

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. U. Joos-

Einsatz von PLGA Copolymeren als poröse, kommunikationsfähige Knochenimplantate
mit Auswirkung auf die Zellproliferation in vitro

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Mersch, Alena, geb. Svobodova

aus

Tabor, Tschechische Republik

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med.dent. Dr. h. c. U. Joos-
Referent: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann
Koreferent: Prof. Dr. E. Schäfer

ZUSAMMENFASSUNG

Einsatz von PLGA Copolymeren als poröse, kommunikationsfähige Knochenimplantate
mit Auswirkung auf die Zellproliferation in vitro

Mersch, Alena

Die PLA, PGA (engl. Polylactic acid; Polyglycolic acid) sind Polymere der Milch- und Glykolsäure, die aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und ihres problemlosen Abbaus im Körper als Biomaterialien geeignet erscheinen. Durch den Einsatz ihrer Copolymere können ihre Eigenschaften je nach Anforderung modifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die Eignung von PLGA Copolymeren zur Entwicklung eines stabilen Gerüsts untersucht, das als Knochenersatzmaterial eingesetzt werden kann. Dazu wurden poröse Implantate aus industriell hergestellten PLGA Copolymeren gefertigt, die das Attachment und die 3D Proliferation der Osteoblasten erleichtern und idealerweise parallel zur Entstehung des neuen Knochens die Degradation des Copolymers ermöglichen.

Besonders die Porosität und ihr Zusammenhang zur Korngröße wurden untersucht. Hier spielt das Kornspektrum für die Porosität im Gegensatz zu Herstellungsbedingungen, wie der Pressdruck, die Sinterungszeit und die Zugabe von Calciumcarbonat-Puffer eine eher unterordnete Rolle. Ein Zellkulturversuch zeigte, dass eine hohe Porosität in Kombination mit kleinen Granula gute Bedingungen für eine zelluläre Besiedlung darstellen. Die Quellungsversuche der 50:50 PLGA Copolymere zeigten Geschwindigkeit und Ausmaß einer Implantatveränderung. Zur Entwicklung eines 3D-PLA/PGA Systems, welches auch den Ersatz eines größeren Knochendefekts ermöglicht, wurde ein aus Schichten zusammengesetztes Stapelsystem erprobt, dessen Einsatz in der Zellkultur durch die zu geringe Stabilität jedoch nicht möglich war. Zusammengefasst bieten poröse 50:50 PLA/PGA Implantate sehr gute Ausgangsbedingungen für die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien. Ein Nachteil ist jedoch zurzeit noch die geringe Stabilität.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Stand der Forschung	3
1.1.1 Implantate als Knochenersatz	3
1.1.2 PLGA Copolymere	4
1.2 Problemstellung	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Reagenzien	10
2.1.2 Apparaturen.....	10
2.1.3 Zellkultur.....	11
2.2 Methoden	14
2.2.1 Herstellung von Kornfraktionen	14
2.2.2 Einarbeiten von Calciumcarbonat ins Copolymer	15
2.2.3 PLA/PGA Implantate.....	15
2.2.4 Osteoblasten in porösen PGA/PLA Implantaten	23
2.2.5 Analyse und Berechnungsmethoden.....	25
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Vergleich verschiedener Einschicht-Implantate	28
3.1.1 PLGA Copolymer in Verhältnis 50:50	32
3.1.2 PLGA Copolymer im Verhältnis 75:25	32
3.2 Quellungsversuch.....	38
3.2.1 Vorversuch mit PBS	38
3.2.2 Versuch mit MM0-Medium.....	38
3.3 Zellkulturversuch	41

Inhaltsverzeichnis

3.4	PLA/PGA Stapelsystem als Knochenersatz.....	47
4	Diskussion	48
5	Ausblick.....	58
6	Zusammenfassung	60
7	Anhang.....	I
7.1	Errechnen der Angabe des Druckes auf einem Presswerkzeug.....	I
8	Literaturverzeichnis.....	II
9	Danksagung	V
10	Lebenslauf	VI

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Implantate als Knochenersatz

Die Frage, wie ein verloren gegangenes oder erkranktes Hartgewebe durch ein entsprechendes Material zu ersetzen ist, beschäftigt viele Wissenschaftler. In der medizinischen Forschung wird nach einem Ersatz gesucht, der die heutigen Methoden der Transplantation verbessern und die Komplikation der lebenslangen Immunsuppression oder das Risiko einer Abstoßungsreaktion verhindern könnte [Hutmacher et al. 2001].

Generell können Implantate nach ihrer Herkunft in natürliche und synthetische und nach dem Grad der Biodegradierbarkeit in absorbierbare und nicht absorbierbare aufgeteilt werden.

Die Vorteile von biodegradierbaren Materialien liegen in erster Linie in der Vermeidung einer zweiten Operation, die zur Entnahme von z.B. metallischen Implantaten notwendig wäre [Middelton et al. 2000]. Knochenersatzmaterialien sollten Knochen vorübergehend ersetzen können und idealerweise möglichst die gleichen Eigenschaften besitzen [Soldner et al 2001]. Bei Verwendung geeigneter Implantate am Knochen kann der Knochen bereits während der Implantatdegradation schrittweise belastet werden [Athanasίου et al. 1998].

Nach Aussage von Hutmacher et al. sollte ein ideales Implantatgerüst, das als Knochen- und Knorpelersatzmaterial eingesetzt wird, folgende Anforderungen erfüllen [Hutmacher et al. 2001]:

- 1) Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit, kontrollierte Degradation und Resorptionsraten, welche dem Gewebe vergleichbar sind
- 2) Hohe Porosität, mit einem kommunizierenden Hohlraumssystem für Zellwachstum und Transport der Nährstoffe und der Stoffwechselprodukte
- 3) Geeignete Oberfläche für Zell-Attachment, -Proliferation und -Differenzierung

Einleitung

- 4) Mechanische Eigenschaften, die den jeweiligen Geweben entsprechen
- 5) Reproduzierbarkeit, in unterschiedlichen Formen und Größen

Zu den natürlich vorkommenden Implantatmaterialien gehören Kollagene, Agarose, Hyaluronsäurederivate, Chitosan und Fibrinkleber [Hutmacher et al 2001].

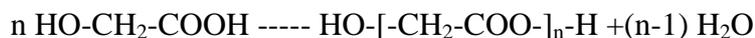
Synthetisch werden häufig Polymere wie PLA (engl. Polylactic acid), PGA (engl. Polyglycolic acid), Polycaprolactone und Polydioxane verwendet [Hutmacher et al 2001].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die PLGA (Poly-lactid-co-glycolid) Copolymere als Implantatmaterial.

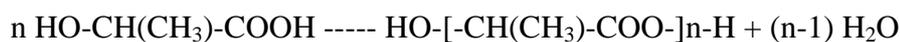
1.1.2 PLGA Copolymere

Nach der chemischen Definition sind Polymere langkettige Moleküle, die aus kleinen Einheiten sog. „Monomeren“ bestehen, deren Anzahl durch den Polymerisationsgrad n beschrieben wird. Die Polymere, die aus gleichen Einheiten bestehen, werden Homopolymere genannt, während die, die aus unterschiedlichen Einheiten bestehen, als Copolymere bezeichnet werden. So ist das Polyglycolid (engl. Polyglycolic acid; PGA) das Homopolymer der Glycolsäure und das Polylactid (engl. Polylactic acid; PLA) das Homopolymer der Milchsäure [Epple 2003]. Sie entstehen jeweils durch Abspaltung von Wassermolekülen zwischen den Monomeren:

Polyglycolid (PGA)



Polylactid (PLA)



Durch die Mischung von Glycolsäure und Milchsäure entsteht das PGLA (Polyglycolid-co-lactid) Copolymer, bzw. PLGA (Poly-lactid-co-glycolid) Copolymer.



Einleitung

Die Glycolsäure (Hydroxyessigsäure) gehört wie auch die Milchsäure (2-Hydroxypropansäure) zu den α -Hydroxycarbonsäuren, die während des normalen Metabolismus im menschlichen Körper produziert werden [Ashammakhi et al. 1997]. Bei der Metabolisierung entstehen keine toxischen Abbauprodukte. Glycolsäure zeichnet sich durch ihre Biokompatibilität und Biodegradation aus. Zum ersten Mal wurde PGA von William Carothers im Jahr 1930 synthetisiert, wobei die hydrolytische Instabilität in dieser Zeit als große Begrenzung galt [Hutmacher et al. 2001].

Bei der biotechnologischen oder chemischen Herstellung von PGA werden aus der Glycolsäure zuerst die zyklischen Dimere sog. Glykolide geformt. Anschließend findet durch die Ringöffnung der zyklischen Dimere die Polymerisation zum hochmolekularen PGA statt [Hutmacher et al. 2001]. Zu den typischen Eigenschaften von PGA gehört die hohe Kristallinität (45-50%), die auch für den hohen Schmelzpunkt von 220-230 °C verantwortlich ist [Hutmacher et al. 2001; Middleton et al. 2000]. Die Glasübergangstemperatur beträgt 35-40 °C. [Middleton et al. 2000]. Der hohe Kristallisierungsgrad beruht auf dem Fehlen der Methyl-Seitengruppen im Vergleich zu PLA. Aufgrund dessen ist PGA in den meisten Lösungsmitteln nicht löslich. Als Ausnahme gelten organische Lösungsmittel mit einem hohen Fluoridanteil, wie z. B. Hexafluoroisopropanol [Middleton et al. 2000].

Das Milchsäure-Monomer enthält ein asymmetrisches, sog. chirales Kohlenstoffatom, welches für die optische Aktivität verantwortlich ist und die Entstehung von D- und L-Isomeren (Poly-D-lactic acid, PDLA, bzw. Poly-L-lactic acid, PLLA) ermöglicht. Dieses erklärt auch die Existenz von mehreren Polylactiden und im Gegensatz dazu nur einem Polyglycolid, da die Glycolsäure kein chirales Kohlenstoffatom besitzt [Hutmacher et al. 2001; Jain 2000; Epple 2003].

PLA ist hydrophober als PGA, was auf das Vorhandensein einer zusätzlichen Methylgruppe zurückzuführen ist. Die Wasseraufnahme ist dadurch reduziert und die Hydrolyserate fällt im Vergleich zu PGA entsprechend niedriger aus. Weiterhin ist PLA löslicher in organischen Lösungsmitteln als PGA [Hutmacher et al. 2001].

PLA kommt in 2 Formen vor, einerseits als ein optisch stereoreguläres Polymer L-PLA und andererseits als ein optisch inaktives Polymer (D, L-PLA) [Jain 2000]. Das L-PLA

Einleitung

weist aufgrund seiner hohen Ordnung der Polymerketten eine semikristalline Struktur auf, ist sehr hart, sehr hydrolysestabil und somit nur langsam biodegradierbar. Dagegen ist die optisch inaktive racemische Form (D, L-PLA) wegen der Unregelmäßigkeit seiner Polymerketten amorph, eher weich, schnell hydrolysierbar und deshalb auch schneller biodegradierbar. [Epple 2003; Jain 2000].

Epple erklärt diese Unterschiede anhand einer hohen Ordnung der geometrisch identischen Monomer-Einheiten, die bei L-PLA Polylactiden für die höhere Kristallinität und Stabilität verantwortlich sind. Dagegen herrscht bei den D, L-PLA Polylactiden eine hohe Unordnung vor, die für die amorphe und wenig stabile Struktur sorgt [Epple 2003].

Die chemische Synthese von PLGA Copolymeren kann durch verschiedene Prozesse stattfinden. Die PLGA Copolymere mit niedrigem Molekulargewicht (d.h. $< 10\,000$) werden durch direkte Kondensation (engl. polyesterification) aus Milch- und Glykolsäure bei einer Temperatur von $130-190^{\circ}\text{C}$ hergestellt [Jain et al.1998]. Dabei wird Wasser entzogen, was auch bei Temperaturen unter 120°C bei zusätzlicher Anwendung von Katalysatoren möglich wäre. Diese PLGA Copolymere zeichnen sich durch geringe mechanische Festigkeit und schnelle Degradation aus und sind deswegen nur begrenzt für eine medizinische Applikation geeignet [Jain et al.1998].

Dagegen werden die PLGA Copolymere mit mittlerem und hohem Molekulargewicht ($10\,000 - 40\,000$) durch Polymerisation von zyklischen Dimeren hergestellt. Dabei erfolgt keine Dehydratation, d.h. kein Wasserentzug. Die Höhe des Molekulargewichts ist von der Konzentration des Katalysators (Pb, Cd, Zn, Sb, Ti) abhängig [Jain et al. 1998].

Sowohl PLA als auch PGA unterliegen in wässriger Umgebung einem Abbau durch Hydrolyse. Da die Milchsäure hydrophober als Glykolsäure ist, sind die milchsäurereichen PLGA Copolymere ebenfalls hydrophober. Sie absorbieren weniger Wasser und degenerieren daher langsamer.

Bei dem Abbau kann es sowohl zu einer enzymatischen, als auch einer hydrolytischen Reaktion kommen, wobei die hydrolytische Spaltung der Esterbindung sowohl durch Protonen (H^+ , saurer pH-Wert), als auch durch Hydroxid-Ionen (OH^- ; basischer pH-Wert) katalysiert wird. Daraus resultiert die optimale Stabilität im neutralen Bereich

Einleitung

[Epple 2003]. Durch die Anlagerung eines Wassermoleküls entstehen somit die entsprechenden Hydroxycarbonsäuren, Glycolsäure und Milchsäure. Diese Bestandteile des normalen Metabolismus können leicht vom menschlichen Körper verarbeitet werden [Epple 2003]. Hutmacher beschreibt die unterschiedlichen Abbaumechanismen von Milch- und Glycolsäure *in vivo*. Die Milchsäure wird direkt im Citratzyclus abgebaut und schließlich als Kohlendioxid aus der Lunge ausgeschieden. Glykolsäure wird mittels Oxidase zu Glycoxyolat oxidiert, das mit dem Enzym Glyzintransaminase reagiert und zur Entstehung von Glycin führt. Glycin kann einerseits zur Proteinsynthese benutzt werden oder genauso wie Milchsäure im Citratzyclus abgebaut werden [Hutmacher et al.2001].

Der Grad der Kristallinität und der Schmelzpunkt sind direkt abhängig vom Molekulargewicht der Polymere, und bei den Copolymeren auch individuell von dem Verhältnis von PLA zu PGA [Jain et al.1998]. Copolymere, die aus L-PLA und PGA bestehen, sind kristalline Copolymere. Die Copolymere, die aus D, L-PLA und PGA entstanden sind, weisen dagegen eine amorphe Form auf [Jain et al.1998]. Somit beeinflusst die Kristallinität die mechanische Festigkeit, das Schwellungsverhalten, die Hydrolysefähigkeit und die Biodegradation der Copolymere [Jain et al. 1998].

Epple hat die PLGA Eigenschaften mit folgenden Regeln beschrieben [Epple 2003]:

- „Je höher der Glycolid-Anteil, desto schneller die Biodegradation.“
- „Je größer die mittlere Kettenlänge n , desto langsamer die Biodegradation.“
- „Je höher die Kristallinität, desto härter das Material.“
- „Je höher die Kristallinität, desto langsamer die Biodegradation.“
- „Ein höherer Ordnungsgrad in den Polymerketten (insbesondere durch gleiche Monomereinheiten) führt zu einer höheren Kristallinität“

Weiterhin kann ein Biomaterial nach verschiedenen Gesichtspunkten beurteilt werden [Epple 2003]:

- Mechanische Eigenschaften
- Biodegradation (Verweildauer im Körper)

- Biokompatibilität
- Monomer-Einheiten
- Mischungsverhältnis bei Copolymeren einschließlich der Verknüpfungsart
- Polymerisations- und Vernetzungsgrad
- Kristallinitätsgrad
- Glastemperatur
- Morphologie (massiv, porös)
- Oberflächeneigenschaften

Die Frage, ob ein Biomaterial als Knochenersatzmaterial eingesetzt werden kann, hängt dann schließlich von mehreren Faktoren ab. Wichtig sind nicht nur die Eigenschaften des Biomaterials selbst, sondern auch die Funktion und die Bedingungen, unter denen das Material eingesetzt werden soll, wie z. B. ob eine kürzere oder eine längere Degradationszeit erwünscht ist. Die Degradationszeiten betragen in vitro für kristalline PGA-Polymere und amorphe PLGA Copolymere Wochen bis Monate, für amorphe D, L-PLA Monate und für kristalline L-PLA Jahre [Epple 2003].

