

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

**GESINTERTES POLYLACTID-POLYGLYCOLID-COPOLYMER ALS
INDIVIDUELL DREIDIMENSIONAL KONFIGURIERBARES UND
BIORESORBIERBARES KNOCHENERSATZMATERIAL**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Christian Cuhlmann

aus Hamburg

2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. medic. Hans-Peter Wiesmann
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ludger Figgenger

Tag der mündlichen Prüfung: 9. November 2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Ulrich Joos
Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. medic. Hans-Peter Wiesmann
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ludger Figgener

Zusammenfassung

Gesintertes Polylactid-Polyglycolid-Copolymer als individuell dreidimensional
konfigurierbares und bioresorbierbares Knochenersatzmaterial

Cuhlmann, Christian

In der Arbeit wird eine neu entwickelte Methode vorgestellt, um ein resorbierbares Copolymer aus Polylactid und Polyglycolid durch thermische Vorbehandlung und anschließende Sinterung als dreidimensional angepasstes Knochenersatzmaterial nach radiologischer Defektanalyse herzustellen. Die Reduktion nicht maßstäblicher Kontraktionen bei der Sinterung von Polylactid-Polyglycolid-Copolymeren sowie die Anpassbarkeit der Porosität des Materials an für die Besiedlung mit Zellen optimale Werte waren Ziele der Arbeit.

Eine Überprüfung von 82 einfach und 93 doppelt gesinterten Probekörpern auf Porengröße, Porenverbindung und mechanische Stabilität durch mikroskopische Untersuchung, Durchflussversuch und Druckbelastung zeigte, dass diese Kriterien bei einer Partikelgröße der Probekörper zwischen 400 und 600 μm am besten erfüllt werden.

Weiterhin wurde das Doppelsintercopolymer im Zellversuch mit osteoblastenähnlichen Zellen besiedelt und auf seine osteokonduktive Eignung überprüft. Dabei konnte eine rasche Proliferation der angesiedelten Zellen bis in innere Hohlräume des Materials nachgewiesen werden. Während des Zellversuchs zeigte sich allerdings auch eine schlechtere mechanische Belastbarkeit der Proben nach UV-Bestrahlung und Wasserkontakt.

Das thermisch vorbehandelte gesinterte Copolymer ist grundsätzlich für einen Einsatz als Knochenersatzmaterial geeignet, sollte aber in Bezug auf die mechanischen Eigenschaften noch weiter verbessert werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 9. November 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Stand der Forschung	7
1.1.1. Allgemeine Vorbemerkungen.....	7
1.1.2. Anforderungen an Knochenersatzmaterial	10
1.1.3. Verschiedene Knochenersatzmaterialgruppen	11
1.1.4. Der Werkstoff PLA-PGA-Copolymer.....	15
1.1.5. Kompatibilität von PLA-PGA-Copolymer.....	19
1.1.6. Das Puffersystem aus Calciumcarbonat	21
1.1.7. Defektbezogene Adaptation des Ersatzmaterials	22
1.1.8. Dreidimensionale Modellherstellung auf Basis bildgebender Methoden.....	23
1.2. Ziel der Arbeit	25
2. Material der Arbeit	26
2.1. Material.....	26
2.1.1. Bestandteile des Copolymers und des Puffersystems.....	26
2.1.1.1. Sinterung des PLA-PGA-Copolymers.....	26
2.1.1.2. Das Puffersystem.....	26
2.1.2. Dreidimensionale Modelle und Formen	27
2.1.2.1. Das Stereolithographiemodell	27
2.1.2.2. Das Arbeitsmodell	28
2.1.2.3. Die individuelle defektbezogene Implantatform	29
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Herstellung der Implantate aus gesintertem Copolymer	29
2.2.1.1. Das Einfachsinterimplantat	29
2.2.1.2. Das Doppelsinterimplantat	30
2.2.1.3. Das Puffersystem aus Calciumcarbonat	32
2.2.1.4. Keimreduktion der Presslinge	33
2.2.2. Versuche zur Bestimmung der Materialeigenschaften.....	34
2.2.2.1. Überprüfung auf Dimensionstreuung	34
2.2.2.2. Kontrolle von Schwellung und pH-Abfall.....	36
2.2.2.3. Ermittlung der Porengröße in Abhängigkeit von der Partikelgröße.....	38
2.2.2.4. Bestimmung der Permeabilität der Porenverbindung.....	39

2.2.2.5. Überprüfung der Doppelsinterpresslinge auf mechanische Stabilität	41
2.2.3. Zellversuch	43
2.2.3.1. Die Osteoblastenkultur – Gewinnen und Kultivieren der Osteoblasten....	43
2.2.3.2. Markieren von osteoblastenähnlichen Zellen mit CM-Dil.....	44
2.2.3.3. Vorbereitung der Proben für die histologische Auswertung	46
2.2.4. Herstellung einer individuellen defektbezogenen Sinterform.....	48
2.2.5. Alternative Herstellung eines Implantates durch Aufschäumen	50
2.2.6. Mechanische Bearbeitung von Copolymerimplantaten.....	50
3. Ergebnisse.....	52
3.1. Dimensionstreuung der Presslinge	52
3.1.1. Dimensionstreuung der Presslinge aus einfach gesintertem Copolymer.....	53
3.1.2. Dimensionstreuung der aus Doppelsintercopolymer hergestellten Presslinge .	56
3.2. Schwellung und pH-Variation.....	60
3.3. Größe der Poren in Abhängigkeit von der Partikelgröße	62
3.4. Durchgängigkeit der Poren.....	68
3.5. Stabilität der Proben in Abhängigkeit von der verwendeten Partikelgröße	69
3.6. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Partikeloberfläche.....	78
3.7. Zellversuch	79
3.8. Ergebnis des Aufschäumversuchs	87
4. Diskussion	88
4.1. Knochenersatzmaterial aus Doppelsintercopolymer	88
4.1.1. Volumentreue durch Verwendung von Doppelsintercopolymer.....	88
4.1.2. Die ideale Partikelgröße	93
4.1.3. Sterilisierbarkeit des Copolymers.....	95
4.1.4. Das in vitro Modell.....	97
4.2. Ausblick.....	99
5. Zusammenfassung	102
6. Quellenangabe	104
6.1. Literatur	104
6.2. Abbildungen	109
7. Lebenslauf	110
8. Danksagung	111

1. Einleitung

1.1. Stand der Forschung

Um ein Material für den Einsatz als Knochenersatz anzupassen, ist es zwingend erforderlich, die Indikation für Knochenersatzmaterial, die Funktionsweise, generelle Anforderungen an das Material und körpereigene sowie etablierte intervenierende Lösungsansätze für das zugrunde liegende Problem des Knochenverlustes zu kennen.

1.1.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Im Rahmen der chirurgischen Therapie von Tumoren, bei größeren Unfällen und bei komplizierten Frakturen entstehen häufig mittlere bis große Knochendefekte. Diese führen zu funktionellen Beeinträchtigungen der betroffenen Region und können bei mit den Defekten einhergehenden Deformationen auch eine ästhetische Belastung darstellen.

In der Parodontologie wird als Folge einer bakteriell bedingten entzündlichen Reaktion die Entstehung von Knochendefekten um Zähne (Parodontitis) oder um dentale Implantate (Periimplantitis) beobachtet und behandelt. Der Knochenverlust als vielleicht schwerstes Symptom von Parodontitis und Periimplantitis erleichtert das Fortschreiten der Erkrankung durch Taschenbildung und führt unbehandelt letztendlich zur Lockerung und somit eventuell zum Verlust der Zähne oder der dentalen enossären Implantate. Nach der Beseitigung der bakteriellen Infektion als obligatem Cofaktor und nach dem Abklingen der Entzündung kann ein geeignetes Knochenersatzmaterial mit dem Ziel einer funktionellen und ästhetischen Rehabilitation eingesetzt werden.

Auch Unterbelastung und Inaktivität beispielsweise im zahnlosen Gebiss sowohl im Oberkiefer als auch im Unterkiefer können zum atrophischen Abbau des Knochens führen. Dieser Mangel an Knochen impliziert in ausgeprägten Fällen erschwerte Bedingungen für die eventuell gewünschte orale Rehabilitation durch die Insertion dentaler Implantate, da diese ein Mindestangebot an Knochen voraussetzen. Ein unzureichendes

Knochenangebot kann dabei die primäre Stabilität der Implantate maßgeblich negativ beeinflussen, die Einheilung der Implantate erheblich erschweren oder auch selbst funktionelle und ästhetische Beeinträchtigungen bedingen.

