

Kompositmaterialien und ionische Agarosederivate zur verzögerten Wirkstofffreisetzung für die Knochenregeneration



FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Markus Witzler, M.Sc.
geboren am 18.06.1991 in Bonn-Bad Godesberg

Gutachter:

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Thomas Heinze | Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| Name | Ort |
| 2. Prof. Dr. Margit Schulze | Hochschule Bonn-Rhein-Sieg |
| Name | Ort |

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15. Februar 2023

Für meine Großeltern

„Curiosity is the essence of the scientific mind.“

Calvin and Hobbes, Bill Waterson, 1993

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Allgemeiner Teil	2
2.1 Knochengewebe und -ersatzmaterialien	3
2.1.1 Zusammensetzung, Aufbau und Metabolismus	3
2.1.2 Osteogene Differenzierung und Einfluss purinerger Rezeptoren	5
2.1.3 Knochenersatzmaterialien	6
2.2 Agarose	12
2.3 Modifizierung von Agarose	14
2.4 Wirkstofffreisetzung und kinetische Modelle	19
2.4.1 Mechanismen der Wirkstofffreisetzung	19
2.4.2 Möglichkeiten der Wirkstofffreisetzung	20
2.4.3 Modelle zur kinetischen Beschreibung von Freisetzungskurven	22
3 Spezieller Teil	26
3.1 Synthese ionischer Agarosederivate	27
3.1.1 Synthese und Charakterisierung von Agarosesulfat	27
3.1.2 Synthese und Charakterisierung von Agarosephenylcarbonat	31
3.1.3 Synthese und Charakterisierung von Agarosecarbamat	34
3.2 Trägermaterialien und beschichtete Alginatmikrokapseln	39
3.2.1 Herstellung und Charakterisierung von Trägermaterialien auf Agarosebasis	39
3.2.2 Herstellung und Charakterisierung der polyelektrolyt-beschichteten Alginatmikrokapseln	44
3.2.3 Kombination von Trägermaterial und beschichteten Mikrokapseln	47
3.3 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung	48
3.3.1 Entwicklung des „ <i>One-Stage</i> “- und „ <i>Two-Stage</i> “-Modells	48
3.3.2 Freisetzung von ATP	50
3.3.3 Freisetzung von Suramin	57
3.3.4 Freisetzung von Methylenblau	64
3.3.5 Freisetzung von A740003	70
3.3.6 Vergleich der Freisetzungsversuche	76

4 Experimenteller Teil	77
4.1 Materialien	78
4.2 Messmethoden	78
4.3 Synthesen	83
4.3.1 Synthese von Agarosesulfat (AGS01-AGS05)	83
4.3.2 Synthese von Agarosephenylcarbonat (APC01-APC05)	83
4.3.3 Synthese von (3-Aminopropyl)trimethylammoniumiodid (TMAPA)	84
4.3.4 Synthese von Agarosecarbamat (ACA01-ACA07)	84
4.4 Hydrogele und Kompositgele	85
4.4.1 Agarosegele	85
4.4.2 Kompositgele	85
4.4.3 Alginatmikrokapseln	86
4.4.4 Wirkstoffbeladung und Verkapselungseffizienz	87
4.5 Wirkstofffreisetzung und Kinetik	88
4.5.1 Freisetzungsversuche	88
4.5.2 Kinetikmodelle	89
5 Zusammenfassung und Ausblick	90
Literaturverzeichnis	92
Danksagung	110
Lebenslauf	111
Publikationsliste	112
Selbstständigkeitserklärung	114
Anhang	115

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer hierarchischer Knochenaufbau	4
2.2	Strukturformeln verschiedener Polysaccharide	9
2.3	Struktur und Gelierung von Alginat	10
2.4	Strukturformel von Agarose.	12
2.5	Reaktionsschema: TEMPO-Oxidation	14
2.6	Möglichkeiten der Oxyalkylierung von Agarose	16
2.7	Möglichkeiten der Veresterung und Carbamatbildung von Agarose	17
2.8	Kategorisierung diffusionsbasierter Freisetzungssysteme	21
3.1	Reaktionsschema der Synthese von Agarosesulfat	27
3.2	FT-IR Spektrum von Agarosesulfat	29
3.3	¹³ C-NMR-Spektren von Agarosesulfat	30
3.4	Reaktionsschema der Synthese von Agarosephenylcarbonat	31
3.5	¹³ C-NMR-Spektrum von Agarosephenylcarbonat	32
3.6	Vergleich der ¹³ C-NMR-Spektren von Agarosephenylcarbonaten	33
3.7	¹³ C- und ¹ H-NMR-Spektren von DMAPA und TMAPA	34
3.8	Reaktionsschema der Synthese von Agarosecarbamat	35
3.9	FT-IR Spektrum von Agarosephenylcarbonat und Agarosecarbamat	36
3.10	¹³ C-NMR-Spektren von Agarosecarbamat	37
3.11	Fotografie der (Komposit-)Gele vor und nach der Trocknung	39
3.12	Röntgendiffraktogramme der Trägermaterialien	40
3.13	Infrarotspektren der Trägermaterialien	41
3.14	REM-Aufnahmen verschiedener Trägermaterialien	43
3.15	Biokompatibilität der Trägermaterialien	44
3.16	Größenverteilung der Mikrokapseln	45
3.17	Digitalmikroskopaufnahmen der Mikrokapseln	45
3.18	Oberflächenladung der beschichteten Mikrokapseln	46
3.19	Verkapselungseffizienz der Mikrokapselsysteme	46
3.20	μ-CT-Rekonstruktion von in Trägermaterial eingebetteten Mikrokapseln	47
3.21	Freisetzung von ATP	50
3.22	Kurvenanpassung an die Freisetzungsdaten ATP	53
3.23	Freisetzung von Suramin	57
3.24	Kurvenanpassung an die Freisetzungsdaten Suramin	61
3.25	Freisetzung von Methylenblau	64
3.26	Kurvenanpassung an die Freisetzungsdaten Methylenblau	67
3.27	Freisetzung von A740003	70

3.28	Kurvenanpassung an die Freisetzungdaten A740003	73
4.1	Schema der polyelektrolytischen Beschichtung	86
4.2	Strukturformeln der Modellsustanzen	87
A.1	Schema der coaxialen Verkapselungsapparatur	115

Tabellenverzeichnis

3.1	Reaktionsbedingungen und Syntheseresultate Agarosesulfate	28
3.2	Reaktionsbedingungen und Syntheseresultate Agarosephenylcarbonate	31
3.3	Reaktionsbedingungen und Syntheseresultate Agarosecarbamate	36
3.4	Ergebnisse der Porositätsmessungen	42
3.5	Anpassungswerte KP- und PS-Modell für ATP	51
3.6	Anpassungswerte FO-, WB-, OSL- und TSL-Modell für ATP	52
3.7	AICc der verschiedenen Anpassungsmodelle für ATP	55
3.8	Anpassungswerte KP- und PS-Modell für ATP	58
3.9	Anpassungswerte FO-, WB-, OSL- und TSL-Modell für ATP	59
3.10	AICc der verschiedenen Anpassungsmodelle für Suramin	62
3.11	Anpassungswerte KP- und PS-Modell für ATP	65
3.12	Anpassungswerte FO-, WB-, OSL- und TSL-Modell für ATP	66
3.13	AICc der verschiedenen Anpassungsmodelle für Methylenblau	68
3.14	Anpassungswerte KP- und PS-Modell für ATP	71
3.15	Anpassungswerte FO-, WB-, OSL- und TSL-Modell für ATP	72
3.16	AICc der verschiedenen Anpassungsmodelle für A740003	74
4.1	Übersicht molare Massen	80
4.2	Zusammensetzung Kompositgele	86
4.3	Verkapselungseffizienzen der Wirkstoffe in nativen und beschichteten Alginat- mikrokapseln	88

Abkürzungsverzeichnis

A74	A740003, Antagonist für den P2X ₇ -Rezeptor, chemisch: <i>N</i> -[1-[[[(Cyanoamino)(5-chinolinylamino)methylen]amino]-2,2-dimethylpropyl]-3,4-dimethoxybenzenacetamid
ACA	Agarosecarbammat
AGE	Agarosewiederholeinheit
AGS	Agarosesulfat
AIC	AKAIKE'S <i>Information Criterion</i>
AIC _c	<i>corrected AKAIKE'S Information Criterion</i>
APC	Agarosephenylcarbonat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BET	Gasadsorption nach Brunauer, Emmett und Teller
β-TCP	β-Tricalciumphosphat
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i>
[BMIM]Cl	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid
CA	Carbammat
CDI	Carbonyldiimidazol
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMAPA	3-(Dimethylamino)propylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	durchschnittlicher Substitutionsgrad (<i>degree of substitution</i>)
EA	Elementaranalyse
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FO	Modell Erster Ordnung (<i>First-Order-Modell</i>)
FT-IR	Fourier-Transform Infrarotspektroskopie
HA	Hydroxyapatit (Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH)
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen (<i>human mesenchymal stem cells</i>)

KP	KORSMEYER-PEPPAS-Modell
MeB	Methylenblau
μ -CT	mikro-Computertomografie (<i>micro computed tomography</i>)
MSC	mesenchymale Stammzellen (<i>mesenchymal stem cells</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	Ausschlussgrenze der Dialysemembran (<i>molecular weight cut-off</i>)
NMR	Magnetkernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
OSL	einphasiges langmuir-basiertes Freisetzungsmodell („ <i>One-Stage</i> “-Modell)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phenylcarbonat
PCL	Poly- ϵ -caprolacton
PGA	Polyglycolid
PLA	Polylactid (<i>poly(lactic acid)</i>)
PLGA	Polylactid-co-glycolid (<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	PEPPAS-SAHLIN-Modell
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RSS	Reststandardabweichung der Kurvenanpassung (<i>residual sum of squares</i>)
RT	Raumtemperatur
SLS	statische Lichtstreuung (<i>static light scattering</i>)
SUR	Suramin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy-Radikal
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TMAPA	(3-Aminopropyl)trimethylammoniumiodid
TSL	zweiphasiges langmuir-basiertes Freisetzungsmodell („ <i>Two-Stage</i> “-Modell)
WB	WEIBULL-Modell
XRD	Röntgendiffraktometrie (<i>X-ray diffraction</i>)

1

Einleitung und Zielsetzung

In der regenerativen Medizin und speziell bei der Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien geht der Trend zu funktionalen Werkstoffsystemen, welche über den einfachen Ersatz des Defekts hinaus gehen.[1] Dabei liegt der Fokus auf Verbundmaterialien mit maßgeschneiderten Einzelkomponenten, um Eigenschaften wie Biokompatibilität, Zellbesiedelung, Resorbierbarkeit oder die Wirkstofffreisetzung zu optimieren.[2] Dadurch können etwa Entzündungshemmer, Antibiotika oder andere Substanzen, welche den Heilungsprozess unterstützen, direkt an Ort und Stelle des Defekts freigesetzt werden und somit schneller und gezielter wirken. Eine der aktuellen Herausforderungen liegt unter anderem darin, die oft leicht wasserlöslichen Wirkstoffe über einen längeren Zeitraum von drei oder mehr Tagen kontrolliert bzw. verzögert freizusetzen.[3] Bei den Trägermaterialien spielen Composite, die dem natürlichen Knochen ähneln, eine immer größere Rolle.[1] So werden Calciumphosphate, die sich auch in natürlichem Knochen finden, als mineralische Matrix eingesetzt und verschiedene Polymere übernehmen die Funktion des Kollagens im Knochen. Immer häufiger werden dabei auch Biopolymere wie Proteine und Polysaccharide eingesetzt, welche deutlich biokompatibler und als nachwachsende Rohstoffe auch nachhaltiger als synthetische Polymere sind. Unter den Polysacchariden, die im Bereich der Knochen- und Geweberegeneration eingesetzt werden, finden sich insbesondere Alginat, Chitosan und Agarose, welche durch physikalische oder elektrostatische Wechselwirkungen stabile Hydrogele bilden können.[4, 5] Um die Funktionalität der gebildenden Polysaccharide zu erhöhen oder an bestimmte Bedürfnisse anzupassen, können diese über ihre Hydroxyl-, Carboxyl- oder Aminogruppen chemisch modifiziert werden. Viele dieser Synthesewege sind insbesondere für Cellulose und Stärke sehr gut erforscht, für viele andere Polysaccharide (darunter auch Agarose) allerdings bislang deutlich weniger untersucht.[6]

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Synthese anionischer und kationischer Agarosederivate. Dazu sollten Synthesewege, die für andere Polysaccharide bekannt sind, entsprechend für Agarose adaptiert werden. Zum anderen sollten neuartige Kompositmaterialien auf Basis von Hydroxyapatit und Agarose, bzw. den chemisch modifizierten Agarosederivaten hergestellt und charakterisiert werden. Zuletzt sollte die Einlagerung und Freisetzung von vier Modellwirkstoffen aus den Verbundmaterialien umfassend untersucht werden, mit dem Ziel die Freisetzung auf über sieben Tage zu verzögern und zudem die Freisetzungprofile mit kinetischen Modellen zu bewerten. Neben den Kompositträgern mit direkter Wirkstoffeinlagerung sollten hierbei auch polyelektrolytbeschichtete Alginatmikrokapseln als Freisetzungssysteme entwickelt und untersucht werden.

2

Allgemeiner Teil

2.1 Knochengewebe und -ersatzmaterialien

Dieses Kapitel liefert einen Überblick über die Zusammensetzung von Knochengewebe, eine kurze Einleitung in die wichtigsten biologischen Prozesse bei Ab- und Aufbau von Knochen im Körper sowie einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung zum Thema Knochenersatzmaterialien. Dazu werden kurz die drei wichtigsten Materialklassen beleuchtet und anschließend der Fokus auf Polysaccharide als Trägermaterial gelegt.

2.1.1 Zusammensetzung, Aufbau und Metabolismus

Das menschliche Knochengewebe macht etwa 3–5 % des Körpergewichts aus und ist für Fortbewegung und Stabilität sowie für den Schutz der inneren Organe von entscheidender Bedeutung. Knochen ist ein natürliches, poröses Kompositmaterial, welches zu etwa 65 % aus anorganischem Calciumphosphat (hauptsächlich Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, (HA)), zu etwa 25 % organischer Matrix (Kollagen Typ I) und etwa 10 % Wasser besteht.[7–9] Die Kollagenfibrillen bilden die Grundstruktur des Knochens und sorgen für eine gewisse Elastizität und Stabilität gegen axiale Belastung, insbesondere Druck oder Kompression. Das Mineral Hydroxyapatit hingegen sorgt für die hohe Festigkeit des Knochens.[10]

Kollagen Typ I ist eines der häufigsten Proteine im menschlichen Körper und besteht aus mehreren hundert Aminosäuren in der Sequenz G-X-Y.[11] Dabei ist in der Abfolge jede dritte Aminosäure Glycin (G), was zur Folge hat, dass sich in der Sekundärstruktur des Proteins eine sehr eng gewickelte α -Helix ausbildet. Weitere sehr häufige Aminosäuren sind Prolin (oft an X) und Hydroxyprolin (oft an Y), die durch ihre Struktur die Helixbildung begünstigen und stabilisieren. Je drei dieser α -Helices bilden eine Tripelhelix als Tertiärstruktur, die auch Tropokollagen genannt wird. Diese etwa 1–2 nm dicken Helices arrangieren sich nebeneinander zu Fibrillen mit Durchmessern von etwa 200–500 nm. Besonders ist dabei, dass sie sich um 67 nm versetzt zueinander anordnen, wodurch Lücken, bzw. Überlappungen entstehen.[12–14] Im Knochen liegen diese Fibrillen mineralisiert vor, was bedeutet, dass entlang der Längsachse und zwischen den Fibrillen längliche, etwa 2–4 nm dicke Hydroxyapatit-Nanokristalle eingebaut sind.[12, 13, 15] Die mineralisierten Fibrillen bilden wiederum größere Faserbündel, welche in lamellaren Arrays in der Größenordnung von 10–50 μm arrangiert sind und den Lamellenknochen bilden. Diese Arrays bilden in weiteren Überstrukturen den makroskopischen Knochen.[14] Dieser hierarchische Knochenaufbau ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Allerdings ist das makroskopische Knochengewebe nicht einheitlich aufgebaut: außen sitzt die Kortikalis (auch Kompakta), eine harte und sehr dichte Knochenschicht welche für mechanische Festigkeit sorgt und die innere Spongiosa schützt. Die Kortikalis besteht aus Osteonen, einer zylindrischen Struktur, bei der die Lamellenknochen ringförmig um einen Gefäßkanal angeordnet sind. Die Spongiosa hingegen besteht aus feinen, gefäßlosen Knochenbalken (Trabekel), welche ein enges, schwammartiges und sehr poröses Gerüst bilden. Diese Leichtbauweise spart Gewicht bei hoher mechanischer Stabilität, ermöglicht schnelle Anpassungen an veränderte Belastungen und bietet Platz für Knochenmark und Blutgefäße.[7]

Knochengewebe durchläuft einen permanenten Ab- und Aufbau durch die Knochenzellen. Das ist wichtig, da der Körper so auf veränderte mechanische Anforderungen, Änderungen im Calciumhaushalt oder Mikrofrakturen reagieren kann. Auch größere Defekte oder Frakturen

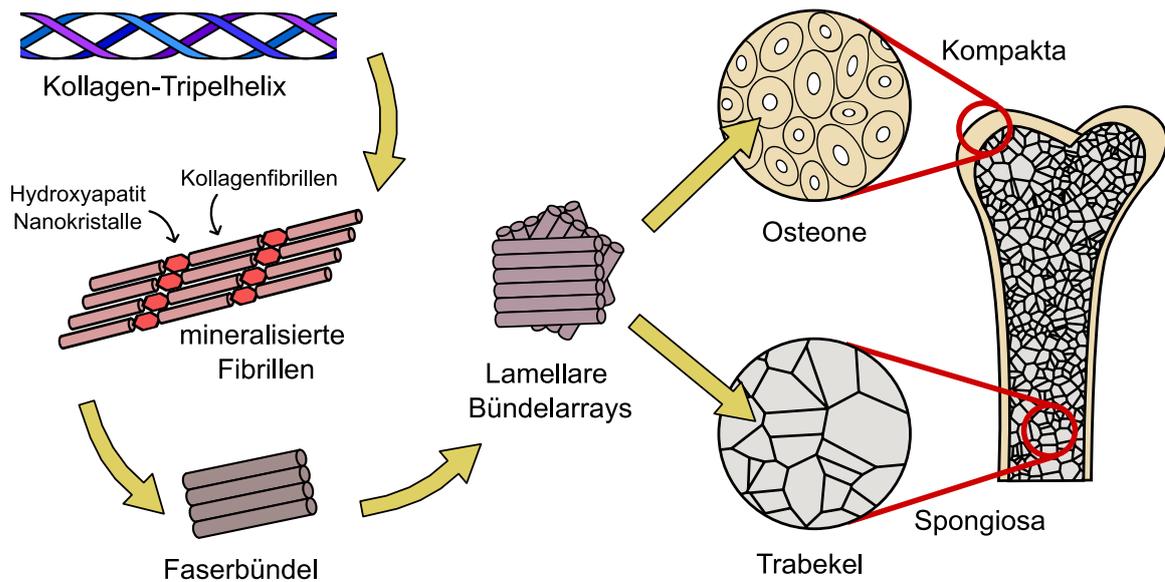


Abbildung 2.1: Schematischer hierarchischer Knochenaufbau. Kollagentripelhelices bilden Fibrillen, welche mit Hydroxyapatit mineralisiert sind. Diese bilden Faserbündel, die lamellare Arrays bilden. Diese bilden die Mikrostruktur des Lamellenknochens aus dem sowohl die zylindrischen Osteone der Kompakta als auch die Trabekel der Spongiosa bestehen. Eigene Darstellung nach [14] und [16].

können auf diese Weise geheilt werden. Der Knochenmetabolismus wird durch das Gleichgewicht der Aktivität zwischen knochenresorbierenden Zellen (Osteoklasten) und knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) bestimmt und durchläuft mehrere Phasen.[17, 18] Zunächst bilden sich Osteoklasten, die den Knochen resorbieren, indem sie lokal den pH-Wert senken um Hydroxyapatit aufzulösen und Enzyme wie Cathepsin K absondern, wodurch die Kollagenmatrix abgebaut wird.[19] Danach folgt eine Umkehrphase (engl. *reversal phase*), in der die Oberfläche für den anschließenden Knochenaufbau durch die Osteoblasten vorbereitet wird. Diese bilden dann unmineralisiertes Kollagen, Glycoproteine und diverse Wachstumsfaktoren und Enzyme. Das Enzym Alkalische Phosphatase, das ebenfalls von Osteoblasten abgegeben wird, sorgt schließlich für die Mineralisierung der Kollagenmatrix durch Calciumphosphat.[17, 20] Bei Frakturen oder Defekten läuft der Prozess ein wenig anders ab. Zunächst tritt eine Entzündungsreaktion mit Hämatombildung auf, bei der diverse Immunantworten auftreten und Wachstums- und Botenstoffe ausgesendet werden, um die Knochen- und Gefäßneubildung zu induzieren. Mesenchymale Stammzellen (MSC) werden zur Defektstelle gelockt und differenzieren dort zunächst in Chondrozyten, die eine knorpelähnliche Matrix bilden und so ein Grundgerüst sowohl für die Knochenbildung als auch für die Gefäßbildung aufbauen. Anschließend beginnen die Osteoblasten, die ebenfalls aus MSC differenzieren, mit dem Aufbau von primärem, ungeordnetem Geflechtknochen durch Kollagenbildung und anschließender Mineralisierung. Zum Abschluss der Knochenheilung wird der Geflechtknochen im Zuge des Knochenmetabolismus in stabilen Lamellenknochen umgewandelt.

Die Knochenbildung ist ein komplexer Prozess, der viele verschiedene Zelltypen und zahlreiche Signal- und Botenstoffe sowie Wachstumsfaktoren beinhaltet. An dieser Stelle soll lediglich noch auf die osteogene Differenzierung, also die Bildung von Osteoblasten aus

mesenchymalen Stammzellen, eingegangen werden, da diese für die Aufgabenstellung und Thematik dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung ist.

2.1.2 Osteogene Differenzierung und Einfluss purinerger Rezeptoren

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente Stammzellen, die sich zwar noch in verschiedene Zellen weiterentwickeln können, dabei aber im Gegensatz zu pluripotenten Stammzellen (wie embryonale Stammzellen) auf einige wenige Zelltypen festgelegt sind. So können sich MSC grundsätzlich noch in Knochen-, Knorpel-, Fett-, Endothel- und Muskelzellen weiterentwickeln, wobei nicht allen MSC alle Wege offenstehen. Die Differenzierungsmöglichkeiten unterscheiden sich je nach Herkunft der MSC: aus Fettgewebe gewonnene MSC können bis auf Knorpelzellen (Chondrozyten) alle genannten Zelltypen bilden, während MSC aus Knochenmark in Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten (Fettgewebe) differenzieren können. MSC aus Weisheitszähnen differenzieren fast ausschließlich zu Osteoblasten.[21] Die Stammzellendifferenzierung wird unter anderem durch verschiedene purinerge Rezeptoren gesteuert. Diese lassen sich abhängig von den ansprechenden Liganden grob in vier Klassen einteilen (P0, P1, P2Y und P2X). Die drei erstgenannten sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden von Adenin (P0), Adenosin (P1) oder Adenosindiphosphat (P2Y) aktiviert. Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um Ionenkanäle, die von Adenosintriphosphat (ATP) aktiviert werden. Die P1-Rezeptoren spielen eine große Rolle im Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, während die P2X- und P2Y-Rezeptoren direkt die Differenzierung der MSC beeinflussen. Je nach Differenzierungsweg wird im Laufe der Differenzierung die Aktivität verschiedener Rezeptoren hoch- oder runterreguliert. Bei Kenntnis der involvierten Rezeptoren kann so durch gezielte *in vitro* Zugabe eines entsprechenden Agonisten oder Antagonisten die Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp gesteuert werden.[22] Insbesondere die Rezeptoren P2X₅, P2X₆, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₁₄ sind als relevante purinerge Rezeptoren für die Osteogenese identifiziert worden. Zudem gibt es eine Fülle an Liganden für diese Rezeptoren, welche als Agonisten oder Antagonisten für den jeweiligen Rezeptor einsetzbar sind.[23, 24] Diese sind oft strukturverwandt zu ATP. Auch ATP selbst gehört selbstverständlich zu den Liganden, ist aber sehr unspezifisch, da es beispielsweise alle P2X-Rezeptoren aktiviert. Die meisten der P2-Rezeptoren sind nicht über den gesamten Zeitraum der Differenzierung gleichmäßig aktiv,[25] sondern steuern nur einzelne Phasen der Zelldifferenzierung von MSC über Vorläuferzellen und Präosteoblasten bis hin zu Osteoblasten. Als Beispiele seien hier P2X₇ und P2Y₁ genannt, welche beide vor allem im späten Stadium der Differenzierung die Bildung von Osteoblasten aus Präosteoblasten beeinflussen.[22, 26] So begünstigt die Herabregulierung der Rezeptoren durch Zugabe eines P2X₇-Antagonisten und/oder die Zugabe eines P2Y₁-Antagonisten bei der Differenzierung von MSC aus Fettgewebe die Entwicklung der Präosteoblasten zu Osteoblasten. Dieser Schritt erfolgt erst spät in der osteogenen Differenzierung, weswegen vor allem in Kombination mit einem Trägermaterial eine langsame und langfristige Abgabe des Liganden nötig ist.[22]

2.1.3 Knochenersatzmaterialien

Problematisch in der Knochenheilung sind Defekte mit kritischer Größe (etwa > 3 cm), welche nicht mehr selbstständig durch die körpereigenen Prozesse heilen können und daher den Einsatz von Implantaten und Trägermaterialien benötigen.[16] Diese Defekte können durch schwere Unfälle aber auch durch Entnahme von Gewebe beispielsweise bei Krebserkrankungen entstehen. Solche Implantate und Trägermaterialien (und ggfs. ihre Abbauprodukte) müssen biokompatibel und nicht toxisch sein und sollten im Idealfall den echten Knochen bestmöglichst nachbilden.[1] Dies bezieht sich sowohl auf die chemische und physikalische Struktur aber auch auf mechanische Eigenschaften, die gegebenenfalls der Defektstelle angepasst werden müssen. Besonders geeignet sind sogenannte „Autografts“: Implantate, die vom Patienten selbst entnommen werden können. Sie haben die geringsten negativen Effekte, sind aber nur in sehr seltenen Fällen verfügbar. Schon deutlich höhere Wahrscheinlichkeiten auf Abstoßungsreaktionen oder Unverträglichkeiten bieten „Allografts“ und „Xenografts“, Implantate von anderen Spendern oder gar tierischen Ursprungs. Neben den möglichen Unverträglichkeiten sind aber auch bei diesen die sehr geringe Verfügbarkeit und die schlechte Anpassung an die Defektstelle starke limitierende Faktoren. Dies ist der Grund, weswegen in der modernen Regenerationsforschung das Hauptaugenmerk auf künstlichen Implantaten und Trägermaterialien liegt, die im Bestfall individuell an den Patienten angepasst werden können. Hinzu kommen weitere technische Möglichkeiten wie die Beladung des Materials mit entzündungshemmenden Wirkstoffen oder Wachstumsfaktoren oder zellbesiedelte Implantate. So haben sich in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Materialklassen etabliert: das klassische Metallimplantat, Trägermaterialien auf Keramik- oder Polymerbasis oder ein Kompositmaterial, welches die Eigenschaften der einzelnen Materialien kombiniert.

Im Bereich der Metallimplantate liegt der Fokus auf leichten und festen Materialien wie Titan, Titanlegierungen oder medizinischem, rostfreiem Stahl. Sie sind medizinisch sicher, zugelassen, bioinert und bieten eine hohe Langlebigkeit bei gleichzeitig sehr guten mechanischen Eigenschaften.[27] Allerdings ähneln sie der Knochenstruktur praktisch gar nicht und durch die bioinerte Oberfläche kann es zu Verzögerungen im Heilungsprozess kommen. Außerdem wird durch die fehlende Resorption im Körper meist eine zweite Operation zur Entnahme der Implantate benötigt, was ein zusätzliches Infektionsrisiko darstellt. Metallimplantate kommen meist bei sehr großen Defekten wie beispielsweise im Oberschenkelknochen, auf größeren Flächen oder zum Stützen und Verschrauben zum Einsatz.[28] Eine Möglichkeit, die Heilung zu beschleunigen, ist die Beschichtung mit Hydroxyapatit, welches für eine verbesserte Zelladhäsion und damit besserer Verwachsung des Implantats sorgt.[29]

Biokeramiken sind ebenfalls Bestandteil aktueller Forschung. Durch die natürliche Zusammensetzung des Knochen liegt es nahe, Biokeramiken wie diverse Calciumphosphate oder Bioglas als Trägermaterialien einzusetzen. Calciumphosphate unterstützen die Zellanhaftung, Knochenbildung und die osteogene Differenzierung, sind allerdings sehr spröde.[2] Bioaktive Gläser auf Basis von Phosphaten, Silikaten und Boraten unterstützen ebenfalls die Zellanhaftung und Knochenbildung, in dem sie die Bildung von Hydroxyapatit auf der Oberfläche und Bindungen zu Kollagen fördern. Der Abbau der Trägermaterialien im Körper selbst fördert zudem die osteogene Differenzierung. Ein Nachteil von bioaktiven Gläsern ist der sehr langsame Abbau, mögliche hohe Siliziumspiegel im Blut und die Sprödigkeit des Materials.[27, 30] Bei

den Calciumphosphaten spielen vor allem Hydroxyapatit, β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und biphasisches Calciumphosphat eine große Rolle. Ersteres entspricht dem mineralischen Anteil im natürlichen Knochen und hat somit eine exzellente Bioverträglichkeit.[31] Allerdings baut es sich nur sehr langsam im Körper ab, weswegen oft das leichter abbaubare β -TCP verwendet oder zumindest beigemischt wird (biphasisches Calciumphosphat). Die Calciumphosphate unterscheiden sich in ihrer chemischen Zusammensetzung und lassen sich durch das stöchiometrische Verhältnis von Calcium zu Phosphor klassifizieren. Hydroxyapatit hat mit einem Ca/P -Verhältnis von 1,67 den höchsten Wert, β -TCP liegt bei 1,50 und biphasisches Calciumphosphat dazwischen. Durch die Wahl der Stöchiometrie lassen sich die verschiedenen Calciumphosphate gezielt herstellen. Weitere Calciumphosphate, die in verschiedenen Studien verwendet werden, sind Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca/P} = 1,00$), Whitlockit ($\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$, $\text{Ca/P} = 1,29$) und Calcium-defizienter Hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $\text{Ca/P} < 1,67$)

Gerade auf Basis von Calciumphosphaten gibt es einige kommerzielle Produkte, welche bereits in der Knochenregeneration eingesetzt werden.[32] Darüber hinaus werden im Forschungsbereich oft weitere Ionen wie Magnesium, Strontium, Silikate oder Carbonat hinzudotiert, welche auch in natürlichem Knochen zu finden sind.[1, 33–36] Die Integration dieser Ionen führt zu einer verbesserten Zellviabilität, besserer Zellanhaftung und besserer Vaskularisierung des Trägermaterials. Besonders oft werden die Biokeramiken allerdings als Komposite in Verbindung mit polymeren Trägermaterialien erforscht, da so besondere Synergien zwischen den verschiedenen Materialien entstehen und genutzt werden können.

Trotz der immensen Auswahl an synthetischen und industriell verfügbaren Polymeren, haben sich nur einige wenige für die medizinische Anwendung etabliert. Als Faktoren spielen Biokompatibilität, Ungiftigkeit des Polymers aber auch seiner Abbauprodukte und das mögliche Anwendungsgebiet eine große Rolle. Sehr häufig werden Poly- ϵ -caprolacton (PCL), Polylactid (PLA), Polyglycolid (PGA) und Polylactid-*co*-glykolid (PLGA), Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polyurethane zur Herstellung von Trägermaterialien verwendet.[37] Für den direkten Einsatz als Implantat mit oder ohne Wirkstofffreisetzung werden häufig PLA, PGA und PLGA verwendet, da sie vom Körper via Esterhydrolyse nach Aufquellen gut resorbiert werden, kaum Immunreaktionen hervorrufen und im medizinischen Bereich bereits als resorbierbares Naht- und Implantatmaterial erprobt und zugelassen sind. Durch den Abbau im Körper können auch ins Material eingeschlossene Wirkstoffe kontrolliert abgegeben werden. Nachteile der drei Polymere sind die Hydrophobizität und die schwache Zellanhaftung am Polymer, sodass sie als Implantat oft als Komposit mit diversen Biokeramiken eingesetzt werden. Schwerer resorbierbar ist PCL, dafür bietet es im Vergleich zu den vorgenannten Polymeren bessere mechanische Eigenschaften und eignet sich eher für Langzeitimplantate. Auch bei PCL können Wirkstoffe in das Material integriert werden, die dann über längere Zeit freigesetzt werden. Polyurethane bieten sich durch ihre Beständigkeit grundsätzlich als langlebiges Implantatmaterial an,[38] allerdings besteht das Problem, dass sie aus toxischen Monomeren (Diisocyanate) bestehen. Die aktuelle Forschung arbeitet allerdings an Lösungen, um nichttoxische und definiert abbaubare Polyurethane herzustellen, welche dann für den Einsatz als Implantatmaterial geeignet wären. So können peptid-basierte Diisocyanate wie LDI (Lysin-diisocyanat) mit niedriger

Toxizität eingesetzt werden, während besser spaltbare Kettenbausteine auf Polyesterbasis die Resorbierbarkeit des Polyurethans erhöhen.[37, 39, 40]

Neben den bereits angesprochenen synthetischen Polymeren werden auch zahlreiche natürlich vorkommende Polymere verwendet. Diese lassen sich grob in Proteine und Polysaccharide unterteilen, letztere werden in einem eigenen Abschnitt separat behandelt. Unter den Proteinen ist sind vor allem Kollagen und Seidenprotein hervorzuheben. Kollagen ist, wie bereits in Kapitel 2.1.1 detailliert besprochen, natürlicher Bestandteil des Knochens und bildet dessen Grundgerüst. Insofern ist es naheliegend, dass auch Trägermaterialien auf Kollagenbasis untersucht werden. Allerdings kann es bei Kollagen aufgrund des tierischen Ursprungs zu Immunreaktionen kommen.[41, 42] Dennoch gibt es einige Studien, in denen Trägermaterialien auf Kollagenbasis untersucht wurden. Dabei zeigte sich eine gute Biokompatibilität, Anhaftung und Vaskularisierung des Trägermaterials.[43–45]

Seidenfibroin, eines der wichtigsten Seidenproteine, zeichnet sich ebenfalls durch seine hohe Biokompatibilität und guten Verarbeitungsmöglichkeiten aus. So lassen sich sehr elastische, hochporöse Hydrogele herstellen, welche gute Zellverträglichkeit *in vitro* und *in vivo* aufweisen. Zudem kann Fibroin im Körper abgebaut werden, weshalb es trotz knapper Verfügbarkeit und aufwendiger Extraktion aus Seidenkokons Bestandteil aktueller Forschung ist und bereits zur Wundversorgung eingesetzt wird.[46–50]

Als besondere Gruppe unter den Biopolymeren sind Polysaccharide hervorzuheben. Sie sind als nachwachsende Rohstoffe sehr gut verfügbar, bio- und zellkompatibel und oft im Körper abbaubar. Sie werden oft als Hydrogele oder Verkapselungsmaterial für Zellen oder Wirkstoffe eingesetzt.[2, 51, 52] Allerdings haben sie wie andere Polymersysteme oft schlechte mechanische Eigenschaften, wenn ein Einsatz als lasttragendes Implantat gewünscht ist. Die Polysaccharide werden entweder unmodifiziert eingesetzt oder in derivatisierter Form mit verbesserten Eigenschaften. Zudem können sie sowohl allein als auch in Verbindung mit anderen Polymeren oder als Komposit mit keramischen Materialien verwendet werden. Sehr häufig werden Alginat, Chitosan, Cellulose und Hyaluronsäure genutzt, aber auch Chondroitin-6-sulfat, Carrageene und Agarose finden Anwendung als Träger- oder Verkapselungsmaterial. Abbildung 2.2 zeigt eine Übersicht über die Struktur der genannten Polysaccharide, die im Folgenden näher in Bezug auf den Einsatz als Trägermaterial vorgestellt werden. Lediglich Agarose wird als Hauptthema und Ausgangsstoff für die Synthesen dieser Arbeit separat in Kapitel 2.2 thematisiert.

Alginat ist Dank der einfachen Vernetzung und Gelbildung durch bivalente Kationen eines der am häufigsten eingesetzten Polysaccharide, vor allem in Verkapselungsanwendungen. Alginat (Abbildung 2.3) ist ein natürliches Block-Copolymer, dessen Monomereinheiten aus (1 → 4) vernetzter β -D-Mannuronsäure (M) und α -L-Guluronsäure (G) bestehen.[53] Diese M- und G-Strukturen bilden unterschiedliche Blöcke aus, welche für die Gelierung von entscheidender Bedeutung sind. Während die MM-Blöcke aus mehreren M-Einheiten eine lineare Struktur besitzen, bilden die GG-Blöcke aus mehreren G-Einheiten eine Faltstruktur. MG-Blöcke in denen sich beide Einheiten abwechseln, liegen wieder linear bzw. helikal vor. Durch die Faltstruktur der GG-Blöcke entstehen bei Annäherung zweier Polymerketten „Taschen“, in denen sich bi- oder multivalente Kationen positionieren und so die Ketten fixieren können. Man spricht auch vom sogenannten „egg-box“-Modell, welches in Abbildung 2.3C schematisch

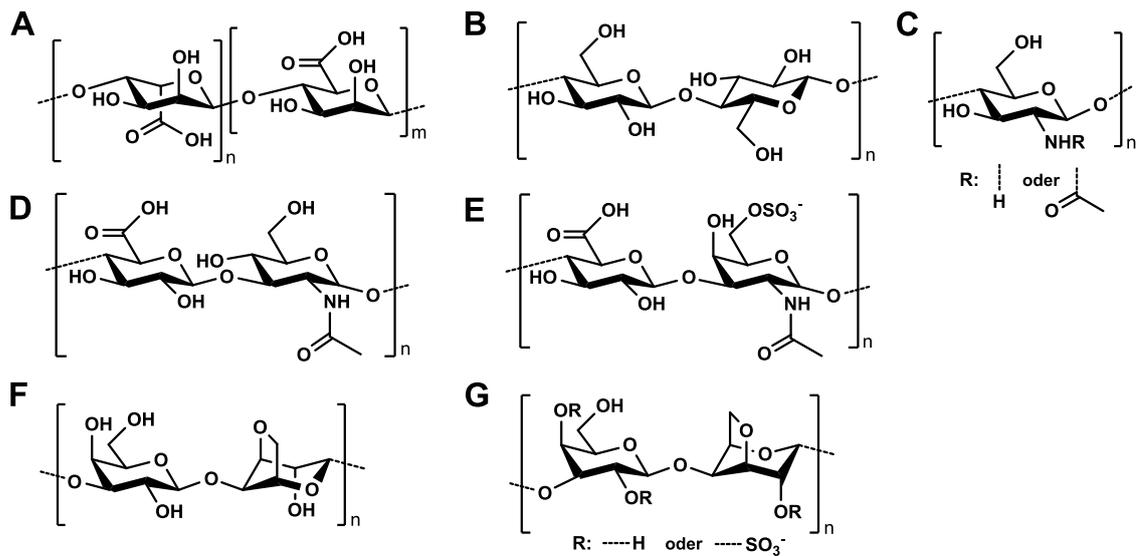


Abbildung 2.2: Strukturformeln der Wiederholeinheiten verschiedener Polysaccharide. A: Alginate (als Alginsäure), B: Cellulose, C: Chitosan, D: Hyaluronsäure, E: Chondroitin-6-sulfat, F: Agarose, G: Carrageene. Gestrichelte Bindungen symbolisieren Anschluss zu benachbarten Wiederholeinheiten oder den Rest R. Eigene Darstellung nach [52].

dargestellt ist. Das am häufigsten genutzte Kation ist Ca^{2+} , für spezielle Einsatzbereiche findet auch Sr^{2+} Anwendung. Die ionotrope Gelierung hängt von Temperatur, pH-Wert und Konzentration der Kationen aber auch von der Struktur des Alginats ab. Je höher das Verhältnis der G-Blöcke gegenüber den M-Blöcken und je mehr und längere G-Blöcke im Polymer vorhanden sind, desto leichter und schneller bildet sich das Hydrogel und desto fester und stabiler ist es.

Alginate wird im Bereich der medizinischen Forschung und der kontrollierten Wirkstofffreisetzung ausgiebig genutzt.[55, 56] So wird es vorrangig mit und ohne Freisetzungsfunktion in Wundauflagen als feuchtigkeitsspendende Schicht,[4] als Material in diversen 3D-Druck-Prozessen zur Herstellung komplexerer Hydrogelgeometrien und als injizierbare Hydrogele[54] sowie als Mikro- oder Nanokapseln zur gezielten und kontrollierten Wirkstofffreisetzung genutzt.[57, 58] Letztere können über Emulsionstechniken, Extrusion oder Sprüh- und Eintropfverfahren hergestellt werden. Ebenso ist die anschließende Beschichtung der Alginatkapseln mit Polyelektrolyten oder hydrophoberen Polymeren zur Verzögerung der Freisetzung sehr gängig.[59] Außerdem wird Alginate zur Verkapselung von Zellen genutzt, um diese beispielsweise in Trägersysteme einzubringen. Darüber hinaus wird Alginate in Verbindung mit anderen (Bio-)Polymeren und Biokeramiken oder in modifizierter Form genutzt, um an die jeweilige Fragestellung angepasste Hydrogelssysteme zu erhalten.

Carrageene, welche ebenfalls aus Algen gewonnen werden, sind sulfatierte Polysaccharide, welche ähnlich zu Alginate ein ionotropisches Gelierungsverhalten aufweisen. Die Wiederholeinheit der Carrageene (Abb. 2.2G) besteht aus $(1 \rightarrow 3)$ -verknüpfter β -D-Galactose (G) und $(1 \rightarrow 4)$ -verknüpfter 3,6-Anhydro- α -D-galactose (A).[60] Je nach Position der Sulfatgruppe unterscheidet man zwischen den beiden am häufigsten verwendeten κ -Carrageen (G4) und ι -Carrageen (G4 und A2). Neben diesen beiden gibt es noch weitere Carrageene mit unterschiedlicher Anzahl und Position der Sulfatgruppen. Zudem existieren die jeweiligen Varianten, bei denen keine

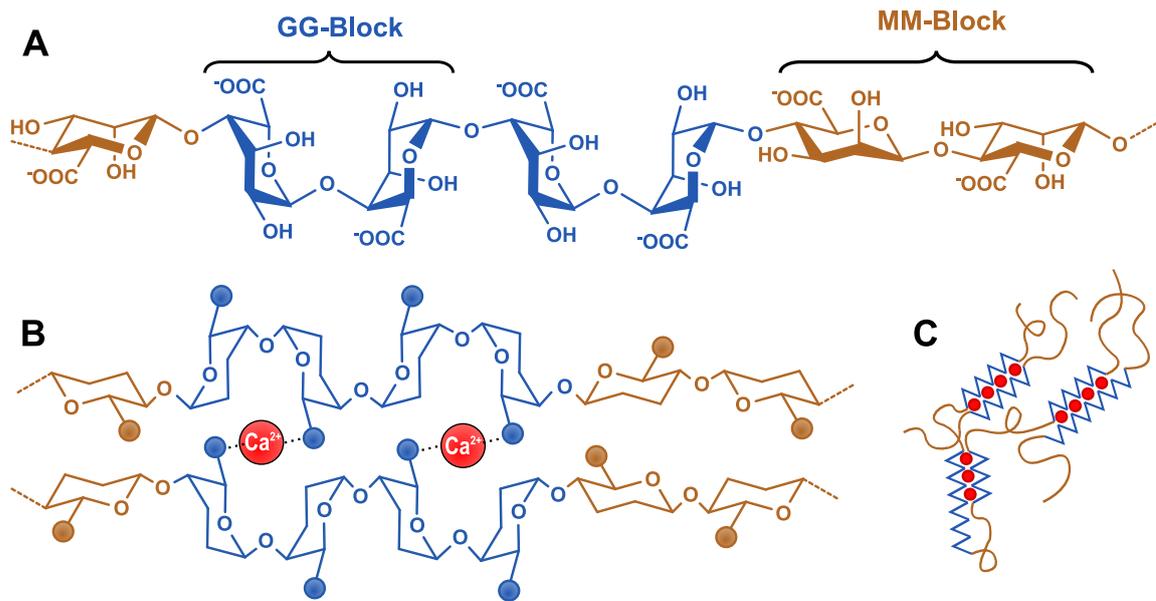


Abbildung 2.3: Struktur und Gelierung von Alginat **A:** Strukturformel von Alginat zeigt die Faltstruktur der GG-Blöcke und die lineare Struktur der MM-Blöcke. **B:** vereinfachte Struktur (ohne OH und COO⁻ als Kugel) zweier benachbarter Alginatketten mit Ca²⁺-Ion als Gelbildner zwischen den GG-Blöcken. **C:** Die weiter vereinfachte Überstruktur des Gels zeigt das so genannte „egg-box“-Modell. Calciumionen (rot) zwischen GG-Blöcken (blau) sorgen für die Quervernetzung zwischen Polymerketten. Eigene Darstellung nach [53] und [54].

intramolekulare Anhydrobrücke sondern stattdessen eine Sulfatgruppe an der A6-Position vorliegt. Die Varianten oder Vorstufen ohne Anhydrobrücke bilden keine Gele aus. Grundsätzlich findet die Gelbildung bei Anwesenheit von Kalium- oder Calciumionen (oder anderen größeren mono- und bivalenten Kationen) statt, κ-Carrageen bildet dabei feste und stabile Gele, während ι-Carrageen eher weiche Gele bildet. Mit diesen Eigenschaften finden sie vor allem in der Lebensmittelindustrie als Verdickungs- und Stabilisierungsmittel Anwendung. Doch auch im Bereich der regenerativen Forschung werden Carrageene zur Verkapselung von Zellen, als Matrix zur Wirkstofffreisetzung oder als Teil eines Kompositrägermaterials für Knochen, Knorpel oder Wundaufgaben verwendet.[61–63]

Ein weiteres, sehr häufig eingesetztes Polysaccharid ist Chitosan (Abb. 2.2C). Es besteht aus β-(1→4)-verknüpftem D-Glucosamin und wird durch Deacetylierung von Chitin, dem Hauptbestandteil der Schale von Krustentieren, gewonnen. Durch einen höheren Grad an Deacetylierung wird sowohl die Wasserlöslichkeit als auch die Kristallinität des Chitosans erhöht. Chitosan ist nur bei sauren pH-Werten löslich, was bei Anwendung und Herstellung von Trägermaterialien beachtet werden muss. In zahlreichen Untersuchungen zeigte Chitosan sehr gute Biokompatibilität, Zellanhaftung, Unterstützung der osteogenen Differenzierung und Mineralisierung. Wie andere gelbildende Polysaccharide bildet es Hydrogele, die keine größeren mechanischen Belastungen aushalten, weswegen es oft in Verbindung mit Biokeramiken wie Hydroxyapatit eingesetzt wird.

Cellulose, bestehend aus (1→4)-verknüpfter β-D-Glucose (Abb. 2.2B), sowie Cellulosederivate wie Carboxymethylcellulose sind seit langem erforscht, industriell verfügbar und bieten ebenfalls hohes Potential als Matrix für Trägermaterialien. Aktueller Fokus der Forschung liegt dabei auf Nanocellulose, welche vom Bakterium *Gluconacetobacter xylinum* produziert wird und

verglichen mit Cellulose aus Pflanzenmaterial eine besonders hohe Reinheit besitzt, da sie keine Begleitsubstanzen wie Hemicellulosen oder Lignin beinhaltet. Zudem bilden mikrofibrilläre und nanokristalline Nanocellulose einen Schwerpunkt, oft in Verbindung mit anderen Polymeren oder Polysacchariden und Calciumphosphat.[64, 65]

Hyaluronsäure (Abb. 2.2D) ist neben Kollagen eines der wichtigsten Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) im Körper. Die Wiederholeinheit besteht aus einem Disaccharid aus D-Glucuronsäure und *N*-Acetyl-D-glucosamin. Ebenfalls Teil der ECM und eng verwandt ist Chondroitin-6-sulfat (Abb. 2.2E), welches strukturell nahezu identisch ist, allerdings eine Sulfatgruppe an der 6-Position der *N*-Acetyl-D-glucosamin-Einheit trägt. Beide Polysaccharide sind biokompatibel, hydrophil und enzymatisch im Körper abbaubar. Sie werden als Trägermaterial für Wirkstofffreisetzungen wie Wachstumsfaktoren eingesetzt, müssen wegen ihrer leichten Wasserlöslichkeit allerdings modifiziert oder in Verbindung mit weiteren Materialien eingesetzt werden.[66–68]

Den sulfatierten Polysacchariden könnte zukünftig eine besondere Rolle in der Entwicklung neuer Trägermaterialien zukommen, da auch die ECM im Körper Sulfatgruppen trägt und die Implantate so dem körpereigenen Material ähneln. Mit definierter Struktur und Eigenschaften der Polysaccharide können so funktionale Trägermaterialien hergestellt werden, die sowohl ein Grundgerüst für die Knochenregeneration bilden als auch zusätzliche Funktionen in der Wirkstofffreisetzung besitzen.[51]

2.2 Agarose

Agarose ist Hauptbestandteil von Agar und wird aus Rotalgen (*Rhodophyta ssp.*) gewonnen. Die meistgenutzten Gattungen sind dabei *Gelidium* und *Gracilaria*. *Gelidium* wird vornehmlich im Ostatlantik vor Marokko und Spanien geerntet, während *Gracilaria* im pazifischen Raum (Chile, Peru und Ostasien) dominiert.[69, 70] Laut Jahresbericht 2018 der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) wird der globale Umsatz an Agar im Jahr 2015 auf ca. 250 Mio. US-Dollar geschätzt. Im Jahr 2015 betrug die Jahresernte an Algen allgemein rund 30 Mio Tonnen, wovon etwa 1 Mio. Tonnen aus wildem Fang und der Rest aus Aquakultur stammten.[69] Etwa 4 Mio. Tonnen der Jahresernte entfallen dabei auf *Gracilaria*, welches damit hinter *Euchema* (Rotalge, aus der Carrageene gewonnen werden, ca. 10 Mio. Tonnen) und *Laminaria japonica* (als Kombu essbare japanische Braunalge, aus der auch Alginat gewonnen wird, ca. 8 Mio. Tonnen) zu den meistangebauten und meistgeernteten Algensorten zählt. *Gelidium*-Algen, welche qualitativ hochwertigere Agar liefern, liegen in der Jahresproduktion weit unter 1 Mio. Tonnen, da sie anspruchsvollere Wachstumsbedingungen benötigen und somit kaum in Aquakultur angebaut werden.[70–72]

Agarose ist ein ungeladenes, unverzweigtes Polysaccharid, bestehend aus sich wiederholenden α -(1→3)-glykosidisch verknüpften Disaccharideinheiten (Agarobiose): β -(1→4)-verknüpfte D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose. Die Struktur ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt. Kommerziell verfügbare Agarose hat ein mittleres Molekulargewicht von etwa 80000–140000 g mol⁻¹, während Agarose, die im Labor direkt aus Rotalgen extrahiert wurde, etwas geringere Molekulargewichte aufweist.[73] Agar-Extrakte aus den Algen enthalten abhängig vom eingesetzten Rohmaterial noch zum Teil Verunreinigungen, welche als Agaropektin bezeichnet werden: die Hydroxylgruppe an der G6-Position der D-Galactose kann Methyl-, Pyruvat- oder Sulfatgruppen tragen, welche das Gelverhalten der Agarose beeinflussen. Zudem kann in seltenen Fällen die Anhydrobrücke zwischen der LA3- und LA6-Position der L-Galactose fehlen; auch hier kann dann eine Substitution der LA6-Position vorkommen. Aufgereinigte Agarose hingegen, die beispielsweise für biochemische Anwendungen angeboten und verwendet wird, enthält in der Regel kein Agaropektin und entspricht weitestgehend der in Abbildung 2.4 dargestellten Struktur.

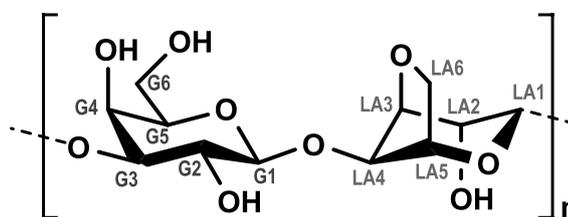


Abbildung 2.4: Idealierte Struktur der Agarosewiederholeinheit mit Zuordnung der Kohlenstoffatome. Der „G-Block“ kennzeichnet die D-Galactoseeinheit, der „LA-Block“ die 3,6-Anhydro-L-galactoseeinheit.

