

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich - Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Dipl.-Phys. Valentin Hagel  
aus Tübingen-Pfrondorf

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2013



# Struktur-Funktions-Korrelationen in PEG-DA- und Hyaluronsäure-Hydrogelen

Gutachter:

Prof. Dr. Joachim P. Spatz

Prof. Dr. Ulrich Schwarz

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Biologische Gewebe und Biopolymere</b>	<b>2</b>
1.1 Biologische Gewebe . . . . .	2
1.2 Hyaluronsäure als Biopolymer und Hyaluronsäuregele . . . . .	4
<b>2 Hydrogele als EZM-Modellsysteme</b>	<b>7</b>
2.1 Kettenkonformationen und Statistik . . . . .	8
2.2 Allgemeine Theorie des mechanischen Verhaltens . . . . .	10
2.3 Diffusion und Partition in Hydrogelen . . . . .	14
<b>3 Motivation und Ziele</b>	<b>18</b>
<b>II Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>4 Herstellung und Charakterisierung der Hydrogele</b>	<b>22</b>

---

4.1	Hyaluronsäure-Hydrogele . . . . .	22
4.2	PEG-DA-Hydrogele . . . . .	27
<b>5</b>	<b>Untersuchung von Struktur- und Transporteigenschaften</b>	<b>29</b>
5.1	Fraktionierung und Charakterisierung der FITC-Dextrane . . . . .	29
5.2	Partitionskoeffizientenanalyse . . . . .	31
5.3	Diffusionskoeffizientenanalyse . . . . .	36
<b>III</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Hyaluronsäuregele mit bio-inspirierten Quervernetzern</b>	<b>47</b>
6.1	Gelbildungsanalyse und Mechanische Charakterisierung . . . . .	49
6.2	Transporteigenschaften und Strukturuntersuchungen . . . . .	68
6.3	Abschlussdiskussion . . . . .	76
<b>7</b>	<b>Transport- und Strukturuntersuchungen in PEG-DA-Hydrogelen</b>	<b>80</b>
7.1	Partitionskoeffizientenanalyse . . . . .	80
7.2	Diffusionskoeffizientenanalyse . . . . .	86
7.3	Diskussion . . . . .	91
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Ausblick</b>	<b>101</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>105</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>A</b>	<b>Berechnungen</b>	<b>115</b>
A.1	Persistenzlänge von Hyaluronsäure in PBS . . . . .	115

---

A.2	Auswertung mit unbeweglicher Fraktion . . . . .	115
A.3	Mittlerer Abstand der Thiolgruppen . . . . .	116
A.4	Quervernetzungspunkte und elastische Ketten . . . . .	117
A.5	Maschengrößenberechnung . . . . .	117
A.6	Gleichgewichtspartition . . . . .	117
<b>B</b>	<b>Biokompatibilitätstests</b>	<b>119</b>
<b>C</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>121</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>

# Zusammenfassung

Die Erforschung von Struktur-Funktions-Korrelationen in biologischen Geweben ist seit vielen Jahren ein großes Forschungsgebiet und dient nicht nur der grundlagenorientierten Wissenschaft, sondern auch der Entwicklung von Konzepten zur Herstellung neuartiger Biomaterialien. In dieser Arbeit wurden neuartige bio-inspirierte Vernetzer, die durch das Quervernetzermolekül im Elastin, das sogenannte Desmosin, inspiriert sind, mit langkettigen thiolierten Hyaluronsäuremolekülen zu dreidimensionalen Hydrogelen vernetzt und charakterisiert. Durch Variation des Vernetzungsgrads und auch der Ladungsdichte des Polymernetzwerks wurden mithilfe von mechanischen Analysen Struktur-Funktions-Korrelationen herausgearbeitet. Dabei wurde herausgefunden, dass eine positive Ladung auf dem Vernetzermolekül, wie sie auch das Desmosin-Molekül besitzt, die mechanischen Eigenschaften und Schwellraten der Gele signifikant und charakteristisch beeinflusst. Zur Strukturanalyse der Gele wurden theoretische Netzwerkmodelle herangezogen. Das Spannungs-Deformations-Verhalten bei starker Deformation wurde charakterisiert und bewertet. Durch die Analyse der Transportprozesse größendefinierter Testmoleküle in den Gelen wurden weitere Strukturuntersuchungen durchgeführt, das Diffusionsverhalten charakterisiert und dieses mit Diffusionsmodellen analysiert. In einem vollsynthetischen Modellsystem aus PEG-DA-Hydrogelen wurden weitere Diffusions- und Permeabilitätsstudien durchgeführt und mithilfe von Modellanalysen bewertet. Dabei hat sich gezeigt, dass Wechselwirkungen zwischen den diffundierenden Molekülen (FITC-Dextranen) und dem PEG-DA-Polymernetzwerk eine große Rolle spielen. Diese konnten durch ein empirisches Diffusionsmodell mit einem Wechselwirkungsterm bei unterschiedlichen Schwellraten und auch bei unterschiedlichen Temperaturen präzise beschrieben werden.

# Abstract

The investigation of structure-function relationships in biological tissues is a major research area since several decades and does not only contribute to basic scientific knowledge but also imparts concepts for the development of new biomaterials. In this work novel bio-inspired cross-linkers based on desmosine, the cross-linker in natural elastin, were used to prepare and characterize hydrogels with thiolated hyaluronic acid. Based on mechanical analyses structure-function relationships were investigated as a function of the cross-linking and the charge density of the polymeric network. It has been found that a positive charge on the cross-linker, as it is also featured on desmosine, significantly influences the swelling behavior and the mechanical properties of the formed hydrogels. For the analysis of the gel structure mechanical models have been applied. The stress-strain behavior at strong compressive loads has been characterized and evaluated. Hydrogel structure has also been analyzed via characterization of diffusion processes of spherical test molecules (FITC-dextran) with defined size and comparing the results to diffusion models. In a fully synthetic model system of PEG-DA-hydrogels further diffusion and permeability assays were performed and analyzed with theoretical models. In this system it was found that interactions between the diffusing molecules (FITC-dextran) and the polymeric network play an important role. An empirical model was found to describe these interactions at different swelling ratios and at different temperature.

# Teil I

## Einleitung

# Biologische Gewebe und Biopolymere

In den 1960er Jahren wurde damit begonnen, das mechanische Verhalten biologischer Materialien mit kontinuumsmechanischen Ansätzen zu ergründen und diese Untersuchungen haben zum Verständnis der Unterschiede von gesundem und krankhaft verändertem Gewebe beigetragen sowie auch zur Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten [1]. Doch wegen der Komplexität der zugrundeliegenden Mikrostruktur biologischer Materialien - Proteine, Zellen, biologische Gewebe und Organe besitzen eine nahezu unüberschaubare Vielfalt an Materialstrukturen und Eigenschaften - werden für ein umfassenderes Verständnis neue Erklärungsmodelle gebraucht, mit welchen die mechanischen Eigenschaften biologischer Gewebe und Organe auf molekularer Ebene verstanden werden können [1]. Aufgrund der Komplexität biologischer Gewebe ist es oft geeigneter, mit Modellsystemen zu arbeiten, in welchen die Komplexität reduziert wird und gewisse Eigenschaften gezielt untersucht werden können. Dazu eignen sich künstlich hergestellte Hydrogele. Dies sind wassergefüllte, quervernetzte Polymernetzwerke, die biologische Gewebe in vereinfachter Weise nachbilden. In Bezug auf diese Arbeit werden zunächst die wichtigsten Eigenschaften und Strukturmerkmale biologischer Gewebe beleuchtet, die Rolle von Elastin und Hyaluronsäure erläutert und ein Überblick über die Herstellung von Hyaluronsäuregelen gegeben.

## 1.1 Biologische Gewebe

Biologische Gewebe existieren in vielen unterschiedlichen Formen. Jede Form ist dabei auf spezielle Funktionen ausgerichtet und besitzt eine Mikrostruktur mit

welcher diese Funktionen erfüllt werden können. Biologische Gewebe bestehen grundsätzlich aus Zellen, der fundamentalen Struktur- und Funktionseinheit von Lebewesen, und extrazellulärer Matrix (EZM) [2]. Im Menschen gibt es etwa 200 verschiedene Zelltypen, die unterschiedliche Gene exprimieren und damit unterschiedliche Aufgaben erfüllen [2]. Zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix besteht ein enges Wechselspiel. Während die EZM die Form, Orientierung, Mobilität und die Gesamtfunktion der Zellen steuert, wird die EZM wiederum durch Zellen aufgebaut und instand gehalten [1]. Die EZM erfüllt dabei mehrere Funktionen. Sie verleiht dem Gewebe Halt und Form und stellt für die Zellen eine biologische Matrix dar, auf welcher sie migrieren und adhären können. Darüber hinaus stellt sie eine wässrige Umgebung dar, in welcher verschiedene Substanzen wie etwa Nährstoffe, Hormone, Wachstumsfaktoren oder Stoffwechselprodukte diffundieren können und gewährleistet damit einen Transportweg zwischen den Zellen und dem Kapillarnetzwerk [2]. Die EZM bestimmt also einerseits die mechanischen Eigenschaften der Gewebe und andererseits auch die Diffusionseigenschaften verschiedener Biomoleküle. Die mechanischen Eigenschaften werden dabei hauptsächlich durch drei Struktureinheiten bestimmt: Kollagen, Elastin und Proteoglykane [2]. In vielen Geweben ist es das Wechselspiel zwischen den elastischen Eigenschaften des Elastins und der Zugfestigkeit des Kollagens, das die Gewebe insgesamt reißfest und dehnbar macht und die gewebespezifischen mechanischen Eigenschaften definiert [3].

### 1.1.1 Elastin

Elastin ist ein hochelastisches, gummiartiges Proteinnetzwerk [4, 5], dessen Fasern sich auf ein Vielfaches der ursprünglichen Länge dehnen können und befindet sich zu einem hohen Anteil im elastischen Bindegewebe der Haut, der Lunge oder in Blutgefäßen [6]. Die Ergründung der elastischen Eigenschaften des Elastins wird seit vielen Jahrzehnten mit großem Eifer verfolgt, doch die genauen molekularen Mechanismen, die für die elastischen Eigenschaften verantwortlich sind, sind bisher nicht genau bekannt [7]. Es wird vermutet, dass das elastische Verhalten der

Elastinfasern durch das Bild einer entropischen Feder beschrieben und verstanden werden kann [6]. Dabei wird angenommen, dass die Dehnung der Polypeptidketten zu einer Reduktion der entropischen Freiheit der Kette selbst und auch der umgebenden Wassermoleküle führt, wodurch eine rüctreibende Kraft entsteht [6, 7, 8]. Diese These wird durch einige Experimenten unterstützt, die gezeigt haben, dass das Elastin-Netzwerk ein System struktureller Unordnung ist, welches nicht aus ausgedehnten Sekundärstrukturen besteht, sondern vielmehr aus fluktuierenden und transienten lokalen Motiven [6]. Eine Polypeptidkette des Elastins besitzt etwa 800 Aminosäuren. Die Quervernetzung dieser Ketten wird durch enzymatisch vernetzte Lysinseitenketten hergestellt [4]. In einer Polypeptidkette des Elastins befinden sich etwa 40 solcher Seitenketten [9]. Das bedeutet, dass die Quervernetzungsdichte gering ist, da nur etwa jede zwanzigste Aminosäure zur Quervernetzung zur Verfügung steht [9]. Die Lysinseitenketten besitzen eine geordnete Struktur innerhalb der Kette und vernetzen vorwiegend durch eine Kombination von vier Seitenketten unter Ausbildung eines sogenannten Desmosins [9], ein vierarmiger Vernetzer mit Seitenarmen an zwei Proteinketten und einem positiv geladenen Pyridinkern (siehe Abbildung 3.1).

## 1.2 Hyaluronsäure als Biopolymer und Hyaluronsäuregele

Hyaluronsäure (HA) ist ein in allen Bindegeweben universell vorkommendes Glykosaminoglykan [10]. Im Knorpel beispielsweise wird Aggrekan durch HA in einer multi-molekularen Konfiguration zusammengehalten [11], die den Grundbaustein eines hydratisierten Gels darstellt, durch das einerseits die Anordnung der Kollagenfasern stabilisiert wird und andererseits einwirkende Kräfte absorbiert werden [12]. Native Hyaluronsäure ist ein Polysaccharid, das im Vergleich zu anderen extrazellulären Polysacchariden nicht im Golgi-Apparat synthetisiert wird, sondern durch HA-Synthasen, die in die Zellmembran eingebettet sind [13]. Von diesen wird HA als langkettiges, lineares Molekül in den extrazellulären Raum extrudiert und wird entweder als intaktes Molekül abgespalten oder durch Hyaluronidasen bzw.

radikalische Spaltung abgebaut [13]. Native HA besitzt eine Molekularmasse von  $10^3 - 10^4$  kDa und eine Gesamtlänge von 2 - 25  $\mu\text{m}$  [14] und ist aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin aufgebaut [15]. HA ist nicht nur ein strukturgebender Baustein der EZM, sondern auch bei einer Vielzahl von Gewebe- und Zellfunktionen entscheidend, wie beispielsweise bei der Signalübertragung von Zellen, bei der Wundheilung oder der Morphogenese [16].

Aufgrund seiner hohen negativen Ladung zieht HA positive Ionen an und erzeugt damit einen osmotischen Druck, durch welchen viel Wasser gespeichert werden kann [14]. Aus diesem Grund und da HA keine Immunreaktion hervorruft [17], sich die Kettenlänge leicht variieren lässt [14], sich die HA-Ketten funktionalisieren lassen [18] und HA enzymatisch im Bioreaktor ohne Verunreinigungen hergestellt werden kann, hat sich HA zu einem idealen Baustein für die Herstellung von Hydrogelen und Anwendungen im Bereich des *Tissue Engineerings* entwickelt [16]. Biopolymere haben zur Herstellung von Hydrogelen für biomedizinische Anwendungen einige Vorteile gegenüber rein synthetischen Materialien, denn diese erzeugen oft Entzündungsreaktionen, können mit Zellen und Geweben nicht interagieren und lösen sich durch nicht-biologische Abbauprozesse auf [16]. Im Gegensatz dazu besitzen Biomaterialien aus Biopolymeren das Potential, von biologischen Systemen erkannt zu werden und lassen sich in natürlicher Weise abbauen [16]. Aus HA hergestellte Hydrogele besitzen eine Reihe sehr günstiger Eigenschaften. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Hyaluronsäuregele in kontrollierter Weise abgebaut werden können [19], dass sie Angiogenese [14] und Osteointegration [14] fördern und die Zellmigration und Ausbildung von perizellulärer Matrix erleichtern [20].

Viele Hyaluronsäuregele werden durch eine chemische Quervernetzung der funktionellen Gruppen der HA durch Additions- oder Kondensationsreaktionen oder durch radikalische Polymerisation hergestellt [16]. Zur Quervernetzung von HA wurden verschiedene Modifikationen der funktionellen Gruppen entwickelt, wobei zur Modifikation meistens die Carboxy- oder Hydroxygruppen adressiert wurden [16]. Als vernetzbare Linker wurden beispielsweise Tyramid, Methacrylat, Brom-

cetat, Thiopropionyl Hydrazid oder Glycidyl Methacrylat angebracht[16]. Thiolierte HA spielt eine große Rolle bei der Herstellung von Hyaluronsäuregelen. Mit thiolierter HA und Gelatine konnten beispielsweise Gele hergestellt werden, die bei Variation der Gelkomposition durch ihre unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften den entstehenden Zell Phänotyp bestimmen [21]. Die Schermodule der Gele betragen zwischen 11 Pa und 3,5 kPa und es konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Eigenschaften im wesentlichen durch die HA-Konzentration und die Quervernetzungsichte bestimmt werden. Mit HA wurden auch bereits doppelt-quervernetzte Hydrogele hergestellt. Durch Quervernetzung von HA-Mikrogelen, deren Oberflächen Aldehyd-modifiziert wurden, konnten Gele hergestellt werden, deren strukturelle Hierarchie und mechanischen Eigenschaften für den Einsatz als Weichgewebeersatz geeignet ist [22]. Neueste technische Entwicklungen zur Herstellung von Hyaluronsäuregelen umfassen auch den Einsatz von Bioprintern [16]. Ein Bioprinter ist ein Gerät, das durch eine Schicht-für-Schicht Auftragung von biologischer Substanz eine 3-dimensionale Fabrikation von biologischen Geweben erlaubt [23]. Mit einem vierarmigen Polyethylenglykol-Tetraacrylat Vernetzer und thiolierter HA konnten beispielsweise aus Mikrokapillaren Makrofilamente gedruckt werden, die ihre Form bewahren können [24]. Es konnte weiter auch gezeigt werden, dass mit dieser Technik röhrenförmige Konstrukte, die vereinfachte Blutgefäße darstellen, erzeugt werden können, die in Zellkultur ihre Form bewahren [24]. Die Quervernetzung der thiolierten HA zur Erzeugung von Makrofilamenten nach dieser Technik wurde auch bereits mit Gold-Nanopartikeln realisiert und dabei konnte beobachtet werden, dass sich die extrudierten Makrofilamente dynamisch verändern indem sie untereinander Quervernetzungen bilden [25]. Wurden Zellen in eine solche Gelmatrix eingebettet, so konnte beobachtet werden, dass diese eine solche dynamische Umgebung nutzen können, um eine eigene EZM aufzubauen.

## Hydrogele als EZM-Modellsysteme

Hydrogele sind drei-dimensionale Wasser-gefüllte Polymernetzwerke, die als einfache Modellsysteme der extra-zellulären Matrix betrachtet werden können (synthetische EZM). Diese verhalten sich im Allgemeinen wie gummielastische Materialien [26]. Um das mechanische Verhalten von Hydrogelen zu verstehen, ist es notwendig, das Verhalten der zugrundeliegenden Polymerketten zu verstehen. Nachfolgend werden zunächst einige theoretische Ansätze zur Beschreibung von Polymerketten erläutert und der Bezug zu realen Polymerketten hergestellt. Außerdem werden wichtige Polymerkettenparameter, wie etwa die Persistenzlänge, erläutert. Anschließend werden grundlegende Netzwerkmodelle beschrieben, die mithilfe der Statistischen Physik entwickelt wurden und einen Zusammenhang zwischen den mikroskopischen und makroskopischen Eigenschaften von elastischen Polymernetzwerken herstellen. Eine wesentliche Charakteristik von Hydrogelen ist die Maschengröße, die einerseits die mechanischen Eigenschaften bestimmt und andererseits aber auch Diffusionsprozesse beeinflusst und bestimmt. Dazu werden im letzten Teil theoretische Modelle zur Beschreibung der Partitionskoeffizienten sphärischer Moleküle für verschiedene Hydrogelstrukturen vorgestellt, die mithilfe der Statistischen Physik entwickelt wurden. Weiter werden zwei grundlegende Diffusionsmodelle, mit welchen die Diffusionskoeffizienten von Makromolekülen in Hydrogelen vorhergesagt werden können, beschrieben.

## 2.1 Kettenkonformationen und Statistik

Zur Beschreibung von Polymerkonformationen gibt es verschiedene Modelle. Die einfachsten Modelle sind idealisierte Modelle, in welchen die Kettenelemente, wie die Atome eines freien Gases, kleinerlei Wechselwirkungen unterliegen und sich ohne Behinderungen durchdringen können.

### 2.1.1 Modell der frei beweglichen Kette

Im Modell der frei beweglichen Kette wird angenommen, dass die Polymerkette aus  $n$  Segmenten von der Länge  $l$  besteht und dass sich die einzelnen Kettensegmente frei bewegen können und nur durch die Verbindungen zueinander in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind. Der End-zu-End Vektor  $\vec{r}$  ist gegeben durch [27]

$$\vec{r} = \sum_{i=1}^n \vec{r}_i \quad (2.1)$$

Eine wichtige Größe zur Beschreibung einer Polymerkette ist der mittlere quadratische End-zu-End Abstand  $\langle r^2 \rangle$ , der für eine beliebige Kette gegeben ist durch [27]

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 + 2l^2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \langle \cos \theta_{ij} \rangle \quad (2.2)$$

Die *frei bewegliche Kette* ist eine Kette, deren Bindungswinkel zueinander vollständig unkorreliert sind und von daher ist  $\langle \cos \theta_{ij} \rangle = 0$  für  $i \neq j$  und der mittlere quadratischen End-zu-End-Abstand der Polymerkette ist gegeben durch

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 \quad (2.3)$$

### 2.1.2 Modell der frei rotierbaren Kette

Die Konformation von Polymeren hängt in einem realistischen Bild aber von den chemischen Eigenschaften der Monomere und deren Wechselwirkung ab. Im Modell der frei rotierbaren Kette wird angenommen, dass die Bindungswinkel  $\theta$  konstant

sind. Es wird keine bestimmte Kettenkonformation bevorzugt und die mittlere Projektion von der Bindung  $i + 1$  auf eine Ebene die orthogonal auf der Achse von Bindung  $i$  liegt, ist Null. In diesem Fall ist  $\langle \cos \theta_{ij} \rangle \neq 0$  und für eine unendlich lange Kette lässt sich berechnen [27], dass der mittlere End-zu-End Abstand gegeben ist durch

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 \left[ \frac{1 + \cos(180 - \theta)}{1 - \cos(180 - \theta)} \right] \quad (2.4)$$

Setzt man den Bindungswinkel von  $sp_3$ -hybridisierten Kohlenstoffatomen ein ( $\theta = 110^\circ$ ), so ergibt sich ein mittleren End-zu-End Abstand von [27]

$$\langle r^2 \rangle \approx 2nl^2. \quad (2.5)$$

Realen Polymerketten besitzen aufgrund von Einschränkungen (bsp. Rotationsbarrieren, Ladungswechselwirkungen, Bindungswinkel) meistens einen mittleren quadratischen End-zu-End Abstand der deutlich grösser als der in Gleichung 2.4 berechnete Wert ist. Dies lässt sich durch das charakteristische Verhältnis [27]

$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2} \quad (2.6)$$

ausdrücken. Dabei gibt  $C_n$  die Anzahl der Bindungen in der Kette an, ab welcher die Korrelationen statistisch unkorreliert sind. Die Kettenlänge  $C_n l$  bestehend aus  $C_n$  Kettenelementen entspricht dabei dem sogenannten Kuhn'schen Segment [28]. Unter der Betrachtung von transformierten Ketten, deren Elemente aus Kuhn'schen Segmenten bestehen, ist es möglich, jede beliebige Polymerkette als *random walk*-Konfiguration zu betrachten [29]. Unter  $\Theta$ -Konditionen beträgt  $C_n$  für Polyethylenoxid  $\approx 4$  [30]. Das bedeutet, dass diese Polymerketten etwa den doppelten End-zu-End Abstand einer idealisierten Kette aus C-Atomen besitzen.

### 2.1.3 Persistenzlänge und Konturlänge

Die Polymerphysik unterscheidet drei Typen von Filamenten, die sich durch die Persistenzlänge und die Konturlänge charakterisieren lassen: die Persistenzlänge

$l_p$  ist ein Maß für die Steifigkeit einer Polymerkette und definiert als die typische Längenskala ab welcher Tangens-Tangens-Korrelationen entlang der Polymerkettenkontur abfallen, welche sich durch die Korrelationsfunktion

$$K(\delta l) = \int dl \vec{e}(l) \vec{e}(l + (\delta l)) \quad (2.7)$$

definieren lässt.  $l$  ist dabei die lineare Koordinate entlang der Kettenkontur und  $\vec{e}(l)$  der Einheitsvektor, der die Kettenausrichtung angibt. Die Konturlänge  $L_c$  ist die Gesamtlänge der Polymerkette. In Netzwerken ist die Konturlänge die Länge zwischen Quervernetzungspunkten.

Eine Polymerkette wird als flexibel bezeichnet wenn  $l_p \ll L_c$  und als steif wenn das Gegenteil der Fall ist. Das elastische Verhalten von vollständig flexiblen Polymerketten geht auf den rein entropischen Prozess der Konfigurationsänderungen zurück. Die rücktreibende Kraft entsteht dabei dadurch, dass die Deformation die Anzahl der möglichen Polymerkettenkonfigurationen reduziert. Eine völlig gestreckte Polymerkette besitzt nur noch eine Konfiguration.

Die meisten Biopolymere zeigen ein elastisches Verhalten zwischen den beiden Extremen und werden von daher als semiflexible Polymere bezeichnet. Durch diese Eigenschaft bilden sie in Netzwerken keine Loops und Knoten, da die Persistenzlängen und die Konturlänge hier in der gleichen Größenordnung liegt, sind hier aber trotzdem flexibel genug um thermisch angetriebene Biegebewegungen ausführen zu können [31].

## 2.2 Allgemeine Theorie des mechanischen Verhaltens

Bereits im 19. Jahrhundert wurde durch Kraft- und Längenmessungen an Gummimaterialien bei unterschiedlichen Temperaturen herausgefunden, dass das elastische Verhalten von Gummimaterialien ein entropie-getriebener Prozess ist (Gogh 1805, Lord Kelvin 1857 und Joule 1859). Davon ausgehend wurde in den

1930er Jahren ein molekulares Bild der entropischen Kräfte von Polymerketten entwickelt (Meyer, von Susich und Valko 1932, Kuhn 1934), das den Grundstein für die Entwicklung von molekularen Netzwerkmodellen zur Beschreibung des mechanischen Verhaltens von Polymernetzwerken lieferte. Gummielastische Materialien (Elastomere) können dadurch charakterisiert werden, dass sie eine hohe Dehnbarkeit besitzen, sich nach einer Dehnung wieder vollständig in den Ausgangszustand zurückverformen und die Deformation im wesentlichen ein entropischer Prozess ist [26]. Dies lässt sich leicht verstehen, denn während eine Polymerkette deformiert wird, ändert sich die Anzahl der möglichen Konfigurationen. Die auf das Netzwerk ausgeübte Kraft führt zu einer höheren Ordnung der willkürlich angeordneten Ketten und die rücktreibende elastische Kraft des Netzwerks entsteht aus der Reduktion der Entropie der deformierten Ketten. Im völlig gestreckten Zustand besitzt eine Kette nur noch eine Konfiguration und die Entropie ist minimal. Im geschwollenen Zustand weisen die meisten Hydrogele gummielastisches Verhalten auf [26] und mithilfe von molekularen Netzwerkmodellen der Gummielastizität ist es möglich, die Polymerstruktur von Hydrogelen zu analysieren und wichtige Informationen über die Vernetzung der Polymerketten zu gewinnen.

### 2.2.1 Netzwerkmodelle

Die innere Energie ändert sich bei der Deformation wenig, da die Polymerkette flexibel ist und sich die Bindungslängen zwischen den Monomeren während der Deformation nicht oder nur sehr wenig ändern. Von daher gilt für die Änderung der freien Energie bei der Deformation eines Elastomers [29]

$$\Delta F = \Delta(U - TS) \cong -T\Delta S. \quad (2.8)$$

Die klassischen Theorien der Gummielastizität beruhen alle auf zwei grundlegenden Annahmen [28]:

i) die freie Energie des Netzwerks ist die Summe der freien Energien der einzelnen

Netzwerkketten

ii) der End-zu-End Abstand der Netzwerkketten gehorcht einer Gauß'schen Verteilung und die einzelnen Netzwerkketten können sich frei durchdringen.

Netzwerkmodelle basieren alle auf der Betrachtung des entropie-elastischen Verhaltens der mikroskopischen Netzwerkstruktur unter Krafteinwirkung. Das einfachste Modell ist das sogenannte **affine Netzwerkmodell** [32]. Hier wird angenommen, dass die makroskopisch einwirkende Kraft die mikroskopische Netzwerkstruktur *affin* transformiert. Die Polymerketten können sich dabei frei bewegen, sind aber durch ihre Endpunkte fixiert und in ein *elastisches Medium* eingebettet, in welchem sie sich durch die makroskopische Krafteinwirkung bewegen können. Die Konnektivität der Polymerketten spielt hierbei keine Rolle, da die Endpunkte fixiert sind. Die Spannung auf die Probe ist gegeben durch

$$\sigma = \frac{\partial F}{\partial \lambda}, \quad (2.9)$$

wobei  $\lambda$  die Deformation der Probe darstellt. Berechnet man die freie Energie  $F$  für Gauß'sche Ketten (frei bewegliche Ketten) mit einer Anzahldichte  $\nu$ , so ergibt sich [33]

$$F = \nu \frac{3kT}{2l^2n} \langle r^2 \rangle \quad (2.10)$$

und daraus ergibt sich bei einer Probendeformation  $\lambda$  [33]

$$\sigma = \nu kT(\lambda^2 - \lambda^{-1}) \quad (2.11)$$

und der Schermodul  $G$  ist gegeben durch

$$G_{affin} = \nu RT. \quad (2.12)$$

Eines der ersten Netzwerkmodelle, das auch Fluktuationen der Quervernetzungs-punkte berücksichtigt, ist das **Phantom – Netzwerkmodell** [34]. Im Vergleich zum affinen Netzwerkmodell sind hier die Netzwerkketten miteinander verbunden und bilden eine Netzwerkstruktur und man kann sich vorstellen, dass die Ketten an der Probenoberfläche fixiert sind, so dass eine makroskopische Kraft auf die Probe

wirken kann. Wird die Probe deformiert, dann wirken Kräfte auf die Quervernetzungspunkte und in Abhängigkeit der möglichen Bewegungsfreiheit der Quervernetzungspunkte werden die einzelnen Netzwerketten mehr oder weniger stark deformiert. Die mittlere quadratische Fluktuation eines Quervernetzungspunkts hängt von der Funktionalität des Quervernetzungspunkts ab und kann durch den Ausdruck [35]

$$\langle \Delta r_{ij}^2 \rangle = \frac{2}{\phi} \langle r^2 \rangle_0 \quad (2.13)$$

dargestellt werden. Dabei ist  $\langle \Delta r_{ij}^2 \rangle$  die mittlere quadratische Fluktuation eines Quervernetzungspunkts und  $\langle r^2 \rangle_0$  der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand. Daraus ist ersichtlich, dass die Bewegungsfreiheit der Quervernetzungspunkte abnimmt wenn deren Funktionalität  $\phi$  zunimmt. Im Vergleich zum affinen Netzwerkmodell sagt das Phantom-Netzwerkmodell durch die zugelassenen Fluktuationen der Quervernetzungspunkten einen deutlich geringeren Schermodul  $G$  vorher, der für dieses Modell gegeben ist durch [36]

$$G_{Phantom} = (\nu - \kappa)RT. \quad (2.14)$$

$\kappa$  ist hierbei die Molzahl der Quervernetzungspunkte pro Einheitsvolumen, die sich durch  $\kappa = 2\nu/\phi$  berechnen lässt [33]. Das affine Netzwerkmodell und das Phantom-Netzwerkmodell stellen durch ihren Ansatz sozusagen ein oberes und unteres Limit für die erwarteten Schermodule von gummielastischen Netzwerken dar [27]. Es gibt eine Reihe anderer Modelle für welche eine eingeschränkte Beweglichkeit der Knotenpunkte angenommen wird, wie etwa das Netzwerkmodell von Flory und Erman [36]. Aus einer solchen Betrachtung werden dazwischenliegende Schermodule berechnet  $G_{Phantom} < G_{Flory-Erman} < G_{affin}$ .

## 2.3 Diffusion und Partition in Hydrogelen

### 2.3.1 Partitionskoeffizienten

Wenn ein Gel in eine Lösung gebracht wird, in der Moleküle gelöst sind, die in das Gel eindiffundieren können, dann wird sich eine gewisse Gleichgewichtskonzentration der Moleküle im Gel einstellen. Dieser Zustand ist dann erreicht wenn das chemische Potential  $\mu$  des Moleküls in beiden Phasen gleich ist. Das Verhältnis der Molekülkonzentration im Gel zur Konzentration in der umgebenden Lösung ist durch den sogenannten Partitionskoeffizienten bestimmt, der für ein gewisses Molekül (mit Index  $i$ ) gegeben ist durch [37]

$$K_i = \frac{c_i}{c_o}. \quad (2.15)$$

Die Größe des Partitionskoeffizienten hängt dabei von verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Moleküle und des Gels ab. Wichtige physikalisch Eigenschaften sind etwa die Geometrie der Moleküle oder die Struktur des Polymernetzwerks, zu den chemische Eigenschaften zählt etwa die Polarität. Sind die Wechselwirkungen unabhängig voneinander, so lässt sich der Partitionskoeffizient folgendermaßen darstellen [37] :

$$\ln K_i = \ln K_{i,o} + \ln K_{i,el} + \ln K_{i,hphob} + \ln K_{i,biosp} + \ln K_{i,size} + \ln K_{i,conf}. \quad (2.16)$$

Dabei repräsentieren *el*, *hphob*, *biosp*, *size*, *conf* elektrische Interaktionen, hydrophobe Wechselwirkungen, biospezifische Affinität, Größen- und Konformationseffekte. Der Term  $\ln K_{i,o}$  umfasst andere mögliche Wechselwirkungen wie beispielsweise van-der-Waals-Kräfte.

Im einfachsten Fall, den man betrachten kann, gibt es keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Polymernetzwerk und den Molekülen. Dann wird der Partitionskoeffizient allein durch geometrische Effekte bestimmt und kann mit den Methoden der statistischen Physik berechnet werden. Dazu wird das Verhältnis der Anzahl der zugänglichen Zustände zwischen den zwei Phasen für ein gege-

benes Molekül betrachtet [38]. Die Zugänglichkeit lässt sich dadurch ausdrücken, dass die Energie des Zustands im Vergleich zur thermischen Energie günstig ist. Damit lassen sich allgemeine Gleichungen formulieren für die sterischen Partitionskoeffizienten von Molekülen in verschiedenen Gelstrukturen. Die sterischen Partitionskoeffizienten sphärischer Moleküle vom Radius  $r_i$  in einem Netzwerk aus willkürlich angeordneten Polymerfasern vom Radius  $r_f$  sind durch das Modell von Schnitzer gegeben durch [38]

$$K_i = \exp(-v_a) \cdot \exp \left[ \frac{v_a \cdot \left(1 - \left(\frac{r_m}{r_f}\right)^2\right)}{(1 - v_a)} \right]. \quad (2.17)$$

Dabei ist  $r_m$  der Radius des ausgeschlossenen Volumens, der gegeben ist durch  $r_m = r_i + r_f$  und  $v_a$  das ausgeschlossene Volumen, das berechnet werden kann mit  $v_a = \pi r_f^2 l$ .  $l$  entspricht hier der Gesamtlänge der Polymerfasern pro Einheitsvolumen.  $v_a$  entspricht etwa der Polymervolumenfraktion  $\phi$  des Hydrogels und von daher lässt sich das ausgeschlossene Volumen berechnen mit  $v_a \approx \phi = 1/SR$  [37], mit  $SR$  der Schwellrate des Hydrogels.

