

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Nanostrukturierte Silicaaggregate für die Weichgewebsregeneration

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Richard Dietrich, geb. am 07.07.1984 in Schwerin

aus Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Gerber,
Institut für Physik, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Werner Götz
Poliklinik für Kieferorthopädie, Universität Bonn

Datum der Einreichung: 22. Dezember 2015

Datum der Verteidigung: 20. April 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Stand der Technik	9
2.1	Sol-Gel-Prozess	9
2.1.1	Herstellung von Silicastrukturen mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses	10
2.2	Biologische Wirksamkeit des SiO ₂	12
2.3	PVP	15
2.4	Wunde	17
2.5	Wundheilung	18
2.6	Wundauflagen	19
3	SiO₂-PVP-Nanokompositmaterial	23
3.1	Herstellung nanostrukturierte Silicaaggregate	24
3.2	PVP	26
3.3	Physikalische Eigenschaften des Komposits	28
3.4	Physikalische Eigenschaften des quervernetzten SiO ₂ -Nanokomposits	36
4	SiO₂-aktive Wundauflagen	45
4.1	Trockenes Vlies	46
4.2	Feuchte Gelaufage	48
5	Biokompatibilität der Wundauflagen	51
5.1	Zytotoxizität des PVP-SiO ₂ -Komposits	51
5.1.1	Live/Dead Test	52
5.1.2	Metabolische Aktivität	55
5.2	Tierversuch	57
5.2.1	Versuchstier	57

5.2.2	Versuchsdurchführung	58
5.2.3	Auswertung	61
5.2.3.1	SiO ₂ -Diffusion	61
5.2.3.2	Äußerliche Bewertung der Wunden	63
5.2.3.3	Histologische Analyse mit Hilfe der HE-Färbung	64
5.2.3.4	Immunhistochemische Analyse zur Vaskulari- sation	72
5.2.3.5	Immunhistochemische Analyse mit Hilfe von α-SMA	74
6	Kompakte SiO₂-Strukturen und deren biologische Aktivität	77
6.1	SiO ₂ -Mikropartikel	77
6.2	SiO ₂ -Mikropartikel im Tierexperiment	81
6.3	Differentielle Genexpressionsanalyse subcutaner Wunden mit im- plantierten SiO ₂ -haltigen Biomaterialien	88
7	Zusammenfassung	93
	Literaturverzeichnis	97

1 Einleitung

Silicium ist das zweithäufigste Element der Erdkruste. Es kommt dort hauptsächlich in Siliciummineralen vor [86].

In biologischen Systemen ist es ein Spurenelement. Beispielsweise bauen Kieselalgen (*Bacillariophyta*) ihr Exoskelett vorwiegend aus amorphem SiO_2 auf, woher sie auch ihren deutschen Trivialnamen haben. Versuche an ihnen mit Germanium als Siliciumtracer ergaben Hinweise darauf, dass die Aufnahme des Siliciumdioxids durch Proteine stattfindet [38].

Weitaus größere Siliciumkonstrukte werden von Glasschwämmen erzeugt. Die Schwammart *Monorhaphis chuni* kann Nadeln bis zu einer Größe von 3 m und einem Durchmesser von 10 mm erzeugen, womit sie die größten Bio-Silica Strukturen der Erde produzieren [87]. Diese Meeresbewohner gewinnen das Siliciumdioxid aus im Wasser gelöster Kieselsäure.

Auch für Landlebewesen ist SiO_2 wichtig. Schachtelhalme (*Equisetum*) benutzen amorphe SiO_2 -Strukturen für ihr Stützgerüst.

Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung des SiO_2 ist Reis, bei dem gezeigt werden konnte, dass die Pflanze auf einem SiO_2 -reicheren Boden mehr Siliciumdioxid in die Halme einbaut und so eine höhere Resistenz gegen einen Schädling, den Zünslerfalter (*Pyraloidea*), sowie einen höheren Ertrag aufweist [42].

Auch höhere Lebewesen nutzten SiO_2 für ihren Gewebeauf- und umbau. Carlisle hat schon 1970 gezeigt, dass die SiO_2 -Konzentration in jungem, neu gebildetem bzw. sich bildenden Knochen höher ist als in ausgewachsenem [10]. Bei Hühnern führte demzufolge eine siliciumarme Kost zu Fehl- und Mangelwüchsen beim Knochen- und Knorpel- und Bindegewebe [11, 12]. Somit ist Silicium essentiell für den normalen Knochenaufbau [13].

Ähnliche Ergebnisse haben Diätversuche an Ratten ergeben, welche während einer siliciumarmen Diät langsamer zunahmen als die Kontrollgruppe. [79].

Dass SiO_2 durch die Nahrung aufgenommen Einflüsse auf den menschlichen Organismus hat, konnte an verschiedenen Stellen verifiziert werden [80, 78, 47].

Es wurde gezeigt, dass SiO_2 -Aufnahme mit einer erhöhten Knochendichte assoziiert werden kann [47].

Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, an welchen biochemischen Prozessen Siliciumdioxid direkt beteiligt ist. Weiterhin besteht Untersuchungsbedarf bezüglich der Bioaktivität verschiedener SiO_2 -Strukturen.

SiO_2 kann kristallin, amorph, stark oder schwach vernetzt vorkommen. Da in biologischen Systemen wie in Pflanzen das Siliciumdioxid aber amorph und schwach vernetzt ist [49], liegt es nahe, dass diese Struktur die biologisch aktivere ist.

Solche schwach vernetzten, amorphen SiO_2 -Strukturen können über einen Sol-Gel-Prozess erzeugt werden. Dieser Prozess bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten die Strukturbildung zu steuern und somit verschiedene SiO_2 -Strukturen zu gestalten.

Da SiO_2 Einfluss auf Knochen- und Bindegewebsaufbau hat, ist der Einsatz als Zusatz für ein Knochenaufbaumaterial denkbar und sogar schon Realität. Im Knochenaufbaumaterial Nanobone[®] sind bis zu 39 % SiO_2 enthalten, welches nachweislich einen positiven Einfluss auf den Knochenaufbau hat [91, 1]. Das Siliciumdioxid dieses Produktes ist ein amorphes, schwach vernetztes Xerogel, welches im Sol-Gel-Prozess hergestellt wird.

Die Eigenschaft beim Knochenaufbau zu unterstützen und sich am Aufbau von Bindegewebe zu beteiligen, legt nahe, dass SiO_2 eine Wirkung auf den Aufbau anderer Organe hat.

Die Haut besteht, wie das Bindegewebe, zu einem wesentlichen Teil aus dem Strukturprotein Kollagen. Calomme hat bei Kälbern festgestellt, dass sich der Kollagenanteil in deren Haut erhöht, wird der Nahrung SiO_2 zugegeben [9]. Es besteht also die Möglichkeit, dass SiO_2 den Aufbau der Haut bzw. ihre Wundheilung unterstützt.

Die Wundheilung ist einer der komplexesten Vorgänge im menschlichen Körper. Sie dient dem Verschluss einer Wunde und der weitestgehenden Wiederherstellung des beschädigten Körpergewebes. Dabei werden verschiedene Phasen durchlaufen, die einander überlappen.

Bei der Wundheilung der Haut sind das die Hämostase, die inflammatorische Phase, die proliferative Phase und die Regenerationsphase [28]. Laufen diese Prozesse nicht in physiologischer Weise ab, sondern sind unkoordiniert und pathologisch verzögert, heilt die Wunde nicht und man spricht von ei-

ner chronischen Wunde [34]. Ab wann dies zutrifft, ist nicht eindeutig ausgewiesen. Gründe für chronische Wunden gibt es einige, am häufigsten (bis zu 70%) treten chronische Wunden infolge von Durchblutungsstörungen auf. Weitere Einflussfaktoren sind dauerhafte Druckschädigungen der Haut, Stoffwechselstörungen, Diabetis, Immunsuppression oder Strahlenschäden. Die Behandlung chronischer Wunden kann relativ komplex sein, da immer nicht nur die Wunde sondern auch die ursächliche Erkrankung mitbehandelt werden muss. Prinzipiell ist die Behandlung einer chronischen Wunde ähnlich der einer akuten Wundbehandlung. Im Unterschied dazu ist sie viel zeitintensiver und benötigt eine größere Einflussnahme auf das Heilungsgeschehen [88].

In der modernen Wundbehandlung wird bei chronischen Wunden auf ein feuchtes Wundmilieu gesetzt. Bereits 1963 hatte Winter festgestellt, dass feuchte Wundauflagen eine wesentlich schnellere Reepithelisierung induzieren als trockene [90]. Jedoch wird heute noch der traditionelle trockene Wundverband, meist Mullkompressen, welche die Wunde austrocknen, weit verbreitet eingesetzt [88, 31]. Dabei muss ein trockener Wundverband nicht gleichzeitig mit einem trockenen Wundmilieu in Zusammenhang gebracht werden. Beispielsweise verhindern Okklusivverbände, die nur aus einer Polymerfolie bestehen können, das Austrocknen der Wunde und schaffen ein feuchtes Wundmilieu. Man spricht hier von hydroaktiven Wundauflagen.

Grundsätzlich ist der Einsatz einer solchen Auflage abhängig vom Wundtyp. Bagatellwunden oder chirurgische Verschlüsse können beispielsweise trocken therapiert werden. Chronische Wunden oder Wunden mit komplizierter Reepithelisierungsphase sollten jedoch mit hydroaktiven Wundauflagen behandelt werden [41].

In Deutschland gibt es schätzungsweise über 4 Mio. Menschen mit chronischen Wunden. Die entsprechenden Behandlungskosten werden auf etwa 5 Mrd. Euro jährlich geschätzt [20]. Aufgrund des Demografiewandels und der Tatsache, dass chronische Wunden meist ältere Menschen betreffen, ist anzunehmen, dass diese Zahlen eher steigen.

Der hohe Bedarf an modernen Wundauflagen und das große Potential des Siliciumdioxids sind eine gute Motivation, eine Wundaufgabe auf SiO_2 -Basis zu entwickeln. Es besteht großer Forschungsbedarf, um die biochemischen Einflüsse des Siliciumdioxids auf, den Gewebeauf- und umbau zu verstehen. Ein Hautdefektmodell ist geeignet, um dies zu untersuchen und gleichzeitig eine

Silica enthaltende Wundauflage zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit werden schwach vernetzte Silicastrukturen im Nanometerbereich im Sol-Gel-Prozess hergestellt und zu einem Nanokomposit für eine Wundauflage weiterentwickelt. Da SiO_2 spröde ist und damit nicht die geeigneten rheologischen Eigenschaften hat, um als Wundauflage zu dienen, wurde ein Additiv gesucht. Dieses Additiv muss natürlich biokompatibel sein und in Kombination mit den Silicastrukturen eine gut handhabbare Wundauflage ergeben. Zusätzlich sollten die Interaktionen mit den Silicastrukturen nicht zu stark sein, damit diese für die Wundheilung zur Verfügung stehen. Polyvinylpyrrolidon (PVP) hat sich als beste Alternative für diesen Zweck ergeben. Dieses Polymer wird schon länger in der Medizin verwendet, kann mit Wasser zu einem elastischen Gel verarbeitet werden und geht mit SiO_2 -Oberflächen nur Wasserstoffbrückenbindungen ein. Bevor dieses PVP- SiO_2 -Nanokompositmaterial *in vivo* und *in vitro* getestet wurde, wurden Strukturuntersuchungen durchgeführt, um die Interaktionen zwischen dem Polymer und den Silicastrukturen zu verstehen.

Für die Entwicklung einer Wundauflage aus dem Nanokomposit wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum Einen wurde ein trockenes Vlies entwickelt, welches bei stark sezernierenden Wunden angewendet werden kann. Zum anderen wurde eine feuchte Wundauflage entwickelt, die auch bei trockenen Wunden ein feuchtes Wundmilieu erzeugt. Beide sollen schwach vernetzte Silicaaggregate im Nanometerbereich freisetzen können, um die Wundheilung positiv zu beeinflussen.

2 Stand der Technik

2.1 Sol-Gel-Prozess

Genutzt wird der Sol-Gel-Prozess in Verfahren zur Synthese nichtmetallischer, anorganischer oder anorganisch-organischer Werkstoffe aus kolloidalen Dispersionen, den Solen.

Es können optische Gläser, dünne Beschichtungen oder Fasern mit diesem Vorgang hergestellt werden, wobei sich die industriellen Anwendungen auf die dünnen Schichten konzentrieren. Diese sind vergleichbar mit Schichten, die durch Kathodenzerstäubung hergestellt werden [95].

Der Sol-Gel-Prozess läuft meist unter milden Bedingungen, also bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck ab. Dabei können aus ein und derselben chemischen Komposition, nur durch das Verändern einiger Prozessparameter, Materialien mit deutlich unterschiedlichen physikalischen Formen und Eigenschaften erzeugt werden.

Das Sol, welches am Anfang des Prozesses steht, kann aus Präkursoren hergestellt werden. Dies sind meist Metalle oder Halbmetalle, an die organische oder auch anorganische Gruppen gebunden sind. Diese Gruppen werden abgelöst und es bilden sich die kolloidalen Strukturen, die das Sol ausmachen. Diese Strukturen können, je nach Syntheseparameter, weiter miteinander aggregieren. Dabei erhöht sich die Viskosität und letztendlich wird ein Hydrogel gebildet. Ein Gel ist ein starres Netzwerk aus Solpartikeln mit interkonnektierenden Poren. Die Form des Netzwerkes und der Poren hängt stark von Parametern wie dem pH-Wert oder der Verdünnung ab. So können mitunter fraktale oder faserartige Strukturen erzeugt werden. Auch die Vernetzung kann beeinflusst werden.

Im Anschluss an die Gelbildung wird das Material meist getrocknet um das Lösungsmittel, welches in den Poren ist, zu entfernen. Dieser Prozess hat ebenso einen großen Einfluss auf das Endprodukt. Einfaches Trocknen auf einer

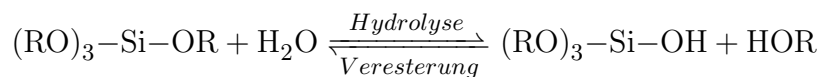
Heizplatte beispielsweise, erzeugt durch Kapillarkräfte große Spannungen im Gel, die zum Kollabieren der Strukturen führen. So entstehen Xerogele. Dies kann man durch überkritisches Trocknen umgehen und Aerogele herstellen, deren Nanostruktur erhalten bleibt. Durch anschließendes Erhitzen können Gläser oder Keramiken erzeugt werden. [75, 35]

2.1.1 Herstellung von Silicastrukturen mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses

Wie schon beschrieben, kann durch den Sol-Gel-Prozess eine Vielzahl an verschiedenen Strukturen erzeugt werden. Ziel ist es, dies zu nutzen, um Siliciumdioxidstrukturen herzustellen, die sich durch eine möglichst schwache Vernetzung auszeichnen. Weiterhin ist die Intention, diese Vernetzung steuern zu können.

Eine Methode ein SiO_2 -Sol herzustellen ist, es aus Natriumwasserglas zu gewinnen. Natriumwasserglas ($\text{Na}_2\text{O}(\text{SiO}_2)_x \cdot x\text{H}_2\text{O}$; $x = \{1, 2, 3, 4\}$) besteht aus SiO_2 -Strukturen im Nanometerbereich die in Wasser gelöst und durch Natriumionen stabilisiert sind. Um nun ein Sol zu gewinnen, muss lediglich das Natrium entfernt werden. Dies kann durch einen Ionenaustausch geschehen. Danach liegt ein wässriges Sol mit SiO_2 -Primärpartikeln vor.

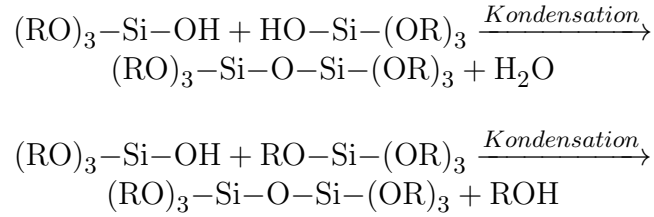
Eine andere Methode ein SiO_2 -Sol zu gewinnen, ist einen Präkursor zu verwenden, zum Beispiel Tetraethylorthosilikat (TEOS). Dem TEOS werden durch Hinzugeben von Wasser in einer Hydrolysereaktion (s.h. Schema 2.1) die organischen Anhänge (Ethylgruppen) entfernt und es entstehen Monomere. Zeitgleich mit der Hydrolyse setzt eine Kondensationsreaktion (s.h. Schema 2.2) ein, bei der die Monomere über Si–O–Si Bindungen kondensieren.



Schema 2.1: Hydrolyse und Veresterung von TEOS mit Wasser;
Der Molekülrest R ist in diesem Fall eine Ethylgruppe.

Das molare Verhältniss von Wasser zu TEOS wird als r_w -Wert bezeichnet. Da bei der Kondensation Wasser frei wird, reicht rechnerisch ein r_w -Wert von 2 aus, damit die Hydrolyse und die Kondensation vollständig ablaufen und ein wasserfreies SiO_2 -Gel entsteht. Dies kommt aber praktisch nicht vor [7].

Da TEOS und Wasser nicht mischbar sind, wird meist ein organisches Lösungs-



Schema 2.2: Kondensation von Kieselsäure über eine OH- bzw. eine Alkoholgruppe (RO)

mittel wie Ethanol verwendet. Dieses beteiligt sich an den Reaktionen wie an der Rückreaktion der Hydrolyse, der Veresterung (s.h. Schema 2.1). Es ist durchaus möglich ohne ein Lösungsmittel auszukommen, da Ethanol bei der Hydrolyse als Nebenprodukt entsteht und sich so im Laufe der Reaktion mehr und mehr TEOS und Wasser miteinander vermischen.

Um die Hydrolyse zu beschleunigen nutzt man Katalysatoren. Dies können Basen oder Säuren sein. Bei der sauer katalysierten Hydrolyse protoniert die Säure eine Alkoxygruppe des TEOS. Dadurch sinkt die Elektronendichte am Si-Atom und es ist angreifbarer durch Wasser. Das hat zur Folge, dass die Hydrolyserate steigt. Bei der basisch katalysierten Hydrolyse wird das Si-Atom des TEOS durch nukleophile Hydroxylanionen angegriffen, die durch die Dissoziation des Wassers unter den basischen Bedingungen entstanden sind [7].

Sowohl der r_w -Wert, der Lösungsmittelanteil und der pH-Wert haben einen Einfluss auf die Kondensation und somit auf die Strukturbildung. Im Allgemeinen kondensiert SiO_2 von Monomeren über Dimere und Trimere zu zyklischen Strukturen und weiter zu SiO_2 -Polyedern, den Primärpartikeln des Sols. Im basischen Milieu entstehen dann größere, sphärische Partikel. Bei niedrigen pH-Werten oder auch in Anwesenheit von Salzen entstehen dreidimensionale Gel-Netzwerke [44]. Speziellere Sole können beispielsweise aus TEOS bei einem r_w -Wert von etwa 1 bis 2 und 0.01 M HCL hergestellt werden. Diese Sole sind spinnbar [76]. Ist der r_w -Wert jedoch höher oder die Hydrolyse basisch katalysiert, entstehen keine spinnbare Sole mehr. Die schon besprochenen, monodispersen, sphärischen Partikel entstehen unter basischen Bedingungen und hohen r_w -Werten durch den Stöber Prozess. Bei diesen Bedingungen aggregiert das SiO_2 zu Partikeln, die ab einer bestimmten Größe aufgrund von Abstoßungseffekten stabil sind [83].

Der pH-Wert beeinflusst sowohl die Löslichkeit als auch die Oberflächenladungen der SiO_2 -Moleküle. In SiO_2 -Solen ist die Netto-Oberflächenladung bei einem

pH-Wert von etwa 2 neutral [64]. Dieser Punkt wird isoelektrischer Punkt genannt. Da an diesem Punkt wenig $\equiv\text{SiOH}^+$ oder $\equiv\text{SiO}^-$ -Gruppen an der SiO_2 -Oberfläche sind, die bei der Aggregation von Partikeln involviert sind [44], braucht ein Sol dort länger zum Gelieren. Ist der pH-Wert des Sols kleiner als der isoelektrische Punkt, also kleiner als 2, ist die Netto-Oberflächenladung der SiO_2 -Partikel positiv. Dadurch gibt es viele $\equiv\text{SiOH}^+$ und die Gelübergangszeit des Sols sinkt. Bei höheren pH-Werten steigt der Anteil an $\equiv\text{SiO}^-$ und die Gelübergangszeit sinkt auch. Der isoelektrische Punkt ist also ein Punkt, an dem die Gelübergangszeit ein lokales Maximum besitzt. Ab einem pH-Wert von 7 bis 8 steigt die Gelübergangszeit wieder, da die negativ geladenen Partikel sich nun immer stärker elektrostatisch abstoßen. Auch erhöht sich die Löslichkeit von SiO_2 in Wasser ab einem pH-Wert von 9 stark, sodass eine Gelbildung bei hohen pH-Werten nicht eintritt bzw. sehr lange dauert. Die Löslichkeit des SiO_2 ist auch von der Größe der Strukturen abhängig. Kleinere sind besser löslich als größere. Diese Löslichkeitsunterschiede führen in Gelen zu einer Reifung, der Ostwaldreifung. Dabei lösen sich im Mittel mehr kleinere Strukturen auf und das gelöste SiO_2 aggregiert wieder. Im Laufe der Zeit werden so die größeren Strukturen größer und die kleinen verschwinden [85]. Für die Entwicklung einer Wundauflage, welche auf SiO_2 -Strukturen basieren soll, ist deren biologische Aktivität wichtig. Es sollen schwach vernetzte Silicaaggregate im Nanometerbereich verwendet werden, da die angenommene Hypothese besagt, dass sie den Gewebeauf- und umbau positiv beeinflussen. Solche Aggregate sollen mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses hergestellt werden, da dieser über weitreichende Möglichkeiten verfügt, die Struktur der Silicaaggregate einzustellen.

2.2 Biologische Wirksamkeit des SiO_2

Die biologische Wirksamkeit von SiO_2 ist im allgemeinen wenig bekannt. Relativ bekannt ist die Krankheit Silikose, eine Form der Fibrose, die durch das Einatmen von Quarzstäuben hervorgerufen wird. Partikel, die Silikose hervorgerufen sind kristallin und haben eine Größe im Mikrometerbereich. Bei Untersuchungen, ob auch Partikel im Nanometerbereich fibrogen sind, wurde festgestellt, dass diese weitaus geringere fibrogene Eigenschaften aufweisen [16]. Inzwischen hat Siliciumdioxid bzw. Silicium einen gewissen Bekanntheitsgrad

bei den Nahrungsergänzungen erhalten. Man kann Kieselerde kaufen oder Zeolithpräparate, die je nach Anwendung verschiedene Wirkungen haben sollen. Dass Silicium ein Spurenelement biologischer Systeme ist, ist schon länger bekannt [57]. Es kommt in der Natur am häufigsten als Siliciumdioxid vor und wird auch so in biologischen Systemen verstoffwechselt.

Verschiedene Diätversuche haben gezeigt, dass ein Mangel an Silicium bzw. SiO_2 zu Fehl- und Mangelwüchsen führt. In Abbildung 2.1 sind beispielhaft zwei Hühner aus einer Ernährungsstudie zu sehen, von denen das rechte wenig SiO_2 in die Nahrung bekam, das linke mehr [14]. Auch Ratten zeigen bei siliciumarmer Kost ein vermindertes Körperwachstum [79, 81].

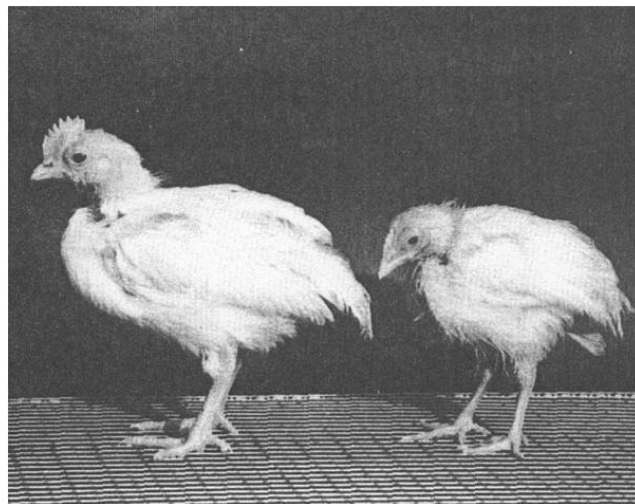


Abbildung 2.1: Vier Wochen alte männliche Hühner während einer mit Silicium ergänzten Diät (links) und einer Basisdiät mit wenig Silicium (rechts), aus [14].

Da SiO_2 im Knochen vorkommt [50, 10], ist es nachvollziehbar, dass erhöhte SiO_2 -Aufnahme die Knochendichte positiv beeinflusst und den Verlauf von Knochenkrankheiten wie Osteoporose verzögert [70, 47, 4]. Weiterhin wurde berichtet, dass Siliciumdioxid Arteriosklerose entgegenwirkt, den HDL- und LDL-Cholesterinspiegel zu Gunsten des HDL-Cholesterinspiegels verschiebt, den Triglyceridwert im Blut senkt und altersbedingten Endothelveränderungen in den Gefäßen entgegenwirkt [80, 78, 62, 56, 8].

SiO_2 wird hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen. Dabei wurde in einer britischen Studie herausgefunden, dass Männer Siliciumdioxid vorwiegend durch Bier und Bananen zu sich nehmen, während es bei Frauen Bananen und grüne Bohnen sind [46]. Viel SiO_2 ist u.a. in Bier, Bohnen, Datteln, Bananen,

braunem Reis, und Dinkel zu finden [67].

Da Siliciumdioxid sehr vielfältig auf der Erde vorkommt und wichtig für Lebewesen ist, stellt sich die Frage, welches SiO_2 für Organismen, speziell den Menschen, brauchbar ist. Ein Quarzkristall oder ein Stück Kieselglas können beispielsweise nicht durch den Körper aufgeschlossen werden. Monokieselsäure dagegen ist bioaktiv wie folgendes Beispiel zeigt. Calomme hat bei seinen Fütterungsversuchen an Kälbern den SiO_2 -Gehalt der Nahrung durch stabilisierte Monokieselsäure um nur 4,9% erhöht, was sowohl einen Anstieg von 70% des Siliciumgehaltes im Blutserum zur Folge hatte als auch den Kollagengehalt in der Haut erhöhte [9]. Monokieselsäure ist nicht vernetztes SiO_2 und sehr bioaktiv, dagegen werden stark vernetzte SiO_2 -Strukturen, wie Quarzkristalle oder auch Kieselglas, nicht verstoffwechselt. Lakshminarayanan hat gezeigt, dass die SiO_2 -Strukturen in Pflanzen schwach vernetzt und amorph sind. Die SiO_2 -Strukturen in Schachtelhalm und Dinkel sind beide aus Primärpartikeln im Bereich von 4 nm aufgebaut [49].

Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Sud aus Ackerschachtelhalm (*equisetum arvense*) als Wundauflage bei Kaninchen eine größere Wundkontraktion hervorruft [32]. Auch werden dem Ackerschachtelhalm antidiabetische [74], blutstillende und andere heilende Wirkungen zugeschrieben [63]. Er wird in der Naturheilkunde u.a. bei Nierenleiden, Harnwegserkrankungen, rheumatischen Beschwerden und auch als Wundauflage bei schlecht heilenden Wunden eingesetzt [77]. Ob diese Wirkungen auf dem hohen SiO_2 -Gehalt beruht, der bis zu 25% der Trockenmasse betragen kann [39], ist nicht ausreichend geklärt. Dass in biologischen Systemen meistens schwach vernetztes SiO_2 vorliegt, legt die Schlussfolgerung nahe: Je schwächer vernetzt das Siliciumdioxid ist, desto brauchbarer ist es für den Organismus.

Das Knochenaufbaumaterial Nanobone[®] macht sich diesen Zusammenhang zu Nutze. Es besteht aus Hydroxylapatitplättchen, die in eine SiO_2 -Matrix eingebunden sind. Diese SiO_2 -Matrix ist schwach vernetzt, amorph und bioaktiv. In den Körper eingebracht, vollzieht diese Matrix einen Matrixwechsel ohne seine Form zu verlieren. Das SiO_2 wird sehr schnell durch körpereigene Proteine ausgetauscht und das Material so maskiert [91].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SiO_2 wichtig und nötig für Organismen ist, speziell für den Bindegewebsaufbau. Es hat sich gezeigt, dass es einen großen Einfluss auf die Kollagensynthese hat. Je schwächer das SiO_2 in

einem Netzwerk gebunden ist, desto bioaktiver ist es.

2.3 PVP

Eine gut handhabbare Wundauflage sollte elastisch und anschmiegsam und nicht spröde sein. SiO₂-Gele sind jedoch spröde. Deshalb muss auf ein Additiv zurückgegriffen werden, welches diese Eigenschaft unterdrückt. Voruntersuchungen haben ergeben, dass sich Polyvinylpyrrolidon (PVP) gut dafür eignet. PVP (Abb. 2.2) ist ein weißes, hygroskopisches Pulver. Es kann durch radikalische Lösungsmittelpolymerisation aus Vinylpyrrolidon in Wasser oder organischen Lösungsmitteln hergestellt werden. Die Molmassen üblicher Polyvinylpyrrolidone liegen zwischen 2000 und 2500000 g/mol. PVP wird typischerweise über die Eigenviskosität, den *K*-Wert charakterisiert, welcher direkt mit der molaren Masse zusammenhängt. PVP liegt in Lösung als Knäuel vor. In

0,9%-iger NaCl Lösung liegen die Knäueldurchmesser zwischen 1 bis 100 nm [29]. Einige *K*-Werte, deren zugehörigen molaren Massen und die mittlere Knäuelgrößen sind in Tabelle 2.1 dargestellt. PVP hat eine Glastemperatur, die von der molaren Masse abhängt (s.h. Tabelle 2.1). Sie reicht von etwa 95 °C für niedrige Molekulargewichte bis etwa 175 °C für hohe Molekulargewichte. Die Pyrrolidoneinheiten des PVP haben eine sehr polare Struktur und sind daher in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Dies ist auch der Grund, weshalb sich PVP gut in Wasser und vielen polaren Lösungsmitteln lösen lässt.

PVP lässt sich in wässriger Lösung chemisch oder durch Bestrahlung mit Gammastrahlen oder UV-Strahlung quervernetzen [59, 2, 45, 23, 36]. Chemisch kann es mit starken Basen, anorganischen Persulfaten oder Peroxiden quervernetzt werden. Dabei kann durch Radikale sowohl die Vinylkette als auch der Pyrrolidon-Ring geöffnet werden. Das an dieser Stelle entstandene Makroradikal kann dann mit anderen Makroradikalen eine kovalente Bindung eingehen und

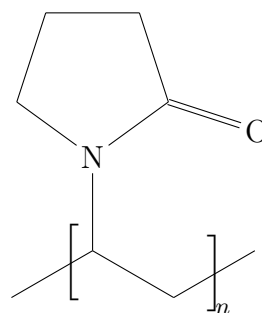


Abbildung 2.2: PVP

<i>K</i> -Wert	molare Masse [Da]	Knäueldurchmesser [nm]	Glasübergangstemperatur [°C]
12	2500	3	97
17	10000	5	109
25	25000	10	141
30	40000	20	158
90	110000	100	178

Tabelle 2.1: Zusammenhang zwischen *K*-Wert, molarer Masse und Knäuelgröße bei Lösung in 0,9 %-iger NaCl Lösung von PVP nach [29]

sich so das PVP-Molekül mit einem anderen oder demselben an anderer Stelle verknüpfen [2]. Bei der Bestrahlung mit UV-Strahlen entstehen im Wasser Hydroxylradikale, die den Pyrrolidon-Ring angreifen. Dadurch entstehen wieder Makroradikale, welche die Quervernetzung bedingen. Die UV-Strahlung kann aber auch die PVP-Kette oder die Pyrrolidon-Ringe radikalisieren und selber Makroradikale bilden. Bei dieser Methode werden die PVP-Ketten durch das Öffnen dieser nicht signifikant kleiner [96]. Da Gammastrahlen eine höhere Energie besitzen, können sie sowohl Radikale im Lösungsmittel und Makroradikale erzeugen als auch kovalente Bindungen der PVP-Moleküle aufbrechen. Die Quervernetzung erfolgt dann wieder durch die inter- und intramolekulare Bindung zweier Makroradikale [36, 48]. Durch die Quervernetzung verliert PVP die Wasserlöslichkeit, wird jedoch quellfähig und kann mit Wasser ein Hydrogel bilden.

Pharmakologisch wird PVP schon länger verwendet. Im 2. Weltkrieg wurde PVP unter dem Namen Periston als Blutplasmaersatz eingesetzt. 1952 wurde auf Grund der langfristigen Speicherung des Peristons im Körper, das Molekulargewicht von 50000 u auf 25000 u herabgesetzt [33]. Es hat sich gezeigt, dass die Knäuelgröße und somit das Molekulargewicht entscheidend für die Ausscheidung des PVP ist. Da die Nierenkapillaren nur etwa 8 nm groß sind, können diese nur von Molekülen mit maximal dieser Größe passiert werden. Ravin hat gezeigt, dass innerhalb von 6 Stunden nach der Infusion, PVP mit einem Molekulargewicht von 30000 u vom Menschen ausgeschieden wird. Danach verlangsamt sich die Ausscheidungsrate und die Molgewichte der ausgeschiedenen PVP-Ketten steigen an [69]. PVP verbleibt also nicht im Körper. Die Toxizität von PVP ist sehr gering. Die mittlere letale Dosis, also die Dosis bei der 50 % der beobachteten Population verstorben sind, wird mit $LD_{50} > 100$ g/kg Körpergewicht für Ratten und Meerschweinchen angegeben [61].

PVP findet eine weite Verbreitung im medizinischen Raum als Komplexbildner mit Iod. Dieses sogenannte Povidon-Iod wird als Antiseptikum bzw. Desinfektionsmittel verwendet. Das Iod ist dabei zwischen zwei Pyrrolidon-Ringe des PVP über Wasserstoffbrücken an den Sauerstoff gebunden [94]. Der Komplex aus Iod und PVP ist gut wasserlöslich, während Iod schlecht in Wasser gelöst werden kann und so schwieriger als Desinfektionsmittel einsetzbar wäre.

Der Umstand, dass quervernetztes PVP ein quellfähiges Hydrogel ist, macht es attraktiv für eine Wundauflage. In Verbindung mit Silicaaggregaten kann es deren Vernetzung und Gelbildung unterbinden und so als anschmiegsames, nicht sprödes Material für eine Wundauflage dienen. Die Medizinische Anwendung von Hydrogelen auf PVP-Basis ist Gegenstand aktueller Forschung [37, 45, 51, 73, 72].

2.4 Wunde

Eine Wunde ist das Resultat einer Störung normaler anatomischer Struktur und Funktion von Gewebe [52]. Es ist schwierig Wunden im Allgemeinen zu klassifizieren. Die wichtigsten Fakten sind die Art der Verletzung, wie tief die Wunde ist, die Zeit, die seit Eintreten der Verwundung vergangen ist und ob es sich um eine akute oder chronische Wunde handelt. Bei der Art der Verletzung ist beispielsweise zu unterscheiden, ob die Wunde durch eine Infektion oder eine Verbrennung zu Stande kam, oder ob Abscherungen, Schnitte oder Quetschungen die Ursache sind. Die Fähigkeit eine Wunde zu Heilen, hängt auch von ihrer Tiefe ab. Man unterscheidet zwischen oberflächlichen, tiefermalen und Vollhautwunden.

Die Zeit spielt insofern eine Rolle, dass, je länger eine Wunde offen ist, desto mehr Krankheitserreger ihre Oberfläche besiedeln. Nach durchschnittlich 5 Tagen ist eine Wunde mit Bakterien kolonisiert und somit chronischer Natur [65].

Akute Wunden durchlaufen normalerweise einen geordneten Wundheilungsprozess, der die Wiederherstellung der normalen anatomischen Struktur und Funktion zum Ziel hat [52].

