erkenntnisse von Pautke et al. wurden innerhalb dieser Promotionsarbeit

MG63-Zellen nur am Rande behandelt und der Schwerpunkt auf humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) gelegt. Es wurde die pH-Stabilität der Zemente in PBS, die Druckstabilitäten und die Freisetzungsprofile der funktionalisierten HA-Zemente mit dem unfunktionalisierten HA-Zement betrachtet. Die Kontrolle des pH-Wertes ist dahingehend wichtig, da die knochenbauenden Zellen, die Osteoblasten sehr leicht durch pH Wertänderungen gehemmt werden. Dies wird bei der Betrachtung der Physiologie des Bewegungsapparates deutlich. Zum einen benötigen Osteoblasten mechanischen Druck zur Aktivierung, da hierbei Signale an die Osteoblasten und die Osteoklasten gesendet werden. Beim Osteoklasten-induzierten Knochenabbau produzieren diese stark saure Phosphatase, Milchsäure, Zitronensäure und saure Hydroxylasen. Somit werden die Osteoblasten während des Knochenabbaus durch das saure Milieu gehemmt. Um dies zu umgehen, ist eine pH-Wertanpassung der verwendeten HA-Knochenzemente sehr wichtig (128). Als Testsystem für die Anwendung funktionalisierter, poröser Strukturen auf Zellsysteme wurden poröse SiO_2 -Schichten als Trägermaterial verwendet, welche durch Ihre transparenten und zugleich porösen Eigenschaften die Vorversuche vereinfachten.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Immobilisierung von Zellen in 3D-Netzwerken. Es gibt drei verschiedene Ansätze für die Zellimmobilisierung. Zum einen die Immobilisierung über die Adhäsion, über den Einbau in die Matrix und die Mikroverkapselung (82). In dieser Arbeit wird auf den Einbau in die Matrix näher eingegangen. Das Ziel ist die Generierung eines 3D-Netzwerks aus Alginat, in dem Zellen adhären, proliferieren und transportiert werden können. Die Einbringung von immobilisierten Zellen in zerstörte Gewebeareale kann mithilfe von natürlichen Hydrogelen, beispielsweise mit Alginat, realisiert werden. Bei der Funktionalisierung von Alginaten ist die Herausforderung, trotz der Funktionalisierung die Hydrogelbildung aufrechtzuerhalten. Die Alginatfunktionalisierung erfolgt mittels Carbodiimid Chemie. Durch die koordinative Funktionalisierung mit Terpyridin-Einheiten ergeben sich mehrere Möglichkeiten der Wechselwirkung der Zellen (siehe Abbildung 7). Proteine können direkt an Metallionen binden oder am Terpyridin-Liganden angebonden werden. Zudem wird das 3D-Alginat-Hydrogel durch Metallionen vernetzt.

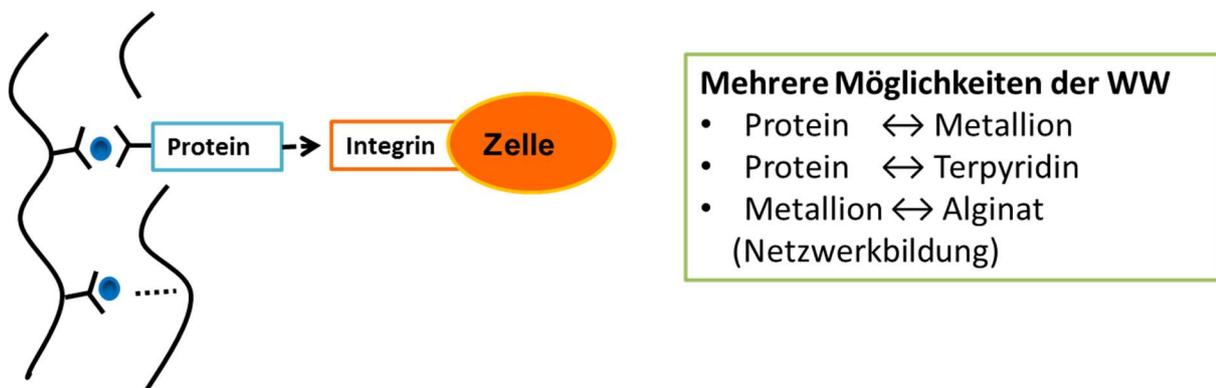


Abbildung 7: Übersicht über die Möglichkeiten der Alginat Funktionalisierung und deren Wechselwirkungen mit zellulären Systemen.

Die folgende Arbeit gliedert sich in die folgenden drei zusammenhängenden Abschnitte:

- a) Einfluss von MEPE auf zelluläre Systeme
- b) Funktionalisierung von Knochenzementen für die Herstellung bioaktiver Implantatmaterialien
- c) Herstellung Terpyridin-funktionalisierter Alginat-Gele für den Zelltransport

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 MEPE Zell-Wechselwirkung

4.1.1 Schichtcharakterisierung

Um die Wechselwirkung der MEPE-Schichten mit Zellen zu untersuchen, wurden LbL, Tauchbeschichtungen und infiltrierte poröse SiO₂-Schichten hergestellt und die Schichtdicken, die Porosität, die Topografien, die Kontaktwinkel und die Fe(II)-Freisetzungsprofile bestimmt.

Schichtdicke

Die hergestellten Schichten wurden via UV/VIS-Messungen anhand der optischen Eigenschaften charakterisiert (siehe Abbildung 8). Aus den UV/VIS-Messungen kann das Absorptionsmaximum der MLCT Bande im Bereich von 593-600nm und daraus die Schichtdicke bestimmt werden (116). Gemäß der Dissertation von M. Schott hängt die Absorption linear von der Schichtdicke ab. Es ist somit möglich, unter Erstellung einer Kalibriergeraden (siehe Anhang) die Schichtdicken zu berechnen (116). Die Kalibriergerade wurde anhand von Ellipsometrie, REM Messungen und gemessenen UV/VIS-Daten erstellt (129). In Tabelle 3 sind die berechneten Schichtdicken der LbL und tauchbeschichteten Proben aufgelistet. Bei der Tauchbeschichtungsbezeichnung gibt die nachgestellte Zahl die verwendete Ziehgeschwindigkeit in mm min⁻¹ an, d.h. die FeDip50 wurde aus einer Fe-MEPE-Lösung bei einer Ziehgeschwindigkeit von 50 mm min⁻¹ hergestellt.

Zudem werden Tauschbeschichtungen aus einer Lösung mit einem Gemisch aus ditopen 1,4-Bis(2,2':6,2''-terpyridin-4'-yl)benzol-Liganden mit 3% bzw. 10% 1,1,1-Tris(2,2':6,2''-terpyridin-4'-yl-oxymethyl)ethan hergestellt (kurz TriTerpy). Der Vernetzungsgrad z in % ist abhängig vom molaren Verhältnis von TriTerpy (n_C) zu DiTerpy (n_L) und wird wie folgt beschrieben:

$$z = \frac{n_C}{n_C + n_L} * 100\%(z\%MEPE) \quad (18)$$

Für die LbL-Schicht wird eine molekulare Schichtdicke von 1-2 nm pro abgeschiedener MEPE-Schicht angenommen. Die hierzu durchgeführten UV/VIS-Messungen führen zum gleichen

Ergebnis wie die in der Literatur vermerkte Schichtdicke (130). Auffällig ist, dass es mit steigender Schichtdicke zu einer Rotverschiebung der MLCT Bande kommt. Diese Verschiebung hängt mit der veränderten Polarität der Schichten zusammen. Ändert sich die Polarität der Schichten, so verschiebt sich die Lage der MLCT Bande hin zu niedrigeren Energien (118). Literaturbekannt ist eine Rotverschiebung aufgrund einer veränderten Umgebung. Es kommt zu einer Verschiebung aller 3 Banden um 3-9 nm (131). Erklärt werden kann eine solche Verschiebung mittels Effektiver Medium Theorie (132, 133).

Tabelle 3 Übersicht der aus den UV/VIS-Spektren resultierenden Schichtdicken. Die erste Spalte beinhaltet die Lage des Absorptionsmaximums der MLCT Bande des Fe-MEPE, die anhand der UV/VIS-Daten bestimmt werden. Die Schichtdicke d (siehe Spalte 2) kann, aus der experimentell bestimmten linearen Regression, berechnet werden.

| | MLCT Bande (nm) | d (nm) aus lin. Re- gression |
|------------------------|--------------------|------------------------------------|
| LbL | 593 | 2,6 |
| FeDip10 | 593 | 25,2 |
| FeDip50 | 597 | 42,9 |
| FeDip100 | 600 | 57,1 |
| 3%TriTerpyDip10 | 595 | 10 |
| 3%TriTerpyDip50 | 595 | 19,4 |
| 10%TriTerpDip10 | 595 | 9,6 |
| 10%TriTerpDip50 | 595 | 18,3 |

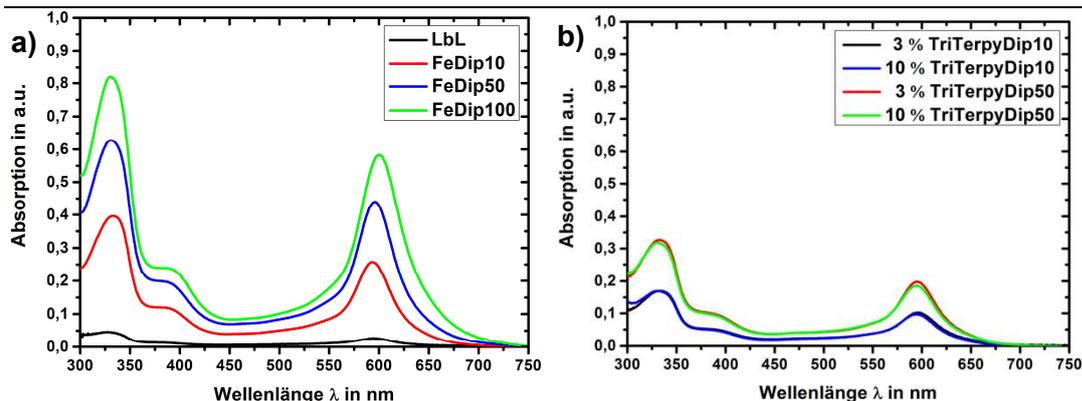


Abbildung 8: UV/VIS-Spektren der LbL-Schichten und Tauchbeschichtungen a) von Fe-MEPE und b) von TriTerpy/Fe-MEPE Gemischen im mit 3% und 10% Triterpy Ligand als Komplexbildner.

Bei den TriTerpy Tauchbeschichtungen ist auffällig, dass es zu keiner Verschiebung der MLCT Bande in Abhängigkeit der Schichtdicke kommt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich hierbei die elektronische Umgebung der Polyelektrolyte nicht wesentlich verändert. Des Weiteren liegt die Schichtdicke der TriTerpyDip10 Tauchbeschichtungen bei 40% der Schichtdicke der reinen FeDip10. Für die Dip50 liegt der Wert bei 43-45% der korrespondierenden FeDip50. In Abbildung 8 ist erkennbar, dass bei gleicher Ziehgeschwindigkeit die Absorption bei höheren TriTerpy Gehalt geringer ist. Die Arbeitsgruppe um Sievers et al.(131) beobachtete ebenfalls, dass die mit TriTerpy angereicherten Beschichtungslösungen sich anders verhalten als die korrespondierende LbL-Schicht. Die erwartete Netzwerkbildung konnte nur in Lösung, nicht aber in der Schicht detektiert werden. Durch die Konzentrationsabhängigkeit der metallo-supramolekularen Polyelektrolyte kommt es bei Annäherung der MEPE an die Oberfläche zu einem Rückgang der molaren Masse und somit zu einer geringeren Fe-MEPE Abscheidung bei Zugabe von TriTerpy in die Tauchbeschichtungslösung (131). Somit verhalten sich die TriTerpy/DiTerpy Mischungen in wässriger und alkoholischer Beschichtungslösung ähnlich. Es resultieren sowohl für die in der Literatur beschriebenen LbL, als auch die in dieser Arbeit hergestellten tauchbeschichteten Substrate nicht vernetzte MEPE-Schichten. Die porösen SiO₂-Schichten wurden zusätzlich mittels Ellipsometrie charakterisiert. Hierzu sind in Tabelle 4 zusätzlich zu den Schichtdicken die Porosität in % vor und nach der Belegung mit Fe-MEPE aufgelistet. In vorherigen Versuchen wurde bereits Fe-MEPE in poröse SiO₂ Gerüste eingelagert. Hierzu „dotierte“ Akcakayiran et al. zylindrische SBA-15 Poren mit Fe-MEPE. Sie fanden heraus, dass die –OH Gruppen des SiO₂-Gerüsts als Gegenion für das Polykation fungiert. Dieser Effekt ist pH-Wert abhängig (134).

Der ermittelte Porenradius bleibt für beide SiO₂-Schichten im Bereich von 2-3 nm. Nach der Beschichtung wird ein Rückgang der Porenradien um 8% beobachtet. Die Schichtdicke wird durch Infiltration 1 nm dicker, was für eine Belegung mit einer Monolage spricht (siehe Tabelle 4). Daraus resultiert, dass sich der Polyelektrolyt bei einer Konzentration von 2,5mM Fe-MEPE nicht ausschließlich in die Poren setzt, sondern die gesamte Oberfläche funktionalisiert. Betrachtet man das UV/VIS-Spektrum der infiltrierten SiO₂-Schicht (siehe Abbildung 9) resultiert aus der Kalibriergeraden eine Schichtdicke von 4 ± 2 nm bei $\lambda = 580$ nm.

Tabelle 4: Schichtdicke, Porosität und Porenradius der porösen SiO₂ Schichten aus den Ellipsometriemessungen.

| | d (nm) | Porosität (%) | Porenradius (nm) |
|--|--------|---------------|------------------|
| Poröse SiO₂-Schicht | 149 | 28,5 ± 2 | 2-3 |
| Poröse SiO₂-Schicht +2,5mM Fe-MEPE | 150 | 20,6 ± 2 | 2,5-3 |

Für die poröse SiO₂-Schicht, die mit 1,25 mM Fe-MEPE infiltriert wird, resultiert aus den UV/VIS-Messungen eine Schichtdicke von 1 ± 1 nm. Bei dieser Infiltrationslösung werden vermutlich die Poren des porösen SiO₂ Gerüsts mit Fe-MEPE belegt. Bei höheren Konzentrationen, hier 2,5 mM Fe-MEPE, bildet sich zusätzlich eine Monolage Fe-MEPE auf der Oberfläche.

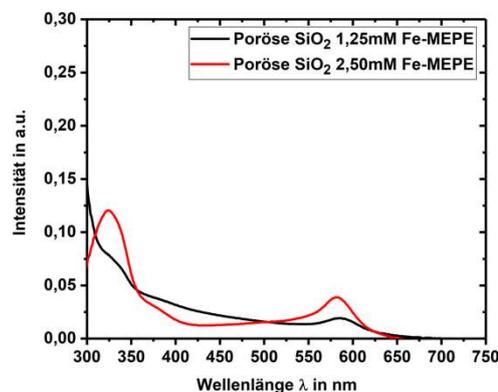


Abbildung 9: UV/VIS-Spektren poröser SiO₂-Schichten, die mit 1,25mM und 2.50mM Fe-MEPE Lösung infiltriert wurden.

Topografie

Die Topografie der Oberfläche der einzelnen Schichten wurde mittels AFM bestimmt. Zum einen wurden die Homogenität und zum anderen die Rauigkeit betrachtet. Abbildung 10 zeigt die AFM Aufnahme der FeDip10-Schicht, die mittels Tauchbeschichtung aus einer 8,8 mol/L Lösung und einer Ziehgeschwindigkeit von 10mm/min auf einem Borosilikatglas hergestellt wurde.

Die Rauigkeit der hier funktionalisierten Oberflächen liegt im Bereich von 3-7 nm. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturwerten der LbL-Schicht aus Röntgenreflektometrie-Messungen (XRR) überein. Hierbei wurde die Rauigkeit der Grenzfläche aus den Interferenzkurven ermittelt (110). Betrachtet man das unbeschichtete Glassubstrat, kommt man auf eine Rauigkeit von 20 ± 1 nm. Der mit der PE-Beschichtung erreichte sogenannten „Glättungseffekt“ des Substrates ist literaturbekannt (135, 136). Zum Beispiel konnte Lowmann et al. einen signifikanten Rückgang der Rauigkeit bei Behandlung der Glassubstrate mit hochgeladenen Polyelektrolyten, wie Polyethylenimin (PEI) erreichen (135).

Durch die Stäbchenform der MEPE resultiert eine Nanostrukturierung, die im Fall von C2C12-Zellen nur einen geringen Effekt auf Zellansiedlung und Vermehrung hat und die myogene Differenzierung von myogenen Vorläuferzellen zu Myozyten beeinflussen kann (40). L929-Zellen hingegen werden durch die Oberfläche in ihrer Adhäsion und Proliferation beeinflusst. Die Adhäsion wird durch glatte Oberflächen begünstigt (28).

In Abbildung 11 sind AFM Aufnahmen der porösen SiO_2 -Beschichtungen in Abhängigkeit der Inkubation in Fe-MEPE zu sehen. Nach der Funktionalisierung erkennt man eine Vergrößerung der agglomerierten SiO_2 Partikel. Die Rauigkeit der unbehandelten SiO_2 -Schicht erhöht sich von 3nm auf 7nm.

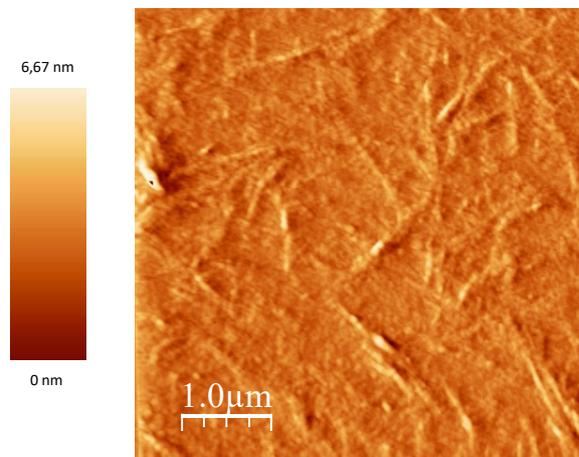


Abbildung 10: AFM Aufnahme der Oberflächenstrukturierung der FeDip10-Schicht.

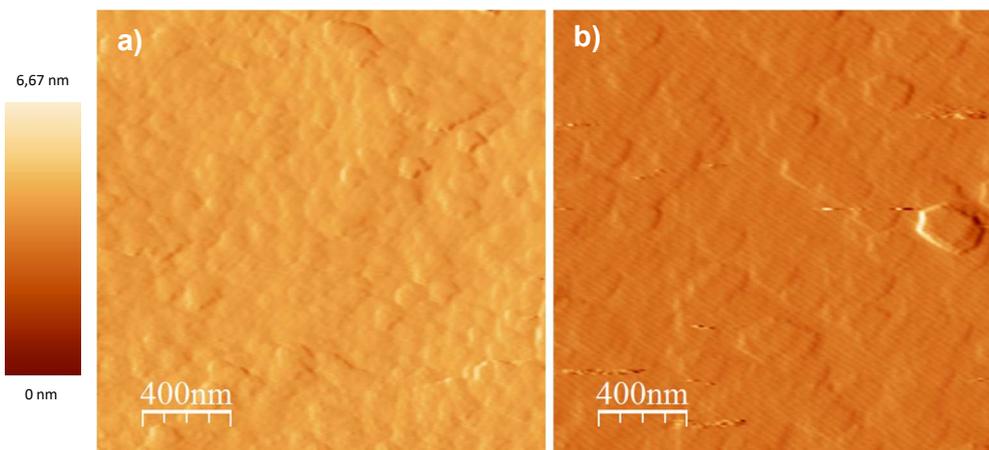


Abbildung 11: AFM Aufnahmen der porösen SiO₂-Schichten a) vor und b) nach der Beschichtung mit einer 2,5mM Fe-MEPE-Lösung.

Kontaktwinkel

Die Benetzbarkeit der Oberflächen ist ein entscheidender Faktor bei der Proteinadsorption. Alle untersuchten Schichten werden vor der Kontaktwinkelmessung einen Tag in PBS inkubiert, um die Bedingungen für die Proteinadsorption im Zellkulturmedium zu simulieren. Werden Fe-MEPE-Schichten in Phosphatpuffer bzw. NaCl inkubiert so kommt es zu Veränderungen der Löslichkeit und der Absorption (siehe Abbildung 12). Zum Vergleich wird eine FeDip50-Probe direkt nach dem Beschichten (somit ohne Vorbehandlung mit PBS) gemessen.

Der Kontaktwinkel für die unbehandelte FeDip50 liegt 22% unter dem in Tabelle 5 aufgeführten Wert für die vorbehandelte FeDip50-Schicht. Somit kommt es in PBS bzw. in Zellkulturmedium zu einer Änderung der Benetzbarkeit. Mit $57-69 \pm 2^\circ$ liegt der Kontaktwinkel der Fe-MEPE modifizierten Glassubstrate annähernd im hydrophoben Bereich. Die NiDip50-Beschichtung fällt mit $28 \pm 2^\circ$ weit unterhalb des idealen Proteinadsorptionsbereichs von $48-62^\circ$ (137). Die Ni-MEPE-Tauschbeschichtungen sind somit stark hydrophil und stellen keine ideale Oberfläche zur Zellbesiedelung dar.

Die unbehandelten porösen SiO_2 -Schichten sind nicht messbar. Dies liegt an der hohen Porosität. Der Kontaktwinkel der Oberfläche steigt nach der Infiltration mit Fe-MEPE auf bis zu $26 \pm 6^\circ$, ist also deutlich hydrophiler.

Tabelle 5 Übersicht der Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen mit jeweils 2 μ L VE-Wasser.

| | Kontaktwinkel ($^\circ$) |
|---|----------------------------|
| FeLbL | 57 ± 2 |
| FeDip10 | 69 ± 3 |
| FeDip50 | 67 ± 2 |
| FeDip100 | 64 ± 1 |
| 3%TriTerpyDip10 | 51 ± 5 |
| 3%TriTerpyDip50 | 55 ± 6 |
| 3%TriTerpDip100 | 58 ± 5 |
| Poröse SiO_2 | Nicht messbar |
| Poröse SiO_2 1,25mM FeMEPE | 12 ± 5 |
| Poröse SiO_2 2,50mM FeMEPE | 26 ± 6 |
| NiDip50 | 28 ± 2 |

Löslichkeit der MEPE-Schichten in Phosphatpuffer

Um das Verhalten der MEPE-Schichten in Zellkulturmedium zu simulieren, wurde die Löslichkeit in Phosphatpuffer betrachtet (Zusammensetzung siehe Anhang). Der Puffer wird zusammen mit Glucose, einem pH Indikator, fetalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika als Nährmedium in der Zellkultur verwendet (30). In Abbildung 12 sind die UV/VIS-Spektren der FeDip10-Schicht vor und nach der Inkubation in PBS für 1h, 2h und 48 h gezeigt. Auffällig sind zum einen die MLCT-Bandenverschiebung und zum anderen die Abnahme der Bande. Das Maximum verschiebt sich von einer Wellenlänge von $\lambda=593\text{nm}$ zu $\lambda=603\text{nm}$ und somit um 10 nm. Die Abnahme der Intensität zeigt, dass sich die Schicht in dem Puffer löst. Die Abnahme der Schichtdicke beträgt nach 1h 12%, nach 2h 20% und nach 48h 60% der ursprünglichen Dicke. Betrachtet man FeDip50 oder FeDip100, erkennt man nach 1h in PBS ebenfalls eine Abnahme der Absorption der MLCT Bande um 11-12%. Nach 48h reduziert sich die Schichtdicke im Fall der FeDip50 um 27%. Die Schichtdicke der FeDip100 ändert sich in den ersten 48h nicht signifikant. Zudem verschiebt sich die MLCT Bande der FeDip50 nach 1h in PBS um 15nm und nach 48h um 18nm. Im Falle der FeDip100 kommt es zu einer Verschiebung um lediglich 7nm, also vergleichbar mit der FeDip10. Nach 5 Tagen stagniert die Abnahme der Absorption der FeDip10 MLCT Bande. Für die FeDip50 sinkt die Absorption auf 66% des Ausgangswertes. Eine Reduktion von insgesamt 22% wurde für die FeDip100 nach 5 Tagen detektiert. Literaturbekannt ist eine Abnahme der Schichtdicke bereits bei der Probenpräparation um 10%. Hier wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur mit Wasser gewaschen (131). Für die CoDip50-Probe nimmt die charakteristische Bande bei 345nm (115) schon bereits nach 15 min in PBS um 50% ab. Nach 1h sinkt die Intensität auf 35% und nach 2h bereits auf 25% der anfänglichen Intensität ab. Auch visuell ist erkennbar, dass sich praktisch sofort nach dem Eintauchen der CoDip50-Schicht in PBS diese ablöst. Aufgrund der schlechten Anhaftung der CoDip50-Schicht konnten keine Daten für die Benetzbarkeit generiert werden, denn die Schicht löst sich bei Kontakt mit Wasser sofort ab.

Im Fall von NiDip50 lösen sich in den ersten zwei Stunden in PBS lediglich 7% der ursprünglichen Schicht ab. und entspricht im Rahmen des Fehlers der von Sievers et. al. angegeben Intensitätsabnahme von 10% beim Waschen der Schichten mit Wasser (131).

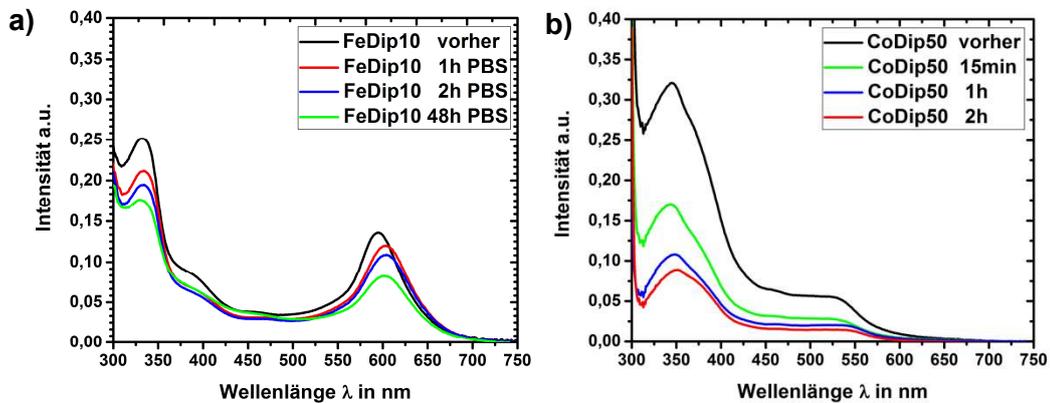


Abbildung 12: UV/VIS-Spektren einer FeDip10-Schicht vor und nach Inkubation in PBS (1h,2h, 48h) und ohne Inkubation in PBS und b) CoDip50 nach 15min, 1h, 2h und ohne Inkubation in PBS.

Freisetzungsprofile

Für die funktionalisierten Oberflächen wurde primär Fe-MEPE verwendet, wodurch in diesem Teilabschnitt der Fe(II)-Gehalt in PBS untersucht wurde. Mithilfe eines Ferrozintests wurde der Gehalt an Fe(II)-Ionen kolorimetrisch in wässrigem Phosphatpuffer bestimmt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Beschichtungen jeweils 1-4 Tage in PBS Lösung belassen und anschließend die Absorption bei 550nm via UV/VIS-Messung bestimmt. Quantifiziert wurden die Absorptionswerte mithilfe einer Kalibriergeraden aus 5 bekannten Fe(II)-Konzentrationen (siehe Anhang). Folgende Testreihen wurden durchgeführt: In der ersten Testreihe verbleibt das Substrat einen bis vier Tage in PBS. In der zweiten Testreihe (kumulativ) wird jeden Tag PBS aus dem Überstand entnommen und neu zugegeben. Die hieraus erhaltenen Daten geben Aufschluss darüber, wieviel Fe(II) bei den beschichteten Glassubstraten in PBS verbleibt bzw. sich bei wechselndem PBS aus der Schicht löst und zur Verfügung steht. Diese Erkenntnisse geben Aufschluss darüber, wieviel Metallionen den Zellen im Medium zur Verfügung steht. In Abbildung 13 sind die erhaltenen Daten dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, dass der Fe(II)-Gehalt in PBS davon abhängig ist, ob das PBS gewechselt wird oder die Proben jeweils für 1-4 Tage in PBS inkubiert werden. Betrachtet man die Ergebnisse für die Proben, bei denen das PBS Volumen konstant gehalten wurde, so wird deutlich, dass es sich hierbei nicht um einen „burst-effect“ handelt. Es wird kontinuierlich Fe(II) über die untersuchten 4 Tage ans Medium abgegeben. Die Freisetzungsprofile der LbL-Schichten unterscheiden sich stark von denen der Tauschbeschichtungen. Zum einen liegt hierbei die dünnste Schicht, mit ungefähr 2 nm, vor und zum anderen ist Fe-MEPE zusätzlich durch elektrostatische Wechselwirkungen

mit der zuvor aufgetragenen PSS-Schicht stabilisiert. Die LbL-Schicht zeigt einen Fe(II)-Anstieg bis Tag 3 und einen anschließenden Rückgang der Konzentration auf 0. Ebenso an Tag 1 konnte keine Freisetzung von Fe(II) detektiert werden. Hierbei handelt es sich somit um ein Freisetzungssystem, welches zwischen Tag 1 und Tag 4 aktiv ist. Interessant ist dies für Zellen, die erst bei der Proliferation, nicht jedoch während der Adhäsion mittels Fe(II)-Freisetzung beeinflusst werden sollen. Die erhaltenen Fe(II)-Konzentrationen liegen im Bereich von $4,2 - 5,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ für Tag 2 bzw. Tag 3. Die Fe(II)-Freisetzungsprofile der Tauchbeschichtungen variieren stark. Die FeDip10-Schichten zeigen in den ersten beiden Tagen einen stetigen Anstieg der Fe(II)-Konzentration auf, wobei die Freisetzung an den Tagen 3 und 4 wieder abnimmt. Hierbei handelt es sich um einen Konzentrationsbereich von 1,44 über 1,74 bis hin zu $1,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ an Tag 1, 2 bzw. 4. Der Verlauf der Fe(II)-Freisetzung der FeDip30, 50 und der FeDip70 Schichten sind nahezu identisch. Hierbei kommt es zu einem Anstieg der Fe(II)-Konzentration bis Tag 2, dann ein Rückgang an Tag 3 wobei es wieder zu einem Fe(II)-Anstieg an Tag 4 kommt. Der Trend für die Fe(II)-Konzentrationen der FeDip30-, FeDip50 und FeDip70-Beschichtungen verläuft somit Tag 1 < Tag 2 > Tag 3 ≥ Tag 4.

Die FeDip100-Schicht ist von den getesteten Schichten die einzige, die einen linearen Anstieg der Fe(II)-Konzentration zeigt. Die erhaltenen Konzentrationen entsprechen bei LbL, FeDip10 und FeDip30 den Erwartungen, denn die dünnsten Schichten liefern die geringsten Fe(II)-Konzentrationen in PBS. Die Werte für FeDip50, 70 und FeDip100 liegen in einen sehr ähnlichen Konzentrationsbereich.

Die Fe(II)-Konzentrationen in PBS bei kumulativer Freisetzung ist an Tag 1 am höchsten. Hierbei folgt die freigesetzte Menge dem Trend der Schichtdicke. Die Proben mit geringeren Schichtdicken setzten geringere Mengen Fe(II)-Ionen frei als die FeDip-Schichten mit höheren Schichtdicken. Somit staffelt sich die Freisetzung gemäß den Schichtdicken wie folgt LbL < FeDip10 < FeDip30 ≈ FeDip 50 ≈ FeDip 70 < FeDip100.

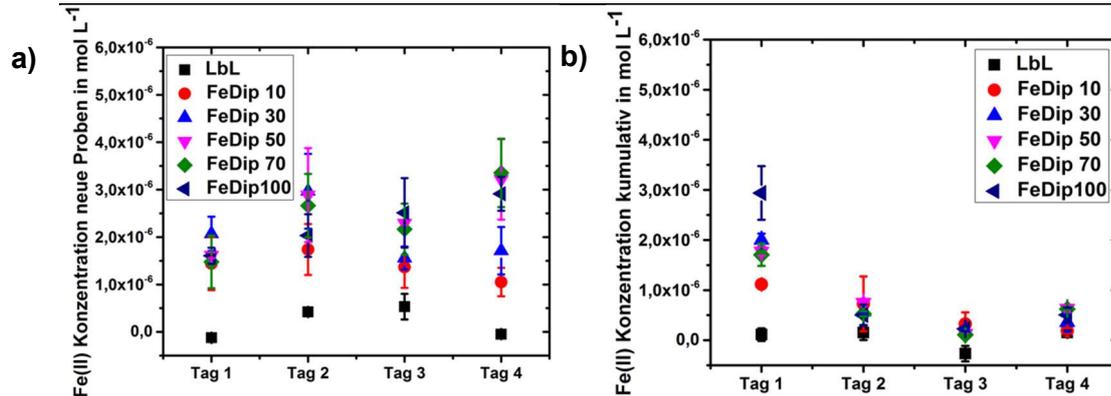


Abbildung 13: Übersicht aus den via Ferrozintest gemessenen Fe(II)-Ionen Konzentrationen von a) jeden Tag eine neue Probe und b) kumulativ. Bei der kumulativen Messreihe wurde jeden Tag PBS zur Messung entnommen und wieder neues PBS hinzugefügt. Inkubiert wurden die Schichten an allen Tagen in PBS bei 37°.

Die Menge für die Fe(II)-Ionen Freisetzung der LbL-Schichten liegt zwischen $4,2-5,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Der Unterschied der dünnsten zur dicksten Schicht bezüglich der Fe(II)-Ionen Freisetzung beträgt an Tag 1 $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. An den Tagen 2, 3 und 4 liegen die Werte der Tauschbeschichtungen im selben Konzentrationsbereich von $1,7$ und $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Fe(II)-Ionen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die LbL-Schichten von den Tauschbeschichtungen unterscheiden. Zudem unterscheiden sich die dünneren Tauschbeschichtungen in Freisetzungsmenge und – profil stark von der dicksten Tauschbeschichtung (Dip100).

In Abbildung 14 sind die Fe(II)-Konzentrationen für die TriTerpyDip50-Schichten und der infiltrierten, porösen SiO₂-Schichten in Abhängigkeit der Tage dargestellt. Die Referenz entspricht der Messung von PBS. Im Fall der Tauschbeschichtungen ist erkennbar, dass bereits am ersten Tag der Eisengehalt erreicht wird, der bis einschließlich Tag 4 im Phosphatpuffer nicht weiter ansteigt. Die porösen SiO₂-Schichten haben bei einer Infiltrationskonzentration von 1,25 mM eine stufenweise Freisetzung über 4 Tage. Die Freisetzung liegt im Bereich von $1,3-1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Fe(II). Bei Zugabe von TriTerpy zum DiTerpy-Liganden kommt es zu keinem detektierbaren Fe(II)-Austausch mit der wässrigen Umgebung. In diesem Fall liegt die gemessene Fe-Konzentration im Bereich der PBS-Referenz.

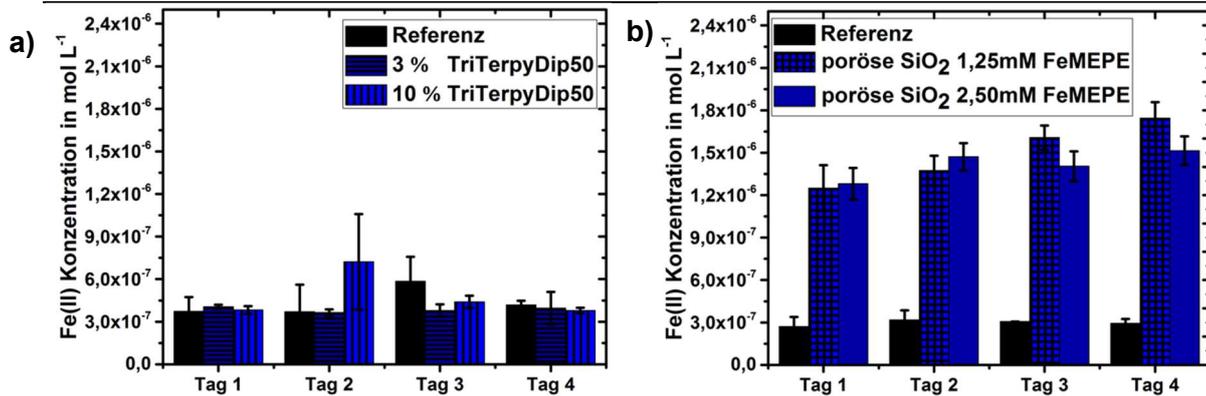


Abbildung 14: Fe(II)-Konzentration der a) TriterypDip50- Schichten und b) der porösen SiO₂-Schichten in mol L⁻¹. Inkubiert wurden die Schichten kumulativ (jeden Tag wurde PBS entnommen und neues hinzugefügt) in PBS bei 37°C. Die Referenz entspricht reinem PBS.

4.1.2 Zytotoxizität

4.1.2.1 L929-Zelllinie

Die Biokompatibilität der modifizierten Oberflächen wird mit dem WST-1 (water soluble tetrazolium) Test bestimmt. In einer intakten Zelle wird das zugegebene schwach gelb gefärbte Tetrazoliumsalz ((2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium Natriumsalz) in den Mitochondrien der Zellen durch die Dehydrogenase glykolytisch mithilfe von NAD(P)H zu dunkelgelbem, wasserlöslichem Formazan reduziert. Die Einfärbung spiegelt also die Mitochondrienaktivität der Zellen wider. Der Gehalt an gebildetem Formazan korreliert direkt mit der Zellzahl. Die quantitative Analyse des gebildeten Formazans erfolgt via Absorptionsmessungen bei $\lambda = 450$ nm. Je höher die Absorption bei $\lambda = 450$ nm ist, desto mehr Formazan wird verstoffwechselt und desto höher ist die Vitalität bzw. die Anzahl der Zellen (138, 139). Wird dieser Wert auf die Zellzahl bezogen, erhält man die Aktivität pro Zelle. Die Zytotoxizitätsgrenzen sind anhand der DIN EN ISO 10993-5 bezüglich des prozentualen Anteils der Proliferation in Bezug auf die Referenz definiert. Eine Proliferation von 100-81% gilt als nicht zytotoxisch. Ab einer Proliferation von 80-71% ist die Wirkung schwach zytotoxisch, 70-61% mäßig zytotoxisch und ab 60% spricht man von einer starken Zytotoxizität. Zudem werden die Zytotoxizitätseinstufungen in Gradeinteilungen unterteilt. Bei einem nicht zytotoxischen System liegt man bei 0 Grad, von 80-71% Proliferation bei 1, bei 70-61% bei 2 und ab 60% Proliferation bei 3 Grad in Bezug auf die Referenz.

Des Weiteren gilt die DIN zur Bestimmung der Zytotoxizität nur unter Verwendung einer etablierten Zelllinie. Innerhalb dieser Arbeit wurden L929-Zellen für die ersten Zytotoxizitätseinstufungen über 10 Tage verwendet. Hierbei handelt es sich um adhärenzte Fibroblasten (Bindegewebszellen), die aus dem Fettgewebe der Maus gewonnen werden.

Mitochondrienaktivität L929 bei Zugabe von Fe-, Co-, Ni-, Zn-MEPE Eluaten

Für die ersten Zellversuche zur Toxizität von MEPE werden ausschließlich Eluate, d.h. der Überstand von zuvor inkubierten Schichten verwendet, um die Effekte wie Oberflächenladung, Benetzbarkeit, Rauigkeit und Steifheit vorerst außer Acht zu lassen. Es wurden die Mitochondrienaktivitäten nach Zugabe von Fe-, Co-, Ni- und Zn-MEPE in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ über 10 Tage gemessen. In Abbildung 15 sind die einzelnen Messwerte in Abhängigkeit der Konzentration über 10 Tage zu sehen. Die Zytotoxizitätsgrenzen von 80% (grüne gestrichelte Linie) bzw. 60% (rote Linie) sind farblich dargestellt.

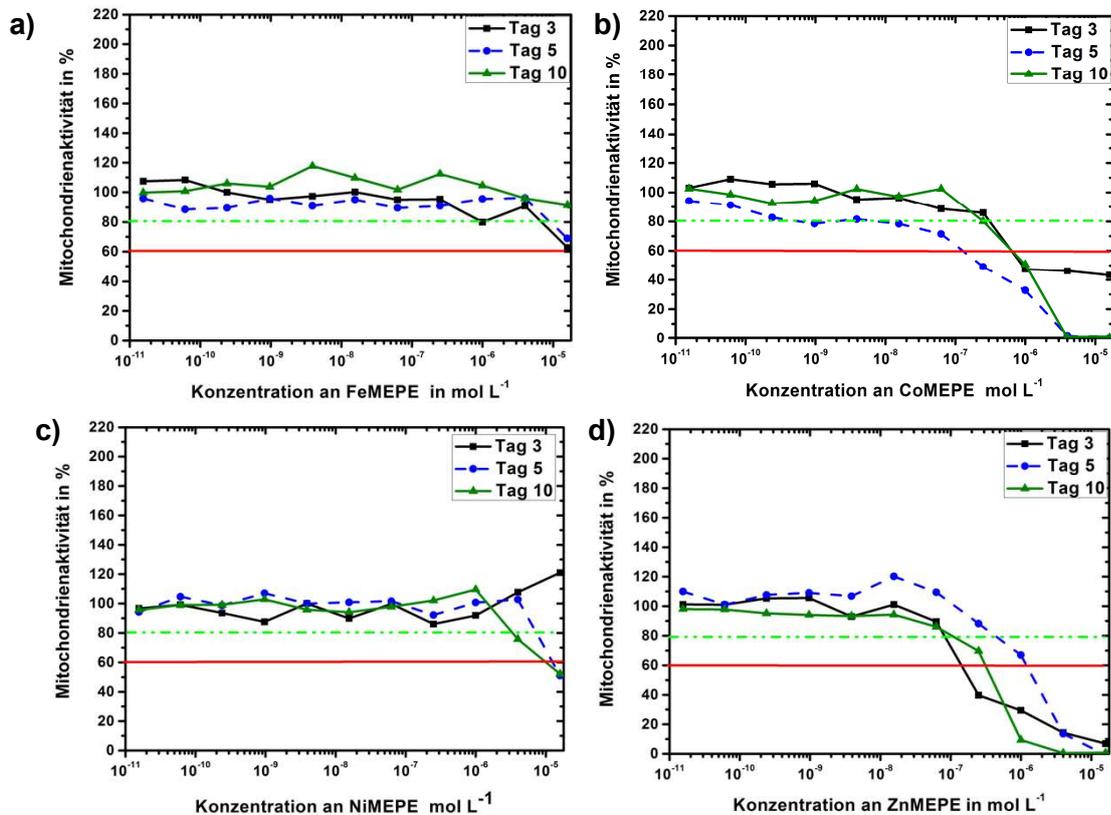


Abbildung 15: Mitochondrienaktivität von L929-Zellen bei Zugabe a) Fe-MEPE b) Co-MEPE c) Ni-MEPE und d) Zn-MEPE in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,60 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Der Zytotoxizitätstest via WST-1 Messung zeigt an allen Tagen ein nicht zytotoxisches Verhalten für die Zugabe von Fe-MEPE in Konzentrationen unter $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Aus Abbildung 13 wird deutlich, dass die höchste Freigesetzte Fe(II)-Konzentration in den ersten 4 Tagen einen Wert von $3,35 \pm 0,721 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ nicht übersteigt. Somit können die mit Fe-MEPE tauchbeschichteten Proben als nicht zytotoxisch auf L929-Zellen eingestuft werden. Die via LbL bzw. Tauchbeschichtung hergestellten Proben liegen mit Freisetzungskonzentrationen von $4,21 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ bis $5,33 \pm 2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ unter dem Grenzwert von der zytotoxisch wirkenden Fe(II)-Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. In Hinsicht auf die Zytotoxizität der porösen SiO_2 -Schichten muss beachtet werden, dass diese Schichten die Konzentration an Fe-MEPE innerhalb der Zytotoxizitätsgrenze von $< 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ um 25-75% überschreiten (siehe Abbildung 14). Die mit Triterpy versetzten Fe-MEPE Tauchbeschichtungen liegen ebenfalls unterhalb einer Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Fe(II)-Ionen in Lösung.

Bei Betrachtung der konzentrationsabhängigen Zellaktivität bei Zugabe von Co-MEPE wird deutlich, dass die Zellen das Co-MEPE 2 Tage tolerieren, anschließend geht die Zellaktivität zurück, aber die Zellen erholen sich zwischen dem 5. und 10. Tag wieder. Für Konzentrationen über $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ wird Co-MEPE zu keinem Zeitpunkt toleriert. Aufgrund dieses Zytotoxizitätsergebnisses und der geringen Schichtstabilität wird auf weitere Zelluntersuchungen mit Co-MEPE-Schichten verzichtet.

Im Fall von Ni-MEPE werden Konzentrationen unterhalb von $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ von toleriert. Bei höheren Konzentrationen sinkt die Zellaktivität schrittweise auf 50%. Der Zytotoxizitätstest für Ni-MEPE zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie Fe-MEPE. Unterhalb einer Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pendeln sich die Zellaktivitäten über 10 Tage im Bereich von 85-100% ein. Oberhalb dieser Konzentration kommt es an Tag 2 zur Stimulierung, ab dem fünften Tag jedoch zu einem Rückgang der Aktivität auf unter 60%. Die Zytotoxizitätsgrenze für Ni-MEPE liegt somit bei unter $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ für die Zellkultur mit L929-Zellen.

Die Reaktion der Zellen auf Zn-MEPE unterscheidet sich erheblich von den anderen beiden MEPE. Bleibt die zugegebene Konzentration unterhalb von $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ kann von Biokompatibilität gesprochen werden. Oberhalb dieser Konzentration sinkt die Zellaktivität rasant auf 0%.

In diesem Zytotoxizitätsversuch wurde das erste Screening der verschiedenen M(II)-MEPE durchgeführt. Aufgrund der positiven Eigenschaften von Metallionen in zellulären Systemen war die Fragestellung zum einen, ob die Polyelektrolyte toleriert werden und zum anderen, ob es zu einer signifikanten, detektierbaren Stimulierung kommt. Im Fall von Co- und Zn-MEPE ist das Konzentrationsfenster für die Biokompatibilität sehr schmal. Es werden nur sehr geringe

Konzentrationen toleriert, vergleichbar mit einer LbL- Beschichtung. Jedoch ist die Beschichtung mittels Zn-MEPE aufgrund der kurzen Ketten nicht realisierbar, wodurch Zn-MEPE ausschließlich in gelöster Form getestet wurde.

Mitochondrienaktivität L929 bei Zugabe von Fe-Salz Eluaten

Um den Einfluss des im MEPE koordinierten Metallzentrums im Vergleich zum Metallsalz zu testen, wurden zudem konzentrationsabhängige Zytotoxizitätsuntersuchungen mit Fe(II)- und Fe(III)-Salzen durchgeführt. In Abbildung 16 ist die konzentrationsabhängige Zellaktivität am 2, 5 und 10 Tag logarithmisch aufgetragen. Hier ist in allen drei Graphen zu sehen, dass die eingesetzte Konzentration an Eisensalz keinerlei Zytotoxizität hervorrufen. Es sind zwei Ausreißer ausgenommen, die im Fall von FeCl_2 und FeSO_4 an Tag 2 zu sehen sind. Es wird jedoch deutlich, dass die Kurvenverläufe von Fe-MEPE bereits bei einer unspezifischen Fibroblasten Zelllinie nicht deckungsgleich mit den Kurvenverläufen der Fe(II)- und Fe(III)-Salze sind.

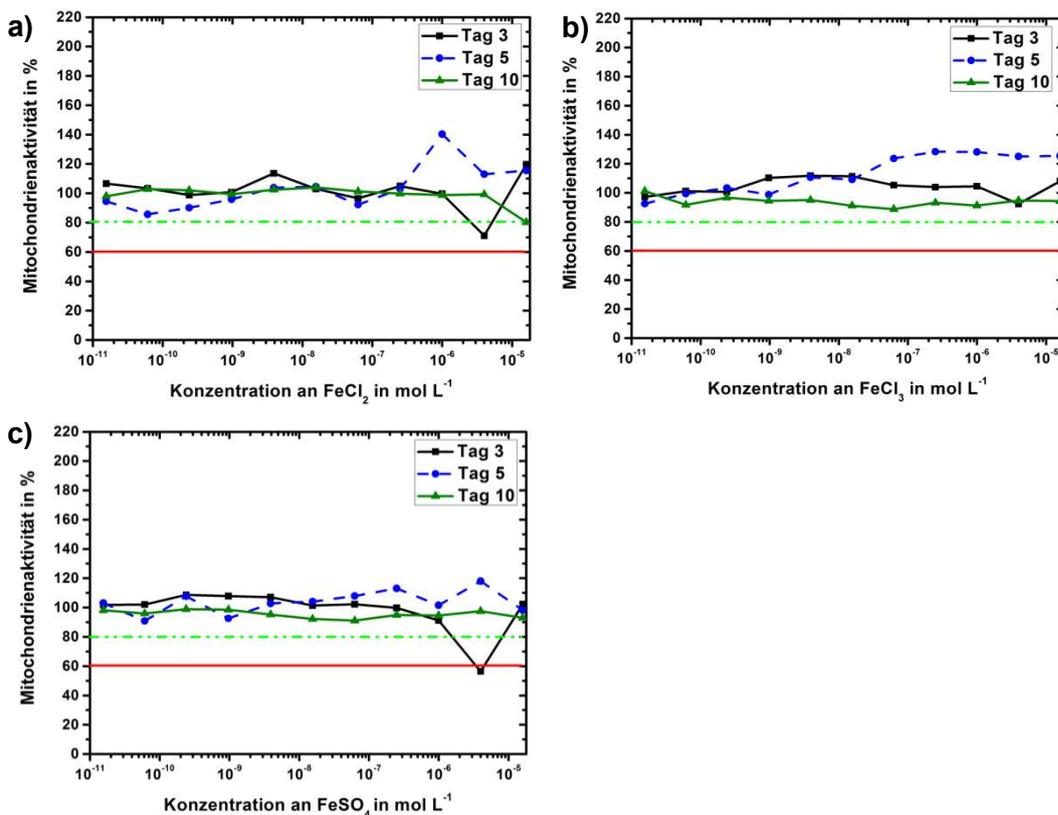


Abbildung 16: Mitochondrienaktivitäten von L929-Zellen bei Zugabe von a) FeCl_2 , b) FeCl_3 und c) FeSO_4 in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,60 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Zellzahl und Mitochondrienaktivität L929 auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen

Um das Verhalten der Zellen näher studieren zu können, hatten die Zellen in den folgenden Versuchen direkten Kontakt zu den Fe-MEPE modifizierten Oberflächen. Die Vorversuche haben gezeigt, dass der Fe(II)-Freisetzung der LbL- und tauchbeschichteten Proben oberhalb der Zytotoxizitätsgrenze für L929-Zellen liegt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Mitochondrienaktivität und die Zellzahl in % in Bezug auf die Referenz (Polystyroloberfläche = 100%) der Zellen direkt auf den Fe-MEPE Beschichtung dargestellt. Im Fall der Mitochondrienaktivität liegen alle funktionalisierten Oberflächen oberhalb der 60% Grenze. An Tag 2 liegen zunächst die porösen Sol-Gel-Schichten über 80% und sind somit nicht zytotoxisch. Für die infiltrierte Probe liegt eine erhöhte Mitochondrienaktivität in Bezug auf die Referenz von $40 \pm 7\%$ vor. Zwischen den Tagen 2 und 5 gleichen sich die Werte der Tauchbeschichtungen an und übersteigen auch hier die Zytotoxizitätsgrenze. Die Langzeituntersuchung an Tag 10 ergibt für alle modifizierten Oberflächen eine Mitochondrienaktivität über 80% und somit eine Biokompatibilität. Bei den Zellzahlen verhält sich die LbL-Schicht ähnlich wie die Referenz. Hier ist kein Einfluss auf die Zellzahl im Vergleich zur Referenz erkennbar. Die Tage bis einschließlich Tag 5 erreichen die modifizierten Oberflächen (außer die bereits genannte LbL-Schicht) nicht die 80% Grenze, sind jedoch über 60% und würden somit als mäßig zytotoxisch eingestuft werden. Über einen längeren Zeitraum (ab 5 Tagen) zeigen sie jedoch keine Zytotoxizität mehr. In Abbildung 17 b) ist zu erkennen, dass die porösen SiO_2 -Schichten mit 2,5mM Fe-MEPE infiltrierte die ersten 5 Tage knapp bei 80% liegen und somit zunächst als schwach zytotoxisch einzustufen sind. Durch den 2-3mal durchgeführten Mediumwechsel wird dies jedoch verdünnt und die Zellzahlen erholen sich bis zum 10. Tag wieder. Die Mitochondrienaktivität ist an allen Tagen über 100%, deshalb ist es nicht ausreichend, ausschließlich den WST-1 Test durchzuführen.

