



Universität
Bremen

Präparation und Charakterisierung von
Hydrogelen zur potentiellen Anwendung als
medizinischer Klebstoff für die Fixierung von
Knochenfragmenten

Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen

von

Vanessa Lührs

geboren am 03.05.1993 in Varel

Bremen 2023

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Andreas Hartwig, Universität Bremen

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ingo Grunwald, Hochschule Bremen

Tag der Disputation: 09.02.2024

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Hartwig für die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit sowie für die Bereitstellung der Labore. Außerdem möchte ich ein großes Dankeschön an Herrn Manfred Peschka und Herrn Prof. Dr. Ingo Grunwald von der Firma Purenum GmbH richten, die für die Ermöglichung und Betreuung meiner Arbeit und für die Bereitstellung des Themas verantwortlich waren.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Ingo Grunwald für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Michael Wark, Herrn Prof. Dr. Ralf Dringen, Herrn Fawaz Al Hussein und Frau Simone Carola Bandte danke ich für die Bereiterklärung Teil meiner Prüfungskommission zu sein.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sebastian Stößlein von der Firma Purenum GmbH für die Betreuung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen der OE414 und der OE461 des Fraunhofer IFAM für die nette Arbeitsatmosphäre, interessante Anregungen, die freundliche Hilfsbereitschaft, die Einweisung in die Laborgeräte und ein stets offenes Ohr danken. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Katharina Richter für die Aufnahme der MALDI-ToF-Massenspektren, Herrn Dr. Karsten Thiel für die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie und EDX-Spektroskopie, Herrn Björn Grabbet für die Unterstützung bei der Anfertigung der Knochenprüfkörper, Herrn Niklas Neumann und Herrn Thorben Haubold für die Aufnahme von NMR-Spektren und Frau Linda Gätjen und Frau Malinn Kastens für die biologischen Untersuchungen (WST-1-Assay).

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die seelische Unterstützung während meiner Promotion.

Publikationen im Rahmen der Dissertation

1. V. Lührs, S. Stößlein, K. Thiel, I. Grunwald, A. Hartwig, *Int J Adhes Adhes* **2021**, *111*, 102977.[1]

Die recherchierten Grundlagen, die experimentelle Durchführung und die Ergebnisse und Diskussion der Kapitel 1.1, 3.2, 4.1 und 5 sind abgesehen von einigen Ergänzungen inhaltsgleich mit dieser Publikation. Die Tabelle 24 und die Abbildungen 8, 9, 13 – 17 und 59 – 62 befinden sich ebenfalls in der Publikation oder der *Supporting Information* der Publikation. Sie wurden für die Dissertation ins Deutsche übersetzt. Teilweise wurde das Layout leicht verändert.

Angaben zum Eigenanteil in der Publikation:

Experimentelles Konzept und Design: ca. 90 %

Erfassung/Beschaffung (experimenteller) Daten: ca. 90 %

Datenanalyse und Interpretation: ca. 90 %

Erstellung von Abbildungen und Tabellen: 100 %

Ausarbeitung des Manuskripts: ca. 90 %

Der Publikation entnommene Inhalte, Abbildungen und Tabellen dürfen gemäß der Elsevier Vorgaben zum Urheberrecht unter Angabe der vollständigen Quelle verwendet werden.

Reproduced from „Lührs, V., Stößlein, S., Thiel, K., Grunwald, I., & Hartwig, A. (2021). An in vitro bone-to-bone adhesion test method using the compression shear test. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, *111*, 102977. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2021.102977>“ with permission from Elsevier.

2. K. Karakyrizis, V. Lührs, S. Stößlein, I. Grunwald, A. Hartwig, *Mater Adv* **2023**, 4, 1648-1655.[2]

Die experimentelle Durchführung und die Ergebnisse und Diskussion der Kapitel 3.3.3, 3.3.4, 3.4.1 – 3.4.4, 3.6.2, 4.2.2, 4.2.3.1 – 4.2.3.6, 4.2.4 und 4.2.5.3 sind in stark verkürzter Form in dieser Publikation vorhanden.

Angaben zum Eigenanteil in der Publikation:

Experimentelles Konzept und Design: ca. 30 %

Erfassung/Beschaffung (experimenteller) Daten: 0 %

Datenanalyse und Interpretation: ca. 30 %

Erstellung von Abbildungen und Tabellen: 0 %

Ausarbeitung des Manuskripts: ca. 5 %

Der Publikation entnommene Inhalte dürfen gemäß den Vorgaben der Royal Society of Chemistry zum Urheberrecht unter Angabe der DOI verwendet werden.

Reproduced from „<https://doi.org/10.1039/D2MA01050J>“ with permission from the Royal Society of Chemistry.

Konferenzbeiträge im Rahmen der Dissertation

1. Vanessa Lührs, Sebastian Stößlein, Karsten Thiel, Ingo Grunwald, Andreas Hartwig
Test method for the characterization of bone-bone adhesive bonds
EURADH 2021 – 13th European Adhesion Conference, virtuelle Konferenz,
11. – 14.10.2021 (Vortrag)
2. Kyriakos Karakyriazis, Vanessa Lührs, Sebastian Stößlein, Ingo Grunwald,
Andreas Hartwig
Synthesis and characterization of a hydrogel-adhesive for medical applications
EURADH & WCARP 2023 – 14th European Adhesion Conference & 7th World
Congress on Adhesion and Related Phenomena, Garmisch-Partenkirchen,
10. – 13.09.2023 (Vortrag)

Kennzeichnung der eigenen Leistung

Alle experimentellen Arbeiten, die nicht im nächsten Abschnitt erwähnt werden und alle Auswertungen im Rahmen dieser Dissertation wurden von mir eigenverantwortlich durchgeführt. Herr Prof. Dr. Andreas Hartwig, die Firma Purenum GmbH und weitere Mitarbeiter des Fraunhofer IFAM haben mich dabei unterstützend begleitet.

Die Aufnahme der MALDI-ToF-Massenspektren und NMR-Spektren, die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie und EDX-Spektroskopie und die biologischen Untersuchungen (WST-1-Assay) wurden nach meinen Wünschen von Mitarbeitern des Fraunhofer IFAM durchgeführt: Frau Dr. Katharina Richter, Herr Niklas Neumann, Herr Thorben Haubold, Herr Dr. Karsten Thiel, Frau Linda Gätjen und Frau Malinn Kastens. Herr Björn Grabbet unterstützte nach meiner Anleitung bei der Anfertigung der Knochenprüfkörper, die in Kapitel 4.2.5.5 verwendet wurden.

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Präparation und Charakterisierung von chemisch vernetzenden Hydrogelen für die potenzielle Anwendung als medizinischer Klebstoff zur Fixierung von Knochenfragmenten.

Im ersten Teil der Arbeit konnte erfolgreich eine einfach anzuwendende und reproduzierbare Methode zur Bestimmung der Festigkeit von Knochenklebungen entwickelt werden. Die Prüfmethode beinhaltet die Präparation von Prüfkörpern aus Rinderknochen, das Kleben und anschließende Aushärten der Fügeiteile unter trockenen oder physiologischen Bedingungen und die Bestimmung der Klebfestigkeit. Zur Validierung der Prüfmethode wurden die beiden Gewebeklebstoffe Histoacryl®, BioGlue® und der Knochenzement Palacos® LV verwendet.

Im zweiten Teil wurden verschiedene Hydrogele aus einem Polyamin (Chitosan) und aus einem Dialdehyd hergestellt. Diese wurden u. a. mit der zuvor entwickelten Prüfmethode charakterisiert und auf ihre Eignung als Knochenklebstoff geprüft. Für die Präparation der Dialdehyde, welche aus einem aldehydfunktionalisierten Polyethylenglycol bestehen, wurden zwei unterschiedliche Syntheserouten betrachtet und bewertet.

Es ist gelungen ein Hydrogel herzustellen, welches nach ersten Untersuchungen biokompatibel ist, eine für die medizinische Anwendung geeignete Verarbeitungszeit aufweist und mit dem unter trockenen Bedingungen eine adäquate Adhäsion und Kohäsion beim Kleben von Rinderknochen festgestellt werden konnte. Unter physiologischen Bedingungen ist die Klebfestigkeit des Hydrogels für reale Anwendungen noch zu gering. Außerdem konnten wichtige Einflussgrößen wie das Verhältnis der reaktiven Gruppen zueinander sowie der Feststoffgehalt des Hydrogels auf die Gelfestigkeit ermittelt werden. Die Festigkeit der Gele kann nämlich durch eine Erhöhung des Feststoffgehaltes und einen Aminogruppenüberschuss optimiert werden.

Abstract

The present work deals with the preparation and characterization of chemically cross-linked hydrogels for the potential application as medical adhesive for the fixation of bone fragments.

First, an easy-to-use and reproducible method for determining the adhesive strength of bone adhesives was successfully developed. The test method involves the preparation of test specimen consisting of bovine bones, bonding and subsequent curing of the adherends under dry or physiological conditions and measuring of the obtained bond strength. The two soft tissue adhesives Histoacryl® and BioGlue® and the bone cement Palacos® LV were used to validate the test method.

In the second part, different hydrogels were prepared using a polyamine (chitosan) and a dialdehyde. The gels were characterized by for example the previously developed test method and tested for their suitability as bone adhesive. For the preparation of the dialdehydes, which consist of an aldehyde-functionalized polyethylene glycol, two different synthesis routes were considered and assessed.

It was possible to prepare hydrogels which seem to be biocompatible, have a suitable processing time for medical applications and which lead to an adequate adhesion and cohesion after bonding bovine bones under dry conditions. Under physiological conditions, the adhesive strength of the hydrogel is not yet sufficient. In addition, important influencing variables such as the ratio of the reactive groups and the solids content of the hydrogel could be clarified by investigating the gel strength. The strength can be optimized by increasing the solids content and using an excess of amino groups.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Zielsetzung	4
2. Grundlagen	5
2.1 Hydrogele	5
2.2 Imine	5
2.3 Polyurethane	7
3. Experimenteller Teil	11
3.1 Verwendete Chemikalien und deren Handhabung	11
3.2 Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen und Untersuchung der Knochenoberfläche	14
3.2.1 Referenzmaterialien	14
3.2.2 Herstellung der Knochenprüfkörper	15
3.2.3 Klebfestigkeit – Druckscherversuche mit Knochenklebungen	16
3.2.4 FTIR-Spektroskopie	17
3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenspektroskopie	17
3.3 Synthese der Dialdehyde (Komponente 1)	18
3.3.1 Syntheseroute 1a	18
3.3.2 Syntheseroute 1b	19
3.3.3 Syntheseroute 2	20
3.3.4 NMR- und IR-spektroskopische Daten	23
3.4 Charakterisierung der Dialdehyde	28
3.4.1 NMR-Spektroskopie	28
3.4.2 MALDI-ToF-Massenspektrometrie	28
3.4.3 Gel-Permeations-Chromatographie	29
3.4.4 UV/VIS-Spektroskopie (CHO-Gehalt Bestimmung)	29
3.4.5 Löslichkeitsverhalten	30
3.4.6 Biokompatibilität	31

3.5 Herstellung der Hydrogele (Komponente 1 + Komponente 2).....	32
3.6 Charakterisierung der Hydrogele.....	39
3.6.1 Topfzeit.....	39
3.6.2 Gelfestigkeit am Texture Analyser	40
3.6.3 Quellverhalten.....	41
4. Ergebnisse und Diskussion.....	42
4.1 Entwicklung einer Prüfmethode zur Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen.....	42
4.1.1 Einleitung.....	42
4.1.2 Klebfestigkeiten der Referenzmaterialien.....	43
4.1.3 Einfluss der Oberflächenbehandlung auf die Knochenstruktur und Klebfestigkeit	50
4.2 Hydrogele zur potentiellen Anwendung als Knochenklebstoff.....	54
4.2.1 Einleitung.....	54
4.2.2 Synthese der Dialdehyde (Komponente 1).....	55
4.2.3 Charakterisierung der Dialdehyde	60
4.2.3.1 FTIR-Spektroskopie.....	60
4.2.3.2 NMR-Spektroskopie	65
4.2.3.3 MALDI-ToF-Massenspektrometrie.....	68
4.2.3.4 Gel-Permeations-Chromatographie	73
4.2.3.5 UV/VIS-Spektroskopie (CHO-Gehalt Bestimmung).....	78
4.2.3.6 Ergebnis der Strukturaufklärung	81
4.2.3.7 Löslichkeitsverhalten	81
4.2.3.8 Biokompatibilität	82
4.2.4 Herstellung der Hydrogele (Komponente 1 + Komponente 2)	84
4.2.5 Charakterisierung der Hydrogele	85
4.2.5.1 IR-Spektroskopie	85
4.2.5.2 Topfzeit	87
4.2.5.3 Gelfestigkeit.....	93
4.2.5.4 Quellverhalten	103

4.2.5.5 Klebfestigkeit – Druckscherversuche mit Knochenklebungen	107
5. Zusammenfassung und Ausblick	115
6. Literaturverzeichnis	118
7. Anhang	126

Abkürzungsverzeichnis

ACS engl.	<i>American Chemical Society</i>
ATR engl.	<i>attenuated total reflection</i>
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CHO-Gruppe	Aldehydgruppe
COSY engl.	<i>correlation spectroscopy</i>
cps	<i>counts per second</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DBTL	Dibutylzinndilaurat
DCM	Dichlormethan
DD engl.	<i>degree of deacetylation</i>
DEA	Dielektrische Analyse
DEPT engl.	<i>distorsionless enhancement by polarisation transfer</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EDX engl.	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
FIB engl.	<i>focused ion beam</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HA	Hydroxylapatit
HAc	Essigsäure
HDI	Hexamethylendiisocyanat
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HMBC engl.	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC engl.	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC engl.	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IPDI	Isophorondiisocyanat
IPN engl.	<i>interpenetrating network</i>

IQR engl.	<i>interquartile range</i>
Li.S.A	Lichtstreuanlage
MALDI-ToF-MS engl.	<i>matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry</i>
MDI	Methylendiphenylisocyanat
MEK	Methylethylketon
MW	Mittelwert
NaTFA	Natriumsalz der Trifluoressigsäure
NCO-Gruppe	Isocyanatgruppe
NH ₂ -Gruppe	Aminogruppe
NK	Negativkontrolle
NMR engl.	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte
PBS engl.	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PK	Positivkontrolle
PMMA	Polymethylmethacrylat
PUR	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RID engl.	<i>refractive index detector</i>
RPMI engl.	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSD engl.	<i>relative standard deviation</i>
RT	Raumtemperatur
SBF engl.	<i>simulated body fluid</i>
SDS engl.	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDV	Styrol-Divinylbenzol-Copolymernetzwerk
TDI	Toluoldiisocyanat
THF	Tetrahydrofuran
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
verd.	verdünnt

verg.	vergällt
VIS engl.	<i>visible</i>
WST engl.	<i>water soluble tetrazolium</i>
XRD engl.	<i>X-ray diffraction</i>

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Neben unkomplizierten, glatten Knochenfrakturen, die meistens schon durch die Stabilisierung mit Gips behandelt werden können, gibt es auch kompliziertere, mehrfragmentäre Frakturen bis hin zu Trümmerbrüchen, bei denen diese konservative Behandlung nicht ausreicht.[3] In diesen Fällen müssen aufwendige Operationen unter Verwendung von Nägeln, Schrauben, Drähten und Platten aus Edelstahl oder Titan durchgeführt werden. Diese gängigen Osteosynthesematerialien wurden im Laufe der Zeit intensiv erforscht und hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und ihres Handlings weiterentwickelt.[4–9] Dennoch haben die Metallimplantate einige Nachteile, wie z. B. die ungleichmäßige Belastungsverteilung, die fehlende Wechselwirkung mit dem Knochen, die punktuelle Verletzung des Knochengewebes und die daraus resultierenden Entzündungen. Außerdem ist es teilweise notwendig die Metallimplantate nach Heilung der Fraktur operativ zu entfernen, wodurch zusätzliche Kosten, Risiken und Krankentage entstehen.[9–14] Medizinische Klebstoffe zur Fixierung von Knochenfrakturen stellen hier eine alternative Behandlungsmethode dar.[15,16]

Klebstoffe sind insbesondere in Hinsicht auf komplizierte Knochenbrüche mit vielen kleinen Knochenfragmenten vergleichsweise einfach zu applizieren. Kleine Knochenfragmente, die mit den gängigen Osteosynthesematerialien nur schwer oder gar nicht zu fixieren sind, könnten mit einem Klebstoff fixiert werden und so zur Knochenheilung beitragen. Die flächige Applikation eines Klebstoffes sorgt zudem für eine gleichmäßige Belastungsverteilung am verletzten Knochengewebe.[15,17] Obwohl es bereits viele Forschungsarbeiten über Knochenklebstoffe gibt, ist es bisher nicht gelungen einen Klebstoff zu entwickeln, der allen Anforderungen bezüglich der Biokompatibilität, mechanischen Eigenschaften und medizinischen Anwendbarkeit entspricht (**Abbildung 1**).[18]

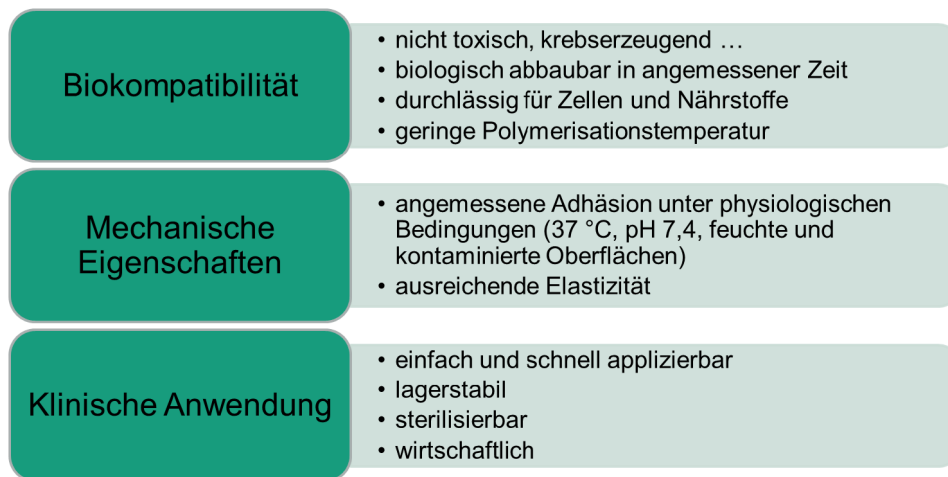


Abbildung 1: Anforderungen an einen medizinischen Klebstoff für Knochenfrakturen.[11,13]

Knochenklebstoffe werden in synthetische und biologisch abgeleitete und/oder inspirierte Klebstoffe unterteilt.[19] Synthetische Klebstoffe z. B. auf Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA)[20], Polycyanoacrylaten[21,22] und Polyurethanen (PUR)[23] verfügen meistens über eine höhere Klebfestigkeit als biologische Knochenklebstoffe. Allerdings besitzen sie oft nur eine geringe Biokompatibilität und sind nicht biologisch abbaubar.[13] Biologische Knochenklebstoffe hingegen sind zwar häufig biokompatibel und biologisch abbaubar, aber weisen dafür nur geringe Klebfestigkeiten auf.[13] Zu ihnen gehören beispielsweise Chitosan-Aldehyd-[24,25], Gelatine-Alginat-[26] und Fibrin[27]-basierte Klebstoffe.

Im Jahr 1931 entwickelte HEDRI den ersten Knochenklebstoff, der Kollagen-basiert war und unter dem Namen Ossocol® bekannt wurde. Der Klebstoff hatte zwar gute mechanische Eigenschaften, aber war auf Grund mangelnder Biokompatibilität nicht für die klinische Anwendung einsetzbar.[12] Heutzutage finden vor allem PMMA-Knochenzemente für die Endoprothetik Anwendung in der Chirurgie. Knochenzemente sind allerdings nicht biologisch abbaubar.[13,28] Auch wenn es derzeit noch keinen in der Praxis angewendeten Klebstoff für die Fixierung von Knochenfragmenten gibt, dessen Adhäsion nicht nur auf mechanische Verklammerungen wie beim PMMA-Knochenzement beruht, sondern auch auf physikalische Wechselwirkungen und chemische Bindungen, gibt es bereits vielversprechende Forschungsergebnisse aus den letzten Jahren. Tetranite® ist ein auf Tetracalciumphosphat und Phosphoserin basierter Klebstoff, der nach 24 h unter feuchten Bedingungen eine Klebfestigkeit von ca. 1,9 MPa aufweist. Zudem ist Tetranite® biologisch abbaubar und hat eine osteokonduktive Wirkung, d. h. er bietet Andockstellen für knochenbildende Zellen und

fördert dadurch die Knochenheilung.[28] SHAHBAZI et al. synthetisierten einen biologisch abbaubaren Klebstoff mit nanobioaktiven Glaspartikeln, auf Basis von Polypropylenfumarat. Unter feuchten Bedingungen wurden nach 24 h Klebfestigkeiten von 6 – 9 MPa ermittelt. Die nanobioaktiven Glaspartikel haben einen positiven Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften und auf die Zellviabilität.[29]

Leider ist es nicht möglich die beiden Klebstoffe miteinander zu vergleichen bzw. sie in Relation zueinander zu setzen, da die jeweiligen Klebfestigkeiten mit unterschiedlichen Prüfmethode bestimmt wurden. Bei Tetranite® wurde die Scherkraft mit zylindrischen Prüfkörpern aus den Schienbeinknochen von Schweinen gemessen.[28] Bei dem Klebstoff mit nanobioaktiven Glaspartikeln wurde die Zugscherkraft mit quaderförmigen Prüfkörpern aus den Rippen von Schafen gemessen.[29] Dieses Beispiel zeigt wie wichtig es ist, eine standardisierte Prüfmethode für die Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen zu etablieren.[10,30]

Es gibt sehr viele Parameter, die bei der Entwicklung einer Prüfmethode berücksichtigt werden müssen: die Oberflächenbehandlung der Klebfläche, die Art der Klebung (z. B. Stumpf-Stoß-Verbindung oder Überlappungsklebung)[10], die Aushärtebedingungen (Temperatur, Dauer, feuchte oder trockene Umgebung), die Art der Beanspruchung (z. B. Zug-[26] oder Scherbeanspruchung[31]) und die Prüfgeschwindigkeit. Auch die Form (z. B. quaderförmig[32] oder zylindrisch[33]) und Größe der Prüfkörper bzw. Fügeile sind besonders in Hinblick auf geringe Standardabweichungen von Bedeutung. Da die Fügeile in diesem Fall aus einem natürlichen Material mit vielen Unregelmäßigkeiten bestehen, ist es schwierig reproduzierbare Knochenprüfkörper herzustellen. Die Wahl der Gewebeart (Kortikalis[26,34] oder Spongiosa[24,28]), der Tierart (z. B. Schwein[35], Rind[26] oder Schaf[29]) und der Knochenart (z. B. Rippenknochen[29], Oberschenkelknochen[26] oder Schienbeinknochen[28]) können die resultierenden Klebfestigkeiten stark beeinflussen.

1.2 Zielsetzung

Zunächst soll eine Prüfmethode zur Evaluierung von potentiellen Knochenklebstoffen erarbeitet werden. Die Anfertigung von geeigneten und reproduzierbar herstellbaren Knochenprüfkörpern ist dabei die wichtigste Aufgabe, da die Prüfkörper einen großen Einfluss auf die relativen Standardabweichungen der Klebfestigkeiten haben.

Im zweiten Schritt soll ein neuer, potentieller Knochenklebstoff synthetisiert werden. Hierfür werden chemische Hydrogele, die aus einer kommerziell erhältlichen Amin- und einer selbst synthetisierten Aldehyd-Komponente bestehen, in Betracht gezogen. Dementsprechend erfolgt die Gelbildung über die Reaktion zwischen den Aldehyd- und Aminogruppen zu Iminen. Die Synthese der Aldehyd-Komponente erfolgt über die Ausbildung von Urethangruppen. Anschließend werden die Hydrogele u. a. mit der neu entwickelten Prüfmethode untersucht.

2. Grundlagen

2.1 Hydrogele

Hydrogele sind dreidimensionale polymere Netzwerke, die Wasser in ihrem Netzwerk aufnehmen und dieses auch wieder abgeben können. Die Fähigkeit Wasser zu absorbieren ist auf hydrophile funktionelle Gruppen am Rückgrat des Makromoleküls zurückzuführen. In der Regel ist der Massenanteil des Wassers in einem gequollenen Gel deutlich höher als der Massenanteil des Polymers. Der Gleichgewichtswassergehalt eines Hydrogels ist abhängig von der Hydrophilie des Polymers und von der Dichte des polymeren Netzwerks.[36]

Es gibt mehrere Möglichkeiten Hydrogele zu klassifizieren. So können sie beispielsweise nach Art ihrer Herkunft (natürlich, synthetisch oder Hybrid), nach der Methode der Herstellung (Homopolymer, Copolymer, IPN (engl. *interpenetrating network*)) und nach Art des Impulses (z. B. pH-Wert oder Temperatur), der zur Bildung des Gels führt oder Eigenschaften des Gels beeinflusst eingeteilt werden. Eine weitere wichtige Einteilung ist die Unterscheidung zwischen physikalischen und chemischen Hydrogelen. Physikalische Hydrogele sind über physikalische Wechselwirkungen und Verflechtungen der Polymerketten vernetzt, wohingegen chemische Hydrogele über kovalente Bindungen vernetzt sind und dadurch in der Regel stabiler in Bezug auf die Löslichkeit sind. Die physikalischen Wechselwirkungen oder auch in Wasser reversible kovalente Bindungen lassen sich einfacher wieder lösen.[36,37]

Auf Grund ihrer Eigenschaften wie die Fähigkeit große Mengen Wasser aufzunehmen und auch wieder abzugeben, ihre Flexibilität, ihre Weichheit und ihre Biokompatibilität, sind Hydrogele besonders in biomedizinischen Anwendungen gefragt.[38] Hierzu zählen beispielweise die Verwendung als Wirkstoffträger, als Wundauflage, als Biosensor und der Einsatz im Gebiet der Gewebezüchtung. Aber auch außerhalb der Medizin gibt es zahlreiche Einsatzgebiete für Hydrogele: Hygieneprodukte, künstlicher Schnee, Lebensmittelindustrie und Landwirtschaft.[36–38]

2.2 Imine

Imine sind Kondensationsprodukte aus primären Aminen (**a**) und Aldehyden/Ketonen (**b**) (**Abbildung 2**). Die primäre Aminogruppe greift das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe nucleophil an. Das entstehende Zwitterion (**c**) stabilisiert sich durch „innere“ Neutralisation zum Halbaminal (**d**), welches immer noch unbeständig und nicht isolierbar ist. Durch diesen Additionsschritt wird aus der ebenen, trigonalen Carbonylverbindung ein tetraedrisches Addukt gebildet. Je sterisch anspruchsvoller die

Reste sind, desto langsamer läuft der Additionsschritt der Reaktion ab. Die Addition kann durch eine Säure katalysiert werden. Je schwächer nucleophil das Reagens ist, desto wichtiger ist die Verwendung einer Säure, die das Sauerstoffatom protoniert und damit die partiell positive Ladung am Carbonylkohlenstoff erhöht. Im weiteren Reaktionsverlauf, dem Kondensationsschritt, wird das Halbaminal (**d**) entweder durch eine Säure oder schon durch das protische Lösungsmittel selbst am Hydroxylsauerstoff protoniert. Die Protonierung des Stickstoffatoms würde eine Rückreaktion bewirken. Durch Abspaltung von Wasser stabilisiert sich das entstandene Oxoniumion (**e**) zu einem Carbenium-Immoniumion (**f**) mit delokalierter positiver Ladung. Abschließend entsteht durch Abgabe eines Protons das stabile Endprodukt: Imin bzw. Schiffsche Base (**g**). Die Reaktion zum Imin (**g**) ist reversibel.[39]

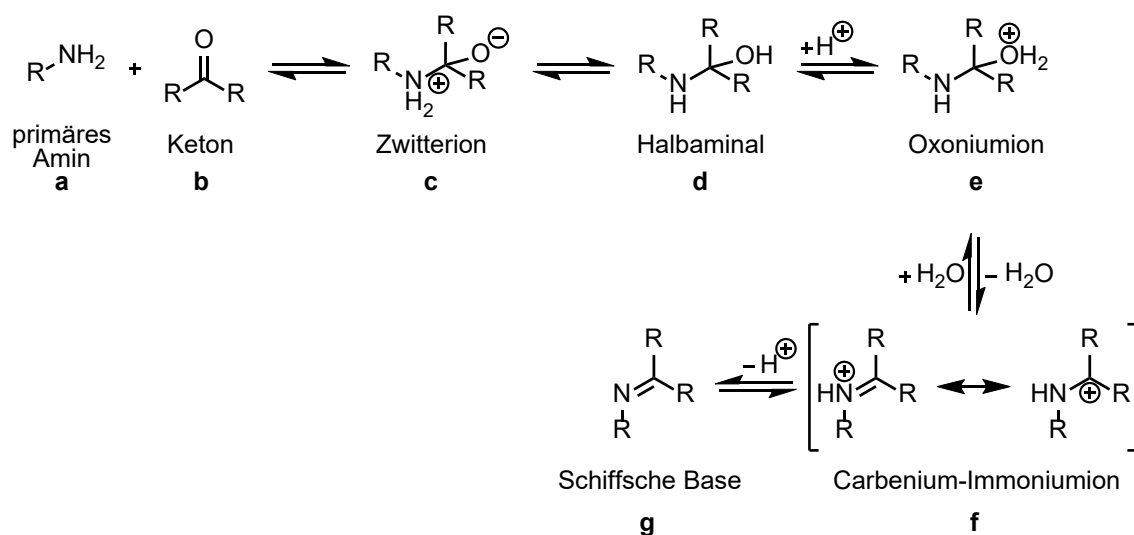


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus zur Synthese einer Schiffschen Base (**g**).[39]

Da Amine (**a**) starke Nucleophile sind, verläuft der Additionsschritt (**a – d**) der Reaktion schon im neutralen oder schwach basischen Milieu schnell ab. Der Kondensationsschritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion (**d – g**). Daher ist dieser Schritt säurekatalysiert. Die Säure im Reaktionsgemisch kann allerdings auch das Amin (**a**) protonieren, sodass es nicht mehr als Nucleophil für den Additionsschritt zur Verfügung steht. Es muss also einen optimalen pH-Wert geben, bei dem die Kondensation ausreichend katalysiert wird und trotzdem noch eine ausreichende Menge nicht protonierter primärer Aminogruppen für die Addition zur Verfügung steht. Grundsätzlich ist das im Bereich des pK_s -Wertes des Amins der Fall, also zwischen pH 9 und 11.[39]

Die Vernetzungsreaktion zwischen Aminen (**a**) und Aldehyden/Ketonen (**b**) findet bereits Anwendung bei medizinischen Hydrogelen und Klebstoffen. Die Reversibilität der Vernetzung bzw. die Dynamik der Iminbindung und die Injizierbarkeit der Gele spielt bei der medizinischen Anwendung eine wichtige Rolle. Außerdem ist die Reaktion zwischen Amino- und Aldehydgruppen schnell und unter milden Bedingungen durchführbar, da keine Metallkatalysatoren oder erhöhte Temperaturen benötigt werden.[40,41] XU et al. haben ein selbstheilendes Chitosan-Vanillin-Hydrogel synthetisiert, welches durch Iminbindungen und Wasserstoffbrückenbindungen vernetzt ist. Selbstheilende Hydrogele sind interessant für die Wundheilung und Gewebezüchtung.[42] Für die potenzielle Anwendung als Wirkstoffträger in der Krebstherapie wurde von ZHANG et al. ein Hydrogel präpariert, welches sowohl durch den pH-Wert als auch durch die Temperatur beeinflussbar ist. Das Hydrogel besteht aus Glycol-Chitosan und Poly(*N*-isopropylacrylamid-co-acrylsäure) endfunktionalisiert mit Benzaldehyd.[43] Bereits seit 1998 ist der Gewebeklebstoff BioGlue® der Firma CryoLife Inc. zugelassen und wird in der Herz- und Gefäßchirurgie eingesetzt.[14,44] Der Klebstoff besteht aus bovinem Serumalbumin (BSA) und Glutaraldehyd. Er härtet über die Ausbildung von Iminbindungen aus.[45]

2.3 Polyurethane

Polyurethane (PUR) sind auf Grund ihrer sehr guten mechanischen Eigenschaften vielseitig einsetzbare Kunststoffe. Es wird zwischen Schaumstoffen und nicht geschäumten Polyurethanen unterschieden. Zu den Schaumstoffen gehören Weichschäume, Hartschäume und Integralschäume. Die nicht geschäumten PUR umfassen u. a. Beschichtungsmaterialien, Klebstoffe und Vergussmassen. Die unterschiedlichen PUR-Materialien werden überwiegend in der Automobil-, Möbel- und Bauindustrie verwendet.[46] Es gibt jedoch auch biomedizinische PUR-Anwendungen wie Katheter, Wundauflagen, strukturelle Gerüste (engl. *scaffold*) in der Gewebezüchtung (engl. *tissue engineering*), Wirkstoffträger (engl. *drug delivery carriers*) und Stents. PUR-Hydrogele werden beispielsweise für Kontaktlinsen verwendet.[47–49] Des Weiteren beschäftigen sich einige Forschungsarbeiten mit der Anwendung von PUR-Klebstoffen als medizinische Klebstoffe zum Fixieren von Knochenfrakturen.[50] ERKEN et al. und LEI et al. verwendeten in ihren Studien beispielsweise PUR-basierte Knochenklebstoffe, die β -Tricalciumphosphat beinhaltenen.[15,18]

Die Synthese der Polyurethane erfolgt über die Polyadditionsreaktion zwischen Polyolen und mehrfunktionellen Isocyanaten (**Abbildung 3**). Das Sauerstoffatom der

Hydroxylgruppe des Polyols greift das partiell positiv geladene Kohlenstoffatom der Isocyanatgruppe nucleophil an, sodass die charakteristische Urethangruppe (–NH–CO–O–) entsteht.[51]

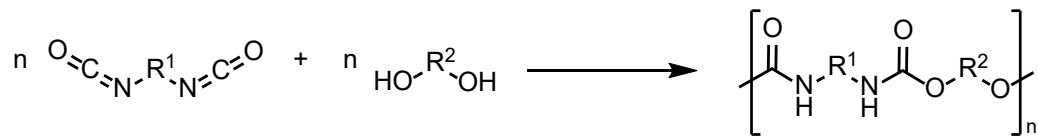


Abbildung 3: Polyadditionsreaktion zwischen einem Diisocyanat und einem Polyol zu einem Polyurethan.[51]

Als Polyole werden Polyetherpolyole und Polyesterpolyole eingesetzt. Zu den gängigsten Isocyanaten gehören die aromatischen Isocyanate Toluoldiisocyanat (TDI) und Methyldiphenylisocyanat (MDI) und die aliphatischen Isocyanate 1,6-Hexamethyldiisocyanat (HDI) und Isophorondiisocyanat (IPDI).[51] Für medizinische Anwendungen sind die reaktionsträgeren, aliphatischen Isocyanate geeigneter, da sie weniger gesundheitsschädlich sind als die aromatischen Isocyanate.[47] Kommerziell erhältliches IPDI ist ein Gemisch aus *trans*- und *cis*-Isomer, wobei das *cis*-IPDI mit ca. 70 - 75 % überwiegt (**Abbildung 4**).[52]

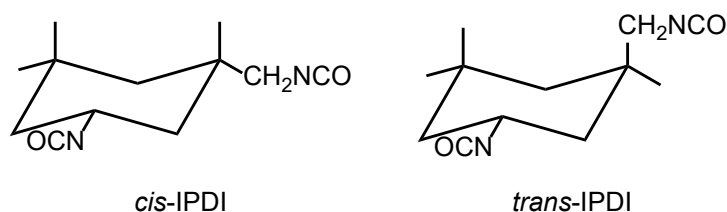


Abbildung 4: *cis*- und *trans*-Isomere des Isophorondiisocyanats. Die sekundäre NCO-Gruppe befindet sich bevorzugt in äquatorialer Position.[52]

Die primäre und die sekundäre Isocyanatgruppe des cycloaliphatischen IPDIs sind zudem unterschiedlich reaktiv. Die Selektivität ist abhängig von der Wahl des Katalysators und von der Reaktionstemperatur.[53] So ist neben dem Einsatz von Additiven (z. B. Vernetzer, Flammschutzmittel, Stabilisatoren) besonders die Verwendung von Katalysatoren für die Herstellung von PUR-Materialien wichtig.[51] Für die Additionsreaktion zwischen NCO- und OH-Gruppe werden Metallkatalysatoren und/oder tertiäre Amine als Katalysator eingesetzt. Metallkatalysatoren wie

Dibutylzinndilaurat (DBTL) fungieren als Lewis-Säure. Sie aktivieren die Isocyanatgruppe indem sie an das Sauerstoffatom koordinieren und dadurch die partiell positive Ladung am Kohlenstoffatom erhöhen. Im Gegensatz dazu wirken tertiäre Amine als Lewis-Basen. Sie aktivieren die Hydroxylgruppe des Polyols indem die Nucleophilie des Sauerstoffatoms erhöht wird.[53] Besonders bei den Metallkatalysatoren ist die sekundäre NCO-Gruppe des IPDI's aus sterischen Gründen reaktiver. LOMÖLDER et al. beobachteten bei der Verwendung des tertiärenamins 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) allerdings eine Inversion der Selektivität.[53] Möglicherweise koordiniert eine tertiäre Aminogruppe an das Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe und die andere tertiäre Aminogruppe koordiniert an das partiell positiv geladene Kohlenstoffatom der sterisch weniger anspruchsvollen, sekundären Isocyanatgruppe, sodass nur die primäre Isocyanatgruppe zugänglich für die Reaktion mit dem Polyol bleibt (**Abbildung 5**).[53]

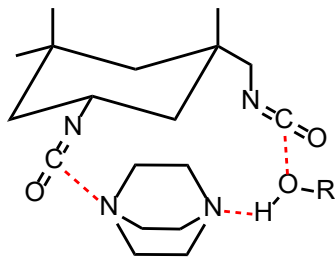


Abbildung 5: Von LOMÖLDER et al. postulierter Katalysemechanismus mit DABCO. (rot gestrichelte Linie = intermolekulare Wechselwirkungen)[53]

Neben der Reaktion zur Urethangruppe kann das Isocyanat auch noch weitere Reaktionen eingehen. Mit Wasser reagieren Isocyanate unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid zu primären Aminen. Diese reagieren dann unter Ausbildung von Harnstoffgruppen (–NH–CO–NH–) mit weiteren NCO-Gruppen (**Abbildung 6**).[46,51]

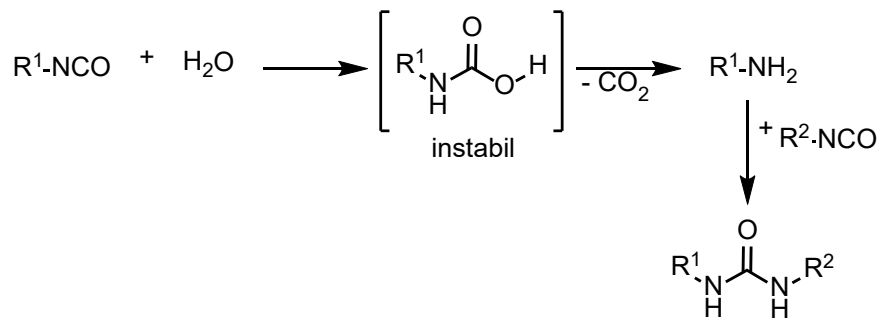


Abbildung 6: Reaktion zwischen Isocyanat und Wasser mit anschließender Ausbildung einer Harnstoffgruppe.[46,51]

Die Harnstoff- und Urethangruppen können mit NCO-Gruppen zu Biureten und Allophanaten reagieren (**Abbildung 7**). Allerdings sind die Nucleophilie und damit auch die Reaktivität dieser beiden Gruppen im Vergleich zu Alkoholen, Aminen und Wasser geringer. Des Weiteren können Isocyanate mit sich selbst Reaktionen eingehen. Sie können polymerisieren, zu Isocyanuraten trimerisieren, zu Uretidionen dimerisieren und unter CO_2 -Abspaltung Carbodiimide bilden. Carbodiimide reagieren über Cycloaddition mit NCO-Gruppen zu Uretonimin (**Abbildung 7**).[46,51]

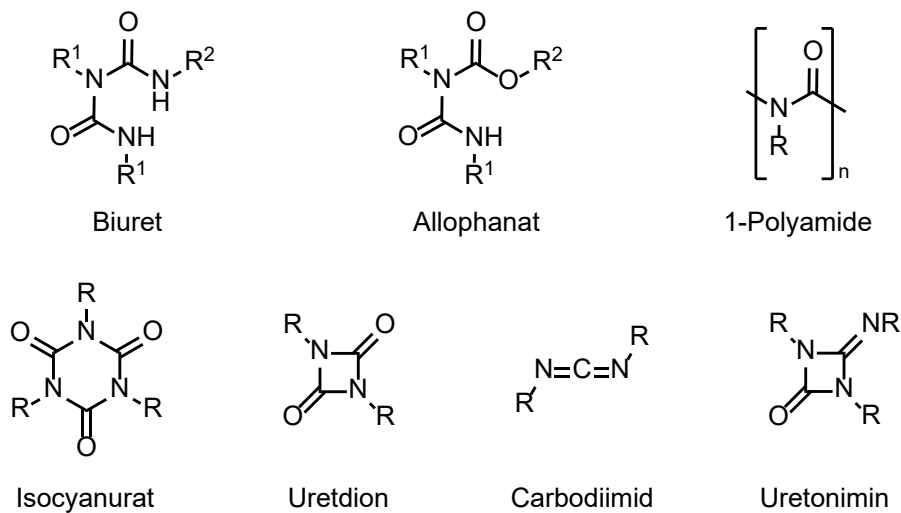


Abbildung 7: Weitere Produkte, die aus Reaktionen mit Isocyanaten hervorgehen können.[46,51]

3. Experimenteller Teil

3.1 Verwendete Chemikalien und deren Handhabung

Bei der Verwendung von sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien und Produkten wurde im Labor Argon (Ar 5.0, 99,999 %) als Inertgas verwendet.

Folgende Lösungsmittel/Chemikalien wurden vor dem Gebrauch mit einem Molekularsieb (Porenweite 3 Å) getrocknet: Hydroxymethylfurfural (HMF, 15 Gew.-%), Tetrahydrofuran (THF, 100 g/L) und Polyethylenglycol (PEG, 15 Gew.-%). Das PEG incl. Molekularsieb wurde für fünf Tage bei 70 °C getrocknet und anschließend in einer Stickstoff-Handschuhbox (*Nitrogen Dry Box*, 850-NB/220, Plas-Labs Inc., Lansing, USA, N₂ 5.0, 99,999 %) gelagert. Das Molekularsieb wurde vor der Verwendung für 12 h bei 350 °C (in 3 h von RT auf 350 °C) im Muffelofen (Modell L9 / SM27, Nabertherm GmbH, Lilienthal, Deutschland) getrocknet und anschließend im Exsikkator zum Abkühlen gelagert. Die getrockneten Chemikalien wurden unter Schutzgas gelagert.

HMF wurde vor jeder Verwendung 1 Stunde bei 45 °C geschmolzen.

Das für wässrige Lösungen und Hydrogele verwendete Wasser (0,055 µS/cm) wurde einem arium® pro VF Reinstwassersystem (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) entnommen.

Alle weiteren Chemikalien wurden ohne vorherige Trocknung und Aufreinigung verwendet. In **Tabelle 1** sind alle verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Summenformel	M / g/mol	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
Borchi® Kat0244	/	/	/	/	OMG Borchers SAS
Chitosan, niedriges Molekulargewicht	(C ₆ H ₁₁ NO ₄) _n	50.000 – 190.000	9012-76-4	76 % (DD)	Sigma-Aldrich
Chloroform-d1	CDCl ₃	120,38	865-49-6	99,8 %	Deutero GmbH
DABCO	C ₆ H ₁₂ N ₂	112,17	280-57-9	98 %	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Summen- formel	M / g/mol	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
Dichlormethan zur Synthese	CH ₂ Cl ₂	84,93	75-09-2	≥ 99,5 %	Carl Roth
Essigsäure, ACS- Reagenz	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	64-19-7	≥ 99,7 %	Sigma- Aldrich
Ethanol 642, verg. MEK	C ₂ H ₆ O	46,07	64-17-5	99 %	Felix Jäger, Chemika- lienportal
Ethylacetat für HPLC	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	141-78-6	≥ 99,7 %	Merck KGaA
Fetales Kälberserum	/	/	1943609 -65-1	/	Sigma- Aldrich
wässrige Glutar- aldehydlösung	C ₅ H ₈ O ₂	100,12	111-30-8	25 %	Sigma- Aldrich
Hydroxymethyl- furfural	C ₆ H ₆ O ₃	126,11	67-47-0	98 %	Fluoro- Chem
2-Hydroxymethyl- methacrylat	C ₆ H ₁₀ O ₃	130,14	868-77-9	≥ 99 %	Sigma- Aldrich
Isophorondiiso- cyanat	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₂	222,29	4098-71- 9	98 %	Sigma- Aldrich
Kieselgel, 60 Å Porengröße, 230 – 400 mesh Partikelgröße, 40 – 63 µm Partikelgröße	SiO ₂	60,08	112926- 00-8	hoch	Supelco Inc.
Methanol, technische Qualität	CH ₄ O	32,04	67-56-1	≥ 98,5 %	VWR Chemicals
Methylenblau	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S · 3H ₂ O	373,9	7220-79- 3	/	Sigma- Aldrich

Chemikalie	Summenformel	M / g/mol	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
Molekularsieb, 3 Å,	K_nNa_{12-n}	/	1318-02-	/	Merck
Perlform, ~ 2 mm Partikelgröße	$[(AlO_2)_{12}(SiO_2)_{12}] \cdot xH_2O$		1		KGaA
Natriumlaurylsulfat	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	288,37	151-21-3	≥ 95 %	Merck KGaA
PEG1000 zur Synthese	$HO(C_2H_4O)_nH$	959	25322- 68-3	/	Merck KGaA
PEG2000 zur Synthese	$HO(C_2H_4O)_nH$	2200	25322- 68-3	/	Merck KGaA
PEG3000 zur Synthese	$HO(C_2H_4O)_nH$	3033	25322- 68-3	/	Merck KGaA
100 x Penicillin- Streptomycin- Lösung	/	/	/	/	Sigma- Aldrich
Phosphatge- pufferte Salzlösung, pH 7,4 bei 25 °C	/	/	/	/	Sigma- Aldrich
Phosphorsäure	H_3PO_4	97,99	7664-38- 2	85 %	Carl Roth
Rinderserum- albumin, pH 7	/	/	9048-46- 8	≥ 96 %	Sigma Life Science
RPMI-1640 Medium mit L- Glutamin und $NaHCO_3$	/	/	/	/	Sigma- Aldrich
Seesand zur Analyse	/	/	7631-86- 9	/	Bernd Kraft - Der Standard

Chemikalie	Summenformel	<i>M</i> / g/mol	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
Tetrahydrofuran, 250 ppm BHT als Inhibitor	C ₄ H ₈ O	72,11	109-99-9	≥ 99 %	Sigma- Aldrich
Trinatriumcitrat, wasserfrei	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	258,07	68-04-2	/	Sigma- Aldrich
Zellproliferations- reagenz WST-1	/	/	/	/	Roche Diagno- stics GmbH
Zitronensäure, erfüllt analytische Spezifikation von BP, Ph. Eur., USP, E330, wasserfrei	C ₆ H ₈ O ₇	192,12	77-92-9	99,5 – 100,5 %	Sigma- Aldrich

3.2 Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen und Untersuchung der Knochenoberfläche

3.2.1 Referenzmaterialien

Der Gewebeklebstoff Histoacryl® (*n*-Butyl-2-cyanoacrylat, B. Braun SE/Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) ist ein Einkomponenten-Klebstoff und wurde in einer Ampulle geliefert. Die Flüssigkeit konnte direkt mit Hilfe der Ampulle appliziert werden.

Der zweite Klebstoff (von hier an BSA-Glue genannt) ähnelt dem kommerziell erhältlichen Zweikomponenten-Gewebeklebstoff BioGlue® (CryoLife Inc., Kennesaw, USA). Die Proteinkomponente Bovines Serumalbumin (BSA, 0,4 g, $6 \cdot 10^{-3}$ mmol) wurde zunächst in einem Citrat-Puffer (1 mL, 204 mM, pH 3) aus Citronensäure (0,171 mmol) und Trinatriumcitrat (0,033 mmol) gelöst. Die Lösung wurde immer frisch hergestellt und nicht länger als einen Tag verwendet. Die BSA-Lösung (100 µL, $4 \cdot 10^{-4}$ mmol, 0,4 g/mL) wurde in ein 3 mL Schnappdeckelglas gegeben und anschließend eine Glutaraldehydlösung (3,2 µL, $8 \cdot 10^{-3}$ mmol, 25 % in Wasser) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit einem Vortexmischer (20 s, 1900 min⁻¹, IKA® MS2

Minishaker) gemischt und danach mit einem Einwegspatel auf die Klebfläche aufgetragen.

