

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

der Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt durch

Diplom-Chemiker (FH) Thomas Kaltofen

aus Großschönau (Sachsen)

Tag der mündlichen Prüfung:

28.10.2008

Titel:

Biophysikalische Aspekte der Schmierung natürlicher Gelenke

Gutachter:

PD Dr. Reiner Dahint
Prof. Dr. Motomu Tanaka

Abstract

Joint disorders are one of the most important diseases in the developed civilisation. The lifetime of currently used implants is approximately 15 years, which could be extended significantly by the use of fluid lubrication as implemented in nature. However, despite of their high medical relevance, the principles of natural joint lubrication are not fully understood. It is assumed, that the synovial fluid compounds hyaluronic acid, a high molecular, linear polysaccharide, and phospholipids are playing an important role. In current literature opinions several models for explaining joint lubrication are discussed, which deal with molecular interactions between hyaluronic acid and phospholipids.

In order to get a better understanding for the molecular mechanisms of natural joint lubrication, a model system consisting of a soft polyelectrolyte cushion and immobilized phospholipid membranes has been established and studied under pressure and shearing forces. For the investigation of the model system, novel shear and pressure cells for neutron reflectometry and a temperature controlled *in situ* ellipsometry cell have been developed.

The formation of lipid films on the polyelectrolyte cushion has been investigated by QCM-D, X-ray and neutron reflectometry. The following lipid bilayers have been successfully built up:

- pure 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC)
- mixtures of DMPC and 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane (DOTAP)
- mixtures of 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (POPC) and DOTAP

In contrast to previous findings, this thesis demonstrates absence of direct intermolecular interactions between hyaluronic acid and phospholipids. In fact, the results suggest that phospholipids exist as free vesicles within the synovial fluid. Further experiments show that the phospholipids maintain their surface activity in hyaluronic acid solutions. Viscosity experiments demonstrate the high lubricating ability of the phospholipids.

Finally, the model system has been investigated in contact with hyaluronic acid applying shearing forces and pressure. Under shear no important new insights have been ob-

tained. Lubrication models, which assume an increased hyaluronic acid concentration close to the interface under shear, could not be proven. When pressing a physiological hyaluronic acid solution at 50 bar against a polyelectrolyte film without lipid coating, irreversible shrinking and dehydration of the polyelectrolyte have been observed. In presence of a phospholipid membrane on top of the polyelectrolyte cushion, this effect has not been observed up to 600 bar.

These results can be important for understanding the origin of joint diseases. It is possible, that the cartilage is damaged by the hygroscopic hyaluronic acid after removal of the lipid coating.

Keywords: Neutron Reflectometry, X-Ray Reflectometry, Ellipsometry, QCM-D, Analytical Ultracentrifugation, Atomic Force Microscopy, Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Microtitration Calorimetry, soft supported lipid bilayers, DMPC, DPPC, POPC, DOTAP, polyelectrolyte, natural joint lubrication

Zusammenfassung

Gelenkerkrankungen zählen in der heutigen Zivilisation zu den am weitesten verbreiteten Krankheiten. Die Haltbarkeit derzeit verwendeter künstlicher Gelenke liegt bei etwa 15 Jahren, was durch den Einsatz des Schmierungsprinzips der Natur, der Flüssigschmierung, deutlich verbessert werden könnte. Trotz zahlreicher Bemühungen ist das Prinzip der Flüssigschmierung bis heute nicht verstanden. Es wird angenommen, dass der lineare Polysaccharid Hyaluronsäure und oberflächenaktive Phospholipide eine wichtige Rolle für die Schmierung spielen. Derzeit werden verschiedene Schmierungsmechanismen diskutiert, die von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten ausgehen.

Um ein verbessertes Verständnis für die Schmierungsmechanismen in natürlichen Gelenken zu gewinnen, wurde ein Modellsystem aufgebaut, das aus einer Polyelektrolytunterlage mit einer darauf verankerten Lipiddoppelschicht besteht. Als Trägermaterial fand Silizium Verwendung. Zur Durchführung der Untersuchungen wurden je eine neuartige Scher- und Druckzelle für die Neutronenreflektometrie sowie eine temperierbare Flusszelle für die *in situ* Ellipsometrie entwickelt.

Mittels QCM-D sowie Neutronen- und Röntgenreflektometrie wurde die erfolgreiche Bildung von Lipid-Doppelschichten aus 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC) sowie aus Mischungen mit DMPC und 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DOTAP) und Mischungen aus 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) und DOTAP auf Polyelektrolytunterlagen gezeigt.

Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass keine Wechselwirkungen zwischen Hyaluronsäure und Lipiden existieren, sondern letztgenannte als freie Vesikel in der Synovialflüssigkeit vorliegen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Lipide auch in Hyaluronsäurelösungen oberflächenaktiv sind. Schließlich konnte in Viskositätsmessungen die guten Schmiereigenschaften der Lipide demonstriert werden.

Das Modellsystem wurde anschließend in Kontakt mit Hyaluronsäurelösungen gebracht und mittels Neutronenreflektometrie unter Druck und Scherung untersucht. Unter Sche-

ung wurden keine wesentlichen neuen Erkenntnisse erlangt. Ein Erklärungsmodell, nachdem unter Scherung die Hyaluronsäurekonzentration in Grenzflächennähe zunimmt, konnte nicht bestätigt werden. Bei einem Druck von 50 bar entzog eine physiologische Hyaluronsäurelösung bei Abwesenheit von Lipiden einem Polyelektrolytfilm irreversibel Wasser. Dies wurde bei Anwesenheit einer Lipidmembran auf der Polyelektrolytoberfläche bis zu einem Druck von 600 bar nicht beobachtet.

Diese Resultate können bedeutsam für das Verständnis der Entstehung von Gelenkerkrankungen sein. Es ist denkbar, dass der Knorpel bei einer abgelösten Lipidbeschichtung durch die hygroskopische Hyaluronsäure geschädigt wird.

Stichworte: Neutronenreflektometrie, Röntgenreflektometrie, Ellipsometrie, QCM-D, Analytische Ultrazentrifugation, Rasterkraftmikroskopie, Differenzenkalorimetrie, Isothermische Titrationskalorimetrie, Lipid Membranen, DMPC, DPPC, POPC, DOTAP, Polyelektrolyt, Schmierung von natürlichen Gelenken

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	11
2. Grundlagen	13
2.1 Aufbau eines natürlichen Gelenkes	13
2.2 Funktionsweise natürlicher Gelenke – Stand der Forschung	14
2.3 Hyaluronsäure als wichtige Komponente der Synovialflüssigkeit	17
2.4 Eigenschaften von Lipiden	21
2.5 Rolle der Lipide im Gelenk	25
2.6 Modellsystem zur Untersuchung der Schmierungseigenschaften von Gelenken	28
3. Methoden	30
3.1 Analytische Ultrazentrifugation (AUC)	30
3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	33
3.3 Kalorimetrie (DSC, ITC)	34
3.4 UV/VIS-Spektroskopie	37
3.5 Viskositätsbestimmung, scherabhängig	38
3.6 Raster-Kraftmikroskopie (AFM)	41
3.7 Schwingquarzwaage (QCM-D)	42
3.8 Ellipsometrie	47
3.9 Reflektometrie (XR, NR)	52
4. Präparationen und Methodenentwicklung	61
4.1 Präparation von Lipidvesikeln	61
4.2 Präparation von Polyelektrolytmultilagen	67
4.3 Temperierbare Flusszelle für Ellipsometrie	74
4.4 Röntgenzelle zur Messung in 100% Luftfeuchte	77
4.5 Druckzelle für Neutronenreflektometrie	78

4.6 Scherzelle für Neutronenreflektometrie	84
5. Ergebnisse Teil 1: Wechselwirkungen von Lipid und Hyaluronsäure und deren Bedeutung für die Funktionsweise des Gelenkes	89
5.1 Struktur von DMPC in Hyaluronsäurelösung	90
5.2 Wechselwirkungen von Hyaluronsäure mit DMPC-Doppelschichten an der Grenzfläche	98
5.3 Oberflächenaktivität von DMPC und DPPC in Hyaluronsäurelösungen	102
5.4 Einfluss der Lipide auf die Viskosität von Hyaluronsäurelösungen	105
6. Ergebnisse Teil 2: Charakterisierung von Lipidmembranen auf Polyelektrolytoberflächen	109
6.1 Bildung von DMPC-Doppelschichten	110
6.2 Bildung von Lipid-Doppelschichten aus POPC und DOTAP	116
6.3 Bildung von Lipid-Doppelschichten aus DMPC und DOTAP	122
7. Ergebnisse Teil 3: Untersuchungen zur Funktionsweise natürlicher Gelenke durch Neutronenreflektometrie unter Druck und Scherung	130
7.1 Messungen unter Scherkräften	130
7.2 Messungen unter Druck	134
8. Zusammenfassung und Ausblick	142
9. Literatur	150
10. Anhang A: Fitparameter der Röntgen- und Neutronenreflektometriedaten	162
11. Anhang B: Verwendete Chemikalien	166
12. Danksagung	167

1. Einführung

Die Entwicklung der modernen Naturwissenschaft ist im Wesentlichen von Interdisziplinarität geprägt. Dies gilt im besonderen Masse für die Biologie und Medizin, die seit dem 1990'er Jahren im Wesentlichen auf molekularer Ebene betrachtet werden. Bereits in früheren Jahren gelangen bedeutende Durchbrüche gerade dadurch, dass Prinzipien anderer Gebiete übertragen wurden. Als Beispiele dafür seien hier Namen wie Delbrück (Physiker, Nobelpreis für Medizin 1969), Crick (Physiker, Nobelpreis für Medizin 1962), Cormack und Hounsfield (Physiker, Nobelpreis für Medizin 1979) genannt.

Diese Andeutungen sollen genügen, um die Bedeutung der Verknüpfung aus Physik und Biologie, der Biophysik, zu ermessen. Dies beinhaltet sowohl die Übertragung physikalischer Theorien auf die belebte Materie als die Anwendung physikalischer Methoden in der Biologie. Letzteres ist in den meisten Fällen mit Kompromissen verbunden, vereint man doch die Wissenschaft der unbelebten Materie mit der als Biologie bezeichneten Lebenswissenschaft. So fordert die Physik meist klar abgegrenzte, wohl definierte Untersuchungsobjekte, wohingegen sich die Biologie möglichst nah an den realen Gegebenheiten des Lebens orientieren möchte.

Die Abwägung der beiden hier genannten, grundverschiedenen Herangehensweisen war einer der zentralen Aspekte, die den Weg dieser Arbeit begleiteten. Ziel der hier vorliegenden Dissertation im weitesten Sinne ist es, ein Verständnis für den physikalischen Sachverhalt der Reibung in einem Bestandteil eines lebenden Objekts, dem natürlichen Gelenk, zu entwickeln. Der Forderung der Physik Rechnung tragend, wurden als Untersuchungsobjekte keine Gelenke verwendet, sondern ein vereinfachtes, aber hinreichendes Modellsystem betrachtet. Ziel im engeren Sinne ist es, das von der Natur verwendete und der heutigen Implantattechnik überlegene Prinzip der Flüssigschmierung auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

Fernziel der hier durchgeführten Untersuchungen ist die Entwicklung neuartiger, stärker an der Natur orientierter, künstlicher Gelenke und somit ein bedeutender Fortschritt in der Implantatmedizin. Die Bedeutung dieses Gebietes lässt sich mit der Kenntnis, dass allein in Deutschland jährlich 100 000 Hüftgelenke und 65 000 Kniegelenke ersetzt

werden müssen /1/, ermessen. Die durchschnittliche Lebensdauer einer Prothese beträgt gegenwärtig etwa 15 Jahre, kann jedoch bei ungünstigen Umständen noch wesentlich kürzer ausfallen /2/. Hauptproblem gegenwärtig verwendeter Gelenke ist, dass die festen Grenzflächen beider beweglichen Teile in direkten Kontakt miteinander stehen und durch mechanische Beanspruchung diese beschädigt werden. Für die Natur ist eine Haltbarkeit für einen Baustein des menschlichen Körpers von nur 15 Jahren völlig unzureichend. Sie löst dieses Problem, in dem sie die beweglichen Bestandteile des Gelenkes durch einen mit der Synovialflüssigkeit gefüllten Spalt trennt.

Die Hyaluronsäure, ein lineares, hochmolekulares Polysacharid und wesentlicher Bestandteil der Synovialflüssigkeit, wird in weiten Kreisen als Hauptfaktor für die geringe Reibung im Gelenk angesehen. In der jüngeren Vergangenheit wurde vor allem die Rolle von ebenfalls anwesenden Lipiden und Proteinen sowie deren Wechselwirkungen mit der Hyaluronsäure diskutiert. Wesentliches Ziel dieser Arbeit ist es, ein besseres Verständnis für die Funktion der Lipide im Gelenk zu entwickeln sowie die Wechselwirkung zwischen Hyaluronsäure und Lipid sowie Knorpel und Lipid zu verstehen.

2. Grundlagen

2.1 Aufbau eines natürlichen Gelenks

Da das wesentliche Ziel dieser Arbeit ist, ein besseres Verständnis für die Schmierung natürliche Gelenke zu entwickeln, wird zunächst der Aufbau eines solchen näher betrachtet. In einem ersten Abschnitt wird im Wesentlichen gesichertes Lehrbuchwissen, wie es in der Medizin gelehrt wird, dargestellt werden. Die daran anschließenden Abschnitte beleuchten stärker den aktuellen Stand der Forschung.

Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau eines natürlichen Gelenks als Boxmodell. Ausgangspunkt der Betrachtung ist zunächst der Knochen. Die organische Matrix des Knochens enthält hauptsächlich Kollagen sowie verschiedene polymere Kohlenhydratderivate. Eine wesentliche Funktion des Knochens ist das Speichern von Calcium, das in Form von Kalziumhydroxylapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ und zu geringeren Teilen als Calciumcarbonat $[CaCO_3]$ in die organische Matrix eingelagert ist. 2/3 des Calciums sind mobil, d. h. sie werden binnen weniger Tage vom Körper umgesetzt /3/.

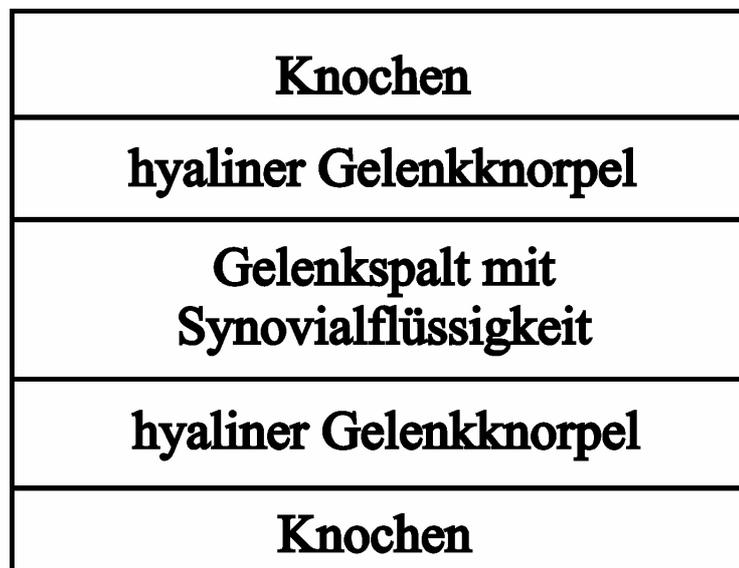


Abb. 2.1: Boxmodell für den Aufbau eines natürlichen Gelenks

Auf den Knochen aufgewachsen ist der hyaline Gelenkknorpel. Er besteht aus Knorpelzellen und einem Matrixgewebe, welches wie der Knochen aus Kollagen und Kohlen-

hydraten aufgebaut ist. Jedoch ist im Knorpel zusätzlich Wasser gebunden. Im Kern des Knorpels haben die Kollagenfasern einen vertikalen und im Außenbereich einen tangentialen Faserverlauf /4/.

Ein vollständiges Gelenk besteht aus einer Gelenkkugel und einer Gelenkpfanne. Während bei gegenwärtig verwendeten künstlichen Gelenken beide Teile im direkten Kontakt stehen, sind sie im natürlichen Gelenk durch den Gelenkspalt, welcher mit der Synovialflüssigkeit gefüllt ist, getrennt. Als Abschluss des Gelenks dient die Gelenkkapsel, eine für kleine Moleküle und Ionen permeable Membran /5/.

2.2 Funktionsweise natürlicher Gelenke – Stand der Forschung

Nachdem im ersten Abschnitt nur ein sehr allgemeiner Überblick über den Aufbau und die Funktionsweise von Gelenken gegeben wurde, wird nun mehr ins Detail gegangen. In diesem Kapitel wird chronologisch das Verständnis der Funktionsweise natürlicher Gelenke dargestellt.

Die Erforschung der Schmierungseigenschaften natürlicher Gelenke geht bis ins 16. Jahrhundert zurück. Eine der ersten Publikationen war die von Paracelsus, welche eine ölige Flüssigkeit in dem Gelenkspalt beschreibt. 1691 veröffentlichte Havers ein Manuskript, in dem er über die chemischen, physikalischen und Schmiereigenschaften der Synovialflüssigkeit von Säugetieren berichtet. In diesem Abschnitt wird jedoch nur die Diskussion, die seit Mitte des 20. Jahrhunderts geführt wurde, zusammengefasst.

Eine erste wichtige Publikation wurde 1953 von Ogston und Stanier veröffentlicht. Sie geht auf die bereits aufgeklärten Bestandteile der Synovialflüssigkeit ein und hebt die Bedeutung der Hyaluronsäure, einem hochmolekularen, linearen Polysaccharid hervor. Da die große Bedeutung der Hyaluronsäure für die Gelenkschmierung heute allgemein akzeptiert ist, wird ihr ein eigener Abschnitt gewidmet. Ogston und Stanier spekulieren, dass Proteine an die Hyaluronsäure binden und Komplexe hoher Viskosität mit einem Gewicht von über 10 Millionen Dalton bilden. Sie heben auch das nicht-Newtonsche Verhalten der Synovialflüssigkeit hervor, dass sich zum Beispiel in dem Phänomen der Scherverdünnung zeigt /6/.

Bunim erklärt 1958 das Modell der Grenzflächenschmierung (engl.: boundary lubrication). Dieses Modell wird angewandt für die Erklärung von Schmierung, wenn sich zwei Oberflächen parallel zueinander bewegen und dabei in direkten Kontakt stehen. Während sich eine Oberfläche bewegt, neigt die zweite dazu, sich mitzubewegen. Bei diesem Modell ist die Reibung proportional zur Belastung. Bei Anwesenheit eines Schmiermittels und hohen Kräfteinwirkungen oder sehr schnellen Bewegungen kann es zusätzlich zur Bindung des Schmiermittels an die Oberfläche kommen /7/.

Ihm entgegen steht das Modell der Flüssigfilmschmierung (engl.: fluid film lubrication). Dabei ist die Reibung unabhängig von der Belastung. Bei ihr wird die Reibung im Wesentlichen durch die Viskosität des Schmiermediums bestimmt. Es wird spekuliert, dass in natürlichen Gelenken bei geringer Belastung und während des Bewegungsstarts Grenzflächenschmierung und während der eigentlichen Bewegung des Gelenks Flüssigfilmschmierung vorherrscht /7/.

Dowson greift 1969 die Modelle der Schmierung von Bunim auf und diskutiert sie ähnlich. Er hält aber auch andere Punkte für wichtig, z. B. die Rauigkeit der Knorpeloberfläche. Weiterhin beschreibt er im Knorpel 60 Angstrom große Poren, welche mit Synovialflüssigkeit gefüllt sind. Darüber hinaus hält er einen verstärkten Schmiereffekt an der Knorpelgrenzfläche durch die Ausbildung von Säurekomplexen für möglich und führt den Begriff der verstärkten Schmierung (engl. boosted lubrication) ein /8/.

1983 veröffentlichte McCutchen ein Manuskript, in dem er das Konzept der Grenzflächenschmierung anzweifelt. Er testete die Reibung zwischen verschiedenen Systemen. So verschob er zwei Teflonplatten sowie zwei mit Seifenlösung separierte Glasplatten gegeneinander und bestimmte die Reibungskoeffizienten. In keinem Fall kam er annähernd an die niedrigen Reibungskoeffizienten heran, welche in natürlichen Gelenken beobachtet wurden. McCutchen zog daraus den Schluss, dass das Modell der Grenzflächenschmierung und Flüssigfilmschmierung nicht allein das natürliche Gelenk erklären kann. Er brachte einen weiteren Parameter ins Spiel: den hydrostatischen Druck im Gelenk. Seiner Meinung nach führt das Gelenk bei Belastung einen Druckausgleich über im Knorpel befindliche Flüssigkeit durch. Er bezeichnete dies als nasse Schmierung (engl.: weeping lubrication) /9/.

Der von McCutchen beschriebene Ansatz zur Erklärung der Schmierung im natürlichen Gelenk wird 1993 von Tandon et al. weiterverfolgt. Sie reduzieren den Knorpel zunächst auf die Tatsache, dass es sich um ein elastisches, poröses Material handelt, welches Flüssigkeit freisetzen und auch Flüssigkeit aufnehmen kann. Sie kommen zu dem Schluss, dass das Eindringen von Flüssigkeit in den Knorpel zu einer erhöhten Konzentration von Hyaluronsäure in Grenzflächennähe führt und damit die Viskosität der Synovialflüssigkeit ansteigt /10/.

Unsworth diskutiert 1991 die Möglichkeiten, das Prinzip der Schmierung von natürlichen Gelenken auf künstliche zu übertragen. Er findet wiederum Argumente, die für die Flüssigfilmschmierung sprechen. So tritt bei geringer Geschwindigkeit der sich gegeneinander bewegenden Oberflächen die maximale Belastung, d. h. Kraftwirkung auf, bei hohen Geschwindigkeiten hingegen ist die Belastung am geringsten (Abbildung 2.2). Nach Unsworth wird bei hoher Beanspruchung ein dickflüssiger Schmierfilm zwischen den Knorpelflächen gebildet, der die Bewegung hemmt. Bei geringeren Kraftwirkungen gibt der Knorpel Flüssigkeit ab und die Synovialflüssigkeit wird dünnflüssiger. Dadurch sind schnellere Geschwindigkeiten möglich. /11/.

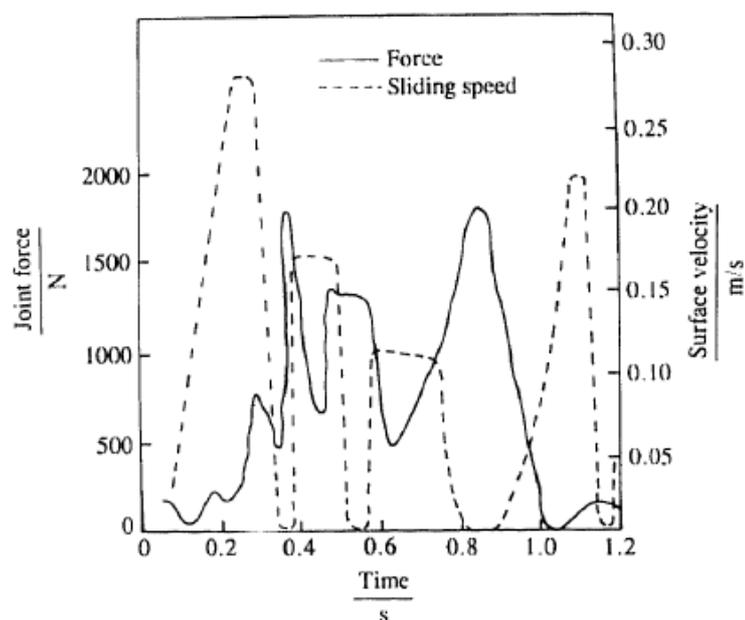


Abb. 2.2: Bei geringen Kraftwirkungen erreicht die Geschwindigkeit der sich gegeneinander bewegten Oberflächen hohe Werte, bei hohen Beanspruchungen hingegen ist die Geschwindigkeit am geringsten /11/. Die Zeitachse entspricht einer Bewegung des Gelenks.

Künstliche Gelenke setzen zurzeit das Prinzip der Flüssigschmierung nicht um. Sie bestehen im Wesentlichen aus einem Metallkörper und einer Beschichtung aus einem hochmolekularen Polyethylenderivat. In ersten Versuchen wurden Gelenke mit synthetischen Schmiermitteln hergestellt. Der Effekt, dass die Reibung bei steigender Belastung abnimmt, konnte jedoch bei diesen Systemen nicht beobachtet werden. Weiterhin wird die beiderseitige Beschichtung von Gelenkpfanne und Kugel abgelehnt, da die Reibung von zwei Kunststoffflächen gegeneinander unakzeptabel hoch ist im Vergleich zu einem System Kunststoff – Edelstahl /11/.

Bruns et al. veröffentlichten 1994 eine Studie, die sich mit den auftretenden Druck in Abhängigkeit von der Beugung in einem Kniegelenk beschäftigt. Der Druck wurde zum einen seitlich und zum anderen im Zentrum des Gelenkes bestimmt. Ohne Beugung ist der Druck in den Seitenbereichen größer als im Zentrum. Bei einer 15° Beugung ist der Druck nahezu gleich, bei einer 30° Beugung ist er hingegen im Zentrum deutlich höher als in der Randzone. Die maximal auftretenden Drücke bewegen sich im Bereich von 50 bar /12/.

1999 diskutiert Hills wiederum das Modell der Grenzflächenschmierung im Gelenk. Er berücksichtigt dabei einen weiteren Parameter: die Bedeckung des Knorpels mit oberflächenaktiven Lipiden. Er geht davon aus, dass zunächst eine Lipidmonoschicht auf der Knorpeloberfläche adsorbiert und sich später weitere Lipidlagen darauf anlagern. Weiterhin vermutet er eine starke elektrostatische Anziehungskraft des Stickstoffs der Phosphocholingrouppe auf die Knorpeloberfläche. Nach Hill spielen diese Lipide eine bedeutende Rolle in der Schmierung bei Anwendung des Modells der Grenzflächenschmierung /13/. Da über die Funktionsweise der Schmierung durch die Phospholipide kontrovers diskutiert wird, wird anschließend gesondert darauf eingegangen.

2.3 Hyaluronsäure als wichtige Komponente der Synovialflüssigkeit

Da die zentrale Rolle der Hyaluronsäure für die Schmierung des Gelenkes allgemein akzeptiert ist, ist dieser ein eigener Abschnitt gewidmet. Dass die Hyaluronsäure ein weites Feld von Forschern beschäftigt, belegt der Fakt, dass die Publikationssuchmaschine

PubMed derzeit für das Stichwort „hyaluron*“ 7042 Treffer liefert (Stand 11. Dezember 2007). Die Hyaluronsäure ist ein sehr vielseitiges Biopolymer, das in zahlreichen Gebieten der Medizin und auch der Kosmetik Anwendung findet /14/. Auch Polymerphysiker haben großes Interesse an ihr. Die Zahl der Treffer bei PubMed soll allerdings auch verdeutlichen, dass die hier vorgestellte Literatur über die Hyaluronsäure niemals vollständig sein kann. Sie beschränkt sich auf die für die Schmierung von Gelenken wesentlichen Themen. Abb. 2.3 zeigt eine Monomereinheit der Hyaluronsäure.

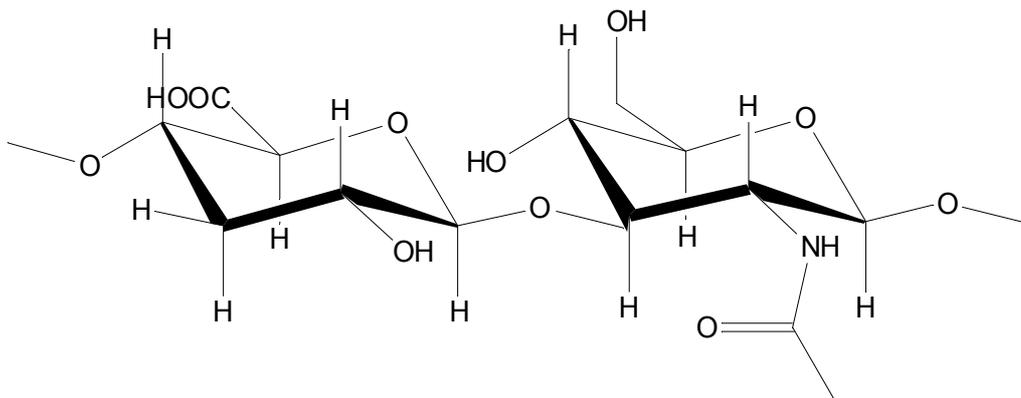


Abb. 2.3: Monomereinheit des linearen Polysaccharids Hyaluronsäure. Die Monomereinheit selbst besteht aus einer Einheit D-Glucuronsäure (links) und einer Einheit N-Acetyl-D-glucosamin (rechts)

Zu Beginn der 1950'er Jahre erschienen wesentliche Publikationen zur Isolierung der Hyaluronsäure. So beschrieben Boas et al. 1949 die Isolierung der Hyaluronsäure aus Hahnenkamm /15/ und Kaye et al. die Isolierung aus der menschlichen Nabelschnur /16/. 1955 veröffentlichten Lowther und Rogers eine biotechnologische Möglichkeit, Hyaluronsäure durch Streptokokkenbakterien herzustellen /17/. Dies ist auch heute noch eine der wichtigsten Quellen für die Gewinnung von Hyaluronsäure zu Forschungszwecken. Drei Namen sind eng mit der Erforschung der Hyaluronsäure verbunden: Sundblad, Balaz und Fraser. Deshalb werden zunächst ihre Arbeiten vorgestellt.

Sundblad beschäftigte sich mit der Chemie der Synovialflüssigkeit. Er erklärt, dass die Hyaluronsäure von Synovialzellen im Gelenk produziert wird. Die hohe Viskosität der Synovialflüssigkeit wird der Hyaluronsäure zugeschrieben. Die Hyaluronsäure - spaltende Hyaluronidase senkt die Viskosität der Hyaluronsäure auf das Niveau von Wasser, während Protein-spaltende Enzyme keinen Einfluss auf die Viskosität haben. Sundblad bestimmte für menschliche Kniegelenke eine durchschnittliche Hyaluronsäure-

Konzentration von 2,85 mg/ml, ein Volumen der Synovialflüssigkeit von 0,2 bis 1 ml pro Gelenk sowie eine Proteinkonzentration von 25,4 mg/ml /18/.

1958 veröffentlichten Balaz et al. ein Manuskript zur physikalischen Chemie der Hyaluronsäure. Zunächst werden verschiedene Reinigungsmethoden diskutiert, um möglichst proteinfreie Hyaluronsäure-Proben zu erhalten. Die Molekulargewichte der Hyaluronsäure variieren im Bereich von $5 \cdot 10^4$ bis $8 \cdot 10^6$ Da, wobei die Möglichkeit der Depolymerisation während des Reinigungsprozesses eingeräumt wird. Weiterhin wird berichtet, dass sich Hyaluronsäure-Moleküle unter der Einwirkung von Scherkräften strecken, wobei dieser Effekt mit steigendem Molekulargewicht zunimmt. Als Länge eines gestreckten Hyaluronsäure -Moleküls werden 100 – 640 nm angegeben. Hyaluronsäure -Moleküle bilden in Lösung eine Random-Coil-Struktur aus. Die Hyaluronsäure ist in dissoziierter Form negativ geladen, der pK_a -Wert der Carboxylgruppe liegt bei 3,21 /19/.

Fraser et al. publizierten 1992 einen Übersichtsartikel zur Hyaluronsäure. Demnach hat ein geknäultes Hyaluronsäure -Molekül in Lösung einen hydrodynamischen Radius von 200 nm, wobei diese Struktur überwiegend aus Wasser und nur zu 0,1 % aus Hyaluronsäure besteht. Die Sekundärstruktur der Hyaluronsäure enthält hydrophobe Cluster, die intermolekulare Wechselwirkungen in Lösung ermöglichen. Die Hyaluronsäure ist ebenfalls Bestandteil des Knorpels und ist über Linkerproteine gebunden. Solche Komplexe aus Hyaluronsäure und Protein haben ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 10^8 Da /20/.

Die Rolle der Hyaluronsäure bei Gelenkerkrankungen wie Rheuma wird unterschiedlich bewertet. Es ist bekannt, dass das Volumen der Synovialflüssigkeit in entzündeten Gelenken zunimmt und damit die Konzentration der Hyaluronsäure sinkt /21, 22/. Swann bezweifelt jedoch, dass die sinkende Hyaluronsäure Konzentration einen wesentlichen Einfluss auf die Schmierung im Gelenk hat /23/. Durch exaktere Analysetechniken in den 1980'er Jahren konnte Hyaluronsäure auch im Blutserum nachgewiesen werden /24/, wobei die Konzentration bei Rheumapatienten ansteigt. Es wird darüber spekuliert, dass die Hyaluronsäure eine erhöhte Mobilität besitzt und den Gelenkspalt verlassen kann /25/.

Immer wieder wird auch der Einfluss des Molekulargewichtes der Hyaluronsäure auf die Schmierung des Gelenkes diskutiert. Es ist bekannt, dass das Molekulargewicht mit zunehmenden Lebensalter abnimmt /26/ und zwischen verschiedenen Individuen variiert /27/. Eine Abnahme des Molekulargewichtes in erkrankten Gelenken ist ebenfalls belegt /28/. Die Reduktion der Konzentration der Hyaluronsäure wird jedoch als bedeutenderer Parameter für die verminderte Schmierungseigenschaft erkrankter Gelenke im Vergleich zu dem verminderten Molekulargewicht angesehen /29/.

Eine Möglichkeit, den Konzentrationsverlust an Hyaluronsäure in erkrankten Gelenken auszugleichen, ist es, Hyaluronsäure in das Gelenk zu injizieren. Der Nutzen für den Patienten wird derzeit kontrovers diskutiert /30/. Die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA ließ diese Form der Therapie 1997 zu. Die Europäische Vereinigung der Rheumatologen beurteilte 1998 die Hyaluronsäure-Therapie zurückhaltend mit einem „möglichen Einfluss auf erkrankte Gelenke“ /31/. Ein Problem der Therapie ist die kurze Halbwertszeit der Hyaluronsäure im Gelenk von etwa einem Tag /32/, so dass der therapeutische Nutzen nur von kurzer Dauer sein kann.

Eine wichtige Eigenschaft der Hyaluronsäure ist deren Nicht-Newtonsches Verhalten, d. h. die Viskosität der Hyaluronsäure ist abhängig vom Auftreten von Scherkräften /33-45/. Abbildung 2.4 zeigt dieses Verhalten für die in dieser Arbeit verwendete Hyaluronsäure. Die Viskosität ist zudem abhängig vom Molekulargewicht /46/ und der Konzentration /47/. Zudem steigt die Viskosität stark bei der Protonierung der Carboxylgruppe /48/. Mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) gelang es, Strukturänderungen in Hyaluronsäure-Lösung unter Scherung zu beobachten /49/.

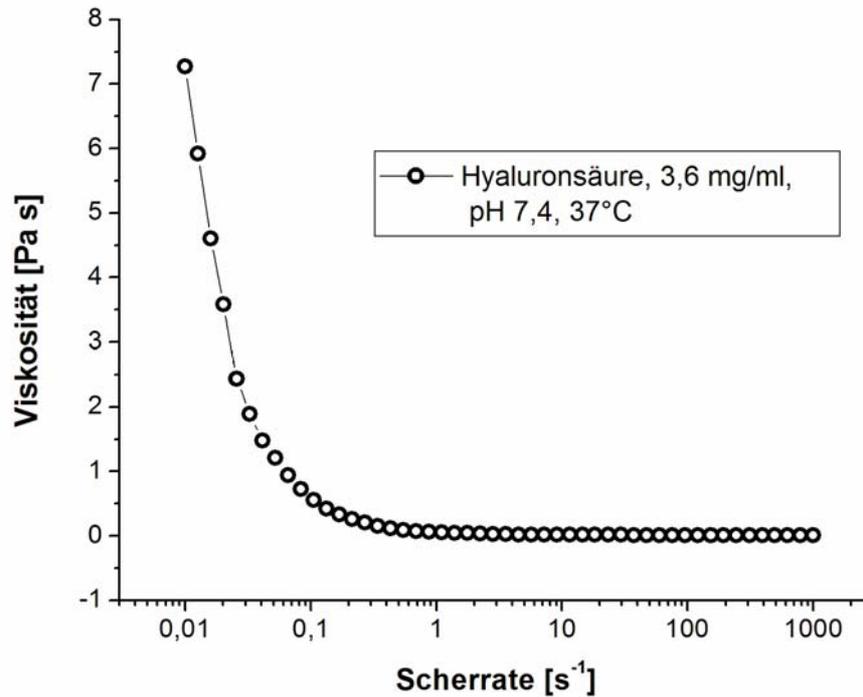


Abb. 2.4: Scherabhängigkeit der Viskosität für eine Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von $8 \cdot 10^5$ Da, einer Hyaluronsäure-Konzentration von 3,6 mg/ml, pH = 7,4, und 0,15 M NaCl bei 37°C. Die Viskosität nimmt mit steigender Scherrate ab und erreicht bei $1 s^{-1}$ ihren unteren Plateau-Wert. Somit hat die Hyaluronsäure in der Ruheposition des Gelenks eine hohe Viskosität, während der Bewegung eine deutlich geringere. Die Viskosität sinkt aufgrund der Streckung der Moleküle. Die Kurve wurde in einer eigenen Messserie ermittelt, für weitere Messungen siehe Abschnitt 5.4.

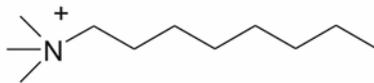
2.4 Eigenschaften von Lipiden

Da Phospholipide in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen, werden die wichtigsten Eigenschaften dieser Stoffklasse hier dargestellt. Lipide sind chemische Analoga zu den Tensiden. Sie kennzeichnet eine geladene, hydrophile Kopfgruppe und eine hydrophobe Schwanzgruppe. Beide Stoffgruppen zeichnet eine gute Löslichkeit in Lösungsmitteln niedriger Polarität aus. Ihre Löslichkeit in Wasser ist aufgrund des volumenmäßig großen Anteils der Schwanzgruppe hingegen schlecht.

Tenside und Lipide besitzen jedoch die Fähigkeit, sich in polaren Lösungsmitteln zu strukturieren. Sie können dadurch als Molekülverbund gelöst werden. Dieser Verbund wird bei den Tensiden als Mizelle und bei den Lipiden als Vesikel oder Liposom bezeichnet. Eine Mizelle ist eine Monolage von Tensidmolekülen, deren Schwanzgruppe sich in polaren Lösungsmitteln zum Mizellkern und die Kopfgruppe zum Lösungsmittel hin orientieren. In einem Liposom hingegen bilden die Lipidmoleküle Doppelschichten, bei dem sich die Schwanzgruppen direkt gegenüber stehen.

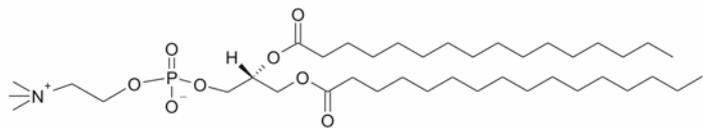
Im Vesikelkern befinden sich dadurch Lösungsmittelmoleküle. Man unterscheidet Vesikel nach ihrer Lamellarität. In multilamellaren Vesikeln befinden sich mehrere Doppelschichten mit Lipidmolekülen übereinander. Unilamellare Liposomen hingegen bestehen nur aus einer einzigen Doppelschicht. Entsprechend ihrer Größe werden Vesikel in klein ($< 0,5 \mu\text{m}$) und groß ($0,5 - 10 \mu\text{m}$) unterteilt /50/. Abbildung 2.5 zeigt ein Beispiel für beide Stoffklassen sowie ihre Struktur im Verbund.

Tensid

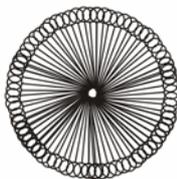


Trimethyloctylamin

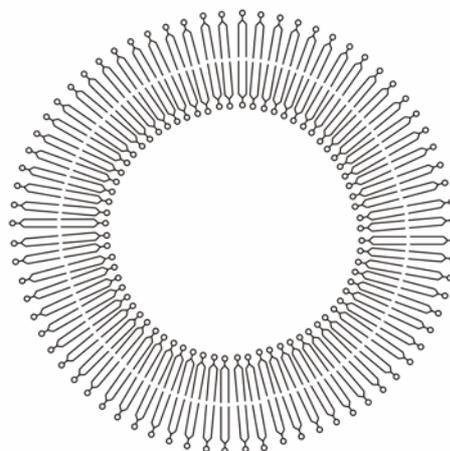
Phospholipid



1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine



Mizelle



Vesikel

Abb. 2.5: Vergleich zwischen Tensid und Phospholipid

Phospholipide unterliegen der Polymorphie. Polymorphie meint hier, dass Lipide in verschiedenen kristallinen Phasen gleicher chemischer Zusammensetzung existieren. Eine Konsequenz daraus ist das Vorhandensein mehrerer Schmelzpunkte. Zwei kristalline Formen werden als enantiotropisch bezeichnet, wenn beide Formen vergleichbare thermodynamische Stabilität besitzen. Ist eine Form weniger stabil, so spricht man von einem monotropischen Phasenübergang. Phasenübergänge finden nur in Richtung der stabileren Form statt /51/.

Larsson untersuchte in den 1960er Jahren die Polymorphie von Triglyceriden mittels Infrarotspektroskopie und Röntgendiffraktometrie und schlug eine heute allgemein akzeptierte Klassifikation von polymorphen Formen vor /53/. Demnach wird zwischen 3 Kristallformen nach ihrer räumlichen Anordnung der kleinsten, sich wiederholenden Kette von Kohlenwasserstoffen (im folgenden Subzelle genannt) unterschieden: L_α , L_β und L_β' .

In der L_α -Form haben die Subzellen eine hexagonale Packung, in welcher die Fettsäureketten rechtwinklig zu der Fläche der terminalen Methylgruppe stehen. Das L_β' -Polymorph besitzt eine orthorhombische Subzellenpackung, in der die Methylgruppen schräg zur Fläche der terminalen Methylgruppe stehen. Der Verlauf der Kette selbst kann als „Zickzack-Form“ beschrieben werden. Die L_β Konformation geht einher mit einer triklinen Subzellenpackung /52/.

Hagemanns und Kellens fanden für Triglyceride eine weitere polymorphe Form, die als L_c Form bezeichnet wird und einen niedrigeren Schmelzpunkt als die L_β Form hat /54, 55/. Das Streumuster in der Röntgendiffraktometrie der L_c Konformation ist analog zur L_β' Konformation /51/.

Die polymorphen Formen unterscheiden sich in ihren Schmelzpunkten. Die L_α -Form ist die mit dem höchsten Schmelzpunkt. Die L_c -Konformation wiederum ist die Form mit dem niedrigsten Schmelzpunkt. Bei den Phasenübergängen ändert sich auch die Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten. In der L_c -Form befinden sich die Ketten in einer kristallinen Form, in der sie keine Beweglichkeit besitzen. In der L_β und L_β' -Form sind die Ketten teilweise geschmolzen und haben eine höhere Beweglichkeit als in der L_c -

Phase. In der L_α -Form schließlich sind die Ketten vollständig geschmolzen und besitzen eine hohe Beweglichkeit /52/.

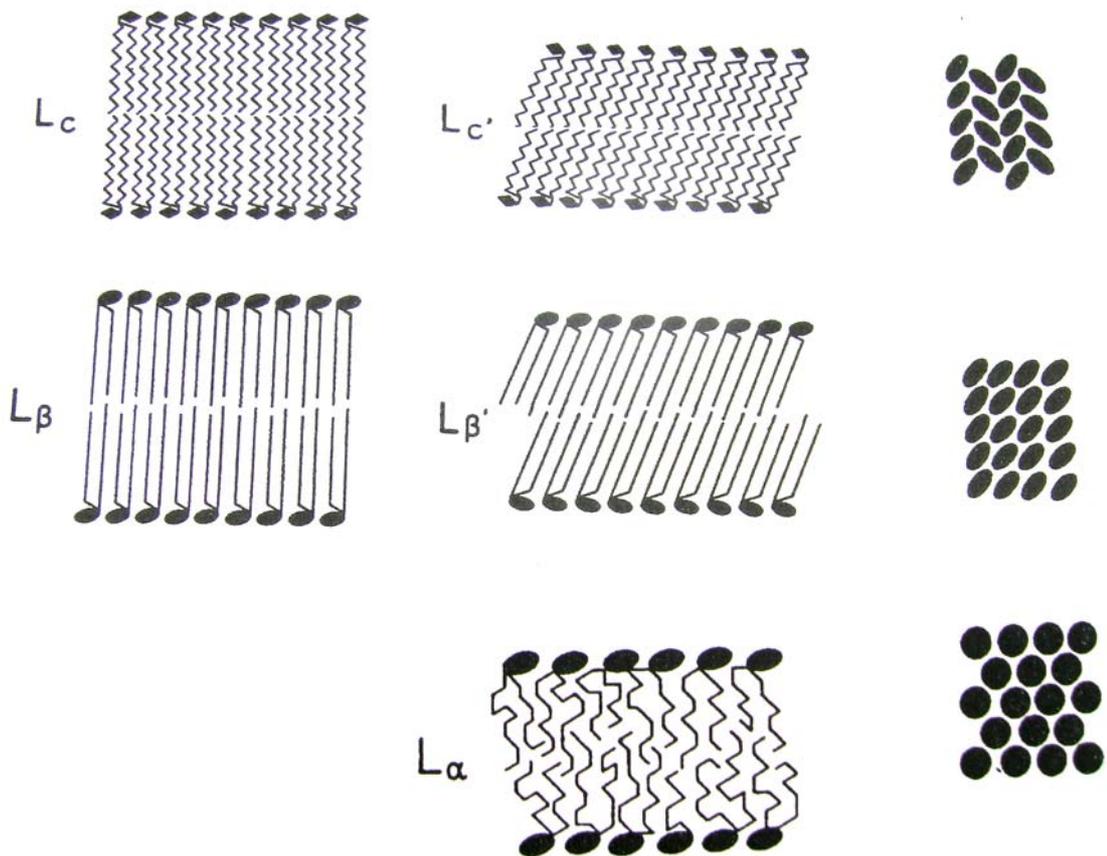


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des c, β und α Polymorphs von Lipiden. Die linke und mittlere Spalte zeigen einen Blick von der Seite und die rechte Spalte einen Blick von oben auf die Doppelschicht und damit die Subzellenpackung /52/.

Der Übergang von der L_c zur L_α -Phase ist enantiotropisch und damit reversibel /51/. Die Phasenübergangstemperaturen für die biologisch relevanten Phospholipide von der L_c - zur L_α -Phase liegen zwischen 10 und 60 °C. Abbildung /50/ entnommen.

Da dieser Übergang für biologische Fragestellungen äußerst relevant ist, spielt er auch für den experimentellen Teil dieser Arbeit eine wichtige Rolle. Die Phasenübergänge in die L_β und $L_{\beta'}$ -Form hingegen sind für die Biologie hingegen eher unbedeutend. Deshalb wird der Übergang von der L_c zur L_α Phase und umgekehrt im Folgenden synonym zu dem Begriff „Phasenübergang“ verwendet. Aufgrund der hohen Beweglichkeit der

Kohlenwasserstoffketten in der L_{α} -Phase wird diese auch als flüssigkristalline oder als Gelphase bezeichnet.

Winter et al. stellten zudem eine Druckabhängigkeit des Phasenübergangs fest. Durch das Anlegen von Überdruck verschiebt sich die Phasenübergangstemperatur zu höheren Werten /56/. Abbildung 2.7 zeigt exemplarisch die Druckabhängigkeit des Phasenübergangs für drei in dieser Arbeit verwendete Phospholipide.

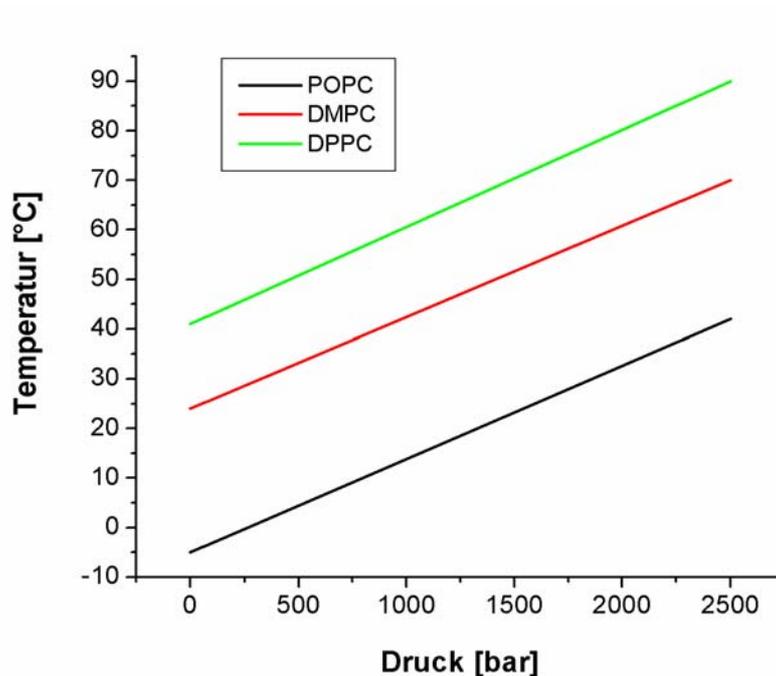


Abb. 2.7: Druckabhängigkeit der Phasenübergangstemperatur für drei in dieser Arbeit verwendete Lipide, nach Winter et. al /56/

2.5 Rolle der Lipide im Gelenk

Seit den 1980er Jahren wurde ein neuer, als wichtig erscheinender Parameter in die Erklärungsmodelle für die Schmierung von Gelenken eingeführt: die Anwesenheit von oberflächenaktiven Lipiden. Das im Gelenk vorkommende Lipid ist das zwitterionische 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DPPC) /57/. Dieses Phospholipid hat eine Phasenübergangstemperatur von 41°C und liegt somit im menschlichen Körper in der L_c -Konformation vor. Little et. al. reinigten die Knorpeloberfläche mit Lösungsmittel

und fanden einen Anstieg der Reibung um 150 %, der der Abwesenheit von DPPC an der Oberfläche zugeschrieben werden kann /58/. Wird hingegen die Synovialflüssigkeit gegen eine Salzlösung substituiert, wird dieser Effekt nicht beobachtet /59, 60/.

In weiteren Versuchen wurden Glasoberflächen mit DPPC beschichtet und in Reibungsversuchen vergleichbare Reibungskoeffizienten wie in Gelenken beobachtet. Ausgehend von einer Fläche von 40 \AA^2 pro Lipidmolekül und einer Lipidbedeckung von $2,58 \text{ \mu g/cm}^2$ errechnete Hill eine Bedeckung der Knorpelfläche mit ca. 6 bis 7 Lipidmonolagen. Hill nennt dies oligolamellare Lipidschichten. Er geht davon aus, dass mehrere Lipiddoppelschichten übereinander liegen /57/. Die Phospholipidkonzentration in der Synovialflüssigkeit beträgt in gesunden Gelenken $0,15 \text{ mg/ml}$ und in rheumatischen Gelenken 1 mg/ml /5/. Nach Hill muss somit das Boxmodell aus Abbildung 2.1 modifiziert werden (Abbildung 2.8).

Es stellt sich zunächst die Frage, warum die Lipidkonzentration der Synovialflüssigkeit in erkrankten Gelenken steigt. Prinzipiell sind zwei Wege denkbar. Zum einen könnte das DPPC von außen in das Gelenk gelangen und zum anderen im Gelenk selbst freigesetzt werden. Nach /5/ ist das Gelenk durchlässig für kleine Moleküle sowie Wasserstoff- und Salzionen. DPPC kann mit einem Molekulargewicht von 735 Da jedoch nicht zu den kleinen Molekülen gezählt werden. Außerdem existiert es in wässrigen Lösungen nur in seiner Verbundform, dem Vesikel. Somit erscheint es eher unwahrscheinlich, dass von außen Lipid in das Gelenk eindringt.

Knochen
hyaliner Gelenkknorpel
oligolamellare Lipidschicht
Gelenkspalt mit Synovialflüssigkeit
oligolamellare Lipidschicht
hyaliner Gelenkknorpel
Knochen

Abb. 2.8: Boxmodell für den Aufbau eines natürlichen Gelenks nach Hill et. al /57/

Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich das Lipid von der Knorpeloberfläche ablöst. Da die Bedeckung der Knorpeloberfläche aus /57/ bekannt ist, kann diese Theorie rechnerisch überprüft werden. Da sowohl Gelenkpfanne als auch -kugel in etwa eine Halbkugelform annehmen, kann die Gesamtoberfläche des Knorpels als Kugeloberfläche berechnet werden. Bei einem Knieumfang von 40 cm sollte der Umfang des Gelenkes selbst etwa 25 cm sein. Bei der angenommenen Kugelform erhält man die Oberfläche nun aus:

$$A_0 = \frac{U^2}{\pi} \approx 200\text{cm}^2, \quad \text{Gl. 2.1}$$

wobei A_0 die Oberfläche und U der Kreisumfang sind. Somit ergibt sich aus den oben erwähnten $2,58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Gesamtmasse von etwa 0,5 mg adsorbiertes Lipid an der Knorpelgrenzfläche. Da das Volumen der Synovialflüssigkeit in etwa 0,5 ml beträgt, würde dies bei Ablösung eine Konzentration von 1 mg/ml ergeben. Da die Konzentration in einem gesunden Gelenk schon 0,15 mg/ml beträgt, errechnet sich damit eine Gesamtkonzentration von 1,15 mg/ml. Diese einfache Überschlagsrechnung soll zeigen, dass es möglich ist, dass bei rheumatischen Erkrankungen der Lipidfilm von der Knorpeloberfläche abgelöst wird.

Warum löst sich der Lipidfilm von der Knorpeloberfläche? Eine mögliche Erklärung dafür könnten Verunreinigungen in der Synovialflüssigkeit erkrankter Gelenke sein. Viele dieser Verunreinigungen sind auch makroskopisch in erkennbar. Während die Synovialflüssigkeit gesunder Gelenke transparent ist, ist die von erkrankten Gelenken meist verfärbt. So lagert sich beispielsweise Fett bei Übergewicht auch in das Gelenk ein /61/. Dieses könnte letztendlich für ein Ablösen des Lipidfilmes sorgen.

In /57/ wurde bereits festgestellt, dass die Anwesenheit von DPPC an der Knorpelfläche ein wichtiger Grund für die niedrige Reibung im Gelenk ist. In einem nächsten Schritt muss nun geklärt werden, warum dies so ist. Ein in der Literatur vielfach diskutiertes Modell geht dabei von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen DPPC und der Hyaluronsäure aus. Wechselwirkungen wurden bereits mittels Elektronenmikroskopie /62, 63/, Röntgendiffraktometrie und einer Langmuir-Filmwaage /64/ beobachtet. Eine Aufgabe dieser Arbeit war es, diese Daten mittels alternativer *in situ* Messmethoden zu überprüfen.

Eine erste mögliche Therapieform für Arthritis unter Verwendung von DPPC wurde 2003 von Kawano et al. vorgestellt. Sie applizierten eine Mischung von DPPC-Vesikeln und Hyaluronsäure in arthritische Gelenke von Ratten und konnten anschließend eine verringerte Reibung beobachten. Weiterhin beobachteten sie, dass der Lipidfilm ein Fortschreiten der Knorpelbeschädigung verhinderte /65/. Demnach erfüllt das Lipid zwei Funktionen an der Knorpeloberfläche: zum einen verringert es die Reibung und zum anderen schützt es den Knorpel. Bis zum jetzigen Zeitpunkt (Februar 2008) ist diese mögliche Therapieform noch nicht über das Tierversuchsstadium hinaus gekommen.

2.6 Modellsystem zur Untersuchung der Schmierungseigenschaften von Gelenken

Aus dem vorhergehenden, einleitenden Text wird nun ein Modellsystem zum Studium der Schmierungseigenschaften in Gelenken abgeleitet. Hierzu soll als erstes die Struktur der Phospholipide in einer Hyaluronssäurelösung bestimmt werden. Da DPPC mit einem Phasenübergang von 41 °C ungünstige Verarbeitungseigenschaften hat, soll dieses im Modellsystem durch 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC), welches eine Phasenübergangstemperatur von 24 °C besitzt, ersetzt werden. Beide Lipide unterscheiden sich in der Länge der Alkylketten, besitzen jedoch beide Phosphocholin als hydrophile Kopfgruppe. Hauptunterschied in Hinblick auf die Funktion im Körper ist, dass DMPC in der L_{α} - und DPPC in der L_c - Konformation bei Körpertemperatur vorliegen. Die Wechselwirkungen in der Volumenphase werden in einem biologischen Puffer bei 0,15 M NaCl Ionenstärke und pH 7,4 untersucht. Punktuell werden darüber hinaus Unterschiede zwischen DMPC und DPPC herausgearbeitet.