Agarose hat die besondere Eigenschaft, thermoreversible Hydrogele zu bilden: Beim Abkühlen einer wässrigen Agaroselösung bildet sich unterhalb einer Temperatur von etwa 35–40 °C ein festes Gel aus. Einzelne Agaroseketten gruppieren sich dabei zu einer helikalen Struktur und

bilden so ein poröses Polymernetzwerk, welches große Mengen an Wasser halten kann. Dieses Hydrogel lässt sich durch Erhitzen auf über 90 °C wieder verflüssigen. Die Hystereseschleife lässt sich dabei mehrfach wiederholen, ohne dabei die Eigenschaften der Agarose(Gele) zu verändern.[74, 75] Die Eigenschaft der Gelbildung wird in verschiedenen Industriezweigen und Anwendungen genutzt. Über 90 % des Agars werden in der Lebensmittelindustrie als Verdickungs- und Geliermittel verwendet.[70] Hier bietet es sich als pflanzliche Alternative zu Gelatine an. Die übrigen 10 % und der überwiegende Teil des „hochwertigen“ Agars, also der aufgereinigten Agarose, werden in der Biologie und Biotechnologie für die Gelelektrophorese oder als Kultursubstrat genutzt. Die Gelstärke wird hierbei über die Konzentration an Agarose in der Lösung kontrolliert, gängig für die Gelelektrophorese sind beispielsweise 0,5–3 %. Dabei bilden sich je nach Gelkonzentration Porengrößen zwischen 50 nm und 250 nm aus.[76, 77]

Neben der Anwendung von Agarose im Lebensmittelsektor oder als Elektrophoresegele in der Bioanalytik, rückt sie durch ihre Gelbildung und grundsätzliche Biokompatibilität immer mehr in den Fokus der regenerativen Forschung.[70] Hier wird sie vor allem für die Regeneration von Nerven-, Haut-, Knorpel- und Knochengewebe eingesetzt. Allerdings erweist sich reine Agarose in der Zellkultur als schwierig, da Agarose als bioinert gegenüber Säugetierzellen gilt und die Zellen nicht auf dem Substrat haften und Agarose im Körper nur schlecht abgebaut wird.[78] Somit bleibt die Anwendung reiner Agarose oft limitiert auf die Bildung des Hydrogels, während für weitere gewünschte Effekte wie Zellanhaftung, Wirkstofffreisetzung und Festigkeit andere Materialien wie Polymere mit anderen funktionellen Gruppen und anorganische Komponenten wie beispielsweise Calciumphosphate zum Einsatz kommen. So können Kompositgele aus Agarose und Chitosan ein Trägermaterial für das dreidimensionale Wachstum von Nervenzellen bieten.[79] In der Rekonstruktion von weichem Gewebe aller Art finden Agarosegele ebenfalls Anwendung. Mit Epichlorhydrin quervernetzte Gele aus Agarose und Hyaluronsäure zeigen *in vivo* eine verbesserte Abbaurate mit geringem Entzündungspotential.[80] Als Wundauflagen, Hautersatz oder andere Weichgewebe wie Muskeln, Bindegewebe aber auch Organe wie Leber wurden diverse Kombinationen von Agarose und anderen Biopolymeren wie Chitosan[81–83], Collagen[84] und Gelatine[85] untersucht, bei denen sich verbesserte Zellanhaftungen und Zellwachstum zeigten. Im Bereich der Knorpelregeneration wird Agarose ebenfalls in Verbindung mit anderen (Bio-)polymeren verwendet, um Hydrogelträgermaterialien mit verbesserter Zellanhaftung und Zellvermehrung zu erhalten.[86–89] Für die Knochenregeneration wird Agarose dann allerdings zusätzlich in Verbindung mit anorganischen, calciumhaltigen Komponenten verwendet, um stabile, knochen-spezifische Trägermaterialien herzustellen.[5, 90–94] Darüber hinaus gibt es auch Anwendungen, bei denen Agarose und Alginat zur Verkapselung von Zellen[95] oder Agarosemikrokapseln zur Freisetzung von Wirkstoffen[96] untersucht wurden. Für verschiedenste Forschungs- und Anwendungszwecke kann Agarose derivatisiert werden. Detaillierte Beispiele dazu werden in Kapitel 2.3 vorgestellt.

2.3 Modifizierung von Agarose

Genau wie viele andere Polysaccharide kann auch Agarose für verschiedene Fragestellungen chemisch modifiziert werden. Auch wenn die Zahl der publizierten Synthesen an Agarose im Vergleich zu extensiv untersuchten Polysacchariden wie Cellulose oder Stärke deutlich niedriger ist, sollen in diesem Kapitel verschiedene Synthesewege dargestellt werden.

Native Agarose weist vier funktionelle Gruppen auf, an denen chemische Modifizierungen durchgeführt werden können: drei Hydroxylgruppen an der D-Galactose-Einheit an den Positionen 2, 4 und 6, sowie eine Hydroxylgruppe an Position 2 der 3,6-Anhydro-L-galactose-Einheit. Die Möglichkeiten der Modifizierung sind somit auf Reaktionen an und mit Hydroxylgruppen limitiert oder bedürfen diverse Umwandlungen in reaktive Zwischenprodukte.

Eine sehr häufig genutzte Möglichkeit zur Modifizierung ist die Oxidation der Hydroxylgruppe. Dies geschieht in der Regel über die TEMPO-Oxidation, wie sie auch für Polysaccharide allgemein gut beschrieben ist.[97–99] Dabei wird eine primäre Hydroxylgruppe in alkalischem Medium mittels des TEMPO-Radikals (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy) in Anwesenheit von Hypochlorit und Bromid zur Aldehydgruppe und Carboxylgruppe (bzw. sekundäre Hydroxylgruppen zu Ketonen) oxidiert.[100, 101] Durch zahlreiche Studien, vor allem an Cellulose, ist bekannt, dass die Reaktion an Polysacchariden in aller Regel regioselektiv an der primären Hydroxylgruppe abläuft.[98, 99, 102–104] Das grundsätzliche Reaktionsschema der TEMPO-Oxidation an Polysacchariden ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

In wässriger, alkalischer Lösung wird zunächst Bromid zu Hypobromit oxidiert, welches anschließend das TEMPO-Radikal oder das reduzierte Hydroxylamin zum *N*-Oxoammoniumion oxidiert. Dieses Kation oxidiert dann wiederum die Hydroxylgruppe des Polysaccharids. Durch Hydratation des entstandenen Aldehyds erfolgt in einem weiteren Schritt die Oxidation zur Carboxylgruppe. Durch konstante Zugabe an NaOH wird durch Deprotonierung der Säuregruppe der pH-Wert konstant gehalten. Während TEMPO und Bromid katalytisch wirken, wird Hypochlorit aktiv verbraucht. Um ein Mol an Hydroxylgruppen zur Carboxylgruppe

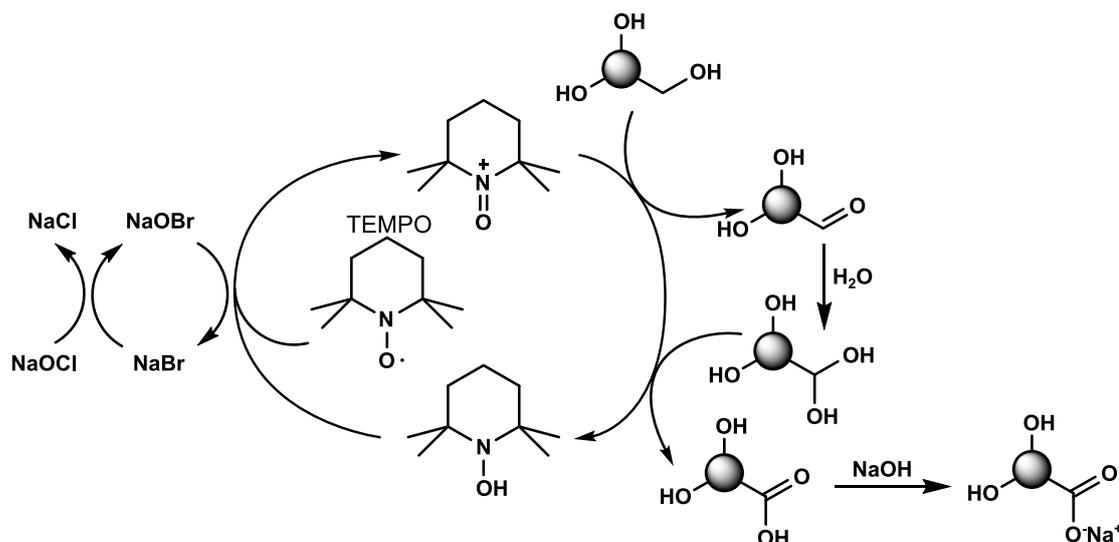


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der TEMPO-Oxidation der primären Hydroxylgruppe von Polysacchariden in wässriger, alkalischer Lösung. Die Kugel stellt das Polysaccharidrückgrat dar. Eigene Darstellung nach [99].

umzuwandeln, sind zwei Mol Hypochlorit notwendig. Speziell zur Oxidation von Agarose gibt es einige Beispiele. Forget *et al.* haben *via* TEMPO-Oxidation carboxylierte Agarose hergestellt, welche ein anderes Verhalten bei der Gelbildung zeigte.[105] Während native Agarose in der Sekundärstruktur der α -Helix erstarrt, bildet die carboxylierte Agarose eine β -Faltblattstruktur. Durch Mischen von nativer und carboxylierter Agarose erhielten sie Hydrogele mit kontrollierbaren mechanischen Eigenschaften. Die gleiche Arbeitsgruppe nutzte carboxylierte Agarose gelöst in ionischer Flüssigkeit zudem zur Herstellung von Fasermatten durch Electrospinning.[106] Durch die Integration und Freisetzung der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl wiesen die Matten eine antimikrobielle Aktivität auf. Die Oxidation zur Carboxylgruppe wird allerdings auch als Zwischenschritt genutzt, um anschließend eine weitere Funktionalisierung durchzuführen. Yixue *et al.* erhielten durch TEMPO-Oxidation maximale Oxidationsgrade von etwa 30 %. Anschließend wurde Dopamin mittels Aktivierung der Carboxylgruppe durch EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) an Agarose angehängt. Den gleichen Reaktionsweg nutzen Chu *et al.*, die aus der Dopamin-funktionalisierten Agarose eine Art Sprühpflaster herstellten, welches eine gute Hautadhäsion und Wundheilung zeigte.[107] Yamada *et al.* modifizierten Agarose mit verschiedenen Peptiden, um eine dreidimensionale Zellanhaftung in der Zellkultur zu ermöglichen. Hierzu nutzten sie die TEMPO-Oxidation mit Iodbenzendiaceat anstelle von Natriumhypochlorit zur Darstellung der Aldehydgruppe an der G6-Position.[108] Anschließend wurden die Peptide über eine Thiazolidinkopplung an die Aldehydgruppen angehängt.

Eine andere, häufiger genutzte Funktionalisierung ist die Überführung der Hydroxylgruppe in eine Etherbindung. Ältere Studien, welche den Einfluss der Methoxygruppen auf das Gelierungsverhalten der Agarose untersuchten, nutzten Dimethylsulfat zur Alkylierung der Hydroxylgruppen.[109, 110] Aktuellere Studien (siehe auch Abbildung 2.6) nutzen in der Regel Epoxide zur Oxyalkylierung. Zhang *et al.* nutzen Ethylenoxid, Propylenoxid und Butylenoxid in alkalischem Medium zur Synthese von Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl- und Hydroxybutylagarose.[111] Die entstandenen Produkte wiesen allesamt niedrigere Gelierungspunkte auf. Anstelle der zuvor genannten Epoxide wird außerdem oft Epichlorhydrin eingesetzt, um das Polysaccharid mit der funktionellen Epoxygruppe zu versehen. Im Anschluss wird diese dann entweder zur Hydroxylgruppe reduziert[112] oder für weitere Funktionalisierungen genutzt. Dabei kann die Epoxygruppe mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und Dithiothreitol[113, 114] oder direkt mit Na_2S [112] zum Thiol reduziert werden, was die Möglichkeit für Disulfidbrücken eröffnet, die in der Proteinimmobilisierung zum Einsatz kommen können. Zur Glycerylstruktur hydrolysierte Epoxide können mit Periodat zu Aldehydgruppen oxidiert werden, die mit Aminogruppen von Proteinen reagieren können.[112, 115]

Epichlorhydrin wird zudem auch als Vernetzer eingesetzt. So können beispielsweise chemisch vernetzte Gele aus Agarose und Hyaluronsäure hergestellt werden.[80] Durch die Verwendung von Divinylsulfon lassen sich sowohl vernetzte Agarosegele als auch funktionelle Gele zur Proteinimmobilisierung herstellen.[118] Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung von Chloressigsäure zur Herstellung von Carboxymethylagarose, analog zur bekannten und industriell verwendeten Carboxymethylcellulose.[116] Mit zunehmendem Substitutionsgrad nimmt allerdings die Fähigkeit Gele zu bilden drastisch ab. Auch kationische funktionelle Gruppen lassen sich über Epoxide an Agarose anbringen, wie Prado *et al.* zeigten, in dem sie

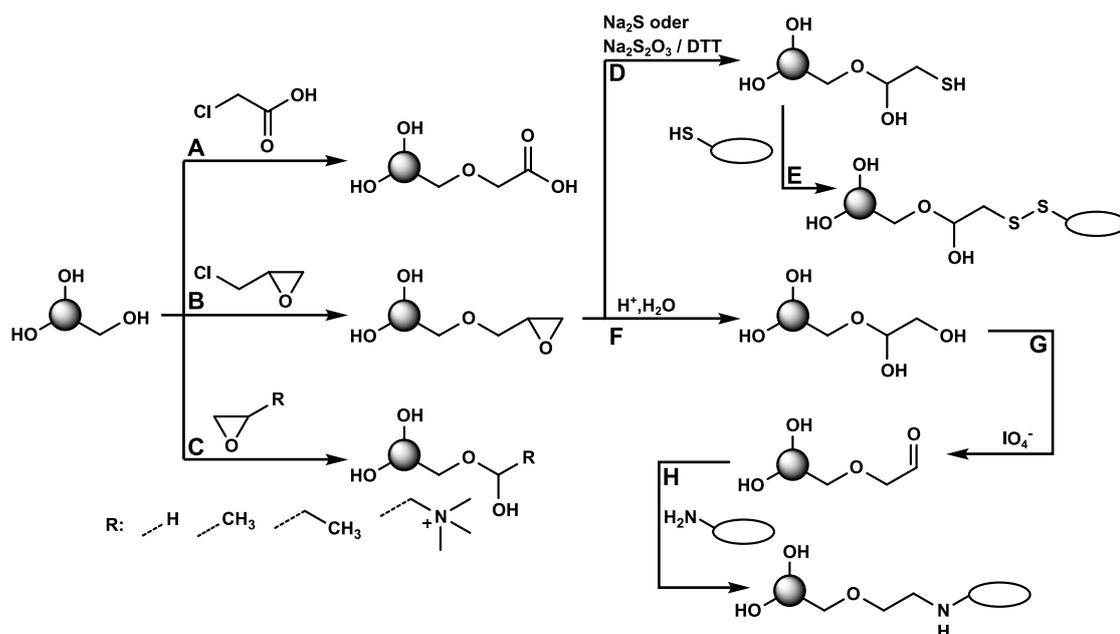


Abbildung 2.6: Verschiedene Möglichkeiten der Oxyalkylierung von Agarose basierend auf Literaturbeispielen. Die Kugel stellt das Agaroserückgrat dar. **A:** Darstellung Carboxymethylagarose [116], **B:** Reaktionen mit Epichlorhydrin [112, 113], **C:** Reaktionen mit Epoxiden [111, 117], **D,E:** anschließende Thiofunktionalisierung und Disulfidbindung von Peptiden[112–114], **F-H:** Hydrolyse, Oxidation zur Aldehydgruppe und Reduktion zum Amin[112, 115].

2,3- Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid *in situ* aus 3-Chlor-2-hydroxypropyltrimethylammoniumchlorid herstellten und an Agarose anknüpften.[117]

Den größten Anteil der Synthesen bilden allerdings Umsetzungen zu Estern, Amiden und Carbamaten in zahlreichen Varianten. Dabei können Agarose und die gewünschte Funktionalisierung direkt umgesetzt werden, es kann über eine aktive Zwischenstufe geschehen, oder das Produkt der Synthese ist Ausgangsstoff für die eigentlich gewünschte Funktionalisierung. Eine Übersicht über verschiedene Reaktionswege ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Direkte Veresterungen werden in der Regel mit Säureanhydriden oder Säurechloriden durchgeführt. Garcia *et al.* nutzten Essigsäureanhydrid zur Darstellung von acetylierter Agarose[119], während De Paepe *et al.* mit Methacrylsäureanhydrid Agarosemethacrylat herstellten, welches sich mittels UV-Licht vernetzen ließ und so deutlich stabilere Gele entstanden sind.[120] Xiao *et al.* nutzen diverse Fettsäurechloride, um mit Agarose die entsprechenden Fettsäureester als Emulgatoren herzustellen.[121] Die gleiche Arbeitsgruppe nutzte zu diesem Anwendungszweck außerdem Bernsteinsäureanhydridderivate für die Veresterung von Agarose.[121, 122] In einer Studie von Trivedi *et al.* wurden Essigsäureanhydrid zur Acetylierung und Phenylisocyanat zur Bildung eines Carbamats in der ionischen Flüssigkeit 1-Butyl-3-methylimidazoliumacetat an der G6-Position der Agarose verwendet.[123] Gele dieses Carbamats in der ionischen Flüssigkeit zeigten selbstheilende Eigenschaften.

Außerdem finden Veresterungen oder Amidbildungen oft unter Zuhilfenahme von Aktivierungsreagenzien wie DCC/DMAP (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid/4-Dimethylaminopyridin) oder CDI (Carbonyldiimidazol) statt. Kondaveeti *et al.* verknüpften Agarose über DCC/DMAP mit Tryptophan, welches in einem weiteren Schritt mit Genipin funktionalisiert wurde, um ein fluoreszierendes Hydrogel zu erzeugen.[129] Zur kovalenten Verknüpfung von Agarose mit

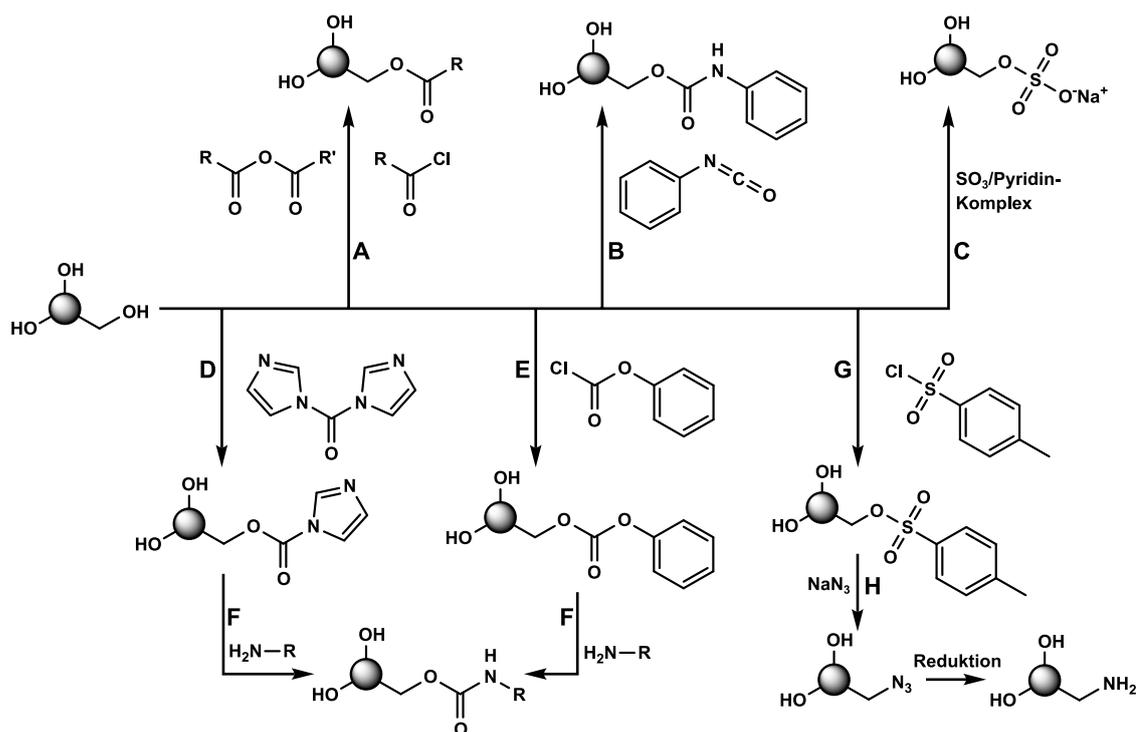


Abbildung 2.7: Ausgewählte Möglichkeiten der Funktionalisierung von Agarose basierend auf Literaturbeispielen. Die Kugel stellt das Agaroserückgrat dar, R und R' bezeichnen organische Reste. **A:** Veresterung mit Säureanhydriden oder Säurechloriden [119, 121], **B:** Carbamatsynthese aus Isocyanat [123], **C:** Sulfatierung mit SO_3 -Pyridin-Komplex [124], **D:** Aktivierung mit CDI [125], **E:** Aktivierung mit Phenylchlorformiat [126], **F:** anschließende Aminolyse zum Carbamat [125, 126], **G-H:** Aktivierung mit Tosylchlorid mit anschließender Umsetzung zu Azidoagarose und Reduktion zu Aminoagarose. [127, 128]

Gelatine wurde zunächst Agarose mit CDI aktiviert, bevor Gelatine über eine Carbamatbindung angebunden wurde. [125] Die resultierenden Gele zeigten erheblich verbesserte Zelladhäsionen und -morphologien als reine Agarosegele oder eine einfache Mischung aus Agarose und Gelatine. Auch Zhang *et al.* nutzen CDI zur Aktivierung von Agarose, bevor Ethylendiamin als Vernetzer eingestetzt wurde. [130] Ähnlich ist der Syntheseweg zum Carbamat über eine Carbonatzwischenstufe. Seidi *et al.* stellten Agarosephenylcarbonat in DMAc/Pyridin mit einem DS von 0,5 her und wandelten dies anschließend mit *N,N*-Dimethylaminopropylamin (DMAPA) zum entsprechenden Carbamat um. [126] Dieses wurde dann in Polyethersulfon-Membranen zur Gaspermeation eingesetzt. Auch die Aktivierung von Agarose mit Tosylchlorid ist eine Möglichkeit, um andere funktionelle Gruppen an das Polysaccharid zu knüpfen. [127] Hier haben Gericke *et al.* umfangreiche Studien zu Reaktionsbedingungen der Tosylierung und anschließender Reaktion mit Aziden und Ethylendiamin angestellt. Den gleichen Reaktionsweg über Tosylagarose und Azidoagarose nutzten Heuko *et al.* zur Darstellung von Aminoagarose, welche auf ihre antimikrobielle Eignung hin untersucht wurde. [128] Eine andere Möglichkeit zur Darstellung von Aminoagarose ist die Reaktion von Phthalimid mit anschließender Hydrazinolyse. [131] Diese Aminoagarose lassen sich dann mit Carbonsäuren zu Amidien umsetzen. Anstelle der Reduktion der Azidgruppe ist auch eine Anwendung in der „Click-Chemie“ denkbar, bei der Azidgruppen und Alkine in einer Cycloadditionsreaktion miteinander gekoppelt werden. [132] Aktivierte Tosylagarose und anschließende Kopplung von Ethylendiamin nutzten Kim *et al.* um dort über eine Amidbindung Monosuccinyl- β -Cyclodextrin zur

Freisetzung hydrophober Wirkstoffe zu koppeln.[133] Rahman *et al.* stellten verschiedene Agarosederivate mit Fluoreszenztags und immobilisierten Wachstumsfaktoren nach CDI-Aktivierung von Agarose her.[134] Dafür nutzten sie Ethylendiamin (Aminofunktionalisierung), Mercaptoessigsäure (Carboxylfunktionalisierung) und Coumarinsulfid (geschützte Thiolgruppe), bevor die EDC/*N*-Hydroxysulfosuccinimid-aktivierten Proteine über diese Funktionalisierungen gekoppelt wurden. Chhatbar *et al.* nutzten ein Zwischenprodukt aus Iodoagarose zur Synthese von Agarosesaccharat[135], während Oza *et al.* Kaliumpersulfat als Radikalbildner zur Verknüpfung von Agarose mit Adenin und Guanin einsetzten.[136, 137] Als weitere Option ist auch die Sulfatierung der G6-Position anzusehen. Dies kann entweder über die Reaktion mit DCC und Schwefelsäure geschehen,[138] oder über den Schwefeltrioxid/Pyridin-Komplex, meist durchgeführt in DMF und Pyridin[124, 139] oder durch *in situ* Erzeugung des Komplexes durch Eintropfen von Chlorsulfonsäure in Pyridin bei 0 °C.[140]

2.4 Wirkstofffreisetzung und kinetische Modelle

Die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen, z. B. Antibiotika, Entzündungshemmer oder Wachstumsfaktoren für Zellen, steht zunehmend im Fokus der regenerativen Medizin. Die Integration in das Trägermaterial hat den Vorteil, dass die Wirkstoffe direkt an Ort und Stelle gelangen, ohne zuvor den Metabolismus des Körpers zu durchlaufen. Sie können somit schneller wirken und werden im Idealfall über einen längeren Zeitraum freigesetzt, ohne durch hohe Dosierungen den Blutspiegel zu belasten. Die größte Herausforderung ist aktuell die kontrollierte Freisetzung leicht wasserlöslicher Wirkstoffe über einen längeren Zeitraum. Dieses Kapitel beleuchtet Anwendungen und Herausforderungen in der kontrollierten Wirkstofffreisetzung und geht auf die verschiedenen mathematischen Kinetikmodelle ein, mit denen die Freisetzung charakterisiert und evaluiert werden können.

2.4.1 Mechanismen der Wirkstofffreisetzung

Grundsätzlich gibt es verschiedene Mechanismen, mit denen eine kontrollierte oder verzögerte Wirkstofffreisetzung beschrieben werden kann. Diese Mechanismen können einzeln oder gemeinsam, aber auch nacheinander in verschiedenen zeitlichen Phasen einer Freisetzung geschwindigkeitsbestimmend sein. Zu den gängigsten Mechanismen gehören Diffusion, das Auflösungsverhalten des Wirkstoffs, sowie Quellung und Erosion der Matrix.[3] Der Vollständigkeit halber seien auch weitere Mechanismen wie Osmose, Verteilung des Wirkstoffs in hydrophiler und hydrophober Phase und das sogenannte „drug targeting“, bei dem der Wirkstoff mit modifizierten Träger im Körper gezielt in bestimmte Bereiche gebracht wird, genannt. Diese spielen für die vorliegende Arbeit allerdings keine Rolle. Zusätzlich muss zwischen dem tatsächlichen Freisetzungsmechanismus, dies ist der Prozess, durch den der Wirkstoff freigesetzt wird, und den geschwindigkeitsbestimmenden Prozessen, das meint alle Prozesse, welche die Freisetzungsrates beeinflussen, unterschieden werden.[141] Allerdings wird in der Literatur diese zum Teil feine Unterscheidung häufig nicht getroffen oder ist je nach Freisetzungssystem nicht abschließend aufklärbar.

In den meisten Fällen der Wirkstofffreisetzung und vor allem bei Nutzung von Hydrogelen als Freisetzungssystem, ist der tatsächliche Freisetzungsmechanismus die Diffusion durch offene, wassergefüllte Poren. Diffusion beschreibt Bewegung von Teilchen in Lösungen, die nicht durch Konvektion, sondern allein durch Konzentrationsgradienten hervorgerufen wird. Zur Beschreibung der Diffusion und Herleitung diffusionsbasierter Kinetikmodelle werden die FICK'SCHEN Gesetze verwendet.[3, 142] Das erste FICK'SCHE Gesetz (Gleichung 2.1) beschreibt die Proportionalität des Teilchenstroms J zur Änderung der Konzentration c entlang einer Strecke x . Diese Proportionalität wird durch den Diffusionskoeffizienten D beschrieben.

$$J = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (2.1)$$

Über den Grundsatz der Massenerhaltung ergibt sich die Diffusionsgleichung (Zweites FICK'SCHES Gesetz, Gleichung 2.2), womit Konzentrationsunterschiede abhängig von der Zeit t beschrieben werden können.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

Allerdings gelten diese Gleichungen nur für konstante Diffusionskoeffizienten in symmetrischen und isotropen Medien mit planen Diffusionsoberflächen. Somit wird die mathematische Beschreibung der Diffusion aus realen, dreidimensionalen Systemen bereits bei einfachen Trägern ohne Reservoir sehr komplex. Der Diffusionskoeffizient D beschreibt die Mobilität des Wirkstoffs im Medium und ist daher abhängig von Temperatur, Druck, Lösemittel sowie Form des Wirkstoffs und im Falle von Hydrogelen auch von der Porengröße.[3, 143] Diese Komplexität hat dazu geführt, dass bei der Beschreibung der Freisetzungskinetik (siehe Kapitel 2.4.3) mathematische (Teil-)Lösungen der Diffusionsgleichung im dreidimensionalen Raum und empirische Formeln genutzt werden.

Die Geschwindigkeit der Diffusion oder die Diffusionsrate wird in den meisten Fällen von weiteren Prozessen beeinflusst. So kann das Aufquellen eines polymeren Trägers die Diffusion begünstigen, wenn dadurch Poren vergrößert oder durch Eindringen des Wassers die Hydrolyse der Matrix und damit deren Erosion beginnt.[3, 143] Ebenso können Wechselwirkungen zwischen dem an sich ungebundenen Wirkstoff und der Trägermatrix die Diffusion verlangsamen, zum Beispiel elektrostatische Wechselwirkungen in Polyelektrolytsystemen, aber auch hydrophobe Wechselwirkungen mit Cyclodextrinen oder aliphatischen Bereichen der Trägermatrix. Feste Wirkstoffe, die bei Kontakt mit Wasser beginnen sich darin zu lösen, können ebenfalls zur kontrollierten Freisetzung verwendet werden, vor allem dann, wenn sich der Wirkstoff nur sehr langsam löst. Alternativ kann der Wirkstoff beschichtet oder verkapselt werden, sodass erst nach Aufquellen oder Erosion der Schicht der Lösungsvorgang und damit die Freisetzung beginnt. Erosion kann auch direkt der Freisetzungsmechanismus sein, wenn ein im Polymer verteilter Wirkstoff nur durch Abbau der Matrix freigesetzt wird. In diesen Fällen ist die Abbaurate des Polymers gleich der Freisetzungsrate des Wirkstoffs. In den meisten Fällen ist die Matrixerosion allerdings eher ein geschwindigkeits-bestimmender Schritt, da das Eindringen von Wasser in die Matrix Poren schafft und anschließend Diffusion durch diese Poren stattfindet.[141] All diese Prozesse treten meist gemeinsam auf: oft findet eine schnelle Freisetzung via Diffusion aus den Randbereichen des Trägers statt, gefolgt von einer langsameren Phase, in der Quellung und Erosion oder Wirkstoff-Matrix-Wechselwirkungen die Diffusion stark beeinflussen.[143]

2.4.2 Möglichkeiten der Wirkstofffreisetzung

Da die meisten Freisetzungssysteme im Bereich der regenerativen Forschung letztlich auf dem Prinzip der Diffusion basieren, können verschiedene Kategorien an Freisetzungssystemen identifiziert werden.[144] Zum einen Reservoirsysteme mit und ohne konstanter Freisetzungaktivität und zum anderen Matrixsysteme (im Englischen auch „monolithic systems“) mit und ohne konstanter Aktivität. Zudem werden verschiedene Geometrien unterschieden, da diese jeweils andere Annahmen und Randbedingungen für die Modellierung der Freisetzung erfordern. Abbildung 2.8 zeigt beispielhaft die verschiedenen Möglichkeiten zur Einstufung der Diffusionssysteme.

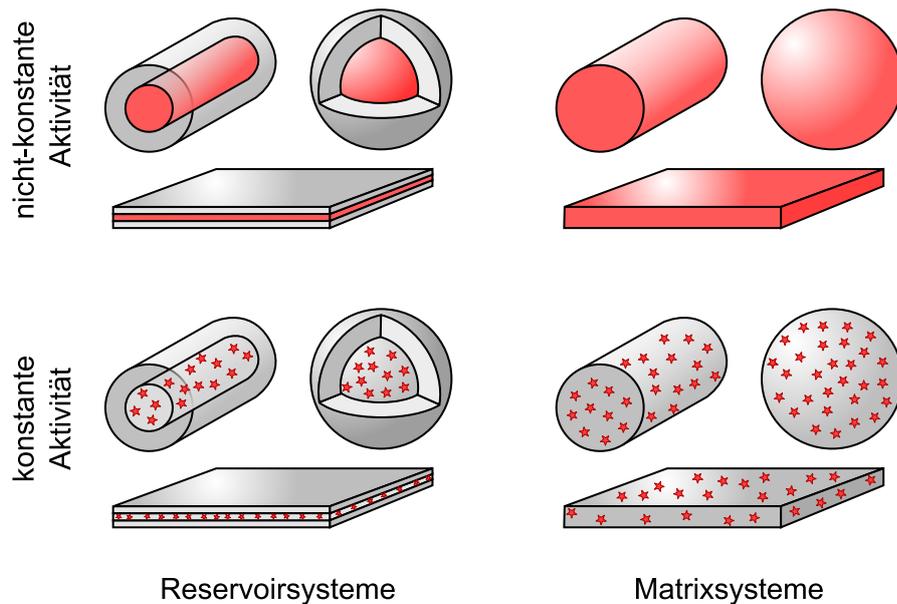


Abbildung 2.8: Kategorisierung diffusionsbasierter Freisetzungssysteme. Es wird zwischen Reservoirsystemen und Matrixsystemen, sowie zwischen Systemen mit konstanter und nicht-konstanter Aktivität unterschieden. Zudem sind die grundsätzlichen Geometrien Platte, Zylinder und Kugel dargestellt. Eigene Darstellung nach [144].

Unter Reservoirsysteme fallen alle Systeme, die den Wirkstoff in einem Bereich vorliegen haben und dann eine Art Barrierschicht aufweisen, sodass der Wirkstoff nicht direkt freigesetzt wird, sondern erst nach Quellung oder Erosion der Barriere oder nach Diffusion durch die Barriere selbst. Am anschaulichsten sind hydrophob beschichtete Kapselsysteme, aus denen ein hydrophiler Wirkstoff erst nach einer gewissen Zeit freigesetzt wird. Je nach Vorliegen des Wirkstoffs unterscheidet man zwischen konstanter und nicht konstanter Aktivität. Ist der Wirkstoff im Reservoir bereits gelöst, wird er mit Beginn der Freisetzung durch Diffusion aus diesem transportiert. Dies geschieht zu Beginn schneller und mit abnehmender Wirkstoffkonzentration im Reservoir immer langsamer. Hier spricht man von nicht-konstanter Aktivität. Liegt der Wirkstoff hingegen ungelöst und in höherer Konzentration als der Löslichkeit vor, wird so lange eine konstante Menge Wirkstoff freigesetzt wie die Sättigungskonzentration im Reservoir überschritten ist. Durch Kenntnis des Lösungsverhalten kann so über lange Zeit eine gleichbleibende Freisetzungaktivität gewährleistet werden. Erst zum Ende hin, wenn die Sättigungskonzentraion unterschritten wird, geht das System in eine nicht-konstante Freisetzungaktivität über. Im Gegensatz zu den Reservoirsystemen ist der Wirkstoff in Matrixsystemen im gesamten Träger homogen verteilt. Dabei kann der Wirkstoff gelöst oder suspendiert vorliegen und je nach Wirkstoffkonzentration (über/unter Sättigungskonzentration) kann auch hier zwischen einer konstanten oder nicht-konstanten Aktivität unterschieden werden. Bezogen auf die Geometrie unterscheidet man in der Regel zwischen Platten (Filme), Zylindern und Kugeln (Sphären).[144] Für all diesen Geometrien gibt es Lösungen der Diffusionsgleichung, wobei einige Annahmen getroffen werden müssen. Bei Filmen oder ähnlichen planen Flächen mit nicht zu großer Dicke geht man bei der Betrachtung der Diffusion davon aus, dass diese nur über die großen Flächen und nicht etwa über die Seitenflächen stattfindet. Somit berücksichtigt man bidirektionale, bzw. je nach Modell sogar nur unidirektionale Diffusion. Ein Reservoir

befindet sich bei Platten in der Modellierung genau mittig in der Platte und erstreckt sich bis zu den Seitenflächen. Bei Zylindern geht man von lediglich radialer Freisetzung aus, ein Reservoir befindet sich axial in der Mitte und erstreckt sich über die gesamte Höhe des Zylinders. Bei Sphären findet die Freisetzung über die gesamte Oberfläche gleichmäßig statt, ein Reservoir befindet sich genau mittig in der Kugel. In der Praxis werden sphärische Systeme sowohl als Matrixsysteme[145–147] als auch als Reservoirsysteme[148] eingesetzt. Der Wirkstoff kann sowohl gelöst als auch in fester Form vorliegen, teilweise ist der ungelöste Wirkstoff auch gleichzeitig Träger für eine Beschichtung. In aller Regel werden aber diverse Polymer- oder Kompositssysteme als Trägermaterial eingesetzt. Neben Sphären finden in der regenerativen Forschung wegen der einfachen Herstellung auch Zylinder sowie Matten und Quader meist als Matrixsysteme Anwendung[81, 85, 149]. Darüber hinaus gibt es injizierbare Hydrogele, die an Ort und Stelle vernetzen[150–152] und so die (komplexe) Geometrie der Implantatstelle annehmen sowie individuell angepasste, 3D-gedruckte Geometrien.[153–155] Die Freisetzung aus diesen Systemen ist allerdings in aller Regel nur qualitativ und nicht mathematisch beschrieben.

2.4.3 Modelle zur kinetischen Beschreibung von Freisetzungskurven

Um die Wirkstofffreisetzung einerseits objektiv mathematisch zu beschreiben und die Freisetzung zu einem gewissen Grad vorhersagen zu können, wurden über die Jahrzehnte diverse kinetische Modelle entwickelt. Diese reichen von einer rein mathematischen Beschreibung von Teilen der Freisetzungskurve über Modelle, die Aufschluss über den Mechanismus geben, bis hin zu komplexen nicht-linearen Modellen, mit denen auch eine Abschätzung der Freisetzung über den beobachteten Zeitraum hinaus möglich ist.

Zero-Order-Modell

Das einfachste Modell ist das Modell nullter Ordnung (Gleichung 2.3), eine konstante Freisetzung des Wirkstoffs. Hierbei hängt die freigesetzte Stoffmenge des Wirkstoffs lediglich von der Zeit t ab. Im einfachsten Fall ist die Stoffmenge zu Beginn $n_0 = 0$, K_0 beschreibt die Freisetzungskonstante. Diese gleichmäßige Freisetzung ist oft bei transdermalen Reservoirsystemen, die über lange Zeit konstant den Wirkstoff abgeben, anzutreffen.[3]

$$n(t) = n_0 + K_0 \cdot t \quad (2.3)$$

First-Order-Modell (FO)

Das „*First Order*“-Modell kennzeichnet eine Freisetzung mit Kinetik erster Ordnung, die sich bei gleichbleibender Oberfläche des Freisetzungssystems nach Gleichung 2.4 beschreiben lässt.[3]

$$f(t) = M_i = M_\infty - B \cdot e^{-kt} \quad (2.4)$$

Hierbei entspricht M_i dem Anteil freigesetztem Wirkstoff zum Probenahmezeitpunkt, M_∞ dem maximal freizusetzenden Wirkstoffanteil und k der Freisetzungsrates. Es gilt zudem $B = M_\infty - M_0$, wobei M_0 dem zum Zeitpunkt $t = 0$ bereits freigesetzten Anteil entspricht. Wenn sich zu Beginn der Freisetzungsversuche noch kein Wirkstoff im Medium befindet, vereinfacht sich die Formel zu:

$$f(t) = M_i = M_\infty \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (2.5)$$

Higuchi-Modell

Ein sehr bekanntes und oft angewendetes Freisetzungsmodell ist das HIGUCHI-Modell, welches eines der ersten empirischen Freisetzungsmodelle ist und an der Wirkstofffreisetzung aus Salben entwickelt wurde.[142, 156]

$$f(t) = K_H \cdot \sqrt{t} \quad (2.6)$$

Das Modell (Gleichung 2.6) beschreibt die Freisetzung als proportional zur Wurzel der Zeit t . In der Higuchi-Konstante K_H sind diverse Faktoren wie Löslichkeit und Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs in der Matrix, Anfangsgehalt des Wirkstoffs in der Matrix sowie Matrixporosität und Matrixortuosität („Grad der Gewundenheit“) enthalten. Allerdings setzt das HIGUCHI-Modell einige Punkte voraus: In der Matrix liegt der Wirkstoff in höherer Konzentration als der Löslichkeit vor, die Dicke der Matrix ist deutlich größer als die Wirkstoffmoleküle, die Diffusion hat einen konstanten Diffusionskoeffizienten und findet zudem nur in eine Richtung statt, die Endkonzentration im Medium liegt deutlich unterhalb der Löslichkeit und die Matrix unterliegt weder Quellung noch Erosion.[142, 157, 158] Diese Einschränkungen zeigen, dass das Modell für dreidimensionale Freisetzungssysteme nicht geeignet ist, noch dazu, wenn es sich um Hydrogele oder aufquellende oder erodierende Polymersysteme handelt.

Korsmeyer-Peppas-Modell (KP)

Das KORSMEYER-PEPPAS-Modell beschreibt eine empirisch ermittelte exponentielle Freisetzungskinetik aus polymeren Matrices.[159, 160]

$$f(t) = \frac{M_i}{M_\infty} = K \cdot t^n \quad (2.7)$$

Hierbei entspricht M_∞ wieder dem maximal freizusetzenden Stoffmengenanteil, K beschreibt die Freisetzungskonstante und umfasst auch strukturelle und geometrische Eigenheiten des Systems und der Exponent n beschreibt die Art der Diffusion. So lassen sich über den Wert n FICK'SCHE und Nicht-FICK'SCHE Diffusion (Anomaler Transport und Relaxationseffekte) identifizieren. Ein Wert von $n = 0,5$ (für dünne Filme; für Zylinder gilt $n = 0,45$, für Sphären $n = 0,43$) beschreibt FICK'SCHE Diffusion, darüber findet Anomaler Transport statt, bei dem die Relaxation des Polymers bereits deutlichen Einfluss hat. Für das KORSMEYER-PEPPAS-Modell gilt die Einschränkung, dass es nur für die ersten 60% der jeweiligen

Freisetzungskurve anwendbar ist und Breite und Höhe der Matrix sich maximal um den Faktor 10 unterscheiden.[159]

Peppas-Sahlin-Modell (PS)

Das PEPPAS-SÄHLIN-Modell ist eine Erweiterung des KORSMEYER-PEPPAS-Modells und beinhaltet einen weiteren Term, um Beiträge von Diffusion und Relaxation beim Wirkstofftransport differenzieren zu können.[161]

$$f(t) = \frac{M_i}{M_\infty} = K_1 \cdot t^m + K_2 \cdot t^{2m} \quad (2.8)$$

K_1 und K_2 beschreiben dabei die Geschwindigkeitskonstanten der Diffusion, bzw. der Relaxation, während der Exponent m dem Wert von n für FICK'SCHE Diffusion aus dem KORSMEYER-PEPPAS-Modell entspricht und ebenfalls konstant ist.

Weibull-Modell (WB)

Das WEIBULL-Modell liefert keine Informationen über Transportmechanismen sondern dient hauptsächlich der mathematischen Beschreibung und dem direkten Vergleich verschiedener Freisetzungskurven.

$$f(t) = \frac{M_i}{M_\infty} = 1 - \exp \left[\frac{-(t - T)^b}{a} \right] \quad (2.9)$$

Dabei beschreibt T einen Zeitversatz, der bei Systemen mit *burst release* allerdings in der Regel Null beträgt.[3, 162] Die Parameter a und b beschreiben Skalierungs- und Formfaktoren. Genauer gesagt lässt sich mit b die Form der Kurve beschreiben: bei $b = 1$ verläuft sie exponentiell, bei $b > 1$ sigmoidal und bei $b < 1$ als Hyperbel mit steilerem Beginn und flacherem Ende als der exponentielle Verlauf. Der Parameter a gibt Auskunft über den zeitlichen Verlauf, allerdings ist es an dieser Stelle praktikabler, den Wert der Freisetzungszeit (urspr. „*time of dissolution*“) $t_d = \sqrt[b]{a}$ anzugeben. Dieser ergibt sich aus der Linearisierung der WEIBULL-Gleichung und beschreibt den Zeitpunkt, an dem 63,2% der jeweiligen Freisetzungskurve erreicht sind, womit sich die Freisetzungskurven gut untereinander vergleichen lassen.[162]

Darüber hinaus gibt es noch viele weitere mathematische Modelle, die für spezielle Anwendungen, Matrixtypen oder -geometrien entwickelt wurden, allerdings nicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Freisetzungssystemen passen. Für mehrphasige Freisetzungsprofile wie ein schneller *burst release* mit anschließender verzögerter Phase werden oft die einzelnen Phasen getrennt mit verschiedenen Modellen ausgewertet.[141] Dies kann zur Ermittlung der (Teil-)Mechanismen führen, erlaubt allerdings keine Vorhersage des weiteren Freisetzungsverlaufs, falls diese noch nicht abgeschlossen sein sollte.

Objektive Bewertung der Kurvenanpassung

Zur objektiven Bewertung der Kurvenanpassung bietet sich die Anpassungsgüte der Funktion an die experimentellen Daten an. Häufig wird das Bestimmtheitsmaß R^2 als einfaches Maß für die Anpassungsgüte betrachtet. Bei nicht-linearen Kurvenanpassungen verliert R^2 allerdings seine

Aussagekraft, da mehrere Modelle mit unterschiedlicher Anzahl Parameter verglichen werden und so die Grundvoraussetzungen für die Anwendung von R^2 nicht mehr gegeben sind.[163, 164] So liegen die Unterschiede in R^2 bei nicht-linearen Anpassungen von Modellen mit mehreren Parametern selbst bei höherer Varianz oft erst in der vierten Nachkommastelle.[164] Für solche Bewertungen können Informationskriterien wie AKAIKE'S *Information Criterion* (AIC) oder das Bayessche Informationskriterium (*Bayesian Information Criterion*, BIC) genutzt werden, welche die Reststandardabweichung (RSS) der Anpassung mit der Zahl der Datenpunkte N und der Zahl der Parameter P kombinieren und mittels Strafterm das weniger komplexe Modell bevorzugen.[165–167]

$$AIC = N \cdot \ln \frac{RSS}{N} + 2P \quad (2.10)$$

$$BIC = N \cdot \ln \frac{RSS}{N} + P \cdot \ln N \quad (2.11)$$

Beide Modelle sind sich mathematisch sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich in der Strenge des Strafterms. Das BIC eignet sich eher für große Stichproben (Datenpunkte), da dort der Strafterm logarithmisch mit der Anzahl Datenpunkte wächst, während beim AIC der Strafterm nur von der Zahl der Parameter abhängt. Bei beiden Modellen gilt, dass ein kleinerer Wert zu bevorzugen ist. Für das AIC existiert noch eine korrigierte Variante AIC_c für kleine Stichprobengrößen (Gleichung 2.12) mit $N/P < 40$, um das Problem des „Overfittings“, der Auswahl eines Modells mit zu vielen Parametern, zu minimieren.[168]

$$AIC_c = N \cdot \ln \frac{RSS}{N} + 2P + \frac{2P^2 + 2P}{N - P - 1} \quad (2.12)$$

Um die verschiedenen getesteten Modelle zu vergleichen, können die ermittelten AIC_c normiert und als Wichtungen w ausgedrückt werden. Dazu wird für jedes AIC_{c_i} die Differenz Δ_i zum niedrigsten Wert $AIC_{c_{min}}$ ermittelt.

$$\Delta_i = AIC_{c_i} - AIC_{c_{min}} \quad (2.13)$$

Mit den Δ_i -Werten lassen sich die Modelle aufsteigend ordnen und die Wichtungen w_i , sowie letztlich die Wahrscheinlichkeiten berechnet werden, dass das jeweilige Modell unter den untersuchten das genügsamste, also bei guter Restvarianz das einfachste, Modell ist.[167, 169]

$$w_i = \frac{\exp(-\Delta_i/2)}{\sum_{r=1}^R \exp(-\Delta_r/2)} \quad (2.14)$$

Das AIC_c liefert eine Aussage darüber, welches von den ausgewählten Modellen am Besten zu den experimentellen Daten passt. Es bewertet allerdings nicht, ob es das beste Modell unter allen möglichen Modellen ist.[3, 170, 171]

3

Spezieller Teil

3.1 Synthese ionischer Agarosederivate

Agarose bietet die Eigenschaft, thermoreversible Hydrogele zu bilden und kommt im Gegensatz zu Alginate und Carrageen ohne ionische Gelbildner aus. Dafür weisen Trägermaterialien aus Agarose zwar Biokompatibilität und Zellverträglichkeit, allerdings keine Zelladhäsion auf. Zudem bietet Agarose als neutrales Molekül kaum Möglichkeiten für elektrostatische Wechselwirkung mit Wirkstoffmolekülen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, ionische Agarosederivate zu synthetisieren und charakterisieren, die nach Möglichkeit die Eigenschaft der thermoreversiblen Gelbildung behalten, oder als Polyelektrolyte einsetzbar sind. Dafür wurden als anionisches Derivat Agarosesulfate und als kationisches Derivat Agaroseammoniumcarbamate hergestellt. Deren Eignung als Materialkomponente für die verzögerte Wirkstofffreisetzung wird im Anschluss in Kapitel 3.3 untersucht.

3.1.1 Synthese und Charakterisierung von Agarosesulfat

Die Veresterung von Polysacchariden mittels eines aktiven Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplexes ist eine gängige Möglichkeit zur Darstellung von Schwefelsäurehalbestern (im Folgenden Polysaccharidsulfate). [6, 172] Typischerweise wird die Reaktion (Abbildung 3.1) in aprotisch-polaren Lösemitteln wie DMF, DMAc oder organischen Basen wie Pyridin durchgeführt. Basierend auf eigenen Vorarbeiten in DMAc und DMF wurde die Veresterung von Agarose nun mit einem SO_3 -Pyridin-Komplex in der ionischen Flüssigkeit 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid ([BMIM]Cl) mit DMF als Co-Solvens durchgeführt. Durch den Einsatz von ionischer Flüssigkeit können schonendere Bedingungen während des Lösungsvorgangs und der Reaktion gewählt werden. Durch Variation des Molverhältnisses zwischen Reagenz und AGE sollten verschiedene durchschnittliche Substitutionsgrade (DS) erreicht werden.

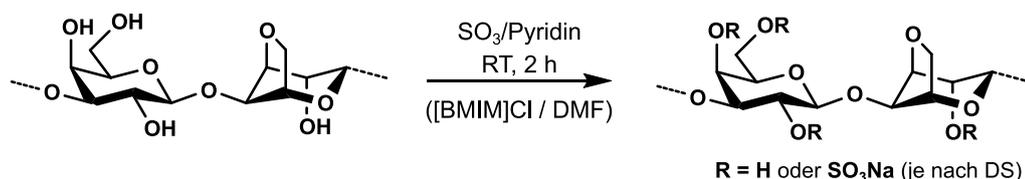


Abbildung 3.1: Reaktionsschema der Synthese von Agarosesulfat.

Durch Fällern und Waschen wurden zunächst [BMIM]Cl, DMF und Pyridin entfernt, durch Lösen in wässriger NaCl-Lösung und Neutralisierung mit NaHCO_3 tauschen dann noch verbleibende $[\text{BMIM}]^+$ -Kationen aus und führten zur Natriumform des Agarosesulfats, welches durch erneutes Fällern und Waschen gereinigt wurde. In Tabelle 3.1 ist ein Überblick über die verschiedenen Synthesen, ihre Parameter sowie die resultierenden DS und das Lösungsverhalten der Produkte in verschiedenen Lösemitteln dargestellt.

Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen und Ergebnisse der Synthesen von Agarosesulfaten durch Umsetzung von Agarose mit SO₃-Pyridin-Komplex in Mischungen von 1-Butyl-3-imidazoliumchlorid und *N,N*-Dimethylformamid bei Raumtemperatur.