Der Knochenzement Palacos® LV (Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Deutschland) wurde vor der Applikation nach Herstellerangaben angefertigt. Dazu wurden die flüssige Komponente (20 mL) und das Polymerpulver (40 g) mit einem Einwegspatel für 2 min vermischt. Die flüssige Komponente enthält Methylmethacrylat, *N,N*-Dimethyl-*p*-toluidin (Beschleuniger), Hydrochinon (Stabilisator/Inhibitor) und den Farbstoff E141 (Chlorophyll). Das Pulver besteht aus Polymethylmethacrylat, Polymethylacrylat, Zirkoniumdioxid (Röntgenkontrastmittel), Benzoylperoxid (Initiator) und E414.

An dieser Stelle möchte ich der Firma Heraeus Medical GmbH für die kostenlose Bereitstellung des Knochenzementes Palacos® LV danken.

3.2.2 Herstellung der Knochenprüfkörper

Die kortikalen Knochenprüfkörper wurden aus Rinderoberschenkelknochen (Fleischerei Olaf Rossol, Bremen, Deutschland) hergestellt (**Abbildung 8**, A). Zunächst wurden Muskel-, Sehnen- und Fleischreste mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurde die Diaphyse des Knochens mit einer Knochensäge (KSH1650, GGM Gastro International GmbH, Ochtrup, Deutschland) in vier Zylinder (35 mm hoch) gesägt (**Abbildung 8**, B). Im Inneren der Zylinder befindet sich Knochenmark, sodass nur der äußere Teil, die Kortikalis, für die Herstellung der Prüfkörper verwendbar ist. Aus jedem Zylinder konnten im besten Fall vier rechteckige, quaderförmige Scheiben (35 x 15 x ca. 4 mm) gesägt werden (**Abbildung 8**, C). Die Knochenscheiben wurden mit Hilfe einer Teller-schleifmaschine (PLANOPOL, Struers GmbH, Hannover, Deutschland) und einem Schleifpapier P80 (WS flex 18 C, Hermes Schleifmittel GmbH, Hamburg, Deutschland) unter Wasserkühlung planparallel auf eine spezifische Dicke von $3,00 \pm 0,15$ mm geschliffen (**Abbildung 8**, D - F). Die Prüfkörper wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von sieben Tagen verwendet. Nach Abschluss der Entwicklung einer Prüfmethode zur Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen wurde die einheitliche Lagerungszeit der Knochen nicht mehr berücksichtigt, um flexibler zu sein. Vergleichsversuche haben ergeben, dass eine Lagerung zwischen einem Tag und ca. zwei Monaten keinen Einfluss auf die Klebfestigkeiten haben.

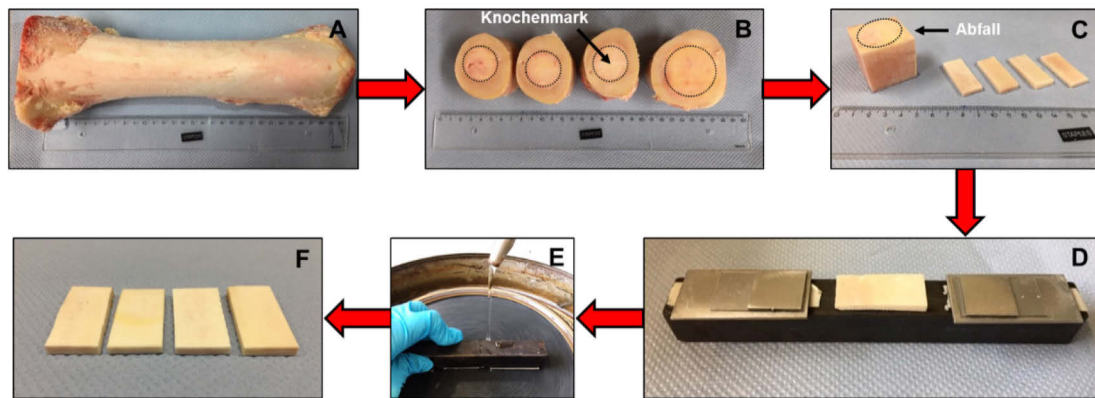


Abbildung 8: Herstellung der Knochenprüfkörper. A: Rinderoberschenkelknochen; B: 35 mm hohe Knochenzylinder mit Knochenmark; C: rechteckige, quaderförmige Knochenscheiben (35 x 15 x ca. 4 mm); D: Knochenscheibe fixiert auf einem Hilfsmittel zum Schleifen mit Abstandshaltern auf beiden Seiten; E: Tellerschleifmaschine; F: fertige Knochenprüfkörper (35 x 15 x 3 mm).[1]

3.2.3 Klebfestigkeit – Druckscherversuche mit Knochenklebungen

Vor dem Kleben wurden die Klebflächen (15 x 10 mm) der Knochenprüfkörper zusätzlich per Hand mit einem feineren Schleifpapier (P800, WS flex 18 C, Hermes Schleifmittel GmbH, Hamburg, Deutschland) bearbeitet. Schleifrückstände wurden mit Druckluft entfernt. Für einige Klebversuche wurden die Klebflächen anschließend angeätzt. Dazu wurde Phosphorsäure (37 % in Wasser) auf die Knochen getropft und nach einer Einwirkzeit von 30 s mit viel Wasser wieder abgespült und mit einem Papiertuch vorsichtig trocken getupft.

Nach der Oberflächenbehandlung wurden Überlappungsklebungen mit einer Überlappungslänge von 10 mm und einem Nullspalt zur Kontrolle der Klebschichtdicke angefertigt (**Abbildung 9, a**). Nach dem einseitigen Klebstoffauftrag mit einem Einwegspatel und dem Fügen der Prüfkörper, wurden zur Fixierung zwei Gewichte mit einer Kraft von insgesamt 9,8 N auf die Überlappungsklebung gelegt.

Nach 24 h Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur (RT) oder unter physiologischen Bedingungen in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS, pH 7,4) bei 37 °C wurde die Klebfestigkeit bzw. die Druckscherfestigkeit der Proben gemessen. Die dafür verwendete Universalprüfmaschine (UTS Testsysteme GmbH & Co. KG, Denkendorf, Deutschland) wurde mit einer Glaszugvorrichtung für spröde Werkstoffe ausgestattet (**Abbildung 9, b**). Die Druckscherversuche wurden mit einer 2,5 kN Kraftmessdose und einer Prüfgeschwindigkeit von 2 mm/min durchgeführt. Jeder Versuch wurde mindestens achtmal wiederholt ($n \geq 8$). Die Klebfestigkeit τ_B ist definiert

als maximal auftretende Kraft F_{max} pro Klebfläche A mit der Probenbreite b und der Überlappungslänge $l_{\dot{u}}$ (**Formel 1**) und wird in N/mm² bzw. MPa angegeben.[54] Die Ergebnisse werden immer als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung aufgeführt.

$$\tau_B = \frac{F_{max}}{b \cdot l_{\dot{u}}}$$

Formel 1: Berechnung der Klebfestigkeit τ_B . [54]

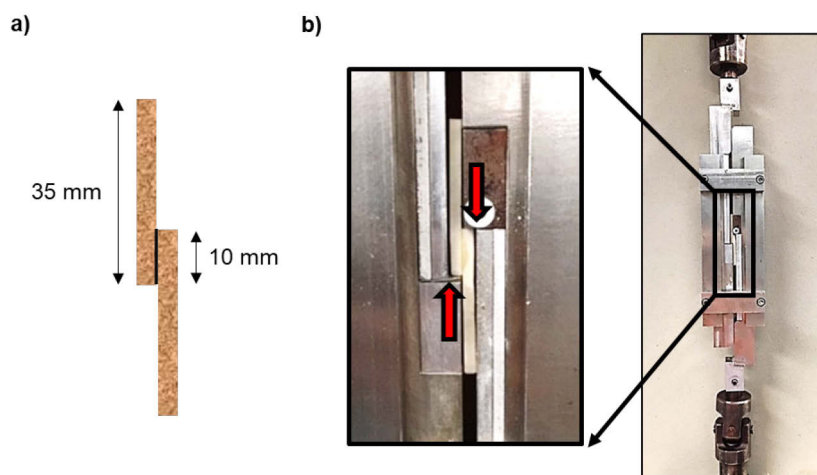


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Überlappungsklebung (a) und Glaszugvorrichtung mit einer Überlappungsklebung (b). Die roten Pfeile veranschaulichen die einwirkende Kraft.[1]

3.2.4 FTIR-Spektroskopie

Die Fourier-Transform-Infrarotspektren (FTIR-Spektren) wurden mit einem ALPHA II Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland), ausgestattet mit einer Platin-Diamant-ATR-Einheit (engl. *attenuated total reflection*), gemessen und mit der OPUS 8.1 Software ausgewertet. Folgende Parameter wurden verwendet: 32 Scans, Auflösung: 2 cm⁻¹, Resultatspektrum: Absorbanz, Messbereich: 4000 – 400 cm⁻¹.

3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde an einem FEI Helios NanoLab 600 Dual-Beam Mikroskop (ThermoFisher, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt. Vor der

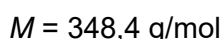
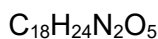
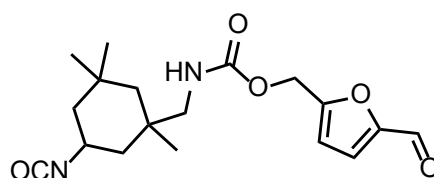
Messung wurde jede Probe mit leitfähigem Iridium beschichtet (ca. 5 nm dick), um das Aufladen der Proben im REM zu verhindern. Die Auflösung bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV betrug 0,9 nm und 1,4 nm bei einer Spannung von 1 kV. Neben REM-Aufnahmen der Probenoberflächen wurden zusätzlich am selben Gerät durch die Verwendung eines fokussierten Ionenstrahls (FIB, engl. *focused ion beam*) Aufnahmen von Querschnitten gemacht. Es wurde ein Galliumionenstrahl und eine Spannung von 30 kV eingesetzt.

Elementaranalysen der Oberflächen und Querschnitte wurden mit der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX, engl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*) unter Verwendung eines Oxford X-Max80-EDX Detektors mit einer Energieauflösung von 129 eV @ Mn-K α durchgeführt. Die Linienmessung (engl. *line scan*) wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV aufgenommen, um eine gute Anregung der Röntgenlinien zu erreichen, ohne die laterale Auflösung zu verschlechtern.

3.3 Synthese der Dialdehyde (Komponente 1)

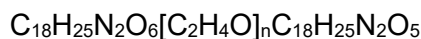
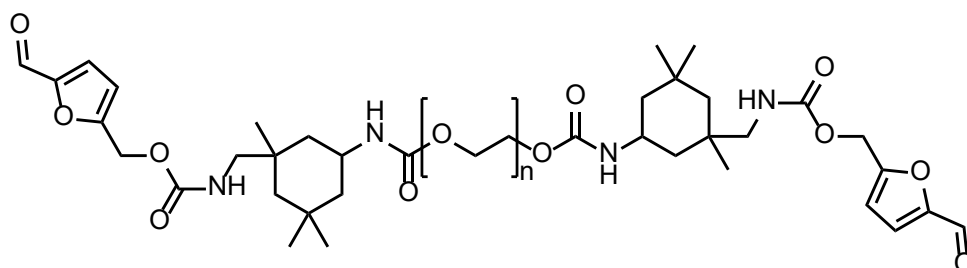
3.3.1 Syntheseroute 1a

Synthese des IPDI-HMF-Monoaddukts



Urethan-Bildung (angelehnt an NEUMANN[55]): In einem 100 mL Zweihalskolben wurden Isophorondiisocyanat (IPDI, 2,89 g, 13,00 mmol) und trockenes THF (6 mL) vorgelegt und bei 50 °C gerührt. Der Katalysator 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO, 0,009 g, 0,081 mmol, 0,6 Mol-%) wurde zunächst separat in trockenem HMF (1,64 g, 13,00 mmol) gelöst. Anschließend wurde die Katalysatorlösung tropfenweise zur IPDI-THF-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei 50 °C unter Schutzgasatmosphäre gerührt. Das braune, hochviskose Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

Umsetzung des Monoaddukts mit PEG



$$\bar{M} = 3729,8 \text{ g/mol}$$

(Abgeleitet von PEG3000 mit $\bar{M} = 3033,0 \text{ g/mol}$. Das Analysenzertifikat des Herstellers gibt nicht an, um welche Art von Mittelwert der Molmasse es sich handelt.)

Urethan-Bildung (angelehnt an NEUMANN [55]): In einem 250 mL Dreihalskolben wurde getrocknetes und zuvor im Ofen (75 °C, 16 h) geschmolzenes PEG3000 (19,71 g, 6,50 mmol) vorgelegt. Der Kolben wurde zweimal evakuiert, mit einem Heißluftföhn erhitzt und nach dem Abkühlen mit Argon geflutet. Anschließend wurde der Kolben in einem Ölbad auf 70 °C erhitzt und so lange evakuiert, bis keine Blasenbildung mehr zu sehen war. Nach ca. 1 h wurde bei 65 °C unter Schutzgasatmosphäre trockenes THF (4,7 mL) hinzugegeben. Anschließend wurde das IPDI-HMF-Monoaddukt (4,53 g, 13,00 mmol) incl. DABCO und THF (6 mL) in weiteren 7,6 mL trockenem THF gelöst und langsam zum PEG getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei 65 °C unter Schutzgasatmosphäre mit einem KPG-Rührer gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde ein orangebraunes Produktgemisch erhalten. Zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen wurde das Rohprodukt chromatographisch (SiO₂, 1. Ethylacetat, 2. DCM, 10 % MeOH) mit einer Glasfilternutsche (Porengröße 4) incl. Saugflasche aufgearbeitet (**Abbildung 10**, b). Dabei wurden zunächst die niedermolekularen Verbindungen mit Ethylacetat entfernt und anschließend das hellorange, polymere Produktgemisch mit dem gewünschten Produkt (20,36 g, 86 %)* aus dem Kieselgel herausgewaschen.

*Die Ausbeute wird nicht als Stoffmenge angegeben, da es sich um ein Produktgemisch handelt (siehe **Kapitel 4.2.3**).

3.3.2 Syntheseroute 1b

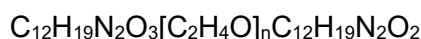
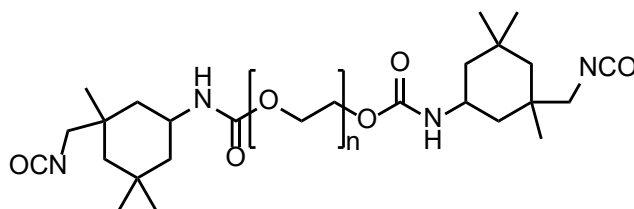
Die Syntheseroute 1b ist analog zur Syntheseroute 1a durchgeführt worden. Allerdings wurde das Monoaddukt in diesem Fall im Überschuss zu dem vorgelegten PEG

gegeben. Anstelle von zwei Äquivalenten Monoaddukt (13,00 mmol) und einem Äquivalent PEG (6,50 mmol), wurden vier Äquivalente Monoaddukt (26,00 mmol) und ein Äquivalent PEG (6,50 mmol) verwendet. Das polymere Produktgemisch mit dem gewünschten Produkt (19,67 g, 88 %)* wurde nach chromatographischer Aufreinigung als helloranger Feststoff erhalten.

*Die Ausbeute wird nicht als Stoffmenge angegeben, da es sich um ein Produktgemisch handelt (siehe **Kapitel 4.2.3**).

3.3.3 Syntheseroute 2

Synthese des IPDI-funktionalisierten PEGs

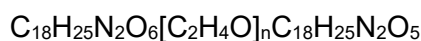
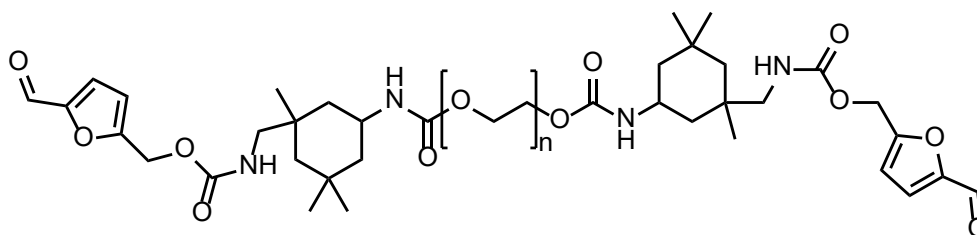


$$\bar{M} = 3477,6 \text{ g/mol}$$

(Abgeleitet von PEG3000 mit $\bar{M} = 3033,0 \text{ g/mol}$. Das Analysenzertifikat des Herstellers gibt nicht an, um welche Art von Mittelwert der Molmasse es sich handelt.)

Urethan-Bildung (angelehnt an SUNDARARAJAN et al.[56]): In einem 250 mL Dreihalskolben wurde vorgetrocknetes und zuvor im Ofen (75 °C, 16 h) geschmolzenes PEG3000 (21,69 g, 7,15 mmol) vorgelegt (**Abbildung 10**, a). Der Kolben wurde zweimal evakuiert, mit einem Heißluftföhn erhitzt und nach dem Abkühlen mit Argon geflutet. Anschließend wurde der Kolben in einem Ölbad auf 70 °C erhitzt und so lange evakuiert bis keine Blasenbildung mehr zu sehen war (ca. 1 h). Unter Schutzgasatmosphäre konnte der Kolben incl. PEG auf 60 °C abkühlen. Es wurden 12 mL trockenes THF über ein Septum hinzugegeben und in weiteren 8 mL trockenem THF wurde der Borchl® Kat0244 (7,5 mg, 0,03 Gew.-%) separat gelöst. Die Katalysatorlösung wurde ebenfalls in den Kolben gegeben. Nach Zugabe von IPDI (3,26 g, 14,70 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 4,5 h bei 60 °C unter Schutzgasatmosphäre mit einem KPG-Rührer gerührt. Zur Reaktionskontrolle wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen und nach Entfernung des Lösungsmittels mit einem Vakuum-Aufsatz am FTIR-Spektrometer untersucht. Das Produktgemisch mit dem gewünschten Zwischenprodukt wurde nicht aufgearbeitet, sondern am nächsten Tag direkt im selben Kolben weiterverarbeitet.

Umsetzung des IPDI-funktionalisierten PEGs mit HMF



$$\bar{M} = 3729,8 \text{ g/mol}$$

(Abgeleitet von PEG3000 mit $\bar{M} = 3033,0 \text{ g/mol}$. Das Analysenzertifikat des Herstellers gibt nicht an, um welche Art von Mittelwert der Molmasse es sich handelt.)

Urethan-Bildung: In einem 250 mL Dreihalskolben befand sich bereits das zuvor hergestellte IPDI-funktionalisierte PEG3000 (24,86 g, 7,15 mmol) unter Schutzgasatmosphäre und wurde zunächst bei 60 °C geschmolzen (**Abbildung 10, a**). Nach Abkühlen auf 50 °C wurde geschmolzenes und trockenes HMF (1,90 g, 15,10 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5,5 h bei 50 °C unter Schutzgasatmosphäre mit einem KPG-Rührer gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde ein orangebraunes Produktgemisch erhalten. Zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen wurde das Rohprodukt chromatographisch (SiO₂, 1. Ethylacetat, 2. DCM, 10 % MeOH) mit einer Glasfilternutsche (Porengröße 4) incl. Saugflasche aufgearbeitet (**Abbildung 10, b**). Dabei wurden zunächst die niedermolekularen Verbindungen mit Ethylacetat entfernt und anschließend das hellorange, polymere Produktgemisch mit dem gewünschten Produkt (21,00 g, 79 %)* aus dem Kieselgel herausgewaschen.

*Die Ausbeute wird nicht als Stoffmenge angegeben, da es sich um ein Produktgemisch handelt (siehe **Kapitel 4.2.3**).

Die Syntheseroute 2 wurde auch mit PEG1000 ($\bar{M} = 959,0 \text{ g/mol}$) und PEG2000 ($\bar{M} = 2200,0 \text{ g/mol}$) durchgeführt (**Tabelle 2** und **Tabelle 3**).

Tabelle 2: Einwaagen für die Synthese mit PEG1000.

	Äquivalente	Stoffmenge	Masse bzw. Volumen
PEG1000	1,00 eq	17,00 mmol	16,30 g
IPDI	2,05 eq	34,90 mmol	7,75 g
Borchi® Kat0244	0,03 Gew.-%	/	7,2 mg
THF	/	/	19 mL
HMF	2,11 eq	35,90 mmol	4,53 g

Tabelle 3: Einwaagen für die Synthese mit PEG2000.

	Äquivalente	Stoffmenge	Masse bzw. Volumen
PEG2000	1,00 eq	13,00 mmol	28,60 g
IPDI	2,05 eq	26,70 mmol	5,92 g
Borchi® Kat0244	0,03 Gew.-%	/	10,4 mg
THF	/	/	28 mL
HMF	2,11 eq	27,50 mmol	3,46 g

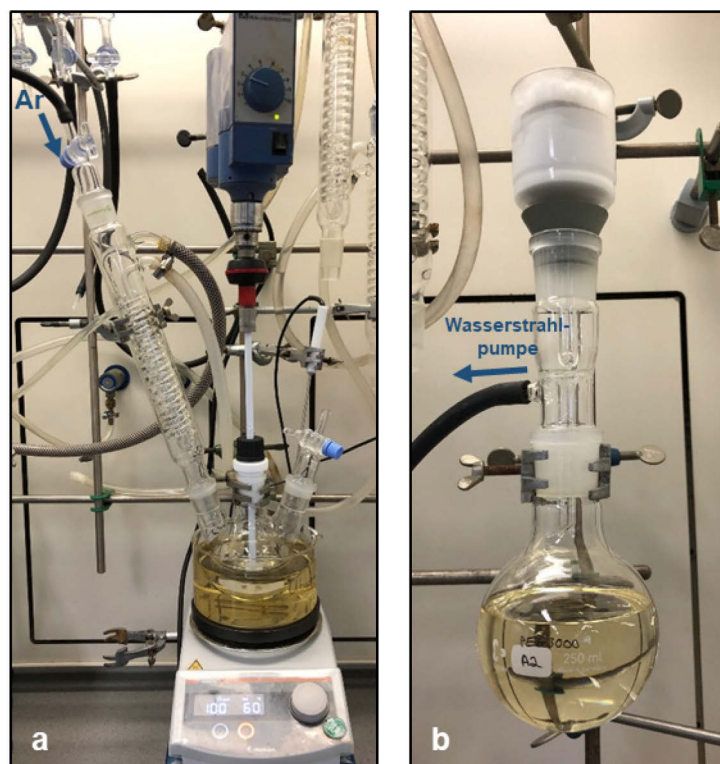
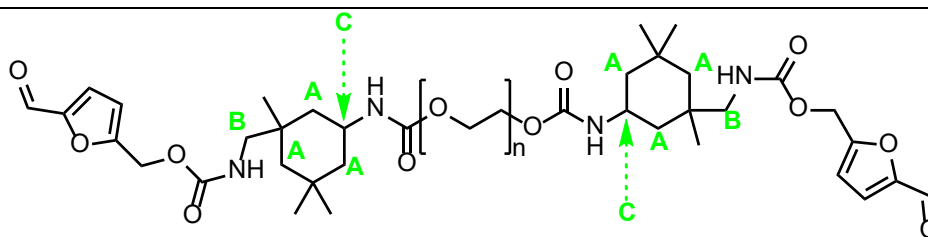


Abbildung 10: Versuchsaufbau für die Synthese des Dialdehyds: Dreihalskolben mit Rückflusskühler, KPG-Rührer und Anschluss an die Schlenkline (a). Chromatographische Aufreinigung des Dialdehyds (b).

3.3.4 NMR- und IR-spektroskopische Daten

In **Tabelle 4** und **Tabelle 5** sind die ^1H NMR-Daten und die ^{13}C NMR-Daten der mit Syntheseroute 1a, b und 2 hergestellten Dialdehyde aufgeführt.

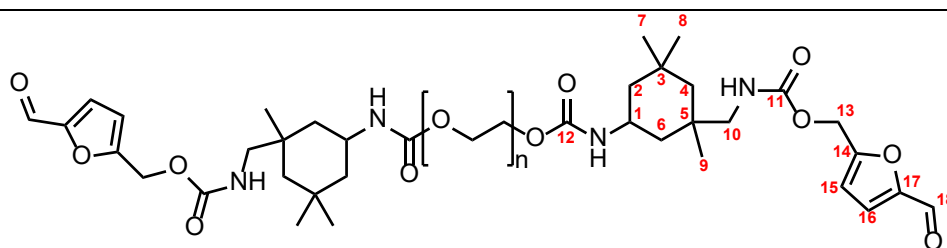
Tabelle 4: ^1H NMR-Daten (600 MHz, CDCl_3) des Dialdehyds3000.



chem. Verschiebung δ / ppm	Multiplizität ^a	Integral	Zuordnung
9,59	s	2 H ^b	CHO (HMF)
7,18	m	2 H	CH (HMF)
6,55	m	2 H	CH (HMF)
5,08 und 5,05	2 x s	4 H	CH ₂ (HMF)
4,95 – 4,89	m	2 H	B-Teil des IPDI
4,65	m	2 H	C-Teil des IPDI
4,29 – 4,27 und 4,17 – 4,15	2 x m	8 H	B-Teil des IPDI
3,78 – 3,74	m	2 H	C-Teil des IPDI
3,70 – 3,56	m	493 H	CH ₂ (PEG)
3,32 – 3,16	m	1 H	A-Teil des IPDI
2,90 – 2,87	m	5 H	B-Teil des IPDI
2,39	br. s	1 H	NH
1,84 – 1,80; 1,69 – 1,63; 1,37 – 1,32; 1,17 – 1,12	mehrere m	9 H	A-Teil des IPDI
1,22; 1,02 – 0,99; 0,89; 0,84	mehrere m	31 H	3 x CH ₃ (IPDI)
0,97 – 0,94; 0,85 – 0,80	mehrere m	6 H	A-Teil des IPDI

^a: Abkürzungen: s = Singulett, br. s = breites Singulett, m = Multiplett. ^b: Da das Dialdehyd zwei CHO-Gruppen besitzt, wurde das CHO-Signal auf 2 H normiert. Alle anderen Integrale beziehen sich folglich auf das CHO-Integral.

Tabelle 5: ^{13}C NMR-Daten (600 MHz, CDCl_3) des Dialdehyds3000.



chem. Verschiebung δ / ppm	DEPT135 ^a	Zuordnung ^b
177,6	CH/CH₃	CHO (HMF)
160,9	C	keine Zuordnung möglich
156,7 – 155,5	C	C-12, C-14 (HMF)
154,6	C	C-11
152,6	C	C-17 (HMF)
121,8 (breit)	CH/CH₃	C-16 (HMF)
2 x 112,1	CH/CH₃	C-15 (HMF)
71,4	CH ₂	PEG
70,4	CH ₂	PEG
69,5	CH ₂	PEG
63,8 und 63,6	CH ₂	C-10 (IPDI, Signal B)
58,2 und 58,0	CH ₂	C-13 (HMF)
54,9; 54,8 und 54,6	CH ₂	C-10 (IPDI, Signal B)
47,6 und 47,5	CH ₂	IPDI, Signal A
47,3 und 47,1	CH ₂	IPDI, Signal A
2 x 46,8	CH ₂	IPDI, Signal A
2 x 46,1; 45,9 und 45,8	CH ₂	IPDI, Signal A
44,8 und 44,5	CH/CH₃	C-1 (IPDI, Signal C)
42,3	CH ₂	IPDI, Signal A
2 x 41,7 und 41,5	CH ₂	IPDI, Signal A
36,3; 36,2; 36,1 und 36,0	C	C-5 (IPDI)

34,9	CH/CH ₃	C-8 (IPDI)
2 x 31,7	C	C-3 (IPDI)
29,6 und 29,5	CH/CH ₃	C-9 (IPDI, trans)
27,6; 27,5 und 27,4	CH/CH ₃	C-7 (IPDI)
23,2 und 2 x 23,1	CH/CH ₃	C-9 (IPDI, cis)

a: Das DEPT135-Experiment gibt Auskunft über Anzahl der benachbarten Protonen bzw. über die Art des C-Atoms. Bei zwei in Frage kommenden Gruppen, ist die nach Auswertung aller NMR-Daten wahrscheinlichere Variante fettgedruckt. **b:** Die Bezeichnung „Signale A – C“ bezieht sich auf das ¹H NMR-Spektrum. Die A-Signale gehören zu den C-Atomen C-2, C-4 und C-6.

In **Tabelle 6** sind die IR-Banden der mit Syntheseroute 1a, b und 2 hergestellten Dialdehyde aufgeführt. Die unterschiedlich synthetisierten Dialdehyde und die Dialdehyde auf Basis unterschiedlich großer PEGs weisen alle dieselben Banden $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$ auf.

Tabelle 6: Charakteristische IR-Banden des Dialdehyds und die zugeordneten Schwingungstypen.[57]

IR-Bande bzw. Wellenzahl / cm^{-1}	Schwingungstyp
508 (w)	– (auch im PEG)
528 (w)	– (auch im PEG)
841 (s)	– (auch im PEG)
945 (s)	– (auch im PEG)
957 (s)	– (auch im PEG)
1060 (s)	C–O-Valenzschwingung
1102 (s)*	C–O-Valenzschwingung
1145 (s)	C–O-Valenzschwingung
1240 (s)	C–O-Valenzschwingung
1279 (m)	C–O-Valenzschwingung
1305 (w)	– (auch in den beiden Vorstufen ¹)
1342 (s)	C–O-Valenzschwingung
1359 (w)	– (auch im PEG)
1453 (w)	C–H-Deformationsschwingung
1465 (m)	C–H-Deformationsschwingung
1527 (w), breites Signal	N–H-Deformationsschwingung
1527 (m), breites Signal	C=C-Valenzschwingung (Aromat)
1678 (m)	C=O -Valenzschwingung (α,β -; γ,δ -ungesättigtes Aldehyd)
1716 (m)	C=O-Valenzschwingung (Urethan)
2960 – 2692 (s)	gesättigte C–H-Valenzschwingungen
3330 (w)	N–H-Valenzschwingung

Abkürzungen: s = stark, m = mittel und w = wenig intensiv. *intensivste Bande

1: Vorstufen = Monoaddukt bzw. IPDI-funktionalisiertes PEG

3.4 Charakterisierung der Dialdehyde

Die Dialdehyde wurden mittels FTIR-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie, MALDI-ToF-Massenspektrometrie, Gel-Permeations-Chromatographie und UV/VIS-Spektroskopie charakterisiert. Außerdem wurden das Löslichkeitsverhalten und die Biokompatibilität untersucht. Auf die FTIR-Spektroskopie wird im Folgenden nicht mehr eingegangen, da diese Analytikmethode bereits in **Kapitel 3.2.4** beschrieben wurde.

3.4.1 NMR-Spektroskopie

Die Messungen der Kernspinresonanzspektren (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*) erfolgten an einem Bruker AVANCE NEO 600 MHz-Spektrometer. Die ^1H NMR-Spektren wurden auf das CDCl_3 -Signal bei 7,26 ppm referenziert und die ^{13}C NMR-Spektren auf das zentrale CDCl_3 -Signal bei 77,0 ppm. Zur genaueren Zuordnung der Signale wurden zusätzliche DEPT135-Experimente (engl. *distorsionless enhancement by polarisation transfer*) und 2D-NMR-Experimente durchgeführt: ^1H , ^1H -COSY (engl. *correlation spectroscopy*), HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*), HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit MestReNova v10.0.2-15465.

3.4.2 MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Die Proben für die matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI, engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*) mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (ToF-MS, engl. *time of flight mass spectrometry*) wurden in Dichlormethan (DCM) gelöst (1 mg/mL) und mit einer DCTB Matrix (*trans*-2-[3-(4-*tert*-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenyliden]-malonsäuredinitril) in einem Verhältnis von 1 : 9 gemischt (Matrixlösung: 10 mg/mL in DCM mit 0,01 % Natriumsalz der Trifluoressigsäure (NaTFA)). Anschließend wurde die Mischung (1 μL) auf den Probenträger aufgetragen („*dried droplet*“-Methode). Nach Verdunsten des Lösungsmittels wurden die Massenspektren mit einem Autoflex Speed LRF MALDI-ToF-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland), ausgestattet mit einem Bruker Smartbeam-II Laser (Nd:YAG, 355 nm), im positiven Ionenmodus akquiriert (Software: Bruker Daltonics flexControl 3.4). Im Massenbereich von 1 – 7 kDa wurde im Reflektormodus gemessen und mit einer Standardlösung aus PEG3000 und PEG4000 auf die monoisotopischen Massen kalibriert. Im Massenbereich von 4 – 20 kDa wurde im Linearmodus gemessen und mit PEG6000 als Standard auf die durchschnittlichen Massen kalibriert. Die

Spektren wurden mit dem Programm Flex Analysis und PolyTools ausgewertet (Software: Bruker Daltonics flexAnalysis 3.4 und Bruker Daltonics PolyTools 1.31).

3.4.3 Gel-Permeations-Chromatographie

Die Untersuchung der Dialdehyde mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) wurde von der Firma PSS Polymer Standards Service GmbH durchgeführt. Die GPC-Anlage ist mit einem PSS SECcurity 1260 Autosampler (20 µL Injektionsvolumen), einer PSS SECcurity 1260 HPLC-Pumpe und einem PSS SECcurity 1260 Differentialrefraktometer RI-Detektor (engl. *refractive index detector*) ausgestattet. Als Vorsäule wurde eine PSS SDV (Styrol-Divinylbenzol-Copolymernetzwerk) Guard-Säule (Partikelgröße 3 µm, 8,0 x 50 mm) verwendet und anschließend drei hintereinander geschaltete PSS SDV Trennsäulen (Partikelgröße 3 µm, Porengröße 1000 Å, 8,0 x 300 mm). Als Eluent wurde THF eingesetzt und die Proben wurden mit einer Konzentration von 5,0 g/L injiziert. Die Messungen wurden mit einer Flussrate von 1,0 mL/min bei 23 °C durchgeführt. Zur Auswertung der Messdaten wurde eine Kalibrierung mit PEG-Standards herangezogen und die Software PSS-WinGPC UniChrom Version 8.3 benutzt.

3.4.4 UV/VIS-Spektroskopie (CHO-Gehalt Bestimmung)

Zur Bestimmung des Aldehyd-Gehalts (CHO-Gehalts) der Produktgemische wurde die UV/VIS-Spektroskopie (ultraviolettes und sichtbares Licht, engl. *visible*) verwendet, da die Aldehyd-Gruppe Teil der UV-aktiven HMF-Einheit des funktionalisierten Polymers ist. Zunächst erfolgte eine Kalibrierung mit einer Verdünnungsreihe von HMF (3-fach Bestimmung). Es wurde eine wässrige 0,005 M HMF-Stammlösung angesetzt und daraus zehn Verdünnungen mit Konzentrationen von 10 µM bis 100 µM hergestellt. Die Absorptionsspektren der Verdünnungen wurden mit einem SPECORD®210 PLUS Zweistrahl-Spektralphotometer (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) und Verwendung von Makro-Küvetten (QS – Quarzglas High Performance, 3,5 mL Fassungsvermögen, Lichtweg 10 mm, 200 – 2500 nm) im Bereich von 190 – 400 nm aufgenommen. Folgende Parametereinstellungen wurden verwendet: Spalt 1 nm, Messmodus Scan, Schrittweite 1 nm, Geschwindigkeit 50 nm/s. Als Referenz diente Luft. Das zur Kalibrierung verwendete Absorptionsmaximum liegt bei 284/285 nm. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software WinASPECT PLUS.

Jede Probe wurde dreimal gemessen und das Absorptionsmaximum anschließend als Mittelwert angegeben.

Für die Polymerproben wurden ebenfalls wässrige Stammlösungen angesetzt und verdünnt (**Tabelle 7**). Die Lösungen wurden so angesetzt, dass das Absorptionsmaximum ungefähr im Bereich von 0,5 bis 1,5 liegt. Sowohl die Herstellung der zu messenden Probelösung als auch die Messung einer Küvette mit Probe erfolgte in 3-fach Bestimmung.

Tabelle 7: Herstellung der Probelösungen für die Bestimmung des CHO-Gehalts.

Produktgemisch	Einwaage pro 100 g Wasser	Verdünnung
auf Basis von	(Stammlösung)	Stammlösung : Wasser
PEG1000	0,0160 g	1 : 3
PEG2000	0,0208 g	1 : 2
PEG3000	0,0186 g	1 : 1

3.4.5 Löslichkeitsverhalten

Die hergestellten Dialdehyde wurden auf ihr Löslichkeitsverhalten in Wasser untersucht. Dazu wurden die Polymere in Konzentrationen von bis zu 1,4 g/mL mit Reinstwasser gemischt und 1 – 3 h mit einem Magnetrührstab in einem 3 mL Schnappdeckelglas gerührt. Des Weiteren wurden Löslichkeitsversuche durchgeführt, bei denen zusätzlich zum Wasser entweder Ethanol (EtOH) oder das Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*) hinzugefügt wurden. Bei den Versuchen mit Ethanol sind 100 Vol.-%, 75 Vol.-%, 50 Vol.-%, 25 Vol.-%, 20 Vol.-%, 15 Vol.-% oder 10 Vol.-% EtOH bezüglich der Menge an Reinstwasser eingesetzt worden. Bei der Verwendung von SDS wurden 5 Mol-%, 10 Mol-%, 15 Mol-% oder 20 Mol-% bezogen auf die eingewogene Menge Dialdehyd benutzt. Außerdem wurde zur besseren Durchmischung der Vortexmischer (ca. 1 min, 1900 min⁻¹, IKA® MS2 Minishaker) verwendet.

Neben der visuellen Beurteilung der Proben, wurden zwei Proben (Dialdehyd auf PEG2000- und PEG3000-Basis, 0,7 g/mL in Wasser) mit der dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht. Die Messung der Partikelgröße wurde mit der Li.S.A (Lichtstreuuanlage, Fraunhofer IFAM, Bremen, Deutschland) bei 25 °C durchgeführt und fünfmal wiederholt. Der verwendete Laser hat eine Wellenlänge von 633 nm. Die Proben

wurde vor der Messung in einem Verhältnis von 1 : 100 mit Wasser verdünnt und 0,5 mL in die für die DLS verwendete Makro-Einwegküvette (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland, PMMA, 4,2 mL Fassungsvermögen, Lichtweg 10 mm, ab 300 nm) gefüllt. Das Dialdehyd1000 (0,3 g/mL in Wasser) wurde ebenfalls in verdünnter Form (1 : 100) mit der Lichtstreuanlage gemessen. In diesem Fall wurde dem Polymer-Wasser-Gemisch aber entweder 15 Mol-% SDS hinzugefügt oder anstatt Wasser ein Gemisch aus 25 Vol.-% EtOH und 75 Vol.-% Wasser verwendet.

3.4.6 Biokompatibilität

Für die Bestimmung der Biokompatibilität wurden L-929 Fibroblasten (Spezies: *Mus musculus* (Hausmaus), DSMZ no: ACC 2, Braunschweig, Deutschland) benutzt, welche in dem Zellkulturmedium RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) mit L-Glutamin (445 mL), 50 mL bzw. 10 Vol.-% Fetalem Kälberserum und 5 mL bzw. 1 Vol.-% Antibiotikum (100 U Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin) kultiviert wurden.

Die Biokompatibilität wurde mit dem WST-1-Assay (engl. *water soluble tetrazolium*) überprüft. Dazu wurden die L-929 Zellen in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät (10⁴ Zellen pro Well, 100 µL Zellkulturmedium pro Well) und für 24 h im Inkubator (MCO-18AIC, Sanyo, Moriguchi, Japan) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die zu untersuchenden Polymerproben wurden in vier unterschiedlichen Konzentrationen im Zellkulturmedium gelöst: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,1 mg/mL und 0,01 mg/mL. Nach der Inkubation der Zellen wurde das Medium entfernt und pro Well 100 µL der Probenlösungen auf die Zellen pipettiert. Für die Negativkontrolle wurden 100 µL Medium pro Well appliziert und für die Positivkontrolle wurde das Medium mit 10 % HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) verwendet. Sowohl die Proben als auch die Positiv- und Negativkontrolle wurden 5-fach bestimmt. Anschließend wurde wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und sofort 150 µL verdünntes WST-1-Reagenz (1 : 30 im Medium) pro Well appliziert. Zusätzlich wurden drei leere Wells mit dem WST-1-Reagenz befüllt (Leerwert). Nach 2 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) wurde von jedem Well 100 µL Überstand in eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und die Absorption mit dem Mikroplatten-Reader (Infinite M Nano, TECAN Group AG, Männedorf, Schweiz) und der Software Magellan 7.2 bei 450 nm gemessen. Der Mittelwert der drei Leerwertmessungen wurde von allen anderen gemessenen Werten subtrahiert. Die Absorption der Negativkontrolle bei 450 nm wurde standardmäßig als 100 % Zellviabilität bzw. Zelllebensfähigkeit angenommen. Die Werte der Proben und der Positivkontrolle wurden in Relation zur Negativkontrolle betrachtet.

3.5 Herstellung der Hydrogele (Komponente 1 + Komponente 2)

Hydrogele aus Dialdehyd und Chitosan

Für die Herstellung der Hydrogele wurde das Chitosan über Nacht mit einem Magnetrührstab in verdünnter Essigsäure (1 % in Wasser) gelöst. Es wurden Stammlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Das Dialdehyd wurde ca. 2 h vor der Verwendung in Wasser dispergiert. Die Dispersionen der Dialdehyde wurden immer frisch hergestellt und innerhalb eines Tages verbraucht. In einem Schnappdeckelglas (3 mL oder 5 mL) wurde die Chitosanlösung gravimetrisch mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette vorgelegt. Danach wurde die Dispersion aus Dialdehyd in Wasser zügig und ebenfalls gravimetrisch mit einer Eppendorf-Pipette hinzugegeben. Die beiden Komponenten wurden mit einem Vortexmischer (20 s, 1900 min⁻¹) homogenisiert und direkt für den jeweiligen Versuch verwendet.

Bei der Präparation der Hydrogele wurde sowohl der Wassergehalt als auch das Verhältnis der funktionellen Gruppen (Aminogruppen (NH₂) des Chitosans, Aldehydgruppen (CHO) des Dialdehyds) variiert.

Das verwendete Chitosan hat einen Deacetylierungsgrad (*DD*, engl. *degree of deacetylation*) von 76 %. Demnach bestehen 76 % des Polyamins aus Wiederholeinheiten von Chitosan (Glucosamin) und 24 % aus Wiederholeinheiten von Chitin (*N*-Acetylglucosamin). Mit den molaren Massen der Wiederholeinheiten für Chitosan ($M_m = 161,15 \text{ g/mol}$) und für Chitin ($M_n = 203,19 \text{ g/mol}$) wurde eine mittlere molare Masse für die Wiederholeinheit des Polyamins (Chitosan mit 76 % *DD*) berechnet: $M_x = 171,24 \text{ g/mol}$ (**Formel 2**).

$$M_x = \frac{DD \cdot M_m + (100 - DD) \cdot M_n}{100 \%}$$

Formel 2: Berechnung der mittleren molaren Masse (M_x) der Wiederholeinheit des Polyamins bzw. des Chitosans mit einem *DD* von 76 %.

Zudem gilt, dass eine Stoffmenge n von 1 mol bzw. 171,24 g des Polyamins 0,76 mol NH₂-Gruppen enthalten. Da der HMF-Anteil in dem Dialdehyd die CHO-Gruppe trägt, gelten folgende Stoffmengenbeziehungen:

Tabelle 8: Verwendete NH₂/CHO-Verhältnisse und die zugehörigen Stoffmengen des Chitosans mit einem *DD* von 76 % und des HMFs. Die Abkürzung „NH₂ = CHO“ bedeutet, dass die beiden funktionellen Gruppen in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen.

NH ₂ /CHO	Berechnung der Stoffmengen
NH ₂ = CHO (1 : 1)	$n_x (\text{Polyamin}) = \frac{n (\text{HMF})}{0,76}$
NH ₂ > CHO (3 : 2), CHO konst. ^a	$n_x (\text{Polyamin}) = \frac{3}{2} \cdot \frac{n (\text{HMF})}{0,76}$
NH ₂ < CHO (2 : 3), CHO konst. ^a	$n_x (\text{Polyamin}) = \frac{2}{3} \cdot \frac{n (\text{HMF})}{0,76}$
NH ₂ << CHO (1 : 2), CHO konst. ^a	$n_x (\text{Polyamin}) = \frac{1}{2} \cdot \frac{n (\text{HMF})}{0,76}$
NH ₂ > CHO (3 : 2), NH ₂ konst. ^b	$n (\text{HMF}) = \frac{2}{3} \cdot n_x (\text{Polyamin}) \cdot 0,76$
NH ₂ < CHO (2 : 3), NH ₂ konst. ^b	$n (\text{HMF}) = \frac{3}{2} \cdot n_x (\text{Polyamin}) \cdot 0,76$
NH ₂ << CHO (1 : 2), NH ₂ konst. ^b	$n (\text{HMF}) = 2 \cdot n_x (\text{Polyamin}) \cdot 0,76$

a: „CHO konst.“ bedeutet, dass ausgehend von den Stoffmengen, die beim äquimolaren Verhältnis verwendet wurden, nur die Stoffmenge des Polyamins entsprechend des NH₂/CHO – Verhältnisses variiert wird. **b:** „NH₂ konst.“ bedeutet dementsprechend, dass nur die Stoffmenge des HMFs variiert wird.

Die Einwaage bzw. die einzusetzende Masse des Polyamins wurde mit der mittleren molaren Masse der Wiederholeinheit des Polyamins ($M_x = 171,24 \text{ g/mol}$) und der Stoffmenge n_x (Polyamin) berechnet. Die Stoffmenge n (HMF) und die molare Masse des HMFs ($M = 126,11 \text{ g/mol}$) wurden zur Berechnung der Masse m (HMF) verwendet. Anschließend konnte aus der Masse m (HMF) und dem, mit der UV/VIS-Spektroskopie ermittelten HMF-Gehalt bzw. CHO-Gehalt (**Kapitel 3.4.4**) des jeweiligen Dialdehyds die Einwaage für das Dialdehyd berechnet werden.

Die Hydrogele wurden mit vier unterschiedlichen Wassergehalten hergestellt (Wassergehalt-1 bis -4). Der Wassergehalt-1 hatte ein Gesamtvolumen von 597 μL . Das Chitosan wurde dabei in 437 μL verdünnter Essigsäure (HAc, 1 % in Wasser) gelöst und das Dialdehyd in 160 μL Wasser dispergiert, sodass sich ein Wasser/Säure-Verhältnis von 0,37 ergeben hat. Das Volumen bezieht sich auf eine Ansatzgröße, die für das Kleben eines Knochenpaares nötig ist und berücksichtigt die Löslichkeits- bzw.

Dispergierbarkeitsgrenzen der beiden Komponenten. Die anderen drei Wassergehalte hatten ein Gesamtvolumen von 716 μL (Wassergehalt-2), 836 μL (Wassergehalt-3) und 955 μL (Wassergehalt-4). In diesen Fällen wurde das Wasser als dritte Komponente behandelt: Nach dem Vorlegen der Chitosanlösung (Chitosan in 437 μL verdünnter HAC) wurde zunächst die entsprechende Menge „Wasser“ mit einem Wasser/Säure-Verhältnis von 0,37 ergänzt (119 μL , 239 μL bzw. 358 μL), um das gewünschte Gesamtvolumen (Wassergehalt-2 bis -4) zu erhalten. Anschließend wurde die Chitosanlösung mit dem zusätzlichen „Wasser“ homogenisiert (Vortexmischer, 20 s, 1900 min^{-1}). Erst danach wurde das Dialdehyd hinzugefügt.

In den folgenden Tabellen sind die Einwaagen für die einzelnen Hydrogele mit dem Wassergehalt-1 (597 μL) aufgelistet.

Tabelle 9: Einwaagen für Hydrogele mit einem $\text{NH}_2 = \text{CHO}$ – Verhältnis (äquimolar), Wassergehalt-1 und einem Dialdehyd auf PEG1000-, PEG2000- oder PEG3000-Basis.