Bei chronischen Wunden ist dieser Heilungsprozess gestört oder er wird nicht beendet [52]. Dies kann mehrere Gründe haben. Man unterscheidet einerseits lokale Faktoren, wie Fremdkörper in der Wunde, aufgequollenes Gewebe, Durch-

blutungsstörungen oder Infektionen und andererseits systematische, wie fortgeschrittenes Alter, Mangelernährung, Diabetes und Nierenerkrankungen, die einen Einfluss auf die Wundheilung haben können. Neben diesen lokalen und systematischen Einflüssen scheinen auch ein niedriges Niveau aktiver Wachstumsfaktoren, ein Ungleichgewicht zwischen Proteinase und deren Inhibitoren und seneszente Zellen den Heilungsprozess ungünstig zu beeinflussen [30, 52].

2.5 Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, den man in vier Phasen einteilen kann (Tabelle 2.2). Die erste Phase ist die Hämostase oder Blutstillung, welche sofort nach der Verletzung des Gewebes einsetzt. Durch das aus den verletzten Gefäßen austretende Blut werden Fremdkörper bzw. Krankheitserreger größtenteils ausgespült. Sekunden danach verengen sich die Gefäße, um einen größeren Blutverlust zu vermeiden. Nun lagern sich Thrombozyten an den verletzten Gefäßwänden an und verklumpen. Es werden Gerinnungsfaktoren freigesetzt, Fibrin bildet ein Fasernetz, in dem sich weitere Thrombozyten festsetzen können – ein Blutgerinnsel bildet sich.

Während der Entzündungs- und Exsudationsphase wandern Leukozyten, zu denen u.a. Phagozyten (Fresszellen), Neutrophile und Lymphozyten gehören,

Phase	zelluläre Vorgänge
Hämostase	- austretendes Blut spült Fremdkörper aus - Vasokonstriktion der betroffenen Gefäße - Aggregation von Blutplättchen, Degranulierung und Fibrinbildung
Entzündungs- & Exsudationsphase	- Leukozyten wandern ein - Krankheitserreger, Zelltrümmer und toxische Stoffe werden abgebaut
Granulations- & Proliferationsphase	- Reepithelisierung, Angiogenese, Kollagensynthese - Fibroblasten wandern ein - Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix
Wundkontraktion/ Remodelling	- aktive Annäherung der Wundränder - Umwandlung des Granulationsgewebes zu Narbengewebe - Abbau und Reifung von Blutgefäßen

Tabelle 2.2: zelluläre Vorgänge während der Wundheilungsphasen nach [28]

in die Wunde ein. Dies sind Zellen des Abwehrsystems und für die spezifische und unspezifische Abwehr zuständig. Makrophagen, die zu den Phagozyten zählen, können Fremdkörper und Krankheitserreger umschließen und phagozytieren. Außerdem setzen sie wichtige Stoffe wie zum Beispiel proteolytische Enzyme (z.B. Kollagenasen und Elastasen), Wachstumsfaktoren und entzündungsfördernde Zytokine frei und unterstützen somit die Wundreinigung und -heilung [66, 54, 21]. Die Lymphozyten sind Teil der spezifischen Immunabwehr und tragen Antigene um bestimmte Krankheitserreger zu bekämpfen.

In der Granulations- und Proliferationsphase wandern nun Fibroblasten ein und ersetzen das Fibrinnetzwerk durch neues Bindegewebe. Weiterhin immigrieren Endothelzellen und bilden neue Blutgefäße, sodass die Wunde mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird.

Auf dem neu gebildeten Granulationsgewebe wandern Keratinozyten von den Wundrändern her in den Hautdefekt. Sie bilden eine neue Epithelschicht und verschließen so die Wunde. Schon während der Granulationsphase setzt die Wundkontraktion und die Remodellierung des Granulationsgewebes zu stabilerem Narbengewebe ein. Bei der Wundkontraktion wird das Wundvolumen verkleinert indem sich die Wundränder aktiv annähern. Das Umstrukturieren des Granulationsgewebes zu Narbengewebe ist durch ein Umbau von Typ-III-Kollagen zu Typ-I-Kollagen gekennzeichnet. Dieser Vorgang kann von mehreren Wochen bis zu Jahren dauern und auch danach beträgt die Reißfestigkeit der Narbe nur noch maximal 70 % der normaler Haut [82].

2.6 Wundauflagen

So vielfältig wie Wunden sein können, so vielfältig ist auch das Spektrum der Wundauflagen. Es reicht von einfachen Mullauflagen bis hin zu gezüchteten Gewebeteilen.

Strukturell besteht eine Wundauflage meist aus drei Schichten, einer Deckschicht zur Abgrenzung gegen die Umgebung, einer Adhäsivschicht zur Fixation der Wundauflage mit der umgebenden Haut und dem Wundfüller, der eigentlichen Auflage [40]. Es gibt sowohl Komplettsysteme, die alle drei Schichten vereinen als auch Auflagen, die nur ein oder zwei Schichten beinhalten. Grundsätzlich kann man zwischen Wundauflagen zur trockenen und feuchten

Wundversorgung unterscheiden. Bei der feuchten Wundversorgung muss nicht zwangsläufig auf eine feuchte Wundauflage zurückgegriffen werden. Wichtig ist nur, dass die Auflage ein feuchtes Wundmilieu gewährleistet. In Tabelle 2.3

Indikation zur trockenen Wundversorgung	Indikation zu feuchten Wundversorgung
- primärer chirurgischer Wundverschluss	- sekundär heilende Wunde
- unkomplizierte (akute) Bagatellwunde	- chronische Wunde
- Wunde in der abschließenden unkomplizierten Epithelisierungsphase	- mit nekrotischem Material belegte Wunde
- trockene Nekrose bei hochgradiger arterieller Minderdurchblutung	- fibrinbedeckte Wunde
	- großflächig unverschlossenes Granulationsgewebe

Tabelle 2.3: Wundtypen und ihre Behandlung nach [41]

sind einige Indikatoren von Wunden für eine trockene bzw. feuchte Wundbehandlung aufgelistet.

Üblicherweise werden Wundauflagen nach ihren Eigenschaften in drei größere Gruppen klassifiziert.

- inaktive (passive) Wundauflagen
- interaktive Wundauflagen
- aktive Wundauflagen

Inaktive Wundauflagen nehmen Sekret aus der Wunde auf. Sie schaffen kein spezielles Wundmilieu, und rufen, im Vergleich zur offenen Wunde, keine Veränderungen auf zellulärer Ebene hervor [40]. Beispiele sind Mullkompressen, welche zur Erstversorgung oder bei Druckverbänden genutzt werden, Gaze, als nicht haftende Verbände oder Saugverbände zur verstärkten Aufnahme von Exsudat [41].

Interaktive Wundauflagen verändern das Mikromilieu der Wunde und fördern so die Wundheilung. Zu ihnen zählen Hydrokolloide.

Sie bestehen aus Natrium-Carboxymethylcellulose, Pektin oder Gelatine, welches meist mit einer Polyurethanschicht abgedeckt ist [34]. Bei Flüssigkeitsaufnahme quellen Hydrokolloide auf das Vielfache ihres Eigengewichts. Eine

andere interaktive Wundauflage sind Alginat. Alginat sind Salze und Ester des Polysaccharids Alginsäure und werden aus Braunalgen gewonnen. Der Hauptbestandteil ist Kalziumalginat, welches unter Abgabe von Kalziumionen und Aufnahme von Natriumionen aus dem Wundexsudat zu einem hydrophilen Gel geliert [34].

Ähnlich wie Alginat gelieren auch Hydrofasern, aus Natrium-Carboxymethylcellulose bei Flüssigkeitsaufnahme. Im Gegensatz zu Alginaten verläuft dieser Prozess aber wesentlich schneller.

Eine weitere Gruppe interaktiver Wundauflagen bilden geschlossene Hydropolymere. Diese bestehen fast ausschließlich aus geschäumten Polyurethanen. Abhängig vom Grad der Schäumung und evtl. von der Einarbeitung eines Superabsorbers (Polyacrylate, z. B. Tielle[®] plus, Allione[®]) haben Polyurethane ein mäßiges bis sehr hohes Flüssigkeitsaufnahmevermögen [41]. Ein anderes Beispiel für eine interaktive Wundauflage, die Flüssigkeit aufnehmen und abgeben kann, sind die Hydrogele. Meist aus dreidimensionalen Netzwerken mit hydrophilen natürlichen (Stärke, Agar) oder synthetischen Polymeren (Polyurethan, Polyethylenoxid) mit einem sehr hohen Wasseranteil (35–96 %). Hydrogele gibt es in Form von Kompressen (z. B. Hydrosorb[®]-Gel-Verband, Geliperm[®]-Gelplatten) und als Gel im Applikator oder in Tuben (NU-GEL[®], Varihesive[®]-Hydrogel).

Aktive Wundauflagen greifen durch verschiedene Substanzen in die Biochemie der Wundheilung aktiv ein. Hyaluronsäure beispielsweise ist Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es ist an der Phagozytosefähigkeit der Makrophagen, der Organisation der extrazellulären Matrix und weiteren physiologischen Prozessen beteiligt [41]. Veresterte Formen der Säure werden als Granulat, Kompressen, Tamponaden oder Spray verkauft (Hyalofil[®], Hyalogran[®], [Textus] heal[®]). Andere aktive Wundauflagen sind Auflagen, die auf Kollagen basieren (ABE Collagen[®], Catrix[®], Nobakoll[®], Suprasorb[®]C) oder Kollagen in Kombination mit oxidiert regenerierter Zellulose (Promogran[®]) beinhalten. Sie hemmen die Neubildung der Matrixmetalloproteinasen bzw. binden die erhöhte Konzentration, die eine Deaktivierung der Wachstumsfaktoren und Abbau der zellulären Matrix bewirkt [41]. Der Abbau des zugeführten Kollagens selbst sorgt dafür, dass weitere Fibroblasten in die Wunde wandern und körpereigene extrazelluläre Matrix aufbauen [34].

Es gibt auch noch weitere Auflagen wie Aktivkohleverbände, die giftige bakterielle Stoffwechselprodukte oder auch Geruchsstoffe binden können (Carbonet[®], Carboflex[®]). Antibakterielle, Silber beinhaltende Auflagen (Acticoat[®] und Contreet[®] H) sind momentan sehr beliebt. Jedoch ist nicht endgültig geklärt, ob Silber wirklich die Wundheilung fördert oder Wundinfektionen signifikant verhindert [34]. Dünne semipermeable Polyurethanfilme (Tegaderm[®], Suprasorb[®] F) werden häufig auch als Wundabdeckung genutzt und eignen sich als solche, wenn schon ein Wundfüller genutzt wird.

Neben diesen Wundauflagen werden momentan schon Auflagen durch Tissue Engineering (Gewebekonstruktion bzw. -züchtung) hergestellt und verkauft. Dabei gibt es verschiedene Varianten: Auflagen, welche keine zellulären Bestandteile enthalten und die extrazelluläre Matrix nachahmen (Integra[®], Biobrane[®]). Sie dienen den Zellen als Vorlage und werden in das neu wachsende Gewebe eingebaut. Dabei sind sie bioresorbierbar, werden also vom Körper ab- und umgebaut [3].

Dann gibt es noch Wundauflagen, die Zellbestandteile beinhalten (Epicel[®], Myskin[®]). Sie bestehen aus einem Gerüst aus Glykosaminoglykane (u.a. Hyaluronsäure) oder Kollagen, in das vom Patienten entnommene Zellen eingebracht werden. Diese bilden dann unter den richtigen Bedingungen im Labor einen Hautersatz, der dann auf die Wunde aufgebracht wird. Die meisten Zellen in dem Hautersatz sterben, nachdem sie wieder in den Körper eingebracht werden, hinterlassen aber ihre extrazelluläre Matrix, die in der Wunde verbleibt und die Wundheilung unterstützt [6].

Es gibt auch Auflagen, bei denen die extrazelluläre Matrix aus toter Haut gewonnen wird (Alloderm[®]) [3]. Ein weiterer Hautersatz ist die eigene Haut, die als Vollhaut- oder Spalthauttransplantat eingesetzt wird.

3 SiO₂-PVP- Nanokompositmaterial

Um den Einfluss von SiO₂ auf die Heilung von kutanen Wunden zu untersuchen, wurden zwei Wundauflagen entwickelt, die Silicaaggregate im Nanometerbereich enthalten, ein trockenes Vlies und ein feuchtes Gel. Der Hypothese folgend, dass schwach vernetztes SiO₂ biologisch am aktivsten ist, sollten die SiO₂-Strukturen möglichst klein sein und nicht miteinander aggregieren. Gleichzeitig musste natürlich auch ein Augenmerk auf die Handhabbarkeit, also der erforderlichen mechanischen Eigenschaften, einer solchen Wundauflage gelegt werden und ein entsprechender Kompromiss aus idealer Struktur und Handhabung gefunden werden.

Da reine Siliciumdioxidgele sehr spröde sind und somit eine schlechte Handhabung aufweisen, kann diesen ein Additiv hinzugefügt werden, um ihnen eine gewisse Elastizität zu verleihen. Für diesen Zweck wurde ein Polymer ausgewählt. Ein weiter Vorteil des Polymers soll sein, dass es das Aggregieren der SiO₂-Strukturen verhindert, einer Vernetzung dieser also entgegenwirkt. Polyvinylpyrrolidon (PVP) erfüllt all diese Anforderungen. Da es unter anderem in der kosmetischen Industrie und der Pharmakologie eingesetzt wird, ist die medizinische Unbedenklichkeit auch hinreichend getestet [61]. Es ist außerdem durch die Eigenschaft, dass es bei Bestrahlung mit Gammastrahlen quervernetzt, besonders geeignet, da so aus einem wasserlöslichen Ausgangsmaterial ein wasserunlösliches Hydrogel erzeugt werden kann [53]. Außerdem hat quervernetztes PVP die Eigenschaft zu quellen, diese Eigenschaft kann gegebenenfalls genutzt werden, um überschüssiges Exsudat der Wunde aufzunehmen.

Zur Herstellung beider Wundauflagen wurde ein Kompositmaterial aus einer PVP-Lösung und einem SiO₂-Sol entwickelt.

Im Folgenden werden Struktur und physikalische Eigenschaften dieses SiO₂-PVP-Nanokomposits und seiner Ausgangsstoffe analysiert.

3.1 Herstellung nanostrukturierte Silicaaggregate

Die Gewinnung der Silicananostrukturen erfolgte über zwei Wege: Zum einen aus Natriumwasserglas (NaWa) und zum anderen über einen Sol-Gel-Prozess aus TEOS (Tetraethylorthosilikat).

Natriumwasserglas besteht aus SiO_2 -Aggregaten, die in Wasser suspendiert und von Natriumionen stabilisiert sind. Die Gewinnung der Aggregate erfolgt mit Hilfe eines Ionenaustauschers (Lewatit[®] MonoPlus SP 112 von Fluka), der die Natriumionen entfernt. Als Prozesskontrolle wird beim Ionenaustausch der Leitwert gemessen. Es wird eine verdünnte NaWa-Lösung (30g NaWa + 107,7g H_2O) mit einer Schlauchpumpe bei Raumtemperatur und einer Geschwindigkeit von 45 ml/min durch den Ionenaustauscher gedrückt. Der Leitwert des ausfließenden Sols ist konzentrationsabhängig und steigt von $< 10\mu\text{S}/\text{cm}$ auf ca. $550\mu\text{S}/\text{cm}$. Dort hat der Leitwert ein Plateau und fällt dann wieder auf $< 10\mu\text{S}/\text{cm}$ (Abb. 3.1). Der Leitwert des vorderen und des hinteren Bereichs

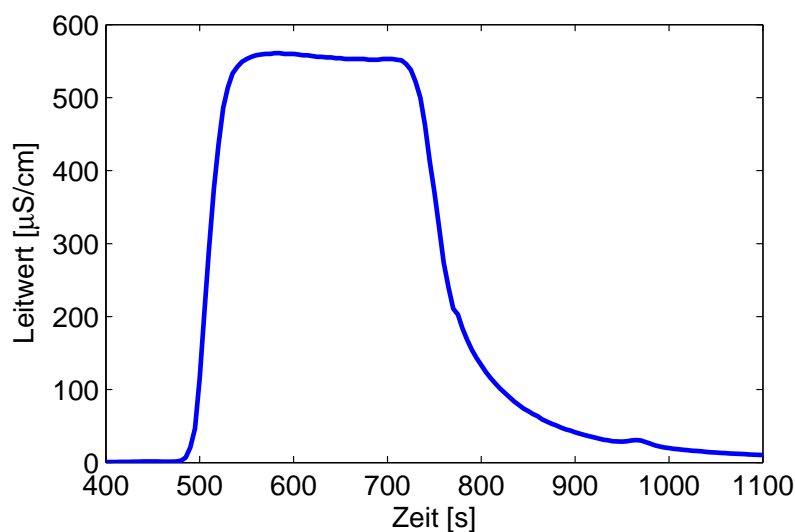


Abbildung 3.1: zeitlicher Verlauf des Leitwertes beim Ionenaustausch

sind durch vor- und nachlaufendes Wasser determiniert, das Plateau durch das SiO_2 -Sol. Die Flanken sind die Mischbereiche. Es wurde nun nur das Sol, welches einen Leitwert von $< 500\mu\text{S}/\text{cm}$ hat, aufgefangen. Das gewonnene Sol hat einen pH-Wert von $2,67 \pm 0,05$.

SAXS-Untersuchungen (Abb. 3.2) am Natriumwasserglas und am Sol konnten Aufschlüsse über die dispergierten SiO_2 -Aggregate erbringen. Die Aggregate der Natriumwasserglaslösung haben eine Größe von 0,7-1,0 nm. Die Größe

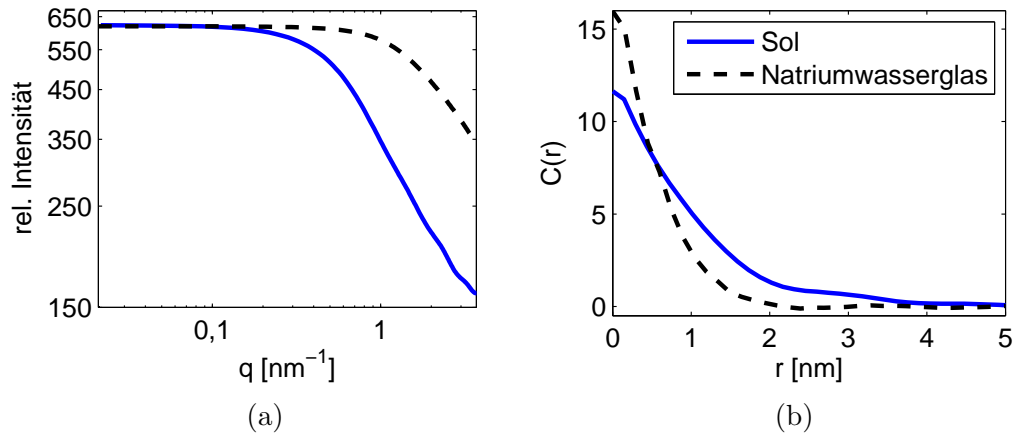


Abbildung 3.2: (a) geglättete Kleinwinkelstreuukurven von Natriumwasserglas und von einem Sol hergestellt aus Natriumwasserglas, eine Stunde nach dem Ionenaustausch bei pH 2,6; (b) errechnete Korrelationsfunktionen der Streukurven

der SiO₂-Aggregate des gewonnenen Sols hat sich auf etwa 1,3-1,6 nm vergrößert. Auch hat sich die durchschnittliche Clustergröße von 2 nm auf 4 nm verdoppelt. Dieses Sol hat bei einem pH-Wert von $2,67 \pm 0,05$ eine Gelbildungszeit von ca. zwei Tagen.

Die Erzeugung der Silicananostrukturen aus TEOS wird mit einer sauer katalysierten Hydrolyse des TEOS und anschließender Kondensation der entstehenden Moleküle realisiert (s.h. Kapitel 2.1.1 Schema 2.1 bzw. 2.2). Die entstehenden Aggregate sind etwa 0,5-0,7 nm groß. Das Sol geliert bei einem pH-Wert von 1 innerhalb von etwa 2 Wochen [19].

Der Unterschied der beiden Sole besteht darin, dass die SiO₂-Aggregate in wässriger (über NaWa) oder alkoholischer (über TEOS) Lösung vorliegen, wobei in der alkoholischen Lösung immer ein wenig Wasser und der verwendete Katalysator enthalten sind. Während die SiO₂-Strukturen in wässriger Lösung sofort verwendet werden können, muss der Alkohol, der Katalysator und die Alkoholgruppen von den Aggregaten in alkoholischer Lösung getrennt werden, da diese toxisch sind. Der Vorteil dieser SiO₂-Strukturen besteht jedoch darin, dass durch eine Veresterung die Vernetzung der Kondensate gesteuert werden kann [19]. So können durch eine Trocknung äußerst schwach vernetzte Xerogele hergestellt werden. Die Trocknung ermöglicht es sowohl den Alkohol als auch den verwendeten Katalysator (Oxalsäure), der sich oberhalb von 157°C zersetzt, zu entfernen. Des weiteren müssen die Alkoholgruppen, die bei der

Veresterung angebracht wurden, wieder entfernt werden. Dies kann durch die Rückreaktion der Veresterung der Hydrolyse erreicht werden. Die erzeugten Kondensate werden dazu mit verdünnter Oxalsäure, welche wieder als Katalysator dient, gespült.

Mit dieser Technik der Einflussnahme auf die Strukturvernetzung kann deren Einfluss auf die biologische Wirksamkeit des SiO₂ untersucht werden.

Das Nanokomposit für die Wundauflage wurde aus SiO₂-Strukturen in wässriger Lösung hergestellt. Die SiO₂-Strukturen in alkoholischer Lösung wurden zur Herstellung von Mikropartikeln benutzt (nach [19]).

3.2 PVP

Für die bessere der Handhabung von Silicaaggregaten als Wundauflage hinsichtlich der erforderlichen mechanischen Eigenschaften wurde PVP als Additiv eingesetzt. Das verwendete PVP ist Kollidon[®] 90F von BASF, welches für pharmakologische und medizinische Anwendungen zugelassen ist. Es liegt als weißes Pulver vor. Der K-Wert dieses PVP wird mit 85-95 angegeben und das Molekulargewicht mit 1000000-1500000 g/mol. Die Viskosität einer PVP-Lösung ist abhängig vom Feststoffgehalt (Abb. 3.3) und steigt mit zunehmender PVP-Konzentration an.

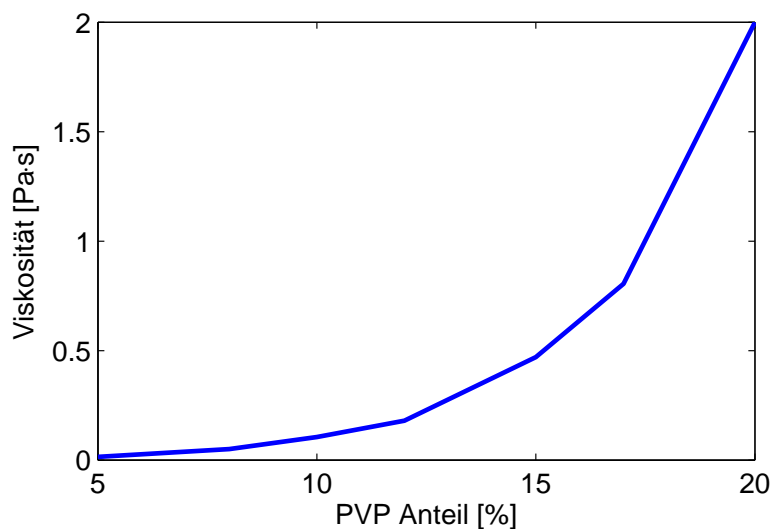


Abbildung 3.3: Viskosität in Abhängigkeit vom Feststoffgehalt einer PVP-Lösung

PVP ist hygroskopisch und bindet Wasser aus der Umgebungsluft. Da aus dem PVP wässrige Lösungen hergestellt werden, ist die Menge an gebundenem Wasser für die Zusammensetzung des Komposits relevant. Auch für kalorimetrische Messungen ist es wichtig zu wissen, bei welchen Temperaturen das Wasser desorbiert. Diese Temperatur und die Zersetzungstemperatur des Polymers können mit einer thermogravimetrischen Analyse (TGA) bestimmt werden. Diese Messung ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Die Desorp-

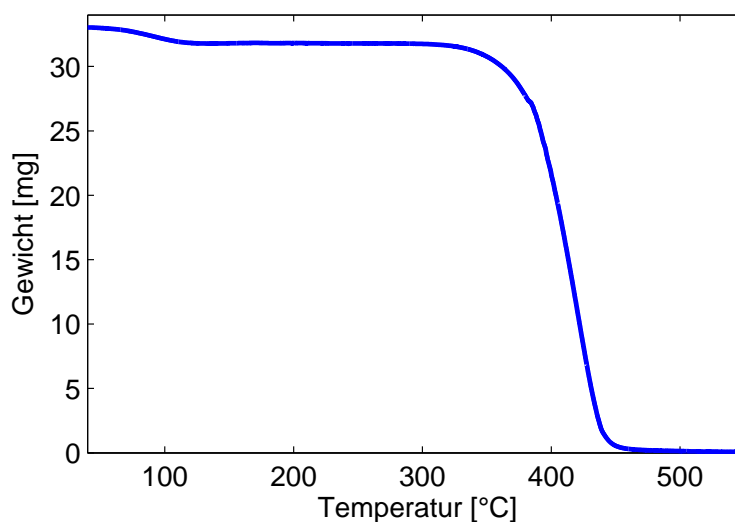


Abbildung 3.4: thermogravimetrische Analyse von Kollidon[®] 90K; gebundenes Wasser wird bis 130 °C abgegeben, das Polymer zersetzt sich ab 290 °C

tion des Wassers ist bei etwa 130 °C abgeschlossen und die thermische Zersetzung setzt ab 290 °C ein. Es ist am Gewichtsverlust zu erkennen, dass das Polymer 20% Wasser enthält, wenn es bei Raumtemperatur und Umgebungsluft gelagert wird. PVP hat einen Glasübergang, der vom Molekulargewicht abhängt. Das verwendete Kollidon[®] 90F hat ein vergleichsweise hohes Molekulargewicht, weshalb eine hohe Glasübergangstemperatur zu erwarten ist. Die Messung der Übergangstemperatur wurde mit Hilfe dynamischer Differenzkalorimetrie durchgeführt. Diese ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Die Glasübergangstemperatur des Kollidon[®] 90F beträgt 174 °C.

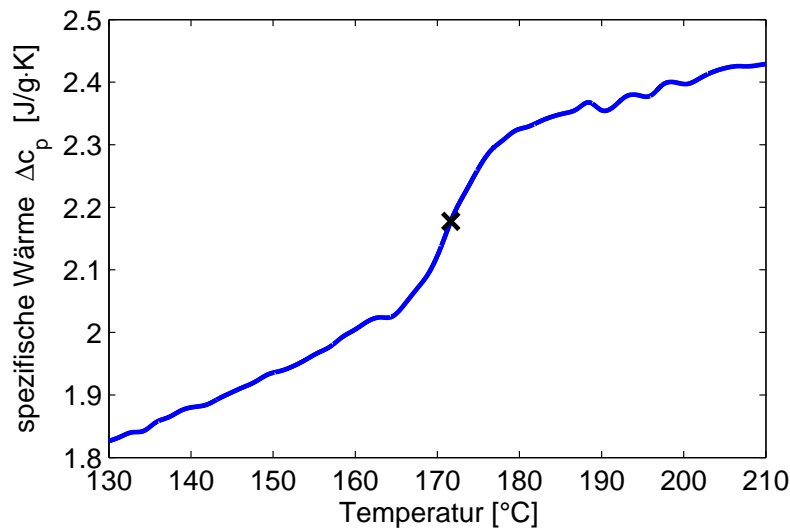


Abbildung 3.5: spezifische Wärmekapazität in Abhängigkeit von der Temperatur für PVP mit Glasübergangstemperatur (x)

3.3 Physikalische Eigenschaften des Komposits

Wie am Anfang dieses Kapitels schon beschrieben wurde, soll ein Material entwickelt werden, welches sich zur Herstellung von Wundauflagen eignet. Diese sollen Silicastrukturen im Nanometerbereich enthalten und abgeben können. Mit dem Material soll es möglich sein sowohl trockene als auch feuchte Wundauflagen zu generieren. Für die Herstellung einer feuchten Wundauflage muss das Material ein wasserunlösliches Gel bilden können. Für ein trockenes Vlies soll es möglich sein, mit dem Material eine poröse Struktur zu erzeugen. Natürlich muss das Material biokompatibel und leicht zu sterilisieren sein.

Reine SiO₂-Xerogele und -Hydrogele besitzen zwar diese Eigenschaften, sind jedoch zu spröde für eine Wundauflage. Somit war es nötig, ein geeignetes Additiv zu finden. Dieses soll biokompatibel und wasserunlöslich sein, ein Gel bilden können und möglichst schwache Bindungen mit SiO₂ eingehen. PVP hat sich als geeignet für diese Aufgaben erwiesen. Es ist biokompatibel, lässt sich in wässriger Lösung durch Bestrahlung zu einem wasserunlöslichen Gel verarbeiten und geht mit SiO₂-Oberflächen nur Wasserstoffbrückenbindung ein [92]. Wegen dieser Wasserstoffbrücken ergeben sich für das SiO₂-PVP-Komposit andere physikalische Eigenschaften als für die reinen Ausgangsstoffe. Auf diese Eigenschaften soll im Folgenden eingegangen werden.

Das SiO₂-PVP-Komposit wird aus einem wässrigen SiO₂-Sol und PVP in

wässriger Lösung hergestellt. Die SiO_2 -Strukturen wurden aus Natriumwasser-glas wie in Kapitel 3.1 beschrieben gewonnen. Unter ständigem Rühren wird nun das SiO_2 -Sol in die PVP-Lösung gegeben. Das SiO_2 -Sol hat dabei einen Feststoffgehalt von 6 % und die PVP-Lösung einen von 12 %. Diese Werte wurden experimentell ermittelt. Es soll so viel SiO_2 wie möglich in der Wundauf-lage sein und da beim Ionenaustausch auch immer SiO_2 am Austauschermaterial aggregiert, kann der Feststoffgehalt nicht beliebig hoch gewählt werden. Das Erzeugen eines Sols mit 6 % Feststoffgehalt erwies sich am optimalsten, da möglichst viel SiO_2 im Sol erhalten werden kann und möglichst wenig SiO_2 im Ionenaustauscher zurückbleibt. Die PVP-Lösung hat einen Feststoffgehalt von 12 %, da möglichst wenig PVP in der Wundauf-lage sein soll, jedoch noch genug um das Vernetzen der Silicaaggregate zu minimieren. Die beiden Dispersio-nen werden mit einem Masseverhältnis von eins zu eins vermischt. Beim Mischen der Dispersionen steigt die Viskosität an (Abbildung 3.6a) und die Lösung wird sofort weißlich trüb. Ab einem SiO_2 -PVP-Gewichtsverhältnis von etwa eins zu

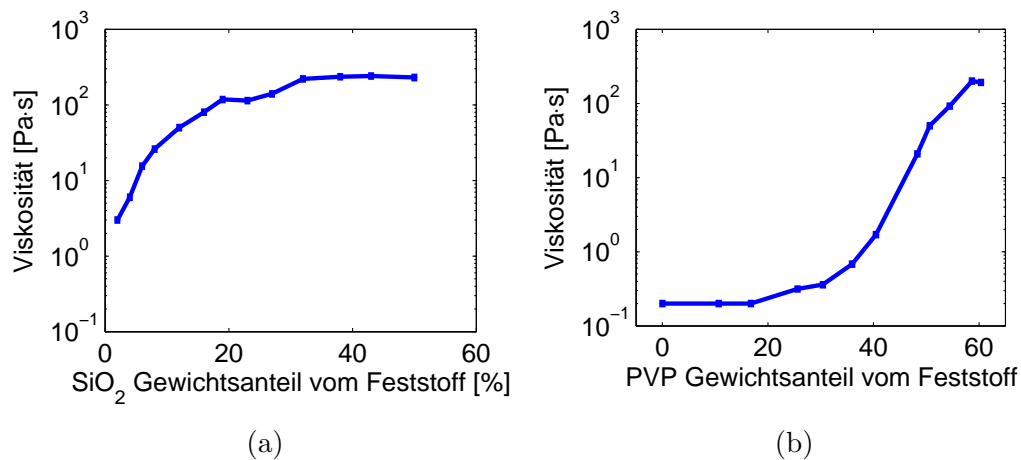


Abbildung 3.6: Viskosität beim Mischen des Komposits in Abhängigkeit vom SiO_2 -Gehalt im Feststoffanteil (a) durch Hinzugeben von einem SiO_2 -Sol in eine PVP Lösung. (b) zeigt die Viskosität in Abhängigkeit vom PVP-Gehalt im Feststoffanteil durch Hinzugeben einer PVP-Lösung zu einem SiO_2 -Sol. Der Gesamtfeststoffanteil beträgt jeweils 9 %.

eins lässt sich kein weiteres Sol mehr einrühren. Man kann auch dem SiO_2 -Sol eine PVP-Lösung hinzugeben, um dadurch einen größeren SiO_2 -Gehalt zu erreichen. In Abbildung 3.6b sind dazu entsprechende Viskositätsmessungen zu sehen. Die Viskosität steigt zuerst langsam an, ab 30 % PVP-Gewichtsanteil vom Feststoff steigt die Viskosität dann stärker an und erreicht schließlich

in etwa 80 % des entsprechenden Wertes bei umgekehrter Mischfolge. Beim Hinzugeben von PVP in das Sol entstehen aber sofort weiße Schlieren. Diese verschwinden auch bei starkem Rühren nicht. Durch weiteres Hinzugeben von PVP vermehren sich diese Schlieren bis die ganze Mischung schließlich weiß ist. Dies ist etwa bei 20 % PVP Gewichtsanteil vom Feststoff der Fall. Wegen des ungleichmäßigen Auftretens der Schlieren wurde beim Herstellen der Wundaufgaben und bei allen weiteren Untersuchungen an dem Komposit, immer ein SiO₂-Sol zu einer PVP-Lösung gegeben. Das Hinzugeben des SiO₂-Sols zur PVP-Lösung hat jedoch nicht zur Folge, dass keine Schlieren entstehen. Lichtmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 3.7) des Komposits zeigen ungeordnete fadenartige Gebilde. Diese Strukturen entstehen sobald SiO₂ in das PVP gegeben wird, da sie schon bei 1 % SiO₂ im Feststoffanteil zu erkennen sind. Daraus lässt sich ableiten, dass die Silicaaggregate anscheinend an die Polymerketten gebunden sind, die sich durch das Rühren ausrichten. Ab einem SiO₂-Anteil von 20 % ist das ganze Volumen von diesen Fäden durchzogen. Diese Strukturen sind auch in REM-Aufnahmen zu erkennen (s.h. Abb. 3.8). Für diese Aufnahmen wurde das feuchte Komposit in einem flüssiges Butan-Propan-Gemisch schockgefroren und dann per Sublimation getrocknet. So konnten die Strukturen des feuchten Komposits beim Trocknen, welches für die Hochvakuumbedingungen innerhalb des REM erforderlich ist, erhalten bleiben. Die stärkeren Vergrößerungen zeigen, dass die Strukturen in sich inhomogen sind und aus kleineren fädigen Strukturen bestehen.