In der chirurgischen Defekttherapie, bei parodontalchirurgischen Eingriffen und in der präprothetischen zahnärztlichen Implantologie ist es also oft indiziert, verlorene Knochensubstanz zu ersetzen oder wieder aufzubauen. Zwar können kleine Knochendefekte vom Körper selbst repariert werden, große Verluste müssen aber intervenierend behandelt werden, das heißt, der verlorene Knochen muss ersetzt werden (Annaz et al. 2004).

Gerade aber die Selbstheilungsfähigkeit des Körpers steht dem eigenständigen Wiederauffüllen eines größeren Knochendefektes im Weg. Da die Fibroblasten in dem den Knochen umgebenden Bindegewebe eine schnellere Proliferationsrate besitzen als die für den Knochenaufbau verantwortlichen Osteoblasten, wird der Knochendefekt mit neu gebildetem Bindegewebe gefüllt. Ein Einwachsen der Osteoblasten ist nun nicht mehr möglich, die Reparatur des Knochens unterbleibt (Cortellini et al. 1993).

Standard bei entsprechenden Indikationen in der Parodontologie oder bei präimplantologischen Eingriffen (beispielsweise nach Extraktion eines nicht erhaltbaren Zahnes, der durch ein dentales Implantat ersetzt werden soll) ist aus diesem Grund das Abdecken intraalveolärer Knochendefekte mit einer resorbierbaren oder auch nicht resorbierbaren Membran bei der „Guided Tissue Regeneration“ (kurz GTR) oder „Guided Bone Regeneration“ (GBR) (Wallkamm et al. 2003). Da die Membran das Bindegewebe und anderes unerwünschtes Gewebe, beispielsweise Epithel, daran hindert, in den Knochendefekt einzuwachsen, wird dieser wieder fast vollständig mit Knochengewebe aufgefüllt.

Diese Methoden sind allerdings nicht uneingeschränkt auf alle Arten von Knochendefekten anwendbar. So darf der zu behandelnde Knochendefekt nicht sehr ausgedehnt sein und muss an allen Seiten vollständig von Knochenwänden eingefasst sein. Erst ab einer Tiefe von mehr als 6 mm wird der Erfolg der GTR im Vergleich zu konservativer, auf die Reduktion des parodontalen Biofilms abzielender Therapie als relevant angegeben (Flemmig 1999).

Die Geschwindigkeit und der Grad der Knochenapposition sind dabei durch die Abhängigkeit von weiteren Faktoren wie dem Nikotinkonsum, der Besiedlung mit oralpathogenen Keimen (Ehmke et al. 2003) und der individuelle Prädisposition schwer allgemeingültig zu bestimmen.

Gegen eine Verwendung dieses Verfahrens bei nicht parodontalen oder nicht durch einzelne Zahnextraktionen entstandenen und somit ausgedehnten Knochendefekten spricht die mangelnde mechanische Stabilität sowohl der Membran als auch des Knochens. Die Membran muss dem Verwendungszweck entsprechend relativ weich und flexibel sein, um an den Einsatzort angepasst werden zu können. Bei einem ausgedehnten Knochendefekt kann die weiche Membran dann aber vom anliegenden Weichgewebe in den Defekt impaktiert werden.

Die Membran muss aus diesem Grund mit einem Stützmaterial versehen werden, welches gleichzeitig ein Einwachsen von Knochen in den Defekt erlaubt oder sogar das Einwachsen aktiv fördert. Dieses Ziel kann einerseits durch ein mit Schrauben fixiertes Titannetz oder andererseits durch die Unterfütterung der Membran mit Knochen oder Knochenersatzmaterial erreicht werden (Wallkamm et al. 2003).

Im Körper erfüllen Knochen eine Stützfunktion. Sie sind großen mechanischen Belastungen, vor allem Druck und Zug ausgesetzt. Um bestmöglich an die auftretenden Belastungen angepasst zu sein, wird die Struktur der Knochen fortlaufend durch An- und Abbau optimiert. Ein großer Defekt kann die mechanische Belastbarkeit des Knochens aber stark herabsetzen, sogar so weit, dass der geschädigte Knochen bei Überlastung frakturieren kann.

Daher ist es wünschenswert, bis zur ausreichenden Ausheilung des Defektes eine Stützfunktion gegen Druckbelastung, der häufigsten Belastung, durch das Knochenersatzmaterial zu erreichen.

Für die Behandlung von Knochendefekten wird also ein Ersatzmaterial benötigt, das anstelle des Knochengewebes den Defekt ausfüllt und dabei eine Vielzahl von notwendigen Eigenschaften besitzen muss.

1.1.2. Anforderungen an Knochenersatzmaterial

Knochenersatzmaterial muss eine Vielzahl von Anforderungen erfüllen:

- Es darf keine Abwehrreaktion des Empfängers hervorrufen.
- Der Knochenersatz sollte eine Platzhalterfunktion gegen Bindegewebe einnehmen.
- Ein fortlaufender und vollständiger Ersatz des Materials durch neu gebildeten Knochen ist wünschenswert, daher sollte es resorbierbar sein.
- Das Ersatzmaterial sollte mechanisch stabil sein, um zumindest teilweise eine Stützfunktion für den umgebenden Knochen zu erfüllen.
- Das Material sollte den Knochendefekt möglichst genau ausfüllen. Hieraus ergibt sich bei Festkörpern die Notwendigkeit für gute Dimensionstreu und Passgenauigkeit.
- Um das Einwachsen von Knochen zu fördern, sollte das Ersatzmaterial ausreichend große und viele verbundene Poren aufweisen, in die Osteoblasten einwachsen können.
- Poröses Material sollte durch gute Affinität des Knochengewebes zum Knochenersatz einen Leitschieneneneffekt (Osteokonduktivität) besitzen und so das Einwachsen fördern.
- Optimal wäre ein beschleunigender kontrollierbarer Effekt des Materials auf die Knochenbildung über das natürliche Maß hinaus, die Osteoinduktivität (Epple 2003).
- Resorbierbares Knochenersatzmaterial sollte eine auf die Regeneration des Knochens einstellbare Abbaugeschwindigkeit besitzen.
- Das Knochenersatzmaterial muss sterilisierbar sein.

1.1.3. Verschiedene Knochenersatzmaterialgruppen

Grundsätzlich kann Knochenersatz in **autogenes**, **allogenes**, **xenogenes** und **alloplastisches** Material unterteilt werden, wobei sich jede Gruppe durch spezifische Eigenschaften auszeichnet:

- **Autogener** Knochenersatz ist Knochen, der dem Empfänger selbst häufig aus der Crista illiaca oder auch in der Nähe des Defektes entnommen wird. Genau genommen handelt es sich bei dieser Methode um eine autogene Transplantation, also die Verpflanzung von lebendem Eigengewebe. Die Verwendung von autogenem Knochen gilt als goldener Standard (Epple 2003, Sandor 2003). Die Verwendung von autogenen Transplantaten bietet entscheidende Vorteile: Das Ersatzmaterial besteht aus demselben Gewebetyp, der Empfänger kann nicht vom fremden Spender infiziert werden und es finden sich keine Antigene, die eine Abstoßung des Ersatzmaterials befürchten lassen. Aus diesen Gründen kann ein autogenes Transplantat auch vital erhalten bleiben und braucht nicht deproteiniert oder anderweitig vorbehandelt zu werden. Meistens erfolgen Entnahme und Transplantation des Gewebes in engem zeitlichen Rahmen (Schwenzer et Ehrenfeld 2000). Dieses Vorgehen resultiert allerdings auch aus dem Nachteil der eingeschränkten Lagerfähigkeit des autogenen Knochenersatzes, sofern die positiven Eigenschaften im vollen Umfang erhalten bleiben sollen. Bei größeren oder häufigeren Operationen kann der Bedarf an Ersatzmaterial schnell die Angebotsmöglichkeiten übertreffen. Auch steht die Belastung des Patienten durch zusätzliche Eingriffe zur Transplantatsentnahme mit einem generell vorhandenen Erkrankungsrisiko gerade auch an der Entnahmestelle und den nach der Operation folgenden Schmerzen sowie den sich daraus ergebenden Funktionseinschränkungen den Vorteilen gegenüber.
- **Allogener** Knochenersatz ist Knochen von humanen Spendern. Spender und Empfänger sind dabei nicht identisch. Die biologischen und mechanischen Eigenschaften sind ebenfalls sehr gut. Da das Material aber einem fremden Organismus entnommen wird und daher ein hohes Risiko für Immunreaktionen und Infektionen besteht, ist eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen indiziert. Um einer Abstoßungsreaktion entgegenzuwirken, muss wie bei anderen Organen auch eine sehr gewissenhafte Spenderselektion erfolgen und auf die Kompatibilität geachtet werden.