Ein weiteres Ziel ist es, die Grenzfläche zwischen Knorpel und Synovialflüssigkeit zu charakterisieren und eine mögliche Interaktion zwischen beiden Komponenten zu beobachten. Dafür wird ein Modellsystem in Anlehnung an das Boxmodell nach Hill (Abbildung 2.8) verwendet und an entsprechenden Stellen vereinfacht werden. Der Knorpel ist im Wesentlichen ein Polymer mit hohem Wasseranteil. Da sich das Modellsystem stark an den Forderungen der Physik orientieren und somit möglichst klar und einfach sein soll, wird der Knorpel durch einen synthetischen Polyelektrolytfilm ersetzt.

Da die Präparation von oligolamellaren Lipidschichten schwierig ist, werden diese im Modellsystem durch eine Lipiddoppelschicht ersetzt. Dieses System wird anschließend in Kontakt mit einer Hyaluronsäurelösung unter Druck sowie unter Scherkräften untersucht. Da die Präparation des Modellsystems auf das Wechselspiel von geladenen Komponenten zurückgreift, wird auf Puffersubstanzen als weitere Ladungsträger verzichtet. In Wasser gelöste Hyaluronsäure besitzt einen pH-Wert von 6,8, bei dem Hyaluronsäure wie unter physiologischen Bedingungen dissoziiert vorliegt. Die physiologische NaCl-Konzentration von 0,15 M NaCl soll jedoch beibehalten werden. Abb. 2.9 zeigt das Modellsystem wiederum als Boxmodell.

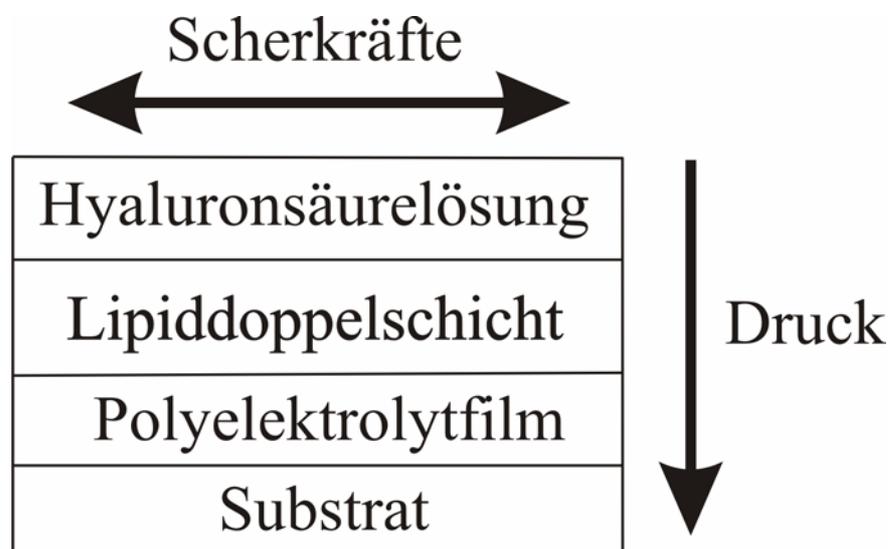


Abb. 2.9: Modellsystem zum Studium der Schmierungseigenschaften des natürlichen Gelenks an der Grenzfläche

3. Methoden

3.1 Analytische Ultrazentrifugation (AUC)

Die Analytische Ultrazentrifugation (AUC) ist eine leistungsstarke und vielseitige Methode in der Biophysik. Sie eignet sich zur Bestimmung des Molekulargewichts sowie dessen Verteilung in hochmolekularen Polymeren, zur Partikelgrößenbestimmung und deren Verteilung und schließlich auch zur Aufklärung von intermolekularen Wechselwirkungen. In aller Regel lassen sich aus AUC-Messungen qualitative Aussagen treffen, bei entsprechender Qualität des Probenmaterials sind auch quantitative Aussagen möglich. Die Grundlagen für die moderne Ultrazentrifugation legten vor allem Svedberg und Peterson /66, 67/, Hengstenberg /68/ und Kuhn /69/.

Grundprinzip eines AUC-Experiments ist die Auftrennung von kolloidalen Teilchen durch die Zentrifugalkraft. Neben der Zentrifugalkraft spielt auch die Reibungskraft und Auftriebskraft eine Rolle, die der Zentrifugalkraft entgegen wirken. Ein weiterer zu beachteter Parameter ist die Diffusion in der Lösung. Darauf wird aber an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Die gesuchte Größe ist prinzipiell auf zwei verschiedene Arten zugänglich. Die eine Möglichkeit ist die Bestimmung des Sedimentationsgleichgewichtes, weiterhin kann die Sedimentationsgeschwindigkeit ermittelt werden. Ein Gleichgewichtsexperiment erfordert einen hohen Zeitaufwand, bei letztgenannter Methode wird der Zeitvorteil durch einen erhöhten Rechenaufwand erkauf /70/. Abbildung 3.1 zeigt schematisch eine Probe im Kraftfeld einer Ultrazentrifuge.

Das Molekulargewicht MW eines Teilchens ist bei der Bestimmung mittels der Gleichgewichtsmethode aus folgender Gleichung zugänglich /70/:

$$MW = \frac{2 R T \ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)}{(1 - V \rho) \omega^2 (x_2^2 - x_1^2) - 4 \ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)}, \quad \text{Gl. 3.1}$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, V das Volumen der Lösung, ρ die Dichte der Lösung, ω Winkelgeschwindigkeit, x_1 und x_2 zwei unterschiedliche Abstände vom Rotationszentrum sowie c_1 und c_2 die Konzentration des Analyten an der entsprechenden Stelle bezeichnen.

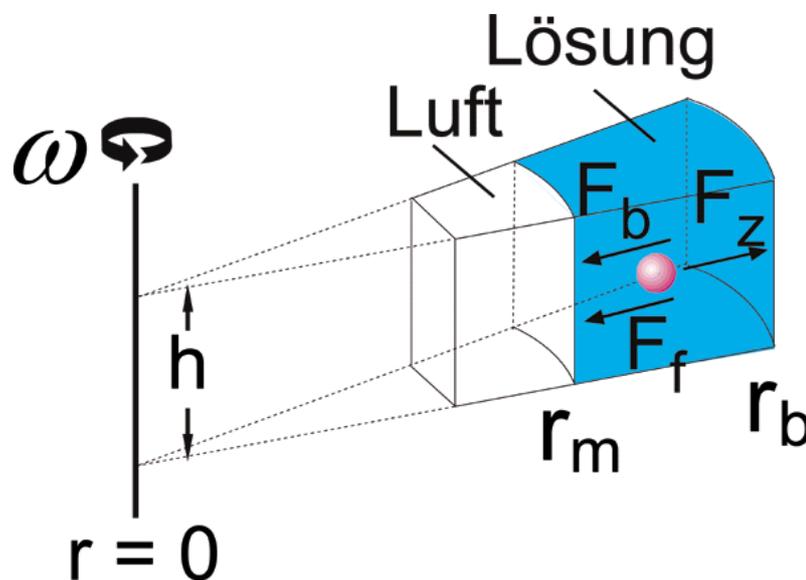


Abb. 3.1: Kräfte auf ein kolloidales Teilchen in der Ultrazentrifuge. Der Zentrifugalkraft (F_z) entgegen wirken die Reibungskraft (F_f) und die Auftriebskraft (F_b). Die Punkte x_1 und x_2 aus Gleichung 3.1 befinden sich zwischen r_m und r_b . Abbildung /71/ entnommen.

Der Messvorgang lässt sich, wie oben bereits erwähnt, durch ein Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wesentlich beschleunigen. Betrachtet man den idealen Fall von monodispersen, kugelförmigen Teilchen, so ist die Geschwindigkeit dx/dt , mit der sich die Moleküle in Richtung der zentrifugalen Kraft bewegen, proportional zu $\omega^2 x$, wobei x der Abstand des Teilchens zum Rotationszentrum ist /70/:

$$\frac{dx}{dt} = s \omega^2 x \quad \text{Gl. 3.2}$$

Die integrierte Form lautet:

$$s = \frac{\ln \frac{x_2}{x_1}}{\omega^2(t_2 - t_1)} \quad \text{Gl. 3.3}$$

Der Faktor s wird als Sedimentationskonstante bezeichnet. Die Dimension von s ist s^{-1} und wird auch als Svedberg-Einheit beschrieben. Bei nichtidealen Lösungen ist s konzentrationsabhängig. Der Zusammenhang zwischen s und dem Molekulargewicht MW ergibt sich aus [70]:

$$MW = \frac{RTs}{D_{\text{Diff}}(1 - \rho V)}, \quad \text{Gl. 3.4}$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, D_{Diff} die Diffusionskonstante, ρ die Dichte und V das Volumen des Lösungsmittels sind.

Bei nichtidealen Sedimentationsverhalten, was beispielsweise durch intermolekulare Vernetzung der Moleküle oder asymmetrische Moleküle hervorgerufen werden kann, ist der s -Wert konzentrationsabhängig ($= s^*$). Um die s -Werte dennoch vergleichbar zu machen, kann ein $s_{0,20,w}$ berechnet werden (0 – unendliche Verdünnung, 20 – 20°C, w – reines Wasser). Die Umrechnung auf reines Wasser und 20°C wird vorgenommen durch:

$$s_{20,w} = s^* \frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20,w} \eta_{T,\text{Puffer}}}{(1 - \bar{v}\rho)_{T,\text{Puffer}} \eta_{20,w}}, \quad \text{Gl. 3.5}$$

wobei \bar{v} das spezifische Volumen des Moleküls, ρ die Dichte und η die Viskosität der Lösung sind. Der Index „20, w“ bezieht sich auf 20°C und reines Wasser und „T, Puffer“ sind die Temperatur und der Puffer während des Experimentes. Den s -Wert bei unendlicher Verdünnung erhält man schließlich durch Extrapolation des reziproken, konzentrationsabhängigen s -Wertes gegen die Konzentration.

3.2 Dynamische Lichtstreuung

Neben der Analytischen Ultrazentrifugation ist die Lichtstreuung eine weitere wichtige Methode zur Bestimmung von Partikelgrößen. Prinzipiell wird zwischen statischer (SLS) und dynamischer Lichtstreuung (DLS) unterschieden, welche unterschiedliche Größenbereiche abdecken. Die SLS kann auch im Kleinwinkelmodus angewendet werden. Die DLS wird auch als quasi-elastische Lichtstreuung oder als Photonenkorrelationspektroskopie bezeichnet. Die Lichtstreuung ist eine zerstörungsfrei arbeitende *in situ* Technik. Ein Nachteil ist der hohe Rechenaufwand, um zu einem Resultat zu kommen. Da in dieser Arbeit nur mit DLS gearbeitet wurde, wird diese Methode im folgenden erläutert.

Die Grundlage der DLS-Messung ist die Molekularbewegung der Teilchen in Lösung. Aufgrund der Diffusion der Partikel kommt es bei der Wechselwirkung des Lichtes mit der Probe zu Interferenzeffekten, und die gestreute Intensität fluktuiert mit der Zeit. Die Information über die Partikelgröße steckt direkt im Abfall der Fluktuation. Schnelle Bewegungen von kleinen Teilchen führen zu einem schnellen Abfall, langsame Diffusion von großen Partikeln bei gleicher Viskosität zu einem langsameren Abfall der Fluktuation. Für die Messung muss die Korrelationsfunktion der Intensität $\langle I(t)I(0) \rangle$ des gestreuten Lichtes aufgezeichnet werden. Die Korrelationsfunktion ergibt sich aus /72/:

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t)I(0) \rangle}{\langle I^2 \rangle} \quad \text{Gl. 3.6}$$

und kann durch die Siegert-Beziehung in die normalisierte Korrelationsfunktion des elektrischen Feldes des gestreuten Lichtes $g_1(t)$ umgewandelt werden /72/:

$$g_2(t) = 1 + g_1(t)^2 \quad \text{Gl. 3.7}$$

Die Korrelationsfunktion $g_1(t)$ ist in der Regel messtechnisch zugänglich. Sie fällt für den Fall eines monodispersen, sphärischen Partikels exponentiell ab /72/:

$$g_1(t) = \exp(-\Gamma t) \quad \text{Gl. 3.8}$$

Die Konstante Γ kann wie folgt errechnet werden /72/:

$$\Gamma = q^2 D_{\text{Diff}} \quad \text{Gl. 3.9}$$

wobei q der Streuvektor, auf den im Abschnitt 3.9 (Reflektometrie) noch eingegangen wird, und D_{Diff} die Diffusionskonstante ist. Gleichung 3.9 zeigt, dass der Abfall der Korrelationsfunktion quadratisch vom Betrag des Streuvektors abhängt. Die inverse Abklingrate kann auch als Zeitfenster verstanden werden, in dem das Partikel eine Strecke entsprechend q^{-1} zurücklegt /72/. Der eigentliche Partikelradius ist dann über die Kenntnis der Diffusionskonstante und der Stokes-Einstein-Beziehung zugänglich:

$$D_{\text{Diff}} = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_h}, \quad \text{Gl. 3.10}$$

wobei k_b die Boltzmannkonstante, η die dynamische Viskosität und r_h der hydrodynamische Teilchenradius ist.

3.3 Kalorimetrie (DSC, ITC)

Die Kalorimetrie umfasst einen sehr breiten Anwendungsbereich, für den die Bestimmung von Reaktionswärmern von Bedeutung ist. Dazu zählen die Ermittlung von Wärmern für den Phasenübergang, der Mischungs-, Lösungs-, Verdünnungs- und Solvatationsenthalpien sowie Adsorptionswärmern. Für die jeweiligen Fragestellungen stehen die unterschiedlichsten Kalorimetertypen zur Verfügung /73/.

Die verschiedenen Kalorimetertypen werden nach der Art der Wechselwirkung zwischen dem Kalorimeter und seiner Umgebung, dem Thermostaten unterschieden. Am gebräuchlichsten ist die Unterteilung in anisotherme, isotherme, adiabatische und Wärmeaustauschkalorimeter. Bei der anisothermen Methode erfährt das Kalorimeter selbst die Temperaturänderung, die Umgebungstemperatur bleibt konstant. Dieser idealisierte Fall erfordert erhöhten Rechenaufwand, um das Resultat unter Berücksichtigung des tatsächlichen Wärmeübergangs vom System zur Umgebung zu erhalten. Das Korrektur-

glied lässt sich für schnelle Reaktionen gut berechnen, für langsame Reaktion hingegen nicht /73/.

Für langsame Reaktionen ist ein adiabatisch arbeitendes Kalorimeter besser geeignet. Dabei muss der Thermostat den Temperaturänderungen des Kalorimeters möglichst genau und schnell folgen. Die isotherme Arbeitsweise unterscheidet sich von der anisothermen in der Art und Weise, dass sowohl die Temperatur des Thermostaten als auch die Temperatur des Kalorimeters gleich gehalten werden und die Reaktionswärme des Phasenübergangs von der Kalorimetersubstanz aufgenommen wird. Das Prinzip des Wärmeaustauschkalorimeters ist, dass die im Reaktionsgefäß entwickelte und vom Kalorimeter aufgenommene Reaktionswärme möglichst schnell und vollständig mit der Umgebung ausgetauscht wird /74/.

Einen besonderen Messaufbau stellt das Differentialkalorimeter dar. Dabei handelt es sich um zwei völlig gleichartige Kalorimetergefäße, die innerhalb eines gemeinsamen Mantels eingefasst sind. Die beiden Zwillingsgefäße sollten die gleiche Form und Größe haben und aus demselben Material gefertigt sein und damit letztlich die gleiche Wärmekapazität besitzen. Ein Differentialkalorimeter kann sowohl anisothermisch als auch adiabatisch arbeiten. Der Differentialmethode liegt folgendes Prinzip zu Grunde: Die in einem Gefäß auftretende Wärmetönung wird mit Hilfe einer elektrischen Heizung im zweiten Gefäß kompensiert. Zwischen beiden Gefäßen ist eine Thermosäule geschaltet, die geringfügige Temperaturänderungen sofort anzeigt /73/.

Das Differenzialkalorimeter eignet sich besonders zur Bestimmung von geringfügigen Wärmemengen, wie sie z. B. bei Mischungs-, Lösungs- und Verdünnungsvorgängen vorkommen. Zur Messung kleinster Differenzen in Wärmekapazitäten, wie sie z. B. für die Bestimmung der spezifischen Wärme des gelösten Stoffes in einer verdünnten Lösung nötig sind, eignet sich ausschließlich die Differenzmethode /73/.

Eine Anwendung der Differentialmethode ist die Differentialabtastkalorimetrie (engl.: Differential Scanning Calorimetry, DSC). Bei diesem Verfahren wird eine Probe- und Referenzsubstanz in einem Differentialkalorimeter vermessen, wobei ein kontrolliertes Temperaturprogramm durchgeführt wird /74/. Dabei werden beiden Proben so viel Energie zugeführt, dass sie während des Messvorgangs stets die gleiche Temperatur ha-

ben. Schließlich wird die Energie, die beiden Probenkammern zugeführt wird, detektiert. Das DSC eignet sich gut zur Bestimmung von Phasenübergängen. Bei einem Messprogramm werden üblicherweise mehrere Heiz- und Kühlzyklen aufgenommen /75/. Abbildung 3.2 zeigt ein Schema eines DSC-Aufbaus.

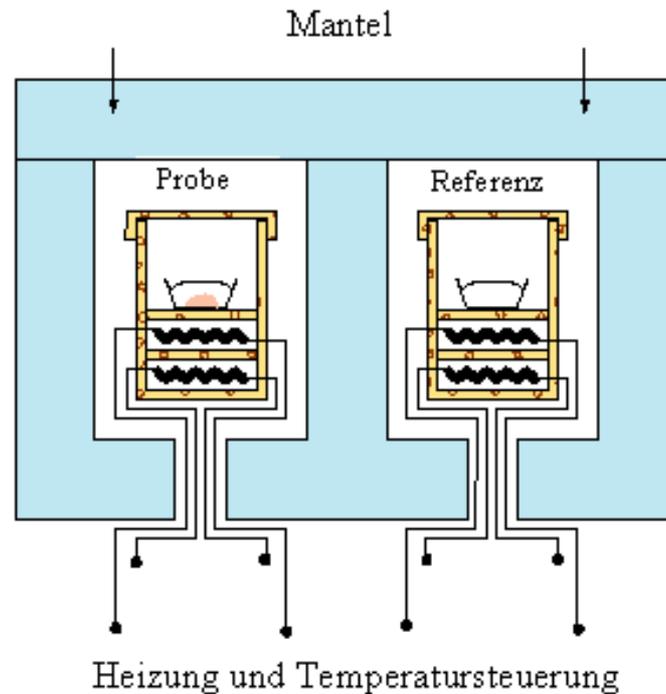


Abb. 3.2: Schema eines DSC-Aufbaus. nach /76/.

Eine weitere kalorimetrische Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die Isotherme Titrationskalorimetrie (engl: Isothermal Titration Calorimetry, ITC). Sie wird eingesetzt, um Reaktionswärmen zu bestimmen. Die ITC wird als Flüssigkeitskalorimetrie betrieben. Dabei wird bei konstanter Temperatur eine Reaktionskomponente in Lösung vorgelegt und die zweite Reaktionskomponente dazu titriert. Detektiert wird schließlich die bei der Reaktion frei werdende oder verbrauchte Reaktionswärme. Dabei lassen sich eine Vielzahl von Ergebnissen aus ITC Experimenten ableiten. Neben der Reaktionsenthalpie lassen sich auch Aussagen zur Stöchiometrie machen, Bindungskonstanten und Kinetiken für schnelle Reaktionen ermitteln.

3.4 UV/VIS-Spektroskopie

Die Spektroskopie ist eine analytische Methode, bei der Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie beobachtet werden. Die UV/VIS-Spektroskopie nutzt den sichtbaren (380 – 800 nm) und den ultravioletten (200 – 380 nm) Teil des Spektralbereiches. In diesen Bereich werden die Valenzelektronen von Molekülen angeregt. Abbildung 3.3 zeigt die dabei möglichen Elektronenübergänge.

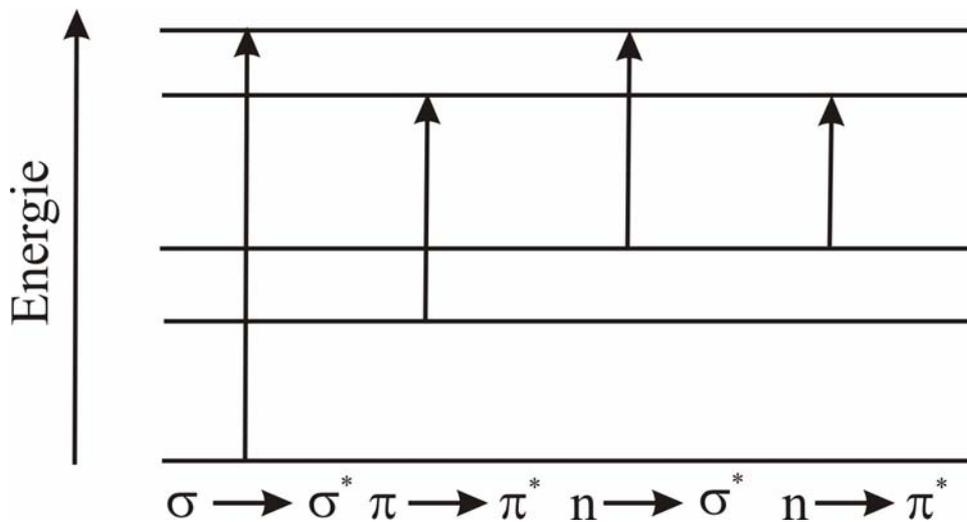


Abb. 3.3: Elektronenübergänge in der UV/VIS-Spektroskopie. Die Übergänge $\sigma \rightarrow \sigma^*$ sowie $\pi \rightarrow \pi^*$ sind Übergänge von bindenden zu antibindenden Molekülorbitalen, die Übergänge $n \rightarrow \sigma^*$ und $n \rightarrow \pi^*$ sind Übergänge von nichtbindenden zu antibindenden Molekülorbitalen, nach /74/.

Prinzipiell gilt, dass je höher die Energie für den Übergang ist, desto kürzwelliger die Wellenlänge des Lichtes zur Anregung des Übergangs sein muss. Der $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergang benötigt somit von allen die meiste Energie, dafür ist Licht aus dem Vakuum-UV nötig. Somit spielt dieser Übergang in der Analytik kaum eine Rolle.

Schon langwelliger absorbiert der $n \rightarrow \sigma^*$ -Übergang, die Absorptionsmaxima liegen hier in Abhängigkeit von den Bindungszuständen im Molekül zwischen 165 und 230 nm. Am bedeutendsten für die UV/VIS-Spektroskopie sind jedoch die Übergänge $\pi \rightarrow$

π^* und $n \rightarrow \pi^*$, diese benötigen die wenigste Energie. Sie weisen außerdem die höchste Intensität auf. Die $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge adsorbieren am langwelligsten /74/.

Die UV/VIS-Spektroskopie ist eine etablierte Methode, die eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten bietet. Häufig wird die Methode zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Den Zusammenhang zwischen der Konzentration der Probe und der analytischen Resonanz, der Extinktion, liefert das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E_{\text{Ext}} = \lg(I_0/I) = \gamma d c, \quad \text{Gl. 3.11}$$

wobei E_{Ext} die Extinktion, I_0 die Intensität des einfallenden Lichtstrahls, I die Intensität des austretenden Lichtstrahls, γ der molekulare Extinktionskoeffizient, d die Dicke der Küvette und c die Konzentration des Analyten sind.

3.5 Viskosimetrie

Die Viskosimetrie ist eine Methode, um das Fließverhalten von Stoffen zu beschreiben. Als quantitative Maßzahl dafür dient die dynamische Viskosität η . Fluide, deren Viskosität nicht scherabhängig ist, werden als Newtonsche Fluide bezeichnet. Stoffe, deren viskose Eigenschaften vom Auftreten von Scherkräften abhängen, werden als Nicht-Newtonsche Fluide oder auch als strukturviskos bezeichnet.

Um die scherabhängige Viskosität zu bestimmen, werden so genannte Rotationsviskosimeter eingesetzt. Dabei befindet sich die Flüssigkeit zwischen zwei Platten. Wenn nun die eine Platte bewegt und die andere festgehalten wird, setzt die flüssige Phase der Bewegung Widerstand in Form von Reibung entgegen. Die an der bewegten Platte haftenden Flüssigkeitsmoleküle besitzen die gleiche Geschwindigkeit wie die Platte selbst, nämlich v_{max} . Die nächste Schicht Moleküle wird ebenfalls bewegt, aber nicht mehr ganz so schnell wie die oberste Schicht. Dies setzt sich bis zur untersten Schicht ($v = 0$) fort. Abbildung 3.4 zeigt dieses Prinzip. Es wird vorausgesetzt, dass es sich um laminares, d.h. wirbelfreies Fließen handelt.

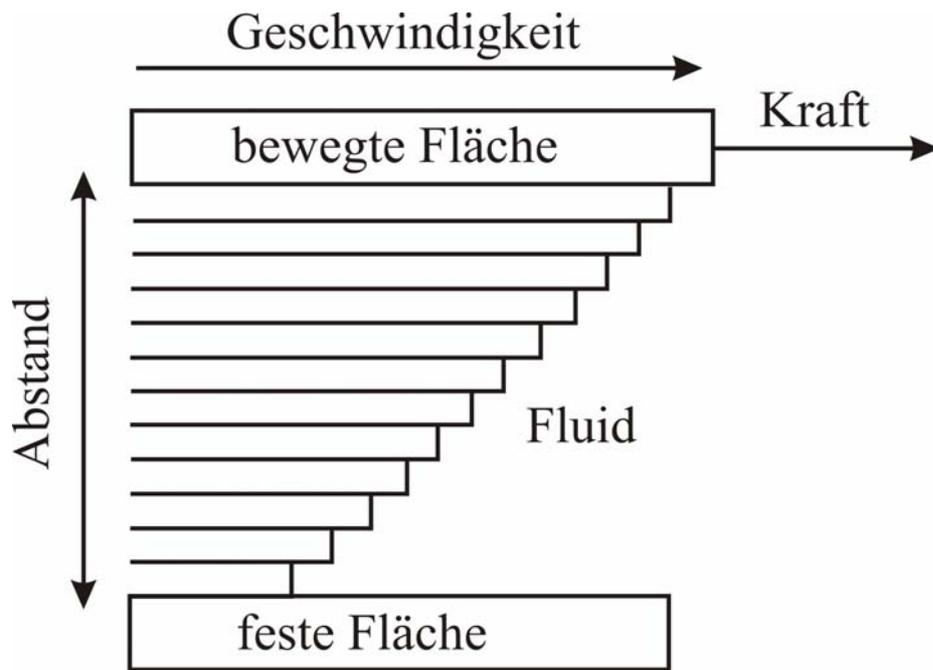


Abb. 3.4: Prinzip der Viskositätsmessung

Zwischen den beiden Platten besteht also senkrecht zur Bewegungsrichtung ein Geschwindigkeitsgradient. Dieser Gradient wird Scherrate oder Schergeschwindigkeit genannt und mit $\dot{\gamma}$ bezeichnet. Die Reibung findet durch Impulsübertragung statt. Moleküle aus einer langsameren Schicht wechseln in eine schnellere und bremsen durch Stöße die schnelleren Teilchen ab.

Umgekehrt werden schnellere Teilchen, die in eine Schicht niedrigerer Geschwindigkeit eindringen, durch Stöße abgebremst und beschleunigen durch Impulsübertragung langsamere Moleküle. Die Arbeit, die zur Beibehaltung der Geschwindigkeit an der Platte verrichtet werden muss, wird irreversibel als Wärme dissipiert. Die dazu benötigte Kraft F wirkt tangential auf eine Fläche A ein und wird deshalb Schubspannung genannt. Für newtonsche Fluide besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Schubspannung und der Scherrate. Es gilt folgende Beziehung:

$$\frac{F_x}{A} = \eta \frac{\Delta v_x}{\Delta z_x} = \eta \dot{\gamma}, \quad \text{Gl. 3.12}$$

wobei Δv_x die Geschwindigkeit der Platte und Δz_x den Abstand der Platten bezeichnet.

Um eine gute Auflösung der Messung zu erhalten, ist es wünschenswert, möglichst große Flächen gegeneinander zu bewegen. Eine Möglichkeit dafür ist, eine Doppelspaltgeometrie, wie sie Abbildung 3.5 zeigt, einzusetzen. Diese Variante der Rotationsviskosimetrie wurde in dieser Arbeit angewendet.

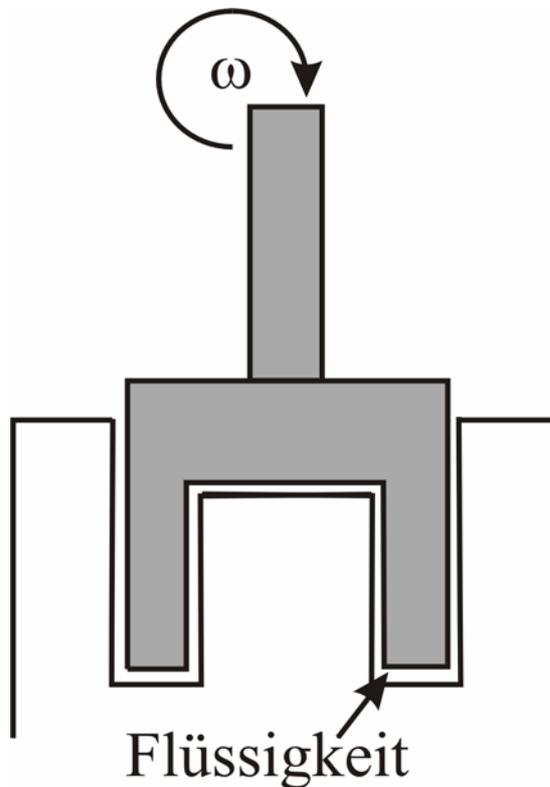


Abb. 3.5: Querschnitt durch den Versuchsaufbau für ein Rotationsviskosimeter mit Doppelspaltgeometrie

Als eigentliche Messgröße in der Viskosimetrie wird das Drehmoment M herangezogen. Der Zusammenhang zwischen der Viskosität η und dem Drehmoment ergibt sich aus:

$$\eta = \frac{M}{Cf}, \quad \text{Gl. 3.13}$$

wobei C eine Gerätekonstante und f die Rotationsfrequenz sind.

3.6 Raster-Kraftmikroskopie (AFM)

Das Raster-Kraftmikroskop (Atomic Force Microscopy, AFM) ist eine seit zirka 20 Jahren eingesetzte Technik zur Abbildung von Oberflächen im atomaren Bereich. Das AFM misst mit Hilfe einer Spitze, die auf der Probenoberfläche entlang fährt, die Topographie der Probenoberfläche. Diese kann anschließend graphisch dargestellt werden. Im Gegensatz zum Rasterelektronen- oder Rastertunnelmikroskop hat das AFM keine speziellen Anforderungen wie Hochvakuum, Tieftemperatur oder Leitfähigkeit der Probe. Die Spitze übt bei der Messung nur eine geringe Kraft (10^{-8} bis 10^{-9} N) auf die Probe aus. Die Abstände und Höhenunterschiede bewegen sich im atomaren Bereich. Es können Höhenunterschiede bis zu $0,1 \text{ \AA}$ aufgelöst werden.

Grundlage der AFM-Technik ist das Lennard-Jones-Potential $V(R)$ (Abbildung 3.6), mit dessen Hilfe die Wechselwirkungen zwischen einzelnen Atomen allgemein beschrieben werden können. Bei großen Atomabständen überwiegen die anziehenden Kräfte, ab einer bestimmten Entfernung steigen jedoch die repulsiven Kräfte stark an. Bei den anziehenden Kräften handelt es sich um van-der-Waals-Kräfte und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Die repulsiven Kräfte kommen überwiegend durch die Pauli-Abstoßung zustande, die aus der Abstoßung von Elektronen gleicher Spinquantenzahl resultieren. Das Lennard-Jones-Potential gilt im Fall, dass zwischen den einzelnen Atomen keine chemische Bindung besteht.

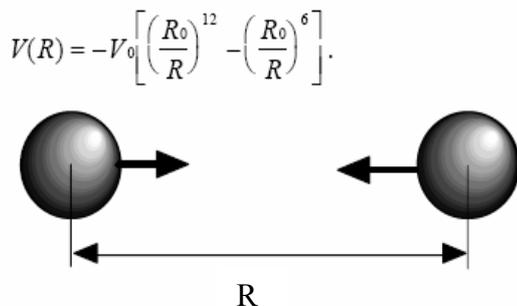


Abb. 3.6: Lennard-Jones-Potential

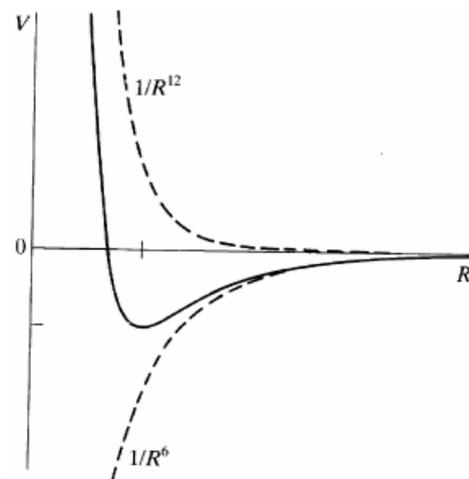


Abb. 3.7: Anziehende und abstoßende Kräfte

V_0 bezeichnet das Potential und R_0 den Atomabstand in der Gleichgewichtslage. Der negative Gradient des Potentials ist die Kraft $F(R)$, die anziehend oder abstoßend sein kann (Abbildung 3.7). Bei starker Annäherung der Sondenspitze an die Oberfläche überlappen sich die besetzten Elektronenwolken der Atome und die repulsiven Kräfte der Pauli-Abstoßung, die proportional zur Elektronendichte sind, überwiegen. Da die abstoßenden Kräfte sehr stark vom Abstand Spitze-Oberfläche abhängig sind, kann die Topographie in diesem Bereich sehr genau abgebildet werden.

Bei der Messung tastet die AFM-Sonde, auch Cantilever genannt, zeilenweise die Probe ab. Durch die Oberflächenstruktur der Probe wird der Cantilever unterschiedlich stark ausgelenkt. Diese Auslenkung wird typischerweise mit einem optischen Sensor aufgezeichnet und ist ein Maß für die zwischen der Spitze und der Oberfläche wirkenden Kräfte. Aus der punktweisen Aufzeichnung der Auslenkungen lässt sich anschließend ein Abbild der Topographie der Probe errechnen.

3.7 Schwingquarzwaage (QCM-D)

Die Quarzmikrowaage mit Dissipationsaufzeichnung (Quarz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, QCM-D) basiert auf der klassischen Schwingquarzwaage und wurde in den 1990er Jahren von Rodahl und Mitarbeitern entwickelt [77]. Sie hat sich seitdem als Technik zum Studium von Adsorptionsvorgängen im Bereich der weichen Materie wie Polymeren, Proteinen, Lipiden und Zellen bewährt. Vorteile der Methode sind, dass sie sehr schnell ist, markierungs- und zerstörungsfrei arbeitet sowie mit kleinen Probemengen und ohne Referenzmessung auskommt. Hauptnachteil ist, dass nicht ohne weiteres zwischen Grenzflächen- und Volumeneffekten unterschieden werden kann.

Ein QCM-D Sensor besteht aus zwei Elektroden, die räumlich durch eine Quarzscheibe als Trägermaterial getrennt sind. Wird an die Elektroden eine Wechselspannung mit der richtigen Frequenz angelegt, so wird durch den inversen piezoelektrischen Effekt der Quarzkristall mit seiner Eigenfrequenz deformiert und in Schwingung versetzt. Diese Schwingung bildet eine stehende, transversale akustische Welle senkrecht zur Quarzoberfläche durch den Quarz hindurch aus.

Die Eigenfrequenz f_0 wird durch die Dicke der Quarzscheibe und den Winkel zwischen Oberfläche und Kristallachse bestimmt. Sie berechnet sich über:

$$f_0 = \frac{1}{2d_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \quad \text{Gl. 3.14}$$

wobei d_q die Dicke des Quarzes, ρ_q die Dichte des Quarzmaterials (2,648 g/cm) und μ_q sein Schermodul ($2.957 \times 10^{10} \text{ N m}^{-2}$) sind.

Die Methode selbst basiert auf der Änderung der Eigenfrequenz (Resonanzfrequenz) der piezoelektrischen Kristallscheibe, sobald diese mit einer Fremdmasse der Schichtdicke Δd beladen wird. 1959 stellte Günter Sauerbrey eine lineare Beziehung zwischen Massebeladung Δm und der Änderung der Resonanzfrequenz Δf von Schwingquarzen fest und stellte folgende Formel auf [78]:

$$\Delta f = -\frac{f_0 \Delta d}{d_q} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} = C \Delta m \quad \text{Gl. 3.15}$$

Hierbei ist A die Elektrodenfläche auf dem Quarz und C eine Konstante. Für den verwendeten 5 MHz-Schwingquarz bedeutet das, dass eine Masseanlagerung von 17,7 ng auf einer Fläche von einem cm^2 eine Frequenzänderung von 1 Hz hervorruft. Werden Moleküle an der Oberfläche adsorbiert, so führt dies zu einer negativen Frequenzverschiebung und bei einem Desorptionsvorgang zu einer positiven Frequenzverschiebung. Die Sauerbrey-Gleichung gilt jedoch nur für starre Filme, weshalb die QCM-Technik lange Zeit nur als Massendetektor für Gase eingesetzt wurde. Die Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen erzeugt jedoch viskoelastische Filme.

Neben der Frequenz detektiert das in dieser Arbeit von Q-Sence eingesetzte System noch die Dissipation oder Dämpfung. Die Dämpfung ist eine Messgröße, die hauptsächlich durch die viskoelastischen Eigenschaften der angelagerten Masse beeinflusst wird. Jede natürliche Schwingung verliert zum einen durch innere Reibung und zum anderen infolge von Dämpfung durch die umgebende Materie an Energie.

Bei der Quarzmikrowaage fällt diese Dämpfung im Vakuum oder in gasförmiger Umgebung gering aus, da Gase eine sehr geringe akustische Impedanz besitzen. Mit akustischer Impedanz sind hier alle Widerstände gemeint, die der Ausbreitung einer Schwingung entgegenwirken. Wird ein Quarz jedoch in flüssiger Umgebung zu Schwingungen angeregt, erfolgt durch die umgebende Flüssigkeit eine erhebliche Dämpfung der Schwingung.

Diese Dämpfung galt lange Zeit als unüberwindbares Hindernis zur Anwendung der QCM in Flüssigkeiten. Aber durch die rasante Entwicklung der Elektrotechnik in den letzten Jahren konnte geeignete Elektronik zur Verfügung gestellt werden, die eine ausreichend stabile Schwingung in flüssiger Umgebung ermöglichen. Wird diese Dämpfung während eines Experiments erfasst, können zusätzliche Informationen über die Beschaffenheit der adsorbierten Masse an der Quarzoberfläche, insbesondere über deren viskoelastisches Verhalten, gewonnen werden. Mathematisch kann die Dissipation D wie folgt beschrieben werden [79, 80]:

$$D = \frac{E_{\text{diss}}}{2\pi E_{\text{stored}}}, \quad \text{Gl. 3.16}$$

wobei E_{diss} die abgegebene Energie während eines Oszillationszyklus und E_{stored} die Gesamtenergie während eines Oszillationszyklus ist. Abbildung 3.8 soll das Arbeitsprinzips der QCM-D noch einmal zusammenfassend darstellen.

Die zeitliche Oszillation des Feldes kann durch folgende Funktion beschrieben werden:

$$A(t) = A_0 e^{-\pi f D t} \sin(\pi f t + \varphi), \quad \text{Gl. 3.17}$$

wobei $A(t)$ die Amplitude zur Zeit t , A_0 die Amplitude zur Zeit $t = 0$, f die Frequenz, D die Dissipation und φ der Phasenwinkel sind.

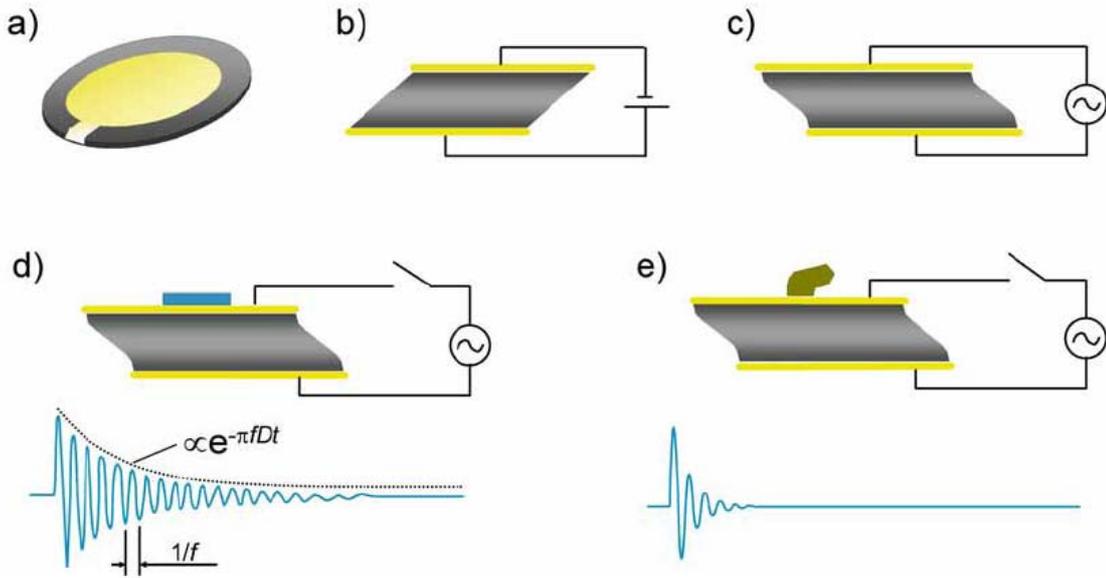


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Arbeitsprinzips der QCM-D. Der piezoelektrische Quarzkristall ist zwischen zwei Elektroden eingeschlossen (a). Das Anlegen einer elektrischen Spannung an dem Elektrodenpaar führt zu Scherdeformationen des Kristalls (b). Das Ergebnis einer angelegten Wechselspannung ist ein oszillierendes Deformationsfeld mit einer bestimmten Frequenz (c). Nach dem Öffnen des Stromkreises wird das Abklingen der Oszillation aufgezeichnet (d, e). Abbildung /81/ entnommen.

Besitzt die Adsorbatschicht viskoelastische Eigenschaften (siehe Abbildung 3.9), treten zusätzlich Dämpfungseffekte auf und die auftretende Frequenzverschiebung ist im Vergleich zu einem starren Film mit gleicher Massendichte reduziert. Durch quasi-simultane Messung von Frequenzänderung und Dissipation bei unterschiedlichen Resonanzfrequenzen sowie Anwendung geeigneter Rechenmodelle ist es möglich, aus den Messdaten Massendichte und Viskoelastizität des Adsorbats zu ermitteln /82/:

$$\Delta f \approx \frac{1}{2\pi\rho_0 h_0} \left\{ \frac{\eta_3}{\delta_3} + \sum_{j=1,2} \left[h_j \rho_j \omega - 2h_j \left(\frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{\eta_j \omega^2}{\mu_j^2 + \omega^2 \eta_j^2} \right] \right\}$$

$$\Delta D \approx \frac{1}{2\pi f \rho_0 h_0} \left\{ \frac{\eta_3}{\delta_3} + \sum_{j=1,2} \left[2h_j \left(\frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{\mu_j \omega}{\mu_j^2 + \omega^2 \eta_j^2} \right] \right\}$$

$$\text{mit } \delta_j = \sqrt{\frac{2\eta_j}{\rho_j \omega}} \quad \text{und} \quad \omega = 2\pi f_R$$

Gl. 3.18

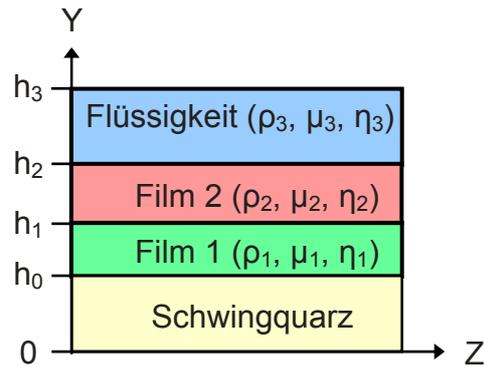


Abb. 3.9: Viskoelastisches Modell

Dies ist ein entscheidender Vorteil des QCM-D-Systems gegenüber anderen Schwingquarzsystemen, die meist im Dauerstrichbetrieb arbeiten und auf eine exakte Bestimmung von Dämpfungseffekten verzichten. In den obigen Formeln wurden zwei Adsorbatschichten mit Dichte ρ_j , Dicke h_j , Elastizität μ_j und Viskosität η_j ($j = 1,2$) berücksichtigt. ρ_3 , h_3 , μ_3 und η_3 kennzeichnen die entsprechenden Größen für die Flüssigkeit.

Das für diese Arbeit eingesetzte QCM-D System der Firma Q-Sense zeichnet sich dadurch aus, dass es neben dem Grundton (5 MHz) noch den dritten (15 MHz), den fünften (25 MHz) und siebten (35 MHz) Oberton der Schwingung aufzeichnet. Für die Datenauswertung müssen die Frequenz- und Dissipationsverschiebungen wieder auf den Grundton normiert werden.

Für die Messung selbst wird die Probelösung kontinuierlich mit einer peristaltischen Pumpe mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit in den Probenraum eingespült. In dem Gerätegehäuse findet sich eine Probenschleife, in der die Lösung vortemperiert wird. Bei großen Differenzen zwischen Umgebungs- und Messtemperatur sollte die Probelösung jedoch vortemperiert werden. Abbildung 3.10 zeigt ein Schema der eingesetzten QCM-D Technik.

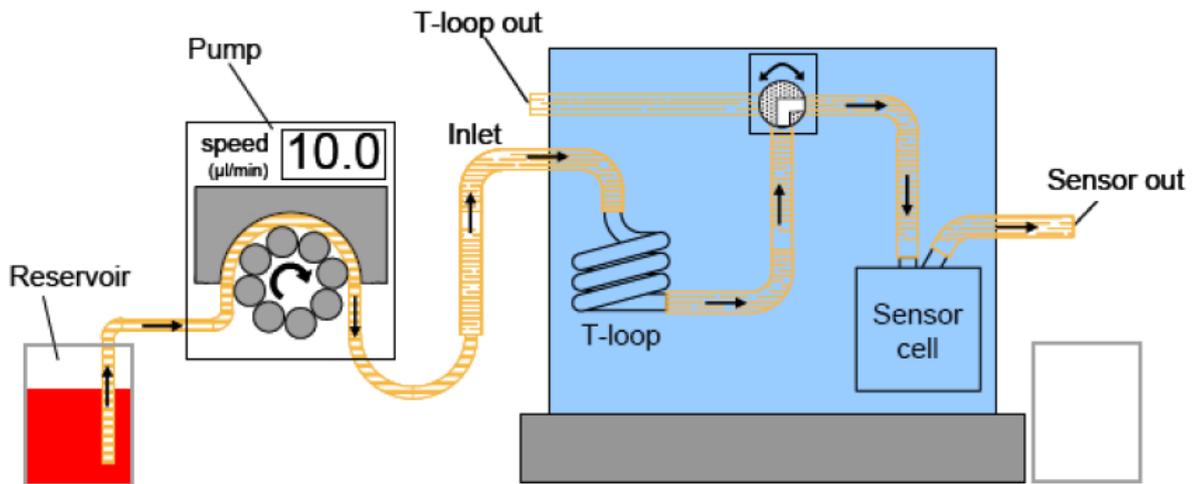


Abb. 3.10: Aufbau des QCM-D Messgerätes. Abbildung /83/ entnommen.

3.8 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist ein Messverfahren in der Oberflächenphysik, um den Brechungsindex und seinen Imaginärteil von dünnen Filmen zu bestimmen. Dabei werden Änderungen in der Polarisation eines Lichtstrahls bei Kontakt mit der Probe ausgenutzt. Ist der Brechungsindex des Filmes bekannt, so kann die Schichtdicke des Filmes ermittelt werden. Die Ellipsometrie ist eine sehr schnelle Technik, die Kinetikmessungen ermöglicht. Weitere Vorteile sind, dass keine Referenzmessung notwendig ist und dass das Messergebnis nicht von der Intensität der Lichtquelle abhängt.

Wie bereits erwähnt, ist die Ellipsometrie ein Verfahren, welches die Änderung des Polarisationszustandes von Licht bei der Reflektion an einer Probe ausnutzt. Deshalb wird als nächstes der Unterschied von linear- und elliptisch polarisiertem Licht dargestellt. Abbildung 3.11 zeigt die Ausbreitung von linear polarisiertem Licht, Abbildung 3.12 von elliptisch polarisiertem Licht.

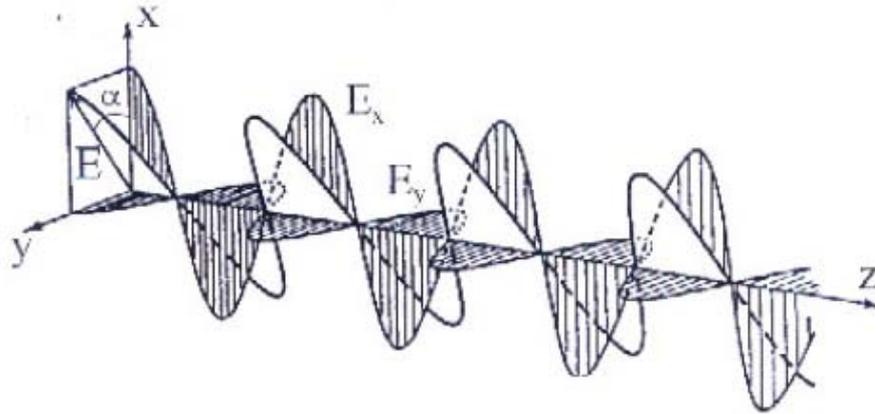


Abb. 3.11: linear polarisiertes Licht; Abbildung /84/ entnommen

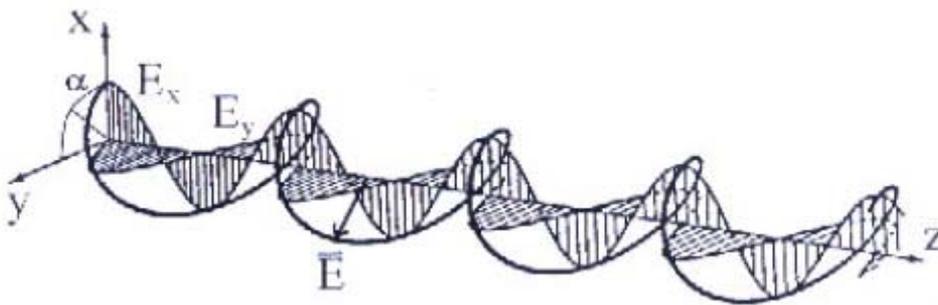


Abb. 3.12: elliptisch polarisiertes Licht; Abbildung /84/ entnommen

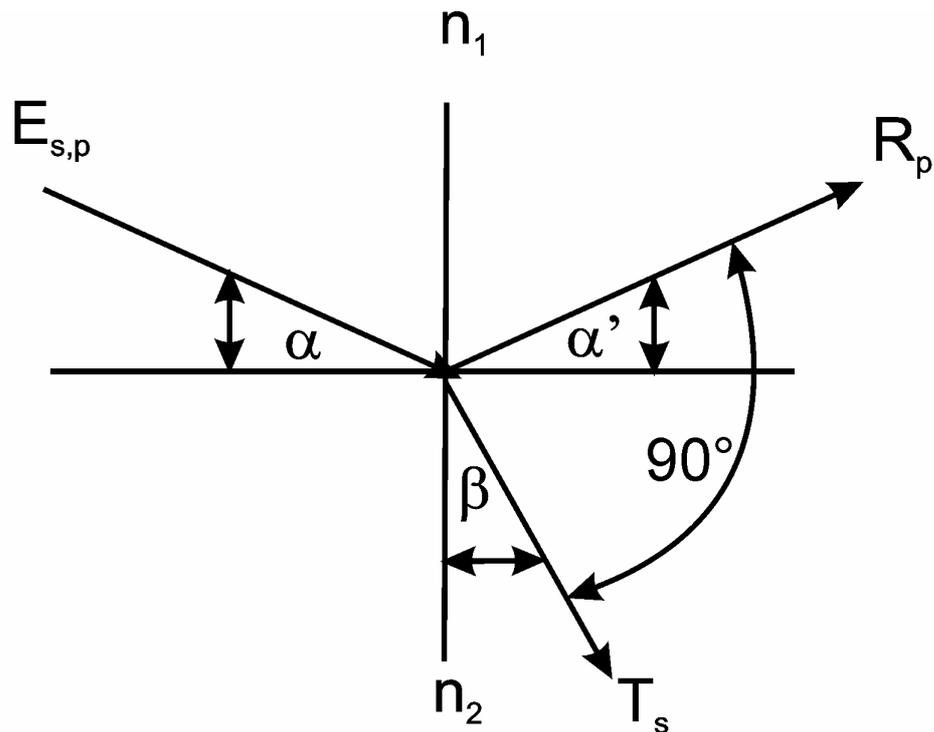
In Abbildung 3.11 ist die Ausbreitung von linear polarisiertem Licht schematisch dargestellt. Dabei ist nur der für die Polarisation relevante elektrische Feldvektor E dargestellt. Der magnetische Feldvektor schwingt senkrecht zu E und zur Ausbreitungsrichtung (z -Achse). In dieser Abbildung erkennt man nun, dass die x - und y -Komponente des elektrischen Feldvektors in gleicher Phase schwingen und der sich daraus ergebende elektrische Feldvektor E in einer festen Polarisationsebene liegt.

Abbildung 3.12 zeigt elliptisch polarisiertes Licht. In diesem Fall schwingen die x - und y -Komponente des elektrischen Feldvektors mit einer Phasenverschiebung. Daraus folgt, dass der resultierende elektrische Feldvektor sich auf einer elliptischen Bahn bewegt (dickere schwarze Linie in Abbildung 3.12).

Das Grundprinzip der spektroskopischen Ellipsometrie funktioniert wie folgt: Linear polarisiertes Licht fällt unter einem Winkel α auf die Probe. Dort wird es reflektiert und ist dann in der Regel elliptisch polarisiert. Der Grund dafür ist, dass die senkrechte Komponente (gemessen zur Einfallsebene), E_s , des elektrischen Feldes und die parallele Komponente (gemessen zur Einfallsebene), E_p , des elektrischen Feldes verschieden

stark in ihren Amplituden gedämpft werden und unterschiedliche Phasenverschiebungen erfahren. Es entsteht eine Phasendifferenz Δ und somit in der Regel elliptisch polarisiertes Licht.

Trifft nun ein Lichtstrahl unter einem Winkel $0 < \alpha < 90^\circ$ auf die Grenzfläche zweier Medien (siehe Abbildung 3.13), z.B. Luft/Glas, so wird dabei sowohl der reflektierte, als auch der gebrochene Strahl teilpolarisiert. Zur genaueren Betrachtung des Effekts ist es zweckmäßig, den E-Vektor der einfallenden Welle in zwei Komponenten, senkrecht und parallel zur Einfallsebene, zu zerlegen. Beim Auftreffen auf die Grenzfläche wird dabei die senkrecht zu Einfallsebene stehende Komponente bevorzugt reflektiert, die parallele Komponente bevorzugt in das optisch dichtere Medium hinein gebrochen. Daraus ergibt sich, dass sowohl der reflektierte als auch der gebrochene Strahl teilpolarisiert ist. Unter dem sog. Brewster-Winkel erfolgt die völlige Abtrennung der parallelen Komponente, d.h. es wird linear polarisiertes Licht reflektiert.