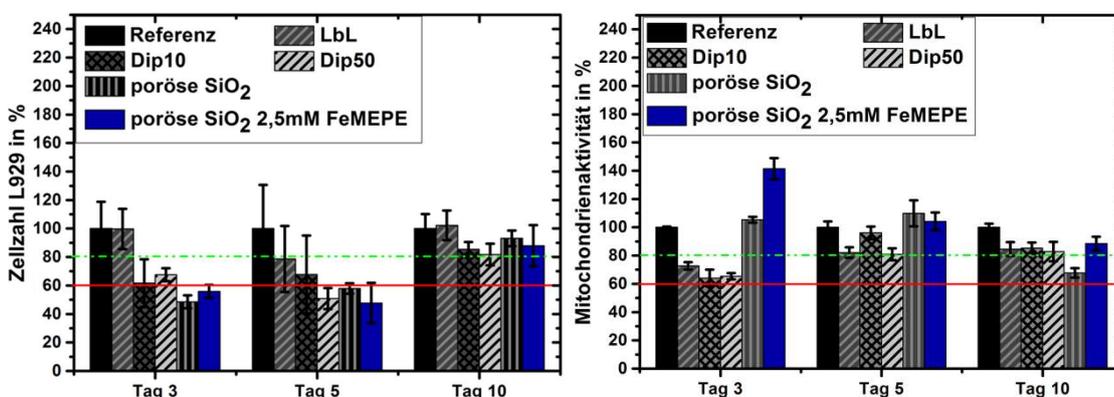


Abbildung 17: Balkendiagramm der a) Zellzahl und b) Mitochondrienaktivität von L929-Zellen auf verschiedenen Oberflächen am Tag 3, 5 und 10 zur Überprüfung der Zytotoxizität.

Um den Einfluss der Anzahl der alternierenden Fe-MEPE LbL-Schichten einschätzen zu können, wurden Schichten mit einer Fe-MEPE-Schicht, [PSS/Fe-MEPE]₂ und [PSS/Fe-MEPE]₅ hergestellt und via Zellzahl und WST-1 Test untersucht (siehe Abbildung 18). Hierbei stellt es sich heraus, dass bis auf die LbL mit einer Fe-MEPE Monolage alle 3 Testsysteme sich annähernd gleich verhalten und es somit keinen signifikanten Unterschied gibt, ob man eine Monolage oder 5 Monolagen auf das Glassubstrat aufträgt. Im Folgenden werden ausschließlich LbL-Schichten mit PEI/PSS/Fe-MEPE untersucht. Die Schichten sind in den ersten 5 Tagen mäßig zytotoxisch, wobei im Langzeittest im Verlauf von 5-10 Tagen die Oberflächen als nicht zytotoxisch eingestuft werden können.

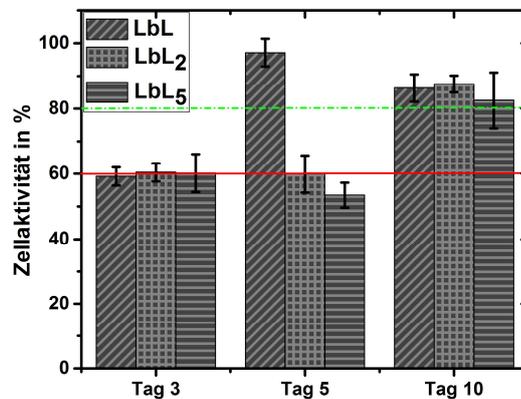


Abbildung 18: Vergleich unterschiedliche Anzahl der Monolage via Layer by Layer beschichteter Fe-MEPE-Proben.

Somit kommt man zu dem Ergebnis, dass metallo-supramolekulare Polyelektrolyte Zellen nicht nur anhand der Fe(II)-Freisetzung beeinflussen, sondern auch durch die Eigenschaften der Beschichtungsoberfläche. Zum einen sind die eingesetzten Fe-MEPE Konzentrationen bezüglich der Mitochondrienaktivität nicht zytotoxisch (siehe Abbildung 15 a)). Zum anderen wirken die Fe-MEPE modifizierten Substrate hemmend auf die Proliferation der L929-Zellen zugunsten der Stoffwechselaktivität. Somit kommt es zu einer erhöhten Zellaktivität.

Um diesen stimulierenden Effekt auf die Stoffwechselaktivität weiter beobachten und spezifizieren zu können, wurde im Folgenden weitere spezifischere Zelllinie in die Versuchsreihe miteinbezogen. Die verwendeten C2C12-Zellen sind myoblastäre Vorläuferzellen und in der Lage zu Muskelfasern zu differenzieren. Hierzu wird ein äußerer Stimulus benötigt. In der Literatur wird dies mittels Reduktion des fetalen Kälberserums im Medium realisiert. Hierbei wird

den Zellen stufenweise Serum entzogen, bis sie im sogenannten Hungerserum beginnen zu differenzieren.

4.1.2.2 C2C12 Zelllinie

Auch im Fall der C2C12 Zelllinie wurde zunächst ein Zytotoxizitätstest der Eluate durchgeführt.

Mitochondrienaktivität C212 bei Zugabe von Fe-, Co-, Ni-, Zn-MEPE Eluaten

Betrachtet man die konzentrationsabhängige Zellaktivität der C2C12-Zellen für Fe-MEPE (siehe Abbildung 19) so wird deutlich, dass es am zweiten Tag zu einer Stimulierung der Zellen kommt. Bei einer Fe-MEPE Konzentration von $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ist die höchste Zellaktivität detektierbar. Diese liegt bei 172% im Vergleich zur Referenzoberfläche. Die Stimulierung ist in den folgenden Tagen nicht mehr erkennbar. Die Werte für die Zellaktivität liegen bis zum 10. Tag im Bereich zwischen 80-100%. Fe-MEPE stellt damit für diese Zelllinie in diesem Konzentrationsbereich keine zytotoxische Substanz dar. Es kommt sogar zur Stimulierung der Zellaktivität.

Bei Co-MEPE kommt es ebenfalls bei Konzentrationen unterhalb von $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ zu einem leicht stimulierenden Effekt. Hierbei stieg die Zellaktivität 20% über die der Referenz. Höhere Konzentrationen an Co-MEPE werden die ersten beiden Tage toleriert, anschließend sinkt die Zellaktivität rapide unter 10% der des Referenzsystems ab. Unterhalb einer Konzentration von $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ wirkt Co-MEPE über 10 Tage nicht zytotoxisch auf die C2C12 Zelllinie. Ni-MEPE wirkt ab einer Konzentration von $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ bis einschließlich $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ positiv auf die Zellaktivität. Die Zellaktivität steigt bis zu einem Wert von 182% an. An den folgenden Tagen geht die Aktivität wieder zurück, vor allem bei Konzentrationen von $c \geq 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Am 10. Tag unterschreitet die Zellaktivität die Grenze zur starken Zytotoxizität von unter 60% für diesen Konzentrationsbereich. Für Zn-MEPE ergibt sich ein uneinheitlicher Trend. Zunächst werden die Konzentrationen zwischen $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ und $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ nur mäßig toleriert. An den folgenden Tagen erholen sich die Zellen und die Aktivität steigt wieder über die 80% Grenze.

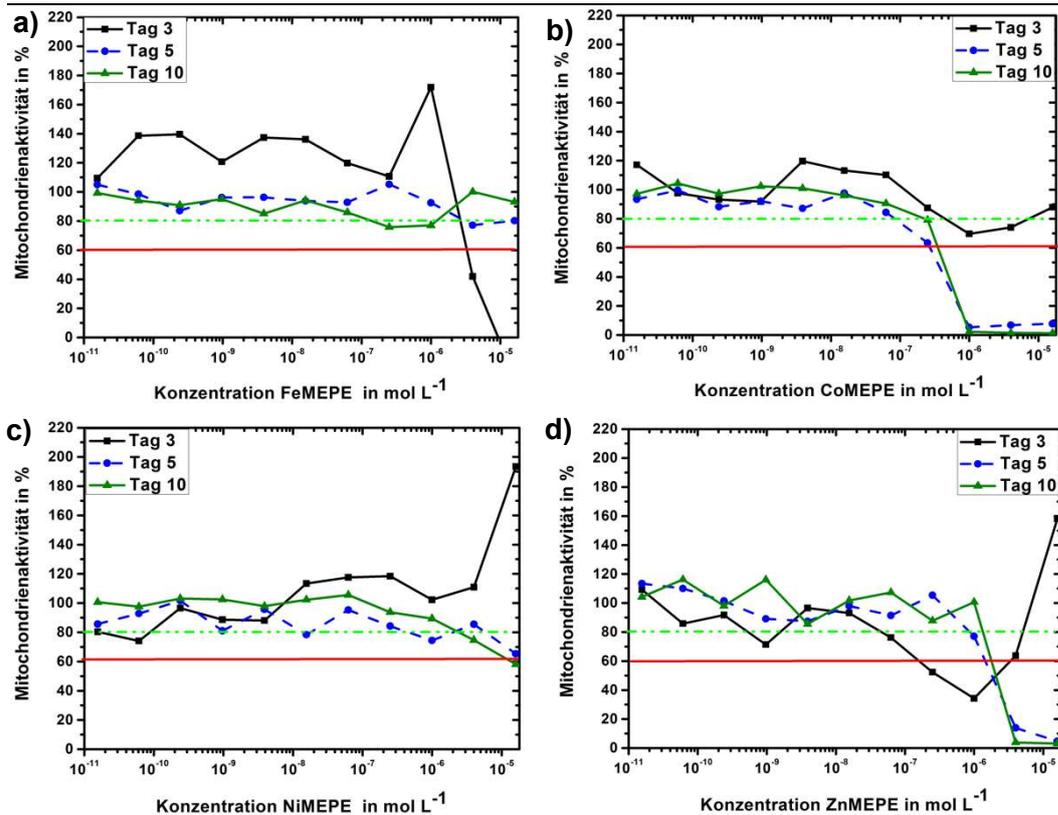


Abbildung 19: Mitochondrienaktivität von C2C12-Zellen bei Zugabe von a) Fe-MEPE b) Co-MEPE c) Ni-MEPE und d) Zn-MEPE in Wasser gelöst und in PBS weiterverdünnt in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5}$ mol/l.

Mitochondrienaktivität C212 bei Zugabe von Fe(II)- und Fe(III) Salzen

Es stellt sich nun die Frage, wodurch die Zellen den Stimulus im Fall von Fe-MEPE erfahren. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein vergleichbarer Elutionstest mit Fe(II)- und Fe(III)-Salzen durchgeführt (siehe Abbildung 20). Vergleicht man nun die konzentrationsabhängige Zellaktivität der C2C12-Zellen von Fe-MEPE (siehe Abbildung 19) mit der für die Eisensalze FeCl_2 , FeCl_3 und FeSO_4 in Abbildung 20 so fällt auf, dass die starke Stimulation von Fe-MEPE am 2. Tag bei den eingesetzten Eisensalzen nicht beobachtet werden konnte. Im Fall der nicht koordinativ gebundenen Fe-Metallionen zeigt sich ein leicht stimulierender Effekt von ca. 20% erst ab Tag 5. Außerdem fällt auf, dass auch das Gegenion eine Rolle spielt. Bei FeCl_2 erkennt man an Tag 5 eine Stimulation von bis zu 130%, bei FeSO_4 sind die Zellaktivitäten überwiegend an Tag 10 erhöht. Die Ausreißer ab einer Konzentration 1×10^{-6} mol L^{-1} sind für Fe-MEPE im Vergleich zu FeCl_2 gegenläufig. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der stimulierende Effekt auf die Zellaktivität der C2C12-Zellen nicht ausschließlich auf die Einbringung

von Metallionen ins System herrührt. Somit bringt die Zugabe von koordinativ gebundenen Fe(II)-Ionen mittels Terpyridinen einen erheblichen Vorteil gegenüber der Zugabe der reinen Eisensalze.

Zudem erkennt man beim Vergleich der Kurvenverläufe in Abbildung 20 (C2C12-Zellen) mit dem Kurvenverlauf in Abbildung 16 (L929-Zellen) ein völlig unterschiedliches Verhalten der beiden Zelllinien. Die L929-Zellen werden nicht in dem Maße von der Zugabe von Eisensalzlösungen stimuliert wie die C2C12-Zellen. Speziell bei der Zugabe von Fe(II)-Salzen erkennt man im Vergleich zur TCPS Referenz eine erhöhte Zellaktivität.

Diese Zelllinie wurde aufgrund der erhaltenen Ergebnisse für Fe-MEPE näher und somit im folgenden Kapitel ausführlicher betrachtet (siehe 4.1.3 Einfluss von Fe-MEPE-Schichten auf C2C12-Zellen).

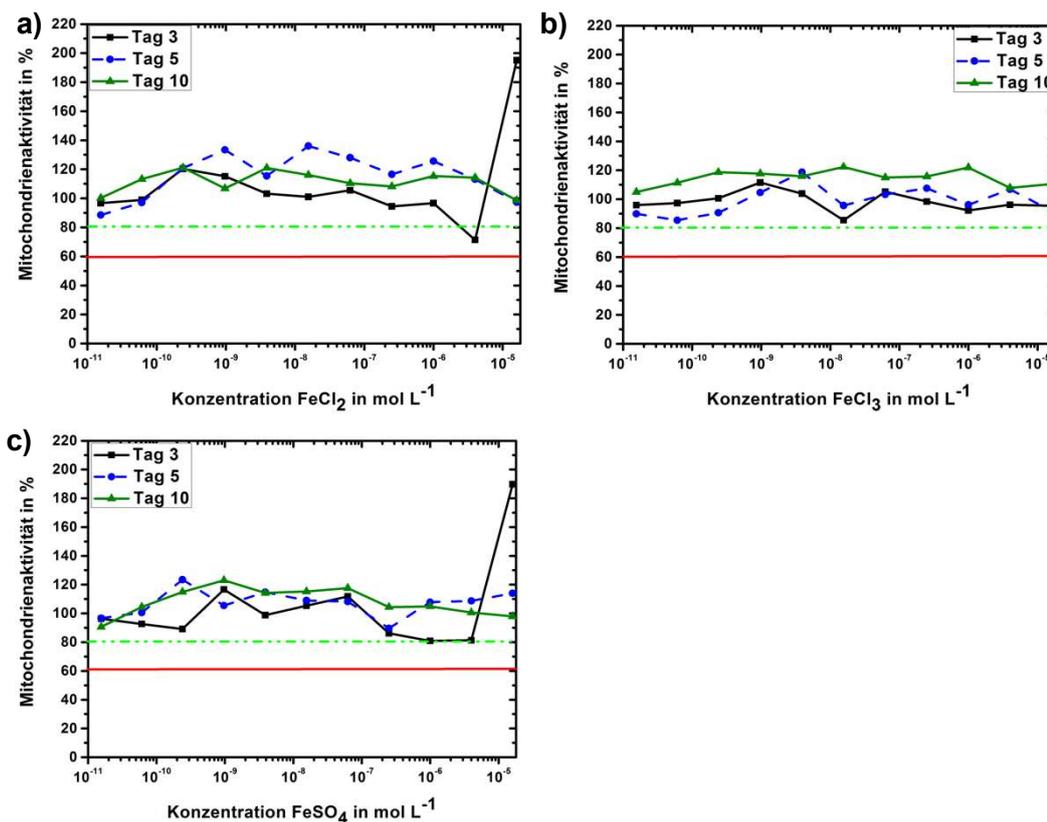


Abbildung 20: Mitochondrienaktivität von C2C12-Zellen bei Zugabe von a) FeCl₂, b) FeCl₃ und c) FeSO₄ in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

4.1.2.3 MG63 Zelllinie

Um den Einfluss von FeMEPE auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen wurden zunächst Fe(II)-/Fe(III)-Salze bzw. Fe-MEPE gelöst in PBS zu den Zellen gegeben und die Mitochondrienaktivität bestimmt.

Mitochondrienaktivität MG63 bei Zugabe von Fe(II)- und Fe(III) Salzen

In Abbildung 21 sind die Mitochondrienaktivitäten in Abhängigkeit der zugegebenen Fe(II)-Salze bzw. des Fe-MEPE zu sehen. Es wird deutlich, dass die Zugabe aller vier Lösungen in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ in den ersten drei Tagen schwach zytotoxisch wirkt. Anschließend steigen die WST-1 Werte auf über 80%. Bei Betrachtung der Messwerte für Fe-MEPE wird deutlich, dass Konzentrationen über $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ stark zytotoxisch auf MG63-Zellen wirken. Zudem erkennt man eine erhöhte Mitochondrienaktivität bei Einbringung von Fe-MEPE ins Zellkulturmedium. Für Tag 5 wirken die Konzentrationen von $2,5 \times 10^{-7}$, $9,7$ und $2,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ um durchschnittlich 10% stimulierend auf die Stoffwechselaktivität im Vergleich zur Referenz. An Tag 10 wirken vor allem höhere Konzentrationen im Bereich von 1×10^{-6} und $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ stimulierend auf die Mitochondrienaktivität (+20%).

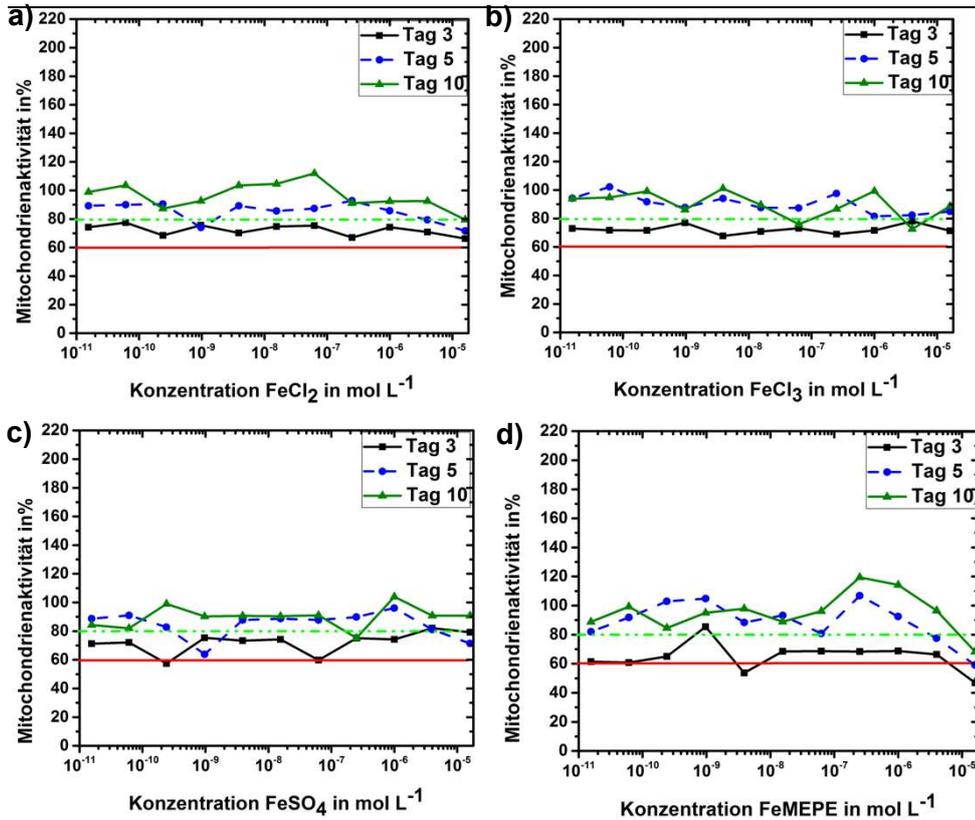


Abbildung 21: Mitochondrienaktivität von MG63-Zellen bei Zugabe von FeCl_2 , FeSO_4 , FeCl_3 und Fe-MEPE (gelöst in PBS) in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Fe-MEPE in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ auf L929-Zellen nicht zytotoxisch wirkt. Zudem konnte bei der Verwendung von Fe-MEPE modifizierten Oberflächen ein Rückgang der Proliferation zugunsten der Mitochondrienaktivität beobachtet werden.

Bei Zugabe von gelöstem Fe-MEPE zu C2C12 und MG63-Zellen konnte ebenfalls eine Stimulierung der Mitochondrienaktivität detektiert werden weshalb im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher auf die myogene Differenzierung der C2C12-Zellen und auf die osteogene Differenzierung von MG63-Zellen eingegangen wird.

4.1.3 Einfluss von Fe-MEPE-Schichten auf C2C12-Zellen

Zellmorphologie C2C12

Im vorherigen Kapitel (siehe Abbildung 19) wurde ein stimulierender Effekt auf die C2C12 Zelllinie an Tag 3 beobachtet. Um dies näher zu betrachten, wurden die Zellen für weitere Zelltests direkt auf LbL und tauchbeschichteten Proben ausgesät. Anschließend werden die Proliferation und Zellmorphologie in regelmäßigen Abständen mikroskopisch untersucht. In Abbildung 22 ist der Übergang der unbeschichteten Glasoberfläche zur Fe-MEPE Beschichtung erkennbar. Vergleicht man das Wachstumsverhalten und Zellmorphologie der C2C12-Zellen, so erscheinen diese morphologisch gestreckter, begleitend mit einer höheren Zellausbreitung. Dies wird an der Grenze zwischen der Beschichtung und dem Glassubstrat noch deutlicher. Obwohl eine vergleichbare Anzahl von Zellen nach 24h (siehe Abbildung 23) beobachtet wird, wird ein substratabhängiger Unterschied der Zelldichte nach 3 Tagen deutlich. Die Zelldichte auf MEPE beschichteten Oberflächen ist signifikant reduziert im Vergleich zum nicht modifizierten Glas. Für einen quantitativen Vergleich wurden die Zellen von den Oberflächen durch trypsinieren entfernt und anschließend mithilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Ein Gesamtvergleich der ermittelten Zellzahlen ist in Abbildung 25 a) dargestellt. Diese Daten bestätigen den subjektiven visuellen Eindruck, der durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen erhalten wurde.



Abbildung 22: Mikroskopie Aufnahme einer tauchbeschichteten Probe mit Fe-MEPE. Dargestellt ist der Übergang des unbeschichteten Teils des Glassubstrats im Vergleich zum beschichteten Teil.

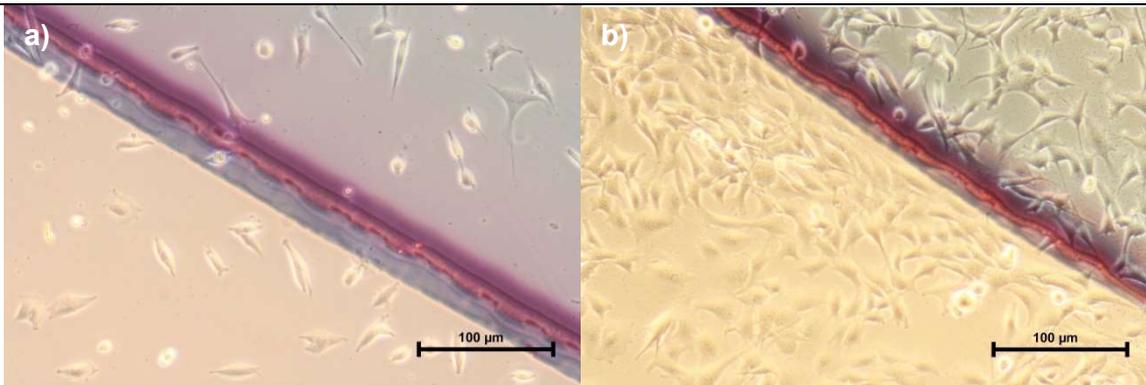


Abbildung 23: Mikroskopie Aufnahme FeDip50 nach a) 1 Tag und b) nach 3 Tagen in Zellkultur.

Im Vergleich zu den Standard-Gewebekulturplatten (TCP-Oberfläche) scheinen die Zellen im allgemein langsamer zu wachsen. Dies bezieht sich auf die Beschichtungen FeDip10 und FeDip50 (siehe Abbildung 25). Zusätzlich entwickeln die Zellen auf den tauchbeschichteten Oberflächen erhöhte zelluläre Vorsprünge aus, die mit zunehmender Konfluenz wieder abnehmen (siehe Abbildung 23). Die LbL beschichteten Substrate ergeben ähnliche Werte wie die auf TCP gewachsenen Zellen.

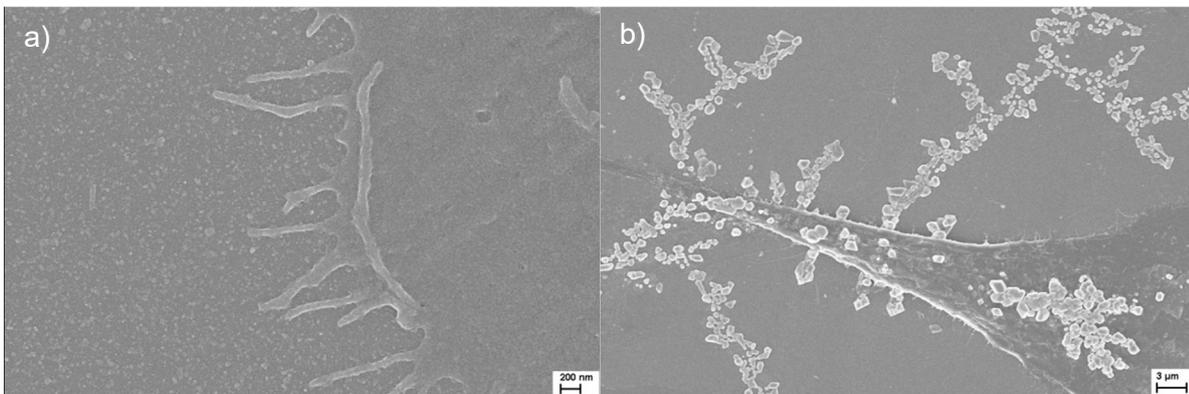


Abbildung 24: REM-Aufnahmen von C2C12-Zellen nach 3 Tagen auf einer FeDip50-Schicht.

Zellzahl und Zellaktivität C2C12 auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen

Die WST-1 Ergebnisse zeigen bei Betrachtung der einzelnen Beschichtungen erhebliche Unterschiede, weshalb in diesem Fall die Zellaktivität bestimmt wird. Bei der Zellaktivität korreliert die Mitochondrienaktivität mit der Zellzahl. Als Ergebnis erhält man die Aktivität pro Zelle und berücksichtigt somit die unterschiedlichen Zellzahlen der Substrate. In Abbildung 25 fällt primär die FeDip10-Probe auf, da hier eine erhöhte Stoffwechselaktivität von $324 \pm 130\%$ in Bezug auf die Referenz (TCP-Oberfläche) gemessen wurde.

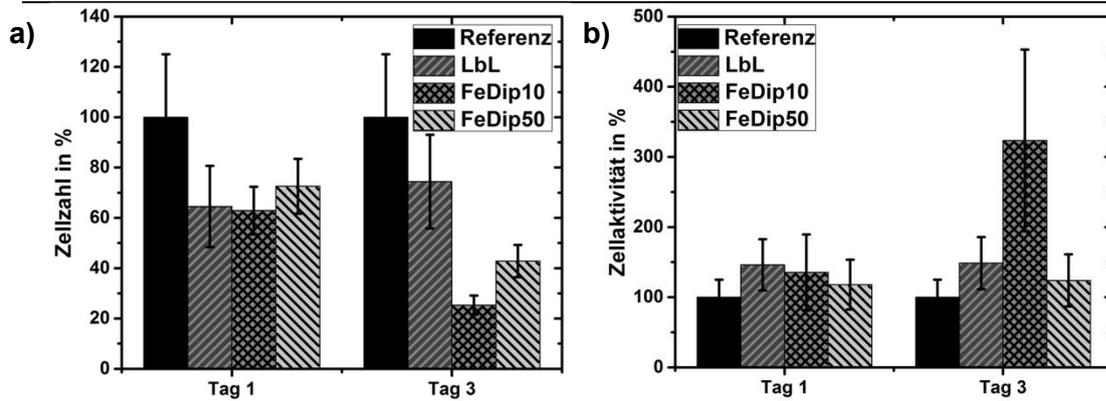


Abbildung 25: Zellzahl und Zellaktivität von C1C12 Zellen an den Tag 1 und Tag 3.

Intrazellulärer Fe(II)-Gehalt C2C12

Auffällig ist zudem, dass der Fe (II)-Gehalt auf der FeDip10 in der Zelle um $120 \pm 10\%$ erhöht ist (siehe Abbildung 26). Nach 24h Wachstum ist der Fe(II)-Gehalt signifikant auf den Fe-MEPE beschichteten Substraten erhöht (125-175% der Kontrolle). Der Verlauf des intrazellulären Fe(II) ist gegenläufig zu den Schichtdicken und somit dem MEPE-Gehalt der Schicht. Nach 3 Tagen gleichen sich die Werte für die LbL und die Dip50-Schicht der Referenz an. Eine veränderte Zellmorphologie, die reduzierte Zellproliferationsrate, die erhöhte metabolische Aktivität und ein erhöhter Fe(II)-Gehalt weisen stark darauf hin, dass die Zellen zu einem Muskel-Phänotyp auf den Dip10-Schichten differenzieren. Um diese Hypothese zu beweisen, wurde die Expression des β_3 Integrins auf der Ebene der mRNA durch qRT-PCR analysiert, da dieses Protein zum einen eine wichtige Rolle bei der C2C12 Zelladhäsion, der Fe(II)-Aufnahme und der Differenzierung spielt (39).

Genexpressionsanalyse C2C12

Nach 24h, siehe Abbildung 27 a), kommt es allgemein zu einer erhöhten β_3 Expression. Die Referenz wurde auf 1 gesetzt. Nach weiteren 2 Tagen der Kultivierung reduziert sich die Expression um das 2-8 fache. Abgesehen von dem Niveau des β_3 -Integrins wurden zusätzlich drei Expressionsmarkergene MyoD, Myf6 und MyoG betrachtet (Abbildung 27 b)-d)). Im Allgemeinen verläuft die Differenzierung schrittweise. Zunächst verharren die Zellen im Zellzyklus, gefolgt von der Hochregulation von spezifischen Muskel Genen und schließlich erfolgt die Fusion der proliferierten Zellen zu Myotubes und Myofibers. Die myogene Schlüsseltranskriptionsfaktoren sind MyoD, MyoG und Myf6. Die Expression der Differenzierungsmarker wurde verwendet, um die einzelnen Stadien der Differenzierung ermitteln zu können.

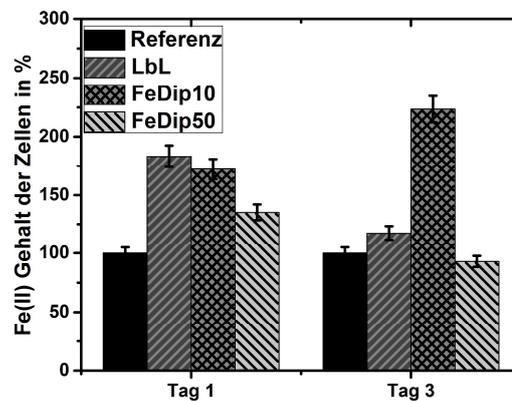


Abbildung 26: Untersuchung intrazellulärer Fe(II)-Gehalt in % bezogen auf TCPS Oberfläche als Referenz.

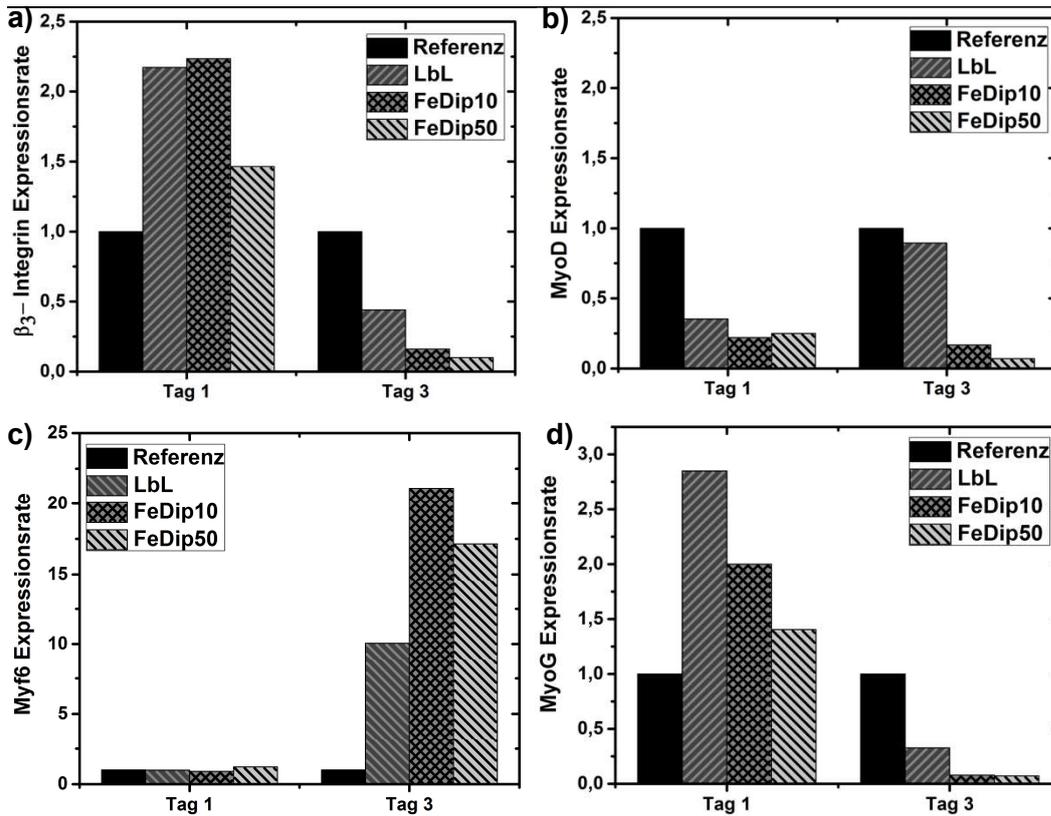


Abbildung 27: Übersicht über die a) β_3 Integrinexpressionsrate b)-d) Genexpressionsraten von MyoD, Myf6 und MyoG der C2C12-Zellen auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen an Tag 1 und Tag 3.

Die Hochregulierung von MyoD erfolgt in frühen Schritten der Differenzierung. Dieser Transkriptionsfaktor hemmt den Zellzyklus und initiiert postmitotisch die myogene Differenzierung der C2C12-Zellen *in vitro* (50, 52). Darüber hinaus triggert MyoD die Expression eines weiteren Expressionsmarkers MyoG. Nach Hochregulierung von MyoG wird MyoD weiterhin exprimiert, jedoch im Vergleich zum den frühen Differenzierungsstadien runter reguliert. Die Expression von Myogenin (MyoG) weist auf den terminalen Differenzierungsschritt hin und ist essenziell für die Zellfusion und Faserbildung der C2C12-Zellen zu Muskelfasern (siehe Abbildung 28).

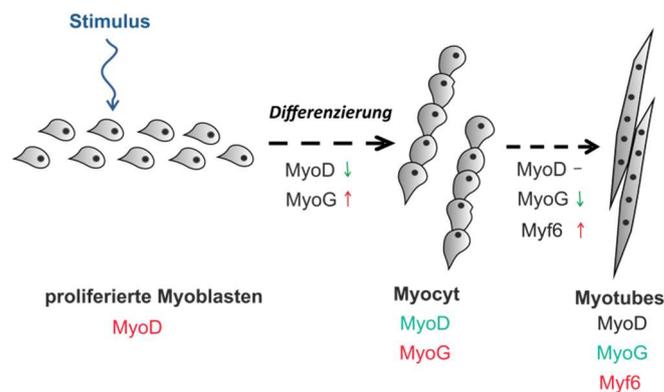


Abbildung 28: Überblick Initiierung der myogenen Differenzierung über die Stadien der frühen Differenzierung (Bildung von Myocyten) bis hin zur finalen Myotubebildung. Dargestellt sind zudem die Expressionsraten der Differenzierungsmarker. Mit rot wird eine Erhöhung der Expression und mit grün ein Rückgang der Marker gekennzeichnet.

Aufgrund dieser Abhängigkeit ist ersichtlich, dass die hohe Expression bereits in der späten Phase der frühen Differenzierungsstadien beginnt. Myf6 dagegen ist im Allgemeinen ein Indikator für den gesamten Differenzierungsprozess. Insbesondere für die späte Differenzierungsphase ist eine erhöhte Expression von Myf6 detektierbar (siehe Abbildung 27 c)) (47). Die Expression von MyoG korreliert mit der des β_3 -Integrins. Auch dieses Gen wird 24h nach der Kultivierung auf den MEPE beschichteten Oberflächen hoch reguliert. Wie auch für das β_3 -Integrin sinkt die Expression in den darauffolgenden beiden Tagen. Die MyoD Expression ist generell nach 24h auf allen beschichteten Oberflächen geringer als auf der Referenz. Hier ist nach 3 Tagen ein klarer Unterschied zu erkennen. Die Zellen, die direkten Kontakt zur LbL-Schicht haben, zeigen eine ähnliche Expression, wie die auf TCP kultivierten Zellen. Betrachtet man nun die tauchbeschichteten Proben, wird deutlich, dass eine erneute Reduktion der Genexpression detektiert wird. Die deutlichsten Effekte wurden für die Expression von Myf6 beobachtet. Nach 24h konnten für alle Wachstumsbedingungen Genexpressionen nahe an der Nachweisgrenze gefunden. An Tag 3 sind die Genexpressionen der Zellen auf der Standard-Zellkulturplatte unverändert auf niedrigem Niveau, wobei eine Hochregulierung auf den modifizierten MEPE-Substraten stattfindet. Die höchste Expression ist auf der FeDip10 zu finden, was mit dem höchsten Eisen (II) Gehalt in der Zelle und der höchsten Stoffwechselrate korreliert (siehe Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27). Zusammenfassend zeigen die gezeigten Daten deutlich, dass die verwendeten Zellen auf MEPE-Substraten adhären und proliferieren. Ferner zeigt die Hochregulierung der Differenzierungsmarker die Verwendbarkeit dieser Substrate zur Initiierung von myogener Differenzierung von C2C12-Zellen.

Zellfusion und Bildung von Myotubes

Um nun einen Zell-Zellkontakt und somit die Zellfusion gewährleisten zu können, wurden die C2C12-Zellen nach Tag 3 auf den tauchbeschichteten MEPE Oberflächen erneut unter Standard Bedingungen auf TCP-Oberflächen ausgesät. In Abbildung 29 a) ist ein deutlicher Trend zur Fusion und in Abbildung 29 b) die Ausbildung von Muskelfasern erkennbar. Durch das Fehlen des Stimulus proliferieren die Zellen erneut und fusionieren beim nötigen Zell-Zell Kontakt zu Fasern.

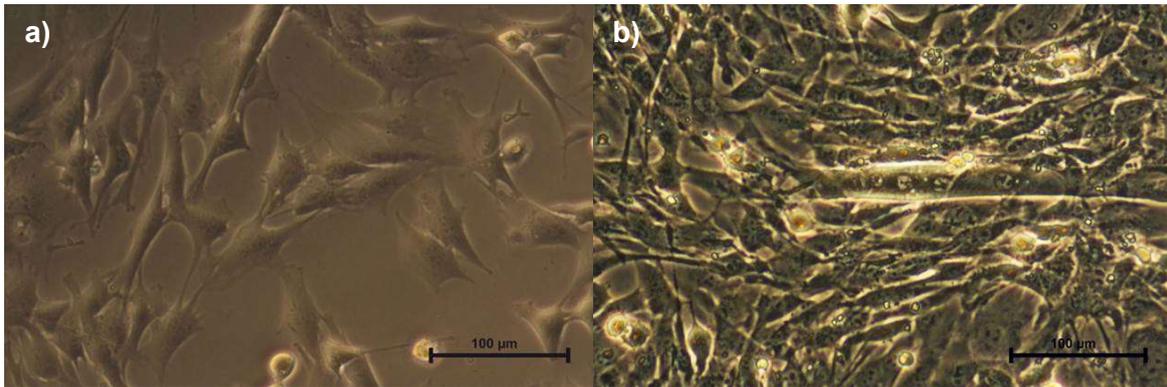


Abbildung 29: C2C12-Zellen, die 3 Tage auf einer FeDip50 kultiviert und neu ausgesät wurden an a) Tag 1 und b) Tag 2.

β_3 -Integrinexpression bei Eisensalz Zugabe

Schon in Kapitel 4.1.2.2 C2C12 Zelllinie wurde diskutiert, ob die Stimulation der Zellaktivität nur auf das Metallion zurückzuführen ist oder ob das komplexierte Metallion einen anderen Einfluss auf die Zellen hat. Fe-MEPE und FeCl_2 stimulieren die Zellaktivität von C2C12-Zellen, jedoch beeinflusst Fe-MEPE die Zellen dahingehend, dass die Proliferation zurückgeht und die Zellen in die Differenzierung gehen. Um nun den Einfluss der Eisensalze auf die Integrin Expression zu überprüfen, wurden Konzentrationen von Fe(II)- und Fe(III)-Ionen von 1 bzw. 100 μM zum Zellkulturmedium zugegeben. In Abbildung 30 sind die erhaltenen Expressionsraten an Tag 1 aufgetragen. Es wird deutlich, dass es zu keiner erhöhten Integrin Expression kommt. Für die Konzentrationen von 100 μM an Fe(II) bzw. Fe(III) sieht man annähernd eine vergleichbare Expression wie die der Referenzzellen ohne Salzzugabe. Für die Konzentrationen von 1 μM kommt es zur herunter Regulierung des Integrins auf bis zu 40% der Referenz. Somit kommt es zu keiner stimulierenden Wirkung auf das β_3 Integrin, was zusätzlich für den Fe(II)-Transport in die Zelle verantwortlich ist. Zusammenfassend ist zu sagen, dass es nicht

ausreicht, C2C12-Zellen Eisensalze zur Verfügung zu stellen, um die myogene Differenzierung zu stimulieren.

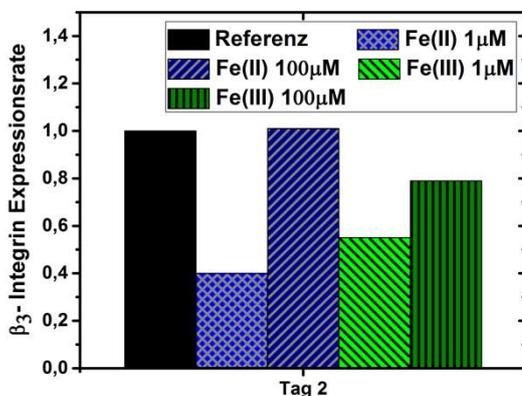


Abbildung 30: β₃-Integrinexpression von C2C12-Zellen ein Tag nach der Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von Fe(II)- und Fe(III)-Salzen.

Lokalisation Fe-MEPE in der Zelle

Nun stellt sich die Frage über den Verbleib des Fe-MEPE bzw. des Liganden in der Zelle. Publierte Arbeiten zeigen, dass [Ru(tpy)(Cl)₃]-Komplexe vergleichbar mit cis-Platin in die DNA/RNA von L1210 Leukämiezellen interkalieren bzw. als Inhibitor für bestimmte Enzyme wirken können, um diese Zellen an weiterem Wachstum zu hindern (105, 140). Diese Ergebnisse beruhen auf Studien mit planaren Ruthenium-Terpyridinkomplexen. In dieser Arbeit wurden Koordinationspolymere verwendet, die kettenartige Strukturen bilden. Als Modellsystem wurde hierfür ein Zn(II) koordiniertes 2,4-Di-2'-pyridyl-1,3,5-triazin (DPT) mit Bithiophenylspacer herangezogen, da Fe(II)-Ionen die Fluoreszenz des BisPhTerpy-Liganden auslöscht und zum anderen die Fluoreszenzintensität von Zn-MPE in zellulären Systemen nicht ausreicht.

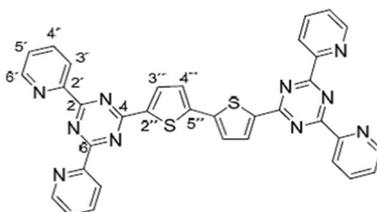


Abbildung 31: Verwendeter Ligand für Fluoreszenzaufnahmen (DPT-Bithiophenyl-DPT) als Modellsystem (141).

In Abbildung 32 sind zum einen Fluoreszenzaufnahmen und Mikroskopie-Aufnahmen der Zn(II) koordinierten DPT-Bithiophenyl-DPT inkubierten C2C12-Zellen zu sehen. Es wird angenommen, dass sich die kürzeren Kettenfragmente bzw. die Liganden um den Zellkern bzw. an die Zelle anlagern, den Zellkern jedoch nicht durchdringen. Somit kann das eingesetzte Fe-MEPE nicht ohne weiteres in die DNA interkalieren und somit bleibt das Erbgut der Zelle intakt.

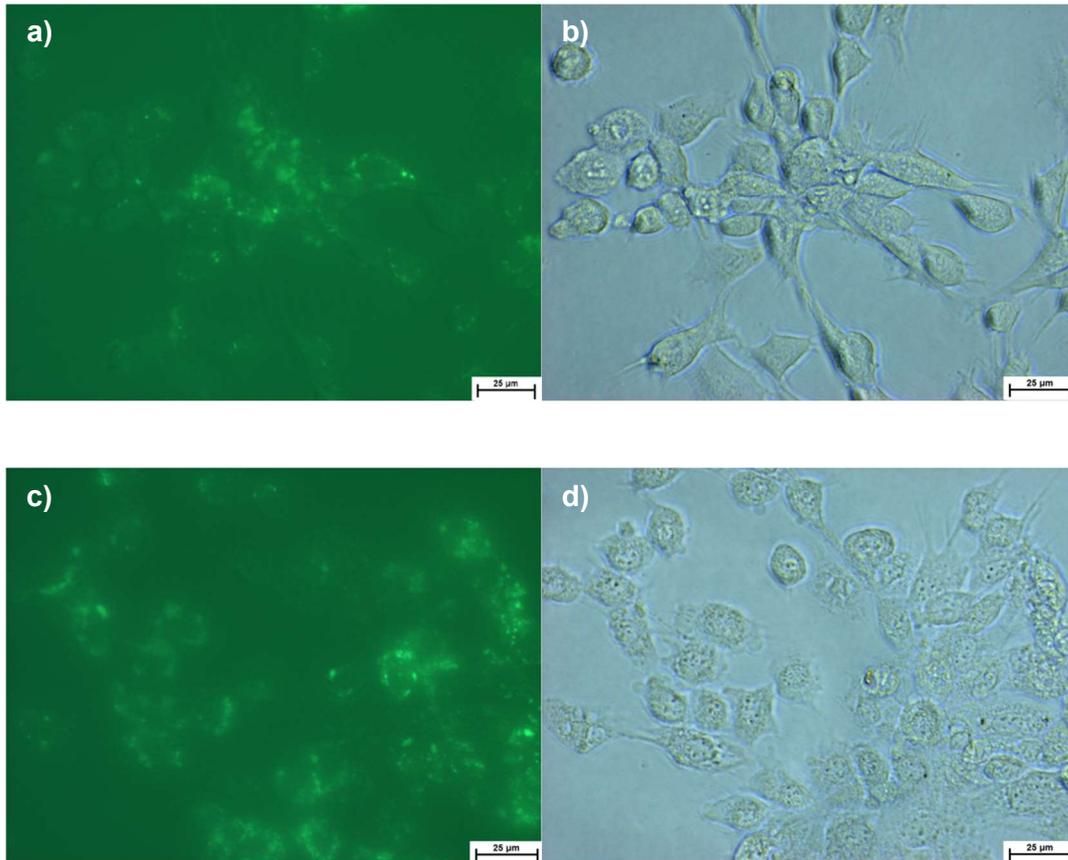


Abbildung 32: Fluoreszenzaufnahmen (links) und Mikroskopie Aufnahmen (rechts) von Zn(II) DPT-Bithiophenyl-DPT inkubierten C2C12-Zellen.

Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Arbeit wird das Zellverhalten auf planaren und porösem Fe-MEPE Schichten charakterisiert. Es wurden Schichtdicken im Bereich von 2-57 nm hergestellt (siehe Tabelle 3). Die Analyse der Rauigkeit ergibt Werte im Bereich von 3-7nm. Die Rauigkeit beeinflusst die Adhäsion und Proliferation der L929-Zellen. Je homogener und glatter die Oberfläche, desto besser adhäreren die Fibroblasten (28). In Hinsicht auf die Zelldifferenzierung der C2C12-Zellen ist eine glatte Oberfläche ein Stimulus in Richtung myogene Differenzierung, da diese Zellen bevorzugt auf Oberflächen mit geringer Rauigkeit differenzieren (40). Im

Hinblick auf die C2C12 Differenzierung folgte daraus eine nachteilige Klassifizierung der porösen SiO₂-Schichten, diese werden im Kapitel 4.2 Funktionalisierte Knochenzemente für die Untersuchung der MG63 Zelllinie wieder aufgegriffen und näher untersucht. Für die Adhäsion und Proliferation der C2C12-Zellen spielt die Rauigkeit eine eher untergeordnete Rolle. Hierbei ist die Benetzbarkeit der Oberflächen ein wichtiger Parameter. Um eine optimale Proteinadsorption gewährleisten zu können bedarf es einem Kontaktwinkel von 48-62° (137). Somit liegen die Fe-MEPE modifizierten Oberflächen im idealen Proteinadsorptionsbereich für zelluläre Systeme.

Die Löslichkeit der MEPE-Schichten erniedrigt sich in Salzlösungen im Vergleich zu reinem Wasser. Wäre dies nicht der Fall, würden sich die Beschichtungen bei Kontakt mit dem Zellmedium sofort ablösen. Aufgrund dieses Verhaltens werden die Beschichtungen für die Kontaktwinkelmessungen in PBS vorinkubiert. Zum Vergleich wird eine FeDip50-Schicht unbehandelt, also nicht in PBS vorinkubiert, vermessen. Die unbehandelte FeDip50-Probe liegt 22% unterhalb der vorinkubierten FeDip50-Schicht. Damit liegt die Benetzbarkeit mit $67 \pm 2^\circ$ annähernd im Bereich der idealen Proteinadsorption von 48-62° (137). Somit wird eine optimale Benetzbarkeit für die Proteinadsorption im Zellkulturmedium bzw. in PBS erhalten. Durch die hohe Löslichkeit der Co-MEPE-Schichten ist eine Kontaktwinkelmessung nicht möglich. Für NiDip50 ergibt sich ein Kontaktwinkel von lediglich 28°, was für eine sehr hydrophile Oberfläche spricht und somit keine ideale Fläche zur Kultivierung von Zellen darstellt, da die Proteine nicht optimal adsorbieren können.

Nun stellte sich die Frage der Löslichkeit der Schichten in zellkulturähnlichen Bedingungen. Hierzu werden die Schichten in einem Phosphatpuffer inkubiert und via UV/VIS-Spektroskopie die Absorptionsintensität vorher, nach 1h, 2h und 48h im Fall von Fe-MEPE gemessen. Literaturbekannt ist ein Rückgang von 10% bereits beim 10minütigen Waschen mit Wasser (131). Im Fall von PBS beträgt die Reduktion der Schichtdicke für die FeDip10 12%, nach 2h 20% und nach 48h reduziert sich die Schicht auf 60% der ursprünglichen Absorptionsintensität.

Je dicker die FeDip-Schicht, desto stabiler ist diese. Bei FeDip100 reduziert sich die anfängliche Intensität in PBS lediglich um 11% über 48h, was einem 10minütigen Waschen mit Wasser gleichkommt. Somit werden in PBS stabilere Schichten gegenüber Hydrolyse erhalten. Dies lässt sich bei der Betrachtung der PBS Zusammensetzung erklären: PBS beinhaltet sowohl NaCl, KCl als auch KH₂PO₄ und Na₂HPO₄·2H₂O. Der stabilisierende Effekt wird auch bei reiner NaCl Lösung erhalten. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Acetationen gegen Chlorid Ionen austauschen und somit die Schicht stabilisiert wird. Bei einem weiteren Vorversuch wird Fe-MEPE tropfenweise zu einer NaCl Lösung zugegeben (äquivalente

Konzentration zu PBS) und es werden Fe-MEPE Gel Tropfen erhalten. Somit bilden die Cl-Anionen mit den Fe-MEPE Ketten ein Netzwerk aus, welches sich gelartig verhält. Der Einfluss von Chlorid-Anionen auf die Gelierung von Terpyridin Derivaten ist literaturbekannt (142). Dong et al. demonstrierte, dass Chlorid-Anionen die Ladungsverteilung von π -konjugierten Molekülen beeinflussen können (143). Hierbei konnte durch positive und negativ geladene Rezeptormoleküle ein lamellar aufgebautes selbst organisiertes Xerogel hergestellt werden. Diese Versuche werden ebenfalls in Wasser durchgeführt und bereits nach 2-3-maligem eintauchen in Milli-Q Wasser löst sich die Fe-MEPE Schicht vom Glassubstrat. Somit ermöglicht die Zusammensetzung des Zellkulturmediums die Untersuchung von MEPE Beschichtungen mit Zellen.