1.2 Problemstellung

Obwohl sich bereits viele Wissenschaftler mit PLGA Copolymeren beschäftigt haben und viele wichtige Informationen bereits bekannt sind, werden bisher diese Stoffe als Knochenersatzmaterial nur selten eingesetzt. Daher sollten die chemisch-physikalischen Eigenschaften dieser Copolymere näher untersucht werden, und auch die Möglichkeit des Einsatzes in größeren Knochendefekten diskutiert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit PLGA Copolymeren, die zur Herstellung von porösen Implantaten verwendet wurden, mit dem Ziel ein kommunizierendes Hohlraumssystem herzustellen, das als Knochenersatz dient. Das Implantat sollte vorübergehend Knochenfunktionen übernehmen können und die Bildung von neuem nativem Knochen unterstützen. Die Poren der Implantate sollten das Attachment und

Einleitung

die 3D Proliferation der Osteoblasten erleichtern. Idealerweise sollte parallel zur Entstehung des neuen Knochens die Degradation des Copolymers erfolgen.

Für die Untersuchungen wurden industriell hergestellte PGLA Copolymere im Verhältnis 50:50 verwendet. Es stellte sich die Frage, wie weit die Porosität der Implantate und die strukturellen Eigenschaften der Copolymere sich auf die in vitro Bedingungen auswirken, besonders ob und in welchem Umfang die Korngröße und ferner auch die Porosität die Proliferation der eingesetzten Osteoblasten in vitro beeinflussen,. Weiterhin sollte die Änderung der Struktur der PLA/PGA Implantate im Laufe der Degradation beobachtet werden und ihre Auswirkung auf die Zellproliferation diskutiert werden. Schließlich sollte mit Hilfe eines 3D-PLGA Prototyps untersucht werden, ob der Einsatz auch in einem größeren Knochendefekt möglich wäre.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In dieser Arbeit sind folgende Materialien und Instrumente verwendet worden:

2.1.1 Reagenzien

- PLGA Copolymere (Boehringer Ingelheim, Typ 50:50 (RG 503H), Typ 75:25 (RG 756))
- Calciumcarbonat (Merck)
- 100 % Isopropanol
- Paladur (Heraeus Kulzer)

2.1.2 Apparaturen

- Presswerkzeug mit Stempel (32 mm Durchmesser) (LOT Oriol)
- Presswerkzeug mit Entlüftung (13 mm Durchmesser)
- KBr-Pressen mit Wasserstrahlpumpe (Perking Elmer)
- Dispergator
- Siebe
- Petrischalen
- Ultraschallbad
- Kugelmühle
- Rotationsverdampfer (Janke & Kelnkel, IKA Werk)
- Waage

Material und Methoden

- Umluft-Wärmeschrank (Heraeus –Kelvitron)
- Stichsäge
- Wärmeplatte (RTC basic IKA-Labortechnik)
- Transilluminator (Herolab, Type RH-2 GmbH, Wiesloch)
- Wärmeschrank (Heraeus Instruments, Düsseldorf)
- Computer Counter-System CASY I (Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen)
- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss)
- Lichtmikroskop Diaphot-TMD (Nikon Kogaku K. K., Tokyo, Japan)
- Zentrifuge Heraeus Laborfuge 400R (Heraeus)

2.1.3 Zellkultur

Zellen: primäre bovine Osteoblasten, Zellen aus dem Periostgewebe vom Metacarpus frisch geschlachteter Kälber

- Earls I Lösung:
 - 450 ml Aqua destillate
 - 50 ml Earls Salze
 - 3 ml 7,5 % NaHCO_3
- Earls II Lösung:
 - 200 ml Earlsalze
 - 2 ml Amphotericin B /Biochrom A2612 (250 μm /ml)
 - Pest (Penicillin + Streptomycin) /Biochrom A2213 (10 000u/10 000 μg /ml)

- MM0 Medium:
 - 100 ml High GEM (High Growth Enhancement Medium, ICN Biomedical GmbH, Eschwege)
 - 12 ml FKS (fetales Kalbserum)
 - 1 ml Glutamin / Biochrom K0283 (200mM)
 - 1 ml Amphotericin B / Biochrom A2612 (250 µg/ml)
 - 1 ml Pest (Penicillin/ Streptomycin) / Biochrom A2213 (10 000u/10 000 µg/ml)

2.1.3.1 Substanzen für die Zellkultur

- Earl's Salze:
 - 6,80 g NaCl (Merck 6404)
 - 0,40 g KCl (Merck 4936)
 - 0,14 g NaH₂PO₄ * H₂O (Merck 6346)
 - 0,20 g MgSO₄ * 7 H₂O (Merck 5886)
 - 0,20 g CaCl₂ (Merck 2382)
 - 1,00 Glucose (Merck 8342)
 - 2,20 g NaHCO₃ * H₂O (Merck 6329)
 - 10,00 mg Phenolrot (Riedel de Haen 326661)

- PBS mit Ca²⁺ / Mg²⁺:
 - 8,00 g NaCl (Merck 6404)

Material und Methoden

▪ für Zellernte / -passage:

- 0,20 g KCl (Merck 4936)
- 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6580)

oder

- 1,15 g Na_2HPO_4
- 0,20 g H_2KPO_4 (Merck 4873)
- 0,10 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 5833)
- 0,13 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 2382)

oder

- 0,10 g CaCl_2

▪ Tyrode Lösung:

- 8,00 g NaCl (Merck 6404)
- 0,20 g KCl (Merck 4933)
- 1,00 g NaHCO_3 (Merck 6329)
- 56,5 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6346)
- 0,30 g Triplex III (= EDTA-Na-Salz) (Merck 8418)
- 1,00 g Glukose (Merck 8342)

▪ Kollagenase:

- 250 ml HAMS F10 Medium (Seromed FG 0715)
- 5 ml HEPES 1M (Seromed L1613)
- 100 mg Kollagenase (Seromed Typ CLS II, C II-28)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Kornfraktionen

Als Ausgangsmaterial für die Implantatherstellung wurden PLGA Copolymere des Typs 50:50 (RG 503 H), 75:25 (RG 756) der Firma Boehringer Ingelheim verwendet.

Da das industriell hergestellte Material eine nicht einheitliche heterogene Struktur aufweist, wurde es vor der Verwendung als Implantatmaterial Bearbeitungsprozessen unterzogen, um eine einheitliche Partikelstruktur zu gewinnen, und damit ein homogenes Kornsystem herstellen zu können. Bei dieser Bearbeitung wurde ein empirisches Verfahren verwendet, das als Hintergrund die unterschiedliche Zusammensetzung der Polymere mit ihrer Struktur berücksichtigt.

Das Hauptprinzip der Trennung der unterschiedlichen Partikel basiert auf einem Siebvorgang mit Hilfe von destilliertem Wasser. Analoge Versuche mit 100% Isopropanol und einem Gemisch von Wasser und Isopropanol erwiesen sich aufgrund von Materialverklebungen als nicht geeignet.

Das PLGA Mischpolymere im Verhältnis 75:25 wurden aufgrund seiner Grobkörnigkeit vor dem eigentlichen Siebvorgang in Wasser suspendiert und anschließend mit Hilfe eines Dispergators zerkleinert. In diesem Fall wurde das Copolymer 75:25 für 60 s dispergiert. Die Dauer und die Stärke des Dispersionsvorganges wurden durch die Körngrößen bestimmt. Für den Siebvorgang sind folgende Siebe benutzt worden: 1000 μm , 600 μm , 400 μm , 150 μm und 50 μm , die in einer aufsteigenden Reihenfolge aufeinander gesetzt wurden. Danach wurde das abgewogene Material auf das obere Sieb platziert und mittels destillierten Wassers durchgespült. Nun wurden die Siebe mit den Fraktionen 400 μm - 1000 μm im Wärmeschrank mit Umluft gelagert und über Nacht bei 30 °C getrocknet. Kleinere Fraktionen (< 400 μm) wurden erneut mit destilliertem Wasser ausgespült und anschließend mittels einer Sterilfiltrationseinheit unter Vakuum (15Hg) filtriert. Die feinen Fraktionen wurden vom Filterpapier auf eine Petrischale übertragen und gleichfalls im Wärmeschrank bei 30 °C über Nacht getrocknet.

2.2.2 Einarbeiten von Calciumcarbonat ins Copolymer

PLGA Copolymere setzen saure Abbauprodukte (Glykolsäure, Milchsäure) frei, die insbesondere im Knochenkontakt über eine pH-Wert-Absenkung zur lokalen Knochenauflösung (Osteolyse) führen können. Durch Zugabe von basischen Pufferstoffen kann die pH-Wert-Absenkung kompensiert werden. In dieser Arbeit wurde als pH-Puffersystem Calciumcarbonat [Epple 2003] ausgewählt und zum Ausgangsmaterial für die Implantatherstellung beigemischt.

Bei der Einarbeitung von Calciumcarbonat wurde auf eine homogene Verteilung im Copolymer geachtet. Um diese zu erfüllen, wurde zuerst sowohl das Copolymer als auch Calciumcarbonat mit 100 % Isopropanol 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend miteinander vermischt. Danach wurde das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers vollständig entfernt. Der Gehalt an CaCO_3 betrug bei allen Mischpolymeren 10 Massenprozent.

2.2.3 PLA/PGA Implantate

Die Herstellung von PLA/PGA Implantaten erfolgte in Form von Einschicht- und Zweischicht-Implantaten, die in folgenden Kapitel (2.2.3.1, 2.2.3.2) genau beschrieben werden.

2.2.3.1 Einschicht-Implantate

Für die Herstellung der Einschicht-Implantate wurden die bereits definierten Kornfraktionen der 50:50 und 75:25 PLGA Copolymere verwendet, die vorher mit Calciumcarbonat gemischt wurden (siehe Kapitel 2.2.2). Zum Vergleich wurden sowohl einige Implantate ohne Calciumcarbonat als auch Implantate ohne definierte Körnergröße hergestellt.

Das Verfahren beruht auf einem Pressvorgang mit anschließender Sinterung der komprimierten Masse. Der Prozess der Sinterung beschreibt das mikroskopische Zusammenschmelzen der einzelnen Werkstoffkörner. Durch das Sintern tritt eine Verdichtung des Materials und damit verbunden eine Zunahme der effektiven Dichte des Werkstücks ein. Auch die mittlere Korngröße wächst an und damit die Kristallinität

Material und Methoden

des Werkstücks. Um eine möglichst große Porosität (bis zu 70 %) zu erzielen, wurden niedrige empirisch ermittelte Druckwerte ($978,87 \text{ N/m}^2$ und $1200,21 \text{ N/m}^2$) eingesetzt (siehe Anhang 7.1), die durch die Verwendung von 2 unterschiedlichen Gewichten von 10 kg und 8 kg erzeugt wurden. Dabei wurde gleichzeitig auf die Stabilität und Porosität geachtet.

Sämtliche Implantate wurden in einem Presswerkzeug der Firma Perkin Elmer hergestellt. Der Implantatdurchmesser des Presswerkzeugs betrug 32,00 mm. Zum Pressen wurde mit einer einzigen Ausnahme (Implantat Nr. 3; Gewicht von 10 kg) ein Gewicht der Masse 8 kg verwendet, wodurch zusätzlich zum Gewicht des Stempels ein Druck von $978,87 \text{ Nm}^{-2}$ auf das Implantat einwirkte. Vor dem Pressen wurde die entsprechende Kornfraktion gewogen und in ein auf Raumtemperatur abgekühltes Presswerkzeug eingefüllt. Das Material wurde mit dem Stempel des Presswerkzeugs belastet und anschließend im Umluft-Wärmeschrank zur Sinterung erhitzt. Der Wärmeschrank wurde für das 75:25 PLGA Copolymer auf $65 \text{ }^\circ\text{C}$ und für das 50:50 PLGA Copolymer auf $58 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt.

Die in der Literatur beschriebene Glasübergangstemperatur (auch Glasübergangstemperatur) T_g ist ein wichtiger Parameter von amorphen und teilkristallinen Polymeren. Oberhalb dieser Temperatur befindet sich das Polymer in einem elastisch-flexiblen Zustand, unterhalb dieses Punktes dagegen in einem harten und spröden Zustand.

Die empirisch ermittelten Werte der Glasübergangstemperaturen für die jeweiligen Copolymere sind in Tabelle 1 dargestellt. Dabei handelt es sich um die Werte, bei denen ein poröses Implantat hergestellt wurde, die einzelnen Körner stehen in direkter Verbindung, sind aber noch nicht miteinander verschmolzen.

Material und Methoden

Tabelle 1 Glastemperaturen der PLGA Copolymere

Copolymer PLA : PGA Verhältnis	Glastemperatur °C
50 : 50	58
75 : 25	65

Die Dauer der Sinterung variierte zwischen 20 min und 30 min für das 75:25 PLGA Copolymer, für das 50:50 PLGA Copolymer zwischen 30 und 40 min. Die Entnahme der Implantate aus dem Presswerkzeug erfolgte erst nach dem Abkühlen des Presswerkzeuges auf Raumtemperatur.

Die untersuchten Implantate sind in den Tabellen. 2 und 3 dargestellt.

Material und Methoden

Tabelle 2 Implantate des PLGA Copolymers im Mischungsverhältnis 50:50

Implantat Nr.	Temperatur °C	Wirkungs- dauer min	Zugabe CaCO ₃ 10%M	Kornspektrum µm
16	58	40	+	150 – 400
20	58	30	+	150 – 400
12	58	40	+	400 – 600
18	58	40	+	400 – 600
21	58	35	+	400 – 600
17	58	40	+	600 – 1000
19	58	40	+	600 – 1000
9	58	40	-	n.d.
3	58	10	-	n.d.
22	58	30	-	n.d.

(+ CaCO₃ eingearbeitet, - kein CaCO₃ eingearbeitet, n.d. nicht definiert)

Tabelle 3 Implantate des PLGA Copolymers im Mischungsverhältnis 75 :25

Implantat Nr.	Temperatur °C	Wirkungs- dauer min	Zugabe CaCO ₃ 10%M	Kornspektrum µm
25	65	20	+	150 – 400
26	65	20	+	150 – 400
13	65	30	+	400 – 600
14	65	30	+	400 – 600
23	65	30	+	600 – 1000
24	65	20	+	600 – 1000
11	65	30	-	n.d.

(+ CaCO₃ eingearbeitet, - kein CaCO₃ eingearbeitet, n.d. nicht definiert)

2.2.3.2 Zweischicht-Implantate

Die Zweischicht-Implantate bestehen aus einer Basis- und einer Deckschicht, wobei die Basisschicht als Träger der Implantate dient.

Die Basisschicht wurde nach dem gleichen Prinzip wie die Einschicht-Implantate (siehe Kapitel 2.2.3.1.) hergestellt, bis auf den Pressdruck, der durch eine Masse von 10t erzeugt wurde. Als Material wurden die PLGA Mischpolymere der Typen 50:50 und 75:25 von verwendet.

Die Herstellungsgrundlage der Deckschicht war eine „Beflockung“, wobei hier das 50:50 PLGA Copolymer auf die gerade hergestellte und noch im Presswerkzeug liegende Basisschicht aufgebracht wurde und anschließend unter leichtem Druck des Stempels (978,87 N/m) bei Glasktemperatur gesintert wurde.

Je nach dem Copolymerauswahl für die Basisschicht entstanden die 50.50/50.50 und 75:25/50:50 PLGA Zweischichtimplantate.

2.2.3.3 Porenvolumen und spezifische Dichte

Um die spezifische Dichte (Kap. 2.2.5.) der verschiedenen Polymergegemische PLGA ermitteln zu können, wurden jeweils zwei kompakte porenfreie Implantate pro Copolymer zur Kalibrierung hergestellt.

Dazu war es nötig, das Polymer über seine Glasstemperatur hinaus (Tab. 1) zu erhitzen und unter Vakuum bei hohem Druck zu pressen.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 0,3 g und 0,2 g von jedem PLGA Copolymer mit den Verhältnissen 50:50 und 75:25 verwendet.

Um homogene blasenfreie Implantate zu erhalten, wurde ein Presswerkzeug mit einem Stempeldurchmesser von 13 mm an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und ein Vakuum von 15 mm Hg erzeugt. Erst danach wurde das Polymer in das Presswerkzeug eingefüllt und mit dem Stempel ohne hohen Druck verschlossen. Das Presswerkzeug wurde auf eine warme Platte gelegt und 15 min erhitzt. Die Temperatur der Wärmeplatte betrug 70 °C. Direkt danach wurde der Stempel des Presswerkzeuges für 5 min mit 10t Gewicht in der KBr-Pressen (hydraulische Presse von Perkin Elmer) belastet. Während der Dauer beider Vorgänge war es nötig, das Vakuum über eine Wasserstrahlpumpe konstant zu halten. Das Implantat wurde noch im warmen Zustand entnommen.