$\text{NH}_2 = \text{CHO}$, Wassergehalt-1					
Chitosan mit <i>DD</i> 76 % bzw. Polyamin		Dialdehyd mit:	PEG1000	PEG2000	PEG3000
n_x (Polyamin) in mmol	0,05	n (HMF) in mmol	0,04	0,04	0,04
n (NH_2) in mmol	0,04	n (CHO) in mmol	0,04	0,04	0,04
		m (HMF) in mg	4,9	4,9	4,9
m (Polyamin) in mg	8,7	m (Dialdehyd) in mg	52,2	94,4	111,9
V (verd. HAC) in mL	0,437	V (Wasser) in mL	0,160	0,160	0,160
c (Polyamin) in verd. HAC in g/mL	0,020	c (Dialdehyd) in Wasser in g/mL	0,326	0,590	0,699

Für weitere Hydrogele mit PEG1000, PEG2000 und PEG3000, dem Wassergehalt-1, aber anderen NH_2/CHO – Verhältnissen werden nur die Werte für das Chitosan angegeben, da die Dialdehyd-Komponenten konstant gehalten wurden (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Einwaagen für Hydrogele mit dem Wassergehalt-1 und Dialdehyden auf PEG1000, 2000 oder 3000-Basis.

NH₂/CHO mit CHO konst., Wassergehalt-1			
Chitosan mit DD 76 % bzw. Polyamin	NH₂ > CHO	NH₂ < CHO	NH₂ << CHO
<i>n_x</i> (Polyamin) in mmol	0,08	0,03	0,03
<i>n</i> (NH ₂) in mmol	0,06	0,03	0,02
<i>m</i> (Polyamin) in mg	13,1	5,8	4,4
<i>V</i> (verd. HAc) in mL	0,437	0,437	0,437
<i>c</i> (Polyamin) in verd. HAc in g/mL	0,030	0,013	0,010

Für Hydrogele mit PEG2000 und PEG3000 und dem Wassergehalt-1 wurden noch weitere NH₂/CHO – Verhältnisse verwendet, bei denen diesmal die Chitosan-Komponente konstant gelassen wurde (**Tabelle 11** und **Tabelle 12**).

Tabelle 11: Einwaagen für Hydrogele mit dem Wassergehalt-1 und einem Dialdehyd auf PEG2000-Basis.

NH₂/CHO mit NH₂ konst., Wassergehalt-1			
Dialdehyd mit PEG2000	NH₂ > CHO	NH₂ < CHO	NH₂ << CHO
<i>n</i> (HMF) in mmol	0,03	0,06	0,08
<i>n</i> (CHO) in mmol	0,03	0,06	0,08
<i>m</i> (HMF) in mg	3,3	7,3	9,8
<i>m</i> (Dialdehyd) in mg	62,9	141,6	188,8
<i>V</i> (Wasser) in mL	0,160	0,160	0,160
<i>c</i> (Dialdehyd) in Wasser in g/mL	0,393	0,885	1,180

Tabelle 12: Einwaagen für Hydrogele mit dem Wassergehalt-1 und einem Dialdehyd auf PEG3000-Basis.

NH₂/CHO mit NH₂ konst., Wassergehalt-1			
Dialdehyd mit PEG3000	NH₂ > CHO	NH₂ < CHO	NH₂ << CHO
<i>n</i> (HMF) in mmol	0,03	0,06	0,08
<i>n</i> (CHO) in mmol	0,03	0,06	0,08
<i>m</i> (HMF) in mg	3,3	7,3	9,8
<i>m</i> (Dialdehyd) in mg	74,6	167,9	223,8
<i>V</i> (Wasser) in mL	0,160	0,160	0,160
<i>c</i> (Dialdehyd) in Wasser in g/mL	0,466	1,049	1,399

Teilweise wurden zusätzliche Hydrogele (**Tabelle 9** bis **Tabelle 12**) präpariert, denen entweder geringe Mengen Ethanol oder das Tensid SDS hinzugefügt wurden. Bei der Verwendung von Ethanol wurde das jeweilige Dialdehyd nicht in Wasser, sondern in einem Ethanol-Wasser-Gemisch (25 Vol.-% EtOH) homogenisiert. Bei den Gelen mit Tensid wurden dem Dialdehyd-Wasser-Gemisch 15 Mol-% SDS (bezogen auf das Dialdehyd) hinzugefügt und homogenisiert.

Außerdem wurden Hydrogele hergestellt, bei denen das verwendete Wasser für die Dialdehyd-Dispersion und das Wasser für die verd. Essigsäure der Chitosanlösung entweder durch eine PBS-Lösung oder eine isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) ersetzt wurde.

Bei einem Hydrogel mit einem Dialdehyd auf PEG3000-Basis, äquimolarem Verhältnis (NH₂ = CHO) und dem Wassergehalt-1 (597 µL) wurde das Wasser/Säure-Verhältnis von 0,37 (pH 2,8) auf 1,06 (pH 2,9) geändert. Es wurden dementsprechend 8,7 mg Chitosan in 0,290 mL verd. Essigsäure gelöst und 111,9 mg Dialdehyd in 0,307 mL Wasser dispergiert.

Weitere Imin-vernetzende Hydrogele

Neben den Hydrogelen aus Chitosan und dem Dialdehyd auf PEG-Basis wurden noch weitere Hydrogele mit Glutaraldehyd und/oder BSA (Bovines Serumalbumin) hergestellt.

Für die Synthese des Chitosan-Glutaraldehyd-Hydrogels wurde die Chitosanlösung gravimetrisch vorgelegt. Danach wurden 154 μL Wasser hinzugefügt, um den Wassergehalt-1 (597 μL) und ein Wasser/Säure-Verhältnis von 0,37 zu erhalten. Nach dem Vortexen (20 s, 1900 min^{-1}) wurde die Glutaraldehydlösung (8 μL , 25 % in Wasser) mit einer Eppendorf-Pipette volumetrisch hinzugegeben. Die beiden Komponenten wurden mit einem Vortexmischer homogenisiert und direkt für den jeweiligen Versuch verwendet.

Tabelle 13: Einwaagen für Chitosan-Glutaraldehyd-Hydrogele mit einem $\text{NH}_2 = \text{CHO}$ – Verhältnis und Wassergehalt-1.

$\text{NH}_2 = \text{CHO}$, Wassergehalt-1			
Chitosan mit DD 76 % bzw. Polyamin		Glutaraldehyd	
n_x (Polyamin) in mmol	0,05	n (Glutaraldehyd) in mmol	0,02
n (NH_2) in mmol	0,04	n (CHO) in mmol	0,04
m (Polyamin) in mg	8,7	m (Glutaraldehyd) in mg	2,0
V (verd. HAc) in mL	0,437	V (Wasser) in mL	0,006
c (Polyamin) in verd. HAc in g/mL	0,020	c (Glutaraldehyd) in Wasser in g/mL	0,334
		V (25 %ige Glutaraldehyd-lösung) in μL	8,0

Die Synthese des BSA-Dialdehyd-Hydrogels erfolgte analog zur Synthese der Chitosan-Dialdehyd-Hydrogele, d.h. beide Komponenten wurden gravimetrisch in ein Schnappdeckelglas gegeben. Das BSA wurde jedoch nicht in verd. Essigsäure gelöst, sondern wie bei der Herstellung des BSA-Glues in einem Citrat-Puffer (pH 3, **Kapitel 3.2.1**). Bei der Ansatzberechnung muss berücksichtigt werden, dass das BSA eine molare Masse von 66430 g/mol hat und aus 583 Aminosäuren besteht, wobei 59 Aminosäuren eine primäre Aminogruppe besitzen (Lysin).[58,59]

Tabelle 14: Einwaagen für BSA-Dialdehyd-Hydrogele mit einem $\text{NH}_2 = \text{CHO}$ – Verhältnis und Wassergehalt-1.

$\text{NH}_2 = \text{CHO}$, Wassergehalt-1			
BSA		Dialdehyd mit PEG3000	
n (BSA) in mmol	0,0007	n (HMF) in mmol	0,04
n (NH_2) in mmol	0,04	n (CHO) in mmol	0,04
		m (HMF) in mg	4,9
m (BSA) in mg	46,5	m (Dialdehyd) in mg	111,9
V (Citrat-Puffer) in mL	0,437	V (Wasser) in mL	0,160
c (BSA) im Citrat-Puffer in g/mL	0,106	c (Dialdehyd) in Wasser in g/mL	0,699

Der BSA-Glue (**Kapitel 3.2.1**) wurde ebenfalls nochmal mit einem äquimolaren NH_2/CHO – Verhältnis und Wassergehalt-1 präpariert. Die BSA-Lösung wurde gravimetrisch vorgelegt und wie beim Chitosan-Glutaraldehyd-Hydrogel 154 μL Wasser hinzugefügt. Nach dem Homogenisieren wurde die Glutaraldehydlösung hinzugegeben und das Reaktionsgemisch erneut mit dem Vortexmischer vermischt.

Tabelle 15: Einwaagen für BSA-Glue mit einem $\text{NH}_2 = \text{CHO}$ – Verhältnis und Wassergehalt-1.

$\text{NH}_2 = \text{CHO}$, Wassergehalt-1			
BSA		Glutaraldehyd	
n (BSA) in mmol	0,0007	n (Glutaraldehyd) in mmol	0,02
n (NH_2) in mmol	0,04	n (CHO) in mmol	0,04
		m (Glutaraldehyd) in mg	2,0
m (BSA) in mg	46,5	V (Wasser) in mL	0,006
V (Citrat-Puffer) in mL	0,437	c (Glutaraldehyd) in Wasser in g/mL	0,334
c (BSA) im Citrat-Puffer in g/mL	0,106	V (25 %ige Glutaraldehyd-lösung) in μL	8,0

3.6 Charakterisierung der Hydrogele

Es wurden folgende Eigenschaften der Hydrogele untersucht: die Topfzeit, die Gelfestigkeit und das Quellverhalten. Des Weiteren wurden die Gele mittels FTIR-Spektroskopie charakterisiert (**Kapitel 3.2.4**) und die Adhäsion auf Knochenoberflächen bzw. deren Klebfestigkeit bestimmt (**Kapitel 3.2.3**). Für die FTIR-Spektroskopie mussten die Hydrogele zuvor für 20 h bei 100 °C getrocknet werden.

3.6.1 Topfzeit

Als Topfzeit wird üblicherweise die Zeit betrachtet, in der ein reaktives Material verarbeitbar ist. Für die Topfzeit bzw. die Verarbeitungszeit der Hydrogele wurde zunächst ein Richtwert und keine exakte Zeit bestimmt. Nach der Herstellung im Schnappdeckelglas und dem Homogenisieren des Reaktionsgemisches (20 s, 1900 min⁻¹) wurde das jeweilige Hydrogel mit einem Spatel gerührt. Die Zeitmessung wurde nach Zugabe der zweiten Komponente gestartet. Der Zeitpunkt, an dem das Gel beim Hinein- und Herausbewegen des Spatels kurzzeitig am Spatel haften bleibt und Fäden gezogen werden, wurde als Topfzeit definiert.

Darüber hinaus wurde die Topfzeit für drei unterschiedliche Hydrogele exemplarisch mit dem Texture Analyser ermittelt. Anstelle der in **Kapitel 3.5** beschriebenen Ansatzmenge wurde für diesen Versuch die vierfache Menge benötigt. Außerdem wurden die Gele in 10 mL Rollrandgläsern präpariert. Das Rollrandglas wurde nach dem Vortexen unter dem Messstempel des Texture Analysers mit einem doppelseitigen Klebeband fixiert. Vor dem Start der Prüfung wurde der Messstempel manuell bis zur Oberfläche des Reaktionsgemisches gefahren. Mit einer Prüfungsgeschwindigkeit von 10 mm/s und der Auf- und Abwärtsbewegung (jeweils 4 mm) des Stempels wurde die zunehmende Kraft des aushärtenden Gels in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Bei einer Viskosität, mit der das Gel augenscheinlich nicht mehr verarbeitbar ist, wurde die Aufzeichnung manuell abgebrochen. Parallel wurde die Zeit mit einer Stoppuhr aufgezeichnet, die schon nach Zugabe der zweiten Komponente gestartet wurde. Die Zeit zwischen der Zugabe der zweiten Komponente und dem Start der Messung wurde anschließend auf die, mit dem Texture Analyser bestimmten Topfzeit addiert. Der Zeitpunkt, bei dem eine Kraft von ca. 74 mN gemessen wurde, wurde als Topfzeit definiert.

3.6.2 Gelfestigkeit am Texture Analyser

Zur Bestimmung der Gelfestigkeit der Hydrogele wurde der Texture Analyser TA.XT*plus* (Kraftmessdose: 500 N, Stable Micro Systems Ltd, Godalming, Vereinigtes Königreich) benutzt. Die Gele wurden, wie in **Kapitel 3.5** beschrieben hergestellt. Allerdings wurde die drei- bis vierfache Ansatzgröße verwendet. Nach dem Homogenisieren mit dem Vortex-Schüttler wurde das jeweilige Hydrogel in ein Well ($d = 17 \text{ mm}$) einer 24-Well-Mikrotiterplatte gegossen, sodass das Well komplett gefüllt war. Um Probenmaterial zu sparen, wurden Mikrotiterplatten verwendet, bei denen die einzelnen Wells schon zur Hälfte mit Silikon gefüllt worden waren. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einem Deckel und Parafilm verschlossen. Nach 24 h Aushärtung bei Raumtemperatur wurde die Gelfestigkeit der Hydrogele gemessen. Der zylinderförmige Messstempel (P/0.5, $d = 12,7 \text{ mm}$, Delrin) des Texture Analysers fährt dazu senkrecht auf die Probe zu (**Abbildung 11**). Bei einer Auslösekraft von 40,2 mN beginnt die Messung mit einer Prüfgeschwindigkeit von 0,5 mm/s. Der Stempel drückt auf die Probe und dringt 4 mm tief in sie ein. Anschließend fährt er wieder 6 mm zurück und fährt dann wieder auf die Probe zu, um erneut eine Druckbelastung auszuüben. Die Messung stoppt nach zwei Zyklen bei Erreichen der Ausgangsposition (2 mm über der Mikrotiterplatte). Der Kurvenverlauf wird mit der Software Exponent (Version 6.1.8.0) aufgezeichnet und ausgewertet. Es erfolgte mindestens eine 3-fach Bestimmung pro Probe ($n \geq 3$).



Abbildung 11: Texture Analyser mit Messstempel, der sich kurz vor dem Eindringen in die Probe befindet.

3.6.3 Quellverhalten

Für die Untersuchung des Quellverhaltens der Hydrogele wurden die Gele analog zu **Kapitel 3.6.1** in einer 24-Well-Mikrotiterplatte hergestellt. Jedes Hydrogel wurde dreimal hergestellt und untersucht. Nach 24 h Aushärtung bei Raumtemperatur wurden die Gele vorsichtig mit einem Spatel aus ihrem Well herausgeholt und gewogen. Anschließend wurden sie jeweils in ein 50 mL Schnappdeckelglas überführt und nach Zugabe von 10 mL PBS-Lösung für 24 h bei 37 °C ausgelagert. Danach wurden die PBS-Lösungen abdekantiert und die Gele vorsichtig mit einem Spatel aus dem Schnappdeckelglas geholt und wieder gewogen. Es folgte eine erneute Auslagerung mit frischer PBS-Lösung bei 37 °C. Nach sieben Tagen wurden die Gele gewogen und für 2 Tage im Ofen (Heratherm OMH180, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland) getrocknet, um das Trockengewicht zu bestimmen. Die nach 24 h und nach sieben Tagen abdekantierten PBS-Lösungen wurden separat aufbewahrt, um den HMF-Gehalt zu bestimmen. Die Lösungen wurden jeweils durch Zugabe von Wasser auf ein Volumen von insgesamt 20 mL gebracht. Diese Stammlösungen wurden für die HMF-Gehalt-Bestimmung verdünnt. Für die Proben nach 24 h wurden 225 µL Stammlösung mit 10 mL Wasser verdünnt und für die Proben nach sieben Tagen wurde 1 mL Stammlösung mit 10 mL Wasser verdünnt. Der HMF-Gehalt wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie ermittelt (**Kapitel 3.4.4**). Pro Probe wurden drei Verdünnungen hergestellt und gemessen. Außerdem erfolgte zusätzlich eine 3-fach Bestimmung pro Küvette.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung einer Prüfmethode zur Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen

4.1.1 Einleitung

Für die Entwicklung von medizinischen Klebstoffen, die für die Fixierung von Knochenfragmenten eingesetzt werden sollen, ist es unabdingbar eine Prüfmethode zur Evaluierung der Klebfestigkeit an natürlichem Knochenmaterial zu verwenden. Aus diesem Grund wurde zunächst eine einfach anzuwendende und reproduzierbare Prüfmethode zur Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen erarbeitet. Aus Rinderoberschenkelknochen wurden rechteckige, quaderförmige Prüfkörper (35 x 15 x 3 mm) hergestellt. Es gibt zwei Arten von Knochengewebe: Kortikalis und Spongiosa. Da das menschliche Skelett zu 80 % aus der Kortikalis besteht, wurde ausschließlich diese Gewebeart für die Prüfkörperherstellung verwendet. Zudem hat die Kortikalis eine höhere Dichte und eine gleichmäßigere Struktur als die Spongiosa, sodass das Erhalten reproduzierbarer Ergebnisse erleichtert wird.[60] Um planparallele Prüfkörper mit einer spezifischen Dicke und ähnlicher Oberflächenstruktur zu erhalten, wurde für die Herstellung ein Schleifteller verwendet und die Klebflächen zusätzlich per Hand nochmal mit einem feineren Schleifpapier bearbeitet. Für die Untersuchung der Klebfestigkeit wurden Überlappungsklebungen mit einem Nullspalt angefertigt. Die Klebstoffmenge pro Klebfläche bzw. die Klebschichtdicke wurde über die Klebvorrichtung mit entsprechenden Abstandshaltern und zwei Gewichten auf den gefügten Prüfkörpern kontrolliert. Die Form der Prüfkörper und die Art des Klebens ähneln den Vorgaben der ISO 4587:2003 „*Adhesives – Determination of tensile lap-shear strength of rigid-to-rigid bonded assemblies*“, wodurch die Etablierung dieser neuen Methode erleichtert werden sollte. Allerdings sind die hergestellten Prüfkörper deutlich kleiner als die ISO-Norm vorgibt, da die Größe der Rinderknochen und die Form der Kortikalis die limitierenden Faktoren für die Anfertigung der Prüfkörper sind. Außerdem wurden keine Zugscherfestigkeiten, sondern Druckscherfestigkeiten bestimmt. Durch die Verwendung einer speziellen Glaszugvorrichtung, mit der Druckscherfestigkeiten ermittelt werden können, wurde verhindert, dass Füge teilbrüche auftreten, da die Knochenprüfkörper recht spröde sind (**Abbildung 9**, b). Dies ist analog zur Prüfung von Klebverbindungen aus Glas, Keramik oder ähnlich spröden Substraten. Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits Prüfmethode n publiziert, mit denen die Klebfestigkeit an Knochenmaterial geprüft werden kann und Ergebnisse mit möglichst geringen relativen Standardabweichungen (RSD, engl. *relative standard deviation*)

erzielt werden sollten. Diese Prüfmethode sind allerdings häufig wesentlich komplexer, schwieriger durchzuführen und sind nicht an ISO-Normen angelehnt. COHEN et al. benutzten für ihre Prüfmethode zur Bestimmung der Zugfestigkeit von Stumpfstoßklebungen beispielsweise eine spezielle Vorrichtung, bei der die beiden quadratischen Knochenprüfkörper (20 x 20 x 2 mm) vor dem Kleben noch auf Metallhaltern (20 x 20 mm, Oberfläche) fixiert werden mussten.[26] RENNER entwickelte sogar zwei spezielle Prüfvorrichtungen, um die Scher- und Zugfestigkeit von verklebten Knochenprüfkörpern (quaderförmig und zylindrisch) zu bestimmen.[61] BOU-FRANCIS et al. haben zwar auch rechteckige, quaderförmige Prüfkörper hergestellt, aber diese waren deutlich ungleichmäßiger und unförmiger als die Prüfkörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.[10] Daher mussten die gefügten Knochenprüfkörperpaare beidseitig in einer zylindrischen Aluminiumhülse, gefüllt mit einem polymeren Vergussmaterial fixiert werden, um die vertikale und konzentrische Ausrichtung der Prüfkörper sicherzustellen. Das Vergussmaterial musste 20 min aushärten. Die Aluminiumhülsen konnten dann mit den Spannbacken der Prüfmaschine befestigt werden. Alle drei genannten Prüfmethode sind demnach komplexer und zeitaufwendiger.

4.1.2 Klebfestigkeiten der Referenzmaterialien

Zur Validierung der Prüfmethode „Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen“ und zum späteren Vergleich mit Ergebnissen der selbsthergestellten Klebstoffe wurden zwei kommerziell erhältliche Gewebeklebstoffe und ein Knochenzement verwendet (**Abbildung 12**).

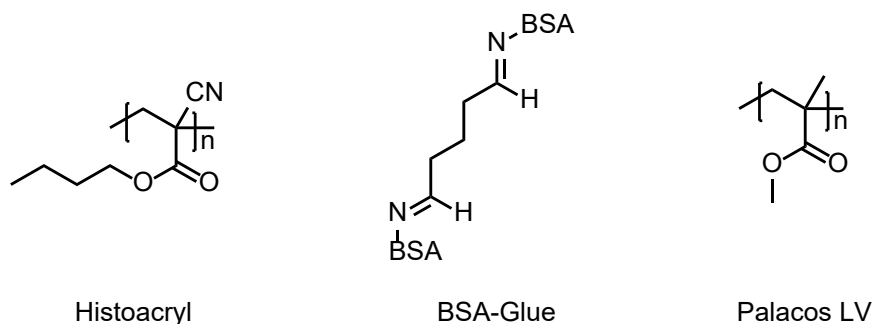


Abbildung 12: Strukturformeln der verwendeten Referenzmaterialien Histoacryl®, BSA-Glue und Palacos® LV.

Der Gewebeklebstoff Histoacryl® der Firma B. Braun SE/Aesculap AG besteht aus *n*-Butyl-2-cyanoacrylat und härtet durch den Kontakt mit der Gewebeflüssigkeit und der Luftfeuchtigkeit über die anionische Polymerisation in ca. 60 s aus.[62,63] Das Cyanoacrylat kann laut Hersteller zum Verschluss von spannungsarmen Hautwunden, für die Sklerosierungstherapie und für die Fixierung von Herniennetzen eingesetzt werden.[62] Polyalkylcyanoacrylate werden im Körper hydrolytisch abgebaut, wobei der entsprechende Cyanoessigsäurealkylester und Formaldehyd entsteht. Auf Grund des entstehenden, toxischen Formaldehyds weisen Cyanoacrylate eine limitierte Biokompatibilität auf.[63] Zudem beobachteten EKELUND und NILSSON, dass Histoacryl® sich negativ auf die Knochenneubildung bei Frakturen auswirkt.[64] Auf Grund der zunächst dünnflüssigen Konsistenz des Klebstoffs, ist es wichtig, dass die Klebflächen sehr genau aufeinander liegen. In der klinischen Anwendung als Knochenklebstoff kann dies allerdings nicht gewährleistet werden, da die einzelnen Knochenfragmente einer Fraktur in der Regel eine unregelmäßige Morphologie der Oberfläche aufweisen. Das verwendete Hydrogel BSA-Glue ähnelt dem kommerziell erhältlichen Zweikomponenten-Gewebeklebstoff BioGlue®, der in der Herz- und Gefäßchirurgie zum Einsatz kommt. Der Klebstoff der Firma CryoLife, Inc. besteht aus Rinderserumalbumin (BSA), Glutaraldehyd und Wasser.[44,45] Die primären Aminogruppen in den Seitenketten der im BSA enthaltenen Lysine reagieren mit den Aldehydgruppen des Glutaraldehyds zu Iminbindungen, wodurch die Vernetzung stattfindet.[65,66] Die Topfzeit von BioGlue® beträgt 20 – 30 s und die Endfestigkeit ist bereits nach 2 min erreicht.[44,66] Da diese geringe Topfzeit nicht ausreicht, um Knochenprüfkörper reproduzierbar und mit ausreichender Klebfestigkeit zu fügen, konnte der originale BioGlue® nicht für die Prüfmethode und damit auch nicht als Knochenklebstoff eingesetzt werden. Der selbsthergestellte BSA-Glue besteht ebenfalls aus BSA und Glutaraldehyd, aber anstelle von Wasser wurde für die BSA-Lösung ein Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 3 verwendet. Durch den niedrigen pH-Wert konnte die Topfzeit auf ca. 4 min verlängert werden und das Klebstoffsystem für die Qualifizierung der Prüfmethode benutzt werden, da im sauren Milieu einige Aminogruppen protoniert vorliegen und somit nicht mit den Aldehydgruppen reagieren können. Für die klinische Anwendung wäre der BSA-Glue jedoch nicht geeignet, da die BSA-Lösung bei dem niedrigen pH-Wert nicht lagerstabil ist. Die schlechte Lagerstabilität äußert sich durch eine starke Zunahme der Viskosität innerhalb von 24 Stunden. Der Knochenzement Palacos® LV, der von der Heraeus Medical GmbH zur Verfügung gestellt wurde, härtet über die radikalische Polymerisation zu einem Polymethylmethacrylat aus.[67] Die Endfestigkeit wird nach ca. 15 min erreicht.[68,69] Das Polymer wird in der Endoprothetik zur dauerhaften Fixierung von Implantaten verwendet und zur Auffüllung

und Stabilisierung von Knochendefekten.[68,69] Da der Zement dauerhaft im Körper verbleibt und nicht mit der Zeit abgebaut wird, ist ein Einsatz als Knochenklebstoff ebenfalls ausgeschlossen.[69,11]

Auch wenn diese drei Referenzmaterialien nicht als Knochenklebstoff geeignet sind, stellen sie dennoch eine sinnvolle Auswahl für die Validierung der Prüfmethode dar. Die drei Materialien decken eine große chemische Bandbreite ab und ermöglichen dadurch die Beobachtung vieler Einflüsse auf die Prüfmethode. Zudem können die Ergebnisse der Klebfestigkeiten dabei helfen, zu entscheiden auf welcher Basis der selbsthergestellte, potenzielle Knochenklebstoff im zweiten Teil dieser Arbeit entwickelt werden soll.

Nach 24 h Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur (RT) oder unter physiologischen Bedingungen (PBS, pH 7,4, 37 °C) wurden die Klebfestigkeiten bzw. die Druckscherfestigkeiten von Histoacryl®, BSA-Glue und Palacos® LV gemessen (**Abbildung 13**).

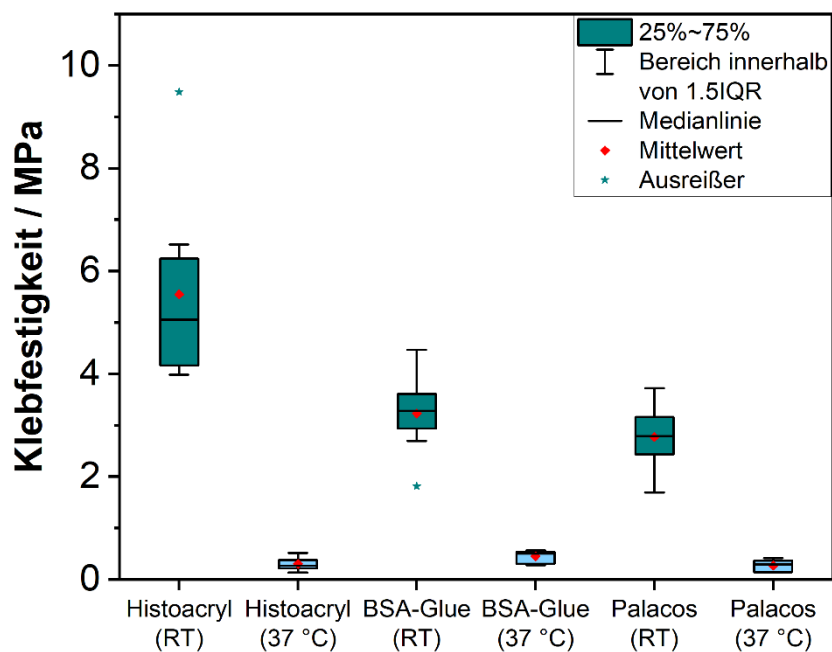


Abbildung 13: Klebfestigkeiten von Histoacryl®, BSA-Glue und Palacos® LV nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT und unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C. 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*).[1]

Obwohl die Klebstoffe später in der klinischen Anwendung insbesondere unter physiologischen Bedingungen eine ausreichende Klebfestigkeit aufweisen müssen, ist es sinnvoll auch die Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur zu untersuchen. Durch diesen etwas einfacher durchführbaren Vorversuch kann eine Vorauswahl an Klebstoffen getroffen werden, mit denen dann weitere Versuche durchgeführt werden können.

Die höchste Klebfestigkeit unter trockenen Bedingungen erzielte Histoacryl® mit einer Festigkeit von $5,5 \pm 1,8$ MPa (33 % RSD). BSA-Glue und Palacos® LV erreichten Klebfestigkeiten von $3,2 \pm 0,7$ MPa (23 % RSD) und $2,8 \pm 0,6$ MPa (23 % RSD). Die Standardabweichungen von 23 – 33 % liegen in einem guten Bereich, da berücksichtigt werden muss, dass die verwendeten Prüfkörper natürliche Materialien biologischen Ursprungs mit Unregelmäßigkeiten sind und keine industriell bzw. maschinell gefertigten, künstlichen Prüfkörper, bei denen Standardabweichungen von 5 – 15 % üblich sind. Außerdem sind die Ergebnisse vergleichbar mit anderen bereits publizierten Standardabweichungen von Prüfmethode zur Bestimmung der Klebfestigkeit von potentiellen Knochenklebstoffen. BOU-FRANCIS et al. haben bei der Verwendung von Knochenzement (Polymethylmethacrylat), Glasionomerezement, Dimethacrylat- und Cyanoacrylatharzen nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen relative Standardabweichungen von 13 – 47 % erhalten. Für die Bestimmung dieser Standardabweichung wurden deren Experimente jeweils siebenmal durchgeführt ($n = 7$).[10] MAURER et al. haben für ihre Prüfmethode ebenfalls Histoacryl® benutzt und ein Dentin-Klebstoffsystem. Beide Klebstoffe wurden jeweils zehnmal geprüft und Standardabweichungen von 25 % und 32 % erreicht.[35] Auf Grund der Verwendung unterschiedlicher Prüfmethode können die erreichten Klebfestigkeiten der beiden Gewebeklebstoffe und des Knochenzements nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden. MAURER et al. haben für Histoacryl® nur eine Festigkeit von $2,0 \pm 0,5$ MPa (25 % RSD) feststellen können.[35] An diesem Vergleich wird deutlich, dass die Art der Prüfmethode einen sehr starken Einfluss auf die Ergebnisse hat. So verwendeten MAURER et al. anstelle von Rinderoberschenkelknochen Unterkieferknochen von Schweinen und anstelle einer Druckscherbeanspruchung übten sie eine Zugbeanspruchung auf die Prüfkörper aus.

Histoacryl® und Palacos® LV wiesen beide einen Adhäsionsbruch auf. Wohingegen BSA-Glue einen Mischbruch, also eine Kombination aus Adhäsions- und Kohäsionsbruch aufwies, der auf eine bessere Adhäsion zum Knochen hindeuten kann (Anhang, **Abbildung 59**).

Nach dem Aushärten unter physiologischen Bedingungen wurden für alle drei Referenzmaterialien deutlich geringere Werte für die Klebfestigkeit ermittelt als unter trockenen Bedingungen, da die PBS-Lösung mit dem Klebstoff bzw. Knochenzement um die Benetzung der Knochenoberfläche konkurriert. Mit Histoacryl® konnte nur eine Klebfestigkeit von $0,3 \pm 0,1$ MPa (43 % RSD) erreicht werden, die im Vergleich zur Aushärtung unter trockenen Bedingungen einer Verringerung von 95 % entspricht. Die Druckscherfestigkeit von BSA-Glue reduzierte sich um 86 % ($0,5 \pm 0,1$ MPa (27 % RSD)) und Palacos® LV verringerte sich um 90 % ($0,3 \pm 0,1$ MPa (44 % RSD)). Die Aushärtebedingungen hatten nicht nur einen großen Einfluss auf die Klebfestigkeiten, sondern auch auf die relativen Standardabweichungen. Auf Grund der anspruchsvolleren Aushärtebedingungen in der PBS-Lösung bei 37 °C stieg die Standardabweichung auf bis zu 44 % an. Auch andere Publikationen, die für das Kleben von Knochen physiologische Bedingungen auswählten, erreichten ähnlich hohe relative Standardabweichungen. Eine Standardabweichung von 46 % erhielten beispielsweise BHAGAT et al. nach drei Wiederholungen mit einem phosphorylierten Polyester-Harnstoff basierten Klebstoff.[32] COHEN et al. haben Gelatine-Alginat Bioklebstoffe mit Calciumphosphat basierten Füllstoffen verwendet und nach jeweils fünf Klebungen Standardabweichungen von 35 – 54 % ermittelt.[26] KIRILLOVA et al. verwendeten ebenfalls den Knochenzement Palacos®. Allerdings benutzten sie Stumpfstoßklebungen mit zylindrischen Prüfkörpern aus Schienbeinknochen von Schweinen. Trotz der Unterschiede bezüglich der Prüfmethode erzielte die Arbeitsgruppe dieselbe geringe Klebfestigkeit für Palacos®: $0,3 \pm 0,1$ MPa (44 % RSD), $n = 10$.[28] Dieses Beispiel verdeutlicht zusätzlich die große Herausforderung des Klebens unter physiologischen Bedingungen. Histoacryl® und Palacos® LV wiesen wieder beide einen Adhäsionsbruch auf und BSA-Glue einen Mischbruch (Anhang, **Abbildung 59**).

Chirurgen und Zahnmediziner stehen vor demselben Problem: Sie benötigen einen Klebstoff, der unter physiologischen Bedingungen eine ausreichende Klebfestigkeit erreicht. Ein weiterer Zusammenhang besteht in der ähnlichen Zusammensetzung der Knochen und Zähne. Knochen bestehen zu 65 % aus anorganischen Mineralien, zu 25 % aus organischen Verbindungen und zu 10 % aus Wasser.[70,71] Der Zahnschmelz besteht zu 96 % aus anorganischen Mineralien. Die restlichen 4 % sind organische Anteile und Wasser. Das Zahnbein (Dentin) besteht zu 70 % aus anorganischen Mineralien, zu 20 % aus organischen Verbindungen und zu 10 % aus Wasser.[72] Sowohl bei den Knochen als auch bei den Zähnen ist das Hydroxylapatit Hauptbestandteil der anorganischen Knochensubstanz und der organische Anteil

besteht überwiegend aus Kollagen.[71,72] In der Zahnmedizin werden die Zähne vor der Applikation des Haftvermittlers mit verdünnter Phosphorsäure (37 % in Wasser) behandelt, um die Benetzung der Oberfläche und dadurch die Klebfestigkeit zu verbessern.[72,73] Während der instrumentellen Zahnbehandlung entsteht eine Schmierschicht (engl. *smear layer*), die aus zerkleinerten Zahnbestandteilen besteht und die durch die Säure vollständig entfernt werden kann. Außerdem werden durch die Säure die anorganischen Mineralien der Zähne aufgelöst, sodass die Oberflächenrauheit des Zahnschmelzes auf einem mikroskopischen Level erhöht wird oder beim Anätzen des Dentins die Kollagenfasern freigelegt werden.[72,73] Diese Technik aus der Zahnmedizin wurde auf Grund der Parallelen ebenfalls als zusätzliche Oberflächenbehandlung für die Knochen angewendet. Vor dem Klebstoffauftrag wurden die Klebflächen der beiden Prüfkörper dementsprechend mit verdünnter Phosphorsäure behandelt. Es sollte überprüft werden, ob die Vorbehandlung mit Säure auch beim Kleben von Knochen einen positiven Effekt hat. Des Weiteren konnte so beurteilt werden, ob die vorgeschlagene Prüfmethode auch bei unterschiedlichen Prüfbedingungen noch reproduzierbare Ergebnisse erzielen kann. In **Abbildung 14** werden die Klebfestigkeiten von Histoacryl®, BSA-Glue und Palacos® LV nach 24 h Aushärtung unter trockenen Bedingungen und einer vorherigen Oberflächenbehandlung mit Phosphorsäure mit den Klebfestigkeiten ohne Säurebehandlung verglichen. Die Proben, die mit Histoacryl® oder BSA-Glue hergestellt wurden, erreichten durch die Säurebehandlung der Klebflächen eine höhere Klebfestigkeit als zuvor. Mit Histoacryl® wurde eine Druckscherfestigkeit von $7,1 \pm 0,7$ MPa (9 % RSD) ermittelt. Die Klebfestigkeit stieg im Vergleich zur Klebfestigkeit ohne Säurebehandlung ($5,5 \pm 1,8$ MPa (33 % RSD)) also um 29 % an. Bei der Verwendung von BSA-Glue konnte die Klebfestigkeit durch die Säurebehandlung sogar um 146 % verbessert werden ($7,9 \pm 1,9$ MPa (24 % RSD)). Dies entspricht einer 2,5-fachen Steigerung der Klebfestigkeit im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Säurebehandlung ($3,2 \pm 0,7$ MPa (23 % RSD)). Des Weiteren sind die Standardabweichungen durch die Säurebehandlung entweder besser geworden (Histoacryl®) oder gleich gut geblieben (BSA-Glue). Die Säurebehandlung bewirkt vermutlich eine homogenere Oberflächenzusammensetzung und –morphologie zugunsten der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Im Gegensatz dazu haben sich bei der Verwendung von Palacos® LV sowohl die Klebfestigkeit als auch die relative Standardabweichung verschlechtert. Ähnlich wie nach der Aushärtung unter physiologischen Bedingungen erreichte Palacos® LV mit der Säurevorbehandlung nur eine Klebfestigkeit von $0,3 \pm 0,1$ MPa (48 % RSD) anstelle von $2,8 \pm 0,6$ MPa (23 % RSD). Die Proben mit Palacos® LV zeigten wieder eindeutig einen Adhäsionsbruch nach der Prüfung. Die Proben, die mit

BSA-Glue oder Histoacryl® geklebt worden sind, wiesen einen Mischbruch auf. Das veränderte Bruchbild (Mischbruch statt Adhäsionsbruch) und die verbesserte Klebfestigkeit von Histoacryl® deuten auf eine verbesserte Adhäsion zwischen dem Klebstoff und der Knochenoberfläche nach Säurebehandlung hin.

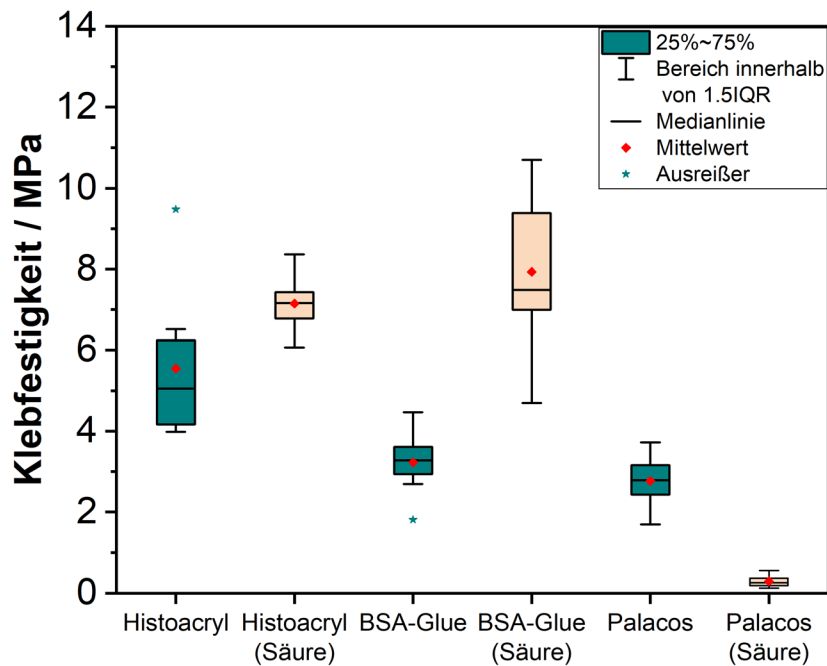


Abbildung 14: Klebfestigkeiten von Histoacryl®, BSA-Glue und Palacos® LV nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen ohne und mit Säurevorbehandlung der Knochenprüfkörper. 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*).[1]

Die Untersuchungen der drei Referenzmaterialien unter trockenen Bedingungen, physiologischen Bedingungen und mit Säurevorbehandlung der Klebflächen zeigen, dass sich die vorgeschlagene Prüfmethode gut für die Bewertung von potenziellen Knochenklebstoffen eignet. Die Standardabweichungen der Klebfestigkeiten sind vergleichbar mit anderen publizierten Standardabweichungen.[10,26,32,35] Der Vorteil dieser Prüfmethode liegt vor allem in der Nähe zur bereits bestehenden Norm ISO 4587:2003 „Adhesives – Determination of tensile lap-shear strength of rigid-to-rigid bonded assemblies“ und in der vergleichbar einfachen Durchführung dieser Prüfmethode.

4.1.3 Einfluss der Oberflächenbehandlung auf die Knochenstruktur und Klebfestigkeit

Um den Einfluss der Säurebehandlung der Knochenoberfläche auf die Klebfestigkeit besser erklären zu können, wurden unbehandelte und mit Säure behandelte Knochenoberflächen mittels FTIR-Spektroskopie, REM und EDX-Spektroskopie analysiert.

Da Knochen zu 66,5 % aus Hydroxylapatit bestehen wurde zum Vergleich neben FTIR-Spektren von behandelten und unbehandelten Knochenproben auch ein Spektrum von Hydroxylapatit aufgenommen (**Abbildung 15**).[71]

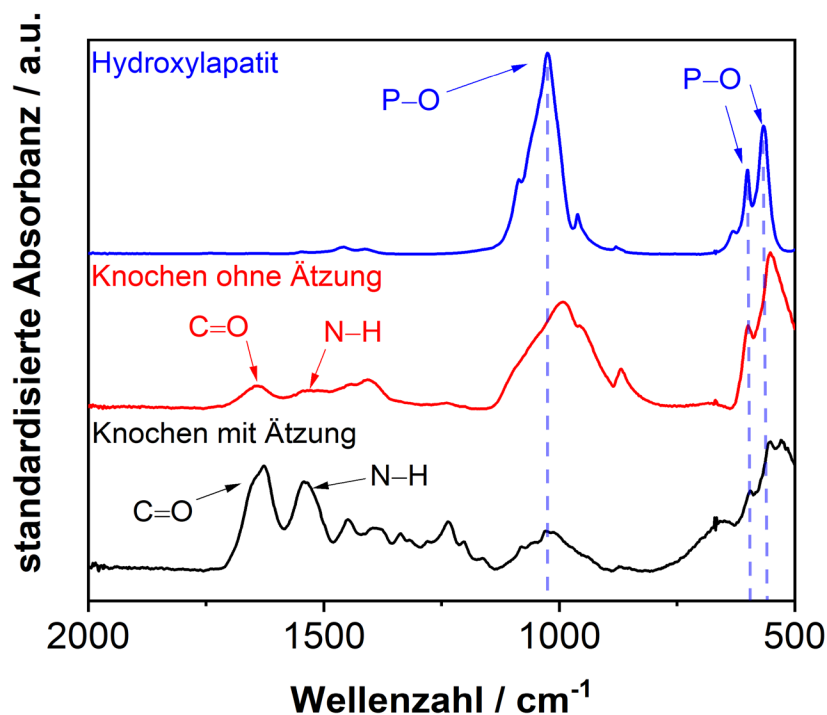


Abbildung 15: FTIR-Spektren von Hydroxylapatit und der Knochenoberfläche ohne und mit Ätzung durch Phosphorsäure.[1]

Im Spektrum des Hydroxylapatits sind drei dominante Banden bei 566 cm⁻¹, 601 cm⁻¹ und 1025 cm⁻¹ zu sehen. Demzufolge können diese Banden in den beiden Spektren der Knochenoberflächen den anorganischen Mineralien im Knochen zugeordnet werden. Die Bande bei 1538 cm⁻¹ ist die Amid II Absorptionsbande, die durch die N-H-Deformationsschwingung und die C-N-Valenzschwingung hervorgerufen wird. Die Bande bei 1636 cm⁻¹ ist die Amid I Bande und ist hauptsächlich der C=O-Valenzschwingung zuzuordnen.[57] Die Amidbanden gehören zu den organischen

Bestandteilen der Knochenoberfläche, wie beispielsweise Kollagen, welches das Hauptprotein der Knochenmatrix ist.[71] Das FTIR-Spektrum der Knochenoberfläche mit Säurebehandlung hat intensivere Amidbanden bezogen auf die Banden der anorganischen Mineralien als das Spektrum der unbehandelten Knochenoberfläche. Demnach hat die Säure den Proteinanteil auf der Oberfläche im Verhältnis zu anorganischen Mineralien erhöht.

Die Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie zeigen, dass die mit Säure behandelte Knochenoberfläche (**Abbildung 16, b + d**) glatter und weniger strukturiert aussieht als die unbehandelte Knochenoberfläche (**Abbildung 16, a + c**). Allerdings befinden sich an manchen Stellen kleine Ansammlungen von Partikeln (siehe weißer Kreis in **Abbildung 16, b + d**).

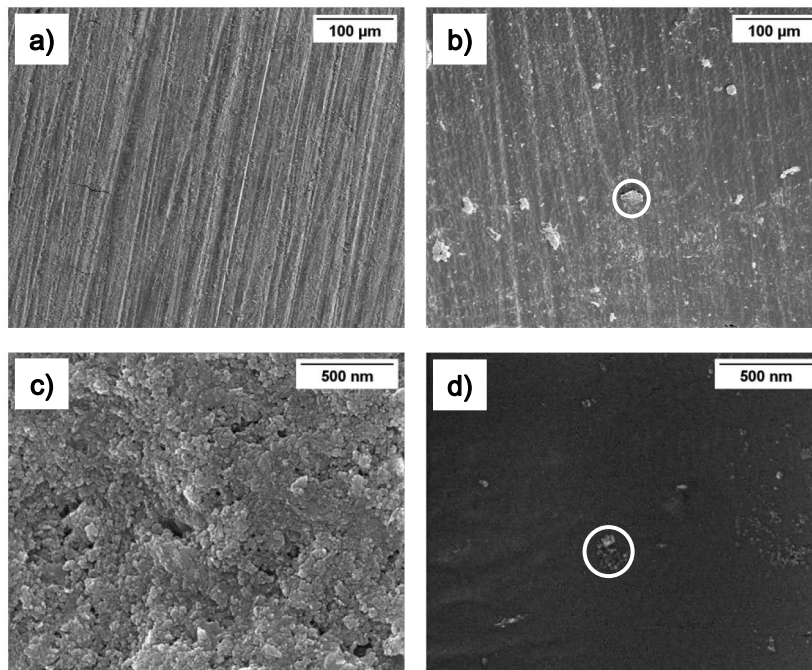


Abbildung 16: REM-Aufnahmen der unbehandelten Knochenoberfläche (a + c, Auflösung 100 µm und 500 nm) und der Oberfläche nach Ätzung mit Phosphorsäure (b + d, Auflösung 100 µm und 500 nm). Die weißen Kreise markieren Partikelansammlungen aus anorganischen Mineralien.[1]

Laut EDX-Spektroskopie bestehen diese Partikel ähnlich wie die unbehandelte Oberfläche hauptsächlich aus 38 Gew.-% Sauerstoff, 27 Gew.-% Calcium, 19 Gew.-% Kohlenstoff, 12 Gew.-% Phosphor und 3 Gew.-% Stickstoff (Anhang, **Abbildung 61 + Abbildung 62**). Im Gegensatz dazu besteht die angeätzte, weniger

strukturierte Oberfläche hauptsächlich aus 50 Gew.-% Kohlenstoff, 20 Gew.-% Sauerstoff, 17 Gew.-% Stickstoff, 8 Gew.-% Calcium und 4 Gew.-% Phosphor (Anhang, **Abbildung 62**). Der starke prozentuale Anstieg von Kohlenstoff und Stickstoff auf der angeätzten Oberfläche und die Abnahme des Calcium- und Phosphorgehaltes verstärken die Schlussfolgerung der FTIR-Spektroskopie, dass eine Vorbehandlung mit Phosphorsäure zu einem höheren Anteil an Proteinen auf der Knochenoberfläche führt. Neben REM-Aufnahmen der Knochenoberflächen wurden zusätzlich durch die Verwendung eines fokussierten Ionenstrahls Aufnahmen der Querschnitte gemacht (**Abbildung 17**, a + b).