Aus der Berechnung der theoretischen Partitionskoeffizienten für eine Netzwerkstruktur, die aus regelmäßig angeordneten Ebenen aufgebaut ist, erhält man [38]

$$K_i = 1 - s \cdot r_m. \quad (2.18)$$

Dabei ist  $s$  die mittlere Oberfläche der Netzwerkebenen pro Einheitsvolumen. Und für eine Netzwerkstruktur, die aus willkürlich angeordneten Ebenen aufgebaut ist erhält man einen exponentiellen Verlauf von der Form [38]

$$K_i = \exp(s \cdot r_m). \quad (2.19)$$

Durch Fitanalysen an gemessene Partitionskoeffizienten ist es damit möglich, die Struktur eines Hydrogels zu bestimmen.

### 2.3.2 Diffusion in Hydrogelen

Zur Beschreibung von Diffusionseigenschaften in Hydrogelen wurden eine Reihe von theoretischen Modellen entwickelt die auf unterschiedlichen physikalischen Konzepten gründen. Eine vereinheitlichte Theorie gibt es bisher jedoch nicht. Der grösste Teil der vorhandenen Modelle basiert entweder auf der Analyse von hydrodynamischen Effekten, Effekten des reduzierten freien Volumens im Gel oder auf Obstruktionseffekten [39].

#### Hydrodynamische Theorien

Hydrodynamische Beschreibungen der Diffusionseigenschaften in Hydrogelen basieren auf der Stokes-Einstein-Relation. Dabei wird angenommen, dass die diffundierenden Moleküle durch *starre Kugeln* beschrieben werden können, die groß im Vergleich zu den Lösemittelmolekülen sind. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird durch einen Reibungsterm  $f$  bestimmt, welcher die Reduktion der Diffusionsgeschwindigkeit durch das Vorhandensein des Polymere verursacht. Dabei kann man sich vorstellen, dass die Polymerketten Elemente in der Lösung darstellen, die einen hydrodynamischen Widerstand aufbauen. Nähert sich ein Molekül einer Polymerkette, so erfährt es einen Reibungseffekt durch die abgebremsten Lösemittelmoleküle in der Umgebung der Polymerkette. In hydrodynamischen Theorien geht es darum, eine genaue Beschreibung des Reibungsterms  $f$  zu liefern. Das Modell von Cukier ist ein grundlegendes hydrodynamisches Modell [40, 39], und beschreibt die Reduktion der Diffusionskoeffizienten in einem Gel für hydrodynamische Strukturelemente von unterschiedlicher Geometrie.

#### Obstruktionsmodelle

In Obstruktionsmodellen wird angenommen, dass die Polymerketten undurchdringliche Hindernisse für die diffundierenden Moleküle darstellen, die dazu führen, dass sich der Diffusionsweg im Vergleich zum reinen Lösungsmittel erhöht [41]. Die Polymerkette stellen sozusagen einen Filter dar, der nur solchen Molekülen einen Transportweg erlaubt, die klein genug sind um zwischen den Polymerket-

ten hindurchdiffundieren zu können. Es gibt eine Reihe solcher Modelle [41] und Ogston hat ein Modell entwickelt, das die Diffusionskoeffizienten von größeren Molekülen beschreibt [42]. Dabei wurde angenommen, dass das Polymernetzwerk aus willkürlich angeordneten, langgestreckten und undurchdringlichen Fasern besteht. Folglich hängt der Diffusionskoeffizient eines gegebenen Moleküls sowohl von der Maschengrößenverteilung des Netzwerks als auch von seiner Größe ab. Berechnet man die Maschengrößenverteilung für ein solches Netzwerk, dann lässt sich damit folgende Gleichung für die reduzierten Diffusionskoeffizienten ableiten [42]

$$\frac{D}{D_0} = \exp \left[ -\frac{r_h + r_f}{r_f} \phi^{1/2} \right]. \quad (2.20)$$

Dabei ist  $r_h$  der hydrodynamische Radius der diffundierenden Moleküle,  $\phi$  die Polymervolumenfraktion im Gel und  $r_f$  der Querschnittsradius der Polymerketten.

## Motivation und Ziele

Die elastischen Eigenschaften von Geweben hängen eng mit der Struktur und Funktion von Elastin zusammen [4, 7]. Die Schwierigkeit Elastin als homogenes und reproduzierbar zusammengesetztes Material aus natürlichen Quellen zu isolieren haben jedoch die Notwendigkeit geschaffen, die molekularen Mechanismen der elastischen Eigenschaften des Elastins auf anderen Wegen zu erforschen. Dazu wurden einerseits molekulardynamische Simulationen lokaler Elastin-Peptidstrukturen durchgeführt [43, 6] und andererseits eine Reihe verschiedener experimenteller Ansätze verfolgt. Es wurde beispielsweise eine Form des Tropoelastins, die unvernetzte Vorstufe des Elastins, durch Rekombination mit *E.Coli*-Bakterien hergestellt und untersucht [44]. Dabei hat sich jedoch herausgestellt, dass nur kleine Ausbeuten möglich sind und dass die Tropoelastinmoleküle schnell defragmentieren. Von daher waren auf diesem Weg weitere biochemische Modifikationen notwendig, um mithilfe von Bakterien stabile Tropoelastinmoleküle zu exprimieren [44]. Ein anderer Weg wurde dadurch beschritten, dass Polypeptidketten synthetisiert und mechanisch charakterisiert wurden, die aus typischen Peptideinheiten des Elastins bestehen wie etwa  $(VPG)_n$ ,  $(VPGG)_n$  oder  $(VPGVG)_n$  mit V = Valin, P = Prolin und G = Glycin [6].

Elastin ist durch Desmosin, ein vierfach Aminosäure-funktionalisiertes Pyridinium-Derivat, quervernetzt (siehe Abbildung ). Dabei ist die genaue Funktion des Desmosins und auch die Frage, ob die positive Ladung auf dem Pyridinkern die elastischen Eigenschaften des Gewebes beeinflusst, bisher nicht genau bekannt. Simulationen haben gezeigt, dass es im Bereich des Quervernetzungsmotifs zu einer reduzierten Flexibilität der Elastin-Ketten kommt.

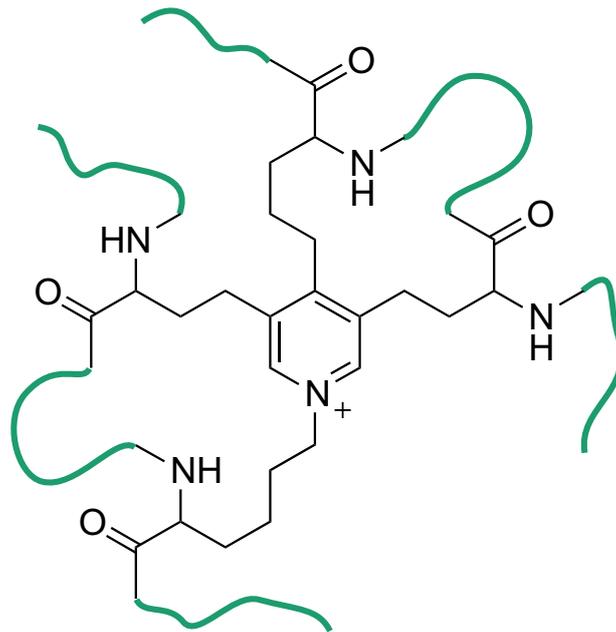


Abbildung 3.1: Quervernetzungseinheit des Elastins: Der Quervernetzer Desmosin ist mit jeweils zwei Armen an das Aminosäurerückgrat des Elastin-Netzwerks angebunden. Abbildung aus [45]

Hier wurden Struktur-Funktions-Korrelationen an Hydrogelen erforscht, die durch Desmosin-inspirierte Quervernetzer hergestellt wurden. Anstelle von vier-arm Vernetzern wurden zwei-armige Vernetzer eingesetzt, um die gleiche Verknüpfungsstruktur wie im Elastin zu erzeugen, wo ein Vernetzer, der vier Arme besitzt, nur zwei Polypeptidketten verknüpft. Zur Hydrogelherstellung wurden chemisch modifizierte Hyluronsäuremoleküle [46] eingesetzt. Hyaluronsäure ist ein langkettiges, lineares Zuckermolekül, besitzt negativ geladene Carboxy-Gruppen wie sie auch in den Polypeptidketten des Elastins zu finden sind [47] und eignet sich sehr gut zur Herstellung von Hydrogelen (siehe Abschnitt 1.2). Durch den direkten Vergleich der mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen mit geladenen und ungeladenen Vernetzern wurde ein spezieller Fokus auf die Untersuchung des Einflusses von Ladungswechselwirkungen gelegt. Anhand von Diffusions- und Permeabilitätsmessungen mit sphärischer Testmoleküle (geladen und ungeladen) werden Zusammenhänge zwischen der Struktur und den Transportprozessen analysiert und bewertet.

Polyethylenglykol-Hydrogele sind vielseitig eingesetzte Hydrogele und werden im Bereich medizinischer Anwendungen als Implantate, Wundheilungspflaster und Träger für *drug delivery*-Anwendungen eingesetzt oder auch zur Herstellung von Kontaktlinsen [48]. In einem weiteren vollsynthetischen Hydrogelsystem aus PEG-DA-Polymer (Polyethylenglykol-Diacrylat) werden durch mechanische Messungen, Diffusions- und Permeabilitätsmessungen Struktur-Funktions-Korrelationen erforscht, Hydrogeleigenschaften analysiert und ein Diffusionsmodell entwickelt.

## **Teil II**

# **Material und Methoden**

# Herstellung und Charakterisierung der Hydrogele

## 4.1 Hyaluronsäure-Hydrogele

### 4.1.1 Gelherstellung

Die Herstellung thiolierter Hyaluronsäure (HA-SH) wurde von Seraphine Wegner (Universität Heidelberg) nach einem in der Literatur beschriebenen Schema [18] durchgeführt. Dazu wurden die Carboxy-Gruppen von hochmolekularer Hyaluronsäure (Hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi*, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) durch Reaktion mit DTP (3,3'-dithiobis(propanoic hydrazide)) mit Thiolgruppen funktionalisiert (Endprodukt: HA-DTPH, hier mit HA-SH bezeichnet). Der Funktionalisierungsgrad  $k$  (mittlere Anzahl der Thiolgruppen pro Hyaluronsäuremonomer) wurde mithilfe von Ellman's Reagenz [49, 50] durchgeführt. Die Messung des mittleren Molekulargewichts der synthetisierten thiolierten Hyaluronsäure wurde von Isabell Nuss (MPI-IS, Stuttgart) gel-chromatographisch bestimmt (MW  $\approx$  450kDa).

Zur Gelherstellung wurde HA-SH in PBS (Phosphate buffered saline, 137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, GIBCO, Auckland, Neuseeland) bei einer Konzentration von 4 mg/ml aufgelöst. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH-Lösung (1M) auf 9,0 eingestellt. Die mit Acrylat-Gruppen end-funktionalisierten Quervernetzer (siehe Abbildung 6.1) wurden in einer PBS/Ethanol-Lösung (Ethanol 99,8 % p.a., Carl

Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Mischungsverhältnis von 50/50 (v/v) aufgelöst. Die Konzentration wurde dabei in Abhängigkeit der eingesetzten Vernetzeräquivalente eingestellt. Alle eingesetzten Lösungsmittel wurden im Ultraschallbad (Elmasonic S 30, Elma, Singen, Deutschland) für 15 min zur Vermeidung von Oxidationsreaktionen wie etwa die Ausbildung von Disulfidbrücken entgast (*degas mode*, 37 kHz). Die Quervernetzer wurden in der PBS/Ethanol-Lösung mithilfe des Ultraschallbads (5 min) aufgelöst. Der Auflösungsprozess der thiolierten Hyaluronsäure wurde durch leichtes Vortexen (IKA VORTEX GENIUS 3, IKA-Werke, Staufen, Deutschland) auf niedriger Stufe beschleunigt. Beide Lösungen wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5702, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei  $1,5 \cdot 10^3$  rpm für 1 - 2 min von beim Auflösungsprozess entstandenen Luftblasen befreit. Anschließend wurden die Lösungen im Verhältnis 70/30 (HA-SH-Lösung/Vernetzerlösung) zusammengeführt und durch leichtes Vortexen auf niedriger Stufe für 3 s homogen durchmischt. Damit betrug die Endkonzentration von HA-SH in der Polymerisierungslösung stets 2,8 % (m/v). Die Polymerisierungslösung wurde in eine für die jeweilige Messung geeignete Form (nachfolgend beschrieben) gegossen und bei  $= 37$  °C für 24 h gelieren lassen. Abbildung 4.1 zeigt das Reaktionsschema der Quervernetzungsreaktion durch Thio-Michael-Addition. Die Reaktion läuft allein thermisch ab und führt zu einer C-S Kopplung zwischen den end-acrylierten Vernetzermolekülen und den Thiolgruppen der HA-SH. Vor der Messung wurden die Gele für 48 h in PBS zur Einstellung der Gleichgewichtsschwellrate inkubiert.

Für die mechanischen Messungen wurden zylindrische Gele hergestellt. Dazu wurden Teflon-Formen mit zylindrischen Aussparungen (3 mm Höhe, 6 mm Durchmesser) von der Mechanischen Werkstatt (MPI-IS, Stuttgart) hergestellt. Die Aussparungen wurden mit Polymerisierungslösung gefüllt und mit einem Deckglas von 18 x 18 mm (Carl Roth GmbH) verschlossen.

Für die Zytotoxizitätstests wurden weitere Teflonformen zur Herstellung von flachen zylindrischen Gelen (Aussparung: 22 mm Durchmesser, 1,5 mm Höhe) hergestellt. Diese wurden auf gleiche Weise mit Polymerisierungslösung gefüllt und mit einem Deckglas von 24 x 24 mm (Carl Roth GmbH) verschlossen.

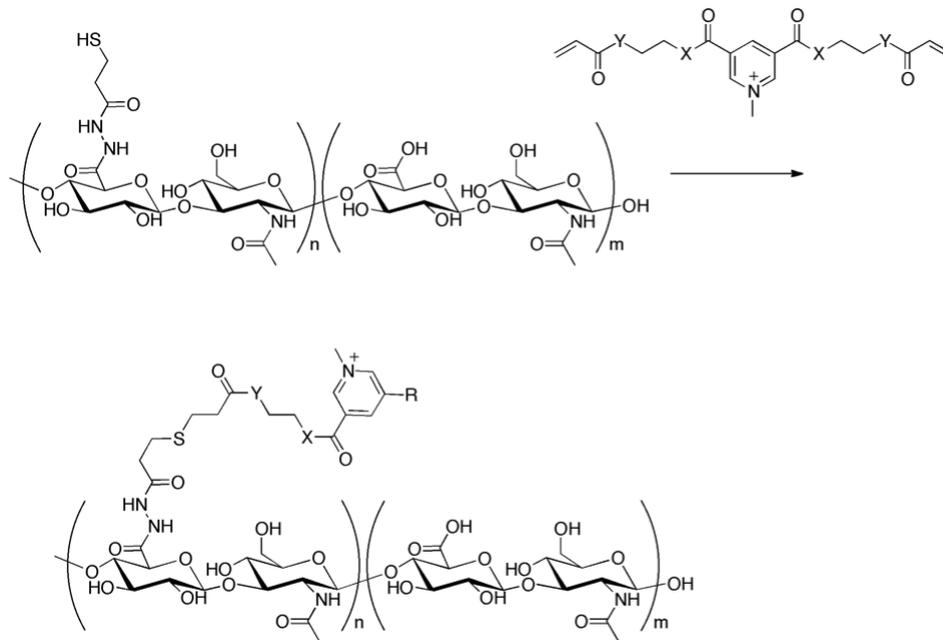


Abbildung 4.1: Reaktionsschema zur Quervernetzung der Hyaluronsäure durch Thio-Michael-Addition.

Für die Diffusions- und Partitionskoeffizientenmessungen wurden flache Gele hergestellt. Dazu wurde ein Glasplättchen von 25 x 75 mm Grösse (Glaswerkstatt, MPI Stuttgart) verwendet und ein zweites solches, das mit Abstandhaltern versehen war. Diese wurden übereinandergelegt, um einen schmalen Zwischenraum zum Einfüllen der Polymerisierungslösung (mittels Kapillarkräften) zu erzeugen. Im Raum zwischen den Abstandhaltern wurden Deckgläschen von 24 x 24 mm Grösse (Carl Roth GmbH) aufgelegt, um den Abstand zwischen den Glasplättchen auf etwa 0,4 mm anzupassen. Nach Einfüllen der Polymerisationslösung wurden die Kammern zur Vermeidung von Austrocknung mit Parafilm (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging/Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) luftdicht verschlossen.

### 4.1.2 Schwellratenbestimmung

Zur Bestimmung der Schwellraten der Hyaluronsäuregele wurde das Gewicht von jeweils drei ins Gleichgewicht geschwellenen Gelen bestimmt und dieses durch den jeweiligen Feststoffgehalt der Gele, der aus den Parametern der Gelherstellung bekannt ist, dividiert. Die hieraus erhaltene Schwellrate entspricht der Massenschwellrate.

### 4.1.3 Gelbildungsanalyse

Zur Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Vernetzungsreaktion wurden die rheologischen Eigenschaften während der Gelbildung an einem Scherrheometer (Kinexus *pro*, Malvern, UK) gemessen. Dazu wurde eine parallele Plattengeometrie mit einem Durchmesser von 20 mm eingesetzt. Für eine Gelierungsanalyse wurden 80  $\mu\text{l}$  Polymerisierungslösung auf die Grundplatte des Rheometers aufgebracht und die Messplatte auf einen Abstand von 0,2 mm heruntergefahren, so dass der gesamte Zwischenraum unter der Messplatte mit Polymerisierungslösung befüllt war. Zur Vermeidung von Austrocknung während der Gelbildung wurde eine Lösemittelfalle (Spezialanfertigung der Mechanischen Werkstatt, MPI Stuttgart) eingesetzt, die es ermöglicht, den Innenraum der Messkammer mit Lösemitteldampf zu sättigen. Die Lösemittelfalle wurde mit einem Rückschlagventil ausgestattet, so dass diese mit einem Schutzgas (Ar) zur Vermeidung von ungewünschten Oxidationsreaktionen befüllt werden konnte. Die Temperatur in der Messkammer wurde auf  $T = 37^\circ\text{C}$  eingestellt, die Oszillationsfrequenz auf 1 Hz und die Amplitude auf 1 %. Während der Gelbildung wurde der Speichermodul  $G'(t)$  und der Verlustmodul  $G''(t)$  aufgezeichnet (*rSpace* Software, Version 1.20).

### 4.1.4 Quantitative Charakterisierung der Vernetzungsreaktion mit Ellman's Reagenz

Die quantitative Analyse der freien Thiole nach der Vernetzungsreaktion wurde mit Ellman's Reagenz durchgeführt. Für jede Vernetzerkonzentration wurden drei

mal 40  $\mu\text{l}$  Polymerisierungslösung in Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) gefüllt. Zur Vermeidung von Oxidationsreaktionen wurden die Reaktionsgefäße mit Argon geflutet bevor sie verschlossen wurden. Nach 3 h bei  $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$  waren in allen Reaktionsgefäßen, die Vernetzerlösung enthielten, Gele entstanden. Alle Eppendorf-Gefäße wurden mit 784 ml DTNB Lösung (50 mM Natriumacetat, 2 mM 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzolsäure) in  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 784 ml Tris-Puffer (1M Tris,  $\text{pH} = 8,0$ ) befüllt. Anschließend wurden die am Boden der Eppendorf-Gefäße festhaftenden Gele von dort abgelöst und in der Lösung mechanisch zerkleinert, so dass eine gute Durchmischung stattfinden konnte. Nach 20 min Inkubation mit aktiver Durchmischung durch einen Schüttler (Shaker DOS-10L, neoLab, Heidelberg, Deutschland) bei 200 rpm wurden aus jedem Gefäß 100  $\mu\text{l}$  Überstand entnommen und die Absorption der Lösung bei 412 nm an einem Mikroplatten-Reader (Tecan, Schweiz) bestimmt. Der Prozentsatz reagierter Thiole wurde aus dem Verhältnis der Messwerte der Proben mit Quervernetzerlösung und der Probe ohne Quervernetzerlösung bestimmt.

#### 4.1.5 Bestimmung der E-Module und des mechanischen Verhaltens unter starker Kompression

Die mechanischen Eigenschaften der Hyaluronsäuregele wurden an einem mechanischen Prüfsystem (Nano Bionix Universal Testing System, MTS, USA) mit paralleler Plattengeometrie im Kompressionsmodus bestimmt. Dazu wurden die zylindrischen Proben zwischen die Messplatten des Prüfsystems gebracht und mit der oberen Messplatte bis auf einen minimalen Spalt angefahren. Die Messung wurde durch einen Trigger, der auf 500  $\mu\text{N}$  gesetzt wurde, gestartet. Zur Vermeidung von Auswölbungen der Proben an den Seiten wurden die Probenoberflächen nicht vollständig getrocknet, so dass ein Gleiten zwischen den Messplatten möglich war. Die Messfrequenz wurde auf den statischen Bereich (0,002 Hz) eingestellt und die Spannung  $\sigma_n$  als Funktion der Deformation  $\lambda$  aufgezeichnet (*TestWorks 4* Software). Die Analyse der E-Module wurde im linear-elastischen Bereich zwischen 0 und 5 % Deformation durch eine lineare Fitanalyse bestimmt. Zur Messung des mechanischen Verhaltens unter starker Deformation wurden die Proben in fünf

aufeinanderfolgenden Zyklen bis zu einer Deformation von mindestens 45 % komprimiert. Um ein Austrocknen der Gele während der lang anhaltenden Messung zu verhindern wurde die Messfrequenz auf 0,003 Hz erhöht.

## 4.2 PEG-DA-Hydrogele

### 4.2.1 Gelherstellung

Zur Herstellung der PEG-DA-Hydrogele wurde Poly(ethylenglykol)-20k-Diacrylat (PEG-DA-Synthese aus Poly(ethylenglykol)-20k (Sigma-Aldrich) durch Radka Kölz, MPI Stuttgart) mit einem mittleren Molekulargewicht von 20 kDa mit 10, 20 und 30 % (v/v) Polymervolumenanteil in PBS (pH = 7,4) aufgelöst und für 5 min auf starker Stufe gevortext (IKA VORTEX, IKA-Werke). Die Polymerisation der PEG-DA-Makromoleküle wurde durch eine radikalische Kettenreaktion erzeugt. Dazu wurde der Photoinitiator 2-Hydroxy-4'-(2-Hydroxyethoxy)-2-Methylpropiophenon (Sigma-Aldrich) mit einer Konzentration von 10 % (m/v) in 70 %-iger Ethanollösung aufgelöst und mit einer Konzentration von 1 % (v/v) zu den Polymerlösungen hinzugefügt. Um eine homogene Durchmischung mit dem Photoinitiator zu erreichen wurden die Polymerlösungen nochmal für 1 min bei starker Stufe gevortext. Zur Vermeidung von Luftblasen in den Hydrogelen wurden die Lösungen für 5 min bei  $4,4 \cdot 10^3$  rpm durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5702) entgast. Zur Polymerisation wurden die Polymerlösungen in Glaskammern, bestehend aus zwei Glasplättchen (Größe: 25 mm x 75 mm, Glaswerkstatt, MPI Stuttgart), die durch Abstandhalter voneinander getrennt waren, eingefüllt. Das oberseitigen Glasplättchen war aus Quarzglas (Glaswerkstatt, MPI Stuttgart) gefertigt. Die Distanz zwischen den beiden Glasplättchen wurde mit Deckgläschen von 24 mm x 24 mm Größe (Carl Roth GmbH) auf 0,4 mm eingestellt. Zur Polymerisation wurde für eine Zeitdauer von 20 min UV-Licht (Abstand zur Lichtquelle 2,5 cm, 6 W - 365 nm Tube, Modell VL-6.L, Vilber Lourmat, Frankreich) in die Glaskammern eingestrahlt. Anschließend wurden die entstandenen Hydrogele für 24 Stunden in PBS bei RT ins Gleichgewicht schwellen lassen.

### 4.2.2 Schwellratenbestimmung

Zur Bestimmung der Schwellraten wurden die Massen der ins Gleichgewicht geschwollenen PEG-DA-Hydrogele bestimmt. Aus der Masse des geschwollenen Hydrogels und der für die Gelherstellung eingesetzten PEG-DA-Masse wurde die Volumenschwellrate  $Q = V_{gesamt}/V_{Polymer}$ , mit  $V_{gesamt}$  dem Gesamtvolumen des geschwollenen Hydrogels und  $V_{Polymer}$  dem Polymervolumen im geschwollenen Hydrogel, mithilfe des spezifischen Volumens von amorphem PEG ( $0,89 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) und dem spezifischen Volumen von Wasser ( $1,0 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) berechnet. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

### 4.2.3 Schermodulmessungen

Die Schermodule der PEG-DA-Hydrogele wurden an einem Rotationsrheometer (Kinexus, Malvern) bestimmt. Für jede Schwellrate wurden drei Gele mit einem Durchmesser vom 20 mm ausgestanzt und im Platte-Platte-Mess-System mit einer 20 mm-Messplatte mit einer Normalkraft von 0,2 N angefahren und fixiert. Um Austrocknungseffekte während der Messung zu vermeiden wurde eine Lösemittelfalle (Sonderanfertigung der mechanischen Werkstatt, MPI Stuttgart) eingesetzt. Vor der Messung wurden die Oberflächen der Gele vollständig getrocknet (Precision Wipes, Kimtech Science, Kimberley-Clark Deutschland), so dass die Gele während der Deformation einen festen Kontakt mit den Messplatten hatten und Gleiteffekte vermieden wurden. Die Messtemperatur wurde auf  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  festgelegt. Zunächst wurde für jede Schwellrate eine Amplitudensweep-Messung durchgeführt, um den linear-elastischen Bereich zu bestimmen. Ausgehend von diesen Messungen wurde die Amplitude auf 0,1 % festgelegt, die Frequenz wurde auf 1 Hz eingestellt. Nachdem die Probe equilibriert war, wurde der Speichermodul  $G'$  und der Verlustmodul  $G''$  aufgezeichnet. Dabei hat sich gezeigt, dass  $G''$  gegenüber  $G'$  vernachlässigbar war.

# Untersuchung von Struktur- und Transporteigenschaften

Zur Untersuchung von Struktur- und Transporteigenschaften in den Hydrogelen wurden Partitions- und Diffusionskoeffizientenanalysen durchgeführt. Dazu wurden monodisperse FITC-Dextrane als sphärische Testmoleküle eingesetzt.

## 5.1 Fraktionierung und Charakterisierung der FITC-Dextrane

Kommerziell hergestellte FITC-Dextrane (Fluorescein-isothiocyanat-markierte Dextrane) sind nur mit eingeschränkter Fraktionierung erhältlich. Um monodisperse FITC-Dextrane zu erhalten wurde eine weitere Fraktionierung durch FPLC (*Fast protein liquid chromatography*, Gerät: ÄKTApurifier 10 mit Fraktioniereinheit Frac-920, GE Healthcare Biosciences AB, Schweden) angeschlossen. Dazu wurden neutrale FITC-Dextrane mit einem mittleren Molekulargewicht von 4 kDa (FD-4) und 150 kDa (FD-150S) und negativ geladene FITC-Dextrane mit einem mittleren Molekulargewicht von 150 kDa (FITC-CM-Dextran) bestellt (Sigma-Aldrich). Die FITC-Dextrane wurden mit einer Konzentration von 50 mg/ml in PBS aufgelöst und vor der Fraktionierung sterilfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter, 0,22  $\mu\text{m}$ , Carl Roth GmbH) und unter Vakuum für 30 min entgast. Die Fraktionierung wurde mit einer hochauflösenden HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt. Die Flussrate wurde auf 1,3 ml/min eingestellt. Das Eluat wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm de-

tektiert und in 10 ml Fraktionen gesammelt. Nach der Fraktionierung wurde jede Fraktion durch Dialyse entsalzt (3 x 4 Stunden in einem 2l-Wasserbad aus doppeltdestilliertem Wasser; Dialyseschlauch mit einer Durchlässigkeit bis 1000Da (Spektra/Por Dialysis Membrane MWCO 1000, Spectrum Laboratorien Inc., USA) und anschließend gefriergetrocknet (Lyophilisierung, Gefriertrocknungsanlage P8K-E-85-4, Piatkowski-Forschungsgeräte, München, Deutschland). Die Fraktionierung, Dialyse und Gefriertrocknung wurde von Christine Mollenhauer (MPI-IS Stuttgart) durchgeführt.

Die hydrodynamischen Radien der fraktionierten FITC-Dextrane wurden durch Diffusionskoeffizientenmessungen bestimmt. Dazu wurden die FITC-Dextrane mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in PBS aufgelöst und in Glaskammern zur Messung mit FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*, siehe Abschnitt 5.3) eingefüllt. Die Glaskammern wurden aus zwei mit Klebeband-Abstandshaltern (Tesa, Deutschland) von 0,4 mm Dicke versehenen Deckgläschen (18 mm x 18 mm und 50 mm x 24 mm Grösse, Carl Roth GmbH) hergestellt. Nach der Befüllung wurde die Kammer mit mittelviskosem Silikonöl (Baysilone-Paste, GE Bayer Silicones, Deutschland) versiegelt. Die Messungen wurden bei  $T = 37\text{ °C}$  durchgeführt und aus der Viskosität von Wasser bei dieser Temperatur ( $\eta = 0,69\text{ mPa}\cdot\text{s}$ ) wurde mithilfe der Stokes-Einstein-Relation

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_h} \quad (5.1)$$

der hydrodynamische Radius  $r_h$  ermittelt. Abbildung 5.1 zeigt die gemessenen hydrodynamischen Radien der aus der Fraktionierung erhaltenen FITC-Dextrane. Fraktionen 1 bis 5 entstammen der Fraktionierung von FD-4, Fraktionen 6 bis 21 entstammen der Fraktionierung von FD-150S. Durch die Fraktionierungen wurden sphärische Testmoleküle im Grössenbereich  $0,9\text{ nm} \leq r_h \leq 12,2\text{ nm}$  erhalten. Für Dextrane lässt sich der hydrodynamische Radius mit der Relation [51]

$$r_h = 0,015 \cdot M_w^{0,053 \pm 0,02} \quad (5.2)$$

in die Molekülmasse umrechnen. Daraus ergibt sich, dass die Molekülmassen im

Bereich  $2,4 \text{ kDa} \leq MW \leq 310 \text{ kDa}$  liegen. Zur Bestimmung der Grössenverteilung der erhaltenen Fraktionen wurde eine Fraktion aus dem zentralen Bereich der Fraktionierung (Fraktion Nr. 12) ein zweites Mal fraktioniert und mit derselben Methode analysiert. Abbildung 5.2 zeigt die Fluoreszenzintensitäten (gemessen wie in Abschnitt 5.2 beschrieben) der erhaltenen Fraktionen in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius. Daraus wurde der Polydispersitätsindex durch [27]

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad (5.3)$$

mit

$$M_n = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i}{\sum_i N_i} \quad (5.4)$$

dem Zahlenmittelwert und

$$M_w = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i^2}{\sum_i N_i \cdot M_i} \quad (5.5)$$

dem Gewichtsmittelwert. Zur Umrechnung der hydrodynamischen Radien in die Molekülmasse  $M_i$  wurde Gleichung 5.2 angewandt. Für die Molekülzahl  $N_i$  wurde die gemessene Intensität eingesetzt. Damit konnte für diese Fraktion ein Polydispersitätsindex von 1,009 gemessen werden und es zeigt sich, dass durch die Fraktionierung monodisperse Fraktionen erhalten wurden.

## 5.2 Partitionskoeffizientenanalyse

**Probenherstellung.** Für die Partitionskoeffizienten- und Diffusionskoeffizientenanalysen wurden identische Proben verwendet. Für beide Analysemethoden wurden Proben aus reiner FITC-Dextran-Lösung (Inkubationslösung) sowie Hydrogelproben benötigt. Zur Herstellung der Inkubationslösung wurden FITC-Dextran-Moleküle mit  $0,5 \text{ mg/ml}$  in PBS aufgelöst. Zur Herstellung von Proben mit reiner Inkubations-Lösung wurde FITC-Dextran-Lösung in Glaskammern mit Klebeband-Abstandshaltern (Hergestellung wie in Abschnitt 5.1 beschrieben) eingefüllt. Zur Präparation von Hydrogelmessproben wurden kleine Hydrogelproben

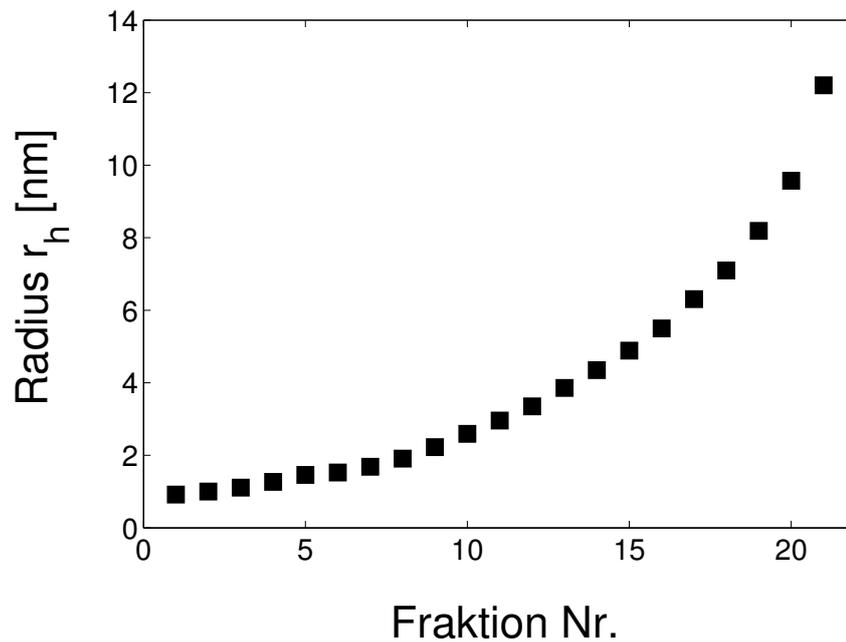


Abbildung 5.1: Fraktionierung der FITC-Dextrane FD-4 und FD-150S. Fraktionen 1 bis 5 entstammen FD-4, Fraktionen 6 bis 21 entstammen FD-150S. Durch die Fraktionierungen wurden monodisperse Testmoleküle im Grössenbereich  $0,9 \text{ nm} \leq r_h \leq 12,2 \text{ nm}$  erhalten. Dies entspricht Molekülmassen im Bereich  $2,4 \text{ kDa} \leq MW \leq 310 \text{ kDa}$ .