Da die biologische Aktivität des SiO₂ von seiner Vernetzung abhängt, soll auch die Nanostruktur des Komposits aufgeklärt werden. Hierzu wurden SAXS-Untersuchungen mit verschiedenen SiO₂-PVP-Konzentrationen bei gleichem Feststoffgehalt von 9 % durchgeführt (Abb. 3.9). Die Intensität und die Anstiege der Streukurven (Abb. 3.9a) sind bei größeren Streuvektoren bis zu einem SiO₂-Gehalt von 10% im Feststoff gleich. Im Bereich kleinerer Streuvektoren ist ein Anstieg der Streuintensität mit steigendem SiO₂-Gehalt zu erkennen. Auch die Anstiege der Kurven werden steiler. Die Anstiege der Intensität und die steileren Anstiege der Kurven können sowohl auf den höheren SiO₂-Gehalt in den Proben als auch auf strukturelle Veränderungen in der Probe zurückzuführen sein. Die errechneten Korrelationsfunktionen der Streukurven (Abb. 3.9b) zeigen erst ab 10% SiO₂ im Feststoff Unterschiede. Der Einfluss des SiO₂ ist also erst dann zu erkennen. Mit steigendem SiO₂-Gehalt

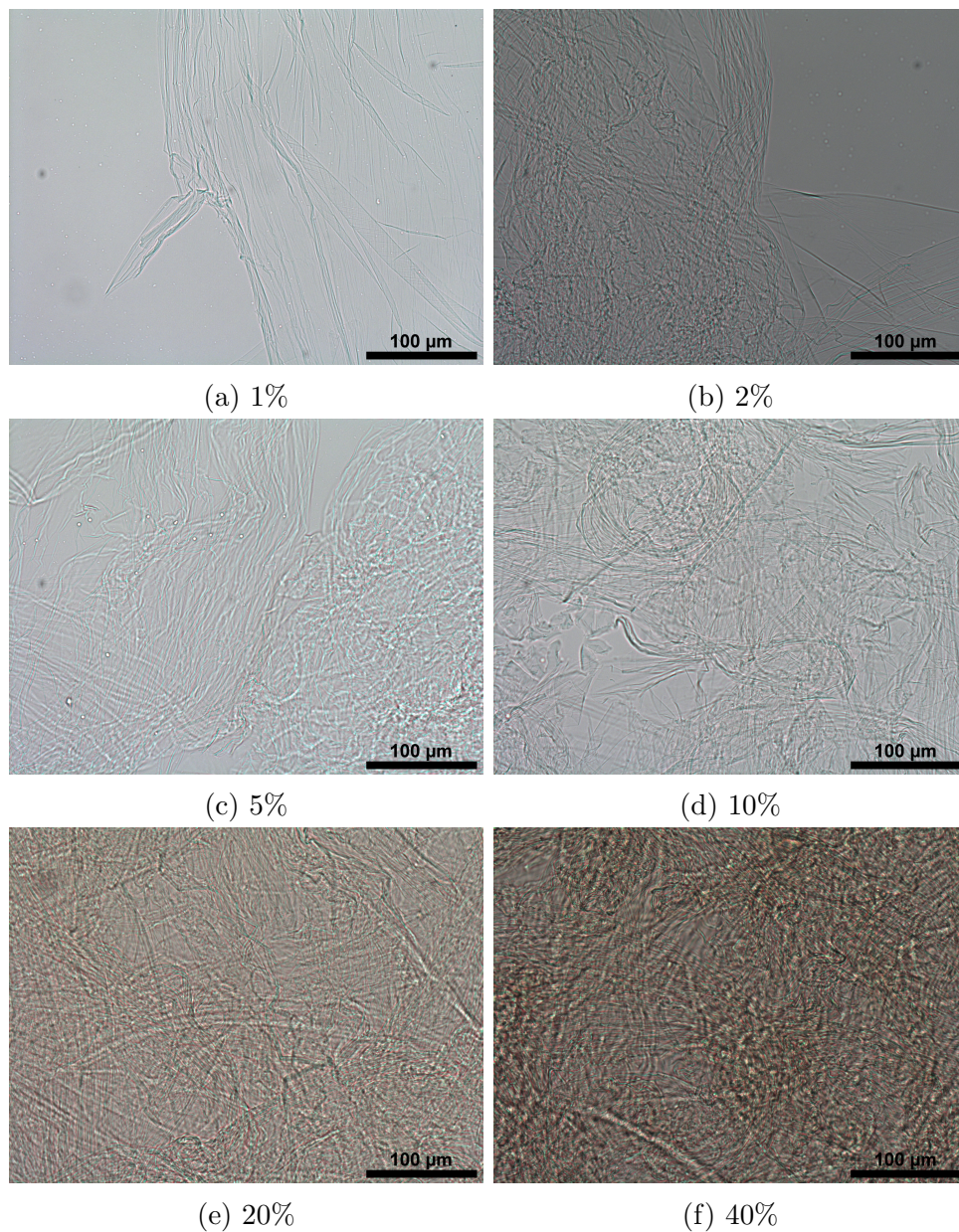


Abbildung 3.7: lichtmikroskopische Aufnahmen des SiO₂-PVP-Nanokomposits; Es ist jeweils der SiO₂-Anteil im Feststoffgehalt angegeben, welcher konstant bei 9% liegt.

wachsen nur die großen Strukturen, die kleinen bleiben etwa gleich groß. Die Primärpartikel im Komposit sind 2 - 2,3 nm groß und somit etwa 1,5 mal größer als die im Sol, welche 1,3 - 1,6 nm groß sind. Die durchschnittliche Clustergröße, also die Größe der Strukturen, die aus aneinander aggregierten Primärpartikeln entstanden sind, beträgt bei der Probe mit 20% SiO₂ im Feststoff 5 nm und bei 40% SiO₂ im Feststoff 7 nm. Das Wachsen der Primärpartikel ist auf den leicht

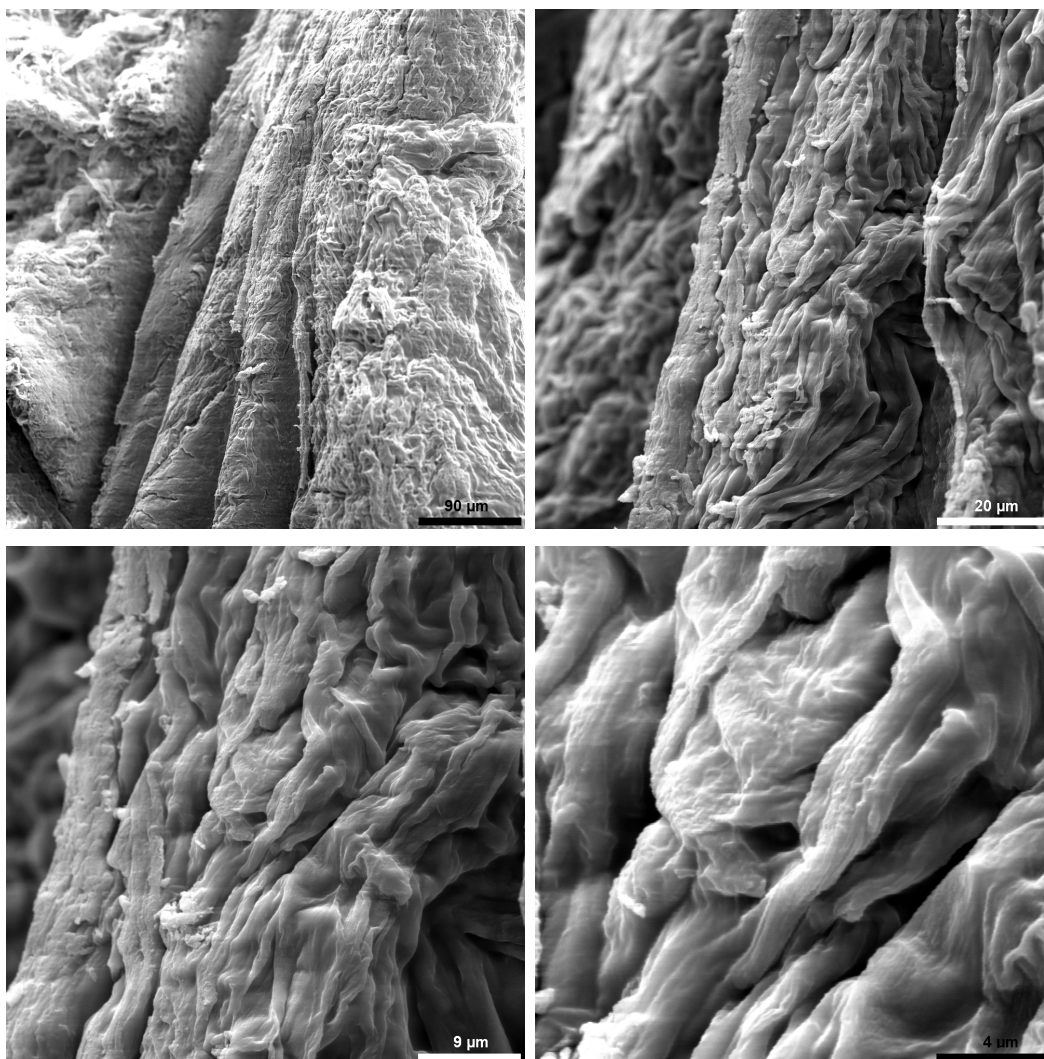


Abbildung 3.8: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des schockgefrorenen SiO_2 -PVP-Nanokomposits

höheren pH-Wert des Komposits gegenüber dem Sol zurückzuführen. Denn damit ändert sich auch die Löslichkeit des SiO_2 und sowohl Ostwald-Reifung als auch der Stöber-Prozess führen bei höheren pH-Werten zu größeren Partikeln. Die größeren Cluster können mit dem Mehr an SiO_2 -Aggregaten erklärt werden, welche nicht mehr durch das Polymer separiert werden können und somit wiederum miteinander aggregieren.

Wie schon in der Literatur beschrieben, geht PVP mit SiO_2 -Oberflächen Wasserstoffbrückenbindungen ein [92]. Ob diese Bindungen einen Einfluss auf die interne Struktur der SiO_2 -Aggregate hat, konnte mit Röntgengroßwinkelstreuung (WAXS) geklärt werden. Diese wurden an getrockneten Kompositproben mit

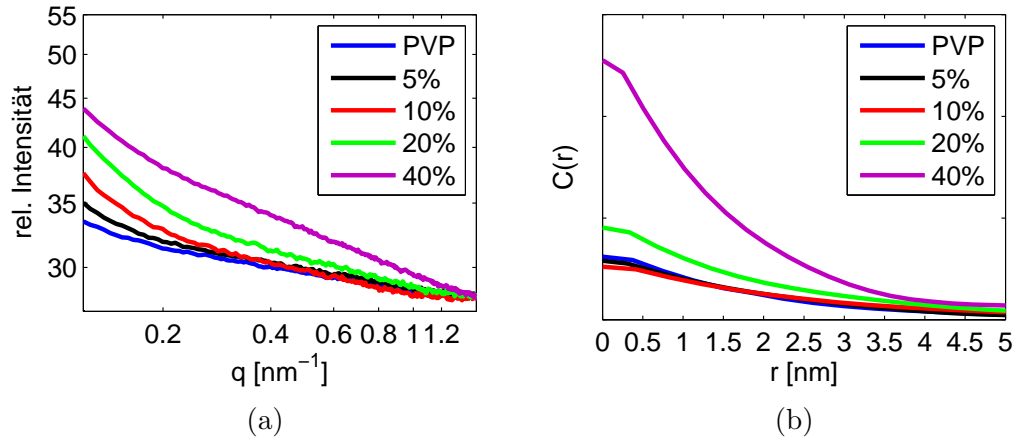


Abbildung 3.9: SAXS-Streukurven (a) und daraus errechnete Korrelationsfunktionen (b)) des SiO₂-PVP-Komposits mit gleichem Feststoffgehalt von 9% und variiertem SiO₂-PVP-Verhältnis (angegeben ist der Anteil von SiO₂ im Feststoffgehalt)

verschiedenen SiO₂-PVP-Konzentrationen und an einer Xerogelprobe durchgeführt. Für das Xerogel wurde, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, aus Natriumwasserglas ein Sol mit einem pH-Wert von 2,6 hergestellt. Dieses wurde bei Raumtemperatur 7 Tage verschlossen stehen gelassen, wobei es zu einem Hydrogel aggregierte. Anschließend erfolgte eine Trocknung über 3 Tage bei Raumtemperatur an Luft. Für die Kompositprobe wurde, wie im Kapitel 3.3 beschrieben, das Kompositmaterial jedoch mit verschiedenen SiO₂-PVP-Verhältnissen bei gleichem Feststoffgehalt von 9% hergestellt. Die Proben wurden trocken vermessen, da das Streusignal von Wasser im Bereich des Streusignals von PVP und SiO₂ liegt. Dazu wurden sie eine Stunde bei 130 °C getrocknet. Die Materialproben waren ca. 0,1 mm stark. Die entsprechenden Streukurven sind in Abbildung 3.10a zu sehen.

Erkennbar ist, dass die Proben, die mehr SiO₂ enthalten, einen starken Intensitätsanstieg bei kleinen Beträgen des Streuvektors aufweisen. Dies ist durch die vergleichsweise großen SiO₂-Strukturen, welche schon mit Hilfe der SAXS-Messungen untersucht wurden, zu erklären. Des Weiteren weisen die Streukurven 2 Maxima auf. Die Maxima resultieren aus der räumlichen Verteilung von Elektronendichteunterschieden. Im Falle der reinen SiO₂-Xerogel Probe tritt ein Maximum bei $(15,9 \pm 0,2) \text{ nm}^{-1}$ auf, das erste amorphe Hauptmaximum. Es entsteht, weil die SiO₂-Polyeder, aus denen das Xerogel zusammengesetzt ist, eine bestimmte Größe aufweisen [22].

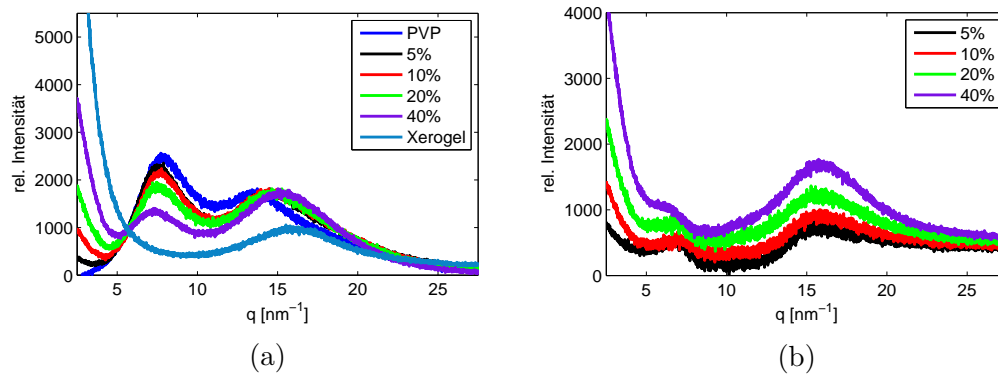


Abbildung 3.10: WAXS-Streukurven des getrockneten SiO_2 -PVP-Komposits mit variiertem SiO_2 -PVP-Verhältnis (angegeben ist der Anteil von SiO_2 im Feststoffgehalt);
 (a) zeigt die gemessenen Streukurven.
 (b) zeigt die gemessenen Streukurven von denen die Kurve der PVP-Messung subtrahiert wurde.

Die Streukurve des reinen PVP weist zwei breite Peaks auf. Der erste Peak, also der bei kleineren Beträgen des Streuvektors, wird auch erstes amorphes Hauptmaximum oder Polymerisationspeak genannt. Die für die Entstehung dieses Peaks verantwortlichen regelmäßig angeordneten Elektronendichteunterschiede sind die Kohlenstoffatome der PVP-Hauptkette [58, 17]. Über diesen Peak kann man also Aussagen zur Anordnung der PVP-Hauptkette machen. Der zweite Peak resultiert aus der Anordnung der Vinylpyrrolidon-Seitenketten, die auch eine gewisse Regelmäßigkeit aufweisen [17]. Die Streukurve des Komposits hat zwei Maxima, die aus der Überlagerung der jeweiligen Streuung des enthaltenen PVP und des SiO_2 entstehen. Unter der Berücksichtigung, dass PVP eine Dichte von $1,2 \text{ g/cm}^3$ hat und SiO_2 von etwa $2,2 \text{ g/cm}^3$ und dass doppelt so viel Masse PVP wie SiO_2 im Komposit ist, nimmt PVP in etwa 3,7 mal mehr Volumen ein als die SiO_2 -Aggregate. Man kann also davon ausgehen, dass die Anordnung der Polymerketten zueinander nicht von den SiO_2 -Aggregaten beeinflusst wird. Unter dieser Annahme, ist es möglich, den PVP-Anteil aus der Streukurve des Komposits durch Subtrahieren herauszurechnen. In Abbildung 3.10b sind errechnete Kurven zu sehen, die durch Subtraktion des PVP-Anteils von den Streukurven entstanden sind. Wie die Streukurve reinen Xerogels weisen sie ein Maximum bei $(15,8 \pm 0,2) \text{ nm}^{-1}$ auf. Dieses Maximum ist das erste amorphe Hauptmaximum des SiO_2 . Es ist nicht signifikant verschoben. Das PVP hat also keinen Einfluss auf die SiO_2 -

Polyeder und somit auch nicht auf die innere Struktur der Silicaaggregate. Im Gegensatz zum reinen Xerogel ist jedoch bei kleineren Beträgen des Streuvektors eine Schulter zu erkennen. Diese Schulter bei $(6,8 \pm 0,2) \text{ nm}^{-1}$ weist auf geordnete Strukturen hin, die einen relativ großen mittleren Abstand zueinander haben. In diesem Fall sind es die SiO_2 -Aggregate. Diese sind also im getrockneten Komposit nicht miteinander aggregiert und in einer PVP-Matrix separiert eingebunden. Es ist davon auszugehen, dass die SiO_2 -Aggregate auch im feuchten Komposit separiert vorliegen.

Um das Komposit weiter zu untersuchen, wurden analog zu den Messungen an PVP (s.h. Abb. 3.4), auch DSC-Messungen an ihm durchgeführt. In Abbildung 3.11a ist zu sehen, dass die Glasübergangstemperatur (T_g) mit höherem SiO_2 -Gehalt zu höheren Temperaturen verschoben wird. Gleichzeitig sinkt die Stufe in der spezifischen Wärmekapazität (Δc_p) (s.h. Abb. 3.11b). Das Ansteigen der Glasübergangstemperatur ist auf eine zunehmende Be-

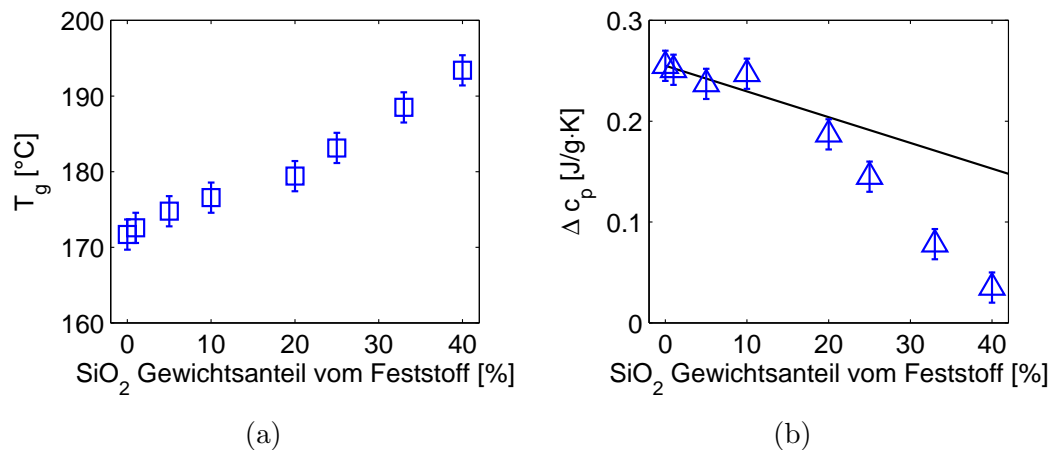


Abbildung 3.11: Glasübergang T_g (a) und spezifische Wärmekapazitätsstufe Δc_p (b) in Abhängigkeit vom SiO_2 -Gewichtsanteil des Feststoffs; Die schwarze Linie in (b) repräsentiert den Verlauf von Δc_p , welche nur vom SiO_2 -PVP-Verhältnis abhängt. Die Messwerte zeigen aber einen deutlich anderen Verlauf, was auf starr amorphe Bereiche schließen lässt.

weglichkeitseinschränkung der PVP-Ketten zurückzuführen. Da sich die SiO_2 -Aggregate über Wasserstoffbrücken an die PVP-Ketten binden und über diese eine Vernetzung der Ketten einhergeht, schränkt das die Beweglichkeit der Ketten ein. Das Absinken von Δc_p hat zum einen den Grund, dass mit höherem SiO_2 -Gehalt weniger PVP für den Glasübergang zur Verfügung steht, welches durch die schwarze Kurve in Abbildung 3.11 dargestellt wird. Zum anderen

bilden sich um die Aggregate starr-amorphe Bereiche des PVP aus, welche nicht an dem Glasübergang teilnehmen.

3.4 Physikalische Eigenschaften des quervernetzten SiO₂-Nanokomposits

Da sich PVP in Wasser löst, löst sich auch das SiO₂-PVP-Komposit in Wasser. Jedoch ist eine feuchte formstabile Wundaufgabe in feuchter Umgebung der angestrebte Anwendungsbereich des Komposits. Daher muss es wasserunlöslich sein. Quervernetztes PVP hat diese Eigenschaft. Die Quervernetzung kann chemisch, durch das Einbringen von Radikalen erreicht werden oder durch eine Bestrahlung mit Gammastrahlen. Dadurch entstehen aus dem vorhandenen Wasser Radikale, die für die Quervernetzung verantwortlich sind, oder die PVP-Moleküle werden direkt durch die Strahlung aufgebrochen und vernetzen sich dann erneut.

Für die Quervernetzung wurde hier die Bestrahlung mit Gammastrahlen einer ⁶⁰Co-Quelle gewählt, da so die chemische Umgebung des Komposits nicht durch Additive beeinflusst wird.

Die Bestrahlung erfolgte bei der Synergy Health Radeberg GmbH und die Dosis betrug 30 kGy bis 35 kGy. ⁶⁰Co zerfällt hauptsächlich über einen β⁻-Zerfall in einen angeregten Zustand von ⁶⁰Ni. Dieses geht über einen weiteren angeregten Zustand in den Grundzustand über. Es werden also zwei Strahlungsenergien emittiert. Die Energien der Gammastrahlung betragen 1,17 MeV und 1,33 MeV.

Um Strukturveränderungen während der Bestrahlung zu untersuchen wurden die vorangegangene Analysemethoden auch an dem bestrahlten Komposit durchgeführt. Das PVP wird durch die Quervernetzung zu einem Gel, auch das Komposit hat diese Eigenschaft, wodurch Viskositätsmessungen natürlich nicht möglich sind. Lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben keine Strukturänderungen (s.h. Abb. 3.12). Es sind wieder fadenartige Strukturen zu erkennen. Lediglich das Auftreten von Brüchen und Rissen im Material ist als Unterschied zu sehen. Diese resultieren aus Probenvorbereitung, da die Proben zwischen Objektträger gedrückt wurden, um eine möglichst dünne Probe zu erhalten.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. 3.13) zeigen ebenso keine

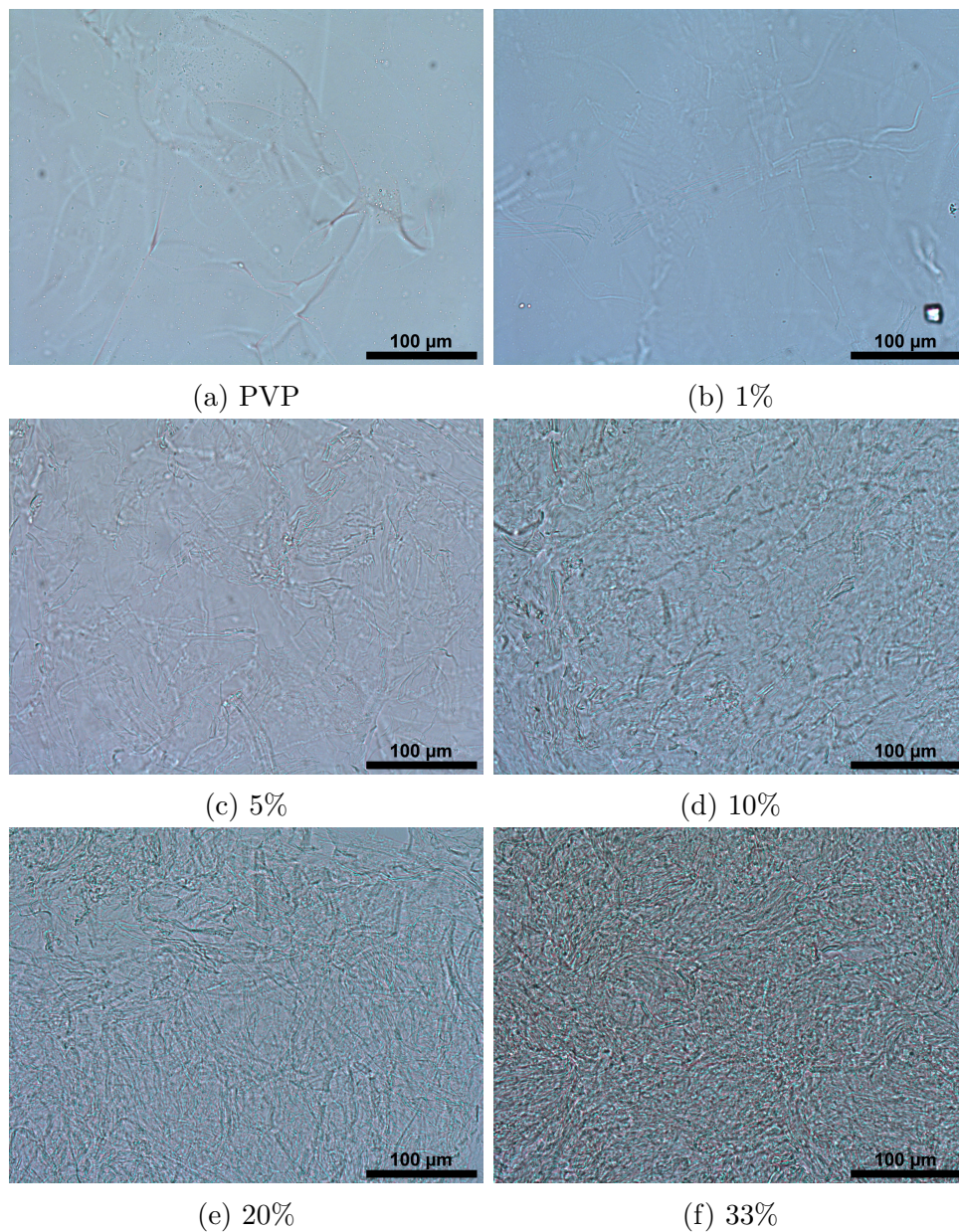


Abbildung 3.12: lichtmikroskopische Aufnahmen des SiO₂-PVP-Nanokomposits nach der Bestrahlung mit Gammastrahlen; Es ist jeweils der SiO₂-Anteil im Feststoffgehalt, der 9 % beträgt, angegeben.

strukturellen Unterschiede nach der Bestrahlung. Es sind auch hier die gleichen faserigen Strukturen zu erkennen wie schon bei den unbestrahlten Proben.

Die SAXS-Streukurven der Kompositproben, zu sehen in Abbildung 3.14, zeigen wie bei den unbestrahlten Proben ein Anwachsen der SiO₂ Strukturen. Jedoch ist hier das Wachstum schon ab 5 % SiO₂ im Feststoffanteil zu beobachten. Ein direkter Vergleich zwischen den Streukurven der unbestrahlten

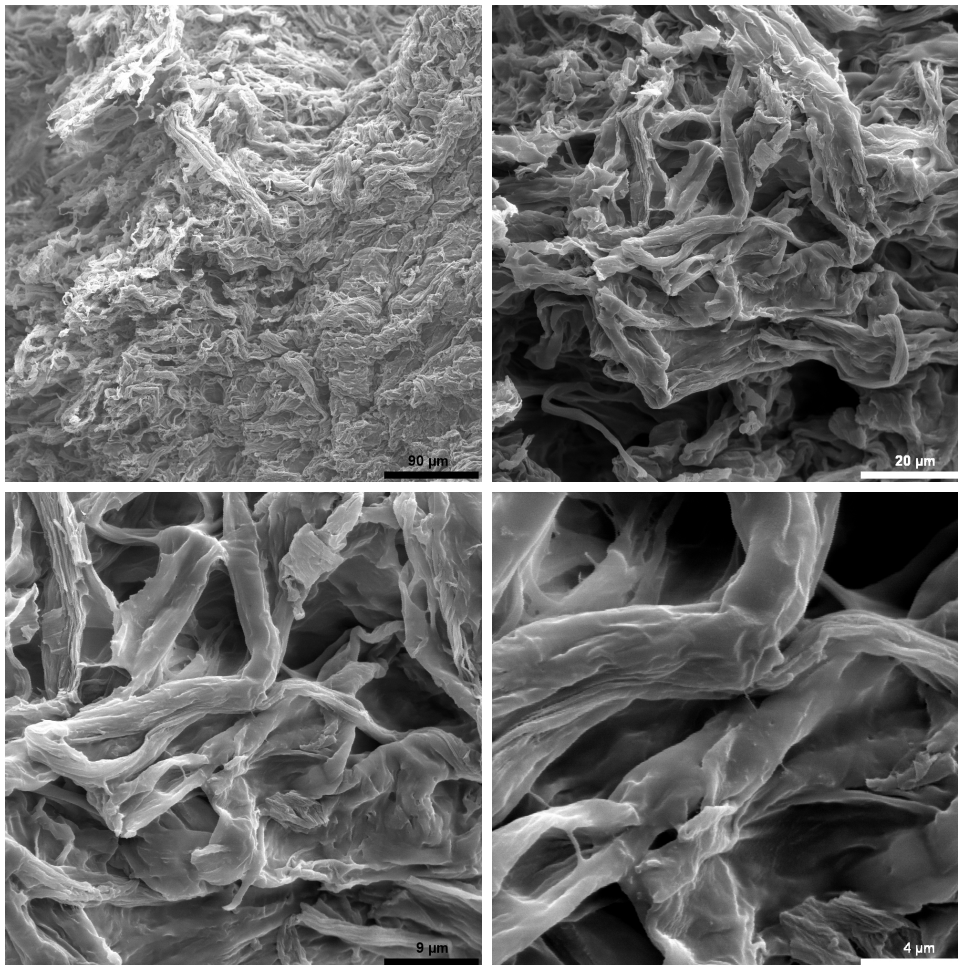


Abbildung 3.13: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des quervernetzten und schockgefrorenen SiO_2 -PVP-Nanokomposits

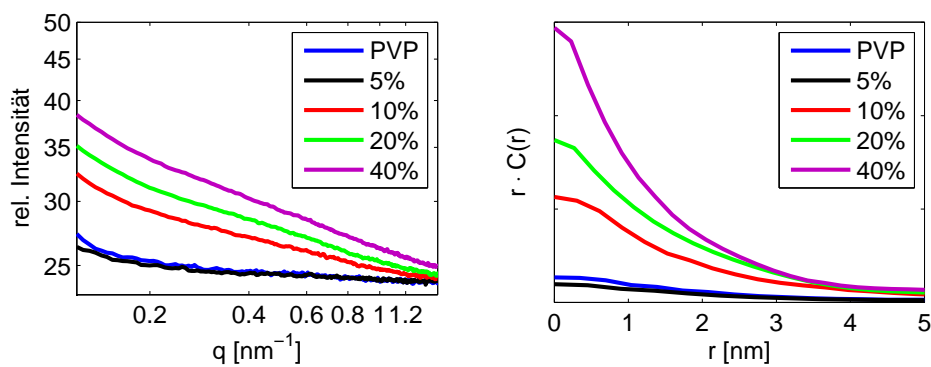


Abbildung 3.14: SAXS-Streukurven (links) und daraus errechnete Korrelationsfunktionen (rechts) des quervernetzten SiO_2 -PVP-Komposits mit gleichem Feststoffgehalt (9%) und variiertem SiO_2 -PVP-Verhältnis (in % vom Feststoff angegeben).

und bestrahlten Proben, zu sehen in Abbildung 3.15, zeigt noch weitere Unterschiede auf. Die Streukurven des PVP bzw. der Probe mit 5% SiO₂ im Feststoffanteil verlieren im Bereich kleinerer Beträge des Streuvektors an Intensität, wenn sie bestrahlt werden. Das ist dadurch zu begründen, dass die PVP-Moleküle, die zwar sehr stark ineinander verwunden sind, aber messbare

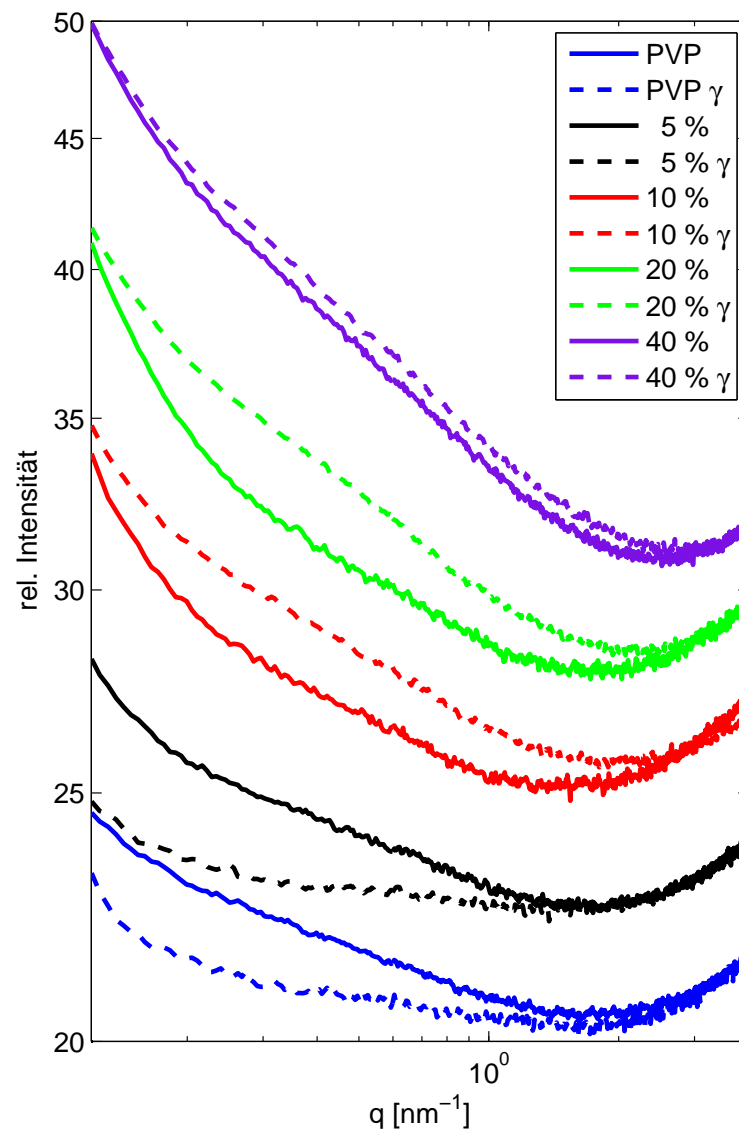


Abbildung 3.15: SAXS-Streukurven des SiO₂-PVP-Nanokomposits vor und nach der Bestrahlung mit Gammastrahlen. Es ist jeweils der SiO₂-Anteil im Feststoffgehalt angegeben. Der Feststoffgehalt beträgt konstant 9%.

Strukturen aufweisen, als Knäuel vorliegen. Durch die Bestrahlung werden diese Moleküle unterbrochen und verknüpfen sich neu, wodurch eine willkürlichere Verteilung von Elektronendichten entsteht, als es im unbestrahlten Zustand der Fall ist. Somit sinkt die Intensität bei kleinen Beträgen des Streuvektors. Bei höheren SiO_2 -Gehalten nimmt der Einfluss des PVP an den Streukurven ab und es ist wieder das schon angesprochene Wachsen der SiO_2 -Strukturen zu beobachten. Dass die Strukturen jetzt auch schon bei einem SiO_2 -Anteil von 10 % im Feststoffgehalt größer sind, liegt daran, dass zwischem dem Zeitpunkt der Herstellung des Komposits bis zur Bestrahlung 3 Tage Postweg lagen und die Strukturen durch die Alterung gewachsen sind. Bei 40 % SiO_2 im Feststoffanteil sind die entsprechenden Strukturen schon während der Herstellung entstanden und es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der bestrahlten und der unbestrahlten Probe in den SAXS-Streukurven zu erkennen.