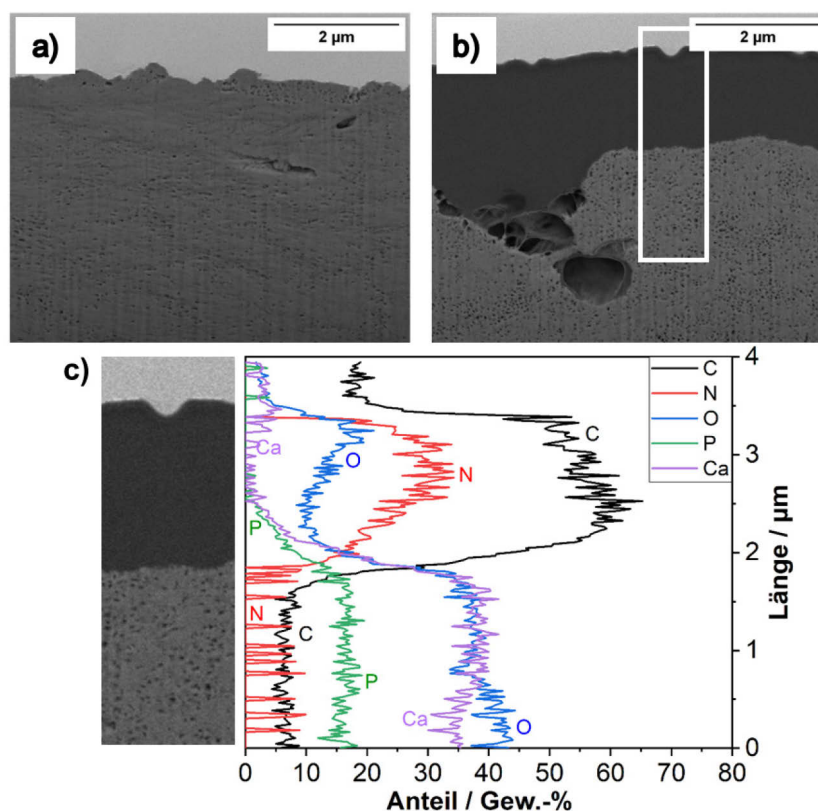


Abbildung 17: REM-Aufnahmen der Querschnitte durch den unbehandelten Knochen (a) und den mit Phosphorsäure behandelten Knochen (b). EDX-Linienmessung der weißen Box in **Abbildung 17**, b (c).[1]

Der Querschnitt des mit Säure behandelten Knochens zeigt im Gegensatz zum unbehandelten Knochen zwei unterschiedliche Schichten. In der oberen Schicht sind keine Poren zu erkennen. Die untere Schicht hat sehr viele kleine Poren im Nanometerbereich. An der Schnittstelle der beiden Schichten sind größere Unregelmäßigkeiten bzw. Poren im Mikrometerbereich zu sehen. Die EDX-

Linienmessung (engl. *Line Scan*) entlang des Querschnittes des mit Säure behandelten Knochens zeigt einen höheren Kohlenstoff- und Stickstoffanteil in der oberen Schicht als in der unteren Schicht (**Abbildung 17, c**). Der Gehalt an Calcium, Sauerstoff und Phosphor hingegen ist in der unteren Schicht höher als in der Oberen. Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Oberflächenanalytik überein und zeigen, dass die geätzte Schicht ca. 2 µm dick ist.

Die FTIR- und EDX-Spektroskopie ergeben, dass die Phosphorsäure analog zur Zahnmedizin die anorganischen Bestandteile, also hauptsächlich das Hydroxylapatit auflöst und dadurch den Anteil an Proteinen auf der Knochenoberfläche erhöht. Grundsätzlich gibt es drei Mechanismen, die zwischen einem Klebstoff und dem Füge teil über die Qualität der Adhäsion entscheiden: mechanische Verklammerungen, physikalische Wechselwirkungen und chemische Bindungen.[74] Die höhere Klebfestigkeit von BSA-Glue und Histoacryl® nach Säurevorbehandlung der Knochenoberflächen deutet auf zusätzliche chemische Bindungen zwischen Klebstoff und Knochen hin, wodurch die Adhäsion verbessert wurde. Histoacryl® ist ein Cyanoacrylat, das durch den nucleophilen Angriff von Hydroxidionen an die Doppelbindung polymerisiert.[75,76] Die primären Aminogruppen der Proteine auf der Knochenoberfläche können ebenfalls als Nucleophil reagieren und dadurch eine chemische Bindung zwischen dem Klebstoff und dem Knochen ausbilden.[75] Der BSA-Glue polymerisiert über die Reaktion zwischen den Aminogruppen des Proteins BSA und den Aldehydgruppen des Glutaraldehyds, wobei Iminbindungen entstehen.[75] Die Aldehydgruppen des Klebstoffs können dementsprechend auch mit den Aminogruppen der Proteine auf der Knochenoberfläche reagieren.[65,66] Beide Klebstoffe können also theoretisch neben den physikalischen Wechselwirkungen auch chemische Bindungen zur Knochenoberfläche ausbilden, insbesondere zum Proteinanteil, und dadurch die Adhäsion verbessern. Palacos® LV härtet über die radikalische Polymerisation zwischen Methylmethacrylat und Prepolymeren aus.[67] Da es sich um einen Knochenzement und nicht um einen Klebstoff handelt, sind die mechanischen Verklammerungen besonders wichtig für eine gute Adhäsion.[11] Allerdings zeigten die REM-Aufnahmen, dass die Knochenoberfläche des mit Säure behandelten Knochens glatter und weniger strukturiert ist als die Oberfläche ohne Vorbehandlung. Dies führt zu einer schlechteren mechanischen Verklammerung und dadurch auch zu einer schlechteren Adhäsion des Knochenzements. Außerdem führt die hohe Viskosität des Knochenzements zu einer geringen Benetzung in mikroskopischen Strukturen. Eine gute Benetzung ist die Grundvoraussetzung für Adhäsion.

4.2 Hydrogele zur potentiellen Anwendung als Knochenklebstoff

4.2.1 Einleitung

Um einen Austausch zwischen den angeklebten Knochenfragmenten, dem Knochen und dem umliegenden Gewebe zu gewährleisten, bieten sich Hydrogele als Knochenklebstoff an. Hydrogele sind dreidimensional vernetzte Polymere, die große Mengen Wasser aufnehmen und auch wieder abgeben können.[36] Durch die Semipermeabilität für Wasser könnten beispielsweise auch Nährstoffe und Zellen, die für die Frakturheilung wichtig sind, das Hydrogel durchdringen. Das Hydrogel BSA-Glue, welches für die Validierung der Prüfmethode verwendet wurde, überzeugte bereits in einigen Eigenschaften als potentieller Knochenklebstoff. Die Gelbildung bzw. die Vernetzung erfolgt über die Reaktion zwischen den Aminogruppen des Proteins BSA und den Aldehydgruppen des Dialdehyds Glutaraldehyd (siehe **Kapitel 2.2**).[63] Diese Kondensationsreaktion zur Bildung von Iminen ist eine reversible Reaktion,[77] wodurch die Möglichkeit eines langsamen hydrolytischen Abbaus des Klebstoffs während der Frakturheilung besteht. Die Klebfestigkeit von 3,2 MPa, die nach einer Aushärtung unter trockenen Bedingungen erreicht wurde, konnte durch eine Oberflächenbehandlung des Knochens mit Phosphorsäure auf 7,9 MPa erhöht werden. Diese Beobachtung ließ auf zusätzliche chemische Bindungen zwischen dem Klebstoff und dem Knochen schließen. Die Aldehyd-Komponente kann mit den Aminogruppen der Proteine des Knochens reagieren und dadurch die Adhäsion verbessern. Unter physiologischen Bedingungen besitzt der BSA-Glue jedoch eine deutlich schlechtere Klebfestigkeit. Es wurde eine Druckscherfestigkeit von nur 0,5 MPa gemessen werden. WEBER und CHAPMAN postulierten zwar eine Klebfestigkeit von nur 0,2 MPa als Mindestanforderung an einen Knochenklebstoff, dennoch wäre eine höhere Festigkeit sinnvoll.[27] Zudem ist das verwendete Glutaraldehyd toxisch.[63,65] Das Protein BSA ist tierischen Ursprungs, sodass es Allergien auslösen oder auch Krankheiten auf den Menschen übertragen kann.[63,78] Daher gibt es für Medizinprodukte mit Materialien tierischen Ursprungs hohe regulatorische Anforderungen der EU, die einen erhöhten Zeitaufwand und Kosten mit sich bringen.[78] Ein weiteres Problem stellt die zu kurze Topfzeit bzw. Verarbeitungszeit des originalen BioGlues® dar, die verhindert, dass das Hydrogel zum Kleben von Knochenfragmenten verwendet werden kann. Für die Verlängerung der Topfzeit wurde der pH-Wert von BSA-Glue auf 3 eingestellt. Allerdings ist die BSA-Lösung dadurch nicht mehr lagerstabil. Angelehnt an BioGlue® wurden als potentieller Knochenklebstoff Hydrogele hergestellt, die aus einer Amin- und einer Aldehyd-Komponente bestehen.

Als Polyamin wurde anstelle von BSA das Polyaminosaccharid Chitosan verwendet. Chitosan wird durch die Deacetylierung von Chitin synthetisiert, welches aus den Exoskeletten von Krabben, Shrimps oder Hummern aus der Fischereindustrie gewonnen wird.[79] Diese Quelle für das Chitosan ist allerdings auch tierischen Ursprungs und weist zusätzlich eine potentielle Belastung mit Schwermetallen durch die Verschmutzung der Meere auf, die die Kosten der Chitosanproduktion beeinflusst.[80] ONDRUSCHKA et al. berichten von der Möglichkeit Chitosan aus Pilzmycelien zu gewinnen, die als Abfallprodukte bei einigen biotechnologischen Prozessen (z. B. Bierbrauerei) anfallen.[80] Mit dieser Methode könnte das Problem des tierischen Ursprungs und der Schwermetallbelastung umgangen werden. Auf Grund seiner Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und antibakteriellen Wirkung eignet sich Chitosan besonders gut für die Anwendung als Medizinprodukt.[79–81] Außerdem fördert Chitosan die Knochenheilung, da es einen positiven Einfluss auf die Proliferation von Osteoblasten hat und osteokonduktiv ist.[80,82,83]

Das toxische Glutaraldehyd wurde gegen ein PEG-basiertes Dialdehyd ausgetauscht. Polyethylenglycol ist ein biokompatibles und wasserlösliches Polymer, das bereits vielseitige Verwendung in der Pharmaindustrie und bei Medizinprodukten findet.[63,84] Neben der Biokompatibilität ist auch die Hydrophilie der beiden Gel-Komponenten wichtig, damit sich überhaupt ein Hydrogel bilden kann. Das PEG wurde zuerst mit Isophorondiisocyanat (IPDI) und dann mit Hydroxymethylfurfural (HMF) beidseitig über die Ausbildung von Urethangruppen bzw. Carbamatgruppen funktionalisiert. Sowohl die PEG-Ketten als auch die Carbamatgruppen können mit den Proteinen und dem Hydroxylapatit des Knochengewebes Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und dadurch zur Adhäsion beitragen. Das HMF trägt die Aldehydgruppe, die für die Vernetzung des Hydrogels notwendig ist und auch mit den Aminogruppen des Knochengewebes reagieren kann.

4.2.2 Synthese der Dialdehyde (Komponente 1)

Für die Synthese des PEG-basierten Dialdehyds wurden zwei unterschiedliche Syntheserouten verwendet, um anschließend herauszufinden, welche Route sich besser für die Herstellung der Dialdehyd-Komponente eignet.

Die erste Syntheseroute begann mit der Umsetzung von IPDI mit HMF zur Herstellung eines IPDI-HMF-Monoaddukts unter Ausbildung einer Urethangruppe. Die Synthese wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem THF und in Anwesenheit eines Aminkatalysators (DABCO) durchgeführt (**Abbildung 18**).

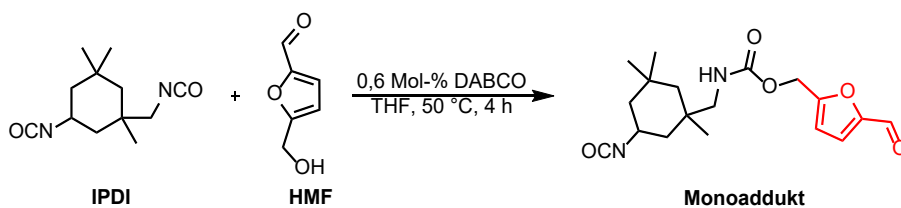


Abbildung 18: Reaktionsschema zur Synthese des Monoaddukts aus IPDI und HMF. Der rot markierte Bereich des Produkts wird in der folgenden Abbildung als Rest **R** abgekürzt.

Bei der Reaktion kann es theoretisch zur Bildung von drei unterschiedlichen Produkten kommen. Das IPDI besitzt zwei Isocyanatgruppen, die mit der Hydroxylgruppe des HMFs zu einer Urethangruppe reagieren können. Neben dem Monoaddukt (IPDI–HMF) könnte dementsprechend auch noch ein weiteres Monoaddukt (HMF–IPDI) entstehen, bei dem die Additionsreaktion über die sekundäre Isocyanatgruppe verläuft und ein Diaddukt (HMF–IPDI–HMF), das aus zwei HMF-Molekülen und einem IPDI-Molekül besteht. Die Bildung von Diaddukten würde allerdings zur Folge haben, dass nach der Reaktion noch IPDI als Edukt vorhanden ist, da die beiden Reaktionspartner in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt wurden. Sowohl das Diaddukt als auch das übrig gebliebene IPDI würden im zweiten Syntheseschritt nicht zum erwünschten Endprodukt führen. Außerdem wären dadurch nicht ausreichend viele Moleküle des Monoaddukts vorhanden. Auf Grund der unterschiedlichen Reaktivitäten der beiden NCO-Gruppen in Gegenwart des Katalysators DABCO wird bevorzugt das Monoaddukt über die primäre NCO-Gruppe gebildet (siehe **Kapitel 2.3**).^[53] In Anwesenheit von Wasser bzw. Luftfeuchtigkeit könnten auch zwei Isocyanate indirekt miteinander reagieren. Die NCO-Gruppen reagieren mit Wasser unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zu Aminen. Die Amine können dann wiederum mit anderen NCO-Gruppen durch eine Additionsreaktion Harnstoffgruppen ausbilden (**Abbildung 6**).^[46,51] Um diese unerwünschte Nebenreaktion zu verhindern, wurde unter Wasserausschluss und Schutzgasatmosphäre gearbeitet.

Das Reaktionsgemisch mit dem Monoaddukt wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt unter Schutzgasatmosphäre mit PEG3000 umgesetzt (**Abbildung 19**). Für die Synthese der Route 1 wurden zwei Äquivalente Monoaddukt und ein Äquivalent PEG eingesetzt, sodass unter Ausbildung von weiteren Urethangruppen ein bifunktionales PEG (Monoaddukt–PEG–Monoaddukt) mit zwei endständigen Aldehydgruppen hergestellt werden konnte. Zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen wurde das Rohprodukt chromatographisch aufgearbeitet und mit einer Ausbeute von 86 % als helloranger

Feststoff erhalten. Die niedermolekularen Verbindungen (z. B. HMF–IPDI–HMF) können teilweise zwar auch als Vernetzer im Hydrogel fungieren, haben aber wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Biokompatibilität. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen eine vollständige Funktionalisierung des PEGs zu erreichen, wurde die Syntheseroute 1 zusätzlich in leicht abgewandelter Form durchgeführt. Hierbei wurde im zweiten Syntheseschritt ein Überschuss an Monoaddukt eingesetzt (4 : 1 anstatt 2 : 1). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 88 % als helloranger Feststoff erhalten.

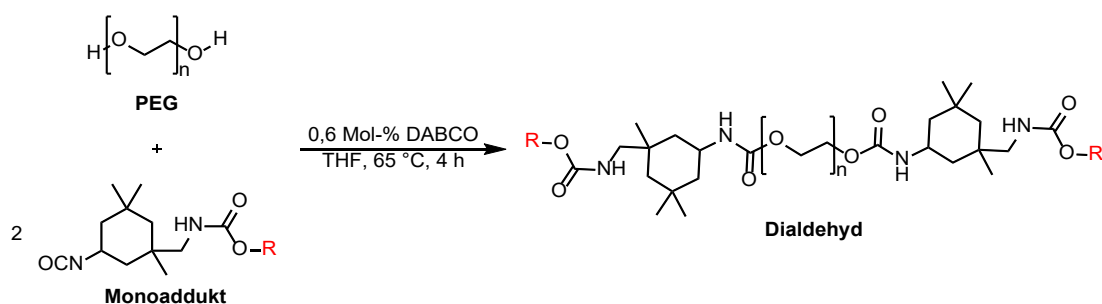


Abbildung 19: Reaktionsschema zur Synthese des Dialdehyds aus dem Monoaddukt und PEG. Der Rest **R** steht für das HMF, das die Aldehydgruppen trägt.

Bei der zweiten Syntheseroute sollte zunächst das PEG mit IPDI unter Ausbildung von Urethangruppen bifunktionalisiert (IPDI–PEG–IPDI) werden (**Abbildung 20**). Das Diisocyanat IPDI musste möglichst schnell hinzugegeben werden, da eine langsame, tropfenweise Zugabe die unerwünschte Bifunktionalisierung von IPDI mit PEG begünstigen würde (PEG–IPDI–PEG). Zudem wirkt dieser Bifunktionalisierung und der Bildung längerer IPDI–PEG-Ketten die unterschiedliche Reaktivität der beiden NCO-Gruppen des Diisocyanats entgegen. Normalerweise wäre es besser gewesen, das Diisocyanat vorzulegen und anschließend das Polyol langsam hinzuzugeben. Dadurch hätte eine Bifunktionalisierung des IPDIs effektiver verhindert werden können. Da das PEG allerdings ein Feststoff ist und vorher aufgeschmolzen und unter Vakuum getrocknet werden musste, wurde es aus praktischen Gründen im Kolben vorgelegt. Das Zutropfen über einen Tropftrichter war nicht möglich, da das PEG im Trichter sehr schnell wieder fest geworden ist. Die Reaktion wurde in trockenem THF und unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Damit die Syntheseroute 2 dasselbe Endprodukt liefert wie die Syntheseroute 1, wurde diesmal anstelle des Aminkatalysators DABCO ein Gemisch aus Bismut(III)-2-ethylhexanoat und Zink(II)-2-ethylhexanoat als Katalysator (Borchi® Kat0244) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen

Metallkatalysator, sodass es bevorzugt zur Reaktion mit der sekundären NCO-Gruppe kommt.[53]

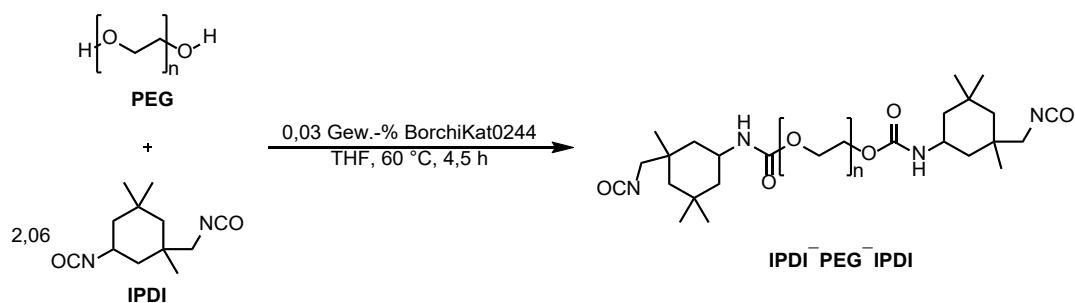


Abbildung 20: Reaktionsschema zur Synthese des IPDI-funktionalisierten PEGs aus IPDI und PEG.

Mittels FTIR-Spektroskopie wurde zur Ermittlung einer adäquaten Reaktionszeit eine Reaktionskontrolle durchgeführt. Dazu wurden in einem Zeitraum von 4,5 h fünf Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen und dessen FTIR-Spektren miteinander verglichen. Die NCO-Bande von Isocyanaten liegt in einem Bereich von 2275 – 2250 cm^{-1} . [57] Durch die Reaktion der NCO-Gruppen konnte im Laufe der Reaktion eine stetige Abnahme der intensiven NCO-Bande (2260 – 2257 cm^{-1}) beobachtet werden (**Abbildung 21, a**). Die Spektren wurden mit der Methode „Vektornormierung“ normiert, um einen Vergleich der Spektren zu ermöglichen. Im Gegensatz zur NCO-Bande, die sich während der Reaktion veränderte, blieben die Bandenintensitäten der C–H-Valenzschwingungen im Bereich von 3000 – 2700 cm^{-1} konstant. Der prozentuale Isocyanatumsatz wurde über die Ermittlung der Flächenintegrale der NCO-Banden bestimmt. Das Flächenintegral der NCO-Bande zu Beginn der Reaktion wurde als 100 % gesetzt und entspricht einem Umsatz von 0 %. Die folgenden Flächenintegrale wurden auf diese 100 % Flächenintegral bezogen. Im Zeitraum von 3 bis 4,5 h schwankt der Isocyanatumsatz zwischen 34 und 37 % (**Abbildung 21, b**). Die Schwankungen können u. a. auf das Lösungsmittel THF zurückgeführt werden. Das THF wurde zwar vor der FTIR-Messung entfernt, allerdings können kleine Unterschiede im Lösungsmittelgehalt der Probe die Intensitäten und Integrale der Banden beeinflussen. Daher wurde der Umsatz der NCO-Gruppe als konstant angenommen und die Reaktion nach 4,5 h abgeschlossen. Bei einem NCO/OH-Verhältnis von 2 : 1 wäre ein Umsatz von 50 % zu erwarten. Der ermittelte Isocyanatumsatz von 34 – 37 % ist aber geringer, da das IPDI im leichten Überschuss eingesetzt wurde.

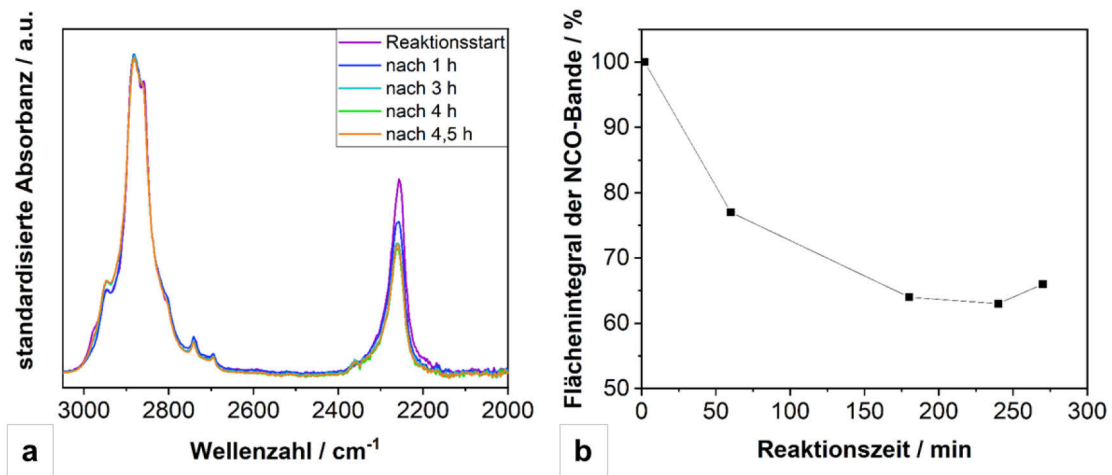


Abbildung 21: Überlagerte FTIR-Spektren der Reaktionskontrolle (a) und prozentuale Flächenintegrale der NCO-Bande in Abhängigkeit der Reaktionszeit (b).

Nach Abschluss der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch ohne Aufarbeitung des Zwischenproduktes (IPDI-PEG-IPDI) unter Schutzgasatmosphäre mit HMF umgesetzt, sodass durch Ausbildung weiterer Urethangruppen zwischen den NCO-Gruppen des PEG-Diisocyanats und der OH-Gruppe des HMFs das Dialdehyd (HMF-IPDI-PEG-IPDI-HMF) hergestellt werden konnte (**Abbildung 22**). Zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen wurde das Rohprodukt chromatographisch aufgearbeitet und mit einer Ausbeute von 79 % als helloranger Feststoff erhalten.

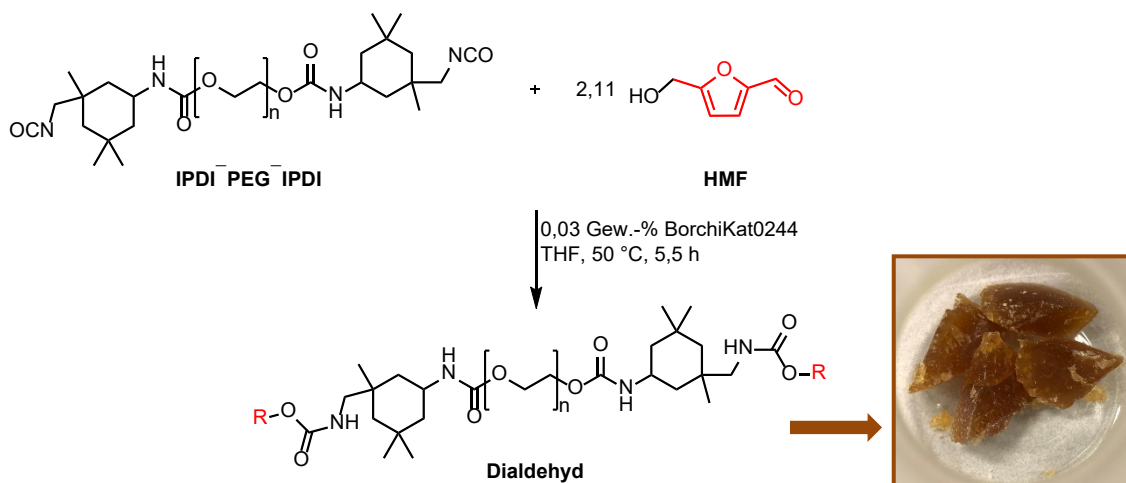


Abbildung 22: Reaktionsschema zur Synthese des Dialdehyds aus dem IPDI-funktionalisierten PEG und HMF. Der Rest **R** steht für das HMF, das die Aldehydgruppe trägt. Das Foto bildet das orangebraune Rohprodukt ab.

Im Gegensatz zur ersten Syntheseroute wurden in der zweiten Syntheseroute neben PEG3000 auch PEG2000 und PEG1000 als Basis für das jeweilige Dialdehyd verwendet. Die entsprechenden Dialdehyde werden im Folgenden als Dialdehyd1000, Dialdehyd2000 und Dialdehyd3000 bezeichnet.

4.2.3 Charakterisierung der Dialdehyde

4.2.3.1 FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-Spektroskopie wurde verwendet, um anhand charakteristischer Banden zu erkennen, ob die Synthesen erfolgreich zur Bildung der Dialdehyde geführt haben. Für die Syntheseroute 1 wurden zunächst die Spektren der Edukte IPDI und HMF mit dem Spektrum des Monoaddukts verglichen (**Abbildung 23**).

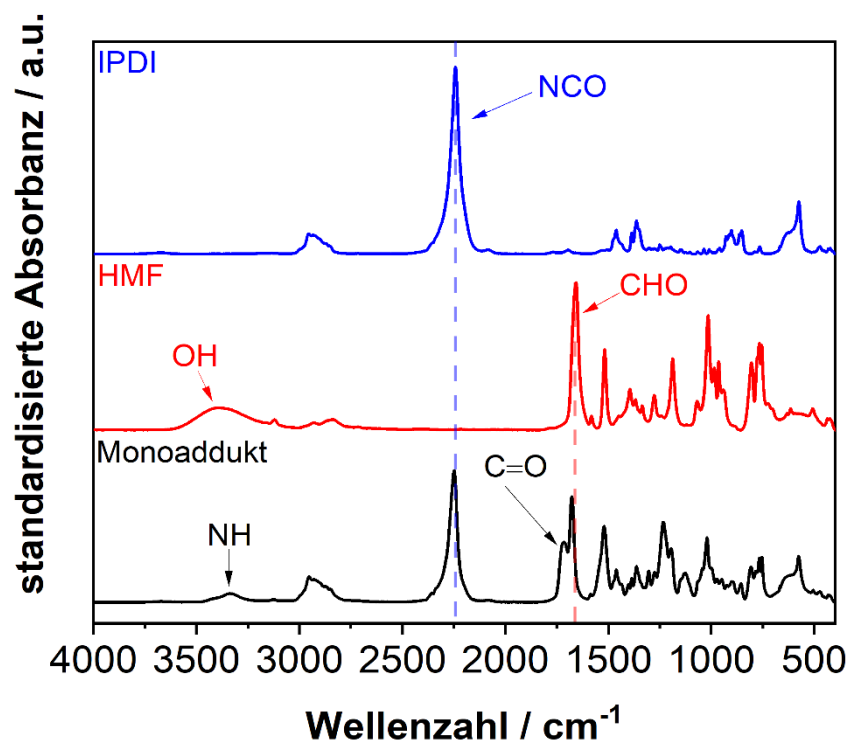


Abbildung 23: FTIR-Spektren von IPDI, HMF und dem Monoaddukt.

Die NCO-Bande bei 2243 cm^{-1} ist sowohl im Spektrum des Diisocyanats als auch im Produkt leicht verschoben bei 2249 cm^{-1} deutlich zu erkennen, da bei einem NCO/OH-Verhältnis von 2 : 1 nur die Hälfte der NCO-Gruppen umgesetzt wurden. Die C=O-Valenzschwingung der Aldehydgruppe des HMFs ist leicht verschoben auch im Monoaddukt bei einer Wellenzahl von 1678 cm^{-1} vorhanden. Die breite OH-Bande (ca.

3390 cm^{-1}) im HMF-Spektrum ist nach der Reaktion mit den NCO-Gruppen des Diisocyanats nicht mehr im Spektrum des Monoaddukts zu sehen. Stattdessen sind die weniger intensive N–H-Valenzschwingung bei 3338 cm^{-1} und eine zweite C=O-Valenzschwingung bei 1715 cm^{-1} sichtbar, die der entstandenen Urethangruppe zuzuordnen sind. Trotz der nachgewiesenen Urethangruppe kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich die in **Kapitel 4.2.2** genannten Nebenprodukte entstanden sind. Des Weiteren wurde das FTIR-Spektrum des Monoaddukts mit den Spektren von PEG3000 und dem chromatographisch aufgearbeiteten Dialdehyd3000 verglichen (**Abbildung 24**).

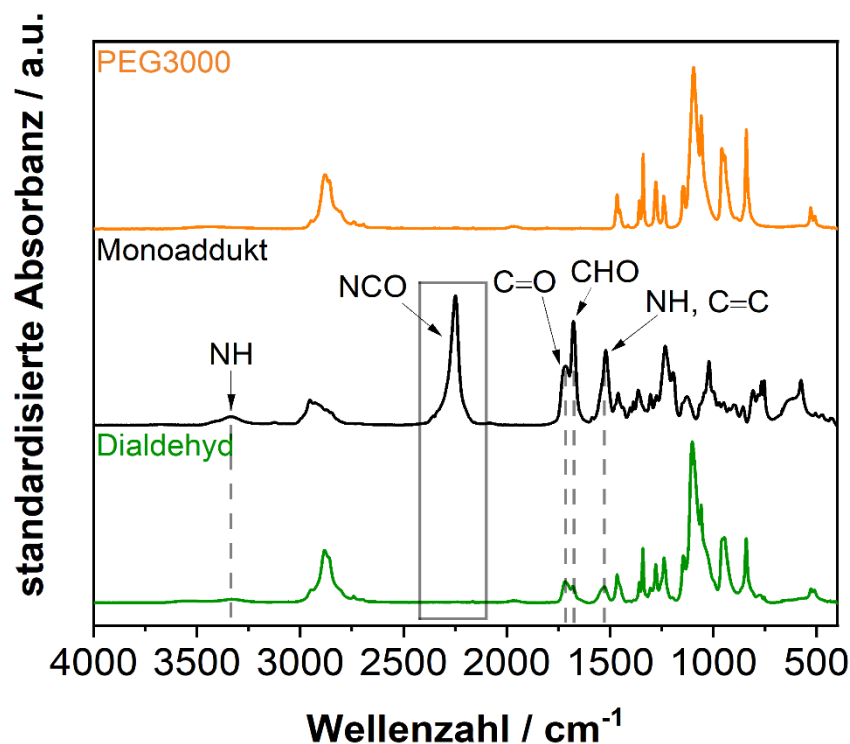


Abbildung 24: FTIR-Spektren von PEG3000, dem Monoaddukt und dem Dialdehyd (Monoaddukt–PEG–Monoaddukt).

Das Verschwinden der NCO-Bande im Spektrum des Dialdehyds bestätigt den vollständigen Umsatz des Monoaddukts. Die nicht vorhandene OH-Bande kann nicht als Beweis für einen vollständigen Umsatz von PEG herangezogen werden, da die OH-Bande auf Grund der großen Kettenlänge auch nicht im Spektrum des Polyethylenglycols sichtbar ist. Das PEG macht einen sehr großen Anteil des Dialdehyds aus, sodass sich die beiden Spektren sehr ähnlich sehen. Die Verbindung Mono-

addukt-PEG-Monoaddukt hat allerdings noch zusätzliche Banden im Spektrum. Die C=O-Valenzschwingungen der Aldehydgruppe (1678 cm^{-1}) und der Urethangruppe (1716 cm^{-1}) befinden sich sowohl im Monoaddukt als auch im Dialdehyd. Die Bande bei 1527 cm^{-1} ist ebenfalls in beiden Spektren zu sehen, sowie im Spektrum von HMF. Diese Wellenzahl kann der C=C-Valenzschwingung des HMF-Furangerüsts zugeordnet werden. Die N-H-Deformationsschwingung der Urethangruppe ist einem Bereich zwischen 1570 und 1515 cm^{-1} zu finden, aber oft so schwach, dass die Bande nicht bemerkt wird.[57] Möglicherweise ist die Bande von der C=C-Valenzschwingung überlagert. Die im Monoaddukt sichtbare N-H-Valenzschwingung der Urethangruppe bei 3338 cm^{-1} ist im Dialdehyd nicht zu erkennen. Generell sind die Banden, die dem Monoaddukt-Anteil im Produkt zuzuordnen sind, weniger intensiv als die Banden, die durch den PEG-Anteil des Produkts hervorgerufen werden, da dieser einen wesentlich größeren Anteil der Molekülstruktur ausmacht. In **Kapitel 3.3.4** sind die charakteristischen Banden des Dialdehyds und die dazugehörigen Schwingungstypen aufgeführt.

Anders als bei der Syntheseroute 1 wurde bei der Route 2 zunächst das IPDI-funktionalisierte PEG aus PEG3000, PEG2000 oder PEG1000 hergestellt. Das FTIR-Spektrum der Verbindung wurde mit den Spektren der Edukte PEG3000 und IPDI verglichen (**Abbildung 25**). Die NCO-Bande des Diisocyanats ist leicht verschoben auch noch im Spektrum des Produkts bei 2259 cm^{-1} zu sehen, da das Produkt durch die Funktionalisierung mit IPDI zwei endständige NCO-Gruppen besitzt. Die C=O-Valenzschwingung bei 1719 cm^{-1} und die N-H-Deformationsschwingung bei 1533 cm^{-1} bestätigen die Bildung von Urethanbindungen. Die anderen Banden des Spektrums ähneln stark den Banden des Edukts PEG.

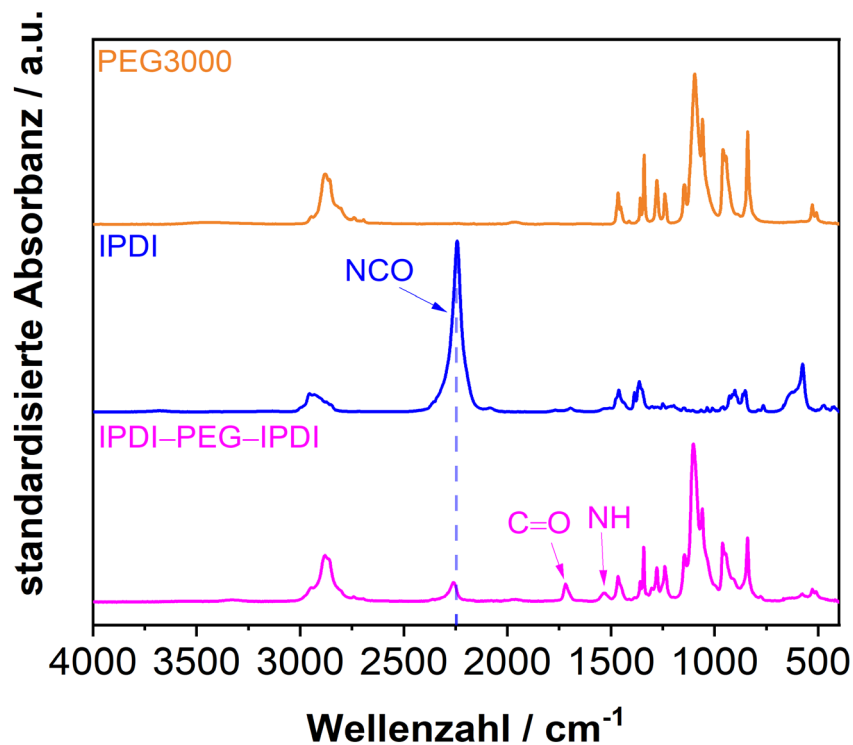


Abbildung 25: FTIR-Spektren von PEG3000, IPDI und dem IPDI-funktionalisierten PEG.

Anschließend wurden die FTIR-Spektren der Edukte HMF und IPDI-PEG-IPDI des zweiten Syntheseschritts mit dem Spektrum des chromatographisch aufgearbeiteten Dialdehyds3000 verglichen (**Abbildung 26**). Die NCO-Bande des IPDI-funktionalisierten PEGs und die OH-Bande im HMF-Spektrum sind nach der Reaktion nicht mehr im Produkt zu sehen, sodass auf einen vollständigen Umsatz der beiden funktionellen Gruppen geschlossen werden kann. Neben der C=O-Valenzschwingung der Urethan-Gruppe, die um 3 cm^{-1} nach rechts auf 1716 cm^{-1} verschoben ist, befindet sich eine weitere C=O-Valenzschwingung bei 1679 cm^{-1} im Dialdehyd. Diese Bande wird durch die CHO-Gruppe des HMF-Anteils im Molekül hervorgerufen. Die N-H-Deformationsschwingung bei 1533 cm^{-1} im Edukt IPDI-PEG-IPDI und die C=C-Valenzschwingung bei 1519 cm^{-1} im HMF überlagern sich im Produkt zu einer breiten Banden bei 1527 cm^{-1} . Die N-H-Valenzschwingung der Urethangruppe, die im Dialdehyd-Spektrum der ersten Syntheseroute nicht sichtbar ist, befindet sich im Dialdehyd dieser zweiten Syntheseroute bei einer Wellenzahl von 3330 cm^{-1} . Abgesehen von der N-H-Valenzschwingung weisen die Dialdehyde der zwei unterschiedlichen Syntheserouten nahezu identische Banden im IR-Spektrum auf.

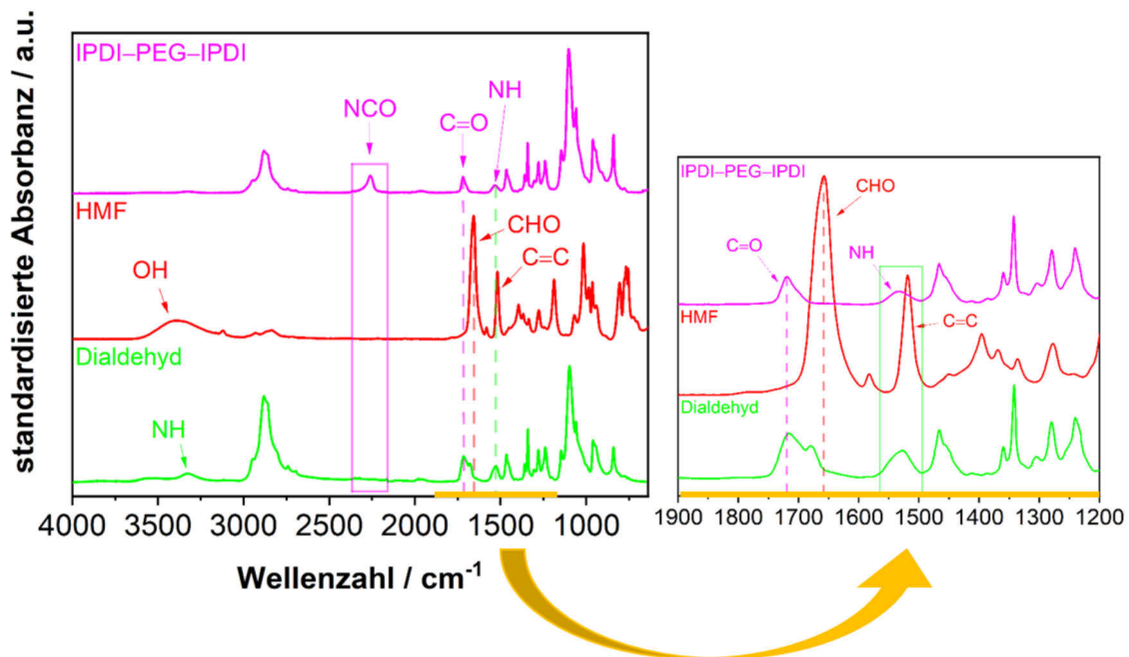


Abbildung 26: FTIR-Spektren des IPDI-funktionalisierten PEGs, von HMF und des Dialdehyds (HMF-IPDI-PEG-IPDI-HMF). Der Bereich von 1900 – 1200 cm⁻¹ wurde zusätzlich vergrößert dargestellt.

Die Dialdehyde der Route 2, die mit PEG2000 und PEG1000 hergestellt wurden unterscheiden sich ebenfalls kaum im IR-Spektrum (**Abbildung 27**). Sie weisen dieselben Banden auf, die auch im Spektrum vom Dialdehyd3000 zu sehen sind. Allerdings unterscheiden sich die IR-Banden in ihrer Intensität. Im Dialdehyd1000 ist der PEG-Anteil im Polymer geringer als im Dialdehyd3000, daher sind die Banden, die zur Urethangruppe und zum HMF-Teil des Polymers gehören deutlich intensiver als im Spektrum von Dialdehyd3000. Die C-H- und C-O-Valenzschwingungen, die im Wesentlichen durch PEG hervorgerufen werden, sind im Spektrum von Dialdehyd3000 etwas intensiver als im Spektrum von Dialdehyd1000.

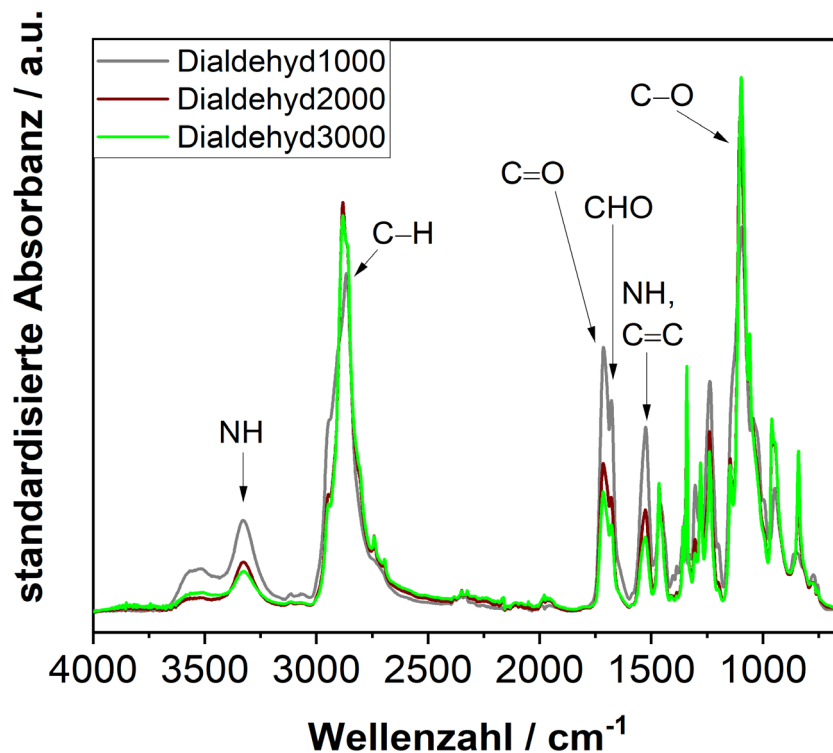


Abbildung 27: Vergleich der FTIR-Spektren der Dialdehyde basierend auf PEG1000, PEG2000 und PEG3000.

4.2.3.2 NMR-Spektroskopie

Zur genaueren Strukturaufklärung der Dialdehyde wurde die NMR-Spektroskopie verwendet (detaillierte Auswertung in **Kapitel 3.3.4**). Die ^1H NMR-Spektren und die ^{13}C NMR-Spektren der unterschiedlich hergestellten Dialdehyde (Route 1 und 2) und auch die Dialdehyde mit unterschiedlicher Kettenlänge (Dialdehyd1000 – 3000) weisen dieselben chemischen Verschiebungen auf. Im Folgenden werden daher nur die NMR-Spektren des nach Route 2 hergestellten Dialdehyds3000 diskutiert. Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte neben der Messung von DEPT135- und 2D-NMR-Experimenten über den Vergleich mit den Spektren der Edukte. Die Signale, die dem HMF- und PEG-Teil des Polymers angehören, sind eindeutig im ^1H NMR des Dialdehyds3000 zu identifizieren (**Abbildung 28**). Die Tieffeldverschiebung der CH_2 -Gruppe des HMF-Teils von 4,67 ppm zu 5,08 ppm ist auf die Reaktion der benachbarten Hydroxylgruppe zu einer Urethangruppe zurückzuführen. Das ursprüngliche Singulett ist im Spektrum des Polymers allerdings in zwei Signale aufgespalten, wobei das Signal bei 5,08 ppm deutlich intensiver ist als das zweite Signal bei 5,05 ppm. Diese Aufspaltung deutet auf die Entstehung unterschiedlicher Spezies (vermutlich cis und trans bezogen auf den Cyclohexan-Ring des IPDI) hin, da die beiden Protonen der CH_2 -Gruppe enantiotop sind

und dementsprechend nur ein Signal im NMR erzeugen würden. Außerdem weist das ^1H , ^1H -COSY keine ^2J -Kopplung zwischen den beiden Signalen auf, wodurch die Annahme von zwei unterschiedlichen Spezies bestärkt wird. Die Signale, die zu dem IPDI-Teil des Polymers gehören sind wesentlich schwerer auszuwerten. Das kommerziell erhältliche IPDI besteht zu ca. 70 % aus dem *cis*-Isomer und zu ca. 30 % aus dem *trans*-Isomer.[52] Die Tatsache, dass das IPDI ein Gemisch aus zwei Isomeren ist trägt zur Komplexität des Spektrums bei. Die drei Methylgruppen des IPDI befinden sich im Bereich von 1,22 – 0,84 ppm. Die anderen IPDI-Signale sind in die Gruppen A bis C eingeteilt. Allerdings ist es nicht genau möglich diese Signale eindeutigen Positionen im IPDI-Teil des Polymers zuzuordnen. Die Signale der A-Gruppe gehören sehr wahrscheinlich zu den drei Methylgruppen, die am Sechsring des IPDI positioniert sind. Die B-Gruppe gehört zu der Methylgruppe, die sich in direkter Nachbarschaft zur primären Urethangruppe befindet. Die beiden mit C gekennzeichneten Signale sind der Methingruppe im Sechsring zuzuordnen. Das breite Singulett bei 2,39 ppm besitzt laut HSQC keine ^1J -Kopplung mit einem Kohlenstoffatom des Moleküls. Daher wird angenommen, dass es sich um das Proton am Stickstoffatom der Urethangruppen handelt.

Da das Dialdehyd3000 zwei Aldehydgruppen besitzen müsste, wurde das Singulett der CHO-Gruppe bei 9,59 ppm auf 2 H normiert. Die Integrale der anderen drei HMF-Signale entsprechen den Erwartungen. Allerdings passen die Integrale des PEG- und des IPDI-Teils des Polymers nicht zu den Integralen des HMF-Teils. Der PEG3000-Teil des Polymers müsste ca. 274 Wasserstoffatome anstatt 493 H aufweisen. Die insgesamt sechs Methylgruppen, die zu den beiden IPDI-Bausteinen gehören, müssten ein Integral von 18 H anstatt 31 H ergeben. Auch die restlichen Signale der Wasserstoffatome (A – C-Teil) der beiden IPDI-Bausteine weisen zu hohe Integrale auf: 16 H statt 12 H (A-Teil), 15 H statt 4 H (B-Teil) und 4 H statt 2 H (C-Teil). Durch die NMR-Spektren kann also nicht bewiesen werden, dass das Dialdehyd3000 erfolgreich hergestellt wurde. Die nicht zueinanderpassenden Integrale lassen vermuten, dass es sich um ein polymeres Produktgemisch handelt.