2.2.3.4 Quellungsverhalten der Implantate

Um das Verhalten der Implantate im wässrigen Medium und die damit verbundene Formstabilität und Implantatdegradation zu beurteilen, wurden einige Quellungsversuche unternommen.

Es wurden sowohl Einzelschicht-Implantate der 50:50 PLGA und 75:25 PLGA Copolymere als auch Zweischicht-Implantate 50:50/50:50 und 75:25/50:50 untersucht, wobei sowohl eine PBS-Lösung (im Vorversuch) als auch MM0-Medium (im Versuch) eingesetzt wurden.

Nach der Herstellung der Implantate erfolgten die genauen Messungen der Proben und ihr Ansetzen in 6-er Wells mit 8 ml PBS bzw. MM0-Medium. Die Lagerung wurde im Umluftwärmeschrank bei 37 °C vorgenommen. Der Vorversuch wurde aufgrund der

entstandenen Probendefekte vorzeitig nach 7 Tagen abgebrochen. Eine Schrumpfung und massive Verformung der Implantate machte eine aussagekräftige Messung der Daten unmöglich und wurde aus diesem Grund unterlassen.

Um vergleichbare Bedingungen wie in den Zellkultur-Versuchen (siehe Kapitel 2.2.4.) herzustellen, wurde der Ansatz in MM0-Medium vorgenommen. Es handelt sich hierbei um ein gepuffertes Zellkulturmedium, dessen pH-Wert sich erst bei intensiver Freisetzung von Säuren verändert. Um dem vorzubeugen, wurde das MM0 Medium alle 2 Tage gewechselt. Die Probenmessung erfolgt in 3, 7, 14, 20, 25 und 31 Tagen. Die untersuchten Implantate und deren Quellungsverhalten werden im Kapitel 3.2. dargestellt.

2.2.3.5 PLA/PGA Stapelsystem

Das Stapelsystem wurde als Modell für größere Knochendefekte entwickelt. Durch das stereolithographische Verfahren kann ein Knochendefekt genau erfasst werden und in Form eines individuellen Kunststoffmodells auch dargestellt werden.

Das Ziel war es, ein aus PLGA Copolymer bestehendes Implantat als Knochenersatz herzustellen, das dem stereolithographischen Modell weitgehend entspricht und somit den Knochendefekt ersetzen kann. Weiterhin sollte dieses Modell aus kleineren Einheiten bestehen, um die Gefahr des Abkapselns des Implantates zu verhindern und eine bessere Zellkommunikation gewährleisten zu können.

Um das stereolithographische Modell genau darzustellen, wurde ein kegelförmiges 3D Modell aus Kaltpolymerisat (Paladur, Heraeus Kulzer) hergestellt (Abbildung 1a, b).

Danach wurden in das Modell 3 Bohrlöcher von je 2 mm Durchmesser gesetzt und anschließend wurde das Modell mit einer Stichsäge in 5 Scheiben zerlegt (Abbildung 1c). Weiter wurden 5 Implantate aus PLGA Colymer von dem Typ 50:50 hergestellt (siehe Kapitel 2.2.3.1.). Aus diesen Implantaten wurden mit einer scharfen Rasierklinge die gewünschten Umrisse der 5 Modellscheiben hergestellt. Die Bohrlöcher wurden mit Hilfe eines Diamantbohrers in die jeweilige Schicht gebohrt (Abbildung 1d). Die hergestellten Scheiben stimmten bis auf die Höhe, die absichtlich niedriger gewählt wurde, mit den Modellscheiben überein (Abb. 1e-f).

Um eine sichere Trennung der einzelnen Schichten gewährleisten zu können, wurden so genannte Abstandshalter zwischen die 5 Basisschichten (siehe Kapitel 2.2.3.1) angepasst. Für die Form dieser Abstandshalter wurden 2 Varianten (dreieckig und kreisförmig) gewählt, die aus den hergestellten Implantaten mittels einer Rasierklinge und einem Diamantbohrer präpariert wurden. Anschließend erfolgte der Aufbau des Stapelsystems mit den Stapelschichten und den jeweils dazwischen gesetzten Abstandshaltern (Abb. 1 f, siehe Pfeil).

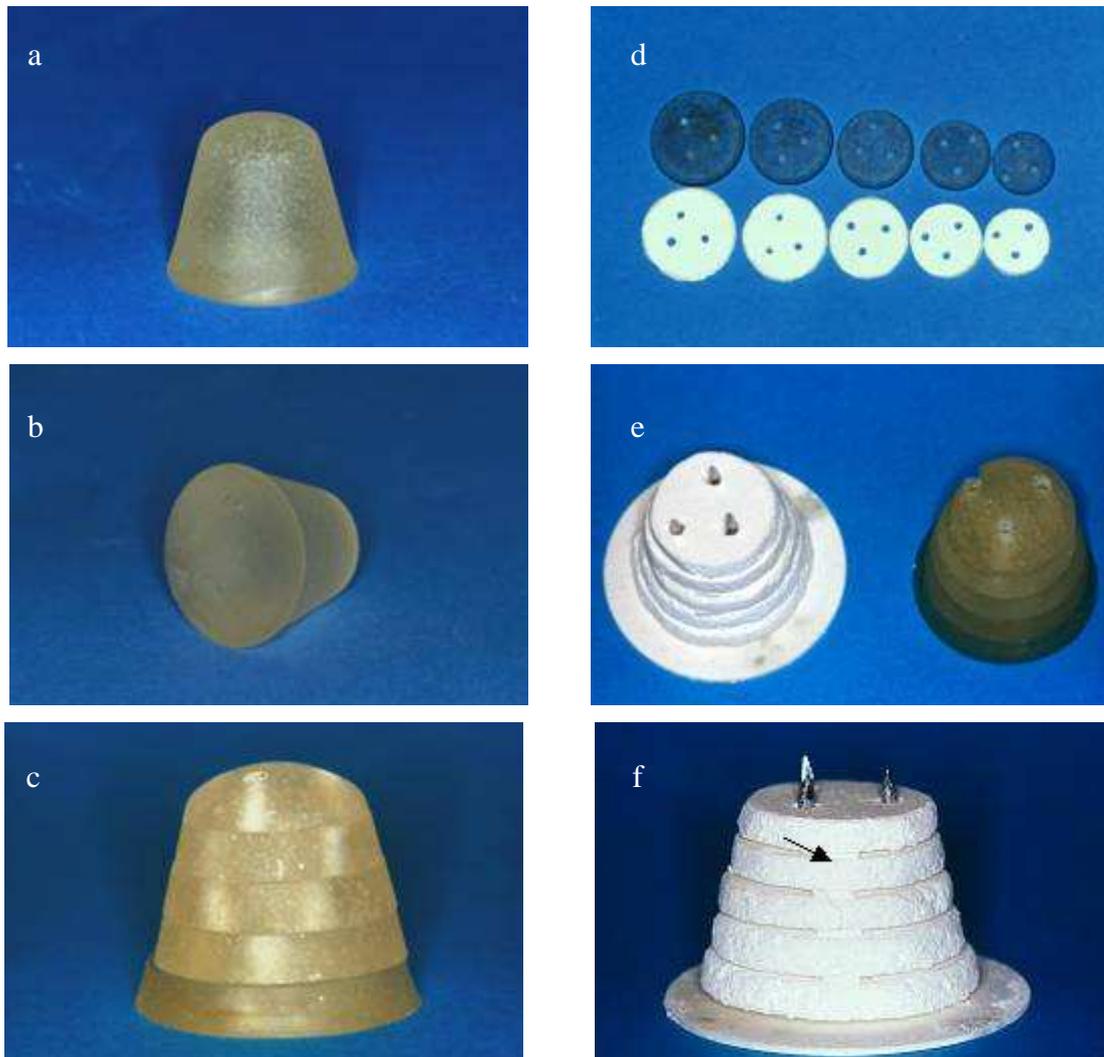


Abbildung 1 Vorgehensweise bei der Herstellung des Stapelsystems

2.2.4 Osteoblasten in porösen PGA/PLA Implantaten

2.2.4.1 Zellgewinnung

Die Zellkulturuntersuchungen wurden mit primären bovinen osteoblasten-ähnlichen Zellen durchgeführt, die durch eine von Jones und Boyde (1977) beschriebene Methode gewonnen wurden [Jones et al 1977]. Diese Methode beruht auf der Fähigkeit der Osteoblasten, unter bestimmten Bedingungen aus Periostgewebe auszuwachsen.

Zur Züchtung der osteoblasten-ähnlichen Zellen wurden frische Metakarpalknochen von Kälbern verwendet, von denen Perioststreifen unter sterilen Bedingungen abpräpariert wurden. Diese wurden zunächst zweimal je 10 min in 37 °C warmer Earl's I Salzlösung und anschließend einmal 10 min in Earl's II Lösung gewaschen. Die abgetropften Perioststreifen wurden danach in quadratische Stücke (5 x 5 mm) geschnitten und zum Antrocknen in Petrischalen gelegt. Nach 30-40 min hatte die Anheftung stattgefunden und die Perioststücke wurden mit dem Kulturmedium MM0 (20 ml pro Petrischale) bedeckt. Die Zellen wurden 1mal pro Woche mit frischem Medium versorgt. Die Kultivierung erfolgte in einem Wärmeschrank (Heraeus Instruments, Düsseldorf) bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und einer Konzentration von 5 % CO₂ über 4 Wochen. Für die Zellernte wurden die Perioststücke entfernt, das Medium vorsichtig abgesaugt und 6 ml Kollagenase zugegeben. Die Inkubation wurde bei 37 °C für 20 min durchgeführt. Daraufhin wurde die Kollagenase abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit je 8 ml PBS gewaschen.

Anschließend wurde der Zellober mit 8 ml Tyrode-Lösung bei 37 °C 10 min inkubiert. Nun war es möglich, die Zellen vom Boden der Petrischale abzulösen und als Zellsuspension zu entnehmen.

Die Bestimmung der Zellzahl und die Zellgrößen-Verteilung wurde mittels eines Coultercountersystems (CASY Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen) ermittelt. Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde bei 500 U/min 5 min zentrifugiert und anschließend in geeigneten Mengen Zellkulturmedium resuspendiert.

Nun konnten die Zellen für Zellversuche verwendet werden. Die Zellproliferation wurde regelmäßig mit dem Lichtmikroskop (Diaphot – TMD, Nikon Kogaku K. K.,Tokyo, Japan) kontrolliert.

2.2.4.2 Zellproliferation

Um das Einwandern und die Proliferation von osteoblasten-ähnlichen Zellen in die Implantate der PLGA Copolymer mit unterschiedlichen Porositäten zu beobachten, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

Die aus unterschiedlichen Kornfraktionen hergestellten Implantate des PLGA Copolymers 50:50 wurden zuerst 30 min im Transilluminator bei 254 nm von unten und 1h von oben unter der Sterilbank mit UV-Licht sterilisiert. Daraufhin erfolgte die Besiedlung mit ca. 360.000 Zellen/cm² in 12er-Wells und 24er-Wells. Die Kultivierung wurde bei einer Temperatur von 37 °C, bei 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ 6 Wochen lang im Inkubator durchgeführt, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde.

2.2.4.3 Durcupaneinbettung

Zur Präparation für elektronmikroskopische Untersuchungen der osteoblasten-ähnlichen Zellen in den PLA/PGA Implantaten wurde die Durcupaneinbettung verwendet.

Die Entnahme der Zellen aus dem Medium erfolgte nach 25 und 47 Tagen, wobei jeweils eine Probe pro Implantat entnommen und in 4% igem Paraformaldehyd 1 h auf Eis fixiert wurde. Das Auswaschen der Fixierlösung erfolgte 4-mal mittels Sörensen-Puffer jeweils 15 min lang. Danach wurde die Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol) nach folgendem Schema (Tab. 4) durchgeführt:

Tabelle 4 : Alkoholreihe

Lösung	Häufigkeit	Dauer Min
30 % Isopropanol	1 mal	15
50 % Isopropanol	1 mal	15
70 % Isopropanol	1 mal	40
80 % Isopropanol	1 mal	40
90 % Isopropanol	1 mal	40
100 % Isopropanol	3 mal	40

Anschließend wurden die Proben in einer 1:1 Isopropanol-Durcupan Lösung über Nacht bei 4 °C eingebettet. Erst danach erfolgte die Einbettung in reinem Durcupan (über Nacht bei 4 °C). Die Polymerisierung fand bei 40 °C (4 h), danach bei 52 °C (30 Tage) statt.

Zur lichtmikroskopischen Kontrolle wurden Semidünnschnitte von 1,5–2 µm Schnittdicke mit dem Mikroton (Ultracuts-Reichert-Jung, Wien) angefertigt und die Zellen mit Toluidinblau angefärbt.

2.2.5 Analyse und Berechnungsmethoden

Für die Berechnung der Gesamtporosität sind folgende Einheiten zu definieren und zu ermitteln:

Masse des Implantates: $[m] = \text{g}$

Höhe des Implantates: $[h] = \text{mm}$

Radius des Implantates: $[r] = \text{mm}$

Grundfläche des Zylinderimplantats: $[A] = \text{mm}^2$; $A = \pi r^2$

Druck: $[p] = \text{N} / \text{mm}^2$; $p = \frac{F}{A} = \frac{mg}{\pi r^2}$

mit $g = \text{konst.} = 9,81 \text{ ms}^{-2}$ (Fallbeschleunigung)

Gesamtvolumen des Zylinderimplantates: $[V_G] = \mu\text{l}$

$$V_G = Ah = \pi r^2 h$$

Rohdichte (Dichte eines porösen Körpers pro Volumeneinheit)

$$[\rho_G] = \text{g}/\mu\text{l}; \rho_G = \frac{m}{V_G}$$

Kompaktvolumen (Volumen eines massiven Körpers):

$$[V_K] = \mu\text{l}; V_K = \frac{m}{\rho_K}$$

mit Spezifischer Dichte (Dichte eines massiven Körpers pro Volumeneinheit):

$$[\rho_K] = \text{g}/\mu\text{l}$$

Gesamtporosität = Porenvolumen / Gesamtvolumen

$$= (\text{Gesamtvolumen} - \text{Kompaktvolumen}) / \text{Gesamtvolumen}$$

$$= (V_G - V_K) / V_G$$

Um das Kompaktvolumen und damit auch die Porosität errechnen zu können, wurden die Parameter Spezifische Dichte ρ_k und Rohdichte ρ eingeführt. Bei der spezifischen Dichte ρ_k handelt es sich um die Masse eines massiven Körpers pro Volumeneinheit. Die Rohdichte ρ gibt die Masse des porösen Implantates pro Volumeneinheit, d.h. die Spezifische Dichte plus den Porenanteil des Volumens.

Da der Hersteller keine Angaben zur Dichte der PLGA Copolymere gegeben hat, wurden die wie bereits im Kapitel 2.2.3.3. beschriebenen kompakten Zylinderimplantate produziert, aus deren Masse und Volumen die spezifische Dichte ermittelt wurde (Abb. 2).