Nr.	Moläq. SO ₃ /Py ^a	DS ^b	Ausbeute %	Löslichkeit ^c			
				H ₂ O RT	H ₂ O 80 °C	DMSO RT	DMSO 80 °C
AGS01	0,5	0,18	93	–	g	+	+
AGS02	1	0,49	80	–	g	+	+
AGS03	2	0,57	86	–	g	+	+
AGS04	3	0,65	91	+	+	+	+
AGS05	5	0,91	95	+	+	+	+

^a SO₃/Py: Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex

^b DS: durchschnittlicher Substitutionsgrad

^c + löslich; – nicht löslich; g löslich mit Gelbildung beim Abkühlen; DMSO: Dimethylsulfoxid; RT: Raumtemperatur.

Grundsätzlich lässt sich mit steigendem Einsatz an Reaktionsäquivalenten des SO₃-Pyridin-Komplexes auch eine Zunahme des DS beobachten. Die Ausbeuten betragen dabei durchweg über 80 %. Durch Variation des Molverhältnisses der Reaktanden konnten DS zwischen 0,18 (**AGS01**, 0,5 Äq.) und etwa 0,91 (**AGS05**, 5 Äq.) erreicht werden. Auffallend ist dabei, dass die DS bei 1, 2 und 3 Äquivalenten mit 0,49, 0,57 und 0,67 sehr nah beieinander liegen.

Vogl *et al.* zeigten bei der Sulfatierung von (1→4)-β-D-Galactan in DMF einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetztem Reagenz und resultierendem DS.[124] Auch eigene Vorarbeiten, bei denen Agarose bei 140 °C in DMAc gelöst und anschließend bei Raumtemperatur mit SO₃/Pyridin umgesetzt wurde, zeigten diesen Trend. Bei der Verwendung von [BMIM]Cl als Lösemittel war dieser Trend nicht über alle Reaktionsäquivalente zu beobachten. Die Verdopplung des Molverhältnisses von 0,5 auf 1 führte zu einem deutlichen Anstieg des DS von 0,18 auf 0,49. Die Zugabe von 2, 3 und 5 Äquivalenten erhöhte den DS dann nur noch langsamer, allerdings in ebenfalls linearer Abhängigkeit bis auf einen Wert von 0,91. Während alle hergestellten Agarosesulfate in DMSO löslich waren, zeigte sich bei der Löslichkeit in Wasser (10 mg mL⁻¹) eine Abhängigkeit vom durchschnittlichen Substitutionsgrad. Bis zu einem DS von etwa 0,6 waren die Agarosesulfate genau wie native Agarose bei Raumtemperatur nicht wasserlöslich. Sie lösten sich zwar nach Erwärmen auf 80 °C, bildeten aber beim Abkühlen wieder ein Gel. Dieses wurde mit zunehmendem DS allerdings instabiler. Ab einem DS von 0,65 lösten sich die Agarosesulfate bereits bei Raumtemperatur in Wasser und bildeten kein Gel mehr aus. Eine Zugabe von 1 M CaCl₂- oder KCl-Lösung führte zu keiner Vernetzung oder Fällung des Polymers. Agarosesulfat unterscheidet sich somit stark von Alginat oder den ebenfalls sulfatierten Carrageenen, welche ionotrope Gelierung mit Ca²⁺ bzw. K⁺ aufweisen.

Ein FT-IR Spektrum des synthetisierten Agarosesulfats (**AGS04**) im Vergleich zu nativer Agarose ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Zuordnung der Banden erfolgte durch Vergleich mit entsprechender Literatur.[173–175] Die grundlegenden Banden der Agarose finden sich auch im Agarosesulfat wieder. Besonders prominent sind dabei die Streck-, Schaukel- und Drehschwingungen der Methylengruppe (ν : um 2900, τ : 930, ρ : 773 cm⁻¹) sowie die Banden der Hydroxylgruppen, letztere als Streckschwingung (ν) bei 3400 cm⁻¹ und Biegeschwingung (δ) bei 1401 cm⁻¹. Daneben sind noch die asymmetrische Streckschwingung der Acetalstruktur

(C–O–C) bei 1160 cm^{-1} und die Streckschwingung der C–O-Bindung bei 1070 cm^{-1} gut zuzuordnen. Für das Agarosesulfat finden sich zusätzlich die asymmetrische und symmetrische Streckschwingung der Sulfatgruppe selbst bei 1250 und 1073 cm^{-1} sowie die asymmetrische und symmetrische Streckschwingung der S–O–C-Struktur bei 1006 und 817 cm^{-1} . Darüber hinaus finden sich keine unerwarteten Banden wieder, welche auf Verunreinigungen der Probe schließen lassen würden.

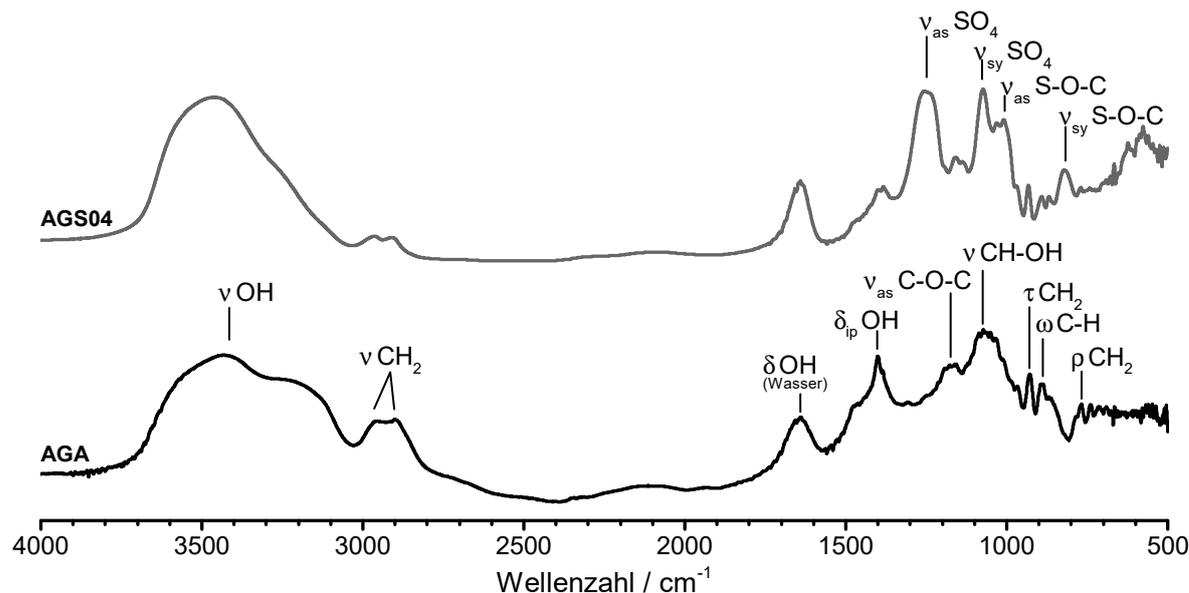


Abbildung 3.2: FT-IR Spektrum von Agarosesulfat. Vergleich mit nativer Agarose (AGA) und zugeordneten Schwingungen. Bei Agarosesulfat (AGS) sind nur die zusätzlichen Banden der Sulfatgruppe markiert. Zuordnung entsprechend der Literatur.[173–175]

Das ^{13}C -NMR-Spektrum des Agarosesulfats (Abb. 3.3) zeigt grundsätzlich noch ähnliche Signale wie unsubstituierte Agarose, deren Signale entsprechend der Literatur zugeordnet wurden.[127] Das auffällige Signal der G6-Position bei 60 ppm nimmt mit zunehmendem DS ab und fehlt bei **AGS05** ($DS = 0,91$) komplett. Stattdessen finden sich zwei neue markante Signale bei 65 ppm und 73 ppm, welche von den Kohlenstoffatomen G6 und G5 nach der Sulfatierung an G6 zuzuordnen sind. Dies deutet darauf hin, dass zunächst selektiv die primäre Hydroxylgruppe an G6 sulfatiert wird. Die Aufspaltung des LA1-Signals bei 98 ppm, welche ab einem DS von 0,66 sichtbar wird, stammt von einer partiellen Substitution am LA2-Kohlenstoffatom, welches selbst allerdings kein eindeutig identifizierbares Signal erzeugt, aber die chemische Umgebung der Atome verändert.

Die Reaktion von Polysacchariden mit $\text{SO}_3/\text{Pyridin}$ -Komplex zu Sulfathalbestern ist eine in der Literatur weit verbreitete Methode zur gezielten Sulfatierung von Polysacchariden.[6] Auch zur Sulfatierung von Agarose gibt es einige Studien, welche die Reaktion meist in DMF oder DMAc durchführen. Allerdings gibt es nur wenige systematische Daten, in denen Reaktionsbedingungen und resultierender DS untersucht wurden. Liang *et al.* deren Hauptfokus auf Carrageen lag, berichteten einen DS von 1,81 und eine Sulfatierung der Agarose an G6 und LA2, allerdings ohne Angabe genauer Mengen eingesetzter Chlorsulfonsäure.[140] Die zugrundeliegende Präparationsmethode von Jie *et al.* berichtete einen DS von 0,17 bei Einsatz von etwa 4,5 Äq. Chlorsulfonsäure, bzw. einen DS von 0,43 bei etwa 9 Äq. und Reaktionen an

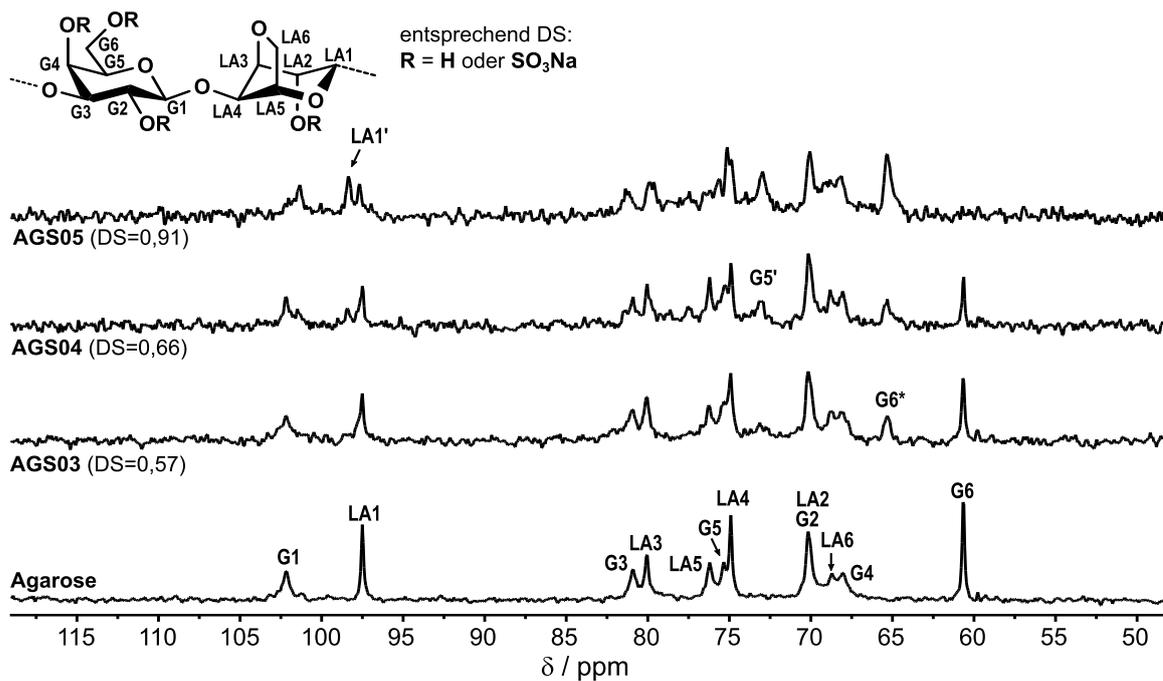


Abbildung 3.3: ^{13}C -NMR-Spektren von Agarosesulfat. Dargestellt sind **AGS05** ($DS = 0,91$), **AGS04** ($DS = 0,66$) und **AGS03** ($DS = 0,57$) mit zugeordneten Signalen im Vergleich zu unsubstituierter Agarose. Ein Apostroph bezeichnet das jeweilige Atom bei Substitution an Position G6, bzw. LA2. Gemessen in DMSO bei 333 K.

G6 und LA3.[176] Wie bereits erwähnt, zeigten vergleichbare Studien an 1,4- β -D-Galactan[124] und eigene Vorarbeiten zur Sulfatierung[177] von Agarose in DMAc und DMAc/LiCl eine fast lineare Abhängigkeit von DS und eingesetzten Reaktionsäquivalenten bei regioselektiver Sulfatierung der G6-Position und erst anschließender Sulfatierung der LA2-Position. Bei Nutzung von [BMIM]Cl als Lösemittel sind mildere Reaktionsbedingungen möglich und es findet ebenfalls eine regioselektive Sulfatierung an G6 und LA2 statt.

3.1.2 Synthese und Charakterisierung von Agarosephenylcarbonat

Neben anionischen Agarosederivaten sind auch kationische Derivate für den Einsatz in der verzögerten Wirkstofffreisetzung interessant. Damit ließen sich anionische Wirkstoffe über elektrostatische Wechselwirkungen besser zurückhalten. Um derartige Derivate zu synthetisieren, wurde ein zweistufiger Ansatz gewählt. Zunächst wurde Agarose zu einem Phenylcarbonatderivat umgesetzt, welches anschließend durch Umsetzung mit verschiedenen ionischen Aminen zu den entsprechenden funktionalen Agarosecarbamaten weiter reagierte. Die Synthesen erfolgten in Anlehnung an zuvor beschriebene Umsetzungen von Cellulose[178] und Xylan[179]. Das Carbamat ist hydrolysebeständiger als der Ester, aber dennoch besser spaltbar als ein Amid. Im ersten Schritt erfolgte die Umsetzung von Agarose mit Phenylchlorformiat in [BMIM]Cl mit Pyridin als Co-Solvens (siehe Schema in Abbildung 3.4).

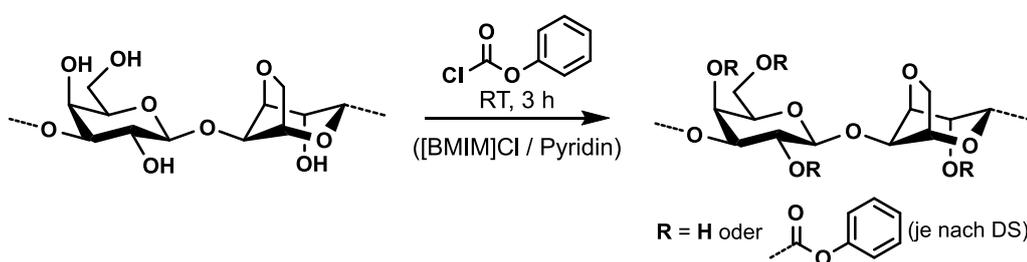


Abbildung 3.4: Reaktionsschema der Synthese von Agarosephenylcarbonat.

Pyridin erfüllte an dieser Stelle zwei Funktionen: zum einen verdünnt es die Reaktionsmischung und setzt die Viskosität herab, was zu einer besseren Durchmischung der Reaktanden führt. Zum anderen fungiert es als Base und fängt so entstehendes HCl während der Reaktion ab. Durch den Einsatz von ionischer Flüssigkeit sind zudem milde Reaktionsbedingungen für die Veresterung möglich und es finden im Vergleich zu Reaktionen in DMF oder DMAc weniger Nebenreaktionen mit dem Lösemittel statt.[180, 181] Die entstandenen Produkte sind unlöslich in Wasser und wurden durch Fällen in Eiswasser und anschließenden Waschen und Umfällen isoliert. Dabei entstand ein lockerer, weißer Feststoff. Durch Variation der Menge an eingesetztem Reagenz sollten verschiedene durchschnittliche Substitutionsgrade erzielt werden, die Ergebnisse der Synthesen sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen und Ergebnisse der Synthesen von Agarosephenylcarbonaten durch Umsetzung von Agarose mit Phenylchlorformiat in Mischungen von 1-Butyl-3-imidazoliumchlorid und Pyridin bei Raumtemperatur.

Nr.	Moläq. PCF ^a	DS ^b	Ausbeute %
APC01	1	0,12	96
APC02	2	0,24	96
APC03	3	0,52	93
APC04	4	1,01	95
APC05	5	0,98	93

^a PCF: Phenylchlorformiat

^b DS: durchschnittlicher Substitutionsgrad

An den Derivaten **APC01** bis **APC05** wird deutlich, dass sich durch Zugabe von mehr Reagenz auch der durchschnittliche Substitutionsgrad erhöht. So führte ein Reaktionsäquivalent zu einem DS von 0,12, zwei Äquivalente zu einem DS von 0,24 und drei Äquivalente zu einem DS von 0,52. Mit vier Äquivalenten Phenylchlorformiat wurde ein DS von 1,01 erreicht, der durch Einsatz von fünf Äquivalenten nicht weiter erhöht wurde.

Das FT-IR-Spektrum (siehe Abb. 3.9) zeigte die für ein Phenylcarbonat erwarteten Banden, die genauen Lagen werden in Kapitel 3.1.3 beschrieben und erläutert, da dort auch der Vergleich mit dem Agarosecarbammat getroffen wird. Das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 3.5) zeigt **APC04**, welches einen durchschnittlichen Substitutionsgrad von $DS = 1,01$ aufweist.

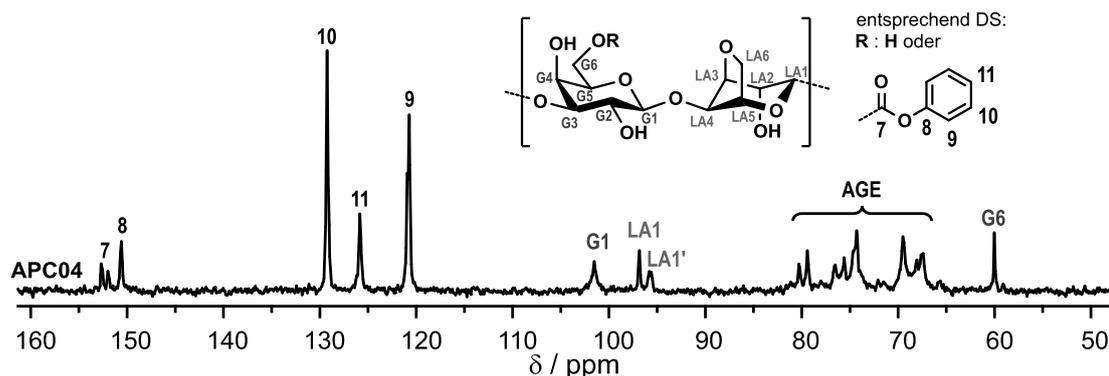


Abbildung 3.5: ^{13}C -NMR-Spektrum von Agarosephenylcarbonat. Dargestellt ist **APC04** mit einem durchschnittlichen Substitutionsgrad von $DS = 1,01$ und zugeordneten Signalen. Gemessen in DMSO bei 333 K und 100 MHz.

Neben den Signalen des Agarosegerüsts (AGE) finden sich im Tieffeld die markanten Signale des Phenylsubstituenten bei 120–130 ppm und 150 ppm und auch das Signal des Carbonylkohlenstoffatoms bei 152 ppm. Ausgehend von der Aufspaltung des LA1- und des Carbonyl-Signals und der Tatsache, dass das Signal der G6-Position auch bei $DS = 1,01$ noch deutlich vorhanden ist, dürfte die Reaktion bei höheren Mengen Reagenz nicht regioselektiv an G6 ablaufen, sondern sowohl die G6- als auch die LA2-Position der Agarose verestert werden. Dies wird auch durch einen Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren verschiedener DS (siehe Abb. 3.6) deutlich. Bei niedrigen DS bis 0,52 spalten sich weder das LA1-Signal noch das Signal des Carbonylkohlenstoffs auf, was zunächst für die regioselektive Reaktion an G6 spricht. Bei den beiden Derivaten mit einem DS von 1 hingegen ist in beiden Fällen die Aufspaltung der Signale des zu beobachten, während das Signal des unsubstituierten G6-Kohlenstoffatoms noch vorhanden ist.

In der Studie von Seidi *et al.*, in dem ebenfalls Agarose zunächst zum Phenylcarbonat und anschließend zum Carbamat umgesetzt wurde, nutzten die Autoren DMAc/Pyridin als Lösemittel und führten die Reaktion nur mit einem stöchiometrischen Verhältnis von 2 zu 1 durch und erhielten ein Produkt mit einem DS von 0,5.[126] Die Autoren geben allerdings keine Information darüber, an welchen Positionen der Agarose die Reaktion ablief. Im Gegensatz dazu konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten Reaktionsführung eine gezielte Einstellung des DS bei hohen Ausbeuten erreicht werden. Bei niedrigeren Reaktionsäquivalenten läuft die Reaktion zudem bevorzugt an der primären Hydroxylgruppe am G6-Kohlenstoff ab. Die gute Reproduzierbarkeit deckt sich mit den Ergebnissen von Gabriel *et al.* an Reaktionen

mit Xylan.[179] Die dort erreichten Substitutionsgrade liegen zudem deutlich niedriger als die bei Reaktion von Cellulose in DMAc/LiCl[182] und erlauben so eine gezielte Einstellung des Substitutionsgrades und somit der Eigenschaften des finalen Produkts.

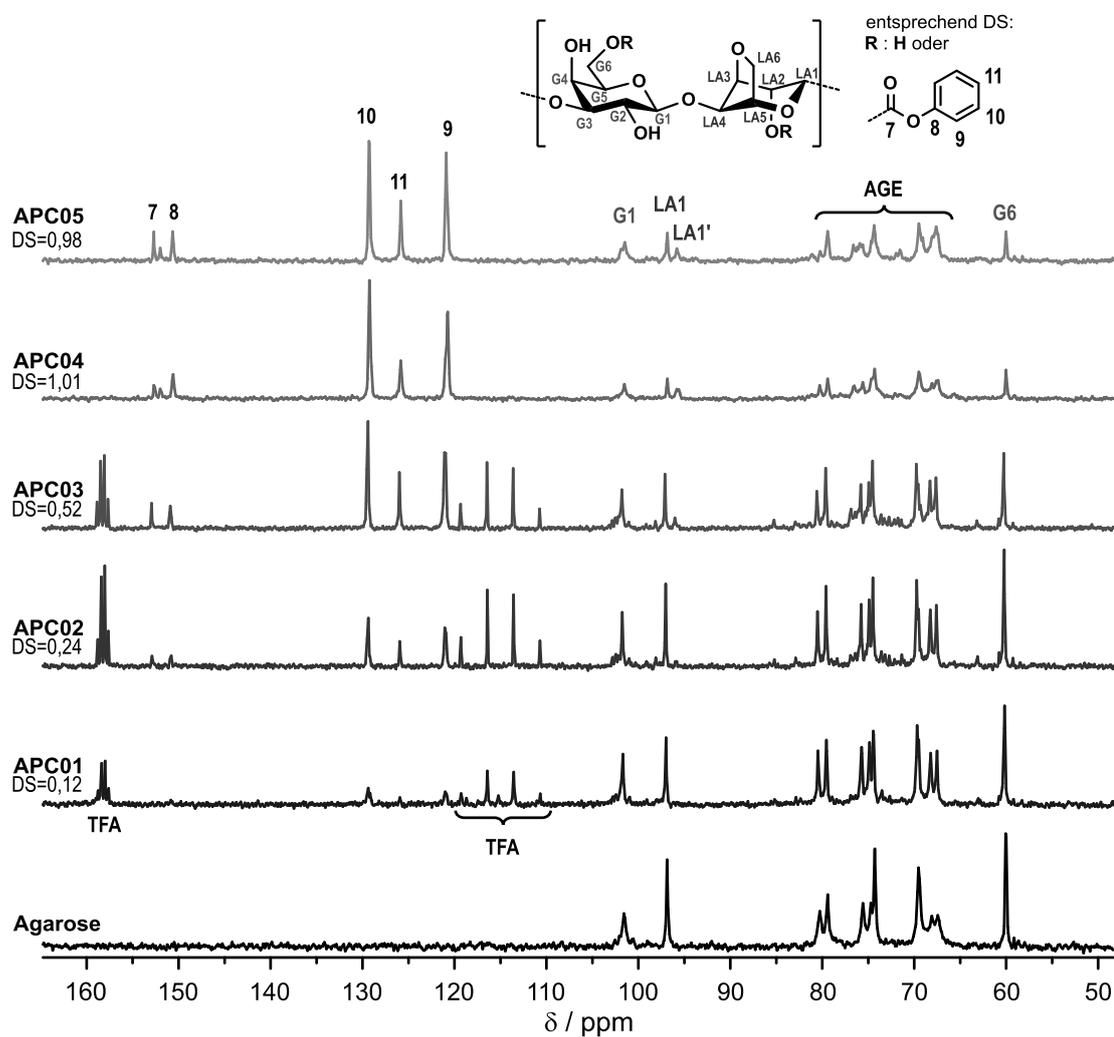


Abbildung 3.6: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von Agarosephenylcarbonaten. Dargestellt sind die verschiedenen APC im Vergleich mit unsubstituierter Agarose und zugeordneten Signalen des Substituenten. Bei höheren DS wird neben der G6-Position auch die LA2-Position substituiert, was zur Aufspaltung der Signale LA1 und 7 führt. Gemessen in DMSO bei 333 K und 100 MHz. TFA: Trifluoressigsäure

3.1.3 Synthese und Charakterisierung von Agarosecarbamat

Für die Umsetzung des Agarosephenylcarbonats zum kationischen Carbamat sind grundsätzlich zwei Synthesewege denkbar. In Variante Eins würde zunächst das Carbonat mit 3-(Dimethylamino)propylamin (DMAPA) zum Carbamat umgesetzt und anschließend an der tertiären Aminogruppe methyliert. In Variante Zwei wird zunächst DMAPA zum quartären Ammoniumsalz methyliert und anschließend mit dem Carbonat zum Carbamat umgesetzt. In dieser Arbeit wurde Variante Zwei angewendet. Diese hat den Vorteil, in einem Schritt größere Mengen des Amins herzustellen und nur eine Reaktion am Polysaccharid durchzuführen, sodass weniger Abbau und Verlust bei Reaktion und Aufarbeitung zu erwarten sind. Für die Synthese des Reagenzes wurde die Methylierung von DMAPA mit Iodmethan (CH_3I) gewählt. Durch die Zugabe etwa äquimolarer Mengen CH_3I zu DMAPA soll dabei zunächst selektiv das tertiäre Amin erschöpfend methyliert werden, bevor die Methylierung der primären Aminogruppe beginnt.[179, 183] Sofort nach Zugabe von DMAPA zum vorgelegten CH_3I fiel ein sehr feiner, weißer Feststoff aus. Nach Filtration, Abrotieren von restlichem THF und anschließendem Trocknen am Vakuum blieb mit einer Ausbeute von rund 76 % ein gelbes, hygroskopisches Produkt zurück, das weiter unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt wurde. Die Elementaranalyse ergab eine Methylierung von 1,06 pro mol DMAPA. Die Zugabe von 1,1 Moläquivalenten CH_3I führte demnach zu einer fast vollständigen Umsetzung des Methyljodids. Die Charakterisierung erfolgte mittels NMR.

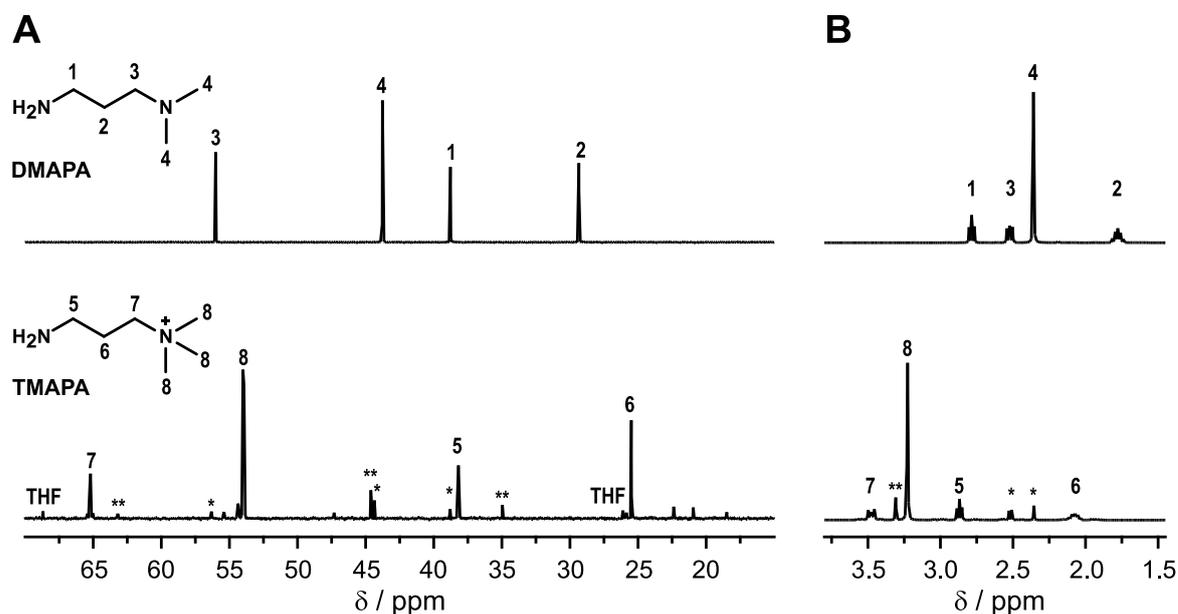


Abbildung 3.7: ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektren von DMAPA und TMAPA. **A:** ^{13}C -NMR-Spektren (100 MHz) mit Zuordnung der wichtigsten Kohlenstoffsignale. **B:** ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) mit Zuordnung der Protonensignale an den nummerierten Kohlenstoffen. Die Spektren von TMAPA enthalten Signale von nicht umgesetztem Edukt (*) und Signale von Produkten mit methylierter primärer Aminogruppe (**). Gemessen in D_2O bei Raumtemperatur.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 3.7A) zeigen sich bei DMAPA nur die vier zu erwartenden Signale der Propylenkohlenstoffe (29,3, 38,8 und 56,0 ppm) und Methylkohlenstoffe (43,8 ppm). Für das methylierte Produkt TMAPA finden sich die drei Signale der Propylengruppe (25,5, 38,1 und 65,2 ppm) sowie das intensive Signal der drei stickstoffgebundenen Methylgruppen

(54,0 ppm). Im Vergleich zu DMAPA sind die Signale der Methylgruppen und der Methylengruppe nahe der quartären Stickstoffs durch den ionischen Charakter der Ammoniumgruppe um rund 10 ppm ins Tieffeld verschoben, während die übrigen beiden Methylengruppen leicht ins Hochfeld verschoben sind. Durch den Einsatz von 1,1 Moläquivalenten CH_3I finden sich neben den vier Hauptsignalen allerdings noch weitere Signale aus nicht umgesetztem DMAPA. Zudem ist das Signal bei 35,0 ppm ein Hinweis darauf, dass zu einem kleinen Teil auch die primäre Aminogruppe methyliert wurde, da es in einem Bereich liegt, in dem typischerweise die Methylgruppe sekundärer Amine liegen.[174] Vergleichbare Aussagen lassen sich auch beim Blick in das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 3.7B) treffen. Das Spektrum von DMAPA besteht aus dem Singulett der sechs Methylprotonen bei 2,36 ppm, den beiden Triplets (2,51 und 2,77 ppm) und dem Quintett (1,77 ppm) der drei Methylengruppen. Auch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von TMAPA zeigt die vier erwarteten Signale: Das Singulett der neun Methylprotonen bei 3,23 ppm sowie die drei Signale der Propylengruppe. Allerdings sind ebenfalls zusätzliche Signale sichtbar: Signale des Edukts DMAPA (2,36 ppm und 2,51 ppm) und die Methylierung der freien Aminogruppe bei 3,32 ppm. Durch Integration der Singulets bei 3,23 ppm (9H, Trimethylammonium) und 3,32 ppm (3H, Methylamin) kann ein Verhältnis von etwa 9 zu 0,61 festgestellt werden, wonach etwa 6,8 % der primären Aminogruppen methyliert wurden. Dies korreliert gut mit dem berechneten Methylierungsgrad von 1,06, welcher bei 100 % Methylierung der tertiären Aminogruppe zusätzlich eine Teilmethylierung von etwa 6 % der primären Aminogruppe suggeriert.

Die Aminolyse des Agarosephenylcarbonats (APC) mit (3-Aminopropyl)trimethylammoniumiodid (TMAPA) (Reaktionsschema in Abbildung 3.8) erfolgte analog zu Arbeiten an Cellulose und Xylan.[178, 179] Der durch Fällung in Ethanol isolierte Feststoff war sehr fein und von hellbrauner Farbe. Während der Dialyse entfärbte sich das Produkt weitestgehend und resultierte nach der Trocknung in einem hellgelben, hygroskopischen Produkt.

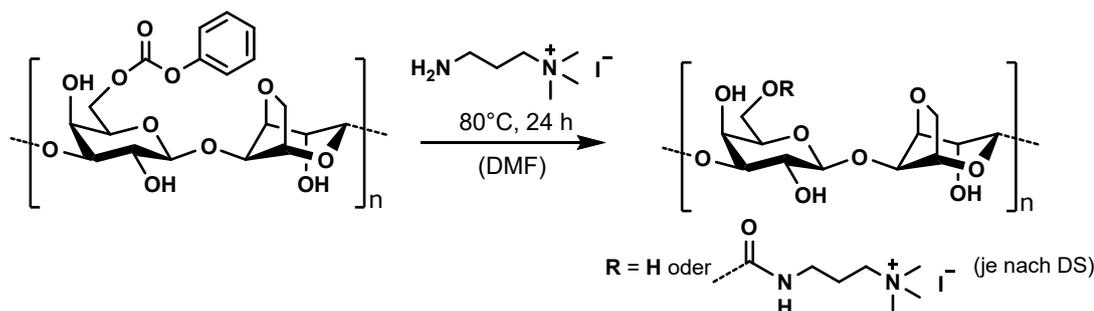


Abbildung 3.8: Reaktionsschema der Synthese von Agarosecarbamat.

Die Ergebnisse der Carbamatsynthesen sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Sie zeigen, dass sowohl der durchschnittliche Substitutionsgrad, als auch die Effizienz (Umsatz der Phenylcarbonatgruppen in Carbamatgruppen je Moläquivalent) abhängig vom eingesetzten Molverhältnis an TMAPA sind. So führt 1 Äquivalent zu einer Umsetzung von etwa 35 % der jeweiligen Phenylcarbonatgruppen, 3 Äquivalente zu einer Umsetzung von etwa 60–70 % und 5 Äquivalente zu einer Umsetzung von etwa 90 %, wobei die Effizienz der Aminolyse auf 18 bis 24 % sinkt. Die erzielten Ausbeuten liegen mit 80–90 % in einem akzeptablen Rahmen. Alle Derivate lösen sich bei 80 °C in Wasser, die Proben mit einem niedrigen Substitutionsgrad bis

Tabelle 3.3: Reaktionsbedingungen und Ergebnisse der Synthesen von Agarosecarbamaten durch Umsetzung von Agarosephenylcarbonat mit (3-Aminopropyl)trimethylammoniumiodid in *N,N*-Dimethylformamid bei 80 °C.

Nr.	Edukt	DS _{PC} ^a	Moläq. TMAPA ^b	DS _{CA} ^a	Ausbeute %	Effizienz ^c %	Löslichkeit ^d	
							H ₂ O	
							RT	80 °C
ACA01	APC02	0,24	1	0,07	88	33	–	g
ACA02	APC03	0,52	1	0,20	83	38	–	g
ACA03	APC03	0,52	3	0,31	90	20	–	g
ACA04	APC05	0,97	1	0,36	81	37	+	+
ACA05	APC05	0,97	3	0,69	88	24	+	+
ACA06	APC05	0,97	5	0,86	91	18	+	+
ACA07	APC04	1,01	1	0,40	81	38	+	+

^a DS: durchschnittlicher Substitutionsgrad; PC: Phenylcarbonat; CA: Carbamat;

^b TMAPA: (3-Aminopropyl)trimethylammoniumiodid, Äquivalente bezogen auf DS_{PC}

^c Anteil des in Carbamat umgewandelten Phenylcarbonats pro Reaktionsäquivalent $DS_{CA}/(DS_{PC} \cdot Mol\ddot{a}q.) \cdot 100\%$

^d + löslich; – nicht löslich; g löslich mit Gelbildung beim Abkühlen. RT: Raumtemperatur

etwa 0,3 bilden beim Abkühlen wie Agarose ein Gel. Die Proben mit höherem DS (**ACA04-07**) lösen sich bereits bei Raumtemperatur in Wasser und bilden kein Gel mehr aus.

In Abbildung 3.9 ist ein Vergleich der FT-IR-Spektren von nativer Agarose, Agarosephenylcarbonat (**APC05**) und kationischem Agarosecarbamat (**ACA06**) dargestellt. Dabei wurden die markantesten Banden der jeweiligen Spektren entsprechend der Literatur zugeordnet.[173, 174] Die detaillierte Beschreibung der Banden nativer Agarose findet sich in Kapitel 3.1.1.

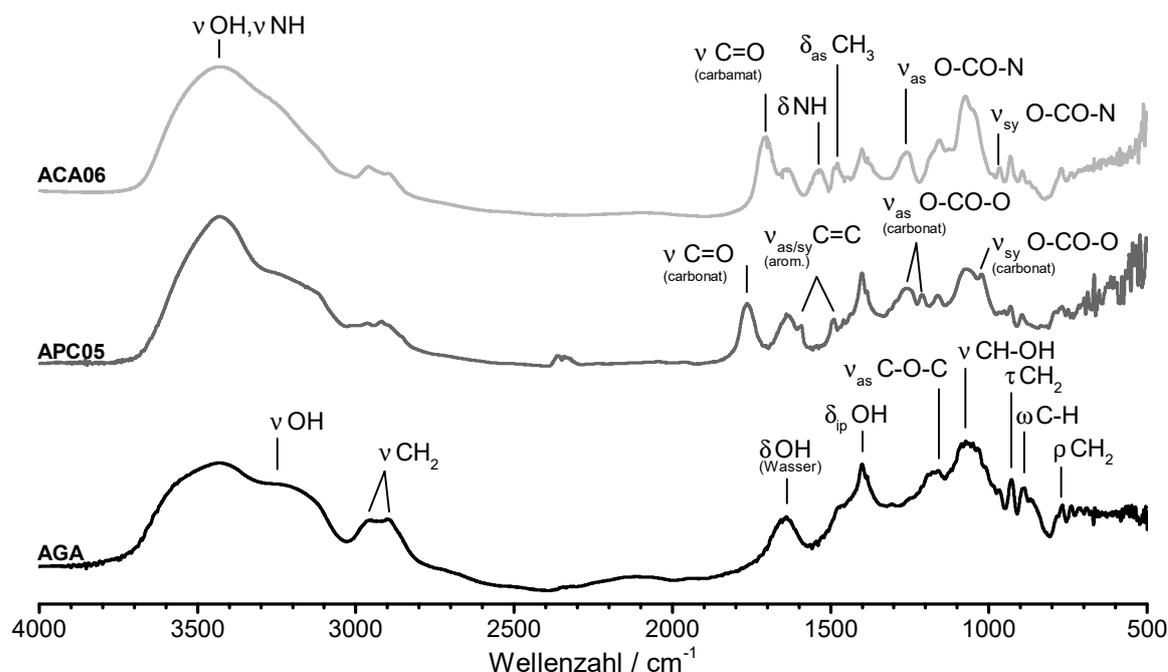


Abbildung 3.9: FT-IR Spektrum von Agarosephenylcarbonat und Agarosecarbamate. Vergleich mit nativer Agarose (AGA) und zugeordneten Schwingungen. Bei den Syntheseprodukten Agarosephenylcarbonat (APC) und Agarosecarbamate (ACA) sind nur die zusätzlichen Banden der funktionellen Gruppen markiert. Zuordnung entsprechend der Literatur.[173, 174]

Ergänzend zu den Banden nativer Agarose sind im Spektrum des Agarosephenylcarbonats die Streckschwingungen der Carbonatgruppe bei 1258, 1210 und 1022 cm^{-1} und die Carbonylbande bei 1764 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) sichtbar. Die asymmetrische und symmetrische Streckschwingung der Phenylgruppe liegt bei 1590 und 1490 cm^{-1} . Das aus dem Phenylcarbonat hergestellte Agarosecarbamat zeigt zunächst die zusätzlichen Schwingungen der N–H-Bindung (ν : 3400, auch O–H, δ : 1536 cm^{-1}) auf. Ebenfalls deutlich sichtbar ist die asymmetrische Biegeschwingung der Methylgruppen bei 1480 cm^{-1} . Die Streckschwingungen der O–CO–N-Struktur (ν_{as} : 1258 und ν_{sy} : 967 cm^{-1}) zeigen das Vorhandensein der Carbamatgruppe auf. Zudem zeigen die Carbonylbande der Carbamatgruppe bei 1706 cm^{-1} und die fehlende Carbonatcarbonylbande und Aromatenbanden deutlich, dass keine Phenylcarbonatgruppen mehr in der ACA-Probe vorhanden ist.

Auch im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 3.10) zeigte keine Probe restliche Phenylcarbonatgruppen (deutliche Aromatensignale im Bereich 120–130 ppm), sodass davon ausgegangen werden kann, dass aufgrund der langen Reaktionszeit alle Phenylcarbonatgruppen entweder unter Abspaltung von Phenol zum Carbamat umgesetzt werden oder mit Wasser aus Lösemittel und Luft hydrolysieren. Im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigen sich deutlich das Signal des Carbonylkohlenstoffs bei 156 ppm, sowie die Signale der Methylengruppen (22, 37 und 63 ppm) und Methylgruppen (52 ppm). Im Gegensatz zu den Agarosephenylcarbonaten zeigt das Agarosecarbamat keine Aufspaltung des Signals des Carbonylkohlenstoffs oder des LA1-Signals, sodass davon ausgegangen werden kann, dass lediglich die Phenylcarbonate an der G6-Position bei der Aminolyse in ein Carbamat umgewandelt wurden, während eventuelle Phenylcarbonate an der LA2-Position mit Wasser zu einer Hydroxylgruppe hydrolysierten.

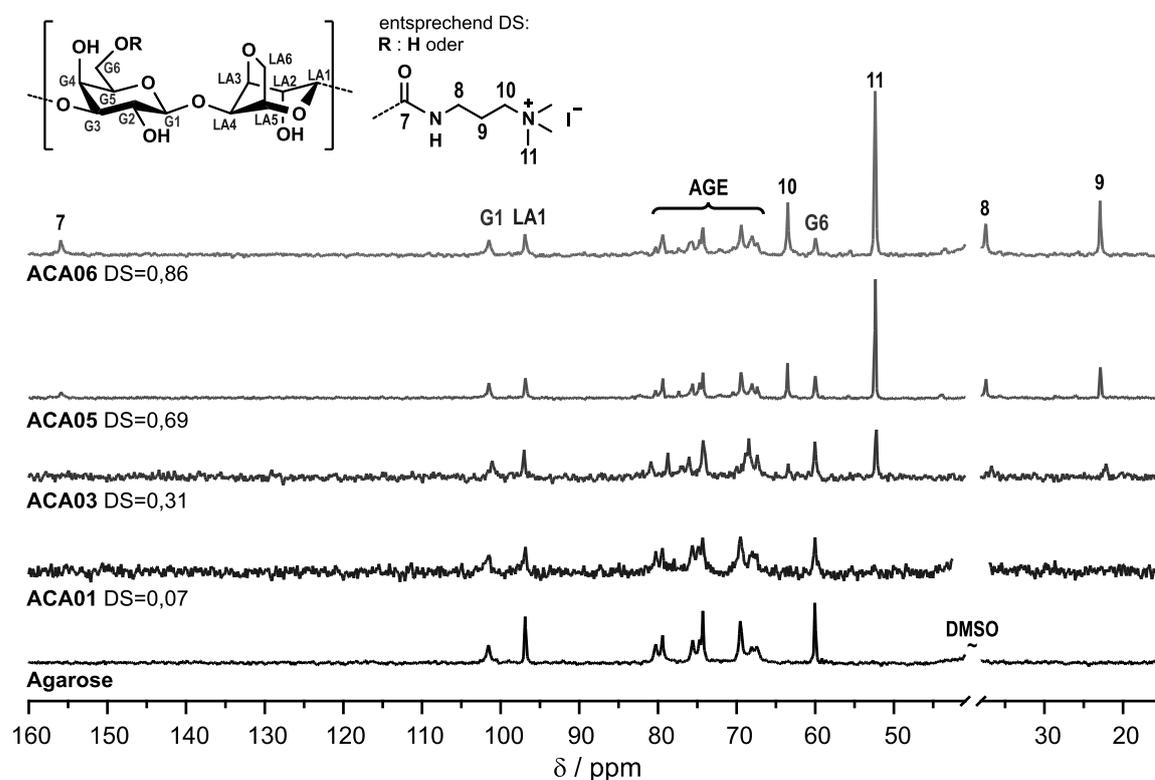


Abbildung 3.10: ^{13}C -NMR-Spektren von Agarosecarbamate. Dargestellt sind ausgewählte Proben verschiedener DS mit zugeordneten Signalen. Gemessen in DMSO bei 333 K.

Der in dieser Arbeit genutzte Reaktionsweg ist in exakt dieser Form für Agarose in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Seidi *et al.* führten die Aminolyse von Agarosephenylcarbonat ($DS_{PC} = 0,5$) mit DMAPA in THF für 15 h bei Raumtemperatur durch und erreichten bei Einsatz von 3 Äq. einen DS von 0,48 und damit unter anderen Reaktionsbedingungen und mit anderem Reagenz eine etwas bessere Effizienz als die Aminolyse in der vorliegenden Arbeit.[126] Bei analogen Reaktionen mit TMAPA an Xylan zeigten sich ebenfalls hohe Umwandlungsraten von Carbonat zu Carbamat bereits bei 2 Äq. mit Reaktionseffizienzen zwischen 34–47%.[179] Insofern sind die in dieser Arbeit hergestellten Agarosecarbamate damit gut vergleichbar und bestätigen die grundsätzliche Eignung des Reaktionswegs zur Synthese kationischer Agarosederivate.

3.2 Trägermaterialien und beschichtete Alginatmikrokapseln

Dieses Kapitel befasst sich mit der Herstellung und Charakterisierung agarosebasierter Trägermaterialien sowie der Herstellung und Charakterisierung der polyelektrolytbeschichteter Alginatmikrokapseln. Der Einsatz der Trägermaterialien und Kapseln für die verzögerte Wirkstofffreisetzung wird im Anschluss in Kapitel 3.3 untersucht.

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung von Trägermaterialien auf Agarosebasis¹

Die funktionellen Trägermaterialien für die Wirkstofffreisetzung wurden im Gelgießverfahren hergestellt. Dazu wurde Agarose in Lösung gebracht und anschließend in eine zylindrische Form gegossen und erkalten gelassen. Durch *in situ* Fällung von Hydroxyapatit und Beimischen der ionischen Agarosederivate wurden Komposite hergestellt (siehe Kapitel 4.4), die durch ihre Bestandteile die Wirkstofffreisetzung verzögern sollten. Die genauen Zusammensetzungen der Gele finden sich in Tabelle 4.2. Bei Abkühlen unter 35 °C bildete die Agarose ein formstabiles Gel, welches anschließend entformt, geschnitten und je nach Anwendung getrocknet werden konnte. Reine Agarosegele (**A**) bildeten ein farbloses, transparentes Hydrogel. Durch *in situ* Fällung von Hydroxyapatit (**AH**, **AH2**) bildeten sich weiße, opake Hydrogele. Die Zugabe von Agarosesulfat (**AH2S**) führte zu keiner Farbveränderung gegenüber den **AH2**-Gelen, während Zugabe von Agarosecarbamat (**AH2C**) in einem Gel mit gelblicher Farbe resultierte (Abb. 3.11). Die so erhaltenen Gele wurden mit verschiedenen Techniken hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften charakterisiert. Für die Freisetzungsexperimente wurde ein definiertes Volumen der jeweiligen Wirkstofflösung auf die gefriergetrockneten Gele aufgebracht und anschließend erneut lyophilisiert.

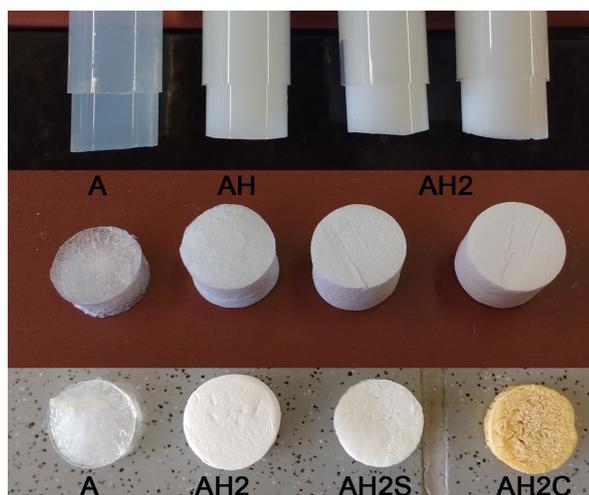


Abbildung 3.11: Beispiele der gefertigten Hydrogele (obere Reihe) und lyophilisierten Gele (mittlere Reihe). Lyophilisierte Gele mit ionischen Agarosederivaten (untere Reihe). **A:** native Agarose, **AH** und **AH2:** Kompositgele aus Agarose mit *in situ* gefälltem Hydroxyapatit, **AH2S** und **AH2C:** Kompositgele mit zugesetztem Agarosesulfat bzw. Agarosecarbamat. Durchmesser der Gele: 16 mm

¹Dieses Kapitel basiert in Teilen auf der Publikation M. Witzler et al., “Non-cytotoxic agarose/hydroxyapatite composite scaffolds for drug release”, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 3565, DOI 10.3390/ijms20143565.

Zur Bestätigung der Identität des Hydroxyapatits wurden Röntgendiffraktogramme (XRD) der gefriergetrockneten und gemörserten Gele **A** und **AH2** verglichen (Abb. 3.12). Als Vergleich wurde eine Hydroxyapatitprobe in Wasser anstelle der Agaroselösung bei ansonsten gleichen Bedingungen hergestellt, getrocknet und für zwei Stunden bei 500 °C behandelt. Die Diffraktogramme wurden gemäß Datenbankreferenz für Hydroxyapatit (JCPDS PDF No. 09-432) und nach Literaturwerten [185] indiziert und ausgewertet.

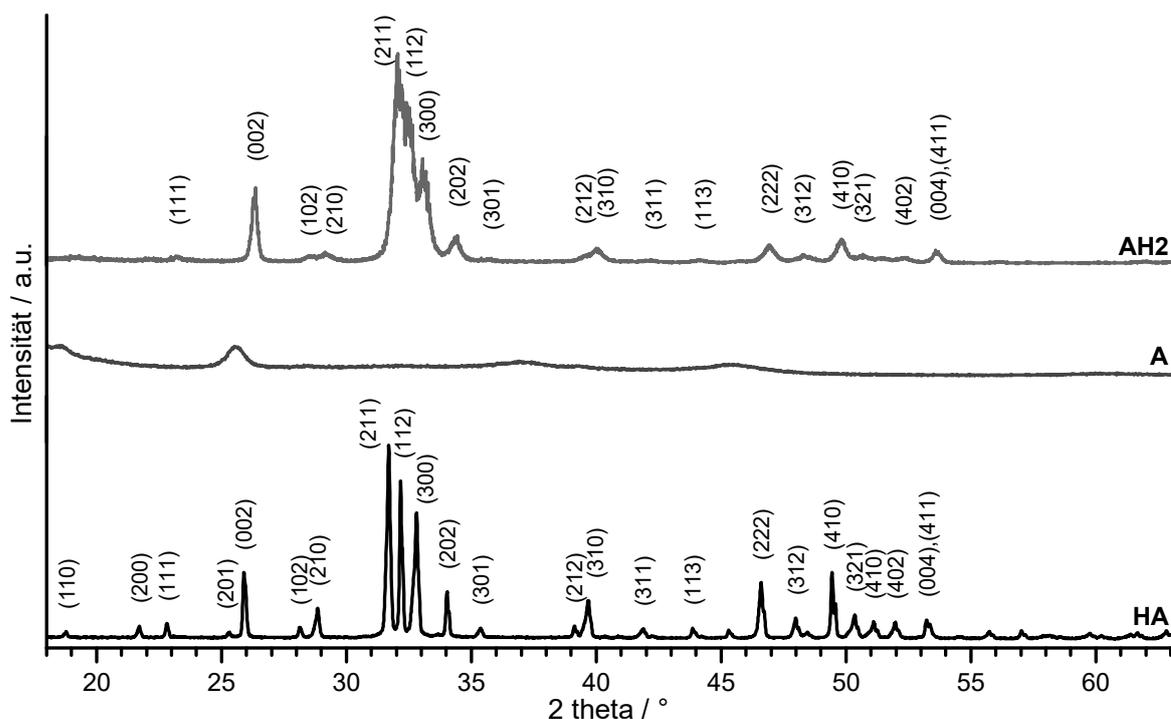


Abbildung 3.12: Röntgendiffraktogramme der Trägermaterialien. Das Komposit **AH2** im Vergleich zu nativer Agarose (**A**) und Hydroxyapatit (**HA**). Indizierung der HA-Reflexe erfolgte gemäß Literatur, in **AH2** sind die wesentlichen Reflexe des HA ohne Signale von Fremdphasen erkennbar.