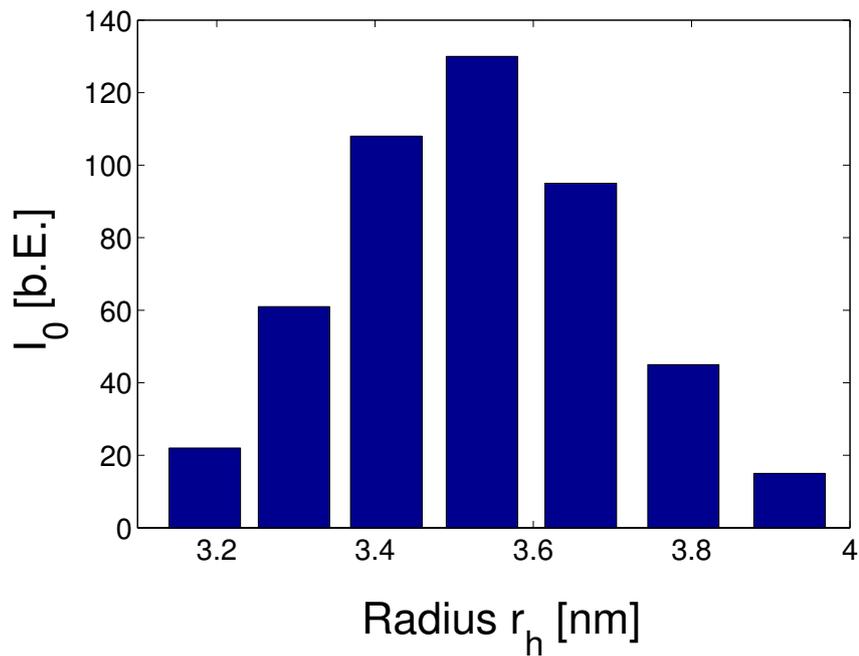


Abbildung 5.2: Zum Nachweis der Monodispersität der FITC-Dextrane nach der Fraktionierung (siehe Abb. 5.1) wurde eine Fraktion aus dem zentralen Bereich der Grössenverteilung (Verwendung von Fraktion Nr. 12) ein zweites Mal fraktioniert und der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt. Berechnung für diese Fraktion ergab  $PDI = 1,009$ .

( $\approx 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ ) getrocknet (Precision Wipes, Kimtech) und auf ein Deckglas von  $50 \text{ mm} \times 24 \text{ mm}$  Größe (Carl Roth GmbH) aufgelegt. Anschließend wurde ein Ring aus mittelviskosem Silikonöl (Baysilone oil, Bayer, Deutschland) um das Hydrogel herum aufgetragen und ein weiteres Deckglas von  $18 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$  (Carl Roth GmbH) wurde von oben aufgedrückt bis der Kontakt mit dem Gel hergestellt war. Zur Bestimmung der Partitionskoeffizienten wurden die Hydrogelproben vor Einschluss in die Messkammern für 5 Tage bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$  in der FITC-Dextran-Lösung inkubiert. Der Partitionskoeffizient für eine spezifische Dextranfraktion  $i$  ist gegeben durch das Konzentrationsverhältnis

$$K_i = \frac{c_i}{c_{i,o}} \quad (5.6)$$

mit  $c_i$  der Molekülkonzentration im Hydrogel und  $c_{i,o}$  der Molekülkonzentration in der Inkubationslösung. Das Verhältnis der Konzentrationen wurde durch Fluoreszenzintensitätsmessungen der farbstoffmarkierten Dextrane bestimmt und nach folgender Formel berechnet

$$K_i = \frac{I}{I_0} \frac{d_0}{d} \cdot (1 - \nu_f) \quad (5.7)$$

Dabei ist  $I$  die Intensität der FITC-Dextrane im Hydrogel und  $I_0$  die Intensität einer zweiten Messprobe, die nur die entsprechende Inkubationslösung enthielt.  $d$  ist die Dicke der Hydrogelprobe und  $d_0$  die Dicke der Probe mit Inkubationslösung.  $\nu_f$  ist die Polymervolumenfraktion, die vom Messwert subtrahiert wurde, da das Polymervolumen für die diffundierenden Moleküle ein nicht zugängliches Volumen darstellt [37]. Die Fluoreszenzintensität wurde an einem Mikroskop (*Delta Vision System*, wie in Abschnitt 5.3 beschrieben), das mit einer Fluoreszenzlampe ausgestattet war, bestimmt. Für den Einsatz von Fluorescein wurde ein entsprechender Anregungsfilter ( $490/20 \text{ nm}$ ) und Emissionsfilter ( $528/38 \text{ nm}$ ) verwendet. Die Belichtungszeit wurde auf  $100 \text{ ms}$  eingestellt. Die Intensität einer Messprobe wurde durch den Mittelwert der Pixelgrauwerte des detektierten Fluoreszenzbildes definiert. Zur Korrektur von dark counts wurde ein weiteres Bild ohne Fluoreszenzlicht aufgenommen und von der gemessenen Intensität subtrahiert. Die Probendicke

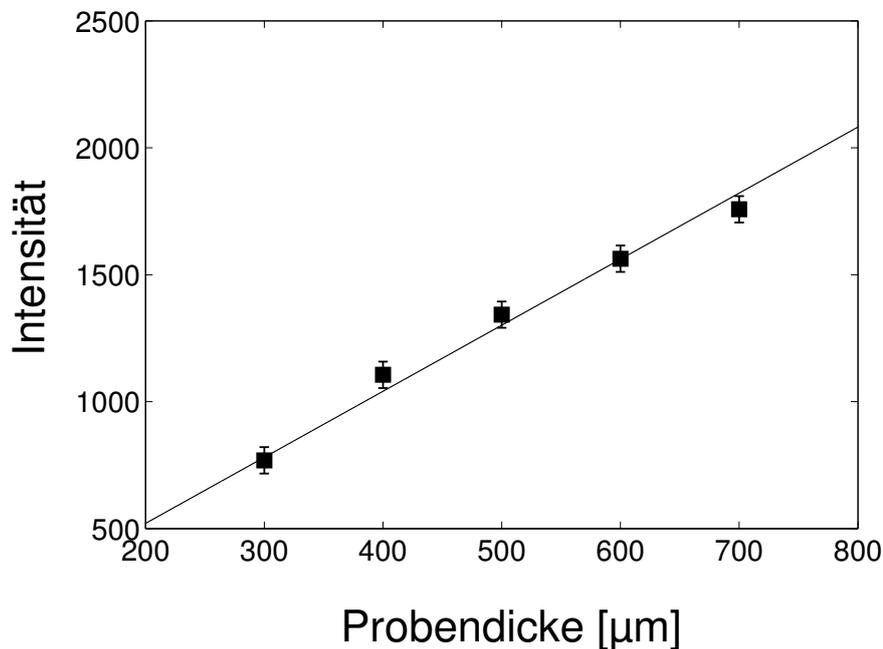


Abbildung 5.3: Die Abhängigkeit der Intensität von der Probendicke zeigt einen linearen Zusammenhang für den gesamten Bereich verwendeter Probendicken.

der Probe mit der Inkubationslösung war durch die Messkammer bestimmt durch 0,4 mm. Die Dicke der Hydrogelproben wurde am Rheometer (siehe Abschnitt 4.2.3) bestimmt. Dazu wurden die Proben auf die Grundplatte des Rheometers aufgelegt und mit einer eingespannten Messplatte mit sehr geringer Normalkraft ( $\approx 0,1$  N) angefahren und der Spalt gemessen. Durch die Spaltemessung lässt sich die Probendickemessung mit sehr hoher Präzision durchführen (Auflösung  $1 \mu\text{m}$ ). Die Polymervolumenfraktion  $\nu_f$  ist aus der Gelherstellung und den gemessenen Schwellraten bekannt.

Um zu gewährleisten, dass die Probenhöhennormierung auf diese Weise korrekt ist, wurde die Linearität der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Probendicke für den gesamten Messbereich nachgewiesen (siehe Abbildung 5.3).

### 5.3 Diffusionskoeffizientenanalyse

Die FRAP-Messungen wurden an einem *Delta Vision System* (Applied Precision, Isaquah, USA), das mit einem invertierten Mikroskops (Olympus IX 70), einer Fluoreszenzlampe (Mercury Short Arc HBO, Osram, Deutschland), einer Cool Snap HQ CCD Kamera (Photometrics, Tucson, USA) und einem optisch gepumpten Festkörperlaser (OPSL, Sapphire 488/20, Coherent Inc., Santa Clara, USA) ausgestattet ist, durchgeführt. Der Laser wurde in der TEM<sub>00</sub>-Mode betrieben, bei welcher das Strahlprofil radialsymmetrisch und annähernd Gauss-förmig ist. Um ein zylindrisches Strahlprofil in der Probe zu erzeugen wurde der Laserstrahl auf die hintere Fokalebene des Objektivs (10 x, NA = 0,2, 0,592  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ ) fokussiert. Durch Aufnahme eines z-stacks an einer Testprobe mit FITC-Dextranen (MW 2000 kDa), die in einem Gelatinegel (Gelatin, powder, from porcine skin, Sigma-Aldrich) fixiert wurden, wurde sichergestellt, dass das Strahlprofil (Durchmesser  $\approx 10 \mu\text{m}$ ) zylindrisch ist. Der Bleichprozess wurde mit 90 % der maximalen Laserleistung (20 mW) durchgeführt. Für den Einsatz von Fluorescein wurde ein entsprechender Anregungsfilter (490/20 nm) und Emissionsfilter (528/38 nm) verwendet. Das Beleuchtungsprofil der Quecksilberdampfampe wurde so homogen wie möglich eingestellt und zur Korrektur wurden für jede FRAP-Sequenz einige Bilder vor dem Bleichprozess aufgezeichnet. Bleichen der Proben während des Recovery-Prozesses wurde dadurch minimiert, dass ein Shutter zwischen den einzelnen Bildaufnahmen geschlossen wurde. Die FRAP-Sequenzen wurden am Kontrolle-PC (*softWoRx Imaging Workstation*, Applied Precision, USA) gespeichert, als 16-bit .tiff-Bilder exportiert und nach der Methode von Tsay und Jacobson [52], die in *Matlab 2009b* (MathWorks) implementiert und an unser Mess-System adaptiert wurde, ausgewertet. Diese Methode basiert auf der Fourieranalyse der Recovery-Bilder und ist im Vergleich zu konventionellen FRAP-Analyse-Methoden (beispielsweise *Direkte photometrische Analyse* [53]) auf dicke (3-dimensionale) Hydrogelproben, wie sie hier verwendet wurden, anwendbar und liefert akkurate Messergebnisse [54]. Die Ursache dafür liegt darin, dass durch die Fourier-Transformation optische Störeffekte, die einerseits durch Intensitätsbeiträge von fluoreszierenden Molekülen, die sich nicht in der Fokusebene befinden und ander-

seits durch Absorptions- und Streueffekte verursacht werden, eliminiert werden [54].

Nachfolgend wird beschrieben wie die FRAP-Sequenzen basierend auf der Methode von Tsay und Jacobson ausgewertet wurden. Das inhomogene Beleuchtungsprofil wurde dadurch korrigiert, dass die relative Fluoreszenzintensität,  $I_{rel}(x, y, t_i)$ , die durch

$$I_{rel}(x, y, t_i) = \frac{I_i(x, y, t_i)}{I_o(x, y)} \quad (5.8)$$

definiert ist, prozessiert wurde. Dabei ist  $I_i(x, y, t_i)$  die Fluoreszenzintensität an einer speziellen Position  $x$  und  $y$  nach einem speziellen Zeitpunkt  $t_i$  nach dem Bleichen, und  $I_o(x, y)$  die Intensitätsverteilung vor dem Bleichen, die aus 3 Bildaufnahmen vor dem Bleichen gemittelt wurde. Von  $I_i(x, y, t_i)$  und von  $I_o(x, y)$  wurde vor der Bestimmung von  $I_{rel}(x, y, t)$  der Dunkelstrombeitrag und Beitrag von Umgebungslicht subtrahiert. Zur Korrektur von Bleichen während des Recovery-Prozesses wurde für jedes Bild ein Ausschnitt von 50 x 50 Pixeln am Bildrand extrahiert und durch Mittelung der Pixelintensitäten ein Bleichkorrekturfaktor ermittelt. Damit kann die korrigierte, relative Intensität dargestellt werden durch

$$I_{korr}(x, y, t_i) = \frac{\beta_o}{\beta_{t_i}} \cdot I_{rel}(x, y, t_i). \quad (5.9)$$

Dabei ist  $\beta_o$  der ermittelte Wert aus den Bildern vor dem Bleichen und  $\beta_{t_i}$  der ermittelte Wert für die Bilder nach dem Bleichen zum Zeitpunkt  $t_i$ . Für die Fourieranalyse wurde aus jedem Bild der FRAP-Sequenz ein quadratischer Bildausschnitt (220 x 220 Pixel), der die Bleichstelle zentral einfasst, extrahiert. Bei der Auswahl des Bildausschnitts wurde darauf geachtet, dass einerseits der Recovery-Prozess optimal eingeschlossen ist und andererseits die Auswertung durch Rauscheffekte aus einem zu groß gewählten Bildausschnitt nicht nachteilig beeinflusst wird.

Die untersuchten Hydrogele werden als isotrope Systeme betrachtet und von daher kann der Recovery-Prozess in einer Ebene, die durch das Objektiv fokussiert wird durch das 2. Fick'sche Gesetz [55]

$$\frac{\partial c(x, y, t)}{\partial t} = D \nabla^2 c(x, y, t) \quad (5.10)$$

beschrieben werden.  $c(x, y, t)$  ist die zeitabhängige Konzentrationsverteilung. Löst man Gleichung 5.10 im Fourierraum so ergibt sich die Lösung [52]

$$C(u, v, t) = C(u, v, 0) \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)Dt] \quad (5.11)$$

mit  $C(u, v, t)$  der zwei-dimensionalen Fouriertransformierten der Konzentrationsverteilung mit den Fourierfrequenzen  $u$  und  $v$  und  $C(u, v, 0)$  der Fouriertransformierten aus dem ersten Bild nach dem Bleichen. Im Fourierraum ist das Verhältnis der Fourieramplituden aus den Intensitätsbildern identisch mit dem Verhältnis der Fourieramplituden der realen Konzentrationsverteilung,

$$\frac{I(u, v, t)}{I(u, v, 0)} = \frac{C(u, v, t)}{C(u, v, 0)}, \quad (5.12)$$

denn  $I(u, v, t) = C(u, v, t) \cdot OTF$  mit der optischen Transferfunktion  $OTF$  [54]. Damit lässt sich der Diffusionskoeffizient aus der Gleichung

$$\frac{I(u, v, t)}{I(u, v, 0)} = \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)Dt] \quad (5.13)$$

mit den Fouriertransformierten der Intensitätsverteilungen  $I(u, v, t)$  anhand einer Fitanalyse bestimmen. Dazu wurde der *non-linear least square curve-fitting* Algorithmus eingesetzt. Für die Fitanalyse wurden alle Fourierfrequenzen mit  $u \leq v \leq 2$  verwendet, das entspricht den fünf kleinsten Fourierfrequenzen. Höhere Frequenzen wurden ausgeschlossen, da die Fourieramplituden dieser Frequenzen aufgrund von Rauscheffekten zu starke Fluktuationen aufwiesen. Abbildung 5.4 zeigt eine farbcodierte Darstellung der Absolutbeträge der Fourieramplituden für das erste Bild aus der Recovery-Sequenz einer Testauswertung. Mit  $C_{ij}$  sind die ausgewerteten Fourierfrequenzen markiert.

Wenn es im Gel neben den diffundierenden Molekülen eine zweite Fraktion von Molekülen gibt, die unbeweglich sind, dann lässt sich die Fitanalyse mit der Gleichung

$$\frac{I(u, v, t)}{I(u, v, 0)} = (1 - \gamma_o) \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)Dt] + \gamma_o \quad (5.14)$$

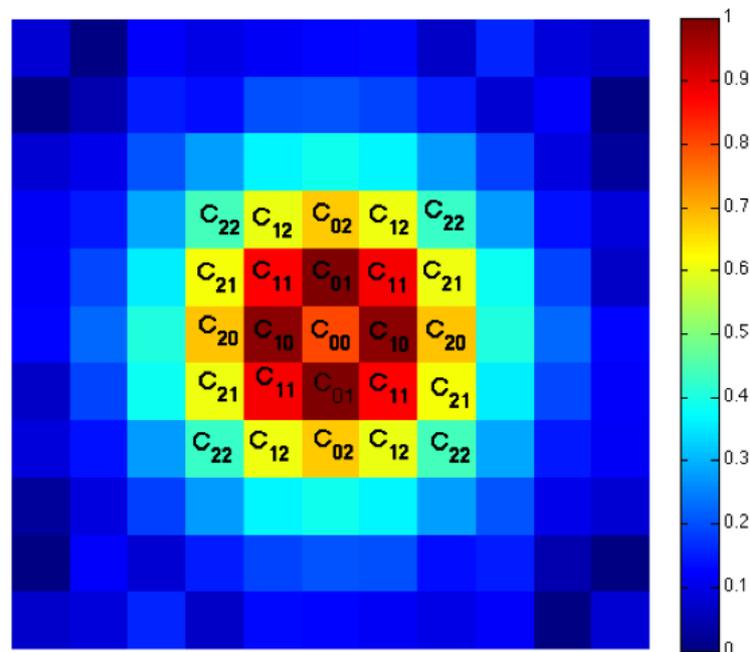


Abbildung 5.4: Farbcodierte Darstellung der Absolutbeträge  $|C_{ij}|$  der Fourieramplituden für das erste Bild aus der Recovery-Sequenz einer Testauswertung. Für die Auswertung der FRAP-Daten wurden die ersten 5 Fourierfrequenzen berücksichtigt, d.h. alle Frequenzen für die gilt:  $|i + j| \leq 4$ , entsprechend den in der Graphik markierten Amplituden  $C_{ij}$ . Die Amplituden höherer Frequenzen wurden aufgrund der Störeffekte von zu geringen Signal-Rausch-Verhältnissen ausgeschlossen.

durchführen.  $\gamma_o$  ist dabei der Anteil der unbeweglichen Moleküle. Die Ableitung von Gleichung 5.14 wurde im Anhang A.2 durchgeführt.

Mit einer Testlösung wurde die korrekte Justage des Mess-Systems dadurch sichergestellt, dass überprüft wurde, ob der zeitliche Abfall der Fourieramplituden unterschiedlicher Frequenzen zu einem Überlapp führt, wie es bei einer zwei-dimensionalen Analyse erwartet wird.

### 5.3.1 FRAP Vortests

Um den Bereich der Mess- und Probenparameter festlegen zu können, in welchem durch die FRAP-Analysen akkurate Messergebnisse ermittelt werden können, wurde in einer Reihe von Vortests die Abhängigkeit der ermittelten Diffusionskoeffizienten von der Bildaufnahmerate, von der Probendicke, von der Bleichdauer und von der Konzentration der FITC-Dextrane bestimmt. Für die Vortests und die anschließende Validierung des Mess-Systems wurden unfraktionierte FITC-Dextrane verwendet. Diese wurden in PBS aufgelöst, in parallele Glaskammern (hergestellt analog zu der in Abschnitt 5.1 beschriebenen Methode) eingefüllt und mit der Fouriertransformations-Methode ausgewertet. Um unterschiedlich dicke Proben zu erhalten wurden Abstandhalter (Klebebandspacer, Tesa; Teflonspacer, Mechanische Werkstatt, MPI) von unterschiedlicher Dicke für die Herstellung der Glaskammern, in welche die Lösungen eingefüllt wurden, verwendet. Abbildung 5.5 zeigt die Ergebnisse der Vortests. Die Proben- und Messparameter wurden variiert und sind in der Bildbeschreibung dargestellt, der Fokus des Objektivs wurde stets auf  $120 \mu\text{m}$  Messhöhe eingestellt, die Messtemperatur war stets  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Es zeigt sich, dass die Messergebnisse nicht von der Bildaufnahmerate (a) abhängen und die gemessenen Werte auch mit dem theoretisch erwarteten Wert ( $22,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) übereinstimmen. Die gestrichelten Linien repräsentieren die 5-% Abweichung. Der theoretische Wert wurde mithilfe der Stokes-Einstein-Relation (Gl. 5.1) unter Verwendung des vom Hersteller (Sigma-Aldrich) angegebenen hydrodynamischen Radius (vom Hersteller mithilfe von *Dynamischer Lichtstreuung* (DLS) gemessen) der Moleküle und der für Wasser bei  $T = 37^\circ\text{C}$  gegebenen Viskosität berechnet. Die Analyse der Bleichzeitabhängigkeit (b) zeigt, dass die Messwerte für eine Bleichzeit von 30 und 100 ms gut mit dem theoretischen Wert übereinstimmen, eine Bleichzeit von 500 ms liefert einen Messwert, der nach oben abweicht. Bei 100 und 500 ms Bleichzeit haben die analysierten Fourieramplituden deutlich stärker gestreut als bei 30 ms Bleichzeit. Abbildung (c) zeigt ermittelte Diffusionskoeffizienten für unterschiedliche Probendicken. Dabei zeigt sich, dass die Messwerte für den gesamten Messbereich ( $0,1\text{mm} \leq d \leq 1,15 \text{ mm}$ ) nicht von der Probendicke abhängen und in sehr guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert sind. Abbildung (d) zeigt

die Diffusionskoeffizienten von 4 kDa großen FITC-Dextranen in Abhängigkeit der Konzentration für eine Probendicke von 0,4 mm (typische Dicke der gemessenen Hydrogele). Dabei zeigt sich, dass die Diffusionskoeffizienten nicht von der Konzentration der FITC-Dextrane abhängen. Der theoretische Wert ist für diesen Datensatz nicht gezeigt, da die Messwerte der 4 kDa großen FITC-Dextrane (FD-4, unfraktioniert) aufgrund ihrer Größenverteilung (siehe Fraktionierung, Abbildung 5.1) etwa 10 % über dem theoretischen Wert liegen.

Basierend auf diesen Vortests wurden folgende Parameter festgelegt:

Bildaufnahmerate: an die Geschwindigkeit des Diffusionsprozesses angepasst, so dass etwa 10 bis 15 Recovery-Bilder für die Auswertung erhalten wurden

Bleichzeit: 30 ms

Fokusebene in der Messprobe: 120  $\mu\text{m}$

Belichtungszeit: 100 ms

eingesetzte Konzentration: bis 0,5 mg/ml

Probendicke: variabel

### 5.3.2 Validierung des FRAP-Mess-Systems

Zur Durchführung einer Validierung des FRAP-Mess-Systems wurden zunächst die Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen mit drei unterschiedlichen Molekülmassen (mittlere Molekülmasse 4 kDa, 150 kDa und 500 kDa, unfraktioniert, Sigma-Aldrich) in Wasser-Glycerol-Lösungen von unterschiedlichen Mischverhältnissen (100/0, 90/10, 80/20 und 70/30 v/v) gemessen. Bei einer Auftragung der Messergebnisse gegen die reziproke Viskosität wird durch die Stokes-Einstein-Relation 5.1 eine lineare Abhängigkeit erwartet und dies konnte im Experiment sehr gut nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.6).

Weiter wurden einige mit dem FRAP-Mess-System experimentell ermittelten Diffusionskoeffizienten gegen die theoretisch errechneten Werte, welche sich unter Zuhilfenahme des vom Hersteller angegebenen hydrodynamischen Radius  $r_h$  (vom Hersteller mithilfe von *Dynamischer Lichtstreuung* bestimmt) der Moleküle und der Stokes-Einstein-Relation errechnen lassen, graphisch aufgetragen (Abbildung 5.7). Dargestellt sind die Messwerte verschiedener FITC-Dextrane (mittlere

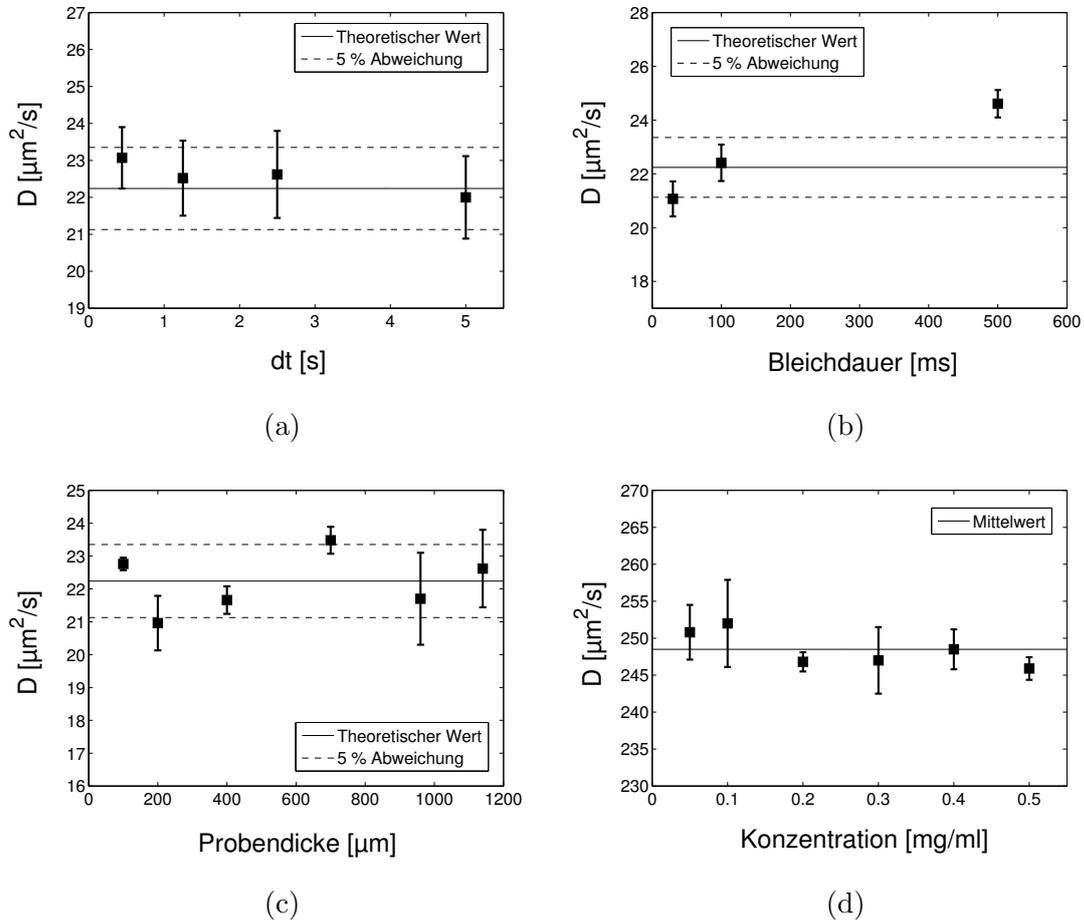


Abbildung 5.5: Vortests zur Kalibrierung des FRAP-Mess-Systems. Abkürzungen:  $d$ =Probedicke,  $c$ =Konzentration,  $t_B$ =Bleichdauer,  $dt$ =Zeitintervall zwischen zwei Recovery-Bildern. (a) Abhängigkeit der Diffusionskoeffizienten von  $dt$  ( $c=0,5$  mg/ml,  $d=0,96$  mm,  $t_B=30$  ms). (b) Abhängigkeit von der Bleichdauer ( $c=0,5$  mg/ml,  $d=0,96$  mm,  $dt=2,5$  s). (c) Abhängigkeit von der Probedicke ( $c=0,5$  mg/ml,  $t_B=30$  ms,  $dt=2,5$  s) und (d) Abhängigkeit von der Konzentration ( $d=0,4$  mm,  $dt=0,23$  s,  $t_B=30$  ms). Die Diffusionskoeffizienten zeigen keine Abhängigkeit von der Bildaufnahmezeit, der Probedicke und der Konzentration der Testmoleküle im gemessenen Bereich. Eine Bleichdauer von 500 ms führt zu einem abweichenden Resultat. Messungen (a) bis (c) wurden mit FD-500 (FITC-Dextrane, mittlere Molekülmasse 500 kDa) durchgeführt, Messung (d) mit FD-4 bei einer Probedicke von 0,4 mm. Fokusebene in der Messprobe in allen Messungen 120  $\mu\text{m}$ . Alle Messungen bei  $T = 37$  °C.

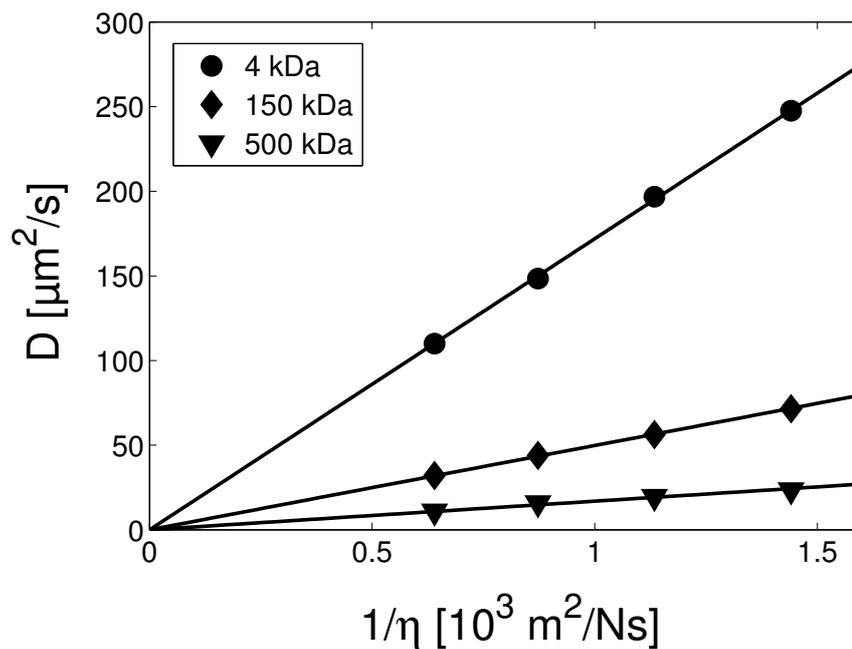


Abbildung 5.6: Validierung des FRAP-Mess-Systems anhand der Stokes-Einstein Relation. Mit drei unterschiedlichen FITC-Dextranen (mittlere Molekülmasse 4 kDa, 150 kDa und 500 kDa) wurden FRAP-Messungen in Wasser-Glycerol-Lösungen von unterschiedlichen Mischverhältnissen durchgeführt. Entsprechend der theoretischen Vorhersage durch die Stokes-Einstein-Relation konnte bei der Auftragung der Diffusionskoeffizienten gegen die reziproke Viskosität eine lineare Abhängigkeit nachgewiesen werden. Messtemperatur  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Fehler nicht darstellbar.

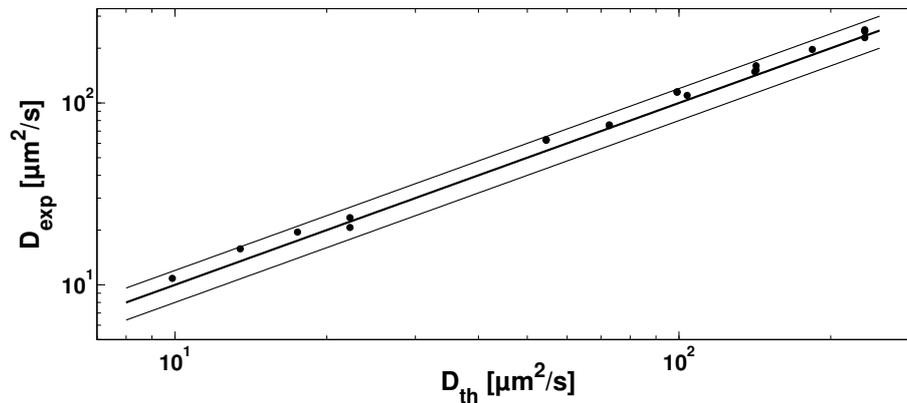


Abbildung 5.7: Auftragung der mit dem FRAP-Mess-System experimentell ermittelten Diffusionskoeffizienten gegen die theoretisch errechneten Werte, welche sich unter Zuhilfenahme des vom Hersteller angegebenen hydrodynamischen Radius  $r_h$  der Moleküle und der Stokes-Einstein-Relation errechnen lassen. Dargestellt sind die Messwerte verschiedener FITC-Dextrane (mittlere Molekülmasse 4 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 40 kDa, 70 kDa und 500 kDa, unfraktioniert) in wässriger Lösung und in Wasser-Glycerol-Gemischen von gegebener Viskosität. Fehler nicht darstellbar.

Molekülmasse 4 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 40 kDa, 70 kDa und 500 kDa, unfraktioniert Sigma-Aldrich) in wässriger Lösung und in Glycerol-Wasser-Gemischen von definierter Viskosität. Dabei zeigt sich, dass die Messwerte sehr gut mit den theoretischen Vorhersagen übereinstimmen. Der Grund dafür, dass die experimentellen Werte etwas größer sind, als die theoretischen Vorhersagen, liegt vermutlich darin, dass der Diffusionsprozess durch kleine Moleküle in der jeweiligen Fraktion dominiert wird, die etwas schneller diffundieren als die Moleküle mit der mittleren Molekülmasse.

## Teil III

# Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend wird zunächst die Herstellung von Hyaluronsäuregelen mit bio-inspirierten Vernetzern, deren mechanische Charakterisierung und deren Potential als künstliches Biomaterial erläutert. Aus den mechanischen Messungen werden mithilfe von Netzwerkmodellen Struktureigenschaften abgeleitet und diese werden mit Strukturanalysen aus Partitions- und Diffusionskoeffizientenmessungen verglichen. Im Vergleich zu Biopolymergelen aus Hyaluronsäure haben auch vollsynthetische PEG-DA-Hydrogele (Poly(ethylenglykol)-Diacrylat-Hydrogele) einen breiten Einsatz als Biomaterial gefunden. In dieser Arbeit werden Partitions- und Diffusionskoeffizientenanalysen an einem System aus PEG-DA-(20k)-Hydrogelen beschrieben und die daraus abgeleiteten strukturellen und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Hydrogele diskutiert.

Diffusionskoeffizienten wurden mithilfe von FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) bestimmt. Dazu wurde ein FRAP-Mess-System zur Analyse von Diffusionskoeffizienten in dicken, drei-dimensionalen Hydrogelen etabliert und getestet. Als Testmoleküle wurden monodisperse, FITC-markierte Dextrane verwendet. Die Auswertung der Messdaten wurde mit einer Fourier-Transformations-Methode durchgeführt, die in Matlab 2009b implementiert wurde. Die gesamte FRAP-Analysetechnik und die durchgeführten Kalibrierungsmessungen sind in Abschnitt 5.3 genau beschrieben.