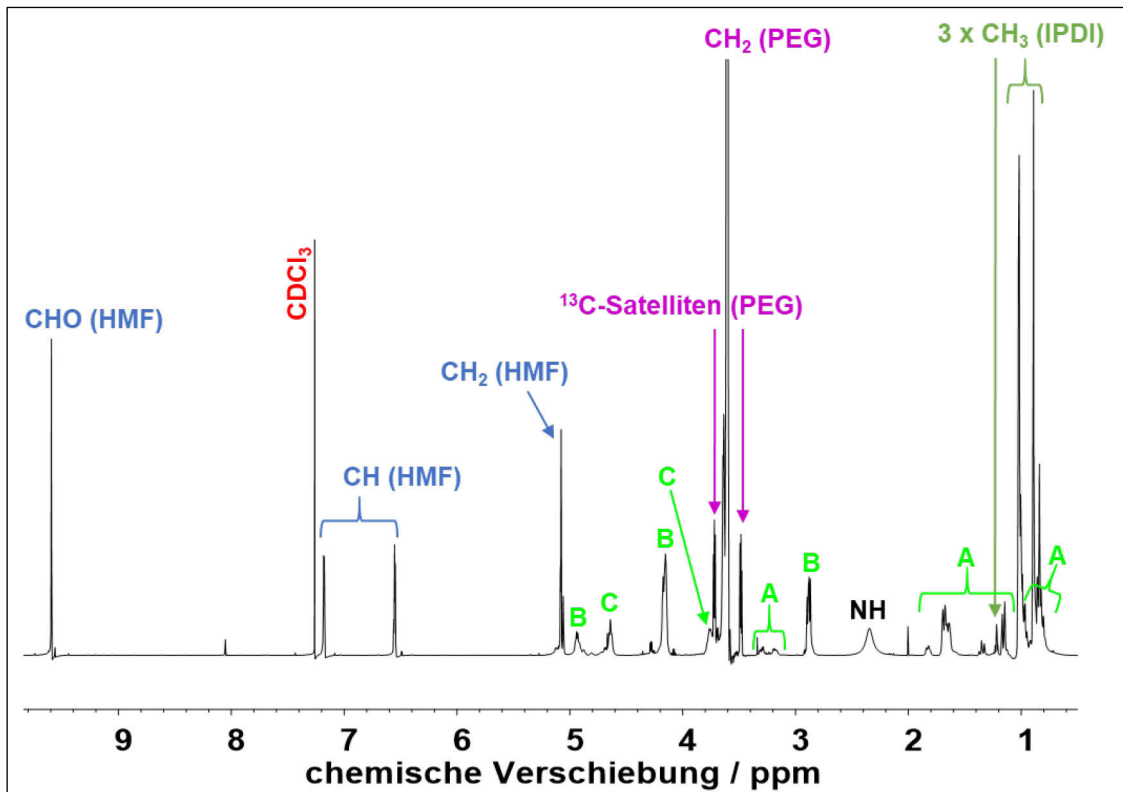


Abbildung 28: ^1H NMR-Spektrum von Dialdehyd3000 in CDCl_3 . Die Signale A – B können dem IPDI-Teil des Polymers zugeordnet werden. Das PEG-Signal bei 3,60 ppm ist zugunsten der Intensität der anderen Signale nicht vollständig abgebildet. Das Signal ist eigentlich deutlich intensiver als die anderen Signale des Polymers (ca. Faktor 22 bezogen auf CDCl_3).

In **Abbildung 29** werden die ^{13}C NMR-Spektren des Edukts IPDI und des Dialdehyds3000 miteinander verglichen. Im Spektrum des IPDI sind alle ^{13}C -Signale zweimal vorhanden und unterscheiden sich nur um $\leq 0,8$ ppm. Die beiden Signale haben jeweils ein Verhältnis von ungefähr 3 : 1 zueinander, wobei das intensivere Signal durch das cis-Isomer hervorgerufen wird und das schwächere Signal durch das trans-Isomer. Lediglich die beiden Signale der primären und sekundären NCO-Gruppen bei 122,0 und 122,8 ppm kommen nur einmal vor, dafür aber breiter. Die chemischen Verschiebungen der beiden Konfigurationsisomere an der Methylengruppe (C-10) in direkter Nachbarschaft zur primären NCO-Gruppe und an der Methylgruppe (C-9) in der Nähe der primären NCO-Gruppe unterscheiden sich deutlich stärker als 0,8 ppm voneinander. Die Methylengruppe weist Verschiebungen von 56,8 ppm (cis) und 50,8 ppm (trans) auf und die Methylgruppe ist den Signalen bei 23,3 ppm (cis) und 29,8 (trans) zuzuordnen. Die Isomerie des Edukts hat auch Einfluss auf das Dialdehyd3000. Allerdings kommen einige Signale auch mehr als nur zweimal vor, sodass erneut auf ein polymeres

Produktgemisch anstatt auf ein reines Dialdehyd3000 geschlossen werden kann. Die beiden Signale der NCO-Gruppen sind im Produktspektrum nicht mehr vorhanden, sodass von einer vollständigen Umsetzung ausgegangen werden kann. Das Signal bei 121,8 ppm konnte mittels HSQC der Methingruppe (C-16) des HMF-Teils zugeordnet werden.

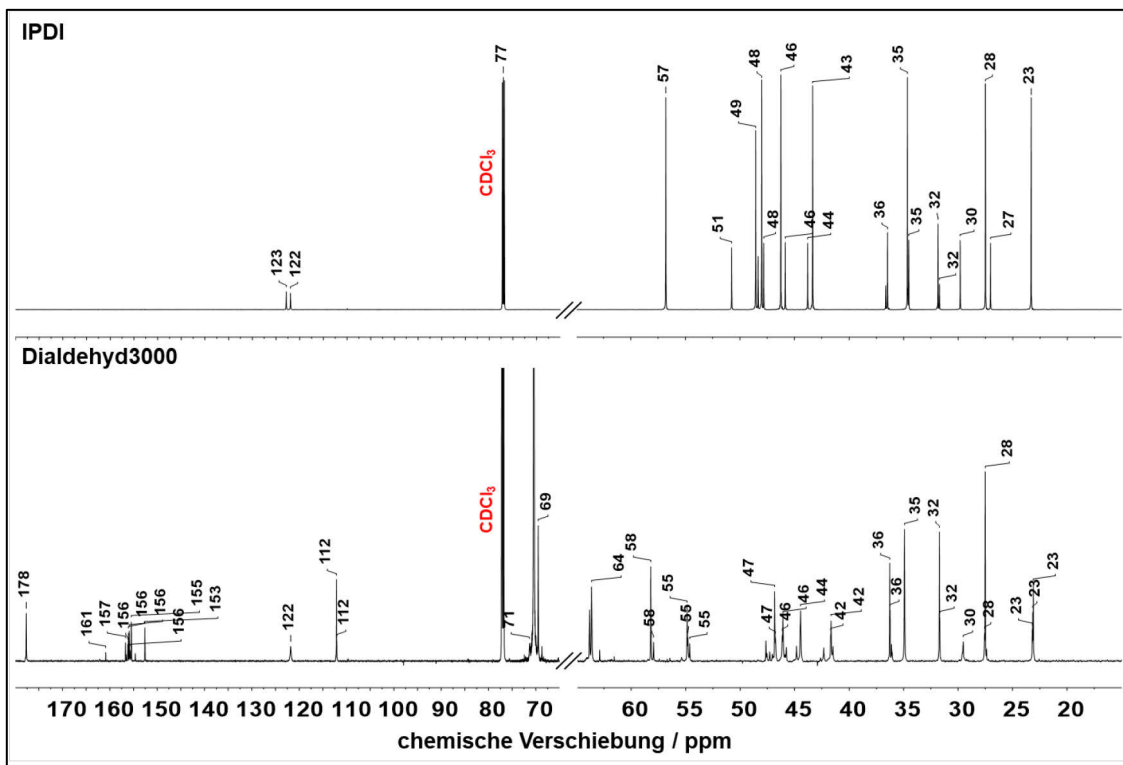


Abbildung 29: ¹³C NMR-Spektren von IPDI und Dialdehyd3000 in CDCl₃. Das Lösungsmittel-Signal bei 77,0 ppm und das Signal bei 70,4 ppm im Spektrum des Dialdehyds sind zugunsten der Intensität der anderen Signale nicht vollständig abgebildet. Insbesondere das Signal bei 70,4 ppm ist deutlich intensiver als die anderen Signale des Polymers (ca. Faktor 19 bezogen auf CDCl₃ und Faktor 200 auf die anderen Signale).

4.2.3.3 MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Da die NMR-Spektroskopie daraufhin deutete, dass bei den Synthesen der Dialdehyde Produktgemische erhalten wurden, erfolgte eine weitere Charakterisierung mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie. Diese Methode erlaubt allerdings nur qualitative und keine quantitativen Aussagen. Die Proben wurden in einem Massenbereich von 1 bis 7 kDa im Reflektormodus und von 4 bis 12 kDa im Linearmodus gemessen. Mit

dem Reflektormodus wird eine sehr hohe Massengenauigkeit und Auflösung erreicht, sodass eine gute Endgruppenanalyse möglich ist. Allerdings ist die Empfindlichkeit bei dieser Messanordnung nicht so hoch wie bei der Messung im Linearmodus, da auf Grund der längeren Flugstrecke insbesondere Quasimoleküle mit hoher Molmasse durch Fragmentierung nicht am Detektor ankommen.[85,86] Im höheren Massenbereich wurde daher der Linearmodus angewendet. Der Linearmodus führt aber zu einer schlechteren Massengenauigkeit und Auflösung, sodass sich diese Messanordnung nicht gut für eine Endgruppenanalyse eignet.[85,86]

Durch die MALDI-ToF-Messungen konnte festgestellt werden, dass keine der zwei Syntheserouten ausschließlich zu dem gewünschten Produkt Dialdehyd3000 führen konnte. Das Massenspektrum der Route 1a zeigt, dass im kleineren Massenbereich neben dem gewünschten Dialdehyd3000 (HMF-IPDI-PEG-IPDI-HMF) auch noch das monofunktionalisierte PEG3000 (Aldehyd3000 bzw. PEG-IPDI-HMF) entstanden ist (**Abbildung 30, a**). Außerdem wies eine weniger ausgeprägte Verteilung auf nicht umgesetztes PEG oder PEG-IPDI hin. Die schwarz dargestellten Signale konnten keiner Verbindung zugeordnet werden. Im höheren Massenbereich wurde eine PEG-Verteilung mit zwei PEG-IPDI-Wiederholeinheiten identifiziert (**Abbildung 30, b**). Möglicherweise handelt es sich dabei um das längerkettige Dialdehyd $\text{HMF}-(\text{IPDI-PEG})_2\text{-IPDI-HMF}$ oder um das längerkettige Aldehyd $\text{HMF}-(\text{IPDI-PEG})_2$. Diese beiden Verbindungen unterscheiden sich um ca. 4 Da. Die orange markierte PEG-Verteilung liegt genau zwischen diesen beiden Verbindungen. Die Form bzw. das Maximum der Molmassenverteilung spricht aber eher für das Dialdehyd $\text{HMF}-(\text{IPDI-PEG})_2\text{-IPDI-HMF}$. Im hinteren Massenbereich gibt es ebenfalls schwarz markierte Signale, die keiner Verbindung zugeordnet werden konnten. Insbesondere für die Signale zwischen 10 und 11 kDa ist eine Identifizierung nicht möglich, da nur mit PEG6000 kalibriert wurde. Es ist aber naheliegend, dass es sich bei der Verteilung auf Grund der molaren Masse um ein Polymer mit drei PEG-IPDI-Wiederholeinheiten handelt. Im Massenspektrum der Syntheseroute 1b, bei der das Monoaddukt aus HMF und IPDI im Überschuss mit PEG3000 umgesetzt wurde, konnte im Bereich von 1 – 5,5 kDa nur das gewünschte Dialdehyd3000 und eine weitere nicht identifizierbare Verteilung nachgewiesen werden (**Abbildung 30, c**). Folglich konnte durch die Zugabe einer größeren Menge Monoaddukt die Bildung des Aldehyds3000 und die Bildung von PEG-IPDI bzw. die nicht Umsetzung von PEG verhindert werden. Die drei Polymere würden auf Grund ihrer nicht vorhandenen Funktionalisierung (PEG) bzw. ihrer Monofunktionalität (Aldehyd und PEG-IPDI) nicht als chemisch vernetzende Komponente im Hydrogel wirksam sein. Im Massenbereich von 5,5 – 12 kDa wurde

eindeutig das längerkettige Dialdehyd (HMF-(IPDI-PEG)₂-IPDI-HMF) nachgewiesen (**Abbildung 30**, d). Des Weiteren wurden erneut zwei nicht zu zuordnende Verteilungen im Bereich von ca. 6,5 – 8,5 kDa und um die 11 kDa detektiert. Letztere ist vermutlich ein Polymer mit drei PEG-IPDI-Wiederholeinheiten. Mit der Syntheseroute 2 konnten laut der MALDI-ToF-Spektren die besten Ergebnisse erzielt werden (**Abbildung 30**, e + f). Es wurden das gewünschte Dialdehyd3000 und die beiden längerkettigen Dialdehyde mit zwei bzw. drei PEG-IPDI-Wiederholeinheiten detektiert. Auf Grund der Bifunktionalität können alle drei Polymere als Vernetzerkomponente im Hydrogel fungieren. Lediglich im vorderen Bereich von 1000 bis 1250 Da sind mehr Signale vorzufinden als bei den anderen beiden Syntheserouten. Diese Signale konnten allerdings keiner Verbindung zugeordnet werden.

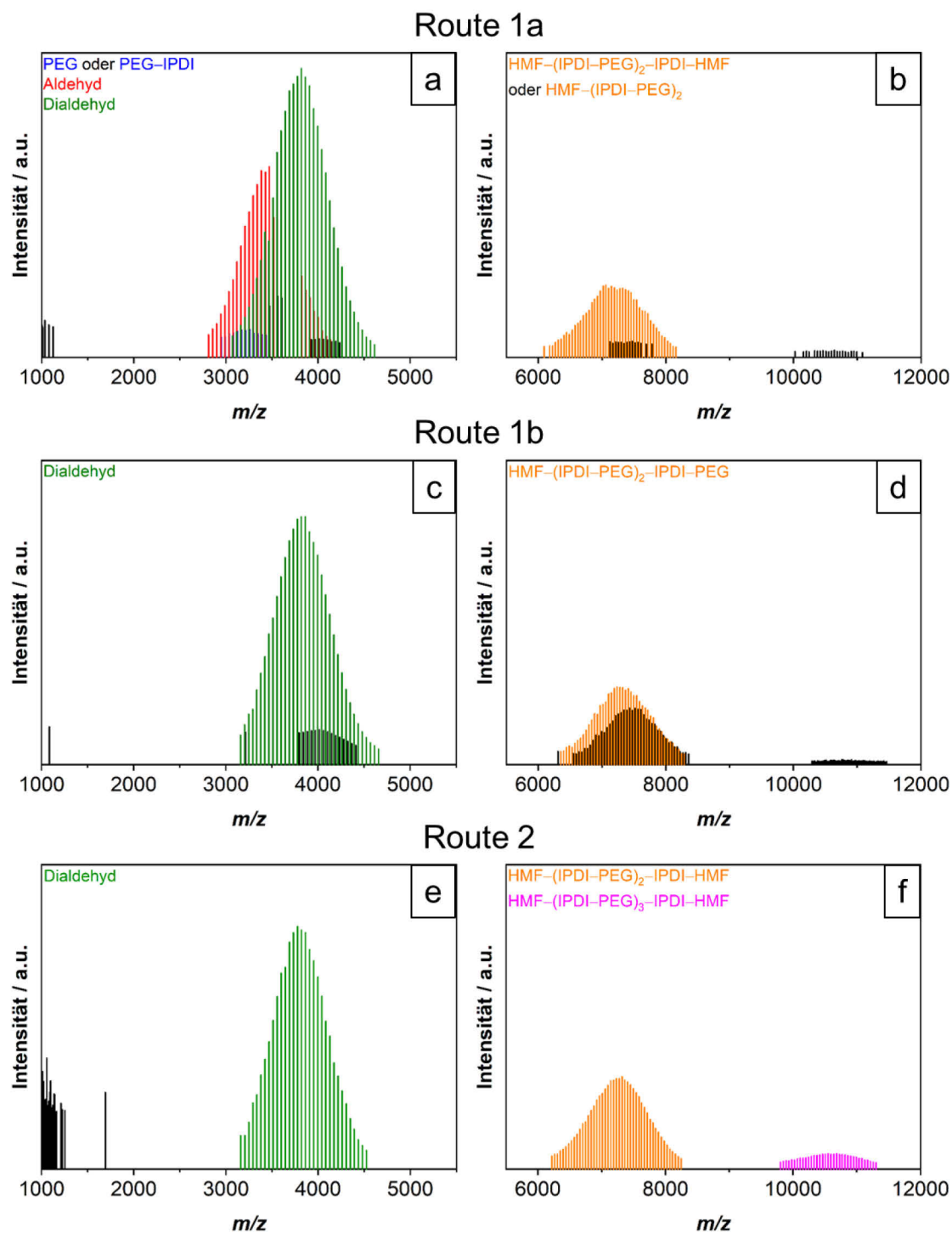


Abbildung 30: MALDI-ToF-Massenspektren des Dialdehyds3000 synthetisiert nach Route 1a (a + b), Route 1b (c + d) und Route 2 (e + f). Die Spektren wurden in einem Massenbereich von 1 bis 12 kDa aufgenommen. Die schwarzen Signale konnten keiner Verbindung zugeordnet werden.

Die MALDI-ToF-Spektren der Dialdehyde1000 und 2000, die ebenfalls mit der Syntheseroute 2 hergestellt wurden, beweisen analog zu den Spektren von

Dialdehyd3000 das Vorhandensein der drei Dialdehyde mit ein, zwei und drei PEG-IPDI-Wiederholeinheiten (grüne, orange und pinke Verteilung, **Abbildung 31**). Im Massenspektrum von Dialdehyd2000 befindet sich im Bereich von ca. 9 – 10 kDa noch eine Verteilung, die nicht identifiziert werden konnte. Auf Grund der Masse wird allerdings ein Polymer mit vier PEG-IPDI-Wiederholeinheiten vermutet. Sowohl in dem Produktgemisch von Dialdehyd1000 als auch im Produktgemisch von Dialdehyd2000 wurde das Polymer PEG-IPDI, welches im Hydrogel nicht chemisch vernetzen kann, nachgewiesen. Diese Verbindung ist aber sehr wahrscheinlich nur in geringer Menge entstanden, weil die FTIR-Spektren keine NCO-Banden mehr aufweisen (**Abbildung 27**) und die MALDI-ToF-Massenspektrometrie deutlich sensitiver als die FTIR-Spektroskopie ist.

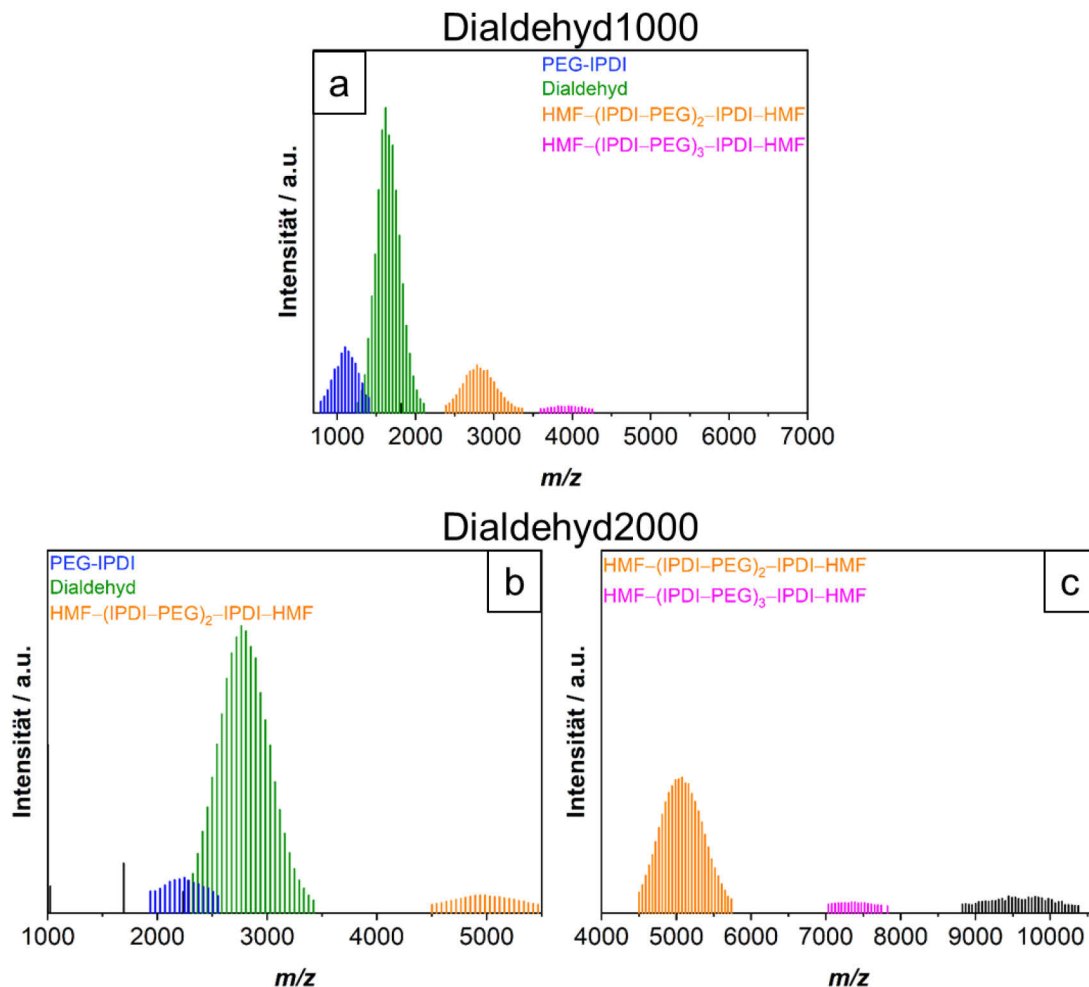


Abbildung 31: MALDI-ToF-Massenspektren der nach Route 2 synthetisierten Dialdehyde 1000 (a) und 2000 (b + c) in einem Massenbereich von 1 bis 7 kDa (a) bzw. 1 bis 10,5 kDa (b + c).

4.2.3.4 Gel-Permeations-Chromatographie

Als Ergänzung zu der MALDI-ToF-Massenspektrometrie wurden die polymeren Produktgemische mit der Gel-Permeations-Chromatographie untersucht. In Kombination mit den MALDI-ToF-Ergebnissen lassen sich quantitative Aussagen über die einzelnen Komponenten der Produktgemische treffen. Die mit der GPC ermittelten molaren Massen stimmen allerdings weder genau mit den molaren Massen der Massenspektrometrie noch mit den berechneten mittleren Molmassen (ausgehend von den Angaben aus den Analysezertifikaten der PEGs) überein, da zur Auswertung der Messdaten nur eine Kalibrierung mit PEG-Standards herangezogen werden konnte und nicht mit den bei der Synthese entstandenen Produkten kalibriert wurde.

Zunächst wurde die Molmassenverteilung des nach Route 1a synthetisierten Dialdehyds3000 mit anschließender chromatographischer Aufarbeitung mit der Molmassenverteilung des Rohprodukts verglichen (**Abbildung 32**). Im Bereich von größer 1000 Da sind vier Fraktionen zu sehen. Die mittleren molaren Massen der entstandenen Produkte liegen zu nah beieinander, sodass sich die Molmassenverteilungen der einzelnen Fraktionen insbesondere im hinteren Bereich stark überlappen. Im Bereich von unter 1000 Da (oranger Kasten) unterscheiden sich die beiden Proben deutlich voneinander. Bei dem Rohprodukt hat der niedermolekulare Bereich einen Anteil von ca. 10 %. Durch die chromatographische Aufreinigung des Produktgemisches konnte der niedermolekulare Bereich auf ca. 1 % reduziert werden. In der Regel wurde der Erfolg der chromatographischen Aufreinigung allerdings über die Dünnschichtchromatographie überprüft. Bei der Dünnschichtchromatographie konnten mit Ethylacetat als Laufmittel drei Fraktionen bzw. Spots unterschieden werden. Die beiden Fraktionen mit Retentionsfaktoren größer Null ($R_f = 0,64$ und $R_f = 0,55$) wurden aus dem Produktgemisch entfernt. Die dritte Fraktion ist auf der Startlinie geblieben ($R_f = 0$) und entspricht den vier GPC-Fraktionen im Bereich von größer 1000 Da. Da die GPC-Messungen sensitiver sind als die Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie sind bei den GPC-Ergebnissen immer noch geringe Mengen niedermolekularer Verbindungen im gereinigten Produkt sichtbar.

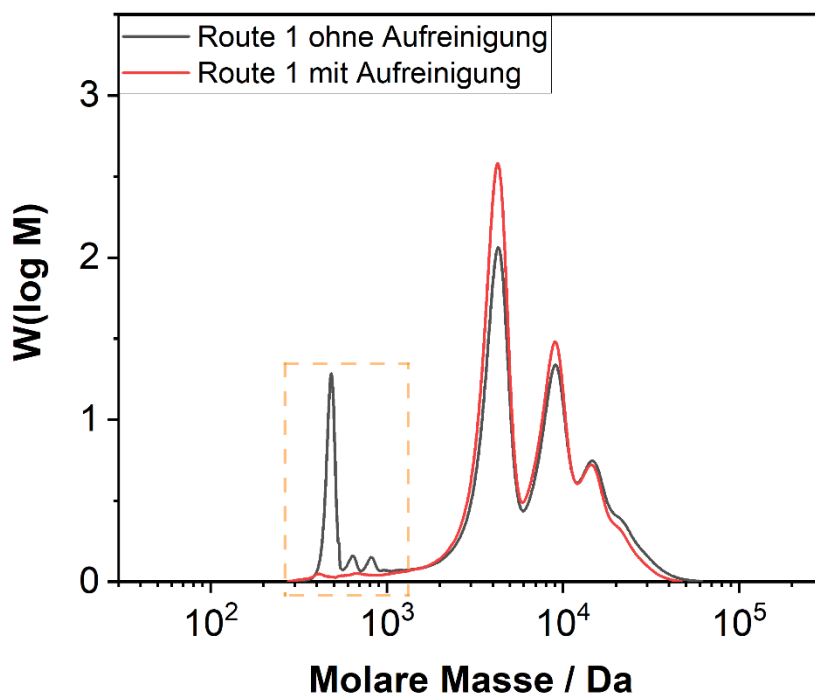


Abbildung 32: Molmassenverteilung des Dialdehyds3000 synthetisiert nach Route 1a mit anschließender chromatographischer Aufreinigung verglichen mit der Molmassenverteilung des Rohprodukts ohne Aufreinigung.

In **Abbildung 33** werden die Molmassenverteilungen der unterschiedlichen Syntheserouten von Dialdehyd3000 miteinander verglichen. Der nach Aufreinigung übergebliebene niedermolekulare Bereich wurde als Fraktion a zusammengefasst. Die anderen vier Fraktionen wurden als b – e gekennzeichnet. Es wurden die prozentualen Peakflächen und die dazugehörigen molaren Massen am Peakmaximum M_p der einzelnen Fraktionen ermittelt (**Tabelle 16**). Auffällig ist, dass sich die Positionen der Peakmaxima von Syntheseroute 1b und 2 sehr ähnlich sind. Die Peakmaxima von Route 1a liegen im Vergleich dazu immer bei höheren Molmassen. Die Fraktion b macht in allen drei Fällen den größten Anteil des Produktgemisches aus (41 – 50 %) und hat ein Peakmaximum bei ca. 4090 Da. Die auf Basis von PEG3000 berechnete mittlere molare Masse des gewünschten Produkts Dialdehyd3000 liegt bei 3730 Da. Das MALDI-ToF-Spektrum der Route 2 weist in diesem Bereich nur eine Verteilung von Dialdehyd3000 auf, d.h. mit der Syntheseroute 2 konnte das gewünschte Produkt mit einer ungefähren Ausbeute von 41 ± 1 % erhalten werden. Die Syntheseroute 1a hat im Bereich von 4090 Da insgesamt vier Verteilungen und die Syntheseroute 1b hat zwei Verteilungen. Die Ausbeute des Dialdehyds3000 kann demnach nicht ermittelt werden. In beiden Fällen nimmt die Fraktion b einen etwas größeren Anteil ein als bei der

Syntheseroute 2. Dies könnte an den zusätzliche PEG-Verteilungen im Bereich von 4090 Da liegen. Die Fraktion c ist zu 27 – 30 % entstanden, hat ein Peakmaximum bei ca. 8487 Da und ist daher am ehesten einem Gemisch aus den Dialdehyden mit zwei und drei PEG–IPDI-Wiederholeinheiten zuzuordnen. Die auf Basis von PEG3000 berechneten mittleren molaren Massen der beiden Verbindungen liegen nämlich bei 6985 Da und 10240 Da. Fraktion d hat ein Peakmaximum bei ca. 13522 Da und macht einen Anteil von 15 – 18 % des Produktgemisches aus. Da die berechnete molare Masse eines Dialdehyds mit vier PEG–IPDI-Wiederholeinheiten bei 13496 Da liegt, kann diese Verbindung der Fraktion d zugeordnet werden. Die Fraktion e ist nur bei den Syntheserouten 1b und 2 zu erkennen und macht 11 % bzw. 14 % des Produktgemisches aus. Da sich für die berechneten molaren Massen eines Dialdehyds mit fünf und sechs PEG–IPDI-Wiederholeinheiten 16751 Da und 20006 Da ergeben, passt Fraktion e (ca. 18101 Da) sehr gut zu diesen beiden Verbindungen.

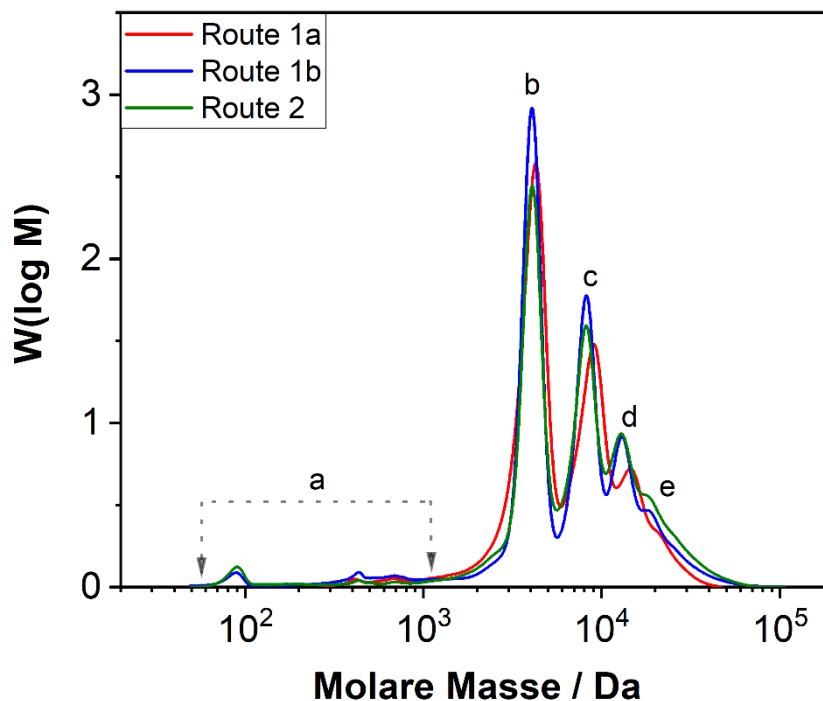


Abbildung 33: Molmassenverteilung des Dialdehyds3000 synthetisiert nach Route 1a, Route 1b und Route 2. Die einzelnen Fraktionen bzw. Peakmaxima wurden mit a – e gekennzeichnet, wobei die Fraktion a den gesamten Bereich unterhalb 1000 Da abdeckt.

Tabelle 16: Peakflächen und molare Massen am Peakmaximum *M_p* der einzelnen Fraktionen a – e der unterschiedlichen Syntheserouten.

Peakname	Syntheseroute	Peakfläche / %	<i>M_p</i> / Da
a	1a	3 ± 2	413, 664, 691 und 1101
	1b	3 ± 1	89, 435, 688 und 759
	2	2 ± 0	90 und 433
b	1a	50 ± 2	4124 ± 197
	1b	49 ± 7	4078 ± 33
	2	41 ± 1	4070 ± 17
c	1a	30 ± 0	8998 ± 193
	1b	27 ± 0	8265 ± 39
	2	28 ± 1	8199 ± 18
d	1a	18 ± 0	14540 ± 269
	1b	15 ± 1	13075 ± 8
	2	17 ± 0	12951 ± 64
e	1a	/	/
	1b	11*	18227*
	2	14 ± 1	17975 ± 211

Die Peakflächen und molaren Massen *M_p* sind die Mittelwerte incl. Standardabweichungen aus mehreren Chargen des jeweiligen Polymergemisches. Route 1a: zwei Chargen, Route 1b: zwei Chargen, Route 2: vier Chargen. *Nur bei einer der beiden Chargen konnte die Fläche der Fraktion e bestimmt werden, daher konnte kein Mittelwert angegeben werden.

In **Abbildung 34** werden die Molmassenverteilungen der nach Route 2 hergestellten Dialdehyd1000 und 2000 mit dem Dialdehyd3000 verglichen. Fraktion b ist den gewünschten Dialdehyden 1000, 2000 und 3000 zuzuordnen und macht 34 – 41 % des Polymergemisches aus. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei der Synthese von Dialdehyd1000 und 2000 in diesem Massenbereich laut MALDI-ToF-Analyse auch noch ein PEG-IPDI-Addukt entstanden ist. Im Gegensatz zur Molmassenverteilung vom Produktgemisch Dialdehyd3000, bei dem die Fraktion c zwei Dialdehyden zugeordnet wurde, kann die Fraktion c der Produktgemische Dialdehyd1000 und 2000 jeweils nur

einem Dialdehyd, und zwar dem, mit zwei PEG–IPDI-Wiederholeinheiten zugeordnet werden. Das Dialdehyd $\text{HMF}-(\text{IPDI-PEG1000})_2\text{-IPDI-HMF}$ (berechnet: 2837 Da) ist demnach zu 25 % und das Dialdehyd $\text{HMF}-(\text{IPDI-PEG2000})_2\text{-IPDI-HMF}$ (berechnet: 5319 Da) ist zu 27 % im jeweiligen Gemisch enthalten. Während Fraktion d beim Dialdehyd3000-Gemisch einem Dialdehyd mit vier PEG–IPDI-Wiederholeinheiten entspricht, ist diese Fraktion bei den Dialdehyd1000- und 2000-Gemischen einem Dialdehyd mit drei Wiederholeinheiten zuzuordnen. Das Dialdehyd $\text{HMF}-(\text{IPDI-PEG1000})_3\text{-IPDI-HMF}$ (berechnet: 4018 Da) ist zu 16 % und das Dialdehyd $\text{HMF}-(\text{IPDI-PEG2000})_3\text{-IPDI-HMF}$ (berechnet: 7741 Da) ist zu 17 % im jeweiligen Produktgemisch zu finden. Die Fraktion e (14 – 22 %) beinhaltet beim Dialdehyd3000-Gemisch die Dialdehyde mit fünf und sechs PEG-IPDI-Wiederholeinheiten und beim Dialdehyd1000- und 2000-Gemisch die Dialdehyde mit vier und fünf Wiederholeinheiten.

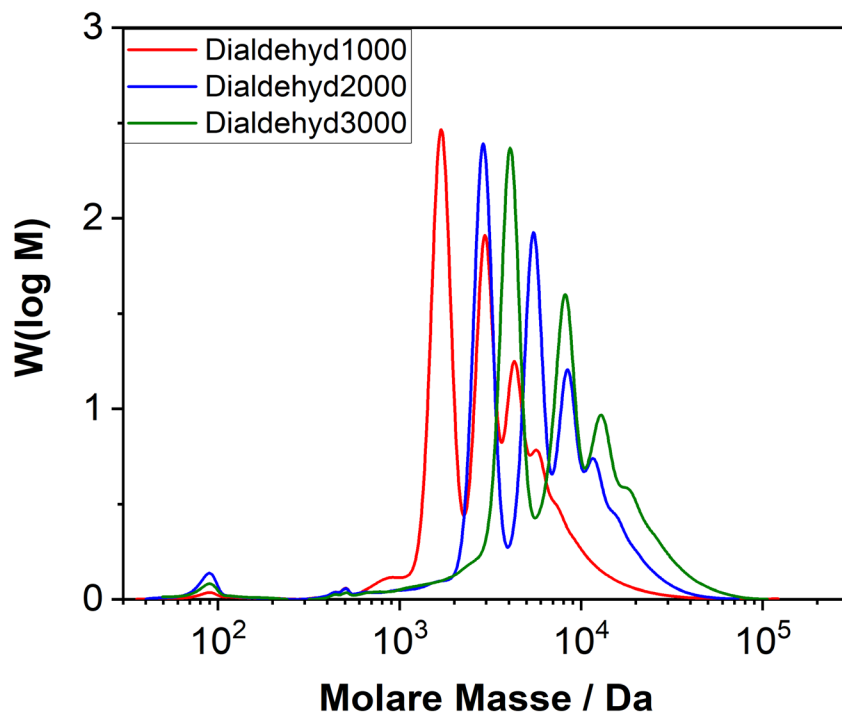


Abbildung 34: Molmassenverteilungen der nach Route 2 synthetisierten Dialdehyde 1000 bis 3000.

Tabelle 17: Peakflächen und molare Massen am Peakmaximum M_p der einzelnen Fraktionen a – e der Dialdehyd1000, 2000 und 3000, die nach Route 2 synthetisiert wurden.

Peakname	Dialdehyd	Peakfläche / %	M_p / Da
a	1000	3 ± 1	90, 505, 868 und 920
	2000	2 ± 1	90
	3000	2 ± 0	90 und 433
b	1000	34 ± 2	1693 ± 4
	2000	37 ± 1	2887 ± 3
	3000	41 ± 1	4070 ± 17
c	1000	25 ± 1	2956 ± 7
	2000	27 ± 1	5500 ± 7
	3000	28 ± 1	8199 ± 18
d	1000	16 ± 0	4306 ± 10
	2000	17 ± 0	8475 ± 12
	3000	17 ± 0	12951 ± 64
e	1000	22 ± 3	5726 ± 14
	2000	17 ± 2	11762 ± 20
	3000	14 ± 1	17975 ± 211

Die Peakflächen und molaren Massen M_p sind die Mittelwerte incl. Standardabweichungen aus mehreren Chargen des jeweiligen Polymergemisches. Dialdehyd1000: drei Chargen, Dialdehyd2000: zwei Chargen, Dialdehyd3000: vier Chargen.

4.2.3.5 UV/VIS-Spektroskopie (CHO-Gehalt Bestimmung)

Der Aldehydgruppengehalt (CHO-Gehalt) in den Produktgemischen der Dialdehyde ist entscheidend für die Vernetzung mit Chitosan zu einem Hydrogel und wurde deshalb mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Der aromatische HMF-Teil der Dialdehyde ist auf Grund des konjugierten Doppelbindungssystems als einziger Teil des Polymers UV-aktiv und beinhaltet die Aldehydgruppe. Folglich wurde eine Kalibrierung einer wässrigen HMF-Verdünnungsreihe durchgeführt, sodass der HMF-Gehalt der Polymere bestimmt werden konnte. Anschließend wurde der HMF-Gehalt in den CHO-Gehalt des Polymers

umgerechnet. Das HMF hat ein Absorptionsmaximum bei 284/285 nm (**Abbildung 35**). Es wurde folgende Formel zur Berechnung der HMF-Konzentration in einer wässrigen Polymerlösung durch Umstellen der linearen Kalibrierfunktion (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9995$) ermittelt:

$$c = \frac{(A - 0,0263)}{0,0171}$$

Formel 3: Berechnung der HMF-Konzentration c in μM mit Hilfe der gemessenen Absorption A bei 284/285 nm.

Der Konzentrationsbereich der Verdünnungsreihe wurde so gewählt, dass das Lambert-Beer-Gesetz gültig ist und die Messwerte der Absorption bei 284/285 nm in einem Bereich von 0,5 und 1,5 liegen, damit noch genügend austretende Strahlung am Detektor ankommt. Das Lambert-Beer-Gesetz, das den linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration und Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge beschreibt, ist nämlich nur für kleine Konzentrationen ($c \leq 10^{-2}$ M) gültig.[57]

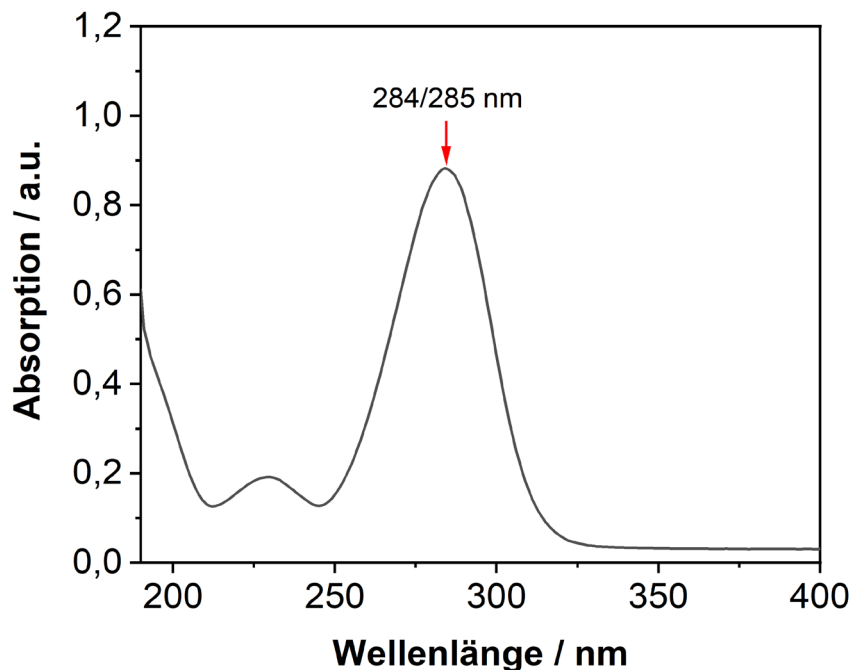


Abbildung 35: UV/VIS-Spektrum einer 50 μM wässrigen HMF-Lösung mit einem Absorptionsmaximum bei 284/285 nm.

Mit Hilfe der berechneten HMF-Konzentration in der Polymerlösung und der Konzentration des Polymers in der gemessenen Lösung wurde der HMF-Gehalt des Polymers bestimmt. Des Weiteren konnte der HMF-Umsatz der jeweiligen Reaktion über den theoretisch zu erwartendem HMF-Gehalt bei vollständigem Umsatz ermittelt werden. Bei den Dialdehyden wären folgende HMF-Gehalte zu erwarten: 6,76 Gew.-% (Dialdehyd3000), 8,70 Gew.-% (Dialdehyd2000) und 15,23 Gew.-% (Dialdehyd1000). Ein HMF-Molekül besteht zu 23 Gew.-% aus der Aldehydgruppe. Darüber lassen sich sowohl die CHO-Gehalte der gemessenen Polymerlösungen berechnen als auch die theoretisch zu erwartenden CHO-Gehalte der Dialdehyde bei vollständigem Umsatz: 1,55 Gew.-% (Dialdehyd3000), 2,00 Gew.-% (Dialdehyd2000) und 3,50 Gew.-% (Dialdehyd1000). In der **Tabelle 18** sind die HMF- und CHO-Gehalte und der HMF-Umsatz der Syntheserouten aufgeführt.

Tabelle 18: Ergebnisse der UV/VIS-Spektroskopie.

Syntheseroute	HMF-Gehalt / Gew.-%	CHO-Gehalt / Gew.-%	HMF-Umsatz / %
1a mit PEG3000 ^a	3,72 (RSD 8 %)	0,86	55
1b mit PEG3000 ^a	4,56 (RSD 4 %)	1,05	67
2 mit PEG3000 ^b	4,32 (RSD 3 %)	0,99	64
2 mit PEG2000 ^c	5,21 (RSD 1 %)	1,20	60
2 mit PEG1000 ^a	9,37 (RSD 1 %)	2,16	62

Die HMF-Gehalte sind die Mittelwerte incl. relative Standardabweichungen aus mehreren Chargen des jeweiligen Polymergemisches. a: drei Chargen, b: fünf Chargen, c: zwei Chargen.

Mit den HMF-Gehalten wurden die Einwaagen der Dialdehyde für die Hydrogel-Herstellung berechnet. Insgesamt wurden HMF-Umsätze von 55 % bis 67 % erreicht. Der nicht vollständige Umsatz von HMF ist auf nicht umgesetztes PEG, monofunktionalisiertes PEG und Polymere mit längeren IPDI-PEG-Ketten zurückzuführen. Im Vergleich der drei unterschiedlich hergestellten Dialdehyde3000, konnte mit den beiden Syntheserouten 1b und 2 eindeutig der bessere HMF-Umsatz erzielt werden als mit Syntheseroute 1a. Dies lässt darauf schließen, dass im ersten Syntheseschritt der Route 1a nicht ausreichend viele Monoaddukte für die Umsetzung mit PEG entstanden sind oder es im zweiten Syntheseschritt nicht zur Reaktion mit PEG

kam. Der Monoaddukt-Überschuss der Route 1b konnte diesem Problem entgegenwirken und einen besseren HMF-Umsatz erzielen. Der HMF-Umsatz der Route 2 ist zwar nicht besser, sondern nur auf demselben Level, aber das Massenspektrum zeigte ein reineres Produktgemisch als bei Route 1b.

4.2.3.6 Ergebnis der Strukturaufklärung

Die FTIR-Spektroskopie ließ zunächst vermuten, dass sowohl Syntheseroute 1 als auch Route 2 zu dem gewünschten Dialdehyd geführt haben. Durch die NMR-Spektroskopie wurde festgestellt, dass in beiden Fällen nicht nur das Dialdehyd in der Form HMF-IPDI-PEG-IPDI-HMF entstanden ist, sondern ein polymeres Produktgemisch. Anschließend konnte dies durch die MALDI-ToF-Massenspektren eindeutig bestätigt werden. Die Syntheseroute 2 wurde als beste Variante identifiziert. Da ausschließlich das gewünschte Dialdehyd und längerkettige Dialdehyde mit mehreren PEG-IPDI-Wiederholeinheiten gebildet wurden, die alle als Vernetzer im Hydrogel fungieren können. Die Ergebnisse der Gel-Permeations-Chromatographie ließen annähernde quantitative Aussagen über das Produktgemisch zu. Das Dialdehyd3000 mit nur einer PEG-IPDI-Wiederholeinheit konnte mit der Route 2 zu ca. 41 % erhalten werden. Außerdem wurde festgestellt, dass Dialdehyde mit bis zu sechs Wiederholeinheiten im Produktgemisch enthalten sind. Im Massenspektrum wurden nur die Dialdehyde mit bis zu drei Wiederholeinheiten detektiert. Über die UV-VIS-Spektroskopie konnte für die Syntheseroute 2 ein HMF-Umsatz von 60 – 64 % ermittelt werden.

Sowohl für die Untersuchungen des Löslichkeitsverhaltens und der Biokompatibilität als auch für die Herstellung der Hydrogele wurden ausschließlich Dialdehyde verwendet, die mit der Syntheseroute 2 hergestellt wurden.