Zu diesem Zweck wurden in einigen Krankenhäusern Knochenbanken angelegt. Hier wird die Sicherheit des Transplantats durch Testung auf Krankheiten (Infektionen, aber auch Tumorerkrankungen), Weiterverarbeitung und Quarantänelagerung sichergestellt. Durch eine größere Sensibilität in Bezug auf das Infektionsrisiko (u. a. mit HIV, HCV und Prionen) werden immer höhere Anforderungen an die Sicherheitsmaßnahmen, vor allem durch Deproteinierung und Gefriertrocknung, bei allogenen Knochen transplantationen gestellt (Epple 2003, Stancari et al. 2000), auch wenn die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Empfängers bei deproteinieren und gefriergetrockneten allogenen Knochen mit 1:8 Millionen angegeben wird (Flemmig 1999). Das immer noch sorgfältig aufzuklärende Risiko und entsprechende Alternativen führen zu einem Zweifel an der Indikation für dieses Material (Flemmig 1999).

- **Xenogenes** Knochenersatzmaterial ist Knochenhartsubstanz von speziell gezüchteten Nutztieren wie Rindern. Durch die Verwendung dieser Tiere als Fleischquelle ist xenogener Knochenersatz in fast unendlichem Umfang verfügbar. Das Risiko von Infektionen und Abstoßungsreaktionen ist dabei aber noch einmal wesentlich höher als bei allogenen Knochen transplantationen. Weit verbreitet ist daher vor allem die Anwendung von xenogenem Knochenersatz, der durch Deproteinierung nicht immunogen und nicht infektiös ist. Auch bei diesem Material sind als Folge von Prionenerkrankungen und der Reaktion der Öffentlichkeit die Sicherheitsvorkehrungen erheblich verschärft worden. Prionen (Abkürzung von „proteinaceous infectious particles“) sind infektiöse Eiweißpartikel mit einem Molekulargewicht von 28.000 u, die bei Scrapie (Traberkrankheit bei Schafen), boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE bei Rindern) und der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (beim Menschen) nachgewiesen werden können (Pschyrembel 1998). Besondere Beachtung fanden Prionen ab 1996, als nach dem Auftreten einer neuen Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJD) mit abweichendem Verlauf in Schottland das Übertreten von Artgrenzen als wahrscheinlich angesehen wurde (Haller 2005). Es wurde der Verzehr von Rindfleischprodukten als Übertragungsweg postuliert (Löffler et Petrides 1998). Als ein großes Problem gilt die sehr hohe Resistenz der Prionen gegenüber Proteasen, Nukleasen, chemischen Agenzien und Temperatur, sowie UV- und Röntgenstrahlung. Daher wird eine lückenlose Dokumentation von Transplantation von der Gewinnung bis zur Implantation und darüber hinaus gefordert.

Hauptgründe für eine schlechtere Akzeptanz sind aber weiterhin das generelle Risiko von Komplikationen sowie Vorbehalte gegen tierische Implantate seitens der Patienten.

- **Alloplastischer** Knochenersatz ist synthetisches Material, dessen Grundkomponenten sehr vielfältig sein können. Wichtige Vertreter der Materialgruppe sind Keramiken, Metalle, Polymere und Komposite aus den genannten Gruppen. Vorteile dieser Materialien sind eine gute Verträglichkeit, also ein geringes Risiko von Infektionen und Abstoßungsreaktionen sowie eine gute Verfügbarkeit. Zwar sind auch bei alloplastischen Knochenersatzmaterialien Probleme möglich und bekannt, sie können aufgrund des weiten Spektrums der Weiterentwicklungsmöglichkeiten dieser Materialgruppe aber häufig abgestellt werden. Außerdem sind alloplastische Materialien in ausreichendem Maß herstellbar und gut zu lagern.

Innerhalb der Gruppe des alloplastischen Knochenersatzes bestehen gravierende Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien bezüglich wichtiger Eigenschaften wie mechanischer Stabilität, Biokompatibilität bei Gewebekontakt, Biodegradierbarkeit, Porosität und möglicher Formgebung im Defekt (Epple 2003).

Knochenersatz aus Metall ist weitgehend etabliert, beispielsweise Titan als Material für Endoprothesen des Hüftgelenks, für Dentalimplantate oder für Befestigungsplatten. Metallbasierter Knochenersatz zeichnet sich durch sehr gute mechanische Stabilität und gute Gewebeverträglichkeit aus (Titan ist sehr unedel, es entsteht sehr schnell eine bioinerte Oxidschicht an der Oberfläche). Aufgeschäumt oder gesintert kann Metall auch porös sein. Nachteilig fällt nur die nicht mögliche Biodegradierbarkeit auf: Ein metallischer Knochenersatz wird nie durch nachwachsenden Knochen ersetzt, Befestigungselemente aus Metall wie Osteosyntheseschrauben und -platten werden deswegen oft nach einer Regenerationszeit von ca. 6 Monaten in einer zusätzlichen Operation entfernt.

Keramiken aus Calciumphosphat oder Calciumcarbonat und Biogläser werden mit zunehmender Häufigkeit als Knochenersatz eingesetzt. Für Knochenersatz aus Keramiken und Biogläser spricht die gute mechanische Stabilität, auch wenn Keramiken sehr spröde und empfindlich sind, sowie ihre gute Biokompatibilität.

Ebenso ist es möglich, die Materialien porös zu gestalten. In Bezug auf die Biodegradierbarkeit gibt es große Unterschiede nicht nur zwischen den einzelnen Stoffen, sondern sogar bei gleicher chemischer Zusammensetzung. Beispielsweise können Keramiken mit gleichen Bestandteilen aufgrund unterschiedlicher Kristallinität verschieden schnell abgebaut werden. Abhängig von ihrer Zusammensetzung sind Biogläser im Allgemeinen nur langsam oder gar nicht abbaubar, wobei ein höherer Anteil an Siliziumdioxid mit schlechterer Abbaubarkeit einhergeht (Epple 2003).

Calciumphosphat und Calciumsulfat können in Form von Zementen individuell an Knochendefekte angepasst werden, da sie pastenförmig in den Defekt eingebracht werden und dort aushärten. Bei akzeptabler Stabilität, guter bis sehr guter Gewebeverträglichkeit und vorhandener Biodegradierbarkeit ist durch die Möglichkeit der Formgebung im Defekt (Einbringen als Paste und Aushärten im Defekt) eine reproduzierbare Porosität nur schwer erreichbar, das Vorkommen verbundener Poren ist vermutlich äußerst gering.

Ein weiteres vollsynthetisches Material als Knochenersatz ist Polymethylmethacrylat, beispielsweise als PMMA-Knochenzement. Oft wird es als ein Zweikomponentensystem eingesetzt, dessen Endprodukt mit Plexiglas oder zahnärztlichem Prothesenkunststoff vergleichbar ist. Als Zement wird es pastenförmig in den Defekt eingebracht und härtet dort aus. Im ausgehärteten Zustand ist die mechanische Stabilität gut, durch einen geringen Restmonomergehalt (PMMA-Monomer gilt als gesundheitsschädlich) ist PMMA biokompatibel. Eine Porosität oder Bioreabsorbierbarkeit besteht nicht.

Zemente auf Calciumsulfat-Basis, die in einer Gips-Reaktion aushärten, und PMMA-Knochenzement entwickeln während des Aushärtens verhältnismäßig hohe Temperaturen.

Polyester wie Polylactid und Polyglycolid stellen eine weitere viel versprechende Möglichkeit für Knochenersatz dar. Bei akzeptabler Stabilität und Biokompatibilität ist die Biodegradierbarkeit über einen großen Bereich einstellbar, ebenso kann das Material porös hergestellt werden. Wie bei allen Festkörpern kann die Form nur indirekt an den Defekt angepasst werden.

1.1.4. Der Werkstoff PLA-PGA-Copolymer

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit PLA-PGA-Copolymer, einer chemischen Mischung aus den Grundbausteinen Polylactid (**P**oly**L**actic **A**cid, kurz PLA) und Polyglycolid (**P**oly**G**lycolic **A**cid, kurz PGA).

Die Monomere Milchsäure und Glycolsäure werden durch direkte Polykondensation, meist aber durch Ringöffnungspolymerisation der Diester hergestellt (Kricheldorf 2001).