E ... einfallender Strahl
R ... reflektierter Strahl
T ... transmittierter Strahl

**n_1, n_2 ... Brechungs-
indizes der Medien
1 und 2**

**α Einfallswinkel
 α' Ausfallswinkel
 β Brewster-Winkel**

Abb. 3.13: Unter dem Brewster-Winkel einfallender Strahl

Die Beziehungen zwischen den einzelnen Komponenten ergeben sich aus den Fresnel'schen Reflexionsformeln, wobei E, R und T die Felder und nicht die Intensitäten bezeichnen /85/:

$$\begin{aligned} \frac{R_p}{E_p} &= \frac{\tan(\alpha - \beta)}{\tan(\alpha + \beta)} & \frac{T_p}{E_p} &= \frac{2\sin\beta \cos\alpha}{\sin(\alpha + \beta)\cos(\alpha - \beta)} \\ \frac{R_s}{E_s} &= \frac{\sin(\alpha - \beta)}{\sin(\alpha + \beta)} & \frac{T_s}{E_s} &= \frac{2\sin\beta \cos\alpha}{\sin(\alpha + \beta)} \end{aligned} \quad \text{Gl. 3.19}$$

Der Winkel β wird auch als Brewster-Winkel bezeichnet und ergibt sich aus der Beziehung:

$$\beta = \arctan\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad \text{Gl. 3.20}$$

Die reflektierten Bruchteile der einfallenden Intensität parallel und senkrecht zur Einfallsebene bezeichnet man als Reflexionskoeffizienten r_p und r_s /85/:

$$r_p = \left(\frac{R_p}{E_p}\right)^2 = \frac{\tan^2(\alpha - \beta)}{\tan^2(\alpha + \beta)} \quad r_s = \left(\frac{R_s}{E_s}\right)^2 = \frac{\sin^2(\alpha - \beta)}{\sin^2(\alpha + \beta)} \quad \text{Gl. 3.21}$$

Für den Fall, dass die oberste Schicht transparent ist, findet an der Grenzfläche Schicht/Substrat erneut Reflexion und eventuell auch Brechung statt.

Gemessen wird bei der Ellipsometrie schließlich der Parameter Ψ , der das Amplituden-Verhältnis der p- und s-Komponente des reflektierten Strahls repräsentiert, sowie die zugehörige Phasenverschiebung Δ , die sich aus dem Verhältnis der Fresnel-Koeffizienten ergeben /86/:

$$\zeta = \frac{R_p}{R_s} = \tan(\Psi)e^{i\Delta} \quad \text{Gl. 3.22}$$

Der Zusammenhang von den Phasenverhältnis ζ (R_p/R_s) zum Einfallswinkel α ergibt sich über den Brechungsindex n und der dielektrische Funktion $\varepsilon = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2$ mit $\varepsilon = n^2$ mit folgender Beziehung:

$$\langle \varepsilon \rangle = \sin^2(\alpha) \left[1 + \tan^2(\alpha) \left(\frac{1-\zeta}{1+\zeta} \right) \right] \quad \text{Gl. 3.23}$$

Der gebrochene Lichtstrahl erfährt beim Durchdringen des Films eine Phasenveränderung, die als Phasentiefe Φ bezeichnet wird:

$$\Phi = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) n \cos \beta, \quad \text{Gl. 3.24}$$

wobei d die Schichtdicke des Filmes, n in diesem Fall der Brechungsindex des Filmes und λ die Wellenlänge des Lichtes sind.

Häufiger als der Brechungsindex ist die Schichtdicke eines dünnen Filmes von Hauptinteresse. Um diese zu ermitteln, muss jedoch eine Annahme für den Brechungsindex gemacht werden. Für transparente Filme, die kein Licht absorbieren, liefert die Cauchy-Funktion eine gute Näherung /87/:

$$n(\lambda) = n_0 + \frac{A}{\lambda^2} + \frac{B}{\lambda^4}, \quad \text{Gl. 3.25}$$

wobei n_0 der Brechungsindex für den Grenzfall großer Wellenlängen sowie A und B die Cauchy-Koeffizienten sind. Wird die Ellipsometrie unter Flüssigkeit betrieben, so muss auch der Brechungsindex des Mediums bekannt sein. In dieser Arbeit war die Schichtdickenbestimmung unter Wasser eine Fragestellung. Um den Brechungsindex möglichst genau exakt wiederzugeben, wurden Literaturangaben über den Brechungsindex von Wasser /88, 89/ in 2 Kelvin-Schritten linear interpoliert und diese Daten mit der Cauchy-Funktion angepasst. Tabelle 3.1 beinhaltet diese Werte. Der Koeffizient B wurde nicht berücksichtigt, da die Werte nach der Division durch λ^4 vernachlässigt werden können.

Tab. 3.1: Cauchy-Parameter n_0 und A für Wasser zwischen 0 und 50 °C

Temperatur [°C]	n_0	A [nm ²]
0	1,32392	331090,42731
2	1,32389	330768,18311
4	1,32385	330626,24118
6	1,32381	330484,29926
8	1,32378	330162,05506
10	1,32374	330020,11313
12	1,32361	329718,07113
14	1,32347	329596,33140
16	1,32334	329294,28941
18	1,3232	329172,54967
20	1,32306	329050,80995
22	1,32286	328705,41040
24	1,32266	328360,01085
26	1,32246	328014,61131
28	1,32226	327669,21177
30	1,32205	327323,81223
32	1,32179	326834,16711
34	1,32153	326524,82428
36	1,32127	326035,17916
38	1,32101	325725,83633
40	1,32075	325236,19121
42	1,32049	324771,21250
44	1,32019	324306,23378
46	1,31988	324021,55733
48	1,31958	323556,57862
50	1,31928	323091,59990

3.9 Reflektometrie (XR, NR)

Die Reflektometrie ist eine sehr leistungsstarke Methode, um die physikalischen Eigenschaften von Grenzflächen zu charakterisieren. Im Wesentlichen dient sie der Bestimmung der Schichtdicke, der Rauigkeit sowie der Brechungsindizes dünner Filme. Brechungsindizes werden bei der Reflektometrie zur Charakterisierung der Materie herangezogen, da aufgrund des viel kleineren Einstreuwinkels im Vergleich zur Diffraktometrie keine atomare Auflösung besteht. Die Reflektivitätsmessung kann sowohl Röntgenstrahlung als auch Neutronenstrahlung als Strahlungsquelle verwenden. Hauptunter-

schied bei dem Einsatz dieser beiden Strahlungsarten ist die physikalische Bedeutung des Brechungsindex n

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad \text{Gl. 3.26,}$$

wobei δ die Dispersion und β der Absorptionskoeffizient sind. Bei Verwendung von Röntgenstrahlung ergibt sich für δ :

$$\delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} r_e \rho_e \quad \text{Gl. 3.27}$$

und für β :

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \mu_x \quad \text{Gl. 3.28}$$

wobei λ die Wellenlänge, r_e der klassische Elektronenradius ($2,818 \cdot 10^{-15}$ m), ρ_e die Elektronendichte des Materials sowie μ_x die Absorptionslänge ist. Die Werte für β sind deutlich geringer als die für δ , so dass dieser Term bei Berechnungen häufig vernachlässigt wird. Da Röntgenstrahlung mit der Elektronenhülle eines Atoms in Wechselwirkung tritt, wird der Kontrast im Film durch die Anzahl der Elektronen im Atom bestimmt. Somit nimmt mit steigender Ordnungszahl der Röntgenkontrast zu.

Insofern $\delta > 0$ ist, ergibt sich ein Brechungsindex von $n < 1$. Daraus resultiert das Phänomen der externen Totalreflexion für Einfallswinkel $\alpha < \alpha_c$. α_c wird als kritischer Winkel der Totalreflexion bezeichnet und ergibt sich aus:

$$\alpha_c = \sqrt{2\delta} \quad \text{Gl. 3.29}$$

Für Neutronenstrahlung gelten für δ und β abweichende Gleichungen:

$$\delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} b\rho_N \quad \text{Gl. 3.30}$$

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \mu_N,$$

Gl. 3.31

wobei ρ_N die Streulängendichte des Materials und μ_N die Absorptionslänge ist. Die Größenordnungen von δ und β sind in etwa die gleichen für Röntgen- und Neutronenstrahlung. Da die Werte für die Streulänge b für Neutronen nicht periodisch über den Gesamtbereich des Periodensystems variieren, ergeben sich Kontrastunterschiede für Röntgen- und Neutronenstreuung. Während für Röntgenstrahlung der Kontrast aus der Elektronenhülle rührt, bestehen Kontrastunterschiede für die Neutronenstreuung zwischen unterschiedlichen Isotopen. Bekanntestes Beispiel dafür ist der große Streulängenunterschied zwischen Wasserstoff (-3,74 fm) und Deuterium (6,67 fm). Da Polymere und biologische Moleküle einen hohen Anteil an Wasserstoff besitzen, kann für diese Moleküle mittels Isotopenaustausch der Kontrast variiert und angepasst werden.

Die Reflektivität selbst unterscheidet sich je nach experimenteller Situation. Zunächst soll die spekulare Reflektivität, d. h. dass Einfallswinkel α_i und Ausfallswinkel α_f gleich sind, betrachtet werden. In diesem Fall steht der Streuvektor $\vec{q}_z = \vec{k}_i - \vec{k}_f$ senkrecht zur Oberfläche auf und ist parallel zur z-Achse des Koordinatensystems. Abbildung 3.14 zeigt die Streugeometrie für den spekularen Fall. Für eine fest vorgegebene Wellenlänge λ kann der Streuvektor q_z wie folgt definiert werden:

$$q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\alpha_i$$

Gl. 3.32

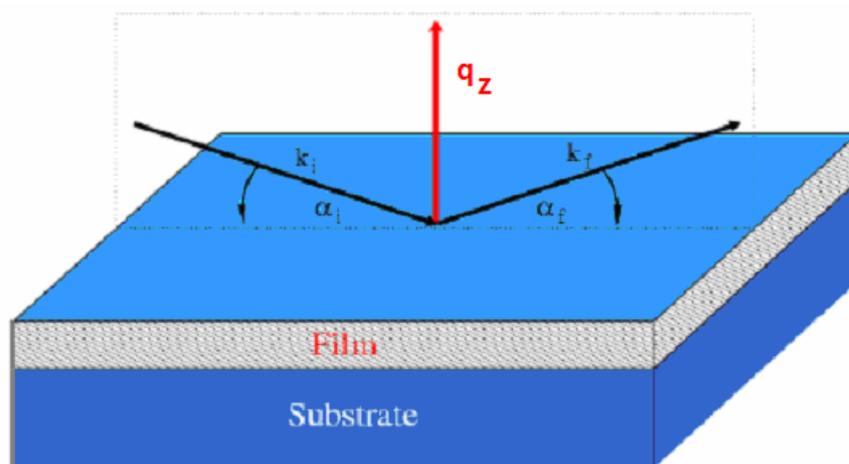


Abb. 3.14: Streugeometrie für die spekulare Reflektivität, Abbildung /90/ entnommen.

Der Reflexionskoeffizient einer idealen, glatten Oberfläche wurde als erstes von Fresnel beschrieben /91/:

$$r = \frac{k_i - k_t}{k_i + k_t}, \quad \text{Gl. 3.33}$$

wobei k_i und k_t die z-Komponenten der Wellenvektoren des einfallenden und des transmittierten Strahles sind. Die Intensität des reflektierten Strahles ergibt sich dann als $R = |r|^2$. Die Oberflächenrauhigkeit einer Schicht j (siehe Abbildung 3.16) wird durch folgende Gleichung berücksichtigt:

$$r_{j,j+1}^{\text{rough}} = r_{j,j+1}^{\text{ideal}} e^{-2k_{z,j}k_{z,j+1}\sigma_j^2}, \quad \text{Gl. 3.34}$$

wobei hier mit $k_{z,j}$ die z-Komponente des einfallenden Wellenvektors in der j-ten Schicht ist. Anhand von Gleichung 3.34 lässt somit die Rauigkeit σ von einfachen Substraten bestimmen. Abbildung 3.14 zeigt eine Simulation für die Neutronenreflektivität einer Silizium/D₂O Grenzfläche mit verschiedenen Rauigkeiten.

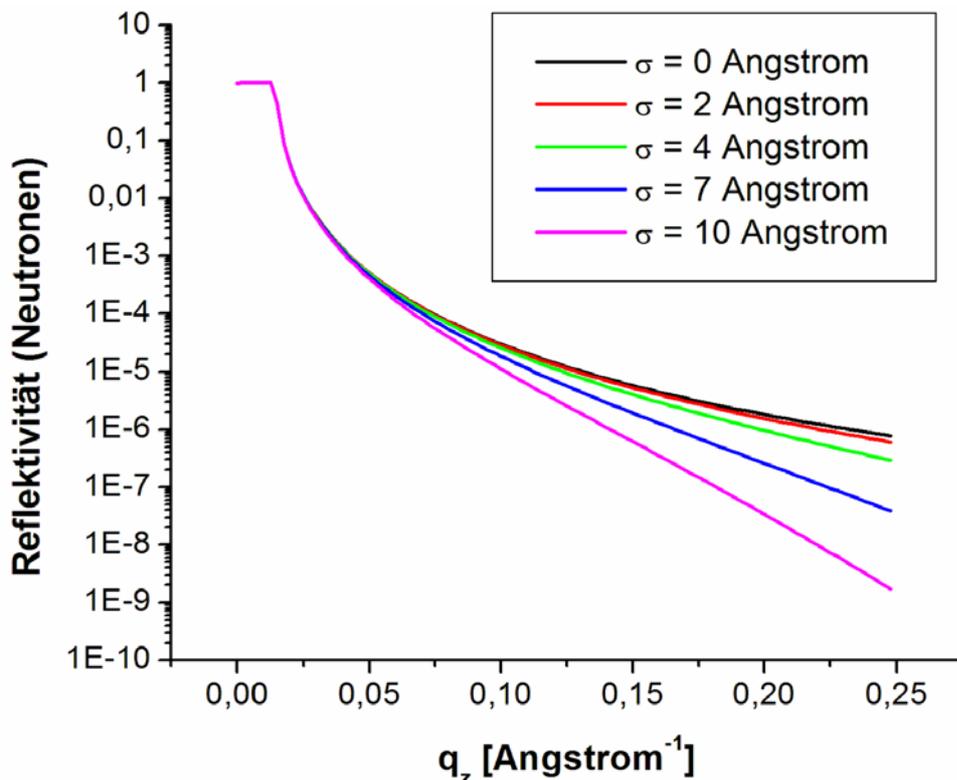


Abb. 3.15: Simulierte Neutronenreflektivitätskurven der Grenzfläche Silizium/D₂O für unterschiedliche Rauigkeiten.

Interessanter als die Rauigkeitsbestimmung von Substraten ist jedoch die Charakterisierung dünner Filme. Befindet sich ein solcher auf dem Substrat, so wird der Strahl sowohl am Film als auch am Substrat reflektiert. Dies führt zu Interferenzmustern in den Reflektivitätskurven, die auch als Kiessig-Oszillationen oder Kiessig-Ringe bezeichnet werden. Abbildung 3.16 zeigt die Reflexion an einer Multischicht.

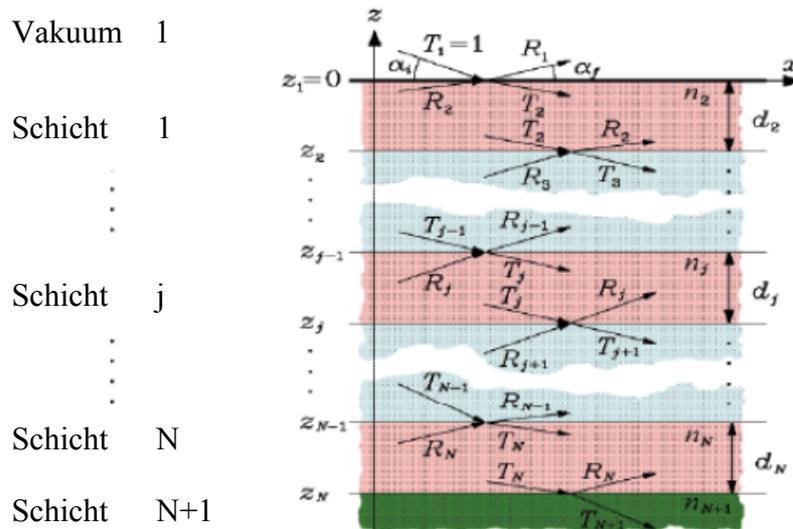


Abb. 3.16: Reflexion eines Neutronen- oder Röntgenstrahls an mehreren Grenzflächen, Abbildung /92/ entnommen.

Eine mathematische Beschreibung für die Reflexion an mehreren Grenzflächen führte 1954 Parrat mit folgender Rekursionsgleichung an, die die an der Grenzfläche zwischen den Schichten j und j+1 reflektierte (R_j) und transmittierte Amplitude (T_j) ins Verhältnis setzt /93/:

$$X_j = \frac{R_j}{T_j} = e^{-2ik_z} \frac{r_{j,j+1} + X_{j+1} e^{-2ik_z}}{1 + r_{j,j+1} + X_{j+1} e^{-2ik_z}} \quad \text{Gl. 3.35}$$

mit

$$r_{j,j+1} = \frac{k_{z,j} - k_{z,j+1}}{k_{z,j} + k_{z,j+1}} \quad \text{Gl. 3.36}$$

Abbildung 3.17 zeigt ein Beispiel für die Reflektivitätskurve eines Polymerfilmes.

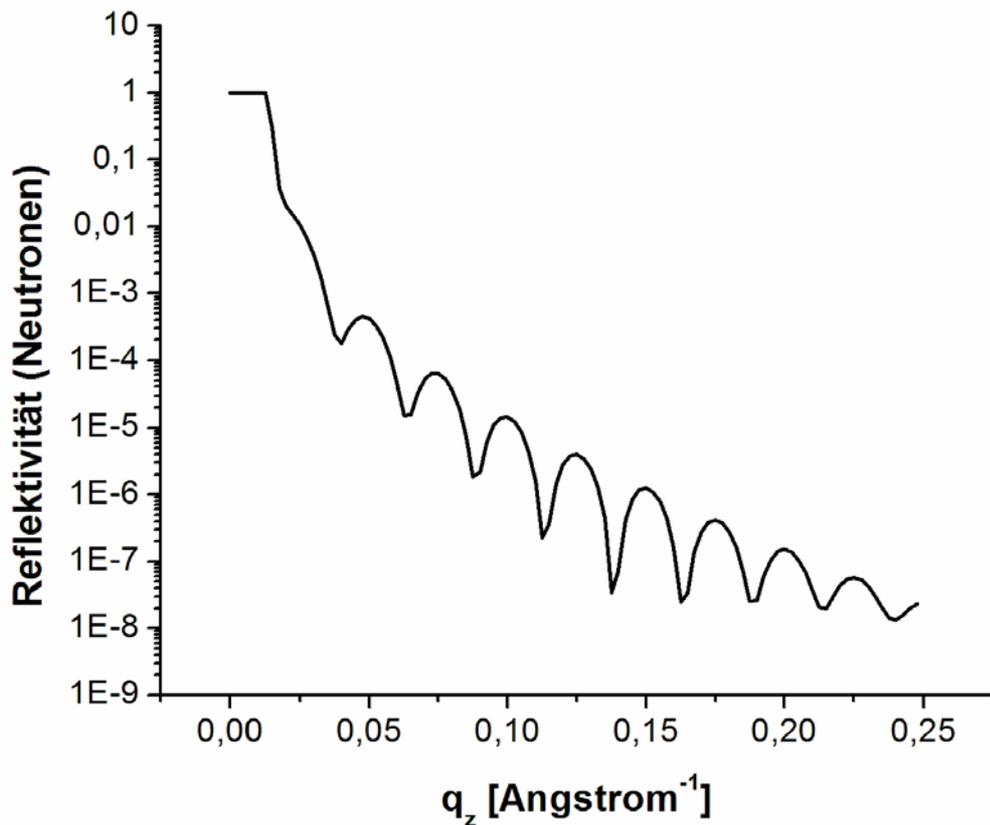


Abb. 3.17: Simulierte Neutronenreflektivitätskurve für einen 25 nm dicken Film mit einer Streulängendichte von $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ mit 1 nm Rauigkeit gegen schweres Wasser. Deutlich zu sehen sind die Interferenzmuster (Kiessig-Ringe).

Wie Abbildung 3.15 zeigt, nimmt die Intensität des spekulär reflektierten Strahls mit steigender Rauigkeit ab. Die fehlende Intensität wird in den nicht-spekulären Bereich gestreut. Während die spekuläre Reflektivität das Streulängendichteprofil senkrecht zur Oberfläche wiedergibt, entsteht die off-spekuläre Streuung vor allem durch Streulängendichteprofile parallel zur Oberfläche und durch Rauigkeit. Die off-spekuläre Streuung wird auch als diffuse Streuung bezeichnet. Abbildung 3.18 veranschaulicht das Phänomen.

Um aus der spekulären Reflektivität quantitative Aussagen machen zu können, wird ein Grenzflächenmodell mit parallelen Schichten entwickelt. Für jede dieser Schichten, die als Box in das Modell eingehen, müssen zunächst Annahmen für die Schichtdicke, die Streulängendichte und die Rauigkeit gemacht werden. Diese werden in einer iterativen Fit-Prozedur immer weiter verfeinert, bis eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen der berechneten und der gemessenen Reflektivitätskurve besteht. Der Unterschied

zwischen beiden Kurven wird mittels des χ^2 -Wertes nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate minimiert. Als Fitsoftware für die Datenauswertung für diese Arbeit kam das Programm Parratt 32, Version 1.5 /94/, welche den Parrat-Algorithmus /93/ als Grundlage hat, zum Einsatz.

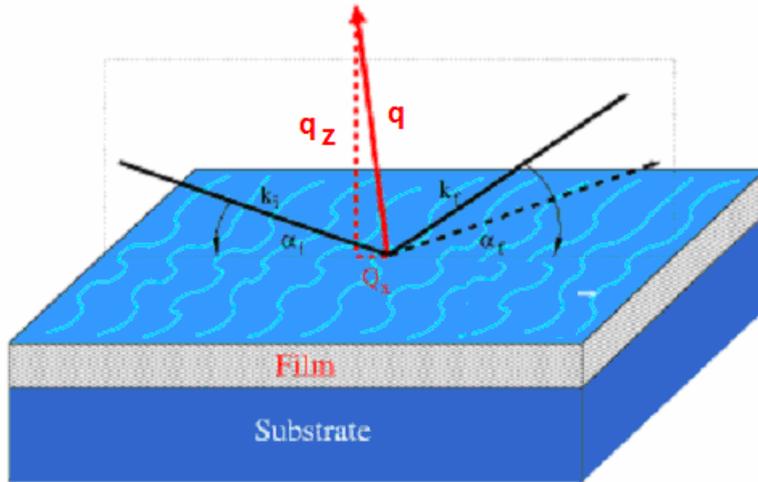


Abb. 3.18: Streugeometrie für die off-spekulare Reflektivität, Abbildung /90/ entnommen.

Durch den Parrat-Rekursionsalgorithmus (Gleichung 3.35) lassen sich die Amplituden an den einzelnen Grenzflächen eines Vielschichtsystems mit n Grenzflächen sowie die von dem Gesamtsystem reflektierte Intensität I_0 berechnen. Startpunkt der Rekursion ist die $n + 1$ -te Grenzfläche, d. h. die Rückseite des Substrats. Es gilt: $X_{n+1} = 0$, da der zuvor transmittierte Strahl T_n vollständig im Substrat absorbiert wird und damit $R_{n+1} = 0$ wird, d. h. von der Rückseite des Substrats wird keine Strahlung reflektiert. Diese Annahme ist für die verwendeten Substrate zulässig, da bei streifendem Einfall bereits ab 500 nm eine vollständige Absorption stattfindet /95/.

Durch Variation der Streulängendichte ρ und der Schichtdicke d jeder Schicht sowie der Rauigkeit kann das so berechnete Profil an das gemessene Profil angepasst werden. Die erste und letzte Schicht der Grenzfläche haben eine unbegrenzte Dicke, aber bei bekannten Materialeigenschaften eine feste Streulängendichte. Obwohl ein berechnetes Profil nicht eine einzige Lösung darstellt, kann durch Kontrastvariation zusammen mit physikalischen und chemischen Randbedingungen weitgehend sichergestellt werden, dass ein eindeutiges unzweifelhaftes Modell der Grenzfläche erhalten wird. Bei der Kontrastvariation durch H_2O/D_2O -Austausch werden von demselben System unter-

schiedliche Reflektivitätskurven aufgenommen, die letztendlich zum selben Strukturprofil führen müssen.

Während des Fits erfolgt die Optimierung zwischen experimentell ermittelter und berechneter Kurve über die Minimierung der χ^2 -Abweichung. Zunächst wird im ersten Schritt die Abweichung zwischen beiden Kurven für jeden gemessenen ($R_{\text{exp}}(q_m)$) und theoretischen Datenpunkt ($R_{\text{th}}(q_m)$) ermittelt. Anschließend gibt es zwei Möglichkeiten, die χ^2 -Abweichung zu berechnen. Eine wird mit $1/y$ und die andere mit „use given errors“ bezeichnet. Im ersten Fall ($1/y$) wird die quadratische Abweichung zwischen $R_{\text{exp}}(q_m)$ und $R_{\text{th}}(q_m)$, durch $R_{\text{exp}}(q_m)$ dividiert und über alle Datenpunkte aufsummiert /96/. Daraus ergibt sich folgende Gleichung:

$$\chi^2 = \sum_m \left[\frac{|R_{\text{exp}}(q_m) - R_{\text{th}}(q_m)|}{R_{\text{exp}}(q_m)} \right]^2 \quad \text{Gl. 3.37}$$

Im zweiten Fall („use given errors“) wird zur Quotientenbildung statt des Messwertes $R_{\text{exp}}(q_m)$ dessen Fehler $\Delta \{R_{\text{exp}}(q_m)\}$ im Nenner eingesetzt /96/. Somit ergibt sich für diese Methode die χ^2 -Abweichung wie folgt:

$$\chi^2 = \sum_m \left[\frac{|R_{\text{exp}}(q_m) - R_{\text{th}}(q_m)|}{\Delta \{R_{\text{exp}}(q_m)\}} \right]^2 \quad \text{Gl. 3.38}$$

Die beiden beschriebenen Vorgehensweisen haben eine unterschiedliche Gewichtung der verschiedenen Abschnitte beim Anpassen der Reflektivitätskurve zur Folge. Bei der Gewichtung auf den Fehler wird durch den Fehler selbst dividiert, der in erster Näherung von der Quadratwurzel der Zahl der detektierten Neutronen \sqrt{n} abhängt. $\Delta \{R_{\text{exp}}(q_m)\}$ ist daher relativ klein zu für kleine q_z -Werte (linke Hälfte der Kurve) verglichen zum Fehler bei niedrigen Zählraten bei höherem q (rechte Hälfte der Kurve). Dadurch haben schon geringe Abweichungen im oberen Bereich der Kurve dramatischen Einfluss auf dem gesamten χ^2 -Wert, d. h. dass das Fitprogramm im Zuge der χ^2 -Optimierung den oberen Teil bei niedrigen q viel stärker gewichtet /96/.

Bei der Gewichtung auf $1/y$ wird durch den Messwert selbst geteilt. Dieser hängt in der Hauptsache von der Zahl der detektierten Neutronen n ab, die mit größer werdenden q_z deutlich abfällt. Dies führt zu einer konträren Situation im Vergleich zur Fehlergewichtung: Abweichungen im rechten Teil der Kurve erhöhen den Gesamt- χ^2 -Wert vergleichsweise stärker. Das Programm konzentriert sich beim Anfitten auf den Bereich kleiner Reflektivitätswerte bei großem q_z /96/. Nach Abschluss des Fittens kann die Qualität zweier Strukturmodelle zum Beschreiben der Grenzflächen durch den Vergleich ihrer χ^2 -Abweichungen eingeschätzt werden.

4. Präparationen und Methodenentwicklung

4.1 Präparation von Lipidvesikeln

Für die Präparation der Lipiddoppelschichten auf Polyelektrolytfilmen werden Lipidliposomen aus wässriger Lösung adsorbiert. Diese sollen im Anschluss daran an der Grenzfläche aufplatzen und dann die Doppelschichten bilden. Da der erste Schritt somit die Herstellung von kleinen, unilamellaren Vesikeln ist, soll diese hier beschrieben werden. Die Präparation wird wie folgt durchgeführt:

- Das Lipid wird in Chloroform mit einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst.
- Das Chloroform wird mit Inertgas abgedampft, so dass an der Glaswand ein dünner, transparenter Lipidfilm zurückbleibt.
- Der Lipidfilm wird zwei Stunden im Vakuum getrocknet, um Chloroformreste aus dem Lipidfilm zu verdampfen.
- Der getrocknete Lipidfilm wird in Wasser aufgenommen, so dass sich erneut eine Konzentration von 5 mg/ml bildet.
- Mittels eines Vortexers wird sämtliches Lipid von der Glaswand abgelöst. Es bildet sich dabei eine milchig-trübe Lösung aus multilamellaren Vesikeln.
- Die Lösung wird so lange in einem Ultraschallbad beschallt, bis die Farbe von milchig-trüb nach transparent umschlägt. Dabei sollte ein leichter, blauer Schimmer aus gestreutem Licht zu sehen sein.
- Optional kann die Lösung danach durch einen Extruder gepresst werden. Der Sinn des Einsatzes eines Extruders soll im Folgenden diskutiert werden.

- Abschließend wird die fertige Vesikellösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt (0,5 mg/ml für Grenzflächenexperimente, 20 mg/ml für Kalorimetrie, variabel für Ultrazentrifugation). Puffersubstanzen (HEPES Puffer, pH 7,4 für Kalorimetrie, Dynamische Lichtstreuung und Ultrazentrifugation) und Salze (0,15 mol/l NaCl für alle Experimente und teilweise 0,002 mol/l CaCl₂ für Grenzflächenexperimente) werden der Verdünnungslösung zugesetzt.
- Werden gemischte Vesikel aus zwei verschiedenen Lipiden hergestellt, so erfolgt das Mischen bereits im ersten Schritt.
- Die fertige Lipidlösung wird oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur gelagert, um ein Fusionieren zurück zu multilamellaren Vesikeln zu verhindern.

Der Einsatz des Extruders erfordert zusätzlichen Aufwand. Als Vorteil hat man anschließend eine garantierte Vesikelgröße. Den Extruder können zunächst nur Vesikel, die kleiner als die Porengröße der Membran sind, die Membran passieren. Größere Vesikel werden an den Poren geschert, reißen auf und organisieren sich neu. Um den Nutzen eines Extruders gegenüber der reinen Beschallung zu prüfen, wurde die Größe beschallter und extrudierter Vesikel mittels DLS gemessen. Zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten D_{Diff} wurde die Relaxationsrate Γ gegen q^2 aufgetragen und Linearität geprüft (vgl. Gleichung 3.9). Abbildung 4.1 zeigt das Ergebnis für die beschallten Vesikel bei unterschiedlicher Beschallungsdauer, Abbildung 4.2 für zusätzlich nach 15-minütiger Beschallungsdauer extrudierte Vesikel.

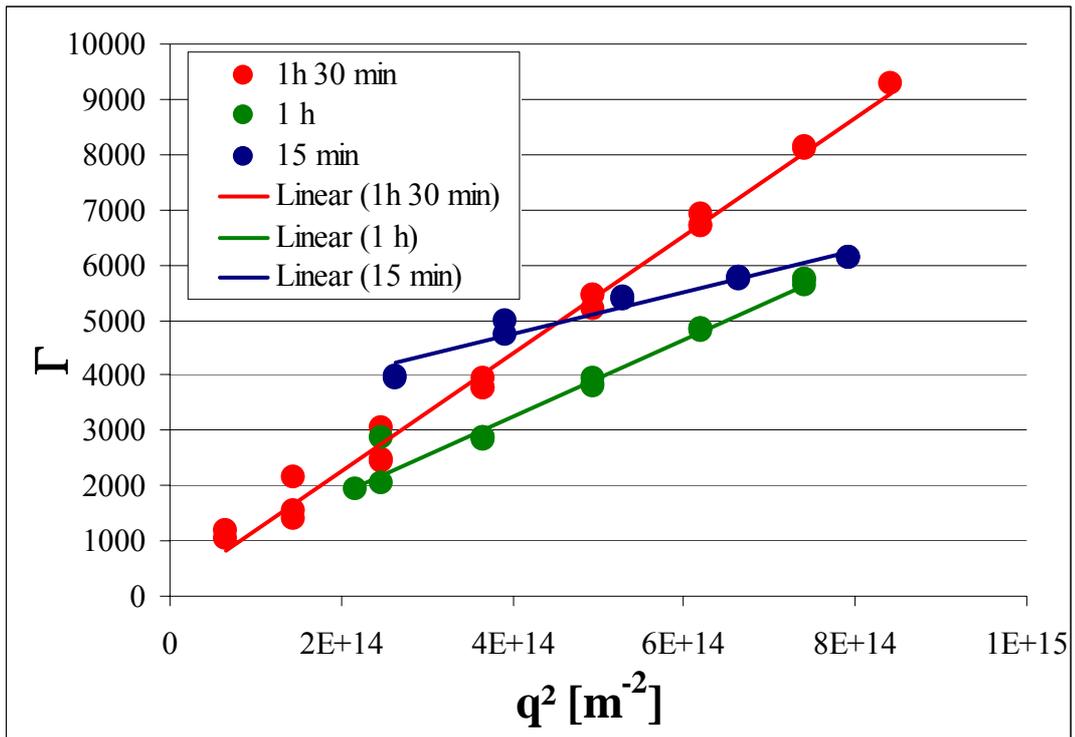


Abb. 4.1: Relaxationsrate Γ gegen q^2 - Auftragung für beschallte DMPC-Vesikel. Die Punkte stellen Messwerte und die Geraden lineare Fits dar. Die Legende gibt die jeweiligen Beschallungszeiten an

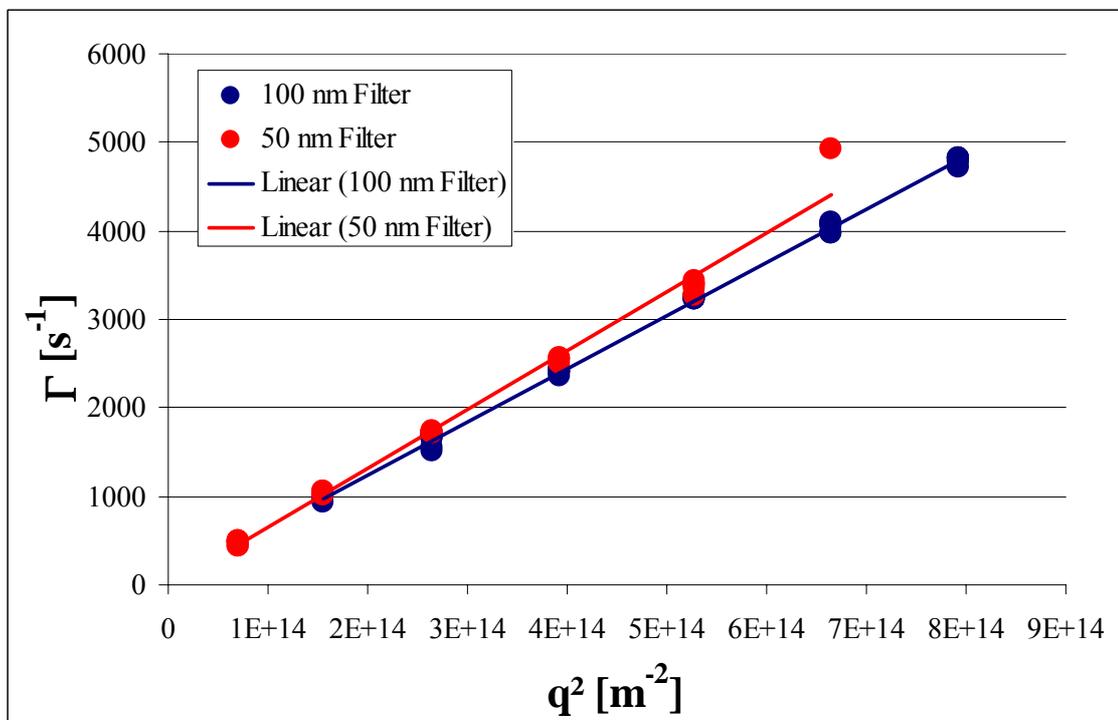


Abb. 4.2: Relaxationsrate Γ gegen q^2 - Auftragung für extrudierte DMPC-Vesikel. Die Punkte stellen Messwerte und die Geraden lineare Fits dar.

Abbildung 4.1 und 4.2 zeigen deutlich, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Relaxationsrate Γ und dem Quadrat des Streuvektor, q^2 , besteht. Somit ist es möglich, aus dem Anstieg die Diffusionsgeschwindigkeit der DMPC-Vesikel zu bestimmen und diese Werte in die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 3.10) einzusetzen, um die Vesikelgröße zu erhalten. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 4.1: Ergebnisse der DLS-Messungen

Präparation	Diffusionsrate [m/s]	Vesikeldurchmesser [nm]
Ultraschall		
15 min	3,90E-12	112
1 h	6,99E-12	61
1 h 30 min	1,07E-11	40
Extrusion		
50 nm Filter	6,72E-12	64
100 nm Filter	5,99E-12	72

Bei den beschallten Vesikeln gibt es einen eindeutigen Trend zu geringeren Teilchendurchmessern mit steigender Beschallungszeit. Bei 90 minütiger Beschallungszeit ergibt sich mit 40 nm ein schon sehr kleiner Durchmesser. Die Größe der extrudierten Vesikel hängt überraschenderweise nur geringfügig von der Wahl des Filters ab. Die Vesikel des 50 nm Filters sind deutlich größer und die des 100 nm Filters deutlich geringer als die vom Hersteller angegebene Filtergröße. Somit spielt die Wahl der Porengröße bei der Vesikelherstellung keine wesentliche Rolle. Als Ursache dafür kann vermutet werden, dass die vom Hersteller angegebenen Porengrößen von den tatsächlichen abweichen oder sich die Vesikel nach Passieren des Filters neu organisieren.

Neben der Größe der Vesikel ist auch die Größenverteilung ein wichtiger Parameter. Eine weitestgehend monodisperse Vesikelprobe sollte es einfacher haben, sich gleichmäßig über die gesamte Oberfläche zu verteilen und einen geschlossenen Lipidfilm zu bilden. Einen Anhaltspunkt für die Größenverteilung bietet die Peakbreite der Relaxationsratenverteilung. Da zwischen der Relaxationsrate und q^2 ein klar linearer Zusammenhang für die Proben nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, repräsentativ die Relaxationsratenverteilung bei einem q -Wert zu betrachten. Abbildung 4.3 und 4.4 zeigen die Ergebnisse für die beschallten Vesikel für einen Detektorwinkel von 90° .

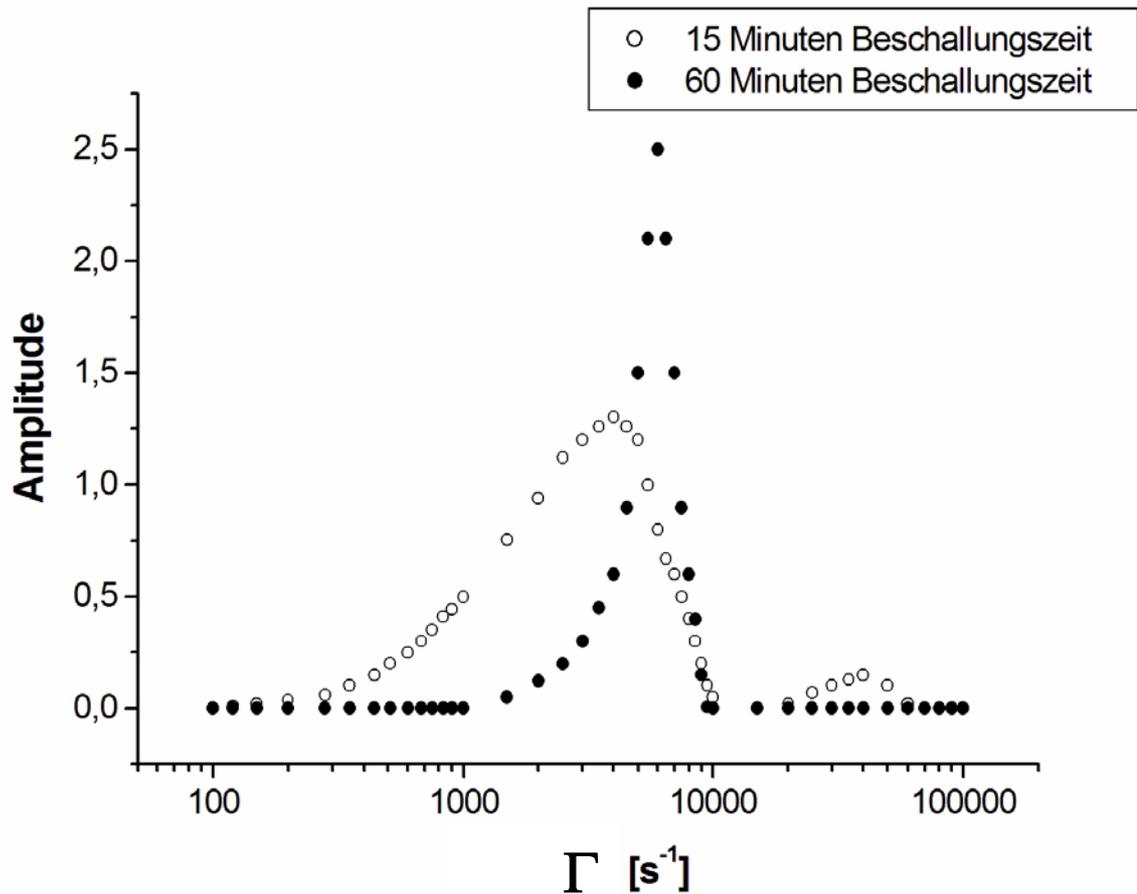


Abb. 4.3: Relaxionsratenverteilung bei 90° für 15 und 60 minütige Beschallungszeit

Abbildung 4.3 zeigt deutlich, dass die Relaxionsratenverteilung mit steigender Beschallungszeit abnimmt. Sie erstreckt sich für die 15 minütige Beschallungszeit von 10^2 bis 10^4 s⁻¹, für eine 60 minütige Beschallungszeit nur noch von 10^3 bis 10^4 s⁻¹. Somit nimmt neben der Teilchengröße auch die Polydispersität mit steigender Beschallungszeit ab. Abbildung 4.5 zeigt die Relaxionsratenverteilungen für extrudierte Vesikel.

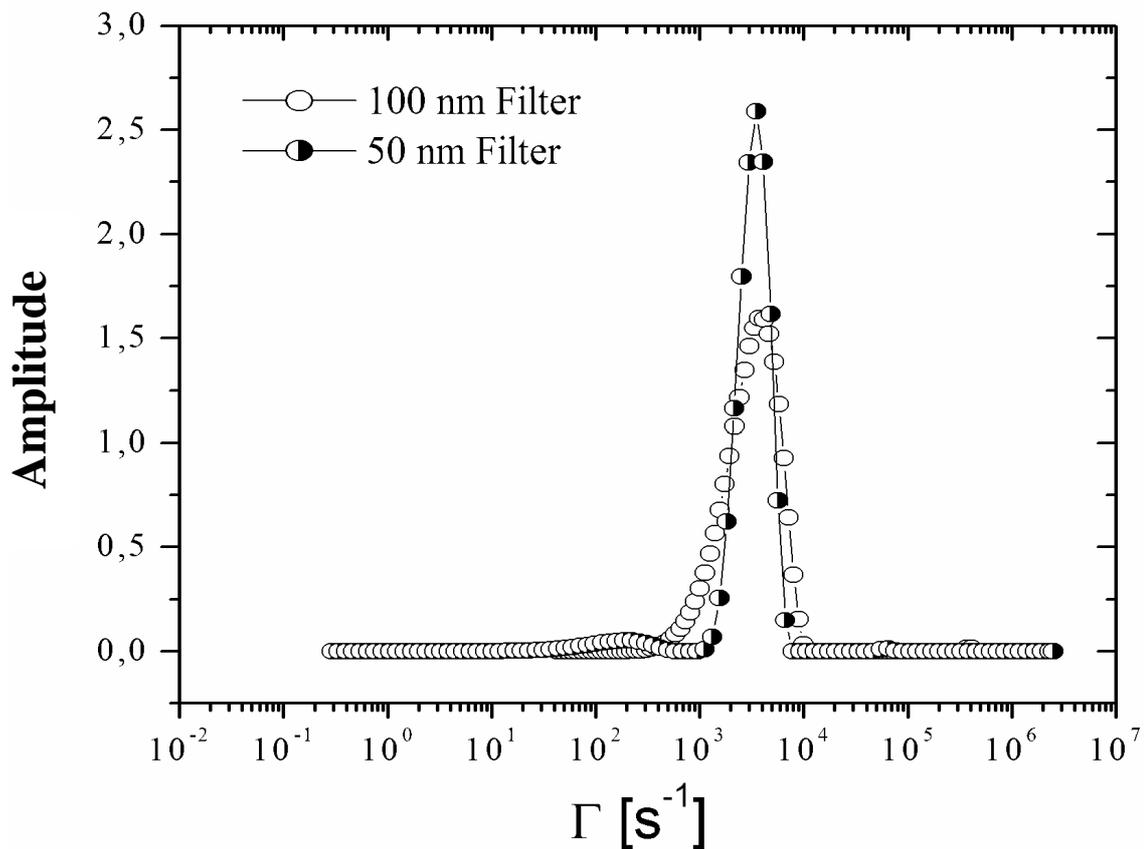


Abb. 4.5: Relaxionsratenverteilung bei 90° für extrudierte Vesikel

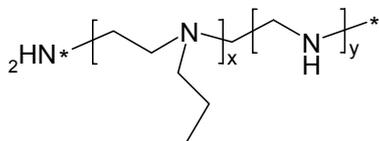
Abbildung 4.5 zeigt, dass bei beiden Filtergrößen die Relaxionsratenverteilung eng ist und die Proben wenig polydispers sind. Die Peakbreite des 50 nm Filter ist vergleichbar mit der 60 minütigen Beschallungszeit, für den 100 nm Filter ist die 60 Minuten beschallte Probe sogar etwas besser. Ein Argument für die Extrudermethode ist jedoch, dass sie wesentlich reproduzierbarer ist. Nach den DLS-Experimenten an den DMPC-Vesikeln und den Erfahrungswerten von /97/ wurde entschieden, die für diese Arbeit verwendeten Lipidvesikel mit der Extrudertechnik und einer Filtergröße von 100 nm herzustellen. Besonders die geringe Polydispersität und die Reproduzierbarkeit gaben den Ausschlag dafür. Möchte man auf den Einsatz eines Extruders verzichten, so sollte auf eine möglichst lange Beschallungszeit geachtet werden.

4. 2 Präparation von Polyelektrolytmultilagen

In Abschnitt 2.6 wurde erläutert, dass ein Polyelektrolytfilm als Modell für den Knorpel eingesetzt werden soll. Nun soll auf dessen Präparation eingegangen werden. Argumente für den Einsatz der Polyelektrolyte sind:

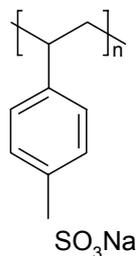
- Die Filme sind einfach zu präparieren.
- Die Filme haben einen hohen Wassergehalt (ca. 40% /98/).
- Die Ladung ermöglicht das Aufbringen von Lipiden.
- Die Filme lassen sich mit geringer Rauigkeit herstellen. Dies ist wichtig für den Einsatz in der Reflektometrie, um möglichst wenig diffuse Streuung zu erhalten.
- Durch die Präparation von Multilagen ist die Schichtdicke in einem weiten Bereich wählbar.

Polyelektrolyte sind Polymere, in denen jede Monomereinheit eine ladungstragende Gruppe besitzt. Es gibt Polyelektrolyte sowohl mit positiver als auch negativer Ladung. Diese lassen sich an Substratgrenzflächen aus wässrigen Lösungen adsorbieren. Nach der Adsorption einer Lage eines positiv geladenen Polyelektrolyten lässt sich anschließend ein negativ geladener Polyelektrolyt adsorbieren. Haupttriebkraft der Komplexbildung ist die steigende Entropie durch das Freisetzen der Gegenionen /99/. Dieser Schritt kann beliebig oft wiederholt werden und somit eine gewünschte Schichtdicke eingestellt werden. Eine Schicht aus je einer Lage positiv und negativ geladener Moleküle wird im Folgenden als Doppelschicht bezeichnet. Als Substrat für die Polyelektrolytpräparation kann sowohl einkristallines Silizium als auch eine mit Gold bedampfte Oberfläche dienen. Abbildung 4.6 zeigt die Monomereinheiten der in dieser Arbeit verwendeten Polyelektrolyte.



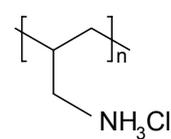
PEI

Polyethylenimin
MW = 750 000 Da



PSS

Poly (Natrium 4-Styrolsulfonat)
MW = 70 000 Da



PAH

Poly(Allylamin Hydrochlorid)
MW = 65 000 Da

Abb. 4.6: Struktur der für die Präparation verwendeten Polyelektrolyte

Im Folgenden soll schrittweise die Herstellung der Filme beschrieben werden. Dabei wurde die Präparation von /100/ übernommen. Abbildung 4.7 zeigt das Präparationsprinzip.

- Reinigung des Substrates. Die Siliziumsubstrate wurden für 30 Minuten in eine Lösung aus 50% Schwefelsäure und 50% Wasserstoffperoxidlösung (Carosche Säure, Piranha Solution) eingelegt. Bei der Präparation der Mischung ist auf die stark ätzende und oxidierende Wirkung zu achten und größtmögliche Sorgfalt anzuwenden. Goldsubstrate wurden 15 Minuten unter einer UV-Lampe gereinigt.
- Die Siliziumsubstrate müssen nach dem Ätzen intensiv gereinigt werden (3 x 15 Minuten in großem Wasservolumen).
- Das Substrat wird nun 20 Minuten in einer 10^{-2} monomol/l PEI-Lösung inkubiert (Die Einheit monomol bezieht sich auf Monomereinheiten von PEI).
- Es folgen 3 Waschschrirte a 2 Minuten in destilliertem Wasser.
- Nun kann der Aufbau der Multilagen beginnen. Die Polyelektrolyte PSS und PAH werden in einer Konzentration von 10^{-2} monomol/l und 1 mol/l NaCl gelöst. Das Salz führt zur Ausbildung einer knäuelartigen Molekülkonformation da die Ladungen abgeschirmt und somit die intramolekularen Repulsionskräfte weitgehend reduziert werden. Somit wird ein schnellerer Schichtdickenzuwachs erreicht. Nach der PEI-Beschichtung erfolgt der erste Adsorptionsschritt in einer PSS-Lösung. Das Substrat verbleibt 20 Minuten in der Lösung und wird dann 3 mal 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Nach jedem Reinigungsschritt wird das Waschwasser verworfen.
- Wie oben erwähnt, können beliebig viele Adsorptionszyklen durchgeführt werden. Für die Ellipsometrie und Reflektometrie wurden jeweils sechs Doppelschichten präpariert. Hingegen wurden für die QCM-D nur 3 Doppelschichten adsorbiert, da die Kristalle sich anschließend besser reinigen lassen und auch ein

stabileres Schwingverhalten zeigten. Die Filme können sowohl positiv (PAH) als auch negativ (PSS) terminiert hergestellt werden.

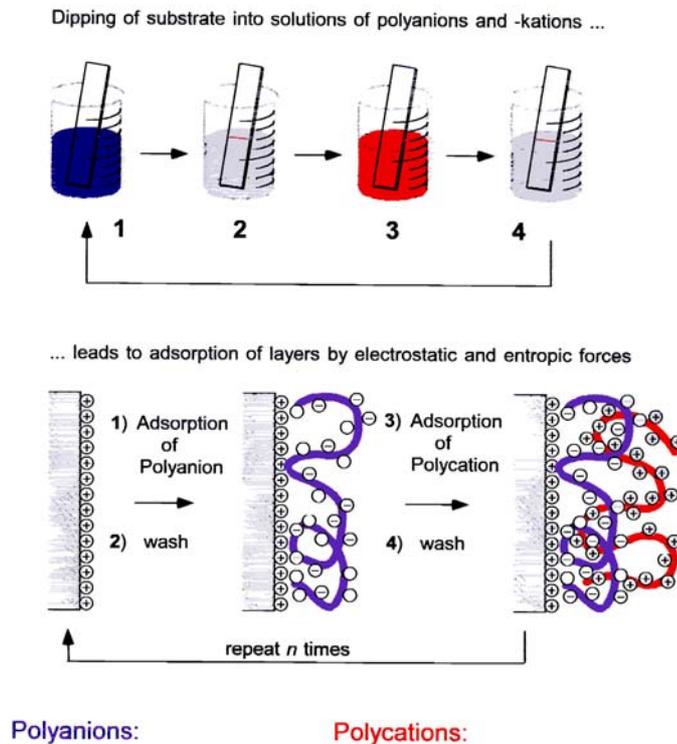


Abb. 4.7: Präparation von Polyelektrolytmultilagen. Die Probe wird jeweils 20 Minuten in die Polymerlösung getaucht und anschließend 3 mal 2 Minuten gewaschen. Nach jedem Adsorptionsschritt wechselt die Oberflächenladung. Abbildung /100/ entnommen.

Im Folgenden werden einige Daten beispielhaft für Polyelektrolytfilme gezeigt. Abbildung 4.8 zeigt eine Reflektivitätskurve mit Neutronen- und Röntgenstrahlung für einen PEI-(PSS/PAH)₆-Film. Bei der Neutronenkurve wurde der Film gegen schweres Wasser und bei der Röntgenkurve in 100 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre gemessen. Beide Kurven zeigen signifikante Kiessig-Ozillationen.

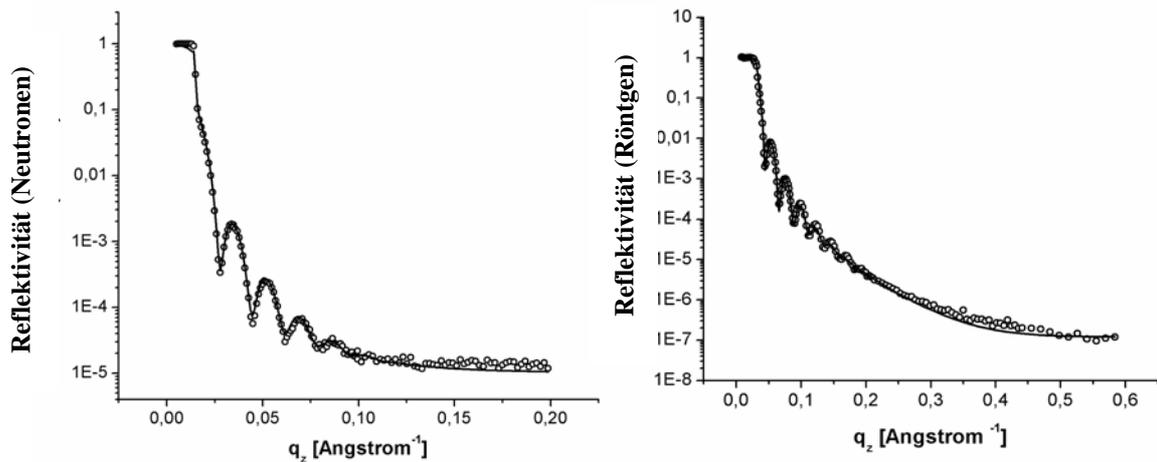


Abb. 4.8: Links: Neutronenreflektivitätskurve für einen Film PEI-(PSS/PAH)₆ gemessen gegen D₂O. Die Reflektivität kann über 5 Größenordnungen verfolgt werden. Die durchgezogene Linie zeigt den Fit (Filmdicke: 362 Å, Filmrauigkeit: 22 Å, Streulängendichte Film: $3,99 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$). Rechts: Röntgenreflektivitätskurve für einen Film PEI-(PSS/PAH)₆ gemessen gegen 100 % Luftfeuchte. Die Reflektivität kann über fast 7 Größenordnungen verfolgt werden. Die durchgezogene Linie zeigt den Fit (Filmdicke: 310 Å, Filmrauigkeit: 17 Å, Streulängendichte Film: $1,19 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-2}$). Der Unterschied in der Schichtdicke rührt aus unterschiedlich starken Quellungen der Polyelektrolytfilme in Wasser und in gesättigter Wasserdampfatmosfera (siehe Ergebnisse Abschnitt 6).

Um die Schichtdicke der Polyelektrolytfilme mittels Ellipsometrie ermitteln zu können, bestand zunächst die Aufgabe ein geeignetes Modell zu finden. Für die Polyelektrolyte war zunächst nicht klar, ob das Cauchy-Modell angewendet werden kann. Dies ist nur möglich, falls kein Licht von den Molekülen absorbiert wird. Um dies zu klären, wurden zunächst die UV/VIS-Spektren der Polyelektrolyte aufgenommen. Abbildung 4.9 zeigt die Spektren.