Die Größe der Primärpartikel beträgt somit 2-2,3) nm und die durchschnittliche Clustergröße beträgt nach der Bestrahlung auch noch 7 nm.

Wie schon am unbestrahltem Komposit, wurden WAXS-Untersuchungen am bestrahlten Komposit durchgeführt, um auf die interne Struktur und die Anordnung der SiO_2 -Aggregate zu schließen. Die Kompositprobe für diese Messungen

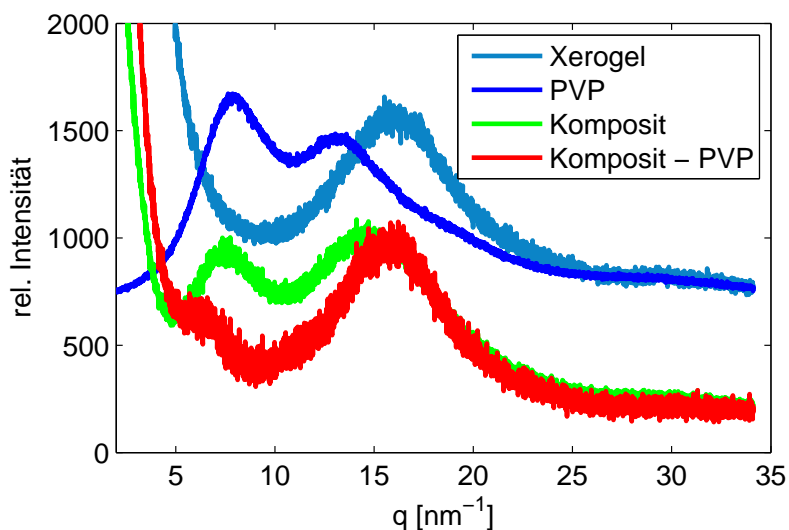


Abbildung 3.16: WAXS-Streukurven des getrockneten SiO_2 -PVP-Komposits, eines Xerogels und von PVP, sowie eine Kurve, die durch Subtraktion der Intensität der PVP-Probe von der Kompositprobe errechnet wurde

wurde, wie im Kapitel 3.3 beschrieben hergestellt, in 2 mm dicke und 100 mal

100 mm große Formen gepresst, verpackt und anschließend bestrahlt. Danach wurde die Probe in 5 mm breite Streifen geschnitten und bei Raumtemperatur zwischen zwei Glasplatten getrocknet. Alle drei Proben wurden unmittelbar vor der WAXS-Messung für eine Stunde auf $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, um sie nachzutrocknen. In Abbildung 3.16 sind die WAXS-Streukurven eines Xerogels, PVP und der Kompositprobe zu sehen. Sowohl Xerogel- als auch PVP-Probe sind selbige wie im vorigen Kapitel. Zusätzlich ist eine berechnete Kurve dargestellt, bei der die Streuintensität der PVP-Probe von der des Komposits abgezogen wurde. Auch hier ist wieder die Schulter bei kleineren Beträgen des Streuvektors zu erkennen, welche darauf schließen lässt, dass die SiO_2 -Aggregate nicht weiter miteinander aggregiert sind. Sowohl das erste amorphe Hauptmaximum bei $(15,8 \pm 0,2)\text{ nm}^{-1}$ als auch die vordere Schulter bei $(6,7 \pm 0,2)\text{ nm}^{-1}$ sind gegenüber den unbestrahlten Proben nicht signifikant verschoben. Demnach hat die Bestrahlung des Komposits mit Gammastrahlen keinen Einfluss auf die interne Struktur der SiO_2 -Aggregate, deren Anordnung zueinander und deren Größe.

Die Quervernetzung des PVP hat nicht nur dessen Wasserunlöslichkeit zur Folge, es wird auch zu einem quellfähigen Hydrogel. Das Quellen des Kompo-

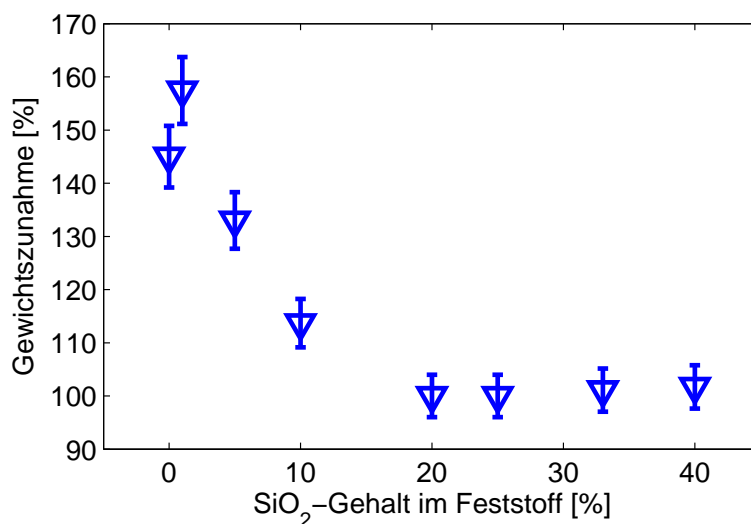


Abbildung 3.17: Quellverhalten von quervernetztem SiO_2 -PVP-Komposit mit einem Feststoffgehalt von 9% in Abhängigkeit vom SiO_2 -Gehalt

sits wurde in Abhängigkeit vom SiO_2 -Gehalt bei einem Feststoffgehalt von 9% gemessen und ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Dazu wurden $(1,00 \pm 0,05)\text{ g}$ des quervernetzten Komposits über 24 Stunden in $(10,00 \pm 0,05)\text{ g}$ Wasser

gelegt. Aus der Gewichtszunahme beim Wässern konnte die Quellfähigkeit des Komposits geschlossen werden. Es ist zu sehen, dass reines PVP bei dieser Bestrahlungsdosis von 30 bis 35 kGy auf 145 % quellen kann. Höhere SiO_2 -Gehalte im Feststoffanteil resultieren in schwächerer Quellfähigkeit. Ab einem SiO_2 -Gehalt von 20 % quillt das Material nicht mehr.

Die SiO_2 -Aggregate und das PVP gehen Wasserstoffbrückenbindungen ein [92]. Da es für die Wirksamkeit der Silicastrukturen zwingend erforderlich ist, dass diese auch in die Wunde gelangen, müssen sie aus dem Komposit herausgelöst werden können. Durch eine Heißwasserextraktion wurde ermittelt, ob SiO_2 -Aggregate überhaupt aus dem Verbund durch Diffusion gelöst werden können und ob dieser Prozess in irgend einer Weise abhängig vom SiO_2 -Gehalt ist. Es wurden dazu zylindrische Proben mit einem Durchmesser und einer Höhe von 10 mm gewogen und anschließend in einen Soxhlet-Apparat 24 Stunden bei ca. 25 ml/min und mit ca. 95 °C heißem Wasser die SiO_2 Aggregate extrahiert. Danach wurden die Proben erneut gewogen, bei 150 °C getrocknet und anschließend wieder gewogen. Abbildung 3.18 zeigt den Feststoffgehalt nach

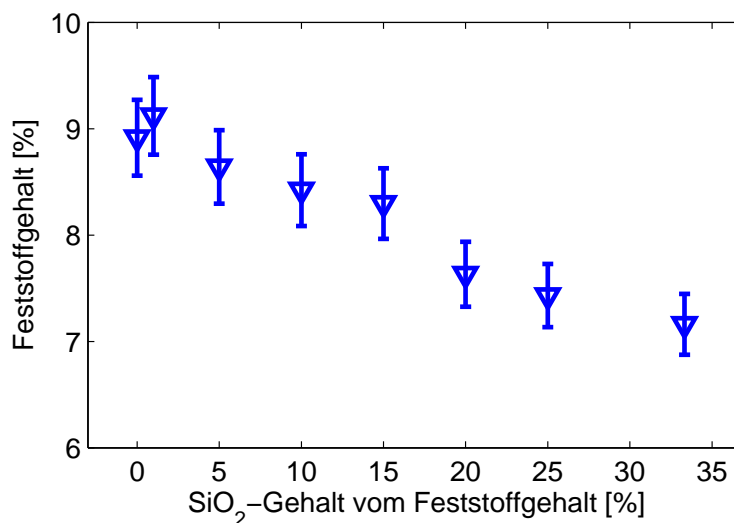


Abbildung 3.18: Feststoffgehalt nach der Heißwasserextraktion in Abhängigkeit vom SiO_2 -Gehalt im Feststoff vor der Extraktion; Der Feststoffgehalt vor der Extraktion betrug immer 9 %.

der Extraktion. Alle Proben hatten vor der Extraktion einen Feststoffgehalt von 9 %. Da die reine PVP-Probe keinen veränderten Feststoffgehalt hat, kann man davon ausgehen, dass das PVP durch die Quervernetzung wasserunlöslich geworden ist. Dies war zu erwarten und ist eine Bestätigung dafür, dass die

verwendete Strahlendosis ausreicht, um eine vollständige Vernetzung der PVP-Ketten zu erreichen. Die Feststoffgehalte der Proben mit SiO₂-Aggregate sind nach der Extraktion geringer als zuvor, wobei ein steigender SiO₂-Gehalt fallende Feststoffgehalte nach sich zieht. Errechnet man das Verhältniss von extrahiertem zu ursprünglichem SiO₂, so ist keine Korellation zwischen SiO₂-Gehalt und Extraktionsrate zu erkennen. Bei allen Proben wurden in den 24 Stunden $(32,8 \pm 4,2) \%$ des SiO₂ extrahiert. Man kann also davon ausgehen, dass die SiO₂-Nanopartikel das Komposit durch Diffusion verlassen können und die Diffusionsrate nicht vom SiO₂-Gehalt abhängt.

4 SiO₂-aktive Wundauflagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Wundauflagen entwickelt, welche Silicaaggregate im Nanometerbereich enthalten und abgeben können, um somit den Wundheilungsprozess positiv zu beeinflussen. Das im vorigen Kapitel 3 vorgestellte PVP-SiO₂-Komposit ist Ausgangsmaterial beider Auflagen.

Es wurde ein trockenes Vlies entwickelt, welches bei stark sezernierenden Wunden angewendet werden kann. Es ist saugfähig, um überschüssiges Exsudat aufzunehmen. Des Weiteren wurde eine feuchte Gelaufage entwickelt, welche auch bei trockenen Wunden ein feuchtes Wundmilieu erzeugen kann.

Bei der heutigen Wundversorgung nicht trivialer Wunden wird mit geeigneten Wundauflagen ein feuchtes Wundmilieu geschaffen, welches den Heilungsprozess optimieren soll. Nach Wundverwundung verzögern das Austrocknen der Wunde und die Schorfbildung die Heilung [90]. Somit sollen beide Auflagen hydroaktiv sein und die Bildung eines feuchten Wundmilieus unterstützen.

Des Weiteren soll es möglich sein, in beide Wundauflagen gegebenenfalls zusätzlich nanostrukturierte SiO₂-Mikropartikel einzubringen, oder diese direkt auf die Wunde zu applizieren und mit den Wundauflagen zu kombinieren. Bei diesen Mikropartikeln kann der Vernetzungsgrad der Nanostrukturen gesteuert werden. Dadurch und durch das Einbringen der Mikropartikel ließe sich der Einfluss der Vernetzung auf die Bioaktivität des SiO₂ erforschen und gleichzeitig der SiO₂-Gehalt in der Wundauflage erhöhen.

Für die biologische Testung der Wundauflagen bzw. des PVP-SiO₂-Komposits wurden tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen durchgeführt. Die Gestalt der eingesetzten Auflagen wurde an die Form des entsprechenden Wundmodells angepasst.

4.1 Trockenes Vlies

Die trockene saugfähige Wundauflage soll möglichst viele Poren enthalten. Außerdem muss sie gut als Wundauflage handhabbar, also nicht zu hart, zu weich oder spröde sein. Das Vlies wird durch das Gefriertrocknen einer Kompositlösung hergestellt. Es hat sich gezeigt, dass ein Feststoffgehalt von 1,5 % am geeignetsten ist. Höhere Feststoffgehalte der Kompositdispersion führen zu übermäßig starren, harten Vliesen, niedrigere zu ungeeignet weichen.

Der SiO₂-Gehalt der Wundauflage soll so hoch wie möglich sein. Ein PVP-SiO₂-Verhältnis von 2 zu 1 hat sich bewährt. Höhere SiO₂-Gehalte haben sprödere Vliese zu Folge.

Für das Vlies wird eine 1,67 %ige PVP-Lösung und ein SiO₂-Sol wie in Abschnitt 3.1 beschrieben hergestellt. Das Sol wird dann durch verdünnen mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 1,33 % gebracht. Anschließend wird das Sol unter permanentem, starkem Rühren zur PVP-Lösung langsam hinzugegeben. Die Masse des Sols ist gleich der Masse der PVP-Lösung, damit ein PVP-SiO₂-Verhältnis von zwei zu eins erreicht wird. Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wird aus den beiden durchsichtigen Lösungen bzw. Dispersionen eine weißlich trübe Dispersion.

Diese Dispersion wird dann in eine Form gegossen und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Einfriereschwindigkeit ist ausschlaggebend für die Porengröße des Vlieses. Ein schnelles Einfrieren führt zu kleinen Eiskristallen, welche beim Sublimieren verschwinden und kleine Poren im trockenen Material hinterlassen. Langsames Einfrieren hingegen führt zu großen Eiskristallen und somit auch zu großen Poren [43]. Es hat sich gezeigt, dass Bereiche des Vlieses mit kleineren Poren fester sind als Bereiche mit großen Poren. Da die Wärme aus dem Material nicht gleichmäßig abgeführt wird, entstehen auch Bereiche mit unterschiedlichen Porengrößen. Um einen festen Bereich zu erzeugen, der dem Vlies eine höhere Integrität verleihen soll, wurde der untere Teil der Form auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt. Dadurch gefriert hier das Material sehr schnell und es entstehen kleine Poren, die $10\text{ }\mu\text{m}$ bis $100\text{ }\mu\text{m}$ groß sind. Im mittleren Bereich friert das Material zuletzt ein, so dass das Vlies hier eine Lamellenstruktur besitzt. Im oberen Bereich kann das Material seine Wärme wieder direkt an die Umgebung abgeben und die Einfriereschwindigkeit ist größer. Es entstehen wieder kleinere Poren mit $50\text{ }\mu\text{m}$ bis $200\text{ }\mu\text{m}$ Größe. Diese Porenverteilung ist in Abbildung 4.1 zu sehen. Der untere, festere Bereich des Vlieses soll beim Auflegen

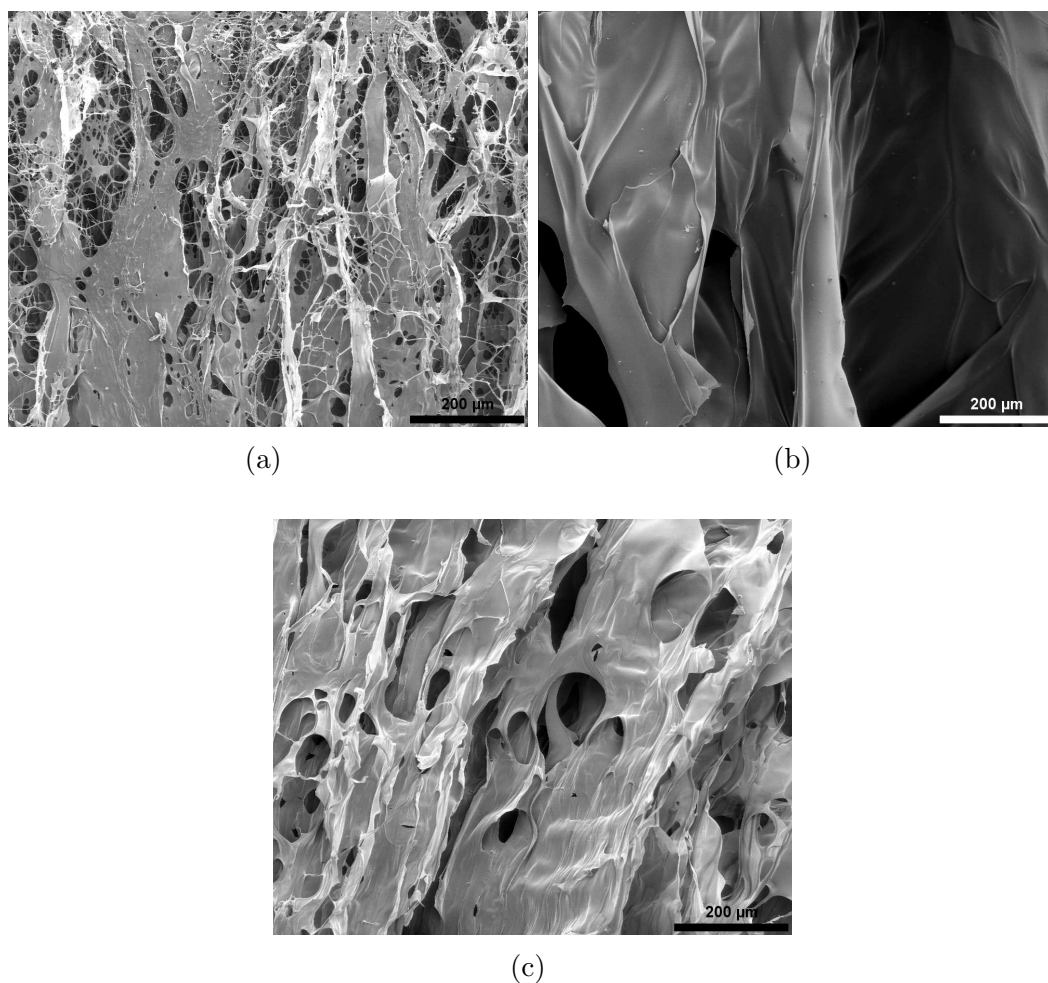


Abbildung 4.1: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vertikaler Schnitte durch ein Vlies.

- a) oberer Teil mit kleinen Poren
- b) Schnitt aus der Mitte des Vlieses
- c) Schnitt aus dem unteren Teil

auf eine Wunde oben sein, also keinen Kontakt zur Wunde haben. Dies hat den Grund, dass dieser Bereich stabiler ist und es so für den Anwender einfacher macht, die Wundauflage zu applizieren. In Abbildung 4.2 ist ein zylindrisches Vlies mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 7 mm abgebildet. Man erkennt auf der rechten Seite, dass der obere Teil dichter wirkt als der obere Teil auf dem linken Bild. Dieser Bereich ist der festere mit den kleinen Poren. Vliese mit diesen Abmessungen wurden für die tierexperimentellen Untersuchungen an Mäusen benutzt.

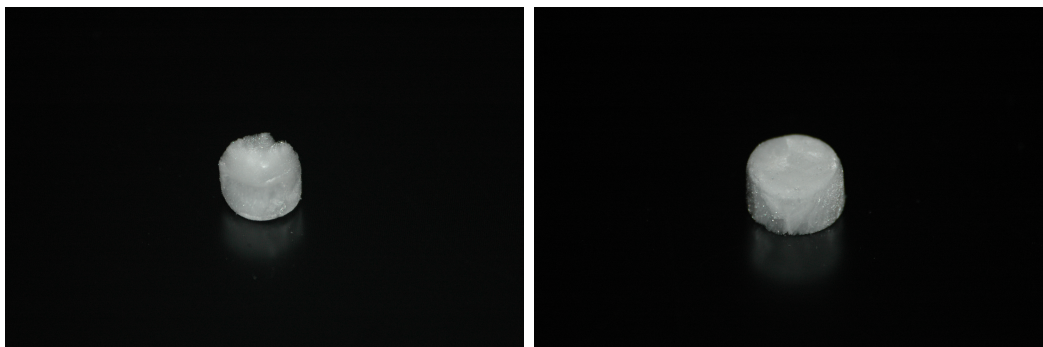


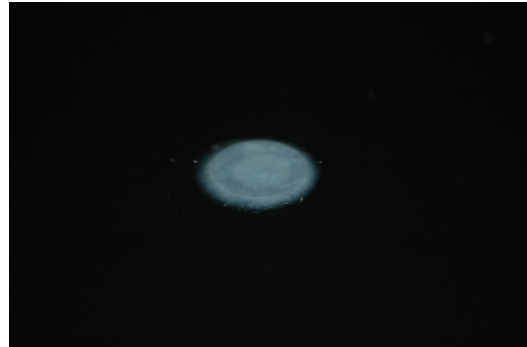
Abbildung 4.2: zylindrisches Vlies mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 7 mm; rechts oben bzw. links unten der schnell gefrorene, festere Bereich mit kleinen Poren

4.2 Feuchte Gelaufage

Wie das trockene Vlies wird auch die feuchte Gelaufage aus PVP und SiO_2 im Verhältnis zwei zu eins hergestellt. Der Feststoffgehalt dieser Mischung beträgt 9 %. Das Vermischen der Edukte gestaltet sich nach folgendem Protokoll: Zu einer 12 %-igen PVP-Lösung wird unter ständigem Rühren, tropfenweise ein 6 %-iges SiO_2 -Sol gleicher Masse gegeben. Beim Zugeben des Sols ist darauf zu achten, wie sich die Mischung verhält. Sind entmischte Bereiche zu erkennen, muss die Zugabe des Sols unterbrochen und so lange gerührt werden bis diese verschwinden. Es ergibt sich eine cremige, weiße Substanz mit einem pH-Wert von $3,36 \pm 0,03$. Nun wird unter weiterem Rühren der pH-Wert mit verdünnter Natriumwasserglaslösung (pH-Wert = 11,0) auf 7,0 erhöht. Die Viskosität der Masse ändert sich beim Einstellen des pH-Wertes von $(183 \pm 20) \text{ Pa} \cdot \text{s}$ auf $(10000 \pm 1000) \text{ Pa} \cdot \text{s}$. Jetzt wird das Material in eine Form gegeben und hineingepresst. Die Formstabilität erhält die Wundauflage durch das Quervernetzen der PVP-Ketten. Dadurch geht die PVP-Lösung in ein Gel über und das PVP verliert seine Wasserlöslichkeit [29].

Eine solche Quervernetzung lässt sich bei PVP, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, chemisch oder durch die Bestrahlung von γ -Strahlen erreichen [36]. Da die Bestrahlung ein Standardverfahren zur Sterilisation von Medizinprodukten ist und weil so die chemische Umgebung der Wundauflagen nicht durch Additive verändert wird, wurde diese Methode gewählt. Sie wurde bei den Wundauflagen mit einem ^{60}CO -Strahler realisiert und erfolgte bei der Synergy Health Radeberg GmbH. Die Dosis betrug 30 kGy bis 35 kGy. Für die Tierexperimente an Mäusen wurden zylindrische Auflagen gefertigt, die 10 mm im Durchmes-

Abbildung 4.3: zylindrische Gelauf-
lage mit einem Durchmesser
von 10 mm und einer
Höhe von 2 mm



ser und 2 mm in der Höhe aufwiesen. In Abbildung 4.3 ist eine entsprechende Wundauf-
lage zu sehen.

5 Biokompatibilität der Wundauflagen

Für die Entwicklung eines Medizinprodukts, so auch einer Wundauflage, ist eine Analyse der biologischen Verträglichkeit des Materials nötig. Im Rahmen dieser Analysen wurden Testungen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Die Untersuchungen *in vitro* erfolgten an murinen Fibroblasten der Linie L929. Es wurden dazu verschiedene Tests zur Zellviabilität durchgeführt, wobei auch der SiO₂-Gehalt des PVP-SiO₂-Komposits variierte, um einen möglichen Einfluss des SiO₂ auf die Zellen zu ermitteln. Die Untersuchungen *in vivo* der entwickelten Wundauflagen wurden an einem Nacktmausmodell mit SKH1-hr-Mäusen durchgeführt.

5.1 Zytotoxizität des PVP-SiO₂-Komposits

Die Zellviabilitätstests wurden in Zusammenarbeit des Zell- und molekularbiologischen Labors, der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie durchgeführt.

Für die Tests wurden 6 verschiedenen Proben des Nanokomposits analysiert. Um einen möglichen Einfluss der SiO₂-Aggregate zu untersuchen, variierte der SiO₂-Gehalt der Proben. Zusätzlich konnte der Einfluss des pH-Wertes des Ausgangsmaterials auf die Zellviabilität untersucht werden. Die Zusammensetzung der Proben und der entsprechende pH-Wert sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt. Der pH-Wert der Probe Sd337 wurde mit verdünnter Natriumwasserglaslösung (1 Teil NaWa, 3 Teile Wasser) auf pH 7,4 eingestellt. Dieser pH-Wert entspricht dem physiologischen und es soll so ausgeschlossen werden, dass mögliche negative Effekte pH-Wert-abhängig sind.

Zusätzlich wurde das Verpackungsmaterial, in dem die Wundauflagen verpackt und sterilisiert werden, getestet. Dies dient der Kontrolle, dass die Sterilisa-

Probe	Wasseranteil [%]	PVP-Anteil [%]	SiO ₂ -Anteil [%]	pH-Wert
PVP	91	9,00	0,00	4,10
Sd5	91	8,55	0,45	4,08
Sd10	91	8,10	0,90	3,95
Sd20	91	7,20	1,80	3,71
Sd334	91	6,00	3,00	3,38
Sd337	91	6,00	3,00	7,40

Tabelle 5.1: Zusammensetzung der Proben für die Biokompatibilitätstests; Sd337 wurde mit verdünnter Natriumwasserglaslösung auf pH 7,4 eingestellt.

Probe	Präparation
V _{γt}	Verpackung trocken gammasterilisiert
V _{γn}	Verpackung nass gammasterilisiert
V _{γSd}	Verpackung in Kontakt mit Sd334 gammasterilisiert

Tabelle 5.2: Präparation der Verpackungsproben für die Biokompatibilitätstests

tion mit Gammastrahlen keine schädlichen Einflüsse auf die Verpackung oder das Material hat. In Tabelle 5.2 sind die drei verschieden präparierten Verpackungsproben zusammengestellt.

Die Inkubationszeit aller Proben mit Fibroblasten betrug 3 und 6 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ in der Atmosphäre. Anschließend wurde an den Zellen ein Live/Dead Test und ein Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität durchgeführt.

5.1.1 Live/Dead Test

Die Reaktion von Zellen auf ein Material kann über die Zellviabilität mit dem Live/Dead Test ermittelt werden. Hierbei wird das Material mit der entsprechenden Zelllinie zusammengebracht und dann über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Anschließend kann über Fluoreszenzfärbungen der toten und lebendigen Zellen die Zellviabilität bestimmt werden.

Die Kompositproben waren zylindrische Gelaufagen mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 2 mm, die Verpackungsproben waren Quadrate mit einer Kantenlänge von 5 mm. Auf alle Proben wurden 50000 Zellen der murinen Fibroblastenlinie L929 gegeben und anschließend mit Medium aufgefüllt. Die Proben wurden dann in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in der Atmosphäre 3 bzw. 6 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die

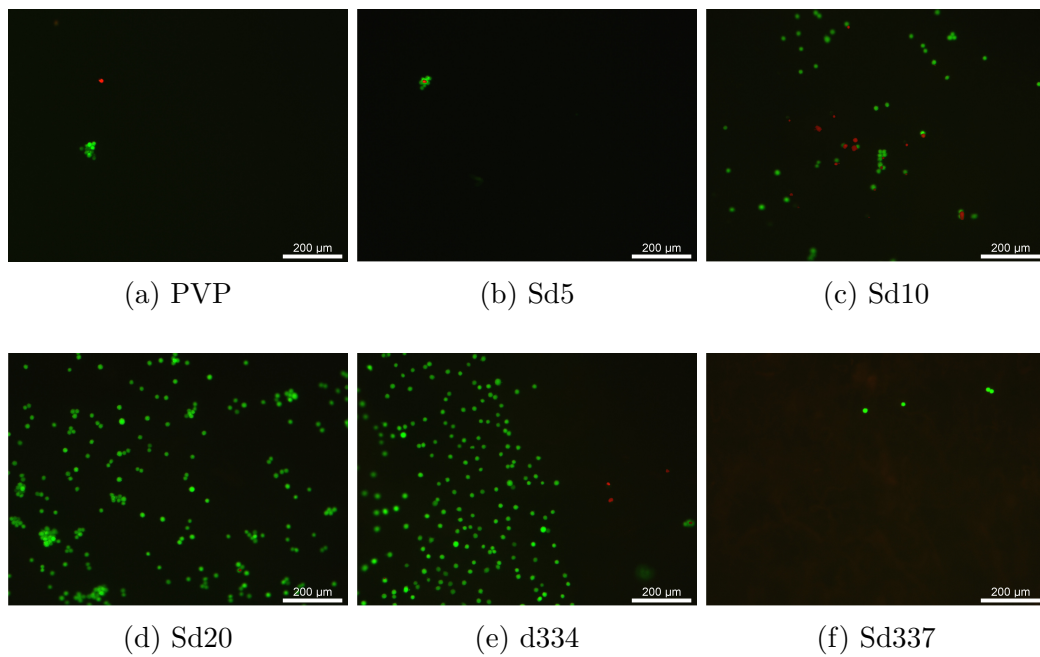


Abbildung 5.1: Zu sehen sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Live/Dead Tests der verschiedenen Materialien (s.h. Tabelle 5.1) nach 3 Tagen. Lebende Zellen sind grün, tote rot dargestellt.

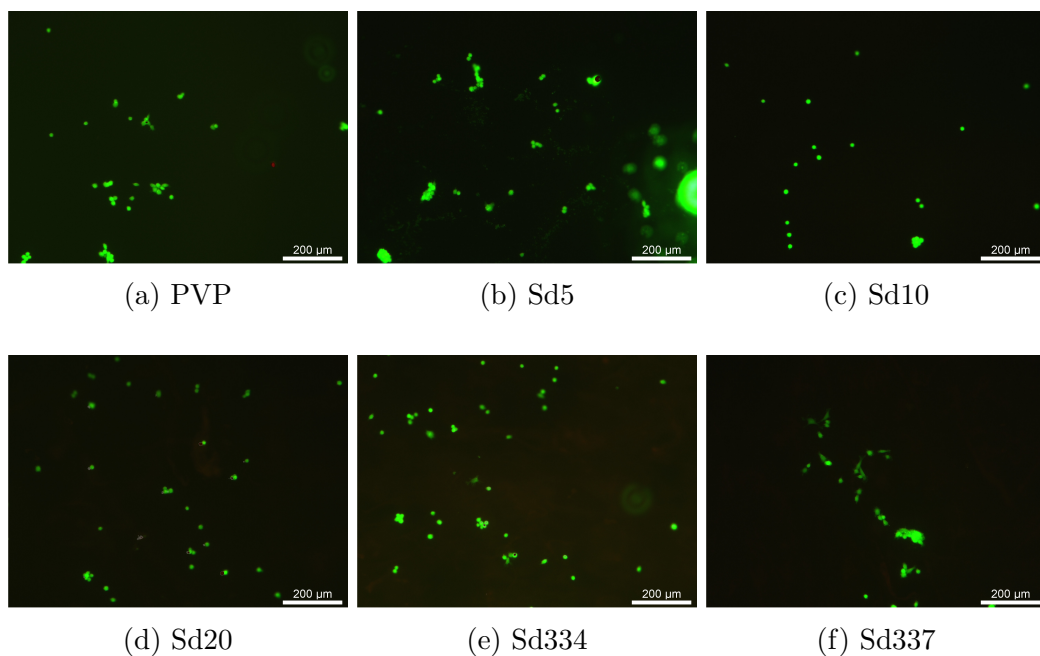


Abbildung 5.2: Zu sehen sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Live/Dead Tests der verschiedenen Materialien (s.h. Tabelle 5.1) nach 6 Tagen. Lebende Zellen sind grün, tote rot dargestellt.

Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein-AM und Ethidium homodimer gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops fotografiert. Der Farbstoff Calcein-AM selbst ist nicht fluoreszierend. Er wird in die Zelle transportiert und dort zu Calcein umgewandelt. Calcein kann Calciumionen komplexieren, was in einer grünen Fluoreszenz resultiert. Da tote Zellen nicht in der Lage sind, Calcein-AM in Calcein umzuwandeln, färbt dieser Farbstoff nur lebende Zellen grün.

Ethidium homodimer dagegen fluoresziert rot und bindet an die DNA. Es kann aber die Zellmembran nicht passieren. Es färbt nur tote oder sterbende Zellen, deren Zellmembran beschädigt ist.

Die jeweiligen Farbstoffe wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop angeregt und die Zellen fotografiert. In Abbildung 5.1 bzw. 5.2 sind Aufnahmen von den einzelnen Proben nach 3 bzw. 6 Tagen zu sehen. Die Calcein- und Ethidium-Färbung sind zusammengefasst, sodass die lebenden (grün) und toten (rot) Zellen zusammen erkennbar sind.

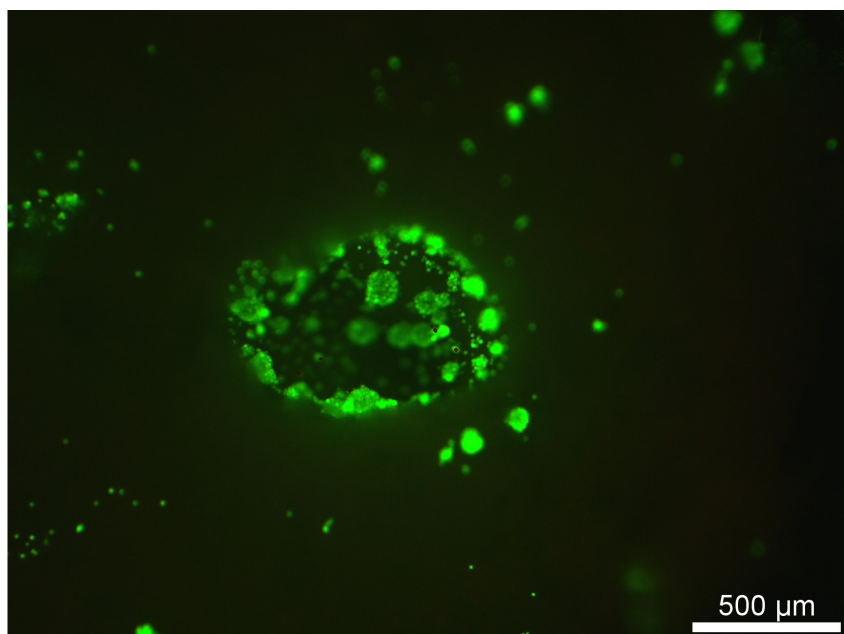


Abbildung 5.3: lichtmikroskopische Aufnahmen der Live/Dead Tests 6 Tage nach der Erstbesiedlung einer SD334 Probe; Es sind große Agglomerate lebender Zellen am Rand bzw. innerhalb einer Vertiefung der Probe zu sehen.

Es ist zu sehen, dass alle Proben von sehr wenigen Zellen besiedelt sind. Sie treten meist als Zellhaufen auf. Die Zellen selbst erscheinen kugelig und haben kaum zytoplasmatische Fortsätze gebildet. Dies kann bedeuten, dass sie versu-

chen, ihre Oberfläche zu minimieren, da die Oberfläche, auf der sie wachsen, offensichtlich ungeeignet ist. Es sind jedoch nur vereinzelt tote Zellen zu erkennen und auch nach 6 Tagen sind noch lebende Zellen zu finden. Ein Einfluss der Silicaaggregate ist nicht zu erkennen, auf allen Proben sind unabhängig vom SiO₂-Gehalt wenige Zellen zu finden. Wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, sind in gestörten Bereichen der Probe wesentlich mehr Zellen zu finden. In diesem Fall ist die Vertiefung durch einen Lufteinschluss bei der Herstellung der Probe entstanden. Die Zellen wachsen zu größeren Agglomeraten am Rand bzw. innerhalb der Vertiefung. Dieser Effekt ist auch bei Rissen im Material zu sehen, in den die Zellen einwachsen.