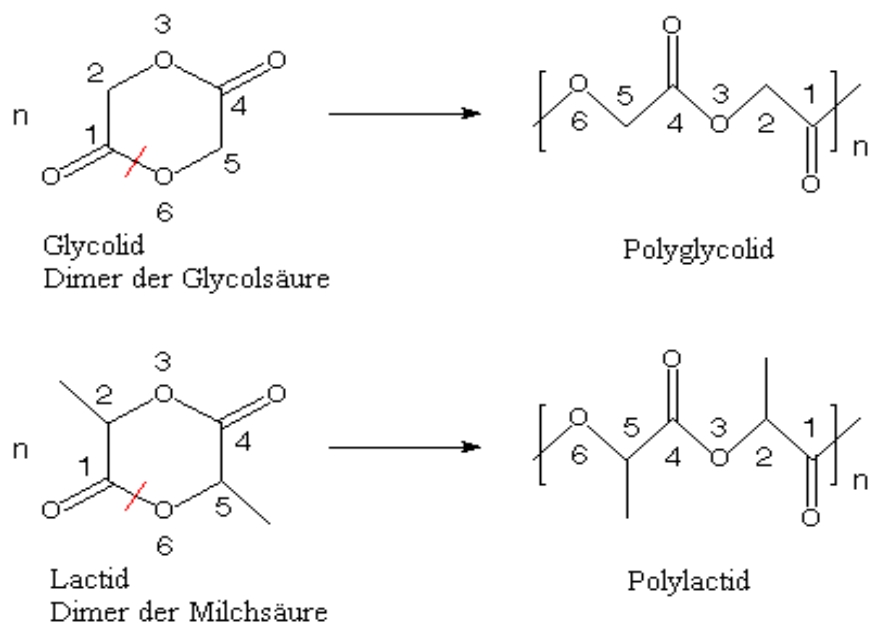


Abb. 1.1.
Schematische Darstellung der Gewinnung von Polyglycolid und Polylactid durch Ringöffnung aus den Dimeren Glycolid und Lactid (nach Gleason 1998)

Polyglycolid ist ein kristallines Material. Es wird im Körper hydrolytisch gespalten, das Monomer Glycolsäure wird enzymatisch abgebaut und ausgeschieden. PGA ist relativ schnell abbaubar, die durchschnittliche in vivo Abbaupzeit wird in Wochen bis Monaten angegeben (Epple 2003).

Auch Polylactid wird nach der hydrolytischen Spaltung in Milchsäure enzymatisch weiter abgebaut und nach der Oxidation in Pyruvat in den Citratzyklus integriert und so letztendlich vollständig verstoffwechselt.

Die Kohlenstoffanteile der beiden Polymere Polylactid und Polyglycolid werden fast vollständig als Kohlendioxid an die Atemluft abgegeben. Ein anderer Weg der Elimination, zum Beispiel über die Nieren, oder eine Einlagerung in den Empfängerkörper, konnte von Miller et al. (1977) nicht nachgewiesen werden.

Das Monomer des PLA, Milchsäure, kommt als L- und D-Milchsäure vor. Obwohl beide Isomere annähernd identische physikalische Eigenschaften besitzen, weichen die Eigenschaften der Polymere aus ihnen erheblich voneinander ab.

Besteht PLA sowohl aus L- als auch aus D-Milchsäure (kurz PDLLA), ist es amorph, weich, hydrolysierbar und gut abbaubar (siehe Abb. 1.2.1.). PDLLA hat eine Abbauezeit von wenigen Monaten.

Besteht PLA ausschließlich aus L-Milchsäure, ist es hochkristallin, sehr hart, relativ hydrolysestabil und daher schwer abbaubar (siehe Abb. 1.2.2.). Dieses PLLA hat eine Abbauezeit von mehreren Monaten bis Jahren.



Abb. 1.2.1.
PLA-PGA-Copolymer mit einem PLA-Anteil aus L- und D-Milchsäure (Poly(DL-lactid-co-glycolid))



Abb. 1.2.2.
PLA-PGA-Copolymer mit einem PLA-Anteil ausschließlich aus L-Milchsäure (Poly(L-lactid-co-glycolid))

Üblicherweise wird das Mischungsverhältnis der Polymere, aus denen das Copolymer zusammengesetzt ist, in mol% angegeben, z. B. 50:50 für das in der Arbeit verwendete Resomer[®] (Boehringer, Ingelheim) aus 50 % Poly(DL)lactid und 50 % Polyglycolid.

Aufbau der Polymere:

Es können vier Möglichkeiten der Verknüpfung der beiden Bestandteile PLA und PGA unterschieden werden (Epple 2003):

- Alternierendes Copolymer aus PLA (abgekürzt mit **L**) und PGA (**G**):

Die verschiedenen Monomere werden abwechselnd aneinander gereiht:

GLGLGLGLG

- Pfropf-Copolymer:

An eine Kette aus nur einem Monomer (Homopolymer) können unterschiedlich lange Ketten aus dem anderen Homopolymer angepfropft sein, ähnlich wie bei einer Flaschenbürste:

```
  G G
  G G G
LLLLLLLLLLLL
  G G   G
  G     G
```

- Block-Copolymer:

Die Monomere werden in Blöcken, die nicht zwangsläufig dieselbe Länge besitzen, aneinander gereiht:

LLGGLLLLGGLLLL

- Statistisches Copolymer:

Die Monomere sind ohne Ordnung aneinander gereiht:

GLLGGGLGLLL

Abbau der Polymere:

Die bioresorbierbaren Polyester Polylactid und Polyglycolid sowie ihre Copolymere werden nach dem Prinzip der „bulk degradation“ abgebaut. Die kettenartig aufgebauten Moleküle werden durch Hydrolyse gespalten, es entstehen kleinere Ketten. Das bedeutet, dass sich während des Abbaus vor allem das Molekulargewicht und nur geringfügig die Masse des Polymers ändert, bis die Molekülketten sehr klein sind und aus der Polymermatrix heraus diffundieren können (Agrawal et al. 1997).

Die Geschwindigkeit des Abbaus ist stark abhängig vom Molekulargewicht. Ein Copolymer aus PLA und PGA (Verhältnis 75:25) hat mit einem Molekulargewicht von 10.000 u eine doppelt so schnelle Abbaugeschwindigkeit wie ein Copolymer mit einem Molekulargewicht von 20.000 u (Anderson et al. 1997). Erst nach einer starken Verringerung des Molekulargewichtes durch Spaltung der Ketten brechen die einzelnen Partikel auseinander.

In vivo können die Partikelreste ab einer Größe von 5 bis 10 µm von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen phagozytiert werden. In den phagolysosomalen Vakuolen dieser Zellen, in denen ein pH-Wert von ca. 3 vorliegt, verstärkt sich die Abbaurate der Copolymerreste (Anderson et al. 1997).

Ein weiterer Faktor, der die Abbaugeschwindigkeit maßgeblich bestimmt, ist der pH-Wert der Umgebung. Eine saure Umgebung führt analog zum intrazellulär beschleunigten Abbau auch in vitro oder extrazellulär zu einem schnelleren Zerfall des Materials.

In Vorversuchen innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Münster stellte sich PDLLA aufgrund der schnelleren Abbaurate im Verhältnis von 50:50 als vorteilhaft für den Einsatz als Knochenersatz heraus.

Allgemein zeichnet sich Poly(DL-lactid-co-glycolid) durch gute mechanische Eigenschaften, gute Biokompatibilität, Resorbierbarkeit und Hydrophilie aus (Epple 2003). Dennoch gibt es auch einige Nachteile, vor allem die lokale Übersäuerung durch die Abbauprodukte Milchsäure und Glycolsäure, die als Monomere bei der Spaltung der Polymere PLA und PGA entstehen, und das Quellungsverhalten, das in Punkt 3.2. noch näher behandelt wird. Das Material quillt als Festkörper durch seine Hydrophilie bei Kontakt mit Wasser oder Körperflüssigkeiten auf und wird weicher.

Zurzeit wird PLA-PGA-Copolymer mit sehr unterschiedlichen Verarbeitungsmethoden für die Verwendung als Knochenersatzmaterial angepasst, etwa als Gel, Schwamm, gewobenes Netz, Mikrosphäre, usw. Diese Endformen des Copolymers scheinen jeweils für einen bestimmten Verwendungszweck gut geeignet. So wird etwa das Gel als Füllmaterial tiefer parodontaler Defekte oder das Netz als bioresorbierbare Membran bei der „Guided Tissue Regeneration“ verwendet (Stancari et al.2000).