# Hyaluronsäuregele mit bio-inspirierten Quervernetzern

Inspiziert durch die chemische Struktur des Elastins und den einzigartigen mechanischen Eigenschaften elastin-basierter biologischer Gewebe wurde in einem bionischen Ansatz ein Hyaluronsäure-Hydrogelsystem etabliert, das einerseits die mechanischen Eigenschaften des biologischen Vorbilds nachahmen soll und andererseits als Testsystem zur Erforschung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit speziellem Fokus auf den Quervernetzereigenschaften dienen soll. Dazu wurden nach dem natürlichen Vorbild des Desmosins, ein vierarmiger, Pyridinium-basierter Quervernetzer des Elastins (siehe Kapitel 3, Abbildung 3.1), an der Universität Stuttgart (Markus Mateescu, Sabine Laschat, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart) verschiedene Quervernetzer synthetisiert und zur Herstellung von Hydrogelen bereitgestellt. Abbildung 6.1 zeigt den Syntheseweg der bioinspirierten Quervernetzer mit den Reaktionsausbeuten. Analog zum Desmosin bestehen die synthetischen Quervernetzer aus relativ kleinen Liganden mit heteroaromatischem Ringsystem und lassen sich durch eine konvergente Synthese in maximal 5 Syntheseschritten herstellen. Hydrogeleigenschaften werden durch Ladungen auf dem Polymersystem beeinflusst [56, 57]. Angeleitet durch die positive Ladung des Pyridinkerns im Desmosinmolekül wurde je ein positiv geladener Vernetzer synthetisiert und ein zweiter, welcher einen neutralen Pyridinkern besitzt, sonst aber zum ersten völlig identisch ist, um den Effekt von Ladungen auf die Hydrogeleigenschaften gezielt untersuchen zu können. Zur Herstellung von Hydrogelen wurden die Vernetzer mit langkettigen Hyalu-

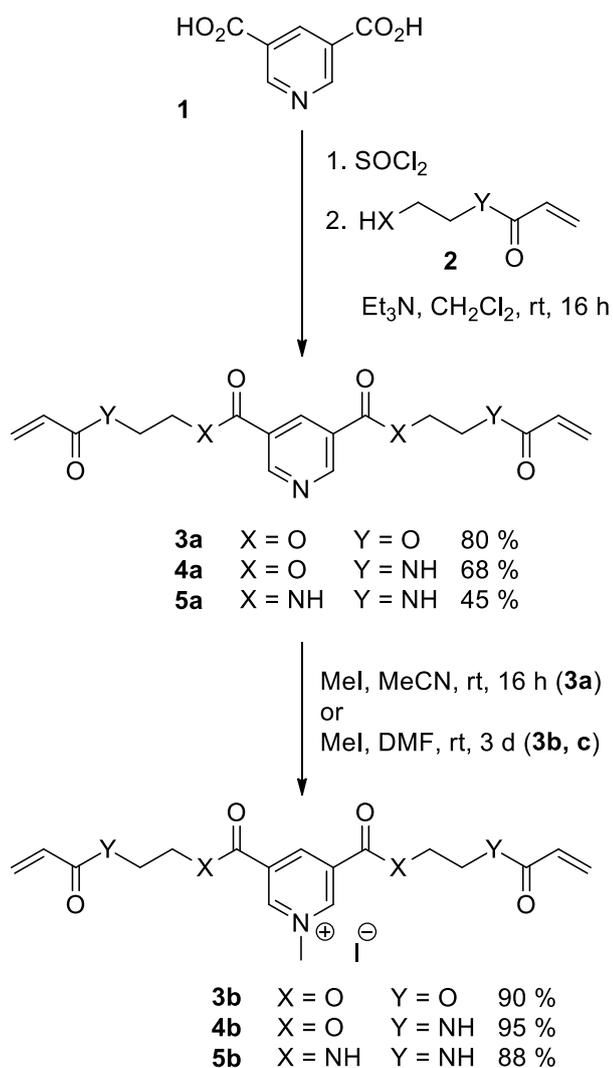


Abbildung 6.1: Synthese der Desmosin-inspirierten Quervernetzer mit Reaktionsausbeuten (in Anlehnung an [45]). Die bioinspirierten Quervernetzer, die analog zum Desmosin aus einem relativ kleinen, starren Liganden mit heteroaromatischem Ringsystem bestehen, sind Kernbaustein unserer elastischen Hydrogele (Synthese der Quervernetzer am Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart).

ronsäuremolekülen quervernetzt. Um eine Vernetzung zu ermöglichen wurden die Vernetzermoleküle sowie die Hyaluronsäuremoleküle mit funktionellen Gruppen ausgestattet. Die Vernetzermoleküle wurden mit jeweils zwei Acrylat-Gruppen endfunktionalisiert, die Hyaluronsäuremoleküle mit Thiolgruppen entlang der Kettenkontur. In basischem Milieu lassen sich die beiden funktionellen Gruppen durch Thio-Michael Addition vernetzen.

## 6.1 Gelbildungsanalyse und Mechanische Charakterisierung

Zur Charakterisierung der Gelbildung wurden Gelierungsmessungen mithilfe eines Scherrheometers durchgeführt und bewertet. Anschließend wurde für unterschiedliche Vernetzerkonzentrationen die Vernetzungsreaktion quantifiziert und die Elastizitätsmodule und das Schwellverhalten gemessen. Durch die Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen mithilfe von mechanischen Modellen wurde die Netzwerkstruktur der bio-inspirierten Hydrogele untersucht. Schließlich wurde das mechanische Verhalten der Hydrogele unter starker mechanischer Belastung getestet.

### 6.1.1 Gelierungsmessungen

Für die Gelierungsmessungen wurde thiolierte Hyaluronsäure (HA-SH) mit einem Thiolierungsgrad von 40 % (der Thiolierungsgrad gibt den Prozentsatz der Carboxy-Gruppen der Hyaluronsäure an, die mit Thiolgruppen funktionalisiert wurden) verwendet. Die Gelierung wurde bei einem pH-Wert von 9,0 und einer Temperatur von  $T = 37\text{ °C}$  durchgeführt. Zunächst wurde die Konzentration der Hyaluronsäure in der Polymerisationslösung so eingestellt, dass aus der Berechnung des mittleren Abstands der Thiol-Gruppen eine Quervernetzung durch die kurzen, nur wenige nm langen Vernetzer gewährleistet werden kann (Berechnung siehe Anhang A.3). Anschließend wurden Polymerisationslösungen aus HA-SH mit

den bio-inspirierten Vernetzern **3a** - **5b** (siehe Abbildung 6.1) hergestellt, um die Gelierungskinetik und die Stabilität der entstehenden Hydrogele zu bestimmen. Dazu wurden die Polymerisationslösungen an einem Scher-Rheometers präpariert und die zeitliche Entwicklung des Speichermoduls  $G'(t)$  während der Gelbildung wurde aufgezeichnet. Abbildung 6.2 zeigt die Messdaten der Gelbildungsanalyse bei 1,0 Vernetzeräquivalenten (Verhältnis aus Acrylatgruppen zu Thiolgruppen in der Reaktion). Die Polymerisationslösungen mit den zweifach-Ester-Vernetzern **3a** und **3b** gelieren innerhalb von 15 min, erreichen einen maximalen Speichermodul von 400 bis 500 Pa und degenerieren wieder. Der neutrale Ester-Amid-Vernetzer **4a** induziert innerhalb einiger Stunden eine Gelbildung und der Speichermodul erreicht einen Maximalwert von etwa 8 Pa, doch auch hier kommt es wieder zu einem Auflösungsprozess. Mit dem geladenen Ester-Amid-Vernetzer **4b** kann in zwei Stufen eine schwache Gelbildung erreicht werden, der Speichermodul erreicht hier nach etwa 40 Stunden einen Endwert von knapp 250 Pa. Im Gegensatz dazu zeigen jedoch die zweifach-Amid-Vernetzer **5a** und **5b** nach einigen Stunden eine stabile Gelbildung mit Plateau-Speichermodulen von 2200 Pa (**5a**) und 800 Pa (**5b**).

Beim Vergleich der Gelierungsmessungen zeigt sich, dass die Ladung des Vernetzers die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst. Die geladenen Vernetzer **3b** und **5b** zeigen im Vergleich zu den ungeladenen Partnerverbindungen eine beschleunigte Gelierungskinetik. Die Ursache dafür könnte in einer Ladungswchselwirkung zwischen dem positiven Vernetzer und den negativen Hyaluronsäureketten liegen, welche zu einer beschleunigten Vernetzungsreaktion führen. Weiter hat sich gezeigt, dass Gele mit den Vernetzern **3a,3b** und **4a** degenerieren. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich eine Spaltung der Vernetzer durch Esterhydrolyse. Dies wird auch durch eine andere Untersuchung bestätigt, für welche esterhaltige Vernetzer in einem Hyaluronsäure-Hydrogelsystem eingesetzt wurden [58] und konnte mit diesen Vernetzern auch an einem PEG-basierten Polymersystem (Poly(1-Glycidylpiperazin)) beobachtet werden [59]. Die schwache Gelbildung mit dem geladenen Ester-Amid-Vernetzer **4b** könnte auf eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den anionischen Hyaluronsäureketten, vermittelt durch den abgespalte-

nen positiven Pyridinkern, zurückzuführen sein. Da somit für eine stabile Gelbildung Vernetzer mit Estergruppen nicht in Betracht gezogen werden können, wurden für alle weiteren Untersuchungen ausschließlich die zweifach-Amid Vernetzer **5a** und **5b** eingesetzt.

### 6.1.2 Quantifizierung der Vernetzungsreaktion

Die Effizienz der Quervernetzungsreaktion zwischen den Acrylatgruppen der Vernetzer und den Thiolgruppen der Hyaluronsäuremoleküle liefert Aussagen über die Vernetzungsstruktur der gebildeten Hydrogele. Dazu wurden unter Verwendung von Ellman's Reagenz (siehe Abschnitt 4.1.4) die freien Thiolgruppen nach der Vernetzungsreaktion in Abhängigkeit der Vernetzeräquivalente quantifiziert (siehe Abbildung 6.3). Diese Untersuchung zeigt, dass die Vernetzungsreaktion für beide Vernetzertypen **5a** und **5b** sehr ähnlich verläuft. Ein Vergleich der Messwerte mit dem maximal möglichen Reaktionsumsatz, der durch die durchgezogene Linie dargestellt ist, zeigt, dass die Vernetzungsreaktion für beide Vernetzertypen bis zu einem Vernetzeranteil von etwa 0,8 Vernetzeräquivalente mit einem maximalen Umsatz reaktiver Gruppen abläuft und keine zusätzlichen Dithiolbindungen gebildet werden. Bei Vernetzeranteilen, die über 0,8 Äquivalente hinausgehen, bleibt ein Teil der reaktiven Gruppen unvernetzt. So bleibt die Bindungsstellenbelegung bei 1,0 Vernetzeräquivalenten auf etwa 80 Prozent beschränkt, mit zunehmender Vernetzermenge steigt die Bindungsstellenbelegung noch weiter an und erreicht am Maximum der eingesetzten Vernetzermenge von 1,8 Vernetzeräquivalenten einen Wert von etwa 90 Prozent.

Bis etwa 0,8 Vernetzeräquivalente findet eine vollständige Reaktionsumsetzung statt. Darüber hinaus bleiben reaktive Thiolgruppen unvernetzt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass es Vernetzermoleküle gibt, die mit einer Reaktionsgruppe bereits reagiert haben, deren freier Vernetzerarm aber nicht mehr die Reichweite an eine freie Bindungsstelle besitzt, da die Vernetzungsstellen in der direkten Nachbarschaft bereits belegt sind oder es können diese durch sterische Behinderungen nicht erreicht werden. Vor allem im Bereich der Überschussvernetzerkonzentration kann es auch Vernetzermoleküle geben, die mit beiden Vernetzerarmen unvernetzt

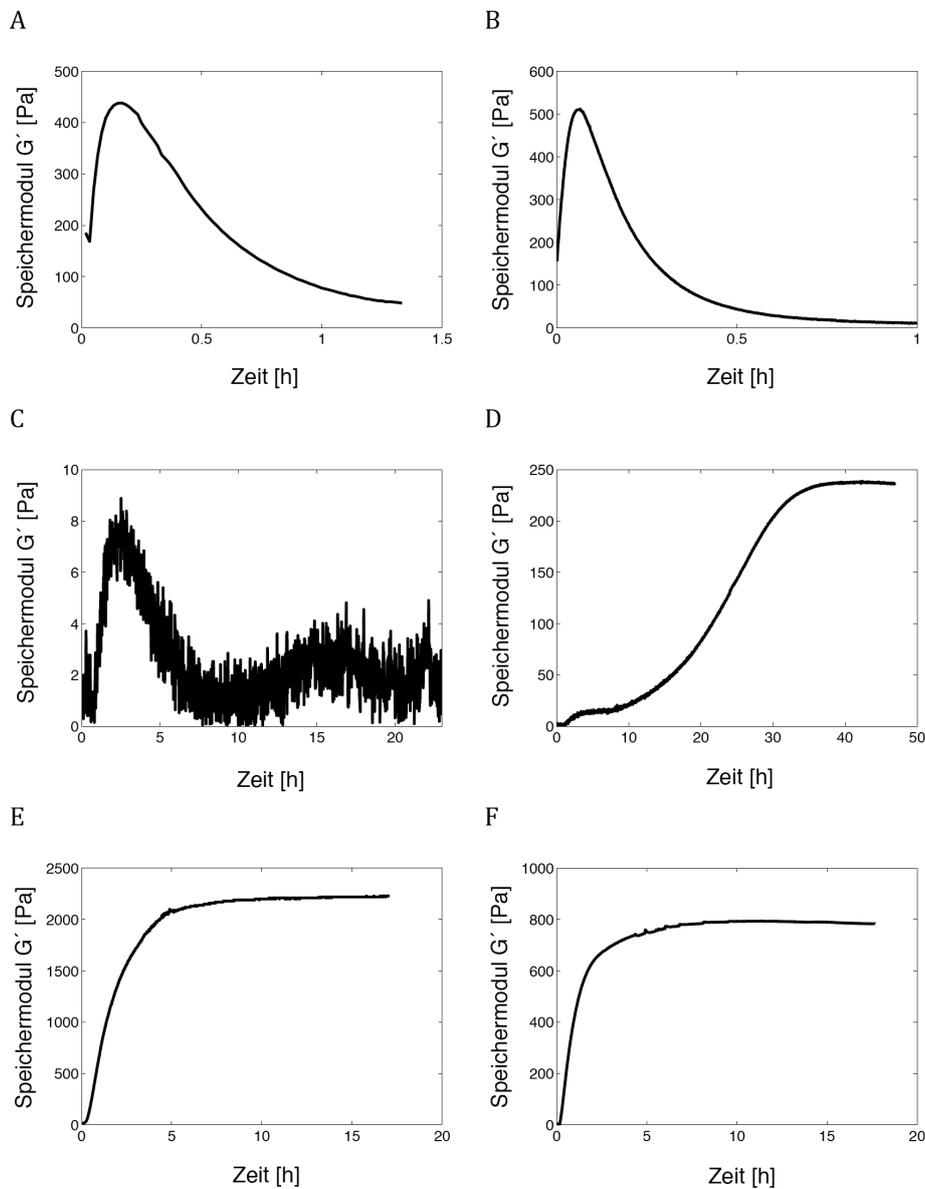


Abbildung 6.2: Messung der zeitliche Entwicklung des Speichermoduls  $G'(t)$  während der Gelbildung zur Bestimmung der Gelierungskurven mit den bioinspirierten Quervernetzern **3a** - **5b** bei 1,0 Vernetzeräquivalenten. Messparameter am Scher-Rheometer. Plattenabstand: 0,2 mm. Frequenz: 1 Hz. Amplitude: 0,01. Alle Messungen bei  $T = 37\text{ °C}$ . A) HA-SH-**3a**; B) HA-SH-**3b**; C) HA-SH-**4a**; D) HA-SH-**4b**; E) HA-SH-**5a**; F) HA-SH-**5b**. Nur mit den beiden Vernetzern **5a** und **5b** lassen sich stabile Hydrogele erzeugen. Man beachte die unterschiedliche Achsenskalierung. Wie veröffentlicht in [45].

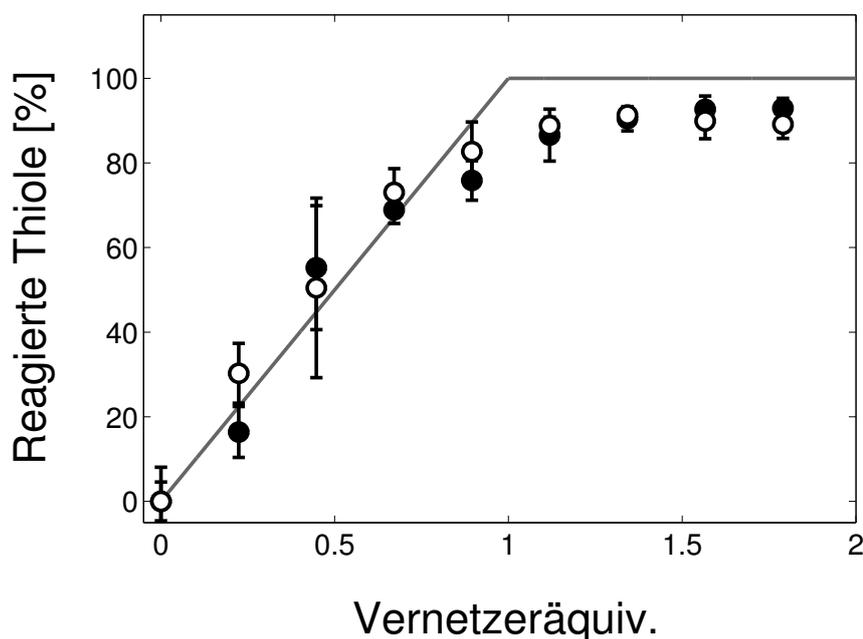


Abbildung 6.3: Bestimmung der quantitativen Umsetzung der Thiolgruppen nach der Vernetzungsreaktion mit Ellman's Reagenz. Für beide Vernetzertypen **5a** (geschlossene Symbole) und **5b** (offene Symbole) reagieren bis etwa 0,8 Vernetzeräquivalente alle Vernetzermoleküle beidseitig. Die durchgezogene Linie stellt die maximal mögliche Umsetzung reaktiver Gruppen dar. Messungen in Triplikaten. Eingezeichnete Fehlerbalken sind Standardfehler. Wie veröffentlicht in [45].

bleiben oder nur eine Bindung eingehen. Es zeigt sich, dass die Ladung des Vernetzers keinen Einfluss auf die Reaktionsumsetzung ausübt.

### 6.1.3 Schwellverhalten und E-Module

Für alle nachfolgend beschriebenen Messungen wurden zylindrische Hydrogelproben bei einem pH-Wert von 9,0 hergestellt, bei einer Temperatur von  $T = 37\text{ °C}$  für 24 h ausgelieren lassen und für 48 h in PBS zur Einstellung der Gleichgewichtsschwellrate inkubiert. Abbildung 6.4 zeigt die Gleichgewichtsschwellraten der Hyaluronsäure-Hydrogele HA-SH-**5a** und HA-SH-**5b** in Abhängigkeit der Vernetzeräquivalente für einen Thiolierungsgrad von 49 %. Die gemessenen Schwellra-

ten entsprechen den Massenschellraten  $Q_M = M_{ges}/M_{fest}$ , mit  $M_{ges}$  der Gesamtmasse des geschwollenen Hydrogels und  $M_{fest}$  dem Feststoffgehalt (HA-SH und Vernetzer) des Hydrogels. Für beide Vernetzer gibt es ein Schwellratenminimum, das sich bei etwa 0,8 - 1,0 Vernetzeräquivalenten befindet. Am Schwellratenminimum beträgt die Schwellrate der Hydrogele mit dem neutralen Vernetzer **5a** 29,5, und die der Gele mit dem geladenen Vernetzer **5b** 26,2. Die Schwellraten der Gele mit dem geladenen Vernetzer zeigen für alle Vernetzerkonzentrationen geringere Schwellraten als die Gele mit dem ungeladenen Vernetzer. Während der Unterschied der Schwellraten im Bereich zwischen 0,4 Vernetzeräquivalenten und dem Schwellratenminimum noch gering ist mit einem maximalen Unterschied von weniger als 15 %, wird der Unterschied im Bereich des Vernetzerüberschusses deutlicher. Bei 1,8 Vernetzeräquivalenten ist die Schwellrate der Gele mit dem ungeladenen Vernetzer auf 68,4 angestiegen, während die Gele mit dem geladenen Vernetzer bei dieser Vernetzermenge nur bis zu einer Schwellrate von 38,9 anschwellen. Bei 0,2 Vernetzeräquivalenten war für beide Geltypen keine Schwellratenmessung möglich, da sich hier keine feste Gelstruktur ausgebildet hat. Die zunehmende Differenz der Schwellraten beider Hydrogeltypen mit zunehmendem Vernetzerüberschuss ist ein klares Zeichen für die Zunahme an positiver Ladung durch erhöhte Bindung an Quervernetzer, die somit nur einseitig gebunden vorliegen können.

Abbildung 6.5 (oben) zeigt die in uniaxialer Kompression gemessenen statischen E-Module der beiden Hydrogeltypen in Abhängigkeit der Vernetzeräquivalente. Für beide Hydrogeltypen zeigt der Verlauf der E-Module einen charakteristischen Verlauf mit einem progressiven Anstieg bis zu einem Maximalwert, der bei etwa 0,8 Vernetzeräquivalenten erreicht wird und einem Abfall der Elastizitätsmodule im Bereich des Vernetzerüberschusses. Die Zunahme der E-Module im Bereich kleiner Vernetzeräquivalente ist durch eine lineare Aufspaltung der Messwerte in Abhängigkeit der Ladung am Vernetzer gekennzeichnet. Abbildung 6.5 (unten) zeigt die E-Module beider Geltypen im Bereich zwischen 0,4 und 0,8 Vernetzeräquivalenten zusammen mit einer linearen Fitanalyse. Der Nulldurchgang beider Fitgeraden befindet sich bei ca. 0,25 Vernetzeräquivalenten.

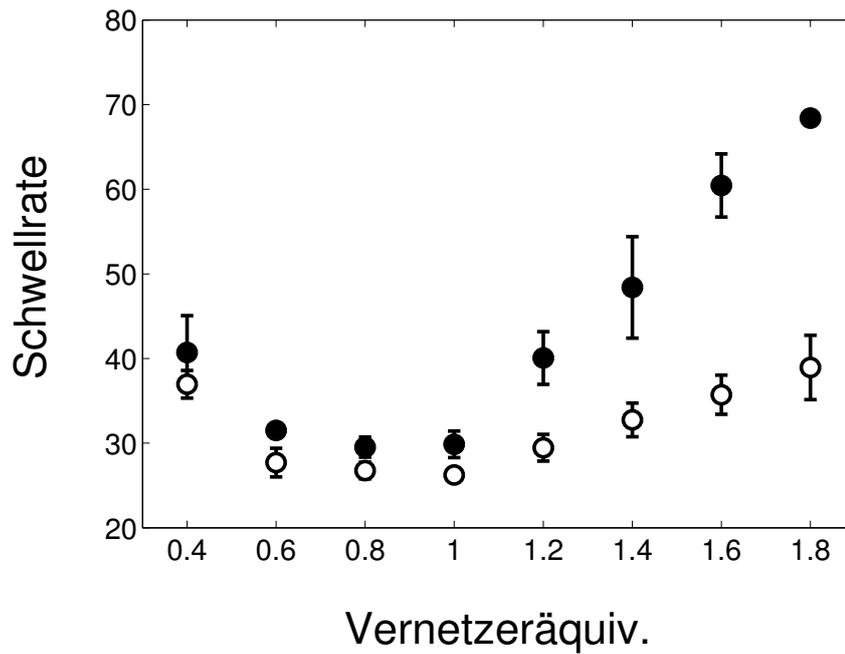


Abbildung 6.4: Schwellrate der Hyaluronsäure-Hydrogele HA-SH-**5a** (geschlossene Symbole) und HA-SH-**5b** (offene Symbole) in Abhängigkeit der Vernetzeräquivalente. Für beide Hydrogeltypen zeigt sich das Schwellratenminimum bei ca. 0,8 Vernetzeräquivalenten. Die Hydrogele mit dem geladenen Vernetzer **5b** zeigen insgesamt geringere Schwellraten. Der Unterschied wird vor allem im Bereich höherer Vernetzeräquivalente deutlich, in welchem die Ladungswchselwirkung mit dem Hyaluronsäuregerüst zusätzliche Bindungen schafft. Messungen in Triplikaten. Fehler repräsentieren Standardfehler. Wie veröffentlicht in [45].

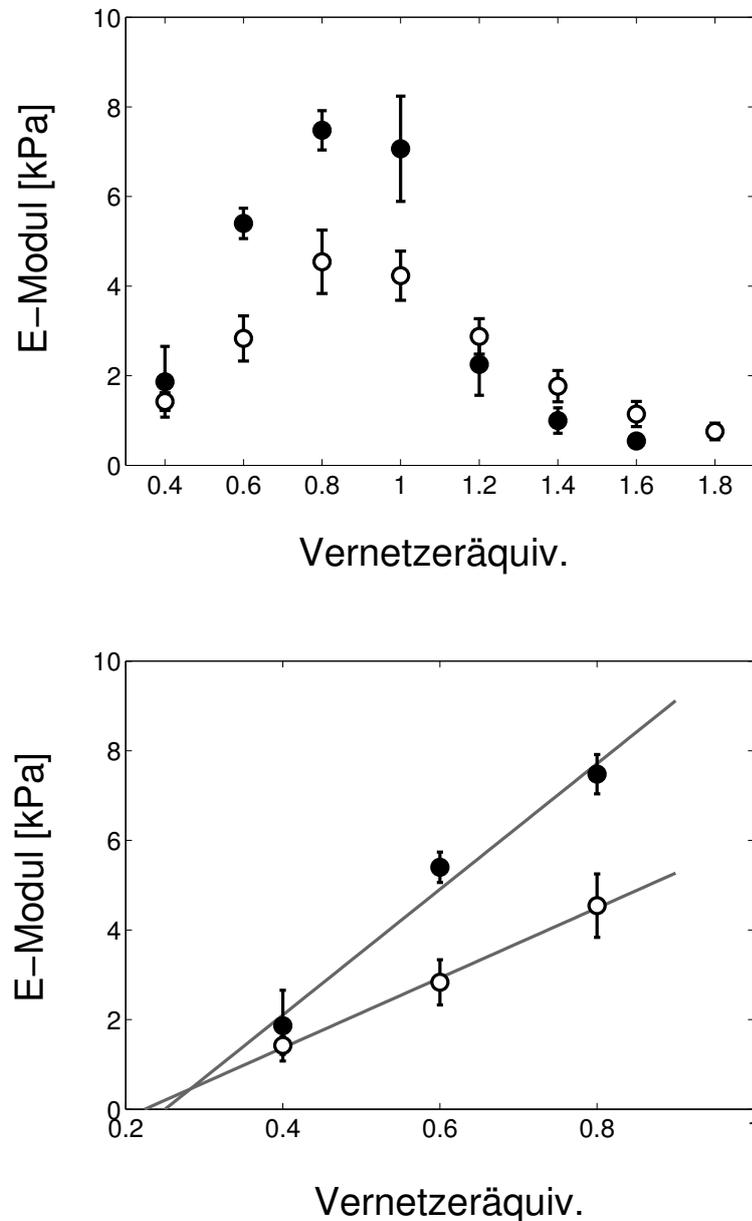


Abbildung 6.5: (oben) E-Module der Hyaluronsäure-Hydrogele HA-SH-5a (geschlossene Symbole) und HA-SH-5b (offene Symbole) in Abhängigkeit der Vernetzeräquivalente. Messung in uniaxialer Kompression. Für beide Hydrogeltypen zeigt sich ein Maximum bei ca. 0,8 Vernetzeräquivalenten. Der unterschiedliche Verlauf der Elastizitätsmodule weist auf charakteristische Unterschiede der beiden Hydrogeltypen hin. Im Bereich kleiner Vernetzeräquivalente zeigen die Hydrogele mit dem ungeladenen Vernetzer höhere E-Module, im Bereich des Vernetzerüberschusses ist es gerade umgekehrt. (unten) Ausschnitt bis 0,8 Vernetzeräquivalenten mit linearem Fit. Der Nulldurchgang ist für beide Vernetzertypen ähnlich. Ab 0,4 Vernetzeräquivalenten kommt es zu einer Aufspaltung der Elastizitätsmodule. Messungen in Triplikaten. Fehler repräsentieren Standardfehler. Wie veröffentlicht in [45].

Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Befund, dass bei 0,2 Vernetzeräquivalenten für beide Vernetzertypen keine feste Gelbildung möglich war. Bei 0,4 Vernetzeräquivalenten sind die E-Module beider Geltypen etwa gleich, darüber hinaus zeigen die Gele mit dem neutralen Vernetzer **5a** einen deutlich steileren Anstieg. Am Maximum bei 0,8 Vernetzeräquivalenten beträgt der E-Modul der Gele mit dem neutralen Vernetzer **5a**  $7,5 \pm 0,8$  kPa, die Hydrogele mit dem geladenen Vernetzer **5b** erreichen am Maximum nur einen Wert von  $4,5 \pm 1,2$  kPa. Das Verhältnis der E-Module ist hier auf etwa das 1,7 fache angestiegen. Zwischen 1,0 und 1,2 Vernetzeräquivalenten kommt es zu einer Kreuzung der Messwerte beider Geltypen und die E-Module der Gele mit dem geladenen Vernetzer sind im Bereich zwischen 1,2 und 1,8 Vernetzeräquivalenten höher als die E-Module der Gele mit dem ungeladenen Vernetzer. Bei 1,8 und 2,0 Vernetzeräquivalenten hatten die Gele mit dem ungeladenen Vernetzer keine feste Gelstruktur mehr und waren deswegen nicht mehr mechanisch messbar. Im Gegensatz dazu waren Gele mit dem geladenen Vernetzer bei 1,8 Vernetzeräquivalenten noch formstabil und ließen eine E-Modul-Messung zu, bei 2,0 Vernetzeräquivalenten waren aber auch diese nicht mehr messbar.

Das Verhalten der Elastizitätsmodule der Gele steht in enger Verbindung mit dem Schwellverhalten. Das Maximum der E-Module korreliert mit dem Minimum der Schwellratenmessung. Am Schwellratenminimum wie am E-Modul-Maximum hat sich die größtmögliche Anzahl funktionaler Querverbindungen ausgebildet. Dadurch erreicht die Maschengröße ein Minimum und folglich der Elastizitätsmodul ein Maximum. Diese Beobachtung korreliert auch mit der Charakterisierung der Vernetzungsstruktur anhand der Bestimmung der freien Thiole nach der Vernetzungsreaktion (siehe Abbildung 6.3), wo sich gezeigt hat, dass bis zu einem Vernetzeranteil von 0,8 Äquivalenten ein maximaler Reaktionsumsatz stattfindet, darüber hinaus aber Thiol- und Acrylatgruppen frei bleiben.

Die Schwellraten sind im Bereich kleiner Vernetzeräquivalente sehr ähnlich und werden durch die Ladung am Vernetzer nur geringfügig beeinflusst, im Bereich des Vernetzerüberschusses zeigt sich jedoch eine Aufspaltung der Schwellraten in Abhängigkeit der Vernetzerladung. Der geringe Einfluss bei kleinen Vernet-

zeräquivalenten könnte dadurch erklärt werden, dass es hier durch den großen Abstand der Ladungen in der festen Verbindungsstruktur des Polymernetzwerks zu keiner direkten Ladungswechselwirkung innerhalb des Polymergerüsts kommt. Im Bereich des Vernetzerüberschusses ist dies anders. Hier ist der Einfluss der Ladung groß, denn hier können die kationischen Vernetzer, die nur einseitig reagiert haben, mit dem anionischen Hyaluronsäuregerüst zusätzliche elektrostatische Knotenpunkte schaffen. Dadurch können die Gele mit dem geladenen Vernetzer bis zu starkem Vernetzerüberschuss durch elektrostatische Wechselwirkungen eine feste Polymerstruktur aufrechterhalten während die Gele mit dem neutralen Vernetzer dazu nicht in der Lage sind und mit zunehmendem Vernetzerüberschuss ungehindert anschwellen.

Während das Verhalten der Schwellraten hauptsächlich im Bereich des Vernetzerüberschusses stark von der Vernetzerladung abhängt, ist das Verhalten der Elastizitätsmodule bei kleinen Vernetzeräquivalenten wie auch im Bereich des Vernetzerüberschusses stark von der Vernetzerladung abhängig und weist auf charakteristische Unterschiede der mechanischen Eigenschaften beider Hydrogeltypen hin. Die höheren Elastizitätsmodule der Hydrogele mit dem kationischen Vernetzer im Bereich des Vernetzerüberschusses lassen sich durch die geringeren Schwellraten bzw. die damit verbundenen Ladungswechselwirkungen erklären, die den Verlust kovalenter Quervernetzungsstelle durch elektrostatische Knotenpunkte bis zu einem gewissen Maß ausgleichen können. Der Bereich kleiner Vernetzeräquivalente ist schwieriger zu verstehen und soll nachfolgend detaillierter untersucht werden. Dabei werden für beide Vernetzer identische Netzwerkstrukturen betrachtet, wie es die Charakterisierung der Vernetzungsreaktion nahelegt (siehe Abbildung 6.3). Unterschiedliche Maschengrößen können die Aufspaltung der E-Module nicht erklären denn die Schwellraten beider Gele sind in diesem Bereich sehr ähnlich und zeigen keine Aufspaltung in Abhängigkeit der Vernetzerladung. Auch eine durch die Ladung des kationischen Quervernetzers hervorgerufene veränderte Hydratisierung von Wassermoleküle, die aufgrund veränderter Wechselwirkungen mit dem Polymergerüst das elastische Verhalten verändern könnten, kann als Ursache ausgeschlossen werden. Denn wenn dies so wäre, dann müsste die Mischenthalpie

zwischen dem Polymernetzwerk und den Lösungsmittelmolekülen durch die unterschiedliche Wechselwirkung mit dem geladenen Vernetzer unterschiedlich sein und demnach auch das chemische Potential  $\Delta\mu = v_s \cdot \Pi$ , wobei  $v_s$  das spezifische Volumen des Lösungsmittels darstellt und  $\Pi$  den osmotischen Druck. Der osmotische Druck korreliert aber mit der Schwellrate und die Tatsache, dass es keine Aufspaltung der Schwellraten in diesem Bereich in Abhängigkeit der Vernetzerladung gibt, zeigt, dass sich die unterschiedlichen Elastizitätsmodule nicht durch unterschiedliche stark hydratisierte Wassermoleküle erklären lassen. Von daher kann vermutet werden, dass die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem kationischen Vernetzer und den anionischen Hyaluronsäureketten die Unterschiede erklären kann. Die positive Ladung am Vernetzer erzeugt einen Abschirmeffekt auf die negativen Ladungen am Hyaluronsäuregerüst und macht dadurch das Polymernetzwerk flexibler als das Netzwerk mit dem neutralen Vernetzer.

#### 6.1.4 Vergleich mit Netzwerkmodellen

Netzwerkmodelle sind hilfreich um Informationen über das elastische Verhalten und die Struktur von Hydrogelen zu gewinnen. Deren Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit hängt allerdings von der Art und Anzahl der vorhandenen Netzwerkdefekte ab [36]. Sind diese schwer einzuschätzen, so werden die Modelanalysen unsicher. Aus diesem Grund soll sich die Analyse auf den Bereich bis 0,8 Vernetzeräquivalente beschränken, da für diesen Bereich nachgewiesen werden konnte, dass die Vernetzungsreaktion mit einem maximalen Umsatz der reaktiven Gruppen abläuft (siehe Abbildung 6.3). Das bedeutet, dass es kaum lose oder nur einseitig vernetzte Quervernetzer gibt.