4.2.3.7 Löslichkeitsverhalten

Da die Hydrogele zur potentiellen Anwendung als Knochenklebstoff zu einem großen Anteil aus Wasser bestehen und die Vernetzung der Komponenten daher im wässrigen Medium stattfindet, müssen beide Komponenten wasserlöslich sein oder zumindest eine stabile, homogene Dispersion mit Wasser bilden. Das Dialdehyd auf PEG3000-Basis lässt sich bis zu einer Konzentration von 1,4 g/mL homogen mit Wasser dispergieren. Nach ca. fünf Tagen ist eine Phasenseparation zu beobachten. Die Mischung sollte also immer möglichst frisch verwendet werden. Mit der dynamischen Lichtstreuung wurde die Partikelgröße in dem Dialdehyd-Wasser-Gemisch gemessen. Die untersuchte Probe

(0,7 g/mL), die für die Messung verdünnt werden musste (1 : 100), hat Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 460 nm aufgewiesen. Das Dialdehyd auf PEG2000-Basis lässt sich ebenfalls problemlos mit Wasser mischen (Partikelgröße 470 nm). Da beide Partikelgrößen > 1 nm sind, handelt es sich offensichtlich nicht um eine Molekulardispersion bzw. echte Lösung.[87] Das Dialdehyd auf PEG1000-Basis ist im Gegensatz zu den beiden anderen Dialdehyden kein Feststoff, sondern eine hochviskose Flüssigkeit. Es ist weder wasserlöslich noch homogen mit Wasser emulgierbar. Beim Mischen mit Wasser bilden sich demnach zwei Phasen. Damit das Dialdehyd1000 trotzdem für die Herstellung von Hydrogelen verwendet werden konnte, wurde durch Zusatz von Ethanol (25 Vol.-%) oder dem Tensid SDS (15 Mol.-%) ein homogenes Gemisch erhalten. In beiden Fällen konnte allerdings kein Partikel-durchmesser mit der dynamischen Lichtstreuung gemessen werden. Das Gerät ist auf die Viskosität von Wasser kalibriert. Die beiden Gemische weichen vermutlich zu stark von dieser Viskosität ab, sodass kein vertrauenswürdiger Wert ermittelt werden konnte. Visuell konnten aber lichtstreuende Partikel anhand einer Trübung beobachtet werden.

4.2.3.8 Biokompatibilität

Für den Einsatz als Medizinprodukt ist es zwingend notwendig, dass der Klebstoff und seine Abbauprodukte biokompatibel sind. Vor der Durchführung von klinischen Studien und *in vivo*-Studien mit Tieren kommen *in vitro*-Methoden zum Einsatz, bei denen unterschiedliche Zellkulturen als Modellsystem genutzt werden. Zur *in vitro*-Untersuchung der Biokompatibilität bzw. Zytotoxizität gibt es unterschiedliche biologische Prüfverfahren.[88] Im Rahmen dieser Arbeit wurde der WST-1-Assay mit Fibroblasten verwendet, der zu den kolorimetrischen Methoden gehört. Bei lebenden bzw. viablen Zellen mit einer intakt funktionierenden Atmungskette wird das wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-1 [(2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium-Mononatriumsalz] durch die mitochondriale Dehydrogenase in Gegenwart eines Elektronenmediators zum Formazan reduziert (**Abbildung 36**).[88,89] Zytotoxische Chemikalien haben einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität (Lebendzellanteil in einer Zellkultur), sodass das Enzym nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr aktiv ist und die Reaktion zum Formazan nicht stattfinden kann. Die Bildung des Formazans ist durch einen Farbumschlag von hellrot zu dunkelrot nachweisbar und kann photometrisch quantifiziert werden.[88] Die gemessene Absorption bzw. optische Dichte (OD) bei 450 nm ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.[90]

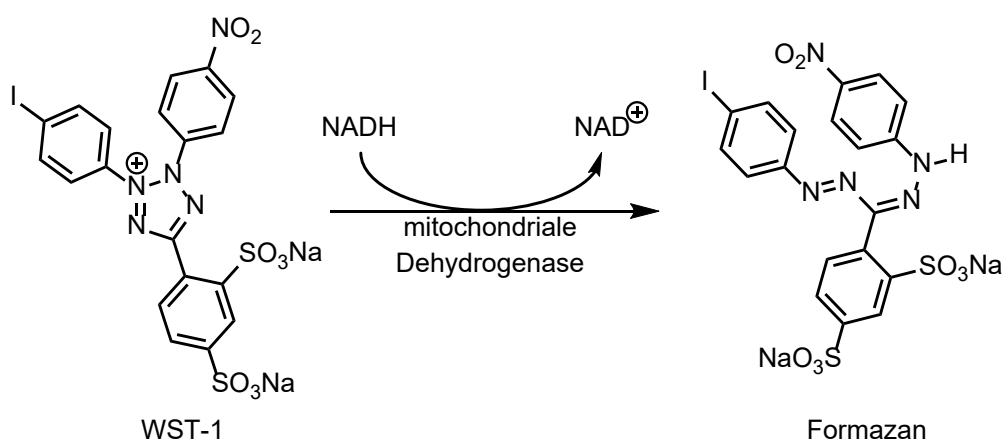


Abbildung 36: Reduktion von WST-1 zum Formazan.[91]

Da das Chitosan schon als biokompatibel bekannt ist, wurde nur das Dialdehyd basierend auf PEG3000 in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem WST-1-Assay untersucht.[81] Außerdem wurde die Untersuchung zum direkten Vergleich auch mit dem Edukt PEG3000 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das toxische HEMA verwendet und als Negativkontrolle das reine Zellkulturmedium. Die relative Zellviabilität der Proben wurde mit **Formel 4** berechnet, wobei die Zellviabilität der Negativkontrolle als 100 % gesetzt wurde.

$$\text{Zellviabilität} = \frac{\text{MW (OD}_{\text{Probe}})}{\text{MW (OD}_{\text{NK}})} \cdot 100 \%$$

Formel 4: Berechnung der relativen Zellviabilität mit den Mittelwerten (MW) der optischen Dichten (OD) der Probe und der Negativkontrolle (NK).[90]

In **Abbildung 37** ist die relative Zellviabilität bezogen auf die Negativkontrolle in Abhängigkeit der unterschiedlichen Konzentrationen von PEG3000 und dem Dialdehyd dargestellt. Außerdem ist die Positivkontrolle (HEMA) aufgeführt, die eine relative Zellviabilität von 0 % aufweist und damit als zytotoxisch eingestuft wird. Laut ISO 10993-5:2009 „*Biological evaluation of medical devices – Tests for in vitro cytotoxicity*“ gelten Substanzen, die bei einem WST-1-Assay Zellviabilitäten von unter 70 % verursachen als zytotoxisch bzw. nicht biokompatibel. Da sowohl das PEG3000 als auch das Dialdehyd in keinen der verwendeten Konzentrationen eine Zellviabilität von unter 70 % verursacht haben, sind beide Verbindungen als biokompatibel bzw. nicht zytotoxisch einzustufen.

Außerdem wurden mit beiden Verbindungen in dem verwendeten Konzentrationsbereich von 0,01 mg/mL bis 1 mg/mL relativ konstante Ergebnisse erzielt. Die Zellviabilitäten von PEG3000 liegen in einem Bereich von 125 – 132 % und die des Dialdehyds liegen zwischen 98 % und 113 %. Die meisten ermittelten Viabilitäten sind dementsprechend höher als die der Negativkontrolle (100 %). Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Zellen auf Grund der Größe der beiden Polymere gestresst wurden und dadurch der Stoffwechsel angeregt wurde.

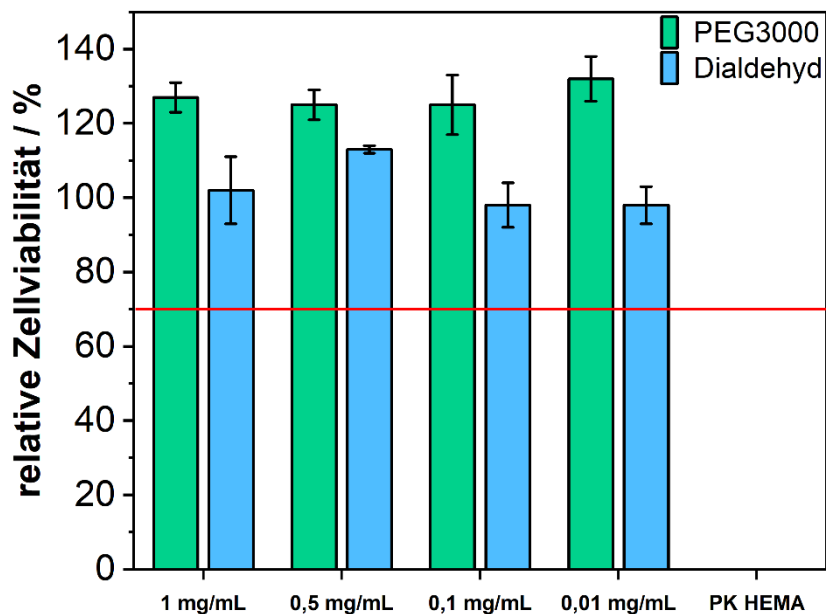


Abbildung 37: Ergebnisse des WST-1-Assays von PEG3000 und dem Dialdehyd3000 mit unterschiedlichen Konzentrationen incl. der Positivkontrolle (PK) mit HEMA. Die rote Linie markiert die 70 %-Grenze.

4.2.4 Herstellung der Hydrogele (Komponente 1 + Komponente 2)

Die chemischen Hydrogele wurden überwiegend aus dem Polyamin Chitosan, gelöst in 1 %iger Essigsäure, und aus einem Dialdehyd-Wasser-Gemisch hergestellt. Die Homogenisierung erfolgte mit einem Vortexmischer bei Raumtemperatur. Da sich in **Kapitel 4.2.3** herausgestellt hat, dass die Syntheseroute 2 zu den besten Ergebnissen geführt hat, wurden ausschließlich Dialdehyde verwendet, die nach Route 2 synthetisiert wurden: Dialdehyd1000, Dialdehyd2000 und Dialdehyd3000. Allerdings muss betont werden, dass es sich bei den drei unterschiedlichen Dialdehyden jeweils um Produktgemische handelt (siehe **Kapitel 4.2.3.4**). Das Dialdehyd3000 besteht zu ca. 41 % aus dem gewünschten Dialdehyd, welches nur ein PEG3000 beinhaltet

(HMF–IPDI–PEG–IPDI–HMF). Der restliche Anteil des Produktgemisches besteht aus längerkettigen Dialdehyden mit mehreren PEG–IPDI-Wiederholeinheiten. Die beiden Dialdehyde 1000 und 2000 beinhalten neben den längerkettigen Dialdehyden auch noch eine PEG–IPDI-Spezies (siehe **Kapitel 4.2.3.3**). Die entstehenden Hydrogele werden Ch-DA1000, Ch-DA2000 und Ch-DA3000 genannt, wobei „Ch“ für Chitosan und „DA“ für Dialdehyd steht.

Es wurden Gele mit vier unterschiedlichen Wassergehalten und vier verschiedenen NH_2/CHO -Verhältnissen präpariert. Das Verhältnis zwischen Wasser und der 1 %igen Essigsäure blieb abgesehen von einer Ausnahme konstant bei 0,37. Dies entspricht einer Säurekonzentration von 0,13 mol/L und einem pH-Wert von 2,8. Ausgehend von einem äquimolaren Verhältnis zwischen den Amino- und Aldehydgruppen der beiden Komponenten wurden drei weitere Verhältnisse untersucht, wobei jeweils einmal der CHO-Anteil konstant gehalten wurde und einmal der NH_2 -Anteil: $\text{NH}_2 > \text{CHO}_{\text{konst.}}$ (3 : 2), $\text{NH}_2 < \text{CHO}_{\text{konst.}}$ (2 : 3), $\text{NH}_2 \ll \text{CHO}_{\text{konst.}}$ (1 : 2), $\text{NH}_{2, \text{konst.}} > \text{CHO}$ (3 : 2), $\text{NH}_{2, \text{konst.}} < \text{CHO}$ (2 : 3) und $\text{NH}_{2, \text{konst.}} \ll \text{CHO}$ (1 : 2).

Da das Dialdehyd 1000 im Gegensatz zu den anderen beiden Dialdehyden sehr hydrophob war und sich nicht homogen dispergieren ließ, wurde anstelle von Wasser entweder ein Ethanol-Wasser-Gemisch verwendet oder das Tensid SDS hinzugegeben. Außerdem wurden Gele hergestellt, bei denen anstelle von Wasser eine PBS-Lösung oder eine isotonische Kochsalzlösung zum Dispergieren eingesetzt wurde, um eine Salzkonzentration wie im menschlichen Blut zu erhalten.

Zusätzlich zu den Ch-DA-Hydrogelen wurden Ch-Glutaraldehyd-Hydrogele, BSA-DA-Hydrogele und BSA-Glutaraldehyd-Hydrogele synthetisiert, um die Gele miteinander zu vergleichen.

4.2.5 Charakterisierung der Hydrogele

4.2.5.1 IR-Spektroskopie

Die Hydrogele wurden zunächst mittels IR-Spektroskopie untersucht. Da der hohe Wassergehalt bei der Auswertung der Spektren stören würde, wurden die Gele vor der Messung im Ofen getrocknet. In **Abbildung 38** werden die IR-Spektren von Chitosan, einem Dialdehyd und dem daraus entstandenen Hydrogel miteinander verglichen. Die $\text{C}=\text{O}$ -Valenzschwingung der CHO-Gruppe im Dialdehyd bei 1678 cm^{-1} ist im Hydrogel kaum noch zu sehen, da diese bei Umsetzung mit Chitosan zum Imin reagiert. Im Spektrum des Hydrogels ist dafür eine Bande bei 1649 cm^{-1} zu finden, die der $\text{C}=\text{N}$ -

Valenzschwingung der Imingruppe ($R_2C=NR$) zuzuordnen ist.[57] Allerdings hat das Chitosan eine breite Bande bei 1647 cm^{-1} , die sich mit der Imin-Bande überschneidet. Da das verwendete Chitosan einen Deacetylierungsgrad von 76 % hat, besitzt das Polyamin auch noch Acetamidogruppen. Die Bande bei 1647 cm^{-1} ist dementsprechend die Amid I Bande ($C=O$ -Valenzschwingung) der Acetamidogruppe. Die primären Aminogruppen des Chitosans reagieren mit den Aldehydgruppen zum Imin. Im Spektrum des Hydrogels sind nur noch die $N-H$ -Deformationsschwingungen (1527 cm^{-1}) der Urethangruppe zu finden. Die $N-H$ -Deformationsschwingungen der primären Aminogruppen, die im Chitosan bei 1569 cm^{-1} liegen, sind nicht mehr vorhanden.

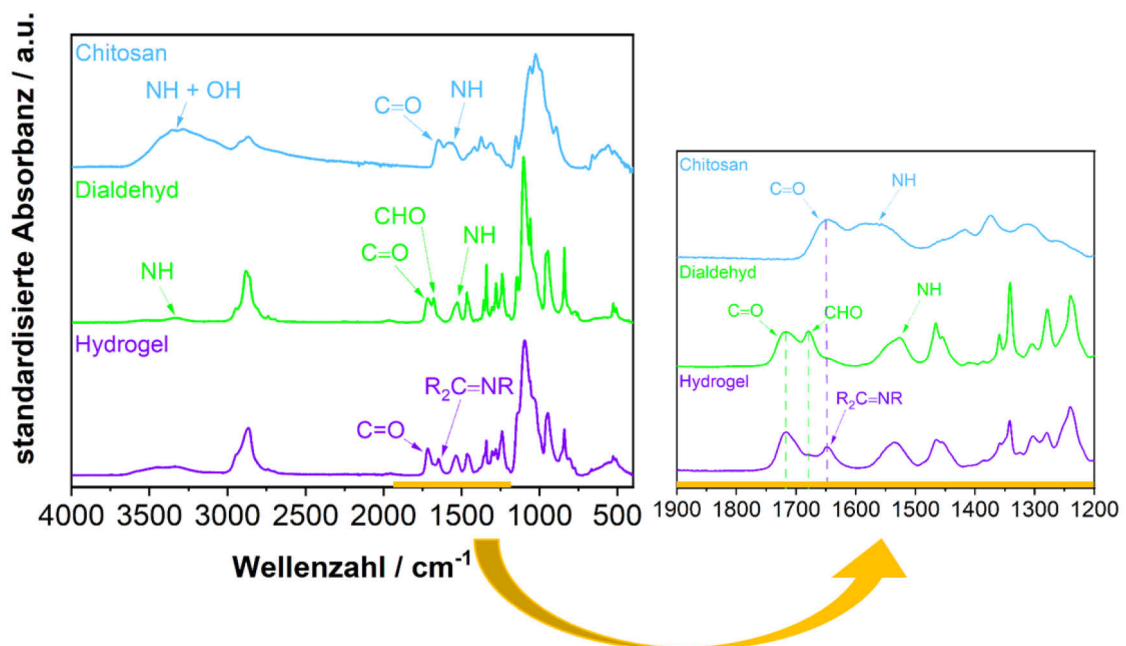


Abbildung 38: FTIR-Spektren von Chitosan, Dialdehyd3000 und dem Ch-DA3000-Hydrogel. Der Bereich von $1900 - 1200\text{ cm}^{-1}$ wurde zusätzlich vergrößert dargestellt.

Zusätzlich zum gemessenen Spektrum des Hydrogels wurde ein berechnetes Spektrum erstellt. Dazu wurden die Spektren von Chitosan und dem Dialdehyd mit der Software OPUS 8.1 addiert. Das Resultat simuliert ein Spektrum, das entstanden wäre, wenn die beiden Komponenten nicht miteinander reagiert hätten (**Abbildung 39**). Der Unterschied des berechneten und des gemessenen Spektrums verstärken die Annahme, dass es zur Reaktion der beiden Komponenten gekommen ist. Das berechnete Spektrum hat wesentlich breitere Banden, da dort auch noch die Banden der CHO - und NH_2 -Gruppen zu sehen sind.

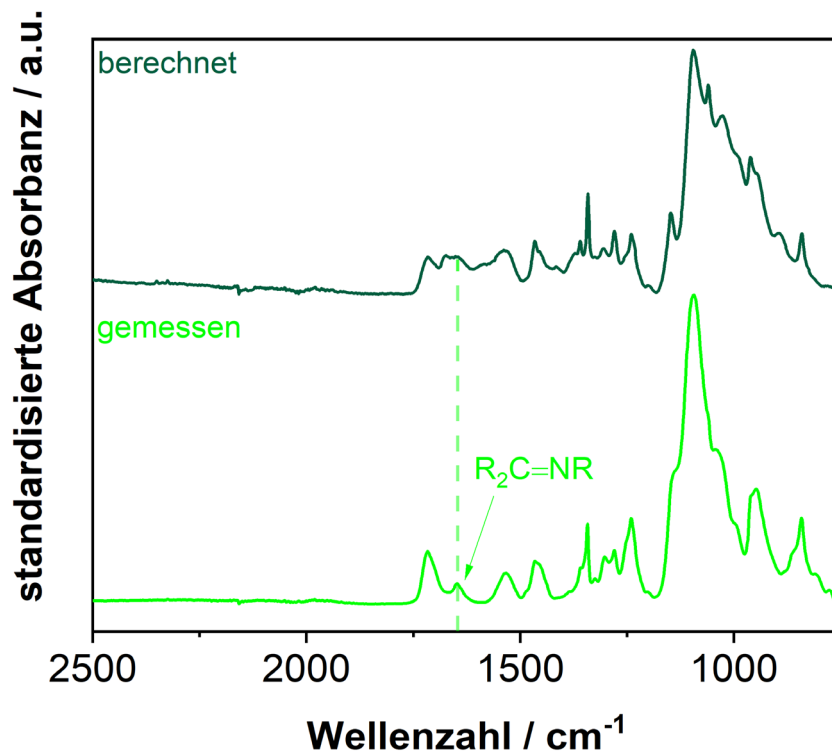


Abbildung 39: FTIR-Spektrum des gemessenen Ch-DA3000-Hydrogels verglichen mit dem berechneten Spektrum aus Dialdehyd und Chitosan.

4.2.5.2 Topfzeit

Die Topfzeit bzw. die Verarbeitungszeit der potentiellen Knochenklebstoffe auf Hydrogel-Basis ist ein wichtiges Kriterium für die klinische Anwendung. Wenn der Klebstoff zu schnell aushärtet, haben die Chirurgen nicht genügend Zeit die entsprechenden Knochenfragmente richtig zu positionieren. Wenn die Topfzeit zu lang ist, dann können eventuell bereits angefügte Knochenfragmente wieder verrutschen. Außerdem könnte sich die Dauer der Operation unnötig verlängern, weil die Wunden erst zugenäht werden können, wenn der Klebstoff bereits eine gewisse Festigkeit vorweisen kann. Zu Beginn der Entwicklung eines Klebstoffes reicht allerdings ein grober Richtwert für die Verarbeitungszeit aus. Erst wenn die wichtigeren Anforderungen wie eine ausreichende Adhäsion am Knochen unter physiologischen Bedingungen erfüllt sind, sollte eine genaue Topfzeit bestimmt werden, damit die Chirurgen wissen, welches Verarbeitungsfenster ihnen zur Verfügung steht. Die Topfzeit könnte dann über die Dielektrische Analyse (DEA) ermittelt werden, da sich während der Vernetzungsreaktion die dielektrischen Eigenschaften ändern.[74] In der vorliegenden Arbeit wurde die Topfzeit zunächst definiert als der Zeitpunkt, an dem das Gel beim Hinein- und

Herausbewegen eines Spatels kurzzeitig am Spatel haften bleibt bzw. anfängt Fäden zu ziehen. Folgende Topfzeiten wurden durch diese Methode ermittelt:

Tabelle 19: Topfzeiten der verschiedenen Hydrogele.

Hydrogel	Feststoffgehalt / Gew.-%	Topfzeit / min
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1	16,8	00:55
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_2	14,4	02:05
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_3	12,6	02:45
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_4	11,2	04:58
Ch-DA3000, NH ₂ > CHO _{konst.} , H ₂ O_1	17,3	00:30
Ch-DA3000, NH ₂ < CHO _{konst.} , H ₂ O_1	16,5	02:50
Ch-DA3000, NH ₂ << CHO _{konst.} , H ₂ O_1	16,3	05:05
Ch-DA3000, NH _{2, konst.} > CHO, H ₂ O_1	12,2	01:38
Ch-DA3000, NH _{2, konst.} < CHO, H ₂ O_1	22,8	00:45
Ch-DA3000, NH _{2, konst.} << CHO, H ₂ O_1	28,0	00:35
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1, SDS	16,8	00:20
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1, EtOH	16,8	00:50
Ch-DA1000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1, SDS	9,3	00:35
Ch-DA1000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1, EtOH	9,3	04:00
Ch-DA1000, NH ₂ > CHO _{konst.} , H ₂ O_1, SDS	9,9	00:25
Ch-DA1000, NH ₂ < CHO _{konst.} , H ₂ O_1, SDS	8,9	> 07:00 ¹
Ch-DA1000, NH ₂ << CHO _{konst.} , H ₂ O_1, SDS	8,7	/
Ch-DA2000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1	14,7	01:00
Ch-DA2000, NH ₂ > CHO _{konst.} , H ₂ O_1	15,3	00:35
Ch-DA2000, NH ₂ < CHO _{konst.} , H ₂ O_1	14,4	05:30
Ch-DA2000, NH ₂ << CHO _{konst.} , H ₂ O_1	14,2	33:00
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1, PBS	16,8	01:30

Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1, NaCl	16,8	02:00
Ch-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1, pH 2,9	16,8	00:40
BSA-DA3000, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1	21,0	/
Ch-Glutar, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1	1,8	> 30:00
BSA-Glutar, NH ₂ = CHO, H ₂ O_1	7,5	/
BSA-Glue ²	29,3	04:00

Abkürzungen: Ch = Chitosan, DA = Dialdehyd, Glutar = Glutaraldehyd, BSA = bovines Serumalbumin.

¹Das Hydrogel war auch nach 24 h nicht vollständig geliert. ²Referenzklebstoff, der für die Validierung der Prüfmethode in Kapitel 4.1 verwendet wurde.

Zunächst ist festzustellen, dass der Feststoffgehalt bzw. der Wassergehalt im Hydrogel die Topfzeit beeinflusst (**Abbildung 40**). Je mehr Wasser, desto langsamer verläuft die Vernetzung, da die beiden Reaktionspartner durch die Verdünnung nicht so schnell aufeinandertreffen und reagieren können.

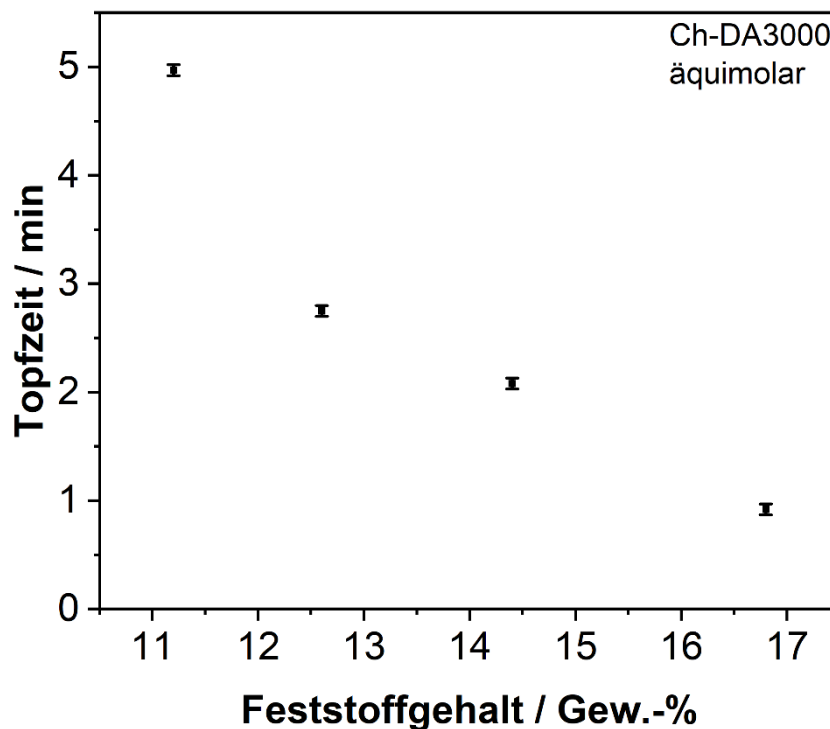


Abbildung 40: Topfzeit der Ch-DA3000-Hydrogele mit äquimolarem NH₂/CHO-Verhältnis in Abhängigkeit des Feststoffgehaltes.

Bei Betrachtung der unterschiedlichen NH_2/CHO -Verhältnisse ist zu erkennen, dass die Geschwindigkeit der Vernetzung durch eine Erhöhung der NH_2 -Gruppen-Anzahl erhöht wird und durch eine Reduzierung der NH_2 -Gruppen-Anzahl deutlich verringert wird (**Abbildung 41**, rote Datenpunkte). Bei den Gelen mit CHO -Gruppen im Überschuss und konstanter NH_2 -Anzahl ist ebenfalls eine schnellere Vernetzung zu beobachten. Dies wird allerdings auch durch den erhöhten Feststoffgehalt gefördert (**Abbildung 41**, blaue Datenpunkte). Durch die Reduzierung der CHO -Konzentration nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit ab und die Topfzeit entsprechend zu, aber nicht so stark wie bei Reduzierung der NH_2 -Konzentration. Die Aminogruppen haben demzufolge einen größeren Einfluss auf die Topfzeit des Gels als die Aldehydgruppen. Aldehyde bilden in wässriger Lösung Aldehydhydrate. Der saure pH-Wert von 2,8 begünstigt die Hydratbildung, da der partiell positive Charakter des Carbonylkohlenstoffs durch Protonierung der Carbonylgruppe erhöht wird. Diese Gleichgewichtsreaktion steht in Konkurrenz zu der Bildung von Iminen. Die Konkurrenzsituation der CHO -Gruppen kann der Grund für den geringeren Einfluss auf die Topfzeit sein.

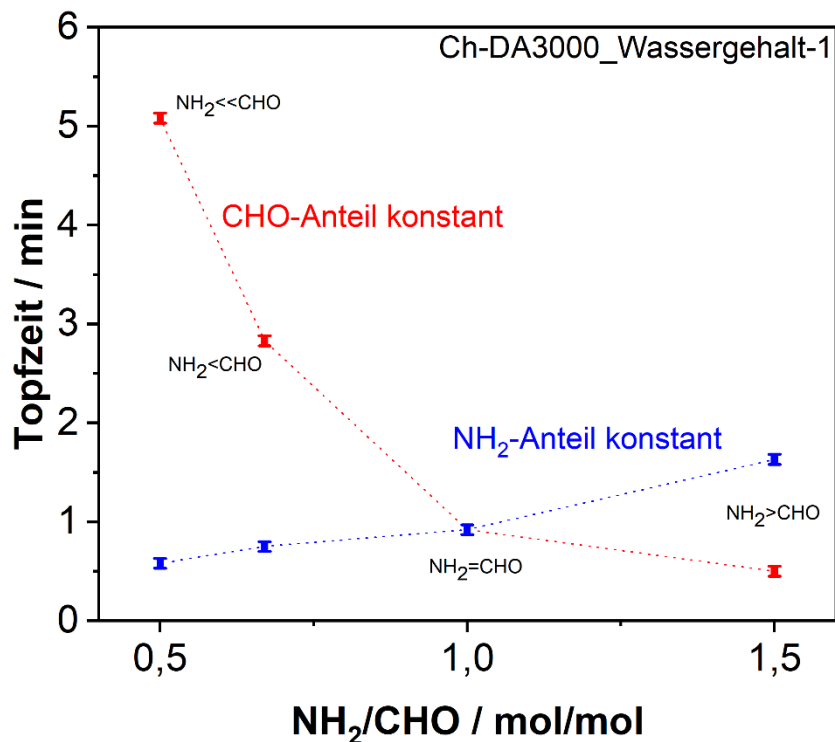


Abbildung 41: Topfzeiten des Hydrogels Ch-DA3000 in Abhängigkeit vom NH_2/CHO -Verhältnis.

Die Gele mit DA1000 und DA2000 haben längere Verarbeitungszeiten als die Gele mit DA3000 (**Abbildung 42**). Insbesondere bei dem Ch-DA1000-Gel ist eine deutlich langsamere Vernetzung zu beobachten. Dies liegt vermutlich an den wesentlich geringeren Feststoffgehalten (**Tabelle 19**). Die Gele, die mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch synthetisiert wurden, verhalten sich bezogen auf die Topfzeit ähnlich wie vergleichbare Gele ohne Ethanol. Das Tensid SDS führt allerdings zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit. Außerdem gelieren die Gele mit DA1000 und SDS nicht homogen. Im Reaktionsgemisch bilden sich einzelne Gelbereiche, wobei der Rest noch flüssig bleibt. Daher wurde zum Vergleich der drei Dialdehyde das Ch-DA1000-Gel mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch verwendet. Der Unterschied zwischen dem Hydrogel mit DA2000 und dem Hydrogel mit DA3000 wird erst bei Reduzierung der Aminogruppen sehr deutlich (**Abbildung 42 b**). Auf Grund der unterschiedlichen Feststoffgehalte, kann allerdings kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Molmasse des Dialdehyds und der Verarbeitungszeit hergestellt werden. Entscheidender für die Topfzeit sind der Feststoffgehalt und die Anzahl der Aminogruppen, vor allem wenn sie nicht mindestens in gleicher Menge wie die CHO-Gruppen vorliegen.

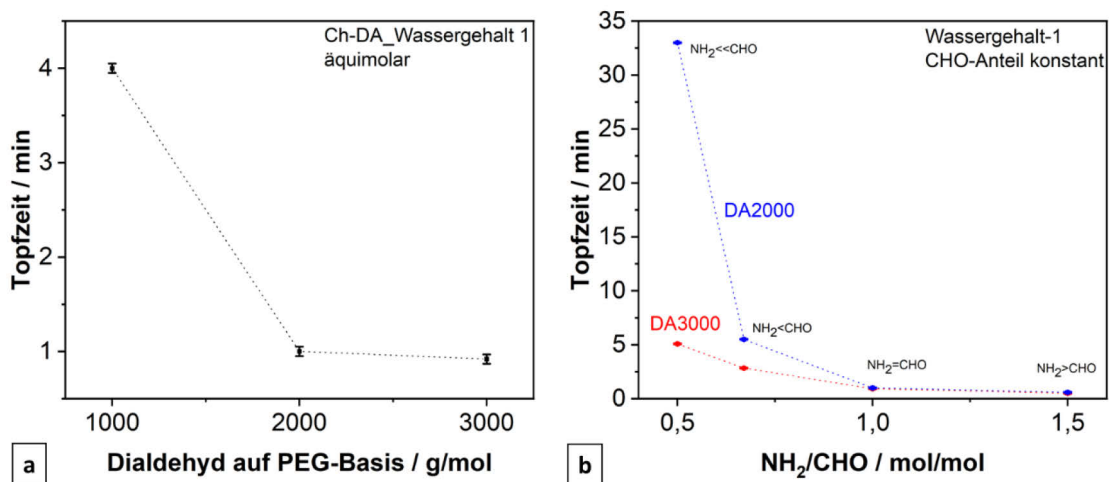


Abbildung 42: a) Topfzeiten der äquimolaren Hydrogele in Abhängigkeit der molaren Masse des PEGs, mit dem das jeweilige Dialdehyd hergestellt wurde. Das Ch-DA1000 wurde mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch hergestellt. b) Topfzeiten der Hydrogele Ch-DA2000 und Ch-DA3000 in Abhängigkeit vom NH₂/CHO-Verhältnis.

Die Reaktionsmedien PBS-Lösung und NaCl-Lösung verlangsamten die Topfzeit. Eine Erhöhung des pH-Wertes von 2,8 auf 2,9 führt hingegen zu einer schnelleren Vernetzung. Ein höherer pH-Wert führt dazu, dass weniger Aminogruppen protoniert

vorliegen und stattdessen an der Vernetzungsreaktion teilnehmen können. Bei den Gelen BSA-DA3000 und BSA-Glutar findet gar keine Vernetzung statt. Das Ch-Glutar-Gel hat eine sehr lange Topfzeit von ca. 30 min. Dies liegt vermutlich hauptsächlich an dem geringen Feststoffgehalt von 1,8 Gew.-%. Der BSA-Glue hat eine Topfzeit von ca. 4 min. Grundsätzlich sind alle Topfzeiten, die zwischen 50 s und 4 min liegen, für die klinische Anwendung denkbar. Für Klebversuche im Labor waren Gele mit einer Topfzeit von 60 ± 10 s am einfachsten zu verarbeiten: Ch-DA3000 (äquimolar und 16,8 Gew.-%) und Ch-DA2000 (äquimolar und 14,7 Gew.-%).

Zusätzlich wurde mit dem Texture Analyser der Reaktionsverlauf dreier Ch-DA3000-Hydrogele mit Wassergehalt-1, aber unterschiedlichen NH_2/CHO -Verhältnissen aufgezeichnet (**Abbildung 43**). Zur Bestimmung der Topfzeit stellte sich diese Methode zwar als ungeeignet heraus, da die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren, aber die entstandenen Graphiken können zur besseren Veranschaulichung der unterschiedlichen Reaktionsverläufe dienen. Bei dem Gel mit äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis wurde nach 3:31 min eine Kraft von 74 mN gemessen. Das Gel mit Aminogruppen im Überschuss konnte diese Kraft bereits nach 56 s erreichen und das Gel mit reduzierter Aminogruppen-Anzahl konnte diese Kraft auch nach 6 min nicht erreichen. In letzterem Fall blieb die Kraft innerhalb der ersten 6 min relativ konstant bei 40 mN. Die drei Reaktionsverläufe weichen sehr stark voneinander ab und verdeutlichen noch einmal den starken Einfluss der Aminogruppen auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Je mehr Aminogruppen im Reaktionsgemisch sind, desto schneller läuft die Vernetzung ab.

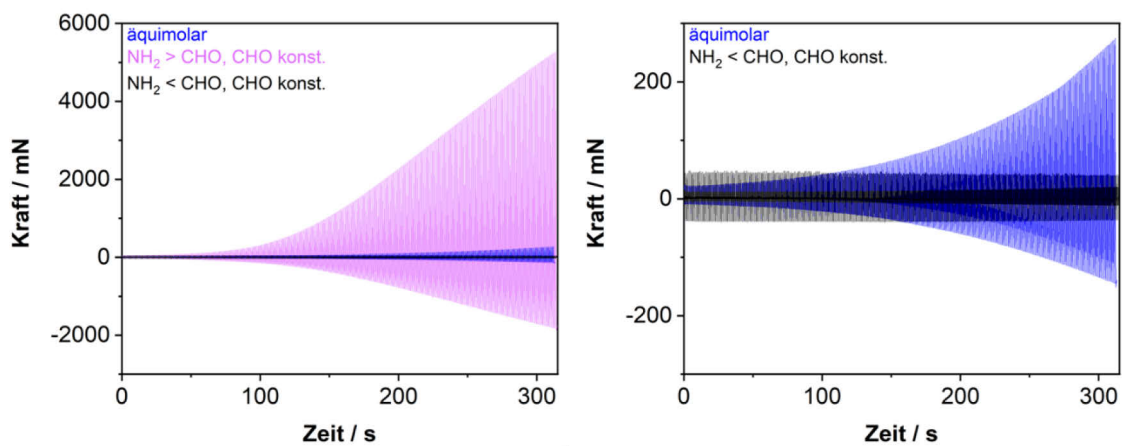


Abbildung 43: Am Texture Analyser gemessener Reaktionsverlauf der Hydrogele Ch-DA3000 mit Wassergehalt-1: äquimolar, $\text{NH}_2 > \text{CHO}_{\text{konst.}}$ und $\text{NH}_2 < \text{CHO}_{\text{konst.}}$.

4.2.5.3 Gelfestigkeit

Die Gelfestigkeit der unterschiedlichen Hydrogele wurde mit dem Texture Analyser bestimmt. Die Gelfestigkeit, definiert als maximal auftretende Kraft pro Fläche, wird im Folgenden nur durch die maximale Kraft dargestellt. Die Fläche wäre in diesem Fall die Fläche des Messstempels, die bei allen Messungen dieselbe ist. Es wurden verschiedene Einflüsse auf die Gelfestigkeit untersucht, um anschließend die besten Bedingungen für ein Hydrogel mit hoher Gelfestigkeit definieren zu können.

Einfluss des Feststoffgehaltes

Zu Beginn wurde untersucht, welchen Einfluss der Wasseranteil bzw. der Feststoffgehalt im Hydrogel auf die Gelfestigkeit hat. Dazu wurden vier Hydrogele aus Chitosan und Dialdehyd3000 mit einem äquimolaren NH_2/CHO -Verhältnis verwendet. Die Gele wurden mit unterschiedlichen Wassergehalten hergestellt. Der Wassergehalt-1 beträgt 597 μL und setzt sich aus 437 μL 1 %iger Essigsäure der Chitosan-Lösung und 160 μL Wasser aus dem Dialdehyd-Wasser-Gemisch zusammen. Das Verhältnis von Wasser zu Essigsäure beträgt demnach 0,37. Dies entspricht einer 0,73 %igen Essigsäure mit einer Konzentration von 0,13 mol/L und einem pH-Wert von 2.8. Bei den drei anderen Wassergehalten wurde die ursprüngliche Wassermenge um den Faktor 1,2, 1,4 und 1,6 erhöht, wobei die Konzentration der Essigsäure konstant gelassen wurde, um einen Einfluss des pH-Wertes auszuschließen. In **Tabelle 20** sind die unterschiedlichen Wassergehalte und die dazugehörigen Feststoffgehalte der Hydrogele aufgeführt.

Tabelle 20: Unterschiedliche Wassergehalte bzw. Feststoffgehalte der Hydrogele.

Wassergehalt	Gesamtvolumen / μL	Feststoffgehalt / Gew.-%
1	597	16,8
2	716	14,4
3	836	12,6
4	955	11,2

Grundsätzlich ist festzustellen, dass die Gelfestigkeit bzw. die maximal auftretende Kraft wie zu erwarten mit steigendem Feststoffgehalt im Hydrogel zunimmt (**Abbildung 44**). Bei einem Feststoffgehalt von 16,8 Gew.-% wurde eine Kraft von 29 N (14 % RSD) ermittelt. Höhere Feststoffgehalte wurden nicht untersucht, da sowohl das Chitosan als

auch das Dialdehyd3000 nur eingeschränkt löslich bzw. homogen dispergierbar sind. Der exponentielle Kurvenverlauf ist dementsprechend durch das Löslichkeitsverhalten der beiden Komponenten nach oben hin limitiert. Um die Gelfestigkeit zu steigern, muss in zukünftigen Arbeiten besonders auf eine sehr gute Löslichkeit der beiden Komponenten geachtet werden. Wie bereits in **Kapitel 5.5.2** festgestellt wurde, hat der Feststoffgehalt auch einen Einfluss auf die Topfzeit. Je höher der Feststoffgehalt, desto kürzer die Topfzeit. Es muss also ein Kompromiss zwischen Gelfestigkeit und Topfzeit gefunden werden.

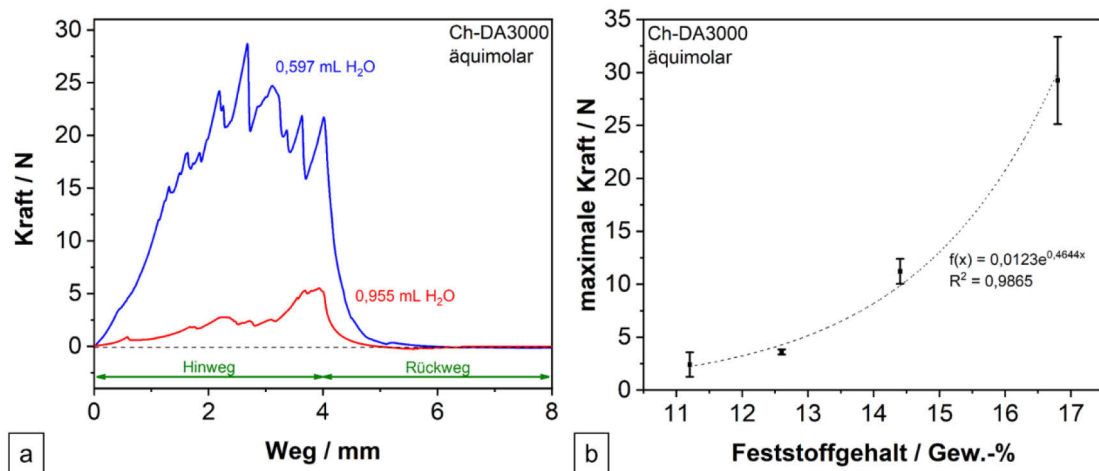


Abbildung 44: a) Kraft-Weg-Diagramm zweier Ch-DA3000-Hydrogele mit äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis, aber unterschiedlichen Wassergehalten. Die ersten 4 mm entsprechen dem Eindringen des Stempels in das Gel. Anschließend fährt der Stempel wieder zurück auf Startposition. b) Mittelwert incl. Standardabweichung der maximal gemessenen Kraft in Abhängigkeit vom Feststoffgehalt der Ch-DA3000-Hydrogele mit äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis. $f(x)$: Regressionsgleichung; R^2 : Bestimmtheitsmaß.

Einfluss des NH_2/CHO -Verhältnisses

Eine weitere Einflussgröße der Gelfestigkeit ist das NH_2/CHO -Verhältnis. Es wurden Ch-DA3000-Hydrogele mit dem Wassergehalt-1 und einer Säurekonzentration von 0,13 mol/L hergestellt. Auf Grund der beiden unterschiedlichen Medien (verdünnte Essigsäure und Wasser) und dem eingeschränkten Löslichkeitsverhalten der Komponenten, konnte der Feststoffgehalt nicht konstant gehalten werden und muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. In **Tabelle 21** sind die NH_2/CHO -Verhältnisse und die dazugehörigen Feststoffgehalte aufgeführt.

Tabelle 21: NH₂/CHO-Verhältnisse und die dazugehörigen Feststoffgehalte.

NH ₂ /CHO-Verhältnisse	Feststoffgehalt / Gew.-%
NH ₂ = CHO	16,8
NH ₂ > CHO _{konst.} (3 : 2)	17,3
NH ₂ < CHO _{konst.} (2 : 3)	16,5
NH ₂ << CHO _{konst.} (1 : 2)	16,3
NH _{2, konst.} > CHO (3 : 2)	12,2
NH _{2, konst.} < CHO (2 : 3)	22,8
NH _{2, konst.} << CHO (1 : 2)	28,0

Bei konstantem CHO-Anteil und variierendem NH₂-Anteil ist deutlich zu erkennen, dass die Gelfestigkeit bei steigender Anzahl von Aminogruppen ebenfalls ansteigt (**Abbildung 45**, rote Datenpunkte). Mit einem Verhältnis von 3 : 2 bzw. NH₂/CHO = 1,5 wurde eine Kraft von 55 N (10 % RSD) erreicht. Im Gegensatz dazu konnte mit einem Verhältnis von 1 : 2 bzw. NH₂/CHO = 0,5 nur eine Kraft von 1 N (44 % RSD) ermittelt werden. In diesem Fall ist der Einfluss des Feststoffgehaltes zu vernachlässigen, da dieser bei allen vier Einstellungen zwischen 16,3 – 17,3 Gew.-% liegt. Bei konstantem NH₂-Anteil und variierendem CHO-Anteil weichen die Messwerte nicht so stark voneinander ab (**Abbildung 45**, blaue Datenpunkte). Der Feststoffgehalt bei den Gelen mit höherem CHO-Anteil liegt bei 23 und 28 Gew.-%, also höher als bei dem äquimolaren Verhältnis und der roten Datenreihe mit variierendem NH₂-Gehalt. Der Feststoffgehalt bei dem Hydrogel mit reduziertem CHO-Anteil ist hingegen geringer und liegt bei 12 Gew.-%. Trotz steigender CHO-Konzentration und erhöhtem Feststoffgehalt bleibt die Gelfestigkeit unter Berücksichtigung der Standardabweichungen nahezu konstant bei Kräften knapp unter 30 N. Lediglich bei einer Reduzierung der CHO-Gruppen (NH₂/CHO = 1,5) und des dadurch resultierenden geringeren Feststoffgehalts sinkt die Gelfestigkeit auf eine gemessene Kraft von 19 N (19 % RSD).

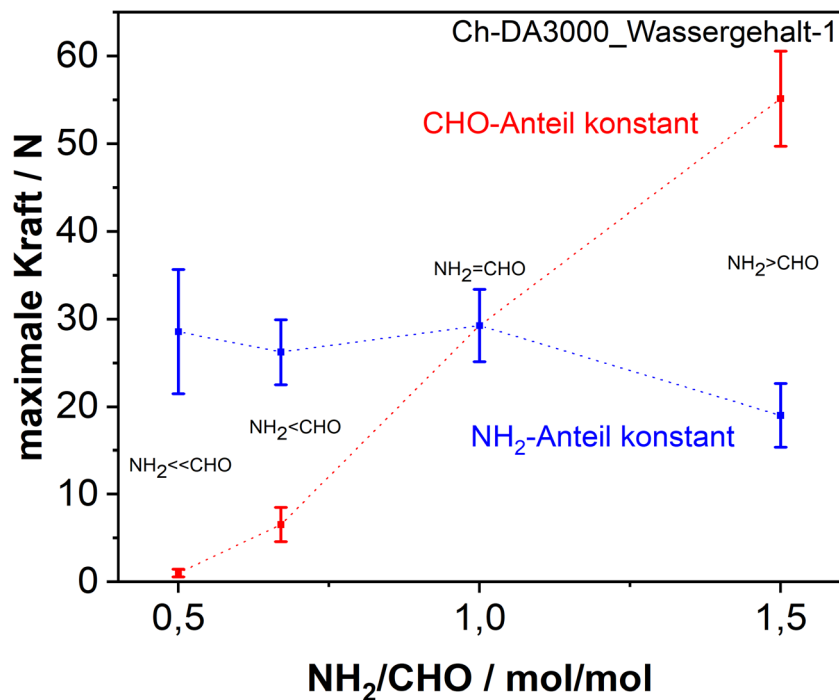


Abbildung 45: Mittelwert incl. Standardabweichung der maximal gemessenen Kraft des Hydrogels Ch-DA3000 in Abhängigkeit vom NH₂/CHO-Verhältnis.