Für die CoDip50 nimmt die charakteristische Co-MEPE Bande bei $\lambda = 345\text{nm}$ schon bereits nach 15min um 50% der anfänglichen Intensität ab. Nach 2h wurde eine Reduktion von 75% der Intensität detektiert. Visuell ist ebenfalls ein Ablösen der Schicht erkennbar. Aufgrund der geringen Schichtstabilität wird auf weitere Charakterisierung der Co-MEPE Schicht, wie beispielsweise die Benetzbarkeit, verzichtet. Die Ni-MEPE Schicht dagegen reduziert sich nach 2h in PBS um lediglich 7% der Schichtdicke. Somit ist der Effekt der Cl-Ionen zudem abhängig von den koordinierten Metallionen. Dies wurde bereits von Bhowmik et al. untersucht und beschrieben, jedoch wurden hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen Fe(II)-, Co(II)- und Ni(II)-Ionen in planaren Komplexen gefunden (142).

Im Falle vom Zusatz von TriTerpy ergeben sich keine Effekte auf die Löslichkeit. Das vernetzende Verhalten des Triterpy-Liganden ist somit nur in Lösung, wie schon von Sievers et. al beschrieben hat, zu finden (131). Bei den TriTerpy versetzten Fe-MEPE Schichten ist zudem auffällig, dass es zu keiner MLCT Bandenverschiebung kommt. Somit resultiert dieser Effekt nur bei Schichten $d \geq 40\text{ nm}$, wie im Fall der FeDip50. Die TriTerpy-Schichten sind zu dünn, um einen Effekt auf die MLCT Bande zeigen zu können. Zudem ist in Abbildung 8 ersichtlich, dass mit zunehmenden TriTerpy Gehalt die Absorption sinkt, was die These des Einflusses des TriTerpy-Liganden in Lösung zusätzlich unterstützt. Das TriTerpy verbleibt somit in Lösung und die verbleibenden BisTerpy-Liganden müssen sich neu koordinieren. Daraus resultieren kürzere Ketten und somit dünnere Schichten, da nicht mehr von einer dicht gepackten Schicht ausgegangen werden kann. Die Verschiebung der MLCT Bande für die Tauchbeschichtungen beträgt in Bezug auf Dip100 5 nm. Die Abweichung der einzelnen Berechnungen der Schichtdicke beträgt im Fall von FeDip10 4%, was innerhalb des tolerierbaren Fehlerbereichs von $\pm 1\text{ nm}$ liegt. Bezieht man die Absorption auf die der LbL-Schicht, kommen im Schnitt Schichtdicken von 30% geringerer Dicke heraus.

Erste Zelltests werden mithilfe des sogenannten Elutionstests durchgeführt. Hierbei wird die zu untersuchende Substanz in PBS gelöst und in das Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben und die Zellaktivität untersucht. Es stellt sich heraus, dass Fe- und Ni-MEPE unterhalb einer Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ von L929-Zellen toleriert werden. Es kommt sogar zwischen Tag 5 und Tag 10 zu einer Erhöhung der Zellaktivität. Co- und Zn-MEPE dagegen könnten lediglich in Konzentrationen unterhalb $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ als nicht zytotoxisch eingestuft werden. Anschließend werden L929-Zellen direkt auf den LbL bzw. tauchbeschichteten Fe-MEPE Oberflächen ausgesät. In den ersten beiden Tagen liegen die Stoffwechsel- und Proliferationsraten noch innerhalb der Grenze zur schwach zytotoxischen Einstufung von 60-80%, doch im weiteren Versuchsverlauf erhöhen sich diese Werte auf über 80%.

Im weiteren Verlauf werden spezifischere Zelltypen mit MEPE im Zellkulturmedium und mit Fe-MEPE beschichteten Oberflächen in Kontakt gebracht. Schon im Elutionstest zeigt sich die stimulierende Wirkung von Fe-MEPE auf die C2C12 Ziellinie. Die vorherigen Zytotoxizitätsuntersuchungen mit L929-Zellen haben bereits gezeigt, dass L929-Zellen auf Fe-MEPE Schichten adhären und proliferieren. Nun stellte sich die Frage ob Fe-MEPE auch für Substrate in der Zellkultur dienen und oder Zellverhalten beeinflussen kann. Hierzu wird eine wohl definierte und gut untersuchte Zelllinie von myoblastären Vorläuferzellen verwendet, um die Differenzierbarkeit dieser Zellen ohne Serumentzug zu untersuchen, da das Eisen (II) des Polymergerüstes zelluläre Systeme beeinflussen kann (144-146). Die Kontaktwinkelmessungen bestätigen, dass MEPE funktionalisierte Oberflächen moderat benetzbar sind und Proteine adsorbieren können (137). Auf allen Oberflächen kann Zelladhäsion und Proliferation beobachtet werden, somit sind MEPE modifizierte Substrate auch für myoblastäre Vorläuferzellen nicht zytotoxisch. Ein quantitativer Vergleich zeigt, dass die auf tauchbeschichteten Proben kultivierten Zellen langsamer als die Zellen auf der TCP Referenz bzw. die auf der LbL-Schicht proliferieren. Außerdem werden Unterschiede in der gesamten Zellmorphologie für die jeweiligen Substrate detektiert. Zum einen beeinflusst die Schichtdicke das Zellwachstum (147), zum anderen können Unterschiede der Proteinadsorptionspotentiale der anfänglichen Zelladhäsion durch einen Austausch oder die Freisetzung von Gegenionen aus der MEPE Struktur entstehen. Die tauchbeschichteten Proben besitzen eine andere Oberfläche als die LbL beschichteten Proben und können so zu Unterschieden in der Flüssigkeitszufuhr, Konzentration und Ladung an der Substrat-Zell-Grenzfläche führen. Ein solcher Effekt ist für Calciumphosphate bekannt (148). Abgesehen von den Wachstums- und morphologischen Unterschieden der C2C12-Zellen auf den tauchbeschichteten Substraten, zeigen diese eine erhöhte Stoffwechselaktivität. Die freigesetzten Eisen(II)-Ionen stimulieren die Zellen und es kommt zu einer

erhöhten Mitochondrienaktivität. Die anabole Wirkung von Eisen (II) wird durch die Zugabe von Eisen (II) Salz zum Standardmedium bestätigt. C2C12-Zellen zeigen in Zellmedium, dem Eisenionen zugesetzt wurden, eine höhere Stoffwechselaktivität als im Standardmedium. Die auf den tauchbeschichteten Proben zeigen jedoch (im Standardmedium) eine noch höhere Stoffwechselaktivität als die Zellen, denen Eisen (II) als Salz zum Medium zugegeben wurde. Der höhere Gehalt an Eisen (II) in den Zellen auf den MEPE beschichteten Oberflächen kann durch die Aufnahme über zwei Wege erklärt werden. Zum einen können Zellen über den Metall Transporter-1 (DMT-1) oder über die Interaktion des β_3 Integrins mittels Integrin-Mobilferrin-Signalweg (IMP) (149, 150) Eisen aufnehmen. Da Integrine eine wichtige Rolle bei der Zellaadhäsion spielen wurde das β_3 Integrin auf mRNA Ebene untersucht. Wie erwartet wird das β_3 Integrin überwiegend von Zellen, die auf Fe-MEPE beschichteten Oberflächen ausgesät wurden, exprimiert. Betrachtet man die Expressionsraten (siehe Abbildung 27 a)) wird deutlich, dass das Fe-MEPE primär in den ersten 24h, also während der ersten Phase der Zelladhäsion und wahrscheinlich auch in den frühen Phasen des Einsetzens der Muskeldifferenzierung stimulierend wirkt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Expression des β_3 Integrins über den Fe(II)-Freisetzung der Fe-MEPE-Schicht stimuliert wird. Dies geschieht wahrscheinlich über den IMP Signalweg. Dieser erfordert eine Oxidation von Fe(II) zu Fe(III). In wässriger Umgebung ist die Oxidationsstufe III für Eisenionen die stabilere Form und somit ist diese Anforderung gegeben sobald Fe(II) ausreichend lange in Lösung verbleibt.

Eine weitere Funktion von Metallionen in Bezug auf Zellverhalten ist die direkte Auswirkung auf die Zelladhäsion. Beispielsweise interagieren Ca(II)-, Mg(II)- und Mn(II)-Ionen direkt mit der β_3 -Untereinheit des Integrins (39). Die Bindung von Mn(II)-Ionen an die Integrine bewirkt eine Verringerung der Disulfidbrücken, was zu einer Konformationsänderung der beiden Integrin-Untereinheiten führt. Als Konsequenz hieraus ergibt sich eine höhere Bindungsaffinität zwischen Integrin und Ligand (151). Basierend auf den Ähnlichkeiten zwischen Mn(II)- und Fe(II)-Ionen, ist es denkbar, dass Fe(II)-Ionen das Integrin vergleichbar aktiviert. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Zellen weite Ausläufer ausbilden (siehe Abbildung 22) (152). Der zweite Effekt auf die Integrine erfolgt durch die Senkung der Disulfidbrückenbindung durch die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III). Nach drei Tagen Kultivierung auf Fe-MEPE wird im Vergleich zu herkömmlichen Substraten, die Expression der β_3 -Untereinheit herunter reguliert. Das beschriebene β_3 -Expressionsprofil, was eine Hochregulierung an Tag 1 und eine anschließende herunter Regulierung nach weiteren zwei Tagen beinhaltet, wurde auch von Liu und Mitarbeitern (153) berichtet. In dieser Veröffentlichung zeigen die Autoren, dass das β_3 Integrin eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Myogenese spielt. Darüber

hinaus argumentieren die Autoren, dass eine Herunterregulierung des beschriebenen Integrins für die nachfolgende Myotube Bildung notwendig ist (56,57). Alle Ergebnisse zeigen, dass Fe-MEPE Beschichtungen die myogene Differenzierung der hier verwendeten C2C12-Zellen initiieren. Die Zellfusion ist aufgrund der geringeren Zellzahlen, im Vergleich zur TCPS Referenz nicht möglich. Sät man die durch Fe-MEPE stimulierten C2C12-Zellen wieder auf eine TCPS Platte aus so gelingt aufgrund der höheren Zellzahlen die Zellfusion und die Faserbildung (siehe Abbildung 29).

Die Hochregulierung des MyoG Differenzierungsmarkers zeigt schon nach 24h die Initiierung der Differenzierung auf den modifizierten Oberflächen (45). Das Expressionsprofil von MyoG zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Expression des β_3 Integrins, was auch schon von Liu et al. berichtet wurde (56). MyoG scheint sekundär über den Focal Adhäsions Kinase (FAK) Weg über das β_3 Integrin aktiviert zu sein. Die MyoD Expression wird unerwartet herunter reguliert, was auf die geringe Zelldichte und somit auf die fehlenden Zell-Zell Kontakte (60) zu schließen ist. Dementsprechend zeigt die Schicht mit der höchsten Zellzahl, die LbL-Schicht, die höchste MyoD Expression. Auf den tauchbeschichteten Proben wurden geringere Zelldichten und somit eine geringere MyoD Expression gefunden. Myf6 wird im Differenzierungsverlauf von myoblastären Vorläuferzellen zu Myozyten und schlussendlich zu Myotubes kontinuierlich hoch reguliert (61). Am ersten Tag wurde Myf-6 weder auf den MEPE Beschichteten, noch auf der Referenz nachgewiesen. Nur auf der Dip50-Schicht ist ein geringer Effekt erkennbar (siehe Abbildung 27 c)). Die Zellen haben zu diesem Zeitpunkt den Zellzyklus bereits gestoppt und differenzieren in Richtung Myocyten. Die hohe Expression am Tag 3 zeigt ein fortgeschrittenes Stadium der Differenzierung. Zusammengefasst zeigen alle Daten die Initiierung der myogenen Differenzierung, welcher durch fehlende Zell-Zell Kontakte auf den tauchbeschichteten Proben ohne nochmaliges aussäen nicht abgeschlossen ist. Werden die Zellen jedoch erneut auf Standardoberflächen ausgesät, kommen die nötigen Zell-Zell Kontakte zustande und es erfolgt ohne Serumentzug eine Zellfusion und Faserbildung (siehe Abbildung 29). Somit werden C2C12-Zellen auf Fe-MEPE Schichten ohne den literaturbekannten Weg über den Serumentzug im Medium zur myogenen Differenzierung stimuliert.

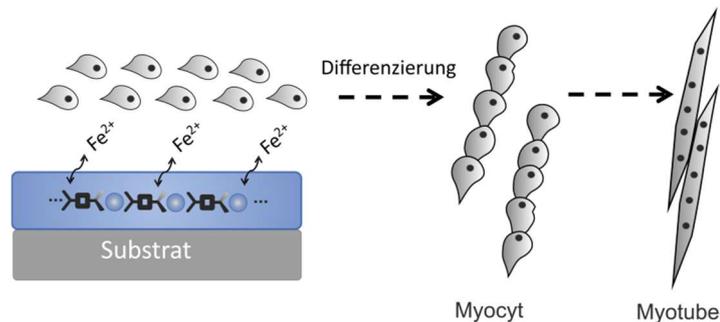


Abbildung 33: Übersicht der Stimulierung der myogenen Differenzierung von C2C12-Zellen durch Fe-MEPE funktionalisierte Glassubstrate.

4.1.4 Einfluss von Fe-MEPE auf MG63-Zellen

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass Fe-MEPE modifizierten Oberflächen myoblastäre Vorläuferzellen der Maus *in vitro* zur myogenen Differenzierung stimulieren. Nun stellt sich die Frage, ob humane MG63-Zellen ebenfalls zur Differenzierung angeregt werden können. Im folgenden Kapitel wird der Einfluss von Fe-MEPE modifizierten Oberflächen auf die osteogene Differenzierung einer homogenen, schnell expandierenden humanen Zelllinie getestet und diskutiert. Die Zellen stammen aus einem Osteosarkom und sind somit nur bedingt mit gesundem Knochengewebe vergleichbar. Um MG63 zur osteogenen Differenzierung *in vitro* zu stimulieren, wird dem Zellkulturmedium zusätzlich Ascorbinsäure und Dexamethason hinzugefügt (154, 155).

Zellzahl und Zellaktivität MG63 auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen

In Abbildung 34 sind die Zellzahlen und die Zellaktivitäten der MG63-Zellen an den Tagen 3 und 5 zu sehen. Hierbei wird deutlich, dass Fe-MEPE modifizierten Oberflächen einen erheblichen Einfluss auf die Zellzahlen und auch die Zellaktivitäten hat. Betrachtet man die Zellzahlen, so wird deutlich, dass an beiden Tagen die Zellzahlen für alle eingebrachten Substrate unterhalb der Referenz liegen. Die FeDip10-Schicht liegt mit $82 \pm 12\%$ knapp oberhalb der Zytotoxizitätsgrenze von 81-100%. Die FeDip50-Schicht liegt bereits an Tag 3 unterhalb einer Proliferation von 60% und wird somit in einen Zytotoxizitätsgrad von 3 eingestuft. Die Zellzahl sinkt innerhalb der ersten 5 Tage von $41 \pm 12\%$ an Tag 3 auf $26 \pm 7\%$ an Tag 5. Die Zellzahlen auf der LbL-Schicht nehmen ebenfalls von Tag 3 auf Tag 5 rapide ab. Hierbei sinken die Werte von ursprünglich $74 \pm 14\%$ auf $25 \pm 7\%$. Vergleicht man die FeDip10-Proben so wird deutlich, dass es ebenso zu einer verminderten Proliferation zwischen Tag 3 und 5 kommt, jedoch

sinken die Werte von $82 \pm 12\%$ lediglich auf $66 \pm 11\%$ und somit um 16%. Ebenso ist auf der FeDip50-Schicht ein Rückgang der Proliferation von 15% zu verzeichnen, für die LbL-Schicht kommt man auf Werte von 49%.

Vergleicht man hierzu die Zellaktivitäten und somit die Mitochondrienaktivität pro Zelle, so wird deutlich, dass die Zellen die Proliferation zugunsten der Stoffwechselaktivität eingestellt haben, im Fall der FeDip50 an Tag 5 sogar um $378 \pm 31\%$ bezüglich der Zellen auf der TCPS Referenzoberfläche. Die Zellen auf der LbL-Schicht steigern die Stoffwechselaktivität um $139 \pm 25\%$ und die FeDip10 Schicht um $98 \pm 21\%$.

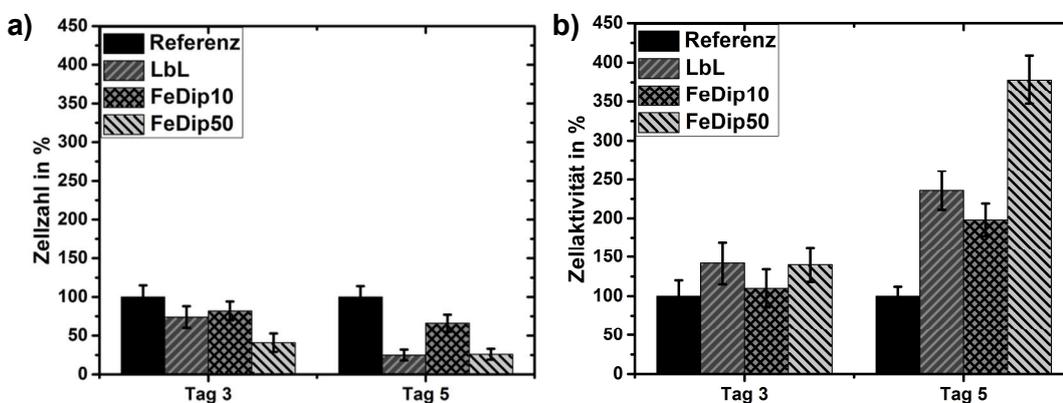


Abbildung 34: Zellzahl (a) und Zellaktivität (b) von MG63-Zellen an Tag 3 und 5.

Die hohen Zellaktivitäten lassen vermuten, dass die Zellen auf allen drei Fe-MEPE modifizierten Oberflächen zur Differenzierung angeregt wurden. Um diese These zu bestätigen, wurde eine Alizarin-Rot-Färbung durchgeführt, um eine vermehrte Ca(II)-Einlagerung der Zellen darstellen zu können.

Nachweis Kalziumeinlagerung in MG63-Zellen

In Abbildung 35 sind die Mikroskopie-Aufnahmen der Alizarin-Rot-Färbung an Tag 3 zu sehen. Die Morphologie und die Zellzahl der Referenz unterscheiden sich stark von den Aufnahmen der tauchbeschichteten Proben. Betrachtet man im Vergleich die FeDip10 Schicht, so erkennt man deutlich eine Subkonfluenz, wobei die Zellen auf der Referenz bereits konfluent sind. Die geringen Zellzahlen sind ebenfalls in Abbildung 34 deutlich erkennbar. Betrachtet man nun die Zellmorphologie, so erkennt man bereits an Tag 3 eine Clusterbildung und eine Einlagerung von Kalzium in diese Zellzusammenschlüsse auf der FeDip50-Probe. Somit befinden sich diese Zellen bereits auf der zweiten Differenzierungsstufe nach Colin et al. (57).

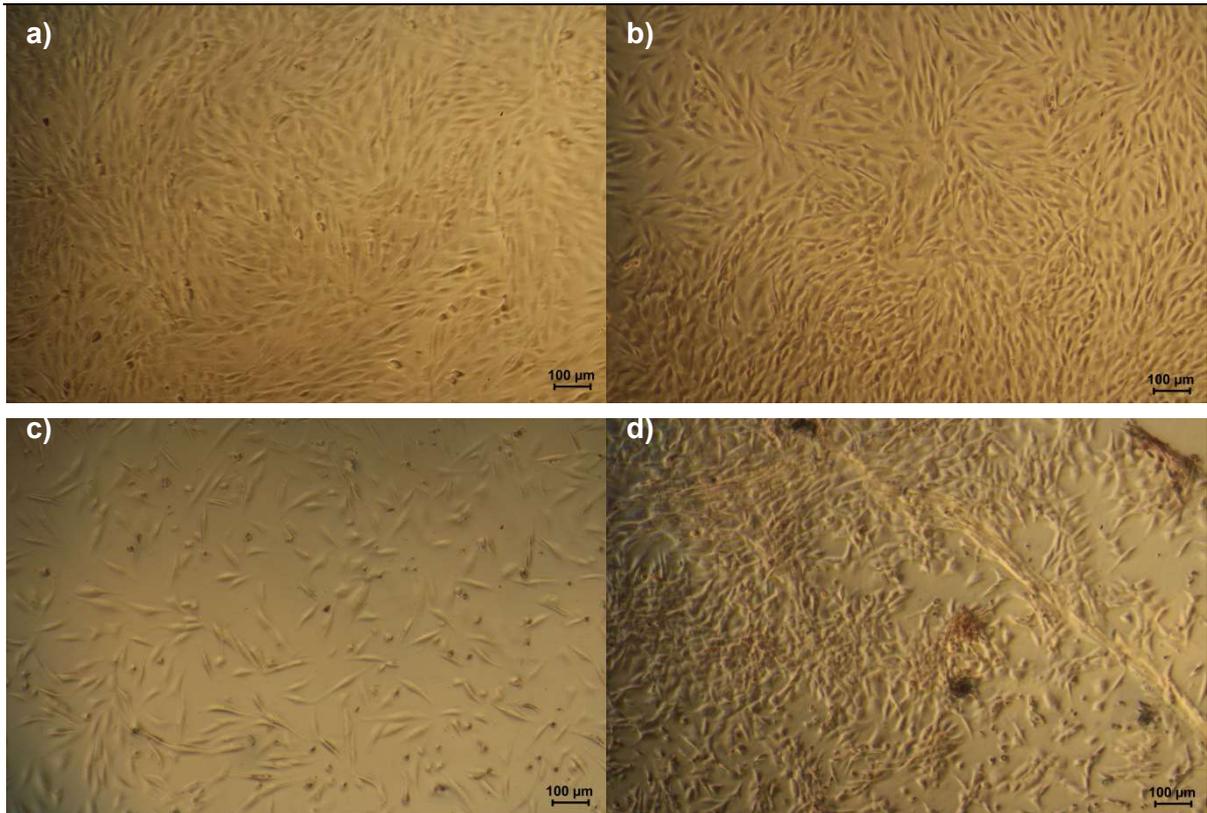


Abbildung 35: Mikroskopie-Aufnahmen der Alizarin-Rot-Färbung von MG63-Zellen ausgesät auf a) der Referenz b) LbL c) FeDip10 und d) FeDip50-Schichten an Tag 3.

In Abbildung 36 sind die jeweiligen Mikroskopie Aufnahmen der Alizarin-Rot-Färbung an Tag 5 zu sehen. Auf der rechten Seite befindet sich jeweils eine Mikroskopie-Aufnahme mit höherer Vergrößerung, um die unterschiedliche Zellmorphologie besser darzustellen. Durch das Ablösen und neu aussäen nach drei Tagen auf den modifizierten Fe-MEPE Schichten wurden die bereits ausgebildeten Cluster auf den FeDip50-Schichten aufgelöst und die Zellen müssen sich neu arrangieren. Durch die sehr geringen Proliferationsraten der MG63 auf Fe-MEPE-Substraten (siehe Abbildung 34) sind an Tag 5 nur kleine Zellanlagerungen auf den tauchbeschichteten Oberflächen zu sehen. In Abbildung 36 f) sind jedoch bereits Zellen mit komplett veränderter Morphologie zu finden. Diese zeichnen sich zudem durch eine vermehrte Ca(II)-Einlagerung aus. Auf allen Fe-MEPE modifizierten Oberflächen adhären die Zellen mit stark ausgebreitet langen Zellausläufern.

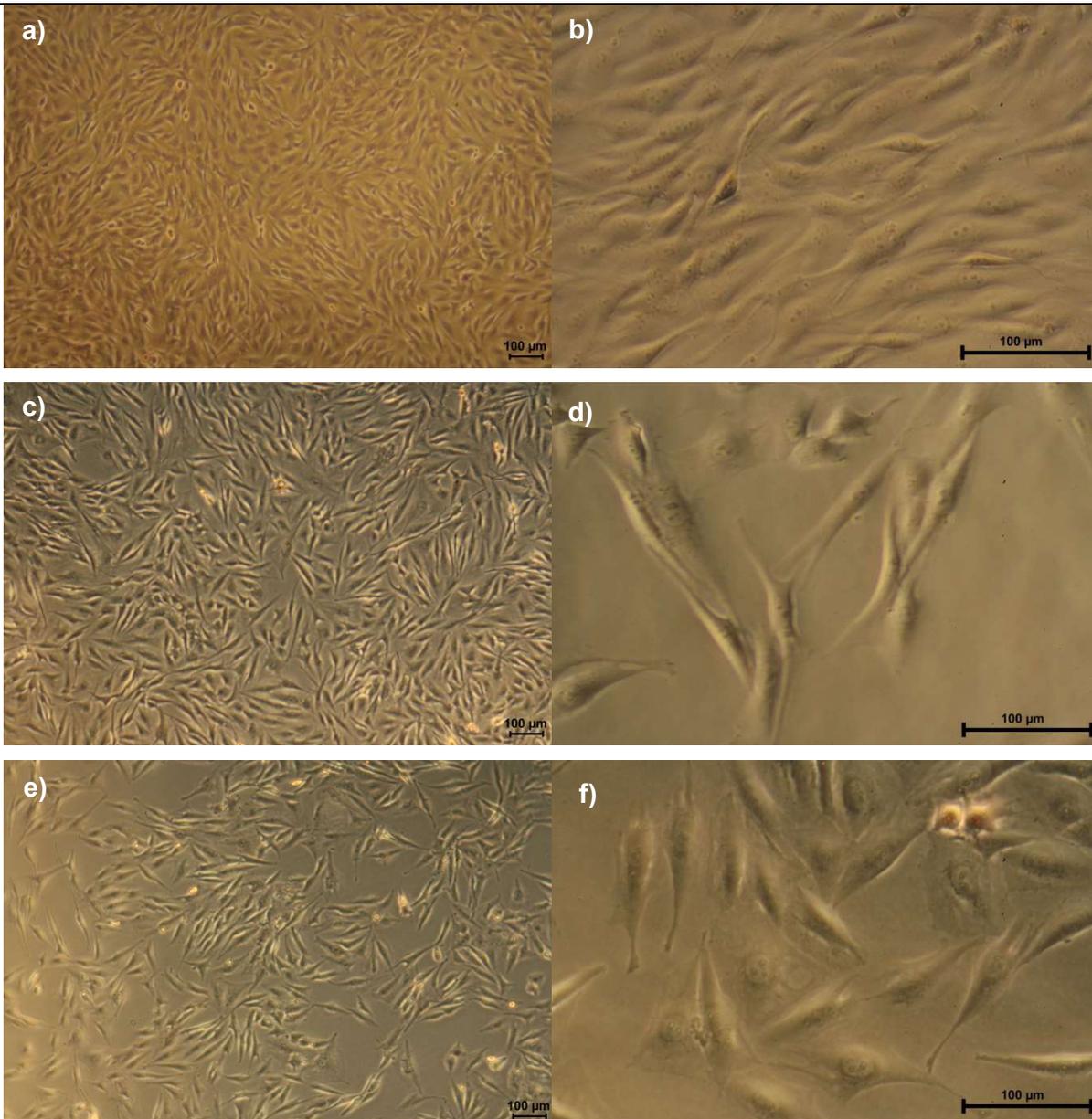


Abbildung 36: Mikroskopie-Aufnahme der Alizarin-Rot-Färbung von a)-b) Referenz c)-d) FeDip10 und e)-f) FeDip50 an Tag 5.

Zusammenfassung und Diskussion

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Ergebnisse von MG63-Zellen auf modifizierten Fe-MEPE-Substraten sowohl durch die hohen Zellaktivitäten und durch die veränderte Morphologie der Zellen bzw. der Clusterbildung auf eine Initiierung der osteogenen Differenzierung hinweisen. Auffällig ist zudem, dass die Zellen an Tag 3 auf der FeDip50-Probe Zellcluster bilden, jedoch an Tag 5 keine zu sehen sind. Durch das Ablösen der Zellen an Tag 3 nimmt man den Zellen den Einfluss auf die Differenzierung und die nicht differenzierten Zellen überwuchern

die differenzierten. Auffällig ist zudem, dass auch auf den LbL-Schichten ein deutlicher Einfluss auf die Zellzahl und Zellaktivität bereits an Tag 3 zu beobachten ist.

Betrachtet man die Morphologie der Zellen so verhalten sich die Zellen auf den LbL-Schichten vergleichbar mit der Referenz. Sie bilden somit keine Zellzusammenschlüsse bzw. Zellcluster. Anhand der erhöhten Zellaktivität spricht dies dafür, dass die Zellen auf den LbL-Schichten zwar zur Differenzierung angeregt werden, sich aber noch in der Proliferationsphase (primärer Differenzierungsschritt) befinden.

In der Literatur ist ein positiver Effekt auf die Differenzierung von hMSCs und MG63 bei Zugabe eines Fe(III)-Chelators bekannt. Chung et al. zeigten, dass die Zugabe von Deferoxamin durch die Induzierung von Antioxidantien mittel MAPK Signalweg die osteogene Differenzierung stimuliert wird. Durch Zugabe von Deferoxamin werden selektiv Fe(III)-Ionen komplexiert. Eisenionen sind generell essenziell für Lebewesen, da die Ionen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen involviert sind, beispielsweise der ATP Produktion und dem Sauerstofftransport sowie der DNA Synthese. Bei einem Überschuss an Eisen kommt es jedoch zur Katalyse der Bildung freier Radikale und somit zur Zerstörung der Zellen (156).

Die Zugabe von Fe-MEPE initiiert somit die osteogene Differenzierung von MG63-Zellen.

4.1.5 Einfluss von Fe-MEPE auf humane mesenchymale Stammzellen

Das Kapitel 4.1.2.2 beschäftigten sich mit der Differenzierbarkeit von C2C12 und MG63-Zellen auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen. Nun stellt sich die Frage, ob diese Beobachtungen sich von den etablierten Zelllinien auf humane und zugleich primäre Zellen übertragen lassen. Grundsätzlich wird zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, das bedeutet, dass sich die Zellen unendlich teilen können und einen eigenständigen Organismus ausbilden können. Dies ist im Fall von adulten Stammzellen, beispielsweise aus dem Knochenmark, nicht möglich. Diese werden auch als Knochenmarks Stroma Zellen bzw. mesenchymale Stammzellen (MSCs) bezeichnet (157). Die aus dem Knochenmark erhaltenen adulten Stammzellen sind in der Lage zu Osteoblasten, Chondrozyten, Astrozyten, Neuronen, Skelett- und Herzmuskulatur zu differenzieren (53, 158-161). Somit können MSCs aus adultem Gewebe gewonnen werden und es werden keine fetalen Zellen benötigt. Dies ist hinsichtlich einer autologen Zelltransplantation essenziell, denn die MSCs können aus Knochenmark des Spenders isoliert und *in vitro* vermehrt werden. Anschließend werden die Zellen bzw. das gewünschte Gewebe reimplantiert (162, 163). Bei allogenen

Zelltransplantationen, wenn der Zellspender und der Zellempfänger nicht dieselbe Person sind, kann es zu Immunreaktionen kommen, die lebenslang via Immunsuppressiva unterdrückt werden müssen (163, 164). Somit gibt es im Fall von MSC mehrere Möglichkeiten für die eingesetzten Zellen zu differenzieren. Im Folgenden werden zunächst das Wachstumsverhalten und die Mitochondrienaktivität der ausgesäten Zellen auf den modifizierten Oberflächen betrachtet. Eine geringe Zellzahl bei hoher Mitochondrienaktivität resultiert in einer hohen Zellaktivität, welche ein erstes Indiz für die Differenzierung der Zellen liefert.

Mitochondrienaktivität hMSCs bei Zugabe von Fe-Salz und Fe-MEPE Eluaten

In Abbildung 37 sind die Mitochondrienaktivitäten der hMSCs des Spenders 46 nach 3, 5 und 10 Tagen nach der Zugabe von Fe-Salzen im Vergleich zur Zugabe von gelöstem Fe-MEPE zu sehen. Es ist auffällig, dass die Zugabe aller Additive zu nicht zytotoxischen Mitochondrienaktivitäten führt. Alle Werte liegen im Bereich von 80%, außer vereinzelt Werten von Fe-MEPE. Somit ist der Einfluss der Eisensalze und des Fe-MEPE an den Tagen zwischen Tag 5 und Tag 10 am höchsten.

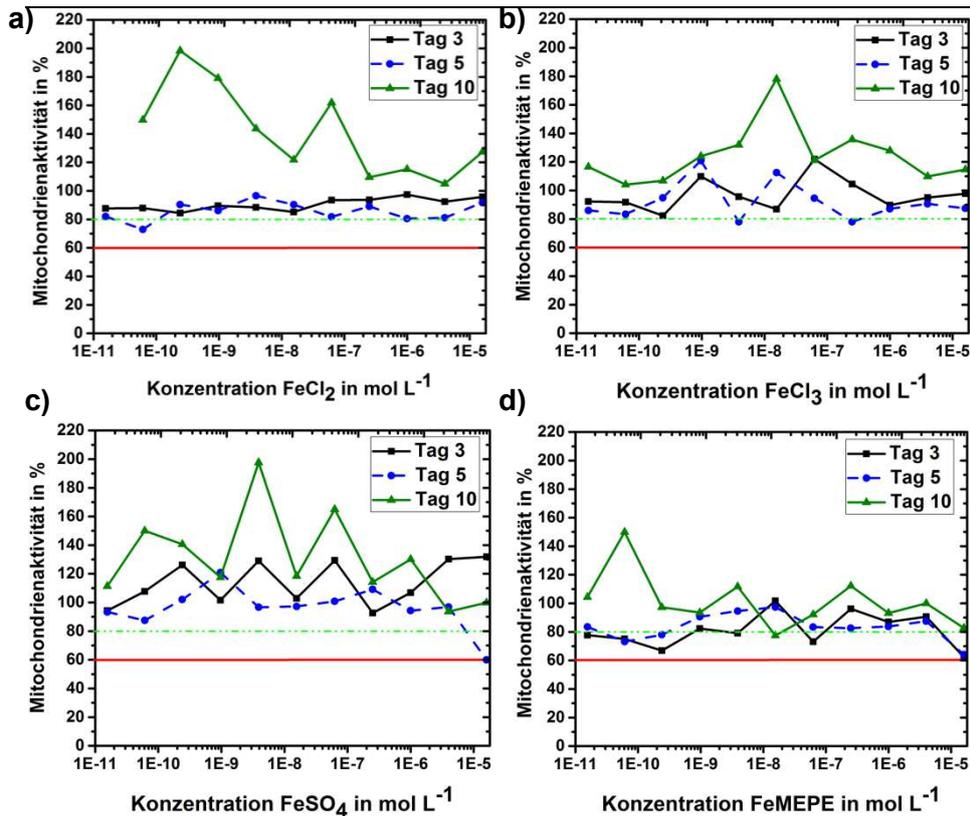


Abbildung 37: Mitochondrienaktivität von hMSCs auf einer Standard-TCPs Oberfläche des Spenders 46 bei Zugabe von Lösungen von FeCl_2 , FeSO_4 , FeCl_3 und Fe-MEPE in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Zellzahl hMSCs auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen

In Abbildung 38 und Abbildung 39 sind die Zellzahlen bzw. die Zellaktivitäten für die LbL, FeDip10 und FeDip50 gezeigt. An Tag 3 geht der Trend der Zellen des Spenders 46 der FeDip10 eher zu höheren Zellzahlen. Ein deutlicher Effekt ist ab Tag 5 zu sehen. An Tag 5 gehen die Zellzahlen im Fall von FeDip50 auf $56 \pm 16\%$ zurück. An Tag 7 sinken die Zellzahlen sogar auf $40 \pm 12\%$ und im Fall der FeDip10 auf $60 \pm 1\%$. An Tag 9 stagnieren die Zellzahlen. Der größte Effekt ist somit beginnend an Tag 5 und an Tag 7 zu sehen. Dieser Effekt ist ein wichtiger Hinweis auf die mögliche Differenzierung der Zellen. Wie im Fall der C2C12 und MG63-Zellen hören die Zellen beim Beginn der Differenzierung allmählich auf sich weiter zu teilen. Der Trend zu geringeren Zellzahlen zeigt ebenfalls Spender 54. Hier zeigt die Abbildung 38b) einen Rückgang der Zellzahl der FeDip50-Probe auf $60 \pm 13\%$ bereits an Tag 3.

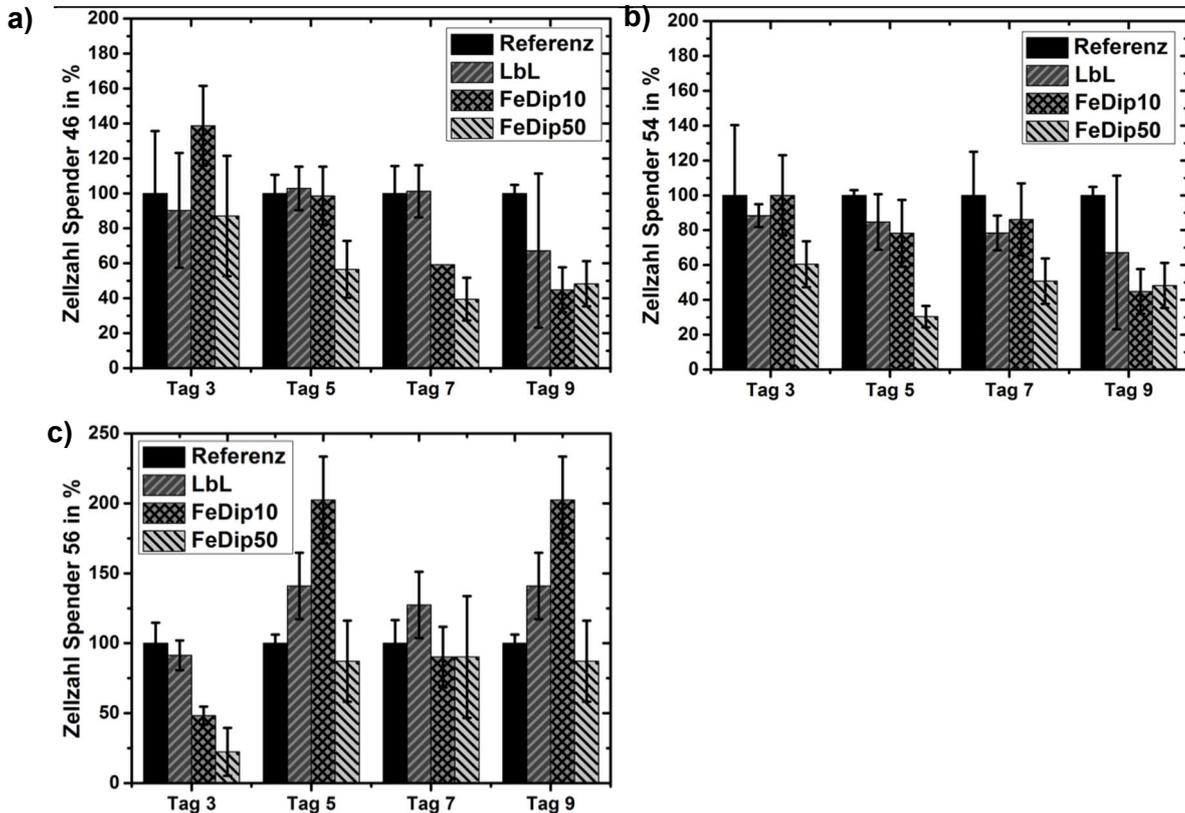


Abbildung 38: Zellzahlen der hMSCs der Spender a) 46, b) 54 und c) 56 bezogen auf die TCPS-Referenzoberfläche in %.

Bei den MSCs des Spenders 56 ist auffällig, dass die geringste Zellzahl an Tag 3 für die FeDip10 und FeDip50 vorherrscht. Hierbei ist ein Rückgang von 50% bzw. um 80% für die FeDip10- bzw. FeDip50-Probe zu sehen.

Diese These gilt es im Folgenden zu beweisen. Es gibt zwei Möglichkeiten für die geringen Zellzahlen. Zum einen ist es möglich, dass die Zellen in Apoptose gehen und zum anderen ihre Proliferation zugunsten der Differenzierung einstellen. Würden die Zellen aufgrund fehlender Proteinadsorption auf der Oberfläche oder der Freisetzung zytotoxischer Stoffe aus den modifizierten Oberflächen nicht lebensfähig sein, könnte man keine erhöhte bzw. nur eine geringe bis gar keine Mitochondrienaktivität der Zellen via WST-1 Test detektieren.

Zellaktivität hMSCs auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen

In Abbildung 39 sind die Zellaktivitäten, somit die Mitochondrienaktivität pro Zelle, aufgezeigt. Die erhaltenen Daten sprechen gegen ein Absterben der Zellen, denn die Zellaktivitäten sind für alle Proben an Tag 3 bis einschließlich Tag 7 mindestens gleich der Referenz.

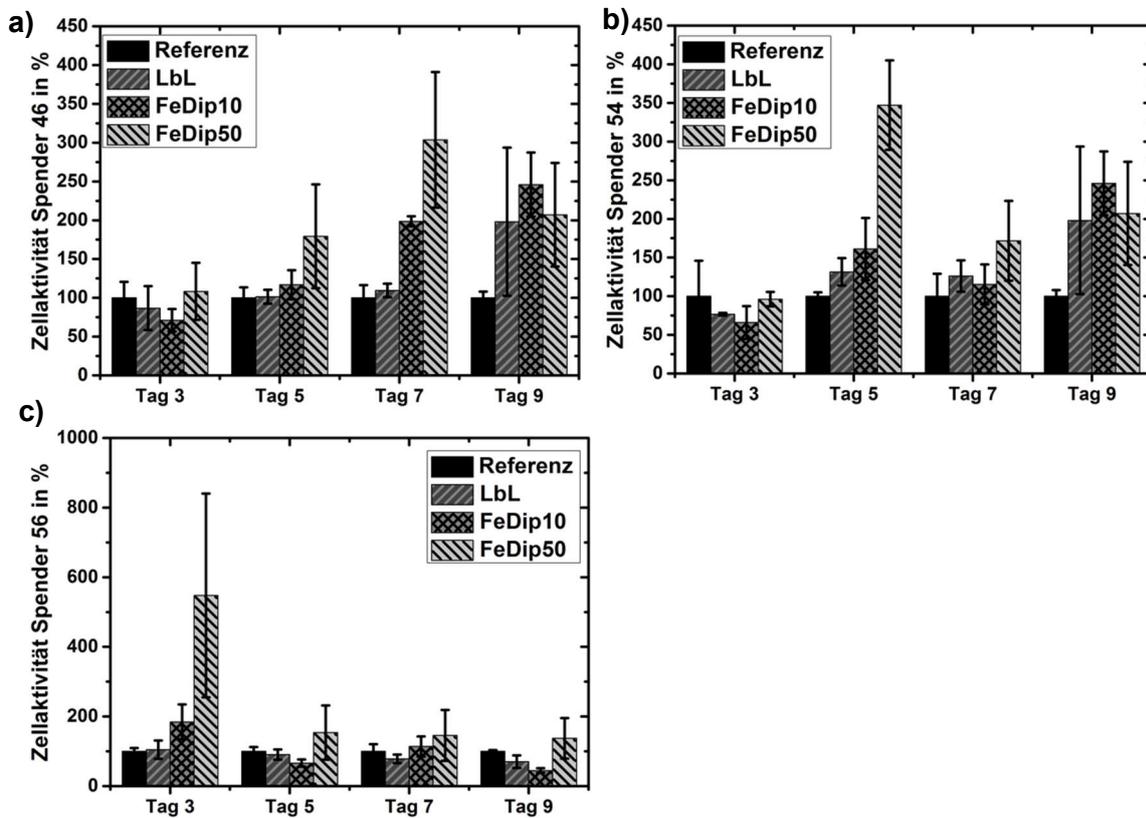


Abbildung 39: Zellaktivitäten der MSCs der Spender a) 46, b) 54 und c) 56 bezogen auf die TCPS Referenzoberfläche in %.

Für die Spender 46 und 54 ist ab Tag 5 ein deutlicher Trend zu erhöhten Zellaktivitäten erkennbar. An Tag 5 steigt die Aktivität pro Zelle für FeDip50-Probe des Spenders 46 auf $180 \pm 67\%$ an. Für den Spender 54 steigt dieser Wert sogar auf über 300%, somit um das Dreifache gegenüber dem Referenzsystem. Auffällig ist zudem, dass sich die LbL beschichteten Proben wiederum ähnlich wie die Referenz verhalten, somit der Effekt gegen Null tendiert. Somit zeigen die Zellen auf den tauchbeschichteten Oberflächen die Tendenz zur Differenzierung. Um dies zu verifizieren wurden zwei charakteristische Tests zur Detektierung der osteogenen Differenzierung gewählt. Zum einen wurde eine Alizarin-Rot-Färbung um die Clusterbildung mikroskopisch und eine ALP-Aktivitätsbestimmung um den Beginn der Differenzierung nachverfolgen zu können, durchgeführt.

Alizarin-Rot-Färbung hMSCs

In Abbildung 40 sind die Referenz und die FeDip50-Probe an Tag 5 zu sehen. Es wird deutlich, dass sich die Zellmorphologie auf der Referenz nicht verändert hat. Bei der Betrachtung der Zellaktivitäten wird ebenfalls deutlich, dass das Referenzsystem in einem nicht differenzierten

Zustand vorliegt. Für die FeDip50 Oberfläche verhält es sich anders. Es ist in Abbildung 40 b) erkennbar, dass sich die Zellen bereits zusammenlagern und sich diese Zellanhäufung mittel Alizarin-Rot rötlich verfärbt. Zudem ist ein deutlicher Unterschied in der Zellzahl zu erkennen. Die Zellen auf der TCP Referenzoberfläche wachsen deutlich dichter als die Zellen auf der tauchbeschichteten Probe, was auch in der Zellzahl in Abbildung 38 deutlich zu erkennen ist.

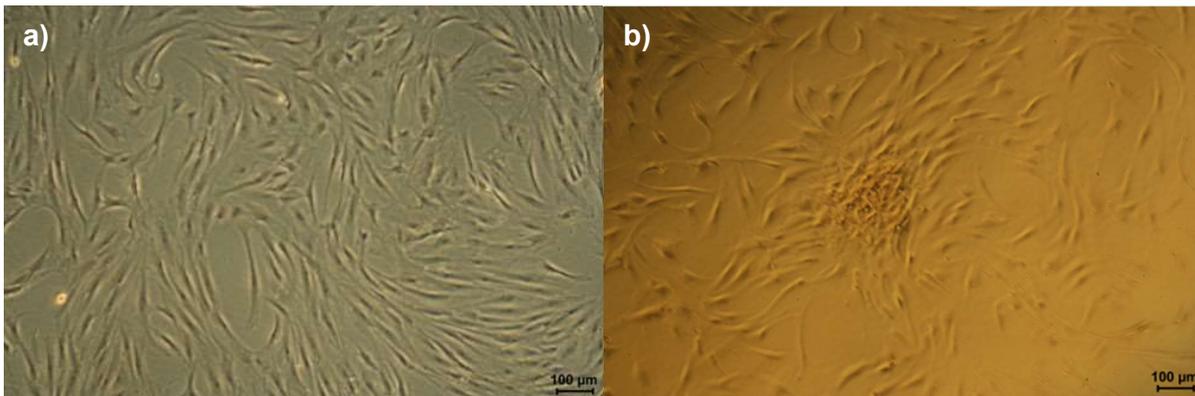


Abbildung 40: Alizarin-Rot-Färbung von hMSCs auf a) der Referenz und b) der FeDip50-Probe des Spenders 46 an Tag 5.

In Abbildung 41 sind die Alizarin-Rot-Färbungen für die FeDip10 Oberflächen an Tag 5 (Spender 54) und 9 (Spender 46), ebenso wie die Färbung der FeDip50 an Tag 5 (Spender 56) zu sehen. An Tag 9 ist klar zu erkennen, dass die Zellen beginnen sich abzukugeln und absterben. Dennoch sind erhöhte Zellaktivitäten der verbleibenden Zellen erkennbar (siehe Abbildung 39). Des Weiteren sind deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie zu erkennen. Zum einen ist die Zellgruppe der FeDip10 an Tag 9 bereits konfluent und bildet spindelförmige Zellen mit langen Ausläufern aus. An Tag 5 sind noch Lücken in der Zellgruppierung zu sehen. Dadurch sind die Zellen flächiger ausgebreitet als an Tag 9 und zeigen eine Migration hin zum Zellgefüge. Die flächige Ausbreitung ist vor allem auf der FeDip50 an Tag 5 zu sehen. Hier ist ebenfalls eine Migration der langen Zellausläufer hin zum Zellgefüge zu erkennen. Im Zellgefüge sehen wir eine Überlappung der einzelnen Zellen, sodass diese teilweise nicht mehr voneinander unterschieden werden können. Dieser Effekt ist auf der Fedip10 des Spenders 54 stärker ausgebildet als an Tag 5 auf der FeDip50 des Spenders 56. Bei allen Proben wurde bei niedrigeren Zellzahlen und erhöhten Zellaktivitäten in der Alizarin-Rot-Färbung ein Zusammenschluss der Zellen, siehe Abbildung 40 und Abbildung 41, zu erkennen und dies bereits ab Tag 5. Wie in den Alizarin-Rot-Färbungen zu erkennen ist befinden sich die Zellen auf der FeDip50 bereits an Tag 5 im Differenzierungsstadium 2 nach Collin et al. (57). Somit sprechen

Zellaktivitäten sowie die Zellmorphologie und die Alizarin-Rot-Färbung für die osteogene Differenzierung der hier verwendeten hMSCs.

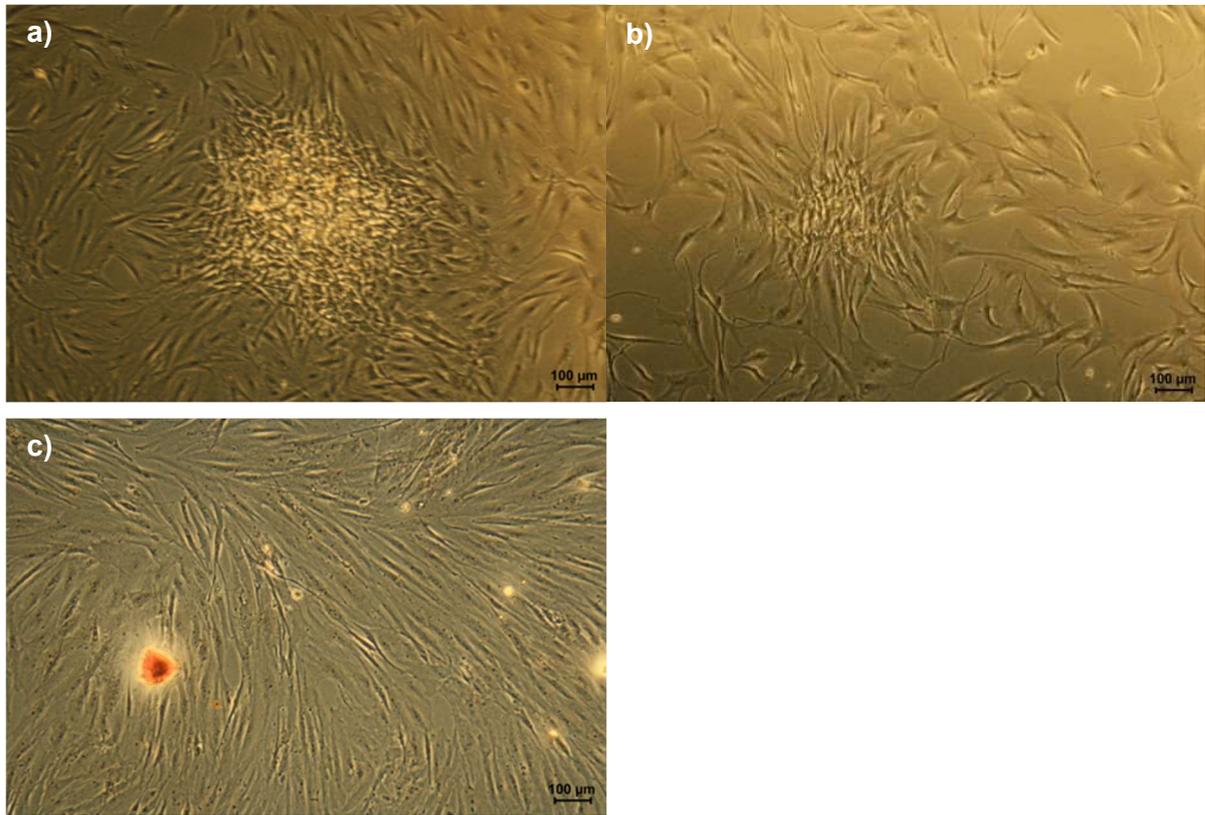


Abbildung 41: Alizarin-Rot-Färbungen von hMSCs auf a) FeDip10 Tag 5 Spender 56 b) FeDip50 Tag 5 Spender 54 c) FeDip10 Tag 9 Spender 46.