Agarose (**A**) zeigte hauptsächlich einen amorphen Bereich bei niedrigen Reflexionswinkeln und einen schwachen Reflex bei etwa 25°, der von den wenigen teilkristallinen Bereichen im Gel stammt. Eine Indizierung erfolgte mangels Gitterparameter und Referenzdaten nicht. Die Signale des Hybridträgermaterials **AH2** waren durch das Agarosenetzwerk und die fehlende Temperaturbehandlung deutlich breiter als bei Hydroxyapatit, dennoch konnten alle Signale der Referenz zugeordnet werden. Ebenso konnten keine Fremdphasen im Kompositmaterial festgestellt werden. Eine Temperaturbehandlung des Hybridmaterials ergab an dieser Stelle wenig Sinn, da dabei die Agarose zerstört würde. Neben der Identität wurden zudem Kristallitgrößen und Kristallinitätsgrad bestimmt. Die Kristallitgrößen wurden über die Halbwertsbreite des (002)-Reflexes bestimmt und ergaben 1,04 nm für reinen Hydroxyapatit und 0,55 nm für **AH2**. Der Kristallinitätsgrad, ermittelt über die Signalschärfe zwischen den (112)- und (300)-Signalen (Gleichung 4.5, [186]), betrug 92,1 %, bzw. 37,8 %. Durch die hinzugefügte amorphe Agarose ist das **AH2**-System weniger kristallin und auch die Kristallite bleiben grundsätzlich kleiner. Außerdem ist eine leichte Verschiebung der Signale im Trägermaterial zu erkennen, was auf eine präferierte Kristallitbildung entlang des Agarosenetzwerks zurückzuführen ist. Dies stimmt mit ähnlichen literaturbekannten Kompositmaterialien aus Agarose und Hydroxyapatit überein,

auch dort lag der Kristallinitätsgrad im Bereich von 24–47 %.[93] Diese Komposite beinhalteten zwar auch *in situ* gefällten HA, allerdings wurden sie auf eine andere Art und Weise hergestellt.

Die Infrarotspektren der Kompositmaterialien sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Dabei zeigt das Kompositmaterial **AH2** Signale von sowohl Agarose (**A**) als auch Hydroxyapatit (**HA**).

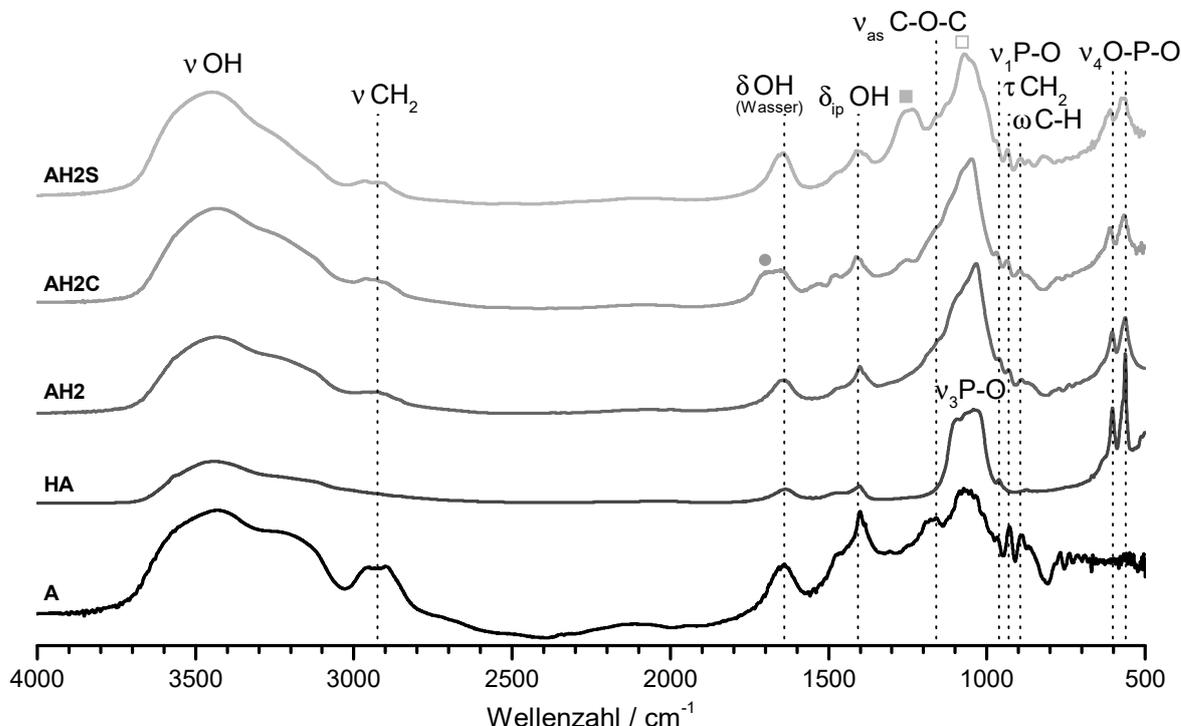


Abbildung 3.13: Infrarotspektren der Trägermaterialien. Vergleich der FT-IR-Spektren von Agarose (**A**), Hydroxyapatit (**HA**) und den Kompositmaterialien mit und ohne ionische Agarosederivate (**AH2**, **AH2C** und **AH2S**) mit zugeordneten Schwingungen. Die Symbole ●, ■ und □ bezeichnen Schwingungen funktioneller Gruppen der ionischen Agarosederivate.

Im Bereich zwischen 3000–3600 cm^{-1} liegen die breiten Valenzschwingungen der Hydroxylgruppen, sowie als Schulter bei 3572 cm^{-1} die Valenzschwingung der Hydroxylgruppe. Bei 2925 cm^{-1} kann die aliphatische asymmetrische C–H-Valenzschwingung der Methylengruppen in Agarose identifiziert werden. Die Deformationsschwingung der Hydroxylgruppen ($\delta(\text{OH})$) liegt bei 1636 cm^{-1} , wird aber auch von adsorbiertem Wasser überlagert. [173, 187] Bei 1406 cm^{-1} und 893 cm^{-1} finden sich die O–H-Deformationsschwingung sowie die C–H-Kippschwingung der Agarose, bzw. die Valenzschwingung ν_3 des carbonatsubstituierten Hydroxyapatits. [173, 187, 188] Das Carbonat stammt dabei aus der im Wasser gelösten Kohlensäure und wird zu einem geringen Teil bei der Fällung anstelle von Phosphat in das Hydroxyapatit-Kristallgitter eingebaut. Auch der im Körper *in vivo* gebildete Hydroxyapatit ist zum Teil carbonatsubstituiert.[33] Die schwache Acetalschwingung (C–O–C) findet sich bei etwa 1160 cm^{-1} sowohl bei Agarose als auch bei den Kompositen. Auch die schwache CH_2 -Schwingung bei 930 cm^{-1} kann dem Agarosegerüst zugeordnet werden. Aus dem Hydroxyapatit findet sich die sehr prominente dreifache asymmetrische $\nu_{3a-c}(\text{P–O})$ -Strettschwingung bei 1087, 1046 und 1032 cm^{-1} , sehr schwach die Carbonatvalenzschwingungen ν_2 und ν_4 bei 873 und 668 cm^{-1} sowie aus den Phosphatgruppen die $\nu_1(\text{P–O})$ -Valenzschwingung

(962 cm^{-1}) und die $\nu_4(\text{O-P-O})$ -Biegeschwingungen bei 602 und 561 cm^{-1} . [185, 188] Die Spektren der Trägermaterialien mit ionischen Agarose (**AH2S** und **AH2C**) sehen dem Spektrum von **AH2** sehr ähnlich. Die in Kapitel 3.1 beschriebenen Banden der ionischen Agarosederivate werden von den starken Signalen des Hydroxyapatits überlagert, sodass nur noch wenige charakteristische Banden erkennbar sind. Für **AH2C** ist das die $\nu(\text{C=O})$ -Valenzschwingung der Carboxylgruppe bei 1704 cm^{-1} (●) und für die **AH2S** die intensive Bande der asymmetrischen Valenzschwingung $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_4)$ der Sulfatgruppe bei 1250 cm^{-1} (■). Die symmetrische Valenzschwingung $\nu_{\text{sy}}(\text{SO}_4)$ bei 1077 cm^{-1} (□) ist durch die veränderte Bandenform ebenfalls erkennbar. Der Hydroxyapatit ist durch die zwei intensiven Banden um 600 cm^{-1} in allen Kompositproben gut identifizierbar.

Zu Bestimmung und Vergleich der Porosität der Komposite wurden Proben der Systeme **A** und **AH2** auf verschiedene Arten getrocknet und anschließend mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Besonderer Fokus wurde dabei auf den Vergleich von zwei verschiedenen Einfriermethoden mit anschließender Lyophilisierung gelegt. Zum einen wurde ein normaler Tiefkühler mit -32 °C für 24 h verwendet, zum anderen wurde das Material für 5 min in Flüssigstickstoff getaucht, was für kleine Proben eine Alternative zur Trocknung mit superkritischem CO_2 darstellen kann. [189] Die offene Porosität wurde über die Aufnahme von Ethanol der getrockneten Materialien bestimmt. Zusätzlich wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und anschließender Bildanalyse mit ImageJ die Porendurchmesser ermittelt. Die spezifische Oberfläche der Trägermaterialien wurde über die Gasadsorption der BET-Methode bestimmt. Die Ergebnisse für die beiden untersuchten Systeme sind in Tabelle 3.4, die Mikroskopaufnahmen befinden sich in Abbildung 3.14.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Porositätsmessungen von **A** und **AH2** mittels Ethanolinvasion, Porendurchmesser mittels REM und Bildanalyse und spezifischer Oberfläche A_{sp} ermittelt mit BET. Vergleich der Einfriermethoden mit anschließender Gefriertrocknung: LYO bezeichnet normales Einfrieren bei -32 °C , N_2L bezeichnet fünf-minütiges Eintauchen in flüssigem Stickstoff.

Probe	LYO			N ₂ L		
	Porosität %	Porengröße µm	A_{sp} $\text{m}^2\text{ g}^{-1}$	Porosität %	Porengröße µm	A_{sp} $\text{m}^2\text{ g}^{-1}$
A	64 ± 2	10–500	24 ± 4	85 ± 3	0,1–2,5	142 ± 8
AH2	79 ± 5	10–500	32 ± 4	95 ± 3	0,1–4	108 ± 6

Die konventionell lyophilisierten Gele weisen eine geringere Porosität, geringere spezifische Oberfläche und insgesamt größere Poren auf. In den REM-Aufnahmen erkennt man deutlich die großen Poren, die durch das langsame Einfrieren entstanden sind. In höherer Vergrößerung erkennt man zudem die durch die wachsenden Eiskristalle aufeinander gepressten Polymerschichten. Bei den Kompositen **AH2** sind zudem die Partikel des Hydroxyapatits deutlich erkennbar. Bei den schnell in Flüssigstickstoff eingefrorenen Proben ist sowohl bei reiner Agarose als auch bei **AH2** eine feine Netzstruktur erkennbar. Die Porengrößen liegen im Bereich von $0,1\text{--}4\text{ µm}$ und damit deutlich unter denen der konventionell lyophilisierten Proben. Auch die Porosität und spezifische Oberfläche sind deutlich höher und sind vergleichbar mit Proben, die durch Trocknung mit superkritischem CO_2 hergestellt wurden. [184] Durch das schnelle Einfrieren konnten hochporöse Proben hergestellt werden, die in der Struktur dem

3.2 Trägermaterialien und beschichtete Alginatmikrokapseln

ursprünglichen Hydrogel ähneln, wie es auch für Polysaccharid-Aerogele bekannt ist.[190, 191] Für eine dreidimensionale Zellbesiedelung wären diese Poren allerdings zu klein, da diese Porendurchmesser von mehreren hundert Mikrometern benötigen.[192]

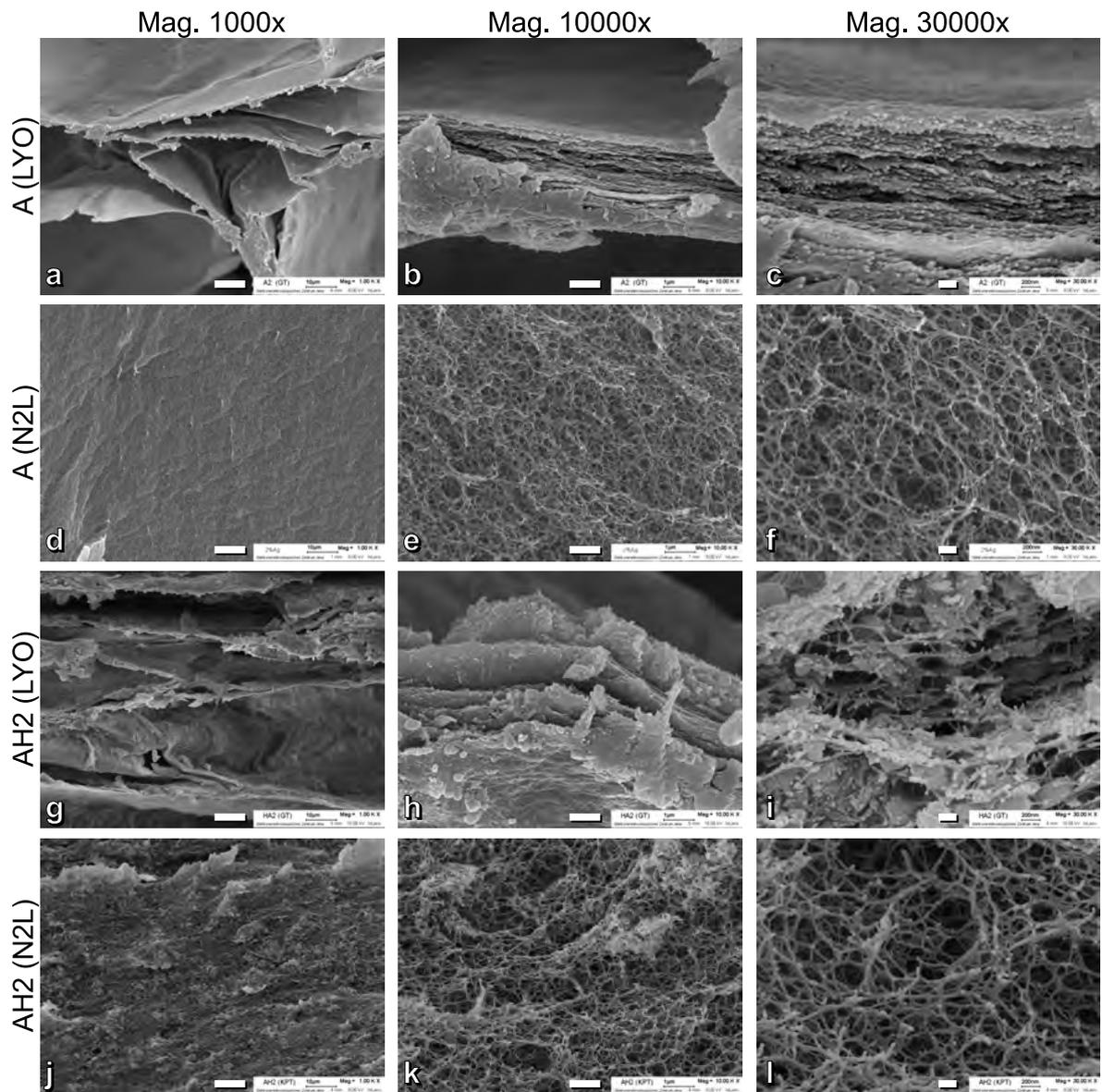


Abbildung 3.14: REM-Aufnahmen der Trägermaterialien. Vergleich der inneren Struktur von Agarose (**A**) und dem Kompositsystem (**AH2**) bei verschiedenen Vergrößerungsstufen. a-c und g-i zeigen normal gefrorene und lyophilisierte Proben (LYO), d-f und j-l zeigen in Flüssigstickstoff gefrorene und anschließend lyophilisierte Proben (N₂L). Der Maßstabsbalken zeigt 10 µm, 1 µm und 200 nm bei den entsprechenden Vergrößerungsstufen 1000, 10000 und 30000.

Die Zellverträglichkeit der Trägermaterialien wurde mittels MTT-Test sowohl an MSC als auch an mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC, Vorläuferzellen von Osteoklasten) untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 3.15) zeigen Zellviabilitäten von über 90 % für alle getesteten Materialien. Reine Agarose **A** und das mineralisierte Trägermaterial **AH2** zeigen für beide Zelllinien leicht erhöhte, bzw. unveränderte Zellviabilitäten im Vergleich zur positiven Kontrolle. Dies bedeutet, dass im inkubierten Testmedium in der Zellkultur mindestens genauso viele Zellen überleben wie in der Positivkontrolle. Die Ergebnisse decken sich mit bereits publizierten Biokompatibilitätstests an diesen Materialien für MSC und Präosteoblasten.[184]

Die Trägermaterialien mit den ionischen Agarosederivaten **AH2S** und **AH2C** schneiden ebenfalls gut ab und erreichen ebenfalls mindestens 75 % Zellviabilität. Die Ergebnisse zeigen, dass von den hergestellten Trägermaterialien keine direkten negativen Einflüsse auf die Zellviabilität zu erwarten sind.

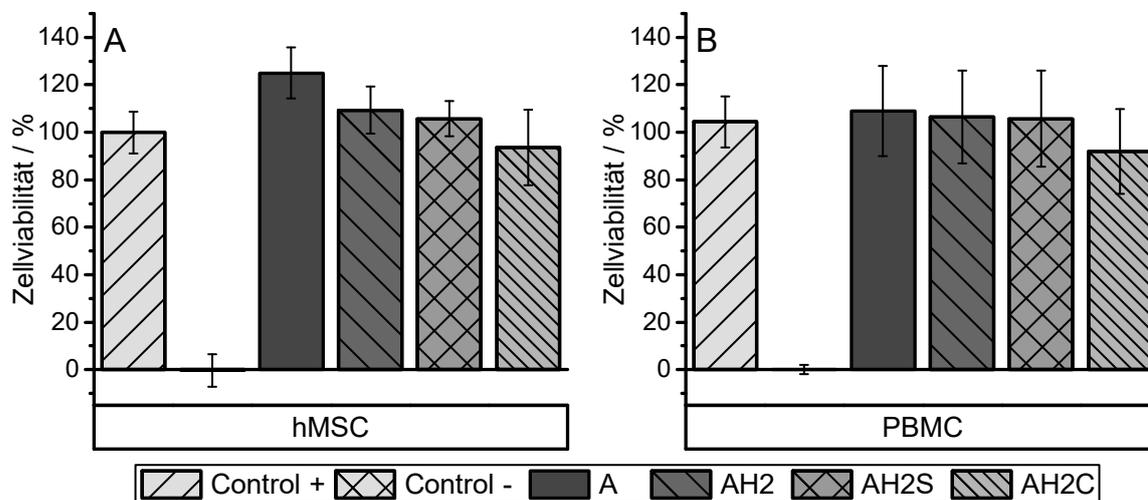


Abbildung 3.15: Biokompatibilität der Trägermaterialien. Überblick über die Ergebnisse des MTT-Tests der Trägermaterialien **A**, **AH2**, **AH2S** und **AH2C** im Vergleich zu positiver und negativer Kontrollmessungen. Getestet wurden hMSC und PBMC mit 20000 Zellen/Well. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 9$.

3.2.2 Herstellung und Charakterisierung der polyelektrolyt-beschichteten Alginatmikrokapseln²

Die Alginatmikrokapseln wurden über ein Sprühverfahren hergestellt und anschließend abwechselnd mit Agarosecarbamat und Agarosesulfat beschichtet (siehe Kapitel 4.4.3). Die Kapseln wurden hinsichtlich ihrer Größenverteilung, der Oberflächenladung nach jedem Beschichtungsvorgang und der Beladung mit Wirkstoff, bzw. der Verkapselungseffizienz untersucht.

Die Größenverteilung der Mikrokapseln wurde mithilfe von statischer Lichtstreuung (SLS) gemessen (Abb. 3.16). Dabei zeigte sich bei den unbeschichteten Alginatkapseln eine Verteilung von etwa 700–1100 μm und einer mittleren Größe von 870 μm . Die beschichteten Mikrokapseln liegen im gleichen Größenbereich, die mittlere Größe wurde mit etwa 890 μm gemessen. Da die Größenverteilungen eine große Spannweite von rund 400 μm aufweist, ist die Auftragung von Schichten im Nanometerbereich mit Hilfe der SLS nicht festzustellen.

Optische Digitalmikroskopaufnahmen (Abb. 3.17) bestätigen die Auftragung der Polyelektrolytschichten, da die beschichteten Kapseln eine leicht gelbliche Färbung aufweisen, was durch die Agarosecarbamatschichten (ACA) zu erklären ist. Das ACA hat selbst eine gelbliche Farbe und auch die Kompositgele bestehend aus Agarose, Hydroxyapatit und ACA (vgl. Abb. 3.11) ist gelb gefärbt. Die Größe der Kapseln im Bereich von etwa 700–1200 μm konnte mithilfe der Digitalmikroskopie ebenfalls bestätigt werden.

²Dieses Kapitel basiert in Teilen auf der Publikation M. Witzler et al., “Evaluating release kinetics from alginate beads coated with polyelectrolyte layers for sustained drug delivery”, *ACS Applied Bio Materials* **2021**, *4*, 6719–6731, DOI 10.1021/acsabm.1c00417.

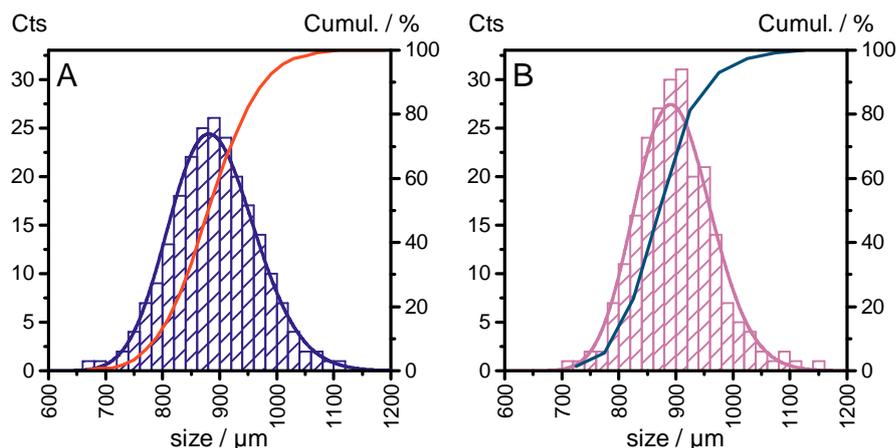


Abbildung 3.16: Größenverteilung der hergestellten Mikrokapseln, bestimmt mit statischer Lichtstreuung. Unbeschichtete Alginatkapseln (**A**, [193]) und mit fünf Doppelschichten Agarosecarbamat/Agarosesulfat (ACA/AGS) beschichtete Alginatmikrokapseln (**B**). Absolute Häufigkeiten und kumulativer Anteil.

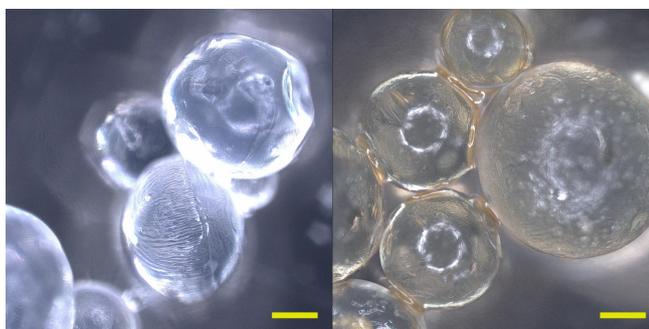


Abbildung 3.17: Digitalmikroskopische Aufnahme der Alginatkapseln **Alg** (links, entnommen aus [193]) und mit fünf Doppelschichten Agarosecarbamat/Agarosesulfat (ACA/AGS) beschichteten Alginatmikrokapseln **cap** (rechts). Maßstab: 250 µm.

Um das Aufbringen der einzelnen Polyelektrolytschichten zu überprüfen, wurde das ζ -Potential der Mikrokapseln nach jeder Auftragung gemessen (Abbildung 3.18). Zwar beschreibt das ζ -Potential nicht direkt die Oberflächenladung der Mikrokapseln, sondern das Potential der diffusen Ladungsschicht eines Partikels, dennoch kann über die Änderung des Potentials die Aufbringung unterschiedlich geladener Polyelektrolytschichten überprüft werden. Schicht Nummer 0 bezeichnet dabei die unbeschichtete Alginatkapsel, dort beträgt das ζ -Potential etwa -10 mV. Das Aufbringen der kationischen Schicht aus ACA (ungerade Schichtnummer) führt jeweils zu einem Potential von etwa 16 mV, die alternierenden Schichten aus AGS (gerade Nummern) liefern ein ζ -Potential von etwa -17 mV. Die gleichmäßigen Werte nach den einzelnen Auftragungen lassen darauf schließen, dass die jeweiligen Schichten vollständig und vergleichbar stark aufgebracht wurden. Die Art der Auftragung und die Ergebnisse decken sich mit anderen *Layer-by-layer*-Systemen, wie beispielsweise Alginatkapseln beschichtet mit Chitosan, Lignosulfonat oder Polyallylamin [193] oder polymeren Nanopartikeln beschichtet mit Aminocellulose und Hyaluronsäure.[194]

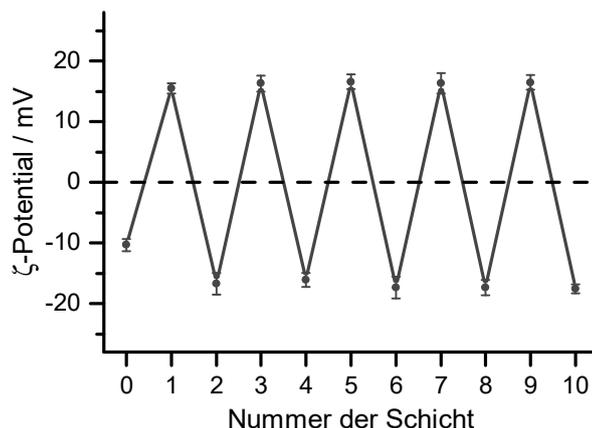


Abbildung 3.18: Verlauf der Oberflächenladung (gemessen als ζ -Potential) der Mikrokapseln nach Auftragung der einzelnen Polyelektrolytschichten. Schicht Nummer 0 ist die unbeschichtete Alginatkapsel, eine ungerade Nummer bezeichnet eine Schicht aus Agarosecarbammat (ACA), eine gerade Nummer eine Schicht aus Agarosesulfat (AGS). Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 5$.

Um die Freisetzung von Wirkstoffen aus den Kapselsystemen korrekt beurteilen zu können, muss zunächst bestimmt werden, wie viel der einzelnen Wirkstoffe nach Abschluss aller Herstellungsschritte (siehe Abb. 4.1) tatsächlich in den Kapseln verblieben ist. Gerade bei den drei leicht wasserlöslichen Substanzen ATP, Suramin und Methylenblau ist durch die Waschschrte ein gewisser Verlust zu erwarten. Die Verkapselungseffizienz für die einzelnen Wirkstoffe wurde durch Auflösen der Kapselsysteme in Natriumcarbonatlösung und anschließender Messung der Wirkstoffkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.19 dargestellt. Generell sind keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz zwischen unbeschichteten und beschichteten Systemen festzustellen. Die Verkapselungseffizienz für die Wirkstoffe ATP, Suramin und Methylenblau liegt zwischen 60–70 %. Das schlecht wasserlösliche A740003 erreicht hingegen eine Verkapselungseffizienz von 90 %. Die ermittelten und im experimentellen Teil in Tabelle 4.3 zusammengefassten Werte wurden als Korrekturfaktoren für die anschließende Wirkstofffreisetzung verwendet, um die maximal freisetzbare Wirkstoffmenge zu ermitteln.

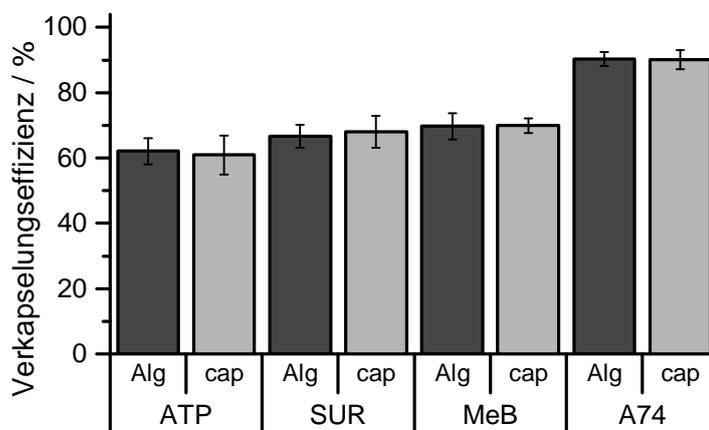


Abbildung 3.19: Vergleich der Verkapselungseffizienz bzw. Wirkstoffbeladung für die verschiedenen Wirkstoffe ATP, Suramin (SUR), Methylenblau (MeB) und A740003 (A74) in beschichteten Mikrokapseln (**cap**) und unbeschichteten Alginatmikrokapseln (**Alg**, Daten für ATP, SUR und A74 entnommen aus [193]). Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$.

Die Verkapselungseffizienzen für die beschichteten Kapseln liegen im Bereich von anderen, ähnlichen literaturbekannten Systemen. Die Verkapselungseffizienz leicht wasserlöslicher Substanzen liegt in der Regel zwischen 40 und 70 %, bei schwerer wasserlöslichen Substanzen können deutlich höhere Werte von 95–100 % erreicht werden.[59, 193, 195]

3.2.3 Kombination von Trägermaterial und beschichteten Mikrokapseln

Die in Kapitel 3.2.2 hergestellten und untersuchten Mikrokapseln wurden neben ihrer direkten Anwendung auch in Kombination mit Trägermaterialien aus Kapitel 3.2.1 untersucht. Dazu wurden die beladenen und beschichteten Mikrokapseln zum Ende der Rührzeit der Suspension zugegeben, in Form gegossen und erkalten und gelieren gelassen. Die in Form geschnittenen Gele wurden dann für die Wirkstofffreisetzung verwendet.

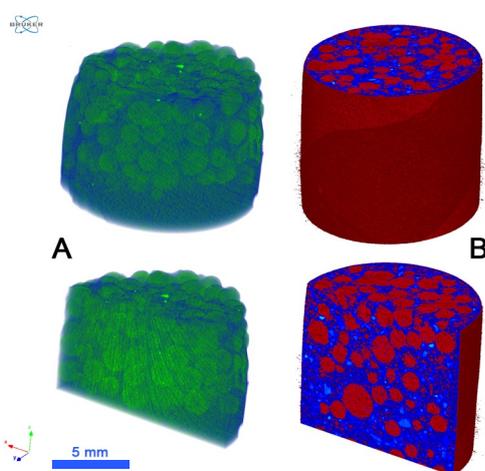


Abbildung 3.20: μ -CT-Rekonstruktion von in Trägermaterial eingebetteten Mikrokapseln. A: Mikrokapseln (grün) in Agarosegel (blau) (Acap). **B:** Mikrokapseln (rot) in mineralisiertem Agarosegel (blau) (AH2cap). Falschfarbeneinfärbung für erhöhten Kontrast. Durchmesser der Proben: 12 mm.

Von je einem Probenkörper bestehend aus Mikrokapseln in reinem Agarosegel (**Acap**) und mineralisiertem Agarosegel (**AH2cap**) wurde zudem eine Rekonstruktion aus μ -Computertomographiescans erstellt, um die grundsätzliche Verteilung der Kapseln in den festen Gelen zu evaluieren. Die Aufnahmen der Probenkörper (Durchmesser: 12 mm) ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Zur Kontrastverbesserung wurde eine Falschfarbendarstellung gewählt, in der das Agarosegel blau und Kapseln grün eingefärbt sind (Abb. 3.20A). Der Röntgenkontrast wird durch die höhere Atommasse des Calciums in den Calciumalginatkapseln verursacht. Während die organischen Strukturen praktisch transparent bleiben, heben sich die Kapseln dagegen ab und die gleichmäßige Verteilung der Kapseln im Gel wird sichtbar. Im mineralisierten Agarosegel (Abb. 3.20B) entsteht der Kontrast durch die geringere Menge an Calcium in den Kapseln (rot) im Vergleich zum mit Calciumphosphat mineralisierten Agarosehydrogel (blau). Die feine Netzstruktur des Agarosegels wird in der μ -CT nicht sichtbar, da diese unter der Auflösungsgrenze von 1–5 μ m des Computertomographen liegt.

3.3 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

In diesem Kapitel werden zunächst die beiden entwickelten LANGMUIR-basierten Modelle beschrieben und erläutert, anschließend werden die zuvor hergestellten Trägermaterialien und beschichteten Mikrokapseln auf ihre Eignung für die verzögerte Wirkstofffreisetzung hin untersucht. Da sich die verschiedenen Modellsubstanzen durch ihre Wasserlöslichkeit unterschiedlich verhalten, werden sie hinsichtlich der Freisetzungskinetik zunächst individuell ausgewertet und am Ende des Kapitels zusammenfassend verglichen und bewertet.

3.3.1 Entwicklung des „*One-Stage*“- und „*Two-Stage*“-Modells

Das „*Two-Stage*“-Modell basiert auf einem zweiphasigen LANGMUIR-ähnlichen Modell. Zur Herleitung wird zunächst das einphasige Modell („*One-Stage*“-Modell, OSL) analog zur LANGMUIR-Adsorptionsisotherme beschrieben. Ein von Lu und ten Hagen beschriebenes und entwickeltes Modell[196] entspricht mathematisch dem OSL-Modell, allerdings definieren die Autoren die Parameter dort auf andere Weise und berücksichtigen die Ähnlichkeit zum LANGMUIR-Modell nicht.

Für die hier beschriebenen OSL- und TSL-Modelle gilt: N_{max} : maximale Stoffmenge im System, bzw. Endwert der Freisetzung; N_{in} : Stoffmenge im System, noch nicht freigesetzt; N_{out} : freigesetzte Stoffmenge. Das gesamte System hat folgende Grenzwerte: Zum Start der Freisetzung bei $t = 0$ ist $N_{out} = 0$; bei unendlich langer Freisetzung $t \rightarrow \infty$ ist $N_{out} = N_{max} = 1$. Neben der Wirkstofffreisetzung, welche neben der Diffusion auch durch andere Transportmechanismen geschehen kann, wird auch immer ein Teil des bereits freigesetzten Wirkstoffes zurück in das System diffundieren. Es gilt also:

$$N_{in} \xrightleftharpoons[k_{in}]{k_{out}} N_{out}$$

Die Freisetzungsrates u_{out} ist dabei proportional zu Zeit und der noch nicht freigesetzten Stoffmenge im System, die Rückdiffusionsrate u_{in} ist dagegen nur proportional zur bereits freigesetzten Stoffmenge:

$$u_{out} = k_{out} \cdot t \cdot N_{in} \quad (3.1)$$

$$u_{in} = k_{in} \cdot N_{out} \quad (3.2)$$

Im Gleichgewicht gilt zudem $u_{in} = u_{out}$:

$$k_{in} \cdot N_{out} = k_{out} \cdot t \cdot N_{in} \quad (3.3)$$

Experimentell wird nur die freigesetzte Stoffmenge bestimmt, die im System verbleibende Stoffmenge lässt sich wie folgt ausdrücken: $N_{in} = N_{max} - N_{out}$. Damit lässt sich die Formel 3.3 schlussendlich nach N_{out} umformen:

$$k_{in} \cdot N_{out} = k_{out} \cdot t \cdot (N_{max} - N_{out})$$

$$N_{out} = \frac{N_{max} \cdot t}{\frac{k_{in}}{k_{out}} + t}$$

Da die beiden einzelnen Konstanten k_{in} und k_{out} nicht direkt bekannt und bestimmbar sind, werden sie in einer Konstante T mit der Dimension der Zeit zusammengefasst.

$$f(t) = N_{out} = \frac{N_{max} \cdot t}{T + t} \quad (3.4)$$

T entspricht dabei der Zeit t_{50} , bis genau die Hälfte von N_{max} freigesetzt wurde:

$$f(t_{50}) = N_{out} = \frac{N_{max} \cdot t_{50}}{T + t_{50}}$$

$$\text{mit: } T = t_{50}$$

$$N_{out} = \frac{N_{max}}{2}$$

Dieses einphasige Modell in Gleichung 3.4 kann nun um einen weiteren Term erweitert werden, was im „*Two-Stage*“-Modell resultiert. Dies gilt für den Fall, dass es zwei Phasen der Freisetzung mit deutlich unterschiedlichen Geschwindigkeiten gibt. Ein Beispiel ist ein *burst release*, gefolgt von einer deutlich verzögerten Freisetzung. Es gilt:

$$f(t) = N_{out} = \frac{B \cdot t}{T_B + t} + \frac{S \cdot t}{T_S + t} \quad (3.5)$$

Hierbei beschreibt B den Anteil des *burst release* und S den Anteil des verzögert freigesetzten Wirkstoffs. Die Summe der beiden ergibt die insgesamt freigesetzte Stoffmenge $N_{max} = B + S$. Analog zu Gleichung 3.4 sind T_B und T_S die Zeiten, bis entsprechend 50% des jeweiligen Anteils freigesetzt wurden und können als Indikator für die Geschwindigkeit des jeweiligen Prozesses angesehen werden: Je kleiner T , desto schneller läuft der Prozess ab. Diese Halbwertszeiten T können zudem dazu genutzt werden, um analog zu Li *et al.* Rückschlüsse auf Wirkstoff-Matrix-Interaktionen und den Transportmechanismus zu ziehen.[143]

3.3.2 Freisetzung von ATP

In Abbildung 3.21 sind die kumulativen Freisetzungskurven von ATP aus den Trägermaterialien (a) und den Kapselsystemen (b) über einen Zeitraum von 14 Tagen dargestellt. Die Linien dienen hierbei lediglich zur Visualisierung der groben Kurvenverläufe. Für das Agarosegel **A** und das Kompositgel **AH** ist eine starke Freisetzung innerhalb der ersten Stunden (*burst release*) feststellbar. Für die übrigen Kompositsysteme mit höherem Anteil Hydroxyapatit und beigemischten ionischen Agarosederivaten ist eine deutliche Verzögerung der Freisetzung zu erkennen. Dabei ist der *burst release* auf die Hälfte (**AH2** und **AH2S**), bzw. ein Viertel (**AH2C**) reduziert worden und es folgt jeweils eine Phase, in welcher der Wirkstoff nahezu konstant freigesetzt wurde. Die Zugabe von anionischem AGS hat im Gegensatz zu kationischem ACA auf die Freisetzung des ebenfalls anionischen ATP keinen stärkeren Einfluss als das **AH2**-Komposit allein.

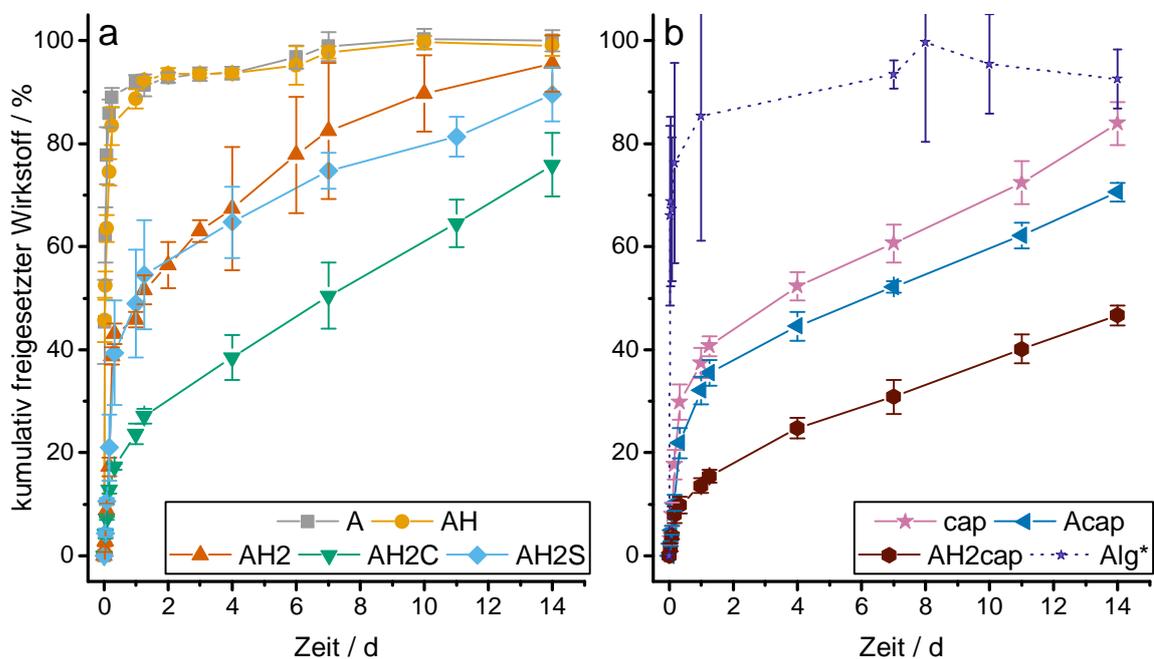


Abbildung 3.21: Freisetzung von ATP. a: Freisetzung aus Trägermaterialien auf Agarosebasis (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemischten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). b: Freisetzung aus Kapselsystemen (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebetteten Kapselsystemen. Alg* bezeichnet Vergleichsdaten aus unbeschichteten Alginatkapseln (publiziert in Witzler et al. [193]). Die Linien dienen zur Veranschaulichung des Kurvenverlaufs. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

Die Freisetzung aus den Kapselsystemen (Alginatkern mit fünf Doppelschichten aus ACA und AGS) erfolgt im Vergleich zu unbeschichteten Alginatmikrokapseln (**Alg***, Daten publiziert in: Witzler et al. [193]) ebenfalls verzögert. Die Mikrokapseln allein (**cap**) weisen bereits nur noch einen *burst release* von etwa 40% mit anschließender konstanter Freisetzung auf, der Kurvenverlauf ähnelt dabei stark dem Kompositgel. Werden die Mikrokapseln den Trägermaterialien beigemischt, ändert sich die Form der Freisetzungskurven kaum, allerdings wird die Freisetzung weiter verzögert. Rein qualitativ lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass bereits die Zugabe von Hydroxyapatit zu Agarosegelen einen merklichen Einfluss auf die Freisetzung von ATP hat und diese durch ionische Wechselwirkung verzögert. Wird

diesem System noch ein kationisches Agarosederivat hinzugegeben, lässt sich die Freisetzung stark verzögern. Die beschichteten Mikrokapseln wirken durch ihre abwechselnd anionischen und kationischen Schichten ebenfalls verzögernd, die Kombination aus Mikrokapseln und Kompositgel hat dabei den stärksten Effekt auf die Freisetzung.

Für eine detailliertere Betrachtung der Wirkstofffreisetzung sollen im Folgenden verschiedene kinetische Modelle verwendet werden, mit denen sich die verschiedenen Freisetzungsphasen klassifizieren und quantifizieren lassen sowie Aussagen zu Freisetzungsmechanismen getroffen werden können. Wie eingangs in Kapitel 2.4.3 erwähnt, eignen sich verschiedenen Modelle zur Untersuchung unterschiedlicher Aspekte. So ist das erste untersuchte Modell nach RITGER, KORSMEYER und PEPPAS (KORSMEYER-PEPPAS-Modell, KP, Gleichung 2.7, [159, 160]) nur für die ersten 60% der Freisetzungskurve anwendbar. Das Modell liefert neben einer Geschwindigkeitskonstante K mit dem Exponenten n auch einen Parameter, über den der Freisetzungsmechanismus abgeschätzt werden kann (siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Anpassungswerte des KORSMEYER-PEPPAS-Modells (KP) und des PEPPAS-SAHLIN-Modells (PS) für die Freisetzung von ATP. Werte gerundet.

Material ^a	KP		PS		
	K	n	K_1	K_2	$ K_1/K_2 $
A	0,61 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,78 ± 0,04	-0,17 ± 0,02	4,6 ± 0,4
AH	0,53 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,71 ± 0,03	-0,17 ± 0,02	4,2 ± 0,4
AH2	0,18 ± 0,08	0,33 ± 0,09	0,14 ± 0,02	-0,01 ± 0,00	20 ± 9
AH2C	0,08 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,06 ± 0,00	-0,00 ± 0,00	45 ± 11
AH2S	0,18 ± 0,08	0,32 ± 0,09	0,15 ± 0,02	-0,01 ± 0,00	19 ± 5
cap	0,13 ± 0,05	0,33 ± 0,08	0,11 ± 0,01	-0,01 ± 0,00	22 ± 8
Acap	0,10 ± 0,04	0,36 ± 0,09	0,08 ± 0,01	-0,00 ± 0,00	33 ± 26
AH2cap	0,04 ± 0,01	0,40 ± 0,05	0,04 ± 0,00	-0,00 ± 0,00	135 ± 29

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, S: Agarosesulfat, C: Agarosecarbammat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

K : Geschwindigkeitskonstante, n : Exponent, K_1 : Beitrag der Diffusion, K_2 : Beitrag der Relaxation.

Systeme, die bereits visuell eine stärkere Verzögerung der Freisetzung aufweisen, haben auch niedrigere Geschwindigkeitskonstanten K im KP-Modell. Für alle untersuchten Materialsysteme liefert das KORSMEYER-PEPPAS-Modell Werte für den Exponenten n zwischen 0,24 und 0,4. Liegt dieser bei zylindrischen Trägermaterialien bei $n = 0,45$ (für sphärische Proben gilt $n = 0,43$), so ist von einem rein FICK'schen Diffusionsverhalten auszugehen. Niedrigere Werte ebenfalls noch auf Diffusion hin, allerdings treten hier weitere Effekte in Erscheinung, welche die Freisetzung beeinflussen, wie beispielsweise eine inhomogene Porengrößenverteilung im Gel, inhomogene Wirkstoffverteilung im Gel oder auch unterschiedliche Partikelgrößen und Schichtdicken bei sphärischen Proben.[147] Aber auch Abweichungen von den Annahmen des Modells führen zu anderen als den idealen Werten. Dies kann ein sehr starker *burst release* sein oder allgemein die Tatsache, dass es sich um eine dreidimensionale Freisetzung handelt, während das Modell von einer eindimensionalen Freisetzung ausgeht.[197] Höhere Werte für den Exponenten, welche auf Quellung und Relaxation des Polymers hindeuten, wurden für die vorliegenden Systeme nicht ermittelt. Um diese Vermutung zu untermauern, kann das PEPPAS-SAHLIN-Modell verwendet werden.[161] Es ist dem ursprünglichen KORSMEYER-PEPPAS-Modell

3.3 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

recht ähnlich, erweitert dessen Diffusionsterm allerdings noch um einen Term, der die Quellung und Relaxation des Systems miteinbezieht (Gleichung 2.8). Bei Verwendung des entsprechenden Exponents des KP-Modells kann aus dem Quotient der beiden Geschwindigkeitskonstanten K_1 und K_2 der Beitrag von Diffusion (K_1) und Relaxation (K_2) an der Freisetzung abgeschätzt werden. Die Parameter der Anpassungen für das PEPPAS-SAHLIN-Modell sind ebenfalls in Tabelle 3.5 aufgelistet. Neben den bereits erwähnten Werten für den Exponenten $n < 0,45$ bestätigen die Quotienten K_1/K_2 , deren Absolutwerte alle deutlich über 1 liegen, das überwiegend diffusionsgesteuerte Freisetzungsverhalten.

Tabelle 3.6: Anpassungswerte des Modells erster Ordnung (FO), des WEIBULL-Modells (WB) und der langmuir-basierten *One-Stage*- (OSL) und *Two-Stage*-Modelle (TSL) für die Freisetzung von ATP.

Material ^a	FO		WB			
	M	k [1/h]	M	a	b	$t_d = \sqrt[3]{a}$ [h]
A	0,94 ± 0,01	1,09 ± 0,10	0,95 ± 0,01	0,97 ± 0,05	0,61 ± 0,7	0,95 ± 0,09
AH	0,92 ± 0,02	0,77 ± 0,12	0,97 ± 0,01	1,20 ± 0,05	0,40 ± 0,03	1,59 ± 0,15
AH2	0,79 ± 0,05	0,044 ± 0,011	1,00 ± 0,15	8 ± 2	0,52 ± 0,09	60 ± 4
AH2C	0,69 ± 0,07	0,012 ± 0,004	1,00 ± 0,06	22 ± 9	0,55 ± 0,13	291 ± 54
AH2S	0,77 ± 0,04	0,054 ± 0,011	0,87 ± 0,07	7 ± 2	0,55 ± 0,09	37 ± 15
cap	0,68 ± 0,05	0,037 ± 0,010	1,00 ± 0,03	10 ± 3	0,47 ± 0,10	144 ± 20
Acap	0,59 ± 0,04	0,033 ± 0,008	0,83 ± 0,24	12 ± 3	0,51 ± 0,10	133 ± 14
AH2cap	0,43 ± 0,04	0,011 ± 0,003	1,00 ± 0,09	35 ± 3	0,52 ± 0,09	952 ± 228

	OSL		TSL			
	M	T [h]	B	S	T_B [h]	T_S [h]
A	0,97 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,93 ± 0,02	0,09 ± 0,06	0,48 ± 0,05	100 ± 30
AH	0,95 ± 0,01	0,79 ± 0,08	0,60 ± 0,19	0,38 ± 0,19	0,25 ± 0,08	4,4 ± 0,3
AH2	0,88 ± 0,05	16 ± 4	0,54 ± 0,12	0,96 ± 0,07	5,5 ± 0,2	418 ± 66
AH2C	0,80 ± 0,09	67 ± 23	0,22 ± 0,03	1,4 ± 0,5	3,9 ± 0,1	600 ± 35
AH2S	0,83 ± 0,04	14 ± 3	0,60 ± 0,08	1,2 ± 0,2	6,8 ± 0,2	1000 ± 297
cap	0,76 ± 0,05	22 ± 6	0,41 ± 0,07	1,28 ± 0,13	5,7 ± 0,2	748 ± 117
Acap	0,67 ± 0,04	26 ± 6	0,39 ± 0,07	1,4 ± 0,2	9,1 ± 0,3	1191 ± 296
AH2cap	0,52 ± 0,06	78 ± 25	0,13 ± 0,02	1,1 ± 0,3	4,0 ± 0,1	760 ± 37

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

M : maximal freigesetzte Wirkstoffmenge, k : Freisetzungsrage, a, b : Kurvenparameter, t_d : Zeit bis 63,2% Freisetzung, T : Zeit bis 50% Freisetzung, B und S : Anteile von *burst release* und verzögerter Phase, T_B und T_S : Zeit bis 50% Freisetzung der entsprechenden Phase.

Weitere literaturbekannte Modelle sind die Freisetzung Erster Ordnung („*First Order*“-Modell (FO), Gleichung 2.5) und das WEIBULL-Modell (WB, Gleichung 2.9), die weniger kinetische oder mechanistische Informationen liefern, dafür aber beispielsweise eine Abschätzung der maximal freigesetzten Wirkstoffmenge erlauben und zur mathematischen Beschreibung des Freisetzungsverhaltens genutzt werden können. Für Systeme mit zur Zeit invers proportionaler Wirkstofffreisetzung (mit zunehmender Zeit wird immer weniger Wirkstoff freigesetzt) bieten sich zur Auswertung vor allem Modelle mit exponentiellem, sigmoidalem oder hyperbolischem

Verlauf[3] und somit neben den bereits genannten auch die beiden LANGMUIR-basierten „*One-Stage*“-und „*Two-Stage*“-Modelle an. Dabei können neben der rein mathematischen Beschreibung der Daten bei letzterem auch wertvolle Informationen zu den Anteilen an *burst release* und verzögerter Freisetzung, sowie Informationen über die jeweiligen Geschwindigkeiten erhalten werden. Aus diesen lassen sich dann wiederum Rückschlüsse auf mögliche Freisetzungsmechanismen ziehen. In Tabelle 3.6 sind die Anpassungswerte der Modelle aufgeführt, Abbildung 3.22 zeigt die entsprechenden Kurvenanpassungen.