Zwei grundlegende Netzwerkmodelle, aus welchen sich der Bereich der erwarteten Elastizitätsmodule abschätzen lässt, sind das *affine Netzwerkmodell* und das *Phantom-Netzwerkmodell* 2.2.1. Die Vorhersagen der Schermodule aus den beiden Modellen stellen eine untere und eine obere Grenze für die erwarteten Schermodule für Netzwerke aus ungeladenen elastischen Ketten dar [27]. Andere Modelle

sagen dazwischenliegende Schermodule voraus [36]. Im affinen Netzwerkmodell wird angenommen, dass die Endpunkte der Netzwerkketten in ein elastisches Kontinuum eingebettet sind und durch die makroskopische Deformation affin transformiert werden. Die Konnektivität der Ketten spielt hierbei keine Rolle, da durch die affine Transformation keine Korrelationen zwischen verschiedenen Ketten berücksichtigt werden. Die Ketten werden als frei beweglich betrachtet. Dann lässt sich mit den Prinzipien der statistischen Physik ein Zusammenhang zwischen dem Schermodul  $G$  und der Molzahl  $\nu$  elastischer Ketten pro Einheitsvolumen herstellen mit  $G_{affin} = \nu RT$  (siehe 2.2.1). Im Vergleich zum affinen Netzwerkmodell werden im Phantom-Netzwerkmodell sowohl die Polymerketten als auch die Quervernetzungspunkte als frei beweglich betrachtet. Die Beweglichkeit der Vernetzungspunkte ist dabei aber abhängig von der Funktionalität  $f$  der Vernetzungspunkte. In diesem Modell ist der Schermodul  $G$  gegeben durch  $G_{Phantom} = (\nu - \kappa)RT$ .  $\kappa$  ist hierbei die Molzahl der Quervernetzungspunkte pro Einheitsvolumen und gegeben durch  $\kappa = 2 \cdot \nu / f$ , mit  $f$  der Funktionalität des Netzwerks [33], welche für das Hyaluronsäurenetzwerk  $f = 3$  beträgt, denn jeder Quervernetzungspunkt besitzt drei Verbindungen. Die Relation  $E = 2G(1 + \mu)$  [60] ermöglicht es, den Schermodul  $G$  in den Elastizitätsmodul  $E$  umzurechnen und die gemessenen E-Module können mit den Vorhersagen der Netzwerkmodelle verglichen werden. Für inkompressible Materialien ist die Poissonzahl  $\mu = 0,5$  und dies kann auch für Hyaluronsäuregele angenommen werden [21]. Damit ist  $E = 3G$ . Zur Berechnung der Anzahl elastischer Ketten pro Einheitsvolumen (Ketten, die mit beiden Enden an das Polymernetzwerk angebunden sind und zur Elastizität beitragen; dafür werden hier die HA-Segmente zwischen Quervernetzungsstellen berechnet) und der Anzahl der Quervernetzungspunkte pro Einheitsvolumen wird angenommen, dass alle Ketten zwischen Quervernetzungspunkten elastische Ketten darstellen. Dann lassen sich die beiden Größen anhand der eingesetzten Konzentration, dem Schwellgrad und dem Molgewicht zwischen Quervernetzungspunkten berechnen (Berechnung siehe A.4). Tabelle 6.1 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der Elastizitätsmodule und die Vergleichswerte der Messungen an den Hydrogelen HA-SH-5a und es zeigt sich, dass die durch die Netzwerkmodelle

vorhergesagten Werte nicht den Bereich der gemessenen Werte erfassen und auch das Phantom-Netzwerkmodell die gemessenen Werte um etwa das 10-fache überschätzt. Dies legt den Schluss nahe, dass die Anzahl elastischer Ketten weit geringer eingeschätzt werden muss als es die Berechnung der Kettenzahl zwischen Quervernetzungspunkten ergibt. Dies wird auch weiter dadurch bekräftigt, dass das reale Hyaluronsäurenetzwerk aus drei Gründen steifer sein müsste als die theoretischen Netzwerke der Modelle: i) die Hyaluronsäureketten sind auf der Längenskala der Maschengröße semiflexible Polymerketten (Persistenzlänge  $l_p \approx 10,5$  nm, Berechnung der Persistenzlänge von HA in PBS siehe Anhang A.1), welche also steifer als die in den Netzwerkmodellen betrachteten frei beweglichen Ketten sind und dadurch einen zusätzlichen Beitrag zum Elastizitätsmodul erzeugen müssten. ii) in realen Netzwerken erzeugen Verschlaufungen einen zusätzlichen Beitrag zum Elastizitätsmodul. iii) die negativen Ladungen am negativ geladenen Netzwerk HA-SH-5a/b erzeugen im Vergleich zu einem ungeladenen Netzwerk einen weiteren Beitrag zum Elastizitätsmodul.

Das bedeutet insgesamt, dass nur ein kleiner Bruchteil der Hyaluronsäuresegmente

**Tabelle 6.1: E-Module nach Berechnung mit Netzwerkmodellen.** Anhand des affinen Netzwerkmodells und des Phantom-Netzwerkmodells wurden die theoretisch erwarteten Elastizitätsmodule berechnet. Diese sind deutlich größer als die gemessenen Werte. Zum Vergleich sind die gemessenen E-Module der Gele HA-SH-5a mit dargestellt.

Vernetzeräquivalente	$E_{Phantom}[kPa]$	$E_{affin}[kPa]$	$E_{HA-SH-5a}[kPa]$
0,4	25,4	76,4	1,9
0,6	49,3	147,9	5,4
0,8	69,8	209,5	7,5

einen elastischen Beitrag leisten kann und dies kann nur durch eine Gelstruktur erklärt werden, die deutlich von einer homogenen Netzwerkstruktur aus willkürlich verflochtenen und quervernetzten Hyaluronsäureketten abweicht.

Dafür können im wesentlichen zwei Strukturelemente in Betracht gezogen werden: globuläre, intramolekular vernetzte Hyaluronsäureketten und lokale Leiterstrukturen, d.h. zwei parallel angeordnete Hyaluronsäureketten, die sequenziell durch mehrere Quervernetzer kovalent verbunden sind. Die Ausbildung

globulärer, intramolekular vernetzter Ketten ist sehr wahrscheinlich, da die langkettigen Hyaluronsäuremoleküle ( $\approx 450$  kDa) bei der Gelbildung unter der hohen Salzkonzentration in PBS vorzugsweise in "random coil"-Konfigurationen vorliegen, die sich nur transient durchdringen [61]. So können durch die kurzen Vernetzer sehr viele intramolekulare Querverbindungen gebildet werden. Die Ausbildung von lokalen Leiterstrukturen wird durch zwei Faktoren begünstigt: i) die semiflexible Eigenschaft der Hyaluronsäureketten, die dazu führt, dass die Parallelausrichtung zweier Hyaluronsäuremoleküle nach Ausbildung von zwei benachbarten Verbindungen erleichtert wird, wodurch die Bildung weiterer Nachbarverbindungen begünstigt wird. ii) selbst-assoziative Eigenschaften [61, 62] kurzer Hyaluronsäuresegmente.

Bei Krafteinwirkung lassen sich beide Strukturelemente durch die geringe Verflochtenheit des Netzwerks leicht verschieben und erzeugen damit einen geringen Beitrag zum Elastizitätsmodul und können somit die Unterschiede zu den Vorhersagen der Netzwerkmodelle erklären.

Ein weiterer Unterscheid der Messdaten zu den Vorhersagen der oben diskutierten Netzwerkmodelle besteht darin, dass die beiden Fitgeraden (Abbildung 6.5 unten) einen negativen Offset besitzen, der in den Netzwerkmodellen nicht vorhergesagt wird. Beide Fitgeraden fallen bei  $\approx 0,25$  Vernetzeräquivalenten auf Null ab. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass sich bei 0,2 Vernetzeräquivalenten keine formstabilen Gele bilden ließen, d.h. es handelt sich dabei um nicht stark quervernetzte Polymerlösungen. Deshalb kann vermutet werden, dass für beide Vernetzer eine Mindestmenge von  $\approx 0,25$  Vernetzeräquivalenten nötig ist, um formstabile Gele zu bilden und sich die Gelstruktur bei darunter liegenden Vernetzermengen bei statischer Krafteinwirkung entflechten lässt. Dies könnte wiederum als ein Hinweis auf die Ausbildung intramolekularer Querverbindungen aufgefasst werden, d.h. dass unterhalb von 0,25 Vernetzeräquivalenten durch die Ausbildung von intramolekularen Querverbindungen noch zu wenige Vernetzer für intermolekulare Quervernetzungen zur Verfügung stehen.

### 6.1.5 Verhalten unter starker mechanischer Beanspruchung

Weiter wurde das Verhalten der beiden Geltypen unter starker mechanischer Beanspruchung untersucht. Dazu wurden für beide Geltypen HA-SH-5a und HA-SH-5b Hydrogele mit 0,5; 1,0 und 1,5 Vernetzeräquivalenten hergestellt und in uniaxialer Kompression in 5 wiederholten Zyklen bis zu einer Deformation von  $\lambda = 0,55$  komprimiert ( $\lambda$  stellt die Deformation der Probe dar und ist definiert durch  $\lambda = L/L_0$ , wobei  $L$  und  $L_0$  die Probenausdehnung in axialer Richtung im deformierten und im nicht deformierten Zustand darstellt). Die Oberflächen der zylindrischen Hydrogele wurden dabei nicht vollständig getrocknet, so dass ein Gleiten der Gele zwischen den parallelen Messplatten möglich war und die Hydrogele über den ganzen Deformationsprozess hinweg ihre zylindrische Form behielten. Abbildung 6.6 zeigt die von den Hydrogelen (1,0 Vernetzeräquivalente) ausgeübte Spannung  $\sigma$  auf die Messplatten des mechanischen Prüfgeräts bei der Deformation  $\lambda = 0,55$  in 5 aufeinanderfolgenden Kompression-Entlastungs-Zyklen. Dabei zeigt sich, dass die Spannung über die 5 Messzyklen für beide Hydrogeltypen HA-SH-5a und HA-SH-5b konstant bleibt und es zu keiner messbaren Beschädigung der Hydrogelstruktur kommt.

Aus den gemessenen Spannungs-Deformations-Kurven wurde nun das mechanische Verhalten der Hydrogele bei starker Kompression näher untersucht (Abbildung 6.7). Dabei zeigt sich, dass sich der *Hookesche Bereich* für beide Geltypen bis etwa 10 Prozent Deformation erstreckt, anschließend kommt es zu einer spannungsinduzierten Materialversteifung, die sich sehr akkurat durch die Gleichung

$$\sigma_n = \frac{E_0}{3} \left( \lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \cdot \exp\left(\frac{J_1}{J_m}\right); \quad J_1 = \lambda^2 + \frac{2}{\lambda} - 3 \quad (6.1)$$

darstellen lässt [63] und zur Fitanalyse benutzt wurde.  $\sigma_n$  stellt die nominale Spannung dar,  $E_0$  den Elastizitätsmodul im *Hookeschen Bereich* und  $J_m$  eine Deformationsinvariante, bei welcher die spannungsinduzierte Materialversteifung dominant wird. Es handelt sich hierbei um eine Größe, die ein Maß für die endliche Dehnbarkeit der Polymerketten repräsentiert.

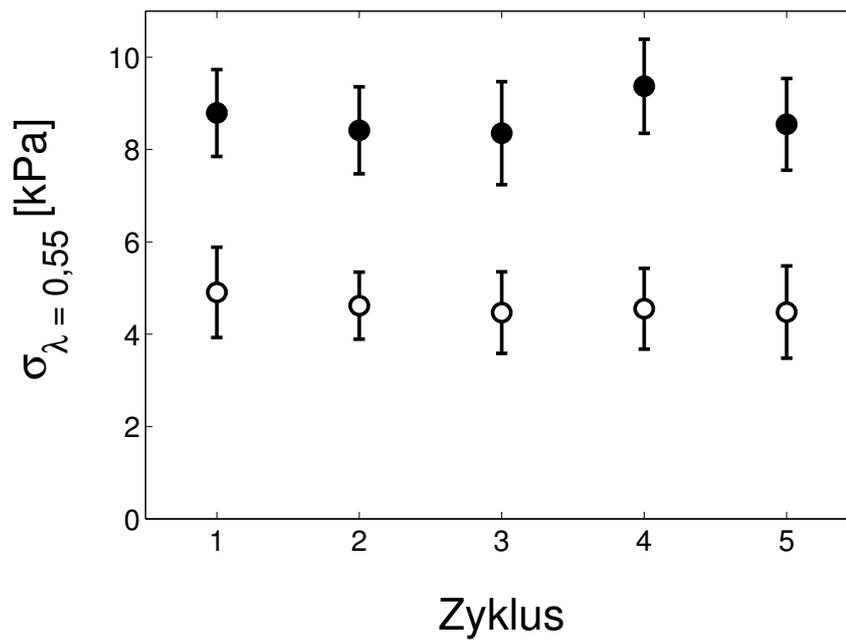


Abbildung 6.6: Verhalten der beiden Hydrogeltypen HA-SH-**5a** (geschlossene Symbole) und HA-SH-**5b** (offene Symbole) unter wiederholten starken Belastungstests. Die Analyse der von den Hydrogelen ausgeübten Spannung  $\sigma$  auf die Messplatten bei der Deformation  $\lambda = 0,55$  in 5 aufeinanderfolgenden Zyklen zeigt keine messbare Beschädigung der Hydrogelstruktur für beide Hydrogeltypen. Messungen in Triplikaten. Wie veröffentlicht in [45].

Für die Fitanalyse wurde für  $E_0$  der im linear-elastischen Bereich bestimmte Elastizitätsmodul (0 - 5 % Deformation) eingesetzt, so dass  $J_m$  als einziger Fitparameter zur Verfügung stand. Bei  $J_1 = J_m$  wird eine kritische Deformation erreicht, bei welcher die Materialversteifung dominant wird. Aus der Gleichung  $J_1 = J_m$  lassen sich zwei kritische Deformationswerte ableiten,  $\lambda_{max,D}$  und  $\lambda_{max,K}$ . Bei  $\lambda_{max,D}$  tritt eine kritische Dehnung der Probe auf und bei  $\lambda_{max,K}$  eine kritische Kompression. Die Relevanz beider Lösungen lässt sich leicht verstehen, denn die Kompression der zylindrischen Proben zwischen den parallelen Messplatten führt sowohl zu einer Stauchung als auch zu einer Dehnung der Probe. Dies lässt sich auch leicht auf mikroskopischer Skala veranschaulichen. Alle Polymerketten, deren Endpunkte in einer horizontalen Probenebene liegen, erfahren durch die Kompression in axialer Richtung eine Dehnung. Alle Polymerketten, deren Endpunkten parallel zur Kompressionsachse liegen, erfahren eine Stauchung. Die kritischen Deformationswerte  $\lambda_{max}$  und  $\lambda_{max,K}$  können auf mikroskopischer Ebene mit der Größe  $l_{max}/l_0$  in Verbindung gebracht werden, mit  $l_{max}$  der Konturlänge einer Polymerkette zwischen zwei Quervernetzungspunkten und  $l_0$  dem End-zu-End Abstand der Polymerketten im nicht deformierten Zustand [63]. In Tabelle 6.2 sind die ermittelten Werte der kritischen Dehnungsfaktoren zusammengestellt. Dabei zeigt sich, dass der kritische Dehnungsfaktor  $\lambda_{max,D}$  innerhalb der gemessenen Fehler weder eine Abhängigkeit von der eingesetzten Vernetzermenge noch vom Vernetzertyp aufweist und für alle gemessenen Gele gilt  $\lambda_{max,D} \approx 2$ . In gleicher Weise verhält sich auch der kritische Kompressionsfaktor, der für beide Geltypen und für die unterschiedlichen Vernetzermengen einen Wert von  $\lambda_{max,K} \approx 0,4$  liefert.

Aus  $\lambda_{max} \approx 2$  und  $\lambda_{max,K} \approx 0,4$  für alle Vernetzeräquivalente lässt sich schließen, dass sich die Hyaluronsäurekonfigurationen zwischen zwei Knotenpunkten unabhängig vom Vernetzungsgrad auf etwa die zweifache Länge dehnen lassen und auf etwa 40 % komprimieren lassen bevor es zu einer sprunghaft ansteigenden Versteifung der Polymerketten kommt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Verhalten bei starker Deformation durch die mesoskopische Netzwerkstruktur bestimmt wird, denn auf dieser Skala besitzen die Gele in dem

Strukturbild, das aus der Analyse mit den Netzwerkmodellen abgeleitet wurde, unabhängig vom Vernetzungsgrad eine ähnliche Struktur. Das würde bedeuten, dass der lokale Vernetzungsgrad dann also im wesentlichen den Elastizitätsmodul im linear-elastischen Bereich bestimmt.

Gleichung 6.1 lässt sich aus einer Deformationsenergiedichtefunktion ableiten, aus welcher sich auch das Spannungs-Deformations-Verhalten vieler anderer Biopolymernetzwerke wie Aktin-, Kollagen- und Vimentin-Netzwerken ableiten lässt [64, 31]. Spannungsinduzierte Materialversteifung ist eine wichtige Eigenschaft vieler biologischer Materialien wie beispielsweise von Blutgefäßen [65], Lungengewebe [66] oder Augenhornhaut [67] und lässt sich auf die semi-flexible Natur der Biopolymere zurückzuführen [31]. Dadurch wird verhindert, dass durch große Deformationen Materialschädigungen auftreten [31]. Aufgrund dieser Charakteristik und der Eigenschaft, auf starke Deformationen ohne Materialschädigungen zu reagieren, besitzen unsere bio-inspirierten Hydrogele mechanische Eigenschaften mit hohem Anwendungspotential als neuartigem Biomaterial.

Tabelle 6.2: **Fitparameter für die kritische Beanspruchung  $\lambda_{max,D}$ . a) Hydrogele mit ungeladenem Vernetzer 5a; b) Hydrogele mit geladenem Vernetzer 5b.**  $\lambda_{max,D}$  ist der kritische Dehnungsfaktor,  $\lambda_{max,K}$  ist eine weitere Lösung von  $J_1 = J_m$  und liefert den kritische Kompressionsfaktor. Analyse in Triplikaten (jede Analyse basierend auf der Mittelung von 5 Einzelmessungen). Fehler von  $J_m$  repräsentieren SD und wurden zur Bestimmung der Fehler von  $\lambda_{max}$  verwendet.

<b>a)</b>			
Vernetzeräquivalente	$J_m$	$\lambda_{max,D}$	$\lambda_{max,K}$
0,5	1,87±0,24	1,96 (1,89;2,03)	0,43 (0,40;0,45)
1,0	1,96±0,09	1,99 (1,96;2,01)	0,42 (0,41;0,43)
1,5	1,82 ±0,25	1,95 (1,87;2,02)	0,43 (0,41;0,46)
<b>b)</b>			
Vernetzeräquivalente	$J_m$	$\lambda_{max,D}$	$\lambda_{max,K}$
0,5	1,76±0,09	1,93 (1,90;1,96)	0,44 (0,43;0,45)
1,0	2,10 ±0,66	2,03 (1,83;2,2)	0,41 (0,36;0,47)
1,5	2,57±0,78	2,15 (1,94;2,34)	0,37 (0,32;0,43)

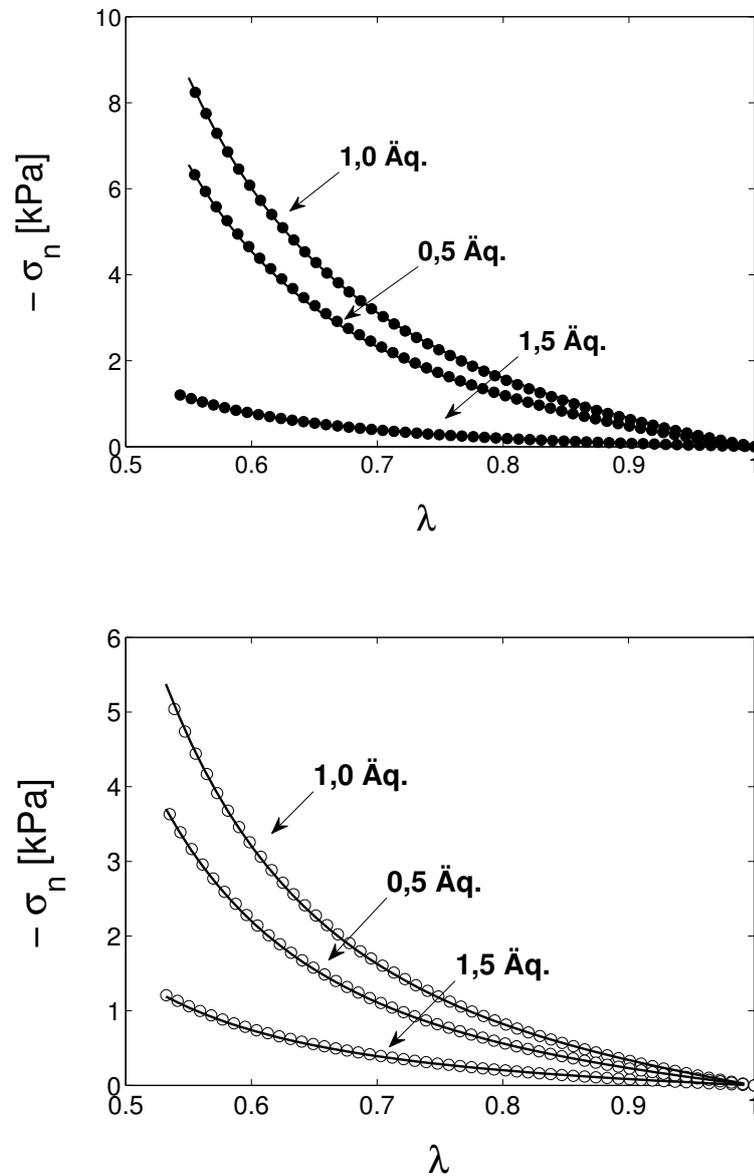


Abbildung 6.7: Verhalten der beiden Hydrogeltypen HA-SH-5a (oben) und HA-SH-5b (unten) unter starker Kompression bei 0,5, 1,0 und 1,5 Vernetzeräquivalenten (Äq.).  $\sigma_n$  stellt die nominale Spannung dar,  $\lambda$  die Deformation. Die durchgezogenen Kurven stellen Fitkurven anhand von Gleichung 6.1 dar. Die Kurven wurden durch Mittelung aus allen Einzelmessungen erstellt. Wie veröffentlicht in [45].

## 6.2 Transporteigenschaften und Strukturuntersuchungen

Zur weiteren Untersuchung der Struktur der bio-inspirierten Hydrogele wurden Partitionskoeffizientenmessungen mit sphärischen Testmolekülen durchgeführt und analysiert. Mithilfe von Diffusionskoeffizientenmessungen derselben Moleküle wurden anschließend die Transporteigenschaften in den Hyaluronsäurenetzwerken untersucht und mithilfe von Diffusionsmodellen bewertet.

### 6.2.1 Partitionskoeffizientenanalyse

Mit den Methoden der statistischen Physik lassen sich allgemeine Relationen für die sterischen Partitionskoeffizienten ( $K = c_1/c_2$ , wobei  $c$  die Konzentration in Phase 1 und 2 ist) von Molekülen für verschiedene geordnete und ungeordnete Gelstrukturen formulieren (siehe Abschnitt 2.3.1). Umgekehrt kann aus dem charakteristischen Abfall der Partitionskoeffizienten die Netzwerkgeometrie mithilfe von Fitanalysen ermittelt werden. Dies ist sozusagen neben den mechanischen Analysen eine zweite, unabhängige Sichtweise auf die Mikrostruktur des Polymernetzwerks und ermöglicht damit eine bessere Einordnung der aus den mechanischen Analysen abgeleiteten Netzwerktopologie. Weiter können anhand der Partitionskoeffizientenanalyse genaue Aussagen über die Permeabilität der Hydrogele in Abhängigkeit der Molekülgröße gemacht werden und damit lässt sich vorhersagen, welche Biomoleküle wie etwa Nährstoffe, Wachstumsfaktoren oder Enzyme im Gel frei diffundieren können und welche durch das Netzwerk gefiltert werden.

Für die Partitionskoeffizientenanalyse wurden sphärische Testmoleküle verwendet. Dazu wurden fraktionierte, monodisperse, neutrale FITC-Dextrane mit hydrodynamischen Radien zwischen 0,9 und 12,2 nm eingesetzt (Fraktionierung und Charakterisierung siehe Abschnitt 5.1). Hydrogelproben (HA-SH-5a, Thiolierungsgrad 40 %, 1,0 Vernetzeräquivalente, hergestellt in PBS, Probenherstellung siehe 4.1) wurden für eine Zeitdauer von 5 Tagen bei  $T = 37\text{ °C}$  mit den Testmolekülen inkubiert und die Gleichgewichtspartitionskoeffizienten  $K_i = c_i/c_{i,o}$  wurden durch Konzentrationsbestimmungen der in die Gele eindiffundierten Moleküle ( $c_i$ ) und

der Moleküle in der Inkubationslösung ( $c_{i,o}$ ) durch Fluoreszenzintensitätsmessung bestimmt. Eine Berechnung des Einstellpunkts der Gleichgewichtspartition kann in Anhang A.6 gefunden werden. Eine detaillierte Beschreibung der Analysetechnik zur Bestimmung der Partitionskoeffizienten wurde in Abschnitt 5.2 aufgezeigt. Abbildung 6.8 zeigt die Partitionskoeffizienten in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius der Testmoleküle und Fittinganalysen basierend auf drei typischen Teststrukturen, die für die Strukturanalyse herangezogen wurden: i) einer kubischen Gitterstruktur, ii) einer Struktur, welche aus willkürlich angeordneten Ebenen aufgebaut ist und iii) einer Netzwerkstruktur, die aus willkürlich angeordneten geraden Fasern vom Querschnittsradius  $r_f$  aufgebaut ist. Es wurde angenommen, dass die Testmoleküle nicht mit dem Polymernetzwerk wechselwirken. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da die Extrapolation der Partitionskoeffizienten für  $r_h \rightarrow 0 \Rightarrow K \approx 1$  liefert.

Für sphärische Moleküle in einem kubischen Gitter erwartet man aus der theoretischen Betrachtung der ausgeschlossenen Moleküle, dass die Partitionskoeffizienten mit  $K_i = 1 - s \cdot r_m$  abfallen [38].  $r_m$  ist dabei der Radius des ausgeschlossenen Volumens ( $r_m = r_h + r_f$ ) und  $s$  ist die mittlere Oberfläche der Gitterebenen pro Einheitsvolumen und wurde als Fitparameter verwendet. Für den effektiven Radius der Hyaluronsäurekette wurde  $r_f = r_{eff} = 0,68$  nm verwendet; dies entspricht dem Radius einer Hyaluronsäurekette (0,4 nm, [68]) mit einer Monolage aus gebundenen Wassermolekülen ( $d = 0,28$  nm, [69]). Aus der Fitanalyse wurde  $s = 0,092$  nm<sup>-1</sup> ermittelt (schwarze Fitgerade,  $RMSE = 0,054$ ). Die Fitanalyse anhand des kubischen Gittermodells liefert eine sehr gute Übereinstimmung mit den gemessenen Partitionskoeffizienten. Aus dem Fitparameter  $s$  lässt sich die Maschengröße des kubischen Gitters (Abstand benachbarter Gitterpunkte) mit  $\xi = 3/s$  berechnen (siehe Anhang A.5) und man erhält  $\xi = 32,6$  nm.

Für eine Struktur aus willkürlich angeordnete Ebenen erwartet man einen exponentiellen Abfall der Partitionskoeffizienten mit  $K_i = \exp(-s \cdot r_m)$  [38]. Dabei wurde  $s = 0,14$  nm<sup>-1</sup> ermittelt (rote Fitkurve,  $RMSE = 0,074$ ).  $s$  besitzt hier die gleiche Definition wie im kubischen Gittermodell. Der exponentielle Fit zeigt für große Moleküle ab etwa 7 nm Radius jedoch eine deutliche Abweichung von

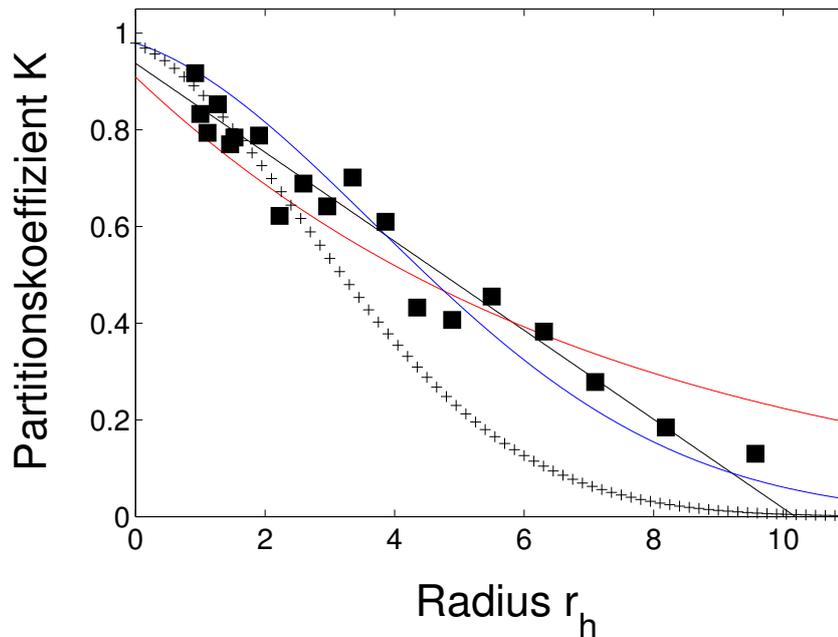


Abbildung 6.8: Partitionskoeffizientenanalyse mit FITC-Dextranen im Hyaluronsäurehydrogel HA-SH-5a basierend auf drei unterschiedlichen Strukturmodellen. Ein linearer Abfall resultiert aus einer kubische Gitterstruktur (schwarze Fitgerade,  $RMSE = 0,054$ ,  $RMSE$ =root mean square error), für eine Struktur aus willkürlich angeordnete Ebenen erwartet man einen exponentiellen Abfall (rote Fitkurve,  $RMSE = 0,074$ ) und für eine Struktur aus willkürlich angeordneten geraden Fasern einen Verlauf entsprechend des Modells von Schnitzer [38] (blaue Fitkurve,  $RMSE = 0,078$ ). Zusätzlich stellt der durch (+)-Symbole dargestellte Verlauf den aus Schnitzers Modell erwarteten Abfall der Partitionskoeffizienten für den Querschnittsradius  $r_f = 0,68$  nm einer Hyaluronsäurekette dar. Der Messpunkt bei  $r_h = 12,2$  nm wurde wegen eines zu geringen Signal-Rausch-Verhältnisses ausgeschlossen. Je drei Einzelmessungen. Fehler nicht darstellbar.

den Messdaten und zeigt, dass sich willkürlich angeordnete Ebenen nicht sehr gut eignen, um die Hydrogelstruktur zu beschreiben .

Der theoretische Verlauf der Partitionskoeffizienten für eine Struktur aus willkürlich angeordneten geraden Fasern ist durch das Modell von Schnitzer [38] gegeben mit

$$K_i = \exp(-v_a) \cdot \exp \left[ \frac{\phi \cdot \left(1 - \left(\frac{r_m}{r_f}\right)^2\right)}{(1 - \phi)} \right]. \quad (6.2)$$

Dabei ist  $\phi$  das ausgeschlossene Volumen (siehe Abschnitt 2.3.1) und wurde mithilfe der Schwellrate ( $SR = 48$ ) berechnet mit  $\phi = 1/SR$ , und der Polymerkettenradius  $r_f$  wurde als Fitparameter verwendet. Dabei wurde  $r_f = 0.96$  nm ermittelt (blaue Fitkurve,  $RMSE = 0,078$ ) und liegt damit deutlich über dem erwarteten Wert von  $r_f = 0,68$  nm. Setzt man diesen Wert für den Polymerkettenradius ein, so verläuft der nach diesem Modell erwartete Kurvenverlauf der Partitionskoeffizienten bei größeren Molekülradien unterhalb von den gemessenen Werten und fällt deutlich früher auf Null ab (siehe Abbildung 6.8, mit +-Symbolen dargestellte Kurve). Dies könnte auch ein Zeichen dafür sein, dass die Hydrogelstruktur eine mesoskopische Überstruktur besitzt, die offene Bereiche besitzt, in welchen große Moleküle noch diffundieren können, die in einer vergleichbaren homogenen, engmaschig vernetzten Gelstruktur nicht mehr diffundieren könnten. Dies kann durch folgende Überlegung bekräftigt werden: wenn es keine übergeordnete mesoskopische Gelstruktur gäbe, dann müsste die Maschengröße etwa den Wert haben, den man aus der Berechnung des mittleren Abstands der Thiolgruppen im geschwollenen Gel erhalten würde. Dieser Abstand beträgt 4,4 nm (Berechnung siehe Anhang A.3). Tatsächlich können aber Moleküle bis  $r_{h,0} \approx 10$  nm in das Gel eindiffundieren, woraus sich abschätzen lässt, dass die effektive Maschengröße  $\geq 20$ nm ( $= 2 \cdot r_{h,0}$ ) sein muss und dies ist in guter Übereinstimmung mit der aus dem kubischen Gittermodell abgeleiteten Maschengröße ( $\xi = 32,6$  nm).

Von daher könnte, in Anlehnung an die Folgerungen der mechanischen Modellanalysen, vermutet werden, dass eine effektive Maschengröße ( $\xi \geq 20$  nm) tatsächlich durch eine übergeordnete Netzwerkstruktur zustande kommt, die viele globulär

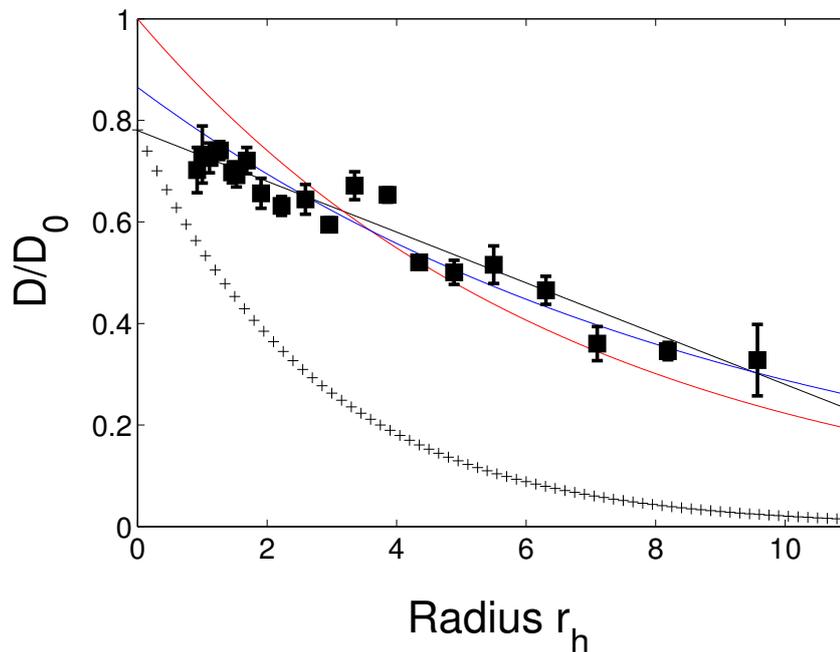


Abbildung 6.9: Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen im Hyaluronsäurehydrogel HA-SH-5a mit Fittinganalyse basierend auf unterschiedlichen Diffusionsmodellen. Vergleich aus linearem Abfall (schwarze Fitgerade,  $RMSE = 0,039$ ), Cukiers hydrodynamischem Modell (rote Fitkurve,  $RMSE = 0,084$ ) und Ogstons Obstruktionsmodell (blaue Fitkurve,  $RMSE = 0,051$ ). Mit (+) ist der Verlauf der erwarteten Diffusionskoeffizienten nach dem Modell von Ogston mit einem Querschnittsradius  $r_f$  der Hyaluronsäureketten von 0,68 nm dargestellt. Je drei Einzelmessungen.

vernetzte Hyaluronsäurekonfigurationen enthält, die etwa durch den Abstand der gefundenen Maschengröße voneinander getrennt sind. Eine solche Netzwerkstruktur könnte auch die Fluktuationen der Messdaten erklären.