Die Live/Dead Tests der Verpackungsproben zeigten ein sehr gutes Zellwachstum. Erwartungsgemäß sind alle Verpackungsmaterialien wie vom Hersteller deklariert biokompatibel.

Das PVP-SiO₂-Komposit ist offensichtlich nicht als Substrat für adhärente Zellen wie Fibroblasten geeignet. Dass jedoch wenig tote Zellen gefunden wurden, kann bedeuten, dass das Material an sich biokompatibel ist. Für eine Wundauflage ist der Sachverhalt, dass die Zellen nicht darauf wachsen, positiv zu bewerten. Die Auflage verwächst nicht mit der Wunde und es entstehen so weniger Irritationen beim Verbandswechsel.

5.1.2 Metabolische Aktivität

Neben dem Live/Dead Test als Zellviabilitätsassay wurde auch ein Zellproliferationsassay durchgeführt. Bei diesem Versuch wird die metabolische Aktivität, also das Zellwachstum und die Zellteilung der Zellen, durch deren enzymatische Reduktion eines Tetrazoliumsalzes (XTT) zu Formazan, gemessen. XTT ist farblos bis schwach gelb, Formazan stark orange. Durch Messung der Absorption von Licht der Wellenlängen von 450 - 500 nm kann auf die Menge des umgesetzten XTT geschlossen werden. Für den Versuch wurden die verschiedenen Komposit- und Verpackungsproben für 3 bzw. 6 Tage bei 37 °C mit Nährmedium inkubiert. Das Medium wurde danach abgenommen, auf die Zellen gegeben und diese dann 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in der Atmosphäre inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellproliferationsassay. Mit diesem Test konnte gezeigt werden ob das Material Stoffe in das Medium abgibt, welche die metabolische Aktivität der Zellen beeinflussen.

In Abbildung 5.4 ist die Zellproliferation im Verhältnis zu einer Positivkontrolle

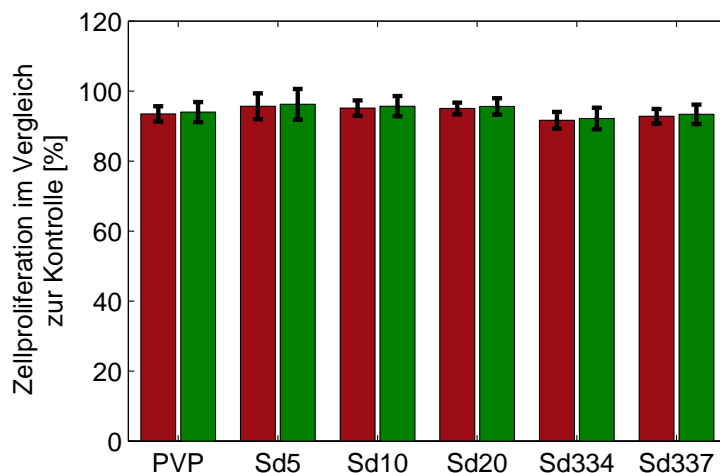
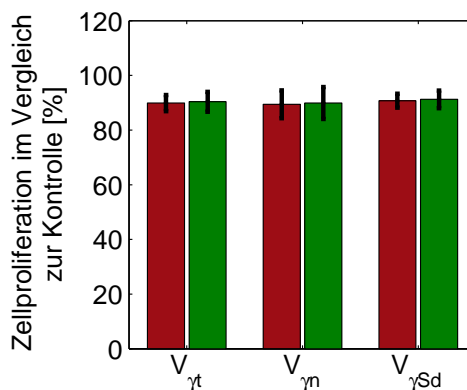


Abbildung 5.4: Zellproliferation muriner Fibroblasten, die mit dem Überstand des PVP-SiO₂-Komposits mit verschiedenen SiO₂-Gehalten für 3 (rot) und 6 (grün) Tage inkubiert wurden. Die Viabilität ist in Prozent einer Positivprobe angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

(Nährmedium) zu sehen. Die Zellproliferation ist im Mittel bei allen getesteten Kompositproben bei $(93,9 \pm 1,6) \%$ nach 3 Tagen und $(94,5 \pm 1,6) \%$ nach 6 Tagen. Bei den Verpackungsproben (Abb. 5.5) sind die entsprechenden Mittelwerte $(90,0 \pm 0,7) \%$ nach 3 Tagen und $(90,5 \pm 0,7) \%$ nach 6 Tagen. Die

Abbildung 5.5: Zellproliferation muriner Fibroblasten, dem Überstand des Verpackungsmaterials für 3 (rot) und 6 (grün) Tage inkubiert wurden. Die Viabilität ist in Prozent einer Positivprobe angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.



Zellproliferation ist bei allen Proben ähnlich hoch. Das bedeutet, dass weder das Komposit, noch die Verpackung toxische Verbindungen in das Medium abgeben. Das Material kann also als biokompatibel eingestuft werden.

Beim Live/Dead Test konnte festgestellt werden, dass die Fibroblasten sehr schlecht auf dem Material wachsen. Da aber nur sehr wenig tote Zellen gefun-

den wurden, wurde der schlechte Bewuchs auf die Oberflächeneigenschaften des Komposits zurückgeführt. Dies kann durch den Zellproliferationsassay bestätigt werden. Die Zellen zeigen auf einem anderen Substrat bei gleicher Umgebung ein sehr gutes Wachstum.

5.2 Tierversuch

5.2.1 Versuchstier

Als Versuchstiere wurden Mäuse der SKH1-hr Linie ausgewählt. Es sind Mäuse mit einer Genmutation, welche unter anderem durch Haarlosigkeit charakterisiert ist. Sie werden wegen ihrer Nacktheit gerne für Experimente an der Haut genutzt, da das Rasieren, welches unerwünschte Hautirritationen hervorrufen kann, wegfällt.



Abbildung 5.6: histologischer Schnitt der Haut einer SKH1-hr-Maus; Es sind mehrere Dermoidzysten (Sternchen), Utriculi, die mit der Oberfläche der Haut verbunden sind (lange schwarze Pfeile), Hyperplasie der Talgdrüsen (kurze schwarze Pfeile), und dermale Entzündungen (kurzer grauer Pfeil) erkennbar. aus [5]

Die *Hr*-Genmutation der Mäuse ist auf einige Nullallele und hypomorphe Al-

lele des *Hr*-Gens zurückzuführen, die für einen Haarausfall nach einem relativ normalen Haarwuchszyklus verantwortlich sind. 13 bis 14 Tage nach der Geburt beginnen die Haare bei den Augenlidern auszufallen, was sich bis zum Schwanz hin fortsetzt, wobei eine scharfe Abgrenzung zwischen behaarten und unbehaarten Bereichen erkennbar ist. Etwa 18 Tage nach der Geburt sind alle Haare bis auf einige Vibrissen ausgefallen. Eine weitere phänotypische Besonderheit dieser Mauslinie ist in histologischen Schnitten der Haut erkennbar. Es sind Utricili, eine Hyperplasie der Talgdrüsen, Dermoidzysten und dermale Entzündungen zu sehen (s.h. Abbildung 5.6).[5]

5.2.2 Versuchsdurchführung

Es wurden drei verschiedene Wundauflagen getestet. Das gefriergetrocknete Vlies, die feuchte Gelaufage, beide aus dem Nanokomposit, und Sorbion plus, eine perforierte Folie aus PE. Als Kontrollgruppe dienten nur mit Mull abgedeckte Wunden. Die Versuchstiere waren die schon erwähnten SKH1-hr-Mäuse. Zum Zeitpunkt des Defektsetzens hatten die Tiere ein Alter von 10 bis 12 Wochen und waren zwischen 20 und 25 g schwer. Zu jeder Wundauflage und jedem Zeitpunkt wurden vier weibliche Tiere verwendet, also inklusive der Kontrollgruppe 80. Die Mäuse wurden in der SPF-nahen (spezifiziert pathogenfrei) Haltung des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock gehalten.

Die Operation der Tiere wurde von Ferenc Öri, einem Chirurgen der Klinik und Polyklinik für Mund,- Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie Rostock, durchgeführt. Nach dem Narkotisieren des Versuchstieres durch eine intraperitoneale Injektion einer Rompun-Ketamin-Lösung (1 ml/kg; 0,5 % Rompun; 7,5 % Ketamin), erfolgte das Setzen eines kreisrunden Vollhautdefektes beidseitig auf den Rücken mit Hautstanze und Schere. Der Defekt hatte einen Durchmesser von 10 mm. Anschließend wurde die entsprechende Wundauflage aufgelegt, mit Mull abgedeckt und der Wundverband mit einem Heftpflaster fixiert. Der OP-Ablauf ist in der Bildreihe in Abbildung 5.7 zu sehen. Die ersten drei Tage nach der Operation bekamen die Tiere Novaminsulfon als Schmerzmittel ins Trinkwasser, welches täglich bei der postoperativen Überwachung gewechselt wurde. Als Futter diente ein Standard-Nagerfutter. Die Versuchsdauer betrug 3, 6, 9, 12 und 15 Tage. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Verbandswechsel. Dazu wurden die Tiere mit Diethylether betäubt, der Verband mit einer

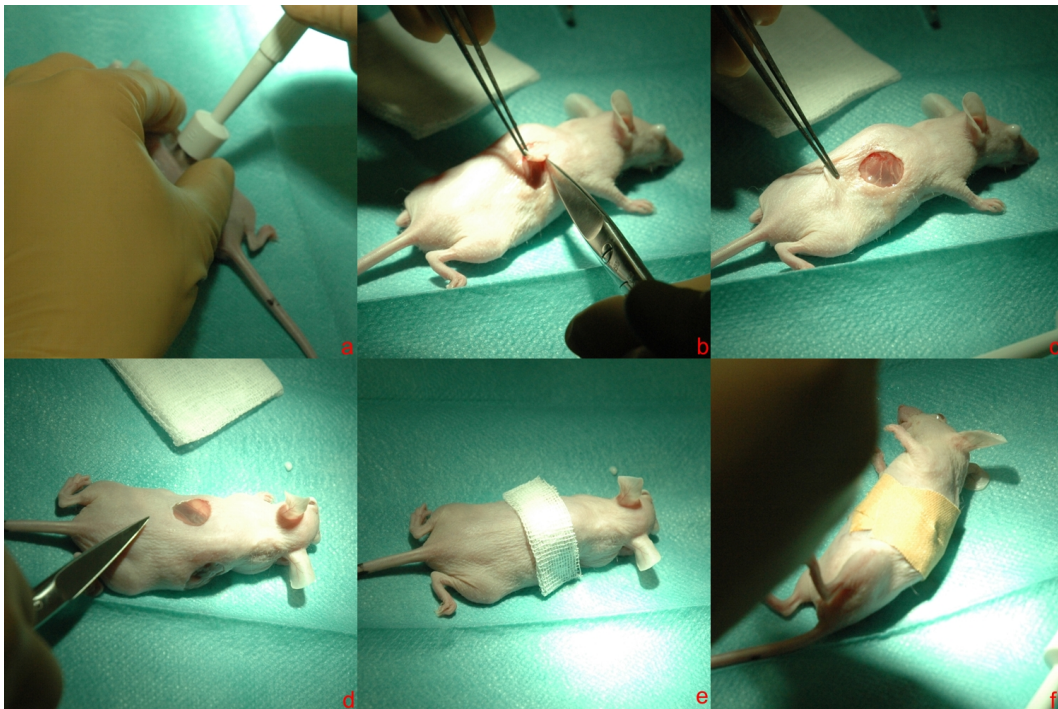


Abbildung 5.7: OP-Ablauf des Tierversuchs zur Biokompatibilitätsuntersuchung der entwickelten Wundauflagen;
 a, b) setzen des Defektes mit Hautstanze bzw. Schere
 c) Vollhautdefekt auf der rechten Seite mit einem Durchmesser von 10 mm
 d) Vollhautdefekte beidseitig
 e) Abdecken der Defekte mit Mull
 f) Fixieren des Verbandes mit Heftpflaster

Schere aufgeschnitten und entfernt, die Wunde vermessen, fotografiert und anschließend der neue Verband angelegt. In Abbildung 5.8 ist der Verbandswechsel nach 3 Tagen Standzeit an einer Maus mit gefriergetrocknetem Vlies als Wundauflage zu sehen. Nach den jeweiligen Versuchszeiträumen von 3, 6, 9, 12 bzw. 15 Tagen wurde die Wunde und die Haut um die Wunde herum explantiert, auf Korkplatten aufgepinnt und in Formalin fixiert. Anschließend erfolgte eine Einbettung in Paraffin und eine Teilung der Proben. Die Teilung verlief mittig, quer zur Längsachse des Tieres, um es zu ermöglichen, Einblicke aus der Wundmitte zu erhalten. Aus diesen Proben konnten dann histologische Dünnschnittpräparate aus der Mitte der Wunde angefertigt werden.



Abbildung 5.8: Verbandswchsel nach 3 Tagen bei einer Maus mit gefriergetrocknetem Vlies als Wundauflage;
 a) mit Diethylether betäubte Maus, Verband wurde entfernt Wundauflage ist links noch vorhanden
 b) Wundauflage wurde entfernt (Die Wundauflage ist die gleiche, die in a) zu sehen ist, nur die andere Seite. Die zugehörige Wunde ist aber nicht die sichtbare, da das Tier gedreht wurde.)
 c) Ein neues Vlies ist auf der Wunde rechts zu sehen.
 d) Die Wunden sind mit den Wundauflagen abgedeckt und der Verband wird angelegt.

5.2.3 Auswertung

Für die Bewertung der Wundheilung in Abhängigkeit von der Wundaufgabe konnten verschiedene Parameter herangezogen werden. Bei jedem Verbandswechsel und zum Ende der jeweiligen Versuchszeiten der Tiere wurden die Wunden vermessen und fotografiert. Bei den nach 3 Tagen entfernten Wundaufgaben konnte untersucht werden, ob SiO_2 aus ihnen herausdiffundiert.

Des Weiteren wurden histologische Dünnschnitte der Haut im Wundbereich angefertigt und je nach Anforderung gefärbt. Für eine morphometrische Auswertung wurde eine HE-Färbung verwendet, zur Untersuchung der Neoangiogenese der Wunden eine immunhistochemische Färbung mit Hilfe von CD31. Eine weitere immunchemische Färbung über das α -Smooth-Muscle-Actin konnte zur Untersuchung der Myofibroblasten verwendet werden.

5.2.3.1 SiO_2 -Diffusion

Die Grundhypothese „Nanostrukturierte Silicaaggregate unterstützen die Wundheilung.“, setzt natürlich voraus, dass die SiO_2 -Aggregate in das Gewebe gelangen. In Kapitel 3.4 konnte gezeigt werden, dass das SiO_2 das quervernetzte Komposit verlassen kann. Inwieweit dies in der Umgebung einer Wunde auftritt, muss natürlich evaluiert werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Wundaufgaben nach dem ersten Verbandswechsel untersucht. Die Aufgaben wurden getrocknet, in der Mitte zerschnitten und die Schnittkante mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) und energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) analysiert. In Abbildung 5.9 ist der Schnitt durch das Vlies bzw. Gel zu sehen. EDX-Spektren an verschiedenen Stellen und auch ein lineares Scannen (line scan) durch die Wundaufgabe zeigen ein Siliciumgefälle zu der Seite hin, die Kontakt mit der Wunde hatte. Somit ist festzustellen, dass die Silicaaggregate aus den Wundaufgaben in die Wunde diffundieren. Aus dem line scan an der Schnittkante der Gel-Wundaufgabe ist erkennbar, dass etwa die Hälfte der Wundaufgabe weniger Silicium enthält, während bei der Vlies-Aufgabe bei einem Drittel weniger Silicium gefunden wurde. Dies liegt zum Teil daran, dass das Gel zu 91 % aus Wasser besteht und die Aggregate darin leichter diffundieren können. Das Vlies wird durch das Wundexsudat natürlich auch feucht und sollte ein feuchtes Wundmilieu aufrecht erhalten können. Jedoch könnten durch das Einfrieren beim Gefriertrocknen die Silicaaggregate stärker im Material fixiert worden sein.

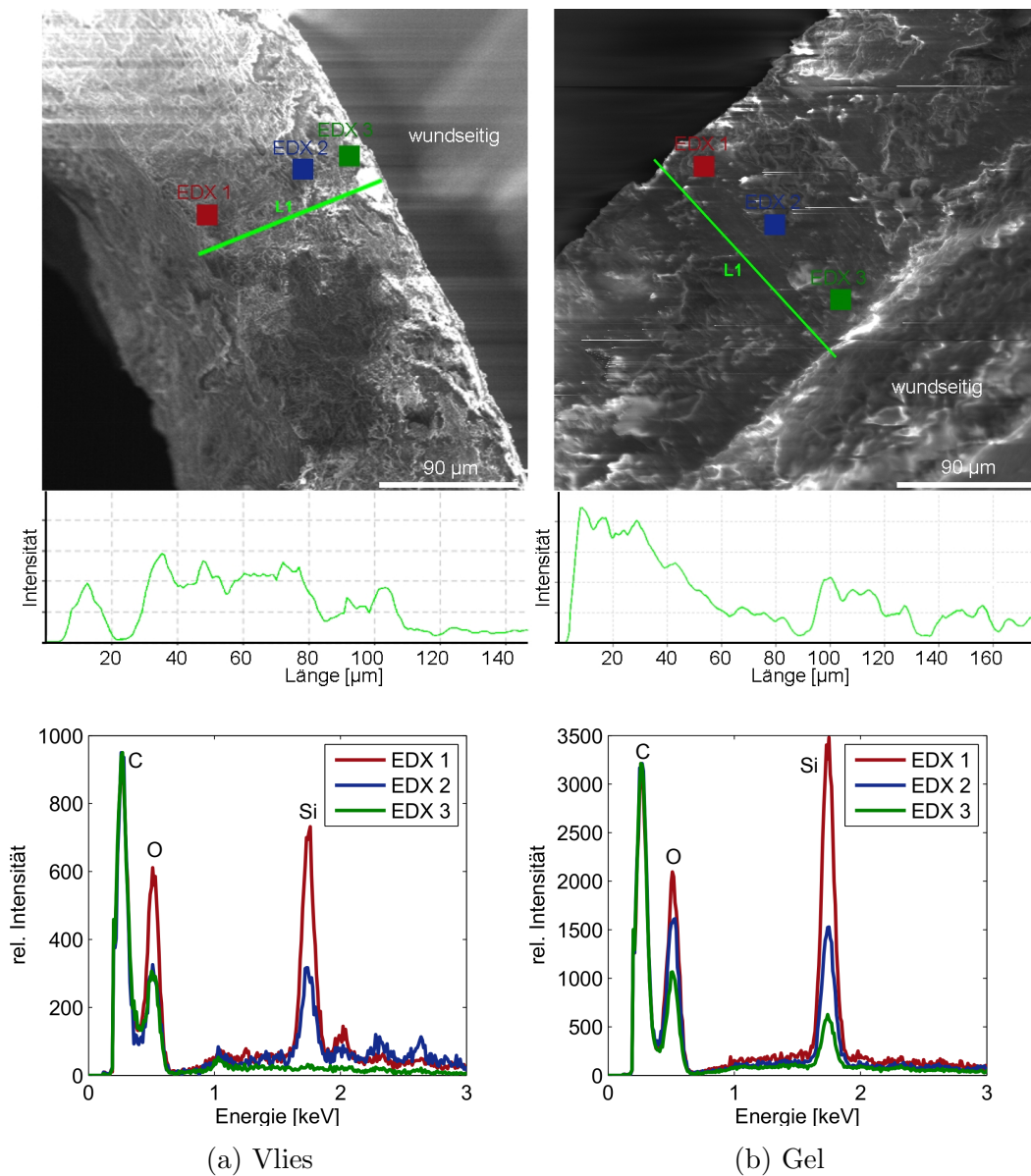


Abbildung 5.9: REM-Aufnahme und EDX-Analyse eines Schnittes durch eine getrocknete Vlies- bzw. eine getrocknete Gel-Wundauflage, nachdem sie 3 Tage auf einer frischen Wunde waren;

Die unteren Spektren zeigen die Elementverteilung an den zugehörigen Orten auf dem Schnitt. Sowohl an den Spektren als auch an dem line scan (grüne Linie mit zugehöriger relativer Si-Konzentration) ist ein Si-Gradient zu erkennen. Die Seite, welche mit der Wunde Kontakt hatte, enthält weniger Si also auch weniger SiO_2 .

5.2.3.2 Äußerliche Bewertung der Wunden

Die Wunden wurden bei jedem Verbandswechsel zu Ende des Versuchszeitraums in Längs- und Querrichtung mit einem Lineal vermessen. Die Wunde

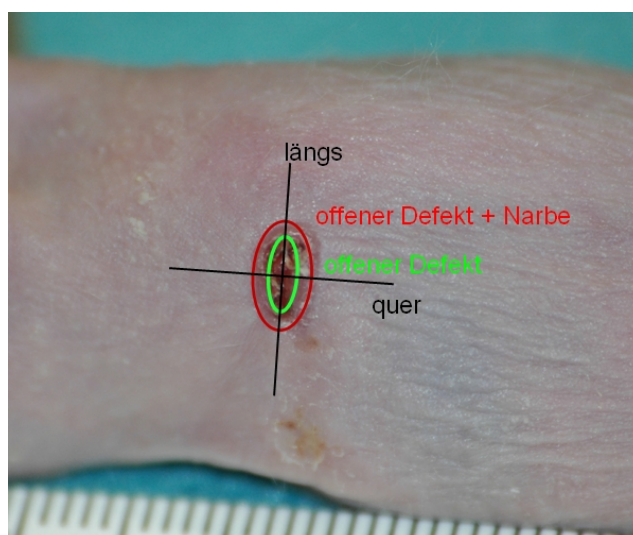


Abbildung 5.10: linksseitiger Defekt einer Maus; Gemessen wurden Längs- und Querausdehnung, woraus Ellipsen (rot & grün) abstrahiert wurden.

wurde in den offenen Defektbereich und den gesamten Defektbereich, der sich aus dem offenen und reepithelisierten Bereich zusammensetzt, eingeteilt.

Aus diesen Maßen konnte anschließend eine Ellipse abstrahiert (s.h. Abbildung 5.10) und die entsprechenden Flächen berechnet und verglichen werden. In Abbildung 5.11 sind die Flächen der Defekte und der Narben in zeitlicher Korrelation dargestellt. Es ist zu erkennen, dass, bis auf bei der Sorbion plus-Gruppe, bei allen Versuchsgruppen die Defekte nach 12 Tagen verschlossen sind. Die Narbenbildung ist bei der Vlies- und Kontrollgruppe erst nach 9 Tagen messbar, während bei den Gruppen mit der feuchten Wundauflage und Sorbion plus dies schon nach 6 Tagen möglich ist. Bei der Versuchsgruppe mit der feuchten Wundauflage ist die Größe der Narbe nach 15 Tagen am kleinsten. Die nächst größere Narbe, ist die der Sorbion plus-Gruppe, dann die Narben der Vlies-Gruppe und die größten Narben hatten die Mäuse der Kontrollgruppe. Die Größe der Narben ist 15 Tage nach der Operation bei allen Gruppen signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$).

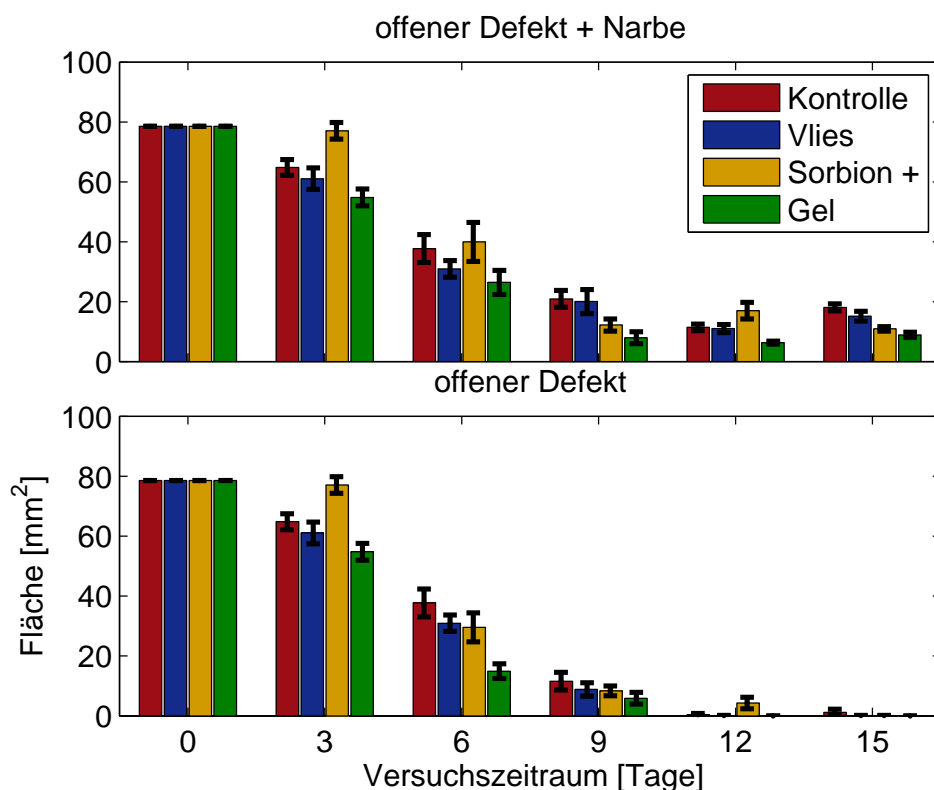


Abbildung 5.11: Auswertung der Defekt- und Narbenflächen;

Nach 12 Tagen sind bei allen Versuchsgruppen die Defekte verschlossen. Eine messbare Narbenbildung ist bei der feuchten Wundauflage bzw. bei Sorbion plus bereits nach 6 Tagen vorhanden, bei dem Schwamm und der Kontrolle erst nach 9 Tagen. Die feuchte Wundauflage hat nach 15 Tagen die kleinste Narbe. Die Narben der 3 anderen Gruppen sind ähnlich groß. Die entsprechenden Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. [Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Ferenc Öri erhoben.]

5.2.3.3 Histologische Analyse mit Hilfe der HE-Färbung

Die histologische und immunhistochemische Aufarbeitung der Proben geschah durch das histologische Labor der Klinik und Polyklinik für Mund,- Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie Rostock.

Die Schnitte der Wunden sind $4\ \mu\text{m}$ dick und wurden mit HE (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) gefärbt. Durch diese Färbung werden alle basophilen (DNS, Zellkern, endoplasmatisches Retikulum) blau und alle acidophilen Strukturen (Zellplasmaproteine, Kollagen) rot gefärbt.

Wie schon in Kapitel 5.2.1 beschrieben, haben die Versuchstiere einige Beson-

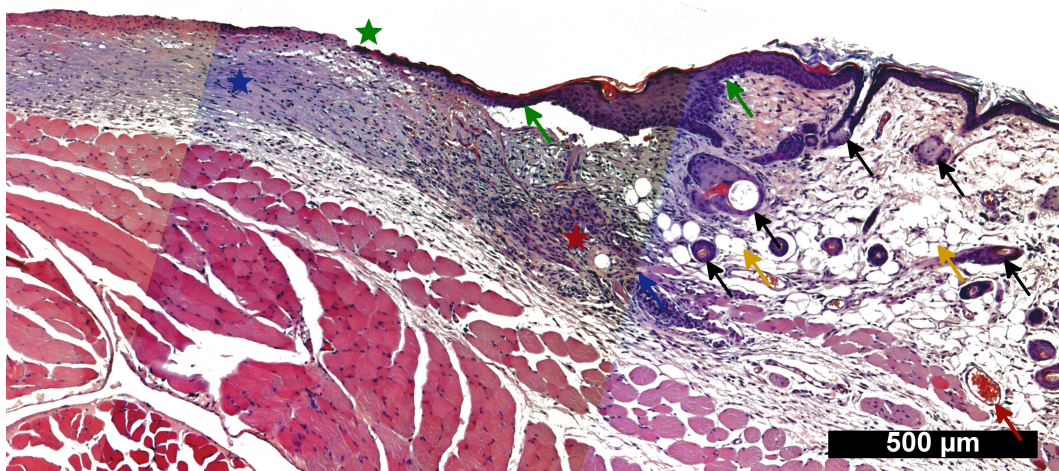


Abbildung 5.12: histologischer Dünnschnitt einer Wunde der Kontrollgruppe 3 Tage nach der Operation; Grüne Pfeile markieren neues Epithel mit der Epithelisierungsfrent (grüner Stern). Schwarze Pfeile rechts im Bild markieren Hautanhangsgewebe, gelbe Pfeile Fettzellen. Der blaue Pfeil markiert das Ende des Unterhautmuskels, der durch das Setzen des Defektes durchtrennt wurde. Rote Pfeile markieren Blutgefäße, rote Sterne entzündliche Infiltrate. Die blauen Sterne markieren das Granulationsgewebe.

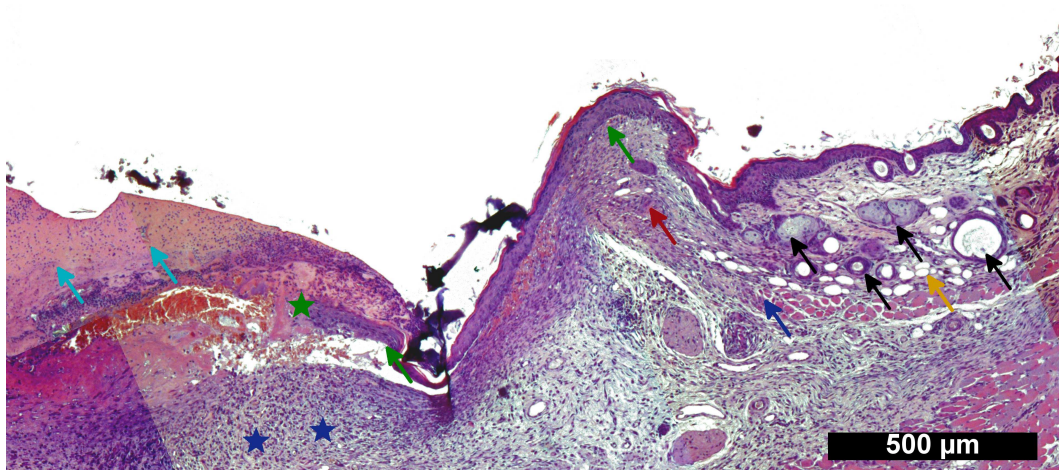


Abbildung 5.13: histologischer Dünnschnitt einer Wunde der Gelgruppe 9 Tage nach der Operation; Grüne Pfeile markieren neues Epithel mit der Epithelisierungsfrent (grüner Stern). Schwarze Pfeile rechts im Bild markieren Hautanhangsgewebe, gelbe Pfeile Fettzellen. Der blaue Pfeil markiert das Ende des Unterhautmuskels, der durch das Setzen des Defektes durchtrennt wurde. Rote Pfeile markieren Blutgefäße. Die blauen Sterne markieren das Granulationsgewebe, hellblaue Sterne markieren aufliegenden Detritus (Schorf).

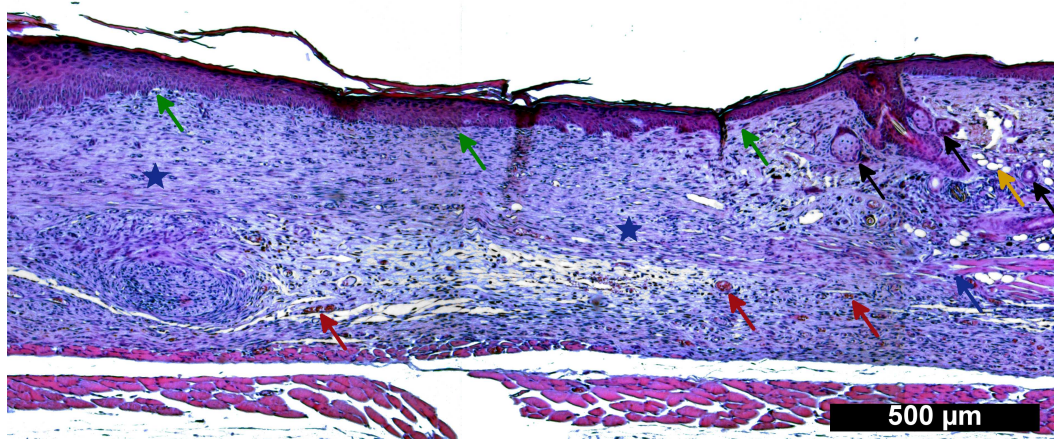


Abbildung 5.14: histologischer Dünnschnitt einer Wunde der Gelgruppe 15 Tage nach der Operation; Grüne Pfeile markieren neues Epithel. Schwarze Pfeile rechts im Bild markieren Hautanhangsgewebe, gelbe Pfeile Fettzellen. Der blaue Pfeil markiert das Ende des Unterhautmuskels, der durch das Setzen des Defektes durchtrennt wurde. Rote Pfeile markieren Blutgefäße. Die blauen Sterne markieren das Granulationsgewebe.

derheiten bezüglich ihrer Hautanhangsgewebe. Diese sind zu allen Zeitpunkten bei allen Versuchsgruppen gut zu erkennen. Da die Hautanhangsgewebe nur im unverletzten Teil der Haut vorkommen, sind sie ein Anhaltspunkt, um regenerierte Haut, also die Narbe, von alter Haut zu unterscheiden. In den Abbildungen 5.12, 5.13 und 5.14 sind die Hautanhangsgewebe mit schwarzen Pfeilen markiert. In den Abbildungen sind histologische Schnitte der Defekte 3, 9 und 15 Tage nach der Operation zu sehen, genauer immer der Übergang von unverletzter Haut bis in den Defekt hinein. Der Übergang ist zum einen, wie schon beschrieben, durch das plötzliche Fehlen der Hautanhangsgewebe gekennzeichnet, zum anderen auch durch das Ende eines Muskels. Dieser ist in den Abbildungen mit einem blauen Pfeil markiert. Der Muskel ist ein Unterhautmuskel, der beim Setzen des Defektes mitentfernt wird. Grüne Pfeile markieren neues Epithel. Die Reepithelisierung verläuft vom Wundrand zur Mitte des Defektes hin. Die Spitze der Epithelisierungsfront ist mit einem grünen Stern markiert. In Abbildung 5.14 ist die Wunde komplett mit Epithel bedeckt, weshalb dort keine Epithelisierungsfront zu sehen ist. Scheinbar leere, große, blasige Formationen, die durch gelbe Pfeile markiert werden, sind Fettvakuolen weißen Fettgewebes. Rote Pfeile zeigen auf Blutgefäße, in denen man die roten Blutplättchen erkennen kann (Abb. 5.12 rechts unten). Ein roter

Stern in Abbildung 5.12 markiert entzündliche Infiltrate. Wahrscheinlich handelt es sich um polymorphkernige neutrophile Leukozyten, die im Rahmen der Entzündungs- und Exsudationsphase der Wundheilung versuchen, mögliche Krankheitserreger, Zelltrümmer oder toxische Stoffe abzubauen. Mit einem blauen Stern ist das Granulationsgewebe markiert, welches in Abbildung 5.12 kompakt erscheint, während in Abbildung 5.13 lockereres, noch unstrukturierendes Granulationsgewebe zu sehen ist. In Abbildung 5.14 ist das Granulationsgewebe im oberen Bereich des Defektes schon strukturierter, was darauf hinweist, dass sich hier die Wundheilung in ihrer letzten Phase, der Wundkontraktion und des Remodellings befindet.

Um zu analysieren, welche Unterschiede bei der Wundheilung aus der Anwendung der verschiedenen Wundaufgaben resultieren, wurden die Präparate aller Versuchsgruppen, bei denen die Wunden vollständig reepithelisiert sind, ausgewählt. Dies war bei allen Gruppen 15 Tage nach der Operation der Fall.