ALP-Aktivität hMSCs

Um nun herauszufinden, ob bereits ab Tag 5 ALP aktive Zellen vorhanden sind wurde die ALP-Aktivität unter Zugabe von 4-Nitrophenolphosphat zum Zelllysats kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405\text{nm}$ bestimmt. In Abbildung 42 wurden die ALP-Aktivitäten pro Zelle in Abhängigkeit der Tage in Kultur aufgetragen.

Pautke et al. fanden heraus, dass die ALP-Aktivität stark von der Zelldichte abhängig ist. Sind die Zellen konfluent so zeigen rund 30% der primären Osteoblasten eine erhöhte ALP-Aktivität, wobei die Aktivitäten für die subkonfluenten Zellen deutlich geringer ausfiel (62).

Die hMSCs auf den Fe-MEPE Schichten verhalten sich indes nicht wie von Pautke et al. beschrieben. In Abbildung 42 ist zu erkennen, dass die ALP-Aktivitäten nicht dem Trend der Zellzahlen folgen (siehe Abbildung 38). Trotz niedriger Zellzahlen, vor allem auf den FeDip50-Schichten, resultieren hieraus die höchsten ALP-Aktivitäten.

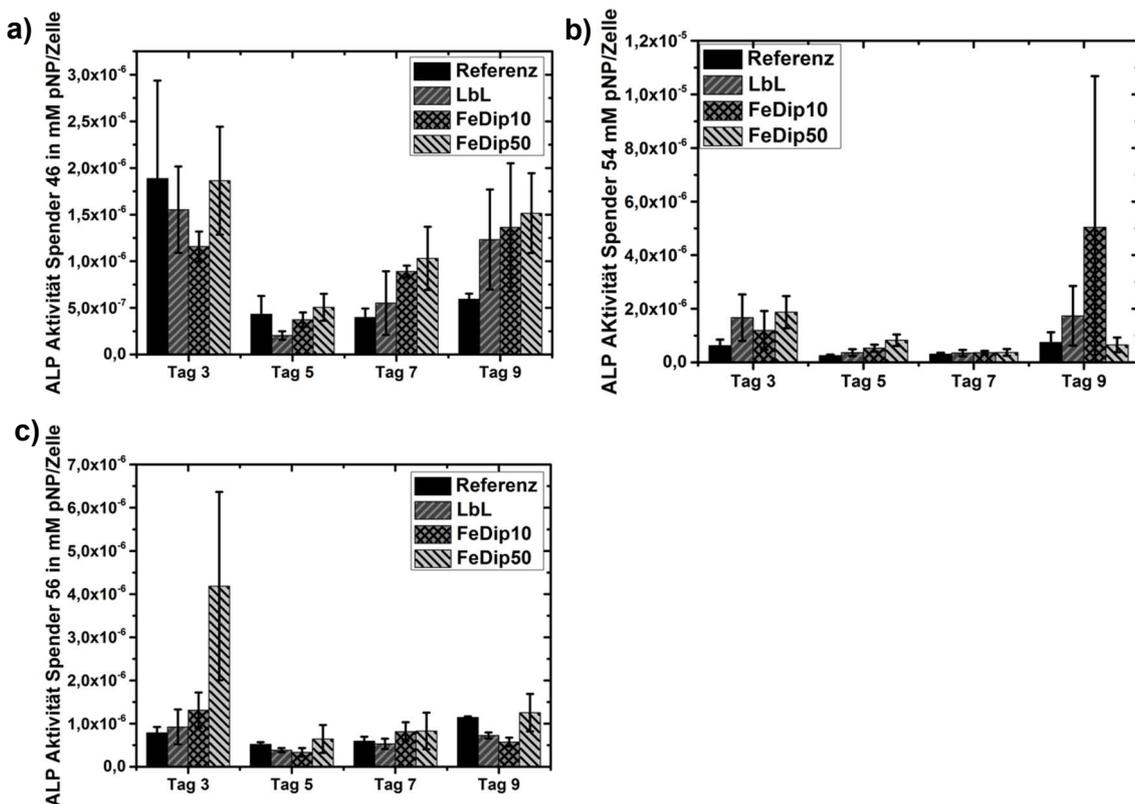


Abbildung 42: ALP-Aktivitäten der hMSCs der Spender a) 46, b) 54 und c) 56 bezogen auf die TCPS Referenzoberfläche in %.

Nun stellt sich die Frage, was der Auslöser für die Differenzierung auf den Fe-MEPE Schichten initiiert. Für die modifizierten Oberflächen ergeben sich mehrere Aspekte. Zum einen ist es möglich über die vorhandene positive Ladung des Polyelektrolyten die Adhäsion und zum anderen über die Fe(II)-Freisetzung die Zelle sowohl in der Proliferation als auch in der Differenzierung zu beeinflussen. Literaturbekannt ist die Tatsache, dass die Einbringung von Eisenionen ins Zellkulturmedium eine starke Erhöhung der Proliferation der MSCs bedingt. Die Eisenionen gelangen hierbei über Transferrin-abhängige und über Transferrin-unabhängige Mechanismen in die Zellen und aktivieren den MAPK Signalweg (165). Betrachtet man nun die Proliferation der Zellen auf den unterschiedlich modifizierten Oberflächen, so sieht man vor allem ab Tag 5 einen gegenteiligen Effekt bei der Verwendung von Fe-MEPE anstelle von Eisensalzen. Des Weiteren ist literaturbekannt, dass die Zugabe von Eisenoxidnanopartikel die Reparatur von Zellgewebe bzw. die osteogene Differenzierung von MSCs *in vitro* hemmen kann (166). Auch dies widerspricht den hier gezeigten Daten.

Intrazellulärer Fe(II)-Gehalt hMSCs

In Abbildung 43 sind die Fe(II)-Gehalte in den Zellen bezogen auf die TCPS Referenz gezeigt. Hierbei wird deutlich, dass die Proben mit erhöhter Zell- und ALP-Aktivität auch einen erhöhten Eisenion-Gehalt aufweisen.

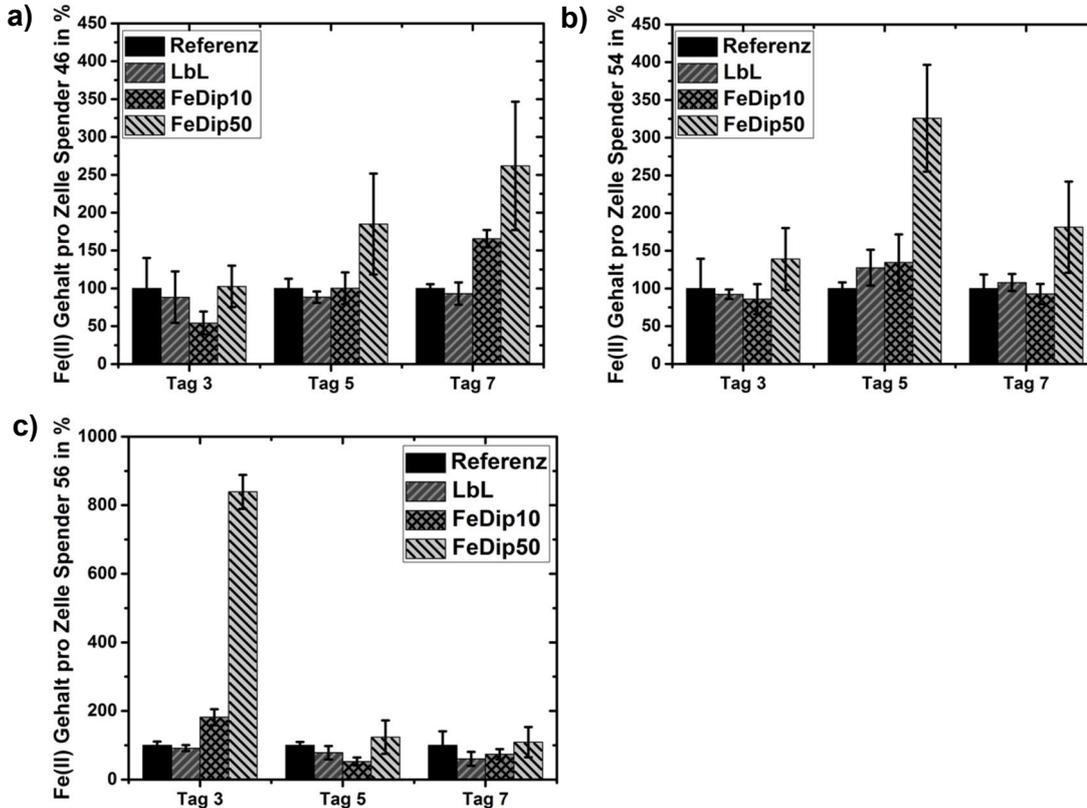


Abbildung 43: Fe(II)-Gehalte in hMSCs via Ferrozintest an den Tagen 3, 5 und 7 der Spender a) 46, b) 54 und c) 56 bezogen auf die TCPS Referenzoberfläche in %.

Die osteogene Differenzierung der MSCs wird durch die Zugabe von Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-phosphat oder Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat initiiert. Die Zellen wurden anschließend über 16 Tage mit den genannten Medienzusätzen kultiviert, um ein zusammenhängendes Netzwerk von ALP-positiven Zellen zu erhalten. Erst nach 16 Tagen in Kultur bilden die MSCs ALP aktive Zellen aus (167). Literaturbekannte Einflüsse von Metallionen auf die hMSCs sind für Mg(II) und Co(II) bekannt. Bei Zugabe von 10mM $MgSO_4$ beobachteten Yoshizawa et al. eine schnellere Proliferation der hMSCs und eine Erhöhung der EZM Mineralisation *in vitro* (168). Wird Co(II)-Salzlösung mit einer Konzentration von 40 μ M bzw. 100 μ M dem Zellkulturmedium hinzugefügt, so beobachteten Schröck et al. eine Abnahme der ALP-Aktivität der behandelten Zellen (169). Für den Einfluss von Übergangsmetallionen wie Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) und Cu(II) wurden osteoblastäre Zelllinien, wie die MG63-Zellen zur Analyse verwendet. Hierbei wurden Konzentrationen von 0,001-10 mM in Form von Chlorid-

Salzlösungen zum Medium hinzugegeben und die Vitalität via Flusszytometrie detektiert. Hallab et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Mn(II)-, Fe(III)- und Ni(II)-Ionen ab einer Konzentration von 0,1mM stark zytotoxisch auf MG63-Zellen wirken (170).

Die Ergebnisse der Fe-MEPE modifizierten Oberflächen weisen darauf hin, dass eine Initiierung der osteogenen Differenzierung bereits zwischen Tag 3 und 5 erfolgt. An Tag 5 wurden nachweislich ALP aktive Zellen erhalten. Somit wird durch die Fe-MEPE modifizierte Tauchbeschichtungen eine zügigere Initiierung der osteogenen Differenzierung ohne Zusatz weiterer Reagenzien möglich.

Genexpressionsanalyse hMSCs

Bei der Betrachtung auf mRNA Ebene wird deutlich, dass die Genexpressionsrate unter der Referenz liegt. Die Arbeitsgruppe Birgani et al. bekamen vergleichbare Ergebnisse. Zum einen detektierten Sie bei Sr^{2+} Zugabe eine erhöhte DNA Menge, korrespondiert zur Anzahl der Zellen und somit ein Indiz für erhöhte Proliferation (Differenzierungsschritt 1) und zum anderen eine erhöhte ALP-Aktivität. Die Ergebnisse aus der qRT-PCR zeigten jedoch keine erhöhte Expression des ALP bzw. Osteocalcin Gens innerhalb der ersten 7 Tage. Eine Erhöhung dieser Gene konnte erst an Tag 14 detektiert werden. Zudem weisen Birgani et al. darauf hin, dass die ALP-Aktivitäten der verschiedenen Donoren variieren können (171). Diese unterschiedlichen Aktivitäten in Abhängigkeit der hMSC Spender wurde bereits von Zhang et al. (172), Boanini et al. (173), Capuccini et al. (174), Brennan et al. (175) und erstmals von Barbara et al. (176) im Jahr 2004 beschrieben. Des Weiteren merkten Birgani et al. an, dass der mRNA Level nicht zwangsläufig für die Produktion des exprimierten Gens nötig sei (171). Als weiterer Punkt wurden die Genexpressionsraten von bestimmten Differenzierungsmarkern analysiert, um die Vorgänge in der Zelle auf mRNA Basis bestimmen zu können. Hierzu wurde zum einen das knochenspezifische ALP betrachtet und zum anderen Osteocalcin, welches spezifisch für Osteoblasten ist (177). Diese beiden Differenzierungsmarker können als Indiz für die Betrachtung des Differenzierungsschrittes herangezogen werden. Bei Beginn der osteogenen Differenzierung wird zunächst ALP hoch reguliert, wobei das Osteocalcin primär im Mineralisationsschritt exprimiert wird. Da der Differenzierungsmechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist, gehen zudem Collin et al. davon aus, dass es zwei Isoformen des ALP gibt. Somit wird ALP laut Collin am Anfang und am Ende der Differenzierung exprimiert (57). In Abbildung 44 sind die Expressionsraten des ALP Gens an Tag 3 und Tag 5 der drei Spender aufgezeigt. Es wird deutlich, dass die Expression für Spender 46 für die FeDip-Proben an Tag 3 sich ähnlich verhält wie die Referenz. An Tag 5 nehmen die Werte der FeDip-Proben um die

Hälfte ab. Dazu verhält sich die LbL-Probe gegensätzlich. Hier ist an Tag 3 nur eine geringe Expressionsrate zu erkennen, die jedoch bis Tag 5 fast auf den Referenzwert ansteigt. Betrachtet man hierzu im Vergleich die Osteocalcin-Expression so erkennt man, dass diese für die FeDip10-Probe an Tag 3 um den Faktor 2,4 höher liegt als die Referenz. Die FeDip50-Probe liegt bei einem Faktor von 1,6 bezogen auf die Referenzoberfläche. Die erhöhte Expression dieser beiden Proben wird bis zu Tag 5 wieder deutlich herunter reguliert. Es resultieren Werte im Bereich von lediglich 10% der Referenz. Auch bei der aus der Enzymaktivität bestimmten ALP-Aktivität pro Zelle sieht man ebenfalls eine Erhöhung an Tag 3 und einen deutlichen Rückgang an Tag 5 (siehe Abbildung 42). Der Trend der ALP-Aktivität auf Enzymbasis und die ALP Genexpression der Spender 54 Zellen zeigen einen ähnlichen Trend. An Tag 3 zeigen alle drei Fe-MEPE modifizierten Zellen eine Erhöhung der ALP-Aktivität und der Expression. Diese erhöhte Expression liegt im Fall der LbL-Proben bei 1,5, für FeDip10 bei 2,0 und für Zellen, welche auf der FeDip50 für 3 Tage inkubiert wurden, 2,2. An Tag 5 steigen die Werte für LbL auf 1,7, die Expressionen für FeDip10 und FeDip50 sinken auf 1,5 bzw. 1,8. Ebenso folgen im Falle des Spenders 56 die Enzymaktivitäten dem Trend auf mRNA Basis. Auch die hohe ALP-Aktivität an Tag 3 bei der FeDip50-Probe findet sich auf mRNA Basis bei einer Expressionsrate von 4 wieder. Der Fehler wurde jeweils mithilfe der Standardabweichung aus drei Proben berechnet. Diese beträgt für die ALP Expressionsrate 10%, 7%, 8% und 20% für die Referenz, LbL-, FeDip10- und FeDip50-Proben. Die Alkalische Phosphatase wird, wie in Abschnitt 2.3.2 bereits erwähnt, primär bei Beginn der Differenzierung und bei Beginn der Mineralisation, dem letzten Differenzierungsschritt, exprimiert. In Abbildung 44 a) ist zu erkennen, dass bei den Zellen von Spender 46 die primäre Differenzierung bereits eingesetzt hat. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich diese Zellen an Tag 3 mindestens im zweiten Differenzierungsschritt befinden. Betrachtet man nun die Mikroskopie-Aufnahmen in Abbildung 41 wird deutlich, dass ein visuell nachvollziehbarer Fortschritt der Differenzierung erst an Tag 5 detektiert werden kann. betrachtet man nun den Fortschritt auf mRNA Ebene via Osteocalcin Genexpression so wird deutlich, dass bereits an Tag 3 weiterführende Differenzierungsschritte durch die Osteocalcin Expression eingeleitet werden (siehe Abbildung 45).

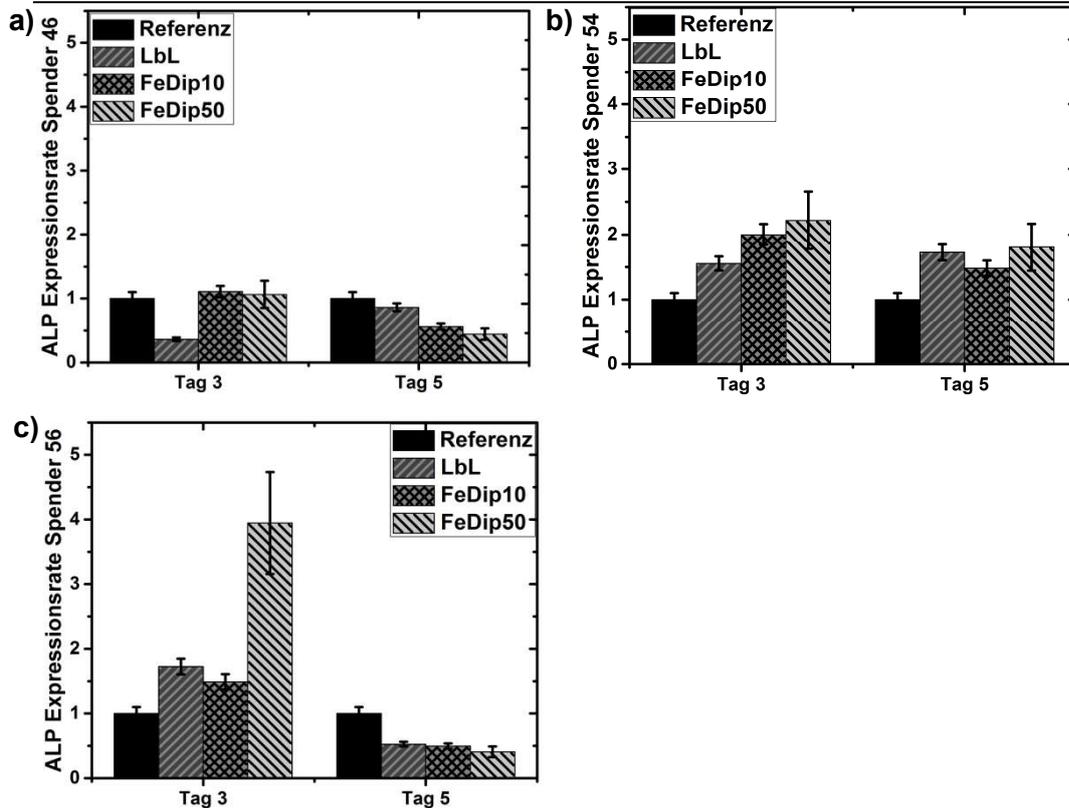


Abbildung 44: Übersicht der ALP Expressionsraten an Tag 3 und Tag 5 der Spender a) 46 b) 54 und c) 56.

Betrachtet man nun die Expressionsraten des Osteocalcins, welches erst in späteren Differenzierungsschritten exprimiert wird, so wird deutlich, dass vor allem auf den FeDip10-Proben eine erhöhte Expression detektiert wurde (siehe Abbildung 45). Diese Erhöhungen reichen von 2,5 im Falle von FeDip10 an Tag 3 von Spender 46 über 7,5 für die FeDip10-Probe des Spenders 54 bis hin zu einer um den Faktor 36 höheren Expression der FeDip50-Probe des Spenders 56 an Tag 3. Die Standardabweichung beträgt für die Referenz 10%, für die LbL-Schicht 20%, für die FeDip10 50% und für die FeDip50-Proben lediglich 1%. Collin et al. beobachteten bei der Mineralisation einen Anstieg der Osteocalcin Expression um das 30fache (57). Dieser erhebliche Anstieg der Osteocalcin Genexpression konnte auch in den hier gewählten Kultivierungsbedingungen mittels Verwendung einer FeDip50 modifizierten Oberfläche bereits an Tag 3 mit den hMSCs Zellen des Spenders 56 erreicht werden.

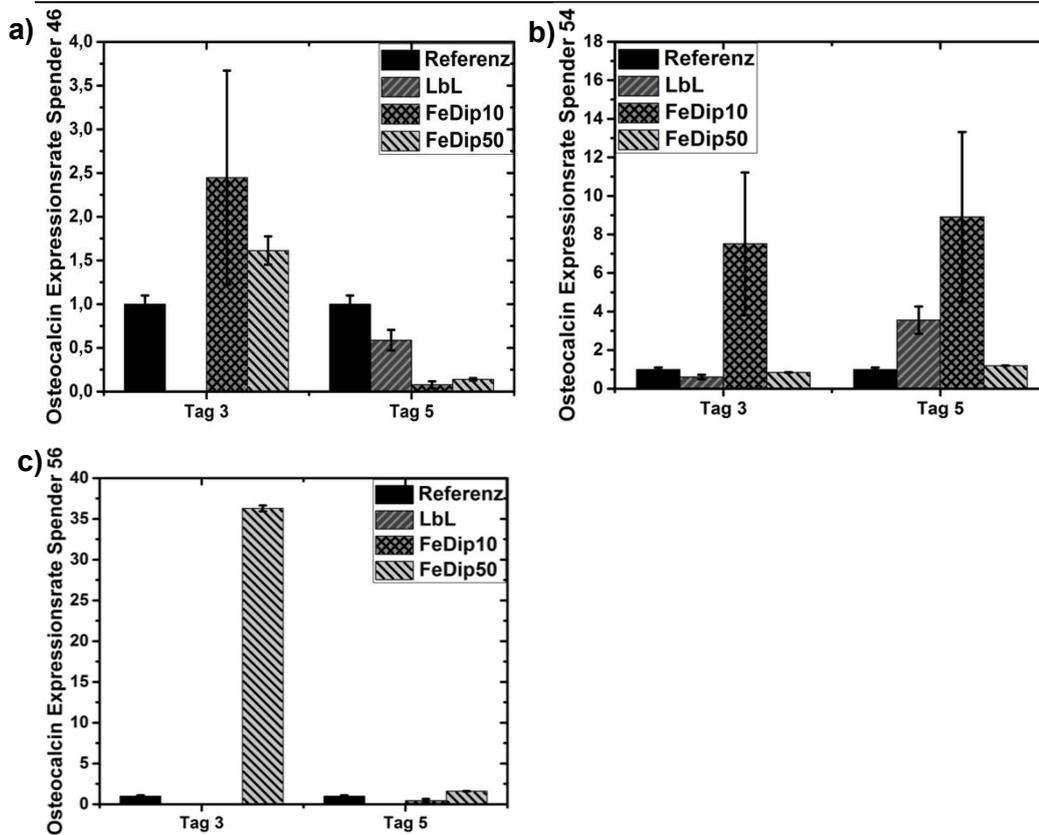


Abbildung 45.: Übersicht der Genexpressionsraten von Osteocalcin an Tag 3 und Tag 5 für Spender a) 46 b) 54 und c) 56.

Zusammenfassung und Diskussion

Zusammenfassend ist zu sagen, dass im Fall der hMSCs die Differenzierung in Hinblick auf die Ausbildung von reifen Osteoblasten durch Fe-MEPE Schichten stimuliert wird. Die erhaltenen Daten sind zusammengefasst in Clusterbildung, ALP und Osteocalcin Genexpression in Tabelle 6 bis Tabelle 8 für die drei Spender an Tag 3 und 5 aufgelistet. Die hMSC Zellen des Spenders 46 exprimieren zwar bereits an Tag 3 Osteocalcin auf den FeDip-Schichten, bilden jedoch erst an Tag 5 auf der FeDip50 visuell erkennbare Cluster aus, ebenso die Zellen des Spenders 54. Diese exprimieren sowohl ALP als auch Osteocalcin auf mRNA Basis und bilden erst nach 5 Tagen Cluster aus. Zudem ist anzumerken, dass der Einfluss der LbL-Schichten auf die Expressionsraten von ALP und Osteocalcin als geringer eingestuft werden kann. Dieser geringere Einfluss ist bereits in Kapitel 4.1.3 für die Initiierung der myogenen Differenzierung der C2C12-Zellen detektiert worden.

Tabelle 6: Übersicht der hMSC Differenzierung des Spenders 46. Die positiven Differenzierungsmerkmale sind mit + gekennzeichnet. Eingeteilt wurde die Proben in die Differenzierungsschritte: Clusterbildung, ALP und Osteocalcin Genexpression an den Tagen 3 und 5.

| Tag 3 | Cluster | ALP | Osteocalcin |
|---------|---------|-----|-------------|
| LbL | - | - | - |
| FeDip10 | - | - | + |
| FeDip50 | - | - | + |

| Tag 5 | Cluster | ALP | Osteocalcin |
|---------|---------|-----|-------------|
| LbL | - | - | - |
| FeDip10 | - | - | - |
| FeDip50 | + | - | - |

Tabelle 7: Übersicht der hMSC Differenzierung des Spenders 54. Die positiven Differenzierungsmerkmale sind mit + gekennzeichnet. Eingeteilt wurde die Proben in die Differenzierungsschritte: Clusterbildung, ALP und Osteocalcin Genexpression an den Tagen 3 und 5.

| Tag 3 | Cluster | ALP | Osteocalcin |
|---------|---------|-----|-------------|
| LbL | - | + | - |
| FeDip10 | - | + | + |
| FeDip50 | - | + | - |

| Tag 5 | Cluster | ALP | Osteocalcin |
|---------|---------|-----|-------------|
| LbL | - | + | + |
| FeDip10 | + | + | + |
| FeDip50 | - | + | - |

Tabelle 8: Übersicht der hMSC Differenzierung des Spenders 56. Die positiven Differenzierungsmerkmale sind mit + gekennzeichnet. Eingeteilt wurde die Proben in die Differenzierungsschritte: Clusterbildung, ALP und Osteocalcin Genexpression an den Tagen 3 und 5.

| Tag 3 | Cluster | ALP | Osteocalcin |
|---------|---------|-----|-------------|
| LbL | - | - | - |
| FeDip10 | - | - | - |
| FeDip50 | - | + | - |

| Tag 5 | Cluster | ALP | Osteocalcin |
|---------|---------|-----|-------------|
| LbL | - | - | - |
| FeDip10 | - | - | - |
| FeDip50 | + | - | + |

Es wird deutlich, dass alle hMSCs zur osteogenen Differenzierung stimuliert werden, jedoch spenderspezifisch und substratspezifisch in unterschiedlichen Stufen. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, ist dies zum einen durch den primären Charakter der Zellen erklärbar und zum anderen durch die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften der Schichten zu erklären.

Die LbL-Schichten unterscheiden sich vor allem durch die geringe Schichtdicke von 2 nm und folglich durch eine geringere Fe(II)-Freisetzung.

Durch die unterschiedlichen Beschichtungstechniken der LbL- und Dip-Proben kommt es zu unterschiedlichem Benetzungsverhalten. Die LbL-Schichten haben im Schnitt einen um 10° reduzierten Kontaktwinkel und sind somit hydrophiler als tauchbeschichtete Substrate.

Der Effekt auf die osteogene Differenzierung der LbL-Schicht ist geringer als die FeDip-Proben, jedoch im Fall der Spender 54 und 56 an Tag 3 sowohl auf mRNA Basis als auch auf Enzymebene detektierbar. Somit beeinflussen alle hier getesteten Fe-MEPE modifizierten Oberflächen die osteogene Differenzierungsfähigkeit humaner, mesenchymaler Stammzellen hin zu osteoblastären Zellen ohne jegliche Medium Zusätze und innerhalb von 3- 5 Tagen.

4.1.6 Einfluss von Fe-MEPE auf humane Endothelzellen

In Kapitel 4.1.4 Einfluss von Fe-MEPE auf MG63-Zellen und 4.1.5 Einfluss von Fe-MEPE auf humane mesenchymale Stammzellen wurde gezeigt, dass Fe-MEPE modifizierte Oberflächen sowohl MG63-Zellen als auch hMSCs zur osteogenen Differenzierung anregen. Im Prozess der Knochenbildung spielt auch die Ausbildung neuer Blutgefäße zur Versorgung des neu gebildeten Knochens eine erhebliche Rolle (178). Bei den hier getesteten Endothelzellen handelt es sich primäre Zellen, die aus Spendergewebe isoliert wurden (vgl. hMSCs). Somit haben diese Zellen zum einen *in vitro* eine begrenzte Lebensdauer und zum anderen sind diese Zellen am wenigsten manipuliert und kommen den Bedingungen im Organismus am nächsten (30).

Zellzahl und Mitochondrienaktivität humane Endothelzellen auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen

Es wurde ein Kurzzeittest über fünf Tage durchgeführt, um die Zytotoxizität der Fe-MEPE modifizierte Oberflächen zu testen und mögliche Einflüsse auf die Angiogenese von Endothelzellen zu detektieren. Es wurden zum einen LbL und tauchbeschichtete Glassubstrate von Fe-MEPE betrachtet (siehe Abbildung 17). Es wird deutlich, dass die LbL-Schicht und die FeDip50 in Bezug auf die Zellzahl an Tag 3 unter der stark zytotoxischen Grenze von 60% liegen und somit dem 3. Zytotoxizitäts Grad entsprechen. Dies ändert sich jedoch zwischen Tag 3 und Tag 5 und die Zellproliferation steigt auf über 95%. Bei einer so geringen Zellproliferation liegt der Gedanke nahe, dass die Endothelzellen ebenfalls die Proliferation zugunsten der Differenzierung eingestellt haben. Betrachtet man wiederum die Mitochondrienaktivität wird klar, dass dies nicht der Fall ist. Die Stoffwechselaktivitäten liegen im Fall der LbL-Schicht an Tag 3 knapp an der 60% Grenze und an Tag 5 mit $40 \pm 5\%$ deutlich darunter. Die FeDip50 wirkt erst zwischen den Tagen 3 und 5 zytotoxisch auf die humanen Endothelzellen. An Tag 3 liegen die Werte noch im nicht-zytotoxischen Bereich mit $81 \pm 5\%$.

Literaturbekannt ist die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen, die durch freie Eisenionen zusätzlich katalysiert wird und die Atherosklerose initiieren kann (179).

Setzt man Endothelzellen hohen Eisenkonzentrationen (30-100 $\mu\text{L Eisen}$) aus, so führt dies zu oxidativem Stress und letztendlich zur Apoptose der Zellen (180, 181). Die Arbeitsgruppe um Mollet et al. fanden 2015 heraus, dass bereits bei einer Zugabe von 10 $\mu\text{L Eisen(II)citrat}$ innerhalb einer Stunde eine Zerstörung der DNA der getesteten Endothelzellen zur Folge hat (182).

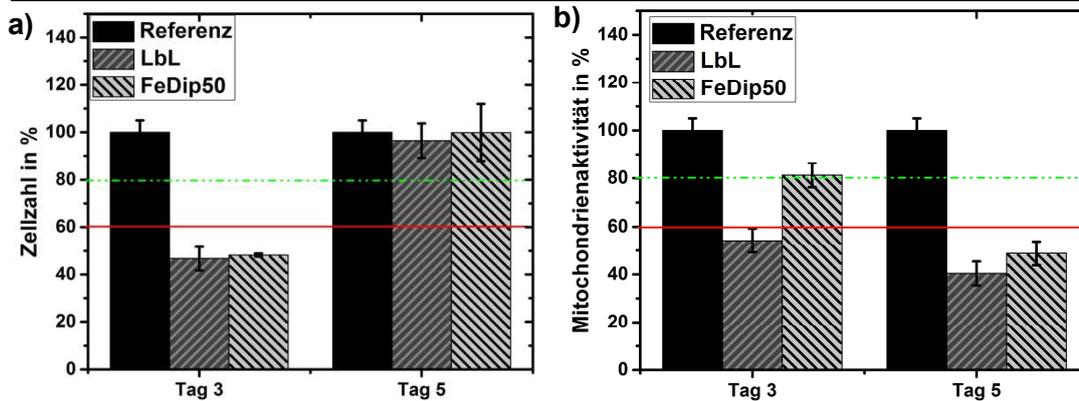


Abbildung 46: Übersicht a) Zellzahl und b) Mitochondrienaktivität von humanen, primären Endothelzellen auf Fe-MEPE modifizierten Oberflächen.

Im Fall der Fe-MEPE-modifizierten LbL- und tauchbeschichteten Substrate befinden sich die Freisetzungskonzentrationen in einem Bereich von 1-4 μL . Somit hat die Einbringung von Fe-MEPE modifizierten Oberflächen keinen stimulierenden Effekt auf die Zellaktivität und somit auf die Differenzierung von primären, humanen Endothelzellen.

Zusammenfassung und Diskussion

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Fe-MEPE in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ nicht zytotoxisch auf L929-Zellen wirkt. Für Konzentrationen über $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ wird Co-MEPE zu keinem Zeitpunkt toleriert. Aufgrund dieses Zytotoxizitätsergebnisses und der hohen Löslichkeit in PBS wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf weitere Zelluntersuchungen mit Co-MEPE Schichten verzichtet. Im Fall von Ni-MEPE werden Konzentrationen unterhalb von $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ von den Zellen als nicht zytotoxisch interpretiert. Bei höheren Konzentrationen sinkt die Zellaktivität schrittweise auf 50% und deutet somit auf eine hohe Zytotoxizität für die L929 Zelllinie hin.

Bei Zugabe von gelöstem Fe-MEPE zu C2C12 und MG63-Zellen konnte eine Stimulierung der Mitochondrienaktivität detektiert werden. Durch den stimulierenden Effekt des Fe-MEPE in Zellkulturmedium auf die Mitochondrienaktivität wird die C2C12 Ziellinie hinsichtlich der myogenen Differenzierung weiter analysiert. Hierzu wird zunächst die Morphologie der Zellen betrachtet. Diese unterscheidet sich auf den tauchbeschichteten Fe-MEPE-Substraten deutlich von der Morphologie auf der TCPS-Oberfläche. Die Zellen auf den Fe-MEPE-Proben sind gestreckter und weisen eine höhere Zellausbreitung auf. Bei Betrachtung der Zellaktivitäten wird deutlich, dass die FeDip-Schichten bereits nach 24h stimulierend auf die Zellen wirken. Die korrespondierenden Fe(II)-Gehalte pro Zelle sind bei den hohen Zellaktivitäten ebenfalls

erhöht. Zudem ist der myogene Regulationsfaktor MyoG bereits nach 24h höher exprimiert. Durch die fehlenden Zell-Zell Kontakte durch die Erhöhung der Mitochondrienaktivität zu Lasten der Proliferation kann die myogene Differenzierung nicht vollständig bis hin zur Muskelfaserbildung ablaufen. Werden die Zellen jedoch nach 3 Tagen von den FeDip-Oberflächen auf eine TCPS-Oberfläche ausgesät bilden sich Myotubes.

Die in Kapitel 4.1 aufgeführten Analysenergebnisse kommen alle zu dem Ergebnis, dass LbL und FeDip10 und FeDip50 modifizierte Oberflächen biokompatible und teilweise sogar bioaktive Eigenschaften für L929, C2C12, MG63, hMSCs und humane Endothelzellen zeigen.

Vergleicht man die einzelnen Ziellinien und primären Zellen so wird deutlich, dass lediglich die C2C12-Zellen innerhalb von drei Tagen auf den Fe-MEPE modifizierten Oberflächen zu einer vollständigen Differenzierung (Ausbildung der Myotubes) angeregt werden. Die MG63-Zellen brauchen weiterhin den Stimulus des Fe-MEPE, um weiter differenzieren zu können. Sät man die MG63 nach drei Tagen wieder auf TCPS Oberflächen aus, so überwuchern die nicht differenzierten Zellen die differenzierten. Die hMSCs verhalten sich hierbei ähnlich. Löst man die primären Zellen nach drei Tagen von der Fe-MEPE-Oberfläche ab, so gehen die Expressionsrate von Osteocalcin und ALP zurück. Der Fe(II)-Gehalt in der Zelle jedoch variiert auch noch zwischen Tag 5 und Tag 7. Somit konnte eine Langzeitwirkung von Fe-MEPE auf C2C12-Zellen beobachtet werden. Aber auch der Einfluss auf den Fe(II)-Gehalt der hMSCs ist deutlich erkennbar. Zudem konnte ein positiver Einfluss von Fe-MEPE-Substraten auf die Mitochondrienaktivität verzeichnet werden. Die supressierte Proliferation durch die Initiierung der Differenzierung und die erhöhte Aktivität der Mitochondrien resultiert in hohen Zellaktivitäten von bis zu 350% im Vergleich zur TCP Oberfläche.

Vergleicht man die einzelnen Beschichtungen untereinander, so wird deutlich, dass der Einfluss der LbL-Schichten im Falle der C2C12-Zellen auf die Proliferation und Stoffwechselaktivität gering ausfällt. Dennoch werden myogene Differenzierungsmarker exprimiert. An Tag 1 ist deutlich zu erkennen, dass sich die C2C12-Zellen auf der LbL-Schicht durch die hohe Expression von MyoG noch in einem sehr frühen Differenzierungsstadium befinden.

An Tag 3 deutet die Expression von Myf6 auf die Ausbildung von Myocyten hin. Den größten Einfluss hat die FeDip10 –

Schicht auf die C2C12-Zellen. Auf diesen Substraten konnte die höchste Zellaktivität, der höchste Fe(II)-Gehalt pro Zelle und die höchste Myf6 Expression detektiert werden. Die Myotube-Bildung wiederum konnte primär auf der FeDip50 visuell nachvollzogen werden.

Die getesteten Osteosarkomzellen (MG63) zeigen auf den FeDip50-Substraten die höchste Zellaktivität sowie die höchste Ca(II)-Einlagerung und eine erhöhte Affinität zur Clusterbildung.

Bei Betrachtung der hMSCs zeigen die Zellen auf den FeDip10-Substraten die höchsten Zellaktivitäten und die meisten Zellzusammenschlüsse im Mikroskop. Wie erwartet zeigen die Zellen auf den FeDip50-Proben die höchsten Fe(II)-Gehalte pro Zelle sowie die höchste ALP Genexpression.

Die Expression von Osteocalcin ist spenderabhängig. Die höchsten Expressionsraten für Spender 46 und 54 sind auf den FeDip10-Proben und für Spender 56 auf der FeDip50 zu finden.

Es kann somit gezeigt werden, dass Fe-MEPE die myogene (C2C12) und die osteogene (MG63, hMSCs) Differenzierung innerhalb von drei Tagen initiiert, ohne weitere Reagenzien wie Wachstumsfaktoren, Vitamine oder Co-Faktoren zuzufügen. Durch MEPE kann die Zellantwort beeinflusst und gesteuert werden. Diese Zellantwort resultiert zum einen aus der Freisetzung von Metallionen, primär Fe(II)-Ionen, und der unterschiedlichen Polarität der einzelnen Schichten. Bei Verwendung von Co(II)-, Ni(II)- oder Zn(II)-MEPE konnte gezeigt werden, dass die LbL und tauchbeschichteten Proben zytotoxisch auf Fibroblasten (L929) wirken und somit für den Aufbau von neuem Gewebe nicht verwendet werden können.

4.2 Funktionalisierte Knochenzemente

In diesem Kapitel wird die Herstellung, Modifizierung und Analytik von Hydroxylapatit (HA) Knochenzementen näher behandelt und diskutiert. Hydroxylapatit ist mit 60-70% der mineralischen Phase des Knochens Hauptbestandteil des strukturgebenden Skelets. Jedoch kommt der Hydroxylapatit nicht in seiner Reinform ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) vor, sondern beinhaltet noch weitere Ionen wie beispielsweise Carbonat, Fluorid, Chlorid, Natrium, Magnesium und auch Kalium (183, 184). Synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien sind dem natürlichen Knochen jedoch sehr ähnlich. Ein ideales Knochenersatzmaterial sollte folgende Eigenschaften aufweisen: es sollte biokompatibel, porös, belastbar, resorbierbar, formbar und osteokonduktiv sein (185). Um die osteokonduktiven Eigenschaften von Hydroxylapatit zu fördern, werden die Knochenzemente mit Wachstumsfaktoren beladen (185, 186).

In Kapitel 4.1 konnte gezeigt werden, dass die Einbringung von Fe-MEPE myogene Vorläuferzellen, Osteosarkom Zellen und selbst primäre, humane mesenchymale Stammzellen zu myogenen bzw. osteogenen Differenzierung innerhalb weniger Tage anregen kann ohne weitere Wachstumsfaktoren o.ä. zusetzen zu müssen. Im folgenden Kapitel wird auf die Fragestellung eingegangen, ob es möglich ist mittels Fe-MEPE eine Freisetzung von Ionen in porösen Substraten (3D) zu generieren, die wiederum Zellen zur Differenzierung anregen können. Hierzu wurden zunächst die funktionalisierten Knochenzemente hergestellt und charakterisiert.

Es handelt sich hierbei um eine „proof of principle“ Studie und beschäftigt sich mit der Handhabbarkeit und Realisierungsfähigkeit von funktionalisierten Knochenzementen auf der Basis von terpyridin-koordinierter Metallionen. Wie in Kapitel 2 erwähnt, besitzen Co(II)- und Cu(II)-Ionen erheblichen Einfluss auf die Angiogenese, somit die Neubildung von Blutgefäßen, welche notwendig für die Versorgung von Knochengewebe sind. Cu(II)-Ionen stimulieren zum einen die Endothelzellenproliferation und zum anderen die Angiogenese (21). Die Bildung von neuem Knochengewebe, somit die Osteogenese, kann durch Zn(II)-, Sr(II)-, Mg(II)- und Ca(II)-Ionen realisiert werden. Fe(II)-, Ni(II)- und Co(II)-Ionen haben zusätzlich Einfluss auf den Mineralisationsprozess des Knochengewebes (21). Da eine Vielzahl von Metallionen auf zellulärer Ebene wirken kann, wurden Fe(II)-, Co(II)-, Ni(II)- und Cu(II)-Ionen in komplexierter Form in die Zemente eingebracht. Die Metallionen in komplexierter Form wurden zum einen während der Knochenzementherstellung und zum anderen nachträglich, durch Infiltration, in die

Hydroxylapatit-Matrix eingebracht. Bei der Funktionalisierung während der Knochenzementherstellung wurde der gewünschte Komplex in Na_2HPO_4 gelöst, welches zum Abbinden des Zements verwendet wird. Hierbei war die Löslichkeit der einzelnen Komplexe in Na_2HPO_4 (2,5%ig) Lösung der limitierende Faktor für die Konzentration der zu funktionalisierenden Zemente. Bei der Funktionalisierung nach der Zementherstellung wurde der bereits abgebundene Zement jeweils mit der gewünschten Metallionenlösung über Nacht infiltriert. Darüber hinaus wurden metallionendotierte α -Tricalciumphosphate (α -TCP) getestet. Bei metallionendotierten HA Knochenzementen ist das Problem, dass durch die Einbringung der Metallionen es während der HA-Bildung zur Einlagerung dieser Ionen in die Matrix kommt. Dadurch erhält man drucklabilere Knochenzemente. Um dies zu umgehen, wurden auch diesen Proben Komplexbildner in Form von DiPhTerpy Ligand bzw. weitere Komplexbildner, Salicylat und Neocuproin zugegeben, um die Metallionen während der Zementherstellung *in situ* zu komplexieren und die mechanischen Zementeigenschaften zu optimieren. Hierbei werden die Zemente mit Cu(II)- bzw. Co(II)-Ionen dotiert, um primär die Angiogenese des Knochenimplantates zu stimulieren.

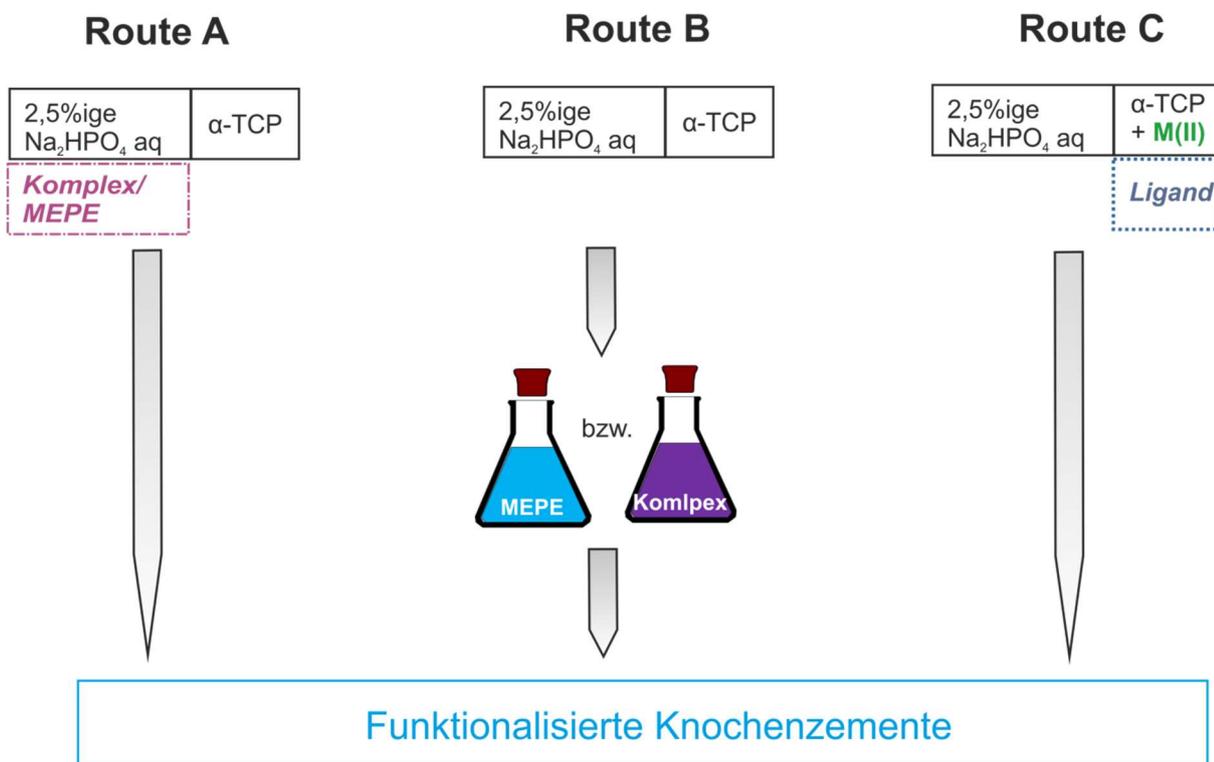


Abbildung 47: Übersicht der Syntheserouten (Routen A-C) zur Herstellung von funktionalisierten Knochenzementen.

4.2.1 Funktionalisierung während Zementpräparation (Route A)

4.2.1.1 $[M(II)(PhTerpy)]_2^{2+}$ Komplexe

Für $Fe(PhTerpy)_2^{2+}$ und $Ni(PhTerpy)_2^{2+}$ konnten Konzentrationen von 0,25mM bis 2,5mM in 2,5%iger Na_2HPO_4 Lösung eingesetzt werden. Zunächst stellt sich die Frage, wie die Hydroxylapatit Bildung mit den zugebenen Komplexen fortschreitet. Um die HA-Bildung abschätzen zu können, wurden die Röntgendiffraktogramme mittels Rietveld Methode analysiert. Hierbei werden die Röntgendiffraktogramme des reinen Edukts und des reinen Produkts mit der gemessenen Probe verglichen und die erhaltenen Röntgenreflexe ins Verhältnis gesetzt.

Im Fall der HA-Zemente handelt es sich um ein Gemisch von gebildetem HA und nicht vollständig umgesetztem α -TCP. In Tabelle 9 sind die prozentualen Anteile von Edukt (α -TCP) zu Produkt (HA), die HA-Kristallgrößen und Druckstabilitäten aufgelistet. Die zugrundeliegenden XRD-Daten der funktionalisierten Knochenzemente sind im Anhang zu finden. Es wird deutlich, dass die HA-Bildungsraten unter den Werten des Referenzsystems verbleiben. Die Kristallgrößen für die Fe-Komplexe liegen im Bereich der Referenz. Für den Ni-Komplex mit einer Konzentration von 0,25 mM kommt es zum einen zu einer verzögerten HA Bildung und zum anderen liegen die Kristallgrößen des gebildeten HAs lediglich im Bereich von $21,9 \pm 1,6$ nm. Die unterschiedlichen Bildungsraten liegen im Bereich des Fehlers von ± 10 -15%. Werden Ni-Komplexe eingebracht, ist eine gehemmte HA-Bildung zu beobachten. Hierbei verbleiben noch 70% des α -TCPs im funktionalisierten Zement. Dieser Effekt kann anhand der geringeren Komplexbildungskonstante für den $Ni(PhTerpy)_2^{2+}$ Komplex erklärt werden. Durch die geringere Komplexbildungskonstante ist mehr unkomplexiertes Ni(II) in der Lösung enthalten und kann während des Abbinde-Prozesses anstelle von Ca(II)-Ionen in die HA-Matrix eingebaut werden. Dies führt zum einen zu einer verminderten HA-Bildung und zum anderen zu drucklabileren Zementen. Bei geringeren Konzentrationen liegt die Hemmung der HA-Bildung im Bereich des Fehlers von 10-15%. Bei Konzentrationen ab 2,5mM kann man von einer gehemmten HA-Bildung sprechen. Hierbei liegt das Edukt zu Produkt Verhältnis bei 1:1. Somit ist der Einfluss auf den Knochenzement sowohl metallionen- und konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration an $Fe(PhTerpy)_2^{2+}$ von $c= 1,25$ mM kommt es zudem zu einer Vergrößerung der HA-Kristalle um 8%. Im Fall der NiPhTerpy Komplexen kommt es zu einer Reduktion der Kristallgrößen. Die Kristallgröße ist im Vergleich zur Referenz 4nm, was 20% entspricht, kleiner. Die Kristallgrößen der Fe-Komplexe liegen im Bereich der Referenz.

Tabelle 9: Zusammensetzung, Kristallgröße und Druckstabilitäten der hergestellten HA-Knochenzemente.

| | α -TCP in% | HA in % | Kristallgröße in nm | Druckstabilität in MPa |
|---|-------------------|---------|------------------------|---------------------------|
| HA Referenz | 22 | 78 | 26,5±0,6 | 33,1±6,2 |
| HA 0,25mM Fe(PhTerpy) ₂ ²⁺ | 38 | 62 | 24,7±0,8 | 23,1±8,3 |
| HA 1,25mM Fe(PhTerpy) ₂ ²⁺ | 25 | 75 | 28,7±0,6 | 24,0±8,3 |
| HA 2,50mM Fe(PhTerpy) ₂ ²⁺ | 50 | 50 | 25,4±1,1 | 16,2±3,75 |
| HA 0,25mM Ni(PhTerpy) ₂ ²⁺ | 70 | 30 | 21,9±1,6 | - |

Der Umsatz von α -TCP beträgt für keine der Proben über 90%. Um die HA-Bildung anzuregen wurden die Hydroxylapatit Zemente einen weiteren Tag ins Wasserbad gegeben und nochmal via XRD vermessen. In Tabelle 10 sind die HA-Bildungsraten nach einem zusätzlichen Tag im Wasserbad zu sehen. Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass der α -TCP Umsatz von allen Proben bei 85-90% liegt. Wie auch bereits in Tabelle 9 zu erkennen, bildet die Referenz den meisten Hydroxylapatit aus. Die hemmende Wirkung der Komplexe auf die HA-Bildung liegt im Bereich des Fehlers. Durch die zusätzliche Behandlung im Wasserbad konnte der α -TCP Umsatz um mindestens 10% gesteigert werden. Im Fall von HA 2,5mM Fe(PhTerpy)₂²⁺ konnte eine Erhöhung der HA-Bildung von 40% erzielt werden. Anzumerken ist zudem, dass mit steigender Konzentration an Fe(PhTerpy)₂²⁺ die HA-Bildung wieder zunimmt. Das kann an den π - π Wechselwirkungen der Terpyridine liegen. Dadurch bilden sich Aggregate und es ist schwieriger, die Metallionen anstelle von Ca(II)-Ionen ins Netzwerk einzubauen. Somit ist es hierbei ausreichend die Zemente einen zusätzlichen Tag im Wasserbad zu belassen. Dies wurde aufgrund der hier erhaltenen Daten für die nachfolgenden Funktionalisierungen standardmäßig durchgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung und Kristallgröße der hergestellten HA-Knochenzemente nach einem Tag zusätzlich im Wasserbad.

| | α -TCP in % | HA in % | Kristallgröße in nm |
|---|--------------------|---------|---------------------|
| HA Referenz | 10 | 90 | 28±0,5 |
| HA 0,25mM Fe(PhTerpy) ₂ ²⁺ | 15 | 85 | 29,5±0,7 |
| HA 1,25mM Fe(PhTerpy) ₂ ²⁺ | 10 | 90 | 28,3±0,6 |
| HA 2,50mM Fe(PhTerpy) ₂ ²⁺ | 11 | 89 | 28±0,6 |

In Abbildung 48 sind die einzelnen pH-Werte über 3 Tage zu sehen. Wird der Hydroxylapatit drei Tage in Phosphatpuffer belassen, so fällt der pH-Wert bis auf einen Wert von 7,04. Es wird deutlich, dass die funktionalisierten Zemente pH stabiler als die Referenz sind. Der gemessene Blindwert für die PBS-Lösung beträgt 7,21. Betrachtet man die Abbildung 48a) wird deutlich, dass die funktionalisierten Knochenzemente bereits nach 1h eine leichte Erhöhung des pH-Wertes zeigen. Die Erhöhung liegt im Bereich von 7,25-7,28 ±0,02. Nach drei Tagen sinken die Werte auf 7,05-7,11 ± 0,1. Die Referenz, der unfunktionalisierte HA-Knochenzement, sinkt über drei Tage auf 7,04 ±0,01 ab. Bereits nach 1h ist der pH-Wert auf 7,19 und innerhalb von 24h auf 7,11 ± 0,03 gesunken. Betrachtet man Abbildung 48b), erkennt man eine noch höhere pH Stabilität für Ni(PhTerpy)₂²⁺. Der pH-Wert bei Zugabe von Ni(PhTerpy)₂²⁺ sinkt auf lediglich 7,17-7,19 ±0,01. Somit puffert die eingebrachte Funktionalität das System zusätzlich ab. Dies ist vor allem im Hinblick auf die vorgesehene Zellkultur fundamental. Zellen reagieren schon bei geringen pH Schwankungen mit Apoptose bzw. die Adhäsion und Proliferation kann gestört werden. Ergänzend dazu ist anzumerken, dass Osteoblasten insbesondere anfällig für pH Schwankungen sind (30).