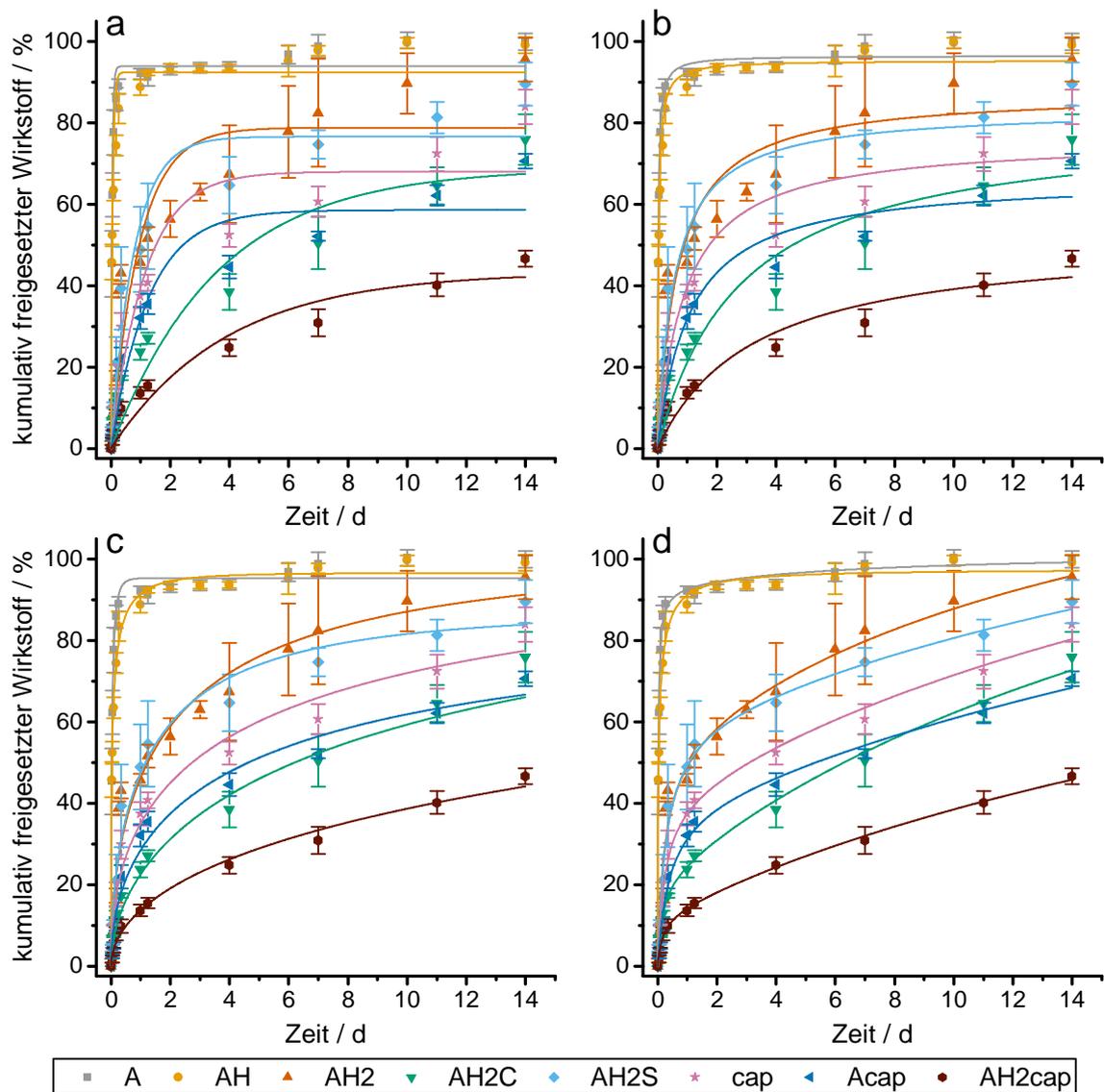


Abbildung 3.22: Kurvenanpassung an die Freisetzungsdaten ATP. a: Modell erster Ordnung (FO), b: „*One-Stage*“-Modell (OSL), c: WEIBULL-Modell (WB), d: „*Two-Stage*“-Modell (TSL). Trägersysteme aus Agarose (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemischten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). Beschichtete Kapselsysteme (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebettete Kapselsysteme. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

Die Freisetzung erster Ordnung (FO-Modell) ist eines der einfachsten Freisetzungsmodelle, allerdings limitiert in der Anwendung. Durch den streng exponentiellen Charakter der Anpassungsfunktion werden in der Regel der *burst release* und das Ende der Freisetzungphase nicht korrekt abgebildet. Dies wird auch bei den Freisetzungskurven für ATP (Abb. 3.22a)

deutlich. Für keines der Systeme entspricht das FO-Modell visuell den experimentellen Daten. Die maximal freigesetzten Wirkstoffmengen werden konsequent unterschätzt und auch im Bereich des *burst release* zeigt das Modell mit einem konstanten Freisetzungsfaktor Schwächen. Das OSL-Modell, welches mathematisch dem Verlauf der LANGMUIR-Adsorptionisotherme entspricht, zeigt visuell eine verbesserte Anpassung (Abb. 3.22b), wobei auch hier vor allem die maximale Wirkstoffmenge systematisch unterschätzt wird. Einzig für die Systeme **A** und **AH**, die bereits nach vier Tagen den Maximalwert erreicht haben, passt das Modell sehr gut zu den experimentellen Daten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Modell mit einem konstanten Freisetzungsfaktor zur Beschreibung nicht ausreicht, da die tatsächlichen Freisetzungsmechanismen komplexer sind und sich an dieser Stelle mehrere Effekte überlagern. Das WEIBULL-Modell (Abb. 3.22c) ist in der Lage, solche komplexeren Freisetzungsvläufe mathematisch zu beschreiben, allerdings liefert es keine kinetischen oder mechanistischen Informationen. Die maximal freigesetzte Wirkstoffmenge wird für alle Systeme gut abgeschätzt und auch die Kurvenverläufe entsprechen visuell den experimentellen Daten. Aus den Parametern a und b lässt sich zudem eine Freisetzungszeit t_d bestimmen, bei der etwa 63% der Maximalmenge freigesetzt ist. Über diesen Wert lassen sich die Freisetzungsgeschwindigkeiten der einzelnen Systeme vergleichen. Auffällig ist, dass ein hoher Anteil Hydroxyapatit bereits zu einer deutlichen Freisetzungverzögerung führt. Die Freisetzungszeit t_d erhöht sich von etwa einer Stunde auf mehr als zwei Tage und mit zugesetztem kationischen Agarosederivat erreicht t_d einen Wert von etwa 12 Tagen. Das anionische Derivat als Zusatz hat keinen weiteren verzögernden Effekt, die Freisetzung liegt im Bereich des **AH2**-Systems. Die Kapselsysteme alleine sind ebenfalls sehr effektiv, die stärkste Wirkung hat aber die Kombination **AH2cap** aus Kompositmaterial und Kapseln, bei der eine Freisetzungszeit t_d von über vier Wochen erreicht wird. Das „Two-Stage“-Modell (Abb. 3.22d) bildet die Freisetzungsvläufe visuell am akkuratesten ab, auch wenn die Abschätzung zum Ende der Messreihe ungenauer wird. Das Modell kann den *burst release* (B -Term) und die verzögerte Freisetzungsphase (S -Term) separat abbilden und liefert so wertvolle Informationen zu den Freisetzungsmechanismen. Die maximal freigesetzte Wirkstoffmenge ergibt sich aus der Summe der in den einzelnen Phasen freigesetzten Menge B und S . Während der Anteil des *burst release* B sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmt, wird die freigesetzte Menge in der verzögerten Phase S mit relativ großer Unsicherheit oft überbestimmt, weswegen auch die maximale Menge in Summe über dem Wert von 1 liegt. Für eine genauere Bestimmung wären Messdaten über einen noch längeren Zeitraum notwendig, damit das Abflachen der Freisetzungskurve besser modelliert werden kann. Neben den Anteilen von B und S sind die Freisetzungshalbwertszeiten T_B und T_S sehr interessant. Für alle **AH2**- und Kapselsysteme liegen die Zeiten für T_B zwischen 4 und 9 h, was daraufhin deutet, dass die diffusionsgesteuerte Freisetzung für alle Systeme zu Beginn sehr ähnlich ist. Lediglich die Menge an Wirkstoff, die während des *burst release* freigesetzt wird, unterscheidet sich stark und nimmt mit zugesetztem kationischen Derivat oder Kapselsystemen ab. Die T_S -Werte, die im Bereich von 20 bis 40 Tagen liegen, deuten dann bei den **AH2**- und Kapselsystemen auf starke Wirkstoff-Matrix-Wechselwirkungen hin.[143] Diese dürften aufgrund der eingesetzten Materialien und den nach 14 Tagen noch intakten Trägern vor allem elektrostatischer Natur sein. Für die Systeme mit starkem *burst release* (**A** und **AH**) ermittelt das „Two-Stage“-Modell hohe Werte für B und sehr kurze Halbwertszeiten T_B . So

ist nach einer halben Stunde bereits die Hälfte des ATP freigesetzt. Auch die T_S -Werte sind deutlich geringer als bei den **AH2**-Systemen, was die schnelle Freisetzung bestätigt.

Durch die Vielzahl der Anpassungsfunktionen mit ihren Vor- und Nachteilen sowie den individuellen Aussagen und Einschränkungen, ist es schwierig zu beurteilen, welches Modell am besten geeignet ist. Zum Einen muss die Frage beantwortet werden, welche Aussagen überhaupt mit dem Modell getroffen werden sollen. Dies können beispielsweise die Ermittlung von mechanistischen Daten in einzelnen Phasen aber auch eine mathematische Beschreibung zur Abschätzung des weiteren Freisetzungsverlaufs sein. Zum Anderen soll möglichst objektiv bewertet werden, welches Modell die experimentellen Daten am besten beschreibt. Hierzu können so genannte Informationskriterien eingesetzt werden, welche neben der Restunsicherheit der Anpassung auch die Anzahl der Datenpunkte und die Zahl der Parameter des Modells miteinbeziehen. Dabei wird in der Bewertung ein einfaches Modell mit weniger Parametern gegenüber einem komplexen Modell bevorzugt. In dieser Arbeit wird dazu AKAIKES Informationskriterium (AIC_c , Gleichung 2.12 [165, 168]) verwendet, welches auch bei wenigen Datenpunkten anwendbar ist. Dabei gilt, je kleiner der Wert für AIC_c , desto besser passt das untersuchte Modell zu den experimentellen Daten. In Tabelle 3.7 sind die entsprechenden Kennwerte für die Freisetzung von ATP dargestellt.

Tabelle 3.7: AIC_c und Wichtungen w der verschiedenen Anpassungsmodelle für ATP.

Modell ^a	TSL		WB		OSL		FO		KP	
	AIC_c	w								
A	-105,3	0,469	-96,1	0,005	-105,6	0,526	-87,3	0,000	-7,8	0,000
AH	-101,2	0,173	-104,3	0,825	-92,0	0,002	-71,2	0,000	-15,9	0,000
AH2	-83,2	0,925	-77,8	0,063	-74,4	0,012	-64,3	0,000	-42,3	0,000
AH2C	-71,3	0,998	-57,2	0,001	-52,5	0,000	-48,6	0,000	-58,2	0,001
AH2S	-58,2	0,668	-52,2	0,033	-56,6	0,295	-47,6	0,003	-22,0	0,000
cap	-60,0	0,932	-54,4	0,055	-51,3	0,012	-45,0	0,001	-28,1	0,000
Acap	-66,2	0,943	-59,0	0,025	-59,3	0,030	-52,1	0,001	-30,1	0,000
AH2cap	-87,6	0,992	-77,9	0,008	-65,5	0,000	-61,7	0,000	-52,6	0,000

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C. TSL: „Two-Stage“-Modell, WB: WEIBULL-Modell, OSL: „One-Stage“-Modell, FO: „First Order“-Modell, KP: KORSMEYER-PEPPAS-Modell

Die Kennwerte zeigen, dass das „Two-Stage“-Modell außer in zwei Fällen (**A** und **AH**) als das von den untersuchten Modellen am besten passendste angesehen werden kann, da es die niedrigsten Werte für das AIC_c liefert. Die Wichtungen w , welche sich aus den Abständen der einzelnen AIC_c zueinander berechnen und eine Art Wahrscheinlichkeit dafür darstellen, dass das jeweilige Modell das genügsamste ist, bestätigen diese Aussage. In den meisten Fällen liegt w bei über 90 %, der Unterschied zu den übrigen untersuchten Modellen ist also sehr deutlich. Lediglich für **AH2S** passt auch das „One-Stage“-Modell noch zu etwa 30 %. Für das reine Agarosegel (**A**) erweisen sich TSL und OSL als etwa gleich stark, mit leichter Tendenz zum „One-Stage“-Modell. Für **AH** ist mit über 80 % das WEIBULL-Modell dasjenige, welches am besten zu den experimentellen Daten passt. Sowohl das Modell erster Ordnung als

auch das KORSMEYER-PEPPAS-Modell eignen sich trotz ihrer Einfachheit aufgrund der hohen Reststandardabweichungen nicht zur Beschreibung der experimentellen Freisetzungskurven.

In der Literatur ist die Freisetzung von ATP nicht besonders dezidiert untersucht, da es in der Regel nicht für praktische Behandlungen eingesetzt wird. Auch in dieser Arbeit wurde ATP lediglich als Modells substanz eingesetzt, da es vielen kommerziell verfügbaren Rezeptorliganden strukturell sehr ähnlich ist.[23] Nichtsdestotrotz lassen sich die Ergebnisse des leicht wasserlöslichen ATPs mit anderen kleinen und gut wasserlöslichen Stoffen vergleichen. Als gut untersuchte Beispiele dienen das Schmerzmittel Paracetamol, das Antibiotikum Ciprofloxacin und das Zytostatikum Doxorubicin. Zu diesen drei Stoffen gibt es vergleichbare Literaturdaten zur Freisetzung aus Alginatkapseln oder Polyelektrolytkapselsystemen. Paracetamol und Doxorubicin weisen unter physiologischen Bedingungen sehr schnelle Freisetzungsraten auf. Innerhalb von 6 bis 8 Stunden wurde nahezu der gesamte Wirkstoff freigesetzt, angestrebte Verzögerungen in der Freisetzung lagen oft im Zeitraum von Stunden und nicht wie in der vorliegenden Arbeit im Bereich von Tagen. Dennoch konnten für beide Stoffe Alginatsysteme mit Vernetzern oder Polyelektrolyten entwickelt werden, welche die sehr schnelle Freisetzung auf über einen Tag verlangsamen.[198, 199] Anandhakumar und Kollegen verkapselten Ciprofloxacin in Polyallylamin/Polymethacrylsäure-Systemen und bewirkten so eine Abnahme der *burst release* von 70 % auf etwa 40 % in den ersten zwölf Stunden.[195] Im Vergleich hierzu leisten die hergestellten Kompositmaterialien **AH2** eine ähnliche Verzögerung bei ATP, mit zugesetztem kationischem **ACA** (**AH2C**) verringert sich der *burst release* sogar auf etwa 20 %. Die Polyelektrolytkapselsysteme bewirken für ATP in etwa die gleiche Verzögerung wie das System aus der Literatur, in Verbindung mit dem Kompositmaterial wird der *burst release* auf etwa 10 % gesenkt und die weitere Freisetzung stark verlangsamt. Als weiteres Beispiel sei noch eine Studie von Wang *et al.* angeführt, in der Alginatmikrokapseln beschichtet mit Polyallylamin und Polystyrolsulfonat zur verzögerten Freisetzung der kleinen und leicht wasserlöslichen Stoffe Natriumbenzoat und 4-Sulfooxyzimtsäure verwendet wurden.[59] Vier solcher Doppelschichten führten zu einer Reduktion des *burst release* von über 95 % auf etwa 60 % und einer deutlichen Verlangsamung der restlichen Freisetzung auf drei, bzw. fünf Tage. Im Vergleich dazu sind die **AH2**-Komposite ähnlich effektiv und auch die Kapselsysteme führen zu einer stärkeren Verzögerung in der Wirkstofffreisetzung. Als weitere Vergleichssysteme dienen die in der eigenen Arbeitsgruppe entstandenen Alginatkapseln, welche mit kommerziell erhältlichen Polyelektrolyten beschichtet wurden.³ Die vergleichbar hergestellten Alginatkapseln wurden mit 5 Doppelschichten bestehend aus Lignosulfonat oder Alginat (anionisch) und Chitosan oder Polyallylamin (kationisch) beschichtet und waren mit den Wirkstoffen ATP, Suramin oder A740003 beladen.[193] Insofern können die Systeme durch ihren gleichartigen Aufbau und dieselben Wirkstoffe sehr gut miteinander verglichen werden. Für ATP hat sich das System aus Polyallylamin und Alginat als effektivstes herausgestellt. Mit den Kennwerten $t_d = 87$ h (Weibull) und $B = 0,5$; $T_B = 0,8$ h; $T_S = 1348$ h (TSL) liegt das System im Bereich der hier präsentierten Kapselsysteme. Allerdings ist der *burst release* bei **cap** mit etwa 40 % etwas niedriger. Noch stärker ist die Verzögerung ($B = 0,13$) bei der Kombination aus Kapseln und mineralisiertem Trägermaterial (**AH2cap**). Interessant ist an der Stelle auch

³Diese Systeme sind im Rahmen einer Masterthese und eines Austauschstipendienprogramms unter meiner fachlichen Begleitung entstanden, in Witzler et al. [193] veröffentlicht worden und dienen an dieser Stelle als Referenzsysteme. [Anm. des Autors]

die Freisetzung in Zellkulturmedium, da die in Nährlösung enthaltenen Ionen die Freisetzung beeinflussen könnten. Das System aus Polyallylamin und Lignosulfonat zeigte bei Verwendung von *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS), einer Nährlösung, die NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, NaH₂PO₄ und NaHCO₃ enthält, für ATP eine vergleichbar schnelle Freisetzung wie in reinem Wasser.[193]

3.3.3 Freisetzung von Suramin

Die kumulativen Freisetzungskurven von Suramin aus Trägermaterialien (a) und Kapselsystemen (b) sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Die Freisetzung wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht, die Linien dienen lediglich zur Visualisierung des groben Kurvenverlaufs. Für Trägermaterialien aus reiner Agarose (A) und beigemishtem Hydroxyapatit (AH und AH2) zeigt sich zu Beginn ein sehr starker *burst release*.

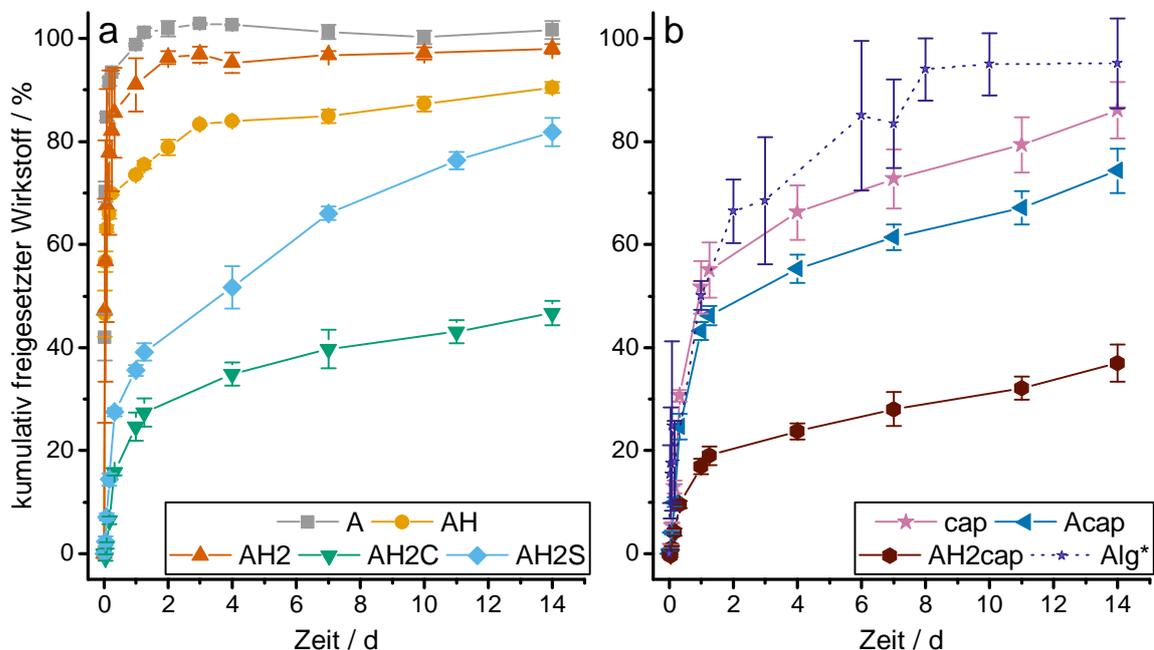


Abbildung 3.23: Freisetzung von Suramin. a: Freisetzung aus Trägermaterialien auf Agarosebasis (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemishten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). b: Freisetzung aus Kapselsystemen (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebetteten Kapselsystemen. Alg* bezeichnet Vergleichsdaten aus unbeschichteten Alginatkapseln (publiziert in Witzler et al. [193]). Die Linien dienen zur Veranschaulichung des Kurvenverlaufs. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

Innerhalb der ersten acht Stunden werden 70–90% des Suramins freigesetzt. Die Beimischung von Agarosesulfat (AH2S) verringert den *burst release* auf etwa 30%, mit einer relativ gleichmäßigen Freisetzung im weiteren Verlauf bis zu einer Gesamtmenge von etwa 80% nach zwei Wochen, wobei nach dem Kurvenverlauf die Freisetzung noch nicht abgeschlossen ist. Sehr effektiv verzögert das Trägermaterial mit beigemishtem Agarosecarbammat (AH2C) die Freisetzung von Suramin. Hier beträgt der *burst release* etwa 20% am ersten Tag, über den weiteren Verlauf der zwei Wochen werden dann nur weitere 15% Suramin freigesetzt. Bei den Kapselsystemen (b) ist die Freisetzung aus den Polyelektrolytkapseln (cap) etwas langsamer

als aus unbeschichteten Alginatkapseln **Alg***. [193] Das Einbetten in Trägermaterial zeigt nur bei **AH2cap** eine deutliche Reduzierung der Freisetzung, in Agarose (**Acap**) verzögert sich die Freisetzung nur wenig. Qualitativ gesehen bewirken vor allem zugesetztes kationisches Agarosecarbammat (**AH2C**) und die Kombination aus Trägermaterial und Polyelektrolytkapseln (**AH2cap**) eine deutliche Verzögerung der Suraminfreisetzung. Aber auch das **AH2S**-System führt zu einem verzögerten Verlauf, wenn auch schwächer als beim **AH2C**-System. Für eine quantitative Betrachtung werden die bereits in Kapitel 3.3.2 verwendeten Freisetzungsmodelle an die experimentell bestimmten Daten angepasst. Die Anpassungswerte für die beiden PEPPAS-Modelle (KP und PS) finden sich in Tabelle 3.8. Beide Modelle sind nur bis etwa 60 % der jeweiligen Freisetzung gültig und spiegeln somit nur den Beginn der Freisetzungsphase wieder.

Tabelle 3.8: Anpassungswerte des KORSMEYER-PEPPAS-Modells (KP) und des PEPPAS-SÄHLIN-Modells (PS) für die Freisetzung von Suramin. Werte gerundet.

Material ^a	KP		PS		
	K	n	K_1	K_2	$ K_1/K_2 $
A	$0,64 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,15$	$0,84 \pm 0,08$	$-0,19 \pm 0,04$	$4,5 \pm 0,6$
AH	$0,55 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,05$	$-0,20 \pm 0,03$	$3,7 \pm 0,3$
AH2	$0,57 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,02$	$-0,16 \pm 0,01$	$4,5 \pm 0,2$
AH2C	$0,07 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,11$	$0,02 \pm 0,15$	$0,01 \pm 0,13$	$2,1 \pm 4$
AH2S	$0,12 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,10$	$0,01 \pm 0,13$	13 ± 31
cap	$0,15 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,11$	$0,04 \pm 0,24$	$0,02 \pm 0,22$	$1,8 \pm 2,9$
Acap	$0,14 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,17$	$0,02 \pm 0,14$	$1,3 \pm 1,8$
AH2cap	$0,05 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,11$	$0,01 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,05$	$0,7 \pm 1,0$

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, S: Agarosesulfat, C: Agarosecarbammat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

K : Geschwindigkeitskonstante, n : Exponent, K_1 : Beitrag der Diffusion, K_2 : Beitrag der Relaxation.

Für Trägermaterialien aus Agarose (**A**) liefert das KORSMEYER-PEPPAS-Modell für den Exponenten n genau den Wert von $n = 0,45$, der für zylindrische Proben zu erwarten ist, wenn die Freisetzung ausschließlich auf Diffusion beruht. Für alle übrigen Systeme liegt der Exponent zwischen 0,21 und 0,40, sodass primär von Diffusion als Freisetzungsmechanismus ausgegangen werden kann. Die Geschwindigkeitskonstante K nimmt wie erwartet mit den bereits visuell langsamer verlaufenden Freisetzungssystemen ab, besonders auffällig sind **AH2C** und **AH2cap**, die beide deutlich niedrigere Werte für die Freisetzungsgeschwindigkeit aufweisen. Das PEPPAS-SÄHLIN-Modell, welches die Anteile an Diffusion K_1 und Relaxation K_2 bestimmt, weist in allen Fällen $K_1/K_2 > 1$ und somit einen überwiegenden Anteil an Diffusion aus. Lediglich für die in mineralisierten Trägern eingebetteten Kapselsysteme wurde ein $K_1/K_2 < 1$ bestimmt, was darauf hindeutet, dass hier neben der Diffusion noch andere Mechanismen wie Quellung, Relaxation oder Wirkstoff-Matrix-Interaktionen entscheidend zur Freisetzung in den ersten Stunden beitragen.

Um den vollständigen Freisetzungsverlauf zu berücksichtigen, werden erneut das Modell erster Ordnung (FO), das WEIBULL-Modell (WB) sowie die beiden langmuir-basierten „One-Stage“- und „Two-Stage“-Modelle (OSL und TSL) an die experimentellen Daten angepasst.

3.3 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Die Anpassungswerte sind in Tabelle 3.9 aufgelistet, die angepassten Kurven sind in Abbildung 3.24 dargestellt.

Tabelle 3.9: Anpassungswerte des Modells erster Ordnung (FO), des WEIBULL-Modells (WB) und der langmuir-basierten *One-Stage-* (OSL) und *Two-Stage-* Modelle (TSL) für die Freisetzung von Suramin.

Material ^a	FO		WB			
	M	k [1/h]	M	a	b	$t_d = \sqrt[3]{a}$ [h]
A	1,00 ± 0,01	1,10 ± 0,08	1,00 ± 0,01	0,96 ± 0,06	0,74 ± 0,08	0,95 ± 0,07
AH	0,79 ± 0,02	1,35 ± 0,27	0,95 ± 0,06	1,15 ± 0,11	0,19 ± 0,03	2,0 ± 1,2
AH2	0,92 ± 0,02	0,94 ± 0,15	0,97 ± 0,01	1,12 ± 0,02	0,41 ± 0,01	1,31 ± 0,05
AH2C	0,41 ± 0,02	0,038 ± 0,006	0,44 ± 0,02	14 ± 5	0,73 ± 0,12	35 ± 8
AH2S	0,71 ± 0,05	0,028 ± 0,007	1,00 ± 0,24	12 ± 2	0,51 ± 0,08	138 ± 12
cap	0,76 ± 0,03	0,047 ± 0,007	0,78 ± 0,03	13 ± 5	0,81 ± 0,13	25 ± 4
Acap	0,65 ± 0,03	0,045 ± 0,007	0,67 ± 0,03	14 ± 6	0,80 ± 0,14	26 ± 5
AH2cap	0,31 ± 0,02	0,030 ± 0,006	0,37 ± 0,06	14 ± 4	0,62 ± 0,12	74 ± 4
	OSL		TSL			
	M	T [h]	B	S	T_B [h]	T_S [h]
A	1,03 ± 0,01	0,55 ± 0,04	1,06 ± 0,04	0,00 ± 0,06	0,5 ± 0,1	40 ± 6
AH	0,82 ± 0,02	0,48 ± 0,09	0,83 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,02	73 ± 20
AH2	0,96 ± 0,01	0,68 ± 0,06	0,85 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,47 ± 0,06	26 ± 2
AH2C	0,46 ± 0,02	22 ± 3	0,38 ± 0,10	0,94 ± 0,16	15 ± 7	3014 ± 586
AH2S	0,81 ± 0,05	29 ± 7	0,43 ± 0,07	1,5 ± 0,2	8 ± 2	902 ± 135
cap	0,84 ± 0,03	17 ± 2	0,62 ± 0,16	0,8 ± 0,4	8 ± 4	942 ± 67
Acap	0,72 ± 0,03	18 ± 3	0,61 ± 0,15	1,4 ± 0,3	14 ± 6	3302 ± 799
AH2cap	0,36 ± 0,02	30 ± 2	0,24 ± 0,07	1,8 ± 0,2	14 ± 7	4281 ± 599

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

M : maximal freigesetzte Wirkstoffmenge, k : Freisetzungsrates, a, b : Kurvenparameter, t_d : Zeit bis 63,2% Freisetzung, T : Zeit bis 50% Freisetzung, B und S : Anteile von *burst release* und verzögerter Phase, T_B und T_S : Zeit bis 50% Freisetzung der entsprechenden Phase.

Das Modell erster Ordnung (Abb. 3.24a) passt bereits rein visuell schlecht zu den experimentell bestimmten Daten. Lediglich der erste Bereich des *burst release* wird annähernd gut erfasst, dann aber ist der weitere Verlauf der Kurve zunächst zu steil und bei längeren Freisetzungzeiten deutlich zu flach. Auch die maximal freigesetzte Menge Suramin wird konsequent unterbestimmt. Einzig bei reiner Agarose (**A**) liefert das Modell $M = 1$ und somit eine vollständige Freisetzung des Suramins. Die Geschwindigkeitskonstanten k nehmen grundsätzlich wie erwartet ab. Auffällig ist aber, dass das System **AG2S** die niedrigste Geschwindigkeitskonstante aufweist, obwohl es nach einem kurzen *burst release* eine relativ gleichmäßige Freisetzung über die 14 Tage zeigt und andere Modelle visuell eine langsamere Freisetzung zeigen. Das Modell erster Ordnung (**FO**) ist daher zur Beschreibung der Suramin-Daten ungeeignet.

Wie schon bei ATP erfasst das „*One-Stage*“-Modell hingegen besonders die schnellen Freisetzungen, die nur von *burst release* gekennzeichnet sind, sehr gut. Für **A** und **AH2** stimmt das Modell praktisch mit den experimentellen Daten überein und liefert gute Kenndaten. Für **AH** wird der *burst release* etwas überschätzt und die maximale Menge unterschätzt, grundsätzlich wird der Kurvenverlauf aber zufriedenstellend dargestellt. Bei den übrigen Systemen, bei denen deutlicher zwei Phasen der Freisetzung zu erkennen sind, stößt das einphasige Modell an seine Grenzen. Obwohl es die nach 14 Tagen insgesamt freigesetzte Menge annähernd korrekt bestimmt, wird die Freisetzung im mittleren Bereich zwischen etwa zwei und zehn Tagen deutlich überbestimmt. Daraus resultiert eine anfangs zu steile und gegen Ende zu flache Freisetzungskurve. Das Modell ist somit nicht für die universelle Beschreibung der Daten geeignet, liefert aber gute Ergebnisse für die Fälle, die einer einphasigen Freisetzung entsprechen.

Das WEIBULL-Modell (Abb. 3.24c) passt subjektiv besser zu den experimentellen Daten. Für die Trägermaterialien aus Agarose und Hydroxyapatit (**A**, **AH** und **AH2**) sowie das System mit beigemischtem Agarosesulfat (**AH2S**) stimmen die modellierten Kurven mit den experimentellen Daten überein. Auch die ermittelten Parameter für M und t_d sind plausibel. Als maximal freigesetzte Menge wird in allen vier Fällen etwa $M = 1$ erreicht und auch die Zeit, bis 63 % Suramin freigesetzt sind, passt zu den experimentellen Daten. Bei den drei Systemen mit sehr starkem *burst release* liegt t_d bei maximal 2 h, bei **AH2S** beträgt $t_d = 138$ h. Dieser Wert lässt sich auch direkt aus dem Diagramm ablesen und ist somit gut verifizierbar. Visuell schlechter passt das WEIBULL-Modell zu den übrigen Modellen, die zwei deutlichere Freisetzungsphasen zeigen. Hier zeigt sich, ähnlich zum „*One-Stage*“-Modell, zwar eine gute Anpassung in der frühen Freisetzungsphase, dann aber wird die Freisetzung zunächst über- und zum Ende hin unterbestimmt. Dies zeigt sich auch in den Maximalmengen M . Diese liegen zwischen $M = 0,78$ und $M = 0,37$ und damit sogar jeweils unter dem letzten aufgenommenen Datenpunkt. Das WEIBULL-Modell ist an dieser Stelle nicht in der Lage, die nur noch leicht ansteigende Kurve korrekt abzubilden. Dies spiegelt sich auch in den Freisetzungszeiten t_d wider. Durch die errechnete Maximalmenge von $M < 1$ bezieht sich t_d nicht wie bei den erste vier Systemen auf 63 % der Gesamtfreisetzung, sondern auf 63 % der jeweiligen Maximalmenge, bei **AH2cap** zum Beispiel auf $M = 0,37$. Dies hat zur Folge, dass die Freisetzungszeiten t_d aller vier Systeme mit ein bis drei Tagen viel zu niedrig angegeben sind. Da die Freisetzungen nach 14 Tagen noch nicht abgeschlossen sind, was an der noch steigenden Kurve erkennbar ist, ist das WEIBULL-Modell für diese Systeme nicht geeignet. Zuletzt soll das „*Two-Stage*“-Modell betrachtet werden, welches visuell am besten mit den experimentellen Daten übereinstimmt. Eine Ausnahme bildet das System aus Agarose (**A**), dessen Freisetzung nach dem schnellen *burst release* leicht überbestimmt wurde. Die Anpassungswerte in Tabelle 3.9 zeigen für die Agarose-Hydroxyapatit-Systeme (**A**, **AH**, **AH2**) sehr plausible Werte. Eine akkurat bestimmte *burst release*-Phase B mit sehr kurzen Halbwertszeiten T_B , gefolgt von einer verzögerten Phase S , die allerdings nur noch wenig Suramin freisetzt. Für die übrigen Modelle ergeben sich Anpassungswerte für B und T_B , welche die jeweiligen *burst release*-Phasen gut abbilden. Für die verzögerte Phase sind die Werte für S aber deutlich über der theoretischen Limitierung $M = B + S = 1$. Dies liegt daran, dass die Freisetzung in der verzögerten Phase auch nach 14 Tagen noch annähernd linear steigt und sich noch nicht an das Maximum der Freisetzung

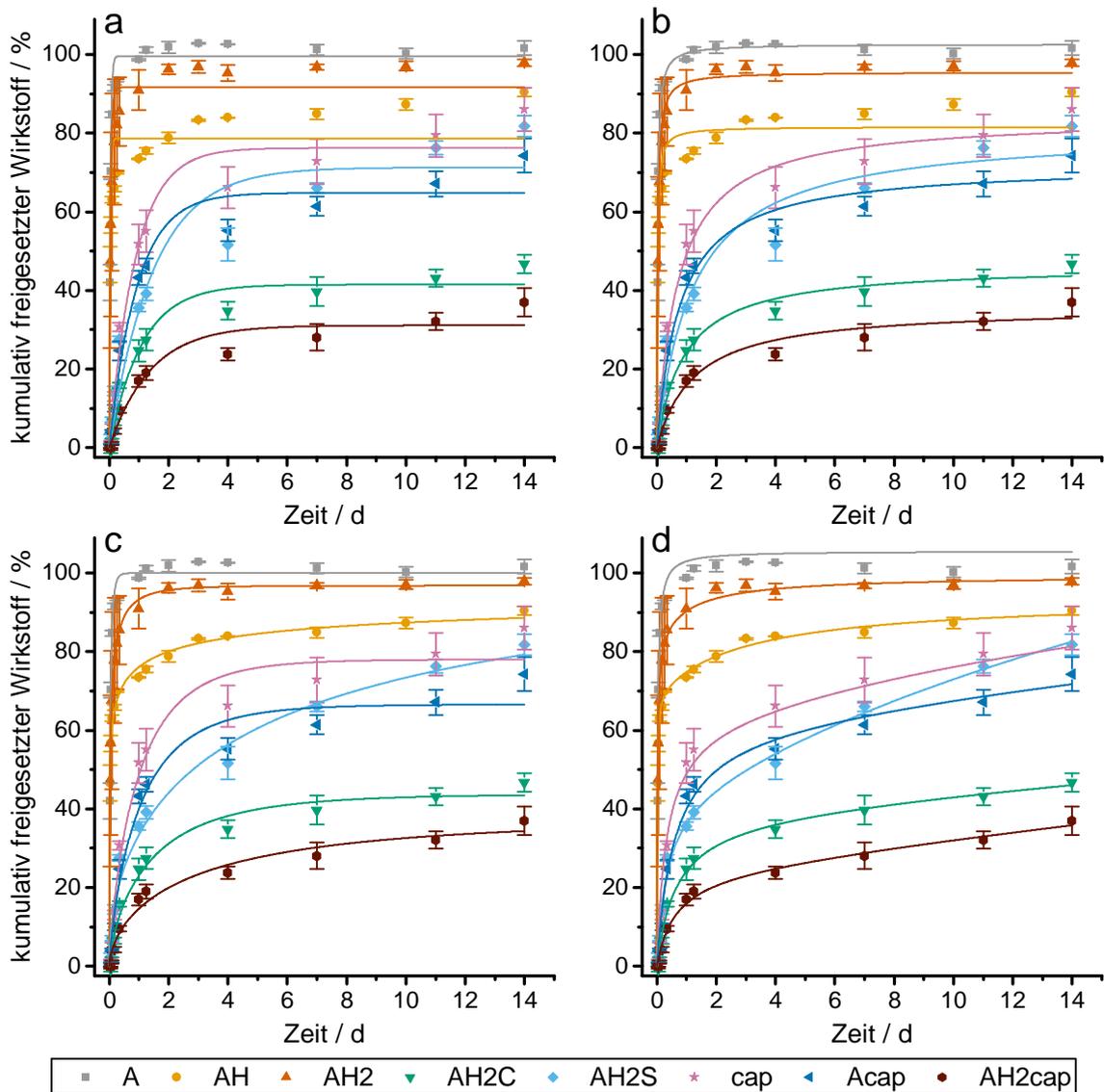


Abbildung 3.24: Kurvenanpassung an die Freisetzungsdaten Suramin. a: Modell erster Ordnung (FO), b: „One-Stage“-Modell (OSL), c: WEIBULL-Modell (WB), d: „Two-Stage“-Modell (TSL). Trägersysteme aus Agarose (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemischten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). Beschichtete Kapselsysteme (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebettete Kapselsysteme. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

annähert. Somit sind die Werte für S und T_S zwar für grobe Abschätzungen und Vergleiche geeignet, sollten aber nicht als absolut angesehen werden. Als weiteren Prognosewert lässt sich noch der Zeitpunkt angeben, an dem die Freisetzungskurve 100% erreichen würde. Dieser ist nur eine Schätzung, liefert aber einen anschaulichen Vergleichswert. So ist das System **AG2S** nach etwa 3 Wochen (23 Tage), **cap** nach etwa 5 Wochen (37 Tage) und **Acap** nach etwa 8 Wochen (54 Tage) vollständig freigesetzt. **AH2cap** (131 Tage) und **AH2C** (244 Tage) benötigen nochmals deutlich länger, um eine vollständige Freisetzung zu erreichen. Dies gilt alles ausgehend von den an die experimentell bestimmten Daten angepassten Werte.

Zum Vergleich der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Modelle wird auch für die Suraminfreisetzung AKAIKES Informationskriterium (AIC_c) genutzt. Die resultierenden Zahlenwerte und Wichtungen sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Durch hohe Reststandardabweichungen

werden das KORSMEYER-PEPPAS-Modell und das Modell erster Ordnung (FO) als ungeeignet zur Beschreibung der Daten bewertet. Dies passt auch zu den Beobachtungen bei Betrachtung der Freisetzungskurven sowie der Kennwerte der Modelle. Das WEIBULL-Modell erweist sich für **AH2** als das geeignetste Modell, bei den übrigen Modellen wurden besser passende Modelle ermittelt. Das „*Two-Stage*“-Modell kann für **AH** und **AH2S** als das am besten zu den Daten passende Modell ausgewählt werden, zu **AH2cap** passt es mit einer 30-prozentigen Wahrscheinlichkeit am Besten. Das „*One-Stage*“-Modell kann in den übrigen Fällen als das bestpassendste Modell identifiziert werden, da es bei geringer Reststandardabweichung durch wenig Parameter als das „einfachere“ Modell bevorzugt wird.

Tabelle 3.10: AIC_c und Wichtungen w der verschiedenen Anpassungsmodelle für Suramin.

Material ^a	TSL		WB		OSL		FO		KP	
	AIC_c	w								
A	-76,7	0,000	-87,4	0,038	-93,8	0,920	-87,6	0,041	7,4	0,000
AH	-112,1	0,999	-97,4	0,001	-76,5	0,000	-65,0	0,000	-9,8	0,000
AH2	-99,6	0,000	-120,7	1,000	-90,6	0,000	-66,1	0,000	-63,4	0,000
AH2C	-68,2	0,017	-66,1	0,006	-76,2	0,961	-68,0	0,016	-31,4	0,000
AH2S	-64,9	0,927	-59,6	0,066	-55,1	0,007	-47,7	0,000	-39,8	0,000
cap	-46,4	0,000	-53,2	0,003	-64,6	0,975	-57,0	0,022	-20,2	0,000
Acap	-57,3	0,013	-55,0	0,004	-65,8	0,952	-59,0	0,031	-30,1	0,000
AH2cap	-74,9	0,304	-70,2	0,029	-76,4	0,650	-69,0	0,016	-37,8	0,000

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C. TSL: „*Two-Stage*“-Modell, WB: WEIBULL-Modell, OSL: „*One-Stage*“-Modell, FO: „*First Order*“-Modell, KP: KORSMEYER-PEPPAS-Modell

Dieses Ergebnis zeigt, dass die LANGMUIR-basierten Modelle grundsätzlich sehr stark in der Beschreibung der Freisetzungskurven von leicht wasserlöslichen Substanzen ist. Der Widerspruch aus den AIC_c -Werten und der inhaltlichen Beschreibung und Interpretation der Modelle resultiert aus leicht unterschiedlichen Betrachtungsweisen. Das AIC_c berücksichtigt nur die Anpassung bis Tag 14, ganz so, als wenn die Freisetzung an diesem Punkt vollständig abgeschlossen wäre. Inhaltlich wurde auch der prognostizierte weitere Verlauf der Freisetzung diskutiert, dort ist das komplexere „*Two-Stage*“-Modell gegenüber dem einfacheren „*One-Stage*“-Modell besser geeignet, da es den weiteren Verlauf realistischer abbilden kann.

Die Freisetzung von Suramin aus Trägermaterialien oder Kapselsystemen ist in der Literatur nicht weit verbreitet. Einige wenige Studien nutzten „*core-shell*“ Mikrokapseln aus Polylactid (PLA) und Polylactid-*co*-glycolid (PLGA).[200, 201] Bei Einbringen des Suramins in die Hülle aus PLGA, wurde 70 % innerhalb von drei Tagen freigesetzt, das Beladen des Kerns aus PLA verzögerte die Freisetzung auf 70 % in 15 Tagen. Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass die PLA/PLGA-Systeme nur bedingt mit den hier untersuchten Materialien vergleichbar sind, da trotz gleichem Freisetzungsmechanismus (Diffusion) der geschwindigkeitsbestimmende Prozess unterschiedlich ist. PLA und PLGA sind deutlich hydrophober als die verwendeten Alginatkapseln, bauen sich aber bei Kontakt mit Wasser durch Esterhydrolyse langsam ab. Dadurch gelangt das Wasser weiter in das Innere der Kapseln, welche dadurch quellen und weiter hydrolysieren bis letztlich die freie Diffusion des Wirkstoffs durch wassergefüllte Poren

stattfinden kann.[141, 202] So erklärt sich auch die Verzögerung bei Beladung des Kerns, da zunächst die äußere PLGA-Schicht überwunden werden muss. Vergleichbar hergestellte Kapselsysteme, welche mit kommerziell erhältlichen Polyelektrolyten beschichtet sind, zeigen vergleichbare Ergebnisse wie die hier vorgestellten Systeme mit ionischen Agarosederivaten.[193] Für die Verzögerung der Suraminfreisetzung erwiesen sich Alginatkapseln beschichtet mit Chitosan/Lignosulfonat (CL) und Polyallylamin/Lignosulfonat (PL) als sehr effizient. Der *burst release* ist auf etwa 30% reduziert, anschließend findet eine verzögerte Freisetzung statt, wobei das PL-System über 13 Tage nur rund 15% freisetzt. Verglichen dazu verzögert das **cap**-System der vorliegenden Arbeit etwas schwächer, in Verbindung mit dem Agaroseträgermaterial (**Acap**) etwa gleich gut und mit dem Kompositmaterial (**AH2cap**) deutlich stärker. Die Komposite allein verzögern die Freisetzung kaum. Erst die Beimischung der ionischen Agarosederivate führt zu einem deutlichen Effekt. Das **AH2C**-System verzögert in etwa gleich stark wie das PL-System, was an der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den kationischen Gruppen des Agarosecarbamat und den anionischen Sulfonsäuregruppen des Suramins liegt. Aber auch das **AH2S**-System zeigt eine deutliche Verzögerung der Freisetzung, obwohl im System anionische Sulfatgruppen dominieren. Hier könnten $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen der aromatischen Suraminstrukturen und der Sulfatgruppen einen verzögernden Effekt verursachen. Dieser Effekt ist von Sulfonsäuren und aromatischen Strukturen aus dem Bereich der Chromatographie [203] und Schadstoffadsorption [204, 205] bekannt und wurde auch als Ursache für die Verzögerung durch Lignosulfonatbeschichtungen in Erwägung gezogen. Da sowohl Trägermaterialien als auch Kapselsysteme nach 14 Tagen noch keine Abbauerscheinungen aufweisen, ist die Freisetzung grundsätzlich auf Diffusion durch wassergefüllte Poren zurückzuführen, welche durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Suramin und Matrix verzögert wird.

An dieser Stelle soll abschließend für dieses Unterkapitel noch auf den Vergleich der Freisetzungen von ATP und Suramin mit besonderem Fokus auf der Molekülgröße eingegangen werden. Bei Betrachtung der Freisetzungskurven für ATP und Suramin aus reinen Alginat- und Agarosegelelen (Abb. 3.21 und 3.23) fällt auf, dass beide Stoffe ähnlich freigesetzt werden, obwohl Suramin ein fast dreimal so hohes Molekulargewicht besitzt wie ATP und nach der Strukturformel deutlich größer ist. Für die Diffusion durch Poren ist allerdings der Moleküldurchmesser in Lösung (hydrodynamischer Durchmesser) entscheidend. Um eine Abschätzung dieses Wertes zu bekommen, wurden Molekülsimulationen vorgenommen. Für das ATP-Molekül wurde ein Streumassenradius von etwa $r_G = 4,3 \text{ \AA}$ berechnet. Daraus folgen etwa 59 Wassermoleküle in der ersten Hydratationsschicht und eine effektive Moleküloberfläche (CONNOLLY-Oberfläche) von etwa 360 \AA^2 . Aus dieser lässt sich bei Annahme einer perfekten Kugel ein hydrodynamischer Durchmesser von $d_H = 10,7 \text{ \AA}$ errechnen. Für Suramin wurde ein Streumassenradius von $r_G = 10,4 \text{ \AA}$ errechnet. Suramin wird in der ersten Schicht von etwa 138 Wassermolekülen umgeben, die CONNOLLY-Oberfläche beträgt 990 \AA^2 . Hieraus ergibt sich bei einer perfekten Kugel ein hydrodynamischer Durchmesser von etwa $d_H = 17,8 \text{ \AA}$. [206] Obwohl dies nur grobe Näherungen sind, lässt sich festhalten, dass ein Suraminmolekül in Lösung etwa 1,7-mal größer ist als ein ATP-Molekül. Mit Durchmessern von unter 2 nm sind beide Moleküle aber immer noch wesentlich kleiner als die Poren der Alginat- und Agarosegele. Alginat hat typischerweise Porengrößen im Bereich von 5–10 nm [207, 208], Agarose sogar im Bereich von

50–200 nm[77]. Somit können die Moleküle weitestgehend ungehindert durch die Poren der Gele diffundieren, was die sehr ähnlichen Freisetzungprofile beider Substanzen erklärt.

3.3.4 Freisetzung von Methylenblau

Nach den zwei anionischen wasserlöslichen Wirkstoffen ATP und Suramin sollte auch ein kationischer, leicht wasserlöslicher Stoff untersucht werden. Die Wahl fiel auf die Modellsubstanz Methylenblau, ein Phenothiazinderivat, welches vor allem als Farbstoff verwendet wird. Es ist leicht zugänglich, nicht giftig und hat eine hohe Absorptionsempfindlichkeit bei 660 nm, wodurch es einfach mittels Photometrie zu detektieren ist. Die kumulativen Freisetzungskurven von Methylenblau aus Trägermaterialien (a) und Kapselsystemen (b) sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Zusätzlich wurden die Freisetzungsexperimente auch an unbeschichteten Alginkapseln (Alg) durchgeführt, um Referenzwerte für die beschichteten Kapselsysteme zu erhalten. Die Freisetzung wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht, die Linien dienen zur Visualisierung des groben Kurvenverlaufs.

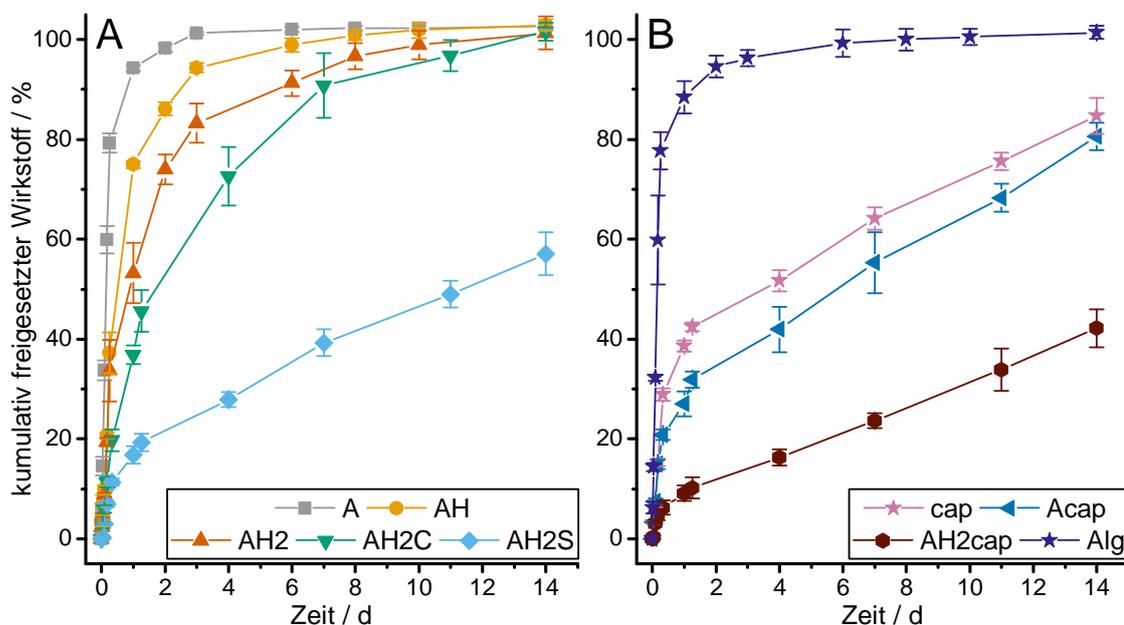


Abbildung 3.25: Freisetzung von Methylenblau. a: Freisetzung aus Trägermaterialien auf Agarosebasis (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemischten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). b: Freisetzung aus unbeschichteten Alginkapseln (Alg), beschichteten Kapselsystemen (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebetteten Kapselsystemen. Die Linien dienen zur Veranschaulichung des Kurvenverlaufs. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

Auffällig ist bei den Freisetzungskurven von Methylenblau die grundsätzliche Ähnlichkeit zu denen von ATP. Für die meisten Trägermaterialien ist eine sehr schnelle Freisetzung mit starkem *burst release* zu beobachten, so wie es für ein kleines, leicht wasserlösliches Molekül zu erwarten ist. Auch die Freisetzung aus unbeschichteten Alginkapseln verläuft mit einem starken *burst release* sehr schnell. Eine leichte Verzögerung tritt bei **AH2C** auf, wo 90% nach etwa 7 Tagen freigesetzt sind. Eine starke Verzögerung wird durch Beimischung des anionischen Agarosederivats erreicht (**AH2S**): der *burst release* wird auf etwa 15% reduziert und nach 14 Tagen wurden insgesamt knapp 60% freigesetzt. Ähnlich sieht es bei den

beschichteten Kapselsystemen aus. Diese führen ebenfalls zu einer deutlichen Verzögerung der Freisetzung, am effektivsten ist auch hier die Kombination aus beschichteten Kapseln und dem mineralisierten Trägermaterial (**AH2cap**). Die beiden PEPPAS-Modelle liefern Einblicke in die Freisetzungsmechanismen der ersten Freisetzungsphase; die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst. Das KORSMEYER-PEPPAS-Modell zeigt zum einen sinkende Werte für die Geschwindigkeitskonstante K , was was mit den visuell flacheren Kurven übereinstimmt. Zum anderen korrelieren die Werte des Exponenten n mit der Art des Freisetzungsmechanismus. Für $n \leq 0,45$ herrscht klassische FICK'SCHE Diffusion, für Werte von $0,45 < n \leq 0,89$ herrscht sogenannte „anormale Diffusion“, bei der zum Beispiel auch Quellung und Relaxation des Matrixmaterials die Freisetzung beeinflussen. Über die Stärke dieses Einflusses liefert das PEPPAS-SAHLIN-Modell weitere Informationen. Für alle Systeme ist der Quotient $K_1/K_2 > 1$, was bedeutet, dass der Diffusionsanteil (K_1) gegenüber dem Relaxationsanteil (K_2) überwiegt. Hierbei ist allerdings noch zu beachten, dass beide Modelle nur bis 60% der jeweiligen Freisetzungskurve anwendbar sind und somit bei den Systemen mit starkem *burst release* nur dieser Ausschnitt mit relativ wenigen Datenpunkten modelliert wurde.