Von den Proben der Wunden wurde alle 150 μm ein histologischer Dünnschnitt angefertigt, mit HE gefärbt und der Defektbereich morphometrisch ausgewertet. In den Schnitten kann der gesamte Defekt und die Narbe eindeutig voneinander unterschieden werden. Der Defekt ist dadurch zu erkennen, dass der Unterhautmuskel, welcher beim Setzen des Defektes mitweggeschnitten wurde, fehlt. Die Narbe ist durch die Abwesenheit von Hautanhangsgewebe zu erkennen. In Abbildung 5.15 ist beispielhaft mit blau bzw. rot der Bereich der Narbe bzw. des fehlenden Unterhautmuskels markiert. Dieser zieht sich wegen seines Eigentonus beim Setzen des Defektes zusammen, weshalb die rote Strecke in der Abbildung nicht mit der blauen übereinstimmt.

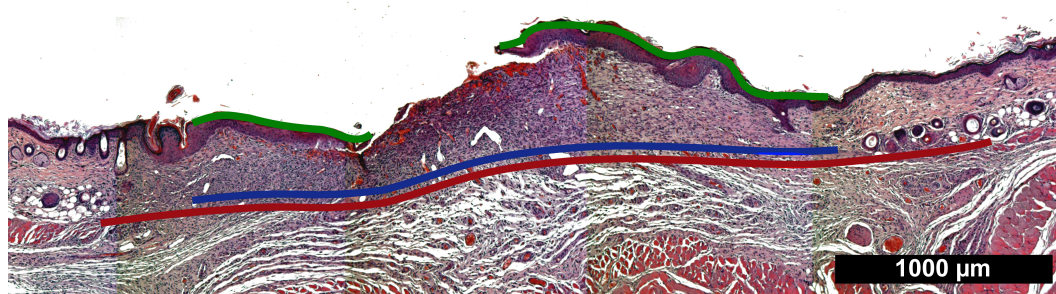


Abbildung 5.15: histologischer Dünnschnitt einer Wunde der Kontrollgruppe 9 Tage nach der Operation. Rot markiert ist der Bereich des fehlenden Unterhautmuskels, blau der der Narbe. Neu gewachsenes Epithel ist grün markiert.

An den Serienschnitten zum 15-Tage-Zeitpunkt wurde die Länge der Narbe und die Strecke des fehlenden Unterhautmuskels gemessen. So kann auf entsprechende Flächen geschlossen und diese können miteinander verglichen werden. Abb. 5.16 zeigt diese Flächenauswertung.

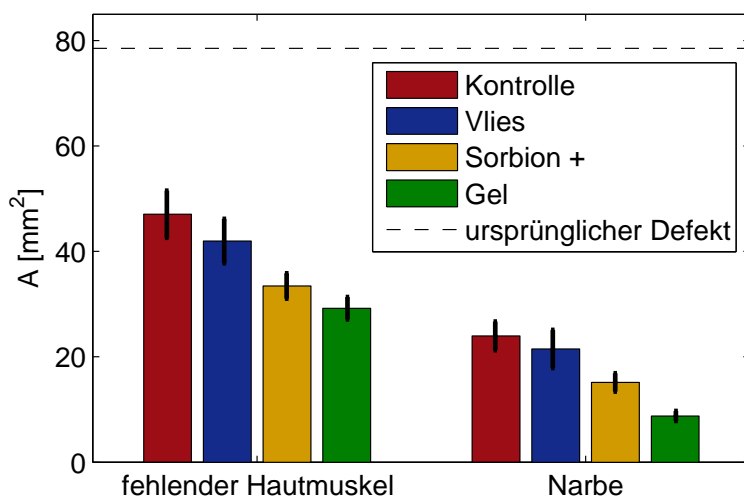


Abbildung 5.16: mittlere Fläche des verbleibenden Muskeldefektes der Wunde und die mittlere Narbenfläche;
Für diese Messung wurde von den Wunden alle $150\ \mu\text{m}$ ein Dünnschnittpräparat angefertigt und ausgemessen. Die entsprechenden Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die Evaluation des Muskeldefekts zeigt, dass bei der Gel-Gruppe der Bereich des fehlenden Unterhautmuskels am kleinsten ist. Das Verkleinern dieses Bereichs geschieht auf zwei Wegen. Zum einen regeneriert sich der Muskel, zum anderen kontrahiert er mit der gesamten Wunde. Wie schon an anderer Stelle gezeigt, ist die Geweberegeneration bei dieser Wundart mit interaktiven Wundauflagen besser als bei passiven [90]. Dies ist anscheinend auch auf den Muskel übertragbar. Dass die Defektfläche bei der Gel-Gruppe am kleinsten ist, könnte auch auf die eindiffundierten Silicaaggregate zurückzuführen sein, bedarf aber weiterer Untersuchungen bezüglich des Zusammenspiels zwischen Siliciumdioxid und des Muskelwachstums. Mit der Kontraktion der Wunde wird auch der Muskel beeinflusst und zusammengezogen. Da aber sowohl die Haut als auch der Muskel unterschiedlich kontrahieren, ist es nicht möglich, diese herauszurechnen und Aussagen über die Regeneration des Muskels zu machen. Diese unterschiedliche Kontraktion ist deutlich an den histologischen Schnitten von

Tag 3 zu sehen.

Wie schon beim Muskeldefekt, zeigt sich bei der mittleren Narbenfläche der gleiche Trend. Die Narbe ist in der Kontrollgruppe am größten und bei der Gel-Gruppe am kleinsten. Das Verschließen einer Wunde ist, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, auf zwei Vorgänge zurückzuführen. Zum einen kontrahiert die Wunde und zum anderen reepithelisiert sie. Die Stärke der Kontraktion korreliert mit der Größe der Narbe: Je stärker die Wundkontraktion, desto kleiner die Narbe. Die kleinere Narbe bei der Gel-Gruppe resultiert also aus einer stärkeren Wundkontraktion. Diese Kontraktion wird unter anderem durch das Zytokin TGF- β_1 reguliert, da TGF- β_1 die Proliferation von Fibroblasten und die Differenzierung dieser zu Myofibroblasten stimuliert [89, 24]. Die Myofibroblasten bilden Stressfasern aus Aktinfilamenten aus, mit denen sie Zugspannung auf die umgebende extrazelluläre Matrix ausüben und so eine lokale Kontraktion der Matrix erzeugen. Diese Kontraktion wird durch den weiteren Aufbau extrazellulärer Matrix stabilisiert und so dauerhaft [24]. Die Diffusion der Silicaaggregate in die Wunde, wie in Abschnitt 5.2.3.1 beschrieben, hat also einen Einfluss auf die Biochemie der Wundheilung, indem offensichtlich die TGF- β_1 -Produktion erhöht, und dadurch die Wundkontraktion verstärkt wird.

Auch die Reepithelisierung wird von TGF- β_1 beeinflusst. Obwohl TGF- β_1 die Produktion von Fibronektinen und Integrinen stimuliert, die den migratorischen Phenotyp von Keratinozyten induziert [55, 25], wird durch TGF- β_1 die Reepithelisierung gehemmt [55, 89, 60, 26, 84, 93]. Diese Beobachtung konnte auch im vorliegenden Experiment gemacht werden. Anhand der histologischen Schnitte konnte mit Hilfe der Reepithelisierungsfront der reepithelisierte Teil und der offene Teil der Wunde vermessen werden. In Abbildung 5.17 ist zu sehen, dass zum einen alle Wunden nach 12 Tagen verschlossen waren und dass die Reepithelisierung der Gel-Gruppe verzögert einsetzt. Auch bei der Vlies-Gruppe setzt die Reepithelisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert ein. An Tag 9 ist außerdem zu sehen, dass mehr Wundfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl bei der Gel- als auch der Vlies-Gruppe reepithelisiert sind.

Ein weiterer Punkt der Wundheilung ist die Reorganisation des neu gebildeten Epithels zu einer gesunden Epidermis. Die Präparate der Wunden von Tag 15 nach der Operation wurden dahingehend untersucht.

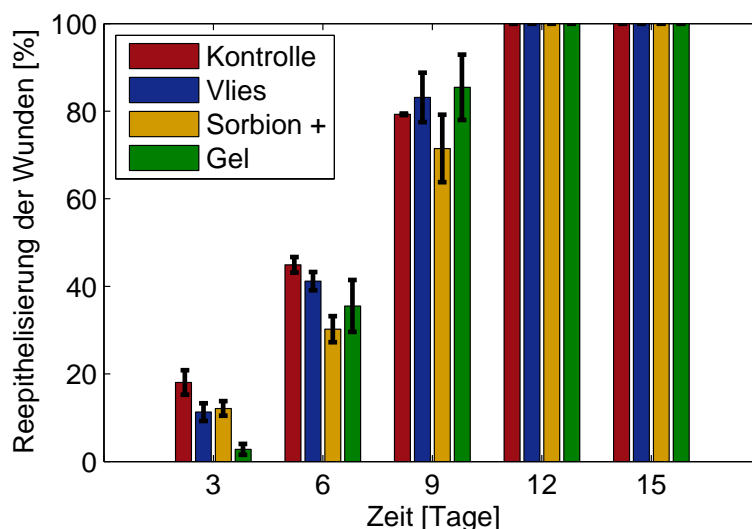
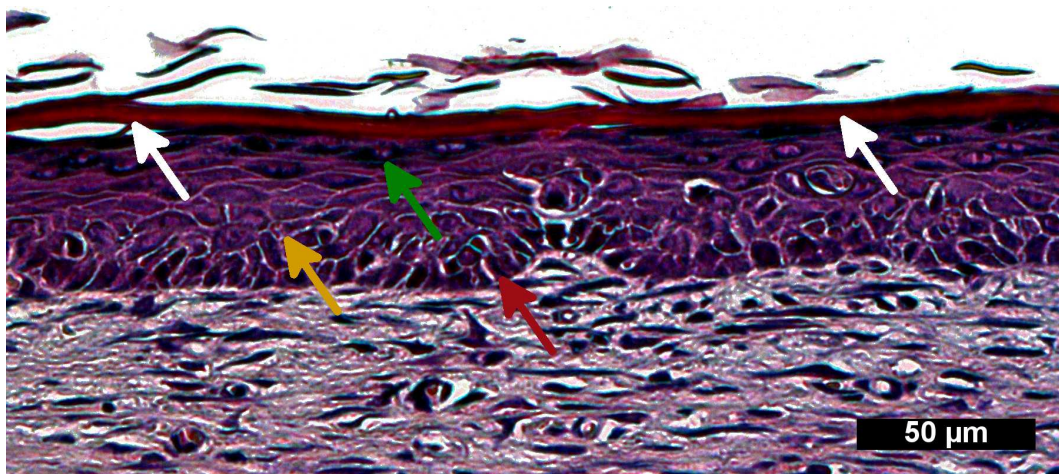


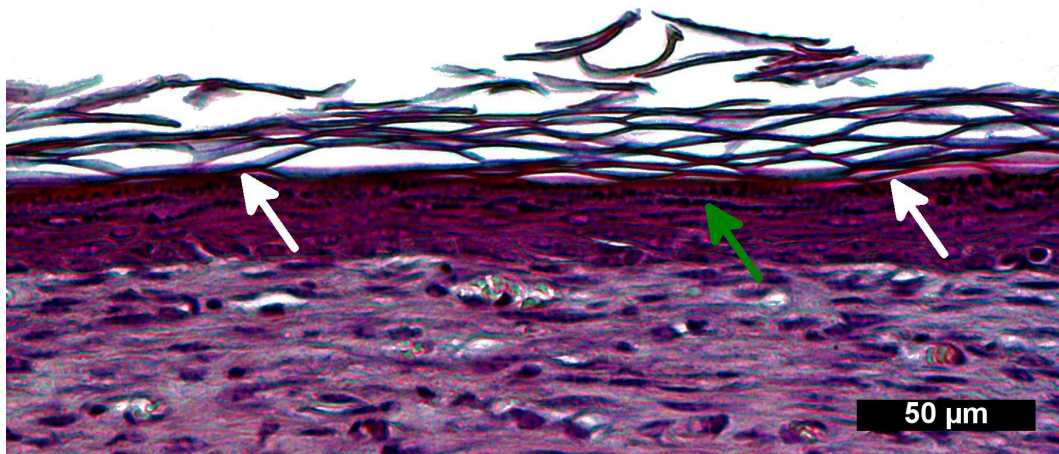
Abbildung 5.17: Reepithelisierung der Wunden der vier Versuchsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten in Prozent der gesamten Wunde; Gemessen wurde an einem Schnitt durch die Mitte der Wunde. Die entsprechenden Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. [Die Daten wurden von Ferenc Öri aufgenommen.]

In Abbildung 5.18 sind zwei Beispiele zu sehen. Abbildung 5.18a zeigt die Epidermis einer Wunde aus der Gel-Gruppe. Es ist deutlich das *stratum basale*, die Basalzellschicht zu sehen. Sie ist in der Abbildung mit einem roten Pfeil markiert. Das *stratum basale* dient als einlagige, innerste Zellschicht der Regeneration. In ihr findet die Zellteilung statt. Über dem *stratum basale* liegt das *stratum spinosum*, die Stachelzellschicht (gelber Pfeil in Abb. 5.18a), in dieser Schicht wird durch die zunehmende Synthese von Keratohyalin, die Verhornung oder Keratinisation der Keratinozyten eingeleitet. In der darauffolgenden Schicht, dem *stratum granulosum* oder Körnerzellschicht (grüner Pfeil in Abb. 5.18a) wandeln sich die Keratinozyten allmählich zu leblosen Korneozyten um. In ihnen sind die dunklen Keratohyalingranula zu erkennen. Die oberste Schicht der Epidermis ist das *stratum corneum*, die Hornzellschicht (weiße Pfeile in Abb. 5.18a). Hier befinden sich nur noch abgestorbene Korneozyten, die keine Zellorganellen mehr aufweisen. Das *stratum corneum* besteht hauptsächlich aus Keratin und stellt die Außenbarriere der Haut dar.

Je nach Heilungsgrad ist diese Ordnung der Epidermis mehr oder weniger ausgeprägt. In Abbildung 5.18b ist die Epidermis einer Wunde aus der Kontrollgruppe gezeigt. Hier sind eindeutig nur die letzten beiden Epidermisschicht-



(a) Epidermis einer Maus der Gel Gruppe



(b) Epidermis einer Maus der Kontrollgruppe

Abbildung 5.18: Epidermen 15 Tage nach der Operation von 2 unterschiedlichen Versuchsgruppen (Gel- bzw. Kontrollgruppe); Erkennbar ist, dass sich bei der Kontrollgruppe (5.18b) noch keine klare Epidermisstruktur gebildet hat, während bei der Gel-Gruppe (5.18a) die Epidermisstrukturen zu erkennen sind.

stratum basale (roter Pfeil)

stratum spinosum (gelber Pfeil)

stratum granulosum (grüner Pfeil)

stratum corneum (weiße Pfeile)

ten zu erkennen. Das *stratum granulosum* (grüner Pfeil), zu erkennen an den Granula und das *stratum corneum* (weiße Pfeile), zu erkennen an den Plattenepithelzellen (Korneozyten). Die Tabelle 5.3 stellt die qualitative Analyse der Epidermis der Präparate dar. Es wurde untersucht, ob die Zellschichten geordnet sind, oder nicht.

Versuchsguppe	geordnete Zellschichten
Kontrolle	2
Vlies	5
Sorbion plus	6
Gel	5

Tabelle 5.3: Angegeben sind jeweils die Anzahl an erkennbar geordneten Zellschichten in der Epidermis von je 8 Schnitten.

Die Dicke der Epidermis ist ein weiterer Parameter, an dem die Qualität der Haut gemessen werden kann. Es wurde die mittlere Dicke der Epidermis der Wunden von Tag 15 nach der Operation gemessen. Der Graf in Abbildung 5.19 zeigt, dass die Epidermis der Sorbion plus-Wundauflage am dicksten ist, die der Gel-Gruppe dünner und die der Kontrollgruppe am dünnsten. Diese Ergebnisse als Indikator für die Epidermisqualität decken sich auch mit der qualitativen Analyse (Tabelle 5.3). Trotz der verzögert einsetzenden Reepithelisierung, ist die Epidermis der Gel-Gruppe 15 Tage nach der Operation reifer als die der Kontrollgruppe.

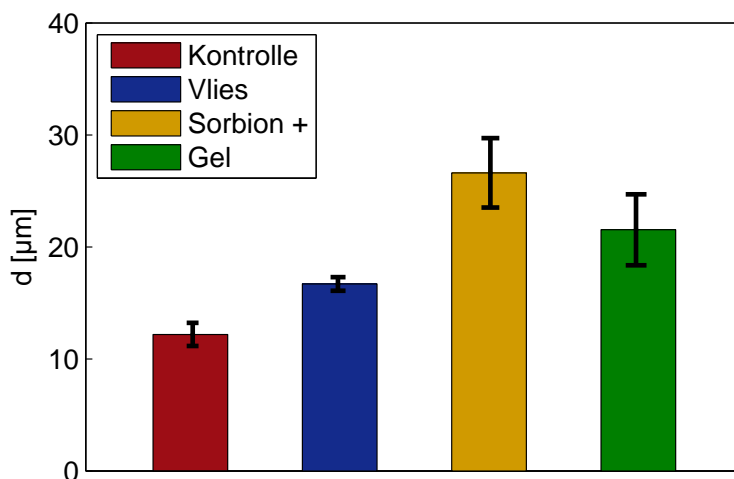


Abbildung 5.19: Abgebildet ist die mittlere Epidermis der Wunden der vier Versuchsgruppen an Tag 15.

5.2.3.4 Immunhistochemische Analyse zur Vaskularisation

Da bei der Wundheilung die Neoangiogenese, also das Wachstum von Blutgefäßen, innerhalb der Defektregion von entscheidender Bedeutung ist, wurden

mit Hilfe des Antikörpers CD31 der Firma Abcam die Blutgefäße nachgewiesen.

Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül oder auch Cluster of Differentiation 31 (CD31), ist ein Protein, welches in hohen Mengen auf der Oberfläche von frühen und reifen Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und einigen Arten von T-Zellen exprimiert ist. Es ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches u.a. die endotheliale Zelladhäsion vermittelt, und eine Rolle bei der Endothelanlagerung spielt.

In Abbildung 5.20 ist ein Dünnschnitt aus dem Defektbereich einer Maus der Vlies-Gruppe 12 Tage nach der Operation zu sehen. Es wurden hier mit Hil-

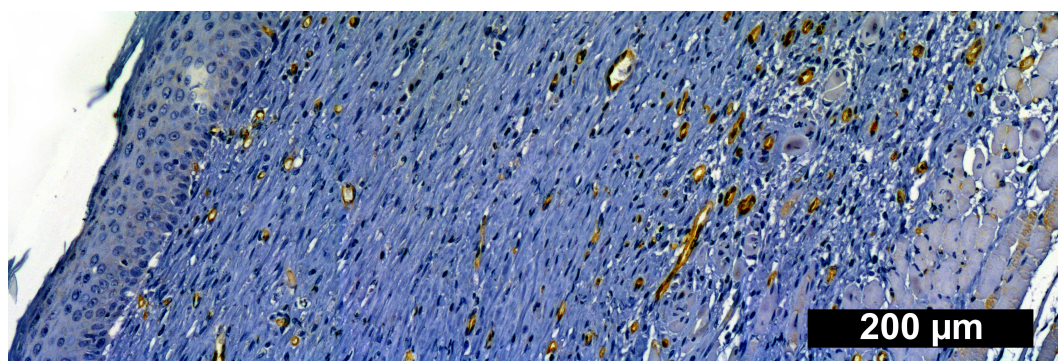


Abbildung 5.20: histologischer Dünnschnitt des Defektes der Vlies-Gruppe 12 Tage nach der Operation; rechts Muskel, links Epithel; Die Gefäßwände sind mit Hilfe von CD31 braun gefärbt. Im rechten Bildbereich sind noch ungeordnete Strukturen mit vielen Gefäßen zu sehen, links geordnetere Struktur und weniger Gefäße.

fe von CD31 die Blutgefäße braun angefärbt. Bei diesem Schnitt sind in der rechten Bildhälfte mehr Blutgefäße zu sehen als in der linken. Die Unterschiede sind durch das Einsprossen der Blutgefäße aus dem Wundgrund zu erklären. Eine hohe Blutgefäßdichte zu frühen Zeiten der Wundheilung beschleunigt diese auf Grund eines höheren Nährstoffeintrags. Das Abfallen der Gefäßdichte zeigt den Übergang von der Granulations-/Proliferationsphase zum Remodelling der Wunde an.

Die histologischen Dünnschnitte der Defekte der verschiedenen Wundauflagen von Tag 6, 12 und 15 nach der Operation wurden mit Hilfe von CD31 gefärbt und die Anzahl der Gefäße bestimmt. Dazu wurde ein Bereich aus der Mitte des Defektes gewählt und in diesem die Gefäße gezählt. Die Anzahl der Blutgefäße im Verhältnis zur Fläche des Bereiches ergibt die Blutgefäßdichte. In Abbildung 5.21 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt. Mit Ausnahme

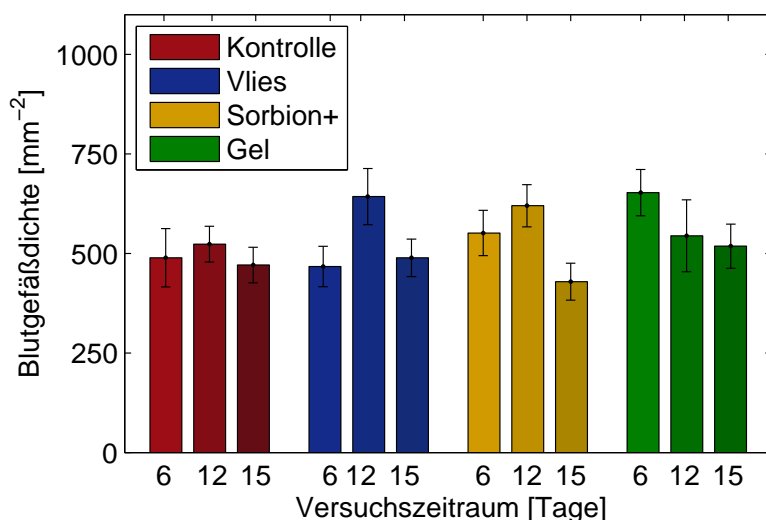


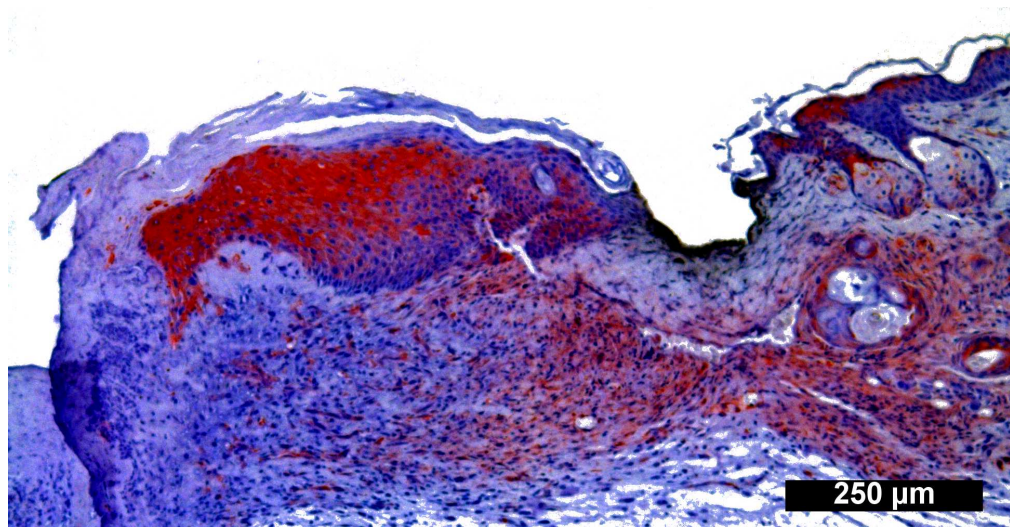
Abbildung 5.21: Blutgefäßdichte der heilenden Defekte der verschiedenen Wundauflagen zu den Zeitpunkten 6, 12 und 15 Tage nach der Operation. Die entsprechenden Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

der Gel-Gruppe ist bei allen Gruppen ein Anwachsen der Blutgefäßdichte von Tag 6 zu Tag 12 und ein Abfallen der Dichte von Tag 12 zu Tag 15 festzustellen. Bei der Gel-Gruppe ist die Gefäßdichte von Anfang an sehr hoch und fällt von Tag 6 zu Tag 12 und von Tag 12 zu Tag 15 ab. Dies legt nahe, dass die Angiogenese beschleunigt stattfindet und somit das Ausreifen der Blutgefäße früher beginnt. Roberts et al. haben gezeigt, dass die Wachstumsfaktoren der TGF- β -Gruppe einen fördernden Einfluss auf die Angiogenese und auch auf die Kollagenbildung haben [71]. Die Analyse der Defektgrößen an den histologischen Schnitten der Wunden (Kapitel 5.2.3.3) weist auf einen erhöhten TGF- β_1 -Spiegel in den Wunden der Gel-Gruppe hin. Es ist davon auszugehen, dass die beschleunigte Angiogenese der Gel-Gruppe auf einen erhöhten TGF- β_1 -Spiegel zurückzuführen ist.

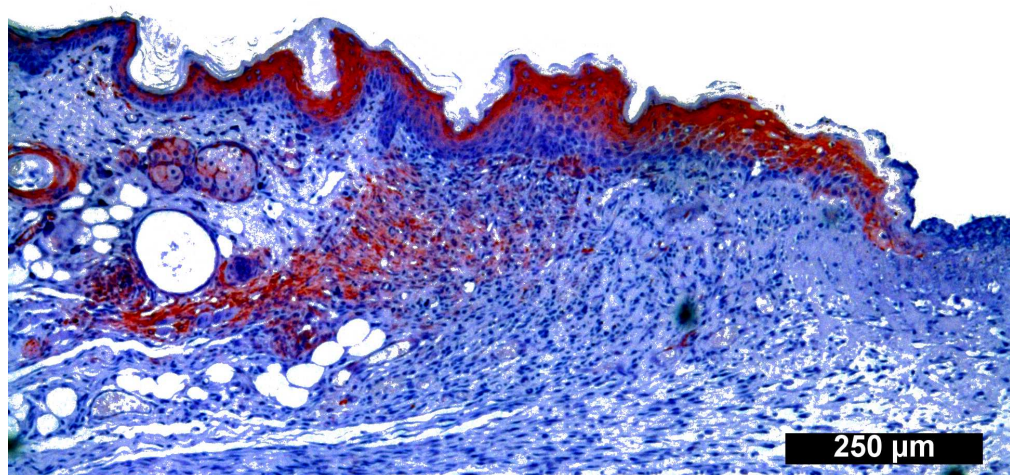
5.2.3.5 Immunhistochemische Analyse mit Hilfe von α -SMA

Die Auswertungen zur Wundkontraktion und zur Blutgefäßdichte ergeben Hinweise darauf, dass der TGF- β_1 -Spiegel in der Wunde durch Silicaaggregate erhöht wird. Da TGF- β_1 die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten stimuliert [89, 24], kann die Analyse der Myofibroblasten weitere Anhaltspunkte über den TGF- β_1 -Spiegel in den Wunden liefern.

Myofibroblasten entwickeln diverse ultrastrukturelle und biochemische Merkmale glatter Muskelzellen, u.a. die Expression des α -Smooth-Muscle-Actins (α -SMA). Eine Erhöhung der Expression dieses Actins kann bei den Myofibroblasten durch TGF- β_1 induziert werden [18]. Durch einen Antikörper, der spezifisch an α -SMA bindet, kann man Zellen mit α -SMA immunhistochemisch färben, somit auch auf die Anwesenheit von TGF- β_1 schließen. Ob SiO₂ einen Einfluss auf die Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten hat, wurde anhand dieser Färbung untersucht. Dazu wurden histologische



(a)



(b)

Abbildung 5.22: α -Smooth Muscle Actin Färbung (rot) eines histologischen Dünnschnitts aus der Mitte einer Wunde der Gel-Gruppe (a) und der Kontrollgruppe (b), 6 Tage nach der Operation

Dünnschnittpräparate der Wunden der Kontroll- und der Gel-Gruppe 6 Tage nach der Operation angefertigt, gefärbt und untersucht. In der Abbildung 5.22 sind entsprechende Färbungen zu sehen. Die rot eingefärbten Bereiche sind die, in denen α -SMA nachweisbar war. Das neu gebildete Epithel, zu sehen im oberen Bereich der Abbildungen, reagiert auch positiv auf die α -SMA Färbung, was aber in dieser Betrachtung keine Rolle spielen soll.

Offensichtlich passiert die Differenzierung der Fibroblasten vom Rand der Wunde her (von rechts in 5.22a; von links in 5.22b). Wie weit dies fortgeschritten ist, wurde gemessen und im Verhältnis zur Wundgröße bzw. zu neu gebildetem Epithel betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.23 dargestellt. Das

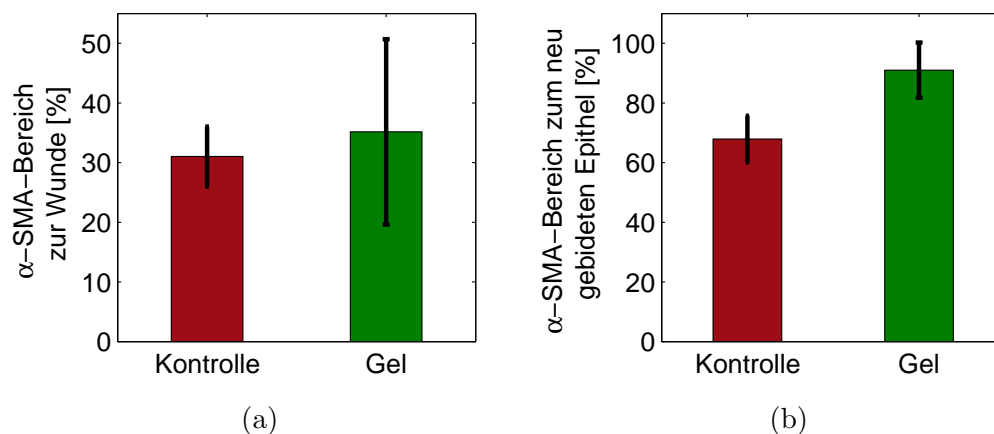


Abbildung 5.23: Bereich mit α -SMA im Verhältnis zur Wundgröße (a) bzw. zum neu gebildeten Epithel (b) an Tag 6 nach der Operation; Die entsprechenden Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

Verhältnis des Bereiches mit nachweisbarem α -SMA, also der Bereich, in dem Myofibroblasten zu finden sind, zur Wunde ist nicht signifikant unterschiedlich. Zu neu gebildetem Epithel ist ein Unterschied zu erkennen. Es zeigt sich, dass bei der Gel-Gruppe dieser Bereich ($91,0 \pm 9,2$) % der Länge des neu gebildeten Epithels entspricht, während es bei der Kontrollgruppe ($67,9 \pm 7,8$) % sind. Im Endeffekt bedeutet dies, dass die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten an Tag 6 nach der Operation unabhängig von der Wundauflage ist. Der Unterscheid beim Verhältnis des Bereiches mit α -SMA zu neu gebildeten Epithel lässt sich durch die verzögerte Reepithelisierung (s.h. Kapitel 5.2.3.3) erklären.

6 Kompakte SiO₂-Strukturen und deren biologische Aktivität

Im vorigen Kapitel wurde beschrieben, welche Einflüsse nanostrukturierte Silicaaggregate in Wunden haben. Sollte sich in klinischen Studien zeigen, dass dies auch auf den Menschen übertragbar ist und durch die SiO₂-Aggregate die Heilung chronischer Wunden positiv beeinflusst wird, stellt sich die Frage, ob mehr SiO₂ zu noch besserer Heilung führt.

Die entwickelte Wundauflage hat einen relativ geringen SiO₂-Gehalt. Um diesen zu erhöhen, würde es sich anbieten, bestimmte SiO₂-Konstrukte zusätzlich in die Auflage oder auf die Wunde zu geben. Ein Vorteil an diesem Verfahren wäre, dass die SiO₂-Konstrukte genau designed werden können.

In diesem Kapitel soll so ein Konstrukt vorgestellt werden. Da dessen Bioaktivität natürlich von entscheidender Bedeutung ist, wurde mit Hilfe zweier Untersuchungen diese aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet.

6.1 SiO₂-Mikropartikel

In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem man die Vernetzung von SiO₂-Strukturen beeinflussen kann [19]. Die Strukturen liegen in Form von Mikropartikeln vor. In Kombination mit den Wundauflagen, können sie zur Klärung der Frage, welchen Einfluss die Vernetzung der SiO₂-Strukturen auf biologische Systeme haben, beitragen.

An dieser Stelle sollen kurz die Mikropartikel und die Strukturbeeinflussung dargestellt werden.