Im vorherigen Versuch wurde festgestellt, dass der Feststoffgehalt der Gele einen erheblichen Einfluss auf deren Festigkeit hat (**Abbildung 44**). Demzufolge ist anzunehmen, dass die Gele mit einem CHO-Überschuss und konstantem NH₂-Anteil nur höhere Festigkeiten als die Gele mit konstantem CHO-Anteil erzielen konnten, weil ihre Feststoffgehalte deutlich höher waren. Genauso ist auch der Unterschied zwischen den beiden Gelen mit NH₂-Überschuss zu erklären. Das Hydrogel mit konstantem NH₂-Anteil hat einen geringeren Feststoffgehalt als das Hydrogel mit konstantem CHO-Anteil. Als weitere entscheidende Einflussgröße neben dem Feststoffgehalt stellt sich demnach die Konzentration der Aminogruppen im Hydrogel heraus. Ein NH₂-Überschuss im Gel sorgt für mehr Stabilität bzw. Festigkeit und ein NH₂-Defizit hat einen negativen Einfluss auf die Gelfestigkeit. Die CHO-Gruppen haben möglicherweise einen geringeren Einfluss auf die Gelfestigkeit, weil sie auch als Aldehydhydrat vorliegen können (siehe **Kapitel 4.2.5.2**). Das Chitosan (50.000 – 190.000 g/mol) bzw. das Polyamin ist im Vergleich zum Dialdehyd3000 ($\bar{M} = 5838$ g/mol, über UV/VIS-Spektroskopie ermittelt) wesentlich größer und trägt deutlich mehr als zwei funktionelle Gruppen. Ein NH₂-Überschuss erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass alle CHO-Gruppen der Dialdehyde einen Reaktionspartner finden und somit an das polymere Netzwerk binden. Außerdem können die überschüssigen NH₂-Gruppen durch die Ausbildung von Wasserstoff-

brückenbindungen, also über eine physikalische Vernetzung für zusätzliche Stabilität sorgen. Ein CHO-Überschuss bzw. ein NH₂-Defizit führt dazu, dass einige Dialdehyde beidseitig keinen Reaktionspartner finden und somit nicht in das polymere Netzwerk eingebunden sind. Dies führt zu einem instabileren Gel. Da das Polyamin mehr als zwei funktionelle Gruppen besitzt, ist die Wahrscheinlichkeit im Vergleich zum bifunktionellen Dialdehyd größer, dass mindestens eine Aminogruppe eines Polyamins an das Netzwerk gebunden ist. Die Gelfestigkeit ist allerdings nicht beliebig weit zu steigern. Es ist anzunehmen, dass bei einem bestimmten NH₂-Überschuss die maximale Gelfestigkeit durch einen maximalen Vernetzungsgrad erreicht wird. Bei zu vielen NH₂-Gruppen sollte der Vernetzungsgrad und damit auch die Gelfestigkeit irgendwann wieder abnehmen.

Einfluss der Dialdehyd-Charge

Bei der Untersuchung der Gelfestigkeit wurde festgestellt, dass die unterschiedlichen Chargen des Hydrogels Ch-DA3000 nicht dieselbe Qualität aufweisen, obwohl die Charakterisierung (NMR, IR, MALDI-ToF-MS, GPC und UV/VIS) der DA3000 Chargen 1 – 5 keine signifikanten Unterschiede aufwiesen und immer dieselbe Charge Chitosan verwendet wurde. Bei einem äquimolaren Verhältnis und Wassergehalt-1 besitzen die Chargen 1 – 3 ($29,2 \pm 4,1$ N) eine höhere Gelfestigkeit als die Chargen 4 – 5 ($16,0 \pm 5,5$ N). Der Grund für die schlechtere Gelfestigkeit ist sehr wahrscheinlich die Tatsache, dass der Syntheseansatz der Chargen 4 – 5 des DA3000 größer war als der Ansatz der Chargen 1 – 3. Die zuvor in diesem Kapitel untersuchten Gele wurden alle aus Dialdehyden der Chargen 1 – 3 hergestellt. Im Folgenden werden allerdings auch Dialdehyde der Charge 4 – 5 verwendet und dann entsprechend gekennzeichnet.

Einfluss der Kettenlänge des Dialdehyds

Zusätzlich zu den Ch-DA3000-Hydrogelen wurden Gele untersucht, bei denen Dialdehyde mit geringerer Molmasse verwendet wurden: Ch-DA2000 und Ch-DA1000. Um ein homogenes Dialdehyd1000-Wasser-Gemisch zu erhalten, war es notwendig Ethanol oder SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*) zu verwenden. Vor dem Vergleich mit den anderen beiden Hydrogelen (Ch-DA2000 und Ch-DA3000) musste demnach eine Beeinflussung der Gelfestigkeit durch Ethanol oder SDS ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Gelfestigkeiten von einem Ch-DA3000-Gel mit Ethanol und einem Ch-DA3000-Gel mit SDS mit einem Gel ohne Ethanol und SDS verglichen. Alle drei Gele hatten ein äquimolares Verhältnis und den Wassergehalt-1. Außerdem wurde die DA3000-Charge 4 verwendet. Folgende Gelfestigkeiten wurden dabei ermittelt: $18,3 \pm 6,0$ N (ohne SDS und Ethanol), $18,7 \pm 3,3$ N (mit SDS) und $20,4 \pm 1,1$ N (mit

Ethanol). Die verwendeten Mengen Ethanol und SDS in den Gelen haben also keinen Einfluss auf die Festigkeit der Hydrogele. Somit können die Gele aus dem DA2000 und dem DA3000 mit den Gelen aus dem DA1000 verglichen werden, auch wenn diese Ethanol oder SDS enthalten. In **Abbildung 46** wurden die maximal gemessenen Kräfte der Hydrogele Ch-DA1000 mit Tensid (SDS), Ch-DA2000 und Ch-DA3000 mit dem Wassergehalt-1 in Abhängigkeit des NH_2/CHO -Verhältnisses dargestellt.

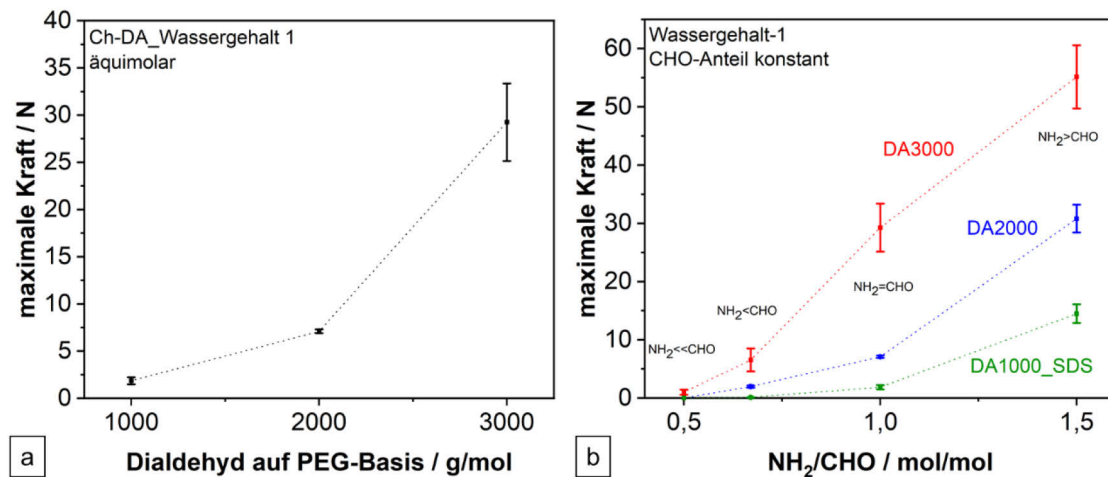


Abbildung 46: a) Mittelwert incl. Standardabweichung der maximal gemessenen Kräfte der äquimolaren ($\text{NH}_2 = \text{CHO}$) Hydrogele in Abhängigkeit der molaren Masse des PEGs, mit dem das jeweilige Dialdehyd hergestellt wurde. b) Mittelwert incl. Standardabweichung der maximal gemessenen Kräfte der Hydrogele Ch-DA1000 mit Tensid (SDS), Ch-DA2000 und Ch-DA3000 in Abhängigkeit vom NH_2/CHO -Verhältnis.

Je größer die Kettenlänge des Dialdehyds, desto höher ist die Gelfestigkeit des Hydrogels. Dies ist wieder über den höheren Feststoffgehalt im Gel zu erklären, der mit einem Dialdehyd höherer molarer Masse einhergeht (**Tabelle 22**). Bei den Dialdehyden mit geringerer molarer Masse ist der prozentuale CHO-Anteil pro Molekül größer, sodass im Vergleich zu einem Dialdehyd mit höherer molarer Masse weniger Dialdehyd benötigt wird, um dieselbe Stoffmengenkonzentration des HMF-Teils des Dialdehyds zu erreichen. Der große Einfluss des Feststoffgehaltes wird hier noch einmal besonders deutlich, da die Gele mit DA3000 trotz geringerer Netzwerkdicke fester sind als die Gele mit DA2000 und 1000.

Tabelle 22: Hydrogele auf Basis von Dialdehyden mit unterschiedlichen molaren Massen und deren Feststoffgehalte bei einem Gesamtvolumen von 597 μL .

äquimolares Hydrogel, Wassergehalt-1 (597 μL)	Feststoffgehalt / Gew.-%
mit Dialdehyd1000	9,3
mit Dialdehyd2000	14,7
mit Dialdehyd3000	16,8

Das äquimolare Hydrogel Ch-DA3000 mit dem Wassergehalt-2 hat einen Feststoffgehalt von 14,4 Gew.-%. Dieser Feststoffgehalt entspricht ungefähr dem Feststoffgehalt des äquimolaren Hydrogels Ch-DA2000 mit dem Wassergehalt-1 (14,7 Gew.-%). Die beiden Gele unterscheiden sich allerdings in der Stoffmengenkonzentration des Polyamins und der des HMF-Teils des Dialdehyds. Das Ch-DA3000 Hydrogel hat eine geringere Stoffmengenkonzentration (0,05 mmol/mL pro Komponente) als das Ch-DA2000 Hydrogel (0,06 mmol/mL pro Komponente). Bei dem Gel mit DA3000 wurde eine Kraft von 11 N (10 % RSD) gemessen und bei dem Gel mit DA2000 wurde eine Kraft von 7 N (3 % RSD) gemessen. Mit ungefähr demselben Feststoffgehalt und trotz geringerer Stoffmengenkonzentration hat das Hydrogel mit DA3000 eine um 4 N höhere Gelfestigkeit. Bei dem länger-kettigen Vernetzer DA3000 kann es vermutlich zu mehr Bildungen von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxygruppen des Chitosans kommen. Diese zusätzliche physikalische Vernetzung erhöht die Gelfestigkeit gegenüber dem Gel mit dem kürzer-kettigen DA2000.

Einfluss des pH-Wertes und des Reaktionsmediums

Da das Chitosan nur in verdünnter Essigsäure löslich ist, wurden alle Gele bisher bei einem pH-Wert von 2,8 (in 0,73% iger Essigsäure) synthetisiert. Ein saurer pH-Wert führt allerdings dazu, dass einige Aminogruppen des Chitosans protoniert vorliegen können und dadurch nicht für die Vernetzung zur Verfügung stehen. Um den Einfluss des pH-Wertes besser beurteilen zu können, wurde ein Ch-DA3000-Hydrogel bei einem pH-Wert von 2,9 (in 0,49 %iger Essigsäure) hergestellt (**Abbildung 47**). Das Gel mit dem höheren pH-Wert, also mit weniger Säure, hat eine doppelt so hohe Gelfestigkeit wie das Hydrogel mit der standardmäßig verwendeten Essigsäurekonzentration. Da die Polyamin-Komponente nur in verdünnter Essigsäure löslich ist, konnten keine genaueren Untersuchungen bezüglich der pH-Abhängigkeit durchgeführt werden. In

zukünftigen Arbeiten wäre die Verwendung einer wasserlöslichen Amin-Komponente erstrebenswert, um herausfinden zu können, bei welchem pH-Wert die maximale Gelfestigkeit erreicht wird.

Zudem wurden Gele synthetisiert, bei denen anstatt Wasser eine PBS-Lösung oder eine isotonische Natriumchlorid-Lösung als Reaktionsmedium verwendet wurde (**Abbildung 47**). Dadurch hat das Hydrogel eine ähnliche Salzkonzentration wie das menschliche Blut, sodass dem osmotischen Druck entgegengewirkt werden würde. Die gemessenen Gelfestigkeiten deuten allerdings auf einen negativen Einfluss der Salze im Reaktionsmedium hin.

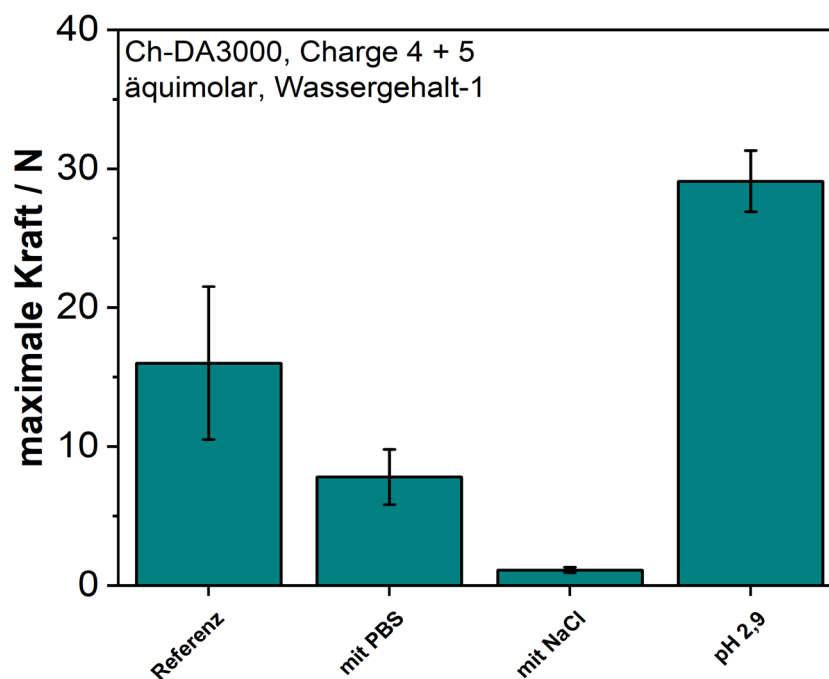


Abbildung 47: Mittlere Gelfestigkeiten von Ch-DA3000-Hydrogelen mit Wassergehalt-1 und äquimolarem Verhältnis der funktionellen Gruppen. Es wurden die DA3000-Cargen 4 und 5 verwendet. Die Bezeichnung „Referenz“ steht für das standardmäßig hergestellte Gel. Die anderen drei Gele wurden entweder mit einer PBS- oder NaCl-Lösung hergestellt oder mit einem anderen pH-Wert.

Vergleich mit anderen Imin-vernetzenden Hydrogelen

Wie bereits in der Einleitung von **Kapitel 5** erwähnt, wurde das Ch-DA-Hydrogel von dem Gewebeklebstoff BioGlue® bzw. dem in dieser Arbeit leicht abgewandelten Klebstoff BSA-Glue abgeleitet. Der BSA-Glue besteht aus Glutaraldehyd, BSA und Wasser. Es wurden verschiedene Kombinationen verglichen. In **Abbildung 48** sind die

mittleren Gelfestigkeiten von Ch-DA3000-Hydrogelen (Charge 1 – 3 und Charge 4 + 5) mit dem Wassergehalt-1 und einem äquimolaren Verhältnis der funktionellen Gruppen aufgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Umsetzung von Dialdehyd3000 (Charge 5) mit BSA, von Chitosan mit Glutaraldehyd und von BSA mit Glutaraldehyd. Bei diesen drei Hydrogelen wurde dieselbe Wassermenge und auch dasselbe Wasser/Säure-Verhältnis wie beim Ch-DA3000-Gel verwendet. Außerdem wurde ebenfalls ein äquimolares NH₂/CHO-Verhältnis gewählt und dieselben Stoffmengenkonzentrationen bezogen auf die funktionellen Gruppen. Auf Grund der Verwendung unterschiedlich großer Moleküle gibt es allerdings große Differenzen im Feststoffgehalt der Gele (**Tabelle 23**). Abschließend wurde das Ch-DA3000-Hydrogel mit dem BSA-Glue (**Kapitel 3.2.1**) verglichen. Der BSA-Glue hat aber einen doppelt so hohen Feststoffgehalt, andere Stoffmengenkonzentrationen und auch kein äquimolares NH₂/CHO-Verhältnis, sondern Aminogruppen im Überschuss: NH₂ > CHO (3 : 2).

Tabelle 23: Feststoffgehalte der Hydrogele in **Abbildung 48**.

Hydrogel	Feststoffgehalt / Gew.-%
Ch-DA3000	16,8
BSA-DA3000	21,0
Ch-Glutar	1,8
BSA-Glutar	7,5
BSA-Glue	29,3

Abkürzungen: Ch = Chitosan, DA = Dialdehyd, Glutar = Glutaraldehyd, BSA = bovines Serumalbumin.

Bei der Umsetzung von BSA mit DA3000 und BSA mit Glutaraldehyd sind keine Gele entstanden. Ausschließlich die Viskosität hat sich etwas erhöht. Es sind also nicht ausreichend viele Iminbindungen gebildet worden, um mit dem Texture Analyser eine Gelfestigkeit bestimmen zu können. Bei dem BSA-Glutar-Gel ist sehr wahrscheinlich der geringe Feststoffgehalt von 7,5 Gew.-% die Ursache. Das BSA-DA3000-Gel hat allerdings sogar einen höheren Feststoffgehalt als das Ch-DA3000-Gel. Das Dialdehyd3000 ist im Vergleich zum Glutaraldehyd ein sehr großes Molekül und das Protein BSA hat auf Grund der komplexen Proteinstruktur weniger leicht zugängliche Aminogruppen als Chitosan. Diese sterische Hinderung verringert die Wahrscheinlichkeit, dass die Aldehyd- und Aminogruppen zu Iminen reagieren und ein

polymeres Netzwerk bilden. Erstaunlich ist die hohe Gelfestigkeit ($26,7 \pm 4,8$ N) des Ch-Glutar-Hydrogels trotz des geringen Feststoffgehalts von 1,8 Gew.-%. Die Gelfestigkeit ist fast genauso hoch wie beim Ch-DA3000-Gel mit einem wesentlich höheren Feststoffgehalt. Die kleinen Glutaraldehyd-Moleküle sorgen vermutlich auf Grund ihrer Größe im Vergleich zu den langkettigen DA3000-Molekülen für ein sehr engmaschiges Netzwerk und bewirken damit eine höhere Festigkeit. Der BSA-Glue hat mit Abstand die höchste Gelfestigkeit. Mit dem Texture Analyser werden ca. 65 N gemessen. Dann bricht die Messung ab, da die Kraftmessdose des Geräts nicht ausreicht, um die tatsächliche Gelfestigkeit von BSA-Glue zu messen. Zum einen enthält der BSA-Glue Aminogruppen im Überschuss und zum anderen sind die beiden Komponenten BSA und Glutaraldehyd wesentlich besser löslich, sodass ein viel höherer Feststoffgehalt gewählt werden kann. Es wird also nochmal deutlich, dass die Löslichkeitseigenschaften der beiden Gel-Komponenten eine entscheidende Rolle für die Performance des Hydrogels spielen.

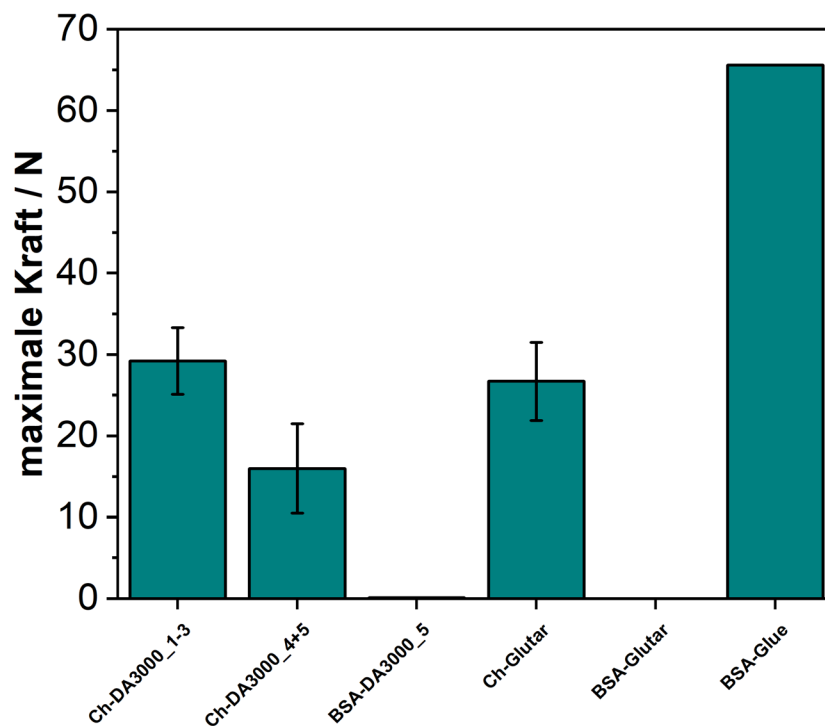


Abbildung 48: Mittlere Gelfestigkeiten von Ch-DA3000-, BSA-DA3000-, Ch-Glutar- und BSA-Glutar-Hydrogelen und von BSA-Glue.

Fazit

Abschließend ist festzustellen, dass ein hoher Feststoffgehalt, ein Amingruppen-Überschuss, Wasser als neutrales Reaktionsmedium und ein Dialdehyd mit hohem Molekulargewicht zu den höchsten Gelfestigkeiten führen würden.

4.2.5.4 Quellverhalten

Zur Untersuchung des Quellverhaltens wurden vier Hydrogele für eine Woche unter physiologischen Bedingungen in einer PBS-Lösung (pH 7,4, bei 37 °C) ausgelagert. Folgende drei Ch-DA3000 Hydrogele mit dem Wassergehalt-1 wurden ausgewählt: äquimolar; äquimolar, aber mit einer PBS-Lösung statt Wasser hergestellt und $\text{NH}_2 > \text{CHO}_{\text{konst.}}$ (3 : 2). Zum Vergleich wurde als viertes Gel BSA-Glue verwendet. Das Gel mit der PBS-Lösung wurde untersucht, um festzustellen, ob dadurch dem osmotischen Druck entgegengewirkt werden kann und somit der Wassergehalt im Hydrogel trotz Auslagerung in der PBS-Lösung konstant bleibt. Das Gel mit dem erhöhten Amingruppenanteil (3 : 2) wurde verwendet, da es bei der Bestimmung der Gelfestigkeit den höchsten Wert erzielen konnte (**Abbildung 45**).

Die Gele wurden vor der Auslagerung gewogen, um das Anfangsgewicht w_0 zu ermitteln. Nach einem Tag bzw. 24 h (w_1) und nach sieben Tagen (w_7) wurden die Gele ebenfalls gewogen. Der prozentuale Quellgrad nach einem und nach sieben Tagen wurde mit **Formel 5** berechnet.

$$Q = \frac{(w_n - w_0)}{w_0} \cdot 100 \%$$

Formel 5: Berechnung des Quellgrades Q mit $n = 1$ oder 7 Tage.

In **Abbildung 49** sind Fotos der vier Hydrogele im Ausgangszustand, nach einem Tag in PBS-Lösung und nach sieben Tagen in PBS-Lösung zu sehen. Die Ch-DA3000 Hydrogele waren nach einem Tag in der PBS-Lösung sehr schleimig, instabil und stark deformiert. Ein Teil des jeweiligen Gels verhielt sich eher wie eine Flüssigkeit. Im Gegensatz dazu hat sich das Gel aus BSA-Glue kaum verändert. Nach sieben Tagen waren die Ch-DA3000 Gele sehr spröde und haben ihre Farbe von blassgelb zu teilweise milchig weiß geändert. Das Gel aus BSA-Glue blieb immer noch unverändert.

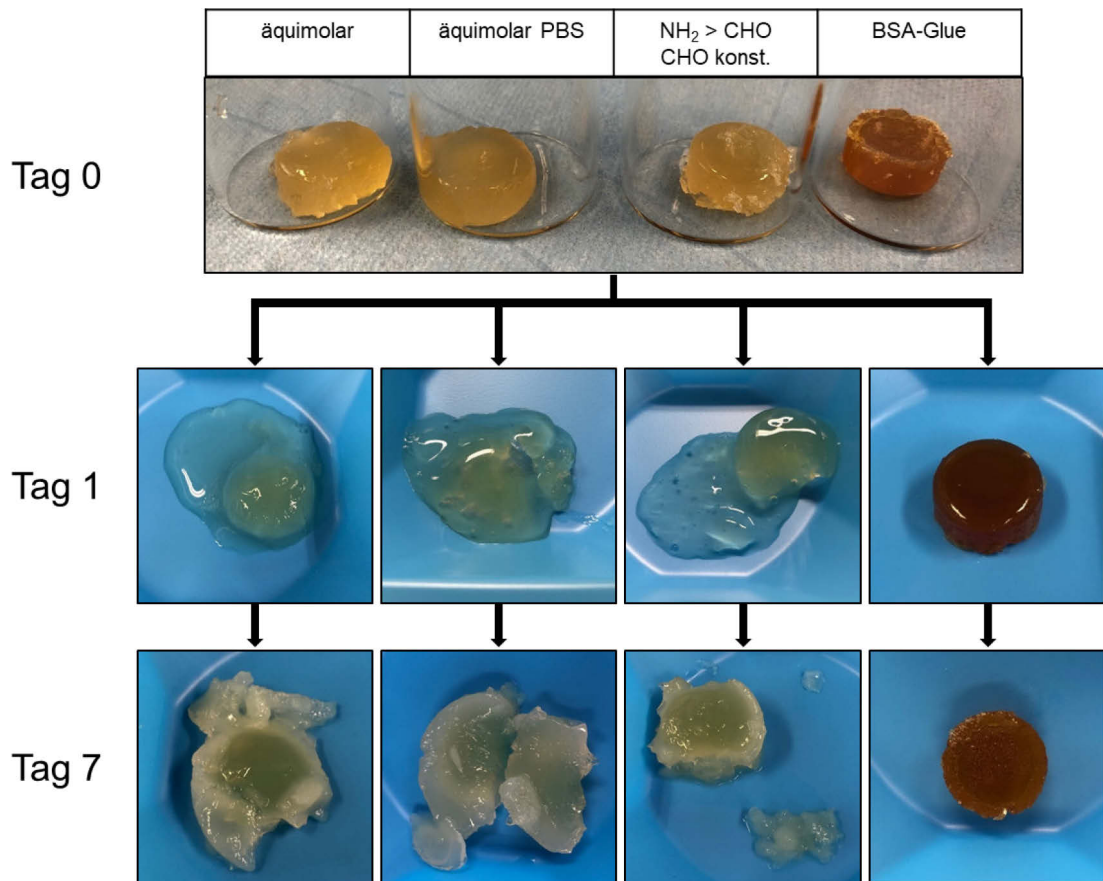


Abbildung 49: Optik der Hydrogele vor Auslagerung in einer PBS-Lösung und nach einem bzw. sieben Tagen in einer PBS-Lösung bei 37 °C.

Nach einem Tag in PBS-Lösung sind die beiden Ch-DA3000 Hydrogele mit äquimolarem Verhältnis um ca. 80 % gequollen. Das Hydrogel mit einem höheren Amingruppenanteil ist um 199 % gequollen, also auf die dreifache Größe seines Ausgangszustandes. Das BSA-Glue Hydrogel ist nicht aufgequollen (**Abbildung 50**). Auch nach sieben Tagen konnte beim BSA-Glue Hydrogel keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Die anderen drei Hydrogele haben nach sieben Tagen wieder an Gewicht verloren. Im Vergleich zum Ausgangszustand war das äquimolare Hydrogel scheinbar nur noch um 14 % gequollen, das äquimolare Hydrogel mit PBS um 39 % und das Hydrogel mit mehr Amingruppen um 60 %. Für die Verwendung als Knochenklebstoff wäre es besser, wenn die Gele, so wie beim BSA-Glue konstant bleiben würden. Durch das starke Quellen kann die Klebverbindung nämlich an Stabilität verlieren und die noch nicht angewachsenen Knochenfragmente könnten verrutschen.

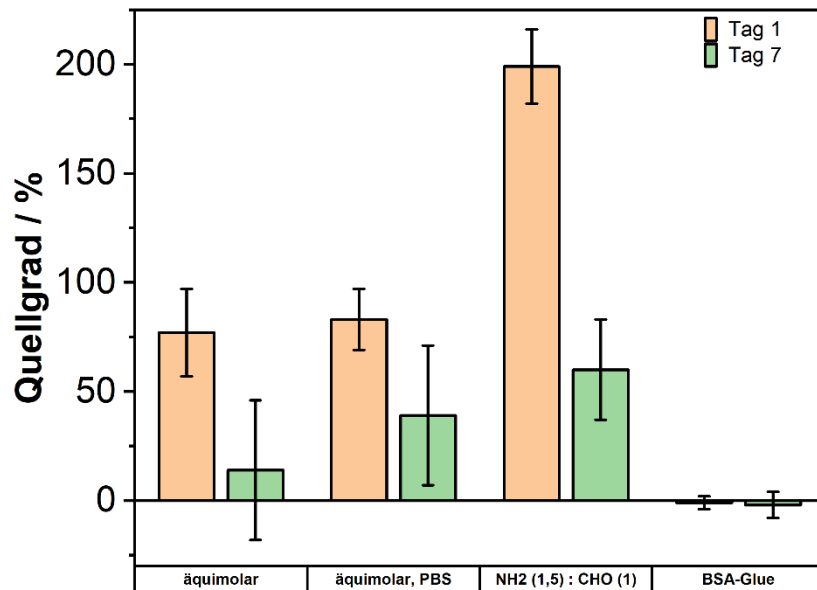


Abbildung 50: Mittlerer Quellgrad der Hydrogele nach einem und nach sieben Tagen Auslagerung bei 37 °C in PBS-Lösung.

Zusätzlich zur Untersuchung des Quellgrades wurden die Gele nach sieben Tagen im Ofen getrocknet, um das Trockengewicht und darüber den Feststoffanteil der Gele zu ermitteln (**Abbildung 51**). Über den Vergleich mit dem jeweiligen ursprünglichen Feststoffgehalt der Hydrogele wurde wieder ein großer Unterschied zwischen den Ch-DA3000 Gelen und dem BSA-Glue-Gel deutlich. Der Feststoffgehalt des BSA-Glue-Gels hat sich nur minimal verändert. Der Feststoffgehalt der anderen drei Hydrogele hat sich hingegen stark verringert. In **Kapitel 4.2.5.3** wurde bereits herausgefunden, dass der Feststoffgehalt einen starken Einfluss auf die Gelfestigkeit hat. Es ist also wichtig, dass sich der Feststoffgehalt nur ganz langsam verringert, während die Knochen wieder zusammenwachsen. Da eine Frakturheilung eher drei Monate und nicht sieben Tage dauert, ist die starke und vor allem schnelle Reduktion des Feststoffgehalts nicht gut für die medizinische Anwendung.

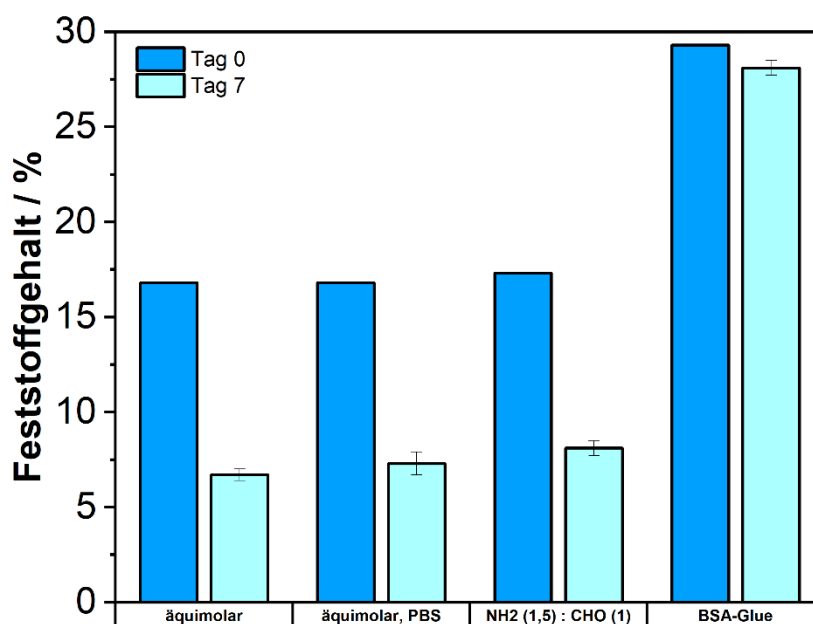


Abbildung 51: Vergleich des ursprünglichen Feststoffanteils der Hydrogele (Tag 0) mit dem Feststoffanteil nach sieben Tagen Auslagerung bei 37 °C in PBS-Lösung (Tag 7).

Außerdem wurde der HMF-Gehalt der abdekantierten PBS-Lösungen der Ch-DA3000 Hydrogele nach einem und nach sieben Tagen über die UV/VIS-Spektroskopie ermittelt (**Abbildung 52**). Durch diese Methode kann allerdings nicht bestimmt werden, ob es sich dabei um einzelne HMF-Moleküle handelt oder ob das HMF noch am IPDI bzw. am Dialdehyd3000 gebunden ist. Nach einem Tag ist der HMF-Anteil in den PBS-Lösungen der beiden äquimolaren Hydrogele deutlich höher ($275 \pm 55 \mu\text{g/mL}$ und $180 \pm 15 \mu\text{g/mL}$) als bei dem Hydrogel mit höherem Aminanteil ($10 \pm 5 \mu\text{g/mL}$). Nach sieben Tagen sind die ermittelten HMF-Mengen aller drei Hydrogele relativ ähnlich und liegen bei 60 – 80 $\mu\text{g/mL}$. Dies deutet darauf hin, dass nach einem Tag nur die Dialdehyde, die nicht an das polymere Netzwerk gebunden waren, aus dem Gel diffundiert sind. Das Hydrogel mit einem höheren Amingruppenanteil hat einen höheren Vernetzungsgrad, sodass nach einem Tag so gut wie kein Dialdehyd bzw. HMF in der abdekantierten Lösung zu messen war. Die nach sieben Tagen ermittelte HMF-Menge deutet bereits auf einen Abbau des Gels hin, also auf eine Hydrolyse der Iminbindungen. Der Abbau des Klebstoffes ist für die medizinische Anwendung notwendig. Allerdings sollte dies in einem angemessenen Zeitfenster passieren, da der Knochen und die Knochenfragmente währenddessen zusammenwachsen können müssen.

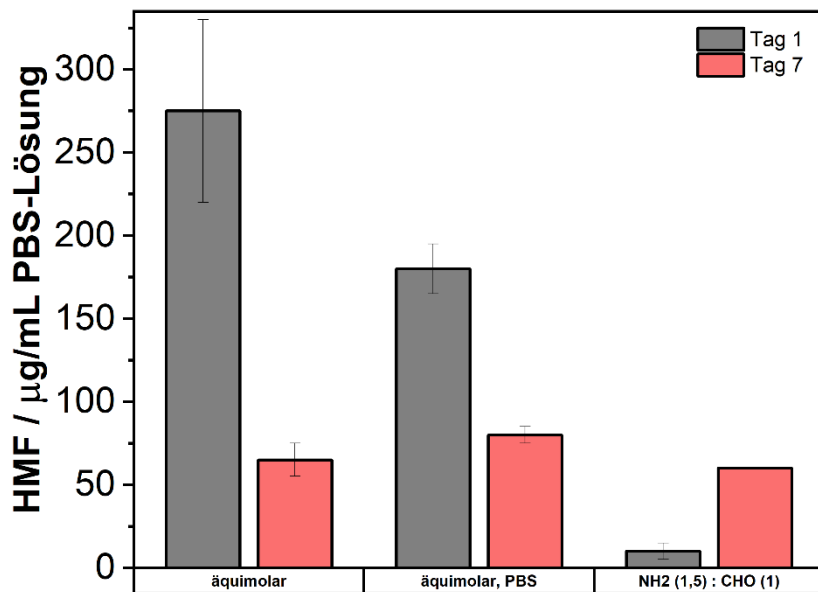


Abbildung 52: Menge an HMF pro mL abdekantierter PBS-Lösung nach einem Tag und nach sieben Tagen.

4.2.5.5 Klebfestigkeit – Druckscherversuche mit Knochenklebungen

Die in **Kapitel 4.1** entwickelte Prüfmethode zur Bestimmung der Klebfestigkeit von Knochenklebstoffen wurde abschließend auch für die Ch-DA-Hydrogele verwendet. Nach dem Aushärten unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur (RT) wurden die Druckscherfestigkeiten von Ch-DA3000 mit einem äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis und Wassergehalt-1 gemessen. Da bereits bei der Untersuchung der Gelfestigkeiten herausgefunden worden ist, dass sich die Chargen 1 – 3 (Charge 1 wurde bereits aufgebraucht) von den Chargen 4 + 5 des DA3000 unterscheiden, wurden die unterschiedlichen Chargen auch bezüglich ihrer Klebfestigkeiten miteinander verglichen (**Abbildung 53**). Die Chargen 2 und 3 resultieren in einer Klebfestigkeit von $2,4 \pm 0,7$ MPa (31 % RSD) und die Chargen 4 und 5 in einer Klebfestigkeit von $1,9 \pm 0,7$ MPa (37 % RSD). Die Chargen unterscheiden sich um 0,5 MPa, wobei berücksichtigt werden muss, dass die jeweilige Standardabweichung größer als 0,5 MPa ist. Ein Unterschied zwischen den Chargen kann beim Vergleich der Klebfestigkeiten im Gegensatz zu den Gelfestigkeiten demzufolge nicht festgestellt werden. Für weitere Untersuchungen der Klebfestigkeiten wurden ausschließlich die Chargen 4 und 5 verwendet, da die Chargen 1 bis 3 bereits durch andere Versuche aufgebraucht wurden.

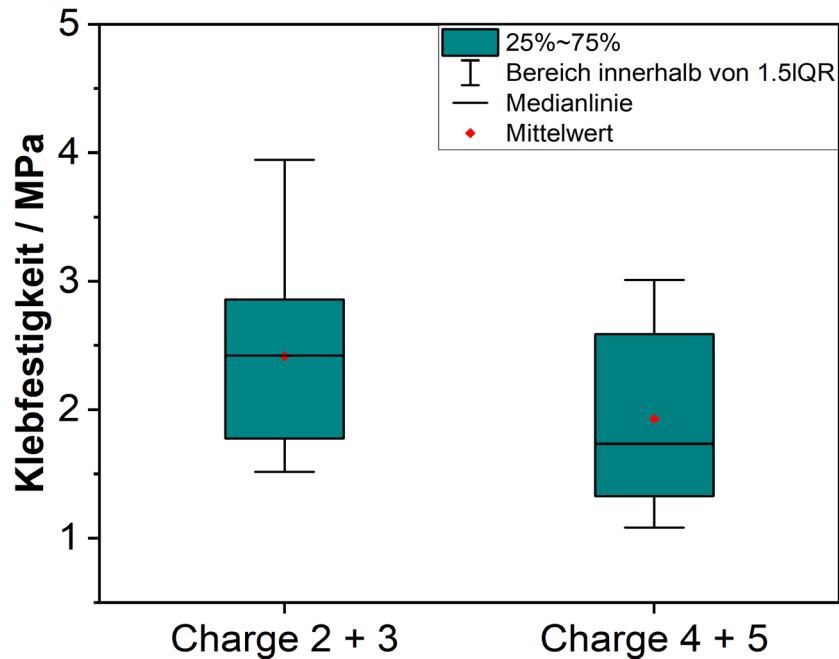


Abbildung 53: Klebfestigkeiten der Ch-DA3000-Hydrogele mit einem äquimolaren NH_2/CHO -Verhältnis und Wassergehalt-1 nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT. 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*).

Bei vorherigen Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass ein Amingruppenüberschuss zu einer höheren Gelfestigkeit führt. Daher wurden Knochenprüfkörper unter Verwendung von einem Ch-DA3000-Hydrogel mit Wassergehalt-1 und einem äquimolaren NH_2/CHO -Verhältnis und einem Ch-DA3000-Hydrogel mit Wassergehalt-1 und NH_2 -Überschuss ($\text{NH}_2 > \text{CHO}_{\text{konst.}}$ (3 : 2)) geklebt. Nach dem Aushärten unter trockenen Bedingungen bei RT konnte mit dem Hydrogel, das Amingruppen im Überschuss enthalten hat, eine Druckscherfestigkeit von $1,6 \pm 0,7$ MPa (43 % RSD) ermittelt werden (**Abbildung 54**). Auf Grund der Standardabweichungen von 37 – 43 % kann kein eindeutiger Unterschied zwischen äquimolar (1,9 MPa) und NH_2 -Überschuss (1,6 MPa) festgestellt werden. Folglich hat der NH_2 -Überschuss keinen Einfluss auf die Adhäsion zum Knochen. Bei der Bestimmung der Klebfestigkeit ist das Hydrogel einer Druckscherbeanspruchung ausgesetzt und bei der Bestimmung der Gelfestigkeit einer Druckbeanspruchung. Die Flächen (Stempel des Texture Analysers vs. Klebfläche des Knochenprüfkörpers), auf die die Kraft wirkt unterscheiden sich ebenfalls in Größe und Form. Offenbar haben die zusätzlichen Amingruppen bei dieser Prüfmethode keinen positiven Einfluss auf die Kohäsion oder die Adhäsion ist so gering, dass der positive Einfluss der Amingruppen nicht zum Ausdruck kommen kann.

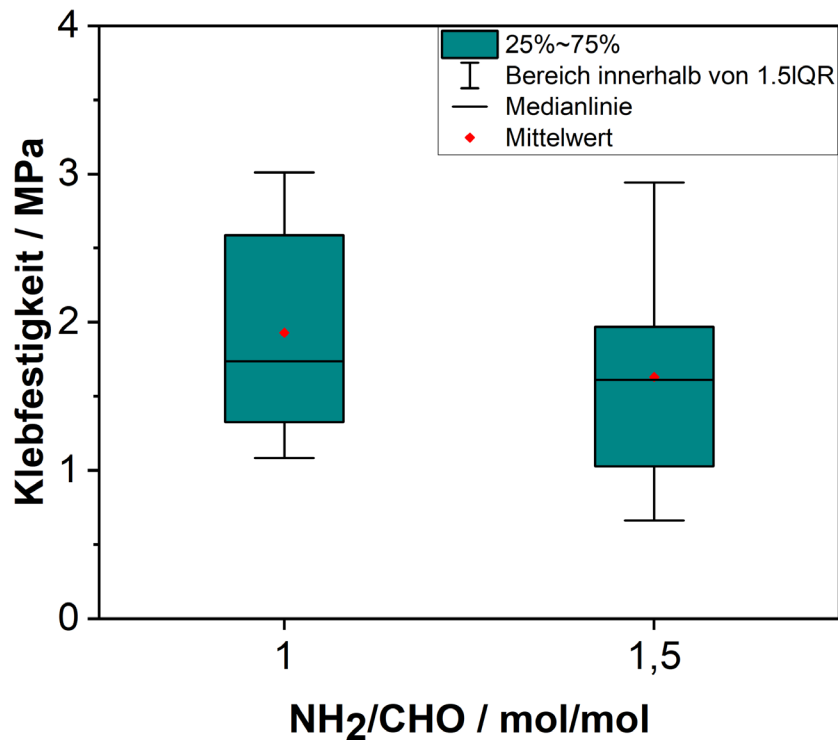


Abbildung 54: Klebfestigkeiten der Ch-DA3000-Hydrogele mit Wassergehalt-1 nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT in Abhängigkeit vom NH₂/CHO-Verhältnis. 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*).

Des Weiteren wurde der Einfluss der molaren Masse der Dialdehyd-Komponente im Gel auf die Klebfestigkeit untersucht. Ein längerkettiges Dialdehyd könnte möglicherweise durch mehr Möglichkeiten von zwischenmolekularen Wechselwirkungen zum Knochengewebe eine verbesserte Adhäsion bewirken. Es wurden Gele mit einem äquimolaren Verhältnis und Wassergehalt-1 hergestellt und entweder DA3000 oder DA2000 für die Synthese verwendet. Nach Aushärtung der geklebten Knochen unter trockenen Bedingungen bei RT wurde mit dem Gel aus DA2000 eine Druckscherfestigkeit von $1,5 \pm 0,5$ MPa (35 % RSD) erreicht und mit dem Gel aus DA3000 eine Druckscherfestigkeit von $1,9 \pm 0,7$ MPa (37 % RSD) (**Abbildung 55**). Auch bei diesem Vergleich kann auf Grund der recht hohen Standardabweichungen nicht von einem Unterschied zwischen den beiden Hydrogelen gesprochen werden. Die Kettenlänge des Dialdehyds hat also keinen Einfluss auf die Adhäsion bzw. Klebfestigkeit.

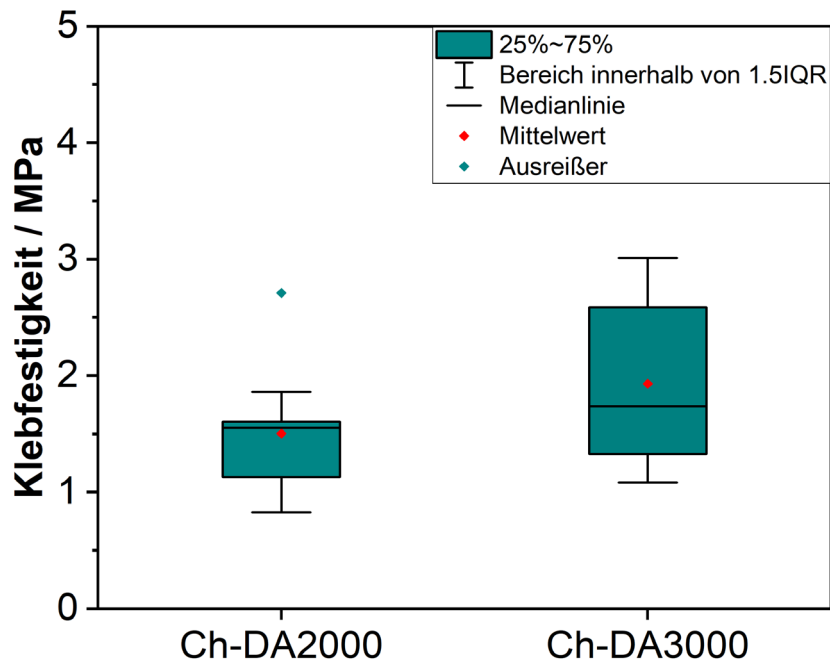


Abbildung 55: Vergleich der Klebfestigkeiten von Ch-DA2000 und Ch-DA3000 mit einem äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis und Wassergehalt-1 nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT. 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*).

Ebenso wie ein erhöhter Aminogruppengehalt im Hydrogel, hat auch ein geringerer Säureanteil im Gel einen positiven Effekt auf die Gelfestigkeit (siehe **Kapitel 4.2.5.3**). Aus diesem Grund wurde eine Messreihe durchgeführt, bei der zum Kleben der Knochenprüfkörper ein Hydrogel mit einem Wasser/Säure-Verhältnis von 1,06 anstatt 0,37 verwendet wurde. Doch auch in diesem Fall konnte beim Vergleich der mittleren Klebfestigkeiten kein Unterschied zwischen dem Gel mit standardmäßigem Säureanteil ($1,9 \pm 0,7$ MPa (37 % RSD)) und dem Gel mit geringerem Säureanteil ($1,9 \pm 0,7$ MPa (35 % RSD)) festgestellt werden (**Abbildung 56**).

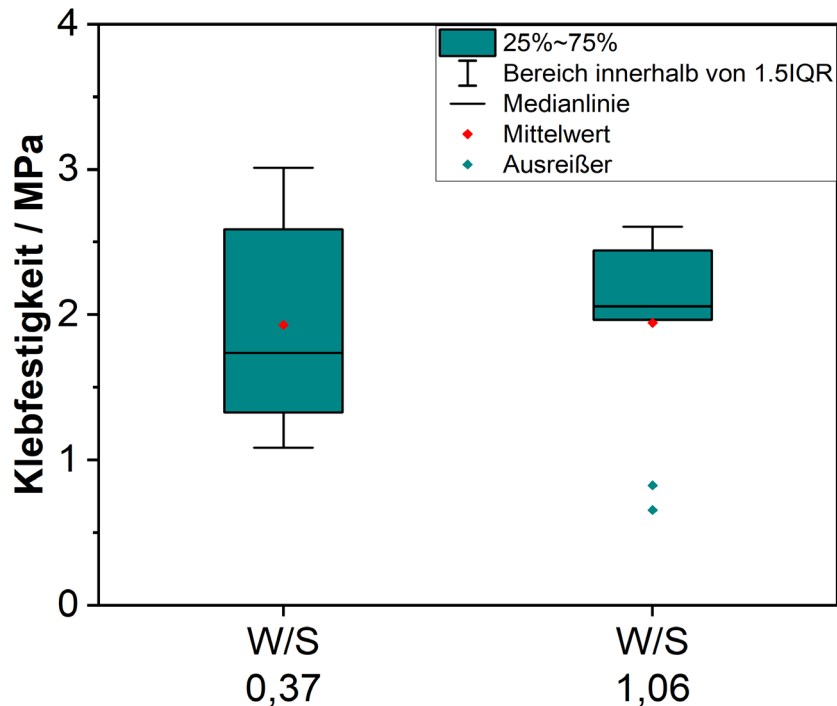


Abbildung 56: Klebfestigkeiten von Ch-DA3000-Hydrogelen mit einem äquimolaren NH_2/CHO -Verhältnis und Wassergehalt-1 nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT in Abhängigkeit vom Wasser/Säure-Verhältnis (W/S). 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*).