### 6.2.2 Diffusionskoeffizientenanalyse

Zur Charakterisierung der Transporteigenschaften in den bio-inspirierten Hyaluronsäuregelen wurden die Diffusionskoeffizienten der FITC-Dextrane in den Hydrogelen mittels FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) bestimmt. FRAP ist eine Methode zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wird eine Stelle der Probe durch einen kurzen und

intensiven Laserpuls gebleicht und die zeitliche Entwicklung des Diffusionsprozesses der ungebleichten Moleküle aufgezeichnet. Durch die mathematische Analyse des Diffusionsprozesses lässt sich der Diffusionskoeffizient ermitteln. Eine genaue Erläuterung der FRAP-Messtechnik ist in Abschnitt 5.3 gegeben. Bei den Messungen wurde festgestellt, dass es auch unbewegliche Moleküle in den Hydrogelen gibt. Deshalb wurde ein spezielles Auswertprogramm geschrieben, mit welchem gleichzeitig die Fraktion der unbeweglichen Moleküle und der Diffusionskoeffizient der diffundierenden Moleküle bestimmt werden kann (siehe Abschnitt 5.3 und Anhang A.2).

Abbildung 6.9 zeigt die reduzierten Diffusionskoeffizienten der (beweglichen) FITC-Dextrane in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius bei  $T = 37^\circ\text{C}$  und die Analyse der Messdaten mithilfe von zwei grundlegenden Diffusionsmodellen. Der reduzierte Diffusionskoeffizient  $D/D_0$  stellt den im Gel gemessenen Diffusionskoeffizienten dividiert durch den Diffusionskoeffizient in reinem PBS bei  $T = 37^\circ\text{C}$  dar, welcher in einer separaten Messung für jede Dextranfraktion bestimmt wurde. Die blaue Fitkurve zeigt die Fitanalyse mit dem Obstruktionsmodell von Ogston [42]. Das Modell von Ogston basiert auf der analytischen Analyse sterischer Einschränkungen der Diffusionspfade sphärischer Moleküle in einem Netzwerk aus geraden, willkürlich angeordneten Polymerfasern (gleiche Struktur wie in Schnitzers Modell der Partitionskoeffizienten) und sagt die reduzierten Diffusionskoeffizienten nach folgender Relation voraus

$$\frac{D}{D_0} = \exp \left[ -\frac{r_h + r_f}{r_f} \phi^{1/2} \right]. \quad (6.3)$$

Dabei ist  $r_h$  der hydrodynamische Radius der diffundierenden Moleküle,  $r_f$  der Querschnittsradius der Polymerketten des Hydrogelnetzwerks und  $\phi$  der Polymervolumenanteil im Hydrogel.  $\phi$  wurde aus der Schwellrate ( $SR = 48$ ) mit  $\phi \approx 1/SR$  berechnet und  $r_f$  wurde als Fitparameter verwendet. Die Fitanalyse mit dem Modell von Ogston liefert eine sehr gute Übereinstimmung mit den Messdaten ( $RMSE = 0,044$ ), doch ist der hieraus erhaltene Polymerfaserradius mit  $r_f = 1,32$  nm deutlich höher als der effektive Radius einer Hyaluronsäurekette. Unter Verwendung von  $r_f = 0,68$  nm sagt das Modell von Ogston einen Verlauf

der Diffusionskoeffizienten voraus, der deutlich unterhalb der gemessenen Werte liegt (siehe Abbildung 6.9, der mit (+)-Symbolen dargestellte Verlauf). Basierend auf diesem Resultat und der Tatsache, dass das Modell von Ogston eine gute Vorhersagekraft für Diffusionskoeffizienten in Gelen, die einen geringen bis moderaten Polymeranteil aufweisen, besitzt [39], kann vermutet werden, dass ein Modell willkürlich angeordneter Polymerketten nicht die reale Hydrogelstruktur beschreibt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem Resultat der Partitionskoeffizientenanalyse.

Tabelle 6.3: **Anteil der unbeweglichen Moleküle.** Unbewegliche Molekülfraktion  $\gamma_o$  in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius  $r_h$  in den Hydrogelen HA-SH-5a.

$r_h$	0,9	1,0	1,1	1,3	1,5	1,7	1,9	2,2	2,6	3,0
$\gamma_o$	0,06	0,05	0,03	0,02	0,04	0,11	0,12	0,15	0,09	0,14
$r_h$	3,4	3,9	4,3	4,9	5,5	6,3	7,1	8,2	9,6	
$\gamma_o$	0,12	0,15	0,18	0,14	0,13	0,15	0,32	0,29	0,35	

Weiter wurde das hydrodynamische Modell von Cukier [40] auf die Messdaten angewendet. Der von Cukier auf Basis von hydrodynamischen Wechselwirkungen abgeleitete Zusammenhang zwischen dem reduzierten Diffusionskoeffizienten und dem hydrodynamischen Radius der diffundierenden Moleküle ist gegeben durch

$$\frac{D}{D_0} = \exp[-\kappa \cdot r_h]. \quad (6.4)$$

Dabei ist  $\kappa$  der hydrodynamische Abschirmfaktor, welcher sich für einfache Hydrogelmodelle anhand der Hydrogelparameter berechnen lässt. Für eine Gelstruktur aus stabförmigen Elementen ist  $\kappa$  abhängig von deren Anzahldichte, von der Viskosität des Lösungsmittels und einem Reibungsfaktor. Aufgrund der Komplexität der Hybridgelstruktur der hier untersuchten Hyaluronsäuregele und des unbekanntenen Reibungsfaktors lässt sich dieser Faktor hier jedoch nicht genauer untersuchen. Aus der Fitanalyse wurde  $\kappa = 0,15 \text{ nm}^{-1}$  (rote Fitkurve,  $RMSE = 0,088$ ) ermittelt. Der Fit zeigt bei kleinen Molekülradien eine deutliche Abweichung zu höheren Diffusionskoeffizienten hin und verläuft bei größeren Molekülradien etwas

unterhalb der Messdaten. Diese Abweichung bei kleinen Radien könnte damit in Verbindung gebracht werden, dass die sehr kleinen Moleküle in lokal engmaschig vernetzte Gelbereiche eindiffundieren können (bsp. intramolekular vernetzte globuläre Bereiche), wo sie für eine gewisse Verweilzeit gefangen sind bevor sie wieder frei diffundieren können. Insgesamt kann also geschlossen werden, dass sich die Diffusionseigenschaften der FITC-Dextrane im Hyaluronsäuregel nicht sehr gut durch hydrodynamische Effekte beschreiben lassen. Eine limitierte Anwendbarkeit von Cukier's hydrodynamischem Modell bei der Vorhersage von Diffusionskoeffizienten von Polymermolekülen wurde auch bereits in mehreren anderen Arbeiten gefunden [39].

Die lineare Fitgerade stellt einen empirisch gefundenen Zusammenhang zwischen den Diffusionskoeffizienten und dem hydrodynamischen Radius mit

$$\frac{D}{D_0} = 1 - \alpha - \beta \cdot r_h \quad (6.5)$$

dar, welcher mit den Fitparametern  $\alpha = 0,22$  und  $\beta = 0,05 \text{ nm}^{-1}$  (schwarze Fitgerade,  $RMSE = 0,034$ ) eine sehr gute Beschreibung der Messdaten liefert.

Dabei könnte  $\alpha$  als ein Faktor aufgefasst werden, der den Abfall der Diffusionskoeffizienten bei kleinen Molekülradien beschreibt, und  $\beta$  als ein Faktor, der die radiusabhängige Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeiten durch sterische Effekte beschreibt. Mackie und Meares [70] haben durch Betrachtung der Tortuosität (Grad der Gewundenheit der Transportwege in den Poren poröser Materialien) der Transportwege kleiner Moleküle in einem starren Polymergerüst ein Modell entwickelt, mit welchem der erwartete Wert von  $1 - \alpha$  abgeschätzt werden kann mit

$$\frac{D}{D_0} = \left[ \frac{1 - \phi}{1 + \phi} \right]^2. \quad (6.6)$$

Dabei ist  $\phi$  der Polymervolumenanteil im Hydrogel. Berechnet man  $\phi$  aus der Schwellrate des Hydrogels ( $SR = 48$ ) und dem Radius einer Hyaluronsäurekette mit einer Monolage aus gebundenem Wasser, so ergibt sich  $\phi = 0,061$  und daraus  $1 - \alpha = D/D_0 = 0,78$ , und  $\alpha = 0,22$ , in sehr guter Übereinstimmung mit

dem experimentellen Wert. Es kann demnach vermutet werden, dass die Hyaluronsäureketten eine Monolage aus Wasser binden, das für die diffundierenden Moleküle undurchdringlich ist.

Tabelle 6.3 zeigt die Fraktion  $\gamma_o$  der unbeweglichen Moleküle in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius der Moleküle. Dabei zeigt sich, dass kleine Moleküle nahezu vollständig frei diffundieren können. Größere Moleküle werden im Polymer Netzwerk jedoch zunehmend festgehalten und bei einem hydrodynamischen Radius von 7,1 nm steigt die unbewegliche Fraktion auf über 30 % an. In einer Messung von 10 min Dauer konnte dabei keine Veränderung der unbeweglichen Fraktion festgestellt werden. Es könnte sich dabei also einerseits um Moleküle handeln, die im Gel Netzwerk temporär elastisch gespeichert sind oder andererseits auch um Moleküle, die sich in der Gelstruktur permanent verhakt haben.

In einem weiteren Experiment wurde das Diffusionsverhalten von negativ geladenen Molekülen untersucht. Dazu wurden Hyaluronsäure-Hydrogele mit dem neutralen Vernetzer **5a** (HA-SH-5a: Thiolierungsgrad 40 %, 1,0 Vernetzeräquivalente) in PBS hergestellt und mit fraktionierten, negativ geladenen FITC-Dextranen (FITC-CM-Dextrane), die zu 3 - 7 % Carboxymethylgruppen enthalten und hydrodynamische Radien zwischen 3,7 und 36,0 nm aufweisen, für 5 Tage bei  $T = 37\text{ °C}$  inkubiert. Nach der Inkubation waren aus keiner Fraktion Moleküle in den Gelen nachweisbar. Dies zeigt, dass die negativ geladenen Dextrane nicht in der Lage sind, die Barriere des negativ geladenen Hyaluronsäuregerüsts zu überwinden auch wenn die Molekülgröße deutlich unterhalb der Maschengröße liegt. Das Hyaluronsäuregel ist also in der Lage, Moleküle in Abhängigkeit der Ladung zu filtern.

### 6.3 Abschlussdiskussion

Biologische Weichgewebe weisen mechanische Eigenschaften auf, die deren Funktionalität entscheidend beeinflussen und die mit rein synthetischen Materialien schwer nachzubilden sind [31]. Die meisten einfachen synthetischen Gele und Gum-

mimaterialien weisen über große Deformationbereiche einen linearen Spannungsanstieg auf (bsp. Polyacrylamidgele [31]) oder zeigen bereits bei mittlerer Deformation einen Abfall der Materialsteifigkeit (bsp. natürlicher Gummi [71]). Spannungsinduzierte Materialversteifung ist eine besondere Eigenschaft vieler biologischer Materialien und verhindert Materialschädigungen bei starker Belastung. Diese Eigenschaft gründet auf der Semiflexibilität der zugrundeliegenden Polymerketten, die dazu führt, dass sich diese bereits bei moderater Belastung gerade ausrichten und einen nichtlinearen Anstieg der Materialsteifigkeit hervorrufen [31]. Durch das Zusammenführen der einzigartigen visko-elastischen Eigenschaften der Hyaluronsäure mit einem kurzen, bio-inspirierten Vernetzer ist es gelungen, ein neuartiges Biomaterial mit diesen besonderen Eigenschaften zu schaffen. Unabhängig von der Vernetzerkonzentration und der Ladung am Vernetzer kommt es bei etwa der zweifachen Ausdehnung zur schützenden Materialversteifung. Während steife Filamente wie F-Aktin oder Kollagen bereits bei wenigen Prozent Deformation versteifen und flexible Biopolymere wie Vimentin erst bei einer Deformation nahe 100 % versteifen [31], liegen die hier charakterisierten Hyaluronsäure-Netzwerke in einem mittleren Bereich und besitzen damit ein hohes Anwendungspotential. Durch eine Reihe von Biokompatibilitätstests, die von unseren Kooperationspartnern (Claudia Kleinhans, Petra Kluger, Fraunhofer IGB, Stuttgart) durchgeführt wurden, konnte die Biokompatibilität der Hydrogele bereits nachgewiesen werden ([45] und Anhang B.1).

Die Elastizitätsmodule der Hydrogele können von wenigen Pa bis zu 7,5 kPa variiert werden. Dies repräsentiert den unteren Steifigkeitsbereich biologischer Gewebe [21] bis hin in die Größenordnung gemessener Elastizitätsmodule von Hautgewebe [72].

Es hat sich gezeigt, dass eine positive Ladung auf dem Quervernetzer zu einer wesentlichen Veränderung der Geleigenschaften führt. Im Bereich kleiner Vernetzeräquivalente führt die Ladung zu einer höheren Flexibilität des Polymergerüsts im linear-elastischen Bereich und dies lässt sich vermutlich durch einen Abschirmeffekt der positiven Ladung erklären. Im Bereich des Vernetzerüberschusses führt die Ladung zur Bildung von elektrostatischen Knotenpunkten mit dem negativ

geladenen Hyaluronsäuregerüst und ruft dadurch eine Straffung des Polymernetzwerks hervor.

Der Vergleich der gemessenen Elastizitätsmodule mit den theoretischen Werten, die man aus Berechnungen mithilfe von Netzwerkmodellen erwartet, hat gezeigt, dass die Gelstruktur nicht mit einer engmaschig quervernetzten Struktur, deren Maschengröße sich näherungsweise aus dem mittleren Abstand der Thiolgruppen ergibt, darstellen lässt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Analyse der Partitionskoeffizienten und der Diffusionskoeffizienten, die gezeigt haben, dass die tatsächliche Polymerstruktur nicht durch eine engmaschig vernetzte Struktur aus willkürlich angeordneten Polymerketten bestehen kann. In beiden Fällen waren die gemessenen Werte der Diffusions- und Partitionskoeffizienten deutlich über den Werten, die man für eine solche Netzwerkstruktur mit Polymerketten vom Radius einer Hyaluronsäurekette erwartet hätte. Von daher lässt sich vermuten, dass das Polymernetzwerk eine mesoskopische Überstruktur mit einer Vielzahl an globulären, intramolekular vernetzten Hyaluronsäureketten und offenen Bereichen aufweist, welche einerseits den Elastizitätsmodul deutlich abschwächen und andererseits auch das Resultat der Partitionskoeffizientenanalyse erklären können. Betrachtet man die globulären Konfigurationen als Knotenpunkte eines übergeordneten Netzwerks, so lässt sich verstehen, dass die wahrscheinlichste Gelstruktur die Form eines kubischen Gitters mit einer Maschengröße von  $\xi \approx 32,6$  nm besitzt. Dieser Wert für die Maschengröße ist auch in guter Übereinstimmung mit dem Befund, dass Moleküle bis zu einem Durchmesser von  $\approx 20$  nm in das Gel eindiffundieren können.

Das empirisch gefundene Diffusionsmodell von der Form  $D/D_0 = 1 - \alpha - \beta \cdot r_h$  liefert eine sehr gute Beschreibung der Messdaten. Der Faktor  $\alpha$  kann hierbei als ein Maß für die Tortuosität der Diffusionspfade kleiner Moleküle aufgefasst werden und kann durch das Modell von Mackie und Meares erklärt werden.  $\beta$  kann als ein Faktor aufgefasst werden, welcher die zusätzlich durch die Molekülausdehnung verursachte Tortuosität der Diffusionspfade größerer Moleküle beschreibt.

Negativ geladene Dextrane können nicht in das Hyaluronsäuregel mit dem neutralen Vernetzer **5a** eindiffundieren auch wenn deren Radius kleiner als die Maschen-

---

grösse des Gels ist. Dies zeigt, dass das Gel, ähnlich wie die Extrazelluläre Matrix [73], ladungsabhängige Filtereigenschaften besitzt, die es ermöglichen, gewisse Moleküle wie etwa Schadstoffe oder Wachstumsfaktoren zu filtern. Damit lässt sich vermuten, dass die Gele auch Moleküle in Abhängigkeit ihrer Ladung speichern können und sich damit für *Drug Delivery*-Anwendungen eignen.

# Transport- und Strukturuntersuchungen in PEG-DA-Hydrogelen

Die Erforschung der Diffusionsprozesse von Makromolekülen in Polymernetzwerken ist ein Forschungsgebiet mit einer Vielzahl ungelöster Probleme, welche auf die Komplexität der Diffusionsprozesse in diesen Systemen zurückzuführen sind. PEG-DA-Hydrogele sind vielseitig eingesetzte vollsynthetische Hydrogele, die sich mit genau definierten Eigenschaften herstellen lassen und wurden in dieser Arbeit als Testsystem zur Erforschung der Transporteigenschaften sphärischer Makromoleküle in einem künstlichen Modellsystem verwendet.

Im ersten Teil werden Partitionskoeffizientenanalysen an den PEG-DA Hydrogelen präsentiert. Basierend auf dieser Analyse wird ein Strukturmodell des Hydrogels entwickelt und die Hydrogelstruktur wird mit der Berechnung von Maschengrößen, die auf unterschiedlichen Wegen ermittelt wurden, analysiert. Im zweiten Teil werden Diffusionskoeffizientenmessungen in den PEG-DA Hydrogelen mit dem Modell von Ogston und mit einem empirisch gefundenen linearen Diffusionsmodell analysiert. Weiter werden Diffusionsmessungen bei unterschiedlichen Temperaturen vorgestellt und analysiert und die Ergebnisse zur Analyse grundlegender Hydrogeleigenschaften verwendet.

## 7.1 Partitionskoeffizientenanalyse

PEG-DA-(20k)-Hydrogele wurden bei drei unterschiedlichen Schwellraten hergestellt. Dazu wurden Polymerisierungslösungen mit 10, 20 und 30 % (v/v) PEG-DA

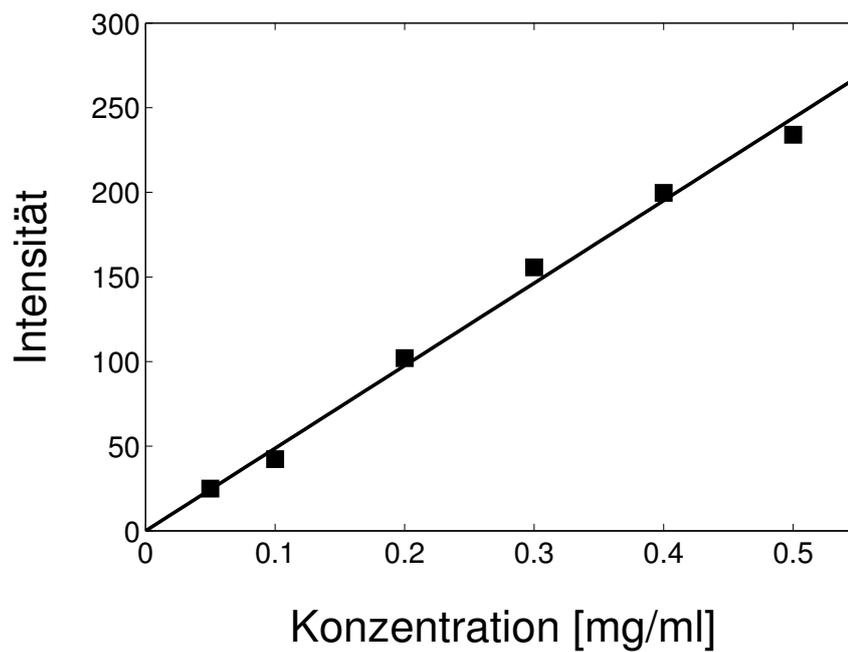


Abbildung 7.1: Die Intensität von FITC-Dextranen mit Radius  $r_h = 2,2$  nm nach 24 h Inkubation in Abhängigkeit der Konzentration der Inkubationslösung zeigt einen linearen Anstieg mit zunehmender Konzentration. Dies zeigt, dass trotz der Wechselwirkung der FITC-Dextrane mit dem PEG-DA-Polymergerüst keine Porenverschlüsse auftreten, welche zu Fluktuationen in den gemessenen Partitionskoeffizienten führen würden. Fehler nicht darstellbar.

in PBS hergestellt und durch Photopolymerisation zu Hydrogelen vernetzt. Aus je drei Einzelproben wurden die Gleichgewichts-Schwellraten (SR) und die Schermodule  $G$  der Gele bei  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen. Tabelle 7.1 zeigt die ermittelten Messdaten zusammen mit dem Polymervolumenanteil  $\phi$  in den geschwollenen Gelen, der aus der Schwellrate mit  $\phi = 1/SR$  berechnet wurde. Die Schwellraten der Hydrogele variieren zwischen 13,2 und 32,7, dies entspricht einem Polymervolumenanteil zwischen 0,03 und 0,08. Die Schermodule betragen zwischen 2,8 und 13,7 kPa.

Tabelle 7.1: **Wichtige Größen der PEG-DA-Hydrogele.** PEG-DA Konzentrationen in der Polymerisierungslösung, Schwellraten (SR), Polymervolumenanteile  $\phi$  in den geschwollenen Gelen und die Schermodule  $G$  der PEG-DA-(20k)-Hydrogele

% PEG-DA (v/v)	SR	$\phi$	$G$ [kPa]
10	$32,7 \pm 0,7$	0,03	$2,8 \pm 0,7$
20	$19,1 \pm 0,4$	0,05	$7,7 \pm 2,3$
30	$13,2 \pm 0,3$	0,08	$13,7 \pm 1,3$

Zur Bestimmung der Netzwerkstruktur der PEG-DA-Hydrogele wurden Partitionskoeffizientenanalysen (siehe Abschnitt 2.3.1) mit sphärischen Testmolekülen durchgeführt. Dazu wurden neutrale, monodisperse FITC-Dextrane mit hydrodynamischen Radien zwischen 0,9 und 12,2 nm bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in PBS aufgelöst und die Hydrogele darin inkubiert.

Zunächst wurde sichergestellt, dass die FITC-Dextrane unabhängig von deren Konzentration mit der gleichen Diffusionsgeschwindigkeit in die Gele eindiffundieren, denn im Gel wird es vorkommen, dass sich die diffundierenden Moleküle ab einer gewissen Konzentration gegenseitig behindern und Diffusionspfade versperren. Weiterhin könnten Wechselwirkungen mit dem Polymernetzwerk stattfinden, die in Abhängigkeit der Konzentration zu Porenverschlüssen führen könnten. Dazu wurden FITC-Dextrane mit einem hydrodynamischen Radius von  $r_h = 2,2$  nm mit Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,5 mg/ml in PBS aufgelöst und PEG-DA-20k-Hydrogele mit einem Polymervolumenanteil  $\phi = 0,03$  wurden für 24 Stunden darin inkubiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal der eindiffundierten FITC-

Dextrane gemessen (siehe Abbildung 7.1). Entsprechend Gleichung A.6 (Anhang A.6) würde man dann bei einer konstanten Diffusionsgeschwindigkeit aller Moleküle erwarten, dass  $c_{gel}/c_o = \text{const.}$ , d.h. dass die Konzentration der Moleküle im Gel  $c_{gel}$  linear mit der Konzentration der Inkubationslösung  $c_o$  ansteigt und dies wird durch die Messung sehr präzise bestätigt.

Für die Partitionskoeffizientenmessungen wurden die Gele für eine Zeitdauer von 5 Tagen mit den Testmolekülen inkubiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass auch die erwarteten Partitionskoeffizienten langsam diffundierender Moleküle annähernd im Gleichgewichtszustand waren (Berechnung siehe Anhang A.6). Abbildung 7.2 zeigt die Partitionskoeffizienten bei den drei unterschiedlichen Schwellraten in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius der FITC-Dextrane. Dabei zeigt sich, dass die Partitionskoeffizienten bei allen drei Polymerkonzentrationen einem exponentiellen Abfall folgen, der sich durch die Form

$$K = A \cdot \exp(-s \cdot (r_h + r_f)). \quad (7.1)$$

darstellen lässt. Dabei ist  $r_h$  der hydrodynamische Radius der Moleküle,  $r_f$  der Polymerfaserradius und  $A$  ein numerischer Faktor. Im Fall von  $A = 1$  beschreibt Gleichung 7.1 den theoretisch erwarteten Verlauf der Partitionskoeffizienten sphärischer, wechselwirkungsfreier Moleküle in einem Netzwerk aus willkürlich angeordneten Ebenen [38]. Der Faktor  $s$  stellt dabei die mittlere Oberfläche der Netzwerkebenen pro Einheitsvolumen dar. Wenn keine Wechselwirkung mit dem Polymernetzwerk stattfindet sind die Partitionskoeffizienten stets kleiner als 1.

Die Ergebnisse der Fitanalysen der Partitionskoeffizienten nach Gleichung 7.1 sind in Tabelle 7.2 dargestellt. Dabei wurde für  $r_f$  der Radius einer PEG-Kette mit einer Monolage aus gebundenen Wassermolekülen eingesetzt ( $r_f = 0,51\text{nm}$ , siehe [69]).  $A$  und  $s$  wurden als Fitparameter verwendet. Für  $s$  wurden Werte zwischen  $0,7$  und  $2,28 \text{ nm}^{-1}$  ermittelt und für  $A$   $2,9$  für das Gel mit dem geringsten Polymervolumenanteil und  $23,1$  für das Gel mit dem höchsten Polymervolumenanteil. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Fitanalysen beträgt nahezu 1 für alle drei Fitanalysen.

Es gibt verschiedene Methoden zur Berechnung der Maschengröße eines Hy-

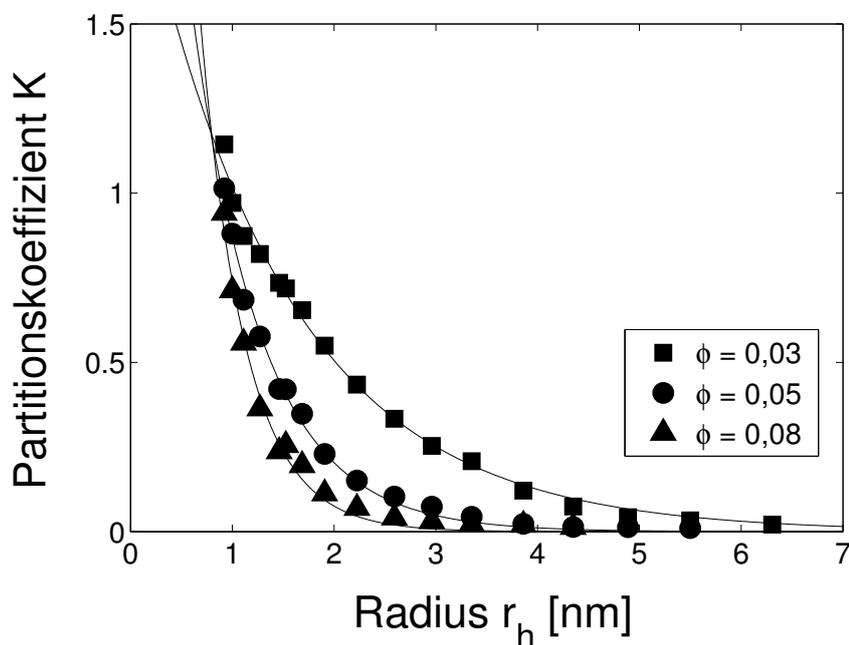


Abbildung 7.2: Partitionskoeffizienten von FITC-Dextranen in PEG-DA-(20k)-Hydrogelen als Funktion des hydrodynamischen Radius  $r_h$  bei drei unterschiedlichen Polymervolumenanteilen  $\phi$ . Unabhängig von  $\phi$  fallen die Partitionskoeffizienten exponentiell mit  $K = A \cdot \exp(-s \cdot (r_h + r_f))$  ab. Aus dieser Analyse lassen sich Informationen über die Struktur des Hydrogels und über Wechselwirkungen der diffundierenden Moleküle mit dem Polymergerüst gewinnen. Messungen in Triplikaten. Fehler nicht darstellbar.

Tabelle 7.2: **Fitting-Parameter der Partitionskoeffizientenanalyse in PEG-DA-(20k)-Hydrogelen bei drei unterschiedlichen Schwellraten anhand der Fitting-Gleichung  $K = A \cdot \exp(-s \cdot (r_h + r_f))$ .**  $\phi$  gibt den Polymervolumenanteil im geschwollenen Hydrogel an. A und s sind Fitparameter: A ist ein Maß für die Wechselwirkung zwischen den Testmolekülen und den Polymerfasern. s ist die mittlere Oberfläche der Polymergerüstebenen pro Einheitsvolumenzelle.  $r_f=0,51$  nm für PEG, siehe [69].

$\phi$	A	s [ $nm^{-1}$ ]	RMSE	$R^2$
0,03	2,9	0,70	0,031	0,993
0,05	7,8	1,45	0,024	0,995
0,08	23,1	2,28	0,031	0,990

drogels, welche auf unterschiedlichen Modellannahmen beruhen. Hier wurden vier unterschiedliche Methoden eingesetzt, um die Maschengrößen der PEG-DA-Hydrogele zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 7.3 dargestellt. Ausgehend von der Partitionskoeffizientenmessungen gibt es zwei Möglichkeiten die Maschengrößen der Hydrogele zu bestimmen. Zunächst kann aus dem Fitparameter  $s$  und der Annahme, dass das Netzwerk aus willkürlich angeordneten Ebenen besteht der mittlere Abstand benachbarter Gitterpunkte durch  $\bar{d} = 3/s$  (siehe Anhang A.5) als Maß für die Maschengröße berechnet werden (Tabelle 7.3, (a)). Dabei betragen die berechneten Maschengrößen zwischen 1,3 und 4,1 nm. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, den Abfall der Partitionskoeffizienten nach  $K \rightarrow 0$  zu bestimmen (Tabelle 7.3, (b)). Dazu wurde der hydrodynamische Radius  $r_{h,0}$  berechnet, für welchen die Partitionskoeffizienten auf  $K = 0,01$  (festgelegtes Limit, siehe dazu auch [38]) abgefallen sind. Die Maschengröße errechnet sich dann mit  $\xi = 2 \cdot (r_{h,0} + r_f)$ . Dabei wird die Maschengröße also durch den Moleküldurchmesser der Moleküle definiert, die nicht mehr ins Gel eindiffundieren können. Mit dieser Berechnung betragen die Maschengrößen zwischen 6,8 und 16,3 nm. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Maschengrößen nach der Theorie der Gummielastizität für geschwollenen Polymernetzwerke unter Verwendung der gemessenen Schermodule  $G$  und der Schwellraten zu bestimmen (Tabelle 7.3, (c): diese Methode ist in [74] beschrieben). Bei dieser Berechnung betragen die Maschengrößen zwischen 1,6 und 4,2 nm. Zuletzt wurden die Maschengrößen durch die Berechnung der Anzahl effektiver Polymerketten im geschwollenen Hydrogel und einer darauf aufgebauten Berechnungsmethode der Maschengröße unter Ausnutzung der gemessenen Schwellrate, der PEG-DA Konzentration in der Polymerisierungslösung und polymerspezifischen Parametern (Tabelle 7.3, (d): die Methode ist in [30] detailliert beschrieben) bestimmt. Mit dieser Methode werden Maschengrößen zwischen 8,9 und 15,4 nm berechnet.

Tabelle 7.3: **Berechnung der Maschengrößen der PEG-DA-Hydrogele.** Zur Berechnung der Maschengrößen der PEG-DA-Hydrogele bei den drei unterschiedlichen Schwellraten wurden drei unterschiedliche Methoden angewandt: a) anhand des Fitparameters  $s$  aus der Partitionskoeffizientenanalyse und dem gefundenen Strukturmodell; b) Abfall der Partitionskoeffizienten auf  $K \approx 0$ ; c) unter Verwendung des gemessenen Schermoduls und der Theorie der Gummielastizität für Hydrogele und d) Berechnung anhand eines Modells der Polymertheorie unter Verwendung der Schwellrate und Polymerparametern.

$\phi$	Maschengrößen [nm] nach Methode			
	a)	b)	c)	d)
0,03	4,1	16,3	4,2	15,4
0,05	2,1	9,2	2,3	11,4
0,08	1,3	6,8	1,6	8,9

## 7.2 Diffusionskoeffizientenanalyse

Mithilfe des FRAP-Mess-Systems wurden die Diffusionskoeffizienten der FITC-Dextrane in den PEG-DA-Hydrogelen bei den drei unterschiedlichen Schwellraten in PBS gemessen. Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Diffusionseigenschaften wurden die Messungen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt,  $T = 25^\circ\text{C}$  und bei  $T = 37^\circ\text{C}$ . Die Temperatur beeinflusst einerseits die thermodynamischen Fluktuationen der Polymerketten, welche die diffundierenden Moleküle in Abhängigkeit der Temperatur unterschiedlich stark behindern können. Andererseits ist die Viskosität von Wasser bei  $T = 25^\circ\text{C}$  um etwa 30 % höher als bei  $T = 37^\circ\text{C}$  und es kann der Einfluss der Viskosität auf die Diffusionseigenschaften untersucht werden. Bei beiden Temperaturen wurden die reduzierten Diffusionskoeffizienten  $D/D_0$  in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius  $r_h$  der diffundierenden Moleküle ermittelt. Dabei ist  $D$  der Diffusionskoeffizient für ein bestimmtes Molekül im Gel und  $D_0$  der Diffusionskoeffizient dieses Moleküls in reinem PBS. Bei  $T = 37^\circ\text{C}$  wurden die Diffusionskoeffizienten  $D_0$  für die eingesetzten Moleküle in reinem PBS durch Messung bestimmt, und bei  $T = 25^\circ\text{C}$  mithilfe der Stokes-Einstein-Relation durch Berechnung des Verhältnisses der Viskosität von Wasser bei beiden Temperaturen und dem Verhältnis der Absoluttemperaturen aus diesen Messwerten berechnet.