In Abschnitt 2.1.1 wird die Strukturbildung von SiO₂-Strukturen aus Tetraethylorthosilikat (TEOS) beschrieben. Durch Hydrolyse werden dem TEOS Ethylgruppen abgetrennt und über die so entstandenen OH-Gruppen kondensieren die Moleküle zu größeren Strukturen. Sie entwickeln sich von Dimeren

über zyklische Strukturen und Polyedern zu Primärpartikeln und dann weiter je nach chemischer Umgebung u.a. zu fraktalen Gelen oder größeren Partikeln. Wird aber nach der Primärpartikelbildung das Sol verestert, so wird die weitere Kondensation beeinflusst. Die Veresterung ist die Rückreaktion der Hydrolyse (Kapitel 2.1.1 Schema 2.1), bei der wieder Ethylgruppen an die SiO₂-Oberfläche gebunden werden. Den Primärpartikeln ist es nicht möglich, sich über zwei Ethylgruppen zu vernetzen, da zur Vernetzung mindestens eine OH-Gruppe nötig ist (Kapitel 2.1.1 Schema 2.2). Nun kann durch eine gezielte Veresterung ein bestimmter Anteil der SiO₂-Oberfläche der Primärpartikel mit Ethylgruppen versehen werden. Je mehr Ethylgruppen sich an der Oberflächen befinden, desto höher ist der Veresterungsgrad (DE). Dieser ist das Verhältnis von Ethylgruppen zu (OH + Ethylgruppen) auf der Oberfläche der Primärpartikel. Ein höherer Veresterungsgrad bewirkt eine schwächere Vernetzung der Partikel beim Aufeinandertreffen. Dass dies so ist, wurde anhand von Röntgenweitwinkelstreuung (WAXS) an ofengetrockneten, verschieden stark veresterten Solen gezeigt (s.h. Abb. 6.1). In dieser Abbildung sind zwei Peaks

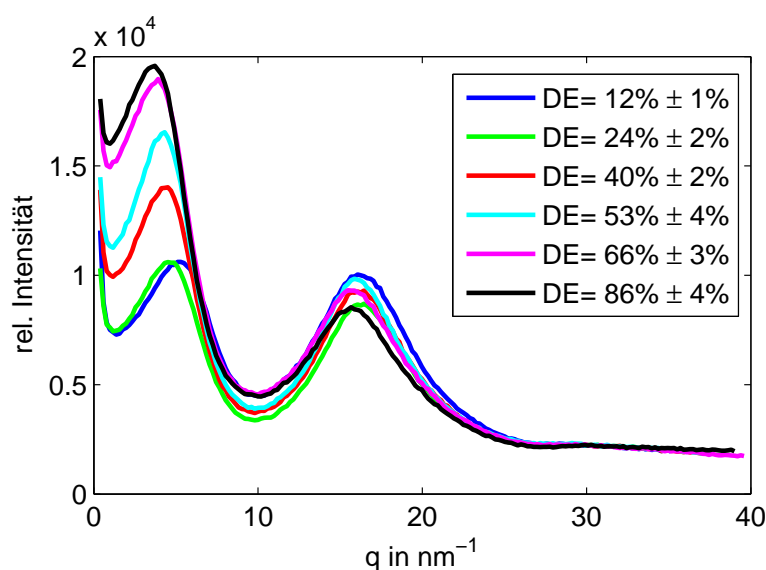
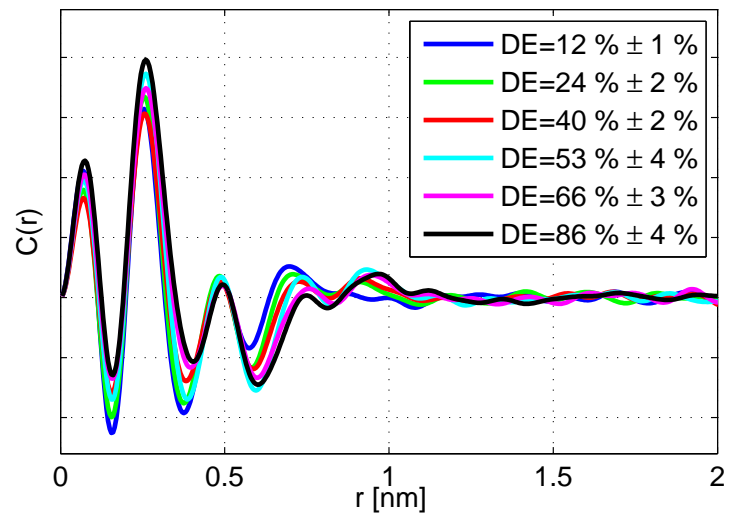
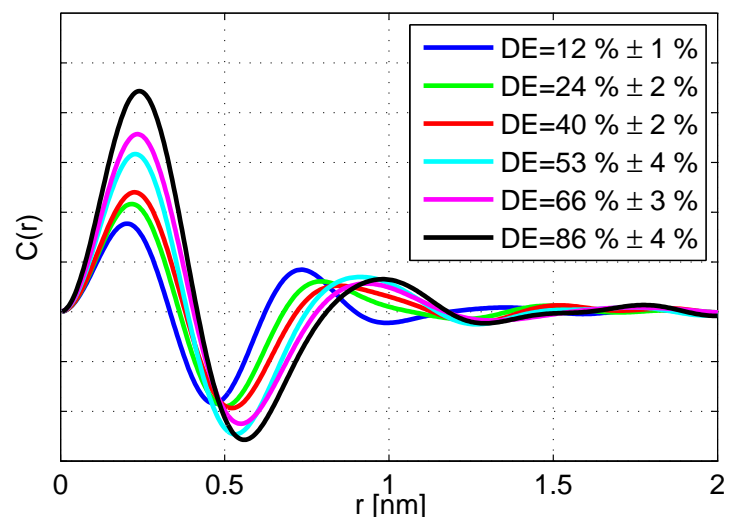


Abbildung 6.1: WAXS-Streukurven getrockneter Sole unterschiedlichen Veresterungsgrades (aus [19])

zu erkennen. Der erste, bei kleineren Beträgen des Streuvektors, lässt sich durch eine leicht geordnete Anlagerung der Primärpartikel beim Trocknen erklären. Man sieht, dass dieser Peak bei stärker veresterten Gelen nach vorne, also zu kleineren Beträgen des Streuvektors, verschoben ist. Das bedeutet, die streuenden Strukturen, welche diesen Peak verursachen, sind größer. Dies ist



(a)



(b)

Abbildung 6.2: errechnete Korrelationsfunktionen der Streukurven aus Abbildung 6.1 unter Berücksichtigung der gesamten Streukurve (a) bzw. nur des Peaks bei kleineren Beträgen des Streuvektors (aus [19])

auch in den aus den Streukurven errechneten Korrelationsfunktionen (Abb. 6.2) zu sehen. Die Korrelationsfunktionen der gesamten Streukurven (Abb. 6.2a) lassen zwei Schwingungen erkennen, eine mit kurzer und eine mit langer Wellenlänge. Die langwellige Schwingung ist separat in Abbildung 6.2b zu sehen und lässt sich errechnen, indem nur der Peak bei kleineren Beträgen des Streuvektors zur Berechnung der Korrelationsfunktion betrachtet wird.

Die Wellenlänge der Schwingung steigt mit höherem Veresterungsgrad. Der minimale Abstand zwischen den streuenden Strukturen steigt also. Da dieser Abstand vornehmlich durch die Größe der Strukturen bedingt wird, müssen diese in irgend einer Weise wachsen. Da jedoch entsprechende Messungen kein Wachstum der SiO_2 Partikel während der Veresterung zeigen (s.h. [19]), ist die größere Größe der Primärpartikel durch die Hülle aus Ethylgruppen zu erklären. Sie behindert zudem auch die Vernetzung der Primärpartikel, da keine Kondensationsreaktion über zwei Ethylgruppen möglich ist.

Durch eine Veresterung kann also die Vernetzung der Primärpartikel beim Trocknen gesteuert werden.

Als geeigneter Trocknungsvorgang hat sich das Sprühtrocknen erwiesen. Dadurch können hohle Partikel im Mikrometerbereich erzeugt werden. In Abbil-

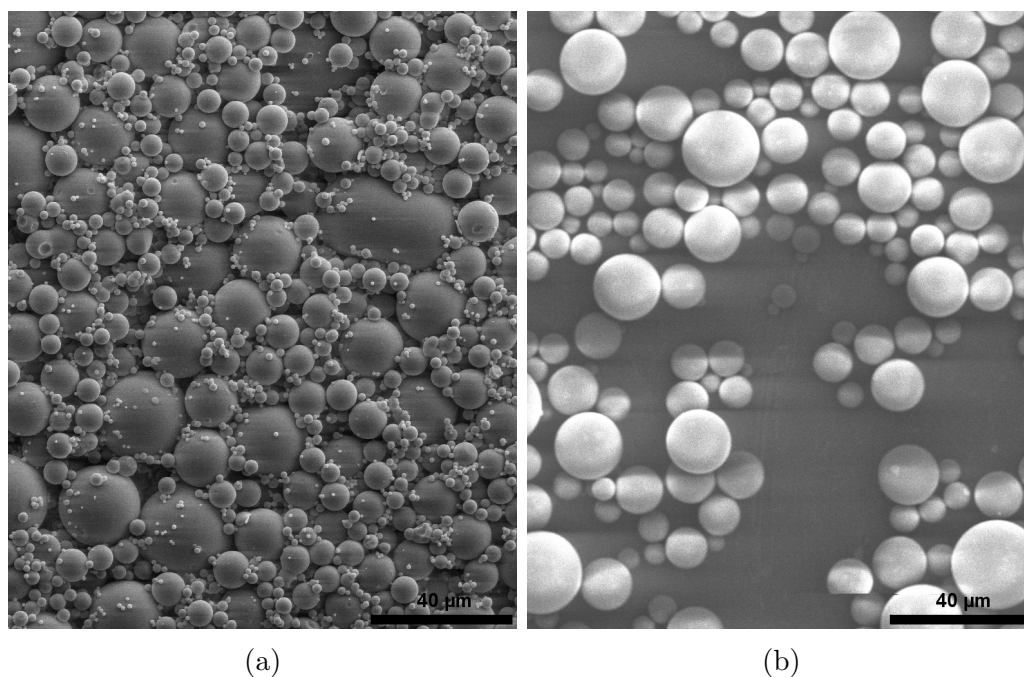


Abbildung 6.3: (a) REM-Aufnahmen sprühgetrockneter Mikropartikel (aus [19]);
(b) mit einem Sieb sortierte Mikropartikel

Abbildung 6.3a sind Partikel zu sehen, die einen Veresterungsgrad von $(12 \pm 1)\%$ aufweisen. Man kann erkennen, dass es zwei Sorten von Mikropartikeln gibt. Eine große und eine sehr kleine. Da diese Partikel in den Körper eingebracht werden sollen und an dieser Stelle zum Verbleib vorgesehen sind, sollten sie eine bestimmte Größe nicht unterschreiten. Sind die Partikel kleiner als $10\text{--}20\ \mu\text{m}$, können sie von Makrophagen phagozytiert werden [15]. Aus diesem

Grund wurden die Mikropartikel mit einem $32\ \mu\text{m}$ Sieb sortiert. Die gesiebten Partikel sind in Abbildung 6.3b abgebildet. Durch das Sieben konnte erreicht

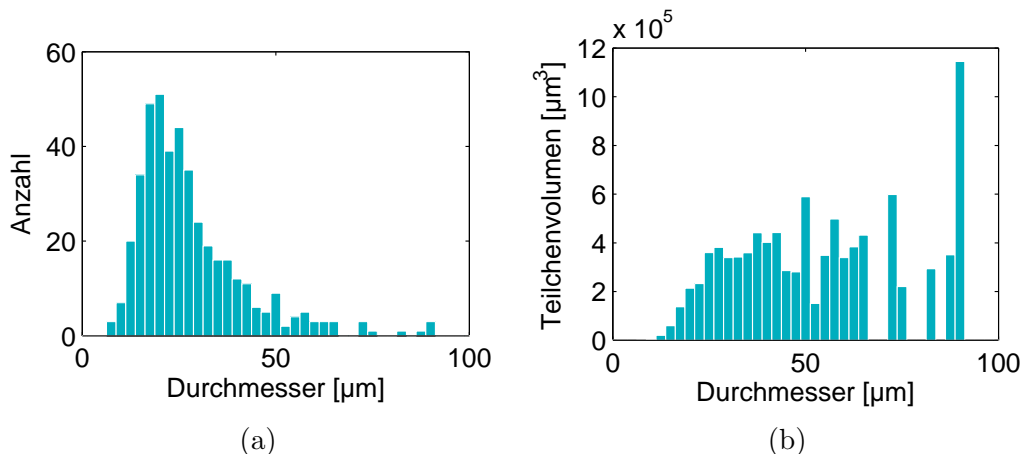


Abbildung 6.4: (a) Größen- und (b) Volumenverteilung der gesiebten SiO_2 -Mikropartikel

werden, dass der Großteil der Mikropartikel größer als $20\ \mu\text{m}$ ist. In Abbildung 6.4 sind die Größen- und Volumenverteilung der gesiebten Mikropartikel zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die meisten Partikel einen Durchmesser um die $20\ \mu\text{m}$ besitzen, die Verteilung zu größeren Durchmessern aber nicht so stark abfällt wie zu kleineren. Trägt man die Volumina über die Durchmesser der Partikel auf (Abb. 6.4b), wird ersichtlich, dass die kleineren Partikel mit einem Durchmesser $\leq 20\ \mu\text{m}$ nur $3,2\%$ des gesamten Volumens ausmachen. $96,8\%$ des SiO_2 liegt also in Mikropartikeln der gewünschten Größe vor.

6.2 SiO_2 -Mikropartikel im Tierexperiment

Dass das Material der Mikropartikel, also Silicaaggregate im Nanometerbereich, biokompatibel ist, konnte an mehreren Stellen nachgewiesen werden (Kapitel 5.1, [68]). Die entsprechende Testung *in vivo* wurde analog zu dem Tierversuch der Wundauflagen durchgeführt (s.h. Kapitel 5.2). Es wurden Mikropartikel mit einem Veresterungsgrad von $(12 \pm 1)\%$ nach [19] hergestellt. Ein Großteil der kleinen Partikel wurde mit Hilfe eines $32\ \mu\text{m}$ Sieb entfernt. Da an der Herstellung der Mikropartikel eine Veresterung beteiligt ist, befinden sich Ethylgruppen an den Partikeln. Diese hydrolysieren in Anwesenheit von Wasser zu Ethanol, welcher toxisch und unerwünscht ist. Aus diesem Grund müssen die Ethylgruppen vor dem Einsatz der Partikel entfernt werden. Dies

wurde durch mehrfaches Spülen der Mikropartikel in verdünnter Oxalsäure (pH = 1) erreicht. Die Oxalsäure dient dabei als Katalysator und wurde anschließend durch Spülen mit Wasser entfernt. Die Partikel liegen dispergiert in Wasser vor. Abbildung 6.3b zeigt Mikropartikel, die für die Testung verwendet wurden. Die Untersuchungen in Kapitel 5.2 haben gezeigt, dass die Wundauf-

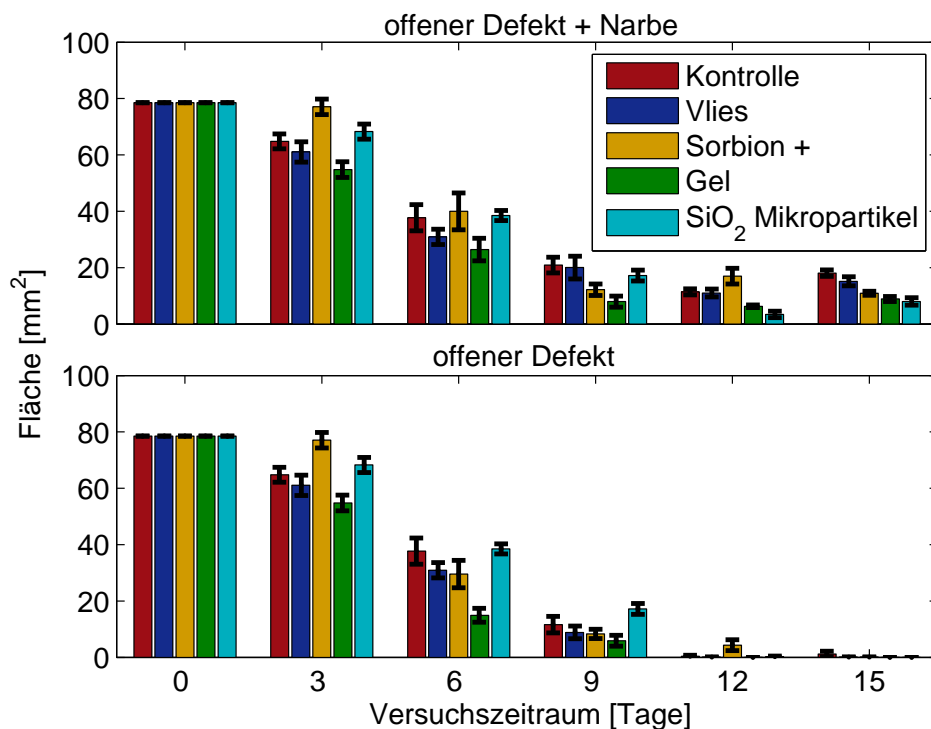


Abbildung 6.5: Auswertung der Defekt- und Narbenflächen analog zu Abbildung 5.11;

Die Defekte sind 12 Tage nach der Operation verschlossen, die Narbenbildung bei der Mikropartikelgruppe ist erst nach 12 Tagen messbar. Jedoch ist diese verglichen mit den der anderen Gruppen am kleinsten. Die entsprechenden Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. [Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Ferenc Öri erhoben.]

lagen nicht resorbiert werden, da sie auch nicht einwachsen. Nur die in ihnen enthaltenen Silicaaggregate gelangen in die Wunde. Aus diesem Grund wurden die Mikropartikel nicht in die Wundauflage eingebaut. Es wurden 30 μ l einer wässrigen Mikropartikeldispersion mit 10000 ± 500 Mikropartikeln direkt auf die Wunde appliziert. Die Größen- und Volumenverteilung der verwendeten Mikropartikel ist in Abbildung 6.4 zu sehen. Anschließend wurde die Wunde mit einer feuchten Kompositwundauflage abgedeckt, welche, wie in

Kapitel 4.2 beschrieben, hergestellt wurde. Die Abdeckung der Wundauflage übernahm eine semipermeable selbstklebende Folie, der Transparentverband 3M™ Tegaderm™ Film.

Bei jedem Verbandswechsel, der analog zu dem Tierversuch nach Kapitel 5.2.2 erfolgte, wurden 30 μ l der Mikropartikeldispersion auf die Wunde gegeben. 3, 6, 9, 12 und 15 Tagen nach der Operation wurden die Defektbereiche vermessen, explantiert und es wurden histologische Schnitte von ihnen angefertigt. Abbildung 6.5 zeigt die Defekt- und Narbenflächen der Mikropartikelgruppe und die Daten der anderen Gruppen aus Kapitel 5.2.3.2.

Der offene Defektbereich ist an Tag 3 und 6 nach der Operation etwa so groß, wie der der Kontrollgruppe und 9 Tage nach der Operation am größten. An Tag 12 und 15 nach Setzen des Defektes waren die Wunden verschlossen, die Narben aber kleiner als die der anderen Gruppen. Interessant ist außerdem, dass eine messbare Narbenbildung erst 12 Tage nach der Operation zu beobachten ist. Die Reepithelisierung muss also sehr stark verzögert, erst zwischen dem neunten und zwölften Tag einsetzen und auch die Wundkontraktion ist anfangs schwächer ausgeprägt. An Tag 3 und 6 nach der Operation sind die Narben in etwa so groß wie die der Kontrollgruppe. Auch 9 Tage nach Setzen des Defektes sind die Gesamtdefekte, also die offenen Defektflächen plus Narbenflächen, in etwa so groß wie die der Kontrollgruppe, jedoch sind bei der Kontrollgruppe die Wunden schon etwa zur Hälfte vernarbt. An Tag 12 nach der Operation sind dann auch die Wunden der Mikropartikelgruppe verschlossen und die Narben sind signifikant ($p < 0,01$) kleiner als die der Gel-Gruppe und damit am kleinsten. 15 Tage nach der Operation sind die Narben signifikant ($p < 0,01$) kleiner als die der Sorbion plus-Gruppe jedoch bei einer Signifikanzgrenze von $p = 0,05$ nicht signifikant ($p = 0,17$) unterschiedlich zu den Narben der Gel-Gruppe. Die Wundkontraktion ist also nach 15 Tagen so stark wie die der Gel-Gruppe, setzt aber später ein. Offensichtlich behindert ein Prozess die Reepithelisierung bzw. die Wundkontraktion.

In den HE-gefärbten histologischen Dünnschnitten (Abb. 6.6) lassen sich die nanostrukturierten SiO₂-Mikropartikel innerhalb der Wunde nachweisen. In Abbildung 6.6c und vergrößert in 6.6d kann man den Übergang sehen, an dem die Mikropartikel von organischem Material infiltriert werden. Dies ist an der unterschiedlichen Erscheinungsform der Mikropartikel erkennbar. Es sind durchscheinende (rote Pfeile) und rosafarbene (weiße Pfeile) Partikel zu

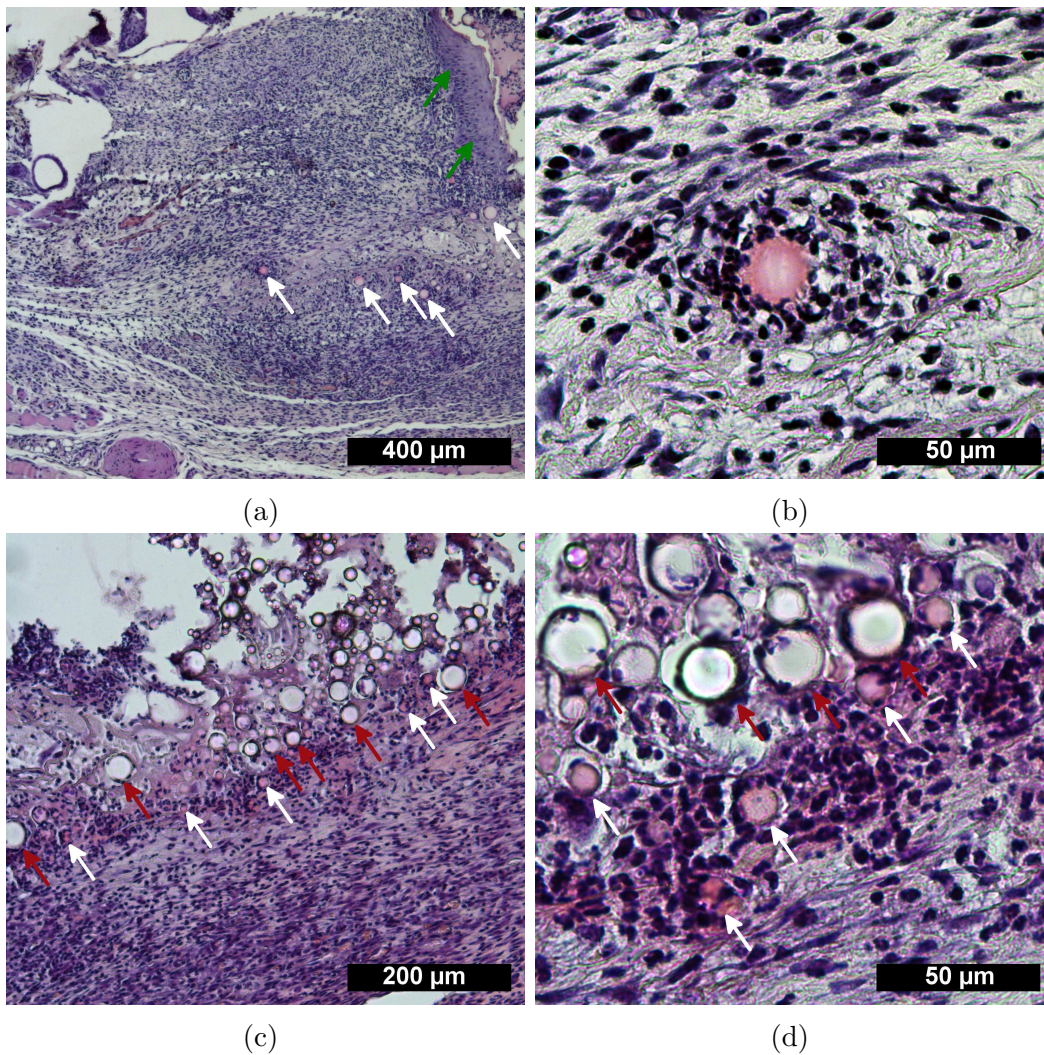


Abbildung 6.6: HE-gefärbte, histologische Dünnschnitte des Defektes der SiO₂-Mikropartikel-Gruppe 9 Tage nach der Operation; Rote Pfeile markieren Mikropartikel, die noch nicht durch organisches Material infiltriert worden sind. Weiße Pfeile markieren Mikropartikel, in die organischen Material eingedrungen ist. Grüne Pfeile zeigen auf neue Epidermis. In (b) und auch (d) ist zu sehen, dass sich viele Zellen um die infiltrierte Mikropartikel konzentrieren. Dies lässt auf eine entzündliche Reaktion auf die Mikropartikel schließen.

sehen. Die durchscheinenden Partikel liegen in einer zellarmen Schicht an der Oberfläche der Wunde. Die rosafarbenen liegen tiefer in der Wunde. Die unterschiedliche Färbung der Partikel ist darauf zurückzuführen, dass das SiO₂ selber keinen Farbstoff annimmt, jedoch nehmen Zellplasmaproteine, Fibrin oder auch Kollagen den roten Farbstoff Eosin an. Die Mikropartikel werden also

von organischem Material infiltriert, welches dann sichtbar ist. Am Übergang

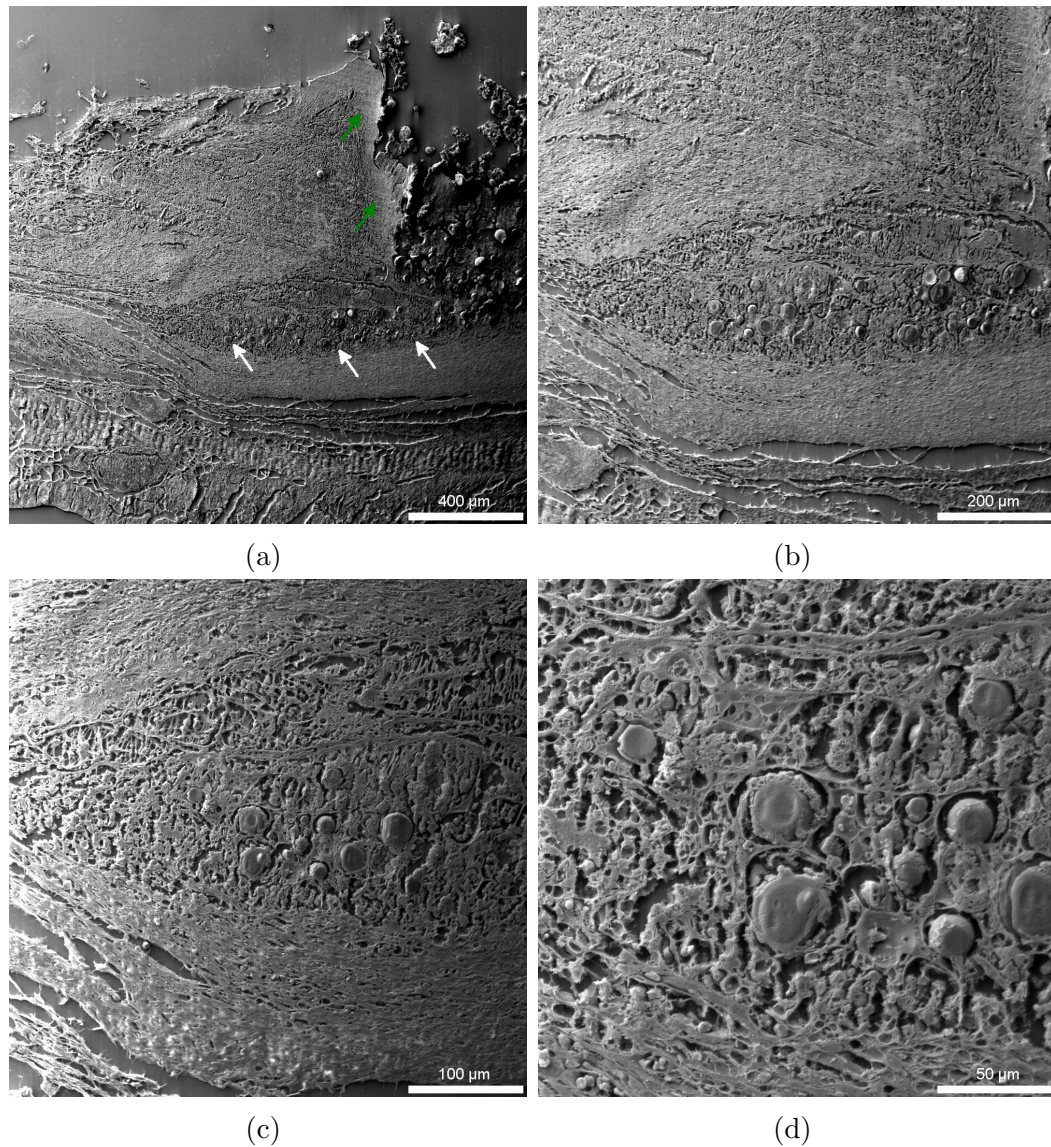


Abbildung 6.7: REM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen eines entparaffinierten, ungefärbten histologischen Dünnschnittes des Defektes der SiO₂-Mikropartikel-Gruppe 9 Tage nach der Operation; Die runden Gebilde sind die eingewachsenen SiO₂-Mikropartikel (weiße Pfeile). Grüne Pfeile markieren die neue Epidermis.

vom äußeren zum inneren Bereich der Wunde (Abb. 6.6d) kann man erkennen, dass die Partikel, in welche schon organisches Material infiltriert ist, noch einen dunklen Rand, ihre SiO₂-Hülle besitzen. Tiefer liegende Partikel wie in Abbildung 6.6b haben keinen sichtbaren dunklen Rand mehr, die SiO₂-Hülle wird also scheinbar abgebaut oder durch organisches Material ausgetauscht. Um

diese Vermutung zu untersuchen, wurde ein weiterer Dünnschnitt der Probe, welche in Abbildung 6.6 zu sehen ist, angefertigt. Dieser wurde entparaffiniert und mit dem REM und EDX analysiert. So konnten die Mikropartikel auf ihre Elementverteilung untersucht werden (Abb. 6.8). In Abbildung 6.7

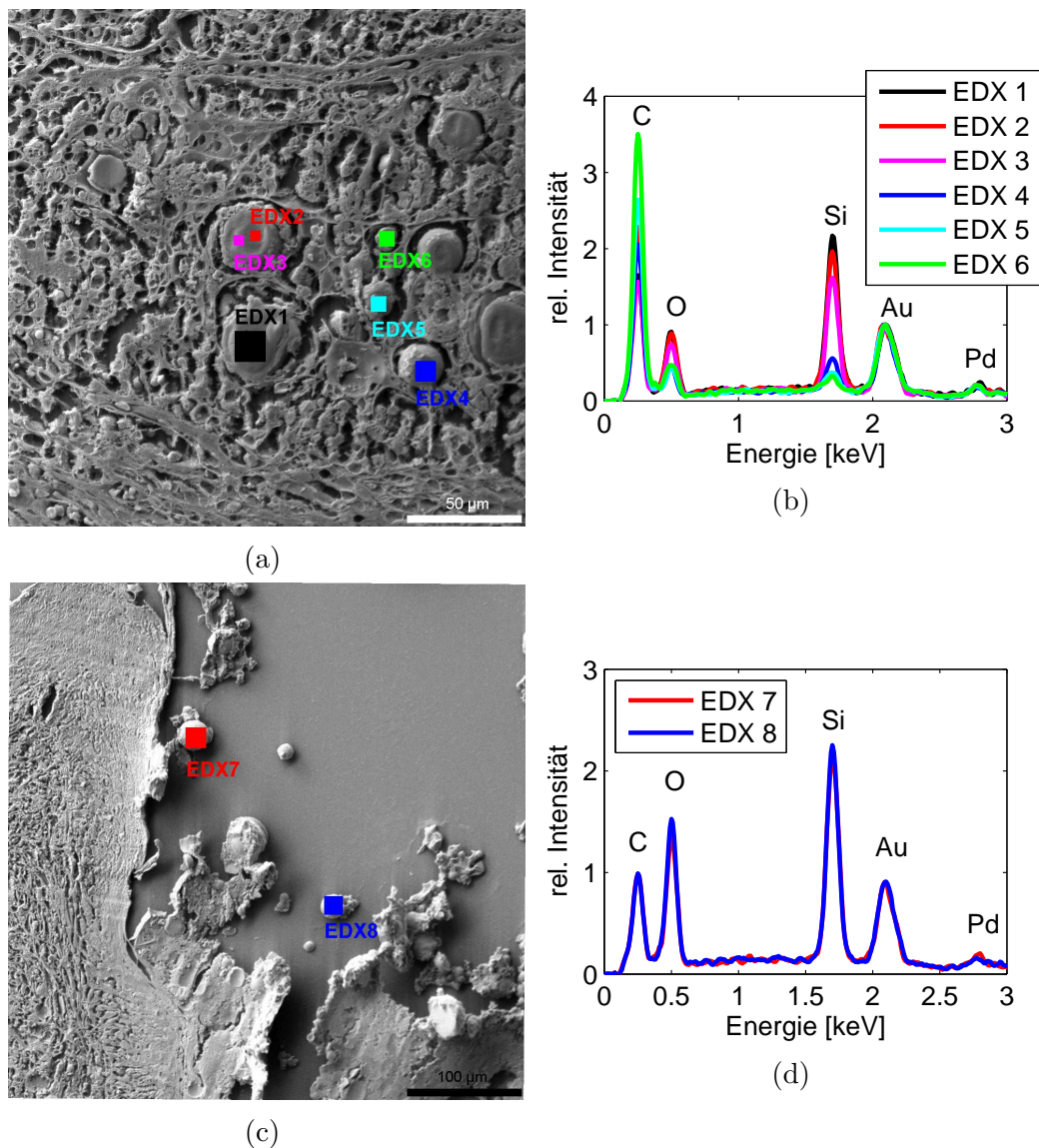


Abbildung 6.8: REM-Aufnahmen eines entparaffinierten, ungefärbten histologischen Dünnschnittes des Defektes der SiO_2 Mikropartikel-Gruppe 9 Tage nach der OP (rechts); Die runden Gebilde sind die Mikropartikel. An den markierten Bereichen wurden EDX-Spektren aufgenommen, die in der Abbildung links zu sehen sind. Gold- und Palladiumsignale resultieren aus einer gleichmäßigen Beschichtung der Probe, um sie leitfähig zu machen. Die Spektren sind auf das Goldsignal normiert.

sind rasterelktronenmikroskopische Aufnahmen des Dünnschnittes zu sehen. Die SiO_2 -Mikropartikel sind als runde Gebilde in der faserigen Struktur des Gewebes zu erkennen. Wie in der Abbildung 6.6a, ist oben rechts die neu gewachsene Epidermis (grüne Pfeile in Abb. 6.6a und 6.7a). In Abbildung 6.7d sind einige Mikropartikel zu sehen, die angeschnitten sind. An ihnen wurden EDX-Spektren aufgenommen, um zu klären, ob sie noch Siliciumdioxid enthalten oder ob es schon abgebaut wurde. Die entsprechenden Messergebnisse sind in Abbildung 6.8 zu finden. Zusätzlich wurden zwei EDX-Spektren von Mikropartikeln aufgenommen, die am Wundrand bzw. oberhalb der neuen Epidermis gefunden wurden (Abb. 6.8c bzw. 6.8d). Diese Mikropartikel haben noch nicht am aktiven Abbauprozess des Körpers teilgenommen.

Die EDX-Spektren der Partikel innerhalb der Wunde weisen ein höheres Verhältnis von Kohlenstoff zu Silicium, im Vergleich zu den Partikeln außerhalb der Wunde auf. Wie anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen der gefärbten Schnitte vermutet wird, enthalten sie mehr organisches Material. Der Siliciumgehalt der Partikel ist außerdem größenabhängig. Je kleiner das Partikel, desto geringer ist der Anteil an Silicium. Das Mikropartikel, an dem die Bereiche EDX 2 und EDX 3 zu finden sind, ist angeschnitten, was in Abbildung 6.7d zu sehen ist. Der Bereich EDX 3 ist angeschnitten, EDX 2 nicht. Das Verhältnis von Silicium zu Kohlenstoff ist bei EDX 3 mit 1,06 höher als bei EDX 2 mit 0,86. Das zeigt, dass innerhalb der Partikel weniger SiO_2 ist als am Rand. Die SiO_2 -Hülle der Mikropartikel existiert also noch, selbst wenn diese schon von organischem Material infiltriert sind. Die SiO_2 -Hülle wird innerhalb von 9 Tagen also nicht, wie vermutet, abgebaut oder ausgetauscht.

Anhand der hohen Zelldichten um die infiltrierten Mikropartikel kann man erkennen, dass diese inflammatorisch abgebaut werden. Abbildung 6.6b zeigt vergrößert das mittig positionierte Partikel aus Abbildung 6.6a. Man sieht deutlich die größere Zelldichte rund um das Partikel, was auf die angesprochene inflammatorische Reaktion des Körpers auf die Mikropartikel hinweist. Diese Entzündungsreaktion auf die Partikel verlängert offensichtlich die Entzündungs- und Exsudationsphase der Wundheilung. Somit setzt die Granulations- und Proliferationsphase, in welcher neues Gewebe aufgebaut wird, später ein, wodurch die späte Narbenbildung und Wundkontraktion zu erklären ist. Wie schon bei der Gel-Gruppe führt das SiO_2 offensichtlich zu einer Erhöhung des TGF- β_1 -Spiegels in der Wunde und damit zu einer verstärkten Diffe-

renzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten, welche die Wundkontraktion verursachen. Die stärkere Wundkontraktion gegenüber der Gel-Gruppe zeigt, dass der höhere SiO₂-Anteil in der Wunde zu einer höheren Ausschüttung von TGF-β₁ führt. Das Applizieren von nanostrukturierten SiO₂-Mikropartikeln in eine Wunde hat dementsprechend einen veränderten Wundheilungsverlauf zur Folge.

Da die Vernetzung der Silicaaggregate, aus welchen die Mikropartikel bestehen, gesteuert werden kann, kann der Zusammenhang zwischen Bioaktivität des SiO₂ und seiner Vernetzung über die Wundkontraktion mit Hilfe der Partikel untersucht werden.