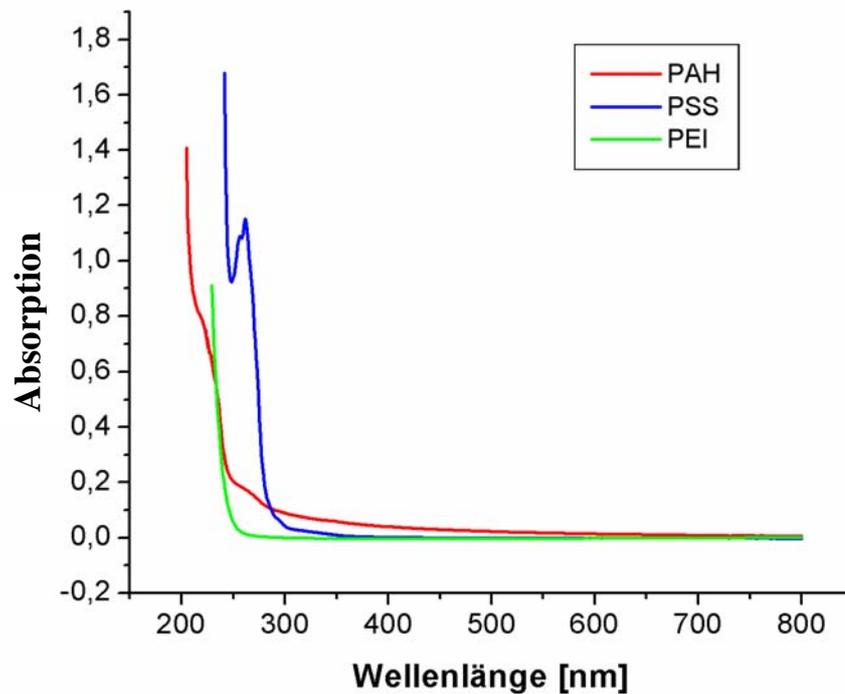


Abb. 4.9: UV/VIS-Spektren von PSS, PAH und PEI

Abbildung 4.9 zeigt, dass PSS und PAH hauptsächlich zwischen 200 und 350 nm Licht absorbieren. Das Ellipsometer verwendet Licht aber erst ab einer Wellenlänge von 420 nm. In diesem Bereich ist nur noch bei PAH eine geringe Absorption zu erkennen. Um ein gutes Modell für die optischen Konstanten zu finden, wurde ein Polyelektrolytfilm am Ellipsometer und anschließend mit Röntgenreflektometrie an Luft vermessen. Aus der Röntgenmessung konnte die Schichtdicke der Probe bestimmt werden. Bei Kenntnis der Schichtdicke ist es anschließend möglich, den Brechungsindex n und seinen Imaginärteil k anzufitten. Dieses Modell wurde dann für die Bestimmung der Schichtdicke der Polyelektrolytfilme eingesetzt. Abbildung 4.10 zeigt die optischen Konstanten eines Polyelektrolytfilmes PEI-(PSS/PAH)₆ auf einem Siliziumsubstrat.

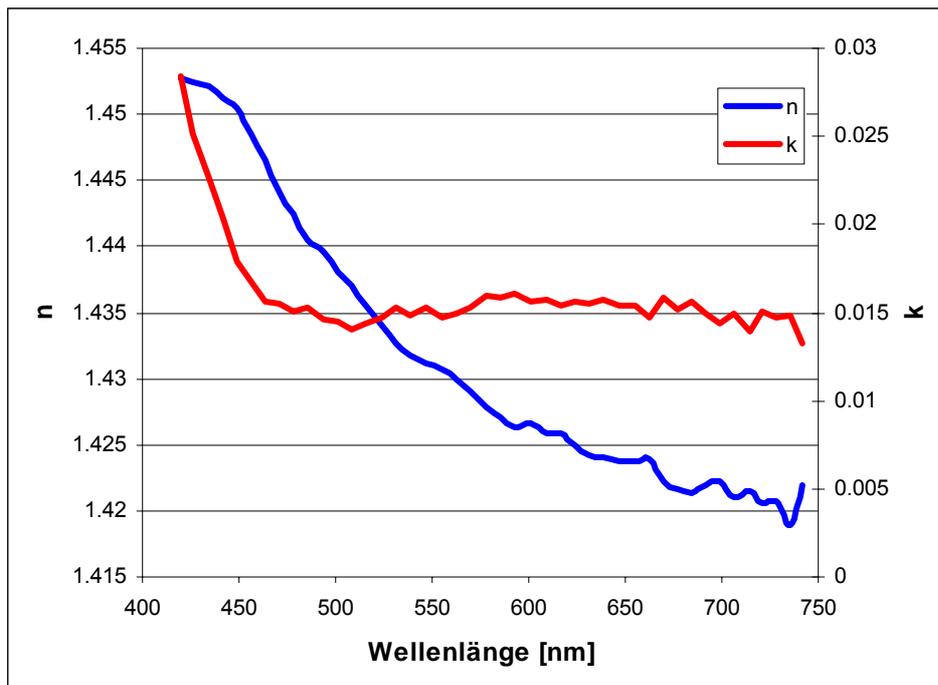


Abb. 4.10: Brechungsindex n und sein Imaginärteil k eines Filmes PEI-(PSS/PAH)₆, an Luft gemessen.

Mittels *in situ* Ellipsometrie und QCM-D wurden die Adsorptionskinetiken von PSS und PAH aufgezeichnet. Abbildung 4.11 und 4.12 zeigen die Ergebnisse. Bei den Messungen zeigte sich, dass eine der Polyelektrolytfilm zu 60% (Ellipsometrie) bzw. 67% (QCM-D) aus PSS besteht. Vergleichsmessungen mit Neutronenreflektometrie ergeben einen PSS-Anteil von 76 % /98/, wobei die Filme dabei mit 0 und 0,5 mol/l NaCl und in den eigenen Messungen mit 1 mol/l NaCl in den Polymerlösungen präpariert wurde. Obwohl die eigenen Werte geringer sind, wurde bestätigt, dass PSS den größeren Anteil an den Polyelektrolytfilmen einnimmt.

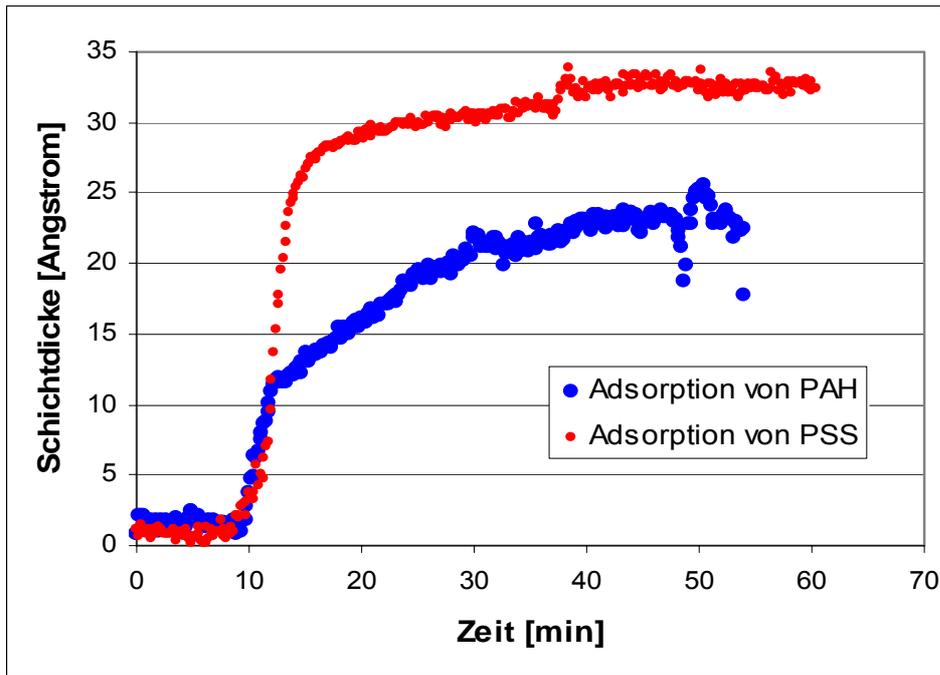


Abb. 4.11: Adsorptionskinetik von PSS und PAH in 1 M NaCl.

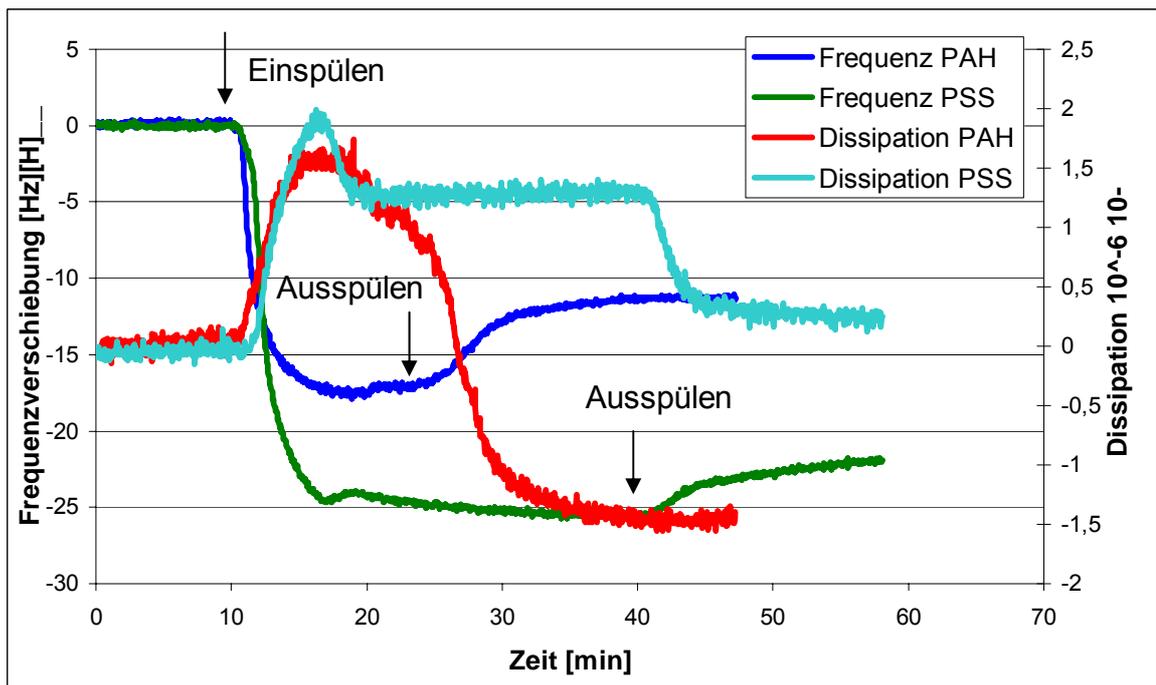


Abb. 4.12: Adsorption von der Polyelektrolyte PSS und PAH. Die Frequenzverschiebung für PSS (22 Hz) fällt stärker aus als für PAH (13 Hz). Beide Kurven haben nur eine geringe Verschiebung in der Dissipation, was auf sehr starre Filme hinweist.

Abbildung 4.11 und 4.12 zeigen, dass die Adsorption unterschiedlich lange benötigt, bis das Gleichgewicht erreicht ist. In der Ellipsometrie ist die Grenzfläche im Kontrast zu

/101/ nach 20 Minuten noch nicht mit Polyelektrolytmolekülen gesättigt, in der QCM-D hingegen schon. Der Hauptgrund für die längere Adsorptionszeit in der *in situ* Ellipsometrie ist vermutlich in der komplexen Geometrie der Zelle (vgl. Abschnitt 4.3) und dem damit verbundenen nicht optimalen Fluss der Probelösung in der Zelle zu suchen.

4.3 Temperierbare Flusszelle für Ellipsometrie

Um die Präparation der Lipidfilme für die Neutronenreflektometrie vorzubereiten, sollte deren Schichtdicke mittels Ellipsometrie bestimmt werden. Da Lipidfilme nur unter Flüssigkeit stabil sind, ist dafür eine Flüssigkeitszelle notwendig. Eine weitere Forderung ist die Temperierbarkeit, da die Liposomen nur oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur aufplatzen.

Das Design orientiert sich im Wesentlichen an zwei Forderungen: Erstens muss die Zelle möglichst homogen temperierbar sein und zweitens muss der Lichtstrahl möglichst parallel zur Oberflächennormalen des Fensters in die Zelle ein- und auch wieder austreten, um eine durch die Flüssigkeitsprobe verursachte Verschiebung in der Polarisation des Lichtes zu vermeiden. Zusätzlich sollte die Zelle ein möglichst kleines Probenvolumen besitzen, um kosteneffizient mit den Molekülen umgehen zu können. Weiterhin sollte die Zelle im Durchflussbetrieb eingesetzt werden, um die Lipidvesikel ein- und wieder ausspülen zu können. Abbildung 4.13 zeigt die neuentwickelte Probenumgebung.

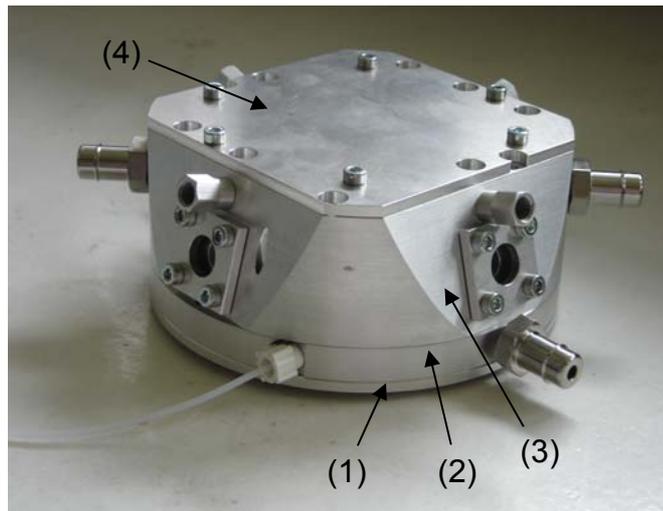


Abb.4.13: Flüssigzelle für Ellipsometer. Die Zelle besteht im Wesentlichen aus 4 Teilen: (1) einer Bodenplatte, die an den Probentisch des Ellipsometers angeschraubt wird und (2) einem temperierbaren Probenraum. Bauteil (3) ist ein auf (2) fixierter weiterer Probenraum. In diesem fließt die Flüssigkeitsprobe im 15° Winkel nach oben, bis sie die Fenster erreicht. Oberhalb der Eintrittsfenster befindet sich der Abfluss. Den Abschluss bildet eine weitere Aluminiumplatte (4).

Um diesen vielen Forderungen gerecht zu werden, entstand ein komplexer Aufbau aus 4 Teilen. Die Bodenplatte dient der Befestigung der Zelle am Probentisch des Instrumentes und weiterhin als Abschluss des unteren Temperierraumes. Das erste Zwischenteil besitzt an der Unterseite einen Hohlraum, der vom Temperierwasser durchflossen wird. An der Oberseite befindet sich der Probenraum. Seitlich befindet sich an diesem Teil ein Einlass für die Probenlösung. Diese wird erst 270° um den Proberaum herum geführt und erst dann erreicht die Lösung den Probenraum. Der Zweck dieser Maßnahme ist eine möglichst gute Vortemperierung der Probenlösung. Abbildung 4.14 zeigt eine Skizze des Bauteiles.

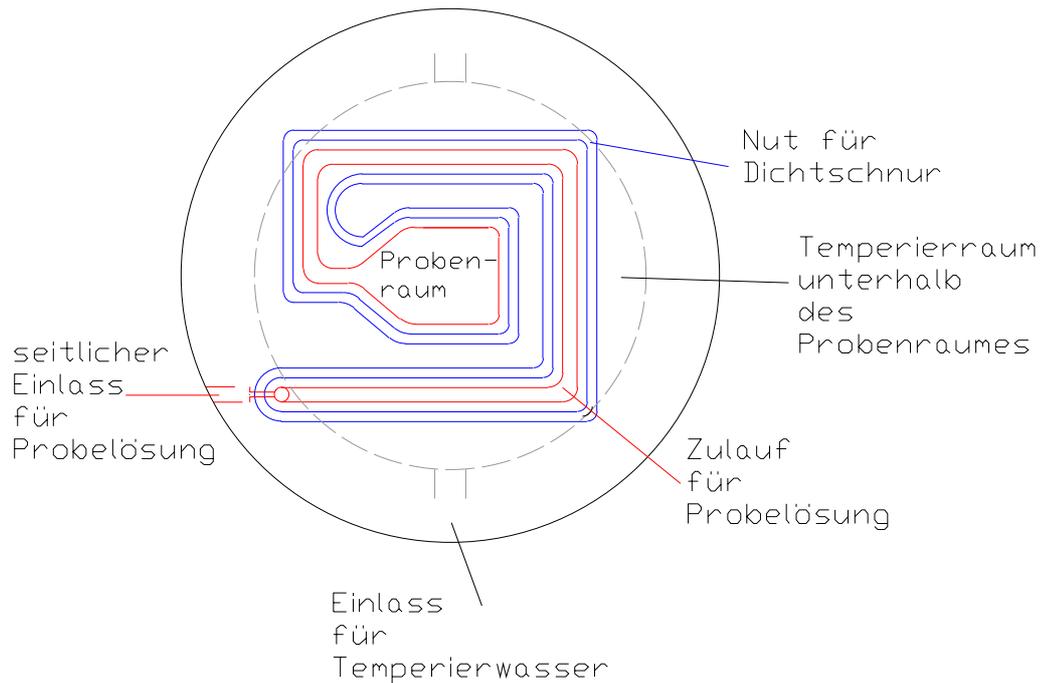


Abb. 4.14: Skizze von Bauteil 2 aus Abbildung 4.13

Das zweite Zwischenteil wird gegen den ersten gedichtet und enthält die Führungen für den Strahl. Im Durchfluss wird die Probelösung im 15° Winkel von dem Probenraum weggeführt. Oberhalb der Fenster befindet sich der Austrittsraum. Die Fenster selbst werden in eine entsprechende Bohrung eingelassen und mit einem Abschluss verschraubt. Dieser besitzt in einer 90° -Teilung 4 Schrauben. Durch unterschiedlich starkes Festziehen der Schrauben kann das Fenster in seiner Position optimal angepasst werden, um ein möglichst rechtwinkliges Auftreffen des Strahls auf das Fenster zu erreichen. Oberhalb der Strahlführung befindet sich ein zweiter Hohlraum, der von Temperierwasser durchflossen wird. Schließlich dichtet eine Abschlussplatte diesen Temperierraum ab. Abbildung 4.15 zeigt eine Skizze des Teiles.

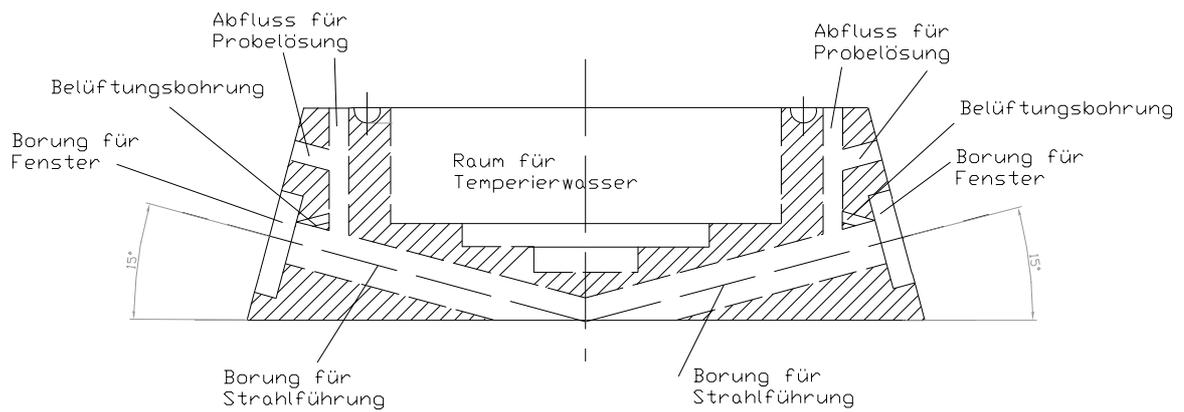


Abb. 4.15: Skizze von Bauteil 3 aus Abbildung 4.13. Die Abbildung zeigt einen Schnitt durch die Mitte des Teiles.

4.4 Röntgenzelle zur Messung in 100% Luftfeuchte

Die Röntgenmessungen wurden in Berlin am Hahn-Meitner Institut durchgeführt und dafür eine dort entwickelte Zelle eingesetzt. Diese soll hier beschrieben werden.

Die Röntgenreflektometrie sollte als komplementäre Technik zur Neutronenreflektometrie eingesetzt werden, um die Präparation der Lipidmembranen zu charakterisieren. Hauptproblem beim Einsatz der Technik ist jedoch, dass sowohl Silizium als auch Wasser nicht transparent für einen Röntgenstrahl einer Laborquelle sind. Somit wäre die Probe in einer Flüssigkeitszelle von keiner Seite her zugänglich. Die Idee hinter dem Einsatz einer Zelle mit 100% gesättigter Wasserdampf Atmosphäre ist, dass die Lipidfilme in dieser Atmosphäre stabilisiert werden können und Wasserdampf transparent für Röntgenstrahlen ist. Abbildung 4.16 zeigt schematisch den Aufbau der Zelle.

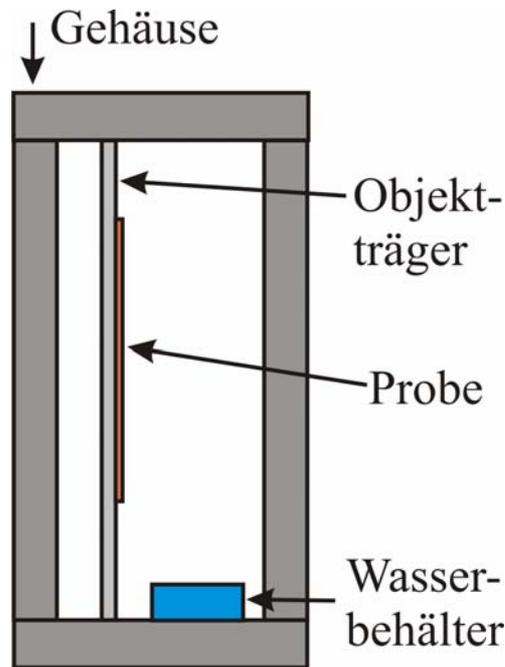


Abb. 4.16: Schema der eingesetzten Zelle für die Röntgenreflektometrie. Das Gehäuse muss so gedichtet sein, dass kein Gasaustausch möglich ist. In der Zelle befindet sich ein Wasservorrat. Die Probe wird an einem Objektträger fixiert. Der Strahlein- und -austritt wird mittels einer Kaptonfolie realisiert.

4.5 Druckzelle für Neutronenreflektometrie

Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Grenzfläche Knorpel/Synovialflüssigkeit anhand des Modellsystems unter mechanischer Belastung wie Druck und Scherung zu studieren. Als Technik dafür sollte die Neutronenreflektometrie dienen, da sie neben der Schichtdicke auch Informationen über den Wassergehalt der einzelnen Schichten liefert. Dafür mussten zunächst aber geeignete Probenumgebungen entwickelt werden.

Die Druckzelle wurde in Zusammenarbeit mit der Fa. Sitec-Sieber Engineering GmbH, Maur/Zürich in der Schweiz entwickelt. Abbildung 4. 17 zeigt ein Foto der Zelle.

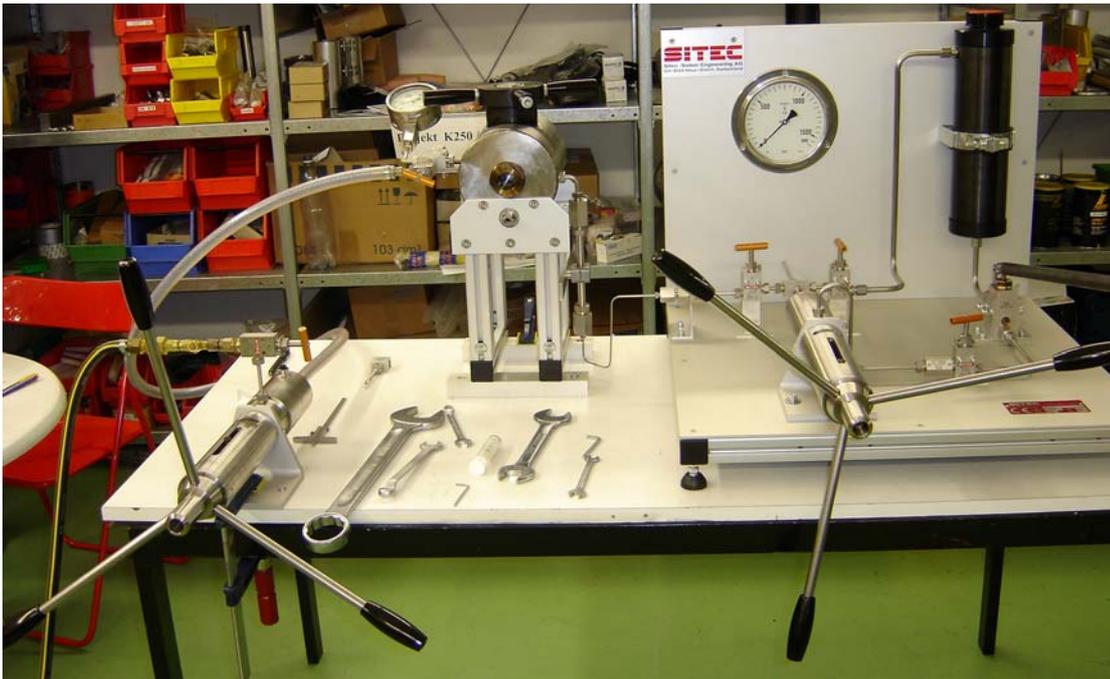


Abb. 4.17: Druckzelle für Neutronenreflektometrie. Rechts ist das Druckaufbausystem zu sehen. Der schwarze Behälter ist mit Wasser gefüllt, über das der Druck hydraulisch aufgebaut wird. Eine mechanische Presse wird benutzt, um Drücke bis 500 bar zu erzeugen. Für den Aufbau von 500 – 1000 bar wird die Spindelpresse benutzt. Links neben dem Druckaufbausystem befindet sich die eigentliche Messzelle.

Die Druckzelle besteht aus zwei Hauptkomponenten: einem Druckaufbausystem und dem eigentlichen Probenraum. Der Druck wird hydraulisch über die Flüssigkeit aufgebaut und vom Druckaufbausystem über eine Trennzelle an die Probeflüssigkeit weitergegeben. Die Trennzelle ist ein Zylinder, in dem sich ein beweglicher Kolben befindet. Die Druckzelle selbst ist ein doppelwandiger Edelstahlkörper. In der Zwischenwand befindet sich Wasser für die Temperierung. Die Zelle ist für Temperaturen zwischen 10 °C und 60 °C ausgelegt. Wie im Abschnitt 2.2 festgestellt wurde, herrschen im Gelenk maximale Drücke bis 50 bar /12/. Die Zelle wurde jedoch für Drücke bis 1 kbar ausgelegt, um sie auch für andere Fragestellungen einsetzen zu können. Das System besitzt sowohl an dem Druckaufbausystem als auch an der Zelle selbst ein Manometer, um jederzeit eine Kontrolle über den Druck zu besitzen. Abbildung 4.18 zeigt eine Schemazeichnung der Zelle und Abbildungen 4.19 bis 4.21 Detailfotos.

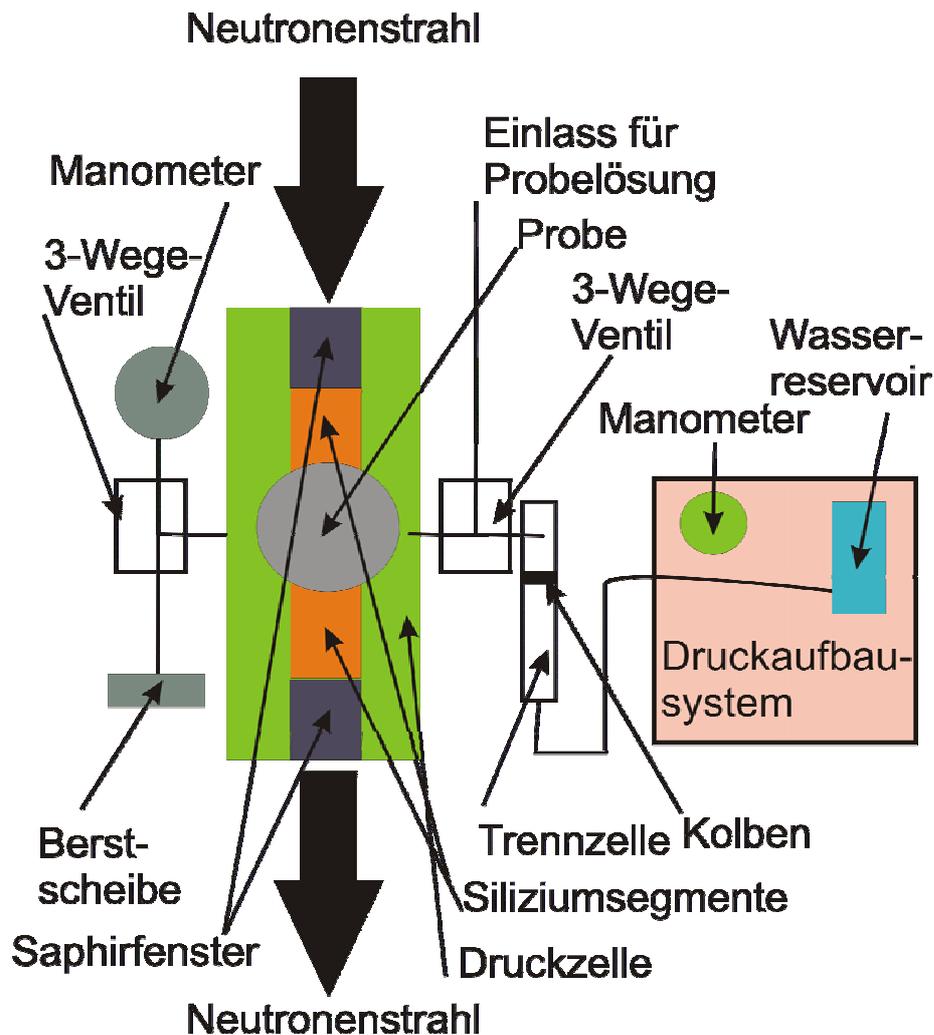


Abb. 4.18: Schemazeichnung der Druckzelle. Der Druck wird mittels des Druckaufbausystems hydraulisch über die Trennzelle, welche einen beweglichen Kolben enthält, in der Druckzelle erzeugt. Die Trennzelle ist über ein 3-Wege-Ventil mit der Druckzelle verbunden. Der dritte Ausgang des Ventils ist die Zuleitung für die Probelösung. Die runde Probe wird passgenau zwischen die Siliziumsegmente positioniert. Zum Befüllen wird in der Zelle Vakuum erzeugt und die Lösung eingesaugt. Über ein zweites 3-Wege-Ventil sind ein Manometer und eine Berstscheibe an die Zelle angeschlossen. Werden in der Zelle Drücke von über 1,5 kbar erreicht, so reißt die Berstscheibe und der Druck kann entweichen.



Abb. 4.19: Detailfoto der Druckzelle

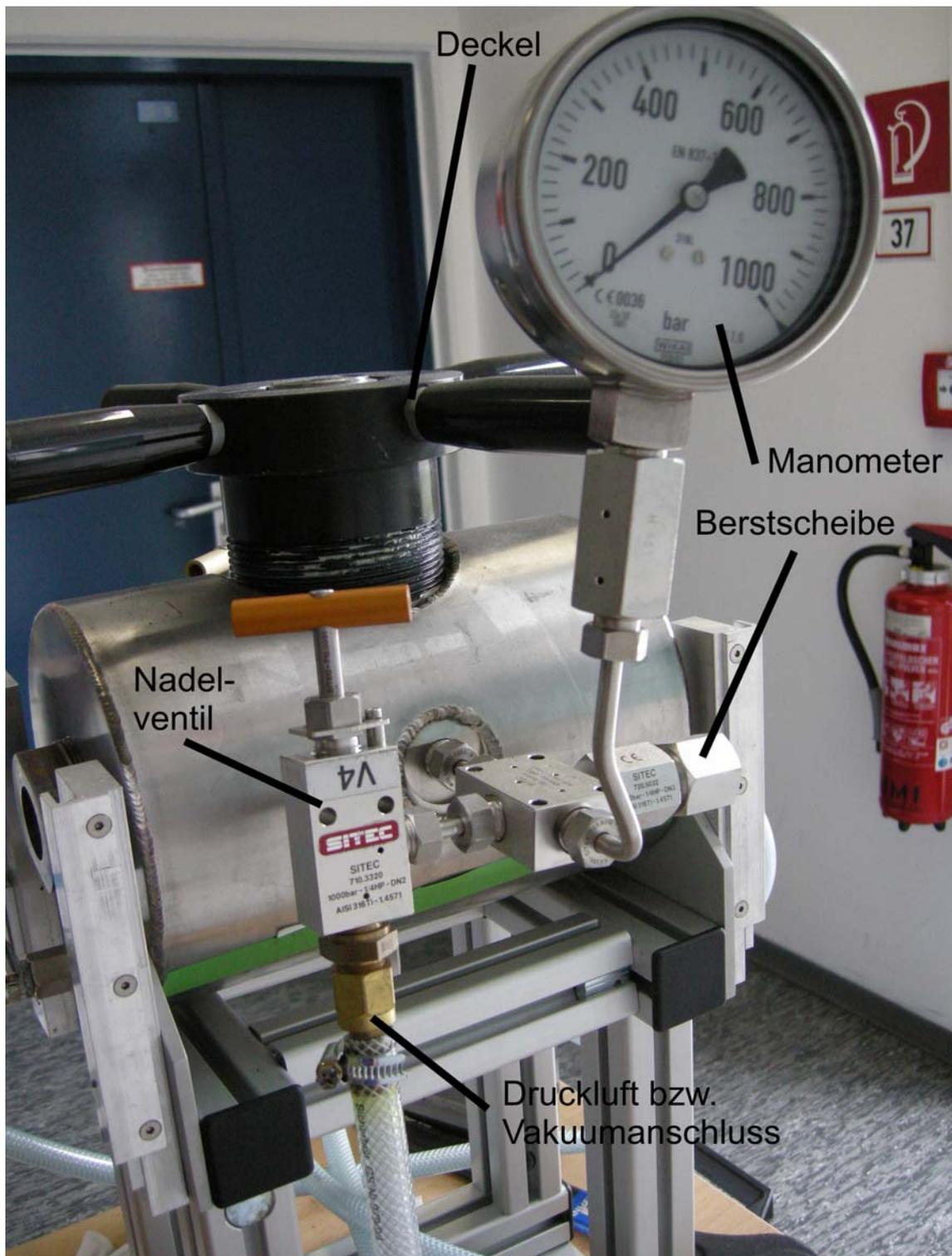


Abb. 4.20: Detailphoto der Druckzelle

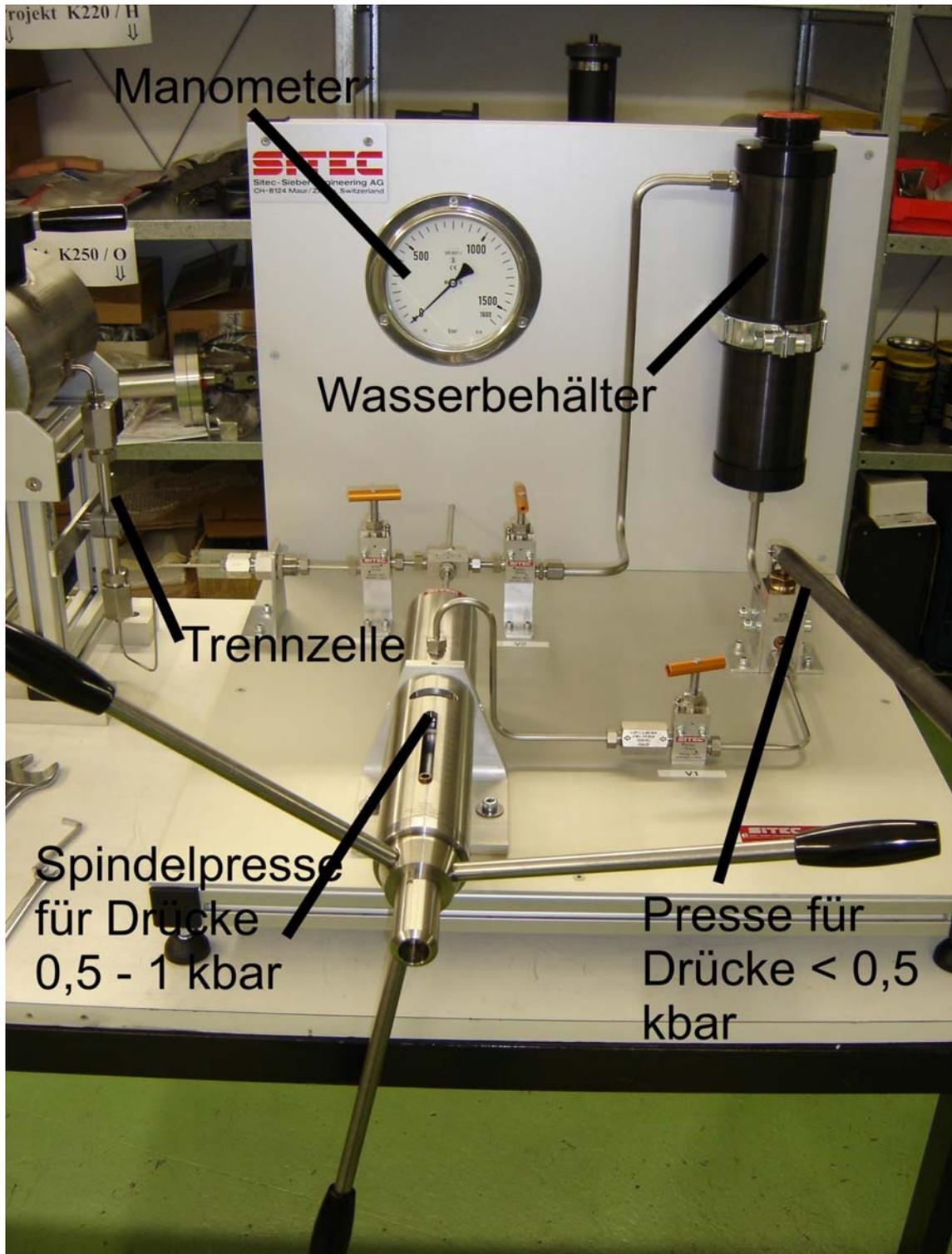


Abb. 4.21: Foto des Druckaufbausystems

Zu lösende Probleme bei der Fertigstellung der Zelle waren einerseits die Strahlführung des Neutronenstrahls und andererseits die Erzeugung hoher Drücke bei großem Fensterdurchmesser. Abbildung 4.22 zeigt die Lösung dieser Probleme. Der Abschluss nach außen erfolgte über neutronentransparente und druckfeste Saphirfenster. Für die Strahlführung wurden Segmente aus Silizium gefertigt. Durch die Verwendung der Segmente

passiert der Neutronenstrahl in der Zelle fast ausschließlich das transparente Silizium und nahezu keine Probelösung, wodurch eine nennenswerte Schwächung der Strahlintensität vermieden wird. Die Segmente schließen auf der einen Seite mit dem Saphirfenster und auf der anderen Seite mit der runden Probe ab.

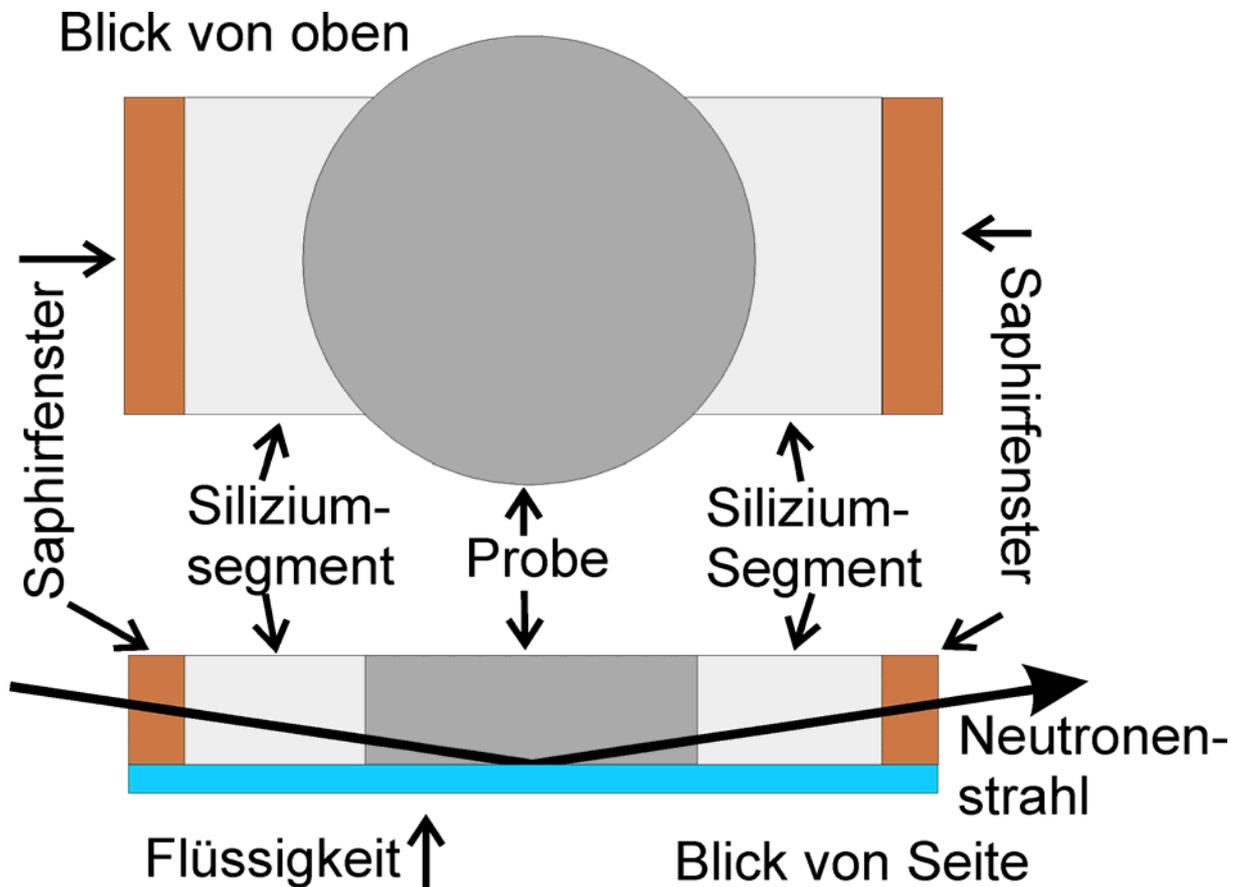


Abb. 4.22: Geometrie der Strahlführung in der Druckzelle. Die Probe selbst ist kreisrund. Daran angepasst wurden Segmente, die bündig mit der Probe abschließen. Somit muss der Strahl lediglich einen minimalen Wasserspalt ($< 100 \mu\text{m}$) zwischen den Segmenten passieren.

4.6 Scherzelle für Neutronenreflektometrie

Neben der Druckzelle wurde auch ein Rheometeraufbau für die Neutronenreflektometrie weiterentwickelt. Als Ausgangspunkt dafür diente eine Scherzelle von Dr. Max Wolff, Universität Bochum und Institut Laue-Langevin (ILL), Grenoble, Frankreich. Mit dieser

wurden auch die Scherexperimente, die in Abschnitt 7.1. gezeigt werden, durchgeführt. Der neuentwickelte Aufbau wurde im Bearbeitungszeitraum dieser Arbeit fertig gestellt, konnte jedoch nicht mehr in Neutronenexperimenten getestet werden. Nichts destoweniger soll er hier kurz beschrieben werden. Abbildung 4.23 zeigt zunächst eine Schemazeichnung der für die Experimente eingesetzten Scherzelle.

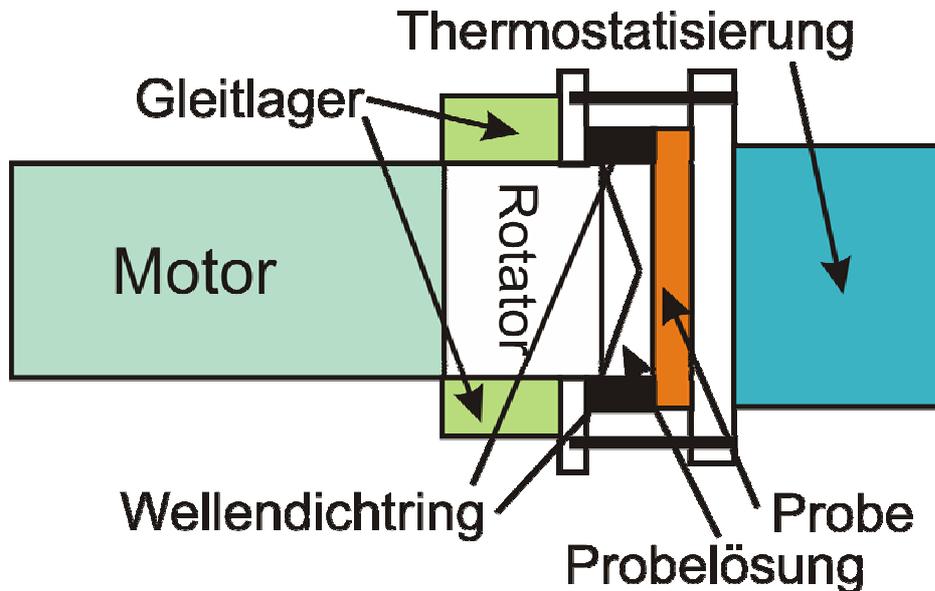


Abb. 4.23: Schemazeichnung der Scherzelle. Der Rotator und das Substrat werden mit einem einzigen Wellendichtring gegeneinander gedichtet. Der Rotator wird mittels eines Elektromotors angetrieben. Der Abstand des Rotators zur Probe nimmt linear mit dem Abstand vom Zentrum zu. Der Zweck dieser Maßnahme ist es, die Scherrate an der Oberfläche über die gesamte Fläche konstant zu halten. Mit steigendem Abstand vom Rotationszentrum nimmt die Bahngeschwindigkeit linear zu. Die vom Rotator übertragene Scherung nimmt wiederum linear mit steigendem Abstand zur Probe ab. In der Summe bleibt somit die Scherrate über den gesamten Radius konstant.

Um die Scherrate über die gesamte Probenoberfläche konstant zu halten, wurde eine Kegelgeometrie für den Rotator gewählt, in der der Abstand zur Probe linear mit steigendem Radius zunimmt. Im „Zwei-Platten-Modell“ ist die Scherrate $\dot{\gamma}$ eine einfache Funktion des Abstands h zwischen Stator (Probe, Platte 1) und Rotor (Platte 2) und der relativen Geschwindigkeit v der Platten zueinander.

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h}$$

Gl. 4.1

Für die Messzelle mit zylinderförmigem Stator und kegelförmigem Rotor (Radius R) ist die Bahngeschwindigkeit v eine Funktion der eingestellten Winkelgeschwindigkeit ω_0 und des Abstandes r von der Rotationsachse. Ihre Änderung mit r ist gegeben durch

$$dv = \omega_0 dr \quad \text{Gl. 4.2.}$$

Der Abstand h zwischen Stator und Rotor ist mit

$$dh = s dr, \quad s = (h_R - h_0)/R \quad \text{Gl. 4.3}$$

ebenfalls abhängig von r sowie von der minimalen Höhe h_0 für $r = 0$ und der maximalen Höhe h_R für $r = R$. Damit ist die Änderung der Scherrate mit r Null

$$\frac{d\dot{\gamma}}{dr} = \frac{d}{dr} \left(\frac{\omega_0 dr}{s dr} \right) = 0 \quad \text{Gl. 4.4}$$

und die Scherrate ist – unabhängig von der jeweils von Neutronen ausgeleuchteten Fläche – konstant.

Dieser Aufbau wurde schließlich weiterentwickelt, da der alte Aufbau für das Experimentieren mit Lipiden und wässrigen Proben einige Nachteile hatte. Die Nachteile sind:

- Zelle zeitweise undicht. Problem der Zelle ist, dass die durch den Wellendichtring zu dichtende Oberfläche sehr groß ist.
- Die Schmierung durch Gleitlager erwies sich als unvorteilhaft. Das Schmiermittel Graphit gelangte teilweise in die Problemlösung
- Ein weiteres Problem war der Abrieb durch den Wellendichtring. Der Dichtring löste mechanisch Partikel aus dem Rotator ab. Dies soll in der neuen Zelle durch die Wahl geeigneter Materialien vermieden werden.
- Die Zelle ist nur für den Einsatz an vertikalen Reflektometern geeignet.

In der neuen Zelle wurde der Rotator selbst völlig in ein Gehäuse verlegt und über eine Welle angetrieben. Da somit nur noch an der Welle gedichtet werden muss, nimmt die zu dichtende Fläche deutlich ab. Weiterhin sorgen eine gehärtete und geschliffene Edel-

stahlwelle sowie ein speziell für das Dichten von Wasser angefertigter Wellendichtring für bessere Dichtheit. Des Weiteren soll die Zelle flexibler im Einsatz sein und sowohl für horizontale als auch vertikale Reflektometer ausgelegt sein. Als weiterer Zusatzpunkt lässt sich mit der neuen Zelle das Drehmoment des Motors über den Frequenzumrichter auslesen. Somit können Rückschlüsse auf die Viskosität der Probe gezogen werden. Abbildung 4.24 zeigt ein Schema der neuentwickelten Zelle.

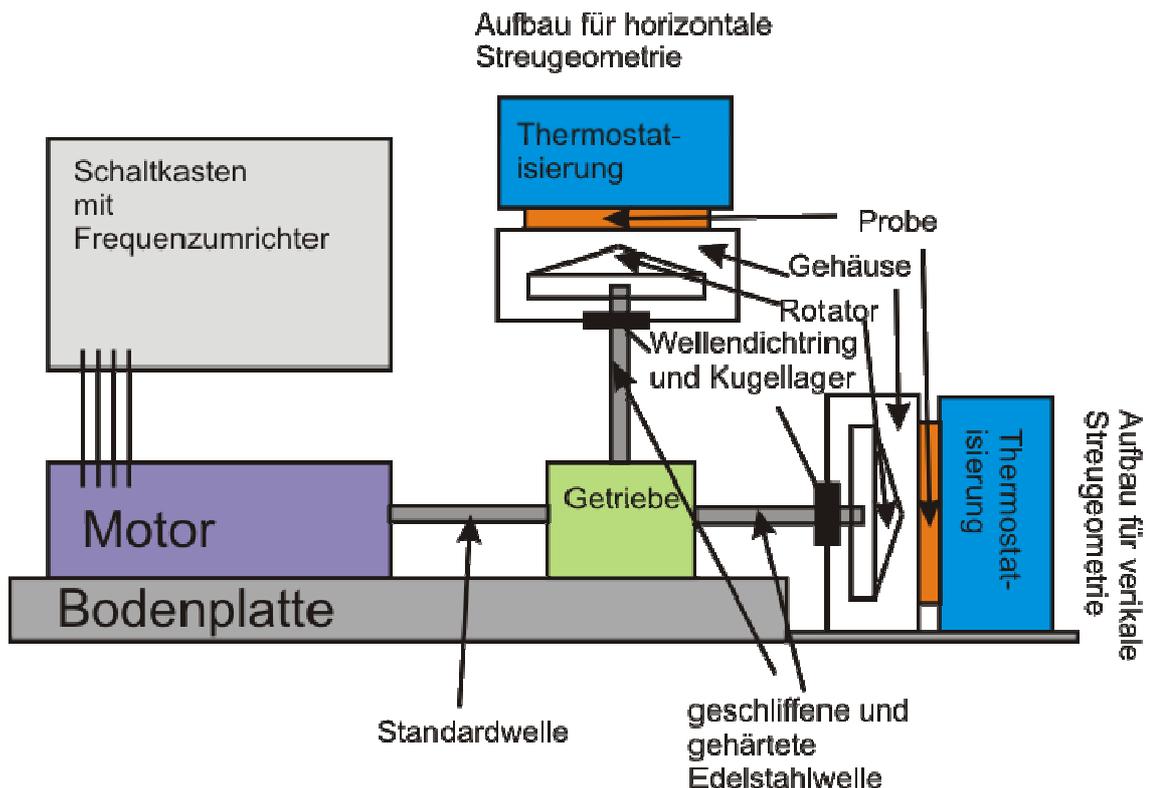


Abb. 4.24: Neuentwickelter Rheometeraufbau für die Neutronenreflektometrie. Die Kraft des Motors wird auf ein Getriebe übertragen. Dieses lenkt die Kraft 90° bzw. 180° um. In beiden Richtungen kann der Probenraum montiert werden, um sowohl horizontal als auch vertikal arbeiten zu können. Die Probe selbst wird mittels eines Dichtringes gegen den Probenraum gedichtet. Oberhalb der Probe befindet sich eine Einheit zur Temperierung

Die Vorteile des neuentwickelten Aufbaus sind:

- bessere Dichtheit, da die zu dichtende Fläche gegenüber alten Aufbau abnimmt und eine gehärtete und geschliffene Edelstahlwelle zum Einsatz kommt. Diese Welle dichtet besser, da der Wellendichtring nicht in das Material einschneiden kann.

- Schmiermittel der Gleitlager können nicht in die Probelösung gelangen, da Kugellager eingesetzt werden.
- Das Drehmoment kann ausgelesen werden.
- Aufbau für horizontale und vertikale Reflektometer geeignet

Zur besseren Veranschaulichung zeigt Abbildung 4.25 ein Foto der Zelle.

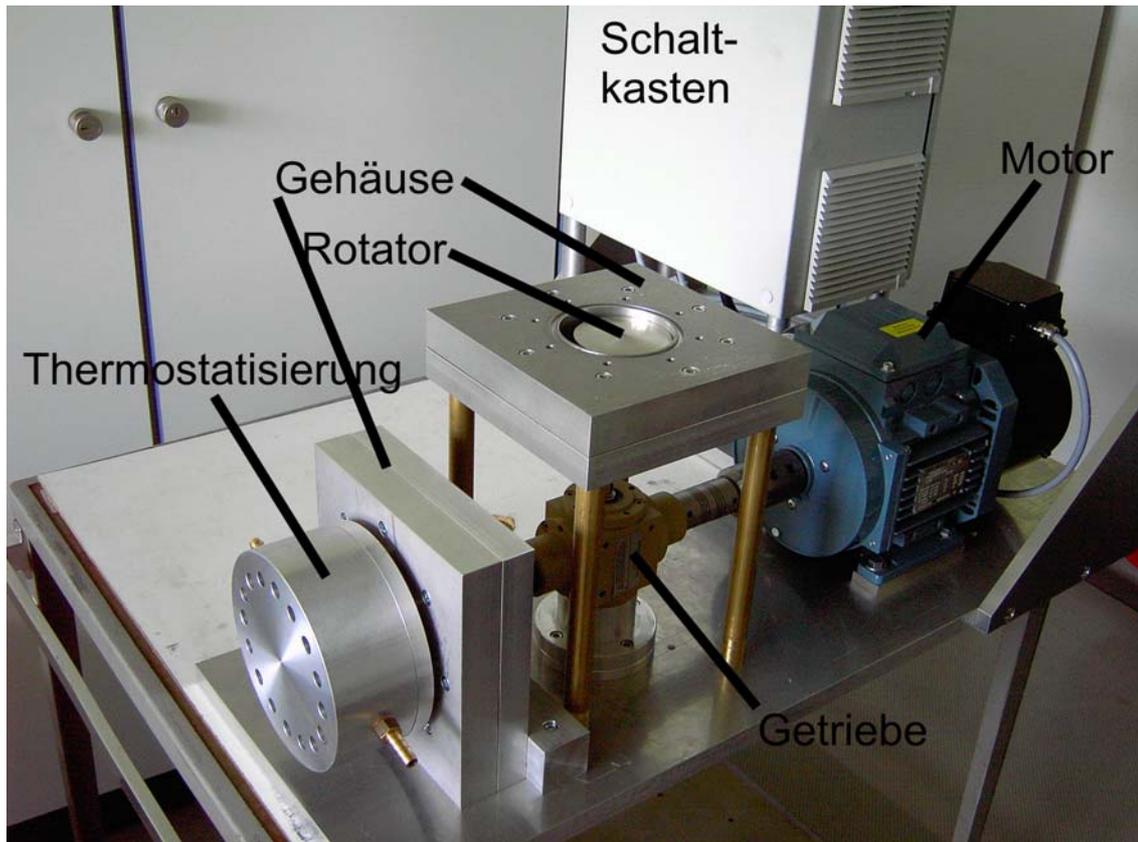


Abb. 4.25: Foto des Rheometeraufbaus für die Neutronenreflektometrie

5. Ergebnisse Teil 1: Wechselwirkungen von Lipid und Hyaluronsäure und deren Bedeutung für die Funktionsweise des Gelenkes

Im einführenden Teil wurde bereits erläutert, dass Wechselwirkungen zwischen Hyaluronsäure und dem Lipid DPPC eine Rolle für die Schmierung von Gelenken spielen könnten. Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen wurde mittels Elektronenmikroskopie /62, 63/, Röntgendiffraktometrie und einer Langmuir-Filmwaage /64/ gefunden. Diese Beobachtungen sollen hier überprüft und das System mit weiteren *in situ* Techniken untersucht werden. In Abschnitt 5.1 soll auf die Struktur des mit dem DPPC eng verwandten DMPC in der Volumenphase und in Abschnitt 5.2 an der Grenzfläche eingegangen werden. Abbildung 5.1 zeigt noch einmal die Struktur von DMPC und Hyaluronsäure.