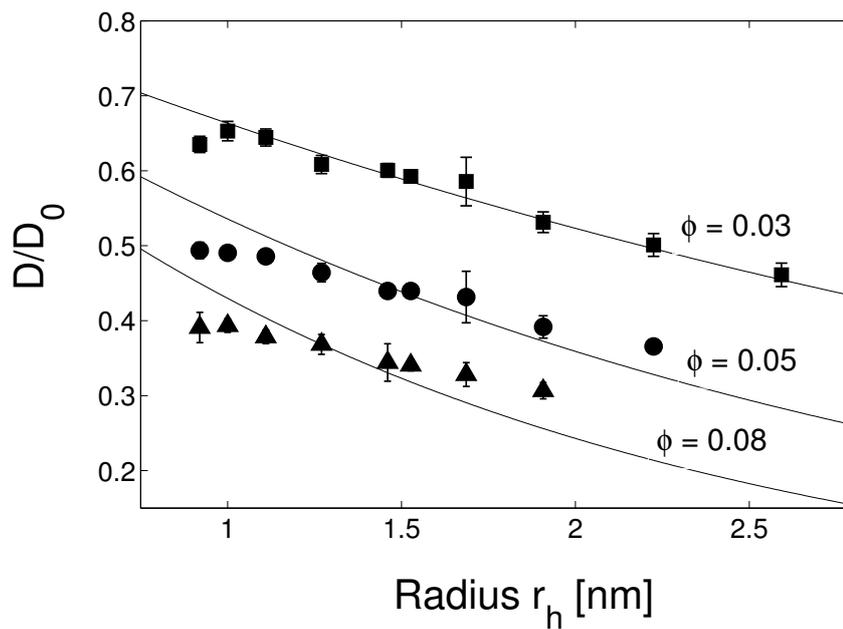


Abbildung 7.3: Analyse der Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen in PEG-DA-(20k)-Hydrogelen mit dem Modell von Ogston [39] basierend auf Gleichung 7.2 mit dem Polymerfaserradius  $r_f$  als Fitparameter. Bei einem Polymervolumenanteil  $\phi = 0,03$  (quadratische Symbole) können die Messdaten sehr gut durch das Modell von Ogston erklärt werden, bei höheren Polymervolumenanteilen nicht mehr (Kreissymbole:  $\phi = 0,05$ ; dreieckige Symbole:  $\phi = 0,08$ ). Messungen in Triplikaten. Fehler stellen Standardabweichung dar.

Abbildung 7.3 zeigt zunächst die reduzierten Diffusionskoeffizienten bei den drei Schwellraten bei  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Um das Verhalten der diffundierenden Moleküle zu untersuchen wurden verschiedene Diffusionsmodelle [39] herangezogen und Fitanalysen mit den aus den Modellen vorhergesagten Diffusionsgleichungen durchgeführt. Eines der grundlegendsten Diffusionsmodelle ist das Modell von Ogston (siehe Abschnitt 6.2, Gleichung 7.2), das die Diffusionskoeffizienten sphärischer Moleküle vom Radius  $r_h$  in einem Netzwerk aus geraden, willkürlich orientierten Fasern vom Querschnittsradius  $r_f$  und dem Polymervolumenanteil  $\phi$  allein aus der mathematischen Analyse von Obstruktionseffekten vorhersagt [42] durch

$$\frac{D}{D_0} = \exp \left[ -\frac{r_h + r_f}{r_f} \phi^{1/2} \right]. \quad (7.2)$$

Abbildung 7.3 zeigt die Fitanalysen nach diesem Modell für alle drei Schwellraten. Für die Fitanalyse wurde der jeweilige Polymervolumenanteil aus der Schwellrate der Gele ermittelt und  $r_f$  als alleiniger Fitparameter verwendet. Dabei wurde  $r_f = 0,73 \text{ nm}$  für  $\phi = 0,03$ ,  $r_f = 0,56 \text{ nm}$  für  $\phi = 0,05$  und  $r_f = 0,48 \text{ nm}$  für  $\phi = 0,08$  ermittelt. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit dem Radius einer PEG-Kette mit einer Monolage aus gebundenen Wassermolekülen ( $r_f = 0,51 \text{ nm}$  [69]). Eine Monolage aus fest gebundenen Wassermolekülen ist sehr wahrscheinlich, da PEG-Ketten sehr starke Wasserstoffbrücken ausbilden [75]. Eine genaue Betrachtung der Fitkurven weist jedoch auch auf eine besondere Charakteristik hin. Während die Fitkurve bei  $\phi = 0,03$  in sehr guter Übereinstimmung mit den Messdaten ist, zeigen die Fitkurven bei  $\phi = 0,05$  und bei  $\phi = 0,08$  deutliche Abweichungen von den Messdaten und schneiden den Verlauf der gemessenen Diffusionskoeffizienten. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass im Modell von Ogston der reduzierte Diffusionskoeffizient bei  $r_h = 0$  festgelegt ist durch  $\frac{D}{D_0}|_{r_h=0} = \exp[-\phi^{1/2}]$ . Eine Übereinstimmung der Messdaten bei  $\phi = 0,05$  und bei  $\phi = 0,08$  mit dem Modell von Ogston könnte also nur durch einen höheren Polymervolumenanteil erreicht werden.

Es wurden weitere in der Literatur gefundene Diffusionsmodelle [39] wie etwa das hydrodynamischen Modell von Cukier [40] oder das hydrodynamische Modell von

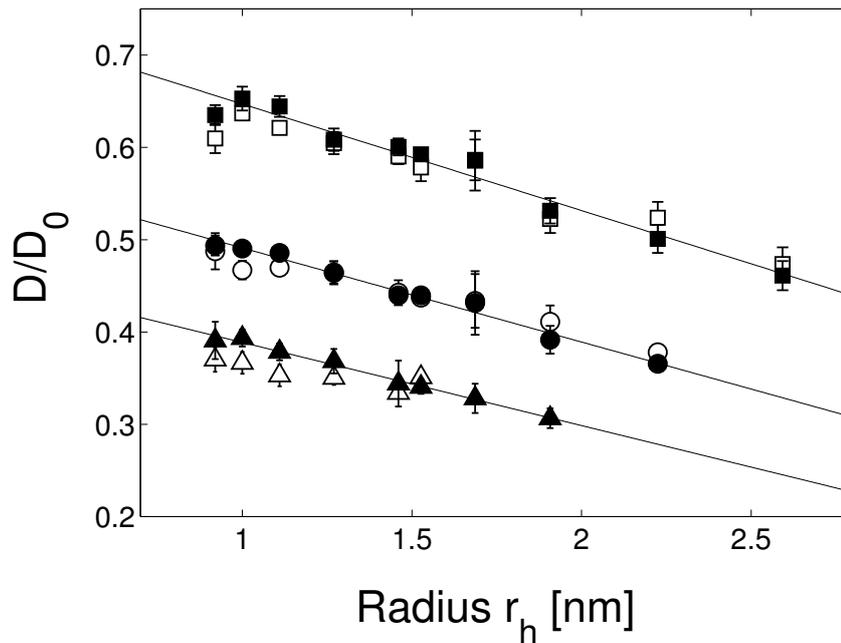


Abbildung 7.4: Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen in PEG-DA-(20k)-Hydrogelen bei drei unterschiedlichen Schwellraten ( $\phi = 0,03$ : quadratische Symbole;  $\phi = 0,05$ : runde Symbole;  $\phi = 0,08$ : dreieckige Symbole) und bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (geschlossene Symbole:  $T = 25^\circ\text{C}$ ; offene Symbole:  $T = 37^\circ\text{C}$ ). Unabhängig von der Molekülgröße und der Schwellrate sind die reduzierten Diffusionskoeffizienten bei den zwei gewählten Temperatureinstellungen nicht nachweisbar verschieden. Die Diffusionsdaten lassen sich durch ein lineares Modell beschreiben. Der Graph zeigt die Fitgeraden für  $T = 25^\circ\text{C}$ . Bei  $T = 37^\circ\text{C}$  konnten die Messungen bei  $r_h = 1,7\text{ nm}$  und  $r_h = 1,9\text{ nm}$  wegen eines zu geringen Signal-Rausch-Verhältnisses nicht zuverlässig ausgewertet werden und wurden aus der Messung ausgeschlossen. Je drei Einzelmessungen pro Datenpunkt. Fehler stellen Standardabweichung dar.

Freed und Edwards [39] auf die Messdaten angewandt, doch auch diese können keine Erklärung der Messdaten liefern, da in diesen Modellen höhere Diffusionskoeffizienten erwartet werden. Andere Diffusionsmodelle, wie etwa Modelle, die auf der Theorie des freien Volumens basieren, waren entweder für eine Fitanalyse nicht geeignet oder besitzen nicht genau bestimmbare oder unbekannte Parameter [39] und wurden von daher nicht verwendet. Dazu wurden die Messdaten zunächst mit einem linearen Modell von der Form  $D/D_0 = a - b \cdot r_h$  gefittet (Abbildung 7.4, geschlossene Symbole) und dabei hat sich gezeigt, dass die Messdaten sehr präzise einem linearen Abfall gehorchen. Aus einer weitergehenden Analyse der Fitparameter  $a$  und  $b$  wurde der empirisch gefundene Zusammenhang

$$\frac{D}{D_0} = 1 - \alpha \cdot \phi - \beta \cdot r_h \quad (7.3)$$

abgeleitet, der die Relation zwischen den reduzierten Diffusionskoeffizienten, dem Polymervolumenanteil  $\phi$  und dem hydrodynamischen Radius  $r_h$  der diffundierenden Moleküle in der Form einer Master-Gleichung herstellt. Die Fitparameter  $\alpha$  und  $\beta$  sind für alle drei Schwellraten in Tabelle 7.4 dargestellt (2. und 3. Spalte). Die Werte von  $\alpha$  liegen alle im Bereich zwischen 6,9 und 7,8 und zeigen damit nur sehr geringe Absolutabweichungen, die Werte von  $\beta$  manifestieren sich zwischen 0,09 und 0,12 nm<sup>-1</sup> und zeigen damit ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung miteinander. Die angegebenen Fehler repräsentieren das Konfidenzintervall (95 %) der Fitanalyse und fallen teilweise sehr gering aus, wenn die Messdaten sehr präzise dem linearen Modell gehorchen.

Tabelle 7.4: **Fitanalyse der Diffusionsdaten in den PEG-DA-(20k)-Hydrogelen.** Fitparameter aus der Fitanalyse mit Gleichung 7.3. Fehler repräsentieren das Konfidenzintervall (95 %) der Fitanalyse.

$\phi$	$\alpha_{T=25^\circ C}$	$\beta_{T=25^\circ C} [\text{nm}^{-1}]$	$\alpha_{T=37^\circ C}$	$\beta_{T=37^\circ C} [\text{nm}^{-1}]$
0,03	7,8±0,9	0,12±0,02	9,2±1,2	0,09±0,02
0,05	7,8±0,3	0,10±0,01	8,5±0,4	0,08±0,01
0,08	6,9±0,2	0,09±0,01	7,9±0,7	0,04±0,04

Weiter zeigt Abbildung 7.4 die Vergleichswerte der reduzierten Diffusionsko-

effizienten  $D/D_0$  bei  $T = 37\text{ °C}$  (offene Symbole). Beim Vergleich der Messwerte bei beiden Temperaturen lässt sich feststellen, dass diese innerhalb der Messfehler für alle drei Polymerkonzentrationen übereinstimmen. Für die Messdaten bei  $T = 37\text{ °C}$  wurden ebenfalls Fitanalysen anhand von Gleichung 7.3 durchgeführt. Die ermittelten Werte für  $\alpha$  und  $\beta$  sind ebenfalls in Tabelle 7.4 (4. und 5. Spalte) dargestellt. Es zeigt sich, dass die Werte von  $\alpha$  im Bereich zwischen 7,9 und 9,2 liegen und innerhalb der Fitfehler miteinander übereinstimmen. Die Werte von  $\beta$  liegen im Bereich zwischen 0,09 und 0,04  $\text{nm}^{-1}$  und stimmen innerhalb der Fitfehler auch miteinander überein.

Der Vergleich der Fitwerte von  $\alpha$  und  $\beta$  bei beiden Temperaturen zeigt, dass sich diese innerhalb der Fitfehler nicht signifikant voneinander unterscheiden.

### 7.3 Diskussion

Die Fitanalysen der Partitionskoeffizienten der FITC-Dextrane in den PEG-DA-Hydrogelen haben gezeigt, dass sich diese sehr präzise durch einen exponentiellen Abfall von der Form  $K = A \cdot \exp(-s \cdot (r_h + r_f))$  mit  $A > 1$  darstellen lassen. Hieraus können zwei Charakteristika abgeleitet werden: i) der exponentiellen Abfall wird durch eine Hydrogelstruktur erzeugt, die durch ein Modell aus willkürlich angeordneten Ebenen beschrieben werden kann [38]. ii) die Fitwerte des Vorfaktors  $A$  zeigen, dass es Wechselwirkungen zwischen den Dextranmolekülen und den PEG-DA-Polymerketten gibt. Wenn dies nicht so wäre, dann müsste  $A \approx 1$  sein, denn wenn kleine Moleküle mit  $r_h \rightarrow 0$  rein sterischen Effekten unterliegen würden, dann müsste gelten, dass  $K \rightarrow 1$  für  $r_h \rightarrow 0$  und dies ist nur möglich wenn  $A \approx 1$ . Für die Wechselwirkungen könnten mehrere Ursachen verantwortlich gemacht werden: zwischen den Hydroxygruppen der Dextrane und den Sauerstoffatomen im PEG-DA-Polymergerüst könnten sich temporäre Wasserstoffbrücken bilden. Weiter ist es aber auch möglich, dass van-der-Waals Wechselwirkungen oder hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Sieht man in erster Näherung davon ab, dass der geometrische Faktor der Moleküle in den Wechselwirkungsterm mit-

Tabelle 7.5: Berechnung des Verhältnisses  $K(r_h = 0)/\phi$ 

$\phi$	$K(r_h = 0)$	$K(r_h = 0)/\phi$
0,03	2,03	67,7
0,05	3,72	71,5
0,08	7,22	95,6

eingeht, so kann das Verhältnis aus dem y-Achsendurchgang  $K(r_h = 0)$  und dem Polymervolumenanteil  $\phi$  als ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung betrachtet werden. Tabelle 7.5 zeigt die berechneten Werte. Für  $\phi = 0,03$  und für  $\phi = 0,05$  ist das Verhältnis etwa gleich, für  $\phi = 0,08$  etwas höher. Daraus kann geschlossen werden, dass  $K \sim \phi$  für kleine Polymervolumenanteile. Der etwas grössere Wert bei  $\phi = 0,08$  könnte damit zusammenhängen, dass in dem dichteren Polymernetzwerk gleichzeitig Wechselwirkungen mit dem Polymergerüst an mehreren Stellen der Moleküloberfläche möglich sind.

Basierend auf den Partitionskoeffizientenmessungen wurden zwei Methoden angewandt, um die Maschengrößen der Hydrogele zu bestimmen. Bei der ersten Methode wurde die Maschengröße durch die Berechnung des mittleren Abstands benachbarter Gitterpunkte im Strukturmodell des Hydrogels berechnet. Bei der zweiten Methode wurde die Maschengröße aus dem Moleküldurchmesser der Moleküle berechnet, die nicht mehr ins Gel eindiffundieren können. Dabei hat sich gezeigt, dass die erste Methode deutlich kleinere Maschengrößen liefert als die zweite, d.h. die Gitterabstände deutlich kleiner sind, als der Moleküldurchmesser von Molekülen, die sich im Gel noch frei bewegen können. Dafür können zwei Ursachen in Betracht gezogen werden: i) PEG-Polymerketten sind sehr flexibel (Persistenzlänge  $l_p \approx 3,8 \text{ \AA}$  [76]) und erlauben dadurch die Diffusion von Molekülen, die größer sind als die Maschengröße. ii) eine Netzwerkstruktur aus flexiblen Polymerketten mit kurzer Persistenzlänge besitzt eine sehr breite Maschengrößenverteilung [77]. In solch einer Struktur können Diffusionspfade auch durch Maschen verlaufen, die größer als die mittlere Maschengröße sind.

Die Methode, die Maschengrößen nach der Theorie der Gummielastizität für Hydrogele (Methode c) zu berechnen, liefert Maschengrößen, die mit den aus der Partitionskoeffizientenanalyse ermittelten mittleren Abständen der Gitterpunkte

sehr gut übereinstimmen. Die Methode, die Maschengrößen anhand der gemessenen Schwellraten und mithilfe der Polymertheorie (Methode d) zu berechnen, liefert Maschengrößen, die mit dem Moleküldurchmesser der größten im Gel frei beweglichen Molekülen sehr gut übereinstimmen.

Es gibt verschiedene theoretische Ansätze und daraus abgeleitete Diffusionsmodelle zur Beschreibung von Diffusionsdaten in Polymernetzwerken [39]. Ein Verständnis der Diffusionseigenschaften und die Entwicklung eines Diffusionsmodells in PEG-DA-Hydrogelen bei unterschiedlichen Polymervolumenanteilen ist insbesondere deswegen von großer Bedeutung, da diese mit unterschiedlichen Elastizitätsmodulen und Polymervolumenanteilen als künstliche Biomaterialien eingesetzt werden [48]. Hier wurde das Modell von Ogston auf die Diffusionsdaten angewendet und es hat sich gezeigt, dass das Modell eine sehr gute Übereinstimmung mit den Messdaten bei  $\phi = 0,03$  liefert, bei höheren PEG-DA-Volumenanteilen aber nicht mehr. Die Abweichungen bei höheren Polymervolumenanteilen könnten dadurch erklärbar sein, dass der tatsächliche Polymervolumenanteil deutlich höher ist als derjenige, der aus der Schwellrate bestimmt wurde. Dies könnte dadurch möglich sein, dass die Polymerketten eine oder mehrere fest gebundene Hydrat-schichten besitzen, die dadurch zu einem höheren effektiven Volumen des Polymernetzwerks führen. Viel wahrscheinlicher ist es aber, dass sich die Abweichungen durch die aus der Partitionskoeffizientenanalyse gefundenen attraktiven Wechselwirkungen mit dem Polymergerüst erklären lassen, die zu einer Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeit führen. Bei  $\phi = 0,03$  sind diese Wechselwirkungen durch den geringen Polymergehalt noch gering und die Diffusionsdaten können aus einer rein geometrischen Betrachtung abgeleitet werden (Ogston Modell), bei höherem Polymergehalt steigt die Wechselwirkungsrate während des Diffusionsprozesses aber stark an und die Diffusionsgeschwindigkeiten lassen sich nicht mehr allein aus Obstruktionseffekten erklären.

Das Modell von Ogston liefert eine sehr gute Beschreibung der Diffusionskoeffizienten bei  $\phi = 0,03$ . Dies ist in Übereinstimmung mit einer Vielzahl an weiteren Diffusionsanalysen [39], die gezeigt haben, dass das Modell von Ogston eine gute Vorhersagekraft für Diffusionskoeffizienten bei kleinen Polymervolumenanteilen besitzt.

In den Experimenten an den PEG-DA-Gelen konnte gezeigt werden, dass die Abweichungen bei größeren Polymervolumenanteilen höchstwahrscheinlich auf Wechselwirkungseffekte zurückgehen, die im Modell von Ogston nicht berücksichtigt werden. Eine weitere Schwäche des Modells von Ogston zeigt sich bei den vorhergesagten Diffusionskoeffizienten von Molekülen, deren Größe die mittlere Maschengröße übertrifft: Die Partitionskoeffizienten fallen bei  $\phi = 0,03$  etwa bei einem Radius  $r_h \approx 7$  nm auf Null ab, d.h. Moleküle mit diesem oder größeren hydrodynamischen Radien können im Gel nicht mehr diffundieren und deren Diffusionskoeffizient verschwindet. Berechnet man aber  $D/D_0$  bei  $r_h = 7$  nm aus der gefitteten Kurve, die bei  $\phi = 0,03$  aus dem Ogston-Modell erhalten wurde, so ergibt sich  $D/D_0|_{r_h=7nm} = 0,16$ , im Widerspruch zur Messung. Die Ursache dafür ist eine grundlegende Schwäche dieses Modells. Es sagt nämlich für alle Moleküle, deren Größe innerhalb der Maschengrößenverteilung des Polymernetzwerks liegt, nicht verschwindende Diffusionskoeffizienten voraus (siehe Abschnitt 2.3.2), berücksichtigt aber nicht die Konnektivität der Netzwerkporen. Diffusion ist aber erst möglich, wenn diese auch miteinander verbunden sind und einen Diffusionspfad für das Molekül dieser Größe herstellen. Von daher wäre es notwendig, das Modell von Ogston mithilfe einer Perkolationsstheorie zu erweitern.

Aufgrund der gefundenen Wechselwirkungen zwischen den diffundierenden Molekülen und dem Polymernetzwerk wurde eine empirische Analyse der Messdaten durchgeführt, da Wechselwirkungen in den vorhandenen Diffusionsmodellen nicht berücksichtigt werden [39]. Dabei hat sich gezeigt, dass die Diffusionskoeffizienten bei beiden Messtemperaturen und allen drei Schwellraten sehr gut durch eine Mastergleichung von der Form  $D/D_0 = 1 - \alpha \cdot \phi - \beta \cdot r_h$  beschrieben werden können. Dabei beschreibt der Term  $\alpha \cdot \phi$  die Reduktion der Diffusionsgeschwindigkeiten durch Wechselwirkung mit dem Polymernetzwerk und  $\alpha$  kann als ein Maß für die Wechselwirkung aufgefasst werden. Der Term  $\beta \cdot r_h$  beschreibt die radiusabhängige Reduktion der Diffusionsgeschwindigkeiten. Dies könnte einerseits auf eine stärkere Behinderung der Beweglichkeit durch eine zunehmende Tortuosität (Gewundenheit) der Diffusionspfade verursacht werden, andererseits aber auch durch eine erhöhte Wechselwirkungsrate, da die größeren Moleküle aufgrund ihrer größeren

Oberfläche häufiger mit Polymerketten in Kontakt treten.

Benutzt man die empirischen Fitgerade bei  $\phi = 0,03$  und berechnet den Nulldurchgang aus der Fortsetzung der Geraden, so findet man, dass dieser bei  $r_h = 6,6$  nm liegt, in sehr guter Übereinstimmung mit dem Verschwinden der Partitionskoeffizienten bei  $r_h \approx 7$  nm. Von daher kann vermutet werden, dass die Diffusionskoeffizienten bei höheren Radien etwa dem linearen Verlauf bis zum Nulldurchgang folgen werden. Aufgrund der geringen Konzentration der FITC-Dextrane in diesem Bereich konnten die Diffusionskoeffizienten hier aufgrund des zu geringen Signal-Rausch-Verhältnisses aber leider nicht gemessen werden und es müsste eine andere Methode wie etwa *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie* angewendet werden.

Das Diffusionsverhalten von Molekülen in Polymernetzwerken ist in vielen Punkten noch nicht verstanden worden [39]. In verschiedenen Ansätzen wurde bereits diskutiert, ob das Polymernetzwerk zu einer veränderten Strukturbildung der Wassermoleküle oder einer geänderten Viskosität des Wassers in den nanometergroßen Maschen des Netzwerks führt [78, 79]. Diese Frage konnte bisher jedoch nicht hinreichend geklärt werden. Dass die Viskosität von Wasser im Gel anders sein könnte als in reinem Wasser, könnte vermutet werden, denn Viskositätsmessungen an nanometerdicken Wasserfilmen zwischen hydrophilen Oberflächen haben gezeigt, dass es hier zu einer starken Veränderung der Viskosität kommt [80]. Außerdem ist unklar, ob die thermischen Fluktuationen der Polymerketten das Diffusionsverhalten beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden die Messungen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen gemacht, bei  $T = 25$  °C und bei  $T = 37$  °C. Da die reduzierten Diffusionskoeffizienten innerhalb ihrer Fehler miteinander übereinstimmen und die Abweichungen nur sehr gering sind, kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlich starken Fluktuationen der Polymerketten keinen starken Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeiten ausüben und das Polymergerüst für die diffundierenden Moleküle ein eher starres Gebilde darstellt. Weiter kann vermutet werden, dass sich die Viskosität von Wasser in den PEG-DA-Gelen nicht wesentlich von derjenigen reinen Wassers unterscheidet, denn die Viskosität von Wasser erfährt bei dieser Temperaturänderung eine Änderung von fast 30 % und durch die Übereinstimmung der Messdaten innerhalb ihrer Fehler konnte gezeigt werden,

---

dass die reduzierten Diffusionskoeffizienten bei beiden Temperaturen unabhängig von der Viskosität sind. Von daher kann vermutet werden, dass sich die Messdaten allein aus Wechselwirkungen und Obstruktionseffekten erklären lassen.

## Teil IV

# Zusammenfassung und Ausblick

## Zusammenfassung

Durch die Erforschung von Struktur-Funktions-Beziehungen in biologischen Materialien ist es nicht nur möglich, die einzigartige Ingenieursleistung der Natur zu ergründen, um damit ein grundlagenorientiertes Verständnis dafür zu entwickeln, in welcher Weise molekulare Strukturen an makroskopische Funktionen gekoppelt sind, sondern es lassen sich auch Konzepte entwickeln, mit welchen neuartige Biomaterialien hergestellt werden können. In der vorliegenden Arbeit habe ich neuartige bio-inspirierte Vernetzer, die durch das Quervernetzermolekül im Elastin, das sogenannte Desmosin, inspiriert sind, mit thiolierten Hyaluronsäuremolekülen (HA) zu dreidimensionalen Hydrogelen vernetzt und charakterisiert [45]. Ein Schwerpunkt wurde dabei darauf gelegt, herauszufinden, welchen Einfluss eine positive Ladung auf dem Vernetzermolekül, wie sie auch das Desmosinmolekül besitzt, auf die Geleigenschaften hat. Dazu wurden die Geleigenschaften von Hydrogelen mit geladenen und neutralen Vernetzern bei unterschiedlichen Vernetzeräquivalenten direkt miteinander verglichen. Dabei wurde herausgefunden, dass eine positive Ladung auf dem Vernetzermolekül einen signifikanten Einfluss auf die elastischen Eigenschaften sowie auch auf die Schwellraten der Hydrogele ausübt. Im Bereich unterhalb einer Übersättigung der HA-Bindungsstellen mit Vernetzermolekülen schirmt die positive Ladung am Vernetzer die negativen Ladungen der Hyaluronsäure ab und führt zu einer höheren Flexibilität des Polymergerüsts. Bei einer Übersättigung mit Vernetzermolekülen kommt es zu elektrostatischen Knotenpunkten, die das Polymergerüst straffen und dazu führen, dass deutlich geringere Schwellraten beobachtet werden als bei Gelen mit neutralen Vernetzern. Bei starker Deformation der Hydrogele

---

kommt es zu einer spannungsinduzierten Materialversteifung, welche die typische mechanische Charakteristik von Biopolymernetzwerken aufweist. Der Vergleich der gemessenen Elastizitätsmodule mit theoretischen Netzwerkmodellen hat ergeben, dass das Polymernetzwerk höchstwahrscheinlich eine Vielzahl intramolekular vernetzter Hyaluronsäurekonfigurationen aufweist und damit eine mesoskopische Überstruktur besitzt.

Durch die Analyse von Permeabilitätsmessungen unter Verwendung monodisperser, größendefinierter, sphärischer Testmoleküle (FITC-Dextrane) konnte herausgefunden werden, dass die Gele eine Maschengröße besitzen, die deutlich größer ist als diejenige, die man für eine homogene, engmaschig vernetzte Netzwerkstruktur erwarten würde. Dies konnte als weiteres Indiz für eine übergeordnete Netzwerkstruktur gewertet werden. Zur Messung von Diffusionskoeffizienten in den Hydrogelen wurde ein FRAP-Mess-System mit einer Auswertmethode, die auf der Fourieranalyse der FRAP-Sequenz basiert, etabliert und getestet. Die Diffusionskoeffizienten sphärischer Testmoleküle (FITC-Dextrane) in den Gelen mit dem neutralen Vernetzer wurde mit Diffusionsmodellen analysiert und bewertet. Weitere Messungen mit negativ geladenen Dextranen haben gezeigt, dass diese nicht in das Gel eindiffundieren können und das Polymernetzwerk ladungsabhängige Filtereigenschaften besitzt. Aus diesen Messungen und Analysen kann das Diffusionsverhalten anderer Moleküle, wie etwa Wachstumsfaktoren oder Nährstoffe, vorhergesagt werden. Insgesamt zeigt die Charakterisierung der Gele, dass diese ein Spektrum an Eigenschaften besitzen, durch welche sie ein großes Potential zur Weiterentwicklung als neuartigem Biomaterial besitzen.

In einer Reihe weiterer Experimente wurden Diffusions- und Permeabilitätsstudien an einem System aus Polyethylenglykol-Diacrylat-Hydrogelen (PEG-DA-Hydrogele) durchgeführt und mithilfe von Modellanalysen bewertet. Dabei hat sich gezeigt, dass die diffundierenden Moleküle (FITC-Dextrane) mit dem PEG-DA-Polymernetzwerk wechselwirken. Aus diesem Grund besitzen bisher vorhandene Diffusionsmodelle nur eine sehr eingeschränkte Anwendbarkeit, denn Wechselwirkungen werden hier nicht berücksichtigt und dies hat sich bei der Analyse mit dem Diffusionsmodell von Ogston, das nur sterische Effekte

berücksichtigt, bei höheren Polymeranteilen deutlich gezeigt. Stattdessen wurde ein lineares empirisches Modell mit einem Wechselwirkungsterm entwickelt, das die Diffusionskoeffizienten bei unterschiedlichen Schwellraten und auch bei unterschiedlichen Temperaturen sehr präzise beschreibt. Es konnte herausgefunden werden, dass die Diffusionskoeffizienten im Polymernetzwerk nur unwesentlich durch thermische Fluktuationen der Polymerketten beeinflusst werden und dass die Reduktion der Diffusionskoeffizienten im Hydrogel im Vergleich zu reinem Wasser nicht durch eine durch das Polymergerüst induzierte Änderung der Viskosität in den nanometer-großen Poren des Polymernetzwerks entsteht, sondern sich allein aus Wechselwirkungen und Obstruktionseffekten erklären lässt.

## Ausblick

In den PEG-DA-Hydrogelen könnten weitere Diffusionsmessungen mit den vorhandenen FITC-Dextranen bei einer weiteren Temperatur (neben 25°C und 37°C bsp. bei 50°C) durchgeführt werden, um die gefundenen Zusammenhänge abzusichern. Weiter könnten die Diffusionskoeffizienten bei größeren hydrodynamischen Radien, die mit der FRAP-Technik aufgrund des zu geringen Signal-Rausch-Verhältnisses nicht gemessen werden konnten, mit Einzelmolekülspektroskopie (*Fluoreszenz – Korrelations – Spektroskopie*) gemessen werden, um ein genaues Verständnis des abfallenden Verlaufs der Diffusionskoeffizienten mit zunehmenden Radien bis zum Abfall auf Null (Barrierestelle) zu entwickeln.

An den HA-Gelen könnten in einem weiteren Schritt die Thiolgruppen der Hyaluronsäure vor der Gelherstellung partiell mit zelladhäsiven Protein- oder Peptidsequenzen, wie beispielsweise dem RGD-Motiv [81], funktionalisiert werden, so dass eine Zelladhäsion möglich ist. Es könnte dann untersucht werden, ob Zellen nach der Adhäsion an der Geloberfläche in der Lage sind, in die Gelmatrix einzudringen, indem sie mithilfe des Enzyms Hyaluronidase Kettenspaltungen am Polymergerüst erzeugen. Weiter könnte untersucht werden, in welcher Weise Zellen, die in das Gelnetzwerk eingebettet sind, das Hydrogel durch eigene Proteine neu strukturieren. Interessant wäre es auch zu sehen, in welcher Weise eingebettete Zellen reagieren, wenn von außen kleine Mengen von Hyaluronidase dazugegeben werden, wodurch das Gelnetzwerk um die Zellen herum langsam degradiert wird und eine Veränderung des Elastizitätsmoduls bewirkt wird.

Die extrazelluläre Matrix (EZM) besitzt vermutlich Filtereigenschaften, die nicht nur durch die Maschengröße bestimmt werden, sondern auch durch die Ladung

der diffundierenden Moleküle [73]. Dazu wurde ein Modell entwickelt, nach welchem die EZM aus positiv und negativ geladenen Struktureinheiten bestehen könnte und damit die Diffusionseigenschaften in Abhängigkeit der Ladung der diffundierenden Moleküle steuern könnte [73]. Hier könnten Hydrogele mit dem positiv geladenen Vernetzer als ein einfaches Modellsystem betrachtet werden, das eine solche Ladungsstruktur simuliert und es könnten an diesen Gelen die Diffusionseigenschaften verschiedener fluoreszenzmarkierter Biomoleküle erforscht werden. Weiter könnte die Filterfunktion der Hyaluronsäuregele noch genauer untersucht werden, um ein besseres Verständnis der Barrierefunktion gegenüber den negativen Dextranen zu entwickeln. Dazu könnten Gele mit unterschiedlichen Mischverhältnissen aus positiv geladenem und neutralem Vernetzer hergestellt werden und das Diffusionsverhalten der negativen Dextrane untersucht werden. Weiter könnten auch analoge Untersuchungen mit positiv geladenen Dextranen angeschlossen werden.