Tabelle 3.11: Anpassungswerte des KORSMEYER-PEPPAS-Modells (KP) und des PEPPAS-SAHLIN-Modells (PS) für die Freisetzung von Methylenblau. Werte gerundet.

Material ^a	KP		PS		
	K	n	K_1	K_2	$ K_1/K_2 $
A	0,19 ± 0,03	0,83 ± 0,09	0,47 ± 0,08	-0,20 ± 0,04	2,4 ± 0,8
AH	0,10 ± 0,03	0,63 ± 0,09	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,03	2,3 ± 0,3
AH2	0,12 ± 0,04	0,49 ± 0,08	0,10 ± 0,05	0,01 ± 0,01	14 ± 2
AH2C	0,08 ± 0,02	0,49 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,01	22 ± 3
AH2S	0,04 ± 0,01	0,47 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00	422 ± 12
Alg	0,18 ± 0,03	0,83 ± 0,09	0,74 ± 0,12	0,22 ± 0,12	3,4 ± 0,3
cap	0,14 ± 0,05	0,32 ± 0,06	0,11 ± 0,03	-0,01 ± 0,01	23 ± 2
Acap	0,09 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,00 ± 0,00	39 ± 3
AH2cap	0,03 ± 0,01	0,41 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	44 ± 5

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, S: Agarosesulfat, C: Agarosecarbammat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

K : Geschwindigkeitskonstante, n : Exponent, K_1 : Beitrag der Diffusion, K_2 : Beitrag der Relaxation.

Um den gesamten Freisetzungsverlauf besser abbilden zu können, werden wie in den vorigen Kapiteln vier verschiedene Freisetzungsmodelle an die experimentellen Daten angepasst. Die Anpassungswerte der Modelle sind Tabelle 3.12 aufgelistet, die Freisetzungskurven sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

Das „First Order“-Modell (**a**) ist wie bei ATP vor allem für die Systeme mit schneller Freisetzung und hohem *burst release* anwendbar. Die maximal freigesetzte Wirkstoffmenge M wird korrekt modelliert und die Freisetzungsrate k nimmt mit zunehmender Verzögerung wie erwartet ab. Allerdings passt die Modellierung nicht über den gesamten Verlauf zu den experimentellen Daten, sondern wird gerade im „Wechselbereich“ zwischen *burst release* und anschließender Phase deutlich überbestimmt. Generell weniger passend ist das Modell für die Systeme mit wenig *burst release* und höherer Verzögerung in der zweiten

3.3 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Tabelle 3.12: Anpassungswerte des Modells erster Ordnung (FO), des WEIBULL-Modells (WB) und der langmuir-basierten *One-Stage*- (OSL) und *Two-Stage*-Modelle (TSL) für die Freisetzung von Methylenblau.

Material ^a	FO		WB			
	M	k [1/h]	M	a	b	$t_d = \sqrt[b]{a}$ [h]
A	1,01 ± 0,01	0,22 ± 0,01	1,00 ± 0,01	6,1 ± 0,7	1,26 ± 0,08	4,2 ± 0,2
AH	0,99 ± 0,02	0,060 ± 0,005	1,00 ± 0,02	12,3 ± 1,8	0,86 ± 0,05	18,2 ± 1,5
AH2	0,95 ± 0,03	0,037 ± 0,005	1,00 ± 0,02	11,9 ± 1,8	0,71 ± 0,05	33 ± 4
AH2C	0,97 ± 0,03	0,019 ± 0,002	1,00 ± 0,03	25 ± 4	0,78 ± 0,05	62 ± 6
AH2S	0,54 ± 0,05	0,010 ± 0,003	1,00 ± 0,17	37 ± 18	0,57 ± 0,10	535 ± 94
Alg	0,98 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,97 ± 0,01	6 ± 1	1,27 ± 0,12	4,1 ± 0,2
cap	0,70 ± 0,05	0,035 ± 0,009	1,00 ± 0,30	11,0 ± 2,5	0,49 ± 0,10	130 ± 15
Acap	0,70 ± 0,06	0,015 ± 0,005	1,00 ± 0,35	18 ± 7	0,53 ± 0,13	238 ± 43
AH2cap	0,54 ± 0,14	0,004 ± 0,002	1,00 ± 0,66	101 ± 12	0,67 ± 0,17	966 ± 327

	OSL		TSL			
	M	T [h]	B	S	T_B [h]	T_S [h]
A	1,06 ± 0,02	3,4 ± 0,4	1,06 ± 0,10	0,00 ± 0,16	3,4 ± 0,8	100 ± 0
AH	1,08 ± 0,02	12,7 ± 1,0	1,08 ± 0,04	0,00 ± 0,05	13 ± 2	0,71 ± 0,00
AH2	1,05 ± 0,02	19 ± 2	0,51 ± 0,28	0,60 ± 0,28	9 ± 1	47 ± 7
AH2C	1,14 ± 0,02	47 ± 3	0,20 ± 0,21	1,01 ± 0,17	8,9 ± 0,9	78 ± 29
AH2S	0,66 ± 0,07	90 ± 27	0,17 ± 0,03	0,83 ± 0,13	8,9 ± 0,9	1221 ± 118
Alg	1,02 ± 0,02	3,4 ± 0,4	0,72 ± 0,08	0,30 ± 0,07	3,40 ± 0,12	3,41 ± 0,64
cap	0,79 ± 0,05	24 ± 6	0,42 ± 0,07	1,6 ± 0,8	6 ± 2	940 ± 159
Acap	0,80 ± 0,08	49 ± 17	0,26 ± 0,04	1,7 ± 0,9	4,1 ± 1,5	785 ± 62
AH2cap	0,76 ± 0,21	306 ± 149	0,06 ± 0,02	1,8 ± 0,6	2,6 ± 0,2	1546 ± 164

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

M : maximal freigesetzte Wirkstoffmenge, k : Freisetzungsrates, a, b : Kurvenparameter, t_d : Zeit bis 63,2% Freisetzung, T : Zeit bis 50% Freisetzung, B und S : Anteile von *burst release* und verzögerter Phase, T_B und T_S : Zeit bis 50% Freisetzung der entsprechenden Phase.

Freisetzungsphase. Zwar sind die Freisetzungsraten insgesamt niedrig, aber die maximal freigesetzte Wirkstoffmenge wird deutlich unterbestimmt und der generelle Kurvenverlauf entspricht visuell nicht den experimentellen Daten. Für das einphasige LANGMUIR-basierte „*One-Stage*“-Modell (**b**) sieht es ganz ähnlich aus. Die Systeme mit schneller Freisetzung werden sehr gut modelliert, Kurvenverlauf und maximale Wirkstoffmenge stimmen sehr gut mit den experimentellen Daten überein. Bei den beschichteten Kapselsystemen, sowie dem Trägermaterial mit Agarosesulfat (**AH2S**) werden allerdings die maximal freizusetzenden Wirkstoffmengen unterschätzt und auch der Kurvenverlauf passt nicht mehr gut zu den Datenpunkten, da nahe dem *burst release* zunächst eine Überbestimmung und dann eine Unterbestimmung erfolgt. Diese Beobachtung ist konsistent mit denen bei ATP und Suramin, bei denen die stärker verzögernden Materialien ähnlich Kurven zeigten.

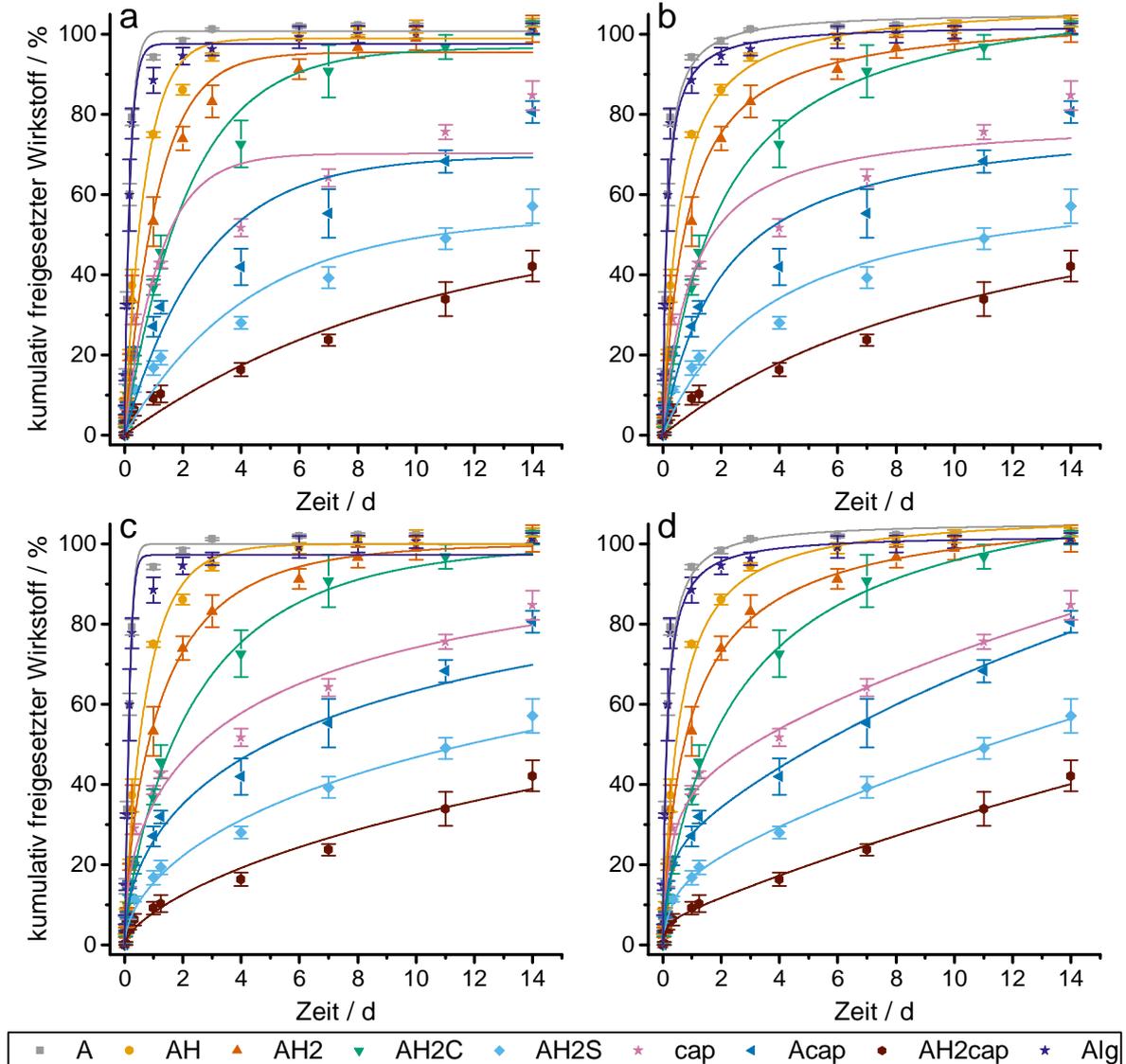


Abbildung 3.26: Kurvenanpassung an die Freisetzungsdaten Methylenblau. **a:** Modell erster Ordnung (FO), **b:** „One-Stage“-Modell (OSL), **c:** WEIBULL-Modell (WB), **d:** „Two-Stage“-Modell (TSL). Trägersysteme aus Agarose (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemischten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). Unbeschichtete Alginatekapseln (Alg), beschichtete Kapselsysteme (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebettete Kapselsysteme. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

Das WEIBULL-Modell (c) hingegen liefert gute Ergebnisse für Kurvenverlauf und Wirkstoffmenge, insbesondere für die Materialien, welche eine stärkere Freisetzungverzögerung aufweisen. Es liefert für die beiden am stärksten verzögernden System **AH2S** und **AH2cap** Freisetzungzeiten t_d von drei bzw. knapp sechs Wochen, bis 63 % des Methylenblaus freigesetzt wurden. Für die beiden sehr schnell freisetzungsfähigen reinen Polysaccharidsysteme (**A**, **Alg**) ist das WEIBULL-Modell qualitativ nicht geeignet, da es zwar die Maximalmenge korrekt abschätzt, aber den Kurvenverlauf falsch abbildet. Grundsätzlich verhält sich das Modell bei gleichmäßigen Kurvenverläufen ohne deutliche Wechsel von *burst release* und verzögerter Phase am besten. Das zweiphasige langmuir-basierte „Two-Stage“-Modell (d) zeigt augenscheinlich für alle Systeme eine sehr gute Anpassung, da die Kurvenverläufe mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Für die Trägermaterialien liefert das Modell sinnvolle Maximalmengen

($M = B + S$) und Freisetzungzeiten bis 50 % der jeweiligen Phase, die im Bereich von Stunden für den *burst release* und im Bereich von Tagen für die verzögerte Phase (**AH2**, **AH2C**) liegen. Für **AH2S**, eines der am stärksten verzögernden Systeme, wird ein sehr geringer *burst release* von etwa 17 % und eine verzögerte Freisetzung mit einer Halbwertszeit von mehr als sieben Wochen ermittelt. Für die Kapselsysteme sind die Werte B für den *burst release* realistisch, die für S allerdings deutlich zu hoch, wenn man bedenkt, dass B und S zusammen 1 (100 % Freisetzung) ergeben sollten. Dies liegt vor allem im fast linearen Anstieg der verzögerten Phase im untersuchten Zeitraum, woraus das Modell eine zu hohe Asymptote wählt. Dementsprechend sind auch die Halbwertszeiten T_S entsprechend hoch, wobei die Größenordnungen von mehreren Wochen durchaus realistisch sind. Auch hier kann zusätzlich der Zeitpunkt angegeben werden, an dem die Anpassungsfunktion die vollständige Freisetzung von 100 % erreicht, mathematisch also den Wert 1 annimmt. Für **cap** und **Acap** wird der Wert nach etwa dreieinhalb Wochen erreicht, **AH2cap** kommt auf eine maximale Freisetzung nach zehn Wochen.

Die Auswertung des Informationskriteriums AIC_c (Tabelle 3.13) bestätigt grundsätzlich die Eindrücke aus der qualitativen Beschreibung der Anpassungsmodelle. Für die sehr schnell freisetzenden Systeme **A**, **AH** und **Alg** ist das „*First Order*“-Modell das einfachste Modell, welches am besten zu den experimentellen Daten passt. Für die beiden nativen Polysaccharidsysteme Agarose und Alginat beschreibt auch das WEIBULL-Modell noch zu etwa 25, bzw. 14 % die Daten noch annehmbar gut. Für die Gruppe der mineralisierten Trägermaterialien **AH2** und **AH2C** (sowie zu einem geringen Teil auch **AH**) schneidet das „*One-Stage*“-Modell am besten ab. Für das Trägermaterial mit anionischer Agarose (**AH2S**) sowie alle beschichteten Kapselsysteme zeigt sich das „*Two-Stage*“-Modell deutlich überlegen.

Mit über 90 % Wahrscheinlichkeit ist es für die stark verzögernden Systeme mit deutlichem zweiphasigen Freisetzungsverlauf das Modell, welches am besten zu den Daten passt. Zu allen AIC_c ist erneut anzumerken, dass die Bewertungen nur auf Grundlage der experimentellen Daten über den Zeitraum von zwei Wochen erfolgen und das Kriterium somit nicht bewerten kann, welches Modell ganz allgemein die beste Beschreibung der Wirkstofffreisetzung liefert.

Tabelle 3.13: AIC_c und Wichtungen w der verschiedenen Anpassungsmodelle für Methylenblau.

Modell ^a	TSL		WB		OSL		FO		KP	
	AIC_c	w								
A	-58,7	0,000	-86,4	0,256	-68,6	0,000	-88,5	0,744	3,0	0,000
AH	-76,6	0,003	-80,6	0,018	-86,6	0,368	-87,6	0,611	8,3	0,000
AH2	-77,8	0,070	-78,6	0,103	-82,7	0,817	-73,9	0,010	11,1	0,000
AH2C	-74,0	0,170	-72,1	0,066	-77,0	0,763	-61,2	0,000	-37,2	0,000
AH2S	-79,7	0,987	-71,1	0,013	-63,3	0,000	-59,4	0,000	-53,9	0,000
Alg	-58,8	0,000	-71,7	0,146	-68,7	0,034	-75,1	0,820	2,5	0,000
cap	-60,7	0,936	-54,7	0,047	-52,6	0,016	-45,8	0,001	-26,2	0,000
Acap	-68,1	0,999	-54,5	0,001	-50,4	0,000	-45,7	0,000	-47,5	0,000
AH2cap	-80,1	0,993	-64,3	0,000	-69,2	0,004	-68,4	0,003	-57,1	0,000

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, Alg: unbeschichtete Alginatmikrokapseln, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C. TSL: „*Two-Stage*“-Modell, WB: WEIBULL-Modell, OSL: „*One-Stage*“-Modell, FO: „*First Order*“-Modell, KP: KORSMEYER-PEPPAS-Modell

Methylenblau wird in der Literatur häufig als leicht wasserlösliche Substanz für Freisetzungs- und Adsorptionsexperimente verwendet. Auch sind insbesondere Systeme mit Alginat und anderen Polysacchariden diesbezüglich gut untersucht. Tu *et al.* haben Alginatmikrokapseln (aus 5 % Natriumalginatlösung) im Größenbereich 100–500 µm hergestellt, mit Methylenblau und 4-Phenylazoanilin beladen und anschließend deren Freisetzung in Wasser und simulierter Magenflüssigkeit über einen Zeitraum von fünf Stunden untersucht.[209] Methylenblau zeigte dabei in Wasser eine Freisetzung über rein FICK'sche Diffusion, die vergleichbar mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten für **A** und **cap** sind. In einer anderen Veröffentlichung untersuchten Bajpai und Kirar die Freisetzung von Methylenblau aus Alginatkapseln und quervernetzten Alginat/Polyacrylatkapseln und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Aus den reinen Alginatkapseln wird Methylenblau binnen weniger Stunden fast vollständig freigesetzt, erst die Vernetzung mit Polyacrylat führt zu einer deutlichen Verzögerung der Freisetzung.[210] Voo *et al.* untersuchten den Zusammenhang der Konzentration der Alginatgele auf die Freisetzung von Methylenblau in 0,1 M Phosphatpuffer. Während der gesamte Wirkstoff aus Alginatkapseln aus einer 2 %igen Alginatlösung in unter drei Stunden freigesetzt wurde, verzögerte sich die komplette Freisetzung aus 10 %igen Kapseln auf über fünf Stunden.[211] Dies zeigt, dass die Alginatkonzentration zwar einen leichten Einfluss auf die Freisetzung hat, aber für Zeiträume über mehrere Tage keine entscheidende Rolle spielt. Zwei Studien, in denen Objektträger aus Glas mit zehn Doppelschichten aus Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)/Polyacrylat[212] bzw. Chitosan/Polyacrylat[213] beschichtet wurden, untersuchten anschließend die Freisetzung von Methylenblau in wässriges Medium. Die Systeme zeigten eine vollständige Freisetzung innerhalb einer Stunde in Wasser, mit zunehmender Konzentration NaCl beschleunigte sich die Freisetzung allerdings stark. Auch ein pH-Wert von 3 sorgte für eine rapide Freisetzung von Methylenblau. Die zusätzlichen Ionen im Medium sorgten für eine stärkere Quellung und somit lockerere Bindung der Polyelektrolytschichten, während der veränderte pH-Wert ebenfalls das Schichtsystem und die Interaktion zwischen Wirkstoff und Matrix abschwächte.[212, 213]

3.3.5 Freisetzung von A740003

Als vierter und letzter Wirkstoff wird der selektive P2X₇ Rezeptorantagonist A740003 untersucht. Es handelt sich dabei um einen schlecht wasserlöslichen Stoff ($< 1 \text{ mg mL}^{-1}$), der eine hohe Effektivität bei der Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen ($\text{IC}_{50}=40 \text{ nM}$) aufweist. Die kumulativen Freisetzungskurven für A740003 aus Trägermaterialien (a) und Kapselsystemen (b) über einen Zeitraum von 14 Tagen sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

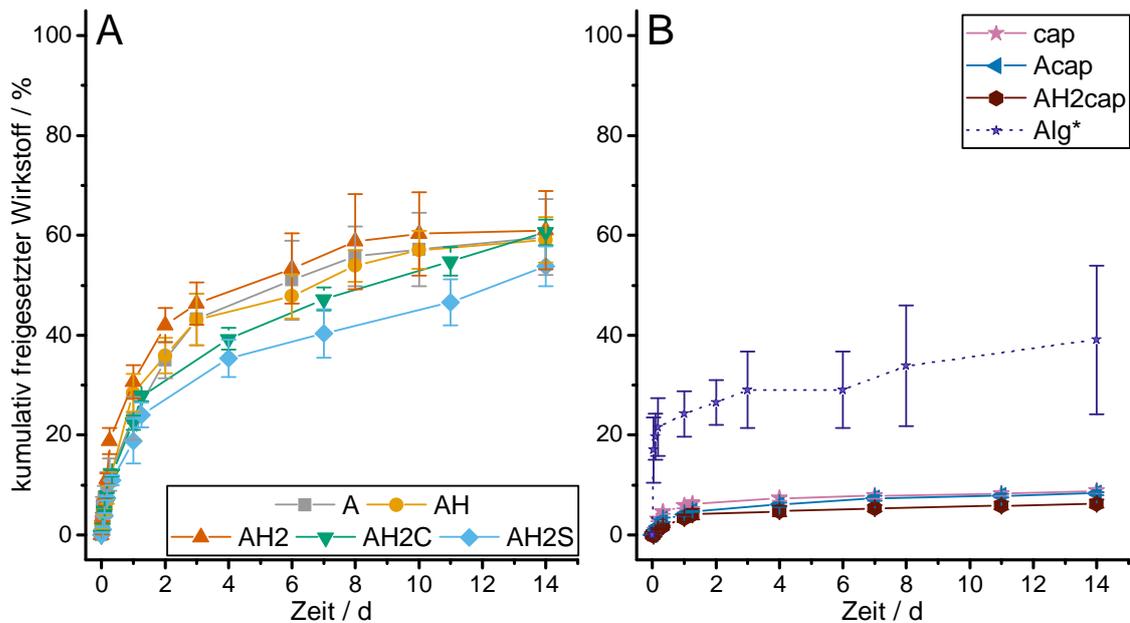


Abbildung 3.27: Freisetzung von A740003. a: Freisetzung aus Trägermaterialien auf Agarosebasis (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemischten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). b: Freisetzung aus Kapselsystemen (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebetteten Kapselsystemen. Alg* bezeichnet Vergleichsdaten aus unbeschichteten Alginatkapseln (publiziert in Witzler et al. [193]). Die Linien dienen zur Veranschaulichung des Kurvenverlaufs. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

Auffällig ist die im Vergleich zu den übrigen Substanzen deutlich niedrigere Gesamtfreisetzung. Die Trägermaterialien (a) weisen unabhängig von ihrer Zusammensetzung ein sehr ähnliches Freisetzungsprofil auf. Dies besteht aus einem schwachen *burst release* um 20% in den ersten 24 h, gefolgt von der Freisetzung von weiteren 30–40% über die restlichen 13 Tage. Die Freisetzungskurven nach zwei Wochen enden bei einer insgesamt freigesetzten Menge von etwa 50–60%. Auch bei den beschichteten Kapselsystemen (b) zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Systemen. Insgesamt liegt die Freisetzung über zwei Wochen bei 5–10%, ein starker *burst release* ist nicht erkennbar. Bereits publizierte Vergleichsdaten aus unbeschichteten Alginatkapseln [193] weisen einen anfänglichen *burst release* um etwa 20% und anschließend eine schwache Freisetzung von weiteren 15% auf. Trotz der schlechteren Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs ist Diffusion durch die wassergefüllten Poren der Trägermaterialien und Kapselsysteme der grundsätzliche Freisetzungsmechanismus. Die Parameter der Anpassung des KORSMEYER-PEPPAS- und des PEPPAS-SÄHLIN-Modells zur analytischen Betrachtung der Diffusion sind in Tabelle 3.14 aufgelistet.

Tabelle 3.14: Anpassungswerte des KORSMEYER-PEPPAS-Modells (KP) und des PEPPAS-SAHLIN-Modells (PS) für die Freisetzung von A740003. Werte gerundet.

Material ^a	KP		PS		
	K	n	K_1	K_2	$ K_1/K_2 $
A	$0,05 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,01$	12 ± 2
AH	$0,04 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	60 ± 8
AH2	$0,07 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,07$	$0,05 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	36 ± 5
AH2C	$0,03 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,06$	$0,03 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,06$	8 ± 2
AH2S	$0,05 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	107 ± 14
cap	$0,01 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,20$	$0,01 \pm 0,04$	$0,00 \pm 0,05$	10 ± 3
Acap	$0,01 \pm 0,00$	$0,48 \pm 0,10$	$0,01 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,01$	12 ± 4
AH2cap	$0,01 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,11$	$0,01 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	88 ± 15

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, S: Agarosesulfat, C: Agarosecarbammat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

K : Geschwindigkeitskonstante, n : Exponent, K_1 : Beitrag der Diffusion, K_2 : Beitrag der Relaxation.

Die Geschwindigkeitskonstanten K des KORSMEYER-PEPPAS-Modells bestätigen, dass die Trägermaterialien und Kapselsysteme unabhängig von ihrer Zusammensetzung sehr ähnliche Freisetzungen aufweisen. Die Konstanten sind zudem deutlich niedriger als bei den übrigen, leichter wasserlöslichen Modellwirkstoffen. Die Exponenten des KORSMEYER-PEPPAS-Modells liegen alle im Bereich des Wertes, der für eine diffusionsgesteuerte Freisetzung erwartet wird. Auch das PEPPAS-SAHLIN-Modell liefert durchweg Werte größer 1 für den Quotienten aus Diffusion und Relaxation, sodass in allen Fällen die Diffusion als maßgeblicher Freisetzungsmechanismus angesehen werden kann. Analog zu den vorherigen Kapiteln wurden die vier verschiedenen Freisetzungsmodelle betrachtet, welche die gesamte Freisetzungskurve miteinschließen. Die graphische Auftragung der an die experimentellen Daten angepassten Funktionen findet sich in Abbildung 3.28, die einzelnen Anpassungswerte sind in Tabelle 3.15 aufgeführt. Dadurch, dass die Freisetzung für die Systeme sehr ähnlich ist, ist eine visuelle Unterscheidung deutlich schwieriger, sodass die Anpassungswerte stärker betrachtet werden. Das „*First Order*“-Modell zeigt visuell die bereits von den anderen Substanzen bekannte Überbestimmung des mittleren Freisetzungsbereichs und die Unterbestimmung der maximal freigesetzten Wirkstoffmenge, besonders für **AH2**, **AH2C** und **AH2S**. Die Anpassungswerte liefern sehr ähnliche Werte für die Trägermaterialien, wobei **AH2S** von diesen die langsamste Freisetzung aufweist. Die maximal freigesetzten Wirkstoffmengen bestimmt das Modell auf etwa 50–60%. Für die Kapselsysteme liegt dieser Wert bei unter 8%, die Geschwindigkeitskonstante zeigt allerdings eine etwas schnellere Freisetzung. Das „*One-Stage*“-Modell (Abb.3.28b) passt visuell etwas besser zu den experimentellen Daten als das FO-Modell. Die Maximalmengen liegen bei 55–65% für die Trägermaterialien und 6–8% für die Kapselsysteme. Die Freisetzungshalbwertszeiten T spiegeln den visuellen Trend wider, die nicht eingebetteten Kapseln haben die schnellste Freisetzung, die übrigen sind grundsätzlich sehr ähnlich und liegen im Bereich von 20–44 h.

3.3 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Tabelle 3.15: Anpassungswerte des Modells erster Ordnung (FO), des WEIBULL-Modells (WB) und der langmuir-basierten *One-Stage*- (OSL) und *Two-Stage*-Modelle (TSL) für die Freisetzung von A740003. Werte gerundet.

Material ^a	FO		WB			
	M	k [1/h]	M	a	b	$t_d = \sqrt[3]{a}$ [h]
A	0,57 ± 0,02	0,021 ± 0,003	0,64 ± 0,02	14,9 ± 1,3	0,64 ± 0,03	69 ± 8
AH	0,55 ± 0,02	0,025 ± 0,003	0,59 ± 0,02	17 ± 3	0,72 ± 0,05	53 ± 7
AH2	0,58 ± 0,02	0,031 ± 0,005	0,62 ± 0,02	11,8 ± 1,4	0,66 ± 0,04	43 ± 5
AH2C	0,54 ± 0,03	0,021 ± 0,004	0,72 ± 0,09	18 ± 2	0,59 ± 0,06	135 ± 58
AH2S	0,47 ± 0,02	0,020 ± 0,004	0,64 ± 0,10	18 ± 3	0,58 ± 0,07	142 ± 77
cap	0,078 ± 0,004	0,081 ± 0,016	0,081 ± 0,004	7,6 ± 2,6	0,74 ± 0,14	16 ± 4
Acap	0,074 ± 0,004	0,039 ± 0,007	0,085 ± 0,006	9,3 ± 1,5	0,57 ± 0,07	51 ± 16
AH2cap	0,056 ± 0,002	0,040 ± 0,006	0,058 ± 0,002	15 ± 5	0,79 ± 0,12	30 ± 6
	OSL		TSL			
	M	T [h]	B	S	T_B [h]	T_S [h]
A	0,65 ± 0,02	37 ± 5	0,06 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,5 ± 0,4	57 ± 5
AH	0,63 ± 0,01	33 ± 3	0,50 ± 0,09	0,43 ± 0,07	22 ± 5	775 ± 230
AH2	0,64 ± 0,02	23 ± 3	0,29 ± 0,17	0,41 ± 0,14	8 ± 2	76 ± 16
AH2C	0,63 ± 0,03	43 ± 7	0,35 ± 0,05	1,00 ± 0,48	15 ± 4	919 ± 114
AH2S	0,55 ± 0,03	44 ± 7	0,31 ± 0,08	1,00 ± 0,61	16 ± 6	1130 ± 272
cap	0,082 ± 0,003	6,3 ± 1,7	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,02	7,4 ± 2,7	26647
Acap	0,082 ± 0,003	20 ± 3	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,03	8,0 ± 2,3	343 ± 38
AH2cap	0,063 ± 0,002	21 ± 3	0,05 ± 0,01	0,00 ± 0,00	16 ± 7	37570

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C.

M : maximal freigesetzte Wirkstoffmenge, k : Freisetzungsrage, a, b : Kurvenparameter, t_d : Zeit bis 63,2% Freisetzung, T : Zeit bis 50% Freisetzung, B und S : Anteile von *burst release* und verzögerter Phase, T_B und T_S : Zeit bis 50% Freisetzung der entsprechenden Phase.

Die beiden zweiphasigen Modelle (WB und TSL) passen visuell gut zu den Daten. Das „*Two-Stage*“-Modell weist allerdings eine weniger starke Abflachung der Kurven auf. Das WEIBULL-Modell liefert Wirkstoffmengen, die mit denen des OSL übereinstimmen und auch die Freisetzungszeit bis 63,2% Wirkstofffreisetzung folgt dem Trend des OSL-Modells. Das „*Two-Stage*“-Modell liefert als einziges Wirkstoffmengen für den Endzeitpunkt der Freisetzung, unterteilt in *burst release*-Phase und verzögerter Freisetzungsphase, sodass diese Werte nicht unbedingt mit denen der übrigen Modelle übereinstimmen. Für die Trägermaterialien **A** und **AH2** ergibt sich eine Maximalmenge von etwa 70%, **AH** kommt auf etwa 90%. Die beiden Systeme mit ionischer Agarose **AH2C** und **AH2S** kommen jeweils auf etwa 135%, da die Freisetzungskurven noch keine deutliche Abflachung zeigen und folglich den asymptotischen Wert erst spät erreichen würden. Dadurch ergeben sich auch sehr hohe Freisetzungshalbwertszeiten von etwa 1000 h für die verzögerte Phase. Nutzt man die Werte der ermittelten Anpassungsfunktionen, um den Zeitpunkt zu berechnen, an dem die Freisetzung 100% erreicht, so erhält man etwa 10,5 Wochen für **AH2C** und etwa 15 Wochen für **AH2S**.

Für die Kapselsysteme ergeben sich für den *burst release* in etwa die gleichen freigesetzten Mengen wie bei den übrigen Modellen, die verzögerte Phase kalkuliert allerdings noch bis zu weitere 10% Freisetzung, wenn auch über eine sehr, sehr lange Zeit. Das System **AH2cap** zeigt keine nennenswerte Freisetzung nach der *burst release*-Phase.

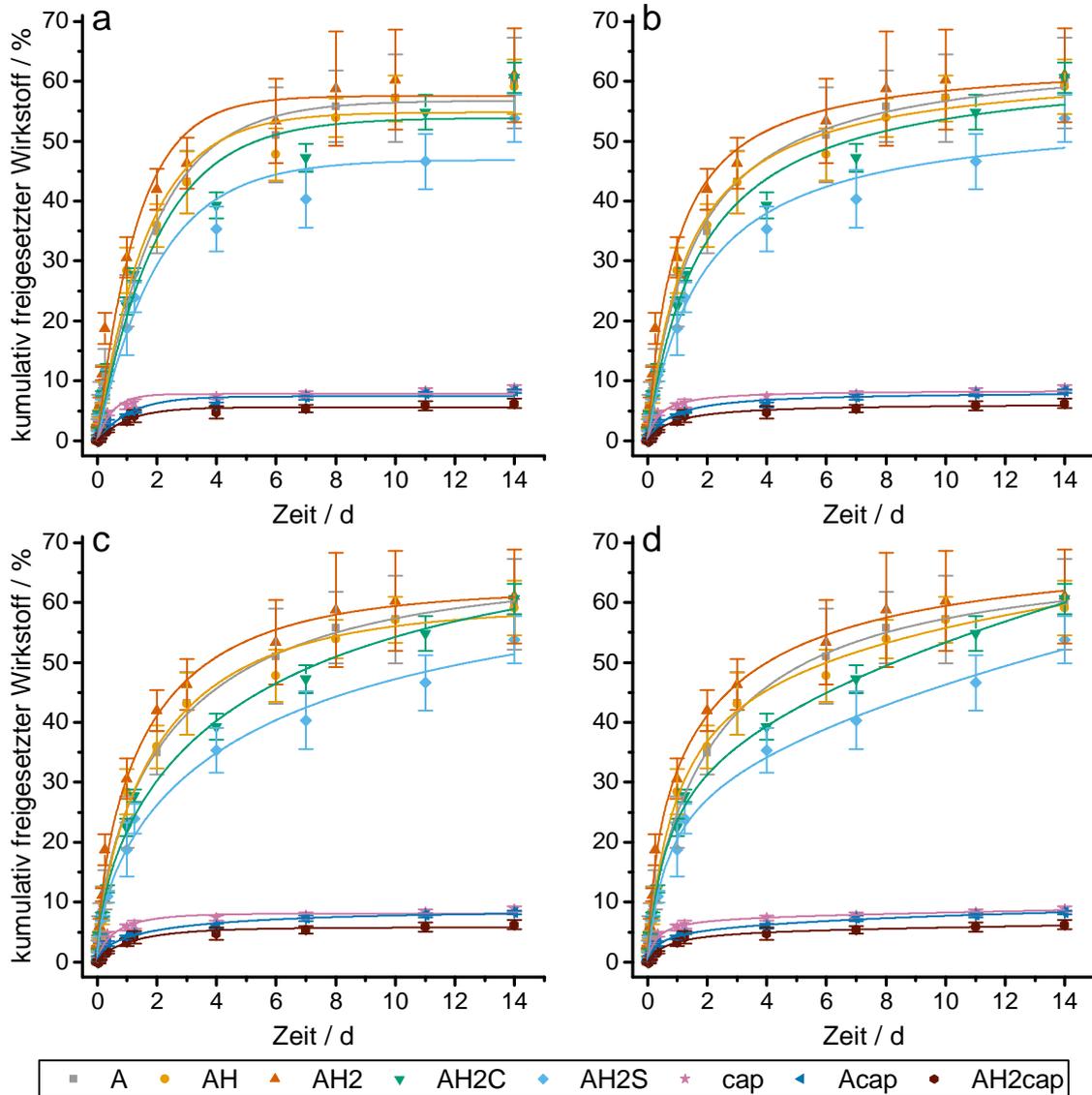


Abbildung 3.28: Kurvenanpassung an die Freisetzungsdaten A740003. a: Modell erster Ordnung (FO), b: „One-Stage“-Modell (OSL), c: WEIBULL-Modell (WB), d: „Two-Stage“-Modell (TSL). Trägersysteme aus Agarose (A) mit Hydroxyapatit (H) und beigemischten ionischen Agarosederivaten (S - anionisch, C - kationisch). Beschichtete Kapselsysteme (cap), bzw. in Trägermaterialien eingebettete Kapselsysteme. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$

Durch den grundsätzlich sehr ähnlichen Kurvenverlauf ist die Bewertung und Wichtung der Modelle mithilfe des Informationskriteriums AIC_c besonders interessant, da es eine objektive Einschätzung darüber trifft, welches der genutzten Modell die Daten am besten beschreibt. Die Werte hierzu finden sich in Tabelle 3.16. Durch die sehr ähnlichen Kurvenverläufe ist das „First Order“-Modell dasjenige mit der höchsten Varianz und hat somit trotz seiner Einfachheit sehr geringe Wichtungsfaktoren. Das „One-Stage“-Modell hat genauso viele Parameter (ist also genauso einfach oder komplex) wie das FO-Modell, allerdings passt es durch die deutlich

niedrigere Varianz besser zu den Daten. Für **cap** und **AH2cap** ist es mit deutlichem Abstand das stärkste Modell, bei **AH** ist es vergleichbar mit dem „*Two-Stage*“-Modell. Dieses wiederum ist grundsätzlich das stärkste Modell, obwohl es deutlich komplexer ist. Bis auf **cap** und **AH2cap** liefert es bei allen anderen den höchsten Wichtungsfaktor, das WEIBULL-Modell folgt etwas dahinter. Hier zeigt sich nun die Stärke des „*Two-Stage*“-Modells, dass es in vielen Fällen seine Komplexität mit einer deutlich verbesserten Kurvenanpassung neutralisiert. Zusätzlich ist es in der Lage, auch zukünftige Werte zu modellieren, sofern die experimentellen Daten dies grundsätzlich erlauben.

Tabelle 3.16: AIC_c und Wichtungen w der verschiedenen Anpassungsmodelle für A740003.

Material ^a	TSL		WB		OSL		FO		KP	
	AIC_c	w								
A	-107,8	0,734	-105,8	0,266	-89,3	0,000	-81,3	0,000	-60,7	0,000
AH	-101,7	0,531	-95,3	0,022	-101,3	0,447	-84,3	0,000	-45,1	0,000
AH2	-96,4	0,595	-95,3	0,339	-92,0	0,065	-77,1	0,000	-50,8	0,000
AH2C	-85,9	0,988	-77,0	0,012	-71,6	0,001	-61,7	0,000	-39,9	0,000
AH2S	-78,1	0,707	-75,9	0,238	-72,9	0,054	-64,2	0,001	-45,3	0,000
cap	-97,5	0,006	-97,9	0,008	-107,6	0,963	-100,1	0,023	-10,1	0,000
Acap	-116,9	0,853	-112,2	0,081	-111,7	0,065	-101,7	0,000	-52,2	0,000
AH2cap	-111,8	0,007	-111,2	0,005	-121,7	0,960	-114,7	0,029	-63,0	0,000

^a A: Agarose, H: Hydroxyapatit, C: Agarosecarbammat, S: Agarosesulfat, cap: Alginatmikrokapseln mit 5 Doppelschichten S und C. TSL: „*Two-Stage*“-Modell, WB: WEIBULL-Modell, OSL: „*One-Stage*“-Modell, FO: „*First Order*“-Modell, KP: KORSMEYER-PEPPAS-Modell

Obwohl A740003 in Zelldifferenzierungen eingesetzt wird und dort als selektiver P2X₇ Ligand identifiziert wurde, gibt es keine Freisetzungsstudien zu diesem Wirkstoff. Lediglich die während des Projektes in der Arbeitsgruppe entstandenen Ergebnisse an anderen polyelektrolytbeschichteten Alginatkapseln können als Vergleich herangezogen werden.[193] Dort wurde die Freisetzung aus Alginatkapseln untersucht, die mit kommerziell erhältlichen Polyelektrolyten beschichtet waren: jeweils fünf Doppelschichten aus entweder Chitosan/Lignosulfonat (CL), Polyallylamin/Lignosulfonat (PL) oder Polyallylamin/Alginat (PA) auf dem mit Wirkstoff beladenen Alginatkern. Die Herstellung erfolgte identisch zu den in dieser Arbeit angefertigten Kapselsystemen. Die Freisetzungen aus den Trägermaterialien verläuft etwas schneller als die aus reinen Alginatkapseln (siehe auch Abb. 3.27, dort sind die Daten zum Vergleich aufgetragen), aus den beschichteten Kapseln sind sie vergleichbar mit dem PL- und PA-System. In Trägermaterial eingebettete Kapseln verhalten sich wiederum nicht anders als die reinen Kapselsysteme, sodass davon auszugehen ist, dass die Freisetzung lediglich durch die Polyelektrolytbeschichtung stärker beeinflusst wird. Die Trägermaterialien mit ihren größeren, durchlässigen Poren zeigen ein langsames, diffusionsgesteuertes Verhalten, das durch die schlechtere Löslichkeit oder eine grundsätzlich höhere nicht-ionische Wirkstoff-Matrix-Wechselwirkung bestimmt wird. Bei den Kapselsystemen ist eine besonders starke Verzögerung in der Wirkstofffreisetzung festzustellen. Ein kleiner Teil des Wirkstoffs wird in den ersten Stunden freigesetzt, danach aber wird so gut wie kein weiterer Wirkstoff freigesetzt. Dies legt den Schluss nahe, dass zunächst Wirkstoff von der Oberfläche oder aus

oberflächennahen Schichten freigesetzt wird, der Rest aber in der Kapsel verbleibt und erst bei Erosion der Kapseln freigesetzt würde. Dies deckt sich mit den Zusammenfassungen von Li *et al.*, nach denen wenig wasserlösliche Wirkstoffe in wässrigen Medien hauptsächlich durch Matrixerosion freigesetzt werden.[143] Da es keine dezidierten Freisetzungsstudien zu A740003 gibt, können nur andere, schwer wasserlösliche Stoffe zum Vergleich herangezogen werden. Ein Beispiel ist das Krebsmedikament Paclitaxel, dessen Freisetzung gut untersucht ist. Nie *et al.* haben neben Suramin (vgl. Kap. 3.3.3) auch Paclitaxel in ihrer Kapselkombination aus PLA/PLGA verwendet, die an sich bereits deutlich hydrophober ist als Alginat und somit den Wirkstoff erst durch Matrixerosion freisetzt. Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurden so lediglich 30–40 % Paclitaxel mit sehr geringen *burst release* freigesetzt.[201] Tu *et al.* haben Alginatmikrokapseln mit dem schwer wasserlöslichen Stoff 4-Phenylazoanilin beladen und anschließend die Freisetzung in Wasser und bei simulierter oraler Aufnahme (Magen) untersucht. In Wasser ergab sich eine Freisetzung von etwa 40 % innerhalb von vier Stunden. Auch simulierter Magensaft ergab keine schnellere Freisetzung, erst der Wechsel zu einem pH-Wert von 6,8 führte zu einer Freisetzung innerhalb einer Stunde, da durch den höheren pH-Wert und den Phosphatgehalt die Struktur des Calciumalginats zerstört und der Wirkstoff freigesetzt wurde.[209] Ein anderes Beispiel für eine schlecht wasserlösliche Modells substanz ist Diflunisal, ein Schmerzmittel und Entzündungshemmer. Rochin-Wong *et al.* haben Nanokapseln mit Chitosan und κ -Carrageen beschichtet und anschließend die Freisetzung von Diflunisal in saurem Medium (pH 1,2) und Phosphatpuffer (pH 7,4) untersucht.[214] Während im sauren Medium praktisch keine Freisetzung stattfand, zeigten die Freisetzungprofile bei einem pH-Wert von 7,4 einen deutlichen verzögernden Einfluss der Polyelektrolytschichten auf die Freisetzung des Wirkstoffs. So konnte durch Einsatz von zwei Doppelschichten die Freisetzungsrates im Verlauf von acht Stunden halbiert werden.

3.3.6 Vergleich der Freisetzungsversuche

Die untersuchten Freisetzungssysteme (Zylinder und Mikrokapseln) lassen sich nach Abbildung 2.8 den Matrixsystemen mit nicht-konstanter Freisetzungsaktivität zuordnen. Der Wirkstoff ist gleichmäßig über das gesamte System verteilt und die Freisetzung beginnt sofort mit Start der Untersuchung, zunächst sehr schnell, im Laufe des Experiments aber langsamer. Auch die beschichteten Kapseln fallen in diese Kategorie, da die Polyelektrolytbeschichtung nur die Geschwindigkeit der Diffusion verlangsamt, nicht aber den Diffusionsprozess an sich behindert oder erst nach einer gewissen Zeit starten lässt.

Abschließend sollen nun die Freisetzungen der verschiedenen Wirkstoffe miteinander verglichen werden. Die drei leicht wasserlöslichen Modellsubstanzen ATP, Suramin und Methylenblau zeigen sehr ähnliche Freisetzungsprofile: eine schnelle Freisetzung aus Agarosegelen die durch den Zusatz von Hydroxyapatit lediglich schwach verlangsamt werden kann. Der Zusatz von den jeweils gegensätzlich zum Wirkstoff geladenen ionischen Agarosederivaten führt hingegen bei allen drei Substanzen zu einer sehr deutlichen Verzögerung in der Wirkstofffreisetzung. Polyelektrolytbeschichtungen von Alginatkapseln haben durch die elektrostatische Wechselwirkung der Schichten einen ähnlichen Effekt, durch zusätzliches Einbetten in die Agarose-Kompositmatrix kann die Freisetzung nochmals verzögert werden. Beim schlecht wasserlöslichen Rezeptorliganden A740003 hat die Zusammensetzung der Agarose-(Komposit-)Gele keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung des Wirkstoffs. Nach vierzehn Tagen sind in allen Fällen etwa 60% freigesetzt worden. Die Verkapselung in Alginat und Beschichtung mit Polyelektrolyten führt nach kurzem *burst release* zu praktisch keiner weiteren Freisetzung.

Unter den untersuchten Anpassungsmodellen erwiesen sich die neu entwickelten „*One-Stage*“- und „*Two-Stage*“-Modelle als sehr leistungsfähig. Im direkten Vergleich mit etablierten Modellen erzielten sie in vielen Fällen genauso gute oder sogar bessere Anpassungswerte. Sie erlauben eine zeitliche Abschätzung der Freisetzung und im Falle des „*Two-Stage*“-Modells auch eine quantitative Abschätzung von *burst release* und verzögerter Freisetzungsphase, allerdings bieten die Modelle keine Informationen zum Freisetzungsmechanismus, sodass die Modelle im Idealfall in Verbindung mit etablierten Modellen zu nutzen sind. Durch den rein beschreibenden Charakter besteht zudem keine Beziehung der Modelle zu Geometrie oder Aktivität des Trägermaterials.

4

Experimenteller Teil

4.1 Materialien

Bei den verwendeten Polysacchariden handelte es sich um Agarose (Roti[®]garose für die DNA/RNA Elektrophorese, sulfatfrei (mit Elementaranalyse überprüft), ¹H-NMR entspricht) und um Natriumalginat (für die Biochemie), beides von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland). Für die Hydroxyapatitsynthese wurden Calciumnitrat Tetrahydrat, Diammoniumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Kapselherstellung wurden zudem Calciumchlorid Dihydrat von Merck und Natriumcarbonat von Carl Roth verwendet. Als Modellwirkstoffe zur Freisetzungsuntersuchung wurden Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz (98 %) von Carl Roth, Suramin Hexanatriumsalz (> 98 %) von Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Deutschland), A740003 (> 96 %) von Alomone Labs (Jerusalem, Israel) sowie Methylenblau von Merck verwendet.

Zur Synthese wurden Schwefeltrioxid/Pyridin-Komplex ($\geq 97\%$) und Iodmethan (99 %) von Merck, Phenylchlorformiat (99 %) von Alfa Aesar und 3-(Dimethylamino)propylamin (> 98 %) von Sigma-Aldrich genutzt. Wasserfreies Dimethylformamid (DMF) und Pyridin in speziellen, mit Septen versiegelten Flaschen mit Molekularsieb stammten von Acros Organics (Geel, Belgien). 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid ([BMIM]Cl, 99 %) wurde von iolitec GmbH (Heilbronn, Deutschland) erworben. Ethanol, 2-Propanol und Tetrahydrofuran stammten von Sigma-Aldrich, letzteres wurde vor Verwendung über Molekularsieb getrocknet. Für NMR-Analysen wurden deuteriertes Wasser und deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) der Firma deuterio GmbH (Kastellaun, Deutschland) verwendet. Trifluoressigsäure stammte von Merck. Sofern nicht explizit anders angegeben, wurden die Chemikalien ohne weitere Aufbereitung oder Behandlung verwendet. Als Wasser wurde entweder deionisiertes Wasser (VE-Wasser) oder Reinstwasser (18,2 M Ω cm) verwendet.

Sterile phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, *phosphate-buffered saline*, pH 7,4), Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM), fetales Kälberserum (FBS, *fetal bovine serum*) und Penicillin/Streptomycin stammten von BioChrom GmbH (Berlin, Deutschland), das 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von AppChem GmbH (Darmstadt, Deutschland). Folgende Zelllinien wurden für Tests zur Biokompatibilität verwendet: Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) isoliert aus dem Fettgewebe von zwei Spenderinnen Mitte 30 (Lw32 und Lw35) und mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) einer 58-jährigen Spenderin mit diagnostizierter Osteoporose. Alle Gewebe-/Blutspenden erfolgten im Rahmen der genehmigten Ethikanträge für die Forschungsprojekte „PersoImplant“ (BMBF IngenieurNachwuchs 2015, 13FH019IX5) und „TestMedgO“ (NRW Zeit für Forschung 2016, 1609FHZ027).