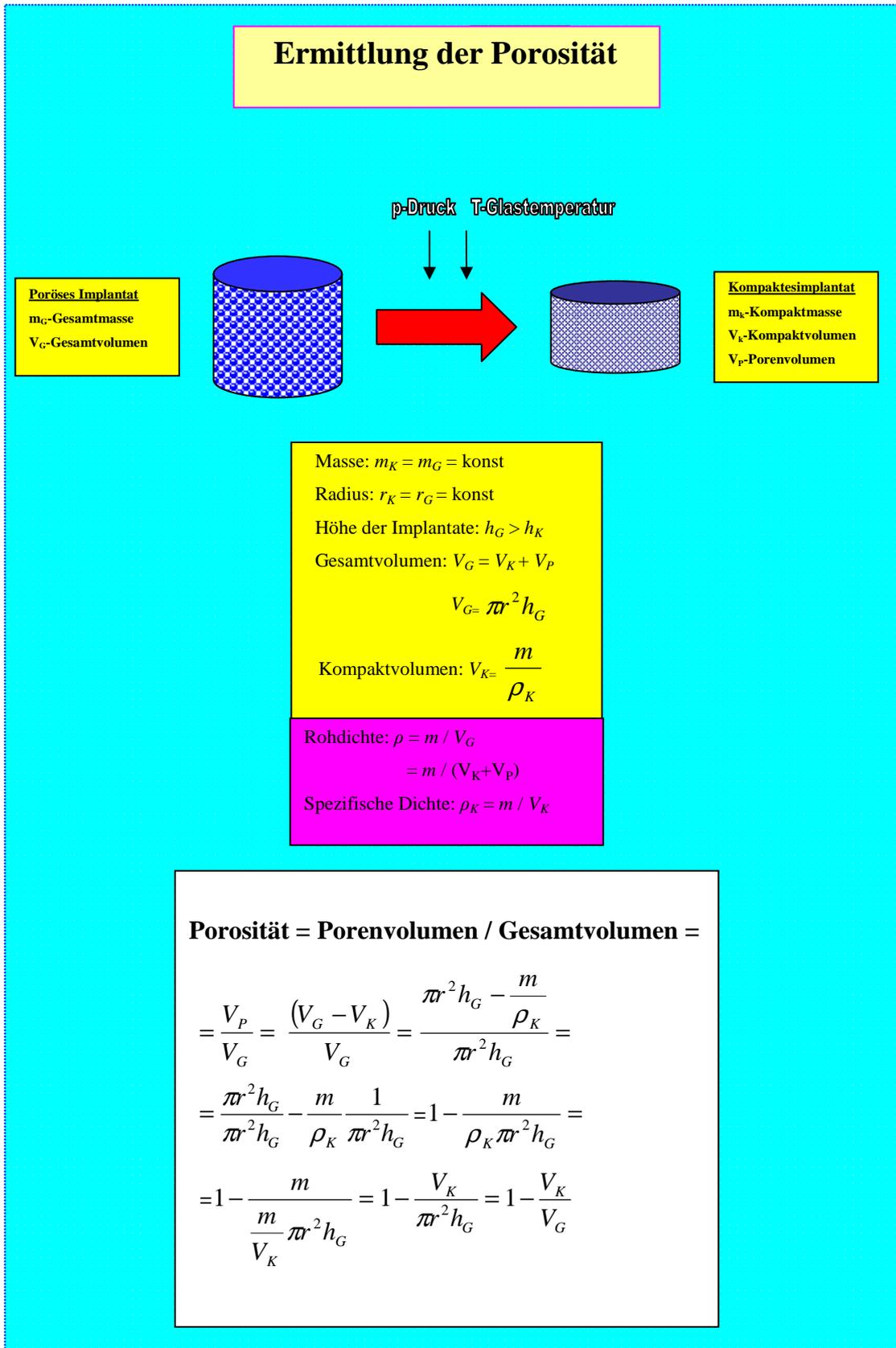


Abbildung 2 Ermittlung der Porosität

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich verschiedener Einschicht-Implantate

Sämtliche Implantate wurden in einem Presswerkzeug der Firma Perkin Elmer hergestellt. Der Innendurchmesser des Presswerkzeuges betrug 32,00 mm, der Durchmesser der gefertigten Implantate betrug 31,95 mm. Für die Ermittlung der spezifischen Dichte der PLGA Copolymere wurde aus technischen Gründen (Notwendigkeit eines Vakuumschlusses) ein Presswerkzeug mit dem Durchmesser von 13 mm verwendet.

Zum Pressen der Deckschichten wurde mit einer einzigen Ausnahme (Implantat Nr. 3; Gewicht von 10 kg) ein Gewicht der Masse 8 kg verwendet, wodurch zusätzlich zum Druck des Stempels ein Druck von $978,87 \text{ N/m}^2$, bzw. 1200 N/m^2 auf das Implantat ausgeübt wurde (siehe 6.1). Zur pH-Pufferung wurde 10 Massenprozent CaCO_3 mit in die Kornfraktionen eingemischt (siehe Kapitel 2.2.2).

Für die Errechnung der Porosität wurde die im Kapitel 2.2.5. eingeführte spezifische Dichte (Tab. 5) ermittelt.

Tabelle 5 Spezifische Dichte der PLGA Copolymere 50:50, 75:25

Implantat Nr.	Copolymer PLGA	Masse <i>G</i>	Höhe <i>Mm</i>	Durchmesser <i>mm</i>	Volumen μl	Spez. Dichte $\text{g}/\mu\text{l}$
6	50:50	0,30	1,65	13,00	219,01	1,37
7	50:50	0,20	1,10	13,00	146,01	1,37
5	75:25	0,30	1,75	13,00	232,28	1,29
4	75:25	0,20	1,15	13,00	152,64	1,31

Tabelle 6 und Abbildung 3 zeigen die ermittelten Daten des 50:50 PLGA Copolymers. Die höchste Porosität (54,3 % bis 73,1 %) weisen die Implantate ohne den Calciumcarbonat-Puffer und mit einem nicht definierten Kornspektrum, d.h. einem unsortierten Ausgangsmaterial auf. Eine mittlere Porosität (20,0 % bis 33,5 %) wird bei

Ergebnisse

den Implantaten mit dem Kornspektrum 400–1000 μm festgestellt. Die kleinste Kornfraktion zeigt die niedrigste Porosität. Die Kornfraktionen 400–600 μm und 600–1000 μm unterscheiden sich in ihrer Gesamtporosität nur unwesentlich. Beide hergestellten Deckschichten der Kornfraktionen 600–1000 μm erscheinen identisch.

Die Porositäten des 75:25 PLGA Copolymers sind im Vergleich zum 50:50 PLGA Copolymer deutlich höher (Tab. 7 und Abb. 3). Die höchsten Porositäten zeigen die Implantate mit dem Kornspektrum 400–600 μm , die mit der Kontrollgruppe vergleichbar sind. Etwas niedrigere, aber immer noch relativ hohe Porosität (Mittelwert 59,2 %) liegt bei der kleinsten Kornfraktion von 150–400 μm vor. Die Implantate mit den Korngrößen 600–1000 μm weisen dagegen nur eine mittlere Porosität von 34,4 % auf.

In den nachfolgenden Tabellen sind die einzelnen Daten zusammengefasst, $A = \text{konst.} = 802 \text{ mm}^2$.

Ergebnisse

Tabelle 6 Implantate des PLGA Copolymers 50:50

Implantat Nr.	Gewicht <i>G</i>	Höhe <i>mm</i>	Durchmesser <i>mm</i>	Gesamtvolumen μl	Kompaktvolumen μl	Porenvolumen μl	Druck /Zeit <i>kg/min</i>	Temperatur /Zeit $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	CaCO ₃ +/-	Korngröße μm	Porosität %
9	0,3	0,6	31,95	481,04	218,98	262,06	8/3	58/40	-	n.d.	54,48
3	1,94	6,6	31,95	5291,46	1416,06	3875,4	10/1,5	55/10	-	n.d.	73,24
22	0,7	2,35	31,95	1884,08	510,95	1373,13	8/3	58/30	-	n.d.	72,88
16	0,7	0,65	31,95	521,13	510,95	10,18	8/3	58/40	+	150	2
20	0,7	0,75	31,95	601,3	510,95	90,35	8/3	58/30	+	150	15,03
12	0,4	0,55	31,95	440,96	292,97	148,99	8/3	58/40	+	400	33,79
18	0,7	0,8	31,95	641,39	510,95	130,44	8/3	58/40	+	400	20,33
21	0,7	0,85	31,95	681,48	510,95	170,53	8/3	58/35	+	400	25,02
17	0,7	0,85	31,95	681,48	510,95	170,53	8/3	58/40	+	600	25,02
19	0,7	0,85	31,95	681,48	510,95	170,53	8/3	58/40	+	600	25,02

(+ CaCO₃ eingearbeitet, - kein CaCO₃ eingearbeitet, n.d. nicht definiert)

Ergebnisse

Tabelle 7 Implantate des PLGA Copolymers 75:25

Implantat Nr.	Gewicht g	Höhe mm	Durchmesser mm	Gesamtvolumen μl	Kompaktvolumen μl	Porenvolumen μl	Druck /Zeit kg/min	Temperatur /Zeit $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	CaCO ₃ +/-	Korngröße μm	Porosität %
11	0,3	1,25	31,95	1002,17	236,85	765,32	8/3	65/30	-	600	76,37
25	0,3	0,7	31,95	561,12	236,85	324,36	8/3	65/20	+	150	57,79
26	0,3	0,75	31,95	601,3	236,85	364,45	8/3	65/20	+	150	60,61
13	0,3	1,2	31,95	962,08	236,85	725,23	8/3	65/30	+	400	75,38
14	0,24	1,15	31,95	922	191,08	730,92	8/3	65/30	+	400	79,27
23	0,3	0,45	31,95	360,78	236,85	123,93	8/3	65/30	+	600	34,35
24	0,3	0,45	31,95	360,78	236,85	123,93	8/3	65/20	+	600	34,35

(+ CaCO₃ eingearbeitet, - kein CaCO₃ eingearbeitet)

Ergebnisse

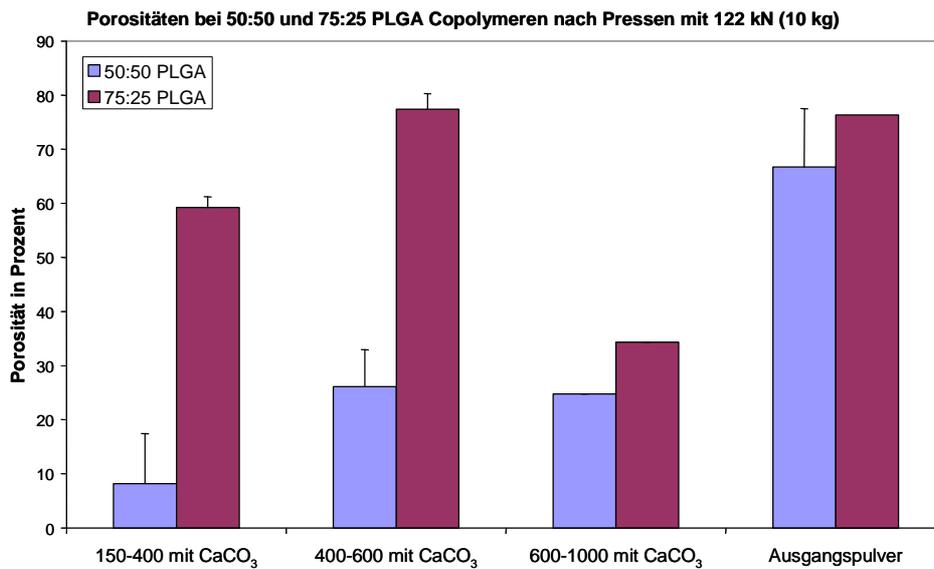


Abbildung 3 Diagramm der Porositäten der PGLA Copolymeren

3.1.1 PLGA Copolymer in Verhältnis 50:50

Sowohl die Auswertung der Tabelle (Tab. 6) als auch die Abbildungen (Abb. 3, 4, 6, 7; 10, 11) weisen darauf hin, dass das eingearbeitete Calciumcarbonat die Kornfraktionen deutlich kompakter werden lässt. Dieser Einfluss zeigt sich besonders deutlich an der sehr niedrigen Porosität (mit Calciumcarbonat) im Vergleich zum Ausgangspulver ohne Calciumcarbonat.

Die Porosität zeigt den maximalen Wert von 73,1% bei Implantat Nr. 3, das ohne Calciumcarbonat hergestellt wurde und den niedrigsten Wert von nur 1,6 % bei Implantat Nr. 16, welches die niedrigste Kornfraktion von 150–400 µm aufweist. Die Unterschiede in den Porositäten sind sehr deutlich in Abbildung 3 zu erkennen.

3.1.2 PLGA Copolymer im Verhältnis 75:25

Die Auswertung ergibt eine auf den ersten Blick nicht einheitliche Porositätenverteilung. Die Porositäten der 75:25 PLA/PGA Implantate weichen von den Werten der 50:50 Implantate deutlich ab. Sie wurden durch die Zugabe von Calciumcarbonat-Puffer nicht grundsätzlich verringert. Die 400–600 µm Kornfraktion weist die höchste Porosität auf und ähnelt sehr den Vergleichsimplantaten, die ohne

Ergebnisse

Calciumcarbonat-Puffer und aus dem nicht definierten Ausgangspulver hergestellt wurden. Etwas geringere Werte zeigt die niedrigste Kornfraktion, gefolgt von 600–1000 μm Implantaten, bei denen nur eine Porosität von 34,4 % ermittelt werden konnte.

Soweit es möglich war, wurden die Standardabweichungen für die bei der Produktion entstehenden Porositäten errechnet. Es wird hier jedoch auf die sehr geringe Anzahl der entsprechenden Implantate ($n = 2$ oder $n = 3$) hingewiesen, so dass die Statistik nur einen Hinweis auf die Reproduzierbarkeit einer bestimmten Porosität liefern kann.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 4–10) stellen die untersuchten Implantate der beiden Copolymere im Vergleich dar. Die Abbildungen 4, 5, 6 zeigen das 50:50 PLGA Copolymer mit eingearbeitetem Calciumcarbonat. Als typisches Merkmal kann die granulare Struktur erwähnt werden. Die Abbildung 4 stellt die grobe Kornfraktion von 600–1000 μm dar, bei der sowohl die einzelnen groben Körner, als auch die dazwischen vorhandenen Poren deutlich zu erkennen sind. Die Körner liegen zwar sehr nah an einander, trotzdem ist eine klare Abgrenzung sichtbar. Bei der kleineren Kornfraktion von 400–600 μm (Abb. 5) kann eine andere Struktur beobachtet werden. Die vorhandenen Granula bestehen nicht nur aus den einzelnen Körnern, sondern aus kleinen Kristallen, die aus mehreren Körnern gebildet worden sind. Es liegt keine deutliche Abgrenzung vor und auch die Porengröße ist dementsprechend sehr unterschiedlich. Die 150–400 μm Kornfraktion (Abb. 6) zeigt ein fast einheitliches Bild von sehr kleinen, in einer engen Beziehung zueinander liegenden Körnern. Beim Verzicht auf die Körnertrennung entstand ein kompaktes Implantat (Abb. 7), in dem sowohl kleine als auch größere Körner sichtbar sind. Es sind zwar keine Poren zu erkennen, trotzdem wirkt das Implantat ziemlich locker.

Zum Vergleich präsentieren die Abbildungen 8, 9, 10 das 75:25 PLGA Copolymer mit eingearbeitetem Calciumcarbonat. Die 600–1000 μm Kornfraktion (Abb. 8) bildet eine sehr kompakte und massive Struktur, einzelne Körner und Poren sind nicht erkennbar, es liegt eher eine partielle Verschmelzung der Körner vor. Auch die 150–400 μm Kornfraktion (Abb. 10) weist eine sehr kompakte Form auf. Dagegen hat das 400–600 μm Implantat (Abb. 9) eine lockere Struktur, die sowohl aus Körnern als auch aus Fasern besteht und deutlich eine große Porosität erkennen lässt.

PLGA Copolymer 50:50 mit CaCO₃



Abbildung 4 Kornspektrum 600–1000 μm , Implantat Nr. 17, 40 fache Vergrößerung

PLGA Copolymer 50:50 mit CaCO₃



Abbildung 5 Kornspektrum 400–600 μm , Implantat Nr. 21, 40 fache Vergrößerung

PLGA Copolymer 50:50 mit CaCO₃



Abbildung 6 Kornspektrum 150–400 µm, Implantat Nr. 20, 40 fache Vergrößerung

PLGA Copolymer 50:50 ohne CaCO₃



Abbildung 7 Kornspektrum nicht definiert, Implantat Nr. 22, 40 fache Vergrößerung

PLGA Copolymer 75:25 mit CaCO₃



Abbildung 8 Kornspektrum 600–1000 μm , Implantat Nr. 24, 40 fache Vergrößerung

PLGA Copolymer 75:25 mit CaCO₃



Abbildung 9 Kornspektrum 400–600 μm , Implantat Nr. 14, 40 fache Vergrößerung

Ergebnisse

PLGA Copolymer 75:25 mit CaCO₃



Abbildung 10 Kornspektrum 150–400 μm , Implantat Nr. 26, 40 fache Vergrößerung

3.2 Quellungsversuch

3.2.1 Vorversuch mit PBS

Während des Vorversuchs wurde sowohl das 75:25 PLGA Copolymer als auch das 50:50 PLGA Copolymer in Form von Einzel- sowie von Zweischichtimplantaten untersucht. Bei den Zweischichtimplantaten blieb die Quellung aus, es kam zur Trennung der Zweischichtimplantate, und es war sogar eine Schrumpfung des 50:50 PLGA Copolymers zu beobachten. Die Messung der Form der Implantate wurde aufgrund von starken Verformungen unterlassen.