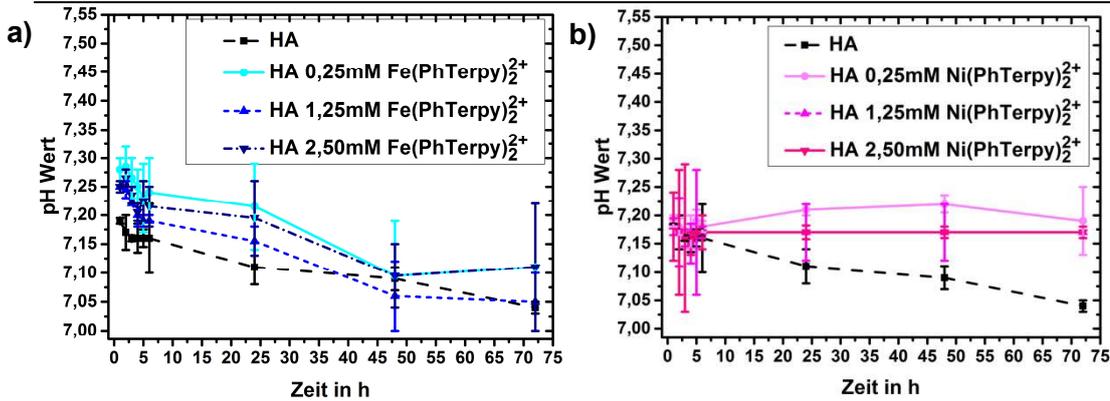


Abbildung 48: Übersicht pH-Stabilität der a) $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ funktionalisierten und b) $\text{Ni}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ bzw. $\text{Cu}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ funktionalisierten HA-Knochenzemente in phosphatgepufferter Lösung bei Raumtemperatur.

Die Freisetzung von Fe(II)-Ionen des zugegebenen $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ konnte mittels Ferrozin-test ermittelt werden. In Abbildung 49 ist zu sehen, dass die Freisetzung am ersten Tag unabhängig von der zugegebenen Komplexkonzentration im Bereich von $1,4\text{--}1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ liegt. Vergleicht man diesen Wert nun mit der Freisetzung der Beschichtungen so ergibt sich ein Maximal-Wert von $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Dieser Wert liegt um das Zehnfache über der Freisetzung der Beschichtungen. Zum Vergleich gibt FeDip50 $0,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ an Fe(II)-Ionen ins Medium ab und SiO_2 $0,6 \times 10^{-5} \text{ -- } 1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

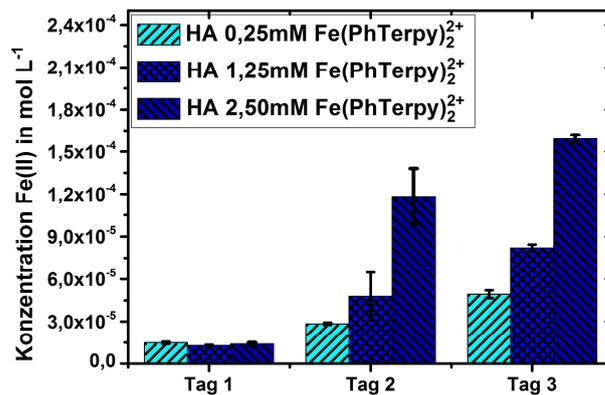


Abbildung 49: Freisetzungsprofile von Fe(II)-Ionen bei der HA-Funktionalisierung mit $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ während der Zementpräparation in PBS.

Somit gilt für die Fe-PhTerpy funktionalisierten HA Knochenzemente eine Freisetzung in den ersten beiden Tagen von $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ bis zu $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Fe(II)-Ionen in PBS. An Tag 3 sinken diese Werte wieder auf $2,1\text{--}4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Wobei die Freisetzung an Tag 1 für alle

drei Konzentrationen sich in einem Bereich von $1,5\text{-}2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ befindet. Die eigentliche stufenweise Freisetzung beginnt ab Tag 2.

Somit wird das Literatursystem mit den aufgetropften Metallsalz-Lösungen dahingehend optimiert, dass eine Freisetzung von Metallionen über mindestens drei Tage gewährleistet werden kann. Es ist ein sprunghafter Anstieg der abgebenden Fe(II)-Konzentration an Tag 2 zu verzeichnen.

4.2.1.2 Fe-MEPE

Die Hydroxylapatit-Bildung in Abhängigkeit der Fe-MEPE Konzentration ist in Abbildung 50 zu sehen. Es wird schon bereits beim ersten Blick deutlich, dass der HA-Reflex bei $31,7^\circ 2\theta$ den α -TCP Reflex bei $20,7^\circ 2\theta$ übersteigt. Um dieses vorläufige Ergebnis quantifizieren zu können, sind in

Tabelle 11 die Verhältnisse von α -TCP zu HA vermerkt. Es wird deutlich, dass alle Differenzen zugunsten der HA-Bildung liegen. Betrachtet man nun die pH Stabilität des Polyelektrolyten, erkennt man eine erhöhte pH-Stabilität im Vergleich zum $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ Komplex. Bei allen drei zugebenen Konzentrationen an Fe-MEPE sinkt der pH-Wert lediglich auf einen Wert von $7,17 \pm 0,02$ (siehe Abbildung 50). Diese Werte liegen 2% über denen vergleichbaren Proben, bei denen während der Synthese der Komplex eingebracht wurde.

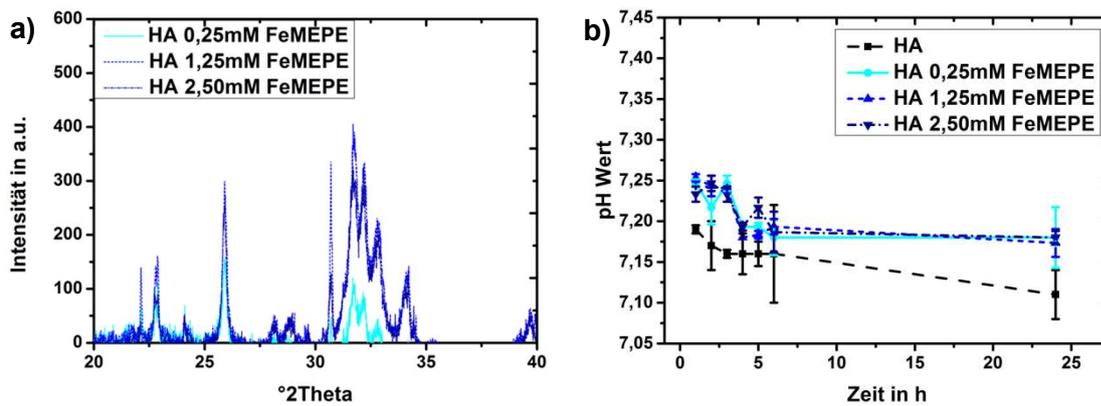


Abbildung 50: a) Hydroxylapatit-Bildung und b) pH-Stabilität von funktionalisierten HA Knochenzementen mit drei verschiedenen Konzentrationen an Fe-MEPE im Vergleich zu unfunktionalisierten HA-Zement.

Tabelle 11: Zusammensetzung, Kristallgröße und Druckstabilitäten der hergestellten HA-Knochenzemente.

| | α-TCP in % | HA in % | Kristallgröße in nm | Druckstabilität in MPa |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| HA 0,25mM Fe- MEPE | 27 | 73 | 31,1±1,3 | 35,4±8,2 |
| HA 1,25mM Fe- MEPE | 17 | 83 | 27,7±0,7 | 38,08±7,7 |
| HA 2,50mM Fe- MEPE | 18 | 82 | 27±0,6 | 25,6±4,5 |

In Abbildung 51 sind die Freisetzungsprofile für die Fe-MEPE funktionalisierten HA Knochenzemente während der Präparation zu sehen. Um den späteren Einfluss auf das Zellverhalten interpretieren zu können ist eine eingehende Charakterisierung des Systems wichtig. Ebenso wichtig wie die pH Stabilitäten und die HA Bildung ist die Freisetzung der dotierten Metallionen, in diesem Fall Fe(II)-Ionen.

Im vorherigen Kapitel (4.1 MEPE Zell-Wechselwirkung) wurden die stimulierenden Effekte der Fe(II)-Ionen auf die myogene Differenzierung ausführlich diskutiert. Um nun ein Freisetzungsprofil für die funktionalisierten HA-Knochenzemente zu bekommen, wurden diese in PBS inkubiert und die Fe(II)-Ionen via Ferrozintest quantifiziert. Vergleicht man Abbildung 51 mit Abbildung 49, so wird deutlich, dass bei Erhöhung der Komplex-Konzentration die Freisetzung ebenso stufenweise erhöht wird. Für den Koordinationspolyelektrolyten ist dies nicht der Fall. Bei einer Fe-MEPE Konzentration von 1,25mM der Ausgangslösung kommt es an den ersten beiden Tagen zu einer erhöhten Fe(II)-Freisetzung. An Tag 3 gleichen sich die Werte für alle drei Konzentrationen wieder an. Auffällig ist zudem, dass es bei der höchsten eingesetzten Fe-MEPE Konzentration von 2,50 mM zur geringsten Freisetzung kommt. Hierbei wird der dynamische Charakter der metallo-supramolekularen Polyelektrolyte deutlich, welcher im Komplex nicht so stark ausgebildet ist. Der Maximalwert am 2. Tag für die HA 1,25 mM Fe-MEPE-Probe übersteigt die maximale Freisetzung der Komplexe um $93 \pm 20\%$. Die Werte am ersten Tag liegen im Bereich vom 2-5fachen der Fe(II)-Konzentration für Fe-MEPE im Vergleich zum Komplex. Somit ist die Fe(II) Verfügbarkeit ausgehend vom Koordinationpolyelektrolyten erheblich höher. Dies bestätigt wiederum die These, dass der Komplex bzw. die im Komplex befindlichen Metallionen während des Abbindeprozesses des Knochenzements in die Matrix mit eingebunden werden. Werden Metallionen bzw. die Komplexe in die HA-Struktur

mit eingebaut, resultiert dies in einer Abnahme der Stabilitäten hinsichtlich des von außen angelegtem Drucks deutlich (siehe Kapitel 4.2.2).

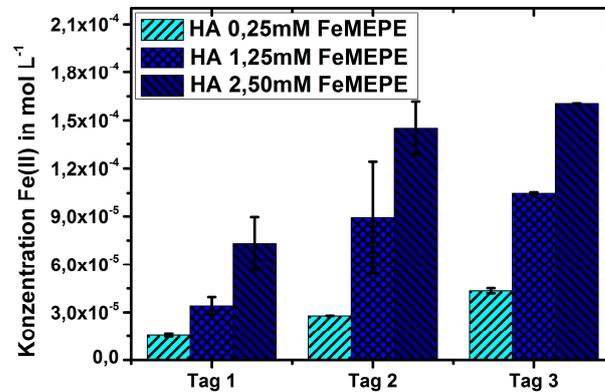


Abbildung 51: Freisetzungsp Profile von Fe(II)-Ionen bei der HA Funktionalisierung mit Fe-MEPE während der Zementpräparation.

Somit gilt für die Fe-MEPE funktionalisierten HA Knochenzemente eine Freisetzung in den ersten beiden Tagen von $3,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ bis zu $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Fe(II)-Ionen in PBS. An Tag 3 sinken diese Werte wieder auf $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Der Komplex zeigt eine stufenweise Freisetzung ab Tag 2 auf, wobei Fe-MEPE die Fe(II)-Ionen primär an Tag 2 freisetzt.

4.2.2 Funktionalisierung nach Zementpräparation (Route B)

4.2.2.1 Fe(PhTerpy)₂²⁺ Komplexe und Fe-MEPE

Bei der Funktionalisierung nach der Zementpräparation wurden die hergestellten HA-Knochenzemente in verschiedenen Konzentrationen 24h inkubiert, anschließend getrocknet und charakterisiert. Zur Übersicht wurde in diesem Kapitel die Infiltration von Fe(PhTerpy)₂²⁺ und Fe-MEPE zusammengefasst.

Die HA-Bildung ist nach der Zementpräparation noch nicht vollständig abgeschlossen. Selbst beim Einsetzen der Knochenimplantate bildet sich stets noch Hydroxylapatit aus restlichem α -TCP. Dieser Prozess der Umsetzung von α -TCP zu HA erfolgt nur langsam. Um eine Aussage über die HA-Bildung treffen zu können, wurden in Abbildung 75 die Röntgendiffraktogramme der funktionalisierten Knochenzemente via Rietveld analysiert. In Tabelle 12 sind die jeweiligen Anteile von Edukt und Produkt zu sehen. Hierbei wurden lediglich zwei funktionalisierte HA-Knochenzemente mit der Referenz verglichen. Die restlichen Daten sind im Anhang zu finden. Auch hier zeigt sich kein negativer Einfluss auf die HA Bildung durch die Einbringung

von $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ und Fe-MEPE. Bei der Funktionalisierung der Knochenzemente durch Infiltration wird zunächst der Zement hergestellt und anschließend in die zu infiltrierende Lösung gegeben. Innerhalb von 24h hat der Komplex bzw. der Polyelektrolyt Zeit, um durch die Poren bzw. sich in den Poren des Knochenzements anzulagern und zu funktionalisieren. Dies resultiert in kleineren HA-Kristallen, da sich der Komplex gleichermaßen wie das MEPE an die HA Kristalle anlagert und die Auflösung der kleineren Kristalle zugunsten der größeren verhindert (189). In Abbildung 52 ist eine Glättung der Oberfläche durch das eingebrachte Fe-MEPE klar erkennbar. In Tabelle 12 ist ersichtlich, dass sich die einzelnen HA Kristalle lediglich um 2nm vergrößern.

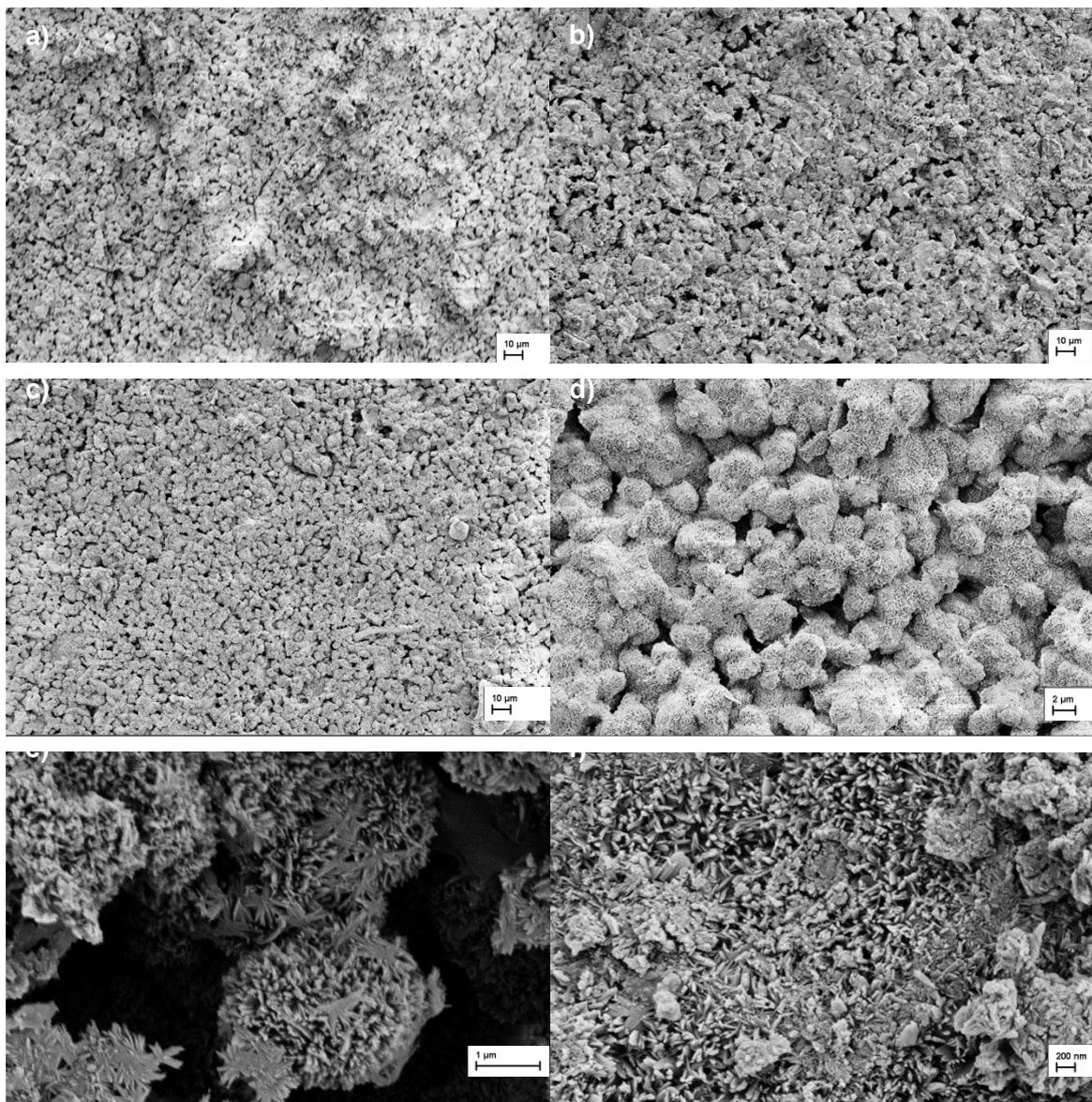


Abbildung 52: REM-Aufnahmen von a) Referenz b) Fe-MEPE während Synthese funktionalisiert c)-d) Fe-MEPE infiltrierten und e)-f) FeTerpy infiltrierten HA-Zementen.

Tabelle 12: Zusammensetzung, Kristallgröße und Druckstabilitäten der hergestellten HA-Knochenzemente.

| | α-TCP in % | HA in % | Kristallgröße in nm | Druckstabilität in MPa |
|--|-------------------------------------|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| HA Referenz | 10 | 90 | 28±0,5 | 61,3±21,3 |
| HA 0,25mM Fe(PhTerpy)₂⁺ | 20 | 80 | 26±0,5 | 45,6±11,9 |
| HA 0,25mM Fe- MEPE | 22 | 78 | 26,2±0,5 | 39,0±17,7 |

Die pH-Werte der Zemente, die via Infiltration von Fe(PhTerpy)₂⁺ Komplexen funktionalisiert wurden, sind deutlich stabiler und weisen keine so hohen Fehler auf wie die vergleichbaren Fe-MEPE-Proben. Die Fe-MEPE-Proben schwanken von 7,25 bis 7,17 mit einer Standardabweichung von ± 0,01 bzw. bei einer Konzentration von 2,5mM sogar um 0,07. Nichtsdestotrotz liegen die Werte für Fe-MEPE 2% über den pH-Werten der Referenz. Der unfunktionalisierte HA-Knochenzement fällt innerhalb von 24h auf einen pH von 7,04, die infiltrierten Proben lediglich auf 7,17. Bei der Infiltration des Fe-Komplexes sinkt der pH-Wert von anfänglich 7,26 ± 0,01 auf 7,24 ± 0,02 bei einer Konzentration von 0,25mM. Das entspricht einem Rückgang von unter 1%. Es wird somit deutlich, dass es sich um sehr geringe pH-Schwankungen handelt, die jedoch für die Zellen entscheidend sind, ob sie adhären und proliferieren können oder sich abkugeln und sterben.

In Abbildung 53 sind die Druckstabilitäten der via Route A und B hergestellten Knochenzemente gezeigt. Zum Vergleich: spongioser Knochen hält einem Druck von 10-20 MPa stand, kortikaler Knochen einem Druck von 25-100MPa.

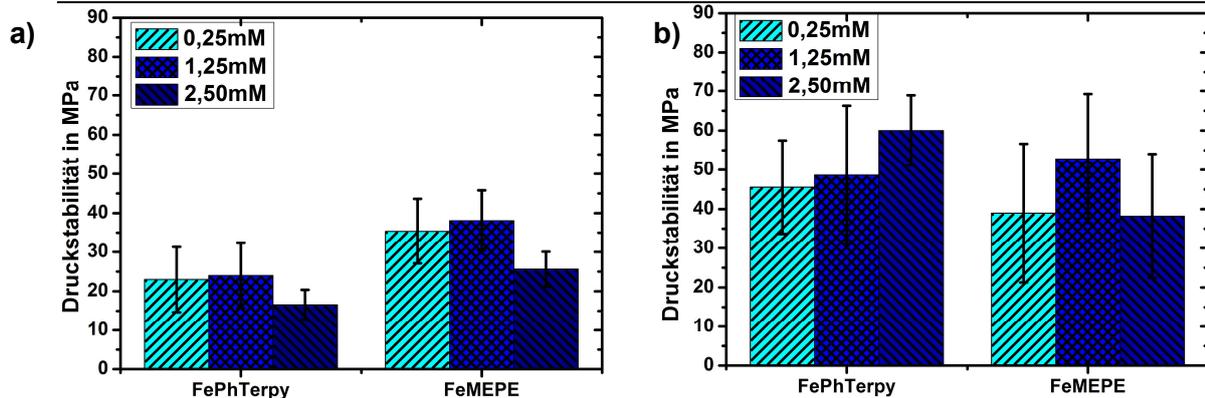


Abbildung 53: Druckstabilitäten der a) während Synthese und b) der infiltrierten HA-Knochenzemente im Vergleich. Zum einen wurden die Knochenzemente mit $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ (kurz Fe-PhTerpy) und zum anderen mit Fe-MEPE versetzt. Jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen.

Es wird deutlich, dass die nachträglich funktionalisierten Proben eine höhere Druckfestigkeit aufweisen, im Fall von FePhTerpy sogar um bis zu 44 MPa bei einer Konzentration von 2,5mM. Dies entspricht einer Erhöhung um 73%. Der Referenzwert zur Druckstabilität bei der Funktionalisierung während der Synthese entspricht einem Wert von $35\text{Mpa} \pm 10\text{MPa}$. Somit erreichen die FePhTerpy-Proben im Schnitt einen Wert von 60% im Bezug zum Referenzsystem. Es ist ein nicht linearer Verlauf erkennbar. Bei Konzentrationen unterhalb von 2,30mM FePhTerpy liegen die Werte im Bereich von 23-24MPa. Bei einer Konzentration von 2,50mM sinkt der Wert auf 16MPa. Daher wird davon ausgegangen, dass bei höheren Konzentrationen im System diese ins Netzwerk eingelagert werden und die Vernetzung stören. Auch im Fall von Fe-MEPE ist dieser Trend zu beobachten. Somit kann die geringere Fe(II)-Freisetzung dadurch erklärt werden, dass durch den Einbau in die Matrix eine geringere Konzentration an Fe(II)-Ionen zur Verfügung steht. Dieser Effekt ist für Fe-MEPE wesentlich geringer.

Der Messwert für die in Abbildung 53b) dargestellten Referenzzemente beträgt $61 \pm 20\text{MPa}$. Diese HA Zemente wurden zur Vergleichbarkeit für eine Infiltrationszeit von 12-24h in Wasser gelegt. Durch die höhere HA-Bildung kommt es somit zur Stabilisierung des Netzwerks und zu höheren Druckstabilitäten. Der Verlauf der Druckstabilitäten im Fall von FePhTerpy steigt bei zunehmender Konzentration schrittweise an. Somit kommt es hier zu einer Verfestigung des Netzwerkes und die Einlagerung der Komplexe hat einen positiven Einfluss auf die Vernetzung und HA-Bildung. Für Fe-MEPE zeigt sich ein Anstieg bei Erhöhung der Infiltrationslösung von $c=0,25$ auf 1,25mM. Bei einer Konzentration von 2,5mM fällt der Wert jedoch auf den bei einer Konzentration von 0,25mM zurück. Es kommt somit zu einer geringeren Vernetzung und HA Bildung als bei geringeren Konzentrationen.

In Abbildung 54 sind unfunktionalisierte und funktionalisierte Knochenzemente in Zellkultur zu sehen. In der ersten Reihe (A1-A4) ist das Referenzsystem zu sehen. Darauf folgen infiltrierte Fe-MEPE HA-Zemente mit der in dieser Arbeit höchsten Konzentration an Infiltrationslösung (2,5mM). Diese Zemente sind in A5-A6 und B1-B2 zu sehen. In B3-B6 wurden infiltrierte Fe-MEPE Zemente mit einer Konzentration von 1,25 getestet. In den Wells C1-C4 befindet sich die Blindprobe, das zugesetzte Zellkulturmedium. Man erkennt bereits am Farbumschlag die unterschiedlichen pH-Werte. Die Abbildung 54 wurde 24h nach der Zugabe des Zellkulturmediums aufgenommen. Selbst visuell ist erkennbar, dass die unfunktionalisierten Knochenzemente sauer reagieren und sich die Zellen in dieser Zellkulturplatte gehemmt adhären und proliferieren aufgrund der pH-Schwankungen. Für die infiltrierten Proben ist nur ein leichter bzw. kein Farbumschlag des dem Zellkulturmedium zugesetzten Indikators (Phenolrot) zu erkennen. Es ist somit ersichtlich, dass die Knochenzemente vor der Einbringung in die Zellkultur neutral gewaschen werden müssen. Im Fall der funktionalisierten Knochenzemente wird deutlich, dass bei diesen Proben das Waschprotokoll abgekürzt werden kann, da durch die freien Elektronenpaare am Stickstoffatom der Terpyridineinheit ein zusätzlicher Puffer ins System eingebracht wird und es zu einer Stabilisierung des pH-Wertes kommt. Das Standard Waschprotokoll für HA-Knochenzemente wird wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde die Zemente 3-5h alle 30min mit Wasser neutral gewaschen. Anschließend wurden die Scaffolds desinfiziert, indem sie 10min in 70% ethanolsche Lösung gelegt wurden. Daraufhin wurde das Ethanol unter sterilen Bedingungen mithilfe von PBS 3-5 Tage lang ausgewaschen (17). Werden Terpyridin-kordinierte Metallionen in den HA-Knochenzement eingebracht verkürzt sich dieses um 1-3 Tage. Es ist ausreichend die Zemente 2 Tage jeweils 4x mit Wasser zu waschen, anschließend mit CHCl_3 zu sterilisieren und noch einen Tag unter sterilen Bedingungen mit PBS für die Zellkultur vorgewaschen.

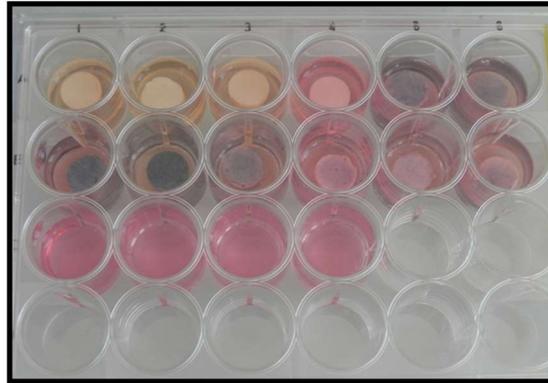


Abbildung 54: Vergleich von unfunktionalisierten und funktionalisierten HA-Knochenzementen in Zellkulturmedium.

In Abbildung 55 sind die Freisetzungsprofile für die Fe-PhTerpy und Fe-MEPE infiltrierten Proben dargestellt. Auch im Fall der infiltrierten Fe-PhTerpy-Proben ist eine stufenweise Freisetzung zu erkennen. Hierbei zeigt die Freisetzung für die HA 2,50mM Fe(PhTerpy)-Probe die höchsten Werte. Bei Infiltration von Fe-MEPE ist eine Freisetzung von $1,0\text{-}6,2 \text{ mol L}^{-1}$ detektierbar. Den Maximalwert erreicht die Probe mit der geringsten Fe-MEPE Konzentration. Es wird deutlich, dass die infiltrierten Proben eine geringere Fe(II)-Freisetzung aufweisen als die während der Präparation funktionalisierten (siehe Abbildung 51) HA-Knochenzemente. Beim Vergleich der beiden Funktionalisierungsarten im Fall von FePhTerpy liegen die Freisetzungsprofile im gleichen Konzentrationsbereich. Somit ist es für die Freisetzung nicht entscheidend ob der Komplex während oder nach der Synthese ins System eingebracht wird.

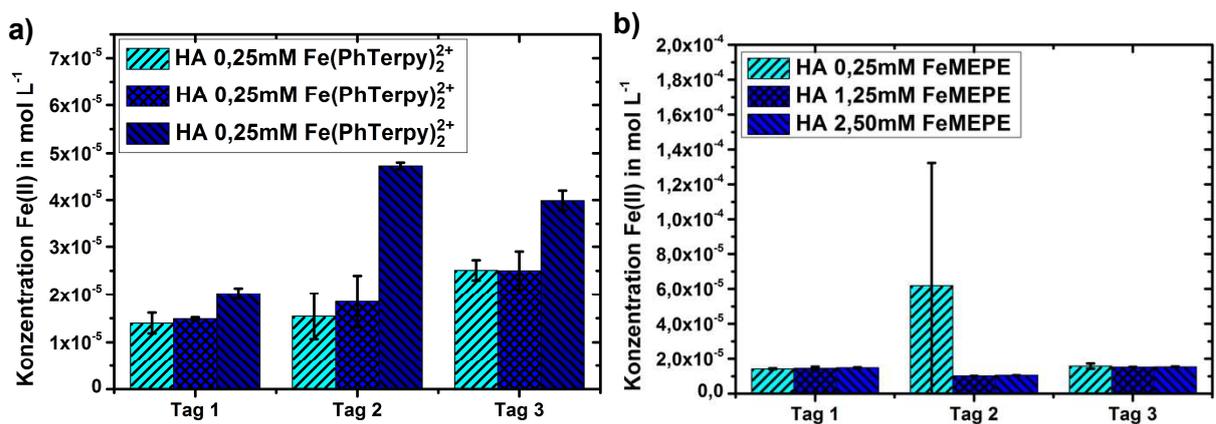


Abbildung 55: Fe(II)-Freisetzungsprofile von a) FePhTerpy und b) Fe-MEPE in PBS via Ferrozin-test.

4.2.1 Funktionalisierung mittels Metallionen dotiertem α -TCP (Route C)

Hierbei wurde bereits zu den Edukten das gewünschte Metallion in Form eines Salzes zugegeben. Das Salz und das α -TCP wurden in einer Kugelmühle gemahlen und bei $T = 1400^\circ\text{C}$ kalziniert. Zugegeben wurde Cu(II)- und Co(II)-Salze. Kupfer spielt eine wichtige Rolle in vielen Metalloenzymen. Beispielsweise in Lysiloxidase, welches die Vernetzung von Lysin und Hydroxyproline in Kollagen katalysiert (190). Es wurde bereits in der Literatur gezeigt, dass ein Mangel an Kupfer in einer Abnahme der Knochenstärke von Ratten (191) und Hühnern (192) resultiert. Es wurde zudem gezeigt, dass die Modifizierung von Kalziumphosphatzementen schon mit geringen Cu(II)-Konzentrationen einen großen Effekt auf die Vaskularisierung der Makroporen im *in vivo* Modell zeigt (193, 194). In einem Vorversuch wurde getestet, ob die Komponenten, also Metallion und Komplexbildner, auch koordinieren, wenn beide Komponenten in fester Form zugegeben werden. Dazu wurde FeSO_4 und DiPhTerpy mit α -TCP gemischt und anschließend mit 2,5%iger NaH_2PO_4 Lösung abgebunden. Es resultierte ein HA Zement, der sich schon während der Vermengung der Komponenten blau färbte. Somit ist eine Komplexierung möglich, wenn die zu komplexierenden Komponenten in fester Form beigemischt werden. Die HA-Bildung ist in Tabelle 13 dargestellt. Es wird in beiden Fällen, durch die Zugabe von festem PhTerpy Ligand, kein Einfluss auf die HA Bildung detektiert.

Um nun zu überprüfen, ob die Zugabe von Komplexbildner den Einbau von Metallionen in die HA-Matrix hindert, wurden die Druckstabilitäten gemessen. Für die Co-dotierten Proben ist eine leichte Erhöhung von 7 ± 2 MPa zu verzeichnen. Die Cu(II)-dotierte Referenzprobe weist die höchste Druckstabilität dieser Testreihe auf. Mit 42 ± 2 MPa liegt dieser Wert 55% über der HA Co-Referenzprobe. Die mit PhTerpy modifizierte HACu-Probe liegt mit 29 ± 2 MPa bei 70% der Druckstabilität der Referenz. Dies ist durch die erschwerte Komplexierung durch die gehinderte Sterik des CuPhTerpy Komplexes erklärbar.

Tabelle 13: Zusammensetzung, Kristallgröße und Druckstabilitäten der hergestellten HA-Knochenzemente.

| | α -TCP in % | HA in % | Kristallgröße in nm | Druckstabilität in MPa |
|---------------------|--------------------|---------|------------------------|---------------------------|
| HA Co-Referenz | 33 | 67 | 26,2± 1,0 | 26,0±2,9 |
| HA Co-SA | 40 | 60 | 24,4± 1,0 | 24,3±3,9 |
| HA Co-Di-Terpy | 26 | 74 | 25,5± 1,2 | 23,0±0,2 |
| HA Co-SA DiTerpy | 38 | 62 | 25,2± 1,2 | 29,4±2,3 |
| HA Cu-Referenz | 25 | 75 | 26,2± 0,9 | 52,2±5,3 |
| HA Cu-SA | 33 | 67 | 24,1± 0,7 | 36,8±5,9 |
| HA Cu-SA DiTerpy | 32 | 68 | 24,1± 0,7 | 37,0±1,8 |
| HA Cu-Neo | 21 | 79 | 25,3± 0,8 | 37,1±4,2 |

Die Cu(II)-Terpyridinkomplexe koordinieren in verzerrter oktaedrischer Geometrie. Literaturbekannt sind überwiegend Komplexe mit einer Terpyridineinheit und weiteren Komplexbildnern (195). Es wurden bereits Studien zu Diphenyl-Cu(II)-Komplexen auf ihre Zytotoxizität auf Krebszellen durchgeführt. Hierbei wurde ein 4'-(9-Anthryl)-2,2':6,2'-Terpyridin Ligand verwendet (196). Die Bildung des CoPhTerpy₂ Komplexes ist sterisch nicht gehindert. Des Weiteren ist die Komplexbildungskonstante für den Co(II)-Komplex höher als für den Cu(II)-Komplex. Zudem bilden Cu(II)-Ionen mit Terpyridinen lediglich einen Monokomplex (CuL) aus, da $K_1 > K_2$. Um die Cu(II)-Ionen zu komplexieren und somit den Einbau in die HA-Matrix zu verhindern, wurden Neocuproin und Salicylat als Ligand getestet. Neocuproin ist bekannt für die Detektion von Cu(I)- und Cu(II)-Ionen im $\mu\text{g L}^{-1}$ Bereich (197). Salicylatanionen komplexieren eine Vielzahl von Metallionen (198, 199). Beispielsweise Ca(II)-, Ba(II)- und Sr(II)-Ionen können mittels Salicylat komplexiert werden (200). Auch Rb(I)- und Cs(I)-Ionen können mittels Salicylsäure zu Salicylatkomplexen umgesetzt werden (201). Sogar heteronukleare Komplexe mit Fe(II)- und Ba(II)- bzw. Sr(II)-Ionen sind möglich (202).

Um die Freisetzung der dotierten Metallionen quantitativ bestimmen zu können, wurde zunächst der Ferrozintest auf die Metallionen Co(II) und Cu(II) getestet (203). Das

Absorptionsmaximum des Fe(II)-Ferrozin-Komplexes liegt bei $\lambda=550\text{nm}$ (204). Für Co(II)- bzw. Cu(II)-Ionen verschiebt sich die Absorptionsbande und es wurde zunächst das Absorptionsmaxima der jeweiligen Komplexe gemessen und bestimmt. Im Fall von Co(II)-Ionen wurde eine Wellenlänge von $\lambda=450\text{nm}$ und für Cu(II)-Ionen $\lambda=470\text{nm}$ verwendet. Um eine quantitative Analyse durchführen zu können wurden zunächst vier Proben bekannter Konzentration im Bereich von $5 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ gemessen und eine Kalibriergerade (siehe Anhang) erstellt.

In Abbildung 56 sind die Freisetzungsprofile für a) Co(II)- und b) Cu(II)-dotierten HA zu sehen. Diese beginnen erst ab Tag 2, da am ersten Tag die Freisetzung unterhalb der Detektionsgrenze von $1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ liegt (204). Es fällt auf, dass die Co(II)-Proben einen höheren Release aufweisen. Dies korreliert wiederum mit der geringen HA-Bildung und den niedrigen Druckstabilitäten für die Cu-Proben. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bevorzugt Cu(II)-Ionen ins HA Netzwerk eingebaut werden, das Netzwerk schwächt und weniger Ionen für die Freisetzung zur Verfügung stehen. Die maximalen Freisetzungsmengen von Co(II)-Ionen liegt im Bereich von $0,8-2,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Die Freisetzung erfolgt stufenweise und im Fall von Co(II) übersteigt die M(II)-Freisetzung der funktionalisierten Probe den der Referenz im Schnitt um 50%. Im Fall von HA Cu kommt zu einem Cu(II)-Release im Bereich von $1,0 - 4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Der Trend für die Freisetzung für Co(II)-Proben ist leicht erhöht im Gegensatz zu den Cu(II)-Proben.

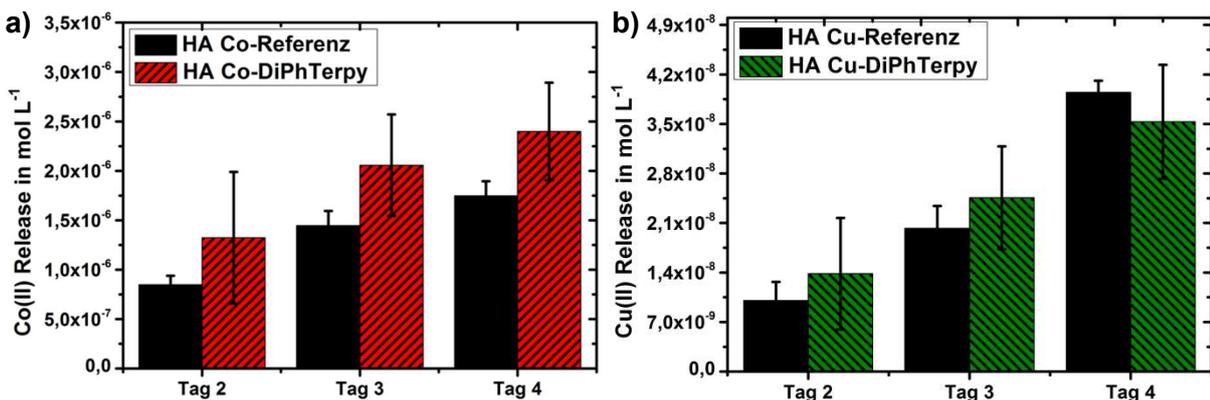


Abbildung 56: Metallionen-Freisetzung in PBS a) für Co(II) dotiertes α -TCP und b) für Cu(II) dotiertes α -TCP in mol L^{-1} .

Aufgrund der erhaltenen Daten wurden noch weitere Komplexbildner ins System eingebracht und untersucht. Zum einen wurde Salicylsäure beigemischt. Literaturbekannt sind zahlreiche

Metallionen-Salicylat-Verbindungen. Im Fall des Cu dotierten α -TCPs wurde zusätzlich Neocuproin zugegeben, welches als Cu Abfangreagens in beispielsweise dem Fe(II)-Ferrozintest angewendet wird.

Um Die HA-Bildung nach der Beimengung der Salicylsäure, der Salicylsäure in Kombination mit DiPhTerpy und dem Neocuproin einschätzen zu können, wurden wiederum Röntgendiffraktogramme im Bereich von $20-40^\circ 2\theta$ aufgenommen (siehe Anhang Abbildung 77). In Tabelle 13 sind die prozentualen Anteile von Edukt (α -TCP) und Produkt (HA) und die korrespondierenden HA-Kristallgröße aufgelistet. Lediglich die HA Co-Neo Probe weist eine erhöhte HA-Bildung im Vergleich zu der Referenz auf. Hieraus ergibt sich, dass Neocuproin unter den verwendeten Liganden für die Komplexbildung von Cu(II)-Ionen innerhalb der Zementherstellung am besten geeignet ist, um den Einbau in die HA-Matrix zu verhindern.

Bei der Betrachtung der Druckstabilitäten liegen die modifizierten HA Zemente mit Werten von 36 bis 37MPa unterhalb des Referenzsystems mit $52,2 \pm 5,3$ MPa.

Um eine vorherige Oxidation der Metallsalze bzw. die Oxidbildung im Ofen zu vermeiden wurden zusätzlich dotierte Knochenzemente getestet, bei denen die Zugabe der Metallsalze erst nach dem Kalzinieren erfolgte. Die Vermutung liegt nahe, dass durch Temperaturen von 1400°C die Metallionen oxidieren (M(II) zu M(III)) und es somit schwieriger wird, die Metallionen durch Liganden zu koordinieren. Durch die Zugabe nach dem 5 stündigen Kalzinierungsprozesses kann davon ausgegangen werden, dass die Metallsalze noch in der gewünschten Oxidationsstufe +II vorliegen. In Abbildung 57 sind die Freisetzungsprofile der modifizierten HA Zemente zu sehen. Die Werte für die Co(II)-Freisetzung liegen wie bei den vorherigen HA-Zementen innerhalb des Fehlers und entsprechen dem Referenzwert. Es wird deutlich, dass es hier bereits ab Tag 1 zu einer Cu(II)-Freisetzung kommt, im Gegensatz zu den konventionell hergestellten Proben. Des Weiteren liegen die Werte der mit Cu-dotierten Knochenzemente mit dem Zusatz von Neocuproin als Komplexbildner um ein 6faches höher als die Referenz. Deutlich wird zudem, dass die Komplexbildung mit DiPhTerpy zu gering ist, um einen Effekt zu erzielen. Die Cu(II)-Gehalte an den ersten beiden Tagen sind mit $1,2 \times 10^{-9}$ und 9×10^{-10} mol L^{-1} für die HA Cu-Neo-Probe am höchsten. Bis zu Tag 4 fallen die Werte auf $2,5 \times 10^{-10}$ mol L^{-1} zurück, liegen aber dennoch 136% über dem Referenzwert der HA Cu-Probe ohne Komplexbildner.

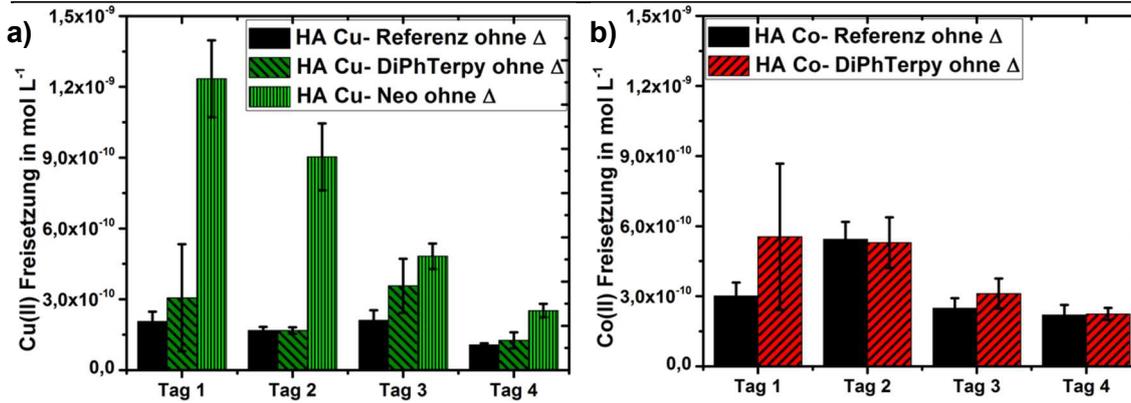


Abbildung 57: Übersicht über die a) Cu(II) Freisetzung und b) Co(II) Freisetzung der über die Route C funktionalisierten HA-Zemente.

Bei Betrachtung der Druckstabilitäten in Tabelle 14 wird deutlich, dass die Einbringung der Liganden keine Erhöhung der Druckstabilität hervorruft. Vergleicht man die erhaltenen Druckstabilitäten jedoch mit den metallionendotierten α -TCP, bei denen die M(II)-Salze mitgesintert wurden, so erhält man im Fall der HA Co-Referenz eine Erhöhung der Druckstabilität um 152%. Bei den HA Cu-Proben kommt es zu einem Rückgang der Stabilität gegenüber äußerem Druck um $40 \pm 24\%$. Jedoch erzielt man in den HA Cu-Proben ohne ΔT einen 6fach höheren Cu(II)-Freisetzung gegenüber der Referenz (siehe Abbildung 57). Somit sind die Einbringung während der Synthese und der anschließende Freisetzung von Cu-Ionen in HA-Zemente ohne vorherige Sinterung des Cu(II)-Salzes möglich.

Tabelle 14: Übersicht über die Druckstabilitäten der M(II) dotierten HA-Zemente.

| | Druckstabilität in MPa |
|----------------|---------------------------|
| HA Co-Referenz | $58,4 \pm 4,4$ |
| HA Co-DiTerpy | $39,5 \pm 18,9$ |
| HA Cu-Referenz | $25,5 \pm 10,0$ |
| HA Cu-DiTerpy | $34,2 \pm 7,7$ |
| HA Cu-Neo | $20,0 \pm 2,5$ |

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Einbringung von FePhTerpy und Fe-MEPE während und nach der Synthese (Route A und B) möglich ist. Sowohl die HA-Bildung als auch die Druckstabilitäten sind im Bereich der Referenz.

Durch die Einbringung von festen Komplexbildnern zu Cu/Co dotiertem α -TCP konnten nur geringe positive Effekte auf die vorhandenen Systeme detektiert werden. Das ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass die Abbindereaktion des HA in einer hoch viskosen Paste erfolgt. Es kommt zur Aufkonzentration der einzelnen Spezies. Des Weiteren ist die Löslichkeit der Komplexbildner nicht außer Acht zu lassen. Im Fall von PhTerpy besitzt dieser zwar eine hohe Affinität zu zweiwertigen Übergangsmetallionen, ist jedoch erst als gebildeter Komplex wasserlöslich.

Durch Einbringung von Neocuproin konnte eine Cu(II)-Freisetzung in einem Konzentrationsbereich von $2,5 - 12 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ generiert werden.

4.2.2 Zelltests

Um die Biokompatibilität der Einzelkomponenten zu prüfen wurde bereits in Kapitel 3.2.1 eine Konzentrationsreihe für Fe-MEPE erstellt. In Abbildung 58 sind die Ergebnisse des WST-1 Tests der L929 Zelllinie zu sehen. Es wird deutlich, dass alle modifizierten Knochenzemente oberhalb der 80% Grenze für eine schwache Zytotoxizität liegen. Somit werden die hier hergestellten Knochenzemente zwei Tage in Zellkultur von den Zellen toleriert.

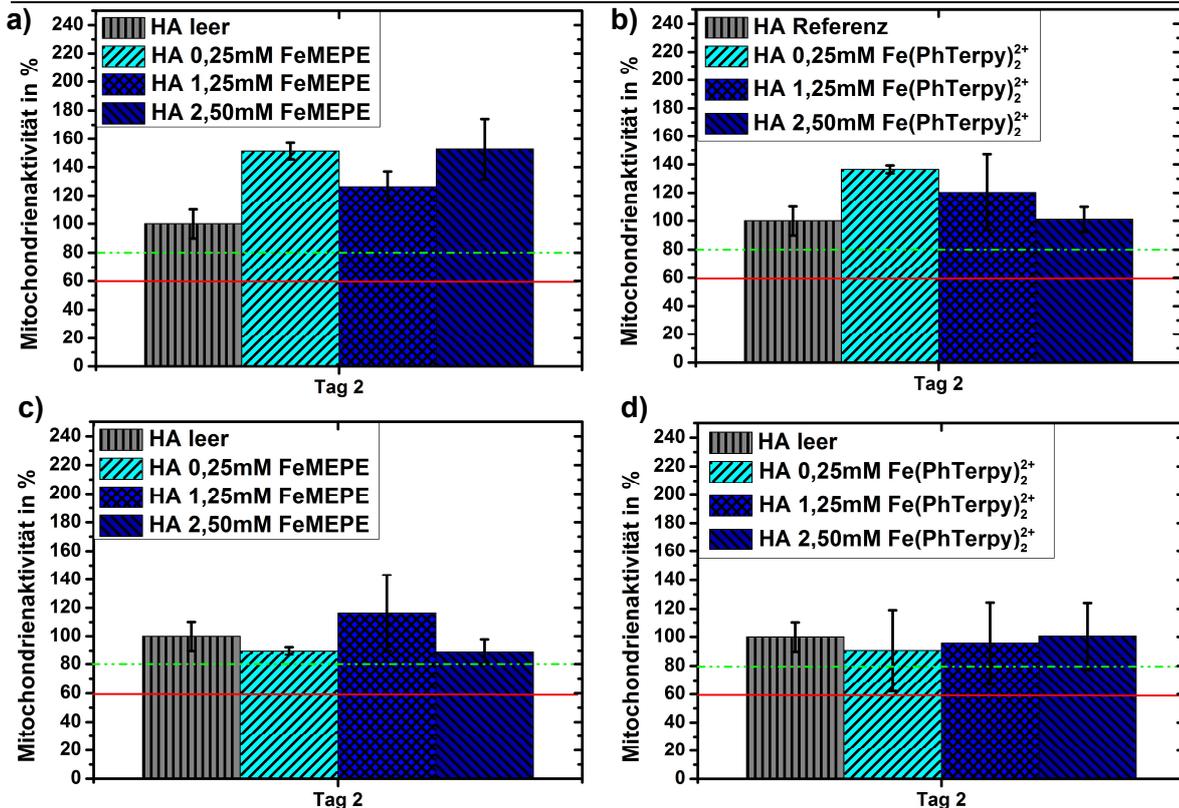


Abbildung 58: Mitochondrienaktivität der L929 Zelllinie von a) Fe-MEPE und b) Fe(PhTerpy) während der Präparation, c) Fe-MEPE und d) Fe(PhTerpy) infiltrieren HA-Zementen an Tag 2.

Für weitere Zelltests wurde die osteoblastäre Zelllinie MG63 verwendet. Zunächst wurde die Stoffwechselaktivität an Tag 2 und Tag 5 für die infiltrierten HA Fe-MEPE-Proben durchgeführt. Die Referenz stellt die TCPS Oberfläche dar. Es wird deutlich, dass die Mitochondrienaktivität an keinem der Tage oberhalb der Zytotoxizitätsgrenze von 80% liegt. Auffällig ist trotz allem, dass die funktionalisierten Proben eine um 5% höhere Stoffwechselaktivität der MG63 generieren als der unfunktionalierte HA-Zement.

Um nun den Einfluss des Fe-MEPE besser beobachten zu können, wurden die MG63-Zellen auf die in Kapitel 4.1.1 bereits erwähnten und charakterisierten porösen SiO₂-Schichten ausgesät. Zum einen erleichtert es die Probenvorbereitung und zum anderen die Probenanalyse, denn durch die hohe Porosität der HA-Knochenzemente ist ein Ablösen und somit die Zellanalytik erschwert. Die porösen SiO₂-Schichten wurden vergleichbar infiltriert.