6.3 Differentielle Genexpressionsanalyse subcutaner Wunden mit implantierten SiO₂-haltigen Biomaterialien

Die dargestellten Ergebnisse zur Wundheilung mit Hilfe von Silica enthaltender Wundauflagen weisen auf eine erhöhte Ausschüttung des Signalproteins TGF-β₁ hin. Ein weiterer Anhaltspunkt auf diesen Zusammenhang konnte in einem früheren Experiment gefunden werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden verschiedene Biomaterialien subkutan in Ratten implantiert. Die implantierten Materialien waren Calciumphosphate mit unterschiedlichen SiO₂-Gehalten sowie eine reine SiO₂-Probe. Als Material ohne SiO₂ wurde BioOss[®] gewählt und im Weiteren als Kontrolle für eine subkutane Wunde mit Implantat genutzt.

Das Tierexperiment wurde von Weigu Xu durchgeführt und die Datenanalyse von Cornelia Ganz.

Die Tiere waren 300-400 g schwere, männliche Wistar Ratten von Charles River Laboratories aus Sulzfeld. Sie bekamen eine Narkose mit Hilfe einer intraperitonealen Injektion von 60 mg/kg einer 6 %igen Natrium-Petnobarbital-Lösung. Den Ratten wurde in Bauchlage über einen 2 cm langen Schnitt in den Nacken die Proben subkutan implantiert. Die Proben bestanden aus 80 mg der verschiedenen Biomaterialien, welche mit 0,2 ml autologem, venösem Blut angerührt wurden. Anschließend wurden die Wunden mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen.

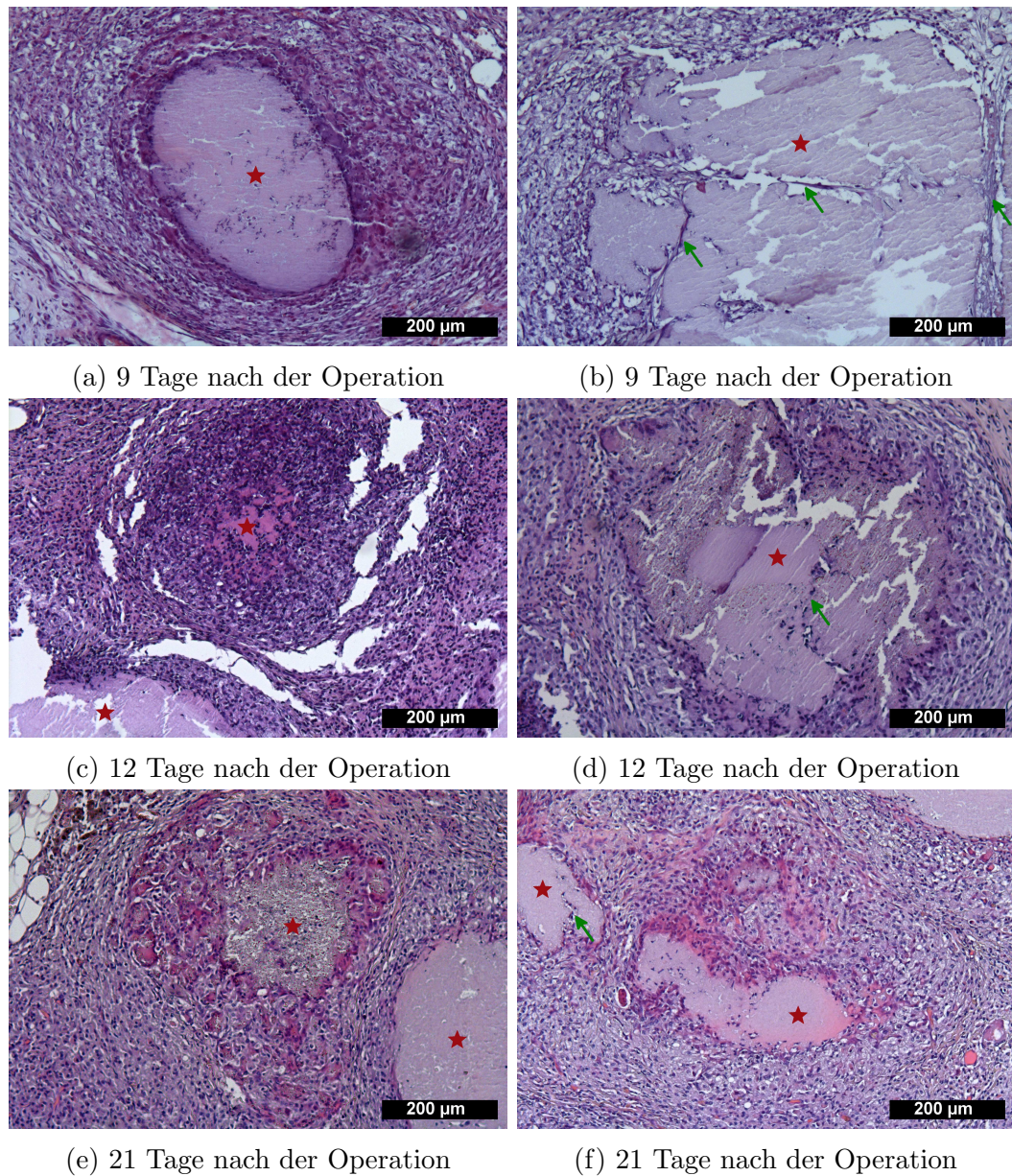


Abbildung 6.9: HE-gefärbte histologische Dünnschnitte des Defektes der SiO₂-Gruppe zu den entsprechenden Zeitpunkten; Rote Sterne markieren die SiO₂-Konstrukte. Grüne Pfeile markieren Bindegewebsstraßen in die Konstrukte. Die Konstrukte sind von einer zellreichen Schicht umgeben. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um polymorphkernige neutrophile Leukozyten, die das SiO₂ entzündlich abbauen. Die rosa Verfärbung der SiO₂-Konstrukte in (c), (e) und (f) ist auf die Infiltration dieser durch organisches Material zurückzuführen. (e) zeigt ein Konstrukt bei einem weit fortgeschrittenen Abbauprozess.

Durch die Implantation wird eine primäre Wundheilung ausgelöst, wie sie bei sauberen, frischen, aseptischen oder auch chirurgischen Wunden zu finden ist. Diese wird zwar von der sekundären Wundheilung, welche bei verschmutzten, infektionsgefährdeten, septischen Wunden, sowie dem im untersuchten Mausmodell verwendeten Vollhautdefekt (s.h. Kapitel 5.2) auftritt, unterschieden. Nach [27] sind die Wundheilungsmechanismen primärer und sekundärer Wunden aber vergleichbar.

NB 24% bzw. NB 39% sind NanoBone[®]-Proben mit 24% bzw. 39% SiO₂. Die reine SiO₂-Probe war entkalktes NanoBone[®], also ein SiO₂-Xerogel. Die Defektbereiche wurden nach 9, 12 und 21 Tagen explantiert und jeweils histologische Dünnschnittpräparate angefertigt. An den Proben vom 12-Tage-Zeitpunkt nach der Operation wurde außerdem eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. Bei dieser Analyse werden Gensonden auf einer Oberfläche fixiert, welche das zu untersuchende Material (RNA oder DNA) hybridisieren. Um möglichst viele Gene gleichzeitig untersuchen zu können, verwendet man Microarrays, die meist mehrere tausend Testfelder mit definierten Sequenzen besitzen. Durch Fluoreszenzfärbung der Test-Lösung kann man die Stellen mit gebundener DNA auf dem Microarray identifizieren. Es sollte mit Hilfe dieser Analyse untersucht werden, welche Gene durch die unterschiedlichen Materialien stärker oder schwächer exprimiert werden.

Die histologischen Dünnschnitte wurden mit HE gefärbt. In Abbildung 6.9 sind einige Schnitte zu sehen. Die implantierten SiO₂-Konstrukte sind mit einem roten Stern markiert. In einigen Konstrukten sind Bindegewebsstraßen (mit grünen Pfeilen markiert) zu erkennen was darauf schließen lässt, dass diese auch von innen abgebaut werden. Um viele Konstrukte ist eine erhöhte Zelldichte zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich wieder um polymorphkernige neutrophile Leukozyten, die das SiO₂ entzündlich abbauen. Wie bei den Mikropartikeln aus dem vorigen Kapitel, ist eine rosa Verfärbung einiger Konstrukte zu erkennen, vor allem bei dem Konstrukt in Abbildung 6.9c. Der Abbau dieses Teilchens ist weit fortgeschritten, wohingegen Konstrukte ohne rosa Verfärbung (Abb. 6.9b) weniger Anzeichen einer Entzündung zeigen. Anscheinend geht auch hier dem Abbau des SiO₂ durch Zellen eine Anreicherung dessen durch organisches Material voraus.

Für die Untersuchung der Genexpressionen wurde die Expression von 27343 Genen im Gewebe um die implantierten Proben untersucht, unter anderem

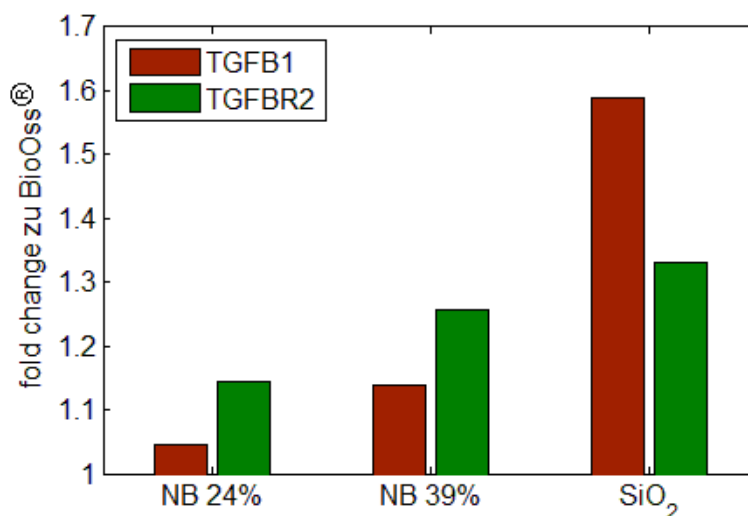


Abbildung 6.10: fold change der Gene TGFB1 und TGFBR2 in Abhängigkeit von den verschiedenen Biomaterialien und einer SiO₂-Probe

auch die Gene TGFB1 und TGFBR2, in welchen TGF- β ₁ bzw. TGF- β -Typ-2-Rezeptor codiert sind. Der TGF- β -Typ-2-Rezeptor ist der Rezeptor, an den die Proteine der TGF- β -Familie binden. Es zeigte sich: Je mehr SiO₂ in der implantierten Probe ist, desto exprimierter sind TGFB1 und TGFBR2. In Abbildung 6.10 ist der fold change zu BioOss[®] über die verschiedenen SiO₂-haltigen Proben aufgetragen. Der fold change zu BioOss[®] gibt das Verhältnis der Expression des Gens der jeweiligen Proben zur Expression des Gens der BioOss[®]-Probe an. Das Gen TGFB1 ist bei der reinen SiO₂-Probe 1,6 mal höher reguliert als bei der Probe ohne SiO₂, TGFBR2 1,3 mal.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass SiO₂ die Produktion von TGF- β ₁ und seines Rezeptors erhöht und somit in den TGF- β -Signalweg eingreift. Dieser Signalweg ist in viele zelluläre Funktionen involviert, wie zum Beispiel im Zellwachstum, der Differenzierung, Apoptose oder Homöostase von Zellen.

7 Zusammenfassung

Dass Siliciumdioxid einen Einfluss auf biologische Systeme hat und den Gewebeaufbau unterstützt, wurde in der Literatur schon beschrieben (s.h. Kapitel 2.2). Welche biochemischen Prozesse dabei zum Tragen kommen, ist kaum aufgeklärt. Auch gibt es kaum Untersuchungen zur Struktur von biologisch aktivem SiO_2 . Die untersuchten Silicastützstrukturen einiger Pflanzen- und Schwammarten bestehen aus amorphem und schwach vernetztem SiO_2 . Dies legt die Hypothese nahe, dass schwach vernetzte Silicaaggregate biologisch aktiv sind und den Gewebeaufbau unterstützen. Positive Einflüsse auf den Gewebeaufbau sind natürlich gerade für medizinische Anwendungen interessant, insbesondere für die Versorgung von Wunden. Als eine solche Anwendung wurden zwei Wundauflagen, welche schwach vernetzte Silicaaggregate im Nanometerbereich enthalten, entwickelt. Eine feuchte Gelaufage und ein trockenes Vlies. Beide Wundauflagen bestehen aus einem Nanokomposit. Dieses Komposit setzt sich aus schwach vernetzten Silicaaggregaten und Polyvinylpyrrolidon zusammen. Die Gelaufage enthält zusätzlich Wasser. Das PVP ist ein Polymer, dessen Einsatz in der Medizin und auch in der Pharmazie weit verbreitet ist. Es begünstigt die mechanischen Eigenschaften des Komposits, verhindert ein Kondensieren der Silicaaggregate und ist insbesondere für die Gelbildung der feuchten Wundauflage verantwortlich. Die Silicaaggregate werden aus einer Natriumwasserglaslösung gewonnen. Das Kompositmaterial wird in einem intensiven Rührverfahren durch das Vermischen der in Wasser dispergierten Silicaaggregate und einer PVP-Lösung gewonnen. Dieses Material kann, je nach Feststoffgehalt, zu dem trockenen Vlies oder dem feuchten Gel verarbeitet werden. Das Vlies wird durch eine Gefriertrocknung hergestellt, das Gel durch die Bestrahlung des Komposits mit Gammastrahlen. Die obligatorische Sterilisierung dieser Medizinprodukte erfolgt auch durch Bestrahlung mit Gammastrahlen. Somit ist die Gelbildung und die Sterilisierung ein und der selbe Schritt. Das Nanokomposit bzw. die Wundauflagen wurden strukturell und auch biologisch untersucht. Die strukturellen Untersuchungen ergaben, dass die einge-

gesetzten Silicaaggregate innerhalb des Komposits aus 2 - 2,3) nm großen Primärpartikeln bestehen, die je nach SiO₂-Gehalt bis zu 7 nm große Aggregate bilden. Das Polymer PVP bindet sich an die Silicaaggregate über Wasserstoffbrückenbindungen und bildet um diese starr-amorphe Bereiche aus. Gleichzeitig erhöht sich die Glasübergangstemperatur des Polymers mit steigendem SiO₂-Gehalt. Die Silicaaggregate vermindern also dessen Beweglichkeit.

Mikroskopische Aufnahmen zeigen eine faserige Struktur des Komposits, welche auf die starken Scherkräfte beim Verrühren des Sols und der Polymerlösung zurückzuführen ist.

Die Bestrahlung des Komposits hat keine Auswirkungen auf die Struktur des SiO₂. Das Polymer wird dadurch jedoch zu einem Gel. Die Silicaaggregate lassen sich aus dem Gel immernoch herauslösen, was wichtig ist, denn diese sollen aus der Wundauflage herausdiffundieren können, um am Wundheilungsprozess teilzunehmen.

Die Untersuchungen des Materials mit Hilfe von Zellkulturen ergab eine biologische Unbedenklichkeit. Es hat sich dabei herausgestellt, dass adhärente Zellen nicht auf der Oberfläche des Materials wachsen. Das ist für eine Wundauflage insofern von Vorteil, dass so ein Einwachsen der Auflage in die Wunde verhindert wird und Verbandswechsel ohne zusätzliche Irritationen der Wunde ausgeführt werden können.

Die tierexperimentelle Studie der beiden Wundauflagen an einem Mausmodell hat gezeigt, dass sie einen Einfluss auf die Wundheilung haben. Aus beiden Auflagen können die nanostrukturierten Silicaaggregate herausdiffundieren und somit am Wundheilungsprozess partizipieren. Äußerlich sind die zurückbleibenden Narben der Versuchsgruppe mit der feuchten Gelaufgabe 15 Tage nach Setzen des Defekts am kleinsten. Die Narben der Versuchsgruppe mit dem trockenen Vlies sind nach 15 Tagen zwar kleiner als die der Kontrollgruppe, jedoch größer als die der Versuchsgruppe mit einer handelsüblichen Wundauflage. Dieser Trend konnte auch in histologischen Dünnschnitten der Wundbereiche zu dem entsprechenden Zeitpunkt nachgewiesen werden. Da die Heilung der gesetzten Vollhautdefekte immer nur in einer Narbe resultiert, ist die kleinere Narbengröße durch eine stärkere Kontraktion der Wunde zu erklären. Diese Kontraktion wird durch spezielle Zellen hervorgerufen, den Myofibroblasten. Die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten wird unter anderem durch den Wachstumsfaktor TGF- β_1 beeinflusst. Dieses Pro-

tein ist auch an der Reepithelisierung beteiligt, eine erhöhte Konzentration verzögert diese. Eine solche Verzögerung wurde auch bei den Tieren mit der feuchte Gelaufgabe beobachtet. Ein weiterer Hinweis auf einen erhöhten TGF- β_1 -Spiegel zeigte sich in der Neoangiogenese, die durch TGF- β_1 angeregt wird. Die Wunden der Versuchstiere mit den Gelaufgaben hatten zu einem früheren Zeitpunkt eine höhere Blutgefäßdichte, die Neoangiogenese lief also schneller ab.

In einem früheren Experiment zur Genexpression subkutanen Gewebes bei Implantation verschiedener Biomaterialien und reinem, amorphem SiO_2 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Gene, welche TGF- β_1 und seinen Rezeptor codieren, bei den Tieren mit der SiO_2 -Probe höher expremiert waren als die mit weniger bzw. ohne SiO_2 .

Offensichtlich beeinflussen die Silicaaggregate den TGF- β -Signalweg bei der Wundheilung. Dies kann sich zunutze gemacht werden, um beispielsweise chronische Wunden zu behandeln, denn Patienten mit solchen Wunden leiden oft an Durchblutungsstörungen. Der positive Einfluss des SiO_2 auf die Neoangiogenese könnte die Wundheilung beschleunigen.

Eine weitere Applizierung der Silicaaggregate zur Unterstützung der Wundheilung, wurde in Form von nanostrukturierten Mikropartikeln entwickelt. Sie bieten die Möglichkeit die Vernetzung der Aggregate gezielt zu beeinflussen, um so eine optimale Vernetzung zu finden. Das direkte Einbringen der nanostrukturierten Mikropartikel in die Wunde hat zu einer noch stärkeren Wundkontraktion geführt. Die Partikel im Gewebe und deren Abbau konnten beobachtet werden, wobei kleinere Partikel schneller abgebaut werden. Jedoch wurden Entzündungsreaktionen auf die Mikropartikel histologisch nachgewiesen. Da bei einer Wundheilung immer eine entzündliche Phase durchlaufen wird, muss diese Reaktion auf die Mikropartikel nicht negativ sein. Dies gilt es noch zu untersuchen.

Prinzipiell ist festzuhalten, dass schwach vernetzte Silicaaggregate im Nanometerbereich die Wundheilung biochemisch beeinflussen. Das entwickelte Nanokompositmaterial und die daraus entstandenen Wundaufgaben ermöglichen es, diese Silicaaggregate gezielt einzusetzen, wobei ein schnellerer Wundverschluss mit kleineren Narben zu beobachten ist.

Literaturverzeichnis

- [1] K. Abshagen, I. Schrödi, T. Gerber, and B. Vollmar. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute nanobone. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(2):557–566, 2009.
- [2] C. C. Anderson, F. Rodriguez, and D. A. Thurston. Crosslinking aqueous poly(vinyl pyrrolidone) solutions by persulfate. *Journal of Applied Polymer Science*, 23(8):2453–2462, 1979.
- [3] L. Andersson, H. Nettelblad, and G. Kratz. From basic wound healing to modern skin engineering. In *Artificial Organs*, volume 4 of *New Techniques in Surgery Series*, pages 93–105. Springer London, 2009.
- [4] Y.-J. Bae, J.-Y. Kim, M.-K. Choi, Y.-S. Chung, and M.-H. Kim. Short-term administration of water-soluble silicon improves mineral density of the femur and tibia in ovariectomized rats. *Biological Trace Element Research*, 124:157–163, 2008.
- [5] F. Benavidesa, T. M. Oberyszynb, A. M. VanBuskirkc, V. E. Reeved, and D. F. Kusewitta. The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci.*, 53(1):10–18, January 2009.
- [6] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. Stevens, and G. M. Eccleston. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8):2892–2923, 2008.
- [7] C. J. Brinker and G. W. Scherer. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel processing*. Academic Press, Inc., 1990.
- [8] B. Buffoli, E. Foglio, E. Borsani, C. Exley, R. Rezzani, and L. F. Rodella. Silicic acid in drinking water prevents age-related alterations in the endothelium-dependent vascular relaxation modulating enos and {AQP1}

- expression in experimental mice: An immunohistochemical study. *Acta Histochemica*, 115(5):418 – 424, 2013.
- [9] M. Calomme and D. Berghe. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. *Biological Trace Element Research*, 56(2):153–165, 1997.
- [10] E. M. Carlisle. Silicon: A possible factor in bone calcification. *Science*, 167(3916):279–280, 1970.
- [11] E. M. Carlisle. Silicon: An essential element for the chick. *Science*, 178(4061):619–621, 1972.
- [12] E. M. Carlisle. In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. *J Nutr*, 106(4):478–484, Apr. 1976.
- [13] E. M. Carlisle. A silicon requirement for normal skull formation in chicks. *J Nutr*, 110(2):352–359, Feb. 1980.
- [14] E. M. Carlisle. Silicon as an essential trace element in animal nutrition. *Ciba Foundation Symposium*, 121:123–139, 1986.
- [15] I. Catelas, O. L. Huk, A. Petit, D. J. Zukor, R. Marchand, and L. Yahia. Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: Effects of size, concentration, and composition. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(4):600–607, 1998.
- [16] Y. Chen, J. Chen, J. Dong, and Y. Jin. Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 20(1-5):21–27, 2004.
- [17] A. Chiba, N. Funamori, K. Nakayama, Y. Ohishi, S. M. Bennington, S. Rastogi, A. Shukla, K. Tsuji, and M. Takenaka. Pressure-induced structural change of intermediate-range order in poly(4-methyl-1-pentene) melt. *Phys. Rev. E*, 85:021807, Feb 2012.
- [18] A. Desmoulière, A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Rockefeller University Press*, 122(1):103–111, 1993.

-
- [19] R. Dietrich. Entwicklung von SiO₂-Nanostrukturen für die Weichgewebsregeneration. Master's thesis, Universität Rostock, 2011.
- [20] D. Dill-Müller and W. Tilgen. Bewährte und aktuelle Verfahren in der Wundheilung. *Der Hautarzt*, 56(5):411–422, 2005.
- [21] L. A. DiPietro. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*, 4(4):233–240, 1995.
- [22] S. R. Elliott. The origin of the first sharp diffraction peak in the structure factor of covalent glasses and liquids. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 4(38):7661, 1992.
- [23] G. Fecine, J. Barros, and L. Catalani. Poly(n-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel production by ultraviolet radiation: new methodologies to accelerate crosslinking. *Polymer*, 45(14):4705 – 4709, 2004.
- [24] G. Gabbiani. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*, 200(4):500–503, 2003.
- [25] J. Gailit, M. P. Welch, and R. A. F. Clark. Tgf- β_1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Investig Dermatol*, 103(2):221–227, Aug. 1994.
- [26] J. A. Garlick and L. B. Taichman. Effect of tgf- β_1 on re-epithelialization of human keratinocytes in vitro: An organotypic model. *J Investig Dermatol*, 103(4):554–559, Oct. 1994.
- [27] K. Glagla. *Bedeutung von TGF-beta/ Smad- Signaltransduktion und Reepithelialisierung für die heilungs- assoziierte Kontraktion cutaner Wunden*. PhD thesis, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2011.
- [28] L. A. Guo S FAU DiPietro and D. LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, 89(3):219–229, 2010.
- [29] F. Haaf, A. Sanner, and F. Straub. Polymers of n-vinylpyrrolidone: Synthesis, characterization and uses. *Polym J*, 17(1):143–152, Jan. 1985.
- [30] K. G. Harding and G. K. P. H. L. Morri and. Healing chronic wounds. *BMJ*, 324(7330):160–163, January 2002.

-
- [31] M. Hartmann, D. Schulz, C. Gundermann, and J. Norgauer. Ökonomische Effekte der Standardisierung in der modernen Wundversorgung. *Der Hautarzt*, 58(11):970–975, 2007.
- [32] A. Hayat, F. Temamogullari, R. Yilmaz, and O. Karabulut. Effect of equisetum arvense on wound contraction of full-thickness skin wounds in rabbits. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(1):81–83, 2011.
- [33] G. Heberer. Makromolekulare Stoffe als Blut- und Gewebeersatz. *Klinische Wochenschrift*, 45(17):874–884, 1967.
- [34] J. Heinlin, S. Schreml, P. Babilas, M. Landthaler, and S. Karrer. Wundheilung. *Der Hautarzt*, 61(7):611–628, 2010.
- [35] L. L. Hench and J. K. West. The sol-gel process. *Chemical Reviews*, 90(1):33–72, 1990.
- [36] A. Henglein. Crosslinking of polymers in solution under the influence of gamma radiation. *The Journal of Physical Chemistry*, 63(11):1852–1858, 1959.
- [37] O. Higa, S. Rogero, L. Machado, M. Mathor, and A. Lugao. Biocompatibility study for pvp wound dressing obtained in different conditions. *Radiation Physics and Chemistry*, 55(5-6):705–707, 1999.
- [38] M. Hildebrand, B. E. Volcani, W. Gassmann, and J. I. Schroeder. A gene family of silicon transporters. *Nature*, 385(6618):688–689, 1997.
- [39] G. Holzhüter, K. Narayanan, and T. Gerber. Structure of silica in equisetum arvense. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(4):512–517, 2003.
- [40] T. Horn. Lokale Wundauflagen: Übersicht und Klassifikation. *Viszeralmedizin*, 22(3):147–154, 2006.
- [41] T. Horn. Lokale Wundauflagen. *Der Unfallchirurg*, 115(9):774–782, 2012.
- [42] S. Z. Hosseini, N. B. Jelodar, and N. Bagheri. Study of silicon effects on plant growth and resistance to stem borer in rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(21):2744–2751, 2012.

-
- [43] A. Hottot, S. Vessot, and J. Andrieu. A direct characterization method of the ice morphology. relationship between mean crystals size and primary drying times of freeze-drying processes. *Drying Technology*, 22(8):2009–2021, 2004.
- [44] R. K. Iler. *The Chemistry of Silica*. John Wiley & Sons, Inc., 1979.
- [45] Y. Jiao, Z. Liu, S. Ding, L. Li, and C. Zhou. Preparation of biodegradable crosslinking agents and application in pvp hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(3):1515–1521, 2006.
- [46] R. Jugdaohsingh, S. H. Anderson, K. L. Tucker, H. Elliott, D. P. Kiel, R. P. Thompson, and J. J. Powell. Dietary silicon intake and absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5):887–893, 2002.
- [47] R. Jugdaohsingh, K. L. Tucker, N. Qiao, L. A. Cupples, D. P. Kiel, and J. J. Powell. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the framingham offspring cohort. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(2):297–307, 2004.
- [48] E. Kiran and F. Rodriguez. Effects of gamma radiation on aqueous polymer solutions-a comparative study. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 7(2):209–224, 1973.
- [49] K. Lakshminarayanan. *Nano Structure of Silica in Biological Systems*. PhD thesis, University of Rostock, 07 2004.
- [50] W. Landis, D. Lee, J. Brenna, S. Chandra, and G. Morrison. Detection and localization of silicon and associated elements in vertebrate bone tissue by imaging ion microscopy. *Calcified Tissue International*, 38(1):52–59, 1986.
- [51] S. Langer, N. Botteck, B. Bosse, K. Reimer, P. Vogt, H.-U. Steinau, and S. Mueller. Effect of polyvinylpyrrolidone-iodine liposomal hydrogel on wound microcirculation in skh1-hr hairless mice. *Eur Surg Res*, 38(1):27–34, 2006.
- [52] G. S. Lazarus, D. M. Cooper, D. R. Knighton, D. J. Margolis, R. E. Percoraro, G. Rodeheaver, and M. C. Robson. Definitions and guidelines for

- assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of Dermatology*, 130(4):489–493, 1994.
- [53] A. B. Lugao, S. O. Rogero, and S. M. Malmonge. Rheological behaviour of irradiated wound dressing poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry*, 63(3-6):543–546, 2002.
- [54] M. Madlener, W. C. Parks, and S. Werner. Matrix metalloproteinases (mmps) and their physiological inhibitors (timps) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Experimental Cell Research*, 242(1):201 – 210, 1998.
- [55] C. Margadant and A. Sonnenberg. Integrin-tgf- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep*, 11(2):97–105, Feb. 2010.
- [56] M. McCarty. Reported anti atherosclerotic activity of silicon may reflect increased endothelial synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Medical Hypotheses*, 49(2):175 – 176, 1997.
- [57] W. Mertz. The essential trace elements. *Science*, 213(4514):1332–1338, 1981.
- [58] R. L. Miller, R. F. Boyer, and J. Heijboer. X-ray scattering from amorphous acrylate and methacrylate polymers: Evidence of local order. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 22(12):2021–2041, 1984.
- [59] L. Miranda, A. Lugao, L. Machado, and L. Ramanathan. Crosslinking and degradation of pvp hydrogels as a function of dose and pvp concentration. *Radiation Physics and Chemistry*, 55(5-6):709 – 712, 1999.
- [60] H. L. Moses, E. Y. Yang, and J. A. Pietenpol. Tgf- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell*, 63(2):245 – 247, 1990.
- [61] B. Nair. Final report on the safety assessment of polyvinylpyrrolidone (pvp). *International Journal of Toxicology*, 17(4):95–130, 1998.
- [62] J. Najda, J. Gminski, M. Drozd, and A. Flak. The effect of silicon (si) on lipid parameters in blood serum and arterial wall. *Biological Trace Element Research*, 31:235–247, 1991.

-
- [63] D. C. Navdeep Singh Sandhu, Sarabjit Kaur. Equietum arvense: Pharmacology and phytochemistry - a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(3):146–150, 2010.
- [64] G. A. Parks. The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems. *Chemical Reviews*, 65(2):177–198, 1965.
- [65] N. J. Percival. Classification of wounds and their management. *Surgery (Oxford)*, 20(5):114 – 117, 2002.
- [66] B. H. Porraz-Reyes, H. C. Blair, J. J. Jeffrey, and T. A. Mustoe. Collagenase production at the border of granulation tissue in a healing wound: Macrophage and mesenchymal collagenase production in vivo. *Connective Tissue Research*, 27(1):63–71, 1991.
- [67] J. J. Powell, S. Mcnaughton, R. Jugdaohsingh, S. H. C. Anderson, J. De-
ar, F. Khot, L. Mowatt, K. L. Gleason, M. Sykes, R. P. H. Thompson,
C. Bolton-Smith, and M. J. Hodson. A provisional database for the sili-
con content of foods in the united kingdom. *British Journal of Nutrition*,
94(5):804–812, 2005.
- [68] C. Punke, J. Ostwald, R. Dietrich, T. Gerber, and H. W. Pau. Fibroblast
colonization of modified silicone films. *Otology & Neurotology*, 33(9):1635
– 1639, 2012.
- [69] H. A. Ravin, A. M. Seligman, and J. Fine. Polyvinyl pyrrolidone as a
plasma expander. *New England Journal of Medicine*, 247(24):921–929,
1952. PMID: 13002648.
- [70] H. Rico, J. L. Gallego-Lago, E. R. Hernández, L. F. Villa, A. Sanchez-
Atrio, C. Seco, and J. J. Gervas. Effect of silicon supplement on osteopenia
induced by ovariectomy in rats. *Calcified Tissue International*, 66(1):53–
55, 2000.
- [71] A. B. Roberts, M. B. Sporn, R. K. Assoian, J. M. Smith, N. S. Roche,
L. M. Wakefield, U. I. Heine, L. A. Liotta, V. Falanga, and J. H. Kehrl.
Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and
angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Pro-
ceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12):4167–4171, 1986.

- [72] J. Rosiak, P. Ulanski, L. Pajewski, F. Yoshii, and K. Makuuchi. Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. some remarks and comments. *Radiation Physics and Chemistry*, 46(2):161 – 168, 1995.
- [73] J. M. Rosiak and F. Yoshii. Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 151(1–4):56 – 64, 1999.
- [74] F. F. A. Safiyeh Soleimani and V. Nejati. The effect of equisetum arvense l. (equisetaceae) in histological changes of pancreatic β -cells in streptozotonic -induced diabetic in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10:4236–4240, 2007.
- [75] S. Sakka. The current state of sol-gel technology. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 3:69–81, 1994.
- [76] S. Sakka and K. Kamiya. The sol-gel transition in the hydrolysis of metal alkoxides in relation to the formation of glass fibers and films. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 48(1):31 – 46, 1982. Proceedings of the International Workshop on Glasses and Glass Ceramics from Gels.
- [77] I. Schönfelder and P. Schönfelder. *Der Kosmos Heilpflanzenführer*. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart, 2010.
- [78] K. Schwarz. Silicon, fibre, and atherosclerosis. *The Lancet*, 309(8009):454 – 457, 1977.
- [79] K. Schwarz and D. B. Milne. Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature*, 239(5371):333–334, Oct. 1972.
- [80] K. Schwarz, B. Ricci, S. Punsar, and M. Karvonen. Inverse relation of silicon in drinking water and atherosclerosis in finland. *The Lancet*, 309(8010):538 – 539, 1977.
- [81] C. Seaborn and F. Nielsen. Dietary silicon and arginine affect mineral element composition of rat femur and vertebra. *Biological Trace Element Research*, 89:239–250, 2002.
- [82] A. J. Singer and R. A. Clark. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 341(10):738–746, 1999.

-
- [83] W. Stöber, A. Fink, and E. Bohn. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1):62 – 69, 1968.
- [84] E. B. Tredget, J. Demare, G. Chandran, E. E. Tredget, L. Yang, and A. Ghahary. Transforming growth factor- β and its effect on reepithelialization of partial-thickness ear wounds in transgenic mice. *Wound Repair and Regeneration*, 13(1):61–67, 2005.
- [85] P. Voorhees. The theory of ostwald ripening. *Journal of Statistical Physics*, 38(1-2):231–252, 1985.
- [86] M. G. Voronkov, G. I. Zelchan, and E. Lukevitz. Silizium und Leben. *Zeitschrift für Chemie*, 17(10):391–392, 1977.
- [87] X. Wang, L. Gan, K. P. Jochum, H. C. Schröde, and W. E. G. Müller. The largest bio-silica structure on earth: The giant basal spicule from the deep-sea glass sponge *Monorhaphis chuni*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011:1–14, 2011.
- [88] R. Weidenhagen and T. Koepfel. Chronische Wunden. In *Chirurgie Basisweiterbildung*, pages 303–308. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [89] S. Werner and R. Grose. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3):835–870, 2003.
- [90] G. D. Winter and J. T. Scales. Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature*, 197(4862):91–92, Jan. 1963.
- [91] W. Xu, G. Holzhüter, H. Sorg, D. Wolter, S. Lenz, T. Gerber, and B. Vollmar. Early matrix change of a nanostructured bone grafting substitute in the rat. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91B(2):692–699, 2009.
- [92] Y. Xu, D. Wu, Y. Sun, W. Chen, H. Yuan, F. Deng, and Z. Wu. Effect of polyvinylpyrrolidone on the ammonia-catalyzed sol-gel process of teos: Study by in situ ^{29}Si nmr, scattering, and rheology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 305:97 – 104, 2007.

- [93] L. Yang, W. Li, S. Wang, L. Wang, Y. Li, X. Yang, and R. Peng. Smad4 disruption accelerates keratinocyte reepithelialization in murine cutaneous wound repair. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(4):573–582, 2012.
- [94] J. L. Zamora. Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions. *The American Journal of Surgery*, 151(3):400 – 406, 1986.
- [95] J. Zarzycki. Past and present of sol-gel science and technology. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8(1-3):17–22, 1997.
- [96] X. Zhu, P. Lu, W. Chen, and J. Dong. Studies of {UV} crosslinked poly(n-vinylpyrrolidone) hydrogels by ftir, raman and solid-state {NMR} spectroscopies. *Polymer*, 51(14):3054 – 3063, 2010.