Neben dem Einsatz als Knochenersatzmaterial ist Polylactid-Polyglycolid-Copolymer als Nahtmaterial weit verbreitet. Für diesen Zweck wurde es ursprünglich entwickelt. Es eignet sich allerdings auch als kontinuierliches Abgabesystem für Medikamente im Körper (Anderson et al. 1997), beispielsweise für Langzeitkontrazeptiva oder in der Chemotherapie von Tumoren, sowie als Träger für Antibiotika (Büchter et al. 2004) zur lokalen Infektionskontrolle. Aktuellere Arbeiten behandeln vor allem die Verwendung und Verbesserung des Materials als Medikamententräger.

1.1.5. Kompatibilität von PLA-PGA-Copolymer

Die Reaktion des Organismus auf die Implantation von Polylactid-Polyglycolid-Copolymer wurde bereits in vielen Studien erforscht. Es bestehen Unstimmigkeiten in Bezug auf die Gewebereaktionen nach PLA-PGA-Copolymer-Implantation: Anderson et al. (1997) berichteten über fibrotische Einkapselung des implantierten Materials,

während Merolli et al. (2001) zwar einen geringen Gewebespalt um ihre Implantate beschrieben, diesen allerdings nicht als Fibrose deuteten. Es kann also möglicherweise einen Unterschied bedeuten, ob Mikrosphären oder größere Zylinder aus solidem Material die Grundlage der Studie darstellen.

Nach Anderson et al. (1997) lässt sich die Gewebereaktion auf die Implantation von PLA-PGA-Copolymer in drei aufeinander folgende Phasen einteilen.

- In der **ersten Phase**, die sich über etwa zwei Wochen erstreckt, sind nach der Verletzung des umliegenden Gewebes am Ort der Implantation Zeichen einer akuten entzündlichen Reaktion in Form von Leukozyten nachweisbar. Die akute Entzündung geht langsam in eine chronische Entzündung über, die sich durch die Anwesenheit von Monozyten und Lymphozyten auszeichnet.
- In der **zweiten Phase**, deren Länge durch die Abbaugeschwindigkeit des implantierten Polymers bestimmt wird, wird Granulationsgewebe gebildet, histologisch sind Fibroblasten und neu gebildete Blutgefäße nachweisbar. Außerdem kommt es zu einer Fremdkörperreaktion, während der sich Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen an der Grenze zwischen Körpergewebe und implantiertem Material befinden.
- Die **dritte Phase** tritt ein, wenn das implantierte Material sehr weit degradiert ist und stark gespaltene Polymerreste mit einem geringen Molekulargewicht auftreten. Sobald diese einen Durchmesser von weniger als 10 µm haben, werden sie von den Makrophagen und mehrkernigen Fremdkörperriesenzellen aufgenommen und beschleunigt resorbiert, wobei der niedrige pH-Wert innerhalb dieser spezialisierten Zellen den Abbau unterstützt. Mehrkernige Fremdkörperriesenzellen gehen bei andauernder Stimulation aus Makrophagen mit einem Entwicklungsschritt über epitheliale Zellen hervor und können 100 oder mehr Zellkerne besitzen (Schiebler 1996).

1.1.6. Das Puffersystem aus Calciumcarbonat

Eine entscheidende, die Eignung als Knochenersatz beeinflussende Eigenschaft von PLA-PGA ist der Abbau des Copolymers in Milchsäure und Glycolsäure. Die Abbauprodukte können metabolisiert und ausgeschieden werden, meistens findet aber an den Stellen, an denen ein Knochenersatzimplantat benötigt wird, kein ausreichender Flüssigkeitsaustausch statt, um einen Abtransport der Säuren zu gewährleisten.

Als Folge kommt es daher in der Nähe eines PLA-PGA-Implantates im Abbau zu einer lokalen Übersäuerung (Agrawal et Athanasiou 1996).

Bei massivem PLA-PGA-Copolymer ohne Puffersystem im in vivo Einsatz, etwa als Osteosyntheseschrauben und Plattenmaterial, treten in 7,9 % aller Fälle aseptische Sinusbildungen und Entzündungen auf (Böstman 1991). Dies kann zum Misserfolg der Implantation durch fehlende Integration oder durch Abstoßung des eingesetzten Materials führen.

Ohne einen Puffer führen die Säuren in vitro zu einem Abfall des pH-Wertes bis auf 3,0, also bis in einen Bereich, der für Osteoblasten schädlich ist und bei dem auch eine Demineralisierung des umgebenden Knochens denkbar ist. In vivo wird dieser Effekt zwar durch körpereigene Puffersysteme verringert, sofern ein Abtransport der Säuren und ihre Elimination möglich ist, die Ergebnisse von Böstman (häufige aseptische Sinusbildungen und Entzündungen neben ungepuffertem Osteosynthesematerial aus Polylactid-Polyglycolid-Copolymer) legen aber dennoch die Verwendung eines effektiven Puffersystems nahe.

Nach Agrawal et Athanasiou (1997) besitzt Calciumcarbonat gute Puffereigenschaften. Calciumcarbonat zeichnet sich durch häufiges Vorkommen unter anderem als Marmor oder in Schalentieren und Korallen aus (Epple 2003) und ist somit ausreichend vorhanden.

Der Einsatz eines Puffersystems ist weiterhin hilfreich, um die von vielen Faktoren wie der pH-abhängigen Autokatalyse bestimmte Degradationsgeschwindigkeit des eingesetzten Copolymers in engeren Grenzen einstellen zu können.

1.1.7. Defektbezogene Adaptation des Ersatzmaterials

Von den unter anderem von Epple (2003) aufgestellten Anforderungen an ein Knochenersatzmaterial spielt die möglichst exakte Passform mit entsprechender Dimensionstreue eine grundlegende Rolle. Wenn dieses Kriterium schlecht erfüllt wird, kann Bindegewebe zwischen Defektwand und Ersatzmaterial einwandern und so eine Besiedlung mit Osteoblasten verhindern.

Das Erreichen der daher obligat guten Adaptation an den Defekt wird von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen Methoden beschrieben:

Am einfachsten ist dabei die Applikation eines gelförmigen Materials (Polylactid-Gel von Fisiograft, Stancari et al. 2000) oder eines pulverförmigen bis locker körnigen Materials (gemahlener deproteiniertes und gefriergetrockneter Knochen oder Bioglass, Chan et al. 2002). Oft wird das eingebrachte Material mit einer Membran vor Verlagerung und Einwachsen bindegewebiger Zellen geschützt. Als Nachteil ist dabei anzusehen, dass die Membran oft zusätzlich mechanisch befestigt werden muss, entweder durch zusätzliche Nähte oder je nach Defektgröße mit Schrauben (Wallkamm et al. 2003), die dann später ebenso wie eine eventuell nicht resorbierbare Membran entfernt werden müssen.

Aus diesem Grund erscheint der Ansatz, den Defekt mit einer aushärtenden resorbierbaren Paste aus einzelnen Knochenersatzmaterialpartikeln und einem Pastenbildner, beispielsweise Dextran (Chan et al. 2002), aufzufüllen vorteilhafter. Der Einsatz dieser Methode wird allerdings dadurch limitiert, dass sie unter Beibehaltung der Porosität für die meisten Knochenersatzmaterialien nicht durchführbar erscheint, da diese als Festkörper vorliegen und der Pastenbildner die grundlegende Eigenschaft der offenen und interkonnektierenden Porosität zum Beispiel durch Verkleben der Poren negativ beeinflussen kann.

Es erscheint daher geeigneter, Festkörper so zu bearbeiten, dass sie genau in den Defekt passen, oder eine Form herzustellen, die das extrakorporale Anfertigen eines passgenauen Knochenersatzstückes aus Basismaterial erlaubt. Durch diese Möglichkeit der Anfertigung kann der Knochenersatz in seinen Eigenschaften besser auf die individuellen

Bedürfnisse in Bezug auf Porosität und Stabilität eingestellt werden und vor der Anwendung auch auf Erreichen der geplanten Materialanforderungen überprüft werden, was bei pastenförmigen Applikationsarten nicht möglich erscheint.

1.1.8. Dreidimensionale Modellherstellung auf Basis bildgebender Methoden

Die Verwendung bildgebender Verfahren in der Medizintechnik (zum Beispiel Röntgen) ermöglicht die zweidimensionale Darstellung anatomischer Strukturen und ebenso möglicher Defekte. Problematisch erscheinen hierbei die Überlagerung von Details durch die zweidimensionale Darstellung dreidimensionaler Strukturen, die nicht maßstabgetreue und durch die Ausbreitung des Röntgenstrahls auch möglicherweise verzerrte Darstellung sowie bei konventioneller Technik die Abbildung auf einem Röntgenfilm, wodurch eine Weiterverwendung der Informationen am Computer (digitales System) nicht direkt ermöglicht wird.