3.2.2 Versuch mit MM0-Medium

Bei der Verwendung von MM0 Medium, das später auch in der Zellkultur eingesetzt wurde, wurden aufgrund der Schichtentrennung bei den Zweischichtenimplantaten nur die Einschichtimplantate untersucht. Dabei kam es zu einer deutlichen Volumenzunahme der PLGA Copolymere. Die Beobachtung der Veränderung des pH-Wertes war durch eine Sichtkontrolle (Farbumschlag von rot nach gelb deutete auf saurere Umgebung hin) möglich. Tabelle 8 und Abbildungen 12 und 13 zeigen die im Versuch verwendeten Implantate und ihr Quellungsverhalten. Die stärkste Volumenzunahme bis auf 1200 % wies das 50:50 PLGA Copolymer auf, das mit 10 t gepresst wurde, gefolgt von dem mit 5 t und anschließend dem mit 56 kg gepressten Copolymer, die eine Quellung von 700 % bzw. 290 % aufwiesen. Durch den frühzeitigen Zerfall der Implantate konnten am ersten, dritten und siebten Tag jeweils 3 Implantate, am vierzehnten Tag jeweils 2 Implantate und am einundzwanzigsten Tag nur jeweils 1 Implantat untersucht werden, so dass hiermit keine statistischen Aussagen über die Reproduzierbarkeit gemacht werden können.

Ergebnisse

Tabelle 8 Quellungsversuch im MMO- Medium

Copolymer (Pressdruck)	Ausgangsvolumen μl	Volumen 3. Tag μl	Volumen 7. Tag μl	Prozentuale Quellung 3. Tag in %	Prozentuale Quellung 7. Tag in %
50:50 (10 t)	51,00	75,31	77,98	48,00	53,29
50:50 (5 t)	63,16	71,00	83,99	12,57	33,05
50:50 (56 kg)	318,21	416,17	448,70	30,69	40,81

Der Quellungsverlauf des 50:50 PLGA Copolymers wird anhand der Quellungskurve deutlich (Abb. 11, 12). Das mit 10 t gepresste 50:50 PLGA Copolymer (50:50 – 10 t) quillt im Vergleich zu dem mit 5 t und dem mit 56 kg gepressten Copolymer am meisten. An Tag 3 quillt das 50:50 – 10 t mehr als das 50:50 – 56 kg, gefolgt vom 50:50 – 5 t. Ab Tag 7 quellen die Implantate in gleicher Reihenfolge: das mit 10 t gepresste Copolymer am stärksten, gefolgt von dem mit 5 t und dem mit 56 kg gepressten.

Ergebnisse

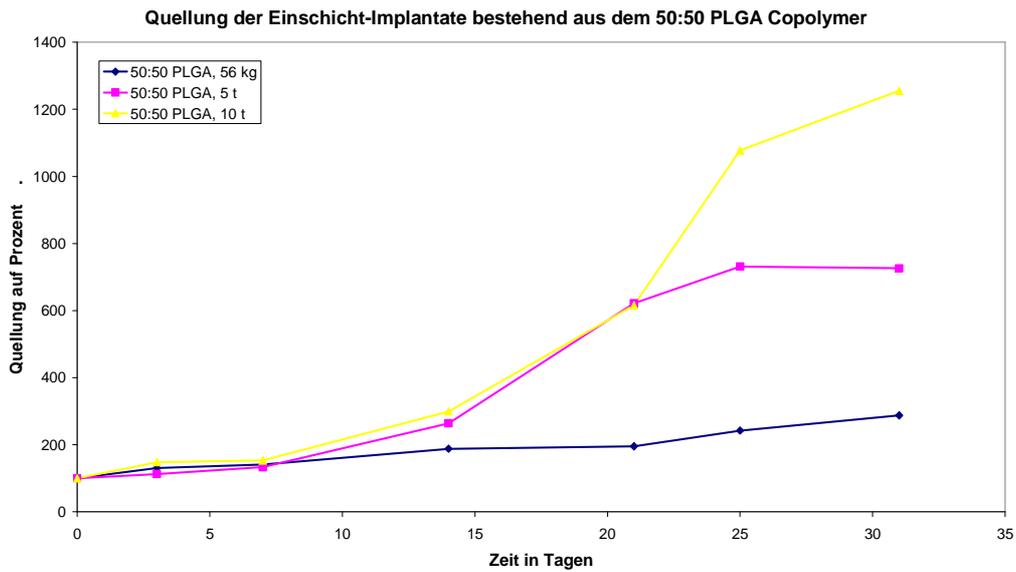


Abbildung 11 Quellungskurve von 50:50 PLGA Copolymer

In Abbildung 12 sind die Quellungsverläufe der Einschichtimplantate detaillierter bis zum Tag 14 dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die geringe Standardabweichung der Messwerte. Die Quellung nimmt mit der Zeit deutlich zu, die Implantate quellen nach 7 Tagen deutlich stärker als in den ersten Tagen. Das Quellungsverhalten der 50:50 – 5 t Implantate nimmt nach 7 Tagen deutlich zu und steigt dann über die der 50:50 – 56 kg Implantate an.

Ergebnisse

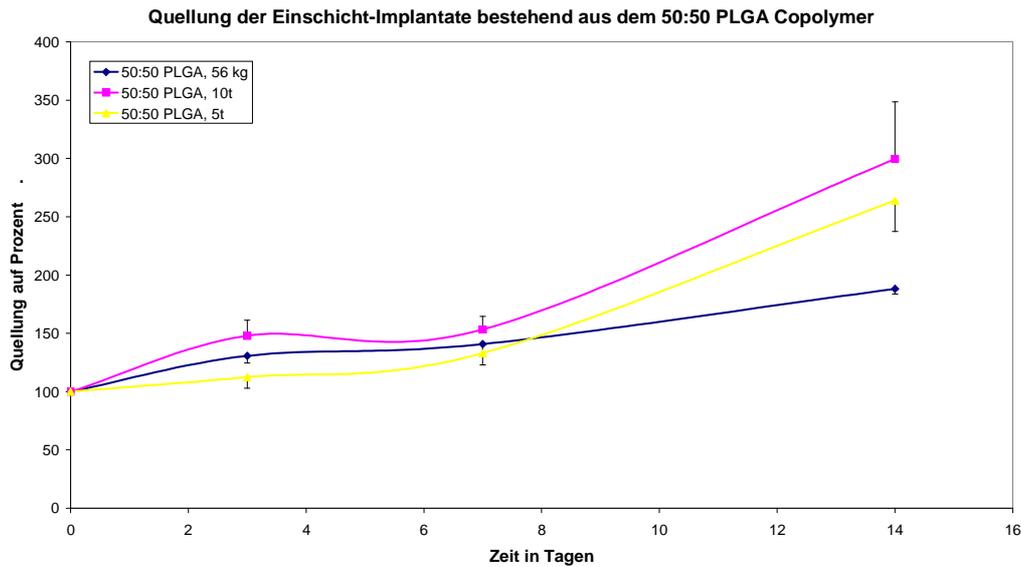


Abbildung 12 Detaillierte Quellungskurve des 50:50 PLGA Copolymer

3.3 Zellkulturversuch

Im Zellkulturversuch wurde der Einfluss von Korngröße bzw. Porosität der PLGA Copolymere auf die verwendeten Zellen untersucht. Es sollte festgestellt werden, inwiefern sich die Porosität auf die Proliferation der Osteoblasten auswirkt und wie schnell es zur Proliferation der Zellen nach Aussiedlung kommt.

Die folgenden Abbildungen zeigen Implantate des 50:50 PLGA Copolymer, die mit Osteoblasten besiedelt und nach 25 und 47 Tagen in Durcupan eingebettet wurden. Die größte Besiedlung zeigt die Probe mit dem Kornspektrum 400–600 μm (Abb.16-19), gefolgt von den 600–1000 μm (Abb. 13, 14) und 150–400 μm (Abb. 20, 21) Proben.

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von Implantaten mit dem Kornspektrum 600–1000 μm , deren errechnete Porosität 25,02 % beträgt. In beiden Fällen sind Osteoblasten-ähnliche Zellen zu erkennen. Die Proben zeigen nach 25 Tagen vereinzelte Zellen, die als Zellmonolayer die PLGA Polymergranula teilweise überziehen. Nach 47 Tagen ist eine signifikant höhere Anzahl an Zellen zu beobachten. Die stark proliferierten Zellen stellen nicht nur Monolayer, sondern 3 dimensionale Zellverbände dar. Die Zellkerne sind deutlich sichtbar. Das Polymermaterial weist durch die Quellung Veränderungen auf. Die großen abgerundeten Polymergranula sind

Ergebnisse

teilweise abgeflacht und bereits nach 25 Tagen durch 2 Monolayer und einen Zwischenraum getrennt. Nach 47 Tagen sind die Polymergranula bis auf 100–150 μm verkleinert und weiter auseinandergerückt.

Die Implantate mit der Kornfraktion von 400–600 μm (Abb. 16 und 17) zeigen nach 47 Tagen die stärkste Besiedlung. Das dicht mit Zellen besiedelte Implantat weist neben der 3D Zellansammlung auch die Bildung einer extrazellulären Matrix auf. Nach 25 Tagen ist das gleiche Implantat (Abb. 15) deutlich geringer besiedelt. Die sehr uneinheitlichen PLGA Polymergranula sind von Zellmonolayer bedeckt, die Zellkerne sind stark abgeflacht, aber deutlich zu erkennen. Die Zellen wachsen bereits in die Tiefe.

Die kleinste Kornfraktion (150–400 μm) wurde am geringsten besiedelt. Nach 25 Tagen (Abb. 19) sind die Körner kaum voneinander gewichen. Es ist nur eine geringe Zellzahl und nahezu kein Zellkern eindeutig zu identifizieren. Nach 47 Tagen (Abb. 20) hat zwar eine Besiedlung stattgefunden, die Zellen sind aber nur als Monolayer angeordnet.

Die Betrachtung der Bilder erfolgte mit 100- oder 200-facher Vergrößerung. Die Toluidinblaufärbung ermöglichte eine gute Darstellung der Zellmembran.

Ergebnisse

Korngröße 600–1000 μm , Porosität 25,02 %

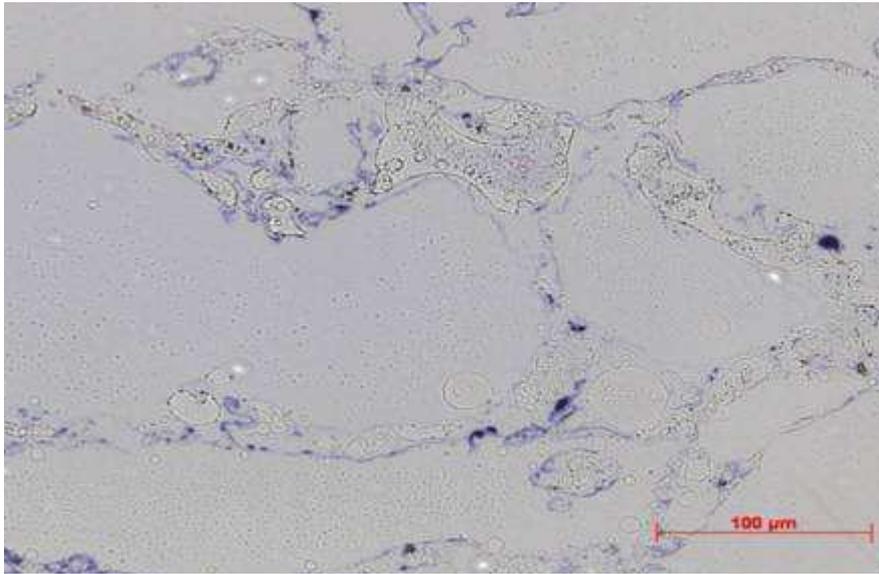


Abbildung 13 Implantat Nr. 17/25 Tage, 200x Vergrößerung, LM (lichtmikroskopische Aufnahme), Toluidinblaufärbung

Korngröße 600–1000 μm , Porosität 25,02%

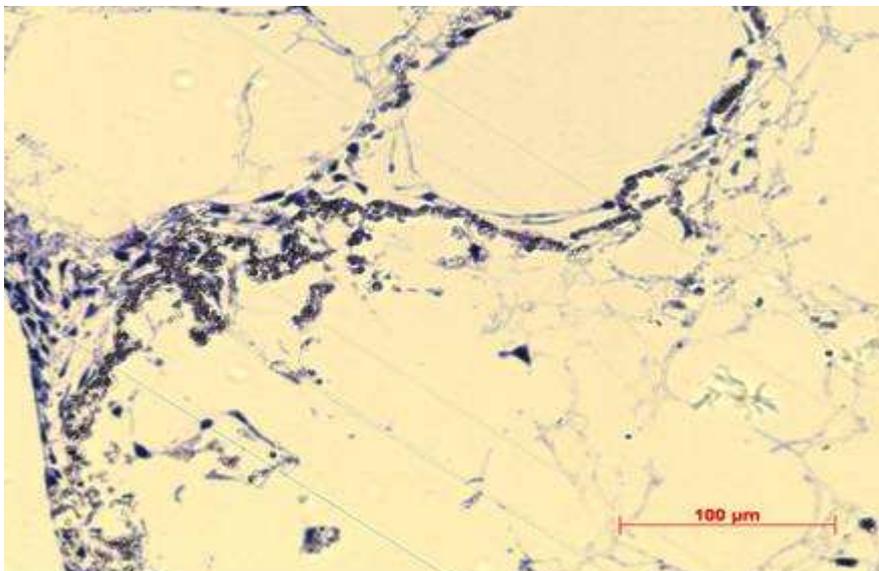


Abbildung 14 Implantat Nr. 17/47 Tage, 200x Vergrößerung, LM, Toluidinblaufärbung

Ergebnisse

Korngröße 400–600 μm , Porosität 25,02%

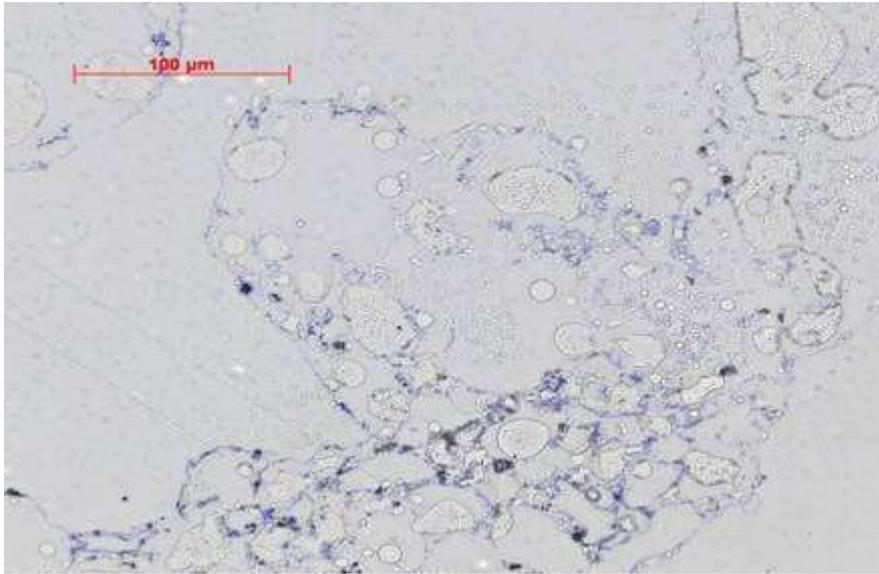


Abbildung 15 Implantat Nr. 21/25 Tage, 200x Vergrößerung, LM, Toluidinblaufärbung

Korngröße 400–600 μm , Porosität 25,02%

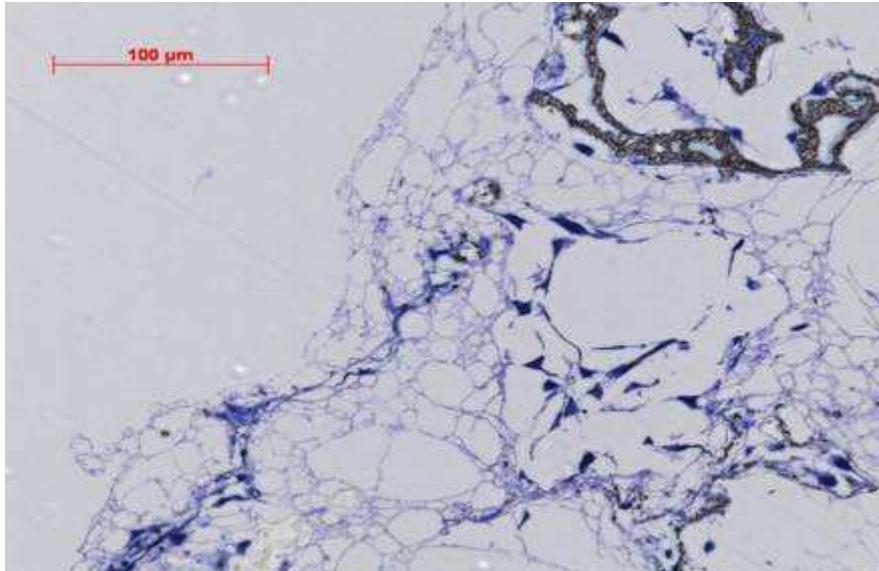


Abbildung 16 Implantat Nr. 21/47 Tage, 200x Vergrößerung, LM, Toluidinblaufärbung