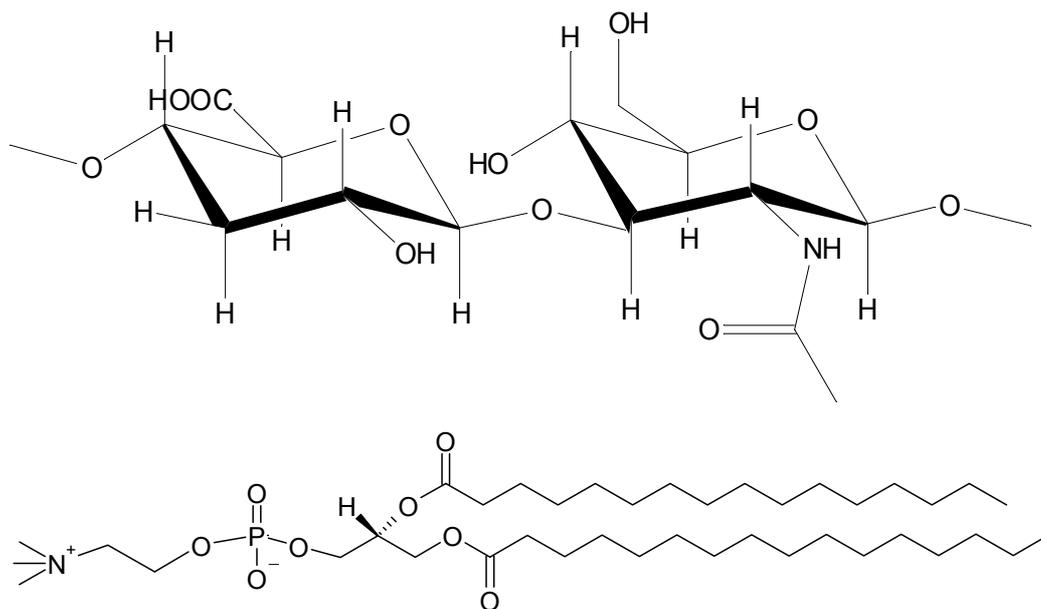


Abb. 5.1: Oben: Struktur einer Hyaluronsäure Monomereinheit. Unten: Struktur von DMPC.

Zunächst stellt sich die Frage: Wenn es Wechselwirkungen gibt, welche Gruppen nehmen daran teil? Beim Betrachten der Struktur kommen zwei Gruppen in Frage. Bei der Hyaluronsäure dürfte dies die bei physiologischen pH-Werten dissoziierte, negativ gela-

dene Carboxylgruppe und beim DMPC die positiv geladene, quartäre Aminogruppe sein.

5.1 Struktur von DMPC in Hyaluronsäurelösung

Zur Untersuchung der Lipid-Struktur in der Hyaluronsäurelösung wurde drei Techniken eingesetzt: die Analytische Ultrazentrifugation (AUC), die Differential Scanning Kalorimetrie (DSC) und die Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC). Die hiermit gewonnenen Daten sollen auch in dieser Reihenfolge vorgestellt werden.

Für die AUC-Messungen wurde folgender Ansatz gewählt: Es wurden acht Proben mit einem unterschiedlichen Massenverhältnis DMPC/Hyaluronsäure zentrifugiert. Binden Lipidvesikel an die Hyaluronsäure, so steigt die Masse des Komplexes mit steigender DMPC-Konzentration falls das System nicht bereits bezüglich DMPC gesättigt ist. Abbildung 5.2 bis 5.4 zeigen Zentrifugationsdaten der reinen Komponenten.

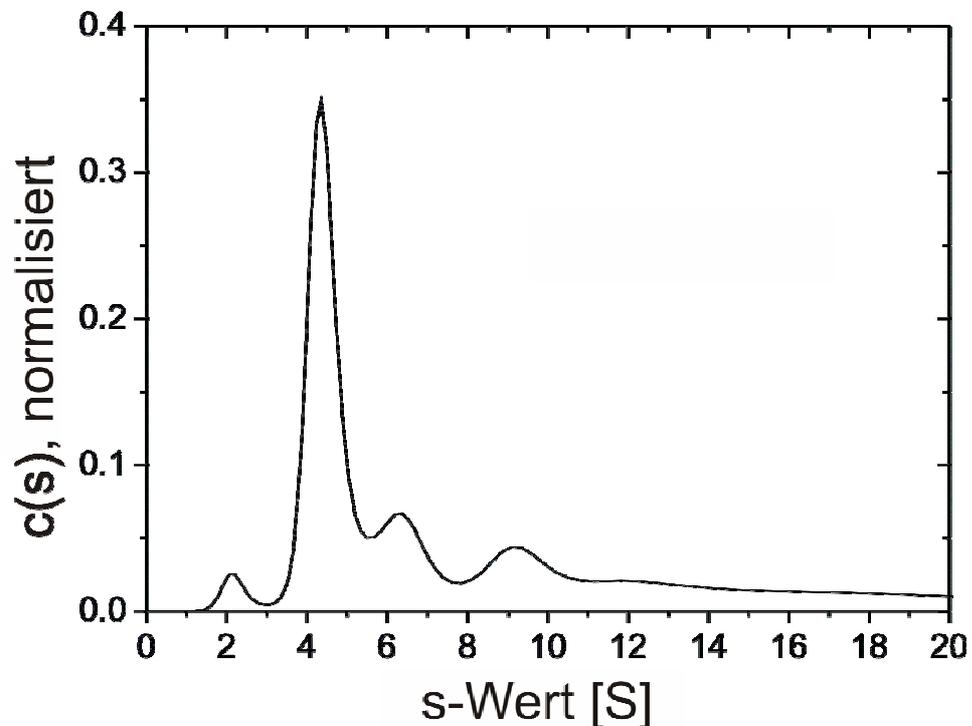


Abb. 5.2: Größenverteilung von DMPC

mittels AUC bestimmt. Die Hauptmode befindet sich bei s-Werten zwischen 3 und 5. Die Nebenmaxima zeigen, dass weitere Größenfraktionen vorhanden sind. Die

Ordinatenbeschriftung $c(s)$ meint hier die Konzentration von Vesikeln mit dem zugehörigen s -Wert. Das Experiment wurde bei 25 °C und einer Vesikel-Konzentration von 2 mg/ml durchgeführt.

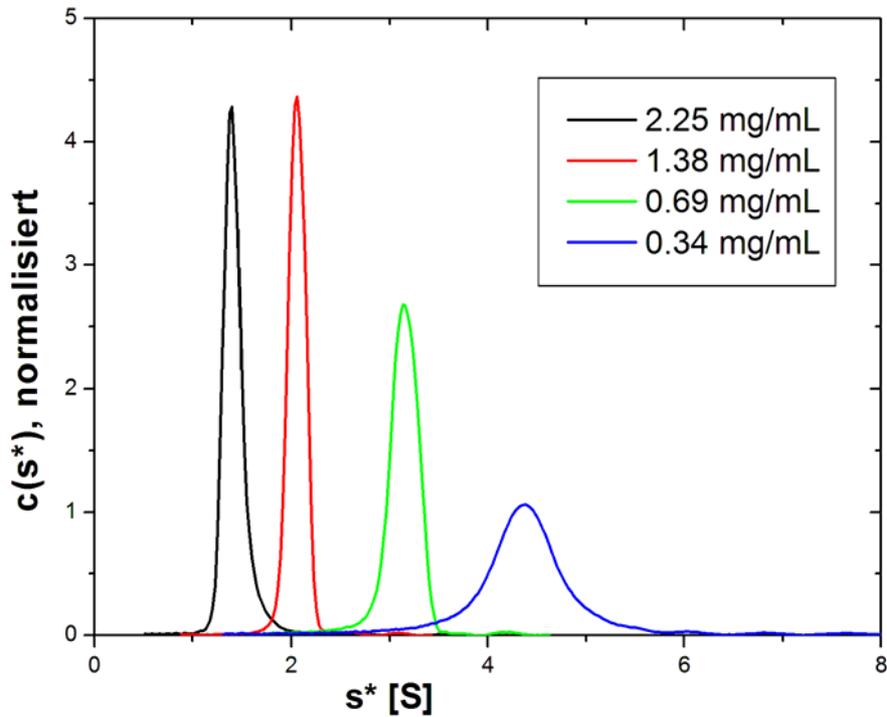


Abb. 5.3: Größenverteilung der Hyaluronsäure mittels AUC bestimmt. Es ist sichtbar, dass der s^* -Wert stark konzentrationsabhängig ist (für Erklärung s^* siehe Abschnitt 3.1).

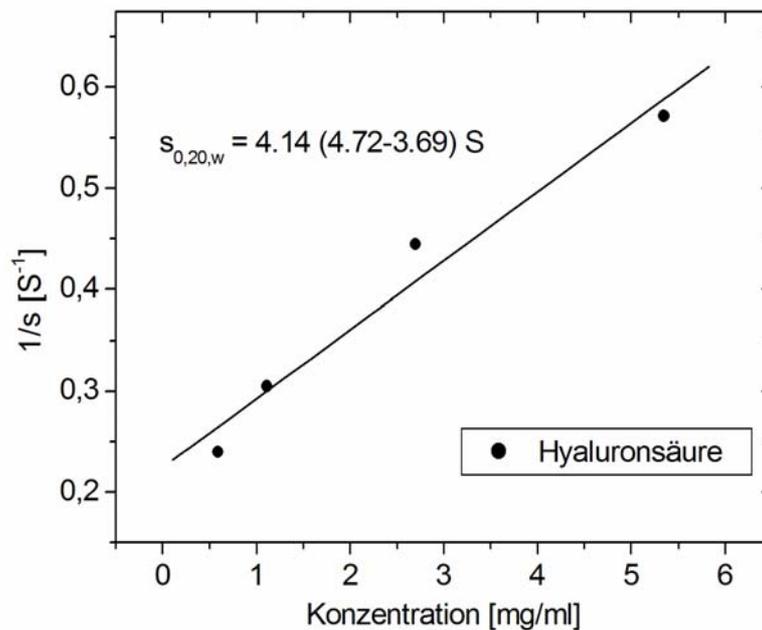


Abb. 5.4: AUC-Messungen von Hyaluronsäure. Der s-Wert ist stark konzentrationsabhängig, was auf ein nicht-ideales Verhalten hinweist. Als konzentrationsunabhängiger s-Wert lässt sich der auf unendliche Verdünnung und reines Wasser bei 20°C extrapolierte s-Wert ($s_{0,20,w}$) errechnen, wofür $1/s$ gegen die Konzentration aufgetragen werden muss (für die Berechnung des $s_{20,w}$ -Wertes siehe Abschnitt 3.1, Gleichung 3.5). Die Experimente wurden bei einer Geschwindigkeit von 16 krpm und bei 25°C durchgeführt. Die Werte in der Klammer ergeben sich aus den Unsicherheiten der linearen Regression.

Zunächst wurden die s-Werte der reinen Komponenten bestimmt. Der s-Wert der Hyaluronsäureprobe lag konzentrationsabhängig zwischen 1,8 und 4,2 S, der s-Wert der DMPC-Vesikel war breit verteilt bei 3 bis 5 S, wobei mehrere Nebenmaxima auftraten. Der s-Wert der Hyaluronsäure war stark konzentrationsabhängig, was auf ein nichtideales Sedimentationsverhalten hinweist (siehe Abbildung 5.3).

Daher ist es sinnvoll, einen konzentrationsunabhängigen s-Wert, den $s_{0,20,w}$, durch die Extrapolation auf unendliche Verdünnung, 20°C und reines Wasser zu ermitteln (siehe Abbildung 5.4). Dieser lag für die Hyaluronsäure bei 4,14 S. Der Grund für das nicht-ideale Sedimentationsverhalten dürfte die intermolekulare Vernetzung der Hyaluronsäuremoleküle, die unter anderem auch zu einem nicht-Newtonschen Verhalten führt, sein.

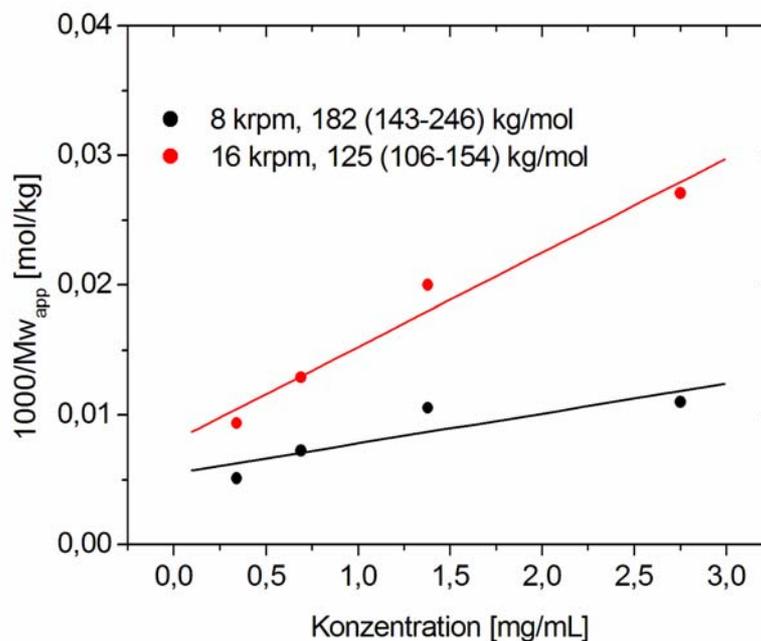


Abb. 5.5: Molekulargewichtsbestimmung der Hyaluronsäure. Um die Konzentrationsabhängigkeit zu beseitigen, wurde auf unendliche Verdünnung extrapoliert. Der Versuch wurde bei 8000 und 16000 Umdrehungen pro Minute durchgeführt, was zu unterschiedlichen Molekulargewichten führte. Auch dies ist ein Hinweis für nichtideales Sedimentationsverhalten. Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte anhand Gleichung 3.4. Die Werte in der Klammer ergeben sich aus den Unsicherheiten der linearen Regression.

Anhand der gewonnen Daten lässt sich auch das Molekulargewicht der Hyaluronsäure bestimmen (Abbildung 5.5). Dieses lag abhängig von der Geschwindigkeit der Zentrifuge bei 182 kg/mol (8 krpm) bzw. bei 125 kg/mol (16 krpm). Das sich die Werte so deutlich unterscheiden, ist wieder ein Hinweis auf das nichtideale Sedimentationsverhalten der Hyaluronsäure. Die hier bestimmten Werte liegen deutlich unterhalb der Angabe des Herstellers Calbiochem, der das Molekulargewicht mit 800 kg/mol angab.

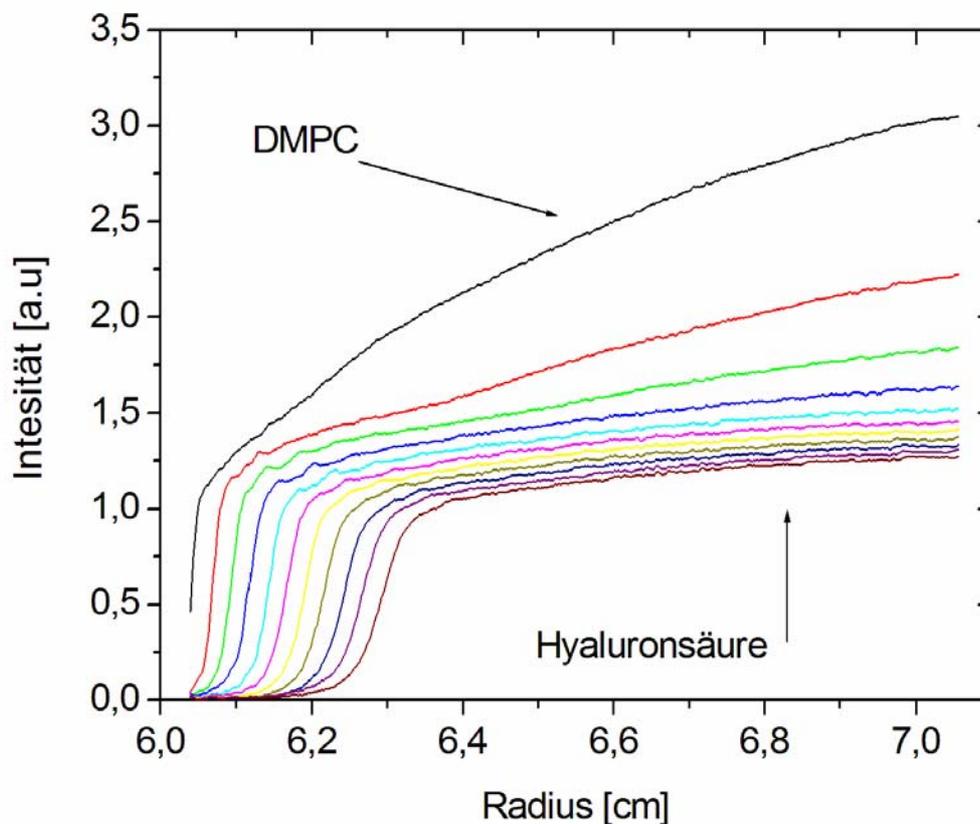


Abb. 5.6: Rohdaten des AUC-Experimentes mit der Mischung von DMPC und Hyaluronsäure. Das mit Intensität bezeichnete Messsignal ist linear proportional zur Konzentration.

ration. Bei Kenntnis des Brechungsindex der entsprechenden Phase wäre eine Umrechnung in die Massekonzentration möglich. Mit Radius ist der Abstand vom Mittelpunkt der Rotorachse gemeint.

Abbildung 5.6 zeigt die Rohdaten des Experimentes der Mischung aus DMPC und Hyaluronsäure. Die Abbildung veranschaulicht, dass bei der Auswertung zwischen DMPC und Hyaluronsäure unterschieden werden kann. Das DMPC hat eine breite Verteilung (siehe Abbildung 5.2) und ist in den oberen Linien erkennbar. Die Hyaluronsäure sedimentiert wesentlich scharfbandiger und ist in den unteren Linien sichtbar. Weiterhin ist die Unterscheidung zwischen DMPC und Hyaluronsäure auch durch den Vergleich mit den Rohdaten der reinen Komponenten möglich.

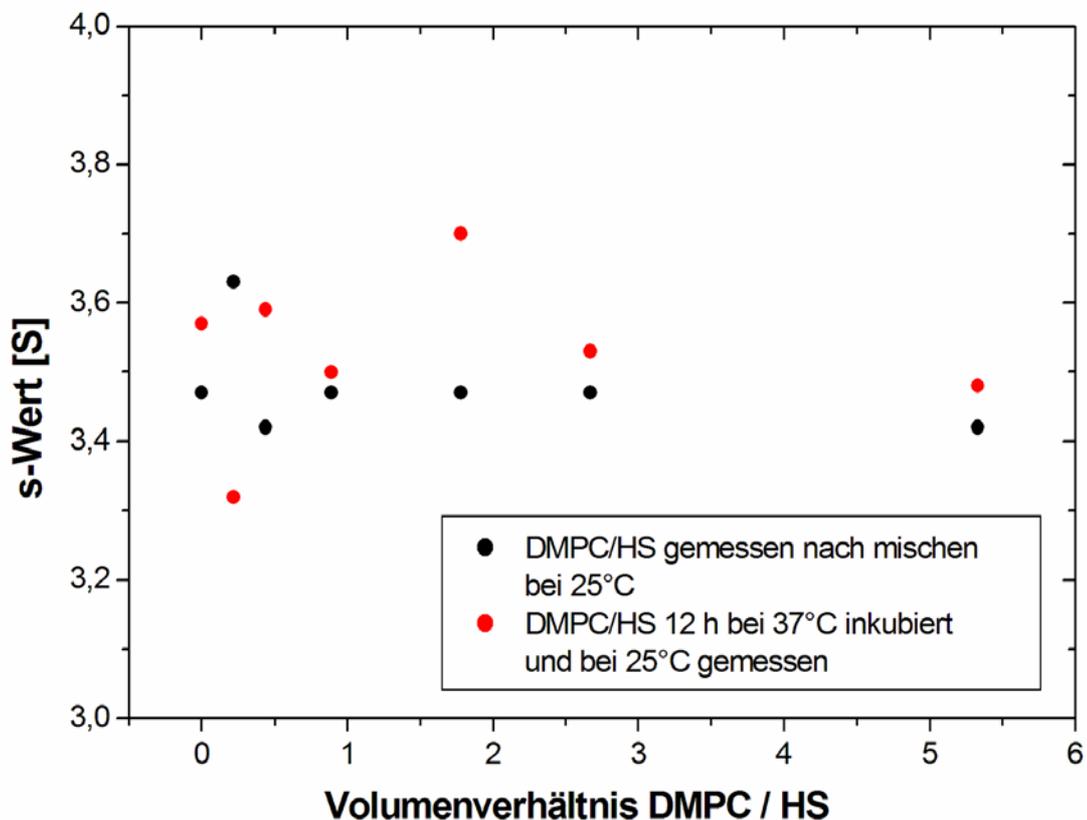


Abb. 5.7: AUC-Daten für Mischungen aus DMPC und Hyaluronsäure. Bei beiden Proben bleibt der s-Wert bei steigendem DMPC-Anteil konstant und entspricht dem der reinen Hyaluronsäure bei einer Konzentration von 1 mg/ml.

Abbildung 5.7 zeigt den s-Wert der Hyaluronsäure in Abhängigkeit zur Zugabe von DMPC. Die Verwendung des $s_{0,20,w}$ war hier nicht nötig, da bei konstanter Hyaluronsäurekonzentration von 1 mg/ml gearbeitet wurde. Der Trend bei der Messung mit beiden

Komponenten ist eindeutig: der s-Werte der Hyaluronsäure ist bei allen Mischungsverhältnissen der beiden Komponenten konstant. Dies lässt darauf schließen, dass es keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen DMPC und Hyaluronsäure gibt. Wäre dies der Fall, so hätte der s-Wert der Hyaluronsäure mit steigendem DMPC-Anteil ansteigen müssen. Eine Auftragung des s-Wertes von DMPC gegen das Volumenverhältnis DMPC/Hyaluronsäure, welches das Ergebnis noch erhärten würde, ist theoretisch ebenfalls möglich. Dies ist in den hier vorliegenden Experimenten jedoch schwierig, da die DMPC-Probe polydispers war und sehr breit sedimentiert (vgl. Abbildung 5.2).

Als nächstes sollen die DSC-Experimente dargestellt werden. Dafür wurde in einer Kammer eine DMPC-Lösung und in der anderen eine Mischung aus DMPC und Hyaluronsäure vermessen. Abbildung 5.8 zeigt die Ergebnisse.

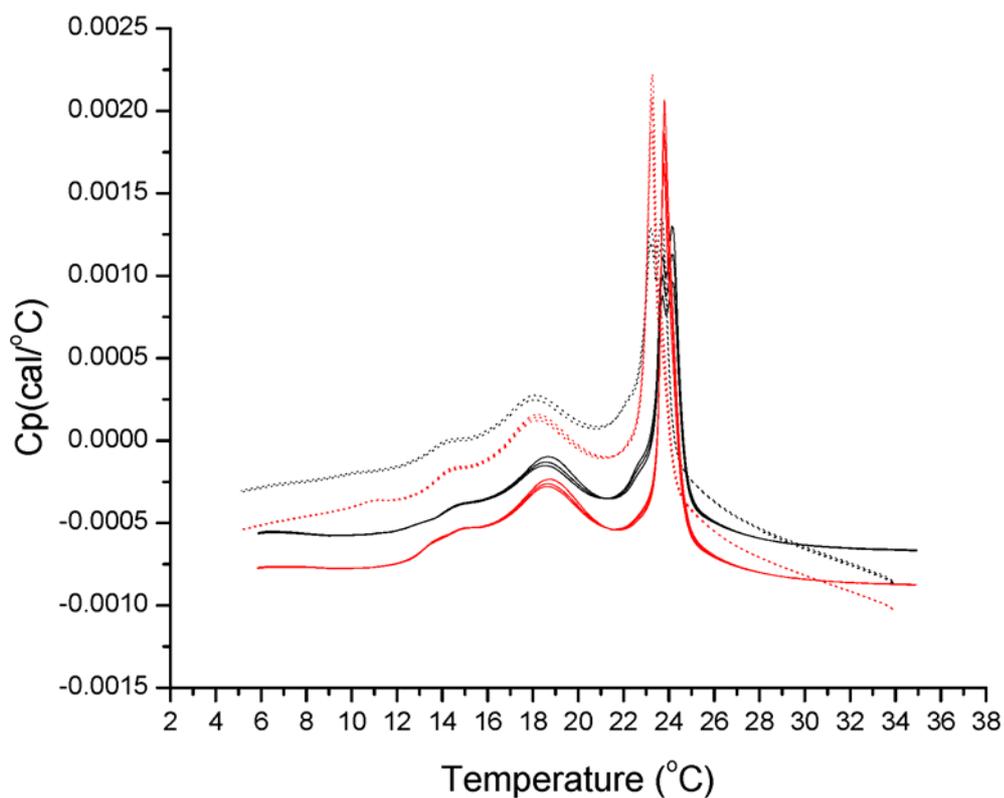


Abb. 5.8: DSC-Messung des Systems DMPC/Hyaluronsäure. Die schwarze Linie zeigt die Messung ohne Hyaluronsäure und die rote Kurve mit Hyaluronsäure. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Upscan-Messungen (von tiefen zu hohen Temperaturen) und die gepunktete Linie den Downscan-Messungen (von hohen zu tiefen Temperaturen). Das Messprogramm wurde jeweils dreimal durchlaufen.

Die DSC ist eine Methode, um Phasenübergänge sichtbar zu machen, da diese exotherme oder endotherme Wärmetönungen haben. Die Hyaluronsäure unterliegt im Temperaturbereich des flüssigen Wassers keinen Phasenübergängen. Das DMPC besitzt einen Phasenübergang von der kristallinen in die flüssige Phase bei 24°C. Sollten sich Wechselwirkungen zwischen DMPC und Hyaluronsäure in DSC-Messungen zeigen, so sollte sich dies, wie in /102/ demonstriert, in einem veränderten Phasenübergang des DMPC und damit in einer um mehrere Kelvin verschobenen Peakposition zeigen. Abbildung 5.8 zeigt deutlich, dass dies im untersuchten System nicht der Fall ist. Der Phasenübergang der Probe liegt sowohl mit als auch ohne Anwesenheit der Hyaluronsäure bei etwa 24°C. Dies entspricht der Phasenübergangstemperatur von DMPC. Somit zeigen auch die DSC-Untersuchungen keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen DMPC und Hyaluronsäure.

Als dritte Technik zur Feststellung von Wechselwirkungen wurde schließlich die ITC eingesetzt. Dabei wurde eine Hyaluronsäurelösung vorgelegt und die DMPC-Vesikel hinein titriert. Abbildung 5.9 zeigt die Ergebnisse.

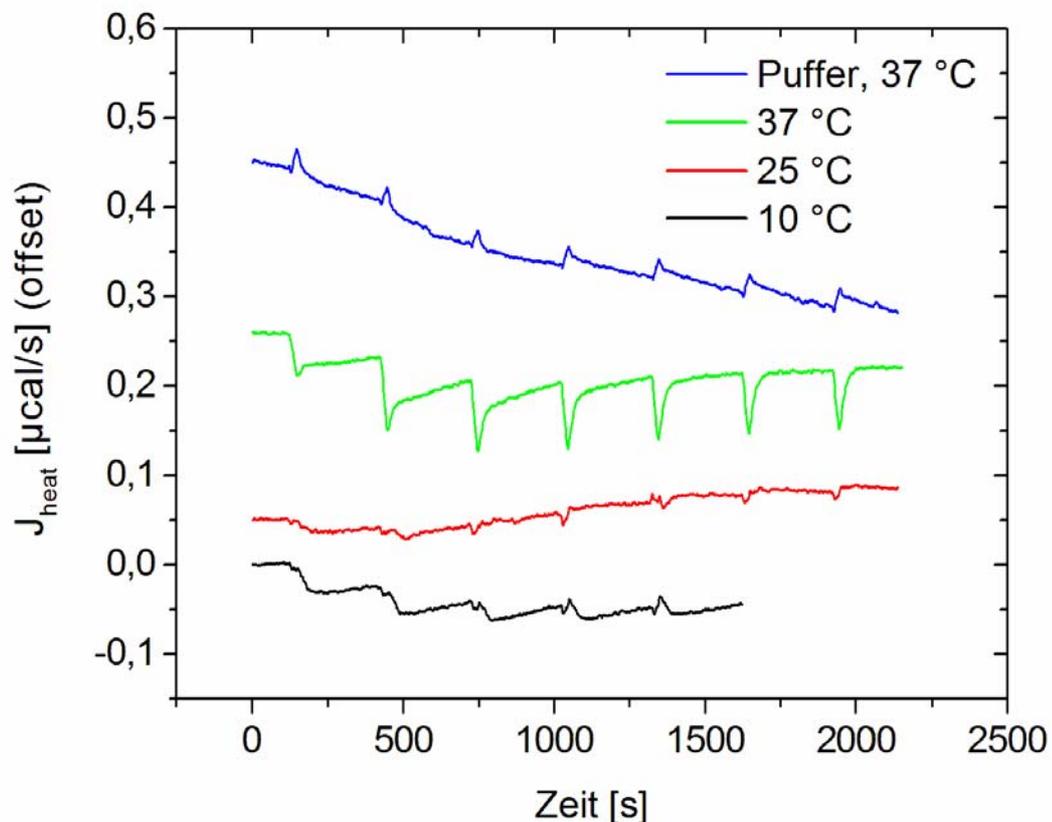


Abb. 5.9: ITC-Titrationen von 20 mg/ml DMPC-Vesikeln gegen eine vorgelegte 5 mg/ml Hyaluronsäurelösung. Als Messgröße wird bei der ITC die Heizleistung J_{heat} auf-

gezeichnet. Negative Peaks in J_{heat} kennzeichnen exotherme Reaktionen, positive Peaks endotherme Reaktionen.

Mittels der ITC können Wechselwirkungen zwischen Molekülen sichtbar gemacht werden, da diese mit Wärmetönungen einhergehen. In diesem Fall wurde eine 20 mg/ml DMPC-Vesikel-Lösung zu einer 5 mg/ml Hyaluronsäurelösung titriert. Die hohe DMPC-Konzentration ist nötig, um einen möglichen Effekt sichtbar zu machen. Die ITC wird bei konstanter Temperatur durchgeführt, die Wärmetönungen aus den Wechselwirkungen müssen durch Heizen oder Kühlen kompensiert werden. Als Messgröße wird die dafür aufgebrauchte Heizleistung J_{heat} betrachtet. Wie in Abbildung 5.9 zeigt, hat bei Temperaturen von 10 und 25 °C das Hinzutitrieren der Vesikel überhaupt keinen Einfluss auf die Heizleistung.

Für Bei 37°C sind geringe Ausschläge der Heizleistung erkennbar. Diese Peaks sind negativ, so dass es sich bei dem beobachteten Effekt um einen exothermen Vorgang handelt. Jedoch ist die Ausprägung der Peaks sehr schwach, so dass es sich dabei wahrscheinlich um Verdünnungs- oder Mischungseffekte handelt. Wie in /103/ gezeigt, sollte der Effekt in der Heizleistung bei einer echten Wechselwirkung über mehrere $\mu\text{cal/s}$ -Einheiten gehen. Somit zeigt auch die ITC, dass keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Hyaluronsäure und DMPC bestehen. Sollten die schwachen Effekte bei 37°C aus Interaktionen der beiden Moleküle rühren, so wären diese außerordentlich schwach und biologisch kaum relevant.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die in der Literatur mittels Elektronenmikroskopie, Röntgendiffraktometrie und einer Langmuir-Filmwaage gefundenen Wechselwirkungen mittels AUC, DSC und ITC nicht bestätigt werden können. Bei keiner der drei Techniken wurde ein Anhaltspunkt für Wechselwirkungen, Bindungen oder Komplexierungen gefunden. Damit liegt das DMPC nach unseren Studien in der Hyaluronsäurelösung als freie Vesikel vor.

Der Grund für diese unterschiedlichen Befunde dürfte zum einen sein, dass die hier durchgeführten Untersuchungen in Lösung und die Elektronenmikroskopie und Röntgendiffraktometrie mit eingetrockneten Proben durchgeführt wurden. Entzieht man dem Dreikomponentensystem DMPC-Hyaluronsäure-Wasser eine Komponente, nämlich das

Wasser, so sind Wechselwirkungen der verbleibenden Komponenten unvermeidbar. Als Ergebnis kann festgestellt werden, dass es schwierig ist, von trockenen Proben auf das Verhalten von Molekülen in Lösung zu schließen. Bei den mittels Langmuir-Filmwaage festgestellten Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Lipiden und der Hyaluronsäure könnte es sich um einen reinen Grenzflächeneffekt handeln, der mit den hier eingesetzten Untersuchungstechniken nicht nachweisbar ist.

5.2 Wechselwirkungen von Hyaluronsäure mit DMPC-Doppelschichten an der Grenzfläche

Nachdem die Struktur der Lipide in Hyaluronsäurelösungen geklärt ist, sollen nun noch mögliche Wechselwirkung der beiden Stoffe an der Grenzfläche studiert werden. Als System dafür sollen DMPC-Doppelschichten, die auf SiO₂-Oberflächen geformt wurden, dienen. Argument für die Verwendung von SiO₂ als Untergrund ist, dass die Herstellung der Doppelschichten auf diesem Substrat eine bereits etablierte Technik darstellt [81]. Als Methoden zur Untersuchung der Grenzfläche dienen das Rasterkraftmikroskop (AFM) und die QCM-D.

Für die Präparation der Lipidfilme für die AFM-Messungen wurde ein Siliziumsubstrat mit Caroscher Säure gereinigt und anschließend für 30 Minuten in einer DMPC-Vesikel-Lösung inkubiert. Eine weitere Probe wurde nach der Lipidbeschichtung für zwei Stunden in einer 3,6 mg/ml Hyaluronsäurelösung inkubiert. Beide Proben wurden anschließend mittels AFM unter Flüssigkeit vermessen. Abbildung 5.10 und 5.11 zeigen die Ergebnisse.

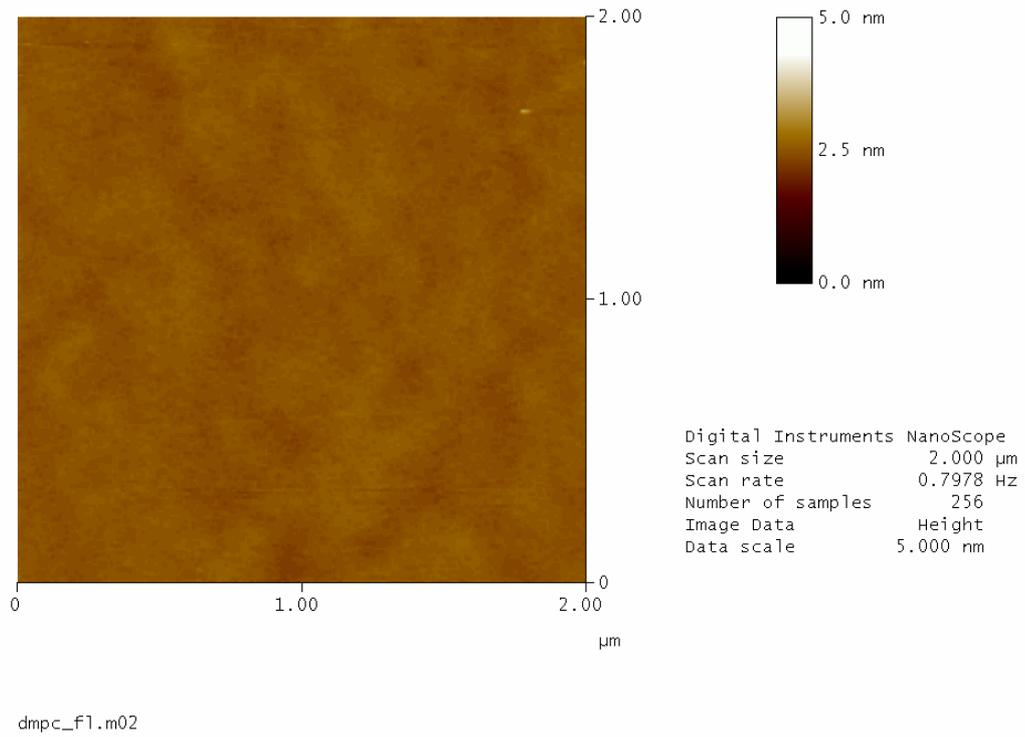


Abb. 5.10 AFM-Aufnahme einer DMPC-Doppelschicht unter Wasser

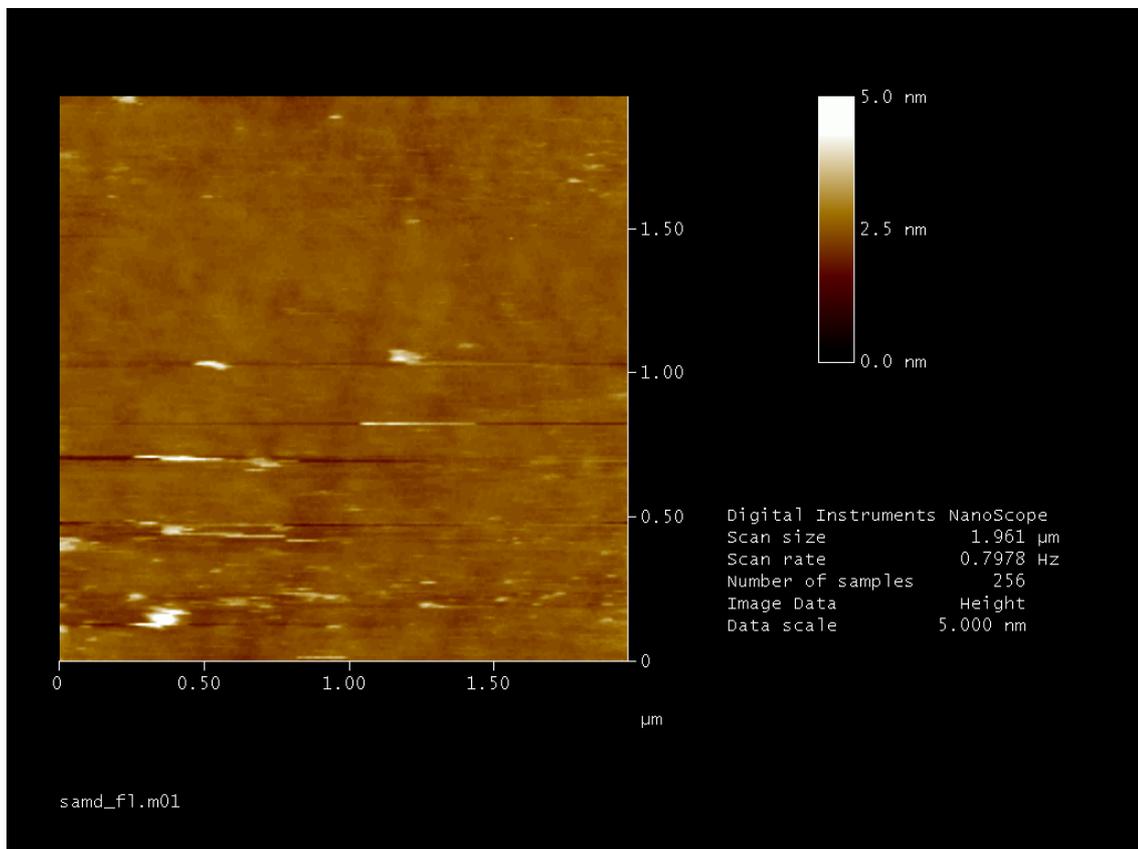


Abb. 5.11: AFM-Aufnahme einer DMPC-Doppelschicht unter Wasser nach zwei Stunden Inkubation in einer Hyaluronsäurelösung

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass die Probe ohne und mit Inkubation in einer Hyaluronsäurelösung sehr ähnlich aussieht. Dass es sich bei den Abbildungen der Höhenprofile um DMPC-Doppelschichten handelt, kann aus dem Vergleich zu /81/ geschlossen werden. Die Abbildungen der DMPC-Doppelschichten sehen den hier gezeigten Proben sehr ähnlich. Die Qualität der Messung in Abbildung 5.10 ist sehr gut, es ist deutlich ein über die gesamte Oberfläche geschlossener Lipidfilm zu erkennen.

Bei Abbildung 5.11 sind einige Störungen auf der Oberfläche erkennbar. Diese rühren aus einem zu starken Druck der AFM-Spitze gegen die Oberfläche. Der Druck lässt sich jedoch bei Messungen unter Flüssigkeit nur schwer steuern. Bei dem korrekt abgebildeten Teil sind jedoch die Ähnlichkeiten zu Abbildung 5.10 sehr hoch. Als quantitative Maßzahl aus den Abbildungen kann die Rauigkeit verglichen werden. Die Rauigkeit der Probe ohne Hyaluronsäureinkubation lag bei $4 \pm 0,8$ Ångstrom, die Probe mit der Hyaluronsäureinkubation bei $6 \pm 1,2$ Ångstrom. Die beiden Werte liegen dicht beieinander. Für einen ungeordneten Hyaluronsäurefilm wäre eine deutlich höhere Rauigkeit zu erwarten gewesen. Damit kann gezeigt werden, dass kein Hyaluronsäurefilm auf der Oberfläche adsorbiert wurde.

Als zweite Technik zum Studium der Wechselwirkungen kam die QCM-D zum Einsatz. Problem beim Einsatz dieser Technik ist, dass die Effekte zunächst nicht eindeutig der Grenzfläche oder der Volumenphase zugeordnet werden können. Um das Ergebnis klarer herausstellen zu können, wurden mit dem Polymer Polyethylenglykol Vergleichsmessungen durchgeführt. Dieses Polymer wurde gewählt, da es keine Ladungen besitzt und damit im Gegensatz zur Hyaluronsäure keine Colom Wechselwirkung zu erwarten ist. Beide Stoffe wurden sowohl einer DMPC-Doppelschicht als auch der reinen SiO₂-Unterlage ausgesetzt. Tabelle 5.1 zeigt die Ergebnisse der Versuche.

Tab. 5.1: Ergebnisse der Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen DMPC und Hyaluronsäure sowie DMPC und Polyethylenglykol

Hyaluronsäure auf DMPC			Polyethylenglykol auf DMPC	
Δf [Hz]	ΔD [10^{-6}]		Δf [Hz]	ΔD [10^{-6}]
0	2.5		-3	2
Hyaluronsäure auf SiO₂			Polyethylenglykol auf SiO₂	
Δf [Hz]	ΔD [10^{-6}]		Δf [Hz]	ΔD [10^{-6}]
-10	2.5		-3	2

Tabelle 5.1 zeigt zunächst, dass Polyethylenglykol sowohl mit der SiO₂-Oberfläche als auch dem DMPC-Film gleich wechselwirkt. Sowohl die Werte für die Frequenzverschiebung Δf als auch für die Dissipation ΔD sind auf DMPC und auf SiO₂ identisch. Dies könnte bedeuten, dass Polyethylenglykol mit beiden Oberflächen identische Wechselwirkungen eingeht oder es sich bei der Beobachtung um einen Volumeneffekt handelt. Etwas anders sieht es für die Hyaluronsäure aus. Beim Einspülen der Hyaluronsäure auf eine DMPC-Doppelschicht gibt es keine Frequenzverschiebung. Diese ist jedoch auf SiO₂ sichtbar. Der Dissipationseffekt hingegen ist auf beiden Unterlagen gleich.

Die reversible Frequenzverschiebung bei der Inkubation von Hyaluronsäure auf SiO₂ könnte darauf hinweisen, dass sich auf der Oberfläche Hyaluronsäureadsorbate bilden, die beim Ausspülen wieder abgelöst werden. Da bei der Inkubation der Hyaluronsäure auf dem DMPC-Film keine Frequenzverschiebung zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass keine Hyaluronsäure adsorbiert wurde. Bei der reversiblen Dissipationsänderung handelt es sich wahrscheinlich um einen Volumeneffekt.

Würde sich jedoch ein Hyaluronsäurefilm auf DMPC-Membranen bilden, so hätte es zu einer deutlichen, negativen Frequenzverschiebung kommen müssen. Dies konnte eindeutig nicht beobachtet werden. Somit bleibt festzustellen, dass auch mit der QCM-D keine Wechselwirkung zwischen Hyaluronsäure und DMPC beobachtet werden kann.

5.3 Oberflächenaktivität von DMPC und DPPC in Hyaluronsäurelösungen

In einem natürlichen Gelenk ist die Knorpelgrenzfläche mit dem Lipid DPPC bedeckt. Es stellt sich die Frage, ob das Lipid auch in Hyaluronsäurelösungen oberflächenaktiv ist. Um dies zu klären, kann die Adsorption von DMPC und DPPC einmal aus einem physiologischen Puffer und einmal aus einer gepufferten Hyaluronsäurelösung verglichen werden. Als Technik für diese Messungen wurde die QCM-D angewandt. Abbildung 5.12 zeigt das Ergebnis des Experiments für DMPC.

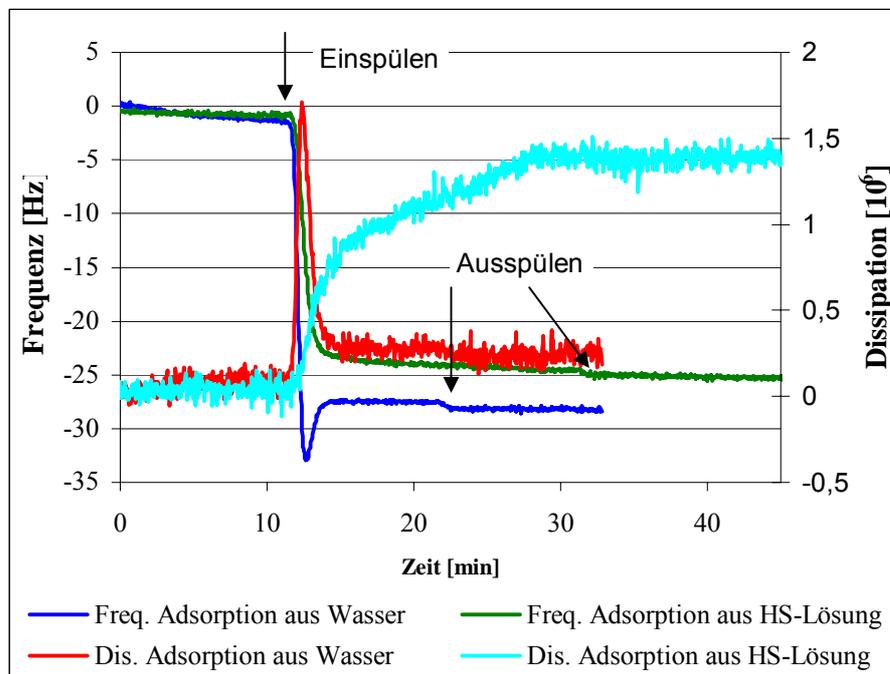


Abb. 5.12: Adsorption von DMPC (0,5 mg/ml) auf SiO₂ aus einem wässrigem Puffer (pH 7,4) und einer Hyaluronsäurelösung (3,6 mg/ml) bei 28°C, gemessen mittels QCM-D.

Abbildung 5.12 zeigt, dass DMPC in der Hyaluronsäurelösung vergleichbar oberflächenaktiv ist wie in einer wässrigen Lösung. Bei den Frequenzverschiebungen der beiden Systeme besteht ein Unterschied von nur 3 Hz. Dieser Unterschied rührt vermutlich aus teilweise nicht aufgeplatzten Vesikeln, die mit einer größeren Masse an der Oberfläche verbleiben und damit für eine größere Frequenzverschiebung sorgen.

Die Experimente wurden bei 28°C und damit oberhalb der Phasenübergangstemperatur von DMPC (24°C) durchgeführt. Diese ermöglicht ein Aufplatzen der Vesikel an der Grenzfläche. Die beobachtete Frequenzverschiebung von 25 bzw. 28 Hz entspricht der einer Lipid-Doppelschicht [81]. Die Ursache für den signifikanten Unterschied in der Dissipation dürfte wahrscheinlich mit den Eigenschaften der Volumenphase zu begründen sein. Vermutlich verursacht die Hyaluronsäurelösung die höhere Dissipation.

Die Experimente mit DPPC wurden ebenfalls bei 28 °C durchgeführt, dabei liegt das Lipid unterhalb seiner Phasenübergangstemperatur (41 °C) vor. Da für eine mögliche Wechselwirkung die Phosphocholingrouppe ausschlaggebend sein sollte, dürften somit auch für DPPC keine Wechselwirkungen mit Hyaluronsäure bestehen. Abbildung 5.13 zeigt die Ergebnisse der Versuche mit DPPC.

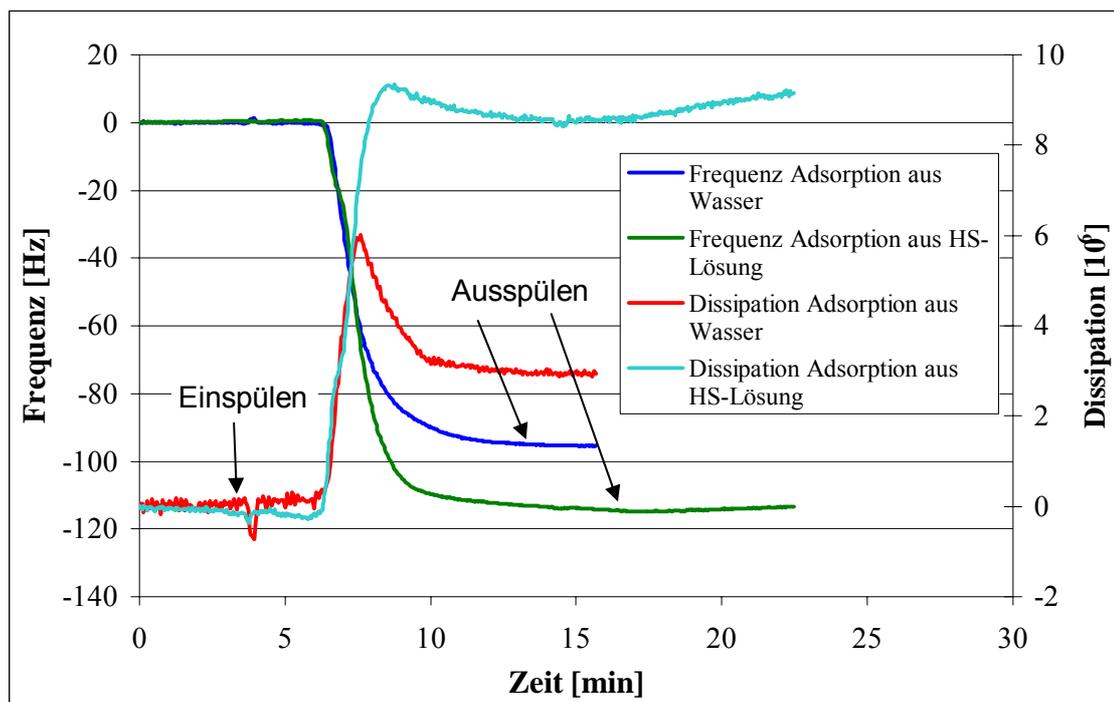


Abb. 5.13: Adsorption von DPPC (0,5 mg/ml) aus einem wässrigem Puffer (pH 7,4) und einer Hyaluronsäurelösung (3,6 mg/ml) bei 28°C

Wie Abbildung 5.13 zeigt, ist auch die Oberflächenaktivität von DPPC in wässriger Lösung vergleichbar mit der in Hyaluronsäurelösung. In der Frequenzverschiebung besteht ein Unterschied von ca. 20 Hz. Für beide Fälle liegt der Wert jedoch deutlich über der für eine Doppelschicht charakteristischen 25 Hz. Damit kann davon ausgegangen werden, dass intakte Vesikel an der Grenzfläche adsorbiert wurden.

Da die Temperatur während des Experimentes (28 °C) unterhalb der Phasenübergangstemperatur von DPPC (41 °C) lag, ist ein Aufplatzen der Vesikel auch nicht möglich. Der Unterschied in der Dissipation liegt wahrscheinlich wieder an den Eigenschaften der Hyaluronsäurelösung, die eine erhöhte Dissipation verursacht. Tabelle 5.2 zeigt die Resultate der Experimente noch einmal im Überblick.

Tab. 5.2: Überblick über Frequenz- und Dissipationsverschiebung zur Überprüfung der Oberflächenaktivität von DMPC und DPPC

System	Δf [Hz]	ΔD [10^{-6}]
DMPC in H ₂ O	-28	0,25
DMPC in Hyaluronsäurelösung	-25	1,40
DPPC in H ₂ O	-90	2,80
DPPC in Hyaluronsäurelösung	-115	9,00

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Lipide DMPC und DPPC vergleichbare Oberflächenaktivität in wässriger Lösung und in Hyaluronsäurelösung besitzen. DMPC ist in beiden Lösungen in der Lage, Doppelschichten zu bilden. DPPC, welches im Körper in der kristallinen Konformation vorliegt, adsorbiert in beiden Lösungen in dieser Konformation als intaktes Vesikel. Der Grund für das unterschiedliche Spreitungsverhalten der beiden Lipide bei 28°C ist in der jeweiligen Konformation (DMPC: L_α-Konformation; DPPC: L_c-Konformation) zu suchen. Ein Aufplatzen der Vesikel ist nur in der L_α, aber nicht in der L_c-Phase möglich.

Anhand dieser Ergebnisse kann nun überlegt werden, in welcher Form der Lipidfilm im realen Gelenk an der Grenzfläche haftet. Es ist nun bekannt, dass das Lipid DMPC als freies Vesikel in der Hyaluronsäurelösung vorliegt. Da DPPC die gleiche Kopfgruppe besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass auch DPPC als freies Vesikel in der Synovialflüssigkeit vorliegt. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass diese Vesikel an der Knorpelgrenzfläche adsorbieren und dann in dieser Form dort verharren.

Nach Hill et al. befinden sich ca. sieben Lipidmonolagen an der Knorpelgrenzfläche/56/. Er interpretierte dies als oligolamellare Lipidschichten, die übereinander liegen. Es ist aber auch durchaus vorstellbar, dass es sich nicht um lamellare Lipidschichten sondern

um adsorbierte Lipidvesikel handelt. In diesem Fall müsste das Boxmodell des Gelenks nach Hill (Abbildung 2.8) korrigiert werden:

Knochen
hyaliner Gelenkknorpel
DPPC-Vesikel
Gelenkspalt mit Synovialflüssigkeit
DPPC-Vesikel
hyaliner Gelenkknorpel
Knochen

Abb. 5.14: korrigiertes Boxmodell des Gelenks nach Hill et al.

5.4 Einfluss der Lipide auf die Viskosität von Hyaluronsäurelösungen

Nachdem die Wechselwirkungen zwischen den Lipiden und Hyaluronsäure aufgeklärt wurden, soll nun noch der Einfluss der Lipide auf die Viskosität der Synovialflüssigkeit aufgeklärt werden. Diese Untersuchungen wurden in Abhängigkeit von der Scherrate durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.3 bereits dargestellt, zeigt Hyaluronsäure ein scherverdünnendes Verhalten. Ausgehend von dieser Messung wurden die Lipide DMPC und DPPC in der Konzentration von 0,1 mg/ml (Konzentration im gesunden Gelenk), 1 mg/ml (Konzentration im erkrankten Gelenk) und 10 mg/ml einer Hyaluronsäurelösung von 3,6 mg/ml zugesetzt. Die Messungen wurden bei 37 °C durchgeführt. Abbildung 5.15 und 5.16 zeigen die Ergebnisse.