4.2 Messmethoden

Elementaranalyse (EA)

Alle Elementaranalysen wurden an einem VARIO EL III CHNS (Elementar Analysensysteme, Hanau, Deutschland) durchgeführt; der Halogengehalt (Chlor oder Iod) wurde nach einem Standardverfahren bestimmt. Nach Verbrennung der Probe wurde der Rückstand mit AgNO₃ an einer halogensensitiven Elektrode potentiometrisch titriert. Die durchschnittlichen

Substitutionsgrade (DS) wurden nach den nachstehenden Gleichungen mit den in Tabelle 4.1 angegebenen molaren Massen berechnet. Für alle Substitutionen (*sub*) wird zunächst die molare Nettoänderung durch die Substitution an der Hauptkette des Polysaccharids ermittelt:

$$A_{\text{sub}} = M_{\text{sub}} - \sum_{k=1}^{z_{\text{sub}}} n_k \cdot M_k \quad (4.1)$$

In den Gleichungen 4.2 und 4.3 bezeichnet $n_{X,RU}$ die Stoffmenge des Atoms X pro Wiederholeinheit des Polysaccharids, $n_{X,sub}$ die Stoffmenge des Atoms im Substituenten und $n_{X,ent}$ die Stoffmenge des Atoms, welches vom Polysaccharid entfernt wurde. AGE bezeichnet die Wiederholeinheit der Agarose. Da unsubstituierte Agarose in der Wiederholeinheit weder Schwefel noch Stickstoff trägt, sind $n_{X,ent}$ und $n_{X,RU}$ in beiden Gleichungen gleich Null.

Für die Derivate **AGS** wurde der DS an Sulfatgruppen über den Schwefelgehalt der Proben berechnet.

$$DS_{\text{SO}_4} = \frac{\frac{\text{S}\%}{100\%} \cdot M_{\text{AGE}} - n_{\text{S,RU}} \cdot M_{\text{S}}}{M_{\text{S}}(n_{\text{S,sub}} - n_{\text{S,ent}}) - \frac{\text{S}\%}{100\%} \cdot A_{\text{SO}_4}} \quad (4.2)$$

Für die Derivate **ACA** wurde der DS des Carbamatsubstituenten über den Stickstoffgehalt der Proben berechnet.

$$DS_{\text{CA}} = \frac{\frac{\text{N}\%}{100\%} \cdot M_{\text{AGE}} - n_{\text{N,RU}} \cdot M_{\text{N}}}{M_{\text{N}}(n_{\text{N,sub}} - n_{\text{N,ent}}) - \frac{\text{N}\%}{100\%} \cdot A_{\text{CA}}} \quad (4.3)$$

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)

FT-IR Spektren wurden an einem Jasco FT/IR-410 Spektrometer (Jasco, Tokio, Japan) im Wellenzahlenbereich von 4000–500 cm^{-1} mit 32 Scans und einer Auflösung von 1 cm^{-1} aufgenommen. Die festen Polysaccharidproben wurden mit etwa der 100-fachen Menge trockenem KBr gemörsert, zu Presslingen (10 t, 2 min) verarbeitet und anschließend die Absorbanz vermessen. Unmittelbar vor jeder Messung wurde ein Hintergrundspektrum mit den gleichen Parametern aufgenommen. Die Spektren wurden mit einem Savitzky-Golay-Filter (Polynom 2. Ordnung, 15 Punkte) geglättet und anschließend zur besseren Vergleichbarkeit auf den Wertebereich [0, 1] normiert.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Alle NMR-Spektren wurden bei 60 °C in DMSO- d_6 oder D₂O mit einer Konzentration von mindestens 60 mg mL^{-1} an einem Bruker Avance I 250 MHz Spektrometer oder einem Bruker Avance II 400 MHz Spektrometer (Bruker, Biospin, Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Für ¹H-NMR-Spektren wurden 16 Scans, für ¹³C-NMR-Spektren bis zu 12000 Scans aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software MestReNova 6.0.2 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spanien) mit Referenzierung über die Lösemittelsignale. Für die Bestimmung des durchschnittlichen Substitutionsgrades der Agarosephenylcarbonate (DS_{PC}) mittels ¹H-NMR wurden etwa 10 Tropfen Trifluoressigsäure (TFA) zur gelösten Probe gegeben,

Tabelle 4.1: Molare Massen (M) der Wiederholeinheiten, Substituenten und Elemente zur Berechnung der durchschnittlichen Substitutionsgrade (DS).

	M g mol ⁻¹
Wiederholeinheiten^a	
AGE	306,12
APC ($DS = 1$)	426,19
ACA ($DS = 1$)	576,11
Substituenten^b	
-SO ₃ Na	103,06
-COO(C ₆ H ₅) (PC)	121,07
-CONH(C ₆ H ₁₅ N ⁺ I ⁻) (CA)	270,99
Elemente	
H	1,00
C	12,01
N	14,01
O	16,00
Na	22,99
S	32,07
Cl	35,45
I	126,90

^a AGE: Agarosewiederholeinheit, APC: Agarosephenylcarbonat, ACA: Agarosecarbamat.

^b -SO₃Na: Natriumsulfat, PC: Phenylcarbonat, CA: Carbamat mit (3-Aminopropyl)-trimethylammoniumiodid.

um die Signale der austauschenden Protonen der Hydroxylgruppen ins Tieffeld (>10 ppm) zu verschieben. Die Berechnung des DS wurde durch das Intensitätsverhältnis der aromatischen Protonensignale zu den Signalen des Agarosegerüsts bestimmt:

$$DS_{PC} = \frac{14 \cdot I_{\text{H (aromatisch)}}}{5 \cdot I_{\text{H (AGE)}}} \quad (4.4)$$

Röntgendiffraktometrie (XRD)

Röntgendiffraktogramme von pulverisierten Proben wurden an einem D2 PHASER (Bruker AXS, Karlsruhe, Deutschland) mit einer 300 W Röntgenröhre (Cu K α , 2 θ : 15–65°) aufgenommen. Die Diffraktogramme wurden mit dem Datenbankeintrag JCPDS PDF Nr. 09-432 für die Hydroxyapatit-Identifizierung verglichen. Die Kristallitgrößenbestimmung erfolgte über die SCHERRER-Gleichung unter Verwendung der Halbwertsbreite des (002)-Signals, vermessen mit OriginPro 2016. Der Kristallinitätsgrad (X_c) wurde durch das Intensitätsverhältnis des (300)-Reflexes I_{300} und des Tals zwischen den (112)- und (300)-Reflexen $I_{112/300}$ bestimmt[186]:

$$X_c \approx 1 - \frac{I_{112/300}}{I_{300}} \quad (4.5)$$

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Ein LEO 1450 VP Rasterelektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer Auflösung von 4 nm wurde zur Aufnahme von gold-gesputterten Proben genutzt. Zur anschließenden Bildanalyse wurde die freie Software *ImageJ* verwendet, Längenmessungen wurden auf den Maßstabsbalken kalibriert.

Oberflächenbestimmung mittels Gasadsorption (BET)

Zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche wurde ein Monosorb BET Gasadsorptions/-desorptionsgerät der Firma Quantachrome Instruments (Boyton Beach, USA). Als Testgas wurde ein Gemisch aus He (5.0) mit 30 % N₂ (5.0) (Westfalen AG, Münster) verwendet, die Adsorption fand unter Kühlung mit Flüssigstickstoff bei 77 K statt. Nach Nullmessung des Geräts wurden circa 15 mg Probenmaterial in Dreifachbestimmung vermessen.

Messung der offenen Porosität mittels Ethanol

Getrocknete, zylindrische Trägermaterialien wurden mit einem Messschieber (Auflösung 0,1 mm) gemessen und auf einer Analysenwaage (Auflösung 0,0001 g) genau gewogen. Anschließend wurden die Probenkörper für 30 min in Ethanol getaucht. Überschüssiges Ethanol wurde entfernt und die aufgenommene Menge an Ethanol bei bekannter Temperatur wurde durch Rückwägung bestimmt. Über den Vergleich von aufgenommenem Volumen Ethanol und Trockenvolumen des Trägermaterials (bestimmt über die gemessene Höhe und Durchmesser) wurde die offene Porosität bestimmt. Alle Messungen wurden als Fünffachmessungen durchgeführt.

Digitale Auflichtmikroskopie

Auflichtmikroskopieaufnahmen wurden an einem Keyence VHX-7000 (Keyence, Japan) mit bis zu 1000facher Vergrößerung angefertigt. Dabei wurde das variable Ringlicht auf einen maximalen Kontrast eingestellt.

Computertomografie (μ -CT)

Ein Bruker SkyScan 1275 Mikrocomputertomograph (Bruker microCT, Kontich, Belgien) wurde für μ -CT-Aufnahmen verwendet. Spannung und Stromstärke der Röntgenröhre wurden abhängig von der Probe so eingestellt, dass die Transmission der Röntgenstrahlen im optimalen Bereich von 15–90 % lag. Die Aufnahmen erfolgten als Helixscan mit 0,2° pro Aufnahmeschritt und 2531 Einzelbildern. Die Rekonstruktion der Aufnahmen erfolgte mit der zugehörigen Software NRecon (Version 1.7.5.0, Bruker).

ζ -Potentialbestimmung

Die Oberflächenladung der Partikel wurde mit einem Stabino[®] Charge Titration System (colloid-metrix, Deutschland, mit Stabino[®] Control v.2.03.03 Software) bestimmt. Hierzu wurden jeweils etwa 100 mg Mikrokapseln und deionisiertes Wasser verwendet.

Statische Lichtstreuung (SLS)

Zur Partikelgrößenbestimmung wurde statische Lichtstreuung an einem Bluewave (Microtrac Europe, Deutschland mit Microtrac FLEX v11.0.0.4 Software) genutzt. Hierzu wurden etwa 200 mg Mikrokapseln in das Probenaufgabesystem gegeben, für eine Minute mit Ultraschall in deionisiertem Wasser dispergiert und anschließend vermessen.

Photometrie (UV/Vis-Spektroskopie)

Die Bestimmung der Freisetzungskinetiken erfolgte mittels Photometrie in Reinstwasser an einem UV-1650 PC Photometer (Shimadzu Europe, Duisburg, Deutschland) mit Hellma 104-QS Quarzglasküvetten ($d = 10$ mm). Für alle Wirkstoffe (ATP, Suramin, A740003 und Methylenblau) wurden entsprechende Kalibrationslösungen im Bereich $1\text{--}100\ \mu\text{mol L}^{-1}$ angesetzt und diese bei den jeweiligen Absorptionsmaxima ($\lambda_{ATP} = 255$ nm, $\lambda_{SUR} = 313$ nm, $\lambda_{MeB} = 660$ nm und $\lambda_{A74} = 282$ nm) vermessen. Über die Kalibrationsgeraden konnten dann die Probenkonzentrationen aus den Freisetzungsversuchen bestimmt werden.

Biokompatibilität

Für die Bestimmung der Biokompatibilität wurden Trägermaterialien wie unter Abschnitt 4.4 beschrieben hergestellt, allerdings mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von 1 bis 1,5 mm. Diese wurden für einen Tag in deionisiertem Wasser gewaschen, anschließend für zwei Tage in sterilem 1 M PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*) konditioniert und dann gefriergetrocknet. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Geräte und Behälter vor Benutzung mit Isopropanol desinfiziert und alle Arbeitsschritte im Abzug durchgeführt. Nach der Trocknung wurden die Probenbehälter erst wieder unter der Laminar Flow Hood geöffnet und nochmals mittels UV-Licht sterilisiert. Für die Biokompatibilität wurden die Proben im Testmedium (DMEM + 10 % FBS + $100\ \text{U mL}^{-1}/100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ Penicillin/Streptomycin) für 72 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und für den MTT-Test verwendet. Von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) aus adipösem Gewebe, und mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) wurden jeweils 20000 Zellen für 16 h in 96er Mikrotiterplatten mit dem inkubierten Testmedium kultiviert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 4 h mit dem Testmedium plus $0,5\ \text{mg mL}^{-1}$ MTT kultiviert. Lebende Zellen wandeln MTT in wasserunlösliches Formazan um, was durch einen Farbwechsel von gelb zu violett sichtbar ist. Um eine Zellyse zu induzieren und das Formazan aufzulösen, wurde DMSO genutzt. Das Lysat wurde photometrisch bei 550 nm vermessen und über positive und negative Referenzkulturen die Zellviabilität bestimmt. Alle Tests wurden als Neunfachbestimmung durchgeführt. Im Anschluss wurde ein Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt und ein entsprechender signifikanter Ausreißer eliminiert. Zur Auswertung wurde mittels der Steigung zwischen negativer und positiver Kontrolle der Anteil lebender Zellen der einzelnen Proben ermittelt.

4.3 Synthesen

4.3.1 Synthese von Agarosesulfat (AGS01-AGS05, Veresterung mit SO₃/Pyridin-Komplex, typisches Beispiel)

Getrocknete Agarose (3,00 g; 9,80 mmol AGE, 1 Äq.) wurde mit [BMIM]Cl (27 g) versetzt und auf 100 °C erhitzt. Nach Schmelzen der ionischen Flüssigkeit und Lösen der Agarose wurde die Mischung auf 80 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 15 mL trockenem DMF (5 mL DMF pro g Agarose) wurde die Reaktionsmischung für 1 h bei 80 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. 4,68 g (29,4 mmol, 3 Äq.) SO₃/Pyridin-Komplex wurden in 15 mL trockenem DMF suspendiert, der Reaktionsmischung hinzugefügt und anschließend für 2 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 300 mL Ethanol isoliert, dreimal mit 100 mL Ethanol gewaschen und abfiltriert. Der Feststoff wurde dann in etwa 50 mL einer 2%-igen wässrigen NaCl-Lösung bei 80 °C gelöst. Nach Neutralisieren mit NaHCO₃ wurde das Produkt erneut in etwa 200 mL Ethanol/Wasser (9:1) gefällt, dreimal mit 50 mL Ethanol/Wasser (9:1) gewaschen, filtriert und anschließend bei 60 °C im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,54 g weißer Feststoff (8,99 mmol, 91 %) **AGS04**.

DS_{SO₄} = 0,65 (bestimmt mit EA)

Elementaranalyse: berechnet (%) C: 38,66; H: 4,65; N: 0; S: 5,62; gefunden (%) C: 37,75; H: 4,97; N: Spuren; S: 5,62.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 60,7 (G6), 65,3 (G6'), 68,1 (G4), 68,8 (LA6), 70,2 (G2,LA2), 73,2 (G5'), 75,0 (LA4), 75,4 (G5), 76,3 (LA5), 80,1 (LA3), 81,0 (G3), 97,5 (LA1), 102,2 (G1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 3,45–5,10 (AGE; G6').

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3433 (s,br), 3218 (w), 2959 (w), 2898 (w), 1640 (m), 1476 (m,sh), 1401 (m), 1250 (s), 1160 (w), 1073 (s), 1006 (w), 930 (m), 890 (w), 817 (m), 773 (w).

4.3.2 Synthese von Agarosephenylcarbonat (APC01-APC05, Veresterung mit Phenylchlorformiat, typisches Beispiel)

Getrocknete Agarose (2,00 g; 6,53 mmol AGE, 1 Äq.) wurde mit [BMIM]Cl (18 g) versetzt und auf 100 °C erhitzt. Nach Schmelzen der ionischen Flüssigkeit und Lösen der Agarose wurde die Mischung auf 80 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 5 mL trockenem Pyridin (2,5 mL Pyridin pro g Agarose) wurde die Reaktionsmischung für mindestens 12 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurden weitere 15 mL Pyridin hinzugegeben und die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt. Sodann wurde Phenylchlorformiat (1,65 mL, 13,1 mmol, 2 Äq.) der Reaktionsmischung tropfenweise hinzugefügt und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 500 mL Eiswasser isoliert, dreimal mit 100 mL Eiswasser und zweimal mit 50 mL Ethanol gewaschen und abfiltriert. Der Feststoff wurde dann in etwa 50 mL DMSO unter Erwärmen auf 60 °C gelöst. Dann wurde das Produkt erneut in etwa 200 mL Ethanol gefällt, dreimal mit 50 mL Ethanol gewaschen, filtriert und anschließend bei 60 °C im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,08 g weißer Feststoff (6,26 mmol, 96 %) **APC02**.

$DS_{PC} = 0,24$ (bestimmt mit NMR)

Elementaranalyse: berechnet (%) C: 49; H: 5,4; N: 0; S: 0; gefunden (%) C: 48,1; H: 5,6; N: Spuren; S: 0.

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 60,0 (G6), 67,4 (G4), 68,1 (LA6), 69,5 (G2,LA2), 74,3 (LA4), 75,5 (G5), 76,5 (LA5), 79,4 (LA3), 80,3 (G3), 96,8 (LA1), 101,5 (G1), 120,7 (C9 arom.), 125,8 (C11 arom.), 129,3 (C10 arom.), 150,6 (C8 arom.), 152,6 (C=O).

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 3,45–5,10 (AGE), 7,00–7,50 (5 H arom.).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3433 (s,br), 3218 (w), 2959 (w), 2898 (w), 1764 (m), 1640 (m), 1590 (w), 1490 (w), 1401 (m), 1258 (m), 1210 (s), 1160 (w), 1070 (s), 1022 (w), 930 (m), 890 (w), 773 (w).

4.3.3 Synthese von (3-Aminopropyl)trimethylammoniumiodid (TMAPA, Methylierung mit Iodmethan)

Zu einer Vorlage von 500 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF) unter N_2 im Eisbad wurde 3-(Dimethylamino)propylamin (DMAPA, 32 mL, 257 mmol, 1 Äq.) gegeben und gelöst. Anschließend wurde CH_3I (40,02 g, 282 mmol, 1,1 Äq.) bei 0°C unter N_2 tropfenweise hinzugegeben, wobei sich ein feiner, weißer Niederschlag bildete. Diese Suspension wurde für 2,5 h bei 0°C weitergerührt, anschließend abfiltriert und fünfmal mit 200 mL trockenem THF gewaschen. Die Trocknung erfolgte zunächst am Rotationsverdampfer bei 350 mbar, 50°C und anschließend am Vakuum bei einem Druck von unter 1 mbar und Raumtemperatur. Die Lagerung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre.

Ausbeute: 48,81 g gelber Feststoff (76 %).

$DS_{\text{CH}_3\text{I}} = 1,06$ (bestimmt mit EA).

Elementaranalyse: berechnet (%) C: 29,0; H: 6,4; N: 11,2; I: 53,4; gefunden (%) C: 29,1; H: 6,6; N: 11,2; I: 53,4.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): δ (ppm) = 25,5 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 38,2 (CH_2-NH_2), 54,0 (N-(CH_3)₃), 65,2 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 2,07 (qn, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 2,87 (t, CH_2-NH_2), 3,23 (s, N-(CH_3)₃), 3,47 (t, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$).

4.3.4 Synthese von Agarosecarbamat (ACA01-ACA07, Aminolyse mit TMAPA, typisches Beispiel)

Agarosephenylcarbonat (0,5 g; 1,3 mmol, 1 Äq., $DS_{PC} = 0,97$) wurde in 25 mL trockenem DMF bei 80°C gelöst. Nach Zugabe von TMAPA (1,55 g, 6,35 mmol, 5 Äq.) wurde die Reaktionsmischung für 24 h bei 80°C gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 150 mL Ethanol isoliert, dreimal mit 30 mL Ethanol gewaschen und abfiltriert. Der Feststoff wurde dann in etwa 40 mL H_2O gelöst und anschließend für 72 h gegen H_2O dialysiert (SpectraPor, MWCO 6000–9000 g mol^{-1} , dreifacher Wasserwechsel). Anschließend wurde die Lösung bei -40°C eingefroren und lyophilisiert.

Ausbeute: 0,638 g gelb-oranger Feststoff (91 %) **ACA06**.

DS_{CA} = 0,86 (bestimmt mit EA)

Elementaranalyse: berechnet (%) C: 41,0; H: 5,7; N: 4,4; I: 19,6; gefunden (%) C: 38,7; H: 5,9; N: 4,4; I: 19,75.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 155,9 (C=O), 101,5 (G1), 96,9 (LA1), 80,3–67,4 (G2-4, LA2-6), 63,5 (–, CH₂, C10), 60,0 (G6), 52,4 (+, CH₃, C11), 37,5 (–, CH₂, C8), 22,9 (–, CH₂, C9).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1,87 (2 H, H₉), 2,84 (2 H, H₈), 3,08 (9 H, H₁₁), 3,28–5,10 (HDO; 2 H, H₁₀; AGE).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{–1}) = 3431 (s,br), 2961 (w), 2895 (w), 1705 (m), 1640 (m), 1536 (m), 1479 (m), 1401 (m), 1258 (m), 1158 (w), 1070 (s), 967 (w), 930 (m), 894 (w), 771 (w).

4.4 Hydrogele und Kompositgele

Als Trägermaterialien wurden Agarosekompositgele hergestellt. Der Agarose wurden verschiedene Anteile Hydroxyapatit durch *in situ* Fällung hinzugefügt. Darüber hinaus wurden für Freisetzungsforschungen auch ionische Agarosederivate oder Mikrokapseln auf Alginatbasis¹ dem Kompositgel zugefügt. Reine Agarosehydrogele dienten als Referenz.

4.4.1 Agarosegele

In einem typischen Ansatz wurden 0,4 g Agarose in 20 mL Reinstwasser bei 90 °C unter Rühren gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurde die Agaroselösung in zylindrische Formen (Durchmesser 16 mm) gegossen und dort abkühlen und verfestigen gelassen. Die Hydrogele wurden in ca. 10 mm hohe Zylinder geschnitten und entweder als Hydrogel weiter genutzt oder getrocknet. Die Trocknung erfolgte in der Regel durch Gefriertrocknung. Hierzu wurden die Gele bei –40 °C in einem Tiefkühler eingefroren und anschließend in einem Gefriertrockner (Alpha 2-4LD plus, CHRIST, Deutschland) bei –82 °C Kondensatortemperatur und einem Vakuum von <0,1 mbar getrocknet. Für vergleichende Messungen zur Porosität wurde ein Batch für 5 min in Flüssigstickstoff getaucht und anschließend gefriergetrocknet.

4.4.2 Kompositgele

In einem typischen Ansatz wurden 0,6 g Agarose in 20 mL einer 0,2 M Ca(NO₃)₂-Lösung bei 90 °C gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60–70 °C wurden 10 mL einer Lösung mit 0,12 M (NH₄)₂HPO₄ und 0,16 M NaOH über den Zeitraum von etwa einer Stunde unter Rühren zugetropft, wobei Hydroxyapatit als weißer Feststoff ausfiel. Diese Suspension wurde bei 60 °C für etwa drei bis vier Stunden weitergerührt und anschließend wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben in die Formen gegossen, erkalten gelassen und anschließend geschnitten und getrocknet. Die Zugabe von gelösten ionischen Agarosederivaten für die Proben **AH2S** und **AH2C** erfolgte gegen Ende der Nachrührzeit. Die Absolutmengen an Agarose und Hydroxyapatit wurden

¹Unter meiner fachlichen Betreuung und Konzeptionierung erfolgte die Etablierung, Einrichtung und Charakterisierung des Laborprototyps während einer Bachelorthese (vgl. [215]) und die generelle Beschichtung von Alginatmikrokapseln während einer Masterthese (vgl. [216], publiziert in: M. Witzler et al., “Evaluating release kinetics from alginate beads coated with polyelectrolyte layers for sustained drug delivery”, *ACS Applied Bio Materials* **2021**, *4*, 6719–6731, DOI 10.1021/acsbm.1c00417) [Anm. d. Autors].

entsprechend angepasst, um das Polymer/Hydroxyapatit-Verhältnis beizubehalten, wobei die Hälfte der Agarose durch das ionische Agarosederivat ersetzt wurde. Die hergestellten Kompositgele sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Kompositgele. Massenanteile w der einzelnen Bestandteile der Trägermaterialien bezogen auf das gesamte Hydrogel.

Probe ^a	w _{AG} /%	w _{HA} /%	w _{AGS} /%	w _{ACA} /%
A	2	0	0	0
AH	2	2	0	0
AH2	2	4	0	0
AH2S	1	4	1	0
AH2C	1	4	0	1

^a AG: Agarose, HA: Hydroxyapatit, AGS: Agarosesulfat, ACA: Agarosecarbamat.

Zur Herstellung von Trägermaterialien mit Polyelektrolytkapseln wurden etwa 0,5 g der von überschüssigem Wasser befreiten Kapseln analytisch genau in die Formen eingewogen und diese anschließend mit der Suspension auf etwa 10 mm Füllhöhe aufgefüllt und erstarren gelassen. Die entformten Gele wurden dann zur Wirkstofffreisetzung verwendet.

4.4.3 Alginatmikrokapseln

Zur Herstellung der Mikrokapseln wurde ein Laborprototyp einer koaxialen Sprühanlage (Abb. A.1) verwendet. Eine wässrige Lösung aus Natriumalginat ($w = 1\%$, Viskosität $\eta = 0,4$ Pa s) und dem entsprechenden Wirkstoff wurde in eine Perfusorspritze (50 mL) gefüllt und mit einer Flussrate von 8 mL min^{-1} durch eine stumpfe 23G Kanüle gefördert. Zur Zerstäubung wurde Druckluft (Flussrate 4 L min^{-1}) verwendet. Die feinen Tröpfchen wurden in einer 1 M CaCl_2 -Lösung mit der gleichen Wirkstoffkonzentration wie die Alginatlösung aufgefangen und dort bei $2\text{--}8^\circ\text{C}$ für 1 h aushärten gelassen. Die Mikrokapseln wurden anschließend abfiltriert.

Für die Beschichtung der Kapseln mit den ionischen Agarosederivaten wurde ein immersiver Ansatz gewählt (siehe Abb. 4.1). Die abfiltrierten Mikrokapseln wurden kurz mit Reinstwasser gewaschen und anschließend in einem 5 mL Vial mit 2 mL einer 2%igen Lösung aus **ACA06** versetzt und für 1 min gevortext. Anschließend wurden die Kapseln abfiltriert, kurz mit Reinstwasser abgespült, mit 2 mL einer 2%igen Lösung aus **AGS05** versetzt. Nach 1 min

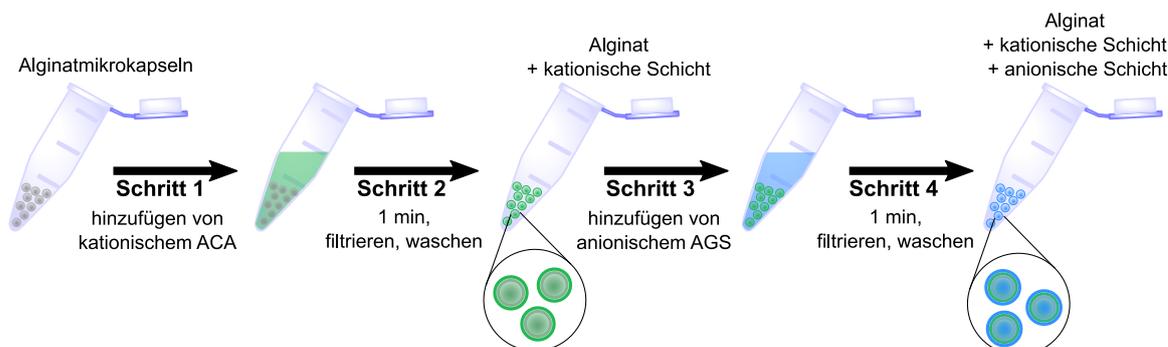


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Beschichtung von Alginatmikrokapseln mit ionischen Agarosederivaten. Nach Auftragung einer Doppelschicht aus ACA und AGS wurden die Schritte 1-4 noch viermal wiederholt, sodass am Ende fünf Doppelschichten aufgetragen wurden.

Vortexen wurden die Kapseln abfiltriert und kurz abgespült. Diese Schritte wurden fünfmal wiederholt, sodass sich danach auf den Alginatmikrokapseln fünf Doppelschichten, jeweils bestehend aus einer kationischen und einer anionischen Schicht, befanden.

4.4.4 Wirkstoffbeladung und Verkapselungseffizienz

Als Modellsubstanzen für die Wirkstofffreisetzung wurden ATP (Adenosin-5'-triphosphat), Suramin, Methylenblau und A740003 verwendet. Die Strukturformeln der Wirkstoffe sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Bei der Beladung der Gele mit Wirkstoffen wurden grundsätzlich zwei Methoden angewendet. Die Trägermaterialien wurden über das so genannte *drop-in* Verfahren beladen, die Polyelektrolytkapseln durch Verkapselung des Wirkstoffs während der Herstellung.

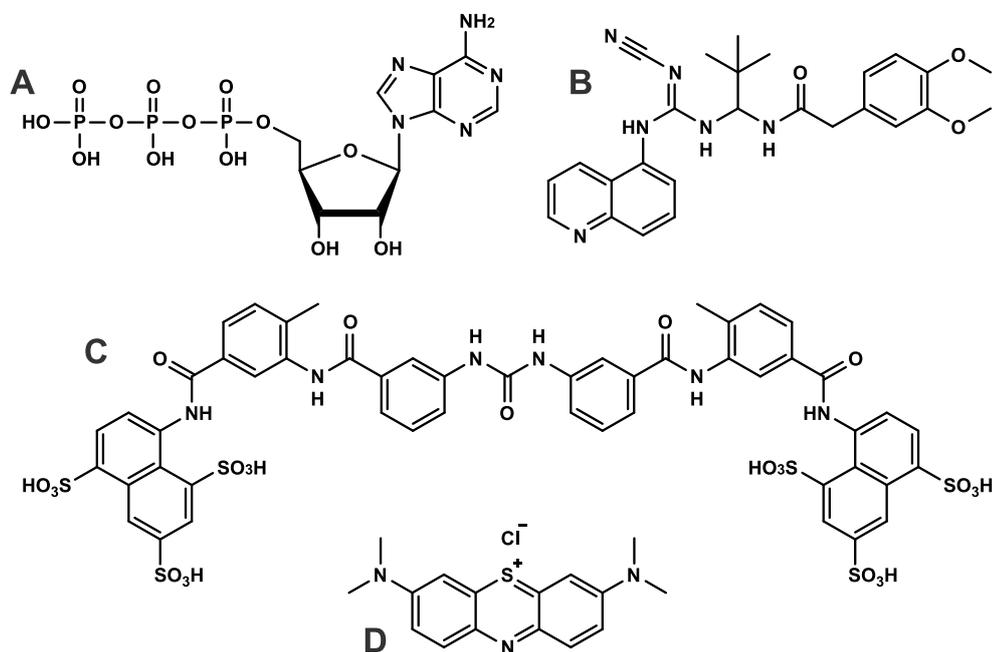


Abbildung 4.2: Strukturformeln der verwendeten Modellsubstanzen. **A:** ATP (verwendet als Dinatriumsalz), **B:** A740003, **C:** Suramin (verwendet als Hexanatriumsalz), **D:** Methylenblau.

Wirkstoffbeladung der Trägermaterialien

Die getrockneten Trägermaterialien wurden durch Auftropfen einer Lösung bekannter Konzentration mit Wirkstoff beladen und anschließend mittels Gefriertrocknung abermals getrocknet. Diese dadurch bekannte Stoffmenge an Wirkstoff wurde für die Berechnungen der Freisetzungsversuche als mögliche 100% angesehen.

Wirkstoffbeladung der Mikrokapseln

Die Beladung der Kapseln erfolgte durch Lösen einer bekannten Masse des Wirkstoffs in der Natriumalginatlösung. Durch die Gelierung des Alginats im Calciumbad wird der Wirkstoff im Alginatkern eingeschlossen. Um eine verfrühte Freisetzung des Wirkstoffs zu vermeiden, hatte das Calciumbad die gleiche Wirkstoffkonzentration wie die Natriumalginatlösung. Bei der Beschichtung der Mikrokapseln ist durch die Beschichtungs- und Waschschr

Verlust an Wirkstoff zu erwarten. Daher wurde die Verkapselungseffizienz der Wirkstoffe nach folgendem Protokoll untersucht: Eine genau abgewogene Masse an Mikrokapseln (je nach Wirkstoff etwa 150 mg bis 300 mg) wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen mit 10 mL einer 0,5 M Na_2CO_3 -Lösung versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Laborüberkopfschüttler (Reax 2, Heidolph, Schwabach, Deutschland) durchmischt. Dabei wurde die Gelierung des Calciumalginats rückgängig gemacht[217] und die Kapseln aufgelöst, wobei CaCO_3 als weißer Feststoff ausfiel. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 9000 rpm zentrifugiert und dann 1 mL der Lösung photometrisch bei der entsprechenden Wellenlänge vermessen. Über die so erhaltene Konzentration kann die Stoffmenge Wirkstoff pro Gramm Kapsel berechnet werden. Dabei wird angenommen, dass die Kapseln durch ihren sehr hohen Wasseranteil in etwa die Dichte 1 g mL^{-1} haben.[218, 219] Die Verkapselungseffizienz EE (*encapsulation efficiency*) berechnet sich dann nach:

$$EE(\%) = \frac{n_{gef}}{n_{theo}} \cdot 100\% \quad (4.6)$$

Dabei bezeichnet n_{gef} die gefundene Stoffmenge pro Gramm Kapseln nach Auflösung der Kapseln und n_{theo} die theoretisch maximal mögliche Stoffmenge Wirkstoff pro Gramm Kapsel ausgehend von der Konzentration der Alginatlösung. Die Verkapselungseffizienzen der einzelnen Wirkstoffe sind in Tabelle 4.3 dargestellt, grundsätzlich liegt ATP bei etwa 62 %, Suramin bei etwa 67 %, Methylenblau bei etwa 70 % und A740003 bei etwa 90 %. Mit diesen Werten lässt sich die jeweilige maximal freizusetzende Stoffmenge pro Gramm Kapseln berechnen.

Tabelle 4.3: Verkapselungseffizienzen der Wirkstoffe ATP, Suramin (SUR), Methylenblau (MeB) und A740003 (A74) in nativen (Alg) und beschichteten (cap) Alginatmikrokapseln. Angabe in Prozent (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$).

	Verkapselungseffizienz [%]			
	ATP	SUR	MeB	A74
Alg	62 ± 4	67 ± 4	70 ± 4	90 ± 2
cap	61 ± 6	68 ± 5	70 ± 2	90 ± 3

Wirkstoffbeladung der Trägermaterialien plus Mikrokapseln

Bei den Trägermaterialien, die Polyelektrolytkapseln beigemischt haben, erfolgte die Beladung ausschließlich über die zugefügten Kapseln. Somit berechnete sich die maximal freizusetzende Stoffmenge analog zu den Kapseln über deren Masse.

4.5 Wirkstofffreisetzung und Kinetik

4.5.1 Freisetzungsversuche

Alle Experimente zur Wirkstofffreisetzung wurden bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die mit Wirkstoff beladenen Trägermaterialien wurden in 20 mL deionisiertem Wasser platziert. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 1 mL des Mediums entnommen und wieder mit 1 mL frischem Medium aufgefüllt.

Die entnommenen Proben wurden bis zur Messung bei 2–8 °C in einem 1,5 mL Probengefäß dunkel gelagert. Die Konzentration der Proben wurde photometrisch bestimmt und daraus die jeweils freigesetzte Stoffmenge zum Zeitpunkt der Probenahme berechnet, wobei der Verdünnungseffekt durch Konstanthalten des Freisetzungsvolumens berücksichtigt wurde. Aus den Einzelwerten wurde die kumulativ freigesetzte Stoffmenge berechnet und auf die maximal freizusetzende Stoffmenge (vgl. Abschnitt 4.4.4) bezogen. So ergibt sich für jedes Trägermaterial und jeden Wirkstoff eine Freisetzungskurve mit dem Anteil an freigesetztem Wirkstoff aufgetragen über die Zeit.

4.5.2 Kinetikmodelle

Zur mathematischen Beschreibung der Freisetzungskurven und um vergleichbare Aussagen über die Kinetik treffen zu können, wurden verschiedene Modelle an die experimentellen Daten angepasst. Für die Kurvenanpassung wurde Origin Pro 2016 verwendet (Levenberg-Marquardt-Algorithmus, max. 500 Iterationen, Toleranz: 10^{-6}). Zur Bewertung der verschiedenen Modelle wurden AKAIKE'S *Information Criterion* (AIC_c , Gleichung 2.12) sowie die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten (w_i , Gleichung 2.14) verwendet.

First-Order-Modell (FO)

Das „*First Order*“-Modell wurde entsprechend Gleichung 2.5 zur Kurvenanpassung verwendet, diese beinhaltet bereits die Vereinfachung, dass M_0 zum Zeitpunkt $t = 0$ für die verwendeten Systeme gleich Null ist.

Korsmeyer-Peppas-Modell (KP) und Peppas-Sahlin-Modell (PS)

Die beiden Modelle wurden entsprechend Gleichungen 2.7 und 2.8 verwendet. Im PEPPAS-SAHLIN-Modell gilt $m = 0,45$ für zylindrische Proben (**A**, **AH2**, **AH2S**, **AH2C**) und $m = 0,43$ für sphärische Proben (**cap**, **Acap**, **AH2cap**).

Weibull-Modell (WB)

Für die Kurvenanpassung nach Gleichung 2.9 gelten die Einschränkungen $T = 0$ und $0 \leq M_\infty \leq 1$.

One-Stage- und Two-Stage-Modell (OSL und TSL)

Für die Kurvenanpassung der beiden Modelle nach den Gleichungen 3.4 und 3.5 gilt die Einschränkung, dass keiner der Werte N, B, S, T, T_B oder T_S negativ sein darf.

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei aufeinander aufbauende Ziele erreicht. Zunächst wurde eine Reihe neuartiger ionischer Agarosederivate synthetisiert und umfassend charakterisiert. Anionische Agarosesulfate mit einer regioselektiven Derivatisierung in Position G6 wurden durch homogene Umsetzung in ionischer Flüssigkeit erhalten. Neuartige kationische Agarosecarbamate mit einstellbarem Funktionalisierungsgrad waren durch einen zweistufigen Synthesansatz zugänglich. Hierzu wurden zunächst Agarosephenylcarbonate in einer homogenen Synthese hergestellt, die im Anschluss selektiv mit ionischen Aminen zu den gewünschten funktionalen Agarosederivaten umgesetzt. Die ionischen Agarosederivate waren bereits bei geringen Funktionalisierungsgraden vollständig löslich in Wasser. Damit war es möglich, Alginatmikrokapseln mit diesen Derivaten polyelektrolytisch zu beschichten und diese als Träger für eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung zu verwenden. Ebenfalls konnten Kompositgele aus Agarose, als gelbildendem Bestandteil, Hydroxyapatit und Agarosederivaten, als ionische Komponenten zur Verzögerung der Wirkstofffreisetzung, hergestellt und charakterisiert werden.

Sowohl die Kompositträgermaterialien als auch die Alginatmikrokapseln wurden mit vier verschiedenen Modellwirkstoffen (ATP, Suramin, Methylenblau und A740003) beladen und die Wirkstofffreisetzung über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht. Die Freisetzungsprofile wurden anschließend mit verschiedenen kinetischen Modellen untersucht und bewertet. Für die anionischen Modellwirkstoffe ATP und Suramin erwiesen sich Kompositträgermaterialien mit kationischem Agarosederivat, die beschichteten Mikrokapseln sowie die Kombination aus Komposit und Kapseln als effektiv, um die Freisetzung auf bis zu 40 % zu verlangsamen. Für die kationische Modellschubstanz Methylenblau zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, wobei hier anstelle des Carbamats das anionische Sulfat eine deutliche Verzögerung bewirkte. Für die schlecht wasserlösliche Substanz A740003, ein Rezeptorligand für die osteogene Differenzierung von Stammzellen, wurde eine stark verzögerte Freisetzung aus Polyelektrolytemikrokapseln festgestellt. Mithilfe von literaturbekannten und neu entwickelten Anpassungsmodellen gelang es, die Diffusion als Hauptmechanismus der Wirkstofffreisetzung zu identifizieren und die Freisetzungskurven mathematisch akkurat zu beschreiben und daraus Rückschlüsse über die einzelnen Phasen der Freisetzung zu ziehen.

Die neu hergestellten Kompositträgermaterialien auf der Basis chemisch modifizierter Agarosederivate sowie die aus wechselseitigen Schichten aufgebauten Polyelektrolytemikrokapseln zeigten eine gute Biokompatibilität. Ebenfalls war es möglich, kontrollierte Langzeitfreisetzung für Wirkstoffe zu realisieren, die die Differenzierungen von osteogenen Stammzellen gezielt induzieren oder unterstützen kann. Ausgehend von den Ergebnissen ergibt sich ein sehr großes

Anwendungspotential für die Materialien in der Behandlung von kritischen Knochendefekten. In aufbauenden Arbeiten müssen hierzu Studien mit ausgewählten Materialien und weiteren, für die osteogene Differenzierung relevanten Wirkstoffen durchgeführt werden, in denen die Wechselwirkungen mit Stammzellen umfassend untersucht werden. Hieraus ließen sich auch Rückschlüsse darüber ziehen, wie die Materialien weiter optimiert werden müssen, um optimale therapeutische Ergebnisse zu erzielen.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Henkel, M. A. Woodruff, D. R. Epari, R. Steck, V. Glatt, I. C. Dickinson, P. F. M. Choong, M. A. Schuetz, D. W. Hutmacher, “Bone regeneration based on tissue engineering conceptions — A 21st century perspective”, *Bone Research* **2013**, *1*, 216–248, DOI 10.4248/BR201303002.
- [2] P. Chocholata, V. Kulda, V. Babuska, “Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration”, *Materials* **2019**, *12*, 568, DOI 10.3390/ma12040568.
- [3] M. L. Bruschi, *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*, 1st, Elsevier, **2015**, S. 208, DOI 10.1016/C2014-0-02342-8.
- [4] T. A. Kuznetsova, B. G. Andryukov, N. N. Besednova, T. S. Zaporozhets, A. V. Kalinin, “Marine algae polysaccharides as basis for wound dressings, drug delivery, and tissue engineering: A review”, *Journal of Marine Science and Engineering* **2020**, *8*, DOI 10.3390/JMSE8070481.
- [5] S. Sánchez-Salcedo, A. Nieto, M. Vallet-Regí, “Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering”, *Chemical Engineering Journal* **2008**, *137*, 62–71, DOI 10.1016/j.cej.2007.09.011.
- [6] T. Heinze, T. Liebert, A. Koschella, *Esterification of polysaccharides*, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2006**, S. 232, DOI 10.1007/3-540-32112-8.
- [7] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology”, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2008**, *3*, S131–S139, DOI 10.2215/CJN.04151206.
- [8] P. A. Downey, M. I. Siegel, “Bone biology and the clinical implications for osteoporosis”, *Physical Therapy* **2006**, *86*, 77–91, DOI 10.1093/ptj/86.1.77.
- [9] D. B. Burr in *Basic and applied bone biology*, Elsevier Inc., **2019**, S. 1–26, DOI 10.1016/B978-0-12-813259-3.00001-4.
- [10] M. R. Senra, M. d. F. V. Marques, “Synthetic polymeric materials for bone replacement”, *Journal of Composites Science* **2020**, *4*, 191, DOI 10.3390/jcs4040191.
- [11] M. D. Shoulders, R. T. Raines, “Collagen structure and stability”, *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78*, 929–958, DOI 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- [12] W. J. Landis, “Mineral characterization in calcifying tissues: Atomic, molecular and macromolecular perspectives”, *Connective Tissue Research* **1996**, *34*, 239–246, DOI 10.3109/03008209609005267.

- [13] W. J. Landis, K. J. Hodgens, M. J. Song, J. Arena, S. Kiyonaga, M. Marko, C. Owen, B. F. McEwen, “Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: Evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging”, *Journal of Structural Biology* **1996**, *117*, 24–35, DOI 10.1006/jsbi.1996.0066.
- [14] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, M. J. Buehler, “Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone”, *Nature Communications* **2013**, *4*, 1724, DOI 10.1038/ncomms2720.
- [15] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, P. Roschger, “Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone”, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2115–2123, DOI 10.1039/B402005G.
- [16] S. P. Malliappan, A. A. Yetisgin, S. B. Sahin, E. Demir, S. Cetinel, “Bone tissue engineering: Anionic polysaccharides as promising scaffolds”, *Carbohydrate Polymers* **2022**, *283*, 119142, DOI 10.1016/j.carbpol.2022.119142.
- [17] N. A. Sims, J. H. Gooi, “Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption”, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2008**, *19*, 444–451, DOI 10.1016/j.semcd.2008.07.016.
- [18] T. Bellido, L. I. Plotkin, A. Bruzzaniti in *Basic and applied bone biology*, (Hrsg.: D. B. Burr, M. R. Allen), Elsevier, **2019**, Kap. 3, S. 37–55, DOI 10.1016/B978-0-12-813259-3.00003-8.
- [19] T. Yamaza, T. Goto, T. Kamiya, Y. Kobayashi, H. Sakai, T. Tanaka, “Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur”, *Bone* **1998**, *23*, 499–509, DOI 10.1016/S8756-3282(98)00138-0.
- [20] M. Filippi, G. Born, M. Chaaban, A. Scherberich, “Natural polymeric scaffolds in bone regeneration”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2020**, *8*, DOI 10.3389/fbioe.2020.00474.
- [21] C. Kaebisch, D. Schipper, P. Babczyk, E. Tobiasch, “The role of purinergic receptors in stem cell differentiation”, *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2015**, *13*, 75–84, DOI 10.1016/j.csbj.2014.11.003.
- [22] P. Ottensmeyer, M. Witzler, M. Schulze, E. Tobiasch, “Small molecules enhance scaffold-based bone grafts via purinergic receptor signaling in stem cells”, *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 3601, DOI 10.3390/ijms19113601.
- [23] K. A. Jacobson, “P2X and P2Y Receptors”, *Tocris Bioscience Scientific Review Series* **2010**, *33*, 1–15.
- [24] K. A. Jacobson, R. Balasubramanian, F. Deflorian, Z.-G. Gao, “G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions”, *Purinergic Signalling* **2012**, *8*, 419–436, DOI 10.1007/s11302-012-9294-7.
- [25] R. Rodrigues-Ribeiro, É. C. Alvarenga, M. L. Calio, E. J. Paredes-Gamero, A. T. Ferreira, “Dual role of P2 receptors during osteoblast differentiation”, *Cell Biochemistry and Biophysics* **2015**, *71*, 1225–1233, DOI 10.1007/s12013-014-0332-7.

- [26] M. W. Grol, N. Panupinthu, J. Korcok, S. M. Sims, S. J. Dixon, “Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone”, *Purinergic Signalling* **2009**, *5*, 205–221, DOI 10.1007/s11302-009-9139-1.
- [27] R. Dorati, A. DeTrizio, T. Modena, B. Conti, F. Benazzo, G. Gastaldi, I. Genta, “Biodegradable scaffolds for bone regeneration combined with drug-delivery systems in osteomyelitis therapy”, *Pharmaceuticals* **2017**, *10*, DOI 10.3390/ph10040096.
- [28] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, W. Shu, “3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Bioactive Materials* **2018**, *3*, 278–314, DOI 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
- [29] Y. Huang, X. Zhang, H. Mao, T. Li, R. Zhao, Y. Yan, X. Pang, “Osteoblastic cell responses and antibacterial efficacy of Cu/Zn co-substituted hydroxyapatite coatings on pure titanium using electrodeposition method”, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 17076–17086, DOI 10.1039/C4RA12118J.
- [30] M. N. Rahaman, D. E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S. B. Jung, L. F. Bonewald, A. P. Tomsia, “Bioactive glass in tissue engineering”, *Acta Biomaterialia* **2011**, *7*, 2355–2373, DOI 10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [31] M.-P. Ginebra, C. Canal, M. Espanol, D. Pastorino, E. B. Montufar, “Calcium phosphate cements as drug delivery materials”, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 1090–1110, DOI 10.1016/j.addr.2012.01.008.
- [32] D. Tadic, M. Epple, “A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone”, *Biomaterials* **2004**, *25*, 987–994, DOI 10.1016/S0142-9612(03)00621-5.
- [33] E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, A. Tampieri, “Carbonated hydroxyapatite as bone substitute”, *Journal of the European Ceramic Society* **2003**, *23*, 2931–2937, DOI 10.1016/S0955-2219(03)00304-2.
- [34] Q. H. M. S. Zaman, A. Takeuchi, C. T. Zaman, S. Matsuya, K. Ishikawa, “Fabrication of Si-substituted hydroxyapatite foam using calcium silicates”, *Journal of the Ceramic Society of Japan* **2008**, *116*, 88–91, DOI 10.2109/jcersj2.116.88.
- [35] K. Guth, C. Champion, T. Buckland, K. A. Hing, “Effect of silicate-substitution on attachment and early development of human osteoblast-like cells seeded on microporous hydroxyapatite discs”, *Advanced Engineering Materials* **2010**, *12*, 26–36, DOI 10.1002/adem.200980003.
- [36] W. Götz, E. Tobiasch, S. Witzleben, M. Schulze, “Effects of silicon compounds on biomineralization, osteogenesis, and hard tissue formation”, *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 117, DOI 10.3390/pharmaceutics11030117.
- [37] B. Guo, P. X. Ma, “Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review”, *Science China Chemistry* **2014**, *57*, 490–500, DOI 10.1007/s11426-014-5086-y.

- [38] S. Parveen, M. Sultan, M. I. Sajid, F. Jubeen, S. Parveen, I. Bibi, Y. Safa, “Synthesis and characterization of biodegradable and cytocompatible polyurethane-bovine-derived hydroxyapatite biomaterials”, *Polymer Bulletin* **2022**, *79*, 2487–2500, DOI 10.1007/s00289-021-03622-z.
- [39] S. A. Guelcher, “Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine”, *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2008**, *14*, 3–17, DOI 10.1089/teb.2007.0133.
- [40] J.-Y. Zhang, B. A. Doll, E. J. Beckman, J. O. Hollinger, “Three-dimensional biocompatible ascorbic acid-containing scaffold for bone tissue engineering”, *Tissue Engineering* **2003**, *9*, 1143–1157, DOI 10.1089/10763270360728053.
- [41] M. M. Stevens, “Biomaterials for bone tissue engineering”, *Materials Today* **2008**, *11*, 18–25, DOI 10.1016/S1369-7021(08)70086-5.
- [42] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering”, *Materials Today* **2011**, *14*, 88–95, DOI 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [43] B.-N. B. Nguyen, R. A. Moriarty, T. Kamalidinov, J. M. Etheridge, J. P. Fisher, “Collagen hydrogel scaffold promotes mesenchymal stem cell and endothelial cell coculture for bone tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2017**, 1123–1131, DOI 10.1002/art.34459.
- [44] E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, J. T. Czernuszka, “Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication”, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1487–1497, DOI 10.1016/S0142-9612(02)00528-8.
- [45] Y. Chen, N. Kawazoe, G. Chen, “Preparation of dexamethasone-loaded biphasic calcium phosphate nanoparticles/collagen porous composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Acta biomaterialia* **2018**, *67*, 341–353, DOI 10.1016/j.actbio.2017.12.004.
- [46] J. H. Choi, D. K. Kim, J. E. Song, J. M. Oliveira, R. L. Reis, G. Khang in *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine*, (Hrsg.: H. J. Chun, K. Park, C.-H. Kim, G. Khang), *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Singapore, Singapore, **2018**, Kap. 20, S. 371–387, DOI 10.1007/978-981-13-0947-2_20.
- [47] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, S. Hofmann, “Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering”, *Acta Biomaterialia* **2016**, *31*, 1–16, DOI 10.1016/j.actbio.2015.09.005.
- [48] W. Shao, J. He, F. Sang, B. Ding, L. Chen, S. Cui, K. Li, Q. Han, W. Tan, “Coaxial electrospun aligned tussah silk fibroin nanostructured fiber scaffolds embedded with hydroxyapatite-tussah silk fibroin nanoparticles for bone tissue engineering”, *Materials Science and Engineering C* **2016**, *58*, 342–351, DOI 10.1016/j.msec.2015.08.046.
- [49] Y.-Y. Y. Jo, S.-G. G. Kim, K.-J. J. Kwon, H. Y. Kweon, W.-S. S. Chae, W.-G. G. Yang, E.-Y. Y. Lee, H. Seok, “Silk fibroin-alginate-hydroxyapatite composite particles in bone tissue engineering applications in vivo”, *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 858, DOI 10.3390/ijms18040858.