Seit der Einführung der Computertomographie (kurz CT) ab 1972 sind auch dreidimensionale Darstellungen möglich, die eine große Hilfe speziell bei der Planung von Operationen darstellen. Die Computertomographie ist eine computerbasierte Aufbereitung einer Vielzahl aus verschiedenen Richtungen aufgenommener Röntgenaufnahmen oder einer durchgängig durchgeführten mehrfach umlaufenden Aufnahme eines Objektes, die einen dreidimensionalen Datensatz generiert.

Neben der dreidimensionalen Darstellung, die eine überlagerungsfreie Abbildung der einzelnen Strukturen ermöglicht, bestehen weitere wichtige Vorteile der Computertomographie in der hohen Genauigkeit und Maßstabstreue und vor allem in der Konvertierung der anatomischen Strukturen in digitale und damit gut im Computer weiter zu bearbeitende Datensätze. Die Datengewinnung im CT erfolgt dabei grob skizziert durch die parallele Aufnahme von Querschnittsbildern mit einer Schichtdicke (das heißt einem Abstand) von 1 bis 2 mm, die dann der Reihe nach ausgedruckt oder interpolierend zusammengesetzt werden können. Bei den neueren Spiral-CTs (seit 1989) erfolgt die Aufnahme als ein großer zusammenhängender Datensatz, der gewonnen wird, während die Röntgenröhre gleichmäßig um den Patienten rotiert und der Tisch mit dem Patienten gleichmäßig vorwärts bewegt wird. Aus dem so gewonnenen Datensatz können

Querschnittsbilder mit einer Schichtdicke von 0,1 bis 0,2 mm errechnet werden. Der große Vorteil der neueren (Mehrschicht-) Spiral-CT's liegt allerdings in der Gewinnung von Datensätzen aus Würfeln gleicher Kantenlänge (isotrope Voxel), die eine hochqualitative dreidimensionale Rekonstruktion der untersuchten Strukturen ermöglichen.

Schon früh nach der Einführung des CTs wurden erste Versuche unternommen, die Datensätze der Computertomographie zur Herstellung von dreidimensionalen Modellen zu verwenden, um schon präoperativ einen Überblick über die knöcherne Situation am Patienten zu erhalten.

Erste Modelle wurden in Frästechnik aus Polyurethanschaum und Calciumcarbonat herausgearbeitet, wobei die Methode keine Ausarbeitung von Hohlräumen ermöglichte. Ab 1990 wurde die Methode der Laserstereolithographie eingeführt. Hierbei polymerisiert ein Laser auf Basis von dreidimensionalen Daten schichtweise ein Modell aus Harz- und Acrylatmonomeren in einem Flüssigkeitsbad aus (Zeilhofer 2005).

Neben der Berechnung der Defekte nach der Operation ist auch die voraussichtliche Ausdehnung des Defektes von einigen Arbeitsgruppen als Basis eines präoperativen Modells verwendet worden. Eufinger et al. (siehe Weihe et al. 2001) haben dazu eine Methode nach dem CAD-CAM-Verfahren entwickelt, die die Herstellung komplexer dreidimensionaler Knochenersatzstücke erlaubt. Diese Methode ist ausgereift und wird routinemäßig für Schädeldeckenersatz aus Titan eingesetzt (Weihe et al. 2001). Basis der Daten, nach denen das Werkstück dabei hergestellt wird, sind Computertomographieaufnahmen, deren digitale Datensätze die computergestützte Analyse des Defektes erlauben. Anhand von gesunder oder erhaltener Umgebungsstruktur wird die Planung eines in den angenommenen perioperativen Defekt passenden dreidimensionalen Werkstücks ermöglicht.

Auf Basis dieser Technik ist auch die Herstellung einer individuellen Form aus Teflon für aufgeschäumtes PLA-PGA-Copolymer möglich (Weihe et al. 2001).

1.2. Ziel der Arbeit

Die Gruppe der alloplastischen Knochenersatzmaterialien besitzt ein hohes Entwicklungspotential. Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Komponenten ist es möglich, spezielle Materialien oder Materialmischungen für bestimmte Einsatzgebiete zu entwickeln.

Bisherige Arbeiten untersuchten vor allem die Eignung von PLA-PGA-Copolymer als Knochenersatzmaterial und die Verbesserung der Materialeigenschaften für diesen Zweck oder die verschiedenen Möglichkeiten, das Material *in vivo* einzusetzen.

In den letzten Jahren wurden viele beachtliche Erfolge publiziert, die die Eignung von Polylactid und Polyglycolid als Knochenersatz unterstreichen (Weihe et al. 2001, Eppe 2003).

In der eigenen Arbeitsgruppe Tissue Engineering und Biomineralisation des Universitätsklinikums Münster wurde eine neuartige Methode entwickelt, den Werkstoff PLA-PGA-Copolymer durch Sintern als Knochenersatzmaterial einsatzfähig zu gestalten. Für andere Werkstoffe, beispielsweise Keramiken, ist Sintern eine etablierte Standardmethode.

Unter Sintern wird das Erhitzen des zuvor in die Form gepressten Basismaterials verstanden, bis die einzelnen Partikel an der Oberfläche miteinander reagieren, so dass sie aneinander haften, ohne zusammenzuschmelzen (Marxkors et Meiners 2001). Zwar ist das Sintern von Polylactid-Polyglycolid-Copolymer anderen Methoden in Bezug auf die Einstellungsmöglichkeiten unterlegen, das Verfahren ist allerdings sehr einfach und benötigt keine zusätzlichen Lösemittel, die vor dem Einsatz des Copolymers als Knochenersatz eventuell beseitigt werden müssen (Hou et al. 2003).

Ziel dieser Arbeit ist, die Methode so weit anzupassen, dass der Einsatz des entwickelten Composites (also des zusammengesetzten Werkstoffes) als Standardmaterial für Knochenersatz mit individueller Konfektionierbarkeit möglich wird. Ein besonderes Augenmerk soll hierbei auf die Eignung des Werkstoffs für die Verwendung speziell in der CAD-CAM-Technik auf Basis von CT-Daten gerichtet werden.

2. Material der Arbeit

2.1. Material

2.1.1. Bestandteile des Copolymers und des Puffersystems

2.1.1.1. Sinterung des PLA-PGA-Copolymers

Das verwendete Copolymer war Resomer[®] RG 50:50 H von Boehringer Ingelheim Pharma (Ingelheim, Deutschland), Chargennummer RES-0260. Resomer[®] RG 50:50 H ist ein amorphes Poly(DL-lactid-co-glycolid), also ein Copolymer von Polylactid mit den Monomeren D- und L-Milchsäure im Verhältnis 50:50 und Polyglycolid.

Die für die erstmalige Sinterung des Copolymers verwendete Metallform wird ursprünglich für die Herstellung von Kaliumbromid-Pellets zu Analysezwecken in der Chemie verwendet (KBr-Pressform, Specac, Kent, UK). Alle Bestandteile der Form (Basisplatte, Mantel, Stempel sowie zwei polierte Stempelplatten) wurden verwendet. Die zweite Sinterung erfolgte entweder ebenfalls in einer KBr-Pressform oder in einer individuellen Sinterform, die weiter unten beschrieben wird (siehe 2.1.2.3. und 2.2.4.).

Die Sinterung wurde in einem Durchluftwärmeschrank (Kelvitron plus, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

2.1.1.2. Das Puffersystem

Um die sauren Abbauprodukte des Copolymers zu neutralisieren und so den pH-Wert im für Zellen kompatiblen Bereich um 7,4 zu halten, wurde dem Basisgranulat als Puffersystem Calciumcarbonat beigemischt (Calciumcarbonat, Qualität p. A., Merck, Darmstadt, Nr. 102066). Abweichend von früheren Versuchen innerhalb der Arbeits-

gruppe, bei denen die Beimischung von Calciumcarbonat 10 % betrug, wurde bei den Presslingen mit Pufferzusatz eine Beimischung von 20 % Calciumcarbonat eingesetzt.

2.1.2. Dreidimensionale Modelle und Formen

Das Ziel bei der Herstellung der individuellen defektbezogenen Form war eine akzeptable Genauigkeit. Das in der Form herzustellende Implantat sollte annähernd so groß sein wie das Original (Abweichung von weniger als 2 %). Ein besonderes Augenmerk lag daher neben der Modifikation des Copolymers zur Kompensation der Schrumpfung auf der Verwendung von Materialien mit möglichst geringen eigenen Volumeneffekten.