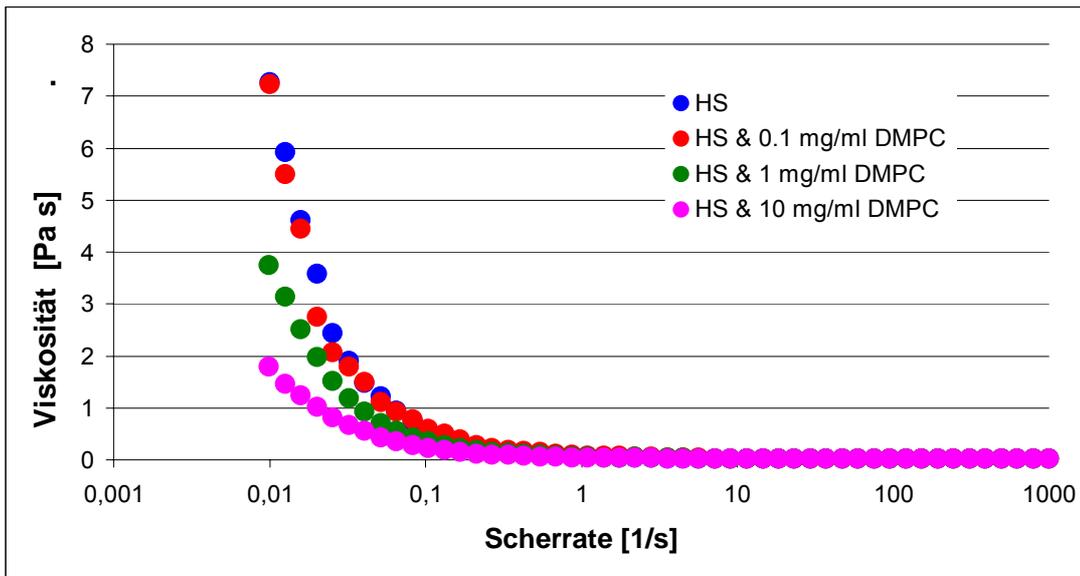


Abb. 5.15: Einfluss von DMPC auf die Viskosität einer Hyaluronsäurelösung

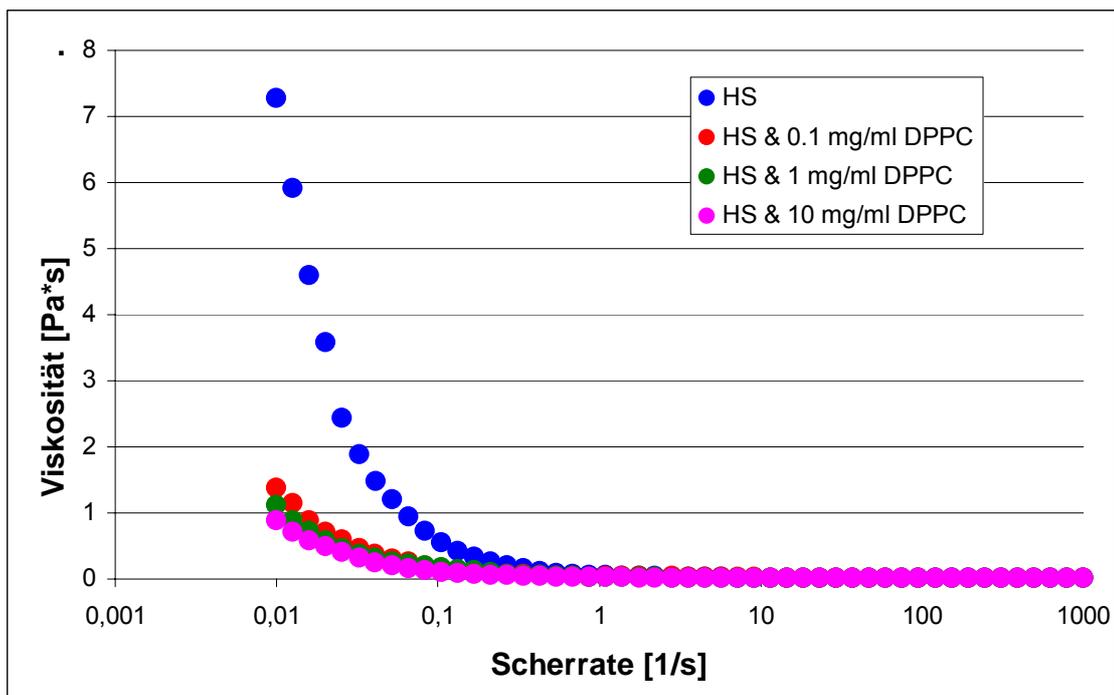


Abb. 5.16: Einfluss von DPPC auf die Viskosität einer Hyaluronsäurelösung

Wie obige Abbildungen zeigen, haben DMPC und DPPC unterschiedlichen Einfluss auf die Viskosität der Lösung. Am gravierendsten ist der Unterschied für die physiologische Konzentration von 0,1 mg/ml. Während DMPC nahezu keinen Einfluss auf die Viskosität hat, senkt DPPC die Viskosität deutlich. Für DMPC ist ein Effekt erst bei einer Konzentration von 1 mg/ml sichtbar.

Nun stellt sich die Frage, warum DPPC den größeren Einfluss hat. Eine Möglichkeit ist, dass die Konformation des Lipides eine Rolle spielt. Während des Experiments bei 37 °C lag DMPC in der L_{α} -Phase (Phasenübergangstemperatur 24 °C) und DPPC (Phasenübergangstemperatur 41°C), wie auch im Körper, in der L_c -Phase vor. Somit könnte es sein, dass das Lipid in der kristallinen Phase die besseren Schmierungseigenschaften hat.

Eine zweite mögliche Erklärung ist, dass sich bei niedriger Lipid-Konzentration Lipid an den Grenzflächen des Rheometers angelagert und dieses den Widerstand des Edelstahl-Zylinders bei der Drehbewegung senkt. Es ist daher auch möglich, dass sich wesentlich mehr DPPC als DMPC an der Grenzfläche angelagert hat (vgl. Abschnitt 5.3). Dies hätte ein vermindertes Drehmoment und damit eine scheinbar sinkende Viskosität der Lösung zur Folge. In Abschnitt 5.3 wurde bereits gezeigt, dass DMPC und DPPC unterschiedliches Adsorptionsverhalten aus Hyaluronsäurelösungen zeigen.

Die hier im zweiten Fall aufgezeigte Situation würde jedoch genau den Gegebenheiten im natürlichen Gelenk entsprechen. Im intakten Gelenk befindet sich eine geringe Lipidkonzentration in der Synovialflüssigkeit (0,15 mg/ml /5/) und Lipidmultilagen oder -vesikel (vgl. Diskussion Abschnitt 5.3) an der Knorpelgrenzfläche. Diese Situation würde der Kurve von 0,1 mg/ml DPPC (Abbildung 5.16) entsprechen, da hier unter den genannten Bedingungen die Schmierung gut ist. Im rheumatischen Gelenk befindet sich eine hohe Konzentration Lipid (1 mg/ml /5/) in der Synovialflüssigkeit und eine geringe Konzentration Lipid an der Knorpelgrenzfläche (vgl. Überschlagsrechnung Abschnitt 2.5). Gleichzeitig sind die Schmiereigenschaften schlecht. Dies entspricht genau der Kurve von 1 mg/ml DMPC (Abbildung 5.15).

Vergleicht man die beiden Kurven, so stellt man fest, dass die „scheinbare“ Viskosität im Falle von 0,1 mg/ml DPPC deutlich geringer als die von 1 mg/ml DMPC ist. Da sich vermutlich deutlich mehr DPPC als DMPC an der Rotatorgrenzfläche befindet, kann geschlossen werden, dass der Schmiereffekt der Lipide im Gelenk (vgl. Abschnitt 2.5) vermutlich von der Beladung der Knorpelgrenzfläche mit Lipid herrührt und das Lipid in der Volumenphase keinen schmierenden Effekt hat. Dies würde mit den Beobachtungen von /58 – 60/ übereinstimmen und die Theorie der Grenzflächenschmierung (vgl. Abschnitt 2.2 und besonders /13/) stützen.

Abschließend kann jedoch festgestellt werden, dass DPPC gegenüber DMPC bei der physiologischen Konzentration von 0,1 mg/ml den größeren Schmierungs-effekt besitzt. Ob dieser Effekt durch die Konformation des Lipides oder durch Grenzflächenschmierung hervorgerufen wurde, kann nicht zweifelsfrei gezeigt werden.

Neben den Messungen an Mischungen aus Hyaluronsäure und den Lipiden wurde auch versucht, die Viskosität des Puffers und der Lipide im Puffer zu ermitteln. Die Viskosität dieser Lösungen befand sich jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode.

6. Ergebnisse Teil 2: Charakterisierung von Lipidmembranen auf Polyelektrolytoberflächen

Wie in Abschnitt 2.6 erläutert wurde, besteht das Modellsystem zur Untersuchung der Schmierungseigenschaften der Gelenke aus einem Lipidfilm, der auf eine Polyelektrolytunterlage aufgebracht wird. Da die Herstellung solcher Lipidfilme noch keine etablierte Technik darstellt, war die Entwicklung der Präparation ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Deswegen wird diesem Gebiet ein eigener Abschnitt gewidmet.

Bestrebungen, Lipide auf festen Grenzflächen zu immobilisieren, gibt es seit ca. 15 Jahren. 1991 publizierten Johnson et. al die Formierung einer Lipid-Doppelschicht auf einem Quarz-Substrat /104/. Diese Präparation wurde von Richter et. al /81/ und Decher et. al /105/ intensiv studiert, insbesondere mit der QCM-D. Sie fanden übereinstimmend heraus, dass die Ausbildung einer Lipid-Doppelschicht einer Frequenzverschiebung von 25 Hz entspricht. Seit 1998 wurden einige Publikationen veröffentlicht, die sich mit der Herstellung von Lipid-Doppelschichten auf verschiedenen Polymerfilmen beschäftigen.

Majewski et. al versuchten, DMPC-Doppelschichten auf einem PEI-Untergrund zu formen. Sie fanden jedoch zunächst eine komplexere Struktur, bestehend aus intakten Vesikeln und Lipidmultilagungen aus mehreren Doppelschichten /106/. Später fanden sie heraus, dass Doppelschichten auf PEI gebildet werden können, wenn dieses vorher getrocknet wurde /107/.

Knoll et al. untersuchten die Formierung von Lipidfilmen auf Polyelektrolytfilmen in Abhängigkeit von der Vesikelladung. Sie beobachteten eine Lipiddoppelschicht aus negativ geladenen Dimiristoyl-L-a-phosphatidylglycerol (DMPG) und DMPC/DMPG Mischungen, auf der sich jedoch eine zweite Lipidlage befand /108/. Krastev et. al berichteten 2005 von einer Sandwich-Struktur, in der ein Lipidfilm von Polyelektrolyten eingeschlossen wurde. Sie bildeten hierzu eine DMPC-Doppelschicht auf der negativ-terminierten PSS-Oberfläche und adsorbierten wiederum einen PSS-Film auf der Doppelschicht /109/. Die Bildung von DMPC-Doppelschichten auf PSS-terminierten Grenzflächen konnte jedoch durch die eigene Arbeit nicht bestätigt werden.

6.1 Bildung von DMPC-Doppelschichten

Nachdem auf negativ terminierten PSS-Filmen nur die Adsorption intakter Vesikel beobachtet werden konnte, wurde versucht, Doppelschichten auf der positiv terminierten PAH-Grenzfläche zu bilden. In ersten Versuchen wurde festgestellt, dass die Ionenkonzentration in der Vesikellösung entscheidenden Einfluss auf die Bildung der Lipidmembranen hat. Wird DMPC in reinem Wasser gelöst, so kann nur die Adsorption intakter Vesikel beobachtet werden. Enthält die Lösung jedoch 0,15 mol/l Natriumchlorid, so platzen die Vesikel an der Grenzfläche auf. Dies lässt sich mit Hilfe der QCM-D beobachten (siehe Abbildung 6.1).

Nach der Adsorption der Vesikel werden ein Frequenzminimum und ein Dissipationsmaximum erreicht. Nach Durchschreiten des Minimums steigt die Frequenz wieder an. Der Grund dafür ist, dass durch das Aufplatzen der Vesikel Lipidmoleküle und Wasser von der Grenzfläche desorbieren und freigesetzt werden. Der Dissipationsverlauf ist genau konträr zum Frequenzverlauf. Die Dissipation steigt zunächst stark an, da die vesikelbehaftete Oberfläche eine diffuse, inhomogene Schicht bildet. Bei Beginn des Aufplatzens der Vesikel sinkt die Dissipation, da eine stabile Schicht mit geringerer Elastizität gebildet wird.

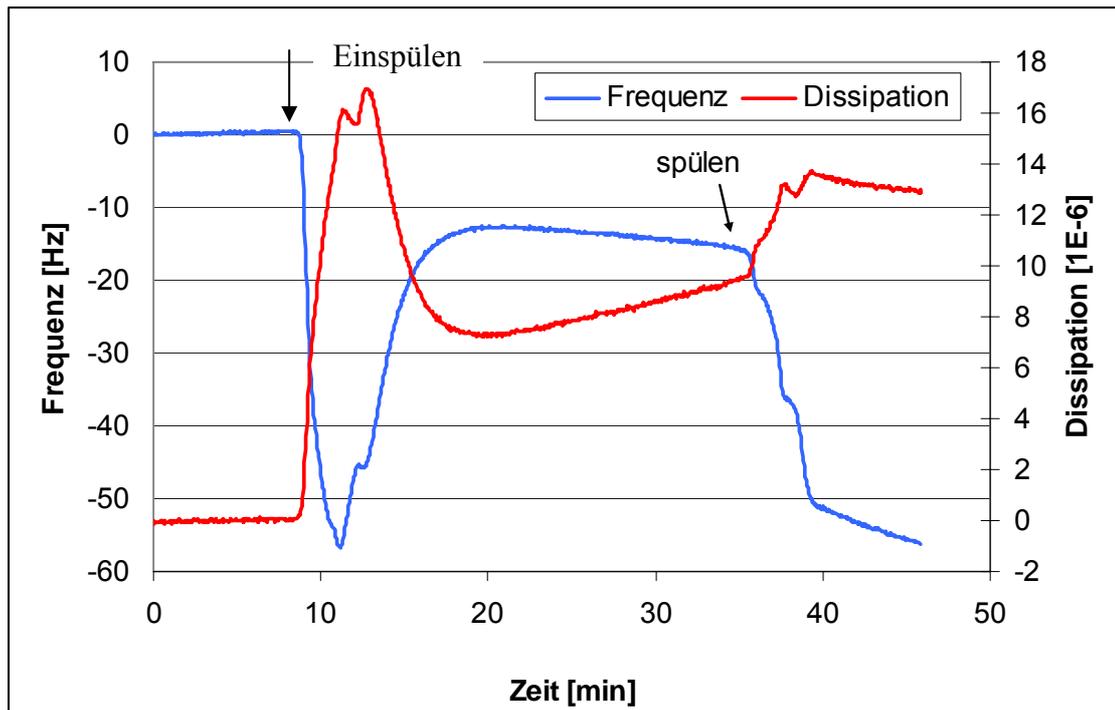


Abb. 6.1: Adsorption von 0,5 mg/ml DMPC-Vesikeln, in 0,15 mol/l NaCl gelöst, gemessen mittels QCM-D bei 28°C. Nach dem Einspülen der Vesikel setzt eine schnelle Adsorption ein. Das Durchschreiten eines Frequenzminimums indiziert den Beginn des Aufplatzens der Vesikel. Nach dem Ausspülen der Vesikel mit 0,15 mol/l NaCl gibt es abermals einen starken Frequenzabfall.

Abbildung 6.1 zeigt, dass die DMPC-Vesikel an der PAH-Grenzfläche adsorbieren und auch aufplatzen. Die Frequenzverschiebung ist mit ca. 15 Hz jedoch etwas geringer, als man sie für eine Doppelschicht (25 Hz) erwarten würde. Eine Erklärung dafür könnte eine unvollständige Bedeckung der Oberfläche mit Lipid sein. Ein Problem wird jedoch beim Ausspülen der Vesikel sichtbar. Die Frequenz fällt deutlich ab. Was diesen Abfall verursacht, kann bisher nicht erklärt werden. Da mit einer 0,15 mol/l Natriumchloridlösung ausgespült wurde, sind keine Moleküle, die an der Grenzfläche adsorbieren, in der Lösung vorhanden. Zudem wurde der Effekt auch festgestellt, wenn nur mit reinem Wasser ausgespült wurde. Da die Frequenz beim Ausspülen jedoch nicht stabil ist, kann vermutet werden, dass der Lipidfilm beschädigt wird.

Ein analoges Experiment wurde auch mittels Röntgenreflektometrie durchgeführt. Dafür wurde zunächst ein Polyelektrolytfilm in gesättigter Wasserdampf Atmosphäre als Referenz vermessen, anschließend die Probe für eine Stunde bei 30°C in der Vesikellösung

inkubiert, mit 0,15 mol/l NaCl gespült und die Probe erneut vermessen. Abbildung 6.2 zeigt das Ergebnis der Messung.

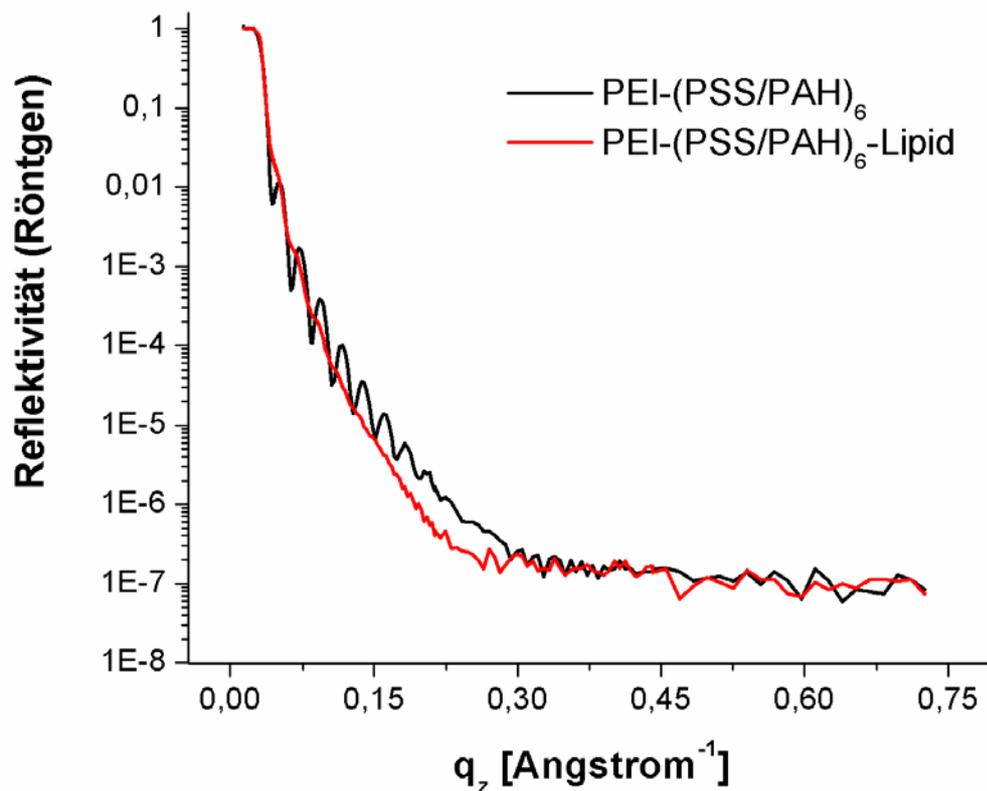


Abb. 6.2: Röntgenreflektometriemessung eines DMPC Films. Es ist deutlich sichtbar, dass nach dem Inkubieren in der Lipidlösung und Spülen 0,15 mol/l NaCl-Lösung die Amplitude der Kiessig-Ozillationen deutlich reduziert und darüber hinaus die Positionen der Minima nach kleineren q_z -Werten verschoben sind.

Abbildung 6.2 bestätigt die Vermutung, dass der Lipidfilm beim Spülen beschädigt wird. Nach der Lipidbeschichtung verliert der Film fast vollständig die Kiessig-Oszillationen. Dies indiziert einen ungeordneten Film von niedriger Qualität. Eine quantitative Anpassung (Fit) lässt diese Kurve nicht zu. Der Polyelektrolytfilm dürfte kaum beschädigt worden sein, da diese Filme in wässrigen Medien außerordentlich stabil sind. Die Rauigkeit von Polyelektrolytfilmen nimmt nur durch langes Inkubieren in organischen Lösungsmittel zu. Somit ist die Präparation der DMPC-Filme in 0,15 mol/l Natriumchloridlösung keine Möglichkeit für den Einsatz in der Neutronenreflektometrie.

Im Folgenden wurde versucht die Präparation zu verfeinern, denn mit dem Spreiten der Vesikel wurde ein wesentlicher Schritt zur Bildung von Doppelschichten erreicht. Eine

Variante dabei war es, der Lösung zusätzlich zum Natriumchlorid eine geringe Konzentration Calciumchlorid zuzusetzen. Dabei wurde die physiologische Konzentration von 0,002 mol/l gewählt. Abbildung 6.3 zeigt die mittels QCM-D beobachtete Adsorption.

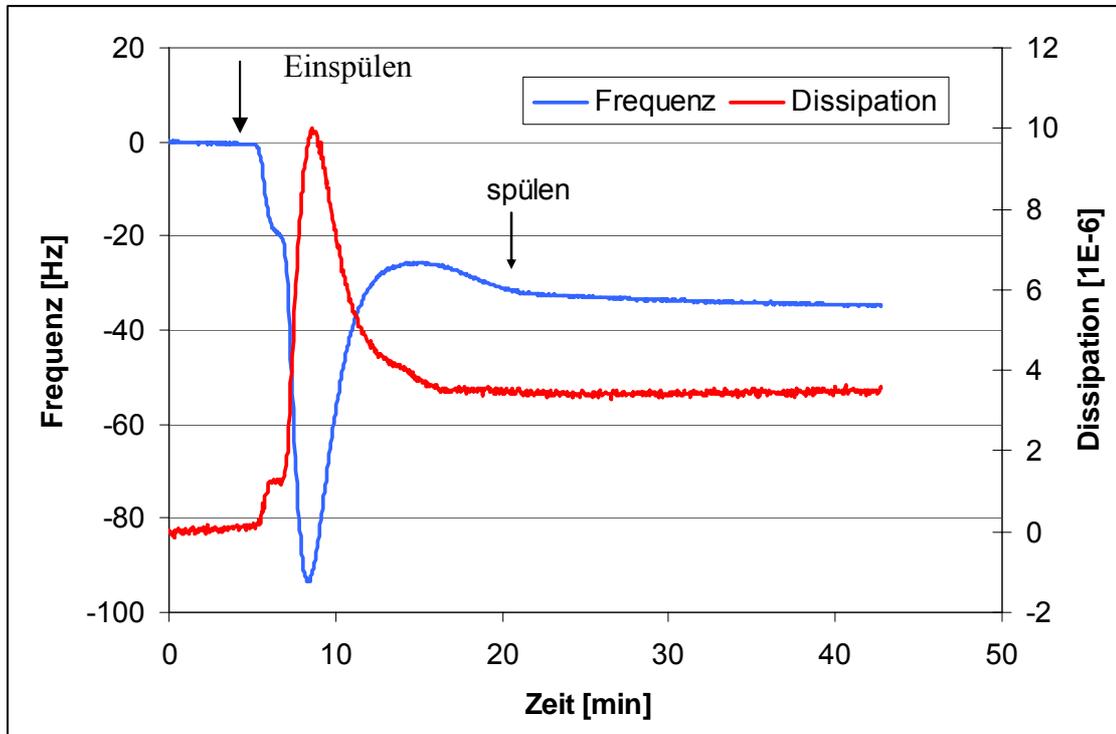


Abb. 6.3: Adsorption von 0,5 mg/ml DMPC-Vesikel, gelöst in 0,15 mol/l NaCl und 0,002 mol/l CaCl₂, gemessen mittels QCM-D bei 28 °C Die Kurve erreicht ein sehr ausgeprägtes Frequenzminimum von fast -100 Hz. Danach steigt die Kurve wieder auf -25 Hz an. Dies entspricht dem erwarteten Wert für eine Doppelschicht. Nach einer leichten Drift stabilisiert sich die Kurve beim Spülen mit einer 0,15 mol/l NaCl und 0,002 mol/l CaCl₂-Lösung.

Abbildung 6.3 zeigt, dass der Lipidfilm bei einer zusätzlichen Verwendung von Calciumchlorid stabil ist. Das ausgeprägte Frequenzminimum zeigt, dass die Vesikel an der Grenzfläche aufplatzen. Die Calciumionen haben einen stabilisierenden Effekt auf den Lipidfilm. Beim Ausspülen der Vesikel ist die Frequenz nun stabil. Doch was macht den stabilisierenden Effekt aus? Darüber kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass das bivalente Calcium zwei benachbarte Lipidmoleküle über die Phosphatgruppe miteinander vernetzt und das Calcium so in den Film eingebaut wird.

Auch dieses Experiment wurde mittels Röntgenreflektometrie durchgeführt. Abbildung 6.4 zeigt das Ergebnis des Versuches.

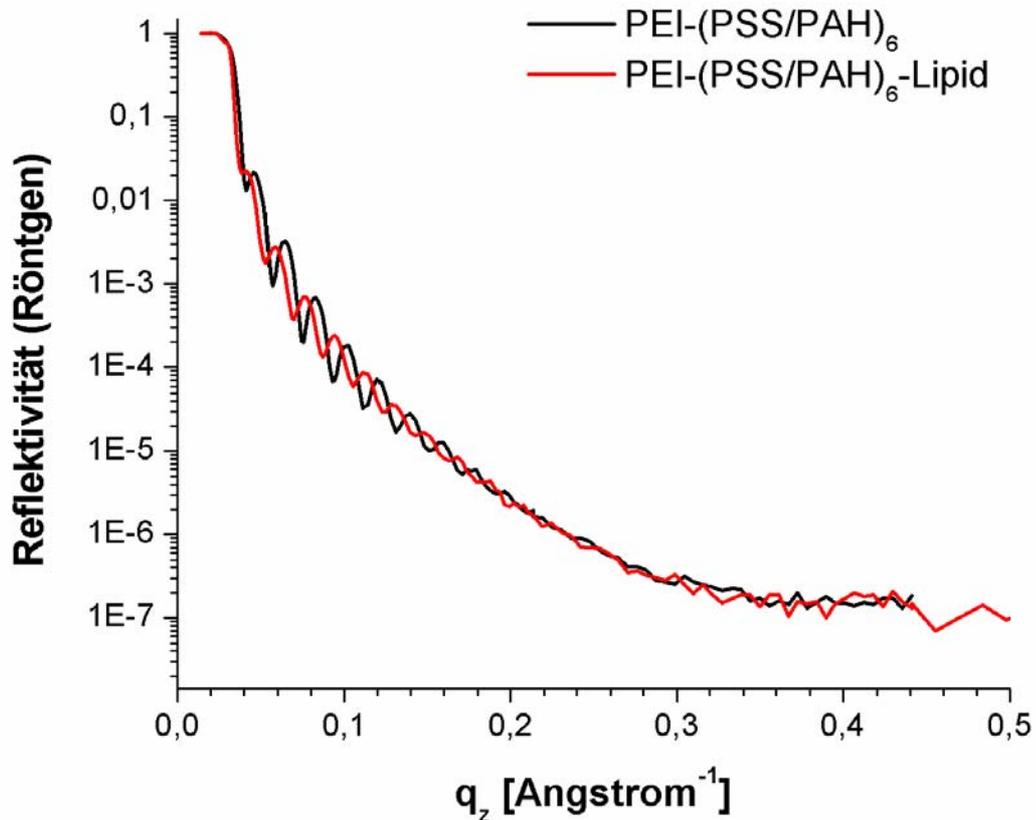


Abb. 6.4: Röntgenreflektometriemessung eines DMPC-Films. Die Probe wurde eine Stunde bei 30 °C in einer 0,5 mg/ml Vesikellösung mit 0,15 mol/l NaCl und 0,002 mol/l CaCl₂ inkubiert. Die schwarze Kurve stellt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm dar. Die rote Kurve nach der Inkubation zeigt eine deutliche Linksverschiebung in den Kiessig-Oszillationen, was auf eine Schichtdickenzunahme hinweist. Der Fit ergibt eine Schichtdicke des Lipidfilms von 26,5 Å. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.1.

Die Röntgenmessung zeigt, wie auch schon die QCM-D-Messung, eine deutliche Verbesserung der Qualität des Lipidfilms. Nach der Inkubation der Probe in der Vesikellösung bleiben die Kiessig-Oszillationen erhalten und verschieben sich nach links. Auch die Amplitude der Oszillationen bleibt in etwa erhalten, was auf eine gute Qualität des Lipidfilms hinweist. Der Fit ergab mit 26,5 Å einen geringeren Wert, als für eine Doppelschicht zu erwarten wäre (40 – 50 Å). Eine mögliche Ursache könnte sein, dass der

Film in gesättigter Wasserdampf Atmosphäre weniger Wasser enthält als wenn unter Wasser. Die Streulängendichten des Polyelektrolytfilms und des Lipidfilms unterscheiden sich nicht, sie liegen bei $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-2}$. Dies war so zu erwarten, da zwischen verschiedenen Kohlenwasserstoffen kein nennenswerter Unterschied in den Röntgenstreu-
längendichten besteht. Die Rauigkeiten des Polyelektrolytfilms ($19,2 \text{ \AA}$) sowie des Lipidfilms ($6,0 \text{ \AA}$) liegen im Bereich des zu erwartenden und sind physikalisch sinnvoll.

Zusätzlich zur QCM-D und Röntgenreflektometrie wurde die Adsorptionskinetik noch mittels *in situ*-Ellipsometrie gemessen. Abbildung 6.5 zeigt das Ergebnis.

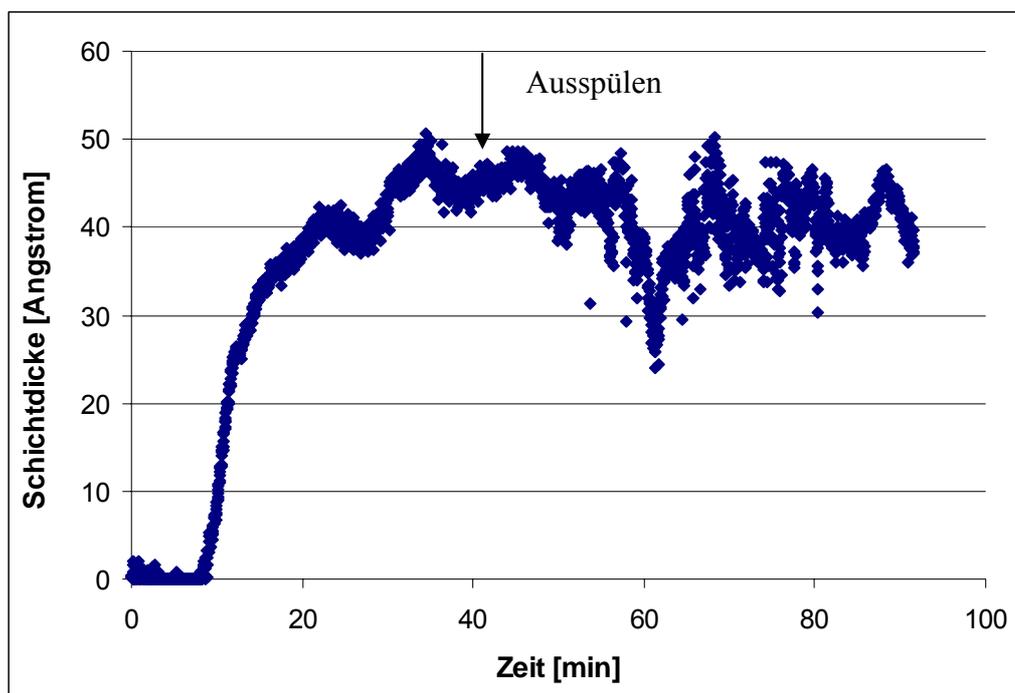


Abb. 6.5: Adsorption von DMPC auf einer positiv terminierten PAH-Oberfläche. Die gemessene Schichtdicke liegt mit 45 \AA in dem Bereich, der für eine Lipid-Doppelschicht zu erwarten ist.

Abbildung 6.5 zeigt, dass die *in situ*-Ellipsometrie erfolgreich eingesetzt werden kann, um Adsorptionskinetiken von Lipiden zu bestimmen. Die gemessene Schichtdicke des Lipidfilms beträgt in etwa 45 \AA . Die Basislinie nach der Adsorption zeigt starke Fluktuationen, welche durch das Ausspülen der Lipidvesikel hervorgerufen wurden.

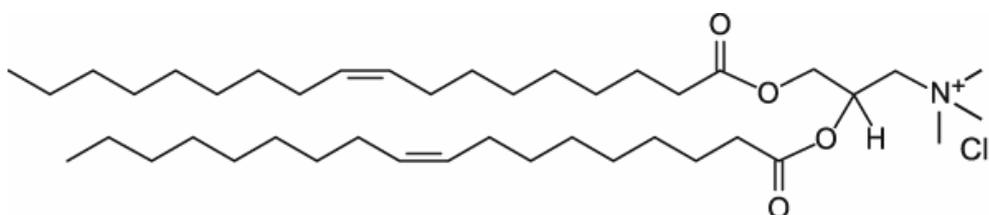
Abschließend kann festgestellt werden, dass die Bildung von DMPC-Doppelschichten auf positiv terminierten PAH-Grenzflächen stark von der Ionenkonzentration der Lö-

sung abhängt. Werden die Vesikel nur in Wasser gelöst, so platzen diese an der Grenzfläche nicht auf. Löst man die Liposomen in einer 0,15 mol/l Natriumchloridlösung, so platzen diese auf und bilden vermutlich zunächst Doppelschichten. Beim Spülen der Filme werden diese jedoch zerstört. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von 0,002 mol/l Calciumchlorid vermieden werden.

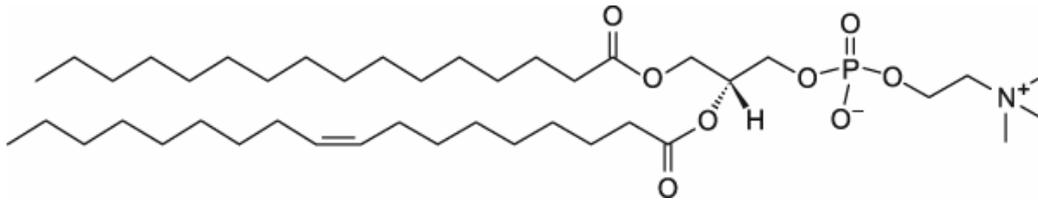
6.2 Bildung von Lipid-Doppelschichten aus POPC und DOTAP

Während Neutronenstreuungsmessungen stellte sich heraus, dass das DMPC nicht reproduzierbar in gewünschter Qualität auf die Polyelektrolytfilme aufgebracht werden kann. Eine mögliche Ursache dafür könnten die großen Probenflächen und –volumina, die für Neutronenmessungen notwendig sind. Somit stellte sich die Frage nach einem stabileren System. Dabei wurden zwei Punkte in Betracht gezogen. Zum einen sollte zunächst das Problem der Temperaturabhängigkeit der Filmbildung umgangen werden. Dafür ist ein Lipid geeignet, welches keinen Phasenübergang besitzt. Die Wahl fiel dafür auf 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC), welches einen ungesättigten Fettsäurerest aufweist. Als funktionelle Gruppe besitzt es wie DMPC und DPPC die Phosphocholingruppe.

Als zweiter Punkt sollten die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den Liposomen und der Oberfläche erhöht werden. Ein Hauptproblem bei der Filmbildung mit dem zwitterionischen DMPC ist, dass es nach außen keine Ladung besitzt und somit nur schwache elektrostatische Anziehungskräfte zwischen der Oberfläche und den Vesikeln existieren. Eine Möglichkeit, die Anziehungskräfte zu erhöhen, besteht darin, ein geladenes Lipid unterzumischen. Zu diesem Zweck wurde das kationische Lipid 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DOTAP) eingesetzt. Abbildung 6.6 zeigt die Struktur von POPC und DOTAP.



1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DOTAP)



1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC)

Abb. 6.6: Struktur von DOTAP und POPC

Als Ausgangspunkt wurde zunächst die Filmbildung von reinem DOTAP beobachtet. Dafür wurde ein PSS-terminierter Polyelektrolytfilm mit einer negativ geladenen Oberfläche 30 Minuten in einer DOTAP-Lösung inkubiert. Die Lösung enthielt keine Salze. Abbildung 6.7 zeigt das Ergebnis der Röntgenmessung.

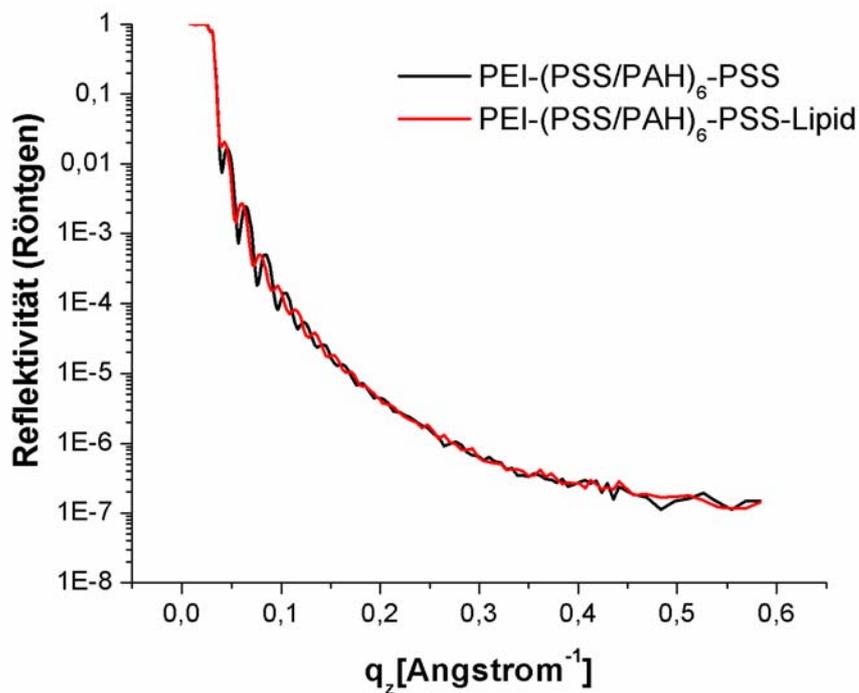


Abb. 6.7: Röntgenreflektometriemessung eines DOTAP-Films. Die schwarze Kurve zeigt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm. Die rote Kurve nach der Inkubation zeigt eine Linksverschiebung in den Kiessig-Ringen, was auf eine Schichtdickenzunahme hinweist. Der Fit ergibt eine Schichtdicke des Lipidfilms von 20 Å. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.1.

Abbildung 6.7 zeigt, dass sich ein DOTAP-Film auf der negativ terminierten PSS-Grenzfläche gebildet hat. Die Schichtdicke war, wie auch schon bei DMPC, geringer, als für eine Doppelschicht zu erwarten wäre. Es ist wahrscheinlich, dass der Film weniger Wasser enthält, als wenn er vollständig von Flüssigkeit bedeckt ist. Wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Messung sind zum einen die Linksverschiebung der Kiesig-Oszillationen und die Beibehaltung ihrer Amplitude im Vergleich zur Referenzmessung. Beide Kriterien werden von der Messung erfüllt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein qualitativ hochwertiger DOTAP-Film auf den Polyelektrolyten präpariert wurde. Die Streulängendichten des Polyelektrolytfilms und des Lipidfilms unterscheiden sich erneut nicht, sie liegen bei $1,25 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-2}$. Dies war so zu erwarten, da zwischen verschiedenen Kohlenwasserstoffen kein nennenswerter Unterschied in den Röntgenstreulängendichten besteht. Die Rauigkeiten des Polyelektrolytfilms (23,2 Å) sowie des Lipidfilms (5,7 Å) liegen im Bereich des zu erwartenden und sind physikalisch sinnvoll.

Jedoch war es nicht das Ziel, die Neutronenstrommessungen mit vollständig geladenen Lipiden durchzuführen, da dies nicht den Gegebenheiten im natürlichen Gelenk entspricht. So wurde im Folgenden schrittweise versucht, die Ladung der Vesikel durch Beimischen von POPC zu verringern. Dafür wurde als nächstes die Filmbildung mit Liposomen, welche je zu 50% aus DOTAP und POPC bestehen, untersucht. Abbildung 6.8 zeigt das Ergebnis der Röntgenmessung.

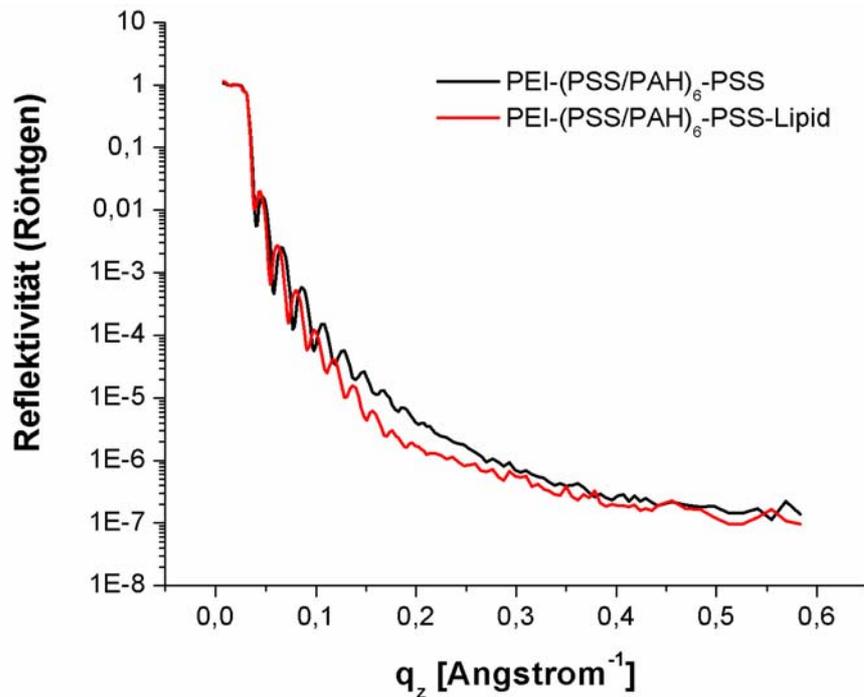


Abb. 6.8: Röntgenreflektometriemessung eines DOTAP/POPC 1:1 Films. Die schwarze Kurve zeigt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm und die rote Kurve nach der Inkubation in der Vesikellösung. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.1.

Wie in Abbildung 6.8 zu sehen ist, kann mit einer Mischung von je 50% DOTAP und POPC ein Lipidfilm gebildet werden. Der Fit ergab wie schon beim DOTAP-Film eine Schichtdicke von 29 Angstrom. Auffällig in der Reflektivitätskurve ist ein leicht veränderter Kontrast im Vergleich zu den vorhergehend diskutierten Kurven. Die Kurve verliert schneller an Intensität mit steigenden q_z im Vergleich zu der Referenzmessung. Der Lipidfilm ($2,1 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-2}$) besitzt eine deutlich höhere Streulängendichte als der Polyelektrolytfilm ($1,56 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-2}$). Die Ursache hierfür ist unklar, da bei den anderen Messung der Effekt nicht auftrat, aber sehr ähnliche Systeme präpariert wurden. Nichts destoweniger gab es eine Linksverschiebung der Kiessig-Oszillationen und auch ihre Amplitude ist vergleichbar mit der der Referenzmessung. Die Probe wurde 15 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gesamtlipidkonzentration betrug 0,5 mg/ml.

Um noch näher an die Gegebenheiten im natürlichen Gelenk heranzureichen, wurde nun die Filmbildung mit Vesikeln aus 80% POPC und 20% DOTAP versucht. Abbildung 6.9 zeigt das Ergebnis der Messung.

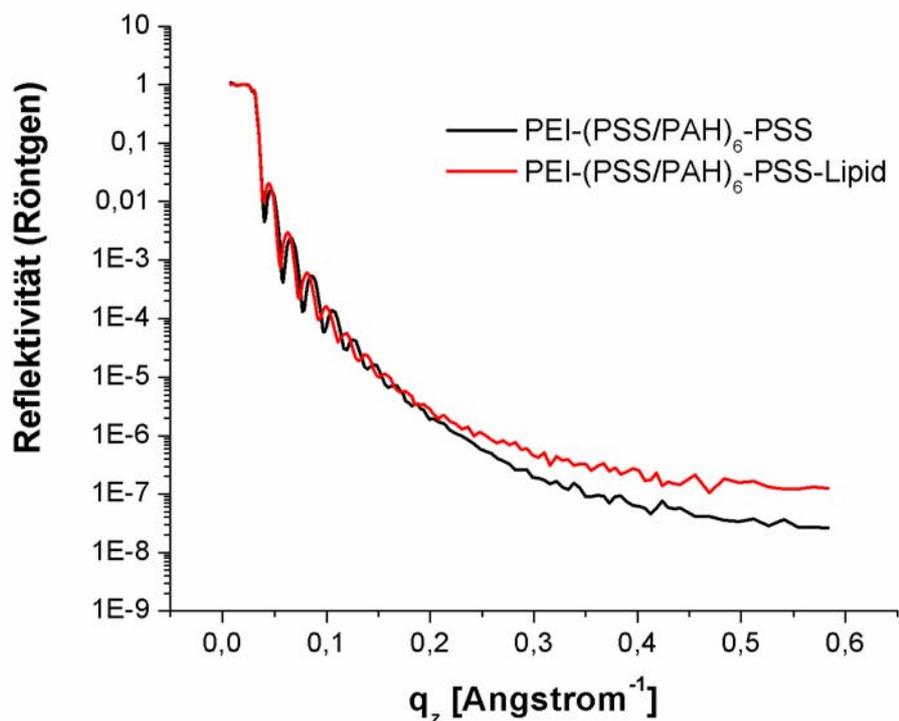


Abb. 6.9: Röntgenreflektometriemessung eines DOTAP/POPC 1:4 Films. Die schwarze Kurve zeigt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm und die rote Kurve nach der Inkubation in die Vesikellösung. Der Fit ergibt eine Schichtdicke des Lipidfilms von 20 Å. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.1.

Abbildung 6.9 zeigt, dass auch mit der 80% POPC und 20% DOTAP-Mischung erfolgreich Lipidfilme geformt werden können. Der Fit erreicht allerdings nur noch die Hälfte des zu erwartenden Wertes von 40 Angstrom Schichtdicke. Die Probe wurde 12 Stunden in der Lipid-Lösung inkubiert.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Bildung von Lipid-Membranen und Verwendung von POPC und DOTAP auch auf großen Substraten, wie sie für die Neutronenreflektometrie benötigt werden, möglich ist. Dabei können die Vesikel bis zu einem Verhältnis 4:1 POPC:DOTAP miteinander gemischt und damit geordnete Lipidmembranen geformt werden. Bei höheren POPC-Anteilen können jedoch nur noch intakte Vesikel adsorbiert werden. Dies wurde mittels Ellipsometrie untersucht. Dafür wurden die Polyelektrolytfilme über Nacht in den Lipidproben inkubiert, die Proben anschließend in 100% gesättigter Wasserdampf-atmosphäre equilibriert und innerhalb von einer Minuten an Luft vermessen. Abbildung 6.10 zeigt das Ergebnis. Um die Ladungen

nicht abzuschirmen, wurden alle Lipidlösungen salzfrei hergestellt. Für die Herstellung der POPC-haltigen Membranen muss der Inkubationstemperatur keine Beachtung geschenkt werden, da nur ein der L_{α} -Phase existiert. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

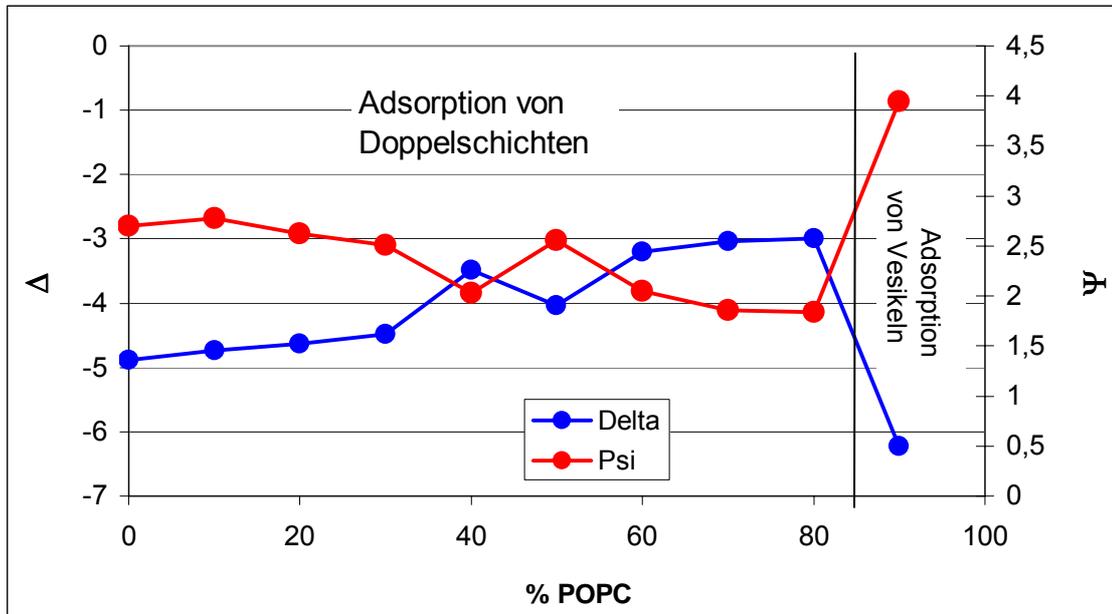


Abb. 6.10: Ψ und Δ -Werte von Ellipsometriemessungen von POPC/DOTAP-Mischungen auf einem PEI-(PSS/PAH)6-PSS Polyelektrolytfilm bei einer Wellenlänge von 601 nm. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei gesättigter Wasserdampf Atmosphäre eingetrocknet. Die Proben wurden anschliessend an Luft vermessen. Es wurden die Ψ und Δ -Wertedifferenz vor und nach der Inkubation aufgetragen, da der Brechungsindex der Lipidfilme unbekannt war und ein Fit mit der Cauchy-Funktion daher keinen Sinn macht.

Abbildung 6.10 lässt den Schluss zu dass in dem System POPC/DOTAP bis 80 % POPC-Anteil Doppelschichten gebildet werden und bei höheren Anteilen intakte Vesikel adsorbiert werden. Da die Proben hier im trocknen vermessen wurden, stellen diese Messungen nur eine sehr grobe Näherung dar. Es wurden nur die Ψ und Δ -Werte, welche zur Massenabscheidung proportional sind, betrachtet, da die Brechungsindizes der Lipidfilme unbekannt sind. Zunächst ist sichtbar, dass die adsorbierte Masse von 100% DOTAP (0% POPC) zu 20 %DOTAP (80% POPC) leicht abnimmt, was mit einer sinkenden Packungsdichte der Lipidfilme erklärt werden kann. Bei 10 % DOTAP (90% POPC) steigt die Ψ und Δ -Wertedifferenz sprunghaft an, was mit einer deutlich erhöh-

ten Massenabscheidung zu erklären ist. Die schlüssigste Erklärung dafür ist, dass Vesikel anstelle von Doppelschichten an der Grenzfläche haften.

6.3 Bildung von Lipid-Doppelschichten aus DMPC und DOTAP

Nachdem ein Lipidsystem aufgebaut wurde, bei dem kein Phasenübergang stattfindet und so der Inkubationstemperatur keine Beachtung geschenkt werden muss, soll diese Forderung nun fallen gelassen werden. Dafür werden im Folgenden Versuche beschrieben, Lipidmembranen unter Verwendung von DMPC und DOTAP aufzubauen. Das kationische DOTAP soll dazu dienen, verstärkte elektrostatische Anziehungskräfte zwischen dem Lipid und der Polyelektrolytoberfläche zu produzieren. Abbildung 6.11 zeigt zunächst eine Röntgenmessung mit einer Mischung aus 50% DMPC und 50% DOTAP.

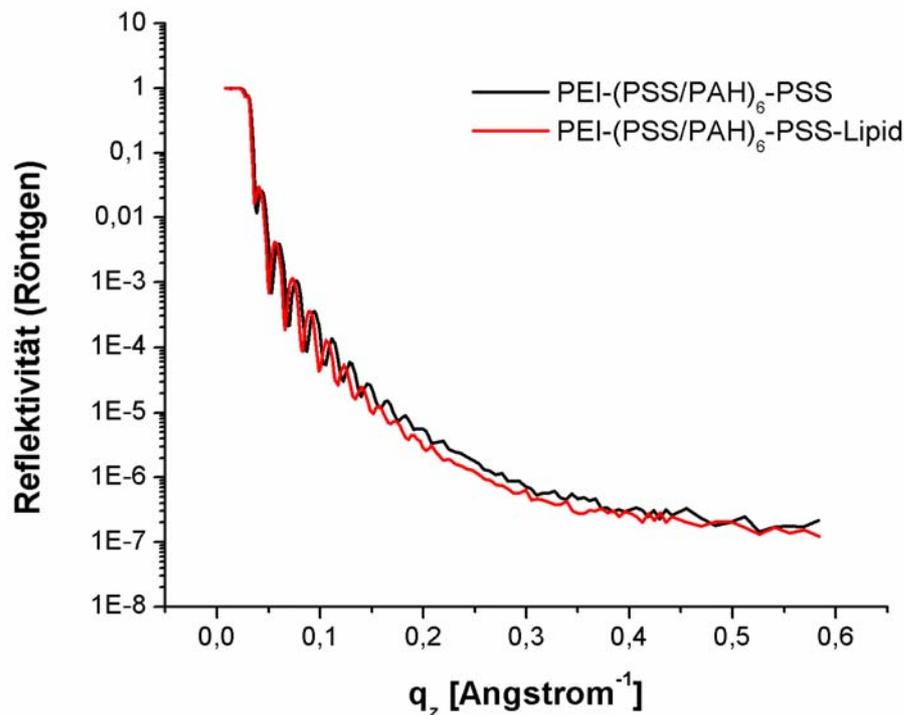


Abb. 6.11: Röntgenreflektometriemessung eines DMPC/DOTAP 1:1 Films. Die schwarze Kurve zeigt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm und die rote Kurve nach der Inkubation in der Vesikellösung. Der Fit ergibt eine Schichtdicke für den Lipidfilm von 22 Å. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.1.

Abbildung 6.11 zeigt, dass die Bildung von Lipidmembranen unter Verwendung gemischter DMPC/DOTAP Vesikel möglich ist. Wie bei den anderen Membranen vorher schon beobachtet, ergibt auch hier der Fit einen tendenziell zu niedrigen Wert. Jedoch ist eine Linksverschiebung der Kiessig-Ozillationen sowie die Beibehaltung der Amplitude der Ozillationen nach der Inkubation erkennbar. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte ein weniger starkes Quellen der Filme in gesättigten Wasserdampf im Vergleich zur Messung unter Flüssigkeit sein. Die Probe wurde 10 Stunden in der Vesikellösung inkubiert.

Das gleiche Experiment wurde ebenfalls mittels Neutronenreflektometrie durchgeführt. Dies gibt die Möglichkeit, das Quellverhalten der Lipidfilme besser zu beurteilen. Das ist möglich, da die Filme direkt unter Wasser vermessen werden können. Abbildung 6.12 zeigt das Ergebnis der Messung und Abbildung 6.13 das dabei erhaltene Realraumprofil.