Ergebnisse

Korngröße 400–600 μm , Porosität 25,02%

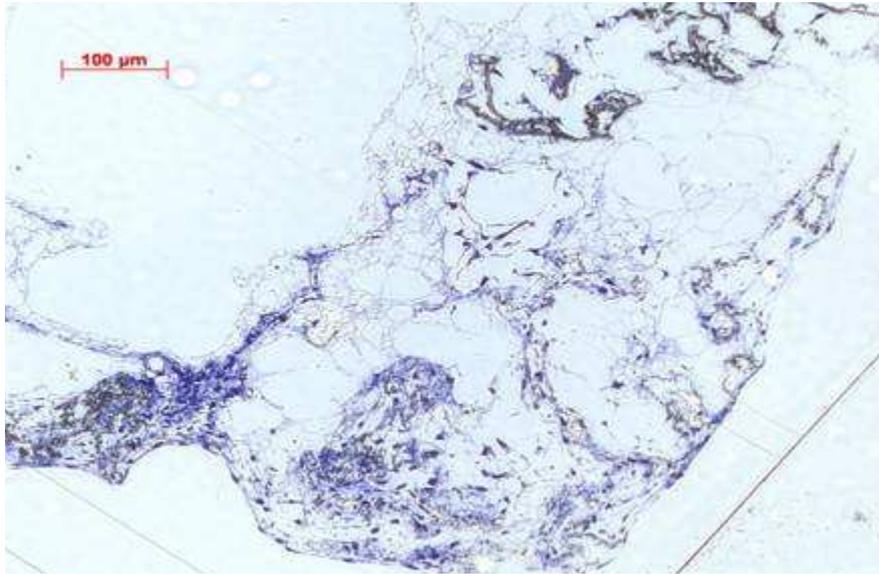


Abbildung 17 Implantat Nr.21/47 Tage, 100x Vergrößerung, LM, Toluidinblaufärbung

Korngröße 400–600 μm , Porosität 20,33%

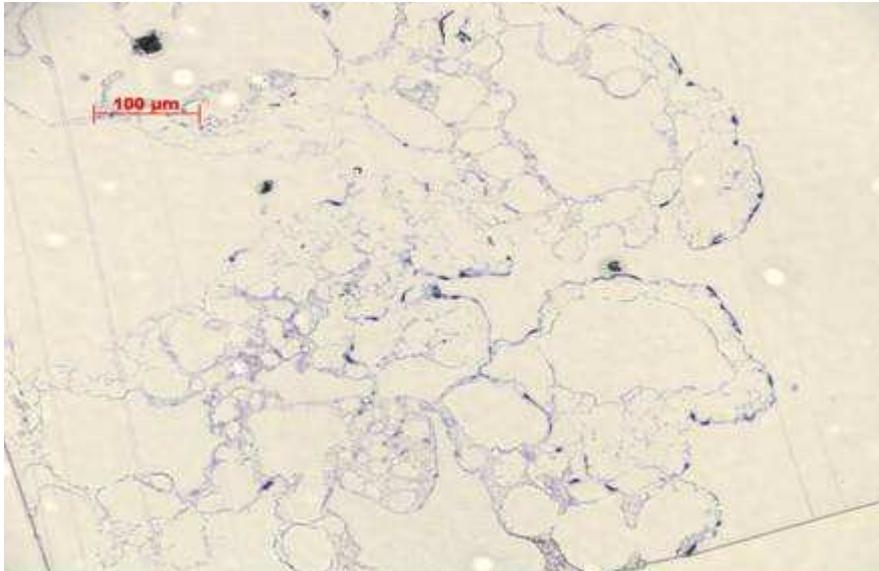


Abbildung 18 Implantat Nr. 18/25 Tage, 100x Vergrößerung, LM, Toluidinblaufärbung

Ergebnisse

Korngröße 150–400 μm , Porosität 15,03%

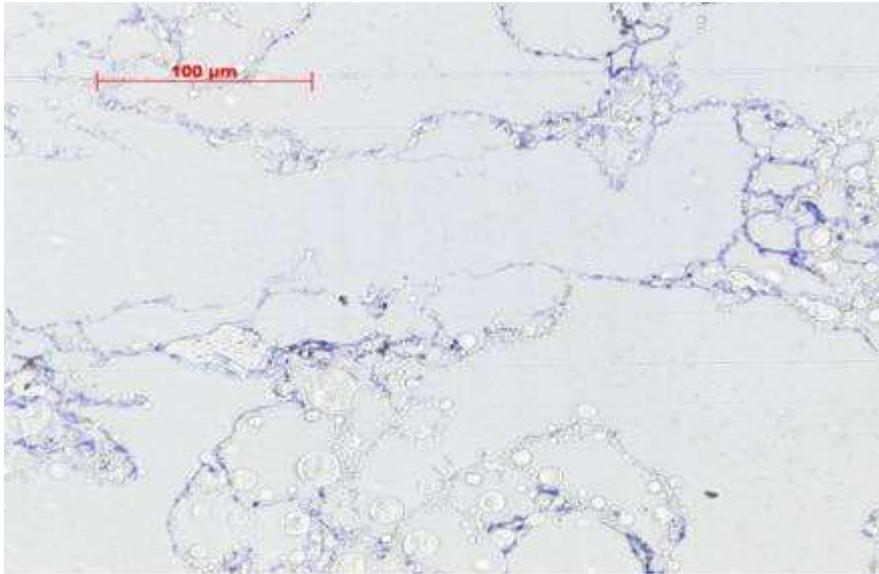


Abbildung 19 Implantat Nr. 20/25 Tage, 200x Vergrößerung, LM, Toluidinblaufärbung

Korngröße 150–400 μm , Porosität 15,03%

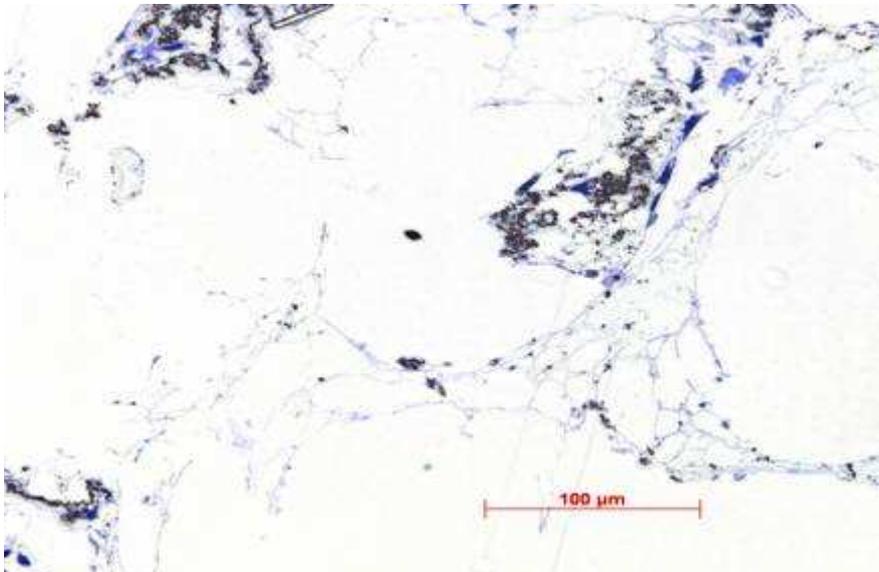


Abbildung 20 Implantat Nr. 20/47 Tage, 200x Vergrößerung, LM, Toluidinblaufärbung

3.4 PLA/PGA Stapelsystem als Knochenersatz

Wie in Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben ist das PLA/PGA Stapelsystem eine aus Schichten bestehende Einheit (Abb.1 und 21). Die Schichten sind jeweils durch PLGA Abstandshalter (Abb. 1f und 21) auseinander gehalten, um den Raum zwischen den Schichten für eine Zellansiedlung bzw. Proliferation zu vergrößern.

Die Schichtverbindung nutzt neben den für die Kommunikation verantwortlichen Abstandshalter auch das Prinzip der Zugschraubenosteosynthese, das häufig in der Traumatologie eingesetzt wird. Die Zugschraubenosteosynthese basiert auf einer spaltfreien Verbindung zweier Fragmente durch interfragmentäre Kompression, wobei gilt, dass die Schraube nur das Schraubenkopf-ferne Fragment (Gewindeloch) erfassen darf, während sie im Schraubenkopf-nahen Fragment nur gleitet (Gleitloch) [Schwenzer et al. 2002].

In diesem Fall dienen die Implantatlöcher als Gleitlöcher. Das Gewindeloch ist dementsprechend in der letzten Schicht einzubringen, wobei in vivo auch die Möglichkeit bestünde, sie direkt im Knochen zu platzieren.

Das hergestellte PLA/PGA Stapelsystem wies eine sehr geringe Stabilität auf.



Abbildung 21 Implantatscheibe mit 3 Abstandshaltern

4 Diskussion

Obwohl die Herstellung von PGA und PLA bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts bekannt war, wurde die Entwicklung und Nutzung dieser Polymere wegen ihrer Instabilität für industrielle Zwecke zuerst nicht weiter verfolgt [Middelton 2000].

Besonders diese Instabilität, die zu einer schnellen Biodegradation führt, war aber für die medizinische Forschung ab den 1960er Jahren von besonderem Interesse. Seitdem wurden biologisch abbaubare Materialien und Polymere sehr intensiv erforscht und weiterentwickelt.

Durch die verschiedenen Herstellungsverfahren entstehen Polymere, die sich durch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden. Anhand dessen können diese definiert für verschiedene Anwendungsbereiche entwickelt werden.

In dieser Arbeit sind besonders die PLGA Copolymere in den Verhältnissen 50:50 und 75:25 untersucht worden, weil sie sich durch eine schnellere Abbaufähigkeit als die reinen Polymere auszeichnen und gleichzeitig ein poröses Hohlräumssystem bilden können.

Die industriell hergestellten PLGA-Copolymere der Firma Bohringer Ingelheim dienten als Ausgangsmaterialien, die durch den Siebvorgang in verschiedene Kornfraktionen (150–400 μm , 400–600 μm , 600–1000 μm) getrennt wurden. Dadurch wurde das PLGA Copolymer nicht nach Porengröße, sondern nach Körnergröße charakterisiert und in 3 Gruppen aufgeteilt. Gleichzeitig wurden auch die Porositäten für jedes Implantat ermittelt (s. S. 24, 25).

Um das durch die schnelle Degradationsrate der Copolymere bedingte lokale Absinken des pH-Wertes zu kompensieren, wurden zusätzlich noch 10 Massenprozent an Calciumcarbonat als Puffer beigemischt.

Bei der Herstellung sind einige Probleme aufgetreten, die zur Änderung bzw. Festlegen von bestimmten Bedingungen geführt haben, mit dem Ziel, ein möglichst homogenes poröses Implantat zu gewinnen:

Diskussion

- Der Pressdruck wurde empirisch ermittelt auf $978,87 \text{ N/m}^2$ festgelegt, um ein zu starkes Verdichten des Implantates zu vermeiden und das Zusammenhalten von einzelnen Körnern zu ermöglichen.
- Die Temperatur des Wärmeschrankes wurde für das 50:50 PLGA Copolymer auf 58 °C und für das 75:25 PLGA Copolymer auf 60 °C eingestellt, um das Einschmelzen der Körner zu verhindern und die Porosität nicht zu erniedrigen.
- Das Presswerkzeug durfte nicht vorgewärmt werden, da sonst der Einfüllvorgang durch frühzeitiges Einschmelzen des Copolymers erschwert oder unmöglich war.
- Beim Verwenden von größeren Pulvermengen wurde auf ein partielles Einfüllen und Verdichten geachtet, um die Verformung der Implantate zu verhindern.

Die Ergebnisse der 50:50 PLGA Copolymere haben gezeigt, dass die Zugabe von Calciumcarbonat zu einer deutlichen Reduktion der Porosität führt. Die höchste Porosität von etwa 70 % wurde bei den Implantaten erreicht, die aus dem Ausgangspulver ohne Zugabe von CaCO_3 hergestellt wurden. Die kleinste Kornfraktion von 150–400 μm zeigt dagegen die niedrigste Porosität von 1,6 bis 14,7 % und deutet darauf hin, dass diese Implantate kaum einheitlich verpressfähig sind. Die 400–600 μm und 600–1000 μm Fraktionen unterscheiden sich in ihrer Gesamtporosität (27,06 % bzw. 25,02 %) nur unerheblich. Das Kornspektrum scheint deswegen eine fast untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr üben die Pressbedingungen, die Sinterungszeit und der Calciumcarbonat-Puffer ihre Wirkung aus. Bereits eine Erhöhung der Sinterungszeit von 30 auf 40 min verursacht eine Absenkung der Porosität von 72,8 % auf 54,3 %. Dabei sind die Sinterungszeit und der Pressdruck umgekehrt proportional zur Porosität. Diese Proportionalität ist besonders bei den niedrigen Fraktionen am deutlichsten.

Die Porositäten der 75:25 PLGA Copolymere unterscheiden sich deutlich von den Werten der 50:50 PLGA Copolymere. Der Grund dafür ist die unterschiedliche Struktur beider Copolymere. Wie auch aus den fotografischen Darstellungen (Abb. 4–10) zu entnehmen ist, zeigt das 50:50 PLGA Copolymer eine granulare Struktur, wobei das 75:25 Copolymer eher ein faseriges Gerüst aufweist. Auch die Zugabe von CaCO_3 hatte

Diskussion

bei den 75:50 Copolymeren keine wesentlichen Veränderungen zur Folge. Die höchste Porosität (77,33 %) weist die mittlere Kornfraktion von 400–600 μm auf und ist vergleichbar mit den Implantaten ohne CaCO_3 (76,37 %), die aus dem nicht definierten Ausgangspulver hergestellt wurden. Auch die kleinste Kornfraktion von 150–400 μm zeigt noch eine Porosität von 59,2 %. Bei den 600–1000 μm Implantaten wurde eine Porosität von 34,4 % ermittelt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zum 50:50 PLGA Copolymer bewirkt der faserige Zustand des 75:25 PLGA Copolymers durch ein engeres Zusammenliegen bei den längeren und dickeren Fasern sowie die Strukturveränderung durch das eingearbeitete CaCO_3 . Die deutlich niedrigere Porosität bei der 600–1000 μm Kornfraktion kann auch durch eine partielle Verschmelzung hervorgerufen worden sein. Diese konnte nicht gesamt verhindert werden, da zur Herstellung eines messbaren Implantats mindestens eine Sinterungstemperatur notwendig war, die empirisch ermittelt und angepasst werden musste. Aufgrund der geringen Anzahl der hergestellten Implantate ($n = 2$ oder $n = 3$) können die Versuche nur einen Hinweis auf die Reproduzierbarkeit einer bestimmten Porosität liefern.

Trotz der Porositätsreduktion bei den 50:50 PLGA Copolymeren durch die Korntrennung (s. Tab. 6,7), kam es während des Zellkulturversuchs zu der gewünschten Proliferation. Die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Implantaten war nach 25 Tagen Proliferationszeit deutlich geringer als nach 47 Tagen. Die Zellproliferation fand vorwiegend am Rand des Implantates und in Bereichen mit großen Hohlräumen statt. Die dichteste Besiedlung wiesen die 50:50 PLA/PGA Implantate mit der Korngröße 400–600 μm auf. Im Vergleich dazu war die Zell-Proliferation bei den Implantaten mit der Körngröße 600–1000 μm bei gleicher Porosität (25,02 %) geringer. Dieses Resultat zeigt, dass eine hohe Porosität in Kombination mit kleinen Granula gute Bedingungen für zelluläre Besiedlung darstellen. Die hohe Porosität sorgt sowohl für eine gute Nährstoffversorgung als auch für eine gute Pufferung im Mikromilieu, wobei die kleinen Körner schneller von den Zellen umschlossen und abgebaut werden. Die geringste Proliferation wurde bei dem 150–400 μm Implantat ermittelt und kann durch die geringe Porosität erklärt werden. Nicht nur die geringe Anzahl an Zellen, sondern auch die reduzierte Menge an vorhandenem Medium innerhalb der Poren ist die Folge, die wiederum einen Mangel an Nährstoffen und niedrige Pufferkapazität hervorruft. Es

findet der Abbau der PLGA-Ketten zu Milch- und Glykolsäure statt, woraus die Übersäuerung des Mikromilieus resultiert. Auch die kleinen Granula tragen dazu bei, denn sie bedeuten eine große Oberfläche, die zur vermehrten Quellung im wässrigen Milieu führt und nachfolgend Kettenbrüche mit Ansäuerung im Mikromilieu verursacht.