# Abbildungsverzeichnis

3.1	Desmosin mit Elastin-Rückgrat . . . . .	19
4.1	Reaktionsschema zur Quervernetzung der Hyaluronsäure . . . . .	24
5.1	Fraktionierung der FITC-Dextrane . . . . .	32
5.2	Histogramm zur Bestimmung des Polydispersitätsindex nach der Fraktionierung . . . . .	33
5.3	Abhängigkeit der Intensität von der Probendicke . . . . .	35
5.4	Graphische Darstellung der Fourieramplituden . . . . .	39
5.5	Vortests zur Kalibrierung des FRAP-Mess-Systems . . . . .	42
5.6	Validierung des FRAP-Mess-Systems anhand der Stokes-Einstein- Relation . . . . .	43
5.7	Auftragung der mit dem FRAP-Mess-System experimentell ermit- telten Diffusionskoeffizienten gegen die theoretisch errechneten Werte.	44
6.1	Synthese der Desmosin-inspirierten Quervernetzer mit Reaktions- ausbeuten (in Anlehnung an [45]). Die bioinspirierten Quervernet- zer, die analog zum Desmosin aus einem relativ kleinen, starren Liganden mit heteroaromatischem Ringsystem bestehen, sind Kern- baustein unserer elastischen Hydrogele (Synthese der Quervernetzer am Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart). . . . .	48
6.2	Gelierungsgraphen der unterschiedlichen Quervernetzer . . . . .	52

---

6.3	Ellman's Reagenz zur Bestimmung der freien Thiole . . . . .	53
6.4	Schwellrate der Hyaluronsäure-Hydrogele mit den Verhetzern <b>5a</b> und <b>5b</b> . . . . .	55
6.5	E-Module der Hyaluronsäure-Hydrogele mit den Verhetzern <b>5a</b> und <b>5b</b> . . . . .	56
6.6	Verhalten der beiden Hydrogeltypen unter wiederholten starken Be- lastungstests. . . . .	64
6.7	Verhalten unter starker Kompression . . . . .	67
6.8	Partitionskoeffizientenanalyse mit FITC-Dextranen im Hyalu- ronsäurehydrogel HA-SH- <b>5a</b> . . . . .	70
6.9	Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen im Hyalu- ronsäurehydrogel HA-SH- <b>5a</b> mit Fittinganalyse . . . . .	72
7.1	Intensität von FITC-Dextranen mit Radius $r_h = 2,2$ nm nach 24 h Inkubation in Abhängigkeit der Konzentration der Inkubationslösung	81
7.2	Partitionskoeffizienten von FITC-Dextranen in PEG-DA-Hydrogelen	84
7.3	Analyse der Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen in PEG- DA-Hydrogelen mit Diffusionsmodellen . . . . .	87
7.4	Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen in PEG-DA- Hydrogelen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	89
B.1	Zellviabilitätsmessungen . . . . .	120

# Tabellenverzeichnis

6.1	E-Module nach Berechnung mit Netzwerkmodellen . . . . .	61
6.2	Fitparameter für die kritische Beanspruchung $\lambda_{max,D}$ . a) Hydrogele mit ungeladenem Vernetzer <b>5a</b> ; b) Hydrogele mit geladenem Vernetzer <b>5b</b> . . . . .	66
6.3	Anteil der unbeweglichen Moleküle . . . . .	74
7.1	Wichtige Größen der PEG-DA-Hydrogele . . . . .	82
7.2	Fitting-Parameter der Partitionskoeffizientenanalyse in PEG-DA-(20k)-Hydrogelen bei drei unterschiedlichen Schwellraten anhand der Fitting-Gleichung $K = A \cdot \exp(-s \cdot (r_h + r_f))$ . . . . .	84
7.3	Berechnung der Maschengrößen der PEG-DA-Hydrogele . . . . .	86
7.4	Fitanalyse der Diffusionsdaten in den PEG-DA-(20k)-Hydrogelen . . . . .	90
7.5	Berechnung des Verhältnisses $K(r_h = 0)/\phi$ . . . . .	92

# Literaturverzeichnis

- [1] Humphrey, J. Continuum biomechanics of soft biological tissues. *Proc. R. Soc. Lond. A* **459**, 1–44 (2003).
- [2] Alberts, B. *et al.* Molecular Biology of the Cell. *Garland Science* (2002).
- [3] Brown, R. E., Butler, J. P. & Rogers, R. A. Mechanical connections between elastin and collagen. *Connective Tissue Research* **30**, 295–308 (1994).
- [4] Debelle, L. & Tamburro, A. Elastin: molecular description and function. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **31**, 26–272 (1999).
- [5] Lyerla, J. R. & Torchia, D. A. Molecular mobility and structure of elastin deduced from the solvent and temperature dependence of carbon-13 magnetic resonance relaxation data. *Biochemistry* **14**, 5175–5183 (1975).
- [6] Muiznieks, L., Weiss, A. & Keeley, F. Structural disorder and dynamics of elastin. *Biochem. Cell Biol.* **88**, 239–250 (2010).
- [7] Rauscher, S., Baud, S., Miao, M., Keeley, F. W. & Pomès, R. Proline and Glycine Control Protein Self-Organization into Elastomeric or Amyloid Fibrils. *Structure* **14**, 1667–1676 (2006).
- [8] Bochicchio, B., Pepe, A. & Tamburro, A. M. Investigating by CD the molecular mechanism of elasticity of elastomeric proteins. *Chirality* **20**, 985–994 (2008).

- [9] Urry, D. W. *et al.* Elastin: a representative ideal protein elastomer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **357**, 169–184 (2002).
- [10] Robert, L., Robert, A.-M. & Renard, G. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie* **58**, 187–198 (2010).
- [11] Heinegård, D. Proteoglycans and more—from molecules to biology. *International journal of experimental pathology* **90**, 575–586 (2009).
- [12] Meechai, N., Jamieson, A. M., Blackwell, J., Carrino, D. A. & Bansal, R. Viscoelastic properties of aggrecan aggregate solutions: Dependence on aggrecan concentration and ionic strength. *J. Rheol.* **46**, 685–707 (2002).
- [13] H J Lüke, P. P. Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells. *Biochemical Journal* **343**, 71 (1999).
- [14] Allison, D. Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Engineering* **12**, 2131–2140 (2006).
- [15] Ghosh, K. *et al.* Rheological characterization of in situ cross-linkable hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules* **6**, 2857–2865 (2004).
- [16] Burdick, J. A. & Prestwich, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials* **23**, H41–56 (2011).
- [17] Ouasti, S. *et al.* Network connectivity, mechanical properties and cell adhesion for hyaluronic acid/PEG hydrogels. *Biomaterials* **32**, 6456–6470 (2011).
- [18] Shu, X. Z., Liu, Y., Luo, Y., Roberts, M. C. & Prestwich, G. D. Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules* **3**, 1304–1311 (2002).
- [19] Patterson, J. *et al.* Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials* **31**, 6772–6781 (2010).

- [20] Evanko, S. P., Angello, J. C. & Wight, T. N. Formation of Hyaluronan- and Versican-Rich Pericellular Matrix Is Required for Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **19**, 1004–1013 (1999).
- [21] Vanderhooft, J. L., Alcoutlabi, M., Magda, J. J. & Prestwich, G. D. Rheological Properties of Cross-Linked Hyaluronan-Gelatin Hydrogels for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* **9**, 20–28 (2009).
- [22] Jha, A. K. *et al.* Structural Analysis and Mechanical Characterization of Hyaluronic Acid-Based Doubly Cross-Linked Networks. *Macromolecules* **42**, 537–546 (2009).
- [23] Arai, K. *et al.* Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images. *Biofabrication* **3**, 1–7 (2011).
- [24] Skardal, A., Zhang, J. & Prestwich, G. D. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates. *Biomaterials* **31**, 6173–6181 (2010).
- [25] Skardal, A., Zhang, J., McCoard, L., Oottamasathien, S. & Prestwich, G. D. Dynamically Crosslinked Gold Nanoparticle - Hyaluronan Hydrogels. *Advanced Materials* **22**, 4736–4740 (2010).
- [26] Anseth, K. & Bowman, C. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* **17**, 1647–1657 (1996).
- [27] Gedde, U. W. Polymer physics. *Springer Verlag* (1995).
- [28] Mark, J. E. Physical Properties of Polymers Handbook. *Springer* (2007).
- [29] Oswald, P. Rheophysics. *Cambridge University Press, Cambridge, UK* (2009).
- [30] Cruise, G. M., Scharp, D. S. & Hubbell, J. A. Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *Biomaterials* **19**, 1287–1294 (1998).

- 
- [31] Storm, C., Pastore, J. J., MacKintosh, F. C., Lubensky, T. C. & Janmey, P. A. Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* **435**, 191–194 (2005).
- [32] Flory, P. J. principles of polymer chemistry. *Cornell University Press: Ithaca, NY* (1953).
- [33] Rubinstein, M. & Panyukov, S. Elasticity of Polymer Networks. *Macromolecules* **35**, 6670–6686 (2002).
- [34] James, H. M. & Guth, E. Theory of the Increase in Rigidity of Rubber during Cure. *J. Chem. Phys.* **15**, 669–683 (1947).
- [35] Burak, E. & Mark, J. E. Structures and Properties of Rubberlike Networks. *Oxford University Press* (1997).
- [36] Patel, S. K., Malone, S., Cohen, C., Gillmor, J. R. & Colby, R. H. Elastic modulus and equilibrium swelling of poly(dimethylsiloxane) networks. *Macromolecules* **25**, 5241–5251 (1992).
- [37] Gehrke, S. H., Fisher, J. P., Palasis, M. & Lund, M. E. Factors determining hydrogel permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences* **831**, 179–207 (1997).
- [38] Schnitzer, J. E. Analysis of steric partition behavior of molecules in membranes using statistical physics. Application to gel chromatography and electrophoresis. *Biophysical Journal* **54**, 1065–1076 (1988).
- [39] Masaro, L. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science* **24**, 731–775 (1999).
- [40] Cukier, R. I. Diffusion of Brownian spheres in semidilute polymer solutions. *Macromolecules* **17**, 252–255 (1984).
- [41] Amsden, B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. *Macromolecules* **31**, 8382–8395 (1998).

- [42] Ogston, A., Preston, B. & Wells, J. On the Transport of Compact Particles Through Solutions of Chain-Polymers. *Proc. R. Soc. London A* **333**, 297–316 (1973).
- [43] Rauscher, S. & Pomès, R. Molecular simulations of protein disorder. *Biochemistry and Cell Biology* **88(2)**, 269–290 (2010).
- [44] Wise, S., Mithieux, S. & Weiss, A. Engineered Tropoelastin and Elastin-Based Biomaterials. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **78**, 1–24 (2009).
- [45] Hagel, V. et al. Desmosine-inspired cross-linkers for hyaluronan hydrogels. *Scientific Report (Nature Publishing Group), mit Vorbehalt angenommen (minor revisions)* (2013).
- [46] Prestwich, G. & Kuo, J.-w. Chemically-modified ha for therapy and regenerative medicine. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **9**, 242–245 (2008).
- [47] Kagan, H. M. & Lerch, R. M. Amidated carboxyl groups in elastin. *Biochimica et Biophysica Acta* **434**, 223–232 (1976).
- [48] Aydin, D. et al. Polymeric Substrates with Tunable Elasticity and Nanoscopically Controlled Biomolecule Presentation. *Langmuir* **26**, 15472–15480 (2010).
- [49] Ellman, G. L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **74**, 443–450 (1958).
- [50] Thannhauser, T. W., Konishi, Y. & Scheraga, H. A. Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins. *Methods in Enzymology* **143**, 115–119 (1987).
- [51] Braeckmans, K., Peeters, L., Sanders, N. N., Smedt, S. C. D. & Demeester, J. Three-Dimensional Fluorescence Recovery after Photobleaching with the Confocal Scanning Laser Microscope. *Biophysical Journal* **85**, 2240–2252 (2008).

- [52] Tsay, T. & Jacobson, K. Spatial Fourier analysis of video photobleaching measurements. Principles and optimization. *Biophysical Journal* **60**, 360–368 (1991).
- [53] Jain, R., Stock, R., Chary, S. & Rueter, M. Convection and diffusion measurements using fluorescence recovery after photobleaching and video image analysis: in vitro calibration and assessment. *Microvascular Research* **39**, 77–93 (1990).
- [54] Berk, D., Yuan, F., Leunig, M. & Jain, R. Fluorescence photobleaching with spatial Fourier analysis: measurement of diffusion in light-scattering media. *Biophysical Journal* **65**, 2428–2436 (1993).
- [55] Cussler, E. Diffusion: Mass transfer in fluid systems. *Cambridge University Press, Cambridge, UK* (1997).
- [56] Okaya, O. & Sariisik, S. B. Swelling behavior of poly(acrylamide-co-sodium acrylate) hydrogels in aqueous salt solutions: theory versus experiments. *European Polymer Journal* **36**, 393–399 (2000).
- [57] Okaya, O. & Durmaz, S. Charge density dependence of elastic modulus of strong polyelectrolyte hydrogels. *Polymer* **43**, 1215–1221 (2002).
- [58] Dhanasingh, A., Salber, J. & Moeller, M. Tailored hyaluronic acid hydrogels through hydrophilic prepolymer cross-linkers. *Soft Matter* **6**, 618–629 (2009).
- [59] Southan, A. e. a. Towards Controlling the Formation, Degradation Behavior and Properties of Hydrogels Synthesized by Aza-Michael Reactions. *in Vorbereitung* (2013).
- [60] Mezger, T. G. Das Rheologie Handbuch. *Farben und Lacke Edition, Vincentz Network, Hannover, Germany* (2010).
- [61] Cowman, M. K. *et al.* Extended, Relaxed, and Condensed Conformations of Hyaluronan Observed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **88**, 590–602 (2005).

- [62] Turner, R. E., Lin, P. & Cowman, M. K. Self-association of hyaluronate segments in aqueous NaCl solution. *Arch. Biochem. Bio-phys.* **265**, 484–495 (1988).
- [63] Seitz, M. E. *et al.* Fracture and large strain behavior of self-assembled triblock copolymer gels. *Soft Matter* **5**, 447 (2009).
- [64] Erk, K. A., Henderson, K. J. & Shull, K. R. Strain stiffening in synthetic and biopolymer networks. *Biomacromolecules* **11**, 1358–1363 (2010).
- [65] Shadwick, R. Mechanical design in arteries. *J. Exp. Biol.* **202**, 3305–3313 (1999).
- [66] Karakaplan, A., Bienik, M. & Skalak, R. A mathematical model of lung parenchyma. *J. Biomech. Eng.* **102**, 124–136 (1980).
- [67] Hjortdal, J. Extensibility of the normo-hydrated human cornea. *Acta Ophthalmol. Scand.* **73**, 12–17 (1995).
- [68] Sabaratnam, S., Coleman, P. J., Badrick, E., Mason, R. M. & Levick, J. R. Interactive effect of chondroitin sulphate C and hyaluronan on fluid movement across rabbit synovium. *The Journal of Physiology* **540**, 271–284 (2002).
- [69] Amsden, B. Application of an Obstruction-Scaling Model To Diffusion of Vitamin B12 and Proteins in Semidilute Alginate Solutions. *Macromolecules* **39**, 1073–1078 (2006).
- [70] Mackie, J. & Meares, P. The sorption of electrolytes by a cation-exchange resin membrane. *Proc. R. Soc. London A* **232**, 485–498 (1955).
- [71] Treolar, L. R. G. The physics of rubber elasticity, 3rd ed. *Clarendon Press: Oxford* (1975).
- [72] Zheng, Y. & Mak, A. Extraction of effective Young’s modulus of skin and subcutaneous tissues from manual indentation data. In *Proceedings of the 19th Annual International Conference of the IEEE*, 2246–2249 (1997).

- [73] Lieleg, O., Baumgärtel, R. & Bausch, A. Selective Filtering of Particles by the Extracellular Matrix: An Electrostatic Bandpass. *Biophysical Journal* **97**, 1569–1577 (2009).
- [74] Schwartz, M. P. *et al.* A synthetic strategy for mimicking the extracellular matrix provides new insight about tumor cell migration. *Integrative Biology* **2**, 32–40 (2010).
- [75] Albrecht, K., Moeller, M. & Groll, J. Structure and Properties of Urea-Crosslinked Star Poly(ethylene oxide)-ran-(propylene oxide) Hydrogels. *Macromol. Biosci.* **8**, 923–931 (2008).
- [76] Lee, H. H., Venable, R. M. R., Mackerell, A. D. A. & Pastor, R. W. R. Molecular Dynamics Studies of Polyethylene Oxide and Polyethylene Glycol: Hydrodynamic Radius and Shape Anisotropy. *Biophysical Journal* **95**, 1590–1599 (2008).
- [77] Johansson, L. & Elvingson, C. Diffusion and interaction in gels and solutions. 3. Theoretical results on the obstruction effect. *Macromolecules* **24**, 6024–6029 (1991).
- [78] Blanshard, J. Diffusion in gels. *Polymer* **23**, 1012–1026 (1982).
- [79] Netz, P. A. & Dorfmueller, T. Computer Simulation Studies on the Polymer-Induced Modification of Water Properties in Polyacrylamide Hydrogels. *J. Phys. Chem. B* **102**, 4875–4886 (1998).
- [80] Goertz, M. P., Houston, J. E. & Zhu, X. Y. Hydrophilicity and the Viscosity of Interfacial Water. *Langmuir* **23**, 5491–5497 (2007).
- [81] Kaufmann, D. *et al.* Chemical Conjugation of Linear and Cyclic RGD Moieties to a Recombinant Elastin-Mimetic Polypeptide - A Versatile Approach towards Bioactive Protein Hydrogels. *Macromolecular Bioscience* **8**, 577–588 (2008).

- 
- [82] Buhler, E. & Boué, F. Chain Persistence Length and Structure in Hyaluronan Solutions: Ionic Strength Dependence for a Model Semirigid Polyelectrolyte. *Macromolecules* **37**, 1600–1610 (2004).

## Berechnungen

### A.1 Persistenzlänge von Hyaluronsäure in PBS

Bei Polymeren in Lösung hängt die Persistenzlänge meistens vom umgebenden Medium ab. Hyaluronsäureketten sind polyanionische Polymerketten, deren totale Persistenzlänge  $l_p$  durch  $l_p = l_0 + l_e$  gegeben ist [82].  $l_p$  setzt sich aus der intrinsischen Persistenzlänge  $l_0$ , die durch die entsprechende Polymerkette ohne Ladung in der Lösung gegeben ist, und der elektrostatischen Persistenzlänge  $l_e$  zusammen.  $l_e$  hängt von der vorhandenen Salzkonzentration ab. Bei Vorliegen von hohen Salzkonzentrationen wie bei der Verwendung von PBS als Lösungsmittel ist  $l_e$  sehr klein ( $\approx 1,5 \text{ \AA}$ ) [82],  $l_0$  beträgt  $90 \text{ \AA}$  und  $l_p \approx l_0$ . Mit der Länge einer Hyaluronsäure-Monomer-Einheit ( $10,2 \text{ \AA}$ ) lässt sich damit abschätzen, dass sich die Persistenzlänge über etwa 9 Hyaluronsäure-Monomereinheiten erstreckt.  $\mu\text{m}$ -lange Hyaluronsäureketten sind somit flexible Ketten.

### A.2 Auswertung mit unbeweglicher Fraktion

Zunächst soll angenommen werden, dass es zwei Molekülfraktionen gibt, die mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten und unabhängig voneinander diffundieren. Dann lassen sich die Fourieramplituden darstellen durch

$$C(u, v, t) = \gamma_0 C_1(u, v, t) + \gamma_1 C_2(u, v, t), \quad (\text{A.1})$$

mit  $\gamma_o$  und  $\gamma_1$  den Molekülfraktionen. Mit Gleichung 5.11 folgt

$$C(u, v, t) = \gamma_o C_1(u, v, 0) \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)D_o t] + \gamma_1 C_2(u, v, 0) \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)D_1 t]. \quad (\text{A.2})$$

Wird die Molekülfraktion  $\gamma_o$  als unbeweglich betrachtet, so ist  $D_o = 0$  und mit  $C_1(u, v, 0) = C_o(u, v, 0) = C(u, v, 0)$  folgt

$$C(u, v, t) = C(u, v, 0)(\gamma_o + \gamma_1 \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)D_1 t]). \quad (\text{A.3})$$

Und mit Gleichung 5.12 und der Forderung  $\gamma_o + \gamma_1 = 1$  folgt schließlich

$$\frac{I(u, v, t)}{I(u, v, 0)} = (1 - \gamma_o) \cdot \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)D_1 t] + \gamma_o. \quad (\text{A.4})$$

### A.3 Mittlerer Abstand der Thiolgruppen

Berechnung für einen Thiolierungsgrad von 40% und eine Konzentration von 2,8 %:

Zunächst wird die Bindungsstellendichte  $n_0$  berechnet durch  $n_0 = (\text{Pd}/\text{M}) \cdot k \cdot N_a$ , dabei ist  $N_a = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  die Avogadrokonstante,  $M = 430$  die mittlere Monomermasse von HA-SH in g/mol für einen Thiolierungsgrad von 40 %,  $k = 0.40$  der Thiolierungsgrad und  $\text{Pd} = P \cdot 10^4$  die Polymerdichte in SI-Einheiten ( $\text{g}/\text{m}^3$ ), mit  $P$  der Massenkonzentration (Massenprozent) von HA-SH in der Polymerisierungslösung in Prozent. Aus der Bindungsstellendichte  $n_0$  berechnet sich der mittlere Abstand  $a$  der Thiolgruppen in [m] durch  $a = n_0^{-1/3}$ , analog zur Berechnung des mittleren Abstands von Gasmolekülen bei einer gegebenen Anzahldichte  $n_0$ . Soll der mittlere Abstand im geschwollenen Gel abgeschätzt werden, so muss die Bindungsstellendichte durch den Faktor des Schwellens korrigiert werden. Für  $P = 2,8$  ergibt sich ohne Schwellen  $a = 4,0 \text{ nm}$ .

## A.4 Quervernetzungspunkte und elastische Ketten

Berechnung der Quervernetzungspunkte  $\kappa$  und der Anzahl elastischer Ketten  $\nu$  pro Einheitsvolumen zur Bestimmung der aus den theoretischen Netzwerkmodellen vorhergesagten Schermodule  $G$ : Der Thiolierungsgrad der gemessenen Gele beträgt 49 %. Die Molzahl der Quervernetzungspunkte  $\kappa$  pro Einheitsvolumen lässt sich aus der Berechnung der Bindungsstellendichte  $n_0$  abschätzen durch  $\kappa = n_0/N_a$ . Im geschwollenen Gel muss der Faktor des Schwellens berücksichtigt werden. Zur Berechnung der Molzahl elastischer Ketten  $\nu$  pro Einheitsvolumen wird die Molzahl der Hyaluronsäuresegmente zwischen Quervernetzungspunkten pro Einheitsvolumen berechnet. Die Molmasse der Hyaluronsäuresegmente berechnet sich durch  $M_{HA-SH,k} = M/k$ , mit  $k$  dem Thiolierungsgrad ( $k = 0,49$ ) und  $M$  der Monomermasse von HA-SH (465 g/mol für  $k = 0,49$ ). Aus der eingesetzten Konzentration von HA-SH und dem Schwellgrad lässt sich dann  $\nu$  berechnen.

## A.5 Maschengrößenberechnung

Im kubischen Gittermodell lässt sich der Abstand  $d$  benachbarter Gitterpunkte aus der mittleren Oberfläche  $s$  der Gitterebenen pro Einheitsvolumen durch  $d = 3/s$  berechnen. Dies folgt aus  $d = 3s^2/s^3$  mit  $3s^2$  der Oberfläche der Gitterebenen pro Einheitszelle und  $s^3$  dem Volumen der Einheitszelle. Für eine Gitterstruktur aus willkürlich angeordneten Ebenen ist die Berechnung identisch, da sich diese Struktur aus einer Transformation der Ebenen des kubischen Gitters erzeugen lässt.

## A.6 Gleichgewichtspartition

Zur Abschätzung des Einstellpunkts der Gleichgewichtspartitionskoeffizienten wurde die erwartete Molekülkonzentration im Gel nach einer Inkubationszeit  $t$  für einen gegebenen Diffusionskoeffizienten  $D$  im Hydrogel nach der Diffusions-

gleichung (2. Fick 'sches Gesetz)

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \vec{\nabla}^2 c \quad (\text{A.5})$$

berechnet. Zur Vereinfachung des Berechnungsproblems wurde angenommen, dass die Moleküle nur durch die Ober- und Unterseite der Hydrogelproben eindiffundieren, nicht aber durch die Seitenwände. Diese Annahme ist zulässig, da die laterale Ausdehnung der Gele deutlich größer war als die Dicke der Gele und die Messungen nicht im Randbereich stattgefunden haben. Dann lässt sich das Diffusionsproblem in einer Dimension lösen. Wird der Koordinatenursprung durch die Gelmitte gelegt und die  $z$ -Ausdehnung des Gels auf  $d = 2 \cdot z_0$  festgelegt, so erhält man die Anfangsbedingungen  $c(z, t_0) = 0$  für  $-z_0 \leq z \leq z_0$  und  $c(z, t_0) = c_0$  sonst. Durch Lösen des Diffusionsproblems folgt die zeitabhängige normierte Konzentrationsverteilung im Gel durch

$$\frac{c(z, t)}{c_0} = \frac{1}{2} \left[ 2 + \operatorname{erf} \left( \frac{z - z_0}{\sqrt{4Dt}} \right) + \operatorname{erf} \left( \frac{-z - z_0}{\sqrt{4Dt}} \right) \right], \quad (\text{A.6})$$

mit  $c(z, t)$  der  $z$ -abhängigen Konzentrationsverteilung im Gel und  $c_0$  der Konzentration der Moleküle in der Inkubationslösung. Dabei wurde angenommen, dass  $c_0$  konstant bleibt.

**Berechnungsbeispiele.** Langsam diffundierende Moleküle, die im Gel mit einem Diffusionskoeffizienten von  $D = 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$  diffundieren, erreichen nach 5 Tagen Inkubationszeit eine Sättigung von 95,2 % in einem Gel von 0,5 mm Dicke (typische Geldicke), schnell diffundierende Moleküle, die im Gel mit  $D = 200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  diffundieren, erreichen eine Sättigung von 98,5 %. Eine grössere Sättigung nimmt sehr viel Zeit in Anspruch und lässt sich experimentell kaum durchführen: Für  $D = 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$  wird eine Sättigung von 99 % erst nach 114 Tagen Inkubationszeit erreicht.

## Biokompatibilitätstests

Zur Bestimmung der Biokompatibilität der Hyaluronsäurehydrogele wurden HA-SH-**5a/b** Hydrogele mit 1,0 und 1,5 Vernetzeräquivalenten hergestellt und durch unsere Kooperationspartner (Claudia Kleinhans, Petra Kluger, Fraunhofer IGB, Stuttgart) durch Extrakttests mit primären humanen Fibroblasten getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass die Zellen in Hydrogelextrakten etwa 80 % Viabilität im Vergleich zu einer Kontroll-Lösung ohne Hydrogelextrakt aufweisen. Damit lässt sich sagen, dass die Hydrogele HA-SH-**5a/b** in diesen Tests keine zytotoxischen Komponenten ausgesondert haben.

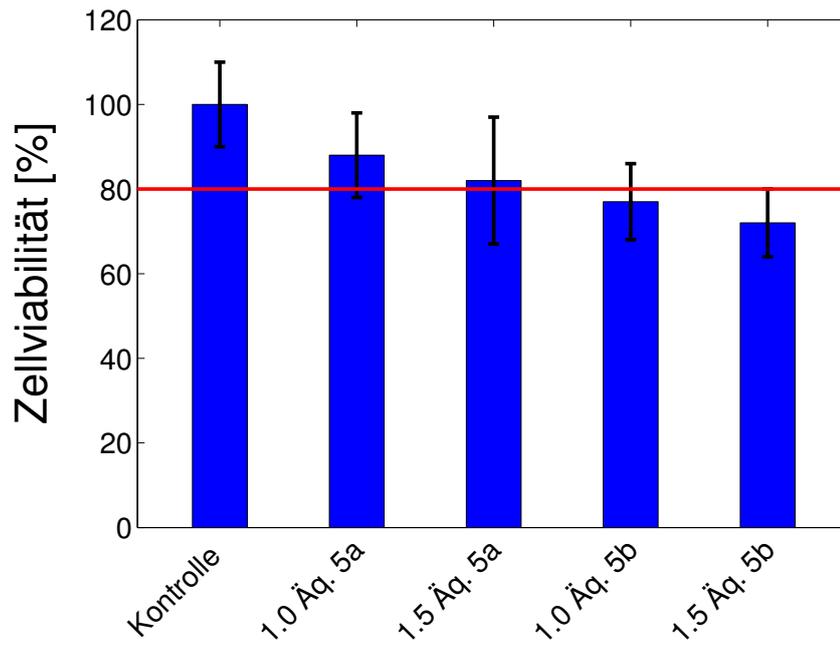


Abbildung B.1: Bestimmung der Zellviabilität durch die quantitative Analyse des Zellwachstums von primären humanen Fibroblasten nach 48 h Inkubation in Lösungen mit Hydrogelextrakten. Durch eine Kontrollprobe ohne Extrakt wurde die 100 %-Marke festgelegt. Der Extrakttest wurde auf Basis des WST-1 Proliferationsassays durchgeführt. Die Hydrogele HA-SH-**5a/b** zeigen eine Zellviabilität von ca. 80 % und lassen sich damit als biokompatibel einstufen. Äq. stellt die Vernetzeräquivalente dar. Messungen in Triplikaten. Fehler stellen Standardabweichung dar.

## Publikationsliste

### Veröffentlichungen

A.Southan<sup>c</sup>, M.Mateescu<sup>c</sup>, **V.Hagel**<sup>c</sup>, M.Bach, C.Schuh, C.Kleinhans, P.J.Kluger, S.Tussetschläger, I.Nuss, T.Haraszti, S.V.Wegner, J.P.Spatz, H.Boehm, S.Laschat and G.E.M.Tovar. Towards Controlling the Formation, Degradation Behavior and Properties of Hydrogels Synthesized by Aza-Michael Reactions. *Macromolecular Chemistry and Physics (accepted)*.

**V.Hagel**, T.Haraszti and H.Boehm. Diffusion and Interaction in Polyethyleneglycol-Diacrylat-Hydrogels. *In Vorbereitung*.

**V.Hagel**<sup>c</sup>, M.Mateescu<sup>c</sup>, A.Southan<sup>c</sup>, S.V.Wegner, I.Nuss, T.Haraszti, C.Kleinhans, C.Schuh, J.P.Spatz, P.J.Kluger, M.Bach, S.Tussetschläger, G.E.M.Tovar, S.Laschat and H.Boehm. (2013) Desmosine-Inspired Cross-Linkers for Hyaluronan Hydrogels. *Scientific Reports (Nature Publishing Group)*. *Unter Vorbehalt angenommen (minor revisions)*.

H.Boehm, **V.Hagel**, T.A.Mundinger, I.Nuss, S.V.Wegner, M.Mateescu and S.Laschat. (2012) "Novel Cross-linkers for Hyaluronan Hydrogels, Hydrogels Including these Cross-linkers and Applications thereof", *PCT/EP2012/004014*.

H.Boehm, T.Mundinger, **V.Hagel**, C.Boehm, J.Curtis, and J.Spatz (2010) Analyzing the Mesoscopic Structure of Pericellular Coats on Living Cells, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 1274, 1274-QQ02-03*.

H.Boehm, T.A.Mundinger, C.H.J.Boehm, **V.Hagel**, U.Rauch, J.P.Spatz and J.E.Curtis. (2009) Mapping the mechanics and macromolecular organization of hyaluronan-rich cell coats. *Soft Matter*.

<sup>c</sup> Co-First Authors

## Posterbeiträge

I.Nuss<sup>c</sup>, **V.Hagel**<sup>c</sup>, M.Mateescu<sup>c</sup>, S.V.Wegner, S.Laschat and H.Boehm. Elastin Inspired Hyaluronan Hydrogels. *HA Conference, Oklahoma City, USA 2013*

**V.Hagel** et al. Desmosine-Inspired Cross-Linkers for Hyaluronan Hydrogels. *EMBO Konferenz, Chemical Biology 2012, Heidelberg*.

**V.Hagel**, S.V.Wegner, H.Boehm and J.P.Spatz. Diffusion Analysis within Hydrogels. *DPG-Frühjahrstagung der Sektion Kondensierte Materie, 2012, Berlin*.

# Danksagung

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich zunächst an Joachim Spatz richten, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an einem sehr spannenden, interdisziplinären Projekt an der Schnittstelle zwischen Biophysik, Chemie und Materialwissenschaft zu forschen und eine Doktorarbeit anzufertigen, die meinen persönlichen Erfahrungsschatz enorm bereichert hat. Vielen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen und die Unterstützung!

Ulrich Schwarz möchte ich für seine freundliche Bereitschaft, das Gutachten für diese Arbeit zu erstellen, herzlich danken!

Weiter möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Heike Böhm bedanken, die mich während der ganzen Doktorarbeit und speziell auch beim Schreiben der Dissertation ausgezeichnet unterstützt hat und in einer Vielzahl von Situationen immer wieder Wege gefunden hat, Hindernisse und Schwierigkeiten aus dem Weg zu räumen. Vielen Dank dafür!

Bei Seraphine Wegner, Isabell Nuss und Tamás Haraszti möchte ich mich für ihr ausgezeichnetes Engagement und Mitwirken im "SynElast"-Projekt bedanken und bei Tamás Haraszti speziell auch für seine hervorragende Unterstützung in allen Fragen der Physik rund um mein Dissertationsthema! Dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Unterstützung des "SynElast"-Projekts!

Bei der "BioInterfaces International Graduate School" des KIT Karlsruhe bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme im Graduiertenprogramm!

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne viel Unterstützung und Hilfe von einigen Kooperationspartnern, die Materialien hergestellt haben, Messungen durchgeführt haben und durch ihren motivierten Einsatz eine lebendige Kooperation entstehen ließen. Dafür möchte ich mich speziell bei Markus Mateescu und Sabine Laschat von der Universität Stuttgart und bei Alexander Southan, Claudia Kleinhaus, Petra Kluger und Günter Tovar vom Fraunhofer Institut Stuttgart bedanken!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei der gesamten AG Böhm Gruppe für die Unterstützung bedanken, und speziell bei Yvonne Schön und Tabea Mundinger, von denen ich viel Unterstützung bekommen habe und die mit mir die Freuden und Leiden der letzten Jahre geteilt haben!

Christian Eberhard, Tamás Haraszti und Heike Böhm möchte möchte ich fürs Korrekturlesen und die hilfreichen Anmerkungen an meiner Arbeit danken!

Bei Elisabeth Pfeilmeier und Jutta Hess möchte ich mich für ihre Unterstützung in allen administrativen Angelegenheiten herzlich bedanken! Und weiter auch bei allen Technikern aus der Arbeitsgruppe, von denen ich immer Unterstützung bekommen hab, wenn ich diese gebraucht hab. Einen speziellen Dank möchte ich an Christine Mollenhauer richten, die mich in meiner Dissertation mit viel Mühe unterstützt hat und die mich auch sonst stets zu freundlichen Gesprächen eingeladen hat. Weiter möchte ich mich auch bei Radka Kölz für ihre Unterstützung bedanken!

Auch an die gesamte Spatz-Gruppe möchte ich ein Dankeschön richten für die stetig und allseitig gute Arbeitsatmosphäre, hilfreiche, spannende und unterhaltsame Diskussionen und die Unterstützung, die ich erhalten habe.

Für die Herstellung zahlreicher Sonderanfertigungen bedanke ich mich bei den Werkstätten des Max-Planck-Instituts.

Auch außerhalb der Arbeit gab es viele Menschen, die mich unterstützten und die herausfordernde Zeit der letzten Jahre mit mir durchlebt haben. Einen großen Dank möchte ich meinen Eltern entgegenbringen, die mich immer wieder großartig unterstützt haben! Ganz besonders möchte ich auch meinen Geschwistern sowie auch meinen zukünftigen Schwiegereltern für ihre Unterstützung danken!

Schließlich möchte ich mich in tiefer Dankbarkeit an meine Lebensgefährtin Melanie Kiefer wenden, die mit mir die Herausforderung meiner Doktorarbeit angenommen hat und die mir durch ihre Liebe und ihr unentwegtes Vertrauen in mich am meisten Kraft geschenkt hat!

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den 13. Mai 2013

.....

Valentin Hagel