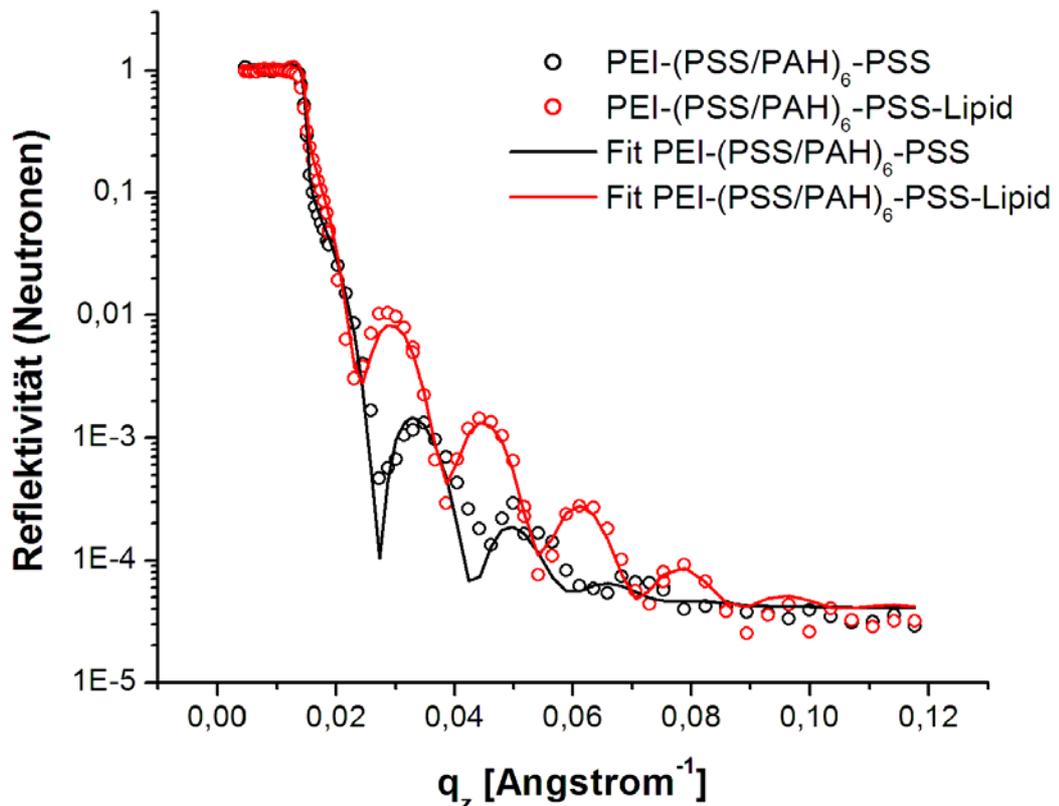


Abb. 6.12: Neutronenreflektivitätsmessung eines DMPC/DOTAP 1:1 Films. Die schwarze Kurve zeigt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm und die rote Kurve nach der Inkubation in die Vesikellösung. Der Fit ergibt eine Schichtdicke

für den Lipidfilm von 62 Å bei einer Streulängendichte von $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.4. Eine bessere Übereinstimmung zwischen Fit und gemessener Kurve ließ sich für den Polyelektrolytfilm nicht erzielen, da die Kurve ab $q_z = 0,02 \text{ \AA}^{-1}$ etwas und ab $q_z = 0,02 \text{ \AA}^{-1}$ deutlich verrauscht ist. Ein Beispiel für eine gut zu fittende Kurve eines Polyelektrolytfilms zeigt Abbildung 4.8 links.

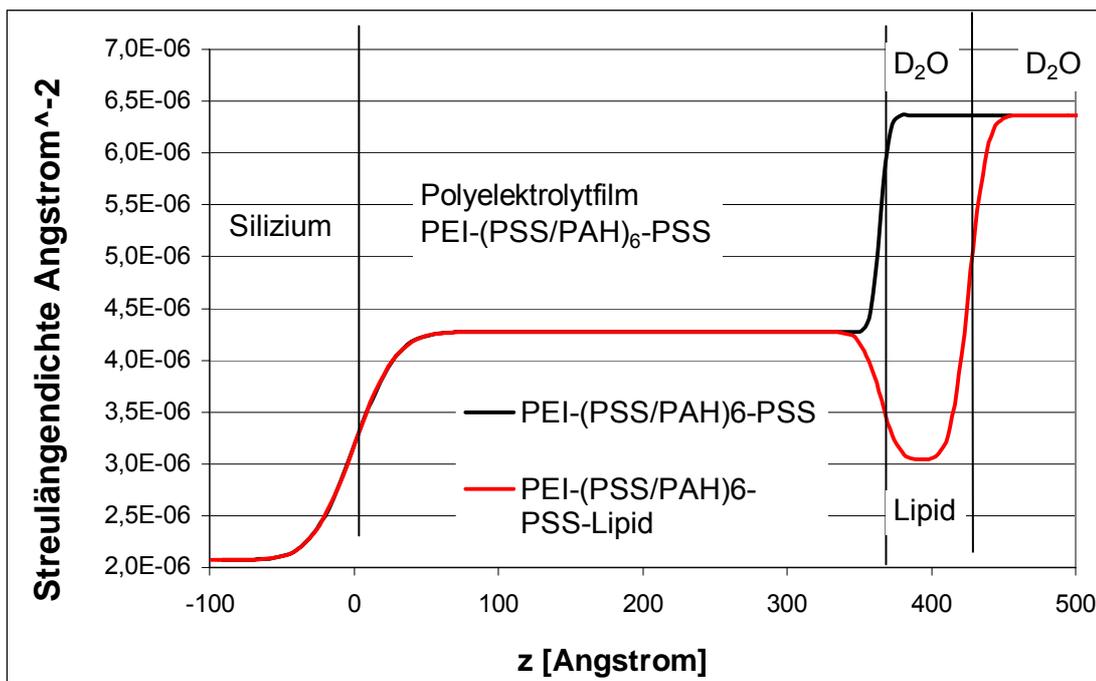


Abb. 6.13: Streulängendichteprofil des Lipidfilms mit der DMPC/DOTAP 1:1-Mischung.

Abbildung 6.12 und 6.13 zeigen deutlich, dass erfolgreich eine Lipid-Doppelschicht auf dem Polyelektrolytfilm gebildet wurde. Die Reflektivitätskurve nach der Inkubation in der Vesikellösung besitzt deutlich mehr Kontrast. Weiterhin ist im Vergleich zur Referenzmessung eine deutliche Linksverschiebung der Kiessig-Oszillationen erkennbar, was auf eine Schichtdickenzunahme hinweist.

Die Messung des reinen Polyelektrolytfilms kann mittels eines 3-Box-Modells gefittet werden, mit je einer Box für das Substrat, den Polyelektrolytfilm und die Volumenphase. Die Anpassung ist mit einer gewissen Ungenauigkeit verbunden, da die Reflektivität nur über vier Größenordnungen gemessen werden konnte. Nach der Inkubation in der Vesikellösung musste eine zusätzliche Box für den Lipidfilm eingefügt werden. Er besitzt eine deutlich verringerte Streulängendichte im Vergleich zu dem Polyelektrolyt-

film. Der Lipidfilm besitzt eine Schichtdicke von 62 Angstrom, wie es in etwa für eine Doppelschicht zu erwarten ist. Die Streulängendichte des Lipidfilms liegt bei $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, dies ist eine gute Übereinstimmung mit $1/110$ ($2,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$). Die Probe wurde 12 Stunden bei 30 °C in der Vesikellösung inkubiert.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Lipidfilme mit 4:1 POPC/DOTAP gebildet werden können, soll dieses Mischungsverhältnis auch für DMPC angewandt werden. Abbildung 6.14 zeigt den mittels QCM-D beobachteten Beschichtungsprozess.

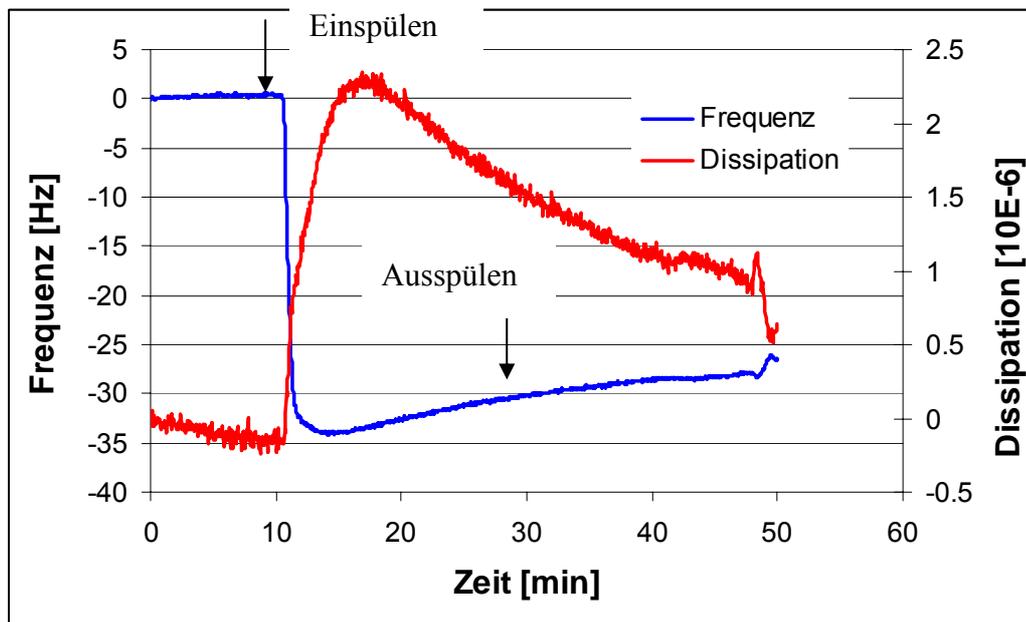


Abb. 6.14.: Adsorption für die Bildung eines Lipidfilmes mit einer 4:1 Mischung DMPC/DOTAP. Die Messung wurde mittels QCM-D mit einer Lipidkonzentration von 0,5 mg/ml bei 28°C durchgeführt. Der Knick am Ende der Messung rührt von einer in der Messkammer gebildeten Luftblase.

Abbildung 6.14 zeigt, dass mit knapp -30 Hz Frequenzverschiebung in etwa der Wert erreicht wird, der für eine Doppelschicht zu erwarten ist. Die Basislinie war jedoch nach der Lipidbeschichtung nicht völlig stabil. Interessant ist, dass die Kinetik einem anderen Muster im Vergleich zu reinem DMPC folgt. Die Kinetik weist reproduzierbar kein Frequenzminimum auf. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Vesikel direkt nach der Adsorption aufplatzen und nicht erst ein kritischer Bedeckungsgrad erreicht werden muss. Der Dissipationsausschlag ist niedrig, so dass die Lipidschicht recht stabil sein muss.

Das gleiche Experiment wurde auch mittels Röntgenreflektometrie durchgeführt. Abbildung 6.15 zeigt das Ergebnis der Messung.

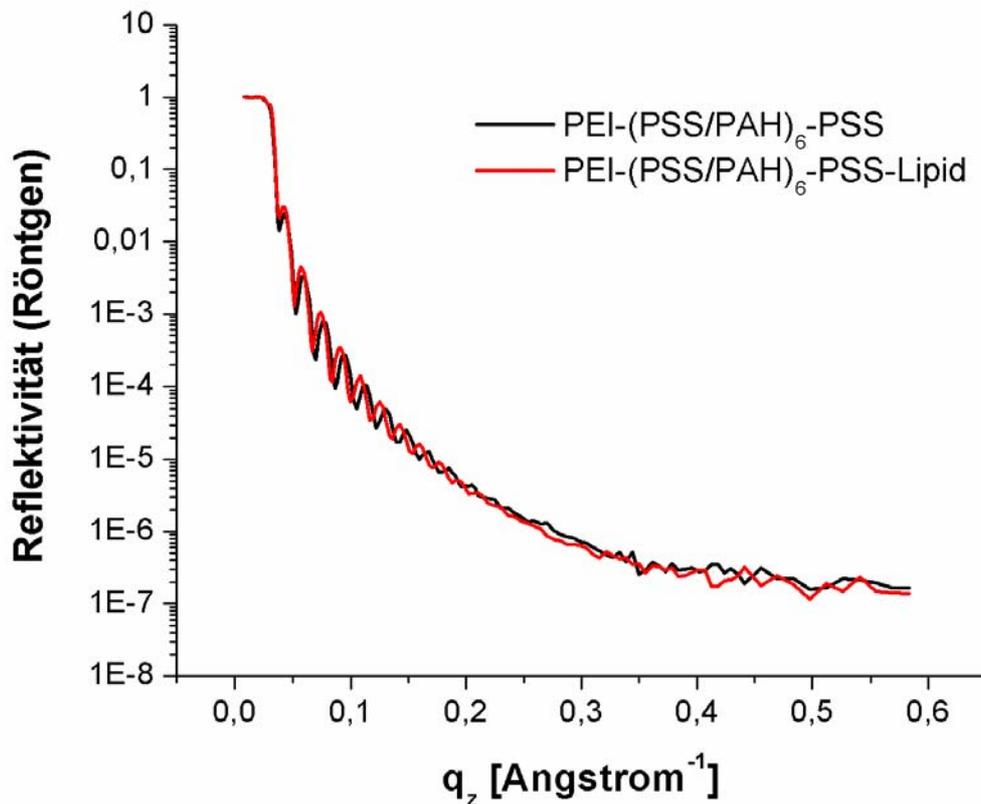


Abb. 6.15: Röntgenreflektometriemessung eines DMPC/DOTAP 4:1 Films. Die schwarze Kurve zeigt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm und die rote Kurve nach der Inkubation in der Vesikellösung. Der Fit ergibt eine Schichtdicke für den Lipidfilm von 22 Å. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.1.

Abbildung 6.15 zeigt ein ähnliches Bild wie bei den anderen Röntgenmessungen. Es ist zu erkennen, dass sich die Kiessig-Oszillationen nach der Inkubation in die Lipidlösung zu kleineren q_z -Werten verschieben. Weiterhin bleibt die Amplitude der Oszillationen erhalten, was auf eine gute Qualität des Filmes hindeutet. Jedoch fällt auch hier der Fit für die Dicke des Lipidfilms zu gering für eine Doppelschicht aus. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Lipide in der gesättigten Wasserdampfatosphäre umordnen und der Film weniger Wasser enthält als wenn er sich vollständig unter Wasser befindet. Das gleiche Experiment wurde auch mittels Neutronenreflektometrie durchgeführt. Abbildung 6.16

zeigt die erhaltenen Kurven sowie Abbildung 6.17 die zugehörigen Streulängendichte-profile.

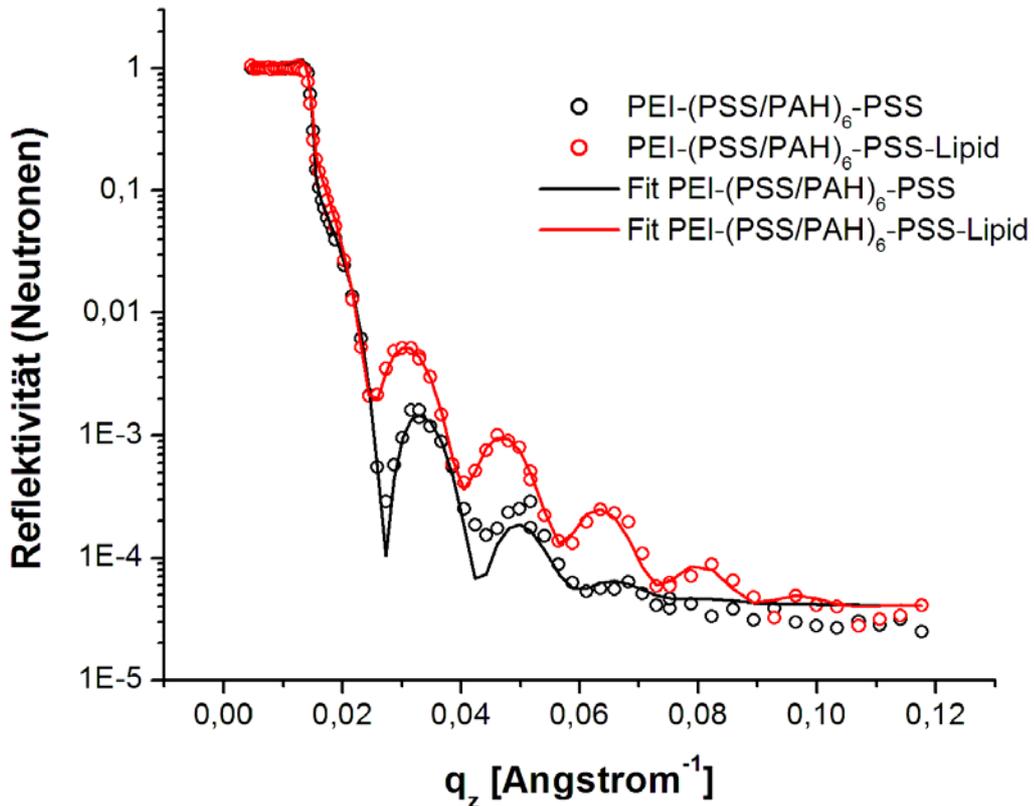


Abb. 6.16: Neutronenreflektivitätsmessung eines DMPC/DOTAP 4:1 Films. Die schwarze Kurve zeigt die Referenzmessung mit dem reinen Polyelektrolytfilm und die rote Kurve nach der Inkubation in die Vesikellösung. Der Fit ergibt eine Schichtdicke für den Lipidfilm von 47 Å bei einer Streulängendichte wie für einen Lipidfilm zu erwarten von $2,43 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Für die genauen Fitparameter siehe im Anhang Tabelle 10.4. Eine bessere Übereinstimmung zwischen Fit und Messkurve lässt sich nicht erzielen, da die Kurve ab $q_z = 0,04 \text{ \AA}^{-1}$ deutlich verrauscht ist.

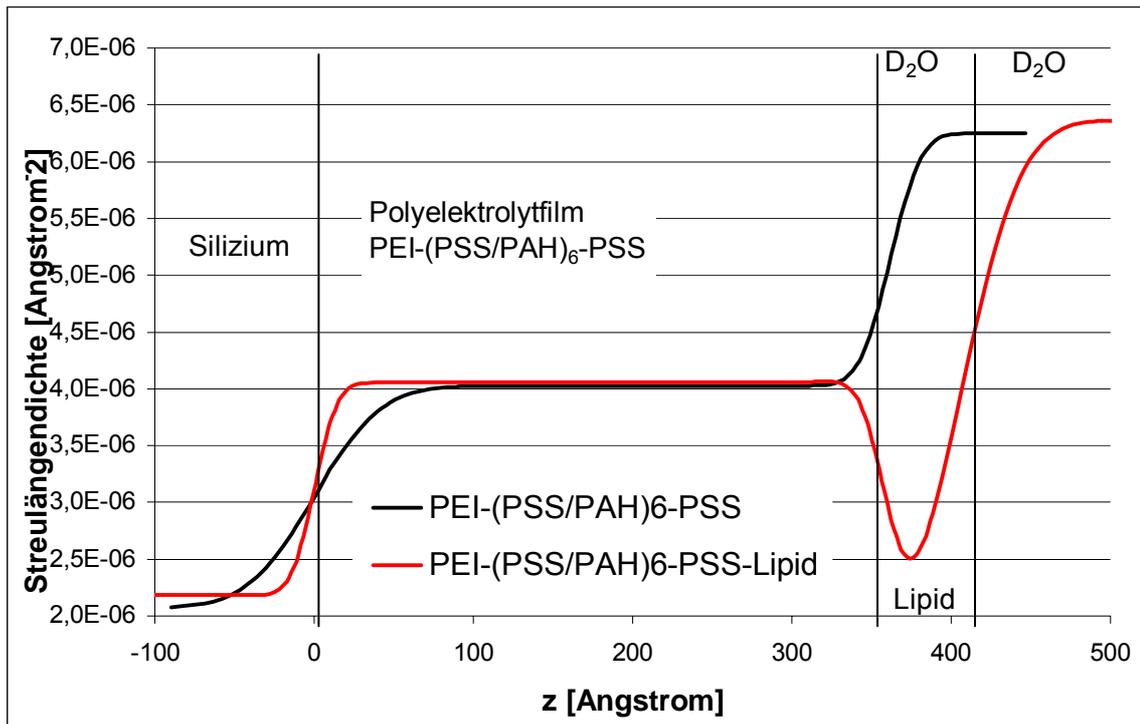


Abb. 6.17: Streulängendichte des Lipidfilms mit der DMPC/DOTAP 4:1-Mischung. Die unterschiedliche Rauigkeit des Substrates in den beiden Fits (d.h. mit und ohne Lipidfilm) ist physikalisch nicht sinnvoll. Jedoch sind die Kurven schwierig anzupassen, da die Reflektivität nur über vier Größenordnungen aufgezeichnet wurde. Dies trifft besonders für die Messung des reinen Polyelektrolytfilms zu, bei der die Kurve zu Beginn gleich um 3,5 Größenordnungen abfällt und die zweite Oszillation sehr verrauscht ist (siehe Abbildung 6.16)

Abbildung 6.16 und 6.17 zeigen, dass auch mit der 4:1 Mischung DMPC/DOTAP erfolgreich Doppelschichten gebildet werden können. Anders als bei der Röntgenmessung ist mit 47 Å die Schichtdicke so, wie sie für eine Doppelschicht zu erwarten ist. Die Messung des reinen Polyelektrolytfilms wurde mit einem 3-Box-Modell gefittet. Für den Lipidfilm musste anschließend noch eine zusätzliche Box eingefügt werden. Im Streulängendichteprofil ist deutlich zu erkennen, dass der Lipidfilm eine geringere Streulängendichte als der Polyelektrolytfilm besitzt. Die Streulängendichte des Lipidfilms liegt mit $2,43 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ im Bereich von Literaturwerten /110/ ($2,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) und /111/ ($1,4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$).

Abschließend kann festgestellt werden, dass es in der Arbeit gelungen ist, Lipid-Doppelschichten auf Polyelektrolytfilmen zu präparieren. Dies konnte mittels QCM-D,

in situ-Ellipsometrie sowie Röntgen- und Neutronenreflektometrie gezeigt werden. Es ist möglich, DMPC-Filme auf positiv terminierten PAH-Grenzflächen aufzubringen. Für das Aufplatzen der Lipidvesikel an der Grenzfläche ist eine Ionenkonzentration von 0,15 mol/l Natriumchlorid nötig. Weiterhin werden die Doppelschichten durch bivalente Calciumionen stabilisiert. Jedoch ließen sich diese Ergebnisse nicht auf die Neutronenreflektometrie übertragen. Der Grund dafür dürfte der große Probenmaßstab sein.

Um ein stabileres System für die Neutronenreflektometrie zu erhalten, wurden zwei Systeme aufgebaut, die mittels gemischter Lipidvesikel präpariert wurden. Dabei wurde das positiv geladene Lipid DOTAP verwendet, um verstärkte elektrostatische Anziehungskräfte zu der Oberfläche zu erhalten. In dem einen System wurde DOTAP mit POPC gemischt. Dieses System unterliegt keinem Phasenübergang, so dass der Inkubationstemperatur keine Beachtung geschenkt werden muss. Das zweite System wurde dazu analog mit DMPC aufgebaut. Folgende Systeme können auf einen PSS-terminierten Polyelektrolytfilm präpariert werden:

- 50 % POPC / 50 % DOTAP
- 80 % POPC / 20 % DOTAP
- 50 % DMPC / 50 % DOTAP
- 80 % DMPC / 20 % DOTAP

Eine generelle Beobachtung war, dass die mit Röntgenmessungen bestimmten Schichtdicken der Lipidfilme geringer als erwartet ausfielen. Sie betragen nur zwischen 50 und 60 % der für Lipid-Doppelschichten erwartenden und auch mittels Neutronenreflektometrie gemessenen Werte. Da bei gleicher Präparation mittels Neutronenreflektometrie die zu erwartenden Werte (40 – 50 Å) gemessen werden, kann davon ausgegangen werden, dass die Lipidfilme weniger stark quellen bzw. die Lipidmoleküle sich anders an der Oberfläche orientieren. Eine zweite Erklärung wäre, dass nur eine Monolage von Lipiden adsorbiert wird oder eine der beiden Monolage beim Spülen abreißt. Dieser zweite Erklärungsansatz ist jedoch wenig wahrscheinlich, weil sich zum Polyelektrolytfilm hin nur die Lipidkopfgruppen orientieren können und eine Anordnung, in der die Schwanzgruppen zur Lösung orientiert sind, eine energetisch und entropisch ungünstige Konstellation darstellt.

7. Ergebnisse Teil 3: Untersuchungen zur Funktionsweise natürlicher Gelenke durch Neutronenreflektometrie unter Druck und Scherung

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt die vorbereitenden Untersuchungen zur Bildung der Lipidmembranen auf den Polyelektrolytfilmen dargestellt wurden, sollen nun die eigentlichen Messungen zur Untersuchung der Schmierungseigenschaften der Gelenke vorgestellt werden. Ziel der Untersuchungen ist es, sich auf molekularer Ebene ein Bild von der Grenzfläche Knorpel/Synovialflüssigkeit unter mechanischer Belastung zu machen und mögliche Interaktionen zwischen der Synovialflüssigkeit und dem Knorpel zu beobachten. Ein weiteres Augenmerk soll auf mögliche reibungsvermindernde Zwischenschichten, wie beispielsweise ein Konzentrationsgradient an Hyaluronsäure in Grenzflächennähe, gelegt werden.

7.1 Messungen unter Scherkräften

Die Scherversuche wurden am Neutronenreflektometer ADAM, Institut Laue-Langevin (ILL), Grenoble, Frankreich mit einer dort vorhandenen Scherzelle durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein einfaches System, bestehend aus einem unbeschichteten Si-Substrat in Kontakt mit D₂O und verschiedenen Hyaluronsäure-Lösungen (physiologische Hyaluronsäure-Konzentration von 3,6 mg/ml sowie eine deutlich höhere Konzentration von 36 mg/ml) studiert. Ziel war es festzustellen, ob sich eine Hyaluronsäure-Schicht auf der Oberfläche ausbildet, deren physikalische Eigenschaften von der Scherrate abhängen. Außerdem sollte anhand der Streulängendichte der Volumenphase untersucht werden, ob sich die strukturellen Eigenschaften der Hyaluronsäure-Lösung unter Scherung ändern. Abbildung 7.1 zeigt die Reflektivitätskurven für das Experiment mit 3,6 mg/ml Hyaluronsäurekonzentration.

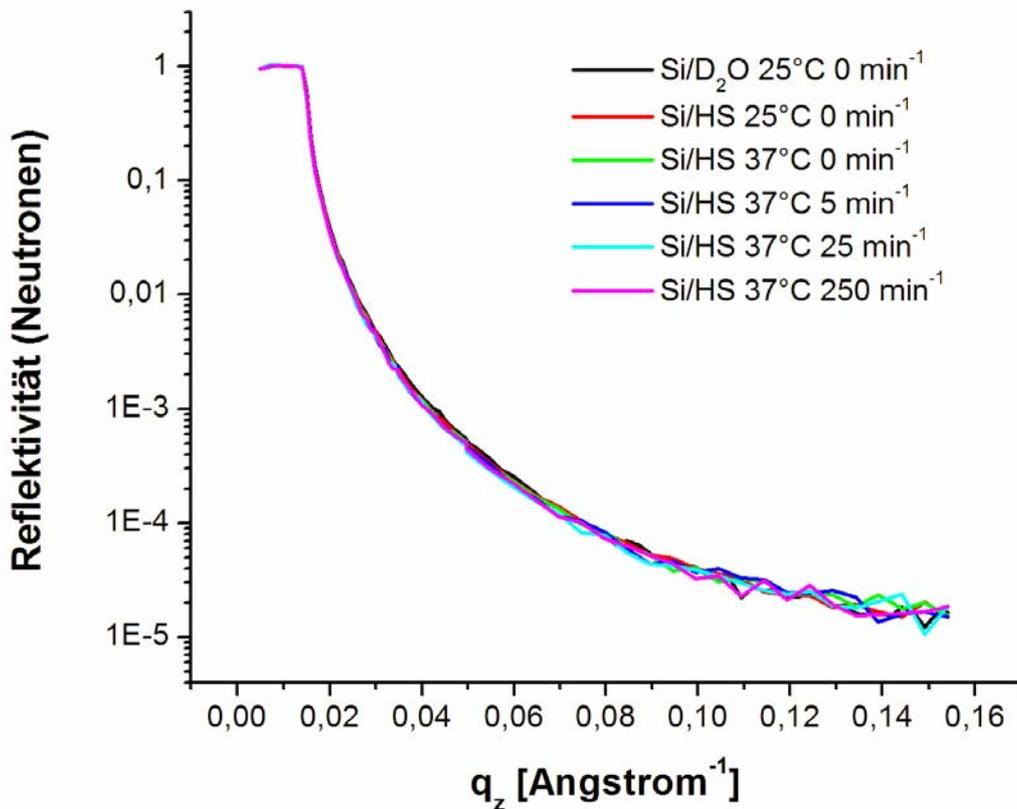


Abb. 7.1: Reflektivitätskurven für Scherexperiment Hyaluronsäure (3,6 mg/ml) gegen Siliziumsubstrat

Zunächst wurde das Reflektivitätsprofil gegen D₂O vermessen, anschließend D₂O gegen Hyaluronsäure-Lösung (3,6 bzw. 36 mg/ml, jeweils in 0,15 M NaCl) in D₂O ausgetauscht und die Scherrate von 0 bis 250 min⁻¹ sukzessive erhöht. Es wurde in keinem Falle eine Änderung der spekulär reflektierten Intensität beobachtet, was darauf hinweist, dass sich weder ein Hyaluronsäure-Adsorbat nennenswerter Dicke ausbildet noch strukturelle Veränderungen der Volumenphase auftreten, die innerhalb der Empfindlichkeitsgrenzen der Methode nachweisbar sind. In der nicht-spekularen Reflexion auftretende Satellitenpeaks weisen darauf hin, dass sich bei Kontakt mit Hyaluronsäure-Lösung laterale Strukturen parallel zur Siliziumoberfläche ausbilden. Eine Abhängigkeit dieses Effekts von der Scherrate wurde nicht festgestellt.

In einem nächsten Schritt wurde eine Hyaluronsäurelösung gegen einen PSS-terminierten Polyelektrolytfilm geschert. An den Film lagerte sich zunächst ein Hyalu-

ronsäure-Adsorbat an, welches unter Scherung dünner wurde und bei hohen Scherraten schließlich ganz verschwand. Abb. 7.2 zeigt die Reflektivitätskurven, Tabelle 7.1 die Ergebnisse der Anpassungen.

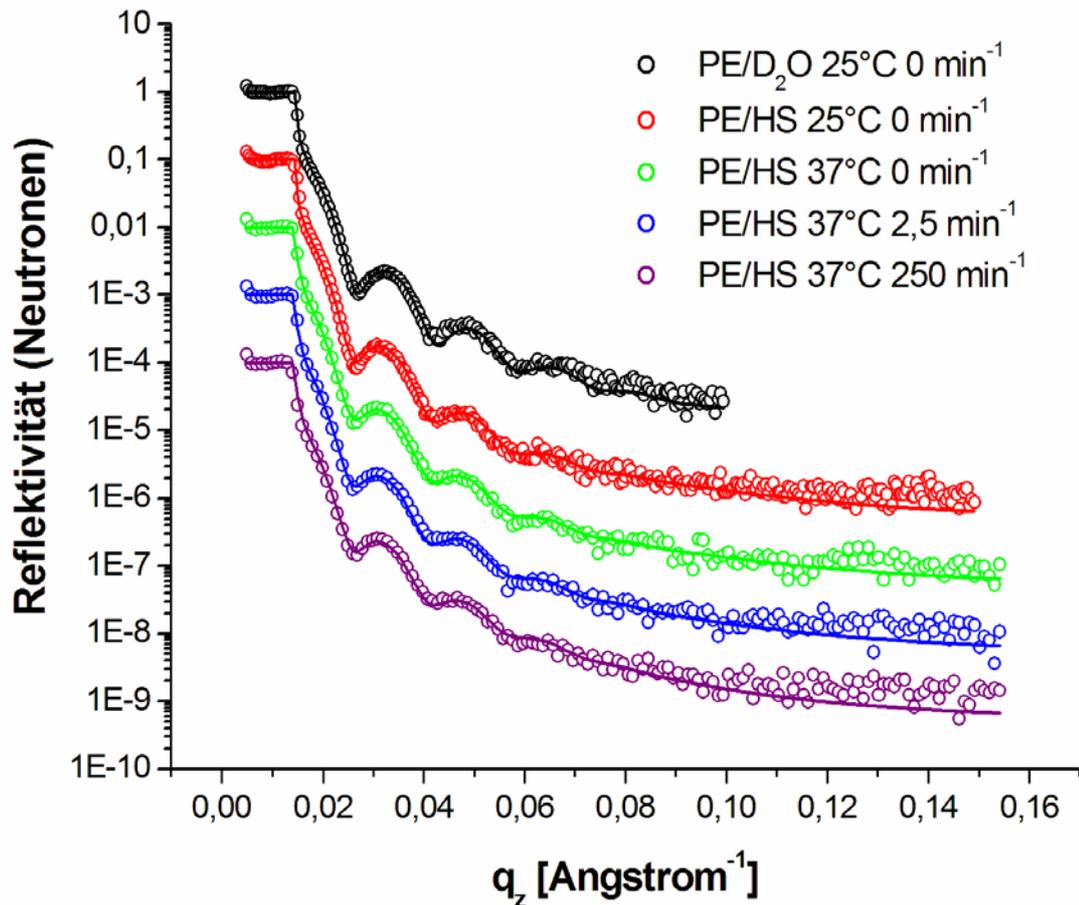


Abb. 7.2: Reflektivitätskurven für Scherexperiment Hyaluronsäure gegen Polyelektrolytfilm. Die Kurven wurden für eine bessere Übersichtlichkeit verschoben. Die Kreise stehen für die Messdatenpunkte, die durchgezogenen Linien stellen die Ergebnisse der Anpassungen dar

Tab. 7.1: Ergebnisse des Fittens der Reflektivitätskurven aus Abbildung 7.2

<i>Probelösung</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Scher-rate [min⁻¹]</i>	<i>SLD Hyaluronsäure-Film [10⁻⁶ Å⁻²]</i>	<i>H₂O Gehalt HS-Film</i>	<i>Dicke Hyaluronsäure-Film [Å]</i>	<i>SLD Volumenphase [10⁻⁶ Å⁻²]</i>
D ₂ O	25	0	-	-	-	6,35
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	25	0	5,9	0,91	66	6,21
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	37	0	5,7	0,87	63	6,21
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	37	2,5	4,2	0,60	28	6,21
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	37	12,5	2,5	0,28	13	6,21
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	37	25	2,5	0,28	12	6,21
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	37	125	2,5	0,28	12	6,21
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	37	250	0	-	-	6,21
Hyaluronsäure 3,6 mg/ml	37	0	0	-	-	6,21

Tabelle 7.1 zeigt, dass sich zunächst bei Kontakt der Hyaluronsäurelösung mit dem Polyelektrolytfilm ein 66 Angstrom dicker, stark gequollener Hyaluronsäurefilm ausbildete. Da sowohl der Polyelektrolytfilm als auch die Hyaluronsäure negativ geladen waren, sind vermutlich hydrophobe Wechselwirkungen für die Bildung des Films verantwortlich. Der Film blieb bei Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 37°C unverändert.

Beim Anlegen einer Scherrate von 2,5 min⁻¹ verlor er dann an Wasser, was sowohl an der sinkenden Schichtdicke als auch an der geringeren Streulängendichte erkennbar ist. Dieser Trend setzte sich bis zu einer Scherrate von 125 min⁻¹ fort. Bei 250 min⁻¹ wurde der Hyaluronsäurefilm schließlich vollständig von der Oberfläche abgelöst. Der Unterschied in Streulängendichte nach dem Einbringen der Hyaluronsäurelösung rührt wahrscheinlich nicht von der Hyaluronsäure, sondern von einer Kontamination der Lösung mit leichtem Wasser her.

Die Scherexperimente unter Verwendung von Lipiden konnten aus zeitlichen Gründen (Verzögerungen bei der Fertigstellung der neuen Scherzelle, Ausfall von Neutronenmesszeit) im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Erste Experimente dieser Art wurden von PD Dr. Reiner Dahint (Universität Heidelberg) und Dr. Roland Steitz (Hahn-Meitner-Institut, Berlin) im Juni 2008 am Instrument ADAM, Institut Laue-Langevin (ILL) in Grenoble, Frankreich durchgeführt. Die Daten befinden sich derzeit noch in der Auswertung und sollen durch weitere Messungen verifiziert werden.

7.2 Messungen unter Druck

Für die Messungen unter Druck musste zunächst eine eigene Probenumgebung entwickelt werden. Dabei entstand die im Abschnitt 4.5 vorgestellte Druckzelle für Messungen unter Flüssigkeit zwischen 1 bar und 1 kbar. Die Zelle wurde während eines Experimentes am Instrument AMOR am Paul-Scherrer-Institut im Dezember 2006 in Betrieb genommen.

Als ein erstes Startexperiment wurde schweres Wasser gegen einen Polyelektrolytfilm gedrückt. Zunächst sollte dabei geklärt werden, ob die Zelle für Reflektivitätsmessungen geeignet ist. Hinsichtlich des Experiments wurde das Augenmerk auf zwei Dinge gelegt. Zum einen sollte untersucht werden, ob sich unter Druck die Streulängendichte der Volumenphase erhöht und damit die Totalreflektionskante der Reflektivitätskurve verschiebt. Dies könnte möglich sein, da die Dichte des Wassers unter Druck ansteigen sollte und somit mehr Moleküle pro Volumeneinheit zum Rückstreuen zur Verfügung stehen.

Zum anderen sollte geklärt werden, ob Wasser aus dem Film herausgedrückt werden kann, was mit einer Rechtsverschiebung der Kiessig-Oszillationen einhergehen müsste. Um die Wahrscheinlichkeit einer Verschiebung der Totalreflexionskante einschätzen zu können, kann der theoretische Wert rechnerisch ermittelt werden. Für Flüssigkeiten und Festkörper kann die Kompressibilität κ folgendermaßen errechnet werden:

$$\kappa = - \frac{1}{V} \frac{dV}{dp}, \quad \text{Gl. 7.1}$$

wobei V das Volumen und p der Druck sind. Da die Masse konstant ist, erhält man folgende integrierte Form:

$$\frac{\Delta\rho}{\rho} = \left| \frac{\Delta V}{V} \right| = |\kappa\Delta p|. \quad \text{Gl. 7.2}$$

Mit einer Kompressibilität von Wasser von $5 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ lässt sich für 820 bar ein Dichteanstieg von 4,1 % errechnen. Bei einer Dichte von Wasser bei 1 bar und 37°C von $0,99332 \text{ g/cm}^3$ steigt die Dichte bei 820 bar auf $1,03405 \text{ g/cm}^3$. Somit lassen sich mittels der Gleichung

$$\delta = \sum_{i=1}^n b_i \frac{\rho N_A}{M}, \quad \text{Gl. 7.3}$$

wobei δ die Streulängendichte, b_i die Streulänge des Atoms i , n die Anzahl der Atome im Molekül, ρ die Dichte, N_A die Avogadro-Zahl ($6,02214179 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) und M die Molmasse des Moleküls sind, die Streulängendichten errechnen. Bei Einsatz der entsprechenden Werte ($b_D = 6,671 \text{ \AA}$ und $b_{16O} = 5,803 \text{ \AA}$) erhält man eine Streulängendichte von schwerem Wasser bei 1 bar von $6,36 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ und für 820 bar von $6,62 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Bei Einsetzen der Werte in Gleichung 3.29 erhält man die Winkel der Totalreflexion von $0,243^\circ$ für einem Druck von 1 bar und $0,248^\circ$ bei 820 bar. Somit verschiebt sich der Winkel nur um $0,005^\circ$. Dieser Unterschied ist durch eine Messung nicht aufzulösen. Abbildung 7.3 zeigt das Ergebnis des Versuches.

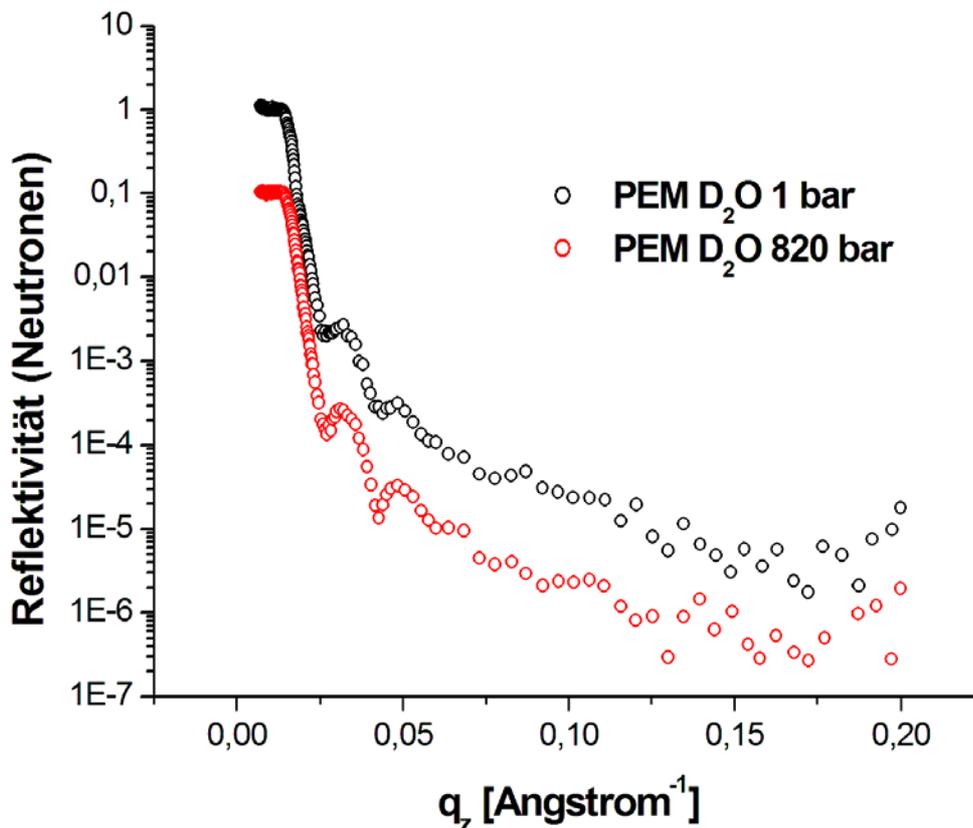


Abb. 7.3: Reflektivitätskurven aus einem Experiment, in dem schweres Wasser gegen einen Polyelektrolytfilm gedrückt wurde

Das Experiment zeigt zunächst, dass die Druckzelle erfolgreich für Reflektivitätsmessungen bis zu Drücken von 820 bar eingesetzt werden kann. Die Reflektivität kann am Instrument AMOR annähernd über fünf Größenordnungen beobachtet werden. Hinsichtlich der wissenschaftlichen Beurteilung des Experiments trat keiner der oben diskutierten Effekte ein. Die Totalreflexionskante verschob sich wie erwartet nicht. Auch die Positionen der Kiessig-Ringe veränderten sich nicht. Einzig die Amplituden der Kiessig-Oszillationen waren etwas ausgeprägter bei 820 bar, was auf eine verminderte Oberflächenrauigkeit schließen lässt.

In einem nächsten Schritt hin zum Modellsystem wurde anschließend eine Hyaluronsäurelösung in 0,15 mol/l NaCl gegen den Polyelektrolytfilm gedrückt. Dabei wurde zunächst ein Druck von 50 bar gewählt, wie er auch lokal in Gelenken auftreten kann. Danach wurde der Druck auf 100 bar erhöht und anschließend wieder bei Umgebungs-

druck gemessen. Die Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt. Abbildung 7.4 und 7.5 zeigen die Ergebnisse des Experiments.

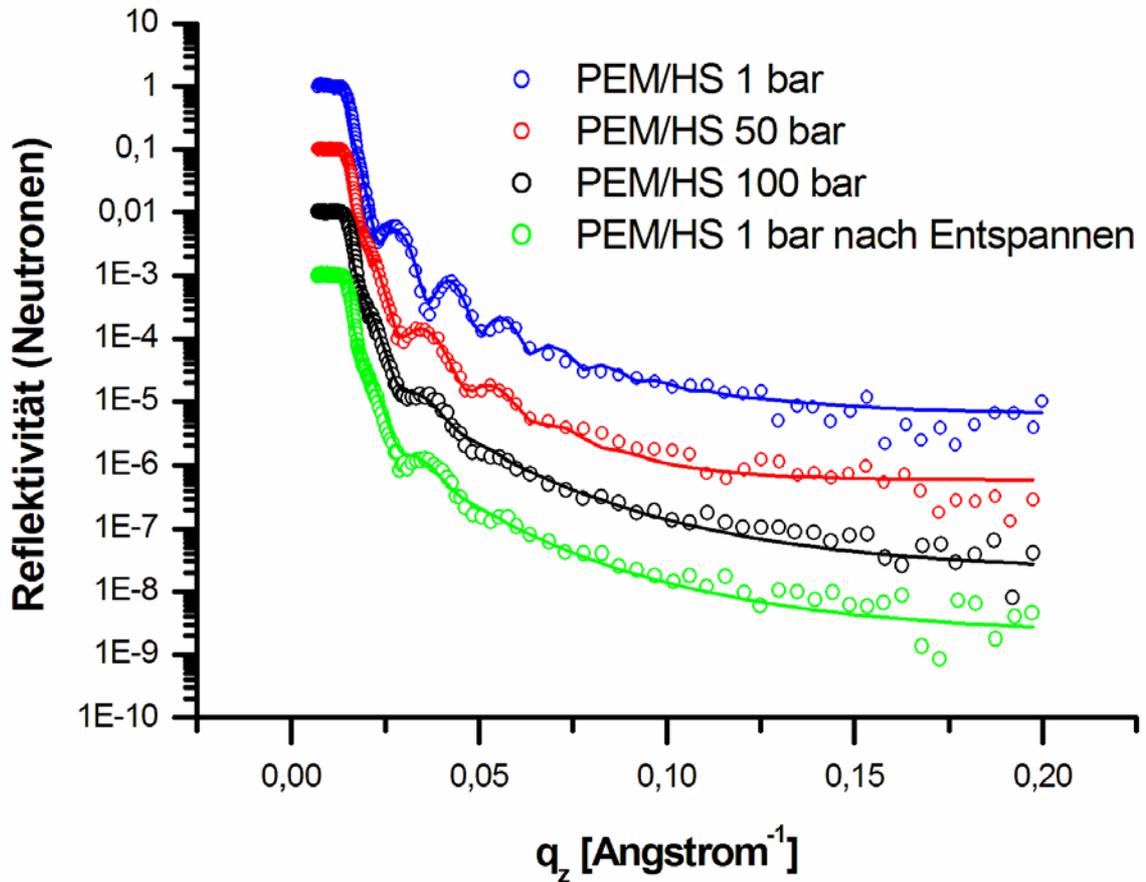


Abb. 7.4: Reflektivitätskurven aus einem Experiment, in dem eine Hyaluronsäure-Lösung in schwerem Wasser und 0,15 mol/l NaCl gegen einen Polyelektrolytfilm gedrückt wurde.

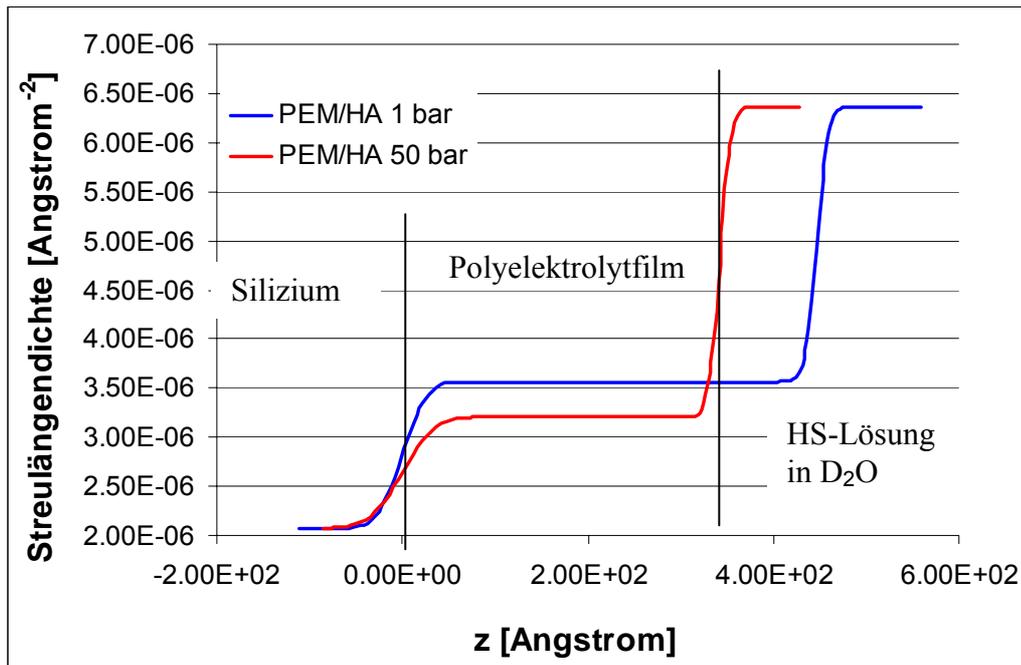


Abb. 7.5: Streulängendichteprofil zu Druckexperiment aus Abbildung 7.4

Abbildung 7.4 zeigt, dass ein Druck von 50 bar eine deutliche Änderung in der Reflektivitätskurve hervorruft. Die Kiessig-Ringe Oszillationen sind im Vergleich zu einem Druck von 1 bar deutlich zu höheren q_z -Werten verschoben. Aus dem Streulängendichteprofil ist zu erkennen, dass der Polyelektrolytfilm um etwa 100 Å dünner geworden ist und auch an Streulängendichte verloren hat. Dies lässt darauf schließen, dass der Wassergehalt des Films sank. Bei der quantitativen Auswertung erhält man einen Dickenverlust von etwa 22,5 % und einen Wasserverlust von 11 %. Eine weitere Erhöhung des Druckes auf 100 bar sowie das anschließende Absenken auf 1 bar hatten keinen Einfluss mehr auf die Reflektivitätskurve. Somit ist der Effekt irreversibel.

Nun stellt sich die Frage, warum Wasser bei einem Druck von 820 bar dem Polyelektrolytfilm kein Wasser entziehen kann, aber eine Hyaluronsäurelösung dies schon bei 50 bar vermag? Eine mögliche Antwort könnte sein, dass die Hyaluronsäure hygroskopische Eigenschaften hat [112, 113]. Warum der Effekt irreversibel ist, ist zurzeit noch unklar. Eine Ursache könnte sein, dass durch das Herauspressen des Wassers ungesättigte, entgegengesetzte Ladungen im Film sich stärker einander nähern und so die Anziehungskräfte irreversibel erhöht wurden.

In einen weiteren Schritt hin zum Modellsystem wurde schweres Wasser gegen eine Lipid-Doppelschicht auf einen Polyelektrolytuntergrund gedrückt. Der Lipidfilm bestand

zu 80 % aus DMPC und zu 20 % aus DOTAP. Der Film wurde zunächst bei 50 bar und anschließend bei 600 bar gedrückt. Das Experiment wurde, wie die anderen auch, bei 37°C durchgeführt: Abbildung 7.6 zeigt die Reflektivitätskurven der Messungen.

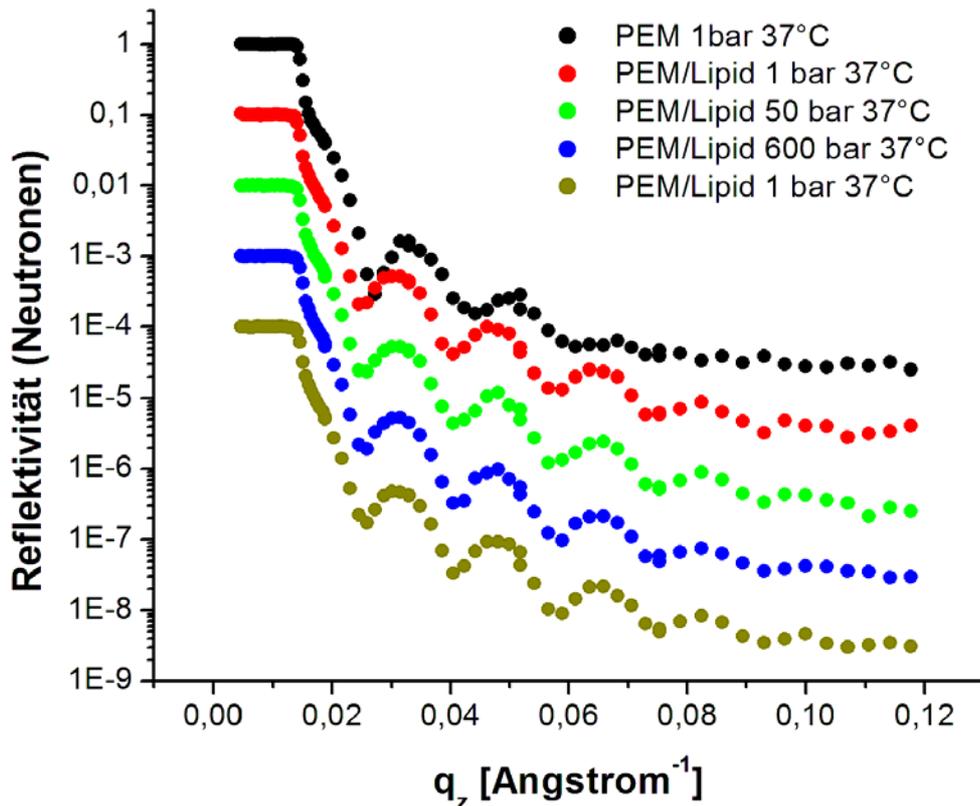


Abb. 7.6: Reflektivitätskurven des Experimentes, bei dem schweres Wasser gegen einen Lipidfilm aus 80 % DMPC und 20% DOTAP gedrückt wurde. Die Ergebnisse der Anpassungen der Kurven zeigt Tabelle 10.4.

Abbildung 7.6 zeigt, dass der Druck keinen Einfluss auf die Beschaffenheit der Lipid-Doppelschicht hat. Zunächst ist eine deutliche Linksverschiebung der Kiessig- Oszillationen nach der Inkubation des Polyelektrolytfilms in die Vesikellösung erkennbar. Dabei bildete sich der bereits in Abschnitt 6 beschriebene Lipidfilm (Schichtdicke: 47 Å, Streulängendichte: $2,43 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$).

Sowohl bei 50 bar als auch bei 600 bar war dann keine Veränderung der Oszillationen mehr sichtbar, so dass innerhalb der Grenzen der Auflösung des Experimentes keine Schichtdickenänderungen des Lipidfilms beobachtet werden konnten. Jedoch bleibt fest-

zustellen, dass die Reflektivität während des Experimentes am V6 am Hahn-Meitner-Institut mit der Druckzelle nur über vier Größenordnungen beobachtet werden konnte und die Daten somit an der Grenze der quantitativen Auswertbarkeit sind. Von daher wird an dieser Stelle empfohlen, das Experiment an einer leistungsstärkeren Quelle zu wiederholen.

Als abschließendes Experiment wurde nun noch das vollständige Modellsystem, bestehend aus einem Polyelektrolytfilm, einer Lipid-Doppelschicht und einer Hyaluronsäurelösung gedrückt. Abbildung 7.7 zeigt das Ergebnis des Experiments.

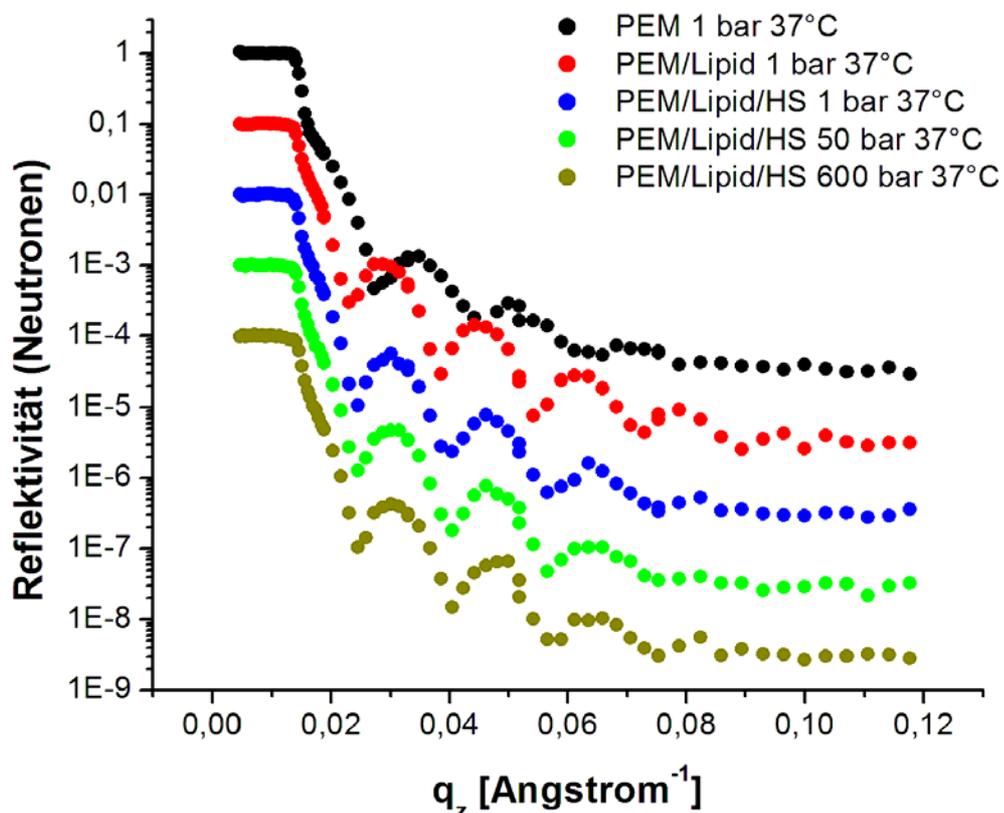


Abb. 7.7: Reflektivitätskurven des Experimentes, bei dem eine Hyaluronsäure-Lösung einer Konzentration von 3,6 mg/ml gegen einen Lipidfilm aus 50 % DMPC und 50% DOTAP gedrückt wurde. Die Ergebnisse der Anpassungen der Kurven zeigt Tabelle 10.4.