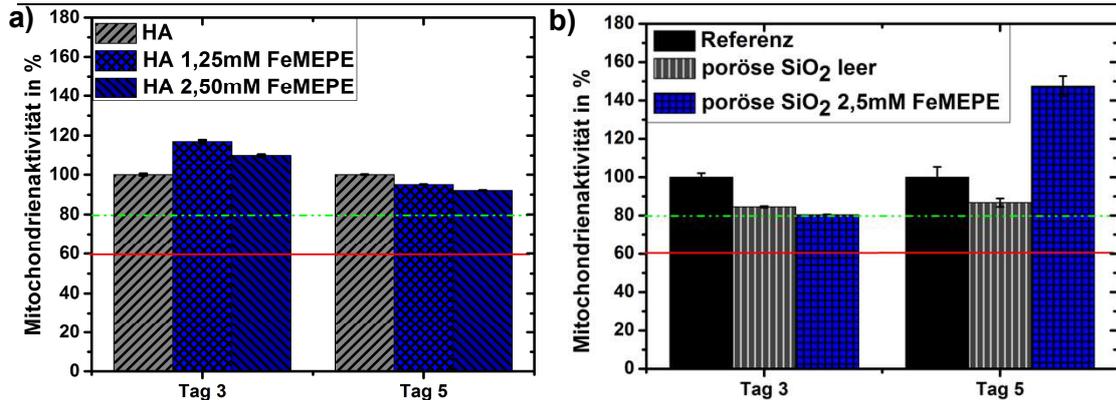


Abbildung 59: Mitochondrienaktivität der MG63 Zelllinie. Die HA-Zemente in a) und die porösen SiO₂-Schichten in b) wurden via Infiltration funktionalisiert.

Bei der Betrachtung der Differenzierung wurde der vergleichbare Versuchsaufbau wie im Fall der C2C12-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst für drei Tage auf den funktionalisierten Schichten ausgesät, abgelöst und wieder auf einer TCP-Referenzoberfläche ausgesät (Tag 4 und 5). In Abbildung 60 sind die Zellzahlen bzw. die aus dem WST-1 Wert und den Zellzahlen resultierende Zellaktivität zu sehen. Tag 1 und 3 sind in einem separaten Diagramm aufgeführt, da sich die Zellen hierbei direkt auf der Oberfläche befanden. An Tag 3 wurden diese dann abgelöst und auf eine Standard-Zellkulturplatte neu ausgesät und an Tag 1 (insgesamt Tag 4) und Tag 2 (insgesamt Tag 5) nach dem Ablösen charakterisiert. An Tag 1 fällt auf, dass die Zellzahlen für die infiltrierte Proben im Falle einer Konzentration von $c = 1,25$ mM bei $66 \pm 25\%$ und bei $c = 2,5$ mM bei einer Zellzahl von $77 \pm 16\%$ liegen. Betrachtet man die Zellaktivitäten so wird deutlich, dass diese in beiden Fällen über 100% liegen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen die Proliferation zugunsten der Differenzierung eingestellt haben. Um diese These überprüfen zu können, wurde eine Alizarin-Rot-Färbung durchgeführt um hierbei die Ca(II)-Ionen, welche von den Zellen bei Differenzierung vermehrt angelagert werden (Mineralisationsprozess) rot anzufärben (siehe Abbildung 61). Die poröse SiO₂-Schicht wirkt zunächst stimulierend auf die Zellproliferation an Tag 1. Betrachtet man Tag 3 so wird deutlich, dass auch hier die Zellzahl allmählich unter 100% liegt. Die Zellaktivität wiederum ist auch hier gesteigert. An Tag 4 ist der Effekt für die poröse Schicht am höchsten, sinkt aber bis zum Tag 5 wieder. Dafür liegt die Zellaktivität für die 1,25mM und 2,5mM Proben an allen Tagen über 100%. Am deutlichsten für 2,5mM an Tag 3. Dies wird auch bei der Betrachtung der Alizarin-Rot-Färbung deutlich: an Tag 4 sieht man im Falle der 1,25mM Proben nur eine leichte rote Färbung, wohingegen 2,5mM bereits stark rot gefärbte Areale aufweist. Auffällig ist an Tag 5 die vermehrte Anlagerung von Ca(II)-Ionen und somit erhöhter Rotfärbung

der Proben, welche mit 1,25mM Fe-MEPE infiltriert wurden. Die Alizarin-Rot-Färbung stellt die terminale Kalzifizierung des Knochenmetabolismus dar. Die Initiierung der Mineralisation kann mittels ALP-Aktivität bestimmt werden.

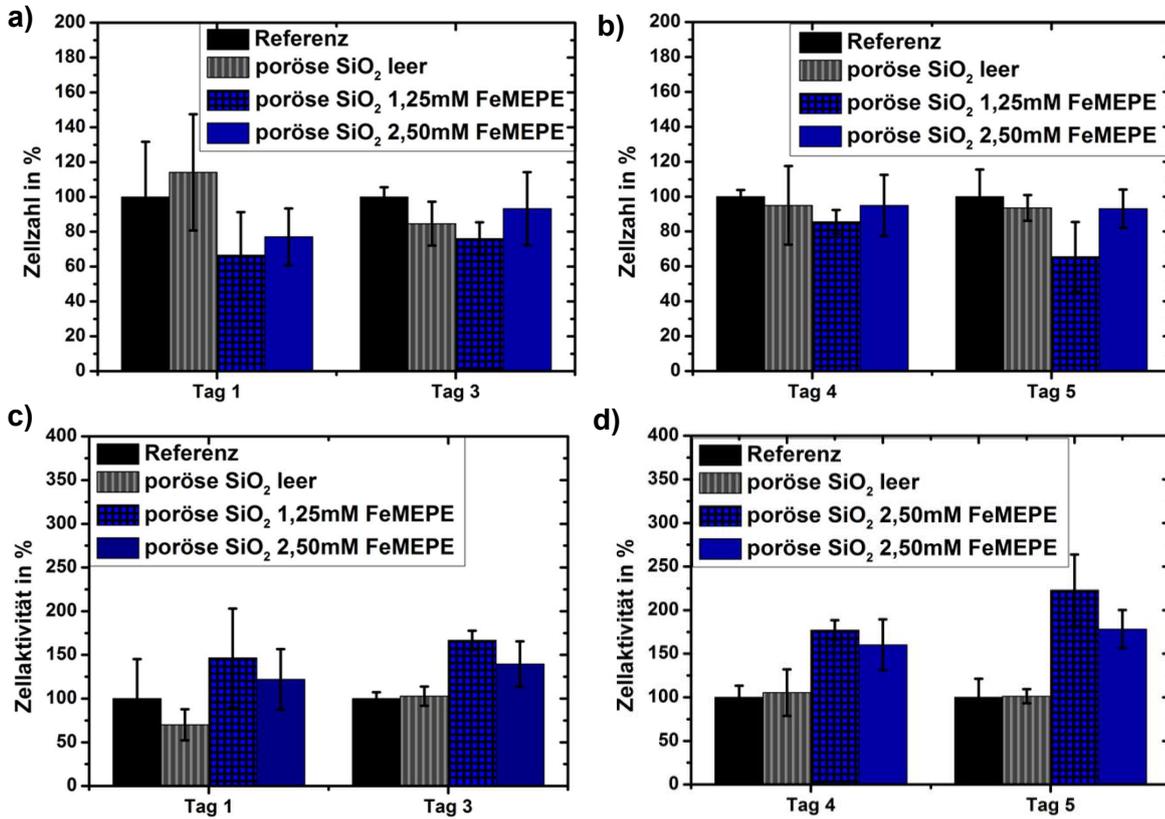


Abbildung 60: Zellzahlen und Zellaktivitäten der MG63-Zellen a) und c) auf porösen SiO₂-Schichten an Tag 1 und 3 und b) und d) auf einer TCP Oberfläche (nach drei Tagen auf der jeweiligen Schicht) an Tag 4 und 5.

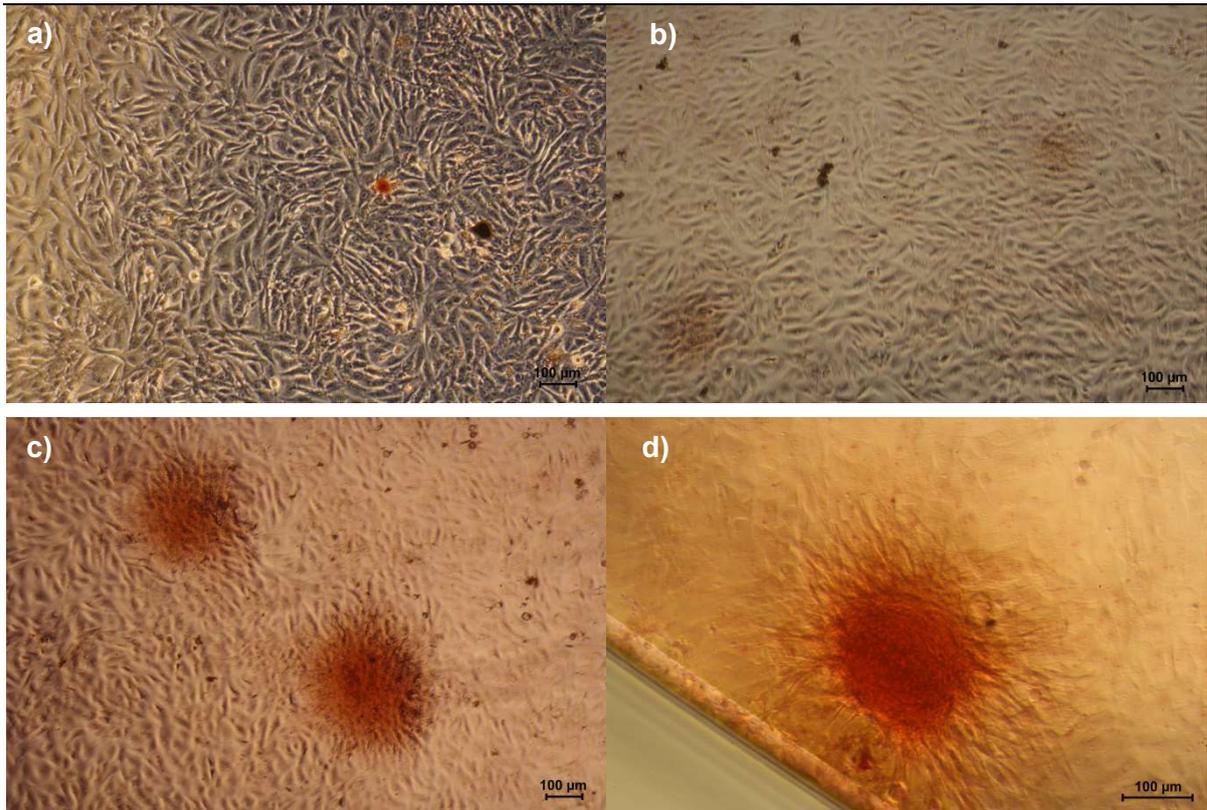


Abbildung 61: Alizarin-Rot-Färbung von MG63-Zellen nach 3 Tagen auf a) einer leeren b) einer mit 1,25mM Fe-MEPE infiltrierten c) einer mit 2,5mM Fe-MEPE infiltrierten und c) wiederum einer leeren porösen SiO₂-Schicht und dem neu aussäen auf eine TCP Platte. Die Aufnahmen erfolgten für a)-c) am 1. Tag nach dem neu aussäen (insgesamt Tag 4) und d) am 2.Tag nach dem neu aussäen (insgesamt Tag 5).

Bei Betrachtung der ALP-Aktivitäten auf Enzymbasis (siehe Anhang) ist zu erkennen, dass die MG63-Zellen auf den HA Knochenzementen, die mit Fe-MEPE funktionalisiert sind, bereits an Tag 1 ALP-aktive Zellen ausbilden. Bei den porösen SiO₂-Schichten ist erst an Tag 4 eine Erhöhung der ALP-Aktivität zu verzeichnen. Somit konnte eine Initiierung der osteogenen Differenzierung von MG63-Zellen auf infiltrierten porösen SiO₂-Schichten mit Fe-MEPE und funktionalisierten HA-Zementen innerhalb der ersten vier Tage nachgewiesen werden. Bei Betrachtung humaner mesenchymaler Stammzellen von drei verschiedenen Spendern konnte ebenfalls die Initiierung der osteogenen Differenzierung anhand erhöhter Zellaktivitäten, Fe(II)-Gehalte und ALP-Aktivitäten detektiert werden (siehe Anhang).

4.1 Reversible Alginat

4.1.1 Funktionalisierung

Die dritte und letzte Fragestellung beschäftigt sich mit Alginaten, einem Biopolymer, mit dem es möglich ist, Zellen zu immobilisieren und zu transportieren. Die Herausforderung bei der Immobilisierung der Zellen innerhalb der Alginatmatrix sind die fehlenden Zell-Alginat Interaktionen. Durch die Hydrophilie des Polymers kann Fibronectin die Oberfläche nur gering benetzen und die Zellen zeigen eine gehemmte Adhäsion und Proliferation. Um dieses Problem zu lösen, werden im Rahmen dieser Arbeit Terpyridineinheiten an die Alginatmatrix kovalent gebunden. Um eine Zell-Alginat Interaktionen zu ermöglichen wird eine koordinative Bindung zwischen Alginat und Zelle erreicht. Hierbei können die Zellen zum einen mit dem Alginat wechselwirken und zum anderen können die Zellen für weitere Versuche bzw. bei Einbringung in traumatisiertes Gewebe wieder freigesetzt werden. Um eine reversible koordinative Bindung zu generieren zu können, wird ein geeigneter Ligand für die Funktionalisierung benötigt. Folgende Bedingungen sind zu erfüllen. Terpyridin basierte Liganden weisen hohe Komplexbildungskonstanten mit 3d-Metallen auf und wirken wie im vorherigen Kapitel gezeigt stimulierend auf die myogene und osteogene Differenzierung von Zelllinien und primären hMSCs. Die eingesetzten Terpyridine sind wasserlöslich und ermöglichen so die Funktionalisierung der primären Amingruppe via Carbodiimid Chemie. Schließlich soll die Funktionalisierung nicht zur frühzeitigen Gelierung des Alginats führen. Die Wahl fiel auf 1-Amino-5-(2,2':6',2''-terpyrid-4'-yl-oxy)pentan, das bereits in der Literatur zur selektiven Lactoferrin Detektion verwendet wird. Hierbei wird der Ligand koordinativ an eine PET Membran gebunden und mit Fe(II) versetzt. Durch die freie Koordinationsstelle am Metallion kann selektiv gelöstes Lactoferrin gebunden werden. Die PET Folie wurde zuvor mit NaOH geätzt, um die benötigten -COOH Gruppen zu generieren (91). Der Ligand wird durch eine nucleophile Substitution von 4'-Chloro-2,2':6',2''-terpyridin mit 2-(2-Aminoethoxy)ethanol in DMSO unter stark basischen Bedingungen hergestellt. Es wurden Ausbeuten von 70% erzielt.

Für die Alginatfunktionalisierung mit dem Terpyridinderivat wurde eine Carbodiimid aktivierte Kupplungsmethode verwendet. Diese Kupplungsmethode kann in wässriger Lösung durchgeführt werden. Hierzu wird ein wasserlösliches Carbodiimid, das 1-Ethyl-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (kurz EDC) verwendet. Die Carboxylgruppe des Alginats wird mit einem Amin funktionalisiertem Molekül kovalent verlinkt. Um die reaktiven EDC-intermediate gegen die konkurrierende Hydrolyse Reaktion zu stabilisieren, wird zusätzlich ein Co-Reaktand Sulfo-

NHS hinzugegeben. Dies erhöht die Amid-Formation und vermindert die Hydrolyse. Im ersten Schritt der Reaktion bindet das EDC an das carboxyl-funktionalisierte Molekül, die **G**- und **M**-Untereinheiten des Alginats. Es entsteht ein instabiles, reaktives O-Acylisoharnstoffderivat, das nun mit einem primären Amin, Wasser oder dem Co-Reaktand reagiert. Bei der Hydrolyse Reaktion wird die Anfangs deprotonierte Carboxyl-Gruppe regeneriert und es liegt somit die Ausgangssubstanz vor. Die favorisierte Amidbindungsbildung erfolgt direkt über die Reaktion mit dem primären Amin oder mithilfe des Sulfo-NHS über eine weitere semistabile, aminreaktive Zwischenstufe (205, 206).

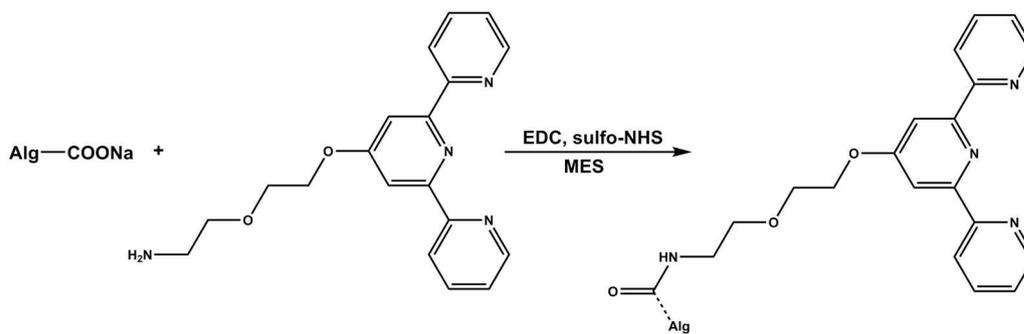


Abbildung 62: Funktionalisierung Alginat mittel Carbodiimid Synthese.

Um den Einfluss der Funktionalisierung auf die Eigenschaften des Gels testen zu können, wurden drei molare Mischverhältnisse Ligand zu Alginat gewählt. Es wurde 10%, 50% und 100% der Carboxygruppen mit Terpyridin funktionalisiert (theoretische Berechnung).

Abbildung 63 zeigt die FTIR Spektren von unfunktionalisiertem und Terpyridin-funktionalisiertem Alginat. Bei einer Wellenzahl von 1694cm^{-1} ist die C=O Valenzschwingung des Amids zu sehen, was für eine erfolgreiche Amidbindungsbildung spricht. Um Aufschluss über den Anteil der Funktionalisierung des Alginats zu bekommen, wurden thermogravimetrische Messungen durchgeführt (siehe Abbildung 63 b)). Es ist ein unterschiedliches thermisches Verhalten zu erkennen. Die thermische Zersetzung des Alginats beginnt bei $28-198,3^\circ\text{C}$ mit der Dehydratation. Ab einer Temperatur von $198,3^\circ\text{C}$ bis 587°C kommt es zur Zersetzung und anschließend wird Na_2CO_3 gebildet und verbleibt mit einer Restmasse von 24%. Dies gilt für Messungen unter Argonatmosphäre und einer Heizrate von 10°C pro Minute. Bei der Messung unter Luftatmosphäre verschiebt sich die Dehydratationsgrenze zu niedrigeren Temperaturen ($26,3^\circ\text{C}$ - $187,1^\circ\text{C}$), somit beginnt der Zersetzungsprozess früher. Auch für die Na_2CO_3 Bildung gilt eine Temperaturerniedrigung auf $521,2^\circ\text{C}$ und eine Restmasse von 22,01% (207). Gemessen wurde bis einschließlich 900°C , eine Zersetzung des Na_2CO_3 würde erst ab einer Temperatur

von 1600°C erfolgen (208). Die erste Stufe der funktionalisierten Probe verschiebt sich zu geringeren Temperaturen. Der Kurvenverlauf weist somit darauf hin, dass die funktionalisierte Probe weniger thermisch stabil ist als das Ausgangsprodukt. In der Literatur ist ein solcher Kurvenverlauf für Alginat Graphenoxid Gel Perlen bekannt. Durch die erhöhte Wärmeleitfähigkeit des Graphenoxids tritt der Massenverlust bei geringeren Temperaturen auf (209). Es bleibt somit eine Restmasse von +16% im Falle der unfunktionalisierten Proben erhalten.

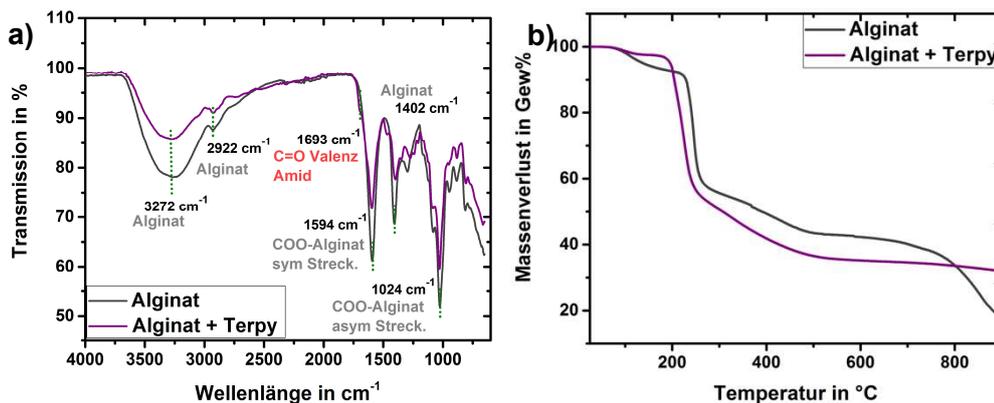


Abbildung 63: In Graph a) sind FTIR Daten und in b) thermogravimetrische Messungen von Alginat (grau) und mit Terpyridin funktionalisierten Alginat (violett) zu sehen.

Für eine genauere Analyse werden im weiteren Verlauf die Glucuronsäure-Untereinheiten genauer untersucht. Die **G**-Untereinheit wurde auf die gleiche Art und Weise wie das korrespondierende Alginat funktionalisiert und analysiert. In Abbildung 64 ist das ^1H NMR der mit 100% funktionalisierten Glucuronsäure zu sehen. Bei einer chemischen Verschiebung von 2,85 ppm ist die CH_2 Gruppe benachbart zur Amidbindung zu erkennen, anschließend überlagern die CH Gruppen der Glucuronsäure der Zucker OH- und des Grundgerüsts, außer die beiden

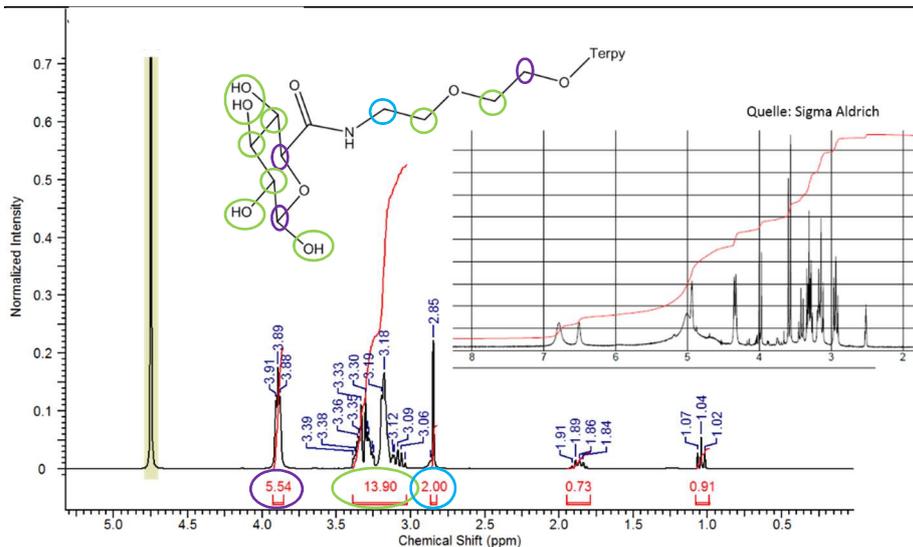


Abbildung 64: ^1H NMR der 100% Terpyridin funktionalisierten Glucuronsäure in D_2O .

CH Gruppen in direkter Nachbarschaft zum Sauerstoffatom im Ring und die in direkter Nachbarschaft zu $-\text{O-Terpy}$. Diese sind bei 3,89 ppm zu finden.

In Abbildung 65 ist das ESI-Massenspektrum dargestellt. Die Massenfragmente wurden bei negativer Spannung detektiert. Der Hauptpeak bei einem Masse zu Ladungsverhältnisses $m/z=192$ ist die zweifach deprotonierte Glucuronsäure. In einem Abstand von 194 (=Masse Glucuronsäure) ist ein zweiter Hauptpeak bei $m/z= 386,4$ zu erkennen. Dies ist ein Glucuronsäure Dimer, das einfach deprotoniert vorliegt. Bei der 100% funktionalisierten Glucuronsäure sind ebenfalls zwei Hauptpeaks zu erkennen, zum einen wie vorher beschrieben bei einem Masse zu Ladungsverhältnisses von 193 die einfach deprotonierte Glucuronsäure. Der zweite Peak bei $m/z=388,5$ stammt vom gewünschten Produkt, der Terpyridin funktionalisierten Glucuronsäure. Es wird deutlich, dass eine Funktionalisierung von 100% nicht erreicht wurde, denn im Massenspektrum ist wie im Eduktspektrum die unfunktionalisierte Uronsäure zu finden. Das Massenspektrum für eine theoretische Funktionalisierung von 50% zeigt die identischen Peaks wie in Abbildung 65, lediglich die relativen Intensitäten der zwei Hauptpeaks unterscheiden sich um 5%.

In Abbildung 66 sind FTIR-Spektren der 100%funktionalisierten und der unfunktionalisierten Glucuronsäure zu sehen. Vergleicht man die reine Glucuronsäure mit der funktionalisierten, so ist deutlich zu sehen, dass die Carbonsäurebande der unfunktionalisierten Glucuronsäure bei 1700 cm^{-1} nach der Funktionalisierung zurück geht und dafür Amidschwingungen im Bereich von 1650 cm^{-1} auftreten.

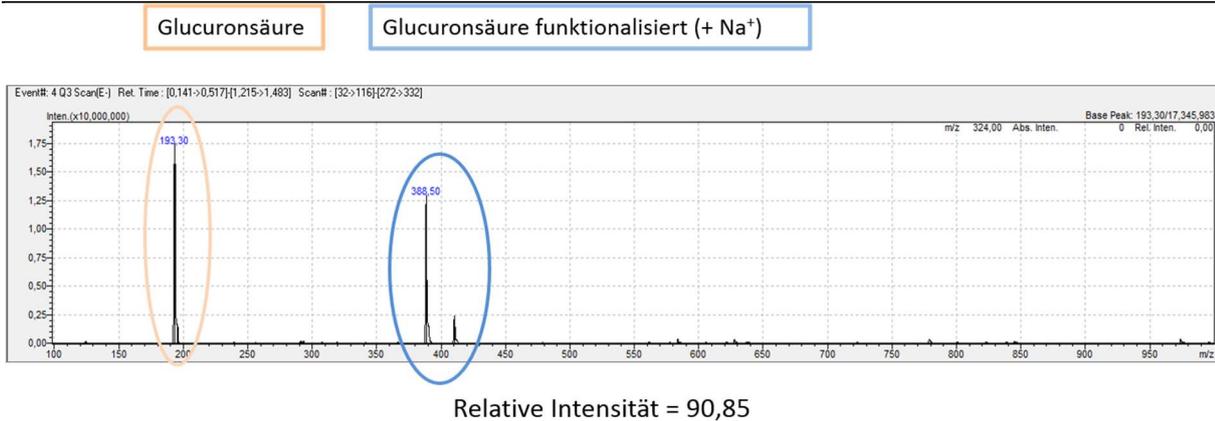


Abbildung 65: ESI-Massenspektrogramm von 100% NH₂-DEG-Terpy funktionalisierter Glucuronsäure.

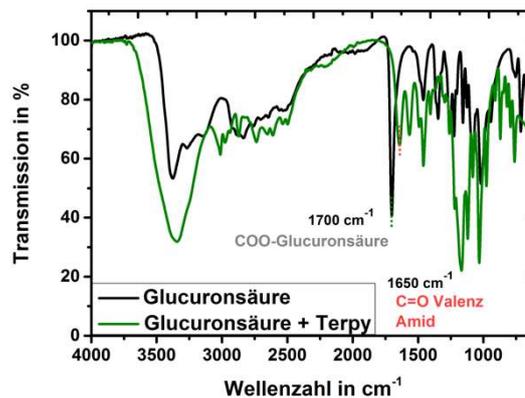


Abbildung 66: FTIR-Spektrum von Glucuronsäure im Vergleich mit funktionalisierter Glucuronsäure.

In Abbildung 67 a) ist die thermogravimetrische Messung der 100% funktionalisierten Glucuronsäure unter Argon zu sehen. Die Messung beinhaltet fünf Massenverluststufen. Die erste Stufe beginnt bei 56°C und endet bei 147°C. Das dazugehörige Massenspektrogramm zeigt ab einer Temperatur von 57°C bis einschließlich 113°C das Masse- zu Ladungsverhältnis von 17. Bis 100°C ist zusätzlich $m/z=18$ detektierbar. Diese beiden Peaks resultieren aus OH^+ und $-\text{H}_2\text{O}^+$ aus der Substanz bzw. aus der Restfeuchte der Probe und wird auch als Sauerstoff Indikator bezeichnet. Es ist auffällig, dass die funktionalisierte Probe mehr physikalisch adsorbiertes Wasser trotz vorheriger Trocknung enthält als das Rohprodukt. Die zweite Massenverluststufe beginnt bei $T=147^\circ\text{C}$ und endet bei 256°C mit einem Massenverlust von 7%. Dieser Massenverlust resultiert aus der Bildung von HCN^+ und C_2H_3^+ aus der Amidbindung bzw. durch Umlagerung der Ethergruppen kommt es zur Bildung einer Vinylfunktionalität, die ab 175°C abgespalten wird. Dafür spricht auch der zweite Massendifferenz Peak von $m/z=56$.

der $C_4H_8^+$ zugeordnet werden kann. Diese beiden Peaks bleiben bis zu einer Temperatur von $225^\circ C$ im Fall von $m/z=56$ und für $m/z=27$ bis $265^\circ C$ erhalten.

Das Masse- zu Ladungsverhältnis von 27 weist auf $C_2H_3^+$ und CHN^+ Fragmente aus aromatischen Stickstoffverbindungen hin. Der zweite Peak von $m/z=56$ kann $C_4H_8^+$ und $C_3H_4O^+$ zugeordnet werden. Betrachtet man nun das gesamte Molekül, wird deutlich, dass die schwächsten Bindungsstellen die Etherbindungen sind. Diese fragmentieren als erstes und es bildet sich eine zweite Massenverluststufe aus Fragmenten wie $C_3H_4O^+$. Die dritte und höchste Massenverluststufe beginnt bei $259^\circ C$ und endet bei $371^\circ C$ und beinhaltet einen Massenverlust von 56%. Auch in dieser dritten Stufe bleibt der m/z Peak von 27 erhalten. Zusätzlich konnte $m/z=26$ und 43 detektiert werden. Der m/z Peak bei 26 kann unspezifisch $C_2H_2^+$ aus aromatischen Kohlenwasserstoffen und CN^+ der Pyridinringe der Terpyridin-Einheit zugeordnet werden. Das Masse- zu Ladung Verhältnis von 43 spricht für die Bildung von $CONH^+$. Bei $287^\circ C$ kommt eine Massendifferenz von 29 und 30 hinzu. Ethylderivate können zu C_2H_5 und somit zu einem m/z Verhältnis von 29 fragmentieren.

Die Amidbindung zersetzt sich zu $NH_2CH_2^+$ ($m/z=30$) und $CONH^+$ ($m/z=43$). Ab $300^\circ C$ beginnt die Glucuronsäure sich zu zersetzen und es kommt erneut zu $-OH$ und $-H_2O$ Bruchstücken aus den endständigen Zucker $-OH$ Gruppen und des im Ring befindlichen Sauerstoffatoms. Von $371^\circ C$ bis $900^\circ C$, tritt lediglich die Massendifferenz von 27 auf und lässt darauf schließen, dass hier die restlichen aromatischen Stickstoffatome verflüchtigt werden.

Abbildung 67 zeigt die TG-Analyse der unfunktionalisierten Glucuronsäure. Vergleicht man die TG-Analysen der unfunktionalisierten mit der funktionalisierten Glucuronsäure, zeigt die funktionalisierte Glucuronsäure eine zusätzliche Stufe bei $T < 150^\circ C$ mit einer Massenänderung von 5%. Anzumerken ist zudem, dass die funktionalisierte Probe vor der TG Messung zusätzlich getrocknet wurde. In einem Temperaturbereich von $150-260^\circ C$ erkennt man in beiden Proben eine zusätzliche Massenverluststufe, jedoch weist die unfunktionalisierte Glucuronsäure eine erheblichere Massenänderung von 27%, verglichen mit der funktionalisierten mit 7%, auf.

Die Funktionalisierung bringt somit auch im Falle der Glucuronsäure eine Änderung des thermischen Verhaltens mit sich.

Die Massenspektren des TGs der unfunktionalisierten Glucuronsäure zeigt lediglich die Massen zu Ladungsverhältnisse von $m/z=17$ (OH^+) und 18 (H_2O^+). Diese resultieren aus den alkoholischen $-OH$ Gruppen und der Carbonsäure der Glucuronsäure. Die Restmassen unterscheiden sich um 8%. Der Hauptmassenverlust der funktionalisierten Probe ist zu geringeren Temperaturen verschoben. Die unfunktionalisierte Probe zersetzt sich über einen breiteren Temperaturbereich. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Probe erfolgreich

funktionalisiert wurde. Bei der Betrachtung des Temperaturbereichs von 200°C bis 600°C, in dem die höchste Zersetzungsrates und die thermische Zersetzung des Amids stattfindet, wird klar, dass die Massenänderungen der unfunctionalisierten Glucuronsäure identisch sind.

Somit kann der Grad der Funktionalität anhand der Restmassen bestimmt werden. Hier wurde unter Argon gemessen und die Substanzen nicht restlos oxidiert. Betrachtet man die Messungen unter synthetischer Luft wird deutlich, dass hierbei nicht die Restmassen zur Bestimmung der Funktionalität zu Rate gezogen werden kann, sondern die zweite Massenverluststufe, da diese durch die Funktionalität zusätzlich auftritt. Auch im Fall der Argonmessung wird deutlich, dass die zweite Massenänderungsstufe und die Differenz der Restmasse mit 7-8% identisch sind. Durch die Anbindung des Liganden wurde die chemische Umgebung der Glucuronsäure und somit die thermischen Eigenschaften verändert. Das Zucker-Grundgerüst zersetzt sich im gleichbleibenden Temperaturbereich, jedoch verändert sich das Profil der thermischen Zersetzung. Dadurch treten zusätzliche Stufen im Thermogramm und zusätzliche Massenfragmente im Massenspektrogramm auf. Bei der Messung unter Argon wird die Oxidbildung gehemmt, wodurch die Fragmentierung besser beobachtet werden kann. Unter synthetischer Luft würden primär CO₂ aus dem Kohlenstoffgrundgerüst und Stickoxide entstehen.

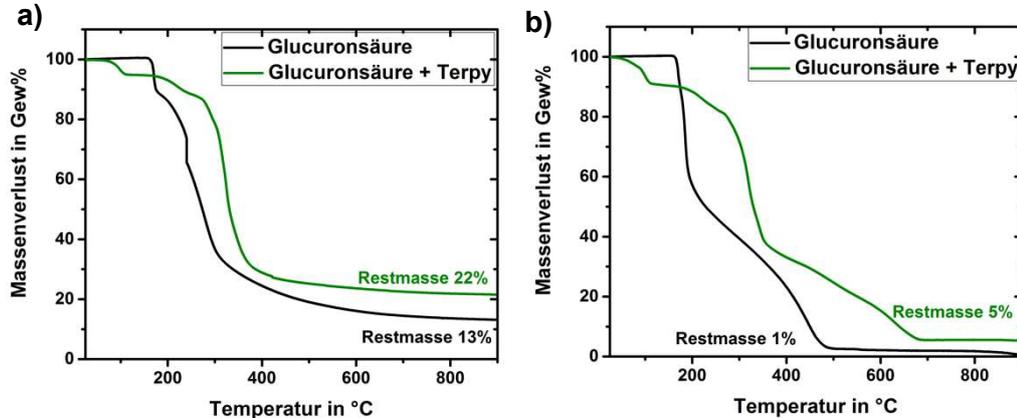


Abbildung 67: Thermogravimetrische Messung unter a) Argon mit insitu Massenspektrometrie und b) unter synthetischer Luft.

Zudem wird in den ersten beiden Massenverluststufen deutlich, dass hier ein minimal höherer Verlust zu verzeichnen ist. Zum einen sind 9% Verlust unterhalb von 147°C detektiert worden. In der zweiten Stufe kommt es zu einem Massenverlust von ebenfalls 9%. Die Massenänderung in der dritten Stufe beträgt dafür nur 46% anstelle von 56%. Die darauffolgende Stufe ist identisch. Anzumerken sind zudem zwei weitere Stufen bei 448°C bis 566°C und 566°C bis 722°C. Darüber hinaus unterscheiden sich die Restmassen um 17%. Betrachtet man nun die

Gegenüberstellung der unfunktionalisierten mit der funktionalisierten Glucuronsäure, fällt auch hier ein unterschiedliches thermisches Verhalten auf (siehe Abbildung 68 a)). Bei der unfunktionalisierten Glucuronsäure sind 2 relevante Massenverluststufen detektierbar: im Bereich von 30-263°C und 263-512°C. Hierbei kommt es zu einem Massenverlust von insgesamt 98%. Es resultiert insgesamt eine Restmasse von unter 1%. Im Fall der 100% Terpy-funktionalisierten Glucuronsäure wurden aus der ersten Ableitung 4 Hauptmassenverluststufen detektiert. Diese befinden sich in den Bereichen von 44-147°C, 147-260°C, 260-373°C, 373-512°C und machen einen Massenverlust von 76% aus wobei die Restmasse 5% beträgt. In Abbildung 68 b) sind die thermogravimetrischen Messungen zweier unterschiedlicher Funktionalitäten zu sehen. Zum einen die 50% und zum anderen die 100% Terpy funktionalisierte Probe. Aus der ersten Ableitung der Kurven wird deutlich, dass die thermische Zersetzung im Falle der 50% Terpy-Probe gering zu höheren Temperaturen verschoben ist. Die Stufen teilen sich wie folgt auf: 44-153°C, 153-266°C, 266-379°C, 397-550°C und einer zusätzlichen Stufe bei 550-721°C. Der Massenverlust der beiden ersten Stufen ist für beide Proben identisch bei 9%. Somit kann davon ausgegangen werden, dass trotz unterschiedlicher molarer Verhältnisse, die generierte Funktionalität gleichgeblieben ist.

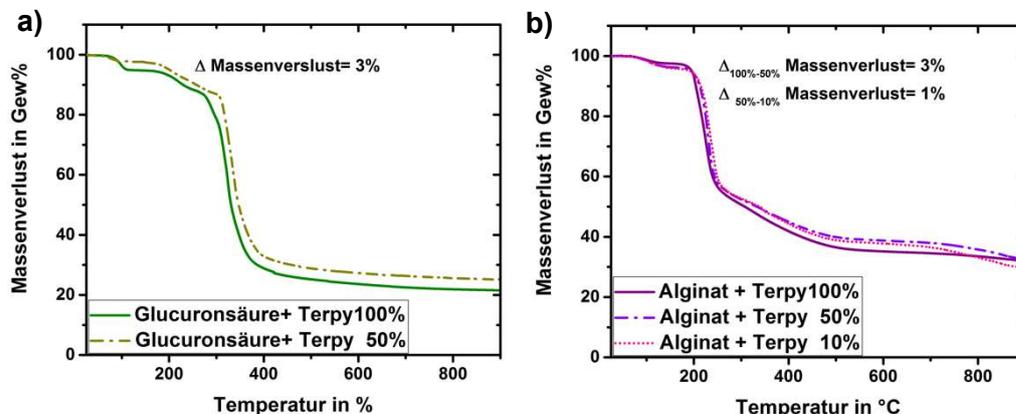


Abbildung 68: Thermogravimetrische Messungen von a) unfunktionalisierte Glucuronsäure im Vergleich zu 100% funktionalisierter Glucuronsäure und b) Vergleich von 100% und 50% Terpyridin funktionalisierter Glucuronsäure.

Die Quantifizierung der Terpyridin-Einheiten erfolgte auch im Fall von Glucuronsäure mittels thermogravimetrischer Messungen. Die erste Massenverluststufe ist im Falle des Monomers zu höheren und nicht wie im Alginate zu tieferen Temperaturen verschoben. Eine zusätzliche Massenverluststufe ist zwischen 200 und 300°C zu erkennen. Amide sind bekannt dafür, in diesem Temperaturbereich zu zerfallen (210). Um die Intermediate identifizieren zu können, wurde während der TG-Messung ein Massenspektrum aufgenommen. Dieses zeigt primär

stickstoffhaltige Bruchstücke, was die These bestätigt, dass die zusätzliche Massenverluststufe der funktionalisierten Glucuronsäure auf den Grad der Funktionalisierung schließen lässt. Bei einer theoretischen -COOH Belegung durch Terpyridin zeigt das TG eine Funktionalisierung von 9 Massen% im Fall von 100%funktionalisierter Glucuronsäure. Unter Berücksichtigung der eingewogenen Probenmasse erhält man eine Funktionalität von 35Mol%, somit 65Mol% weniger als die eingesetzte Menge von 100Mol%. Für 50%funktionalisierte Glucuronsäure kommt man auf einen Massenverlust durch die Funktionalität von 5Masse%. Bezogen auf die für die Thermogravimetrie Messung eingewogene Masse und die molare Masse der Glucuronsäure kommt man auf einen Wert von 5Mol% anstelle des theoretisch berechneten Werts von 50Mol%. Somit liegt die tatsächliche Funktionalität 90% unterhalb der berechneten bzw. der eingesetzten Menge an NH₂-DEG-Terpy.

Das Gelierverhalten von unfunktionalisiertem Alginat wurde zunächst in Abhängigkeit verschiedener Metallionen untersucht. Es wurden 1%ige bzw. 2%ige Alginatlösungen vorgelegt und mit biogenen Metallionen (Beschreibung bzw. Übersicht siehe Einleitung), beispielsweise Sr(II)-, Ba(II)- und Mn(II)-Ionen versetzt. Des Weiteren wurde Fe(II)-/Ca(II)-Gemische zur Gelierung getestet, da zum einen Ca(II)-Ionen zum Netzwerkbilden gebraucht wird und zum anderen Fe(II)-Ionen um die Terpyridin-Einheiten im modifizierten Alginat zu koordinieren. Wie in der Literatur schon beschrieben, gelieren Alginathydrogele bei Fe(II)-Ionen Zugabe nur sehr langsam, denn die Alginate bilden nur mit Fe(III)-Ionen feste Hydrogele aus. Somit ist die Gelbildung von der Oxidation von Fe(II)- zu Fe(III)-Ionen in Lösung abhängig. Als Referenzsystem wurden zunächst die jeweiligen Metallsalzlösungen an 1% bzw. 2% Alginatlösung getestet. Wie oben beschrieben gelierten die Hydrogele bei Fe(III)-Ionen Zugabe innerhalb weniger Sekunden und führten zu inhomogenen, gelben klumpigen Gelen. Dabei spielt es keine Rolle, ob Fe(III)-Ionen als Chlorid oder Nitrat zugegeben werden. Bei Verwendung von FeCl₂ oder FeSO₄ konnte eine langsamere Gelierung beobachtet werden. Im Falle von FeCl₂ wurden inhomogene Gele erhalten, was auch der teilweisen Bildung unlöslichen Eisenhydroxyds zuzuschreiben ist. Mit FeSO₄ konnten innerhalb von 10min homogene Hydrogele erhalten werden. Hier konnte während des Geliervorgangs eine Farbänderung beobachtet werden. Die zunächst farblose Lösung verfärbte sich zunehmend gelb. Dies spricht für eine Oxidation der Fe(II)- zu Fe(III)-Ionen. Da die Oxidation schrittweise verläuft und es somit nicht punktuell zu erhöhten Fe(III)-Konzentrationen kommt, werden im Gegensatz zur direkten Zugabe von Fe(III)-Lösungen homogene Gele erhalten. Die Konzentrationen der Metallsalzlösungen wurden jeweils von 300mM bis 50mM in 50er Schritten variiert. Im Fall von FeCl₂ und FeCl₃ werden

bei einer 2%igen Alginatlösung inhomogene Gele erhalten werden. Im Fall von FeCl_2 konnte erst ab einer Konzentration von 40mM ein homogenes Hydrogel erhalten werden. Mit FeSO_4 Lösungen in einem Konzentrationsbereich von 300mM bis 50mM ausgehend von einer 1%igen Alginatlösung werden homogene Gele erhalten.

Aufgrund der langen Gelierzeiten wurden Fe(II) -Salze und Ca(II) -Salze in verschiedenen Verhältnissen gemischt und zu wässrigen Alginat Lösungen gegeben. Die zugegebenen Ca(II) -Ionen sollen das Netzwerk aufbauen und die Fe(II) -Ionen ebenfalls unterstützend zur Vernetzung beitragen, als auch später im Hinblick auf die Funktionalisierung die Terpyridin-Einheiten koordinieren. Das beste Ergebnis konnte für ein Fe(II) - zu Ca(II) -Verhältnis von 2:3 erreicht werden (beides 300mM). Es wurden zudem weitere biogene Metallionen getestet. Strontium in der Oxidationsstufe +2 ergab beispielsweise als Acetatlösung mit 2%iger und 1%iger Alginatlösung homogene Gele. Im Gegensatz dazu steht SrCl_2 , das inhomogene, klumpige Gele ergibt. Auch die Ba(II) -Ionen induzierte Gelierung ergab vielversprechende homogene und farblose Gele. Da Ca(II) -Salze stabilere Gele bilden, Ba(II) - und Sr(II) -Salze jedoch in Bezug auf Osseointegration vielversprechende Ergebnisse geliefert haben, wurden auch Mischungen von Ba(II)/Ca(II) - und Sr(II)/Ca(II) -Salzlösungen auf ihre Gelbildung getestet. Die Zugabe von Mn(II) -Ionen ergab keine Hydrogele, die Alginatlösung verblieb hier in ihrem flüssigen Ausgangszustand. Die besten Ergebnisse erzielte ein M(II) - zu Ca(II) -Mischverhältnis von 1:1 ($\text{M}=\text{Ba(II)}$ und Sr(II)). Nach der Funktionalisierung resultierte ein geändertes Gelierverhalten. Mit reiner Eisensulfat Fe(II)SO_4 Lösung konnten bei keiner Funktionalisierung Gele erhalten werden, weshalb dazu übergegangen wurde, Ca(II) - mit Fe(II) -Lösungen in verschiedenen Verhältnissen zu mischen und diese zuzugeben. Die Mischung von 10% funktionalisierter 1%iger Alginatlösung mit 1:1 Ca(II)/Fe(II) -Ionen ergab die homogensten und stabilsten Gele. Für eine 50%ige Funktionalisierung war dies bei einem Verhältnis von 3:2 und bei einer 100%igen Funktionalisierung bei 3,5:1,5 der Fall. Durch das unterschiedliche Gelierverhalten wird vermutet, dass sich die Struktur und somit die Vernetzungseigenschaften der funktionalisierten Gele stark unterscheiden. Um dieser Frage nachzugehen wurden die besagten Gele via FTIR-Messungen untersucht. Auffällig ist die Verschiebung der asymmetrischen COO^- Streckschwingung bei zunehmender Terpyridin-Funktionalisierung. Im Fall von 10% Terpy 3 cm^{-1} , bei 50% 4 cm^{-1} und für 100% Terpyridin-Funktionalisierung 6 cm^{-1} . Somit hat die Funktionalität vor allem auf die asymmetrische Streckschwingung der freien Carboxylatgruppen einen Einfluss.

Anschließend wurden das Auflösungsverhalten und somit die Festigkeit der Gele getestet. Es ist bekannt, dass sich das Alginatnetzwerk durch Citrat Zugabe wieder auflöst. Auch in dieser

Arbeit wird 300mM Citratlösung zu den einzelnen Gelen hinzugegeben und das Auflösungsverhalten protokolliert. Die Fe/Ca Gele lösten sich vergleichbar zum reinen Ca(II)-Hydrogel auf. Bei den Gelen die mit Sr(II)- bzw. Ba(II)-Salzen versetzt wurden war eine unvollständige Auflösung nach der Zugabe der Referenzmenge an Citratlösung zu beobachten. Hierbei musste die doppelte bis dreifache Menge an Citratlösung zugegeben werden, bis sich das Netzwerk auflöste. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Sr(II)- und Ba(II)-Ionen das Netzwerk stabilisieren, was schlussendlich zu festeren Gelen führt.

Um das Gelierverhalten der funktionalisierten Alginat zu untersuchen zu können, wurden drei unterschiedliche Verhältnisse von eingesetztem Ligand zu COOH Gruppen eingesetzt. Hergestellt und getestet wurden 100%, 50% und 10% theoretische COOH Funktionalisierung. Für die Betrachtung des Gelierverhaltens wurden die gleichen Metallsalzlösungen wie für die unfunktionalisierten Alginat verwendet. Um die Alginat und Terpyridine koordinativ abzusättigen, wurden zunächst die Ca(II)/Fe(II)-Gemische untersucht. Da Fe(II)-Ionen nur schwach mit der Carboxylat, dafür stark mit Terpyridin Einheit wechselwirkt, wurden auch hier verschiedene Verhältnisse auf ihr Gelbildung hin überprüft. Es wurden auch reine Ca(II)- und Fe(II)-Gele getestet. Im Fall von Fe(II)-Ionen wurde keine Gelierung bei einer Funktionalisierung von 10% erhalten. Zum einen wirken vor allem Fe(III)-Ionen vernetzende auf das Alginat, zum anderen reicht die geringe Funktionalität nicht aus, um die Polymerketten über die Terpyridin-Einheiten zu verknüpfen. Bei einem Ca(II)/Fe(II)-Mischverhältnis von 1:1 kommt es zu einer homogenen Gelierung. Auch bei der Zugabe von 300mM Sr(II)-Lösung, sowohl als Chlorid als auch Acetat, und für BaCl₂ wurde Gelbildung beobachtet. Auffällig sind die geringeren Gelstabilitäten. Bei der Natriumcitrat Zugabe wurde vollständige Verflüssigung von allen getesteten Proben mit der Referenzmenge beobachtet. Die Verflüssigung der reinen Ca(II)-Probe dauerte rund 40s bis zur Auflösung. Für die anderen Proben liegt der Wert deutlich darunter, was die vermuten lässt, dass diese eine labilere Netzstruktur als das Referenzsystem mit Ca(II)-Ionen ausbilden. Mit zunehmender Funktionalisierung kommt es zu immer unvollständigerer Gelierung und es bleibt wässrige Alginatlösung zurück.

Um die Bildung des Hydrogels noch genauer bestimmen zu können wurden zusätzlich rheologische Untersuchungen durchgeführt. Es wurde mithilfe des zeitabhängigen Oszillationsmodus mit einem Platte/Platte System das Speichermodul G' (Maß für die Elastizität eines Systems) und der Verlustfaktor G'' (Maß für die Viskosität eines Systems) bestimmt. In der wässrigen Alginatlösung ist G'' kleiner als G' , denn es handelt sich um eine hochviskose Flüssigkeit. Bei Beginn der Gelierung (Vernetzung des Systems) steigt G' zunehmend an, bis $G' =$

G'' ist, an diesem Punkt geht die Flüssigkeit in ein vernetztes Gel (Gelpunkt). Wird nun G'' ins Verhältnis zu G' gesetzt erhält man den Verlustfaktor $\tan \delta$ (siehe).

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Beim Übergang vom Sol zum Gel (=Gelpunkt) gilt zusätzlich $\tan \delta=1$. Ist der Verlustfaktor > 1 verhält sich die Probe eher einer ideal viskosen Flüssigkeit mit Newton'schem Fließverhalten. Bei einem Verlustfaktor von <1 nähert sich das Verhalten der Probe einem ideal elastischen Festkörper an. Es gibt somit zwei Darstellungsverfahren die den Gelpunkt veranschaulichen, zum einen den Schnittpunkt des Verlust- mit dem Speichermodul und zum anderen die Auftragung des Verlustfaktors (211).

Aufgrund der schnellen Gelbildung der Alginat konnten nur ausgewählte Proben analysiert werden bzw. via rheologischer Messung bewiesen werden, dass Mn(II) doch Alginat-Gele ausbilden kann. Aufgrund der Messanordnung war es nicht möglich, alle Gelpunkte graphisch darzustellen, denn nach der Zugabe der Metallsalzlösung zur Alginatlösung auf der Platte benötigt das Herunterfahren des 2. Stempels ca. 20s. Viele Alginatgele gelieren schon früher, was eine rheologische Untersuchung unmöglich macht, da das Speichermodul bereits höher als das Verlustmodul ist. Die Deformationsamplitude wurde auf $\gamma=0,1$ und die Frequenz auf $\omega=1\text{Hz}$ gesetzt. Im Referenzsystem (= unfunktionalisiertes Alginat + Ca(II)-Lösung) konnte gezeigt werden, dass visuell die Probe bereits fest ist, sich aber noch nicht vollständig geliert ist. Erst nach 3,4 min schneiden sich die Kurven des Verlustmoduls mit der des Speichermoduls.