Die Quellungsversuche haben gezeigt, wie schnell und in welchem Ausmaß eine Implantatveränderung stattfindet. Während im Vorversuch eine Schrumpfung und Schichtentrennung bei den Zweischichtimplantaten beobachtet wurde, zeigten die weiteren Versuche im MM0-Medium eine deutliche Volumenzunahme. Für die beobachtete Schrumpfung scheint die verwendete PBS-Lösung verantwortlich zu sein. Der bereits erwähnte Abbau von PLA/PGA Implantaten zu Milch- und Glykolsäure verursachte eine starke Übersäuerung, die hier im Gegensatz zum MM0-Medium nicht durch einen Farbumschlag sichtbar war. Das Schrumpfen könnte durch eine Umkristallisation der unverzweigten PLA-Ketten verursacht worden sein. Diese lagern sich parallel zueinander an und nehmen daher weniger Platz ein. Die Schichttrennung kann durch das unterschiedliche Quellungsverhalten der einzelnen Schichten verursacht worden sein. Aufgrund der starken Verformung der Implantate wurde die Messung unterlassen.

Die weiteren Quellungsversuche wurden ausschließlich in MM0 Medium durchgeführt und auf die Einschichtimplantate des 50:50 PLGA Copolymers begrenzt, die mit 10 t, 5 t, und 56 kg gepresst wurden. Der Quellungsverlauf nimmt mit der Zeit deutlich zu, die Implantate quellen nach 7 Tagen viel stärker als in den ersten Tagen. Ab dem Tag 14 quellen die 10 t Implantate am stärksten, gefolgt von 5 t und 56 kg.

Eine Erklärung dieses Quellungsverhaltens ist in der morphologischen Anordnung der Körner im Implantat zu finden. Während die Körner bei einem 10 t Implantat sehr dicht aneinander gepresst werden, weist das 56 kg Implantat kleine Zwischenräume auf. Das quellende Material drückt somit bei einer dichten Zusammensetzung sofort die Körner auseinander, wobei bei einer lockeren Struktur gleichzeitig auch die Zwischenräume aufgefüllt werden, was zur Folge hat, dass das Material brüchig und sehr schlecht zu bearbeiten ist. Trotzdem hat sich das poröse Implantat zu einer Art Masse entwickelt, die den Osteoblasten sehr gute Bedingungen zur Zellbesiedlung bietet. Die Ergebnisse

der Zellkulturversuche deuten darauf hin, dass sich diese Veränderungen sehr positiv auf die Zellproliferation auswirken.

Zum Abschluss dieser Arbeit wurde noch ein so genanntes PLA / PGA Stapelsystem entwickelt. Dabei handelt es sich um ein Modell, das auch größere Knochendefekte ersetzen könnte. Durch das stereolithographische Verfahren kann ein Knochendefekt erfasst und in ein Kunststoffmodell überführt werden. Analog dazu wurde erst ein Kunststoffmodell hergestellt, das als Vorlage für das PLA / PGA Stapelsystem genutzt wurde. Damit die Gefahr des Abkapselns des Implantats verhindert und eine bessere Zell-Kommunikation gewährleistet werden kann, bestand das Modell nicht aus einem massiven Implantat, sondern war aus kleinen Einheiten aufgebaut. Neben den einzelnen aus 50:50 PLGA Copolymer bestehenden Stapelschichten, wurden aus dem gleichen Copolymer auch kleine Abstandshalter hergestellt, die das Einwandern der Zellen verbessern sollten. Für den Aufbau und letztendlich auch für die Befestigung im Knochen wurde das Prinzip der Zugschraubenosteosynthese vorgeschlagen. Durch die interfragmentäre Kompression kann eine spaltfreie Verbindung zwischen Implantat und Knochen hergestellt werden. Das in dieser Arbeit entwickelte System war ein Prototyp, und war aufgrund seiner Instabilität für den Einsatz in der Zellkultur ungeeignet.

In der Literatur ist die Degradation von PLGA Copolymeren durch zahlreiche Autoren beschrieben worden. [Middelton et al. 2000; van der Elst et al.1999; Ashammakki et al. 1997; Ishaug et al.1997; Jain et al. 1998, Taylor et al. 1994]

Nach Middelton (2000) besteht keine lineare Beziehung zwischen der Copolymerzusammensetzung und ihrer mechanischen Stabilität bzw. Degradationsrate [Middelton et al. 2000]. Besonders das PLGA Copolymer 50:50 weist eine sehr schnelle Degradationsrate im Vergleich zu den Ausgangspolymeren auf. Auch Jain (1998) beschrieb, dass die 50:50 PLGA Copolymere schneller hydrolysieren als Copolymere mit einem anderen Copolymerverhältnis, wovon die Kristallinität und damit auch die mechanische Stabilität abhängig sind [Jain et al. 1998].

Van der Elst führte eine dreißigmonatige in vivo Untersuchung durch, in der PLA Polymere und 20:80 PLGA Copolymere eingesetzt wurden und sofort nach der Implantation belastet wurden [van der Elst et al. 1999]. Bereits nach einem Monat kam es bei den PLGA Copolymeren zum Verlust der ursprünglichen Stabilität, die zwar

keine Fraktur oder Deformation zur Folge hatte, aber für eine Implantation am Menschen inakzeptabel war. Die Ergebnisse dieser Studie haben eine unkontrollierte Degradation dargestellt, die Degradationsrate von 20:80 PLGA Copolymer lag deutlich höher als bei den hochkristallinen, hydrophoben PLA Implantaten. Die Hydrolyse der amorphen, hydrophilen PLA/PGA Implantate erfolgte hingegen deutlich schneller. Besonders die Entwicklung von Mikrorissen schien zur Penetration von Körperflüssigkeiten und Gewebebestandteilen zu führen, was die Degradationsrate ebenfalls beschleunigte. Häufig waren auch eine fibröse Abkapselung und zahlreiche entzündliche Reaktionen sichtbar. Diese Studie hatte die Nachteile einer unkontrollierten Degradation belegt, besonders die immunologischen Abwehrreaktionen, die mit steigender Degradationsrate einhergehen.

Um das Risiko einer Übersäuerung und damit verbundene negative Konsequenzen, wie Hemmung der Zell-Proliferation, Infektionsbefall und Änderung des Degradationsvorganges zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit Calciumcarbonat als Puffer in die Implantate eingebracht. Es neutralisiert saure Degradationsprodukte und begünstigt die Knochenformation durch die Calcium-Freigabe in die Umgebung [Farrar 2006]. Hutmacher (2000) gibt die Notwendigkeit des Einsatzes von Tricalciumphosphat (TCP), Hydroxylapatit (HA) und basischen Salzen an, um die Pufferung von sauren Abbauprodukten der Polymere zu gewährleisten und damit die unerwünschte Umgebung, die mit dem Abfall des pH-Wertes einhergeht, für die Zellenproliferation zu verhindern. Nach seiner Ansicht sollte sich das gesamte System aus Zellen und 3D Polymergerüst die ganze Zeit in einem neutralen Kulturmedium befinden, besonders in der Abbauphase [Hutmacher 2000]. Er unterscheidet zwischen der Reduktion des Molekulargewichts und der Reduktion der Polymermasse. Während das Molekulargewicht bereits am ersten Tag im wässrigen Medium bei PGA und PDLA und nach einigen Wochen auch bei PLLA abnimmt, erfolgt der Verlust an Polymermasse erst später. Zuerst wird die Polymerkette soweit reduziert, bis eine freie Diffusion von Abbauprodukten aus der Polymermatrix möglich ist [Hutmacher et al. 2000]. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits von Jain [Jain et al. 1998] bei einer dreiphasigen Degradation von PLGA Copolymeren in wässriger Umgebung beschrieben. In der ersten Phase erfolgte eine zufällige Kettentrennung, wobei das Molekulargewicht signifikant reduziert wurde. Dagegen nahm die Polymermasse kaum

ab und es wurden keine Monomere gelöst. In der zweiten Phase erfolgten ein weiterer Rückgang des Molekulargewichts sowie ein schneller Polymermassenverlust und die Bildung von Monomeren. In der dritten Phase kam es zur kompletten Polymer-Auflösung in Oligomere und letztendlich in Monomere [Jain et al. 1998]. Diese Beobachtungen wurden durch die Ergebnisse der Quellungsuntersuchungen dieser Arbeit bestätigt. Der Quellungsverlauf nimmt mit der Zeit deutlich zu. Die schnelle Degradationsrate wurde durch ein starkes Absinken des pH-Wertes bei den MM0-Versuchen nachgewiesen. Auch das Misslingen der Vorversuche im PBS-Medium kann dadurch erklärt werden. Denn durch die schnelle Degradation entstand beim unzureichenden Kompensieren eine starke Übersäuerung, was sich wiederum negativ auf das weitere Verhalten der Implantate auswirken kann. Das Trennen der Einzelschichten der Zweischichtimplantate kann auf das unterschiedliche Quellungsverhalten zurückzuführen sein. Die PLA/PGA Implantate quellen nach 7 Tagen stärker als in den ersten Tagen.

Ein weiterer Nachteil, die geringere Stabilität, konnte nicht kompensiert werden. Es handelt sich bei den in dieser Arbeit hergestellten Proben daher um Implantate, die zwar größere Defekte ausfüllen können, aber keiner großen Krafteinwirkung ausgesetzt werden dürfen. Im Vergleich dazu können die bereits in den klinischen Studien eingesetzten PLA/PGA-Implantate erwähnt werden, die meist aus reinen PLA, PGA Polymeren hergestellt und besonders in der Orthopädie, Zahnmedizin (Kieferchirurgie, Parodontologie) und Pharmazie in verschiedenen Formen erprobt werden [Midellton et al. 2000, Ashammakhi et al. 1997, van der Elst et al. 1999, Jain et al.1998, Jain 2000, Koskikare et al. 1998, Stancari et al. 2000]. Diese Art von PLA/PGA Implantaten zeigt ein hohes Maß an Stabilität, aber eine sehr langsame Degradationsrate, woraus eine lange Verweildauer des Materials im Körper resultiert. Ashammakhie et al. (1997) beschreibt gute klinische Ergebnisse von PGA Implantaten, die als SR-PGA (self-reinforced) Membranen oder Drähte angewendet werden Sie finden ihren Einsatz bei maxillofazialen Rekonstruktionen, bei Orbitabodenrevision, bei Fixation von Frakturen und Osteotomie [Ashammakhi et al.1997].

Die Degradation ist neben den Material-Eigenschaften der Polymere und Copolymere auch vom Abbaumilieu abhängig. Sowohl bei den Quellungsversuchen als auch im Zellkulturexperiment wurde MM0 Medium eingesetzt und alle 2 Tage gewechselt, um

das Absinken des pH-Wertes durch die Ansammlung der Abbauprodukte zu verhindern. Ob die *in vitro* Degradation mit der *in vivo* Degradation vergleichbar ist, kann und sollte in Tierversuchen untersucht werden.

Der bereits beschriebene Degradationsvorgang von PGA stellt eine hydrolytische und enzymatische Spaltung dar. In der Literatur gibt es unterschiedliche Meinungen, ob und in welchem Maß die enzymatische Spaltung hierbei eine Rolle spielt [Ashammakhi et al. 1997, Jain et al. 1998]. Möglicherweise könnte die enzymatische Spaltung *in vivo* von einer Spaltung *in vitro* abweichen. Während *in vitro* die Degradation durch die alleinige Hydrolyse in wässriger Umgebung stattfindet, nehmen Enzyme an der *in vivo* Degradation teil [Ashammakhi et al. 1997, Williams et al. 1979]. Hollinger vermutet eine Beteiligung von nicht spezifischen Esterasen und Carboxylpeptidasen bei der Entstehung von Monomeren der Glykolsäure, die ferner enzymatisch in Glyzin umgewandelt werden. Dieses kann zur Proteinsynthese benutzt werden oder als Pyruvat in den Zitratcyklus eintreten, wobei Energie, CO₂ und Wasser freigesetzt werden [Hollinger 1983; Hollinger et al. 1986].

Nach Ashammakhi et al. wird die Hydrolyse von PGA durch folgende Faktoren beeinflusst: Molekulargewicht, Verhältnis Oberfläche/Gewicht, Porosität, Monomerkonzentration, Konformation, Kristallinität und pH-Wert [Ashammakhi et al. 1997].

Auch die Porosität und die Porengröße werden häufig im Zusammenhang mit PLA/PGA Implantaten diskutiert [Attawia et al. 1995]. Attawia schrieb, dass die Adhäsion zwischen den Zellen und dem Polymer die Voraussetzung für eine erfolgreiche Proliferation sei, die wiederum durch das Vorhandensein von Poren verbessert werde. Seine Experimente mit porösen 50:50 PLGA-HA Gemischen (HA-Hydroxylapatit) zeigen eine minimale Adhäsion von 25 % bereits nach 2 h und eine Proliferation nach 24 h nach der Besiedlung mit Osteoblasten. Seiner Ansicht nach liegen die Vorteile der Poren in vier Prozessen:

- Durch die Poren kann eine erhöhte Migration stattfinden
- Die Oberfläche für ein zelluläres Attachment wird erhöht
- Poren stellen Transportwege für notwendige Nährstoffe dar

- Poren erhöhen die Oberfläche zum Degradationsmedium

Die Untersuchungen von Meyer et al. zeigen, dass ein Material mit einem guten zellulären Attachment nicht gleichzeitig die beste Zellproliferation ermöglicht [Meyer et al. 1993]. In dieser Studie wurde bei Knochenzement das beste Zellattachment erzielt, gefolgt von 70:30 TCP/PLA (Tri-Calcium-Phosphat-poly-L-lactid-composite) und PLA-Gemisch (95:5 poly-L-lactid-polycitric acid composite). Dagegen war die beste Proliferationsrate bei PLA-Gemisch erreicht worden [Meyer et al. 1993].

Ishaug-Riley et al. beschreibt, dass eine niedrigere Adhäsion nicht immer einen Nachteil für eine gute Proliferation bedeutet [Ishaug-Riley et al. 1999]. Das Attachment von Chondrozyten auf der PGA Oberfläche lag bereits nach 8 Stunden signifikant höher als bei PLA oder PCL (Polycaprolan). Nach 7 Tagen wies die Proliferation keine signifikanten Unterschiede auf [Ishaug-Riley et al. 1999].

Die Herstellung von porösen PLA/PGA Implantaten ist in der Literatur durch zahlreiche Methoden beschrieben worden, die mit Hilfe von zusätzlichen Stoffen ein 3D poröses System produzieren [Ashammakhi et al. 1997, Friedlander 1991, Attawia et al. 1995, Harris et al. 1998, Howdle et al. 2001, Hutmacher 2000, Ishaug et al. 1997, Whang et al. 1995, Whang et al. 1998, Yang et al. 2001, Zeltinger et al. 2001]. Häufig werden NaCl Kristalle als Grundlage für die Porenherstellung und Lösungsmittel wie Chloroform und PVA (Polyvinylalkohol) verwendet [Attawia et al. 1995, Ishaug et al. 1997, Zeltinger et al. 2001].

In 1997 beschrieb Ishaug et al. einen in vitro Versuch mit 75:25 PLAPGA Implantaten, die als 3D poröses System mittels NaCl Kristallen der Körnergröße 150–300 µm, 300–500 µm, 500–700 µm und Chloroform entstanden sind. Die Ergebnisse der Besiedlung mit Osteoblasten aus dem Knochenmark von Ratten zeigten keinen signifikanten Einfluss der Porengröße auf die Zellproliferation. Die Osteoblasten proliferierten auf den Implantaten der drei verschiedenen Porengrößen gleich gut. Eine niedrige Aussiedlungsdichte bewirkte anfänglich eine bessere Attachment- und Proliferationsrate, wurde aber mit der Zeit weniger signifikant. Nach 56 Tagen waren keine signifikanten Unterschiede messbar [Ishaug et al. 1997]. Nach Friedlander beträgt der kleinste Porendurchmesser, der für ein erfolgreiches Einwandern von Osteoblasten notwendig ist, 100 µm [Friedlander 1991].