Abbildung 7.7 zeigt zunächst, dass sich ein Lipidfilm auf der Polyelektrolytoberfläche ausgebildet hat. Der Film hat die in Abschnitt 6 gezeigten Eigenschaften (62 Å Schicht-

dicke bei einer Streulängendichte von $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$). Der Film ist somit etwa 20 % dicker als es für eine Doppelschicht zu erwarten wäre. Nach dem Kontakt mit der Hyaluronsäurelösung kam es zu einer Rechtsverschiebung der Kiessig-Oszillationen. Der Grund dürfte jedoch ein anderer sein als der Kontakt mit der Hyaluronsäure. Der Film wurde aus organisatorischen Gründen etwa 24 Stunden in leichtem Wasser gelagert. Dabei wurde vermutlich ein geringer Teil des Lipidfilms abgelöst und möglicherweise auch leichtes Wasser in den Lipidfilm eingelagert. Der Fit ergibt für diesen Film eine Schichtdicke von 56 \AA bei einer Streulängendichte von $3,49 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Der Druck hatte schließlich, wenn überhaupt, nur einen marginalen Einfluss auf die Reflektivitätskurven. Es lässt sich bei einem Druck von 600 bar eine minimale Rechtsverschiebung der Fringes erahnen. Da die Kurven jedoch etwas verrauscht sind, ist dies nicht deutlich genug erkennbar. Deshalb bleibt auch hier das Ergebnis, dass das System innerhalb der Grenzen der Auflösung des Experiments stabil ist.

Abschließend stellt sich nun die Frage nach der Bedeutung der Ergebnisse. In den Scherexperimenten wurden keine wesentlichen Erkenntnisse über die Schmierung von Gelenken erlangt. Ein mögliches Szenario, nach dem sich unter Scherung ein Schmierfilm erhöhter Hyaluronsäurekonzentration bildet, wurde nicht beobachtet. Stattdessen wurde eine Verringerung der Schichtdicke eines Hyaluronsäure-Filmes an der Grenzfläche gefunden. Strukturänderungen in der Volumenphase konnten ebenfalls nicht sichtbar gemacht werden.

In den Druckexperimenten wurde bei Abwesenheit eines Lipidfilms der Polyelektrolytfilm bei gleichzeitigem Wasserverlust um ca. 25% komprimiert. Dieser Effekt trat bei einem physiologisch bedeutsamen Druck von 50 bar auf. Eine mögliche Ursache dafür sind die hygroskopischen Eigenschaften der Hyaluronsäure. Befindet sich ein Lipidfilm auf dem Polyelektrolyten, so konnte kein Wasser herausgedrückt werden.

Diese Beobachtungen könnten zu einem besseren Verständnis der Entstehung von Gelenkerkrankungen beitragen. In erkrankten Gelenken könnte die Lipidschicht auf dem Knorpel beschädigt bzw. abgelöst sein. Dies führt dazu, dass der Knorpel frei liegt und von der hygroskopischen Hyaluronsäure angegriffen wird. Diese könnte allmählich dem Knorpel Wasser entziehen und ihn somit spröder werden lassen. Demnach hätte der Lipidfilm eine wichtige Schutzfunktion für den Knorpel.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Gelenkerkrankungen zählen in der heutigen Zivilisation zu den am weitesten verbreiteten Krankheiten. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Zum einen wird durch die moderne Medizin ein höheres Lebensalter erzielt, so dass der Gelenkverschleiß häufiger in Erscheinung tritt. Zum anderen kommen andere Faktoren wie mangelnde Bewegung oder Übergewicht, welches die Gelenke stark belastet, zum Tragen. Gelenkerkrankungen sind in aller Regel nicht tödlich, schränken jedoch die Lebensqualität stark ein. Als mögliche Behandlungsmaßnahme für den Patienten kommt prinzipiell ein Gelenkersatz in Frage.

Die Eigenschaften heutiger Gelenkprothesen sind jedoch nicht in jedem Fall zufriedenstellend. Die Haltbarkeit dieser beträgt etwa 10 bis 15 Jahre, so dass nach Ablauf dieses Zeitraumes erneut eine für den Patienten belastende und darüber hinaus teure Operation von Nöten ist. Hauptproblem der derzeit verwendeten Gelenkprothesen ist, dass Gelenkkugel und Pfanne im direkten Kontakt miteinander stehen und durch die daraus resultierende hohe Reibung allmählich beschädigt werden.

Ein Ansatz, dieses Problem zu lösen, ist, sich beim Aufbau eines künstlichen Gelenkes stärker an der Natur zu orientieren. Diese benutzt für Gelenke die Flüssigschmierung, welche für Prothesen unerreicht niedrige Reibungskoeffizienten erzielt. Dabei ist zum einen der Knochen mit einer zentimeterstarken, elastischen Knorpelschicht bedeckt und zum anderen die beiden gegenüberliegenden Gelenkteile durch einen flüssigen Schmierfilm voneinander getrennt.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die Funktionsweise der Flüssigschmierung in einem natürlichen Gelenk zu entwickeln und so den Weg für die Übertragung der Flüssigschmierung auf künstliche Gelenke zu ebnen. Dabei wurde das Augenmerk auf zwei Punkte gelegt. Zum einen sollte die Rolle von oberflächenaktiven Lipiden, welche sich in natürlichen Gelenken befinden, aufgeklärt werden. Zum anderen sollte ein Modellsystem, welches die wesentlichen Komponenten des Gelenks enthält, unter mechanischer Belastung wie Druck und Scherkräften untersucht werden.

Zunächst sollte geklärt werden, ob die Lipide in der Synovialflüssigkeit als freie Vesikel oder durch die Hyaluronsäure komplexiert vorliegen. In der Literatur wurde an einigen Stellen über Wechselwirkungen zwischen Hyaluronsäure und DPPC, dem hauptsächlich im Gelenk vorkommenden Lipid, berichtet [62 – 64]. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten kam DMPC als Modells substanz zum Einsatz, da dieses aufgrund der kürzeren Fettsäureketten eine niedrigere Phasenübergangstemperatur und damit bessere Verarbeitungseigenschaften besitzt. Beide Lipide besitzen jedoch mit der Phosphocholingroupe die gleiche Kopfgruppe, welche für intermolekulare Wechselwirkungen verantwortlich sein sollte.

Um die Struktur der Lipide in Hyaluronsäurelösungen aufzuklären, kamen mit der Analytischen Ultrazentrifugation, der Differenzkalorimetrie und der Isothermischen Titrationskalorimetrie drei verschiedene Techniken zum Einsatz. Dabei wurden im Gegensatz zur gegenwärtigen Meinung in der Literatur keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Hyaluronsäure und DMPC festgestellt. Als mögliche Gruppen für das Auftreten von Wechselwirkungen kam bei dem Lipid die Phosphocholingroupe und bei der Hyaluronsäure die dissoziierte Carboxylgruppe in Betracht. Jedoch dürfte das bipolare Lipid nach außen nahezu neutral sein. Zum anderen ist der Abstand zweier benachbarter Carboxylgruppen in dem Hyaluronsäuremolekül recht groß, so dass dies ein Polyelektrolyt mit geringer Ladungsdichte sein dürfte. Als Schlussfolgerung bleibt, dass elektrostatische Wechselwirkungen eine untergeordnete Rolle spielen sollten und die Lipide in der Synovialflüssigkeit als freie Vesikel vorliegen dürften.

Da in der Arbeit ein wesentliches Augenmerk auf die Eigenschaften der Grenzfläche zwischen Knorpel und Synovialflüssigkeit gelegt wurde, sollten auch Wechselwirkungen zwischen DMPC und Hyaluronsäure an der Grenzfläche aufgeklärt werden. Als Techniken dafür kamen die QCM-D und die Rasterkraftmikroskopie, welche unter Flüssigkeit durchgeführt wurde, zum Einsatz. Als System für die Untersuchungen wurde zunächst eine DMPC-Doppelschicht, welche auf einer SiO₂-Oberfläche aufgebracht wurde, untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass keine Wechselwirkungen zwischen den beiden Molekülen bestehen.

Um das Bild weiter zu vervollständigen, wurde anschließend die Frage nach der Oberflächenaktivität der Lipide in der Synovialflüssigkeit aufgegriffen. Dafür wurden die

Adsorption von DMPC und DPPC sowohl aus einem wässrigen Puffer als auch aus Hyaluronsäurelösungen mittels QCM-D gemessen. Da die Lipide nicht von der Hyaluronsäurelösung komplexiert werden, war zu erwarten, dass die Lipide auch in Hyaluronsäurelösungen oberflächenaktiv sind. Dies konnte so auch festgestellt werden. Sowohl DMPC als auch DPPC besitzen in Wasser und Hyaluronsäurelösung eine vergleichbare Oberflächenaktivität. Diese Aussage trifft sowohl auf die adsorbierte Masse als auch auf die Adsorptionsgeschwindigkeit zu. Ein Unterschied war jedoch zwischen DMPC und DPPC auszumachen. DMPC wurde in Form einer Doppelschicht und DPPC als intakte Vesikel adsorbiert. Hill et al. gingen davon aus, dass die Grenzfläche Knorpel/Synovialflüssigkeit von einer oligolamellaren Lipidschicht bedeckt ist /56/. Da DPPC im Gelenk in der kristallinen Phase vorliegt, ist es nicht unwahrscheinlich, dass es auch im Gelenk als intaktes Vesikel am Knorpel anhaftet.

Um die Schmierungseigenschaften der Lipide in der Synovialflüssigkeit beurteilen zu können, wurden Viskositätsmessungen mit verschiedenen Mischungen aus DMPC bzw. DPPC und Hyaluronsäure durchgeführt. Auch dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen DMPC und DPPC festgestellt. Zunächst ist das nicht-Newtonsche Verhalten der Hyaluronsäure, welches sich durch Scherverdünnung zeigt, seit langem bekannt. Dies zeigte sich auch bei der hier untersuchten Probe. Während DMPC den Kurvenverlauf für die scherabhängige Viskosität bei der physiologischen Konzentration von 0,1 mg/ml nicht beeinflusst, senkt DPPC bei gleicher Konzentration die Viskosität deutlich.

Über den Grund dafür kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass das Lipid in der L_c -Phase bessere Schmierungseigenschaften hat als in der L_α -Konformation. Ein andere Erklärung könnte sein, dass sich an die Grenzfläche des Rheometers DPPC-Vesikel anlagerten und damit den Drehwiderstand des Kegels senken. Dies entspricht genau der Situation im natürlichen Gelenk. Letztlich bleibt festzustellen, dass DPPC offensichtlich die besseren Schmierungseigenschaften im Vergleich zu DMPC besitzt.

Nachdem geklärt wurde, dass die Lipide als freie Vesikel in der Synovialflüssigkeit vorliegen, wurde ein Modellsystem zum Studium der Grenzfläche Knorpel/Synovialflüssigkeit aufgebaut und eingesetzt. Das Modellsystem bestand aus einem Siliziumsubstrat, auf dem erst ein Polyelektrolytfilm und darauf eine Lipid-Doppelschicht aufgebracht wurden. Der Polyelektrolytfilm war als Modellschicht für

den Knorpel besonders geeignet, da er drei wichtige Eigenschaften in sich vereint. Zum ersten enthält er ca. 40% Wasser und ist damit ähnlich stark gequollen wie der Knorpel. Zum zweiten ist seine Oberfläche geladen und ermöglicht es somit, Lipidmembranen darauf abzuscheiden. Schließlich kann er mit geringen Rauigkeiten auf das Siliziumsubstrat aufgebracht werden und erfüllt somit eine strenge Forderung der Neutronenreflektometrie, welche die Hauptcharakterisierungstechnik für das System darstellt.

Da das Aufbringen von Lipid-Doppelschichten auf Polyelektrolytoberflächen keine etablierte Technik darstellt, waren zunächst umfassende Untersuchungen zu diesem Punkt nötig. Als Charakterisierungstechniken kam hierbei die QCM-D, die *in situ*-Ellipsometrie sowie die Röntgenreflektometrie zum Einsatz. QCM-D und Ellipsometrie wurden unter Flüssigkeit durchgeführt, für die Röntgenreflektometrie kam eine Zelle mit 100% gesättigter Wasserdampfathmosphäre zum Einsatz.

Zunächst wurde versucht, das DMPC als Doppelschicht auf den Polyelektrolytfilm aufzubringen. Dabei wurden die wichtigsten Erkenntnisse durch die QCM-D gewonnen. Die in /109/ beschriebene Technik, nach der DMPC-Filme auf negativ terminierten PSS-Grenzflächen gebildet werden können, konnte in eigenen Arbeiten nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurde das Aufplatzen der Lipidvesikel auf positiv terminierten PAH-Grenzflächen beobachtet. Dafür ist die Anwesenheit von 0,15 mol/l Natriumchlorid in der Vesikellösung notwendig. Ohne diese wurde nur die Adsorption intakter Vesikel beobachtet. Mittels QCM-D ist das Aufplatzen durch ein sehr ausgeprägtes Frequenzminimum sichtbar. Die Filme erwiesen sich jedoch beim Spülen als nicht stabil. Eine stabile Basislinie beim Spülen konnte erst durch das Zusetzen von $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l Calciumchlorid erreicht werden. Die Ergebnisse konnten mit der Röntgenreflektometrie und der *in situ*-Ellipsometrie bestätigt werden.

Später erwies es sich jedoch als schwierig, die Ergebnisse in der Neutronenreflektometrie umzusetzen. Als Hauptgrund dafür dürfte die um den Faktor 20 bis 40 größere Probenfläche bzw. das 1000-fach größere Probenvolumen im Vergleich zur QCM-D sein. Deshalb wurde ein stabileres System aufgebaut, bei welchem geladene Lipide untergemischt wurden. Zunächst wurde unter Verwendung von POPC ein System aufgebaut, welches keinen Phasenübergang besitzt. Es konnten mit Mischungen aus 1:1 und aus 4:1 POPC:DOTAP erfolgreich Lipid-Doppelschichten gebildet werden. Das gleiche System

wurde anschließend unter Verwendung von DMPC aufgebaut. Auch hier konnten erfolgreich Doppelschichten mit Mischungen aus 1:1 und aus 4:1 DMPC:DOTAP geformt werden. Als Hauptcharakterisierungstechnik für diese Systeme kam die Röntgenreflektometrie zum Einsatz. Die Ergebnisse konnten anschließend in der Neutronenreflektometrie bestätigt werden.

Schließlich wurde das Modellsystem unter Druck und Scherung mittels Neutronenreflektometrie untersucht. Die Neutronenreflektometrie war dafür die geeignetste Technik, da sie ein Bild der Grenzfläche auf molekularer Ebene erstellt. Neben der Schichtdicke der Filme im Nanometerbereich lassen sich auch Rückschlüsse auf den Wassergehalt der einzelnen Schichten ziehen.

In den Scherversuchen wurde eine Hyaluronsäurelösung gegen ein Siliziumsubstrat und gegen einen Polyelektrolytfilm vermessen. In den erstgenannten Experimenten konnte kein Effekt festgestellt werden. Weder die Bildung eines Hyaluronsäureadsorbates auf dem Substrat noch Strukturänderungen in der Volumenphase konnten sichtbar gemacht werden. Im Versuch mit dem Polyelektrolytfilm wurde die Streckung eines Hyaluronsäurefilmes, welcher sich durch hydrophobe Wechselwirkungen an den Polyelektrolytfilm angelagert hatte, beobachtet. Wesentliche Rückschlüsse auf die Schmierung von Gelenken lassen sich aus diesen Resultaten nicht ziehen. Ein Erklärungsmodell, nach dem die Hyaluronsäurekonzentration unter Scherung in Grenzflächennähe ansteigt, konnte nicht bestätigt werden.

In den Druckversuchen wurde als erster Schritt schweres Wasser bei 820 bar gegen einen Polyelektrolytfilm gedrückt. Abgesehen von einer verminderten Oberflächenrauigkeit des Polyelektrolyten wurde dabei kein Effekt festgestellt. Weder eine Verschiebung der Kiessig-Oszillationen, die eine Schichtdickenänderung anzeigen würde, noch eine Veränderung der Totalreflektionskante wurden beobachtet. Anschließend wurde eine Hyaluronsäurelösung gegen einen Polyelektrolytfilm gedrückt. Dabei war schon bei 50 bar ein deutlicher Effekt sichtbar. Der Film verlor ca. 25 % an Schichtdicke und 11% an Wasser. Ein weiteres Steigern des Druckes auf 100 bar sowie ein darauffolgendes Entspannen hatten keinen Einfluss auf die Reflektivität. Es handelt sich somit um einen irreversiblen Effekt. Schließlich wurden sowohl schweres Wasser als auch eine Hyalu-

ronsäurelösung bei 50 und 600 bar gegen einen Lipidfilm gedrückt. Dabei konnte innerhalb der Auflösungsgrenzen der Methode kein Effekt festgestellt werden.

Bei der Frage nach der Bedeutung der hier gewonnenen Ergebnisse ist zu beachten, dass ein stark vereinfachtes Modellsystem untersucht wurde. Dennoch können auf Basis der durchgeführten Studien Spekulationen hinsichtlich der Funktionsweise natürlicher Gelenke angestellt werden. Zum einen wäre es möglich, dass der Knorpel unter Druck reversibel Wasser mit der Synovialflüssigkeit austauscht. Es wäre denkbar, dass der Knorpel unter Druck Wasser abgibt und dadurch das Volumen der Synovialflüssigkeit ansteigen lässt. Sollte dieser Effekt im natürlichen Gelenk reversibel sein, so würde der Knorpel beim Entspannen wieder Wasser aufnehmen. Das unter Druck steigende Volumen der Synovialflüssigkeit würde dafür sorgen, dass sich die beiden Knorpelflächen nicht berühren können und somit nicht beschädigt werden.

Eine andere Deutung der Ergebnisse würde die These stützen, nach der die Lipide eine Schutzfunktion für den Knorpel besitzen. Werden die Lipide von der Knorpeloberfläche abgelöst, wie es wahrscheinlich in erkrankten Gelenken der Fall ist (vgl. Abschnitt 2.5), so ist die hygroskopische Hyaluronsäure in direkten Kontakt mit dem Knorpel. Diese könnte dann dem Knorpel allmählich sein Wasser entziehen und so einen Schädigungsprozess einleiten. Dies würde dem Ergebnis entsprechen, in dem bei 50 bar dem Polyelektrolytfilm bei irreversibler Schrumpfung Wasser entzogen wurde.

Der Wasserverlust dürfte zu einer Versprödung des Knorpels führen, ein Einreißen des Knorpels wäre dann die Folge. Auch dürfte die Ernährung der Knorpelzellen gestört werden. Befindet sich jedoch eine intakte Lipidschicht auf dem Knorpel, so ist die Synovialflüssigkeit nicht in der Lage, dem Knorpel Wasser zu entziehen. Dies würde dem Ergebnis des Versuches, bei dem Wasser gegen einen Lipidfilm gedrückt und keine Effekte beobachtet wurde, entsprechen. Demnach würden die Lipide zwei Funktionen im Gelenk erfüllen. Erstens bilden sie durch ihre „ölige Natur“ einen Schmierfilm auf der Knorpeloberfläche und zweitens schützen sie den Knorpel vor der hygroskopischen Hyaluronsäure.

Basierend auf den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit sollte es möglich sein, ein künstliches Gelenk, welches sich am Aufbau der Natur orientiert, nachzubauen. Die Be-

deutung der Hyaluronsäure für die Schmierung des Gelenkes ist allgemein akzeptiert. Die Struktur und Funktion des Lipides DPPC im Gelenk ist durch die hier vorliegende Arbeit ebenfalls erforscht. DPPC liegt als freies Vesikel in der Synovialflüssigkeit und vermutlich in Form intakter Vesikel an der Knorpelgrenzfläche im Gelenk vor. Abbildung 8.1 zeigt ein künstliches Gelenk, welches am Aufbau der Natur orientiert ist, als Boxmodell.

Titan
Polymer + Wasser
DPPC Vesikel
Hyaluronsäure, 0,15 M NaCl, DPPC Vesikel
DPPC Vesikel
Polymer + Wasser
Titan

Abb. 8.1: Boxmodell eines künstlichen Gelenkes, welches sich am Aufbau natürlicher Gelenke orientiert.

Abbildung 8.1 zeigt den Aufbau eines denkbaren künstlichen Gelenkes. Als Trägermaterial dient das bereits bewährte Titan. Darauf könnte ein hydrophiles Polymer, welches die Adsorption von Lipiden ermöglicht, aufgebracht werden. Denkbar wäre dafür auch der Einsatz der in dieser Arbeit verwendeten Polyelektrolyte. In einen Spalt zwischen der mit Polymer beschichteten Gelenkkugel und -pfanne wird dann eine physiologisch gepufferte Lösung aus Hyaluronsäure und DPPC-Vesikeln eingebracht. Da DPPC auch in Hyaluronsäurelösungen oberflächenaktiv ist, lagert sich dieses an der Grenzfläche an und bildet dann den Schmierfilm und die Schutzschicht für das Polymer.

Weiterhin wäre es denkbar, die derzeit angewendete Therapie, nach der Hyaluronsäure in erkrankte Gelenke injiziert wird, weiter zu verbessern. Bereits in /65/ wurden Mischungen aus Hyaluronsäure und DPPC in Gelenke von Ratten eingespritzt und dabei

eine signifikante Verringerung der Reibung sowie ein verbesserter Schutz des Knorpels festgestellt. Denkbar wäre, dass durch eine solche Therapie die Ausbildung einer neuen Lipidschicht auf dem Knorpel gefördert werden könnte. Deshalb sollte dieser Ansatz unbedingt weiterverfolgt werden.

Neben der Untersuchung der Schmierungseigenschaften von Gelenken war die Methodenentwicklung in der Neutronenreflektometrie und der Ellipsometrie ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit. Für die in situ Ellipsometrie wurde eine temperierbare Durchflusszelle entwickelt und erfolgreich getestet. Die Temperierbarkeit ist ein wichtiger Bestandteil, da es so erst möglich ist, die Adsorption von Lipiden oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur zu bestimmen. Dies gelang in einen Versuch erfolgreich. Weiterhin wurde eine anspruchsvolle, für große Probensubstrate geeignete Druckzelle für die Neutronenreflektometrie entwickelt. Diese ermöglicht es, Flüssigkeiten und Gase bis zu einen Druck von 1 kbar gegen eine Grenzfläche zu drücken. Die Zelle wurde erfolgreich in Betrieb genommen. Dies stellt insofern einen großen methodischen Fortschritt dar, da solche Versuche bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurden.

Schließlich wurde noch ein neuartiger Rheometeraufbau für die Neutronenreflektometrie entwickelt, der sowohl in horizontaler als auch vertikaler Streugeometrie eingesetzt werden kann. Diese Zelle ermöglicht es auch, das Drehmoment des Kegels auszu-lesen. Dadurch können Rückschlüsse auf die Viskosität der Probelösung gezogen werden. Ein Test der Zelle steht jedoch noch aus.

9. Literatur

- /1/ E. M. Bitzer, T. G. Grobe, H. Dörning, F. W. Schwartz, *GEK-Report akut-stationäre Versorgung 2005, Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, Band 37*, ISBN 3-537-44037-5
- /2/ <http://www.implantatforschung.de>, Internetpräsensts der orthopädischen Klinik der Universität Heidelberg, aufgerufen am 14.09.2005
- /3/ Helmut Rössler, Wolfgang Rüther, Peter Pitzen , *Orthopädie*, Urban & Fischer Verlag, 2003, ISBN 3437425900
- /4/ Fritz U. Niethard, Joachim Pfeil, *Orthopädie*, Thieme-Verlag, 4. Auflage, 2003, ISBN 3131308141
- /5/ Robert A. Gatter, H. Ralph Schumacher, *A practical handbook of joint fluid analysis*, Verlag Lea & Febiger, 2. Auflage, 1991, ISBN 0812113772
- /6/ A. G. Ogston, J. E. Stainer, *The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties*, Journal of Physiology, 119, 244 – 252, 1953
- /7/ Joseph J. Bunim, *Joint lubrication*, Arthritis and Rheumatism Foundation, 9(2), 169 - 170, 1958
- /8/ D. Dowson, V. Wright, *Human Joint Lubrication*, Biomedical Engineering, 4(4), 160 – 165, 1996
- /9/ Charles W. McCutchen, *Joint Lubrication*, Buletin of the Hospital for Joint Diseases Orthopaedic Institute, 18(2), 118 – 129, 1983
- /10/ P. N. Tandon, N. H. Bong. Kiran Kushwaha, *A new model for joint lubrication*, Interational Journal of Biomedical Computing, 35, 125 – 140, 1994

- /11/ A. Udworth, *Tribology of human and artificial joints*, Proceedings Institution of Mechanical Engineers, 205, 163 – 172, 1991
- /12/ J. Bruns, M. Volker, S. Luessenhop, *Pressure distribution in knee joints*, Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 113, 204 – 209, 1994
- /13/ B. A. Hills, *Boundary Lubrication in vivo*, Proceedings Institution of Mechanical Engineers, 214, Part H, 83 – 94, 1999
- /14/ S. W. Tan, M. R. Johns, P. F. Greenfield, *Hyaluronic acid - a versatile biopolymer*, Australien Journal of Biotechnology, 4(1), 38 – 43, 1990
- /15/ Norman F., *Isolation of HA from cock's comb*, Journal of Biological Chemistry, 181(2), 573 – 575, 1949
- /16/ M. A. G. Kaye, *Isolation of sodium hyaluronate*, Nature, 166, 478 – 479, 1950
- /17/ D. A. Lowther, H. J. Rogers, *Biosynthesis of Hyaluronate*, Nature, 175, 435-435, 1955
- /18/ Lars Sundblad, *The chemistry of synovial fluid with special regard to hyaluronic acid*, Acta orthopaedica Scandinavica, 20 (2), 105-113, 1950
- /19/ Endre A. Balazs, *Physical chemistry of hyaluronic acid*, Federation Proceedings, 17(4), 1086 – 1093, 1958
- /20/ Torvard C. Laurent, J. Robert E. Fraser, *Hyaluronan*, The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 6, 2397 – 2404, 1992
- /21/ Seppälä, *Synovial fluid in rheumatoid arthritis*, PhD thesis, University of Turku, 1964
- /22/ Sunblad, L., *Glycosaminoglycans and Glycoproteins in synovial fluid: The amino sugars*, Academic Press, New York & London, 1965

- /23/ David A. Swann, Eric L. Radin, Michael Nazimiec, Paul A. Weisser, Nancy Curran, George Lewinek, *Role of hyaluronic acid in joint lubrication*, *Annals of Rheumatic Diseases*, 33, 318 – 326, 1974
- /24/ Tovar C. Laurent, J. Robert E. Fraser, Ulla B. G. Laurent, Anna Engström-Laurent, *Hyaluronan in inflammatory joint disease*, *Acta Orthopaedica Scandinavica* 266(66), 116-120, 1995
- /25/ N. M. Hadler, , M. A. Napier, , *Structure of hyaluronic acid in synovial fluid and its influence of the movement of solutes*, *Sem Arthritis Rheum*, 7, 141, 1977
- /26/ A. Bjelle, *Content and composition of glycosaminoglycans in human knee joint cartilage. Variation with site and age in adults*, *Conn Tiss Res*, 3, 141, 1975
- /27/ Tetsu Takahashi, Kazuhiro Tominaga, Hiroshi Takano, Wataru Ariyoshi, Manabu Habu, Jinichi Fukuda, Hiroshi Maeda, *A decrease in molecular weight of hyaluronic acid in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders*, *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 33, 224 – 229, 2004
- /28/ Anders Bjelle, Torvald Anderson, Kirsti Granath, *Molecular weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in rheumatic diseases*, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 12, 133-138, 1982
- /29/ L. B. Dahl, I. M. Dahl, A. Engstrom-Laurent, , K. Granath, *Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies*, *Ann Rheum Dis*, 44, 817 – 822, 1985
- /30/ Grace H. Lo, Michael LaValley, Timothy McAlindon, David T Felson, *Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis*, *Journal of the American Medical Association* , 290, 23, 3115 – 3121, 2003
- /31/ B. Mazieres, B. Bannwarth, M. Dougados, M. Lequesne, *EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the standing commit-*

tee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trails, *Joint Bone Spine*, 68, 231 – 240, 2001

/32/ J. Denlinger, *Metabolism of sodium hyaluronate in articular and ocular tissues*, PhD thesis, University of Lille, France, 1982

/33/ K. Weil, *Die Viskosität der Hyaluronsäure*, *Chimia*, 11, 161 – 163, 1957

/34/ D. A. Gibbs, E. W. Merrill, K. A. Smith, *Rheology of hyaluronic acid*, *Biopolymers*, 6, 777 – 791, 1966

/35/ Martin Pisarcik, Dusan Bakos, Michal Ceppan, *Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 97, 197 – 202, 1995

/36/ S. Altman, H. Zeidler, R. Gaffga, W.-M. Kulicke, *Rheologie pathologischer Gelenkflüssigkeiten: II. Zur Strukturehologie der Hyaluronsäure*, *Rheological Acta*, 19, 642 – 659, 1980

/37/ L. Ambrosio, A. Borzacchiello, P. A. Netti, L. Nicolais, *Rheological study on hyaluronic acid and its derivates solutions*, *Journal of Macromolecular Research*, A36, 991 – 1000, 1999

/38/ Samuel J. Falcone, David M. Palmeri, Richard R. Berg, *Rheological and cohesive properties of hyaluronic acid*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76A(4) 721 – 728, 2005

/39/ Wendy E. Krause, Enrico G. Bellomo, Ralph H. Colby, *Rheology of Sodium Hyaluronate under Physiological Conditions*, *Biomacromolecules*, 2, 65-69, 2001

/40/ Mary K. Cowman, Shiro Matzuoka, *Experimental approaches to hyaluronan structure*, *Carbohydrate Research*, 340, 791 – 809, 2005

- /41/ Richard S. Johnson, William Niedermeier, *Viscosity of Biological Fluids, A review article*, Ala. J. Med. Sci., 5 (4), 428 – 433, 1968
- /42/ Y. Kobajashi, A. Okamoto, K. Nishinari, *Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights*, Biorheology, 31(3), 235 – 244, 1994
- /43/ Yunqian Mo, Kazuyoshi Nishinari, *Rheology of hyaluronan solutions under extensional flow*, Biorheology, 38, 379 – 387, 2001
- /44/ Dan Mazzucco, Gareth McKinley, Richard D. Scott, Myron Spector, *Rheology of joint fluid in total knee arthroplasty patients*, Journal of Orthopaedic Research, 20, 1157 – 1163, 2002
- /45/ Sinichi Takahashi, Kazuyoshi Ogino, *Viscoelasticity of hyaluronic acid alkaline-salts in aqueous solutions (II)*, Nihon Reoroji Gakkaishi, 25(3), 143 – 148, 1997
- /46/ Hege Bothner, Ove Wik, *Rheology of hyaluronate*, Acta Otolaryngol, 442, 25 – 30, 1987
- /47/ Atsushi Honda, Yoshiaki Ohashi, Yo Mori, *Effect of high-molecular-weight hyaluronic acid on the viscosity of rabbit pericardial fluid measured with cone and plate viscometer*, Chem. Pharm. Bull., 34(11), 4844 – 4847, 1986
- /48/ Iuliana Gatej, Marcel Popa, Marguerite Rinaudo, *Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution*, Biomacromolecules, 6, 61-67, 2005
- /49/ M. Villetti, R. Borsali, O. Diat, V. Soldi, K. Fukada, *SAXS from Polyelectrolyte Solutions under Shear: Xanthan and Na-Hyaluronate Examples*, Macromolecules, 33, 9418-9422, 2000
- /50/ Krister Holmberg, *Handbook of applied surface and Colloid Chemistry*, Wiley Verlag, ISBN: 0471490830, 2001

- /51/ Frank D. Gunstone, John L. Harwood, Albert J. Dijkstra, *The Lipid Handbook*, CRC Press, ISBN: 0849396883, 2007
- /52/ Y. Barenholz, G. Cevc, *Structure and Properties of Membranes*, Abschnitt 7 aus A. Baszkin, W. Norde, *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, Marcel Decker-Verlag, ISBN: 0824775813, 2000
- /53/ K. Larsson, *Classification of glyceride crystal forms*, Acta Chemica Scandinavica, 20, 2255–2260, 1966
- /54/ J.W. Hagemann, *Thermal behavior and polymorphism of acylglycerides*, in *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*, Garti, N. and Sato, K., Eds., Marcel Dekker, New York, 9–95, (1988)
- /55/ M. J. Kellens, *Polymorphism of saturated monoacid triglycerides*, Ph.D. thesis, K.U. Leuven, Belgium., 1991
- /56/ R. Winter, J. Erbes, C. Czeslik, A. Gabke, *Effect of pressure on the stability, phase behaviour and transformation kinetics between structures of lyotropic lipid mesophases and model membrane systems*, J. Phys.: Condens. Matter 10, 11499–11518, 1998
- /57/ Brian A. Hills, *Oligolamellar Lubrication of Joints by surface active phospholipids*, The Journal of Rheumatology, 16(1), 82 - 91, 1989
- /58/ T. Little, M. A. R. Freeman, S. A. R. Swanson, *Experiments on friction in the human hip joint*, Lubrication and Wear in Joints, 110 – 116, 1969
- /59/ E. S. Jones, *Joint lubrication*, Lancet, 1, 1426 – 1427, 1934
- /60/ J. Charnley, *Lubrication of animal joints*, Proceedings of the Biomechanical Symposium, 12 – 22, 1959
- /61/ H. Ralph Schumacher, Antonio J. Reginato, *Atlas of Synovial Fluid Analysis and Crystal Identification*, Verlag Lea & Febiger, 2. Auflage, 1991, ISBN 0812113322

- /62/ Ivonne Pasquali-Ronchetti, Daniela Quaglino, Guisepppe Mori, Barbara Baccelli, Peter Gosh, *Hyaluronan-Phospholipid Interactions*, Journal of Structural Biology, 120, 1-10, 1997
- /63/ V. Crescenzi, A. Taglienti, I. Pasquali-Ronchetti, *Supramolecular structures prevailing in aqueous hyaluronic acid and phospholipid vesicle mixtures: an electron microscopy and rheometric study*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 245, 133 – 135, 2004
- /64/ R. Ionov, A. El-Abed, M. Goldmann, P. Peretti, *Interactions of lipid monolayers with the natural biopolymer hyaluronic acid*, Biochimica et Biophysica Acta, 1667, 200 – 207, 2004
- /65/ Tsutomu Kawano, Hiromasa Miura, Taro Mawatari, Takaaki Moro-Oka, Yoshitaka Nakanishi, Hidehiko Higaki, Yukihide Iwamoto, *Mechanical Effects of the Intraarticular Administration of High Molecular Weight Hyaluronic Acid Plus Phospholipid on Synovial Joint Lubrication and Prevention of Articular Cartilage Degeneration in Experimental Osteoarthritis*, Arthritis & Rheumatism, 48(7), 1923–1929, 2003
- /66/ T. Svedberg, K. O. Petersen, *Die Ultrazentrifuge*, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden/Leipzig, 1940
- /67/ T. Svedberg, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A)*, 67, 117, 1934
- /68/ J. Hengstenberg, in: H. A. Stuart, *Die Physik der Hochpolymeren. Bd. II: Das Makromolekül in Lösung*. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg, S. 411 – 494, 1953
- /69/ A. Kuhn, *Kolloidchemisches Taschenbuch*, Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig, 4. Auflage, 1953
- /70/ G: Geiseler, *Ausgewählte physikalische Methoden in der organischen Chemie Band II*, Akademie-Verlag Berlin, 1963
- /71/ <http://www.kolloidanalytik.de/uz/uzindex.htm>, gefunden am 12.05.2008

/72/ Krister Holmberg, *Handbook of Applied Surface and Colloid Analysis*, Chapter 18, Michal Borkovec, *Measuring Particle Size by Light Scattering*, Verlag John Wiley & Sons, ISBN 9780471490838, 2002

/73/ Klaus Otto Bindernagel, Gerhard Geiseler, *Ausgewählte physikalische Methoden der organischen Chemie Bd. 1*, Akademie-Verlag, 1963

/74/ Matthias Otto, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, 3. Auflage, ISBN 3527314164, 2006

/75/ J. M. G. Cowi, *Chemie und Physik der synthetischen Polymere*, 2. Auflage, Viewegverlag, ISBN 3528066164, 1991

/76/ http://www.ifw.tu-bs.de/ifw/deutsch/forschung/physik_mess/transformation/kalorimetrie/index.htm, gefunden am 12.05.2008

/77/ Rodahl, M.; Höök, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B., *Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments*, Review of Scientific Instruments, 66, 3924-3930, 1995

/78/ G. Sauerbrey, Journal of Physics, 155, 206 - 222, 1959

/79/ D. S. Ballantine, R. M. White, S. I. Martin, A. J Ricco, E. T. Zellers, G. C. Frey, H. Wohltjen, *Acoustic wave sensors: theory, design and physico-chemical applications*. Academic Press Inc., ISBN: 0120774607, 1996.

/80/ F. Höök, *Development of a novel QCM technique for protein adsorption studies*, PhD thesis, Chalmers University of Technology, 2001.

/81/ Ralf Richter, *The Formation of Solid-Supported Lipid Membranes and Two-Dimensional Assembly of Proteins*, Ph.D. thesis, University of Bordeaux, 2004

/82/ M. V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, B. Kasemo, Phys. Script. 1999, 59, 391

/83/ <http://www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/WS06/QCM-D.pdf>, gefunden am 14.05.2008

/84/ <http://www.timkolbe.de/ellipsometrie.pdf>, gefunden am 11.06.2008

/85/ Harland Tompkins, Eugene Irene, *Handbook of Ellipsometry*, William Andrew Publishing, ISBN: 0815514999, 2005

/86/ Ellipsometer Woollam M-44, Benutzer Handbuch

/87/ L. Cauchy, Bull. Des. Sc. Math., 14, 9, 1830

/88/ Allan H. Harvey, John S. Gallagher, J. M. H. Levelt Sengers, *Revised formulation for the refractive index of water and steam as a function of wavelength, temperature and density*, J. Phys. Chem. Ref. Data, 27(4), 761 – 774, 1998

/89/ David R. Lide, *CRC Handbook of chemistry and physics*, 83rd Edition, CRC Press New York, ISBN 0849304830, 2002

/90/ Frank Schreiber, Alexander Gerlach, *X-Ray and Neutron Reflectivity for the investigation of thin films*, gefunden auf <http://www.physchem.ox.ac.uk/~fs> am 12.02.2005

/91/ M. Tolan, *X-Ray scattering from soft-matter thin films*, Springer tracts in modern physics, Vol. 148, Springer Verlag Heidelberg, ISBN: 3540651829, 1999

/92/ Thomas Gutberlet, *Reflectometry with X-rays and neutrons*, Vortrag, unbekanntes Jahr

/93/ L. G. Parratt, *Surface studies of solids by total reflection of x-rays*, Physical Review Letters., 95, 359, 1954

/94/ http://www.hmi.de/bensc/instrumentation/instrumente/v6/refl/parratt_en.html, gefunden am 11.06.2008

- /95/ Ingo Busch, *Röntgenreflektometrie und diffuse Röntgenstreuung zur Charakterisierung von Grenzflächenrauheiten und Grenzflächenmorphologien im Bereich der Nanometrologie*, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2004
- /96/ Dirk Schwendel, *Untersuchung der Grenzphasenbildung von Oligo(ethylenglykol)-terminierten Alkanthiolatmonolagen auf Gold in Kontakt mit Wasser und wässriger Proteinlösung*, Dissertation, Universität Heidelberg, 2003
- /97/ Rumen Krastev, Max Planck Institut für Kolloide und Grenzflächen, Golm, *Privatmitteilung*, 10.5.2005
- /98/ Mathias Lösche, Johannes Schmitt, Gero Decher, Wim G. Bouwman, Kristian Kjaer, *Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry*, *Macromolecules*, 31, 8893 – 8906, 1998
- /99/ Z. Ou, M. Muthukumar, *Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations*, *Journal of Chemical Physics*, 124(15), 154902, 2006
- /100/ Gero Decher, *Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites*, *Science*, 277, 1232 – 1237, 1997
- /101/ Anton Plech, Tim Salditt, Christian Münster, Johannes Peisl, *Investigation of structure and growth of self-assembled polyelectrolyte layers by X-ray and neutron scattering under grazing angles*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 233, 74 – 82, 2000
- /102/ Sergio Bonora, Andrea Trincherò, Armida Torreggiani, Maurizio Tamba, *A DSC and raman study of the interaction between tricresyl phosphates (TCP) and phospholipids liposomes*, *Croatia Chemica Acta*, 80(1), 81-89, 2007
- /103/ Markus R. Wenk, Thomas Alt, Anna Seelig, Joachim Seelig, *Octyl- β -D-Glucopyranoside partitioning into lipid bilayers: Thermodynamics of Binding and structural changes of the bilayer*, *Biophysical Journal*, 72, 1719 - 1731, 1997

- /104/ S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, and E. Sackmann, *Structure of an adsorbed dimyristoylphosphocholine bilayer measured with specular reflection of neutrons*, *Biophysical Journal*, 59, 289 – 294, 1991
- /105/ B. Seantier, C. Breffa, O. Felix, G. Decher, *Dissipation-Enhanced Quartz Crystal Microbalance studies on the experimental parameters controlling the formation of supported lipid bilayers*, *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 21755-21765, 2005
- /106/ J. Majewski, J. Y. Wong, C. K. Park, M. Seitz, J. N. Israelachvili, G. S. Smith, *Structural Studies of Polymer-Cushioned Lipid Bilayers*, *Biophysical Journal*, 75, 2363–2367, 1998
- /107/ J. Y. Wong, J. Majewski, M. Seitz, C. K. Park, J. N. Israelachvili, G. S. Smith, *Polymer-Cushioned Bilayers. I. A Structural Study of Various Preparation Methods Using Neutron Reflectometry*, *Biophysical Journal*, 77, 1445–1457, 1999
- /108/ R. Kügler, W. Knoll, *Polyelectrolyte supported lipid membranes*, *Bioelectrochemistry*, 56, 175 - 178 ,2002
- /109/ Christophe Delajon, Thomas Gutberlet, Roland Steitz, Helmuth Möhwald, Rumen Krastev, *Formation of polyelectrolyte multilayer architectures with embedded DMPC studied in situ by Neutron Reflectometry*, *Langmuir*, 21, 8509-8514, 2005
- /110/ T. L. Kuhl, J. Majewski, J. Y. Wong, S. Steinberg, D. E. Leckband, J. N. Israelachvili, G. S. Smith, *A Neutron reflectometry study of polymer-modified phospholipid monolayers at the solid-solution Interface: polyethylene glycol –lipids on silane-modified substrates*, *Biophysical Journal*, 75, 2352-2362, 1998
- /111/ Sandra Gromelski, *Wechselwirkung zwischen Lipiden und DNA -Auf dem Weg zum künstlichen Virus*, Doktorarbeit, Universität Potsdam, 2006

/112/ G. Weindl , M. Schaller , M. Schäfer-Korting , H. C. Korting, *Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects*, Skin Pharmacology and Physiology, 17(5), 207-213, 2004

/113/ W. Y. Chen , G. Abatangelo, *Functions of hyaluronan in wound repair*, Wound Repair and Regeneration, 7(2), 79-89, 1999

10. Anhang A: Fitparameter der Röntgen- und Neutronenreflektometriedaten

Tab. 10.1: Fitergebnisse der Röntgenreflektometriemessungen

Abbildung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6.4 (schwarz)	2.02	4.3	316	1.21	19				0	0.164
6.4 (rot)	2.02	4.3	316	1.21	19	26.5	1.25	6	0	0.261
6.7 (schwarz)	2.02	3	309	1.27	23				0	0.151
6.7 (rot)	2.02	3	309	1.27	23	19.7	1.25	5.7	0	0.189
6.8 (schwarz)	2.02	2.5	301	1.26	17.6				0	0.115
6.8 (rot)	2.02	2.5	301	1.56	17.6	29.8	2.1	8.3	0	0.213
6.9 (schwarz)	2.02	2.8	310	1.48	14.5				0	0.141
6.9 (rot)	2.02	2.8	310	1.48	14.5	20.1	1.45	7.1	0	0.218
6.10 (schwarz)	2.02	2.7	341	1.15	17.2				0	0.108
6.10 (rot)	2.02	2.7	341	1.15	17.2	21.8	0.86	7.9	0	0.255
6.13 (schwarz)	2.02	2.7	341	1.19	19.9				0	0.116
6.13 (rot)	2.02	2.7	341	1.19	19.9	19.5	0.67	6.8	0	0.145

Spaltenbezeichnungen

- 1 SLD Substrat [10^{-5} \AA^{-2}]
- 2 Rauigkeit Substrat [\AA]
- 3 Schichtdicke Polyelektrolytfilm [\AA]
- 4 SLD Polyelektrolytfilm [10^{-5} \AA^{-2}]
- 5 Rauigkeit Polyelektrolytfilm [\AA]
- 6 Schichtdicke Lipidfilm [\AA]
- 7 SLD Lipidfilm [10^{-5} \AA^{-2}]
- 8 Rauigkeit Lipidfilm [\AA]
- 9 SLD Luft [10^{-5} \AA^{-2}]
- 10 χ^2 des Fits

Tab. 10.2: Fitergebnisse der Scherexperimente

Tabelle 7.1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zeile 1	2,07	15	377	3,68	10				6,36	0,235
Zeile 2	2,07	15	377	3,68	10	66	5,9	10	6,21	0,211
Zeile 3	2,07	15	382	3,02	10	63	5,7	10	6,21	0,346
Zeile 4	2,07	15	377	3,68	10	28	4,2	6	6,21	0,284
Zeile 5	2,07	15	377	3,68	10	13	2,5	2	6,21	0,148
Zeile 6	2,07	15	377	3,68	10	12	2,5	2	6,21	0,177
Zeile 7	2,07	15	377	3,68	10	12	2,5	2	6,21	0,201
Zeile 8	2,07	15	387	3,33	10	0	0	0	6,21	0,248
Zeile 9	2,07	15	387	3,33	10	0	0	0	6,21	0,219

Spaltenbezeichnungen

- 1 SLD Substrat [10^{-6} \AA^{-2}]
- 2 Rauigkeit Substrat [\AA]
- 3 Schichtdicke Polyelektrolytfilm [\AA]
- 4 SLD Polyelektrolytfilm [10^{-6} \AA^{-2}]
- 5 Rauigkeit Polyelektrolytfilm [\AA]
- 6 Schichtdicke HS-Film [\AA]
- 7 SLD HS-Film [10^{-6} \AA^{-2}]
- 8 Rauigkeit HS-Film [\AA]
- 9 SLD Volumenphase [10^{-6} \AA^{-2}]
- 10 χ^2 des Fits

Tab. 10.3: Fitergebnisse der Druckmessungen ohne Verwendung von Lipiden

Abbildung	1	2	3	4	5	6	7
7.3 (schwarz)	1,8	32,2	382	3,28	5	6,1	0,118
7.3 (rot)	1,8	32,2	380	3,46	2	6,1	0,156
7.4 (schwarz)	2,07	17,7	447	3,51	11	6,36	0,181
7.4 (rot)	2,07	17,7	340	3,2	11	6,36	0,172
7.4 (blau)	2,07	17,7	328	3,21	11	6,36	0,185
7.4 (grün)	2,07	17,7	337	3,32	15	6,36	0,214

Spaltenbezeichnungen

- 1 SLD Substrat [10^{-6} \AA^{-2}]
- 2 Rauigkeit Substrat [\AA]
- 3 Schichtdicke Polyelektrolytfilm [\AA]
- 4 SLD Polyelektrolytfilm [10^{-6} \AA^{-2}]
- 5 Rauigkeit Polyelektrolytfilm [\AA]
- 6 SLD Volumenphase [10^{-6} \AA^{-2}]
- 7 χ^2 des Fits

Tab. 10.4: Fitergebnisse der Neutronenreflektometriemessungen unter Verwendung von Lipiden

Abbildung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6.10 (schwarz)	2,07	23,3	363	4,25	15,1				6,36	0,169
6.10 (rot)	2,07	23,3	364	4,27	15,1	61,8	3,03	10	6,36	0,246
6.14 (schwarz)	2,07	27,6	378	4,08	15				6,17	0,261
6.14 (rot)	2,07	27,6	360	3,87	15	47,2	2,42	12	6,17	0,182
7.6 (schwarz)	2,07	27,6	378	4,08	15				6,17	0,261
7.6 (rot)	2,07	27,6	360	3,87	15	47,2	2,42	12	6,17	0,182
7.6 (grün)	2,07	27,6	360	3,87	15	47,2	2,42	12	6,17	0,182
7.6 (blau)	2,07	27,6	360	3,87	15	42,3	2,27	12	6,17	0,188
7.6 (ocker)	2,07	27,6	360	3,87	15	42,3	2,27	12	6,17	0,195
7.7 (schwarz)	2,07	23,3	363	4,25	15,1				6,36	0,169
7.7 (rot)	2,07	23,3	364	4,27	15,1	61,8	3,03	10	6,36	0,246
7.7 (blau)	2,07	23,3	350	4,01	10	55,8	3,49	10	6,36	0,185
7.7 (grün)	2,07	23,3	350	4,01	10	55,8	3,49	10	6,36	0,175
7.7 (ocker)	2,07	23,3	350	4,01	10	48	3,38	10	6,36	0,165

Spaltenbezeichnungen

- 1 SLD Substrat [10^{-6} \AA^{-2}]
- 2 Rauigkeit Substrat [\AA]
- 3 Schichtdicke Polyelektrolytfilm [\AA]
- 4 SLD Polyelektrolytfilm [10^{-6} \AA^{-2}]
- 5 Rauigkeit Polyelektrolytfilm [\AA]
- 6 Schichtdicke Lipidfilm [\AA]
- 7 SLD Lipidfilm [10^{-6} \AA^{-2}]
- 8 Rauigkeit Lipidfilm [\AA]
- 9 SLD Volumenphase [10^{-6} \AA^{-2}]
- 10 χ^2 des Fits

11. Anhang B: Verwendete Chemikalien

Tab. 11.1: Verwendete Chemikalien

Nr.	Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
1	Hyaluronic Acid, Sodium Salt	Calbiochem	385908-500
2	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC)	Avanti Polar Lipids	850345
3	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DPPC)	Avanti Polar Lipids	850355
4	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC)	Avanti Polar Lipids	850457
5	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DOTAP)	Avanti Polar Lipids	890890
6	Polyethylenimine (PEI)	Sigma-Aldrich	40,872-7
7	Poly(Sodium 4-Styrenesulfonate) (PSS)	Sigma-Aldrich	24,305-1
8	Poly(Allylamine Hydrochloride) (PAH)	Sigma-Aldrich	28,322-3

12. Danksagung

Wissenschaftliche Arbeit entsteht heutzutage wohl in den seltensten Fällen durch geniale Geistesblitze im Elfenbeinturm, sondern vielmehr durch Teamarbeit. So habe ich es zumindest während meiner Tätigkeit am Institut für Angewandte Physikalische Chemie der Universität Heidelberg empfunden – und so ist die hier vorliegende Arbeit auch entstanden. Deshalb möchte ich zum Abschluss bei dem vielen Helfer bedanken.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Reiner Dahint bedanken, dass er mir zunächst die Chance eröffnet hat in seiner Gruppe zu promovieren. Besonders bedanken möchte ich mich dafür, dass er mir über die vielen Anlaufschwierigkeiten, die ein Absolvent von einer kleinen Fachhochschule an so einer großen Universität wie in Heidelberg hat, hinweg geholfen hat. Ferner werden mir unsere gemeinsamen Ausflüge in Europas Neutronenleiterhallen und die damit verbundenen Aufenthalte in Hotels, Gästehäusern, Zügen und Flughäfen wohl immer in Erinnerung bleiben.

An zweiter Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Motomu Tanaka für die Übernahme der Funktion des Zweitgutachters dieser Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Grunze für die fruchtbaren Diskussionen zu Beginn der Arbeit und die Vermittlung zahlreicher Kontakte bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Dr. Roland Steitz vom Hahn-Meitner-Institut Berlin richten. Ihm verdanke ich einen Grossteil meines Wissens über die Reflektometrie. Es war mir stets ein besonderes Vergnügen mit ihm gemeinsam zu messen. Zum einen weil ich unglaublich viel von seinen experimentellen Geschick und seinem Präzisionsverständnis lernen und profitieren konnte, zum anderen weil mir seine vielen lustigen Erzählungen aus seinem Wissenschaftlerleben in Erinnerung geblieben sind.

Den nächsten ganz besonderen Dank möchte ich an Dr. Holger Strauss richten, mit dem mich natürlich mehr verbindet als die wissenschaftliche Arbeit verbindet. Ohne seine Unterstützung und sein Engagement hätte diese Arbeit möglicherweise im Chaos geän-

det. Durch unsere Zusammenarbeit konnte ich wirklich interessanten Einblick in die Kolloidanalytik gewinnen, den ich sonst wohl nicht erhalten hätte. Ferner möchte ich mich dafür bedanken, dass ich durch ihn Zugang zu der exzellenten Infrastruktur am MPI für Kolloide und Grenzflächen in Golm hatte. Deshalb möchte ich an dieser Stelle auch meinen Dank an die Mitarbeiter des MPI's für die Unterstützung während meiner Experimente und die vielen fruchtbaren Diskussionen richten.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Hellweg und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung und die Durchführung der Lichtstreuemessungen bedanken. Durch ihn erhielt ich nicht nur einen Einblick in diese wichtige Technik der Kolloid- und Polymeranalytik, sondern auch einen Crash-Kurs im Bedienen von Linux. Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeitern seines Arbeitskreises für die angenehme Arbeitsatmosphäre in Berlin.

Mein Dank gilt ferner den Instrumentwissenschaftlern vom AMOR am PSI in Villigen, Dr. Thomas Gutberlet und Dr. Jochen Stahn sowie vom ADAM am ILL in Grenoble, Dr. Maximilian Wolff für ihre unerlässliche Hilfe und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Ferner möchte ich Dr. Ralf Richter für seine Starthilfe bei der Arbeit mit Lipiden danken. Ohne seine vielen Hinweise und Interpretationen meiner QCM-D Daten hätte die Anfertigung dieser Arbeit möglicherweise noch ein Jahr länger gedauert.

Einen weiteren Dank möchte ich an Herrn Gerhard Schmidt von der Firma BASF für die Unterstützung bei den Viskositätsmessungen und den Einblick in die chemische Großindustrie richten.

Da ein wesentliches Augenmerk der Arbeit auf der Methodenentwicklung, möchte ich einen besonderen Dank an die feinmechanische Werkstatt des PCI's der Universität Heidelberg um Herrn Werner Weis, Herrn Klaus Schmitt, Herrn Reinhold Jehle und Herrn Günther Meinsch richten. Ohne ihre Unterstützung wäre ein viele experimentelle Arbeiten nicht möglich gewesen. Besonders die Entwicklung der komplexen Flusszelle für die Ellipsometrie war für alle Beteiligten eine große Herausforderung.

Einen weitem Dank möchte ich an Herrn Peter Jeschka für seine Unterstützung bei dem die gesamte Arbeit begleitenden Computerproblemen richten. Weiterhin gilt mein Dank allen Verwaltungsmitarbeiter des Instituts für ihre Unterstützung, sei es durch die Bereitstellung von Arbeitsmitteln oder die Hilfe bei meinen zahlreichen Reisekostenabrechnungen und sonstigen bürokratischen Hürden.

Darüber hinaus möchte ich Dr. Mohamed Eita dafür danken, es mit mir 3,5 Jahre im Reinstraum, der seinen Namen wohl vor allem nicht durch meinen mangelnden Ordnungssinn verdiente, ausgehalten zu haben. Unsere vielen spannenden Diskussionen werden mir immer in Erinnerung bleiben und ich hoffe, dass wir eines Tages die Gelegenheit haben, daran anzuknüpfen. Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen Kollegen vom APC für alle Unterstützung und die vielen Diskussionen bedanken. Ich drücke auf jeden Fall allen noch Tätigen die Daumen, auch eines Tages so ein gedrucktes Werk vor sich liegen zu haben.

Zu guter letzt gilt meinen Dank allen, ohne deren Unterstützung diese Arbeit wohl kaum fertig geworden wäre: meinen Eltern, meiner Oma meinen Geschwistern und trotz allem auch meiner Frau Tala. Ich möchte mich für alle Unterstützung in dieser entbehrungsreichen Zeit sowie das Verständnis, mich viel zu selten zu Gesicht bekommen zu haben, bedanken.

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, den 02.09.2008

Thomas Kaltofen