2.1.2.1. Das Stereolithographiemodell

Die Datensätze, denen das Stereolithographiemodell zugrunde liegt, basieren auf Computertomographieaufnahmen knöcherner Defekte an Göttinger Minischweinen. In Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Dirksen, Poliklinik für zahnärztliche Prothetik im ZMK Münster, wurde auf der Grundlage dieser Daten ein dreidimensionales Planungsmodell eines exakt passenden Knocheninserts erarbeitet.

Anschließend wurde das virtuelle Planungsmodell mit Laserstereolithographie in einen realen dreidimensionalen Festkörper aus polymerisiertem Spezialkunststoff überführt (siehe Abb. 2.1.), der in den Knochendefekt im Minischwein passen würde. Dieses Stereolithographiemodell wurde der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und stellte die Basis für das in 2.1.2.2. beschriebene Arbeitsmodell dar.



Abb. 2.1.
Das Stereolithographiemodell. Die Terrassen auf der Oberfläche interpolieren schräge Flächen und dienen als Marker für die Präzision.

2.1.2.2. Das Arbeitsmodell

Das Arbeitsmodell wurde mit Methoden und Materialien aus dem Bereich der Dentaltechnik hergestellt. Auf Basis des Stereolithographiemodells als Positivform des Knochendefektes wurde mittels einer Doppelmischabformung mit additionsvernetzendem Dentsilikon (Provil Novo Heavy Body und Light Body, Heraeus Kulzer, Hanau) ein Arbeitsmodell aus Modellkunststoff auf Polyurethanbasis (Mirapont, Hager & Werken, Duisburg) angefertigt (siehe Abb. 2.2.). Dieses diente in der Phase der experimentellen Ermittlung einer geeigneten Herstellungsmethode als Standardmodell für die Sinterform, um das Original zu schützen.



Abb. 2.2.
Das Arbeitsmodell aus Modellkunststoff (Mirapont). Die Darstellung der Terrassen sowie die Maße gleichen dem Original.

2.1.2.3. Die individuelle defektbezogene Implantatform

Für die individuelle Sinterform nach dem Vorbild des Stereolithographiemodells wurden ebenfalls Materialien aus dem zahntechnischen Bereich benutzt. Insbesondere kamen lichthärtender Kunststoff (Löffelmaterial, Ivoclar, Schaan, Liechtenstein) sowie hoch und schwach gefülltes additionsvernetzendes Dentalsilikon (Provil Novo Heavy Body und Light Body, Heraeus Kulzer, Hanau), Silikonadhäsiv (ebenfalls Heraeus Kulzer) sowie Plattenwachs (Universalqualität, Orbis Dental, Münster) und eine kleine Zellkulturschale (Nunc, Wiesbaden) zum Einsatz.

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung der Implantate aus gesintertem Copolymer

2.2.1.1. Das Einfachsinterimplantat

Das Einfachsinterimplantat wurde als Kontrollimplantat und in gemörserter Form als Basismaterial für das Doppelsinterimplantat verwendet.

Je nach Einsatzzweck wurde das PLA-PGA-Copolymerpulver aufgeschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Polymerpartikel zu erreichen, oder mit CaCO_3 versetzt, zusätzlich in einer Kugelmühle (Retsch, Haan) zermahlen und erneut durchmischt.

Der Durchluftwärmeschrank wurde in der Vorwärmphase mit der jeweils verwendeten Sinterform beschickt, bis diese auf die Arbeitstemperatur von $57\text{ }^\circ\text{C}$ aufgeheizt war (mindestens 60 Min.). Vor dem Beschicken der Form mit dem Sintergut wurde die Form für 10 Min. bei Raumtemperatur abgekühlt, um eine Reproduzierbarkeit mit weiteren Presslingen sicherzustellen.

Nach der Entnahme der Form aus dem Ofen und dem leichten Abkühlen wurde das vorbehandelte PLA-PGA-Copolymer in die Form gegeben und durch Rotieren des Pressstempels vorsichtig auf eine gleichmäßige Materialstärke verteilt.

Durch Pressen des Copolymers in der Form mit definiertem Druck von 20 N/mm² und mit definierter Dauer von 3 Min. wurde ein intensivierter Kontakt der einzelnen Polymerpartikel zueinander ermöglicht (Vorverdichten).

Anschließend wurde das Copolymer ohne weiteren zusätzlichen Druck, aber mit belassenem Pressstempel im Durchluftwärmeschrank bei konstanter Temperatur gleichmäßig für 30 Min. erwärmt, um eine Adhäsion der einzelnen Partikel aneinander zu erreichen. Experimentell wurde von der Arbeitsgruppe eine optimale Sinterungstemperatur von 57 °C ermittelt. Der Einfluss auf die Eigenschaften des Materials durch vorheriges Kaltpressen, also die Vorverdichtung, und die gleichmäßige Verteilung der Partikel wurde ebenfalls ermittelt.

Nach der Entnahme aus dem Ofen wurde das Sintergut während einer zehnmütigen Abkühlphase weiterhin in der Form belassen und erst danach entnommen, um eine Verformung des bei 57 °C schwach plastischen Materials zu verhindern.

Wenn es sich bei dem Sintergut um Rohlinge für Doppelsinterimplantate handelte, wurde es erst nach dem vollständigem Abkühlen weiterverarbeitet.

2.2.1.2. Das Doppelsinterimplantat

Dem Doppelsinterimplantat diene einfach gesintertes Copolymer (mit oder ohne Puffersystem aus Calciumcarbonat) als Basis.

Um Basisgranulat mit definierter Partikelgröße zu erhalten, wurde das einfach gesinterte Werkstück in einer Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) mit einer Kugel (Durchmesser 10 cm) bei 50 % der maximalen Intensität gemörsert. Das entstandene Pulver wurde mit Analysesieben in unterschiedliche Fraktionen aufgeteilt.

Die Siebe wurden als Siebturm in die Kugelmühle montiert (siehe Abb. 2.3.). Dafür wurden sie mit nach oben aufsteigender Maschengröße in ein Kunststoffgefäß gestellt und ineinandergefügt in die Kugelmühle eingebaut. Die Sicherung des Siebturms erfolgte durch zwei Rändelschrauben auf den seitlichen Gewindestangen.

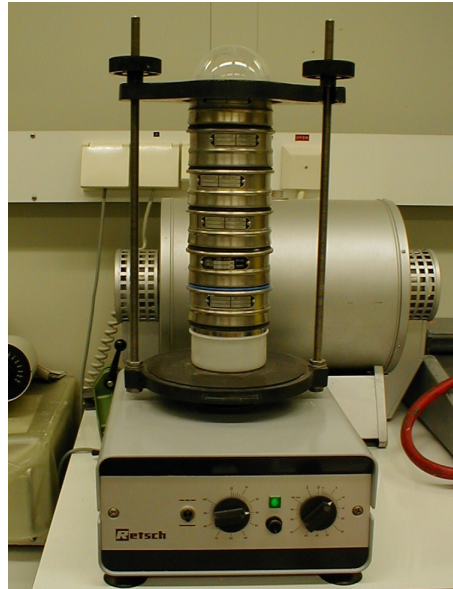


Abb. 2.3.
Siebturm mit Analysesieben zur Auftrennung des gemörserten einfach gesinterten Materials in Partikelintervalle definierter Größe.

Die Analysesiebe mit Maschengrößen von 1000 μm , 800 μm , 600 μm , 400 μm , 315 μm und 150 μm ergaben jeweils ein Intervall zwischen zwei Maschengrößen, also beispielsweise zwischen 1000 μm und 800 μm . Partikel, die größer als 1000 μm oder kleiner als 150 μm waren, wurden nicht verwendet.

Anschließend wurde das Basisgranulat in die entsprechende auf 57 °C vorgewärmte Form (KBr-Pressen, Specac, Kent, UK, oder eine individuell angefertigte Pressform) gefüllt und gepresst. Das Granulat wurde vor dem Pressen in der Form mit einer drehenden Bewegung des Stempels der Pressform geglättet, um eine gleichmäßige Verteilung des Sinterguts zu gewährleisten. Als Pressdruck bewährte sich experimentell 20 N/mm². Die Pressdauer wurde auf 3 Min. festgelegt.