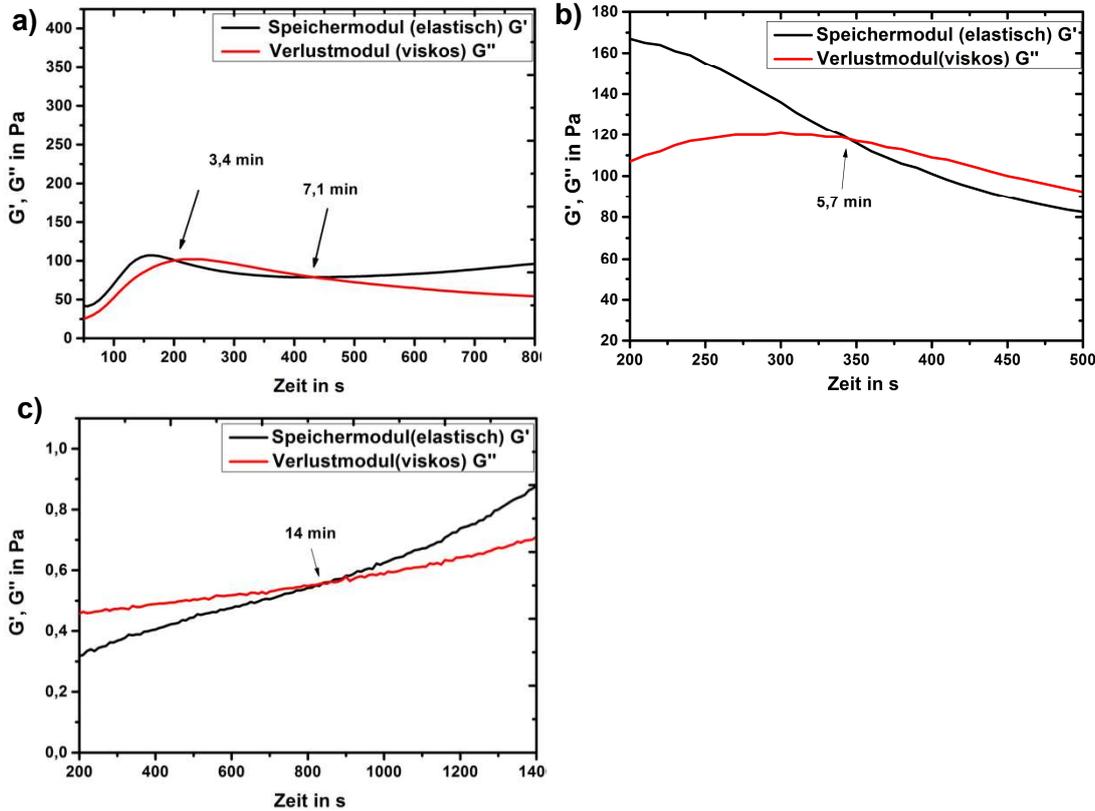


Abbildung 69: Rheologie Daten von a) 1%iger Alginate Lösung mit CaCl_2 Lösung b) 1%iger Alginate Lösung mit $\text{CaCl}_2/\text{BaCl}_2$ Lösung im Verhältnis 3:2 c) 1%iger Alginate Lösung (50% theoretische Funktionalität) mit $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ Lösung.

Auffällig ist zudem, dass nach 7,1 min das Verlustmodul wieder absinkt und erneut die Kurve des Speichermoduls schneidet. Es verliert somit seine ideal-elastischen Eigenschaften wieder und nähert sich erneut einer ideal viskosen Flüssigkeit an. Auch bei $\text{Ca}(\text{II})/\text{Ba}(\text{II})$ -Gelen ist eine Annäherung der beiden Geraden zu beobachten. Abbildung 69 zeigt zudem eine Gelbildung des 50% funktionalisierten Alginats mit Manganacetat Lösung, dies ist mit unfunktionalisiertem Alginate nicht gelungen. Es ist bekannt, dass Terpyridine ebenfalls fähig sind $\text{Mn}(\text{II})$ -Ionen zu koordinieren.

4.1.2 Zelltests

Um die Toleranz der eingebundenen Terpyridin-Einheiten auf zelluläre Systeme zu testen, wurde ein sogenannter Elutionstest mit hMSCs durchgeführt. Hierbei wird das Hydrogel 24h in Zellkulturmedium inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Ergebnisse sind

in Abbildung 70 dargestellt. Hierbei wurde als Referenz das literaturbekannte Standard-Hydrogel aus Alginat und CaCl_2 verwendet. Um nun eine Funktionalität ins System einzubringen, wurde zum einen für das Standard Hydrogel die Netzwerkbildende Ca(II) -Lösung zusätzlich mit zellaktiven Fe(II) -Ionen versetzt und zum anderen die hergestellten Terpyridin-funktionalisierten Alginat verwendet. Hierbei wird die schon in Kapitel 4.1 beschriebene aktivierende Eigenschaft von Fe(II) -Ionen deutlich. Die Mitochondrienaktivitäten der Zellen, welche mit dem Eluat der Alginat, die mit der Fe(II) - / Ca(II) -Lösung geliert wurden, versetzt wurden sind an allen 3 Messtagen über 160%.

Die Terpyridin-funktionalisierten Proben zeigen vor allem bis Tag 3 eine stimulierende Wirkung auf die Stoffwechselaktivität der Stammzellen. Ab Tag 5 fallen die Werte auf 75-82% und kommen demnach an die Zytotoxizitätsgrenze der ersten Stufe (mäßig zytotoxisch).

Somit zeigen die funktionalisierten Alginat primär bis Tag 3 stimulierende Eigenschaften auf primäre, humane mesenchymale Stammzellen. Dieser Effekt geht zwischen den Tagen 3 und 5 verloren. Bei den unfunktionalisierten Proben kommt es noch an Tag 10 zu einer um 100% gesteigerten Mitochondrienaktivität.

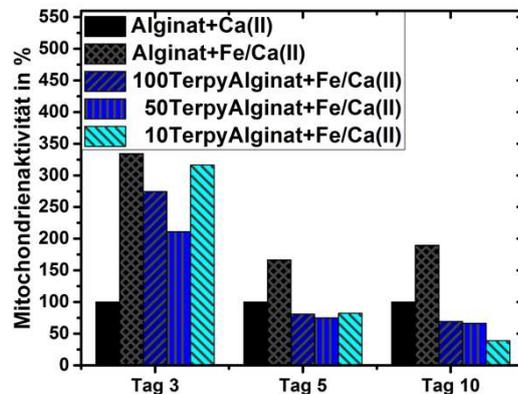


Abbildung 70. Übersicht der aus dem WST-1 erhaltenen Mitochondrienaktivitäten der funktionalisierten Alginat für hMSCs. Als Referenz dient das Standard-Hydrogel aus unfunktionalisiertem Alginat und 300mM CaCl_2 zur Netzwerkbildung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Glucuronsäure und Alginat via Carbodiimid Chemie mit NH_2DEG -Terpy funktionalisiert werden konnten. Durch die Hydrolyseempfindlichkeit der zugesetzten Reagenzien konnte eine Funktionalisierung von 10% erreicht werden. Zudem konnten Hydrogele mit verschiedenen Metallionensalzen und Mischungen hergestellt und charakterisiert werden. Hierbei zeigte sich ein Ca(II) : Fe(II) -Verhältnis von 2:1 zum einen

gut für die Netzwerkbildung und zum anderen aktivierend auf die Stoffwechselaktivität der hMSCs. Zudem kommt es bei Funktionalisierung des Alginats zu einer Erhöhung der Mitochondrienaktivität von bis zu 250% an Tag 3, die bis zu Tag 10 wieder abnimmt. In Kapitel 4.1.2.2 konnte bereits gezeigt werden, dass zur Initiierung der myogenen Differenzierung von C2C12 ein Stimulus von drei Tagen nötig ist.

Die rheologischen Untersuchungen zeigten, dass mit Ca(II) -Ionen gelierte Hydrogele zwei Schnittpunkte der Kurven des Speicher- und Verlustmoduls aufweisen. Somit gelieren die Gele zwar, nähern sich jedoch wieder einer ideal viskosen Flüssigkeit an. Für die funktionalisierten Gele gilt dies nicht. Auch bei Ca(II)/Ba(II) -Gelen ist eine Annäherung der beiden Geraden zu beobachten. Bei den funktionalisierten Alginaten ist auffällig, dass bei steigender Funktionalität der Ca(II) -Gehalt bei den Ca(II)/Fe(II) -Mischungen erhöht werden muss, um ein homogenes und stabiles Hydrogel zu generieren. Die Terpyridin-Funktionalität hindert somit die Bildung des Eierschachtelmodells des Alginats und deshalb wird mehr Netzwerkbildner in Form von Ca(II) -Ionen benötigt. Zudem ist es möglich, die hergestellten Hydrogele wieder mit Citratlösung in viskose Flüssigkeiten aufzulösen. Somit ist die Reversibilität für die Zellentnahme auch nach der Funktionalisierung gewährleistet.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von Metallkomplexverbindungen auf der Basis von monotonen und ditopen Terpyridin-Liganden auf Zellen behandelt. Es können mehrere Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie MEPE als kontrollierte Freisetzungssysteme für Zellanwendungen eingesetzt werden können. Es werden 2D-Beschichtungen, 3D-Knochenzemente und Terpyridin funktionalisierte Alginate hergestellt. Es ist möglich, definierte, homogene Fe-MEPE Schichten auf Borosilikatglas mithilfe der Layer by Layer Technik und mittels Tauschbeschichtung abzuscheiden. Um die Oberfläche und somit die Freisetzung von Metallionen zu erhöhen, werden zusätzlich poröse SiO_2 -Schichten hergestellt, welche mit Fe-MEPE infiltriert werden. Um die Anwendbarkeit von Metallkomplexverbindungen auf der Basis von monotonen und ditopen Terpyridin-Liganden als Knochenersatzmaterial zu testen werden Hydroxylapatit Knochenzemente synthetisiert. Ziel ist eine retardierende Freisetzung der Metallionen ohne Burst Effekt und ohne den Verlust der Druckstabilitäten der HA Zemente. Die Funktionalisierung von Alginat mit 1-Amino-5-(2,2':6',2''-terpyrid-4'-yl-oxy)pentan resultiert in Hydrogelen, welche ein anderes Gelierverhalten als das unfunktionalisierte Alginat zeigen. Zudem ist es möglich mit Fe(II)- /Ca(II)-Salzmischungen Hydrogele auszubilden. Die funktionalisierten Alginate sind zudem bioaktiv.

Zum grundlegenden Verständnis der MEPE Zell Wechselwirkung werden zunächst Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels WST-1 Test von L929 und C2C12-Zellen mit wässrigen M(II)MEPE Lösungen (Metallionen M= Fe(II), Co(II), Ni(II), Zn(II)) in einem Konzentrationsbereich von $1,56 \times 10^{-11}$ bis $1,6 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} durchgeführt. Fe-MEPE zeigt im betrachteten Konzentrationsbereich keine zytotoxischen Eigenschaften auf die eingesetzte Fibroblastenzelllinie. Bei Konzentrationen über 1×10^{-6} mol L^{-1} Fe-MEPE sinkt die Mitochondrienaktivität der C2C12-Zellen auf 40%. Dagegen wirken Co- und Zn-MEPE ab einer Konzentration von 1×10^{-7} mol L^{-1} stark zytotoxisch auf L929 und C2C12-Zellen.

Um selektiv die Differenzierung von C2C12, MG63, humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) und humanen Endothelzellen anzuregen, werden die Zellen auf den hergestellten 2D Beschichtungen ausgesät. Es kann gezeigt werden, dass Fe-MEPE die Proliferation zugunsten der Stoffwechselaktivität von C2C12, MG63-Zellen und hMSCs hemmt. Bei weiterer Betrachtung der spezifischen myogenen Differenzierungsmarker der C2C12-Zellen bzw. der spezifischen Gene der osteogenen Differenzierung (Osteocalcin und ALP) mithilfe qRT-PCR können erhebliche Stimulierungen auf der mRNA Basis detektiert werden. Auch auf

enzymatischer Ebene zeigen Fe-MEPE modifizierte Oberflächen einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase der MG63 Zelllinie und humaner mesenchymaler Stammzellen.

Somit kann eine Stimulierung der myogenen Differenzierung von C2C12-Zellen, sowie osteogenen Differenzierung von MG63-Zellen und hMSCs mittels Fe-MEPE beschichteten Oberflächen innerhalb von drei Tagen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Fe-MEPE funktionalisierte Oberflächen als innovative Scaffolds für die Behandlung von Knochendefekten eingesetzt werden können.

6 Summary

In this thesis the influence of metal complexes based on monotopic and ditopic terpyridine ligands on cells is discussed. There are several ways MEPE can be used as a controlled release system for cell applications. 2D planar and porous coatings, 3D bone cements and terpyridine functionalised alginates are produced. It is possible to deposit defined, homogeneous Fe-MEPE layers on borosilicate glass using the layer by layer technique and by dip coating. In order to increase the surface and thus the release of metal ions, porous SiO₂ layers are additionally produced, which are infiltrated with Fe-MEPE. To test the applicability of monosubstituted and ditopic terpyridine ligand metal complexes as bone substitutes, hydroxyapatite bone cements are synthesized. The intent is to release the metal ions without a burst effect and without losing the pressure stability of the HA cements.

The functionalization of alginate with 1-amino-5-(2,2'-6',2'-terpyrid-4'-yl-oxy) pentane results in hydrogels which exhibit a different gelling behavior than the unfunctionalised alginate. It is possible to form hydrogels with aqueous Fe (II) / Ca (II) salt mixtures. The functionalized alginates are bioactive.

To gain a basic understanding of the MEPE cell interaction, cytotoxicity studies are first performed by WST-1 assay of L929 and C2C12 cells with aqueous M (II) MEPE solutions (metal ions M = Fe (II), Co (II), Ni (II), Zn (II)) in a concentration range of 1.56×10^{-11} to 1.6×10^{-5} mole L⁻¹. In the concentration range Fe-MEPE shows no cytotoxic properties on the fibroblast cell line. At concentrations above 1×10^{-6} mol L⁻¹ Fe-MEPE the mitochondrial activity of C2C12 cells decreases to 40%. In contrast, Co and Zn MEPEs have a strong cytotoxic effect on L929 and C2C12 cells at a concentration of 1×10^{-7} mol L⁻¹. C2C12, MG63, human mesenchymal stem cells (hMSCs) and human endothelial cells are seeded on the prepared Fe-MEPE 2D coatings to selectively stimulate the differentiation. It can be shown that Fe-MEPE inhibits the proliferation in favor of the metabolic activity of C2C12, MG63 cells and hMSCs. Further consideration of the specific myogenic differentiation markers of the C2C12 cells or the specific genes of osteogenic differentiation (osteocalcin and ALP) by means of qRT-PCR, significant mRNA-based stimuli can be detected. Likewise on the enzymatic level, the Fe-MEPE modified surfaces have a stimulating effect on the alkaline phosphatase activity of the MG63 cell line and human mesenchymal stem cells. During 3 days Fe-MEPE stimulates myogenic differentiation of C2C12 cells as well as osteogenic differentiation of MG63 cells and hMSCs. Thus, the results indicate that Fe-MEPE functionalized surfaces may serve as innovative scaffold for the treatment of bone defects.

7 Experimentelles

7.1 Ligandensynthese

Die Synthese des 1,4-Bis(2,2':6,2''-terpyridin-4'-yl)benzol-Liganden erfolgte nach literaturbekanntem Anleitungsprotokoll (212), 4'-Phenyl-2,2':6,2''-Terpyridin-Ligand wurde nach Winter et al. (213) hergestellt.

Der TriTerpy Ligand wurde nach Sievers et al. (131) hergestellt.

7.2 Synthese PhTerpy-Komplexe/Fe-MEPE

Bei der Fe(II)-PhTerpy-Komplexsynthese wurde zunächst das Lösemittel (100% Essigsäure) entgast. Zu 150mL der entgasten Essigsäure wurde anschließend 8,06mmol Eisenpulver hinzugegeben und unter Schutzatmosphäre 2-3h unter Rückfluss erhitzt. Das so entstandene Fe(II)-Acetat wurde mit 16,16mmol des PhTerpy-Liganden in 200mL 75%iger Essigsäure zugegeben und 30min bei RT gerührt. Nach der Lyophilisation des Feststoffes wurde dieser wiederum in 500mL VE Wasser aufgenommen und erneut gefriergetrocknet. Die Ni(II)-, Co(II)- und Zn(II)-Acetate wurden von Fluka in einer Reinheit von 99% erworben. Für die MEPE Synthese wurden M(II)-Acetat Lösung (7,1mmol in 160mL) im molaren Verhältnis von 1:1 mit der Ligandenlösung (7,1mmol in 700mL) vermischt, 30min bei RT gerührt, lyophilisiert, wieder mit Wasser aufgenommen und wiederum gefriergetrocknet.

7.3 Schichtpräparation

Für alle Beschichtungen wurden runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 18mm und einer Stärke von 0,13-0,16 (nach DIN ISO 8255) der Firma Hartenstein aus Borosilikat verwendet. Alle Beschichtungen wurden bei Raumtemperatur mit einer Luftfeuchtigkeit von 25±5% durchgeführt.

7.3.1 Layer by Layer-Schichten

Die zu beschichtenden Glassubstrate wurden zunächst mit Wasser und Ethanol gereinigt und anschließend via Druckluft getrocknet. Die Deckgläschen wurden 2 min in die PEI Lösung (10mM Lösung) getaucht, mit Wasser gespült und in die PSS-Lösung (1mM Lösung) getaucht. Anschließend wurde das Glassubstrat mit Wasser gespült, in Fe-MEPE (2,1mM Lösung) Lösung getaucht, wieder abgespült und schlussendlich via Druckluft getrocknet.

7.3.2 Tauchbeschichtungen

Die zu beschichtenden Glassubstrate wurden zunächst mit Wasser und Ethanol gereinigt und anschließend via Druckluft getrocknet. Anschließend wurden die Substrate mithilfe einer Tauchbeschichtungsanlage in die Tauchbeschichtungslösung (8,8 mM in reinst Ethanol) getaucht, 60s gewartet und anschließend bei definierter Ziehgeschwindigkeit herausgezogen.

7.3.3 Poröse SiO₂-Schichten

In dieser Arbeit wurden SiO₂ Modifizierte Oberflächen zusätzlich mit MEPE bzw. dem korrespondierenden ML₂ Komplex mit L= 4'-Phenyl-(2,2':6',2''-Terpyridin) funktionalisiert.

Die Ausgangslösung ist eine Levasil® 300/30% Lösung dar, welche auf 4% Feststoffgehalt reduziert wurde.

Bei der Levasil® 300/30% Lösung handelt es sich um eine wässrige kolloiddisperse Lösung aus amorpher Kieselsäure. Die Lösung enthält Partikel im Nanometer Bereich. Im Fall der Levasil® 300/30% Lösung sind SiO₂ Partikel in der Größenordnung von d= 9 nm enthalten. Die homogene, niederviskose Beschichtungslösung wird über geringe Mengen Alkali in einem pH-Bereich von pH= 8-11 stabilisiert. Durch den schwach alkalischen pH-Wert werden negative Ladungen auf den SiO₂ Partikeln generiert und es wird eine nicht entmischende kolloiddisperse Lösung erhalten, ohne zusätzliche oberflächenaktive Stoffe zusetzen zu müssen. Hierbei übersteigt der Na₂O Gehalt 0,35% nicht. Die Lösung besitzt eine Dichte von 1,21g/ml. Die Deklaration von Levasil ® Lösungen lautet wie folgt: die erste Zahl beschreibt die spezifische Oberfläche in m²/g. Die zweite Kennzahl bezieht sich auf die Konzentration des Kolloids als Glührückstand. Im Falle einer Levasil® 300/30% Lösung handelt es sich somit um eine

Lösung welche Partikel mit einer spezifischen Oberfläche der Teilchen von $300\text{m}^2\text{g}^{-1}$ beinhaltet, deren Kolloidkonzentration bei 30% liegt (214).

Für die Herstellung der porösen SiO_2 -Schichten wurde eine Levasil300/30% Lösung verwendet. Unter Levasil versteht man ein anionisches Sol, in diesem Fall mit 30% Aktivgehalt, einer spezifischen Oberfläche von $300\text{m}^2/\text{g}$ und einer Teilchengröße von 9nm. Der pH-Wert dieser Beschichtungslösung liegt bei 20,2 (bei 20°C).

Vorbereitet wurden die Glassubstrate wie folgt: Zunächst wurden die Substrate mit Wasser, Ethanol (reinst) und zuletzt mit Aceton gespült. Anschließend wurden die Substrate via Druckluft getrocknet. Die Beschichtung erfolgte wiederum via Tauchbeschichtung mit einer Ziehgeschwindigkeit von $100\text{mm}/\text{min}$ (s.o.). Nach der Beschichtung wurden die SiO_2 -Schichten zunächst einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend im Muffelofen bei 700°C für 10s ausgehärtet.

Für die Funktionalisierung wurden die hergestellten Schichten in 1,25 bzw. 2,5mM MEPE bzw. M(II)-Komplexlösung für 24h inkubiert, anschließend so lange mit VE Wasser gewaschen bis das Waschwasser farblos war und bei RT getrocknet.

7.4 Schichtcharakterisierung

Die Messung der Kontaktwinkel und somit der Hydrophilie der Oberflächen erfolgte mittels ACA 50 Automatic Angle System von DataPhysics Instruments GmbH.

Hierbei wurde ein Tropfen ($2\mu\text{L}$) VE-Wasser auf die modifizierten Oberflächen gegeben und mit der dazugehörigen Software ausgewertet.

Die UV/VIS-Messungen erfolgten mittels Verwendung eines Cary 50 Spectral Photometers.

Die Rauigkeit und Oberflächenbeschaffenheit wurde mit einem Innova AFM SPC-101027-05 (SPM) Rasterkraft-Mikroskops durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels WSxM Software.

Die Schichtdicke, die Porosität und der Porenradius wurden mittels Ellipsometrie an einem Ellipsometer der Firma SOPRA (GES-5E EP-A) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der WinElli2 Software.

Der Fe(II)-Gehalt der Schichten wurde wie folgt bestimmt. Zunächst wurden die Schichten ein bis vier Tage in PBS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das PBS abpipettiert und

getrocknet. Der Rückstand wurde wiederum in 100 μ L VE-Wasser aufgenommen und via Ferrozintest bestimmt (siehe 7.5.6).

Die REM Aufnahmen wurden mit einem Supra 25 Rasterelektronenmikroskop von Zeiss bei 3 kV aufgenommen und zuvor 6s mit Gold besputtert (50mA).

7.5 Zellanalytik

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten Zelllinien mit Bezeichnung, Zellart, Spender und ATCC Nummer.

| Bezeichnung | Zellart | Spender | ATCC Nummer |
|--------------|-----------------------------|---------|-------------|
| L929 | Fibroblasten | Maus | CCL-1 |
| C2C12 | Myoblastäre Vorläuferzellen | Maus | CRL-1772 |
| MG63 | Osteosarkoma Zellen | Mensch | CRL-1427 |

Die verwendeten Endothelzellen wurden von einem 2-Jährigen, männlichen Spender aus dem Präputium isoliert.

Die hMSCs wurden aus der TERM Biobank verwendet. Das Geschlecht und Alter des jeweiligen Spenders sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten hMSCs Spenderzellen.

| Bezeichnung | Geschlecht | Alter in Jahren |
|-------------------|------------|-----------------|
| Spender 46 | männlich | 73 |
| Spender 54 | weiblich | 61 |
| Spender 56 | weiblich | 75 |

7.5.1 Kultivierung

Für alle Versuche wurde eine Zelldichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät. Alle Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

7.5.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde zunächst das Medium abgesaugt und 500µL Accutase® (Sigma) zum Ablösen der Zellen hinzugegeben. Nach 2-5min Inkubation bei 37°C wurde via Mikroskop überprüft, ob sich die Zellen abgekugelt haben und sich von der Oberfläche gelöst hatten. Anschließend wurde die Accutase abzentrifugiert und durch eine definierte Menge an DEMEM Zellkulturmedium ausgetauscht. Es wurden 20µL Trypanblau mit 20µL Zellsuspension gemischt und 10µL der Mischung auf eine Neubauer Zählkammer gegeben und via Mikroskop gezählt.

7.5.3 WST-1 Test (nach EN ISO 10993-5)

Der WST-1 Test dient zur Bestimmung der Zellaktivität über die Succinatdehydrogenase der Mitochondrien. Die Mitochondrien sind für die Zellatmung zuständig. Die zu analysierenden Zellen werden zunächst vom Zellkulturmedium befreit. Anschließend werden 500µL Medium (gilt für 24-Well-Platte) mit 10% WST-1 Reagenz (Roche) dazugegeben. Anschließend werden die Zellen 30-60min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden je 2x200 µL der jeweiligen Lösung in eine 96-Well-Platte überführt (Doppelbestimmung). Zusätzlich zum Referenzwert wird ein Leerwert bestimmt (10% WST-Reagenz in Zellmedium). Anschließend wurde die Bildung des wasserlöslichen Formazan mithilfe eines TECAN infinite M200 ELISA Reader bei $\lambda=450\text{nm}$ durchgeführt. Als Referenzwellenlänge wurde $\lambda=620\text{nm}$ verwendet.

7.5.4 Fixierung von Zellen

Zunächst wird das überstehende Medium abgesaugt. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wird wieder dreimal mit PBS gewaschen und bei Bedarf bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

7.5.5 Acridinorange-Färbung

Die Zellen werden wie oben beschrieben fixiert und anschließend mit 13 μM Acridinorange-Färbelösung für 5 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und unter einem Fluoreszenzmikroskop im Bereich zwischen 430-500 nm angeregt. Die Zellkerne fluoreszieren bei 530 nm (gelbgrün) und bei nicht mehr intakten Zellen erkennt man eine Rotfärbung der RNA (650 nm).

7.5.6 Ferrozintest Zellen

Für die Untersuchung von intrazellulären Fe(II)-Ionen wurden die Zellen zunächst mittels Accutase geerntet, zentrifugiert und 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 50mM NaOH lysiert und für 2h geschüttelt.

Ein Aliquot von 100 μL wurde mit 100 μL 10mM HCl versetzt. Hierzu wurden 100 μL des Fe(II)-Freisetzungsreagenz zugegeben und für 2h bei 60°C erhitzt. Das Fe(II)-Freisetzungsreagenz besteht aus 1,4mM Salzsäure und 4,5% Kaliumpermanganat Lösung. Nach 2h Stunden bei 60°C wurden 30 μL Fe(II)-Nachweisreagenz zugegeben und nach 30 min Inkubationszeit 280 μL in eine 96er Well Platte überführt und bei $\lambda=550\text{nm}$ mittels TECAN infinite M200 ELISA Reader den Fe(II)-Gehalt gemessen.

Das Fe(II)-Nachweisreagenz besteht aus 6,5mM Ferrozin, 6,5mM Neocuproin, 2,5mM Ammoniumacetat und 1M Ascorbinsäure in VE Wasser (204).

7.5.7 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase

Für die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden die Zellen mit 0,2M Carbonat-Puffer gewaschen und anschließend mittels Lysispuffer (0,5% Triton X 100 Lösung in 0,2M Carbonat-Puffer) lysiert. Die Wellplatten wurden 3x bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut.

Nachdem Einfrier-/Auftauvorgang wurden die Zellen mit einer Mikroliterpipette resuspendiert und je 50µL Zellsuspension mit 50µL 0,9mM 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat Lösung (pNPP-Substratlösung) versetzt. Nach 30min Inkubationszeit wurde die Absorption bei $\lambda = 405\text{nm}$ mittels TECAN infinite M200 ELISA Reader gemessen.

7.5.8 qRT-PCR

Für die RNA Isolierung wurde mittels des RNeasy Micro Kits von Qiagen und der korrespondierenden Anleitung durchgeführt. Um die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA bestimmen zu können, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ und $\lambda = 280\text{nm}$ mittels TECAN infinite M200 ELISA Reader durchgeführt. Anschließend wurde die cDNA für die qRT-PCR synthetisiert. Hierbei wurde das cDNA-Synthese-Kit von BioRad verwendet.

Zunächst wurde die isolierte RNA auf 500ng in einem Arbeitsvolumen von 15µL verdünnt und anschließend mit dem „iScript Reaction Mix“ und „iScript reverse Transcriptase“ versetzt.

Die Proben wurden im Semcoquest labcycler (Thermocycler) mit folgendem Temperaturprotokoll behandelt:

5min 25°C

30min 42°C

5min 85°C

∞ 12°C

Unter Verwendung der Primer, vermerkt in Tabelle 17, wurden die PCR Reaktionen in einem C1000TM Thermal Cycler mit CFX96 real-time Überwachungssystem durchgeführt.

Tabelle 17: Verwendete Primer für die qRT-PCR

| Ziel Gen | sense | antisense |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Hprt | 5'-GGCAGCGTTTCTGAGCCATT-3' | 5'-TGGCCTCCCATCTCCTTCAT-3' |
| Itgb3 | 5'-CAGGACTCACAGCCAGACAC-3' | 5'-AGTGGCCGGGACAACCTCT-3' |
| MyoD | 5'-GCAGAATGGCTACGACACCG-3' | 5'-CTGCAGTCGATCTCTCAAAGCA-3' |
| MyoG | 5'-GCAATGCACTGGAGTTCGGT-3' | 5'-TAAATTCCTCGCTGGGCTGG-3' |
| Myf-6 | 5'-ATTCCAGGGGCTCGTGATA-3' | 5'-CCAAGGCGAAGGACTTTCAC-3' |
| hGAPDH | 5'-TGACGCTGGGGCTGGCATTG-3' | 5'-GCTCTTGCTGGGGCTGGTGG-3' |
| ALP | 5'-CTTGACCTCCTCGGAAGACACTC-3' | 5'-GCCTGGTAGTTGTTGTGAGCATAG-3' |
| Osteocalcin | 5'-TTGGACACAAAGGCTGCAC-3' | 5'-CTCACACTCCTCGCCCTATT-3' |

Die Effizienz der Primer betrug für Hprt, Itgb3, MyoD, MyoG, Myf-6 und ALP 100%, für hGAPDH 88% und für Osteocalcin 87%.

7.5.9 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

7.5.9.1 Vorbereitung der Zellen für Rasterelektronenmikroskopie

Zunächst wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen 2-4mal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wird die Zellkulturschale auf Eis überführt mit eiskaltem Glutardialdehyd (6% in PBS) überschichtet. Nun müssen die Zellen entwässert werden. Dazu werden die Proben 5x mit eiskaltem PBS bei 4°C gewaschen. Die Verweildauer beträgt hierbei jeweils 5min. Anschließend wird mittels Zugabe von Aceton entwässert, wobei darauf zu achten ist, dass dies in Glasbehältnissen passiert. Zunächst wird 30% Aceton (Verweildauer 15min), dann 50% Aceton (Verweildauer 20min), dann 75%Aceton (Verweildauer 30min), 90% Aceton (Verweildauer 45min) und zum Schluss 5x100%Aceton (Verweildauer jeweils 30min) zugegeben. Dies erfolgt bei Raumtemperatur. Die In Aceton gelagerten Proben werden dann in die Probenkörbchen der kritischen Punkttrockenanlage (BAL-TEC CPD 030 critical point dryer) überführt und in die mit Aceton gefüllte Probenkammer gegeben. Nach dem kritischen Punkttrocknen wurden die Proben auf REM-Proben Träger geklebt und 6s mit Gold besputtert (50mA).

7.5.9.2 Messung

Die Aufnahmen wurden mit einem Supra 25 Rasterelektronenmikroskop von Zeiss bei 3 kV aufgenommen.

7.1 Funktionalisierte Knochenzemente

7.1.1 Zementherstellung

Zur Herstellung von HA-Zementen wurden 3g α -TCP mit 1mL 2,5%iger NaH_2PO_4 -Lösung vermengt, bis eine homogene Masse erhalten wurde. Anschließend wird die Masse in eine Silikonform gestrichen, sodass Luftblasen vermieden werden und 2 Tage im Wasserbad bei 37°C belassen.

7.1.2 Herstellung von Metallionendotiertem α -TCP

Es wurden 146,26 g CaHPO_4 , 50,05 g CaCO_3 und 239,4mg Kupfersulfat bzw. 436,56mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in der Kugelmühle für 1h bei 200U/min 2Ri gemischt.

Die Pulvermischung wurde 5h bei 1400°C gesintert.

Der Sinterkuchen wurde im Mörser zerkleinert und auf eine Partikelgröße von $<355\mu\text{m}$.

Das erhaltene Pulver wurde für 2h bei 200U/min, in 2 Richtungen und mit 4Kugeln ($d=30\text{mm}$) gemahlen.

7.1.3 Charakterisierung

Die hergestellten HA Knochenzemente wurden mittels STOE Stadi P Pulverdiffraktometer mit einer Cu K α -Quelle in Transmission in einem Winkelbereich von 20-40° 2Theta in 0,2 Schritten mit einer Zeit $t=30\text{s}$ gemessen.

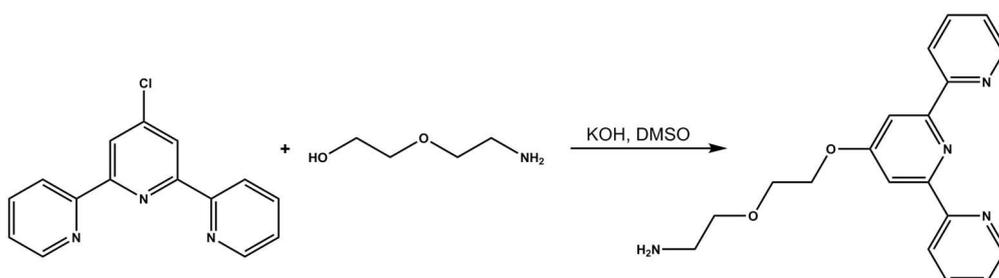
Die Proben für die pH-Wert Messungen wurden jeweils in PBS bei 37°C inkubiert und nach 0, 0,8, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 23, 27, 43, 69 und 75 h (siehe Abbildung 48) bzw. 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24h (siehe Abbildung 50) durchgeführt.

Die Rietveld Analyse wurde mittels TOPAS2 Software und Referenzmessungen von reinem HA und reinem α -TCP von 20-40° 2Theta in 0,02 Schritten mit einer Zeit $t=3\text{s}$ aufgenommen.

7.1 Alginate

7.1.1 Synthese des Terpy-DEG-NH₂-Liganden

Die Synthese des Liganden erfolgte nach Ali et al (91).



Ansatz:

1 g KOH

20 mL DMSO

0.38 mL (3.74 mmol) 2-(2-Aminoethoxy)ethanol

1 g (3.74 mmol) 4'-Chloro-2,2':6',2''-terpyridin

Durchführung:

Eine Suspension von KOH in trockenem DMSO wurde 15 min bei 60 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde 2-(2-Aminoethoxy)ethanol zugegeben und für 30 min bei 60 °C gerührt. Danach wurde 4'-Chloro-2,2':6',2''-terpyridin zugegeben, wobei sich die zunächst gelbliche Suspension nach rot verfärbte. Diese Mischung wurde 4.5 h bei 70 °C gerührt und anschließend mit 80 mL dest. Wasser und 3x10 mL Dichlormethan extrahiert. Hierbei färbten sich wässrige und organische Phase gelblich. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

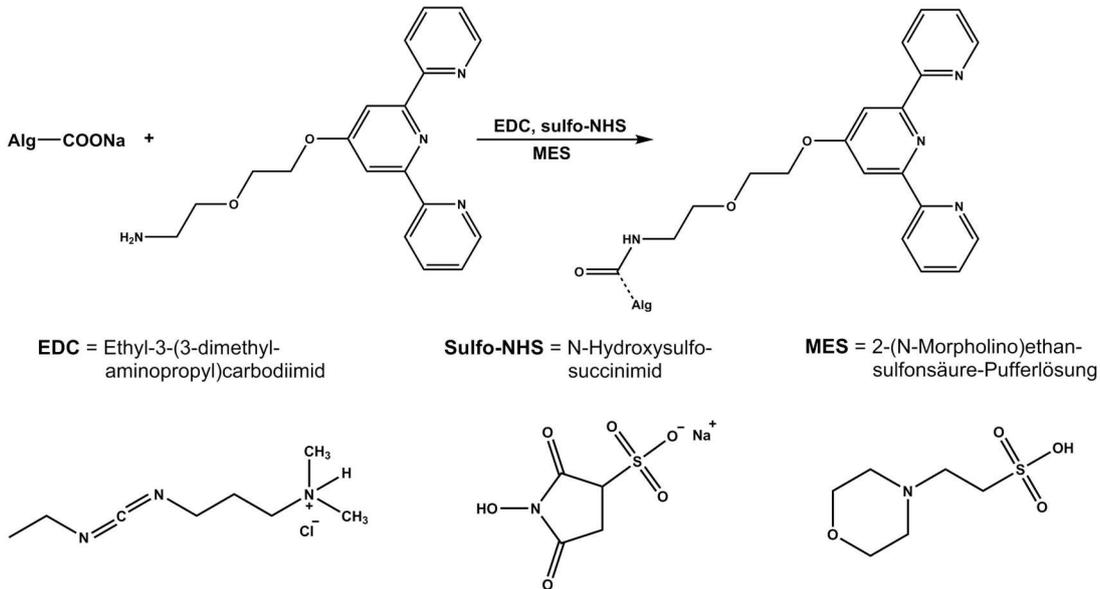
Ausbeute: 441 mg (1.31 mmol, 70 %) gelbes Öl, welches nach 4 d bei 5 °C fest wurde.

Analytik:

¹H-NMR (DMSO-D₆, 300 MHz): δ = 2.65 (t, J = 3.6 Hz, 2 H, CH₂), 3.42 (t, J = 3.3 Hz, 2 H, CH₂), 3.75 (t, J = 2.7 Hz, 2 H, CH₂), 4.31 (t, J = 2.4 Hz, 2 H, CH₂), 7.43 (ddd, J = 0.6 und 2.7 Hz, 2 H, CH), 7.93 (s, 2 H, CH), 7.93 (td, J = 1.2 und 4.8 Hz, 2 H, CH), 8.54 (dt, J = 0.6 und 4.8 Hz, 2 H, CH), 8.66 (dq, J = 0.6 und 3.0 Hz, 2 H, CH) ppm.

7.1.2 Synthese von funktionalisiertem Alginat

Die Synthese des Terpyridin funktionalisierten Alginats erfolgte nach Rowley et al. (87)



Ansatz:

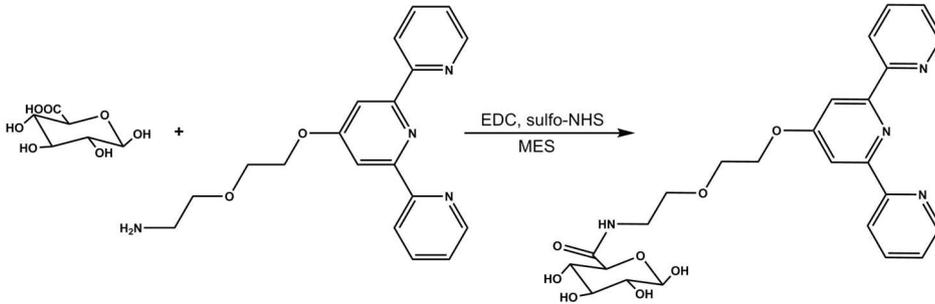
| | 1:1 | 1:0,5 | 10% |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| | 100% | 50% | |
| 0.1 M MES-Lösung | 130 mL (2,538 g) | 260 mL (5,07g) | 650mL (12,675g) |
| Natriumalginat | 1,3g (5,2µmol) | 2,6g (10,4 µmol) | 6,5g |
| EDC | 2 mg 10,4 µmol | 4 mg 20,8 µmol | 1ml |
| sulfo-NHS | 1,13 mg 5,2 µmol | 2,26 mg 10,4 µmol | 5,65 mg |
| NH₂-DEG-tpy | 1,75 mg 5,2 µmol | 1,75 mg 5,2 µmol | 1mg |

Durchführung:

In einer MES-Pufferlösung wurde das Natriumalginat gelöst (1% v/v). Anschließend wurden EDC und sulfo-NHS zugegeben (2:1). Dabei wurde die Lösung trüb und es bildeten sich Fasern. Diese Mischung wurde 1 h bei RT gerührt bevor das Terpyridin-Derivat zugegeben wurde. Die Mischung färbte sich hierbei rosa und es bildeten sich gelbliche Fasern aus. Es wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde anschließend durch Dialyse gegen Wasser aufgereinigt. Die Zellosoeschläuche wurden zur Vorbereitung 3 Mal für 5 min in Wasser mit 0.2 M NaHCO₃ und 5 mM ETDA ausgekocht und dazwischen mit dest. Wasser abgespült. Das Wasser für die Dialyse wurde nach 4, 17 und 24 h gewechselt. Die Dialyse wurde insgesamt für 5 d durchgeführt. Anschließend wurde das Produkt durch Lyophilisation getrocknet.

7.1.3 Synthese von funktionalisierter Glucuronsäure

Die Synthese der Terpyridin funktionalisierten Glucuronsäure erfolgte nach Rowley et al. (87)



Ansatz:

| | 1:1 | 1:0,5 | 10% |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| | 100% | 50% | |
| 0.1 M MES-Lösung | 130 mL (2,538 g) | 260 mL (5,07g) | 650mL (12,675g) |
| Glucuron-säure | 1 mg (5,2µmol) | 2 mg (10,4 µmol) | |
| EDC | 2 mg 10,4 µmol | 4 mg 20,8 µmol | 1ml |
| sulfo-NHS | 1,13 mg 5,2 µmol | 2,26 mg 10,4 µmol | 5,65 mg |
| NH₂-DEG-tpy | 1,75 mg 5,2 µmol | 1,75 mg 5,2 µmol | 1mg |

Durchführung:

In einer MES-Pufferlösung wurde die Glucuronsäure gelöst (1% v/v). Anschließend wurden EDC und sulfo-NHS zugegeben (2:1). Dabei würde die Lösung trüb und es bildeten sich Fasern. Diese Mischung wurde 1 h bei RT gerührt bevor das Terpyridin-Derivat zugegeben wurde. Es wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt durch Lyophilisation getrocknet.

7.1.4 Charakterisierung

Die Infrarotspektren wurden mit einem FT/IR-4100 Spektrometer der Firma Jasco mithilfe der ATR Einheit bei Raumtemperatur aufgenommen.

Die NMR Messungen erfolgten am Bruker Avance III HD 600 bei einer Anregungsfrequenz von 600MHz für die funktionalisierte Glucuronsäure. Bei der Messung des NH₂-DEG-Liganden erfolgte die Messung bei einer Anregungsfrequenz von 300MHz.

Die thermogravimetrischen Untersuchungen erfolgten an einer Thermo-Mirkowaage mit Quadrupol-Massenspektrometer von Netsch.

Die rheologischen Untersuchungen wurden mithilfe des Anton Paar Physica MR301 Rheometer durchgeführt. Die Messungen wurden im Platte/Platte System im zeitabhängigen Oszillationsmodus durchgeführt. Dabei betrug die Spaltbreite 0,5nm, die Deformationsamplitude $\gamma=0,1$ und die Frequenz $\omega=1\text{Hz}$.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------|--|
| BisPhTerpy | 1,4-Bis(2,2':6',2''-terpyridin-4'-yl)benzol |
| C2C12 | myoblastäre Vorläuferzellen |
| cDNA | komplementäre DNA |
| d | Tage |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| Dip | Tauchbeschichtung |
| DPT | 2,4-Di-2'-pyridyl-1,3,5-triazin |
| EDTA | Ethylentriamintetraessigsäure |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FCS | fetal calf serum (fetales Kälberserum) |
| FT-IR | Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer |
| G | α -L-Glucuronsäure |
| h | Stunden |
| hMSC | human mesenchymal stem cell |
| HOMO | Highest occupied molecular Orbital |
| IMP | Integrin-Mobilferin-Pathway |
| L929 | Fibroblastenzelllinie |
| LbL | Layer-by-Layer |
| LM | Lösemittel |
| LUMO | Lowest occupied molecular Orbital |
| M | β -D-Mannuronsäure |
| MEPE | Metallo-supramolekulare Polyelektrolyt |
| MLCT | Metal-to-Ligand charge transfer |
| MMCT | Metal-to-Metal charge transfer |
| mRNA | messenger RNA |
| NH ₂ -DEG-Terpy | 1-Amino-5-(2,2':6',2''-terpyrid-4'-yl-oxy)pentan |
| OAc | Acetat |
| PEI | Polyethylenimin |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |

| | |
|---------------|--|
| PBS | Phosphate Buffert Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaktion |
| pNP | 4-Nitrophenol |
| pNPP-Substrat | 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat |
| PSS | Polystyrolsulfonat |
| qRT-PCR | quantitative Real-Time PCR |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| RGD | Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin und Asparaginsäure |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| TCP | Tissue culture plastic |
| TG | Thermogravimetrie |
| TriTerpy | 1,1,1-Tris(2,2':6,2''-terpyridin-4'-yl-oxymethyl)ethan |
| Terpy | 2,2':6,2''-Terpyridin |
| UV | Ultraviolett |
| VE-Wasser | vollentsalztes Wasser |
| VIS | Visible |
| WST | water-soluble tetrazolium salt |

Anhang

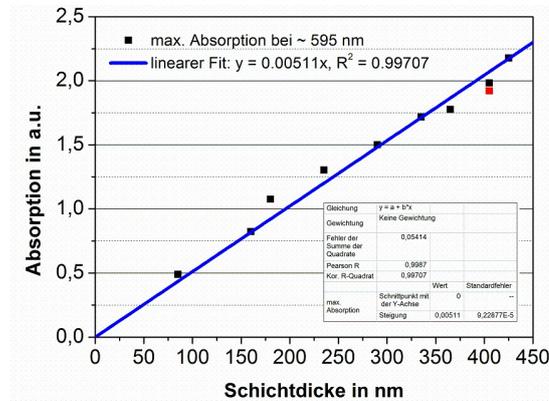


Abbildung 71: Lineare Abhängigkeit der Schichtdicke von der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda \approx 595 \text{ nm}$ (129).

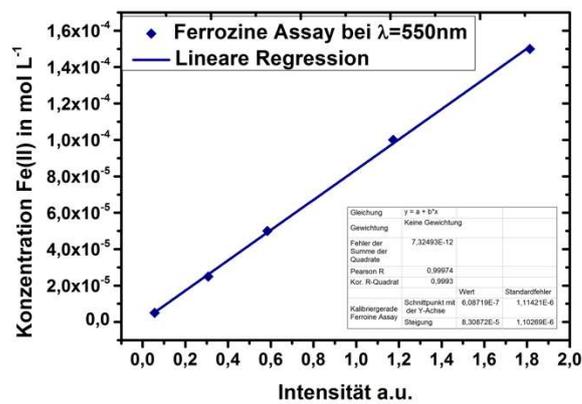


Abbildung 72: Ferrozintest Kalibrierreihe mit Fe(II)-Ionen.

Tabelle 18: Übersicht über die PBS Zusammensetzung.

| Salze | g/L |
|---|------|
| NaCl | 8,00 |
| KCl | 2,00 |
| KH ₂ PO ₄ | 2,00 |
| Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O | 1,15 |

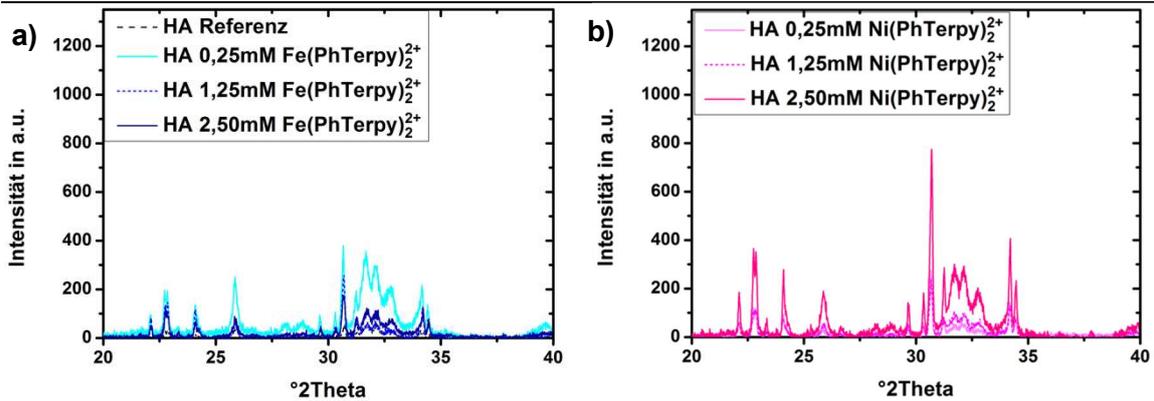


Abbildung 73: HA Bildung in Abhängigkeit der Komplexkonzentration und des Zentralmetallions.

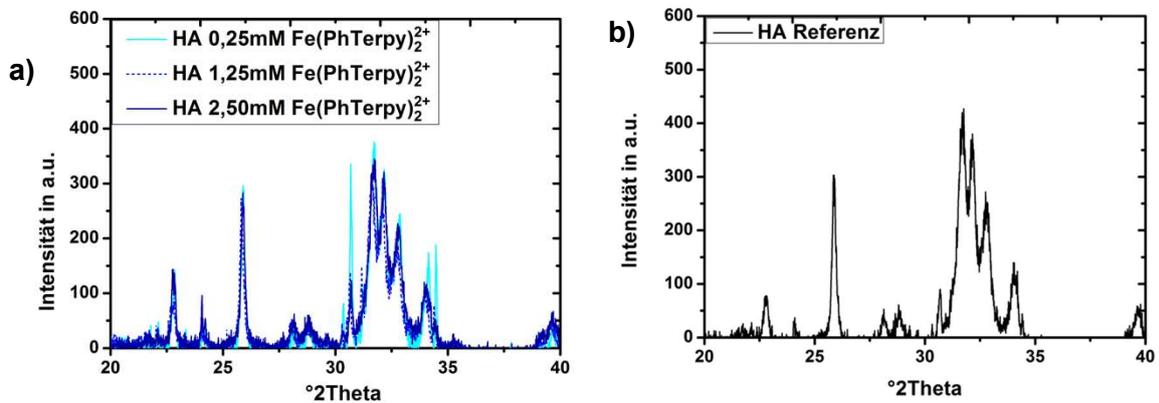


Abbildung 74: Hydroxylapatitbildung nach einem Tag zusätzlich im Wasserbad.

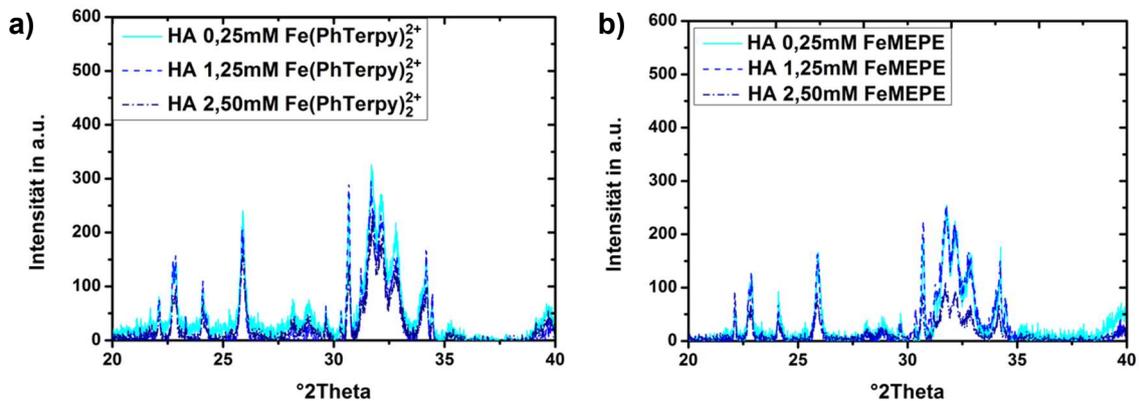


Abbildung 75: Röntgendiffraktogramme der a) Fe(PhTerpy)₂²⁺ und b) Fe-MEPE infiltrieren HA-Zemente.

Tabelle 19: Vergleich α -TCP Reflex mit HA Reflex nach der Zugabe von festem PhTerpy Ligand in Abhängigkeit der Inkubationszeit in FeSO_4 -Lösung.

| | α -TCP | HA | Kristallgröße in nm |
|---|---------------|----|------------------------|
| HA 10% PhTerpy | 40 | 60 | 25,5±0,7 |
| HA 10% PhTerpy 5min FeSO_4 | | | |
| HA 10% PhTerpy 15min FeSO_4 | 20 | 80 | 26,1±0,6 |
| HA 10% PhTerpy 30min FeSO_4 | 35 | 65 | 21,1±0,8 |
| HA 10% PhTerpy 60min FeSO_4 | 31 | 69 | 24,0±0,6 |
| HA 0,25mM $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ | 20 | 80 | 26±0,5 |
| HA 1,25mM $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ | 23 | 77 | 25,5±0,6 |
| HA 2,50mM $\text{Fe}(\text{PhTerpy})_2^{2+}$ | 25 | 75 | 26,2±0,8 |
| HA 0,25mM Fe- MEPE | 22 | 78 | 26,2±0,5 |
| HA 1,25mM Fe- MEPE | 23 | 77 | 25,5±0,6 |
| HA 2,50mM Fe- MEPE | 24 | 76 | 26,6±0,8 |

Der Fehler für die HA-Bildung beträgt 15%.