Durch das Auflösen von NaCl-Kristallen mittels Chloroform entstehen aber geschlossene Poren, die wahrscheinlich keine direkte Zellkommunikation ermöglichen. Im Gegensatz dazu wurde in den Versuchen dieser Arbeit nicht nur ein poröses 3D System, sondern auch ein kommunizierendes, aus Hohlräumen bestehendes Modell entwickelt, bei dem die Zellkommunikation durchgängig gewährleistet ist. Um eine mögliche Wechselreaktion des Copolymers mit dem Lösungsmittel oder einen negativen Einfluss auf die Zellenproliferation zu vermeiden, wurde daher lediglich das Press- und Sinterverfahren angewendet.

Hutmacher (2000) vergleicht in seiner Arbeit verschiedene Produktionstechniken in Bezug auf die Porosität, Porengröße, den Einsatz von Lösungsmittel etc. [Hutmacher 2000].

Das Ermitteln der Porosität wird von Harris durch zwei Methoden beschrieben [Harris et al. 1998]. Die rechnerische Methode beschreibt das Verhältnis von Masse, Volumen und Dichte und ermöglicht das Ermitteln der gesamten Porosität, die sowohl offene als auch geschlossene Pore umfasst.

- Porosität (%) = $1 - [(Masse / Volumen) / Dichte \text{ Polymer}] * 100$

Die zweite Methode basiert auf der angewandten „mercury intrusion porosimetry“, mit der aber nur offene, kommunizierende Poren erfasst werden können [Harris et al. 1998]. Die geschlossenen Hohlräume und damit die gesamte Porosität kann nur rechnerisch ermittelt werden.

Auch in dieser Arbeit wurde die gesamte Porosität analog wie von Harrison durch die rechnerische Methode ermittelt. Da der Hersteller keine Angaben zur Dichte der PLGA Copolymere angegeben hat, musste die spezifische Dichte empirisch ermittelt werden (siehe Kapitel 2.2.3.3). Anders als in den beschriebenen Studien wurde nicht der Zusammenhang zwischen der Porosität und der Porengröße, sondern der Korngröße ermittelt, die letztendlich eine eher unbedeutende Rolle gespielt hatte. Bei den hergestellten PGA/PLA Implantaten handelte sich um poröse, kommunikationsfähige Systeme, die gute Proliferationsmöglichkeiten boten. Diese waren aber aufgrund der schnell zu unterliegenden Degradation instabil und daher nicht für jeden Einsatz geeignet.

5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben die hervorragenden Eigenschaften der PLGA Copolymere bestätigt und ein großes Potential für die Medizin gezeigt. Die porösen PLA/PGA Implantate degradieren zu Abbauprodukten, die vom menschlichen Körper weitgehend problemlos metabolisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode erprobt werden, die auch den Ersatz von größeren Knochendefekten ermöglichen könnte. Ein ideales Implantat würde auch einen Knochendefekt nach einer Tumorsektion vollständig rekonstruieren, um die Notwendigkeit von weiteren Operationen auszuschließen. Auch die Abstoßungsreaktionen könnte durch die gute Biokompatibilität und Biodegradation der PLGA Copolymere reduziert werden.

Bei diesem Versuch wurde ein nachgeahmtes stereolithographisches Modell in ein PLGA Implantat überführt. Dies wurde jedoch nicht als ein massiver Körper hergestellt, sondern aus Einzelschichten mit entsprechenden Abstandhaltern zusammengebaut. Auf diese Weise sollte ein besserer Medienaustausch gewährleistet werden, der einerseits für eine ausreichende Nährstoffzufuhr sorgt und andererseits auch das Neutralisieren von Abbauprodukten ermöglicht. Dadurch würde einer Übersäuerung und damit verbundenen ungünstigen Bedingungen für die Zellkultur vorgebeugt werden. Gleichzeitig würde eine noch schnellere Zellproliferation erreicht und das Abkapseln vom ganzen Implantat vermieden werden.

Das gleiche Ziel hatte auch die zuerst geplante Vorbehandlung der Schichten mit bereits proliferierten Zellen, die sich aber nach den durchgeführten Quellungs- und Proliferationsversuchen wegen der geringen Stabilität als nicht sinnvoll erwiesen hat und deswegen nicht mehr weitergeführt wurde.

Demzufolge kann das 50:50 PLGA Implantat aufgrund seiner geringen Stabilität nur eine Füllfunktion übernehmen und besitzt bei einem alleinigen Einsatz nur eine eingeschränkte Anwendbarkeit. Ein Ersatz bei größeren Defekten würde noch die Funktion eines stabilen Gerüsts erfordern. Die Anwendung von reinen PLA, PGA Polymere würde zwar die Erhöhung der Stabilität ermöglichen, weist aber dagegen eine

Ausblick

zu langsame Degradation auf. Notwendig wäre ein Materialzusatz, der die primäre Degradationsrate solange verlangsamen würde, bis der eigene Knochen seine Funktion ausreichend übernehmen könnte. Optimal wäre eine abgestimmte Degradation des Implantats auf die Osteosynthese. Umgekehrt bestünde auch die Möglichkeit die Degradationsrate vom stabilen, langsam abbaubaren Implantaten zu erhöhen. Deswegen erscheinen noch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Knochenersatzmaterialien sind Thema zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen, die alle das gleiche Ziel anstreben, ein biokompatibles und möglichst stabiles Material herzustellen. Einige der Experimente, wie auch die in dieser Arbeit durchgeführten, versuchen, den Knochen nicht nur langfristig zu ersetzen, sondern ihn durch einen temporären Ersatz umzubauen. Sie streben den Verzicht des zweiten operativen Eingriffs an, der z.B. bei einer Metallverplattung erforderlich wäre.

Die PLA und PGA Polymere als Copolymere sind für ihre Biokompatibilität bekannt. Ihre Abbauprodukte können direkt und restlos im Körper abgebaut werden. Der große Nachteil dieser Stoffe liegt in ihrer geringen Stabilität und Festigkeit. Sie können sowohl als Monopolymere, als auch als Copolymere eingesetzt werden. Dadurch können ihre Eigenschaften modifiziert und je nach Anforderung verändert werden. Aber nicht nur das prozentuelle Verhältnis der Polymere zueinander, sondern auch das Herstellungsverfahren und das Abbaumilieu haben einen großen Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der PLGA Copolymere.

In dieser Arbeit wurde das PLGA Copolymer in Verhältnissen 50:50 und 75:25 untersucht. Bereits die fotografischen Darstellungen beider als Implantatgruppen verwendeten Copolymere zeigen strukturelle Unterschiede. Das faserige Gerüst des 75:25 Copolymers ist als Implantat lockerer und poröser. Dagegen zeichnen sich die aus dem 50:50 PLGA Copolymer hergestellten Implantate durch ihre granulare Struktur und vergleichbar geringere Porosität aus. Auch der Einsatz von Calciumcarbonat als pH Puffer verändert die Struktur der PLGA Copolymere. Dies scheint aber für die Proliferation der Zellkulturen nicht von Nachteil zu sein. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht nur die Porosität, sondern auch die Korngröße die Zellproliferation beeinflusst. Die durch einen Siebvorgang gewonnene Kornfraktion von 400–600µm der 50:50 PLGA Copolymere wies die dichteste Zellbesiedlung auf. Es wurde eine deutlich größere Proliferation beobachtet als bei der 600–1000µm Kornfraktion, die die gleiche Porosität aufwies. Dies kann dadurch erklärt werden, dass kleine Körner schneller von Zellen umschlossen und abgebaut werden, wenn genügend Freiraum d.h. eine ausreichende Porosität vorliegt. Dies kann auch das Ergebnis, das bei den Implantaten

Zusammenfassung

mit der geringsten Porosität beobachtet wurde, erklären. Die kleine Kornfraktion von 150–400 µm führte nicht nur zur Reduktion der Porosität, sondern verhinderte auch das Einwandern der Zellen und damit die Proliferation.

Die Quellungsversuche haben gezeigt, dass eine Vorbehandlung der Implantate mit bereits proliferierten Zellen aufgrund der sehr schnellen Degradation fast unmöglich ist. Das Absinken des pH-Wertes und damit die drohende Übersäuerung kann durch den Einsatz von Puffersubstanzen (Calciumcarbonat, TCP, HA) reguliert werden. Das Hauptproblem ist die sehr geringe Stabilität, die im Verlauf der Degradation noch zunimmt. Die Herstellungsmethoden, aber auch die Umgebungseigenschaften, haben einen großen Einfluss auf das Implantatverhalten. Eine schnelle Degradationsrate geht mit einer niedrigen Stabilität einher und umgekehrt weist ein stabiles, festes Implantat eine niedrige Degradationsrate auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Einsatz von PLA/PGA Implantaten noch weiterer Untersuchungen bedarf, in denen eventuell auch die Kombination mit weiteren Substanzen zur Erhöhung der Stabilität oder umgekehrt zur Veränderung der Degradationsrate in Betracht gezogen werden sollte.

7 Anhang

7.1 Errechnen der Angabe des Druckes auf einem Presswerkzeug

Druck: $p = F / A$

$$[p] = \text{Pa} = \text{Nm}^{-2}$$

Kraft: $F = mg$

$$[F] = \text{N} = \text{kgms}^{-2}$$

Fläche: $A = \pi r^2$

$$[A] = \text{m}^2$$

Es gilt:

1kg Last ergibt eine Kraft: $F = 1 \text{ kg} * 9,81 \text{ ms}^{-2} = 9,81 \text{ N}$

Bei einer Belastung des Stempels mit dem Durchmesser $d = 2r = 31,95 \text{ mm}$ mit 8kg (10 kg) ergibt sich folgende Kraft:

$$F = mg = 8 \text{ kg} * 9,81 \text{ ms}^{-2} = 78,48 \text{ kgms}^{-2} = 78,48 \text{ N} (98,1 \text{ N})$$

$$A = \pi r^2 = \pi * (0,3195 \text{ m} / 2)^2 = 0,081736 \text{ m}^2$$

$$\underline{P = F / A = 78,48 \text{ N} / 0,081736 \text{ m}^2 = 978,87 \text{ N m}^{-2} (1200,22 \text{ Nm}^{-2})}$$

8 Literaturverzeichnis

[1]	Ashammakhi N, Rokkanen P (1997) Absorbable Polyglycolide Devices in Trauma and Bone Surgery. <i>Biomaterials</i> 18: 3-9
[2]	Athanasίου KA., Schmitz JP; Agrawal CM (1998) The Effects of Porosity on in Vitro Degradation of Polylactic Acid-Polyglycolic Acid Implants Used in Repair of Articular Cartilage. <i>Tissue Engineering</i> 4(1): 53-63
[3]	Attawia MA, Herbert KM; Laurencin CT (1995) Osteoblast-like cell Adherence and Migration through 3-Dimensional Porous Polymer Matrices. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 213(2): 639-644
[4]	Elst van der M; Klein CPAT; Blicck-Hogervorst de JM; Patka P, Haarman HJThM (1999) Bone Tissue Response to Biodegradable Polymers Used for intra Medullary Fracture Fixation: A Long-Term in Vivo Study in Sheep Femora. <i>Biomaterials</i> 20: 121-128
[5]	Epple M (2003) <i>Biomaterialien und Biomineralisation</i> . B.G. Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, 1. Aufl.
[6]	Farrar D (2006) Healing the Rift. <i>Materials World</i> 14(8): 18-20
[7]	Friedlander G (1991) <i>Bone and Cartilage Allografts</i> . AAOS, Park Ridge, IL.
[8]	Harris LD; Kim B; Mooney DJ (1998) Open Pore Biodegradable Matrices Formed with Gas Foamig. <i>Journal of Biomedical Materials Research</i> 42: 396-402
[9]	Hollinger JO, Battistone GC (1986) Biodegradable Bone Repair Materials, Synthetic Polymers and Ceramics. <i>Clinical Orthopaedics and Related Research</i> 207: 290-305
[10]	Hollinger JO (1983) Preliminary Report on the Osteogenic Potential of a Biodegradable Copolymer of Polylactide (PLA) and Polyglycoide (PGA). <i>Journal of Biomedical Materials Research</i> 17(1): 71-82
[11]	Howdle SM, Watson MS; Whitaker MJ; Popov VK; Davies MC; Mandel FS, Wang JD; Shakesheff KM (2001) Supercritical Fluid Mixing: Preparation of Thermally Sensitive Polymer Composites Containing Bioactive Materials.

Literaturverzeichnis

	Chemical Communication 1: 109-110
[12]	Hutmacher, DW (2000) Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. Biomaterials 21: 2529-2543
[13]	Hutmacher DW; Goh JCH; Teoh SH (2001) An Introduction to Biodegradable Materials for Tissue Engineering Applications. Annals of the Academy Medizin, Singapore 30(2): 183-191
[14]	Ishaug SL, Crane GM; Miller MJ; Yasko AW; Yaszemski MJ; Mikos AG (1997) Bone Formation by Three-Dimensional Stromal Osteoblast Culture in Biodegradable Polymer Scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research 36: 17-28
[15]	Ishaug-Riley SL; Okun LE; Prado G; Applegate MA; Ratcliffe A (1999) Human Articular Chondrocyte Adhesion and Proliferation on Synthetic Biodegradable Polymer Films. Biomaterials 20: 2245-2256
[16]	Jain RA (2000) The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials 21: 2475-2490
[17]	Jain R; Shah NH; Malick AW; Rhodes CT (1998) Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly (Ester) Devices: Different Preparative Approaches. Drug Development and Industrial Pharmacy 24(8): 703-727
[18]	Jones SJ; Boyde A (1977) The Migration of Osteoblasts. Cell Tissue Research 184: 179-193
[19]	Koskikare K; Toivonen T; Rokkanen P (1989) Tissue Response to Bioabsorbable Self-Reinforced Polylevolactide and Polyglycolide Pins Implanted Intra-articularly and Directly into the Bone on Different Levels. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. 118: 149-155
[20]	Meyer U, Szulczewski DH; Möller K; Heide H; Jones DB (1993) Attachment Kinetics and Differentiation of Osteoblasts on Different Biomaterials. Cell and Materials.3(2): 129-140
[21]	Middelton JC; Tipton AJ (2000) Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices. Biomaterials 21: 2335-2346
[22]	Stancari F; Zanni B; Bernardi I; Calandrillo M (2000) Anwendung von kopolymerisierten Polylactid-Polyglycolidsäuren als Knochenersatzmaterial.

Literaturverzeichnis

	Klinische Erfahrung und histologische Ergebnisse. Die Quintessenz 51(1): 47-52
[23]	Schwenzer N; Ehrenfeld M (2002) Spezielle Chirurgie. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, Bd. 2, 3.Auflage.
[24]	Soldner E; Herr G (2001) Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien. Trauma und Berufskrankheiten 3: 256-269
[25]	Taylor MS; Daniels AU; Adriano KP; Heller J (1994) Six Bioabsorbable Polymers: In Vitro Acute Toxicity of Accumulated Degradation Products. Journal of Applied Biomaterials 5: 151-157
[26]	Whang K; Thomas CH; Healy KE (1995) A Novel Method to Fabricate Bioabsorbable Scaffolds. Polymer 36(4): 837-842
[27]	Whang K; Tsai DC; Nam EK; Aitken M; Sprague SM; Patel PK; Healy KE (1998) Ectopic Bone Formation via rhBMP-2 Delivery from Porous Bioabsorbable Polymer Scaffolds. Journal of Biomedical Material Research 42: 491-499
[28]	Williams DF, Brown SA (1979) Some Observations on the Role of Cellular Enzymes in the in-Vivo Degradation of Polymers. ASTM Special Technical Publications 684: 61-75
[29]	Yang XB; Roach HI; Clarke NMP ; Howdle SM; Quirk R; Shakesheff KM; Oreffo ROC (2001) Human Osteoprogenitor Growth and Differentiation on Synthetic Biodegradable Structures After Surface Modification. Bone 29(6): 523-531
[30]	Zeltinger J; Sherwood JK; Graham DA; Müller R; Griffith LG (2001) Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. Tissue Engineering 7(5): 557-572

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mir bei der Erstellung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben, ganz herzlich bedanken. Folgenden Personen möchte ich ausdrücklich meinen Dank aussprechen:

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. Ulrich Joos für die Ermöglichung in seinem Institut an dieser Arbeit forschen zu dürfen,

Herrn Priv. Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann für die Vermittlung dieser Arbeit und die Anregung zu diesem Thema, sowie für die fachliche Unterstützung,

Frau Elke Stoffels und Herrn Dr. Ulrich Plate für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der ganzen Zeit.

Frau Irene Grabiniok für die hilfsbereite technische Assistenz, insbesondere in der Zellkultur,

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima,

und besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden, die mir geholfen haben, meine Wünsche und Ziele zu realisieren und mich jederzeit unermüdlich unterstützt und motiviert haben.

10 Lebenslauf