- [50] T. P. Nguyen, Q. V. Nguyen, V.-H. Nguyen, T.-H. Le, V. Q. N. Huynh, D.-V. N. Vo, Q. T. Trinh, S. Y. Kim, Q. V. Le, “Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: A review”, *Polymers* **2019**, *11*, 1933, DOI 10.3390/polym11121933.
- [51] J. Dinoro, M. Maher, S. Talebian, M. Jafarkhani, M. Mehrali, G. Orive, J. Foroughi, M. S. Lord, A. Dolatshahi-Pirouz, “Sulfated polysaccharide-based scaffolds for orthopaedic tissue engineering”, *Biomaterials* **2019**, *214*, 119214, DOI 10.1016/j.biomaterials.2019.05.025.
- [52] M. Witzler, D. Büchner, S. Shoushrah, P. Babczyk, J. Baranova, S. Witzleben, E. Tobiasch, M. Schulze, “Polysaccharide-based systems for targeted stem cell differentiation and bone regeneration”, *Biomolecules* **2019**, *9*, 840, DOI 10.3390/biom9120840.
- [53] K. Y. Lee, D. J. Mooney, “Alginate: Properties and biomedical applications”, *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2012**, *37*, 106–126, DOI 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- [54] F. Abasalizadeh, S. V. Moghaddam, E. Alizadeh, E. Akbari, E. Kashani, S. M. B. Fazljou, M. Torbati, A. Akbarzadeh, “Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting”, *Journal of Biological Engineering* **2020**, *14*, 8, DOI 10.1186/s13036-020-0227-7.
- [55] J. Sun, H. Tan, “Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications”, *Materials* **2013**, *6*, 1285–1309, DOI 10.3390/ma6041285.
- [56] H. Zhang, J. Cheng, Q. Ao, “Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine”, *Marine Drugs* **2021**, *19*, 1–24, DOI 10.3390/md19050264.
- [57] N. T. T. Uyen, Z. A. A. Hamid, N. X. T. Tram, N. Ahmad, “Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review”, *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *153*, 1035–1046, DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233.
- [58] U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewińska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Tosi, A. Vikartovská, K. D. Vorlop, “Comparison of different technologies for alginate beads production”, *Chemical Papers* **2008**, *62*, 364–374, DOI 10.2478/s11696-008-0035-x.
- [59] Q. Wang, B.-m. Zhang Newby, “Layer-by-layer polyelectrolyte coating of alginate microgels for sustained release of sodium benzoate and zosteric acid”, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2018**, *46*, 46–54, DOI 10.1016/j.jddst.2018.04.019.
- [60] R. Tuvikene in *Handbook of Hydrocolloids*, (Hrsg.: G. O. Phillips, P. A. Williams), Elsevier, **2021**, Kap. 25, S. 767–804, DOI 10.1016/B978-0-12-820104-6.00006-1.
- [61] L. Li, R. Ni, Y. Shao, S. Mao, “Carrageenan and its applications in drug delivery”, *Carbohydrate Polymers* **2014**, *103*, 1–11, DOI 10.1016/j.carbpol.2013.12.008.
- [62] R. Yegappan, V. Selvaprithiviraj, S. Amirthalingam, R. Jayakumar, “Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing”, *Carbohydrate Polymers* **2018**, *198*, 385–400, DOI 10.1016/j.carbpol.2018.06.086.

- [63] J. Li, B. Yang, Y. Qian, Q. Wang, R. Han, T. Hao, Y. Shu, Y. Zhang, F. Yao, C. Wang, “Iota -carrageenan/chitosan/gelatin scaffold for the osteogenic differentiation of adipose-derived MSCs in vitro”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2015**, *103*, 1498–1510, DOI 10.1002/jbm.b.33339.
- [64] M. Zaborowska, A. Bodin, H. Bäckdahl, J. Popp, A. Goldstein, P. Gatenholm, “Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration”, *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 2540–2547, DOI 10.1016/j.actbio.2010.01.004.
- [65] N. I. S. Murizan, N. S. Mustafa, N. H. A. Ngadiman, N. Mohd Yusof, A. Idris, “Review on nanocrystalline cellulose in bone tissue engineering applications”, *Polymers* **2020**, *12*, 2818, DOI 10.3390/polym12122818.
- [66] J. L. Holloway, H. Ma, R. Rai, K. D. Hankenson, J. A. Burdick, “Synergistic effects of SDF-1 α and BMP-2 delivery from proteolytically degradable hyaluronic acid hydrogels for bone repair”, *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15*, 1218–1223, DOI 10.1002/mabi.201500178.
- [67] H. Shi, X. Ye, J. Zhang, J. Ye, “Enhanced osteogenesis of injectable calcium phosphate bone cement mediated by loading chondroitin sulfate”, *ACS Biomaterials Science and Engineering* **2019**, *5*, 262–271, DOI 10.1021/acsbiomaterials.8b00871.
- [68] X. Bai, S. Lü, Z. Cao, B. Ni, X. Wang, P. Ning, D. Ma, H. Wei, M. Liu, “Dual crosslinked chondroitin sulfate injectable hydrogel formed via continuous Diels-Alder (DA) click chemistry for bone repair”, *Carbohydrate Polymers* **2017**, *166*, 123–130, DOI 10.1016/j.carbpol.2017.02.062.
- [69] FAO (Food & Agriculture Organisation), “The global status of seaweed production, trade and utilization”, *Globefish Research Programme* **2018**, *124*, 120.
- [70] A. M. Sousa, C. M. Rocha, M. P. Gonçalves in *Handbook of Hydrocolloids*, (Hrsg.: G. O. Phillips, P. A. Williams), Elsevier, **2021**, Kap. 24, S. 731–765, DOI 10.1016/B978-0-12-820104-6.00014-0.
- [71] K. W. Chew, J. C. Juan, S. M. Phang, T. C. Ling, P. L. Show, “An overview on the development of conventional and alternative extractive methods for the purification of agarose from seaweed”, *Separation Science and Technology* **2018**, *53*, 467–480, DOI 10.1080/01496395.2017.1394881.
- [72] H. Porse, B. Rudolph, “The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook”, *Journal of Applied Phycology* **2017**, *29*, 2187–2200, DOI 10.1007/s10811-017-1144-0.
- [73] C. Rochas, M. Lahaye, “Average molecular weight and molecular weight distribution of agarose and agarose type polysaccharides”, *Carbohydrate Polymers* **1989**, *10*, 289–298.
- [74] S. Arnott, A. Fulmer, W. Scott, I. Dea, R. Moorhouse, D. Rees, “The agarose double helix and its function in agarose gel structure”, *Journal of Molecular Biology* **1974**, *90*, 269–284, DOI 10.1016/0022-2836(74)90372-6.
- [75] V. Normand, D. L. Lootens, E. Amici, K. P. Plucknett, “New insight into agarose gel mechanical properties”, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 730–738, DOI 10.1021/bm005583j.

- [76] J.-L. Viovy, “Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms”, *Reviews of Modern Physics* **2000**, *72*, 813–872, DOI 10.1103/RevModPhys.72.813.
- [77] B. H. Zimm, S. D. Levene, “Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA”, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1992**, *25*, 171–204, DOI 10.1017/S0033583500004662.
- [78] E. Varoni, M. Tschon, B. Palazzo, P. Nitti, L. Martini, L. Rimondini, “Agarose gel as biomaterial or scaffold for implantation surgery: Characterization, histological and histomorphometric study on soft tissue response”, *Connective Tissue Research* **2012**, *53*, 548–554, DOI 10.3109/03008207.2012.712583.
- [79] Z. Cao, R. J. Gilbert, W. He, “Simple agarose–chitosan gel composite system for enhanced neuronal growth in three dimensions”, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2954–2959, DOI 10.1021/bm900670n.
- [80] L. M. Zhang, C. X. Wu, J. Y. Huang, X. H. Peng, P. Chen, S. Q. Tang, “Synthesis and characterization of a degradable composite agarose/HA hydrogel”, *Carbohydrate Polymers* **2012**, *88*, 1445–1452, DOI 10.1016/j.carbpol.2012.02.050.
- [81] A. Tripathi, J. S. Melo, “Preparation of a sponge-like biocomposite agarose–chitosan scaffold with primary hepatocytes for establishing an in vitro 3D liver tissue model”, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 30701–30710, DOI 10.1039/C5RA04153H.
- [82] S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, H. Brancal, P. Coutinho, I. J. Correia, “Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration”, *Carbohydrate Polymers* **2014**, *111*, 366–373, DOI 10.1016/j.carbpol.2014.04.093.
- [83] L. G. Gómez-Mascaraque, J. A. Méndez, M. Fernández-Gutiérrez, B. Vázquez, J. San Román, “Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose-chitosan”, *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 798–811, DOI 10.1016/j.actbio.2013.10.003.
- [84] M. Köpf, D. F. D. Campos, A. Blaeser, K. S. Sen, H. Fischer, “A tailored three-dimensionally printable agarose-collagen blend allows encapsulation, spreading, and attachment of human umbilical artery smooth muscle cells.”, *Biofabrication* **2016**, *8*, 025011, DOI 10.1088/1758-5090/8/2/025011.
- [85] A. Tripathi, N. Kathuria, A. Kumar, “Elastic and macroporous agarose – gelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering”, **2008**, DOI 10.1002/jbm.a.32127.
- [86] H. A. Awad, M. Q. Wickham, H. A. Leddy, J. M. Gimble, F. Guilak, “Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds”, *Biomaterials* **2004**, *25*, 3211–3222, DOI 10.1016/j.biomaterials.2003.10.045.
- [87] S. Bhat, A. Tripathi, A. Kumar, “Supermacroporous chitosan-agarose-gelatin cryogels: in vitro characterization and in vivo assessment for cartilage tissue engineering.”, *Journal of the Royal Society Interface / the Royal Society* **2011**, *8*, 540–554, DOI 10.1098/rsif.2010.0455.

- [88] B. J. DeKosky, N. H. Dormer, G. C. Ingavle, C. H. Roatch, J. Lomakin, M. S. Detamore, S. H. Gehrke, “Hierarchically designed agarose and poly(ethylene glycol) interpenetrating network hydrogels for cartilage tissue engineering”, *Tissue Engineering Part C: Methods* **2010**, *16*, 1533–1542, DOI 10.1089/ten.tec.2009.0761.
- [89] M. A. Salati, J. Khazai, A. M. Tahmuri, A. Samadi, A. Taghizadeh, M. Taghizadeh, P. Zarrintaj, J. D. Ramsey, S. Habibzadeh, F. Seidi, M. R. Saeb, M. Mozafari, “Agarose-based biomaterials: opportunities and challenges in cartilage tissue engineering”, *Polymers* **2020**, *12*, 1150, DOI 10.3390/polym12051150.
- [90] N. T. Khanarian, N. M. Haney, R. A. Burga, H. H. Lu, “A functional agarose-hydroxyapatite scaffold for osteochondral interface regeneration”, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5247–5258, DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.03.076.
- [91] Y. Suzawa, T. Funaki, J. Watanabe, S. Iwai, Y. Yura, T. Nakano, Y. Umakoshi, M. Akashi, “Regenerative behavior of biomineral/agarose composite gels as bone grafting materials in rat cranial defects”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2010**, *93*, 965–975, DOI 10.1002/jbm.a.32518.
- [92] Y. Suzawa, N. Kubo, S. Iwai, Y. Yura, H. Ohgushi, M. Akashi, “Biomineral/agarose composite gels enhance proliferation of mesenchymal stem cells with osteogenic capability”, *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 14245–14258, DOI 10.3390/ijms160614245.
- [93] E. Kolanthai, V. S. Dikeshwar Colon, P. A. Sindu, V. S. Chandra, K. R. Karthikeyan, M. S. Babu, S. M. Sundaram, M. Palanichamy, S. N. Kalkura, “Effect of solvent; enhancing the wettability and engineering the porous structure of a calcium phosphate/agarose composite for drug delivery”, *RSC Advances* **2015**, *5*, 18301–18311, DOI 10.1039/C4RA14584D.
- [94] E. Kolanthai, K. Ganesan, M. Epple, S. N. Kalkura, “Synthesis of nanosized hydroxyapatite/agarose powders for bone filler and drug delivery application”, *Materials Today Communications* **2016**, *8*, 31–40, DOI 10.1016/j.mtcomm.2016.03.008.
- [95] G. Orive, R. M. Hernández, A. R. Gascón, M. Igartua, J. L. Pedraz, “Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *18*, 23–30, DOI 10.1016/S0928-0987(02)00220-8.
- [96] N. Wang, X. S. Wu, “Preparation and characterization of agarose hydrogel nanoparticles for protein and peptide drug delivery.”, *Pharm. Development Technology* **1997**, *2*, 135–142, DOI 10.3109/10837459709022618.
- [97] P. L. Bragd, H. V. Bekkum, A. C. Besemer, “TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: Survey of methods and applications”, *Topics in Catalysis* **2004**, *27*.
- [98] G. Pierre, C. Punta, C. Delattre, L. Melone, P. Dubessay, A. Fiorati, N. Pastori, Y. M. Galante, P. Michaud, “TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: An ongoing story”, *Carbohydrate Polymers* **2017**, *165*, 71–85, DOI 10.1016/j.carbpol.2017.02.028.
- [99] A. Isogai, “TEMPO-catalyzed oxidation of polysaccharides”, *Polymer Journal* **2022**, *54*, 387–402, DOI 10.1038/s41428-021-00580-1.

- [100] P. Lucio Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, “Fast and selective oxidation of primary alcohols to aldehydes or to carboxylic acids and of secondary alcohols to ketones mediated by oxoammonium salts under two-phase conditions”, *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*, 2559–2562, DOI 10.1021/jo00388a038.
- [101] S. R. Reddy, S. Stella, A. Chadha, “Simplified procedure for TEMPO-catalyzed oxidation: Selective oxidation of alcohols, α -hydroxy esters, and amides using TEMPO and calcium hypochlorite”, *Synthetic Communications* **2012**, *42*, 3493–3503, DOI 10.1080/00397911.2011.584650.
- [102] C. Tahiri, M. R. Vignon, “TEMPO-oxidation of cellulose: Synthesis and characterisation of polyglucuronans”, *Cellulose* **2000**, *7*, 177–188, DOI 10.1023/A:1009276009711.
- [103] T. Saito, A. Isogai, “TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions”, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1983–1989, DOI 10.1021/bm0497769.
- [104] R. Elboutachfaiti, C. Delattre, E. Petit, P. Michaud, “Polyglucuronic acids: Structures, functions and degrading enzymes”, *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*, 1–13, DOI 10.1016/j.carbpol.2010.10.063.
- [105] A. Forget, R.-A. Pique, V. Ahmadi, S. Lüdeke, V. P. Shastri, “Mechanically tailored agarose hydrogels through molecular alloying with β -sheet polysaccharides”, *Macromolecular Rapid Communications* **2015**, *36*, 196–203, DOI 10.1002/marc.201400353.
- [106] A. Forget, N. Arya, R. Randriantsilefisoa, F. Miessmer, M. Buck, V. Ahmadi, D. Jonas, A. Blencowe, V. P. Shastri, “Nonwoven carboxylated agarose-based fiber meshes with antimicrobial properties”, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 4021–4026, DOI 10.1021/acs.biomac.6b01401.
- [107] B. Chu, C. Wu, S. Tang, M. Tu, “Sprayable agarose-derived dopamine-grafted microgels for promoting tissue adhesion in skin regeneration”, *Reactive and Functional Polymers* **2020**, *154*, 104665, DOI 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104665.
- [108] Y. Yamada, C. Yoshida, K. Hamada, Y. Kikkawa, M. Nomizu, “Development of three-dimensional cell culture scaffolds using laminin peptide-conjugated agarose microgels”, *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 3765–3771, DOI 10.1021/acs.biomac.0c00871.
- [109] K. B. Guiseley, “The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose”, *Carbohydrate Research* **1970**, *13*, 247–256, DOI 10.1016/S0008-6215(00)80831-9.
- [110] I. J. Miller, R. Falshaw, R. H. Furneaux, “Chemical methylation of agaroid hydroxyl-groups”, *Carbohydrate Research* **1994**, *262*, 127–135, DOI 10.1016/0008-6215(94)84009-1.
- [111] N. Zhang, J. Wang, J. Ye, P. Zhao, M. Xiao, “Oxyalkylation modification as a promising method for preparing low-melting-point agarose”, *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *117*, 696–703, DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.171.
- [112] C. A. Godoy, B. D. L. Rivas, V. Grazú, T. Montes, J. M. Guisán, F. López-Gallego, “Glyoxyl-disulfide agarose: A tailor-made support for site-directed rigidification of proteins”, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1800–1809, DOI 10.1021/bm200161f.

- [113] R. Axén, H. Drevin, J. Carlsson, G. Gaupset, G. Schroll, C. Altona, “Preparation of modified agarose gels containing thiol groups.”, *Acta Chemica Scandinavica* **1975**, *29b*, 471–474, DOI 10.3891/acta.chem.scand.29b-0471.
- [114] N. Ferraz, J. Leverrier, F. Batista-Viera, C. Manta, “Thiopropyl-agarose as a solid phase reducing agent for chemical modification of IgG and F(ab')₂”, *Biotechnology Progress* **2008**, *24*, 1154–1159, DOI 10.1002/btpr.38.
- [115] J. M. Guisán, “Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes”, *Enzyme and Microbial Technology* **1988**, *10*, 375–382, DOI 10.1016/0141-0229(88)90018-X.
- [116] J. P. Chaudhary, S. Kondaveeti, V. Gupta, K. Prasad, R. Meena, “Preparation and functional evaluation of agarose derivatives”, *Journal of Applied Polymer Science* **2014**, *131*, n/a–n/a, DOI 10.1002/app.40630.
- [117] H. J. Prado, M. C. Matulewicz, P. R. Bonelli, A. L. Cukierman, “Studies on the cationization of agarose”, *Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 311–321, DOI 10.1016/j.carres.2010.12.004.
- [118] J. C. Dos Santos, N. Rueda, O. Barbosa, J. F. Fernández-Sánchez, A. L. Medina-Castillo, T. Ramón-Márquez, M. C. Arias-Martos, M. C. Millán-Linares, J. Pedroche, M. D. M. Yust, L. R. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, “Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin”, *RSC Advances* **2015**, *5*, 20639–20649, DOI 10.1039/c4ra16926c.
- [119] R. B. Garcia, R. R. L. Vidal, M. Rinaudo, “Preparation and structural characterization of O-acetyl agarose with low degree of substitution”, *Polímeros* **2000**, *10*, 155–161, DOI 10.1590/S0104-14282000000300012.
- [120] I. D. Paepe, H. Declercq, M. Cornelissen, E. Schacht, “Novel hydrogels based on methacrylate-modified agarose”, *Polymer International* **2002**, *51*, 867–870, DOI 10.1002/pi.945.
- [121] Q. Xiao, G. Chen, A. Xiao, “Preparation, characterization, and emulsification properties of agarose fatty acid derivatives with different hydrophobic chains”, *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *141*, 906–918, DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.056.
- [122] Q. Xiao, H. Weng, G. Chen, A. Xiao, “Preparation and characterization of octenyl succinic anhydride modified agarose derivative”, *Food Chemistry* **2019**, *279*, 30–39, DOI 10.1016/j.foodchem.2018.11.133.
- [123] T. J. Trivedi, D. Bhattacharjya, J.-S. Yu, A. Kumar, “Functionalized agarose self-healing ionogels suitable for supercapacitors”, *ChemSusChem* **2015**, *8*, 3294–3303, DOI 10.1002/cssc.201500648.
- [124] H. Vogl, D. Paper, G. Franz, “Preparation of a sulfated linear (1→4)- β -d-galactan with variable degrees of sulfation”, *Carbohydrate Polymers* **2000**, *41*, 185–190, DOI 10.1016/S0144-8617(99)00076-4.

- [125] S. Sakai, I. Hashimoto, K. Kawakami, “Synthesis of an agarose-gelatin conjugate for use as a tissue engineering scaffold”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2007**, *103*, 22–26, DOI 10.1263/jbb.103.22.
- [126] F. Seidi, M. B. Salarabadi, S. Saedi, L. Modadi, A. A. Shamsabadi, B. Nikraves, “Introduction of a novel amino-agarose (AAG) derivative as a fixed facilitated transport carrier to prepare newly asymmetric PES/AAG membranes for CO₂ removal”, *Greenhouse Gases: Science and Technology* **2015**, *5*, 701–713, DOI 10.1002/ghg.1514.
- [127] M. Gericke, T. Heinze, “Homogeneous tosylation of agarose as an approach toward novel functional polysaccharide materials”, *Carbohydrate Polymers* **2015**, *127*, 236–245, DOI 10.1016/j.carbpol.2015.03.025.
- [128] J. G. Heuko, M. E. R. Duarte, A. G. Gonçalves, M. D. Nosedá, F. S. Murakami, M. M. de Carvalho, D. R. Ducatti, “Synthesis of C6-amino agarose and evaluation of its antibacterial activity”, *Carbohydrate Research* **2021**, *507*, 1–9, DOI 10.1016/j.carres.2021.108387.
- [129] S. Kondaveeti, K. Prasad, A. K. Siddhanta, “Functional modification of agarose: A facile synthesis of a fluorescent agarose-tryptophan based hydrogel”, *Carbohydrate Polymers* **2013**, *97*, 165–171, DOI 10.1016/j.carbpol.2013.04.034.
- [130] Z. Zhang, X. Wang, Y. Wang, J. Hao, “Rapid-forming and self-healing agarose-based hydrogels for tissue adhesives and potential wound dressings”, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 980–988, DOI 10.1021/acs.biomac.7b01764.
- [131] S. Kondaveeti, G. K. Mehta, A. Siddhanta, “Modification of agarose: 6-Aminoagarose mediated syntheses of fluorogenic pyridine carboxylic acid amides”, *Carbohydrate Polymers* **2014**, *106*, 365–373, DOI 10.1016/j.carbpol.2014.02.051.
- [132] S. Punna, E. Kaltgrad, M. G. Finn, “Clickable agarose for affinity chromatography”, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1536–1541, DOI 10.1021/bc0501496.
- [133] C. Kim, D. Jeong, S. Kim, Y. Kim, S. Jung, “Cyclodextrin functionalized agarose gel with low gelling temperature for controlled drug delivery systems”, *Carbohydrate Polymers* **2019**, *222*, 115011, DOI 10.1016/j.carbpol.2019.115011.
- [134] N. Rahman, K. A. Purpura, R. G. Wylie, P. W. Zandstra, M. S. Shoichet, “The use of vascular endothelial growth factor functionalized agarose to guide pluripotent stem cell aggregates toward blood progenitor cells”, *Biomaterials* **2010**, *31*, 8262–8270, DOI 10.1016/j.biomaterials.2010.07.040.
- [135] M. U. Chhatbar, C. B. Godiya, A. Siddhanta, “Functional modification of agarose: A facile synthesis of an agarose-saccharate derivative”, *Carbohydrate Polymers* **2012**, *88*, 1118–1123, DOI 10.1016/j.carbpol.2012.01.086.
- [136] M. D. Oza, R. Meena, K. Prasad, P. Paul, A. Siddhanta, “Functional modification of agarose: A facile synthesis of a fluorescent agarose-guanine derivative”, *Carbohydrate Polymers* **2010**, *81*, 878–884, DOI 10.1016/j.carbpol.2010.03.062.
- [137] M. D. Oza, K. Prasad, A. K. Siddhanta, “One-pot synthesis of fluorescent polysaccharides: Adenine grafted agarose and carrageenan”, *Carbohydrate Research* **2012**, *357*, 23–31, DOI 10.1016/j.carres.2012.05.016.

- [138] R. Takano, S. Yoshikawa, T. Ueda, K. Hayashi, S. Hirase, S. Hara, “Sulfation of polysaccharides with sulfuric acid mediated by dicyclohexylcarbodiimide”, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1996**, *15*, 449–457, DOI 10.1080/07328309608005665.
- [139] B. Matsuhiro, T. Barahona, M. V. Encinas, A. Mansilla, J. A. Ortiz, “Sulfation of agarose from subantarctic *Ahnfeltia plicata* (Ahnfeltiales, Rhodophyta): Studies of its antioxidant and anticoagulant properties in vitro and its copolymerization with acrylamide”, *Journal of Applied Phycology* **2014**, *26*, 2011–2019, DOI 10.1007/s10811-014-0297-3.
- [140] W. Liang, X. Mao, X. Peng, S. Tang, “Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity”, *Carbohydrate Polymers* **2014**, *101*, 776–785, DOI 10.1016/j.carbpol.2013.10.010.
- [141] S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow, A. Axelsson, “The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review”, *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *415*, 34–52, DOI 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.
- [142] P. I. Lee, “Modeling of drug release from matrix systems involving moving boundaries: Approximate analytical solutions”, *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *418*, 18–27, DOI 10.1016/j.ijpharm.2011.01.019.
- [143] J. Li, D. J. Mooney, “Designing hydrogels for controlled drug delivery”, *Nature Reviews Materials* **2016**, *1*, 16071, DOI 10.1038/natrevmats.2016.71.
- [144] J. Siepmann, F. Siepmann, “Modeling of diffusion controlled drug delivery”, *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 351–362, DOI 10.1016/j.jconrel.2011.10.006.
- [145] M. Sivakumar, K. Panduranga Rao, “Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–gelatin composite microspheres”, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3175–3181, DOI 10.1016/S0142-9612(02)00066-2.
- [146] E. Quinlan, A. López-Noriega, E. M. Thompson, A. Hibbitts, S. A. Cryan, F. J. O’Brien, “Controlled release of vascular endothelial growth factor from spray-dried alginate microparticles in collagen–hydroxyapatite scaffolds for promoting vascularization and bone repair”, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2017**, *11*, 1097–1109, DOI 10.1002/term.2013.
- [147] J. M. Unagolla, A. C. Jayasuriya, “Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *114*, 199–209, DOI 10.1016/j.ejps.2017.12.012.
- [148] C. d. S. Bitencourt, L. B. d. Silva, P. A. T. Pereira, G. M. Gelfuso, L. H. Faccioli, “Microspheres prepared with different co-polymers of poly(lactic-glycolic acid) (PLGA) or with chitosan cause distinct effects on macrophages”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *136*, 678–686, DOI 10.1016/j.colsurfb.2015.10.011.
- [149] J. Paris, J. Román, M. Manzano, M. Cabañas, M. Vallet-Regí, “Tuning dual-drug release from composite scaffolds for bone regeneration”, *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *486*, 30–37, DOI 10.1016/j.ijpharm.2015.03.048.

- [150] X. Ma, L. Zhang, D. Fan, W. Xue, C. Zhu, X. Li, “Physicochemical properties and biological behavior of injectable crosslinked hydrogels composed of pullulan and recombinant human-like collagen”, *Journal of Materials Science* **2017**, *52*, 3771–3785, DOI 10.1007/s10853-016-0577-1.
- [151] K. Song, M. Qiao, T. Liu, B. Jiang, H. M. MacEdo, X. Ma, Z. Cui, “Preparation, fabrication and biocompatibility of novel injectable temperature-sensitive chitosan/glycerophosphate/collagen hydrogels”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2010**, *21*, 2835–2842, DOI 10.1007/s10856-010-4131-4.
- [152] T. N. Vo, A. M. Tatara, M. Santoro, J. J. J. P. van den Beucken, S. C. G. Leeuwenburgh, J. A. Jansen, A. G. Mikos, “Acellular mineral deposition within injectable, dual-gelling hydrogels for bone tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2017**, *105*, 110–117, DOI 10.1002/jbm.a.35875.
- [153] Y. Luo, A. Lode, C. Wu, J. Chang, M. Gelinsky, “Alginate/nanohydroxyapatite scaffolds with designed core/shell structures fabricated by 3D plotting and in situ mineralization for bone tissue engineering”, *ACS Applied Materials and Interfaces* **2015**, *7*, 6541–6549, DOI 10.1021/am508469h.
- [154] Y. Luo, Y. Li, X. Qin, Q. Wa, “3D printing of concentrated alginate/gelatin scaffolds with homogeneous nano apatite coating for bone tissue engineering”, *Materials and Design* **2018**, *146*, 12–19, DOI 10.1016/j.matdes.2018.03.002.
- [155] L. Bracaglia, B. Smith, E. Watson, N. Arumugasaamy, “3D Printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds”, *Acta Biomaterialia* **2017**, 1–10, DOI 10.1016/j.actbio.2017.03.030.
- [156] T. Higuchi, “Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension”, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1961**, *50*, 874–875, DOI 10.1002/jps.2600501018.
- [157] J. Siepmann, N. A. Peppas, “Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)”, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 163–174, DOI 10.1016/j.addr.2012.09.028.
- [158] N. A. Peppas, B. Narasimhan, “Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems”, *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 75–81, DOI 10.1016/j.jconrel.2014.06.041.
- [159] P. L. Ritger, N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs”, *Journal of Controlled Release* **1987**, *5*, 23–36, DOI 10.1016/0168-3659(87)90034-4.
- [160] P. L. Ritger, N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices”, *Journal of Controlled Release* **1987**, *5*, 37–42, DOI 10.1016/0168-3659(87)90035-6.
- [161] N. A. Peppas, J. J. Sahlin, “A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation”, *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, *57*, 169–172, DOI 10.1016/0378-5173(89)90306-2.

- [162] F. Langenbucher, “Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *24*, 979–981, DOI 10.1111/j.2042-7158.1972.tb08930.x.
- [163] R. Anderson-Sprecher, “Model Comparisons and R²”, *The American Statistician* **1994**, *48*, 113–117, DOI 10.1080/00031305.1994.10476036.
- [164] A. N. Spiess, N. Neumeyer, “An evaluation of R² as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: A Monte Carlo approach”, *BMC Pharmacology* **2010**, *10*, 1–11, DOI 10.1186/1471-2210-10-6.
- [165] H. Akaike, “On the likelihood of a time series model”, *The Statistician* **1978**, *27*, 217, DOI 10.2307/2988185.
- [166] G. Schwarz, “Estimating the dimension of a model”, *The Annals of Statistics* **1978**, *6*, 461–464.
- [167] K. P. Burnham, D. R. Anderson, “Kullback-Leibler information as a basis for strong inference in ecological studies”, *Wildlife Research* **2001**, *28*, 111, DOI 10.1071/WR99107.
- [168] K. P. Burnham, D. R. Anderson in *Model Selection and Multimodel Inference*, Springer New York, New York, NY, **2002**, Kap. 2, S. 49–97, DOI 10.1007/978-0-387-22456-5_2.
- [169] E. J. Wagenmakers, S. Farrell, “AIC model selection using Akaike weights”, *Psychonomic Bulletin and Review* **2004**, *11*, 192–196, DOI 10.3758/BF03206482.
- [170] P. Costa, J. M. Sousa Lobo, “Modeling and comparison of dissolution profiles”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, *13*, 123–133, DOI 10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
- [171] D. Paolino, A. Tudose, C. Celia, L. Di Marzio, F. Cilurzo, C. Mircioiu, “Mathematical models as tools to predict the release kinetic of fluorescein from lyotropic colloidal liquid crystals”, *Materials* **2019**, *12*, DOI 10.3390/ma12050693.
- [172] M. Gericke, T. Liebert, T. Heinze, “Interaction of ionic liquids with polysaccharides, 8-synthesis of cellulose sulfates suitable for polyelectrolyte complex formation”, *Macromolecular Bioscience* **2009**, *9*, 343–353, DOI 10.1002/mabi.200800329.
- [173] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*, 3 ed. repr, John Wiley & Sons, Chichester, **2008**, S. 347.
- [174] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Structure determination of organic compounds*, 5. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2020**, DOI 10.1007/978-3-662-62439-5.
- [175] F. Cabassi, B. Casu, A. S. Perlin, “Infrared absorption and raman scattering of sulfate groups of heparin and related glycosaminoglycans in aqueous solution”, *Carbohydrate Research* **1978**, *63*, 1–11, DOI 10.1016/S0008-6215(00)80924-6.
- [176] Y. Jie, L. Zhang, P. Chen, X. Mao, S. Tang, “Preparation of agarose sulfate and its antithrombogenicity”, *Journal Wuhan University of Technology Materials Science Edition* **2012**, *27*, 110–114, DOI 10.1007/s11595-012-0418-2.

- [177] M. Witzler, Sulfatierung von Agarose, Praktikum Bioorganische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2020**.
- [178] T. Elschner, K. Ganske, T. Heinze, “Synthesis and aminolysis of polysaccharide carbonates”, *Cellulose* **2013**, *20*, 339–353, DOI 10.1007/s10570-012-9819-9.
- [179] L. Gabriel, M. Gericke, T. Heinze, “Modular synthesis of non-charged and ionic xylan carbamate derivatives from xylan carbonates”, *Carbohydrate Polymers* **2019**, *207*, 782–790, DOI 10.1016/j.carbpol.2018.12.012.
- [180] T. Elschner, M. Kötteritzsch, T. Heinze, “Synthesis of cellulose tricarbonates in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride/pyridine”, *Macromolecular Bioscience* **2014**, *14*, 161–165, DOI 10.1002/mabi.201300345.
- [181] H. Wondraczek, T. Elschner, T. Heinze, “Synthesis of highly functionalized dextran alkyl carbonates showing nanosphere formation”, *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, 1112–1118, DOI 10.1016/j.carbpol.2010.09.013.
- [182] K. Ganske, T. Heinze, “Evaluation of the synthesis of soluble aromatic cellulose carbonates of low degree of substitution”, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2018**, *219*, 1–7, DOI 10.1002/macp.201800152.
- [183] N. Nugay, T. Nugay, J. P. Kennedy, “Minute amounts of organically modified montmorillonite improve the properties of polyisobutylene-based polyurethanes”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2013**, *51*, 4076–4087, DOI 10.1002/pola.26814.
- [184] M. Witzler, P. F. Ottensmeyer, M. Gericke, T. Heinze, E. Tobiasch, M. Schulze, “Non-cytotoxic agarose/hydroxyapatite composite scaffolds for drug release”, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 3565, DOI 10.3390/ijms20143565.
- [185] S. Koutsopoulos, “Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods”, *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *62*, 600–612, DOI 10.1002/jbm.10280.
- [186] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, “Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites”, *Journal of the European Ceramic Society* **2000**, *20*, 2377–2387, DOI 10.1016/S0955-2219(00)00154-0.
- [187] T. Kuriakose, S. Kalkura, M. Palanichamy, D. Arivuoli, K. Dierks, G. Bocelli, C. Betzel, “Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature”, *Journal of Crystal Growth* **2004**, *263*, 517–523, DOI 10.1016/j.jcrysgro.2003.11.057.
- [188] A. Antonakos, E. Liarokapis, T. Leventouri, “Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites”, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3043–3054, DOI 10.1016/j.biomaterials.2007.02.028.
- [189] C. Aulin, J. Netrval, L. Wågberg, T. Lindström, “Aerogels from nanofibrillated cellulose with tunable oleophobicity”, *Soft Matter* **2010**, *6*, 3298, DOI 10.1039/c001939a.
- [190] C. García-González, M. Alnaief, I. Smirnova, “Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems”, *Carbohydrate Polymers* **2011**, *86*, 1425–1438, DOI 10.1016/j.carbpol.2011.06.066.

- [191] M. Robitzer, A. Tournette, R. Horga, R. Valentin, M. Boissière, J. Devoisselle, F. Di Renzo, F. Quignard, “Nitrogen sorption as a tool for the characterisation of polysaccharide aerogels”, *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85*, 44–53, DOI 10.1016/j.carbpol.2011.01.040.
- [192] M. A. Velasco, C. A. Narváez-Tovar, D. A. Garzón-Alvarado, “Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering”, *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 1–21, DOI 10.1155/2015/729076.
- [193] M. Witzler, S. Vermeeren, R. O. Kolevatov, R. Haddad, M. Gericke, T. Heinze, M. Schulze, “Evaluating release kinetics from alginate beads coated with polyelectrolyte layers for sustained drug delivery”, *ACS Applied Bio Materials* **2021**, *4*, 6719–6731, DOI 10.1021/acsabm.1c00417.
- [194] A. Ivanova, K. Ivanova, J. Hoyo, T. Heinze, S. Sanchez-Gomez, T. Tzanov, “Layer-by-layer decorated nanoparticles with tunable antibacterial and antibiofilm properties against both gram-positive and gram-negative bacteria”, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10*, 3314–3323, DOI 10.1021/acsami.7b16508.
- [195] S. Anandhakumar, M. Debapriya, V. Nagaraja, A. M. Raichur, “Polyelectrolyte microcapsules for sustained delivery of water-soluble drugs”, *Materials Science and Engineering: C* **2011**, *31*, 342–349, DOI 10.1016/j.msec.2010.10.005.
- [196] T. Lu, T. L. ten Hagen, “A novel kinetic model to describe the ultra-fast triggered release of thermosensitive liposomal drug delivery systems”, *Journal of Controlled Release* **2020**, *324*, 669–678, DOI 10.1016/j.jconrel.2020.05.047.
- [197] N. Malekjani, S. M. Jafari, “Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2021**, *20*, 3–47, DOI 10.1111/1541-4337.12660.
- [198] P. Treenate, P. Monvisade, “In vitro drug release profiles of pH-sensitive hydroxyethylacryl chitosan/sodium alginate hydrogels using paracetamol as a soluble model drug”, *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *99*, 71–78, DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.061.
- [199] S. Boi, N. Rouatbi, E. Dellacasa, D. Di Lisa, P. Bianchini, O. Monticelli, L. Pastorino, “Alginate microbeads with internal microvoids for the sustained release of drugs”, *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *156*, 454–461, DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.083.
- [200] H. Nie, Z. Dong, D. Y. Arifin, Y. Hu, C.-h. Wang, “Core/shell microspheres via coaxial electrohydrodynamic atomization for sequential and parallel release of drugs”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, *95A*, 709–716, DOI 10.1002/jbm.a.32867.
- [201] H. Nie, Y. Fu, C.-h. Wang, “Paclitaxel and suramin-loaded core/shell microspheres in the treatment of brain tumors”, *Biomaterials* **2010**, *31*, 8732–8740, DOI 10.1016/j.biomaterials.2010.07.080.

- [202] C. Bode, H. Kranz, A. Fizez, F. Siepmann, J. Siepmann, “Often neglected: PLGA/PLA swelling orchestrates drug release: HME implants”, *Journal of Controlled Release* **2019**, *306*, 97–107, DOI 10.1016/j.jconrel.2019.05.039.
- [203] J. Horak, W. Lindner, “Contribution of sulfonyl–aromatic and sulfonic acid–aromatic interactions in novel sulfonyl/sulfonic acid-embedded reversed phase materials”, *Journal of Chromatography A* **2008**, *1191*, 141–156, DOI 10.1016/j.chroma.2007.12.059.
- [204] X.-P. Luo, S.-Y. Fu, Y.-M. Du, J.-Z. Guo, B. Li, “Adsorption of methylene blue and malachite green from aqueous solution by sulfonic acid group modified MIL-101”, *Microporous and Mesoporous Materials* **2017**, *237*, 268–274, DOI 10.1016/j.micromeso.2016.09.032.
- [205] H. Zhang, A. Li, J. Sun, P. Li, “Adsorption of amphoteric aromatic compounds by hyper-cross-linked resins with amino groups and sulfonic groups”, *Chemical Engineering Journal* **2013**, *217*, 354–362, DOI 10.1016/j.cej.2012.12.001.
- [206] K. N. Kirschner, Simulations of ATP and suramin, **2021**.
- [207] W. Stewart, H. E. Swaisgood, “Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards”, *Enzyme and Microbial Technology* **1993**, *15*, 922–927, DOI 10.1016/0141-0229(93)90167-Z.
- [208] T. Boontheekul, H. J. Kong, D. J. Mooney, “Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution”, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2455–2465, DOI 10.1016/j.biomaterials.2004.06.044.
- [209] J. Tu, S. Bolla, J. Barr, J. Miedema, X. Li, B. Jasti, “Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization”, *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, *303*, 171–181, DOI 10.1016/j.ijpharm.2005.07.008.
- [210] S. K. Bajpai, N. Kirar, “Swelling and drug release behavior of calcium alginate/poly (sodium acrylate) hydrogel beads”, *Designed Monomers and Polymers* **2016**, *19*, 89–98, DOI 10.1080/15685551.2015.1092016.
- [211] W.-P. Voo, C.-W. Ooi, A. Islam, B.-T. Tey, E.-S. Chan, “Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour”, *European Polymer Journal* **2016**, *75*, 343–353, DOI 10.1016/j.eurpolymj.2015.12.029.
- [212] C. Ding, S. Xu, J. Wang, Y. Liu, P. Chen, S. Feng, “Controlled loading and release of methylene blue in layer-by-layer assembled polyelectrolyte films”, *Materials Science and Engineering: C* **2012**, *32*, 670–673, DOI 10.1016/j.msec.2012.01.005.
- [213] M. Şenel, F. Ebru Koç, “Controlled release of methylene blue from layer-by-layer assembled chitosan/polyacrylic acid”, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2020**, *69*, 258–262, DOI 10.1080/00914037.2018.1563082.
- [214] S. Rochín-Wong, A. Rosas-Durazo, P. Zavala-Rivera, A. Maldonado, M. E. Martínez-Barbosa, I. Vélaz, J. Tánori, “Drug release properties of diflunisal from layer-by-layer self-assembled k-carrageenan/chitosan nanocapsules: Effect of deposited layers”, *Polymers* **2018**, *10*, 1–16, DOI 10.3390/polym10070760.

- [215] D. Feuser, Bachelorthese, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, **2018**.
- [216] S. Vermeeren, Masterthese, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, **2019**, DOI 10.18418/opus-4722.
- [217] O. Murujew, R. Whitton, M. Kube, L. Fan, F. Roddick, B. Jefferson, M. Pidou, “Recovery and reuse of alginate in an immobilized algae reactor”, *Environmental Technology* **2021**, *42*, 1521–1530, DOI 10.1080/09593330.2019.1673827.
- [218] M. E. Lyn, D. Ying, “Drying model for calcium alginate beads”, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2010**, *49*, 1986–1990, DOI 10.1021/ie901451m.
- [219] C. Jeong, S. Kim, C. Lee, S. Cho, S.-B. Kim, “Changes in the physical properties of calcium alginate gel beads under a wide range of gelation temperature conditions”, *Foods* **2020**, *9*, 180, DOI 10.3390/foods9020180.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Heinze dafür bedanken, dass er die Betreuung der Arbeit und das Erstellen des Erstgutachtens übernahm. Er gab mir als extern forschender Doktorand die Möglichkeit, Teil seines Arbeitskreises zu sein und stellte so den Rahmen des Promotionsprojekts.

Mein zweiter Dank gilt Prof. Dr. Margit Schulze für die unermüdliche fachliche und persönliche Unterstützung in den letzten Jahren und das Vertrauen, ein völlig neues Forschungsfeld unserer Arbeitsgruppe voranzubringen. Ich möchte mich für die exzellente und wertschätzende Zusammenarbeit und die vielen produktiven Gespräche und nicht zuletzt für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Ein weiterer großer Dank geht an Dr. Martin Gericke, der mir bei fachlichen und organisatorischen Fragen und Problemen zur Seite stand und ohne dessen Rat, Kritik, Ideen und Unterstützung ich nicht dort wäre, wo ich heute bin.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Steffen Witzleben für die gute Zusammenarbeit in Lehre und Forschung, insbesondere auch für den Zugang zu Labor und Analysenpool in Rheinbach. An dieser Stelle danke ich auch Prof. Dr. Ulrike Bartz für das Vertrauen, dass ich mit meinen Aufbauten in ihrem Labor unterkommen durfte. Ein weiterer Dank geht an Dr. Karl Kirschner vom Institut für Visual Computing der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg für die Anregungen und Berechnungen der Molekülsimulationen.

Ich möchte mich außerdem bei meiner Arbeitsgruppe und Kollegen bedanken: bei Jessica Rumpf, Katharina Walbrück, Dominik Büchner, Xuan-Tung Do, Roman Grimmig, Philipp Gillemot, René Burger und Jonas Bergrath für das tolle Arbeitsumfeld und den guten fachlichen Austausch, aber auch für zahlreiche Aktionen und Momente abseits des Arbeitsalltags. Danke an Sarah Vermeeren, die während ihrer Masterthese wertvolle Vor- und Zuarbeiten geleistet hat und an Christian Tonk, der mir bei biologischen Fragen stets weiter half und dem ich die Biokompatibilitätstests verdanke. Ebenso möchte ich mich aber auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Heinze der FSU Jena bedanken, die mich während meiner Aufenthalte sehr herzlich aufgenommen haben und mir stets mit ihrer Expertise sowie Rat und Tat zur Seite standen.

Danke an meine Freunde, ganz besonders René, Leni, Conny, Lisa, Mina, Jule und Kenni, für ihre Unterstützung, offene Ohren und Ablenkung, wann immer sie nötig waren.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und ganz besonders meiner Frau Kristina aus tiefstem Herzen dafür danken, dass sie immer hinter mir standen und mich in allen Phasen und Entscheidungen unterstützt und motiviert haben.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde in der elektronischen Version der Arbeit aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Publikationsliste

Veröffentlichungen (*peer reviewed*) während der Promotion

M. Witzler, S. Vermeeren, R. O. Kolevatov, R. Haddad, M. Gericke, T. Heinze, M. Schulze, “Evaluating release kinetics from alginate beads coated with polyelectrolyte layers for sustained drug delivery”, *ACS Applied Bio Materials* **2021**, *4*, 6719–6731, DOI 10.1021/acsbm.1c00417.

M. Witzler, D. Büchner, S. Shoushrah, P. Babczyk, J. Baranova, S. Witzleben, E. Tobiasch, M. Schulze, “Polysaccharide-based systems for targeted stem cell differentiation and bone regeneration”, *Biomolecules* **2019**, *9*, 840, DOI 10.3390/biom9120840.

M. Witzler, P. F. Ottensmeyer, M. Gericke, T. Heinze, E. Tobiasch, M. Schulze, “Non-cytotoxic agarose/hydroxyapatite composite scaffolds for drug release”, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 3565, DOI 10.3390/ijms20143565.

P. Ottensmeyer, M. Witzler, M. Schulze, E. Tobiasch, “Small molecules enhance scaffold-based bone grafts via purinergic receptor signaling in stem cell”, *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 3601, DOI 10.3390/ijms19113601.

M. Witzler, A. Alzagameem, M. Bergs, B. E. Khaldi-Hansen, S. E. Klein, D. Hielscher, B. Kamm, J. Kreyenschmidt, E. Tobiasch, M. Schulze, “Lignin-derived biomaterials for drug release and tissue engineering”, *Molecules* **2018**, *23*, 1885, DOI 10.3390/molecules23081885.

Buchkapitel

C. H. Tonk, M. Witzler, M. Schulze, E. Tobiasch in *Essential Current Concepts in Stem Cell Biology*, (Hrsg.: B. Brand-Saberi), Springer, Cham, **2020**, S. 21–39, DOI 10.1007/978-3-030-33923-4_2.

Vorträge (*Redner)

M. Witzler, M. Schulze, M. Gericke*, T. Heinze, 7th International Polysaccharide Conference, Nantes, **2021**.

M. Witzler*, S. Vermeeren, R. O. Kolevatov, M. Gericke, T. Heinze, M. Schulze, AERoGELS, Santiago de Compostela, **2020**.

M. Gericke*, M. Witzler, D. Büchner, A. Enkelmann, P. F. Ottensmeyer, G. Schneider, E. Tobiasch, M. Schulze, T. Heinze, 257th ACS National Meeting, Orlando, **2019**.

M. Gericke*, M. Witzler, A. Enkelmann, G. Schneider, T. Heinze, Chemiedozententagung, Jena, **2018**.

M. Gericke*, M. Witzler, A. Enkelmann, G. Schneider, M. Schulze, T. Heinze, 255th ACS National Meeting, New Orleans, **2018**.

M. Schulze, M. Witzler*, P. F. Ottensmeyer, D. Feuser, M. Pickett, M. Gericke, T. Heinze, E. Tobiasch, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Braunschweig, **2018**.

M. Gericke*, M. Witzler, M. Schulze, T. Heinze, 253th ACS National Meeting, San Francisco, **2017**.

M. Witzler*, M. Gericke, P. F. Ottensmeyer, E. Tobiasch, M. Schulze, T. Heinze, 5th International Polysaccharide Conference, Jena, **2017**.

M. Witzler, B. El Khaldi-Hansen, T. Hausen, F. Elsayed, E. Tobiasch, M. Schulze*, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Aachen, **2016**.

Poster

M. Witzler, D. Büchner, M. Gericke, T. Heinze, E. Tobiasch, S. Witzleben, M. Schulze, GDCh Wissenschaftsforum, online, **2021**.

M. Witzler, D. Büchner, P. F. Ottensmeyer, M. Gericke, T. Heinze, E. Tobiasch, M. Schulze, GDCh Wissenschaftsforum, Aachen, **2019**.

M. Witzler, S. Vermeeren, D. Feuser, P. F. Ottensmeyer, D. Büchner, M. Gericke, T. Heinze, E. Tobiasch, M. Schulze, 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, Dresden, **2019**.

M. Schulze, D. Büchner, M. Witzler, E. Tobiasch, M. Gericke, T. Heinze, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Braunschweig, **2018**.

M. Witzler, M. Gericke, T. Heinze, M. Schulze, NanoBioMater SummerSchool and International Conference, Bad Herrenalb, **2017**.

M. Witzler, M. Gericke, T. Heinze, S. Witzleben, P. F. Ottensmeyer, E. Tobiasch, M. Schulze, GDCh Wissenschaftsforum, Berlin, **2017**.

Veröffentlichungen vor der Promotion

M. Witzler, F. Küllmer, K. Günther, “Validating a Single-Particle ICP-MS method to measure nanoparticles in human whole blood for nanotoxicology”, *Analytical Letters* **2018**, *51*, 587–599, DOI 10.1080/00032719.2017.1327538.

F. Küllmer, M. Witzler, K. Günther, 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, **2016**.

M. Witzler, A. Hirtz, F. Küllmer, K. Günther, “Single-Particle-ICP-MS Nanopartikelanalytik in Fruchtsäften”, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **2016**, 378–380.

M. Witzler, F. Küllmer, A. Hirtz, K. Günther, “Validation of gold and silver nanoparticle analysis in fruit juices by Single-Particle ICP-MS without sample pretreatment”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, *64*, 4165–4170, DOI 10.1021/acs.jafc.6b01248.

M. Witzler, F. Küllmer, A. Hirtz, K. Günther, 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe, **2015**.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Datum, Ort

Markus Witzler

Anhang

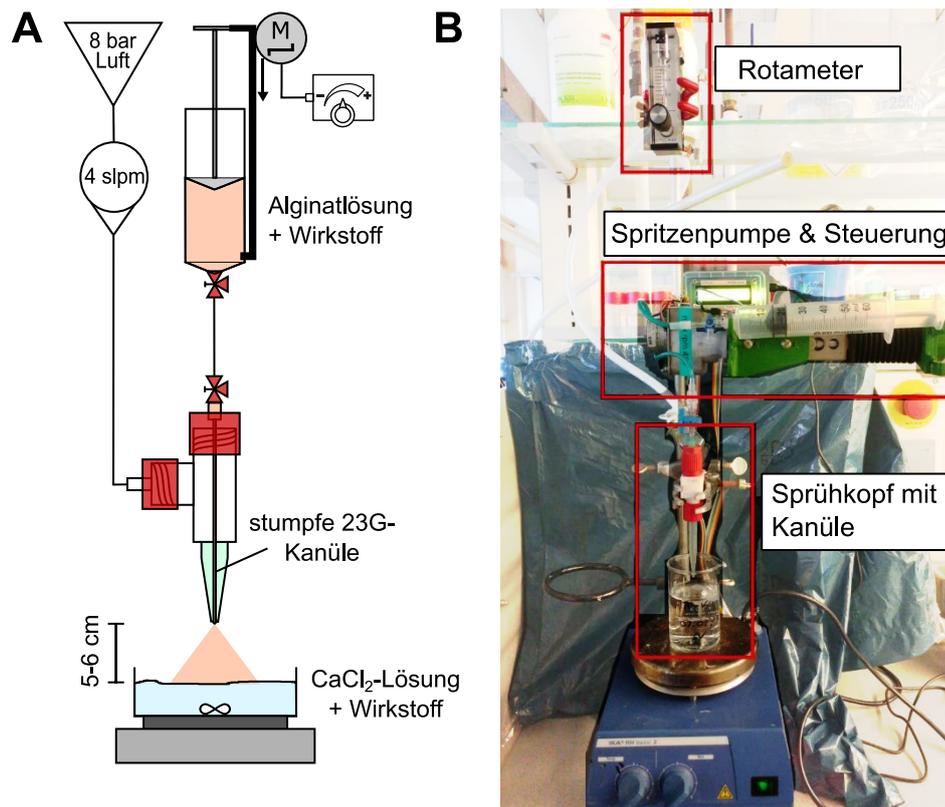


Abbildung A.1: Schematische Darstellung und Aufbau der coaxialen Verkapselungsapparatur. **A:** Schema des Aufbaus mit den wichtigsten Komponenten. Druckluft und Rotameter liefern einen definierten Luftstrom, die Spritzenpumpe mit Schrittmotor und Steuerungseinheit sorgt für eine konstante Zufuhr an Natriumalginatlösung. Der Sprühkopf besteht aus einer stumpfen 23G-Kanüle in einer Düse, ca. 5–6 cm oberhalb der Aushärtelösung. **B:** Tatsächlicher Aufbau des Laborprototypen. Die Komponenten wurden für das Foto etwas näher aneinander positioniert. Foto: Sarah Vermeeren, 2019, entnommen aus [216] mit Erlaubnis.