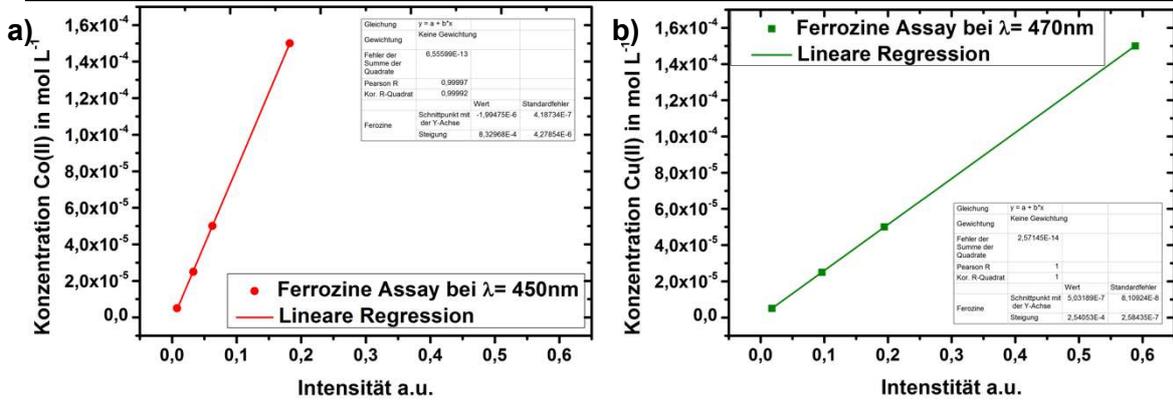


Abbildung 76: Kalibriereihen für a) Ferrozintest mit Co(II)- und b) mit Cu(II)-Ionen bei unterschiedlichen Wellenlängen.

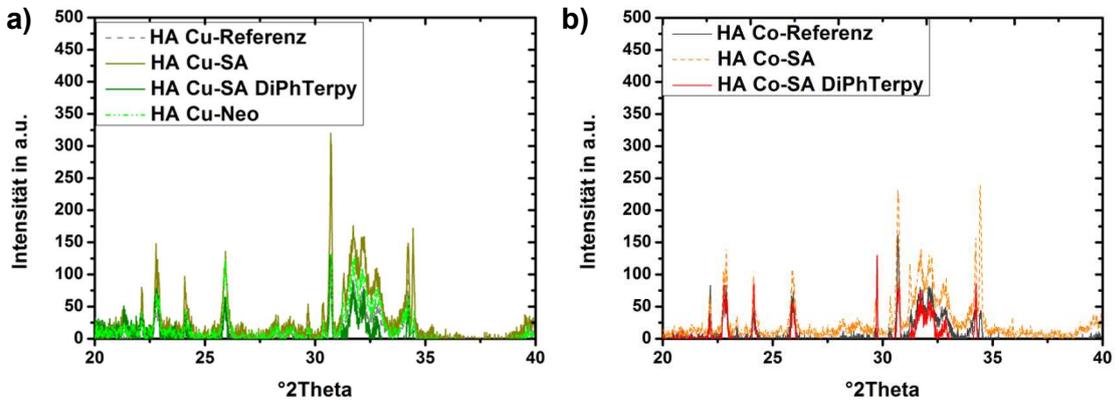


Abbildung 77: Röntgendiffraktogramme der Salicylat, Salicylat DiPhTeryp und Neocuproin Funktionalisierung.

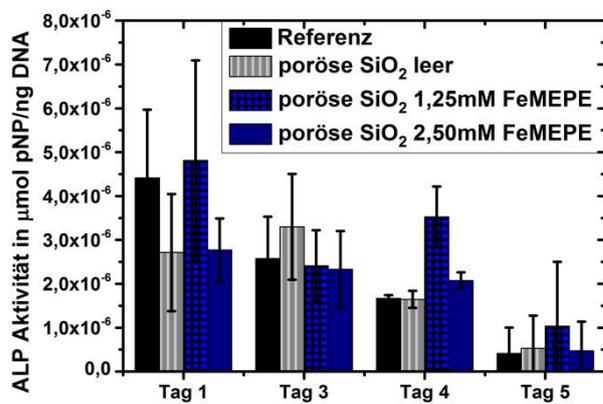


Abbildung 78: ALP-Aktivitäten der MG63-Zellen auf porösen SiO_2 -Schichten.

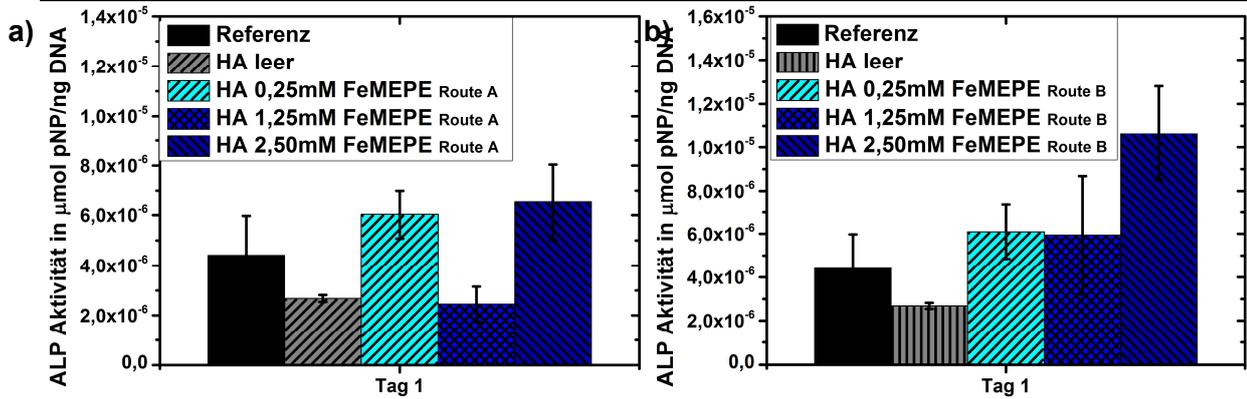


Abbildung 79: ALP-Aktivitäten der MG63-Zellen auf a) modifizierten HA-Zementen Route A und b) modifizierten HA Zementen Route B.

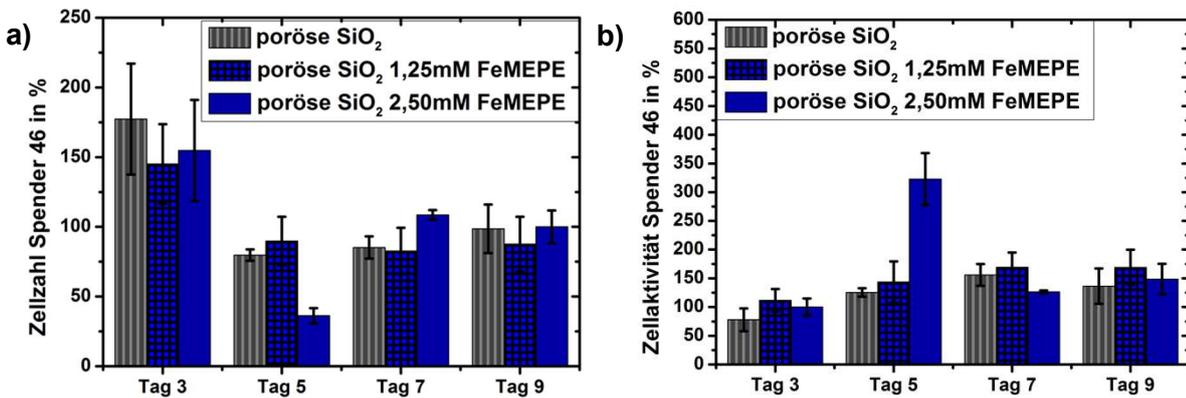


Abbildung 80: a) Zellzahl und b) Zellaktivität der hMSCs des Spenders 46 auf porösen SiO_2 -Oberflächen.

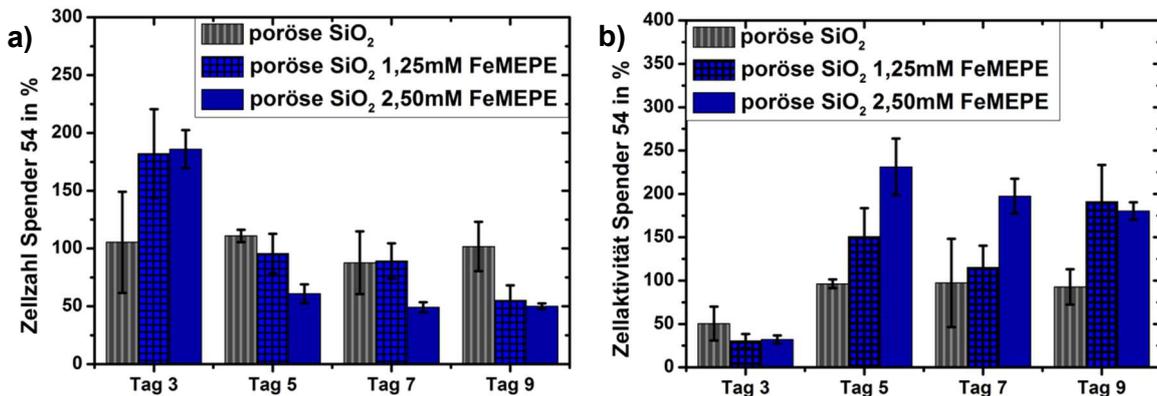


Abbildung 81: a) Zellzahl und b) Zellaktivität der hMSCs des Spenders 54 auf porösen SiO_2 -Oberflächen.

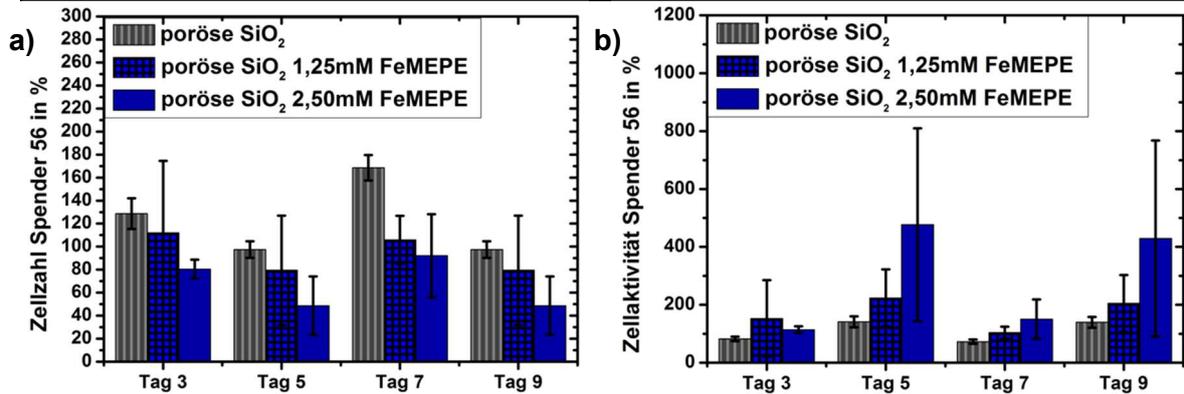


Abbildung 82: a) Zellzahl und b) Zellaktivität der hMSCs des Spenders 56 auf porösen SiO₂-Oberflächen.

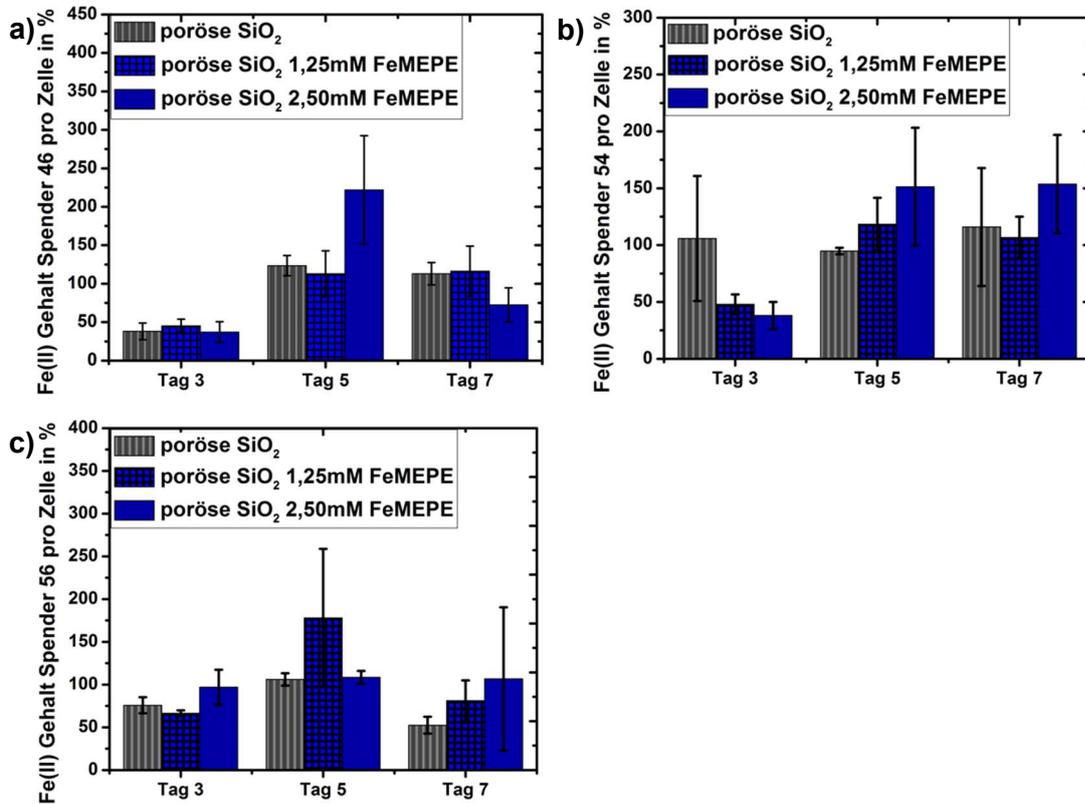


Abbildung 83: Fe(II)-Gehalte in % pro Zelle der hMSCs der a) Spender 46 b) Spender 54 und c) Spender 56.

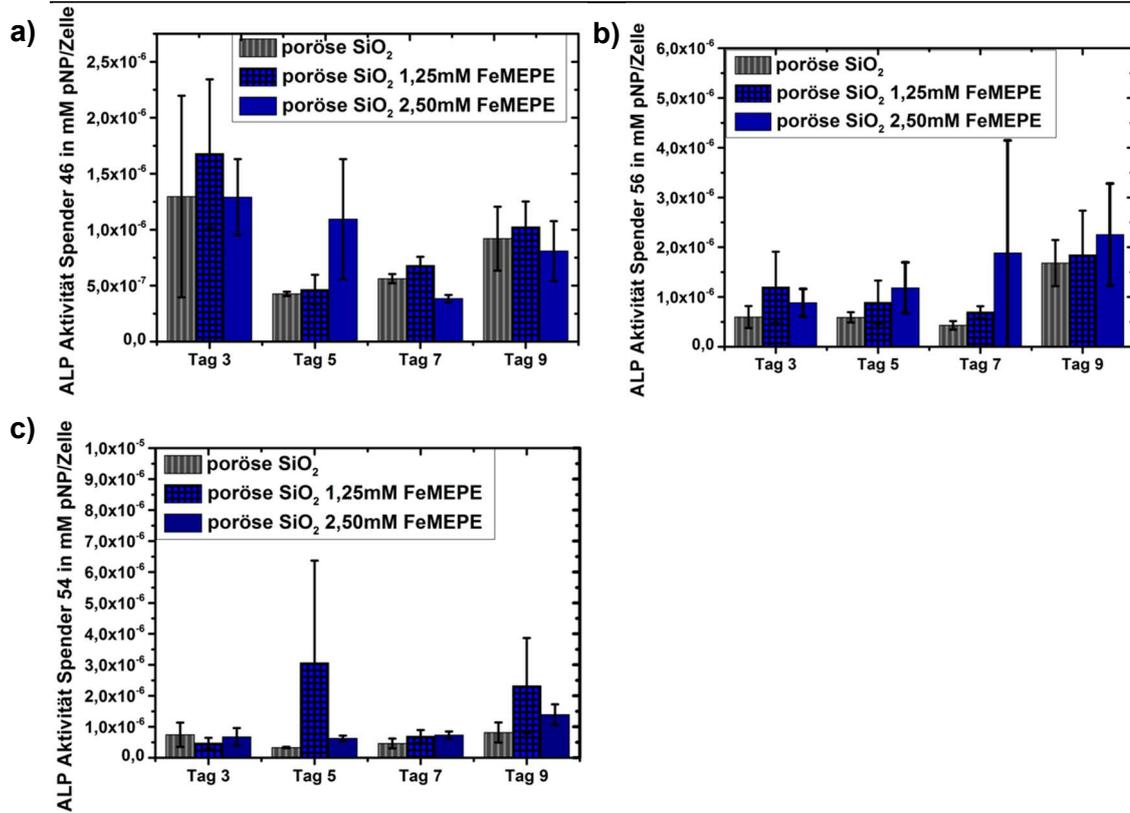


Abbildung 84: ALP-Aktivitäten in mM pNP pro Zelle der hMSCs der Spender a) 46 b) 54 und c) 56.

Literaturverzeichnis

1. Costerton JW, Marie, T.J., Cheng, K.J. Phenomena of Bacterial Adhesion. In: Fletcher M, editor. Bacterial Adhesion- Mechanism and Physiological Significance. New York: Plenum Press; 1985.
2. Dollwet HHA, Sorenson JRJ. Historic Uses of Copper-Compounds in Medicine. Trace Elem Med. 1985;2(2):80-7.
3. Quartiellers RC. Die Augenheilkunde in der Römerzeit: TP Verone Publishing; 2016.
4. Ekmann O. W A R U M: denkt der Mensch nicht weiter: epubli GmbH; 2012.
5. Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. Berlin: Springer Verlag; 1998.
6. Lang K. Biochemie der Ernährung: Steinkopff; 2013.
7. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, et al. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(4):C853-C860. doi:10.1152/ajpcell.2000.278.4.C853.
8. Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and Angiogenesis: Unravelling a Relationship Key to Cancer Progression. *Clin Exp Pharmacol P*. 2009;36(1):88-94.
9. Hu GF. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J Cell Biochem*. 1998;69(3):326-35.
10. Yamaguchi M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. *J Trace Elem Exp Med*. 1998;11(2-3):119-35.
11. Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32(11):2757-74.
12. Schmidt R. Werkstoffverhalten in biologischen Systemen: Grundlagen, Anwendungen, Schädigungsmechanismen, Werkstoffprüfung: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
13. Krämer E. Fluch und Segen eines künstlichen Gelenks: http://www.deutschlandradiokultur.de/implantate-fluch-und-segen-eines-kuenstlichen-gelenks.976.de.html?dram:article_id=323611; 2015 [aufgerufen am 14.09.2016].
14. Schneider T, Rinio, M. Hüftprothese: Spezialisten für das künstliche Hüftgelenk (Hüft-TEP) <https://gelenk-klinik.de/orthopaedische-operation/hueft-operation/hueftprothese-kuenstliche-hueftgelenk.html2016> [aufgerufen am 14.09.2016].
15. Mabileau G, Filmon R, Petrov PK, Basle MF, Sabokbar A, Chappard D. Cobalt, chromium and nickel affect hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Acta Biomater*. 2010;6(4):1555-60.
16. Ewald A, Hosel D, Patel S, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U. Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity. *Acta Biomater*. 2011;7(11):4064-70.
17. Ewald A, Kappel C, Vorndran E, Moseke C, Gelinsky M, Gbureck U. The effect of Cu(II)-loaded brushite scaffolds on growth and activity of osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100A(9):2392-400.

18. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci.* 2006;6(8):623-33.
19. Gaynor D, Griffith DM. The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: beyond platinum. *Dalton T.* 2012;41(43):13239-57.
20. Videla LA, Fernandez V, Tapia G, Varela P. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: Role of Kupffer cells. *Biometals.* 2003;16(1):103-11.
21. Mourino V, Cattalini JP, Boccaccini AR. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *J R Soc Interface.* 2012;9(68):401-19.
22. Fan W, Crawford R, Xiao Y. Enhancing in vivo vascularized bone formation by cobalt chloride-treated bone marrow stromal cells in a tissue engineered periosteum model. *Biomaterials.* 2010;31(13):3580-9.
23. Gerard C, Bordeleau LJ, Barralet J, Doillon CJ. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials.* 2010;31(5):824-31.
24. Zhu LL, Zaidi S, Peng YZ, Zhou H, Moonga BS, Blesius A, et al. Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. *Biochem Bioph Res Co.* 2007;355(2):307-11.
25. Rink L, Kruse A, Haase H, Lay M. *Immunologie für Einsteiger*: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
26. Heine H. *Lehrbuch der biologischen Medizin: Grundlagen und Extrazelluläre* Martix: Haug Fachbuch; 2014.
27. Roach P, Eglin D, Rohde K, Perry CC. Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci-Mater M.* 2007;18(7):1263-77.
28. Tachaboonyakiat W, Ogomi D, Serizawa T, Akashi M. Evaluation of cell adhesion and proliferation on a novel tissue engineering scaffold containing chitosan and hydroxyapatite. *J Bioact Compat Pol.* 2006;21(6):579-89.
29. Li XM, van Blitterswijk CA, Feng QL, Cui FZ, Watari FM. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. *Biomaterials.* 2008;29(23):3306-16.
30. Schmitz S. *Der Experimentator, Zellkultur.* 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
31. Grafahrend D, Heffels KH, Beer MV, Gasteier P, Moller M, Boehm G, et al. Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation. *Nat Mater.* 2011;10(1):67-73.
32. Shor L, Guceri S, Wen XJ, Gandhi M, Sun W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials.* 2007;28(35):5291-7.
33. Muller P, Bulnheim U, Diener A, Luthen F, Teller M, Klinkenberg ED, et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2008;12(1):281-91.
34. Endres M, Hutmacher DW, Salgado AJ, Kaps C, Ringe J, Reis RL, et al. Osteogenic induction of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymer-hydrogel matrices. *Tissue Eng.* 2003;9(4):689-702.
35. Polak SJ, Levengood SKL, Wheeler MB, Maki AJ, Clark SG, Johnson AJW. Analysis of the roles of microporosity and BMP-2 on multiple measures of bone

- regeneration and healing in calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater.* 2011;7(4):1760-71.
36. Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CXF, Woodruff MA, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials.* 2009;30(13):2479-88.
37. Masters KS. Covalent Growth Factor Immobilization Strategies for Tissue Repair and Regeneration. *Macromol Biosci.* 2011;11(9):1149-63.
38. Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and Angiogenesis: Unravelling a Relationship Key to Cancer Progression. *Clin Exp Pharmacol P.* 2009;36(1):88-94.
39. Ren KF, Fourel L, Rouviere CG, Albiges-Rizo C, Picart C. Manipulation of the adhesive behaviour of skeletal muscle cells on soft and stiff polyelectrolyte multilayers. *Acta Biomater.* 2010;6(11):4238-48.
40. Hu X, Park SH, Gil ES, Xia XX, Weiss AS, Kaplan DL. The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. *Biomaterials.* 2011;32(34):8979-89.
41. Pitt WG, Cooper SL. Albumin Adsorption on Alkyl Chain Derivatized Polyurethanes .1. The Effect of C-18 Alkylation. *J Biomed Mater Res.* 1988;22(5):359-82.
42. Gergely C, Bahi S, Szalontai B, Flores H, Schaaf P, Voegel JC, et al. Human serum albumin self-assembly on weak polyelectrolyte multilayer films structurally modified by pH changes. *Langmuir.* 2004;20(13):5575-82.
43. Hanein D, Geiger B, Addadi L. Fibronectin Adsorption to Surfaces of Hydrated Crystals - an Analysis of the Importance of Bound Water in Protein Substrate Interactions. *Langmuir.* 1993;9(4):1058-65.
44. R. H. Mammalian cell lines. Rockville: American Type Culture Collection; 1992.
45. Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007;16(5):857-68.
46. Cerletti M, Jurga S, Witczak CA, Hirshman MF, Shadrach JL, Goodyear LJ, et al. Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell.* 2008;134(1):37-47.
47. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Csh Perspect Biol.* 2012;4(2).
48. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270(5639):725-7.
49. Green MC. Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1981.
50. Andres V, Walsh K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol.* 1996;132(4):657-66.
51. Bennett AM, Tonks NK. Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science.* 1997;278(5341):1288-91.
52. Blais A, Tsikitis M, Acosta-Alvear D, Sharan R, Kluger Y, Dynlacht BD. An initial blueprint for myogenic differentiation. *Gene Dev.* 2005;19(5):553-69.
53. Caplan AI. Mesenchymal Stem-Cells. *J Orthopaed Res.* 1991;9(5):641-50.
54. Wlodarski KH. Properties and Origin of Osteoblasts. *Clin Orthop Relat R.* 1990(252):276-93.

55. Stein GS, Lian JB. Molecular Mechanisms Mediating Proliferation Differentiation Interrelationships during Progressive Development of the Osteoblast Phenotype. *Endocr Rev.* 1993;14(4):424-42.
56. Gollub E. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics.* 2007;18:444-8.
57. Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, Nicolas V, Boylefevre ML, Fleisch H, et al. Expression of Collagen, Osteocalcin, and Bone Alkaline-Phosphatase in a Mineralizing Rat Osteoblastic Cell-Culture. *Calcified Tissue Int.* 1992;50(2):175-83.
58. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype Invitro - Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation during Formation of the Bone Extracellular-Matrix. *J Cell Physiol.* 1990;143(3):420-30.
59. Zernik J, Twarog K, Upholt WB. Regulation of Alkaline-Phosphatase and Alpha-2(I) Procollagen Synthesis during Early Intramembranous Bone-Formation in the Rat Mandible. *Differentiation.* 1990;44(3):207-15.
60. Bronckers ALJJ, Gay S, Finkelman RD, Butler WT. Developmental Appearance of Gla Proteins (Osteocalcin) and Alkaline-Phosphatase in Tooth Germs and Bones of the Rat. *Bone Miner.* 1987;2(5):361-73.
61. Ducy P. Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dynam.* 2000;219(4):461-71.
62. Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res.* 2004;24(6):3743-8.
63. Clover J, Gowen M. Are Mg-63 and Hos Te85 Human Osteosarcoma Cell-Lines Representative Models of the Osteoblastic Phenotype. *Bone.* 1994;15(6):585-91.
64. Mutschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79A(11):1699-709.
65. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept - open questions. *Injury.* 2008;39:S5-S8.
66. Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE. Determination of the Capacity for Proliferation and Differentiation of Osteoprogenitor Cells in the Presence and Absence of Dexamethasone. *Dev Biol.* 1990;140(1):132-8.
67. Liu P, Oyajobi BO, Russell RGG, Scutt A. Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: Interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)(2) vitamin D-3 in vitro. *Calcified Tissue Int.* 1999;65(2):173-80.
68. Aaboe M, Pinholt EM, Hjortinghansen E. Healing of Experimentally Created Defects - a Review. *Brit J Oral Max Surg.* 1995;33(5):312-8.
69. Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials.* 2015;8(9):5744-94.
70. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie.* 2002;41(17):3130-46.
71. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(2):141-50.

72. Mehrban N, Paxton JZ, Bowen J, Bolarinwa A, Vorndran E, Gbureck U, et al. Comparing physicochemical properties of printed and hand cast bioceramics designed for ligament replacement. *Adv Appl Ceram.* 2011;110(3):162-7.
73. Hasan MS, Ahmed I, Parsons AJ, Rudd CD, Walker GS, Scotchford CA. Investigating the use of coupling agents to improve the interfacial properties between a resorbable phosphate glass and polylactic acid matrix. *J Biomater Appl.* 2013;28(3):354-66.
74. Zitzmann NU, Rateitschak-Pluss E, Marinello CP. Treatment of angular bone defects with a composite bone grafting material in combination with a collagen membrane. *J Periodontol.* 2003;74(5):687-94.
75. Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998;81(7):1705-28.
76. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury.* 2000;31:S37-S47.
77. Schmitz JP, Hollinger JO, Milam SB. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: A critical review. *J Oral Maxil Surg.* 1999;57(9):1122-6.
78. Chan LW, Jin Y, Heng PWS. Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002;242(1-2):255-8.
79. Martinsen A, Skjakbraek G, Smidsrod O. Alginate as Immobilization Material .1. Correlation between Chemical and Physical-Properties of Alginate Gel Beads. *Biotechnology and Bioengineering.* 1989;33(1):79-89.
80. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations - Egg-Box Model. *Febs Letters.* 1973;32(1):195-8.
81. Narayanan RP, Melman G, Letourneau NJ, Mendelson NL, Melman A. Photodegradable Iron(III) Cross-Linked Alginate Gels. *Biomacromolecules.* 2012;13(8):2465-71.
82. Jen AC, Wake MC, Mikos AG. Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering.* 1996;50(4):357-64.
83. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical Switching between Growth and Differentiation during Fibroblast Growth Factor-Stimulated Angiogenesis In vitro - Role of Extracellular-Matrix. *J Cell Biol.* 1989;109(1):317-30.
84. Price LS. Morphological control of cell growth and viability. *Bioessays.* 1997;19(11):941-3.
85. Smetana K. Cell Biology of Hydrogels. *Biomaterials.* 1993;14(14):1046-50.
86. Yagi K, Tsuda K, Serada M, Yamada C, Kondoh A, Miura Y. Rapid Formation of Multicellular Spheroids of Adult-Rat Hepatocytes by Rotation Culture and Their Immobilization within Calcium Alginate. *Artificial Organs.* 1993;17(11):929-34.
87. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials.* 1999;20(1):45-53.
88. Machida-Sano I, Matsuda Y, Namiki H. In vitro adhesion of human dermal fibroblasts on iron cross-linked alginate films. *Biomed Mater.* 2009;4(2).
89. Machida-Sano I, Matsuda Y, Namiki H. A novel harvesting method for cultured cells using iron-cross-linked alginate films as culture substrates. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2010;55:1-8.

90. Shoichet MS, Li RH, White ML, Winn SR. Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996;50(4):374-81.
91. Ali M, Nasir S, Nguyen QH, Sahoo JK, Tahir MN, Tremel W, et al. Metal Ion Affinity-based Biomolecular Recognition and Conjugation inside Synthetic Polymer Nanopores Modified with Iron-Terpyridine Complexes. *J Am Chem Soc*. 2011;133(43):17307-14.
92. Hollemann A, Wiberg, E. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Berlin: Walter de Gruyter Co.; 1995.
93. Lehn JM. Toward self-organization and complex matter. *Science*. 2002;295(5564):2400-3.
94. Wasserle E. Adsorption von kationischen Polymeren unterschiedlicher Struktur und deren Einfluß auf das Stabilitätsverhalten von Latex-Suspensionen. München: Herbert Utz Verlag GmbH; 1999.
95. Henderson IM, Hayward RC. Kinetic stabilities of bis-terpyridine complexes with iron(II) and cobalt(II) in organic solvent environments. *J Mater Chem*. 2012;22(40):21366-9.
96. Akcakayiran A. Pure and acid-funcionalized ordered mesoporous silicas:Host for metallo-supramolecular coordination polymers. In: Berlin FI-MuNdTU, editor. 2009.
97. Hofmeier H, Andres PR, Hoogenboom R, Herdtweck E, Schubert US. Terpyridine-ruthenium complexes as building blocks for new metallo-supramolecular architectures. *Aust J Chem*. 2004;57(5):419-26.
98. Kolb U, Buscher K, Helm CA, Lindner A, Thunemann AF, Menzel M, et al. The solid-state architecture of a metallosupramolecular polyelectrolyte. *P Natl Acad Sci USA*. 2006;103(27):10202-6.
99. Schwarz G, Bodenthin Y, Geue T, Koetz J, Kurth DG. Structure and Properties of Dynamic Rigid Rod-Like Metallo-Supramolecular Polyelectrolytes in Solution. *Macromolecules*. 2010;43(1):494-500.
100. Schwarz G, Sievers TK, Bodenthin Y, Hasslauer I, Geue T, Koetz J, et al. The structure of metallo-supramolecular polyelectrolytes in solution and on surfaces. *J Mater Chem*. 2010;20(20):4142-8.
101. Schubert US, Eschbaumer C, Hien O, Andres PR. 4'-functionalized 2,2':6',2''-terpyridines as building blocks for supramolecular chemistry and nanoscience. *Tetrahedron Lett*. 2001;42(28):4705-7.
102. Schwarz G, Hasslauer I, Kurth DG. From terpyridine-based assemblies to metallo-supramolecular polyelectrolytes (MEPEs). *Adv Colloid Interfac*. 2014;207:107-20.
103. Han FS, Higuchi M, Kurth DG. Metallo-supramolecular polymers based on functionalized bis-terpyridines as novel electrochromic materials. *Adv Mater*. 2007;19(22):3928-+.
104. Holyer RH, Hubbard CD, Kettle SFA, Wilkins RG. Kinetics of Replacement Reactions of Complexes of Transition Metals with 2,2',2''-Terpyridine. *Inorg Chem*. 1966;5(4):622-&.
105. Schubert US, Hofmeier H, Newkome GR. *Modern Terpyridine Chemistry*: Wiley; 2006.
106. Kleimann J. Gleichgewicht und Kinetik der Protonierung von Polyelektrolyten: Theorie, Experimente und Simulationen: Cuvillier; 2004.

107. Lieb D. Mechanistic and Synthetic Approaches for Activation of Water and Oxygen-Species by Biomimetic Systems (Containing Manganese and Cobalt). Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen; 2013.
108. Templeton JL. Hexakis(Pyridine)Ruthenium(II) Tetrafluoroborate - Molecular-Structure and Spectroscopic Properties. *J Am Chem Soc.* 1979;101(17):4906-17.
109. Doedens RJ, Dahl LF. Structure of Hexapyridineiron(II) Salt of Tetranuclear Iron Carbonyl Anion[Fe₄(Co)₁₃]²⁻ with Comments Concerning Nonisolation of Corresponding Neutral Tetranuclear Iron Carbonyl Fe₄(Co)₁₄. *J Am Chem Soc.* 1966;88(21):4847-&.
110. Schutte M, Kurth DG, Linford MR, Colfen H, Mohwald H. Metallosupramolecular thin polyelectrolyte films. *Angew Chem Int Edit.* 1998;37(20):2891-3.
111. Siebert R, Winter A, Schubert US, Dietzek B, Popp J. The molecular mechanism of dual emission in terpyridine transition metal complexes-ultrafast investigations of photoinduced dynamics. *Phys Chem Chem Phys.* 2011;13(4):1606-17.
112. Siebert R, Winter A, Schmitt M, Popp J, Schubert US, Dietzek B. Light-Induced Dynamics in Conjugated Bis(terpyridine) Ligands - A Case Study Toward Photoactive Coordination Polymers. *Macromol Rapid Comm.* 2012;33(6-7):481-97.
113. Vogler A, Kunkely H. Photochemistry of Transition-Metal Complexes Induced by Outer-Sphere Charge-Transfer Excitation. *Top Curr Chem.* 1990;158:1-30.
114. Endicott JF, Schlegel HB, Uddin MJ, Seniveratne DS. MLCT excited states and charge delocalization in some ruthenium-ammine-polypyridyl complexes. *Coord Chem Rev.* 2002;229(1-2):95-106.
115. Kurth DG, Schutte M, Wen J. Metallo-supramolecular polyelectrolyte multilayers with cobalt(II): preparation and properties. *Colloid Surface A.* 2002;198:633-43.
116. Schott M, Lorrman H, Szczerba W, Beck M, Kurth DG. State-of-the-art electrochromic materials based on metallo-supramolecular polymers. *Sol Energy Mat Sol C.* 2014;126:68-73.
117. Haensch C, Chiper M, Ulbricht C, Winter A, Hoepfner S, Schubert US. Reversible Supramolecular Functionalization of Surfaces: Terpyridine Ligands as Versatile Building Blocks for Noncovalent Architectures. *Langmuir.* 2008;24(22):12981-5.
118. Lambert JB. *Introduction to Organic Spectroscopy*: Macmillan; 1987.
119. Yan Y, Huang JB. Hierarchical assemblies of coordination supramolecules (vol 254, pg 1072, 2010). *Coord Chem Rev.* 2010;254(23-24):3030-.
120. Ai H, Jones SA, Lvov YM. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochem Biophys.* 2003;39(1):23-43.
121. Schott M, Szczerba W, Kurth DG. Detailed Study of Layer-by-Layer Self-Assembled and Dip-Coated Electrochromic Thin Films Based on Metallo-Supramolecular Polymers. *Langmuir.* 2014;30(35):10721-7.
122. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science.* 1997;277(5330):1232-7.
123. Kurth DG, Schutte M. Layer-by-layer self-assembly of a metallo-supramolecular coordination polyelectrolyte studied by infrared spectroscopy, microgravimetry, and X-ray reflectance. *Macromol Symp.* 2001;164:167-79.

124. de Villiers MM, Otto DP, Strydom SJ, Lvov YM. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Adv Drug Deliver Rev.* 2011;63(9):701-15.
125. Richardson JJ, Cui J, Bjornmalm M, Braunger JA, Ejima H, Caruso F. Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chem Rev.* 2016;116(23):14828-67.
126. Richardson JJ, Cui JW, Bjornmalm M, Braunger JA, Ejima H, Caruso F. Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chem Rev.* 2016;116(23):14828-67.
127. L. D. Landau BGL. *Acta Physiochimica.* 1942(17):42-54.
128. van den Berg F. *Angewandte Physiologie: Band 1: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen: Georg Thieme Verlag; 2010.*
129. Schott M. *Neuartige Elektrodenmaterialien auf der Basis von Metallo-Polyelektrolyten und Hybridpolymeren für elektrochrome Fenster. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2015.*
130. Kurth DG, Osterhout R. In situ analysis of metallosupramolecular coordination polyelectrolyte films by surface plasmon resonance spectroscopy. *Langmuir.* 1999;15(14):4842-6.
131. Sievers TK, Vergin A, Mohwald H, Kurth DG. Thin films of cross-linked metallo-supramolecular coordination polyelectrolytes. *Langmuir.* 2007;23(24):12179-84.
132. Norskov JK. Covalent Effects in the Effective-Medium Theory of Chemical-Binding - Hydrogen Heats of Solution in the 3d-Metals. *Phys Rev B.* 1982;26(6):2875-85.
133. Stott MJ, Zaremba E. Quasiatoms - an Approach to Atoms in Nonuniform Electronic Systems. *Phys Rev B.* 1980;22(4):1564-83.
134. Akcakayiran D, Mauder D, Hess C, Sievers TK, Kurth DG, Shenderovich I, et al. Carboxylic Acid-Doped SBA-15 Silica as a Host for Metallo-supramolecular Coordination Polymers. *J Phys Chem B.* 2008;112(46):14637-47.
135. Lowman GM, Buratto SK. Nanoscale morphology of polyelectrolyte self-assembled films probed by scanning force and near-field scanning optical microscopy. *Thin Solid Films.* 2002;405(1-2):135-40.
136. Kleinfeld ER, Ferguson GS. Healing of defects in the stepwise formation of polymer/silicate multilayer films. *Chem Mater.* 1996;8(8):1575-+.
137. Menzies KL, Jones L. The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. *Optometry Vision Sci.* 2010;87(6):387-99.
138. Schroterova L, Kralova V, Voracova A, Haskova P, Rudolf E, Cervinka M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2009;23(7):1406-11.
139. Peskin AV, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta.* 2000;293(1-2):157-66.
140. Corral E, Hotze ACG, den Dulk H, Leczkowska A, Rodger A, Hannon MJ, et al. Ruthenium polypyridyl complexes and their modes of interaction with DNA: Is there a correlation between these interactions and the antitumor activity of the compounds? *J Biol Inorg Chem.* 2009;14(3):439-48.
141. Geist M. *Koordinationspolymere auf der Basis von Terpyridin und Dipyridyltriazin: Synthese und Anwendung: Julius-Maximilian-Universität Würzburg; 2015.*

142. Bhowmik S, Ghosh BN, Rissanen K. Transition metal ion induced hydrogelation by amino-terpyridine ligands. *Org Biomol Chem*. 2014;12(44):8836-9.
143. Dong B, Sakurai T, Bando Y, Seki S, Takaishi K, Uchiyama M, et al. Ion-Based Materials Derived from Positively and Negatively Charged Chloride Complexes of pi-Conjugated Molecules. *J Am Chem Soc*. 2013;135(39):14797-805.
144. Ramasarma T. Fe²⁺-Dependent Metabolic Modulation. *Curr Sci India*. 1985;54(9):407-11.
145. Yang Q, Jian JL, Abramson SB, Huang X. Inhibitory Effects of Iron on Bone Morphogenetic Protein 2-Induced Osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2011;26(6):1188-96.
146. Vorpahl M, Wiemann M, Brauer H, Bingmann D. Effects of metal ions on proliferation of aortic smooth muscle cells and myoblastic cells in vitro. *Materialwiss Werkst*. 2001;32(12):970-5.
147. Ricotti L, Taccola S, Bernardeschi I, Pensabene V, Dario P, Menciassi A. Quantification of growth and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells on PSS-PAH-based polyelectrolyte layer-by-layer nanofilms. *Biomed Mater*. 2011;6(3).
148. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*. 2013;9(9):8037-45.
149. Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Hainsworth LN, Porubcin M, Simovich MJ, et al. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol-Gastr L*. 2000;279(4):G767-G74.
150. Conrad ME, Umbreit JN, Peterson RDA, Moore EG, Harper KP. Function of Integrin in Duodenal Mucosal Uptake of Iron. *Blood*. 1993;81(2):517-21.
151. Yan BX, Smith JW. Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction. *Biochemistry-U.S.* 2001;40(30):8861-7.
152. Gribova V, Gauthier-Rouviere C, Albiges-Rizo C, Auzely-Velty R, Picart C. Effect of RGD functionalization and stiffness modulation of polyelectrolyte multilayer films on muscle cell differentiation. *Acta Biomater*. 2013;9(5):6468-80.
153. Liu HJ, Niu AR, Chen SE, Li YP. beta 3-Integrin mediates satellite cell differentiation in regenerating mouse muscle. *Faseb J*. 2011;25(6):1914-21.
154. Atmani H, Audrain C, Mercier L, Chappard D, Basle MF. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*. 2002;85(3):640-50.
155. Carinci F, Pezzetti F, Spina AM, Palmieri A, Laino G, De Rosa A, et al. Effect of Vitamin C on pre-osteoblast gene expression. *Arch Oral Biol*. 2005;50(5):481-96.
156. Chung JH, Kim YS, Noh K, Lee YM, Chang SW, Kim EC. Deferoxamine promotes osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells via the nuclear factor erythroid 2-related factor-mediated antioxidant signaling pathway. *J Periodontal Res*. 2014;49(5):563-73.
157. Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV, Zander AR. High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem cells develop* (vol 14, pg 70, 2005). *Stem Cells Dev*. 2005;14(2):236-.
158. Chen JL, Li Y, Wang L, Zhang ZG, Lu DY, Lu M, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32(4):1005-11.

159. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-30.
160. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
161. Friedenstein AJ, Gorskaja UF, Kulagina NN. Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-74.
162. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue-engineering applications: Current status and future prospects. *Tissue Eng*. 2005;11(5-6):787-802.
163. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. *J Anat*. 2006;208(1):3-12.
164. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45.
165. Borriello A, Caldarelli I, Speranza MC, Scianguetta S, Tramontano A, Bencivenga D, et al. Iron overload enhances human mesenchymal stromal cell growth and hampers matrix calcification. *Bba-Gen Subjects*. 2016;1860(6):1211-23.
166. Wang QW, Chen B, Cao M, Sun JF, Wu H, Zhao P, et al. Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. *Biomaterials*. 2016;86:11-20.
167. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):295-312.
168. Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, Sfeir C. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater*. 2014;10(6):2834-42.
169. Schrock K, Lutz J, Mandl S, Hacker MC, Kamprad M, Schulz-Siegmund M. Co(II)-Mediated Effects of Plain and Plasma Immersion Ion Implanted Cobalt-Chromium Alloys on the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Orthopaed Res*. 2015;33(3):325-33.
170. Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 2002;60(3):420-33.
171. Birgani ZT, Malhotra A, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Human mesenchymal stromal cells response to biomimetic octacalcium phosphate containing strontium. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(8):1946-60.
172. Zhang WB, Shen YH, Pan HB, Lin KL, Liu XG, Darvell BW, et al. Effects of strontium in modified biomaterials. *Acta Biomater*. 2011;7(2):800-8.
173. Boanini E, Torricelli P, Fini M, Sima F, Serban N, Mihailescu IN, et al. Magnesium and strontium doped octacalcium phosphate thin films by matrix assisted pulsed laser evaporation. *J Inorg Biochem*. 2012;107(1):65-72.
174. Capuccini C, Torricelli P, Sima F, Boanini E, Ristoscu C, Bracci B, et al. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomater*. 2008;4(6):1885-93.

175. Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Brit J Pharmacol*. 2009;157(7):1291-300.
176. Barbara A, Delannoy P, Denis BG, Marie PJ. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism*. 2004;53(4):532-7.
177. Hofmann A, Mattyasovszky SG, Bruning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, et al. [Osteoblasts : cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing]. *Der Orthopade*. 2009;38(11):1009-19.
178. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*. 2003;8(21):980-9.
179. Wagner U. Oldtimer sorgt immer wieder für Überraschung. *Pharmazeutische Zeitung online*. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=210181999>.
180. Chan S, Chen MP, Cao JM, Chan GCF, Cheung YF. Carvedilol Protects against Iron-Induced Microparticle Generation and Apoptosis of Endothelial Cells. *Acta Haematol-Basel*. 2014;132(2):200-10.
181. Kartikasari AER, Georgiou NA, Visseren FLJ, van Kats-Renaud H, van Asbeck BS, Marx JJM. Endothelial activation and induction of monocyte adhesion by nontransferrin-bound iron present in human sera. *Faseb J*. 2006;20(2):353-5.
182. Mollet IG, Patel D, Govani FS, Giess A, Paschalaki K, Periyasamy M, et al. Low Dose Iron Treatments Induce a DNA Damage Response in Human Endothelial Cells within Minutes. *PLoS One*. 2016;11(2):21.
183. Berger G, Gildenhaar R. Resorbable Bone Substitution on the Basis of Calcium Phosphates. *Materialwiss Werkst*. 1995;26(7):379-85.
184. LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem Rev*. 2008;108(11):4742-53.
185. Ishikawa K. Bone Substitute Fabrication Based on Dissolution-Precipitation Reactions. *Materials*. 2010;3(2):1138-55.
186. Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. Bone substitutes. *Der Orthopade*. 2003;32(1):2-10.
187. Rietveld HM. Line Profiles of Neutron Powder-Diffraction Peaks for Structure Refinement. *Acta Crystallogr*. 1967;22:151-&.
188. Rietveld HM. A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures. *J Appl Crystallogr*. 1969;2:65-&.
189. Pitsch W, Sauthoff G. Kinetik und Morphologie verschiedener Gefügereaktionen. *Werkstoffkunde Stahl: Band 1: Grundlagen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1984. p. 115-76.
190. Tuderman L, Myllyla R, Kivirikko KI. Mechanism of the Prolyl Hydroxylase Reaction .1. Role of Co-Substrates. *Nutr Rev*. 1982;40(10):306-9.
191. Jonas J, Burns J, Abel EW, Cresswell MJ, Strain JJ, Paterson CR. Impaired Mechanical Strength of Bone in Experimental Copper Deficiency. *Ann Nutr Metab*. 1993;37(5):245-52.
192. Rucker RB, Riggins RS, Laughlin R, Chan MM, Chen M, Tom K. Effects of Nutritional Copper Deficiency on Biomechanical Properties of Bone and Arterial Elastin Metabolism in Chick. *J Nutr*. 1975;105(8):1062-70.

193. Gbureck U, Holzel T, Doillon CJ, Muller FA, Barralet JE. Direct printing of bioceramic implants with spatially localized angiogenic factors. *Adv Mater.* 2007;19(6):795-+.
194. Barralet J, Gbureck U, Habibovic P, Vorndran E, Gerard C, Doillon CJ. Angiogenesis in Calcium Phosphate Scaffolds by Inorganic Copper Ion Release. *Tissue Eng Pt A.* 2009;15(7):1601-9.
195. Constable EC, Housecroft CE, Neuburger M, Schonle J, Vujovic S, Zampese JA. Molecular recognition between 4'-(4-biphenyl)-4,2':6',4"-terpyridine domains in the assembly of d(9) and d(10) metal ion-containing one-dimensional coordination polymers. *Polyhedron.* 2013;60:120-9.
196. Kumar A, Chinta JP, Ajay AK, Bhat MK, Rao CP. Synthesis, characterization, plasmid cleavage and cytotoxicity of cancer cells by a copper(II) complex of anthracenyl-terpyridine. *Dalton T.* 2011;40(41):10865-72.
197. Prestel H. Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz modular aufgebauter, faseroptischer Schwermetall-Sensoren für die Gewässerüberwachung: Utz, Wiss.; 2002.
198. Gopalakrishnan M, Senthilkumar K, Rao PR, Siva R, Palanisami N. Synthesis, crystal structure, DNA binding and molecular docking studies on new copper(II) salicylate [Cu(DTBSA)(2)(2,2'-bpy)](dmf). *Inorg Chem Commun.* 2014;46:54-9.
199. Castro I, Faus J, Julve M, Gleizes A. Complex-Formation between Oxalate and (2,2'-6',2"-Terpyridyl)-Copper(Ii) in Dimethyl-Sulfoxide Solution - Synthesis and Crystal-Structures of Mononuclear and Dinuclear Complexes. *J Chem Soc Dalton.* 1991(8):1937-44.
200. Murugavel R, Korah R. Structural diversity and supramolecular aggregation in calcium, strontium, and barium Salicylates incorporating 1,10-phenanthroline and 4,4'-bipyridine: Probing the softer side of group 2 metal ions with pyridinic ligands. *Inorg Chem.* 2007;46(26):11048-62.
201. Wiesbrock F, Schmidbaur H. Crystal structures of rubidium and cesium anthranilates and salicylates. *Inorg Chem.* 2003;42(22):7283-9.
202. Gorinchoi VV, Turte KI, Simonov YA, Shova SG, Lipkovskii Y, Shofranskii VN. Heteronuclear {Fe-Ba, Fe-Sr} salicylate complexes. Synthesis, structure, and physicochemical properties. *Russ J Coord Chem+.* 2009;35(4):279-85.
203. Kundra SK, Katyal M, Singh RP. Spectrophotometric Determination of Copper(I) and Cobalt(II) with Ferrozine. *Anal Chem.* 1974;46(11):1605-6.
204. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem.* 2004;331(2):370-5.
205. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* 2005;61(46):10827-52.
206. Gauthier MA, Gibson MI, Klok HA. Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification. *Angew Chem Int Edit.* 2009;48(1):48-58.
207. J. P. Soares JES, G.O. Chierice, E. T. G. Cavalheiro. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Ecl Quim.* 2004;29(2):53-6.
208. Merck. Datenblatt Natriumcarbonat (pdf). aufgerufen am 8. März 2012.
209. Algothmi WM, Bandaru NM, Yu Y, Shapter JG, Ellis AV. Alginate-graphene oxide hybrid gel beads: An efficient copper adsorbent material. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2013;397:32-8.

-
210. Skutil J, Gasparic J. Identification of Primary Aromatic Amides by Thermal Dehydration .80. Report on Identification of Organic Compounds. Mikrochim Acta. 1974(5):791-6.
211. Mezger TG. Das Rheologie Handbuch. Hannover: Vincentz Network; 2006.
212. Constable EC, Thompson AMWC. Multinucleating 2,2',6',2''-Terpyridine Ligands as Building-Blocks for the Assembly of Coordination Polymers and Oligomers. J Chem Soc Dalton. 1992(24):3467-75.
213. Winter A, van den Berg AMJ, Hoogenboom R, Kickelbick G, Schubert US. A green and straightforward synthesis of 4'-substituted terpyridines. Synthesis-Stuttgart. 2006(17):2873-8.
214. Stark H. Handbuch Levasil 300/30%.

Danksagung

Am Ende dieser Dissertation möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Chemische Technologie der Materialsynthese, des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde, des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, des Fraunhofer Institut ISC und der Universität Würzburg für die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gebührt dabei

- Herrn Prof. Dr. Kurth für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen.
- Herrn Prof. Dr. Gbureck für seine stets offene Tür bei Fragen rund um das Thema Knochenzemente
- Herrn Dr. Nickel für seine Unterstützung während der gesamten Promotion
- Meinen ehemaligen Kollegen Basti, Tobias, Iris, Matthias und Julian für die schöne Zeit am Röntgenring
- Stephanie Maaß für die Ligandensynthese und ihre Hilfe bei jeglichen Fragen rund ums Labor
- Meinen Studenten Sabine Seifert, Julian Bechold, Balndine Castay und Noemie Frere für die gute Zusammenarbeit
- Heide für die Einführung in die Zellkultur und PCR
- Isabell für die Unterstützung bei der Knochenzementherstellung
- Frau Midtbö für Ihre Hilfe bei allen organisatorischen Dingen und Sandra Stockmann für alle Sicherheitsfragen

Und natürlich meiner Familie, insbesondere dir Andreas, die mir mein Studium und die Promotion ermöglicht haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe.

Würzburg, den _____

Janina Belka