In **Kapitel 4.1.2** konnten die Klebfestigkeiten von Histoacryl® und BSA-Glue durch eine Säurevorbehandlung der Klebflächen erhöht werden. Die funktionellen Gruppen der beiden Klebstoffe können mit den Aminogruppen auf der Knochenoberfläche reagieren und verbessern dadurch die Adhäsion. Das Ch-DA3000-Hydrogel besitzt genau wie BSA-Glue Aldehydgruppen, die mit den durch die Säurevorbehandlung vermehrt vorkommenden bzw. freigelegten Aminogruppen des Knochens reagieren könnten. Es wurden Klebversuche mit und ohne Säurevorbehandlung durchgeführt (**Abbildung 57**). Dazu wurde das Ch-DA3000-Hydrogel mit Wassergehalt-1 und äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis verwendet und zusätzlich das Ch-DA3000-Hydrogel mit Wassergehalt-1 und einem erhöhten CHO-Gehalt ($\text{NH}_{2, \text{konst.}} \ll \text{CHO} (1 : 2)$). Bereits bei der Bestimmung der Gelfestigkeit wurde festgestellt, dass ein CHO-Überschuss im Gel die Festigkeit nicht positiv beeinflusst. Allerdings wurde vermutet, dass die zusätzlichen CHO-Gruppen die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass es zu Reaktionen mit der Knochenoberfläche kommt und zumindest die Adhäsion verbessert wird. Bei einem äquimolaren Verhältnis wurde ohne Säurevorbehandlung eine mittlere Klebfestigkeit von $1,9 \pm 0,7$ MPa (37 % RSD) ermittelt. Mit Säurevorbehandlung hat sich die Klebfestigkeit entgegen den Erwartungen

auf $1,0 \pm 0,3$ MPa (32 % RSD) verringert. Die Verwendung eines CHO-Überschusses im Hydrogel führte ohne Säurevorbehandlung zu einer Druckscherfestigkeit von $1,9 \pm 0,6$ MPa (30 % RSD). Die Klebeigenschaften wurden gegenüber dem äquimolaren Verhältnis also weder verbessert, noch verschlechtert.

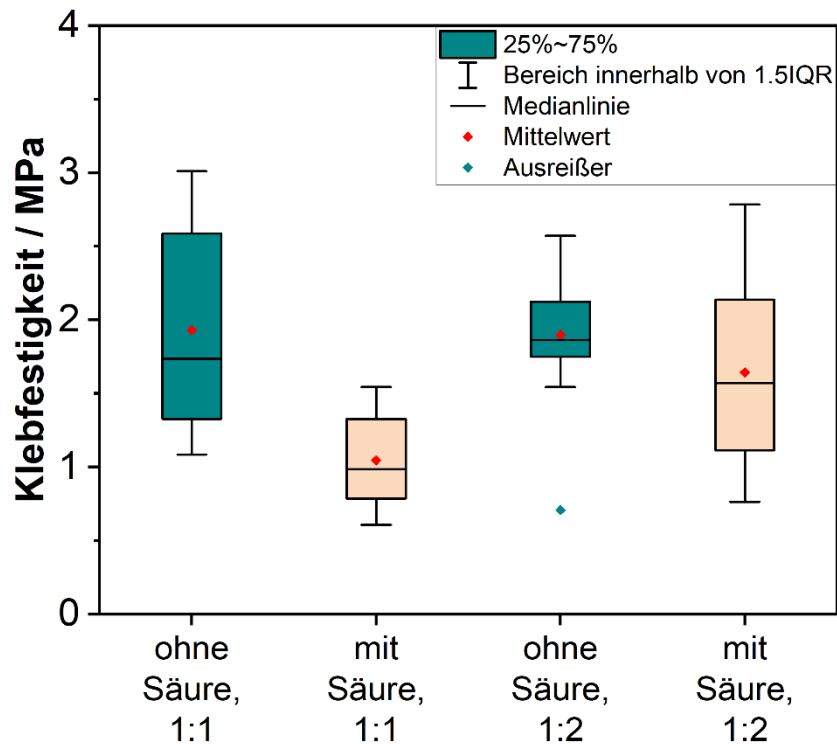


Abbildung 57: Klebfestigkeiten von Ch-DA3000-Hydrogelen mit Wassergehalt-1 nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT in Abhängigkeit vom NH_2/CHO -Verhältnis ohne und mit Säurevorbehandlung der Knochenprüfkörper. 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*).

Allerdings ist die Klebfestigkeit nach Säurevorbehandlung durch den CHO-Überschuss auf ungefähr demselben Level geblieben ($1,6 \pm 0,7$ MPa (43 % RSD)), anstatt geringer zu werden. Im Gegensatz zum BSA-Glue, bei dem das Dialdehyd ein kleines Molekül ist (100,11 g/mol), ist die Aldehyd-Komponente des Ch-DA3000-Hydrogels ein großes Polymer ($\bar{M} = 5838$ g/mol, über UV/VIS-Spektroskopie ermittelt). Die Polymerkette mit den beiden CHO-Endgruppen kann im Gegensatz zum Glutaraldehyd verknäuel vorliegen, sodass die CHO-Gruppen nicht zugänglich für Reaktionen mit der Knochenoberfläche sind. Beim Ch-DA3000-Hydrogel sind also besonders die physikalischen Wechselwirkungen und mechanische Verklammerungen für die Adhäsion wichtig, die offenbar durch die Säurebehandlung so wie beim Knochenzement

Palacos® LV beeinträchtigt wurden. Die zusätzlichen CHO-Gruppen des Ch-DA3000-Gels mit NH_2 , konst. \ll CHO (1 : 2) konnten dem zumindest geringfügig entgegenwirken.

Abschließend wurde die mittlere Klebfestigkeit des Ch-DA3000-Hydrogels mit einem äquimolaren NH_2/CHO -Verhältnis und Wassergehalt-1 nach Aushärtung unter physiologischen Bedingungen (PBS, pH 7,4, 37 °C) ermittelt. Außerdem wurden die Ergebnisse mit den Klebfestigkeiten der Referenzklebstoffe aus **Kapitel 4.1** verglichen (**Abbildung 58**). Mit Histoacryl® ($5,5 \pm 1,8$ MPa (33 % RSD)), BSA-Glue ($3,2 \pm 0,7$ MPa (23 % RSD)) und Palacos® LV ($2,8 \pm 0,6$ MPa (23 % RSD)) konnten höhere Klebfestigkeiten nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen erreicht werden als mit Ch-DA3000 ($1,9 \pm 0,7$ MPa (37 % RSD)). Nach Aushärtung unter physiologischen Bedingungen reduzierte sich die Klebfestigkeit von Ch-DA3000 um ca. 90 % auf $0,2 \pm 0,1$ MPa (28 % RSD). Der negative Einfluss der physiologischen Bedingungen auf die Klebfestigkeit des Ch-DA3000-Hydrogels liegt ungefähr im selben Bereich wie bei den Referenzklebstoffen Histoacryl® ($0,3 \pm 0,1$ MPa (43 % RSD)), BSA-Glue ($0,5 \pm 0,1$ MPa (27 % RSD)) und Palacos® LV ($0,3 \pm 0,1$ MPa (44 % RSD)).

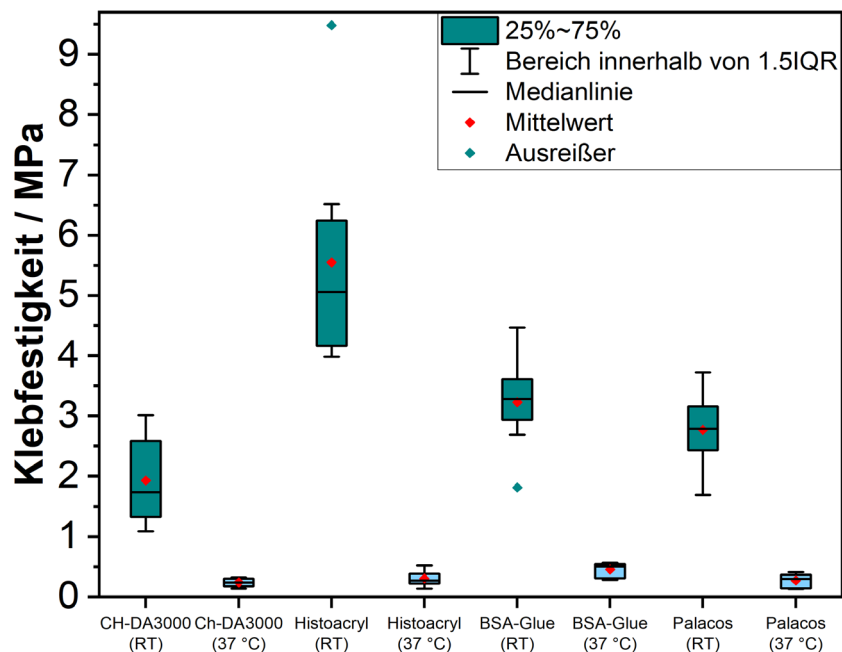


Abbildung 58: Klebfestigkeiten der Ch-DA3000-Hydrogele mit einem äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis und Wassergehalt-1 nach Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT und nach Aushärtung unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4, bei 37 °C). 1.5IQR = 1,5-facher Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*). Zusätzlich wird das Ch-DA3000-Hydrogel mit den Referenzklebstoffen aus **Kapitel 4.1** verglichen.

Zusammenfassend betrachtet haben sowohl das NH_2/CHO -Verhältnis, die molare Masse der Dialdehyd-Komponente als auch der Säureanteil im Hydrogel keinen Einfluss auf die Klebfestigkeit des Chitosan-Dialdehyd-Hydrogels. Lediglich die Säurebehandlung der Knochenoberfläche bewirkte eine geringfügige Veränderung der Klebfestigkeit. Das System ist also robust in Bezug auf Veränderungen. Dies ist grundsätzlich positiv, da ein Klebstoff, der kleine Anwendungsfehler oder Abweichungen der Chargen verzeiht vorteilhaft für den klinischen Einsatz ist. Dennoch muss in zukünftigen Arbeiten herausgefunden werden, wie die Klebfestigkeit erhöht werden kann. Insbesondere unter physiologischen Bedingungen ist die Performance des Hydrogels noch nicht gut genug, wobei anzumerken ist, dass die drei Referenzklebstoffe in diesem Fall auch keine besseren Ergebnisse liefern. Zudem sollte die Methode zur Untersuchung der Klebfestigkeit unter physiologischen Bedingungen überarbeitet werden. Bei der Aushärtung unter physiologischen Bedingungen liegen die geklebten Knochenprüfkörper für 24 h bei 37 °C in einer PBS-Lösung. Im Körper befinden sich die Knochen aber nicht in einer Flüssigkeit, sondern sind umgeben von feuchtem Gewebe. Eine etwas mildere Prüfmethode wäre daher möglicherweise realitätsnäher. Die Knochenprüfkörper könnten beispielsweise mit in PBS getränkten Tüchern umwickelt werden und dann bei 37 °C und erhöhter Luftfeuchtigkeit gelagert werden. Des Weiteren wäre nach Optimierung der Klebfestigkeit eine Untersuchung der Klebfestigkeit in Abhängigkeit der Aushärtezeit sinnvoll. Die Bestimmung der Anfangsfestigkeit und der Zeitpunkt, ab dem die Festigkeit ihr Optimum erreicht hat und eventuell wieder abnimmt, sind entscheidende Kennzahlen zur Beurteilung des potenziellen Knochenklebstoffes.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Methode zur Bestimmung der Klebfestigkeit von potenziellen medizinischen Knochenklebstoffen entwickelt und validiert. Die Prüfmethode ist angelehnt an die ISO 4587:2003 „*Adhesives – Determination of tensile lap-shear strength of rigid-to-rigid bonded assemblies*“ und ist im Vergleich zu anderen publizierten Methoden einfach anzuwenden.[10,26,61] Unter trockenen Bedingungen konnten relative Standardabweichungen von 9 – 33 % erreicht werden. Nach Aushärtung unter physiologischen Bedingungen lagen die Standardabweichungen auf Grund der deutlich anspruchsvolleren Versuchsbedingungen bei 27 – 44 %. Da es sich bei den Prüfkörpern um biologisches Material handelt, liegen die ermittelten Standardabweichungen dennoch in einem angemessenen Rahmen. Die Entwicklung der Prüfmethode war zwingend notwendig, um die potenziellen Knochenklebstoffe, die im Zuge dieser Arbeit hergestellt wurden, zu evaluieren. Es muss allerdings bedacht werden, dass diese *in vitro* Prüfmethode nur als einer der Vorversuche für die Beurteilung von Knochenklebstoffen zu betrachten ist. Es kann also eine Vorauswahl potenzieller Klebstoffe getroffen werden, die dann in einem zweiten Schritt mit *in vivo* Prüfmethoden an Tieren untersucht werden können. Die Unterschiede zwischen der *in vitro* und *in vivo* Methode sind einerseits die Prüfkörper, die sich, obwohl es sich um echte Knochen handelt, stark von den Knochen im lebenden Organismus unterscheiden und andererseits die Umgebung, in der geklebt wird. Die Knochen im lebenden Organismus haben eine andere Struktur, da sie nicht wie die Prüfkörper zuvor gesägt und geschliffen werden. Körperflüssigkeiten erschweren zusätzlich das Kleben einer Knochenfraktur innerhalb des Körpers.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden chemisch vernetzende Hydrogele hergestellt, charakterisiert und in der Anwendung als potenzieller Knochenklebstoff geprüft. In Anlehnung an den kommerziell erhältlichen Gewebeklebstoff BioGlue®, mit dem bereits bei den Versuchen zur Entwicklung der Prüfmethode positive Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden Hydrogele aus Chitosan und einem Dialdehyd hergestellt. Die Vernetzung bzw. die Gelbildung erfolgt wie beim BioGlue® über die Reaktion zwischen Aldehyd- und Aminogruppen. Zunächst wurden drei unterschiedliche Methoden zur Synthese des Dialdehyds miteinander verglichen. Als beste Variante stellte sich die Synthese heraus, bei der zunächst das Polyethylenglycol (PEG3000, PEG2000 oder PEG1000) an beiden Endgruppen mit IPDI funktionalisiert und anschließend mit HMF umgesetzt wurde (HMF–IPDI–PEG–IPDI–HMF). Das HMF trägt die, für das Hydrogel entscheidende Aldehydgruppe. Die Auswertung der analytischen Methoden zur Strukturaufklärung ergab, dass bei der Synthese neben dem gewünschten Dialdehyd

auch Dialdehyde mit mehreren PEG–IPDI-Wiederholeinheiten entstanden sind. Diese können ebenfalls als Vernetzer fungieren und sind daher nicht störend für die Herstellung der Hydrogele.

Die beiden wichtigsten Methoden zur Charakterisierung der Gele waren die Bestimmung der Gelfestigkeit und die Bestimmung der Klebfestigkeit durch die vorher in Teil 1 validierten Prüfmethode. Der Feststoffgehalt der Hydrogele hat, wie zu erwarten, einen großen Einfluss auf deren Gelfestigkeit. Je weniger Wasser, desto fester das Gel. Allerdings wurde der Feststoffgehalt durch das Löslichkeits- bzw. Dispergierbarkeitsverhalten der beiden Komponenten im Gel limitiert. In zukünftigen Arbeiten sollte also darauf geachtet werden, dass die beiden Komponenten des Hydrogels sehr hydrophil sind, damit ein möglichst hoher Feststoffgehalt verwendet werden kann. Außerdem hat auch der pH-Wert Einfluss auf die Gelfestigkeit. Je saurer das Reaktionsmedium, desto mehr Aminogruppen des Chitosans liegen protoniert vor und können nicht mehr zur Vernetzung des Gels beitragen. Das Chitosan ist nur im Sauren löslich, daher konnten keine anderen pH-Werte (neutral/basisch) untersucht werden. Eine Amin-Komponente, die sehr gut in Wasser bzw. in neutralem Milieu löslich ist, wäre also erstrebenswert, um eine höhere Gelfestigkeit zu erreichen. Außerdem ist das Chitosan tierischen Ursprungs. Ein synthetisch hergestelltes Polyamin würde das Zulassungsverfahren des Knochenklebstoffes vereinfachen. Durch Variation des Verhältnisses der funktionellen Gruppen zueinander, wurde festgestellt, dass ein Amingruppenüberschuss im Gel einen positiven Einfluss auf die Festigkeit des Gels hat. Dies liegt aber eher an der Tatsache, dass die Amin-Komponente in diesem Fall die polyfunktionelle Komponente ist und nicht nur der Vernetzer wie das Dialdehyd.

Die Untersuchung der Klebfestigkeit ergab, dass das Ch-DA-Hydrogel ein sehr robustes System ist, da die Klebfestigkeit bei verschiedenen Variationen (z.B. NH_2/CHO -Verhältnis) immer relativ konstant blieb. Dieses Verhalten ist gut für die medizinische Anwendung, da kleinere Fehler bei der Applikation oder auch Abweichungen innerhalb der produzierten Chargen kein Risiko für die Operation darstellen. Nach dem Aushärten unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur wurde für das Gel Ch-DA3000 mit einem äquimolarem NH_2/CHO -Verhältnis und Wassergehalt-1 folgende Klebfestigkeit ermittelt: $2,4 \pm 0,7$ MPa (31 % RSD). Unter physiologischen Bedingungen ist die Klebfestigkeit allerdings deutlich geringer: $0,2 \pm 0,1$ MPa (28 % RSD). Insbesondere die Klebfestigkeit unter physiologischen Bedingungen muss also noch optimiert werden. Allerdings sind die in dieser Prüfmethode angewandten Bedingungen bei Aushärtung unter physiologischen Bedingungen sehr harsch. Etwas mildere Bedingungen wären vermutlich realitätsnäher und würden höhere Klebfestigkeiten erzielen.

Zur Optimierung der Klebfestigkeit und für eine bessere Knochenheilung sollten in zukünftigen Arbeiten z. B. entsprechende Füllstoffe verwendet werden. Hydroxylapatit (HA) wäre eine gute Möglichkeit, da der Knochen zu einem Großteil aus Hydroxylapatit besteht. Über zusätzliche physikalische Wechselwirkungen könnte das HA möglicherweise die Klebfestigkeit verbessern. Eine osteokonduktive Wirkung wie bei KIRILLOVA et al.[28] durch Tetracalciumphosphat und ein positiver Einfluss auf die Zellviabilität wie bei SHAHBAZI et al.[29] durch nanobioaktive Glaspartikel wären ebenfalls möglich. Die Bioaktivität bzw. -mineralisierung des Füllstoffes könnte durch die Auslagerung in SBF (engl. *simulated body fluid*) und anschließender Untersuchung mittels REM und XRD (engl. *X-ray diffraction*) beurteilt werden.

Der Knochenklebstoff sollte primär für die Fixierung von kleinen Knochenfragmenten komplizierter Brüche entwickelt werden. Es wäre aber auch interessant die Klebfestigkeit an Knochen zu Kunststoff-, Metall- oder Komposit-Verbindungen zu untersuchen, da dies wichtig für die Anwendung als Klebstoff für Prothesen oder andere künstliche Implantate wäre.

6. Literaturverzeichnis

- [1] V. Lührs, S. Stößlein, K. Thiel, I. Grunwald, A. Hartwig, An in vitro bone-to-bone adhesion test method using the compression shear test, *Int J Adhes Adhes* 111 (2021) 102977.
- [2] K. Karakriazis, V. Lührs, S. Stößlein, I. Grunwald, A. Hartwig, Synthesis and characterization of a Schiff base crosslinked hydrogel based on hyperbranched polyglycerol, *Mater Adv* 4 (2023) 1648–1655.
- [3] M. Neumaier, S. Siebenlist, A. Buchholz, K.F. Braun, Repositionstechniken der konservativen Frakturbehandlung, *chirurgische praxis* 81 (2016) 139–147.
- [4] M. Bemelman, M. van Baal, J.Z. Yuan, L. Leenen, The Role of Minimally Invasive Plate Osteosynthesis in Rib Fixation: A Review, *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 49 (2016) 1–8.
- [5] H.K. Uthoff, P. Poitras, D.S. Backman, Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments, *J Orthop Sci* 11 (2006) 118–126.
- [6] J. Bartoniček, Early history of operative treatment of fractures, *Arch Orthop Trauma Surg* 130 (2010) 1385–1396.
- [7] T. Miclau, R.E. Martin, The evolution of modern plate osteosynthesis, *Injury* 28 (1997) S-A3-S-A6.
- [8] S. Sauerbier, R. Schön, J.-E. Otten, R. Schmelzeisen, R. Gutwald, The development of plate osteosynthesis for the treatment of fractures of the mandibular body - a literature review, *J Cranio Maxill Surg* 36 (2008) 251–259.
- [9] V. Bhagat, M.L. Becker, Degradable Adhesives for Surgery and Tissue Engineering, *Biomacromolecules* 18 (2017) 3009–3039.
- [10] A. Bou-Francis, A. Ghanem, Standardized methodology for in vitro assessment of bone-to-bone adhesion strength, *Int J Adhes Adhes* 77 (2017) 96–101.
- [11] M.J. Sánchez-Fernández, H. Hammoudeh, R.P. Félix Lanao, M. van Erk, J.C.M. van Hest, S.C.G. Leeuwenburgh, Bone-Adhesive Materials: Clinical Requirements, Mechanisms of Action, and Future Perspective, *Adv Mater Interfaces* 6 (2019) 1802021.
- [12] C. Heiss, R. Schnettler, Bioresorbierbare Klebstoffe in der operativen Traumatologie und Orthopädie, *BIOmaterialien* (2003) 298–304.

- [13] D.F. Farrar, Bone adhesives for trauma surgery: A review of challenges and developments, *Int J Adhes Adhes* 33 (2012) 89–97.
- [14] C. Heiss, R. Schnettler, Bioresorbierbare Knochenklebstoffe. Historischer Rückblick und heutiger Stand, *Der Unfallchirurg* (2005) 348–355.
- [15] K. Lei, Q. Zhu, X. Wang, H. Xiao, Z. Zheng, In Vitro and in Vivo Characterization of a Foam-Like Polyurethane Bone Adhesive for Promoting Bone Tissue Growth, *ACS Biomater Sci Eng* 5 (2019) 5489–5497.
- [16] A. Nahanmoghadam, M. Asemani, V. Goodarzi, S. Ebrahimi-Barough, Design and fabrication of Bone Tissue Scaffolds based on PCL/PHBVContaining Hydroxyapatite Nanoparticles: Dual-Leaching Technique, *J Biomed Mater Res A* 109 (2021) 981–993.
- [17] U. Kandalam, A.J. Bouvier, S.B. Casas, R.L. Smith, A.M. Gallego, J.K. Rothrock, J.Y. Thompson, C.-Y.C. Huang, E.J. Stelnicki, Novel bone adhesives: a comparison of bond strengths in vitro, *Int J Oral Maxillofac Surg* 42 (2013) 1054–1059.
- [18] M. Erken, A. Tevlek, P. Hosseinian, B. Topuz, H.M. Aydin, Effects of ceramic particle size on cell attachment and viability in polyurethane-based bone adhesive composites, *J Compos Mater* 54 (2019) 2013–2022.
- [19] N.V. Shah, R. Meislin, Current state and use of biological adhesives in orthopedic surgery, *Orthopedics* 36 (2013) 945–956.
- [20] K. Endres, R. Marx, J. Tinschert, D.C. Wirtz, C. Stoll, D. Riediger, R. Smeets, A new adhesive technique for internal fixation in midfacial surgery, *Biomed Eng Online* 7 (2008) 16.
- [21] J. Kilpikari, M. Lapinsuo, P. Törmälä, H. Päätiälä, P. Rokkanen, Bonding strength of alkyl-2-cyanoacrylates to bone *in vitro*, *J Biomed Mater Res* 20 (1986) 1095–1102.
- [22] G.M. Brauer, J.W. Kumpula, D.J. Termini, K.M. Davidson, Durability of the bond between bone and various 2-cyanoacrylates in an aqueous environment, *J Biomed Mater Res* 13 (1979) 593–606.
- [23] P.W.M. Fedak, A. Kasatkin, Enhancing sternal closure using Kryptonite bone adhesive: technical report, *Surg Innov* 18 (2011) NP8-11.
- [24] F.J. Cedano Serrano, L.M. Pinzón, D.M. Narváez, C.I. Castro Paéz, C.L. Moreno-Serrano, D.M. Tabima, F. Salcedo, J.C. Briceno, J.P. Casas-Rodriguez,

- Evaluation of a water-resistant and biocompatible adhesive with potential use in bone fractures, *J Adhes Sci Technol* 31 (2016) 1480–1495.
- [25] B. Hoffmann, E. Volkmer, A. Kokott, P. Augat, M. Ohnmacht, N. Sedlmayr, M. Schieker, L. Claes, W. Mutschler, G. Ziegler, Characterisation of a new bioadhesive system based on polysaccharides with the potential to be used as bone glue, *J Mater Sci: Mater Med* 20 (2009) 2001–2009.
- [26] B. Cohen, M. Panker, E. Zuckerman, M. Foox, M. Zilberman, Effect of calcium phosphate-based fillers on the structure and bonding strength of novel gelatin-alginate bioadhesives, *J Biomater Appl* 28 (2014) 1366–1375.
- [27] S.C. Weber, M.W. Chapman, Adhesives in orthopaedic surgery. A review of the literature and *in vitro* bonding strengths of bone-bonding agents, *Clin Orthop Relat Res* (1984) 249–261.
- [28] A. Kirillova, C. Kelly, N. von Windheim, K. Gall, Bioinspired Mineral-Organic Bioresorbable Bone Adhesive, *Adv Healthc Mater* 7 (2018) 1800467.
- [29] S. Shahbazi, F. Moztarzadeh, G.M.M. Sadeghi, Y. Jafari, In vitro study of a new biodegradable nanocomposite based on poly propylene fumarate as bone glue, *Mater Sci Eng C, Mater Biol Appl* 69 (2016) 1201–1209.
- [30] F. Cedano, J. Casas, C. Castro, D. Tabima, C. Moreno, J. Briceno, First approach of a protocol for test bone adhesives (2013).
- [31] T. Brückner, M. Meininger, J. Groll, A.C. Kübler, U. Gbureck, Magnesium Phosphate Cement as Mineral Bone Adhesive, *Materials* 12 (2019) 3819.
- [32] V. Bhagat, E. O'Brien, J. Zhou, M.L. Becker, Caddisfly Inspired Phosphorylated Poly(ester urea)-Based Degradable Bone Adhesives, *Biomacromolecules* 17 (2016) 3016–3024.
- [33] P. Procter, M. Pujari-Palmer, G. Hulsart-Billström, D. Wenner, G. Insley, S. Larsson, H. Engqvist, A biomechanical test model for evaluating osseous and osteochondral tissue adhesives, *BMC biomed eng* 1 (2019) 581.
- [34] L. Wistlich, A. Rücker, M. Schamel, A.C. Kübler, U. Gbureck, J. Groll, A Bone Glue with Sustained Adhesion under Wet Conditions, *Adv Healthc Mater* 6 (2017).
- [35] P. Maurer, K. Bekes, C.R. Gernhardt, H.-G. Schaller, J. Schubert, Comparison of the bond strength of selected adhesive dental systems to cortical bone under *in vitro* conditions, *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 (2004) 377–381.

- [36] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J Adv Res* 6 (2015) 105–121.
- [37] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H. Md Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Mater Sci Eng C, Mater Biol Appl* 57 (2015) 414–433.
- [38] E. Caló, V.V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal* 65 (2015) 252–267.
- [39] K. Schwetlick u. a., *Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum*, Wiley VCH, Weinheim, 2009.
- [40] I.A. Duceac, S. Coseri, Chitosan Schiff-Base Hydrogels-A Critical Perspective Review, *Gels* 8 (2022) 779.
- [41] J. Xu, Y. Liu, S.-H. Hsu, Hydrogels Based on Schiff Base Linkages for Biomedical Applications, *Molecules* 24 (2019) 3005.
- [42] C. Xu, W. Zhan, X. Tang, F. Mo, L. Fu, B. Lin, Self-healing chitosan/vanillin hydrogels based on Schiff-base bond/hydrogen bond hybrid linkages, *Polymer Testing* 66 (2018) 155–163.
- [43] Y. Zhang, C. Fu, Y. Li, K. Wang, X. Wang, Y. Wei, L. Tao, Synthesis of an injectable, self-healable and dual responsive hydrogel for drug delivery and 3D cell cultivation, *Polym Chem* 8 (2017) 537–544.
- [44] CryoLife, Inc., BioGlue, chirurgischer Klebstoff - Gebrauchsanweisung.
- [45] H.-H. Chao, D.F. Torchiana, BioGlue: Albumin/Glutaraldehyde Sealant in Cardiac Surgery, *J CARD SURG* 18 (2003) 500–503.
- [46] K. Uhlig, *Discovering polyurethanes*, Hanser; Hanser-Gardner, Munich, Cincinnati, 1998.
- [47] J. Joseph, R.M. Patel, A. Wenham, J.R. Smith, Biomedical applications of polyurethane materials and coatings, *Trans Inst Met Finish* 96 (2018) 121–129.
- [48] M.F. Sonnenschein, *Polyurethanes. Science, technology, markets, and trends*, Wiley, Hoboken New Jersey, 2015.
- [49] H. Khatoon, S. Ahmad, Polyurethane: A Versatile Scaffold for Biomedical Applications, *Significances bioeng biosci* 2 (2018) 1–3.
- [50] H.B. Bingol, J.C.M.E. Bender, J.A. Opsteen, S.C.G. Leeuwenburgh, Bone adhesive materials: From bench to bedside, *Mater Today Bio* 19 (2023) 100599.

- [51] G. Oertel (Ed.), Polyurethane, Hanser, München, 1993.
- [52] M. Rochery, I. Vroman, T.M. Lam, Kinetic Model for the Reaction of IPDI and Macrodiols: Study on the Relative Reactivity of Isocyanate Groups, *J Macromol Sci - Pure Appl Chem* 37 (2000) 259–275.
- [53] R. Lomölder, F. Plogmann, P. Speier, Selectivity of isophorone diisocyanate in the urethane reaction influence of temperature, catalysis, and reaction partners, *J Coat Technol* 69 (1997) 51–57.
- [54] G. Habenicht, Kleben - erfolgreich und fehlerfrei. Handwerk, Praktiker, Ausbildung, Industrie, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 2012.
- [55] N. Neumann, Synthese und Charakterisierung aldehydfunktionalisierter Polyurethane als potenzielle medizinische Klebstoffe. Masterarbeit, Bremen, 2018.
- [56] S. Sundararajan, A.B. Samui, P.S. Kulkarni, Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) (PEG) based hyperbranched polyurethanes as thermal energy storage materials, *Thermochim Acta* 650 (2017) 114–122.
- [57] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
- [58] A. Tromelin, I. Andriot, E. Guichard, Protein–flavour interactions, in: A. Voilley, P. Etiévant (Eds.) *Flavour in Food*, CRC Press, Boca Raton, Florida, Cambridge, England, 2006 pp. 172–207.
- [59] UniProtKB, P02769 (ALBU_BOVIN).
<https://www.uniprot.org/uniprot/P02769#sequences> (15.02.2022).
- [60] D.J. Hadjidakis, I.I. Androulakis, Bone remodeling, *Ann N.Y. Acad Sci* 1092 (2006) 385–396.
- [61] T. Renner, In vitro Testverfahren zur Qualifizierung von Knochenklebstoffen. Dissertation, Würzburg, 2017.
- [62] B. Braun Melsungen AG, Histoacryl.
<https://www.bbraun.de/de/products/b/histoacryl.html> (16.02.2022).
- [63] S.K. Bhatia, *Biomaterials for Clinical Applications*, Springer, New York, 2010.
- [64] A. Ekelund, O.S. Nilsson, Tissue adhesives inhibit experimental new bone formation, *Int Orthop* 15 (1991) 331–334.

- [65] W. Fürst, A. Banerjee, Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity, *Ann Thorac Surg* 79 (2005) 1522-1528.
- [66] S.S. Stylli, A. Kumar, M. Gonzales, A.H. Kaye, The biocompatibility of BioGlue with the cerebral cortex: a pilot study, *J Clin Neurosci* 11 (2004) 631–635.
- [67] P.-L. Lai, L.-H. Chen, W.-J. Chen, I.-M. Chu, Chemical and physical properties of bone cement for vertebroplasty, *Biomed J* 36 (2013) 162–167.
- [68] Heraeus Medical GmbH, Palacos LV - Gebrauchsanweisung.
- [69] M.E. Müller, Ostamer und Palacos in der Knochenchirurgie, *Arch f klin Chir* 304 (1963) 934–936.
- [70] E. Soldner, G. Herr, Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien. Grundlagen, aktueller Stand und neue Entwicklungen, *Trauma Berufskrankh* 3 (2001) 256–269.
- [71] D. Felsenberg, Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit, *Pharm Unserer Zeit* 30 (2001) 488–494.
- [72] R. van Noort, *Introduction to Dental Materials*, MOSBY Elsevier Verlag, 2013.
- [73] N. Moszner, T. Hirt, New polymer-chemical developments in clinical dental polymer materials: Enamel-dentin adhesives and restorative composites, *J Polym Sci A Polym Chem* 50 (2012) 4369–4402.
- [74] G. Habenicht, *Kleben. Grundlagen, Technologien, Anwendungen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009.
- [75] P.J. Bouten, M. Zonjee, J. Bender, S.T. Yauw, H. van Goor, J.C. van Hest, R. Hoogenboom, The chemistry of tissue adhesive materials, *Prog Polym Sci* 39 (2014) 1375–1405.
- [76] A. Lauto, D. Mawad, L.J.R. Foster, Adhesive biomaterials for tissue reconstruction, *J Chem Technol Biotechnol* 83 (2008) 464–472.
- [77] T. Jiao, G. Wu, Y. Zhang, L. Shen, Y. Lei, C.-Y. Wang, A.C. Fahrenbach, H. Li, Self-Assembly in Water with N-Substituted Imines, *Angew Chem Int Ed* 59 (2020) 18350–18367.
- [78] TÜV Süd, Medizinprodukte mit Materialien tierischen Ursprungs. <https://www.tuvsud.com/de-de/branchen/gesundheit-und-medizintechnik/innovative-medizinprodukte/medizinprodukte-mit-materialien-tierischen-ursprungs> (15.02.2022).

- [79] D.I. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, M.A. Correa-Murrieta, R.G. Sánchez-Duarte, P. Cruz-Flores, G.S. de La Mora-López, Chitosan, in: S.M. Nabavi, A. Sanches Silva (Eds.) *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, Academic Press, 2019 pp. 485–493.
- [80] J. Ondruschka, M. Trutnau, T. Bley, Gewinnung und Potenziale des Biopolymers Chitosan, *Chem Ing Tech* 80 (2008) 811–820.
- [81] P.S. Bakshi, D. Selvakumar, K. Kadirvelu, N.S. Kumar, Chitosan as an environment friendly biomaterial - a review on recent modifications and applications, *Int J Biol Macromol* 150 (2020) 1072–1083.
- [82] A. Lahiji, A. Sohrabi, D.S. Hungerford, C.G. Frondoza, Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes, *J Biomed Mater Res* 51 (2000) 586–595.
- [83] R.A.A. Muzzarelli, M. Mattioli-Belmonte, C. Tietz, R. Biagini, G. Ferioli, M.A. Brunelli, M. Fini, R. Giardino, P. Ilari, G. Biagini, Stimulatory effect on bone formation exerted by modified chitosan, *Biomaterials* 15 (1994) 1075–1081.
- [84] C. Dingels, M. Schömer, H. Frey, Die vielen Gesichter des Poly(ethylenglykol)s, *Chem Unserer Zeit* 45 (2011) 338–349.
- [85] H.J. Räder, W. Schrepp, MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of synthetic polymers, *Acta Polym* 49 (1998) 272–293.
- [86] S. Hosseini, S.O. Martinez-Chapa, Principles and Mechanism of MALDI-ToF-MS Analysis, in: S. Hosseini, S.O. Martinez-Chapa (Eds.) *Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis. Applications in Bio-diagnosis, Tissue Engineering and Drug Delivery*, Springer, Singapore, 2017 pp. 1–19.
- [87] G. Lagaly, O. Schulz, R. Zimehl, Dispersionen und Emulsionen. Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1997.
- [88] Ö.S. Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, in: S. Soloneski, M.L. Larramendy (Eds.) *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, IntechOpen, Erscheinungsort nicht ermittelbar, 2018.
- [89] A. Adan, Y. Kiraz, Y. Baran, Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Curr Pharm Biotechnol* 17 (2016) 1213–1221.

- [90] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, E. Capanoglu, Guidelines for cell viability assays, *Food Frontiers* 1 (2020) 332–349.
- [91] L.-M. Yin, Y. Wei, Y. Wang, Y.-D. Xu, Y.-Q. Yang, Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells, *Int J Med Sci* 10 (2013) 68–72.

7. Anhang

Tabelle 24: Klebfestigkeiten bzw. Druckscherfestigkeiten (MPa) von Histoacryl®, BSA-Glue und Palacos® LV auf Prüfkörpern aus Rinderknochen. Jedes Experiment wurde mindestens achtmal wiederholt ($n \geq 8$).[1]

Referenz- material		Mittelwert	Median	Maximum	Minimum	<i>n</i>
Histoacryl®	trocken, RT	5,5 ± 1,8	5,1	9,5	4,0	8
	physiologisch	0,3 ± 0,1	0,3	0,5	0,1	10
	Säure	7,1 ± 0,7	7,2	8,4	6,1	8
BSA-Glue	trocken, RT	3,2 ± 0,7	3,3	4,5	1,8	9
	physiologisch	0,5 ± 0,1	0,5	0,6	0,3	10
	Säure	7,9 ± 1,9	7,5	10,7	4,7	10
Palacos® LV	trocken, RT	2,8 ± 0,6	2,8	3,7	1,7	9
	physiologisch	0,3 ± 0,1	0,3	0,4	0,1	9
	Säure	0,3 ± 0,1	0,3	0,6	0,1	10

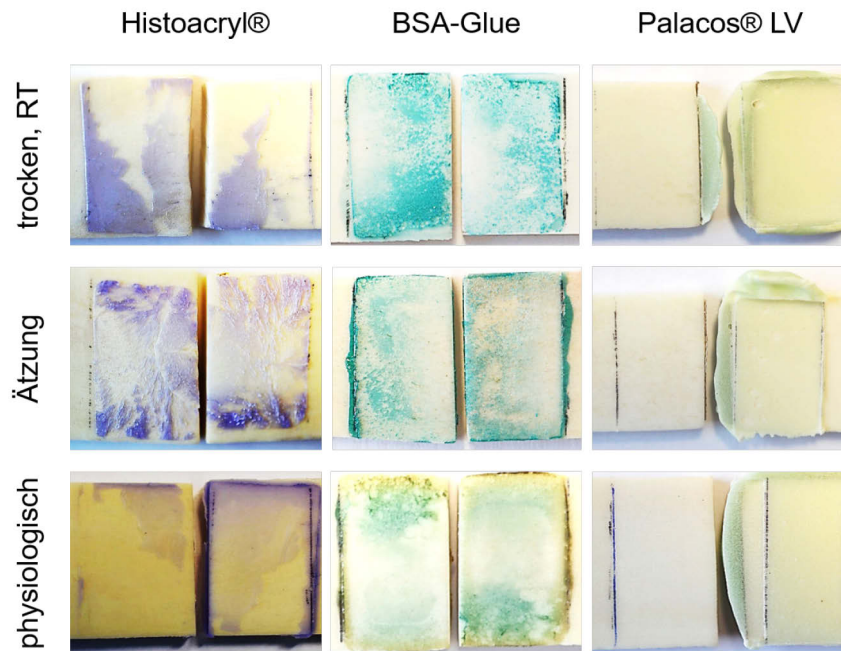


Abbildung 59: Bruchbilder repräsentativer Knochenproben, die mit Histoacryl®, BSA-Glue und Palacos® LV geklebt wurden. Es wird zwischen Aushärtung unter trockenen Bedingungen bei RT, Aushärtung unter physiologischen Bedingungen und Aushärtung unter trockenen Bedingungen mit vorheriger Säurebehandlung der Klebfläche unterschieden. Der BSA-Glue wurde für die Bruchbildbeurteilung mit Methylenblau gefärbt, um den Kontrast zwischen Knochen und Klebstoff zu erhöhen.[1]

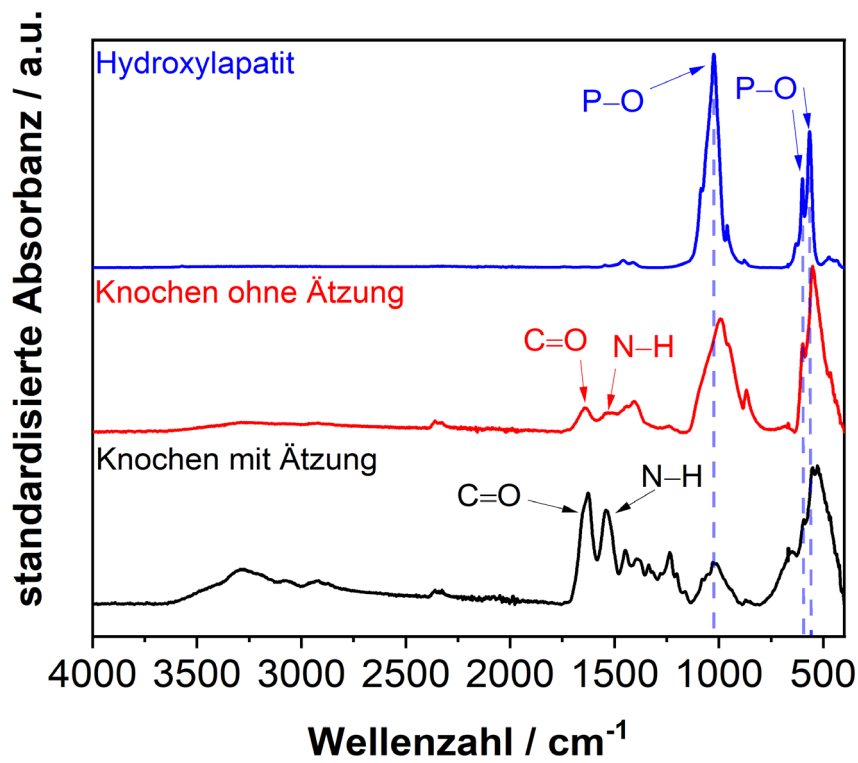


Abbildung 60: FTIR-Spektren von Hydroxylapatit und der Knochenoberfläche ohne und mit Ätzung durch Phosphorsäure im Bereich von 4000 – 400 cm⁻¹. [1]

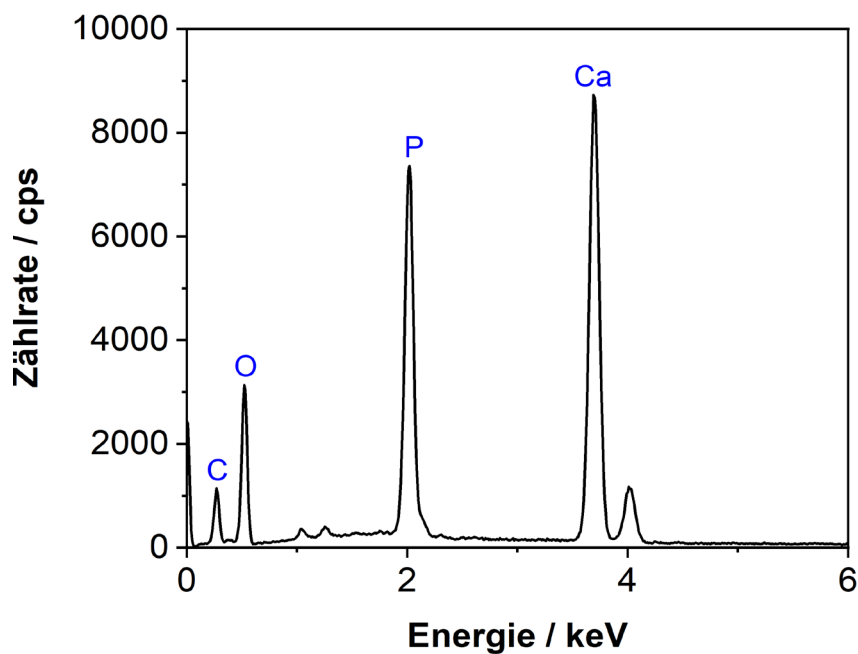


Abbildung 61: EDX-Spektrum der Knochenoberfläche ohne Säurebehandlung. cps = counts per second. [1]

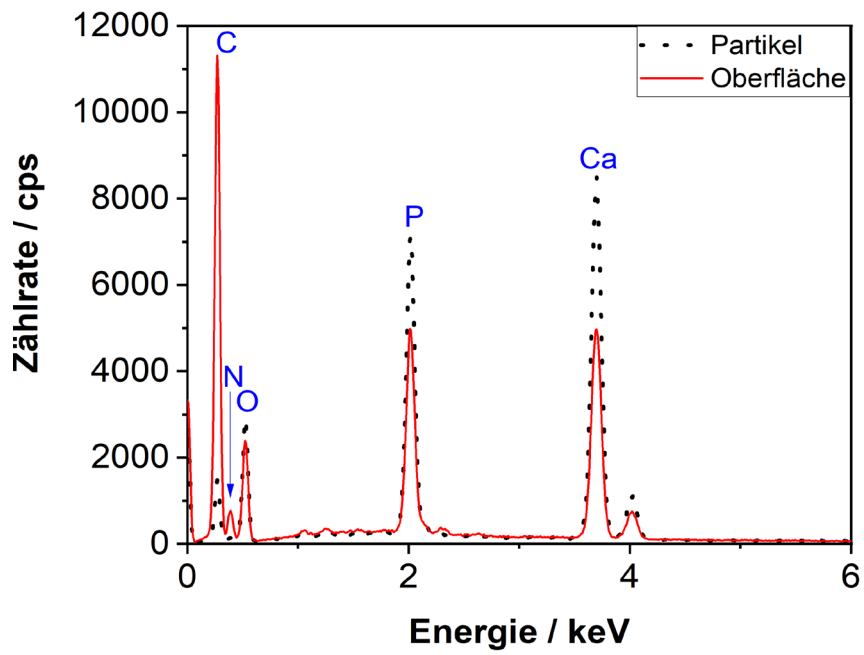


Abbildung 62: EDX-Spektrum der Knochenoberfläche mit Säurebehandlung (rote Linie) und der Partikel auf der Oberfläche (schwarze Punkte). cps = *counts per second*. [1]

Versicherung an Eides Statt¹

Ich, Vanessa Lührs, [REDACTED].

versichere an Eides Statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus Veröffentlichungen entnommen habe, als solche kenntlich gemacht habe, mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient habe.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorgenannten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und dass die Angaben der Wahrheit entsprechen und ich nichts verschwiegen habe.

Die Strafbarkeit einer falschen eidesstattlichen Versicherung ist mir bekannt, namentlich die Strafandrohung gemäß § 156 StGB bis zu drei Jahren Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei vorsätzlicher Begehung der Tat bzw. gemäß § 161 Abs. 1 StGB bis zu einem Jahr Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei fahrlässiger Begehung.

Ort, Datum

Unterschrift

¹Entnommen aus der Promotionsordnung der Universität Bremen, Fachbereich 2 (Biologie/Chemie), vom 14.11.2018.

Erklärungen zur elektronischen Version und zur Überprüfung einer Dissertation

Hiermit bestätige ich gemäß §7, Abs. 7, Punkt 4, dass die zu Prüfungszwecken beigelegte elektronische Version meiner Dissertation identisch ist mit der abgegebenen gedruckten Version.

Ich bin mit der Überprüfung meiner Dissertation gemäß §6, Abs. 2, Punkt 5 mit qualifizierter Software im Rahmen der Untersuchung von Plagiatsvorwürfen einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

Überarbeitung der Dissertation nach bestandenem Kolloquium am 09.02.2024

Nach Absprache mit den beiden Verlagen wurden der Dissertation im Kapitel „Publikationen im Rahmen der Dissertation“ folgende Textpassagen hinzugefügt:

1. Ergänzung auf Seite III:

Der Publikation entnommene Inhalte, Abbildungen und Tabellen dürfen gemäß der Elsevier Vorgaben zum Urheberrecht unter Angabe der vollständigen Quelle verwendet werden.

Reproduced from „Lührs, V., Stößlein, S., Thiel, K., Grunwald, I., & Hartwig, A. (2021). An in vitro bone-to-bone adhesion test method using the compression shear test. International Journal of Adhesion and Adhesives, 111, 102977. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2021.102977>“ with permission from Elsevier.

2. Ergänzung auf Seite IV:

Der Publikation entnommene Inhalte dürfen gemäß den Vorgaben der Royal Society of Chemistry zum Urheberrecht unter Angabe der DOI verwendet werden.

Reproduced from „<https://doi.org/10.1039/D2MA01050J>“ with permission from the Royal Society of Chemistry.