Die vorverdichteten und gepressten Implantate wurden nach dem Pressen ohne Druck, aber mit eingesetztem Pressstempel in einen Durchluftwärmeschrank gegeben, das

Sintern dauerte 20 Min. Anschließend wurde die Form mit dem Implantat 10 Min. ausgekühlt, bevor der Pressling aus der Pressform genommen werden konnte. Das Einhalten des Zeitrahmens war wichtig, um die Temperatur der massiven Edelstahlform im reproduzierbaren Intervall zu halten und so vergleichbare Bedingungen für alle Presslinge zu schaffen.

2.2.1.3. Das Puffersystem aus Calciumcarbonat

Das verwendete Calciumcarbonat (Merck, Darmstadt, Qualität pro Analyti) sollte in der Partikelgröße einstellbar sein. In Vorversuchen hat sich das Mahlen des Puffermaterials auf die gewünschte Größe vor dem Mischen mit dem Copolymer bewährt. Bei den für die Zellversuche bestimmten Presslingen wurde das Calciumcarbonat 1 Stunde lang bei 50 % der maximalen Kraft der Kugelmühle gemahlen. Die durchschnittliche Größe der Partikel korreliert mit der Verweildauer in der Kugelmühle. Eine lichtmikroskopische Kontrolle des gemahlten Calciumcarbonates ergab eine mittlere Partikelgröße von 15 µm. Eine Anpassung der Partikelgröße, um das Puffersystem in Bezug auf Verfügbarkeit und Dauer der Wirkung zu modifizieren, ist durch die Einstellung der Verweildauer in der Kugelmühle jederzeit möglich.

Das Einbringen des Calciumcarbonates in das Copolymerpulver erfolgte unter Zugabe von Isopropanol im Rotationsverdampfer (Aufbau siehe Abb. 2.4.), um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Diese Methode stellte sowohl die gleichmäßige Durchmischung der beiden Pulver in der Suspension als auch die gründliche, eine Überhitzung des thermisch sensiblen Copolymerpulvers vermeidende Entfernung der dazu verwendeten Flüssigkeit sicher.

Am Ende des Prozesses sollte kein Isopropanol mehr im Pulver nachweisbar sein, so dass die Verdampfung des Isopropanols mit Unterdruck in der Versuchsanlage (ca. 1 bar) und mit kontrollierter Wärmezufuhr im Rotationskolben forciert wurde. Ein in der Temperatur auf 40 °C regulierbares Ultraschallbad stellte dabei sowohl die für die Verdampfung des Isopropanols nötige Wärme als auch die zusätzliche kinetische Energie zur Verfügung, um am Rotationskolben haftendes Pulver rasch abzulösen.

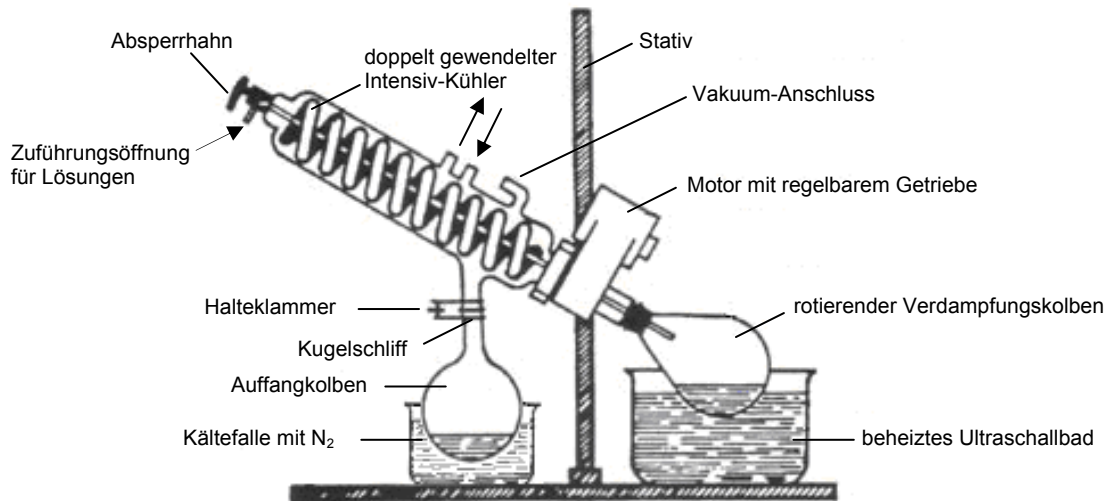


Abb. 2.4.
Skizze des Rotationsverdampfers. Modifikationen erfolgten durch das beheizte Ultraschallbad am Verdampfungskolben und den Behälter mit flüssigem Stickstoff am Auffangkolben.

Das im rotierenden Verdampfungskolben verdampfende Isopropanol wurde nach dem Verlassen dieses Kolbens im Auffangkolben mit flüssigem Stickstoff als Kältefalle wieder kondensiert. Nach 1 Stunde Verweildauer war das Pulver trocken und konnte aus der Apparatur entnommen werden. Die anschließende Aufbewahrung in einem leicht geöffneten Schraubgefäß unter Unterdruck im mit Phosphorpentoxid gefüllten Exsiccator für 24 Stunden stellte die Entfernung des restlichen Isopropanols sicher. Das so entstandene Pulver war gleichmäßig mit Calciumcarbonat versetzt und stellte die Basis für die Zellversuche dar.

2.2.1.4. Keimreduktion der Presslinge

Die Keimreduktion durch ultraviolette Strahlung wurde nur bei Presslingen durchgeführt, die im Zellversuch oder im Kontrollversuch ohne Zellbesiedlung, aber mit Mediumkontakt eingesetzt werden sollten.

Dafür wurden die unter keimreduzierten Bedingungen hergestellten Presslinge vor der Besiedlung mit Zellen für jeweils 20 Min. von 2 Seiten (vorzugsweise Ober- und Unterseite) mit UV-Strahlung der Wellenlänge 264 nm bestrahlt (Herolab UVT-20, Heraeus-Kulzer, Hanau).

2.2.2. Versuche zur Bestimmung der Materialeigenschaften

2.2.2.1. Überprüfung auf Dimensionstreu

Alle Presslinge, die während der Arbeit hergestellt wurden, wurden auf Dimensionstreu vermessen. Die zylinderförmigen Werkstücke wurden dabei jeweils an ihrer Oberseite (willkürlich festgelegt), ihrer Unterseite (der entgegengesetzten Seite) und in der Mitte (halbe Strecke zwischen Ober- und Unterseite) auf ihren Durchmesser überprüft. Als weiterer Parameter wurde die Höhe ermittelt. Als Messinstrument wurde eine Schieblehre aus dem Dentaltechnikbereich (Beerendonk Dental) mit Skalaschritten von 0,1 mm verwendet.

Aus den ermittelten Werten wurde das Volumen der Presslinge annäherungsweise ermittelt.

Die dafür verwendete Formel basiert auf der Annahme, dass die taillierte Einziehung der vornehmlich bei der Einfachsinterung geschrumpften Presslinge einem Ring gleicht, der von einem gleichmäßigen Zylinder subtrahiert wird.

Dadurch kann das zweite Guldinsche Postulat Anwendung finden. Das Postulat besagt: „Das Volumen eines Rotationskörpers (damit ist der Ring gemeint, der vom Zylinder abgezogen werden soll) ist gleich dem Produkt aus dem Flächeninhalt, der erzeugten Fläche und dem Umfang des durch die Rotation des Schwerpunktes dieser Fläche (um die Symmetrieachse des Zylinders) erzeugten Kreises.“

$$V(\text{Rotationskörper}) = A \cdot 2\pi R$$

(V steht für Volumen, A für den Flächeninhalt der erzeugten Fläche und R für den Radius des erzeugten Kreises.)

Der Querschnitt der Taille wurde näherungsweise als Dreieck bestimmt, wobei die Basis des Dreiecks die Außenseite des idealen Zylinders darstellt, von dessen Volumen der Ring subtrahiert wird (siehe Abb. 2.5.). Hieraus ergibt sich folgende Formel:

$$V(\text{Pressling}) = V(\text{Zylinder}) - V(\text{Rotationskörper})$$

Weitere Formeln waren für die Berechnung der Fläche (A) des Dreiecks (als Querschnitt des Rings) und des Schwerpunktes (S) des Dreiecks erforderlich.

$$A_{(\text{Dreieck})} = \frac{1}{2} l \cdot h$$

$$S_{(\text{Dreieck})} = \frac{1}{3} h$$

Durch das Ausmessen der Höhe und der Breite des Presslings an Ober- und Unterseite sowie genau in der Mitte der Presslingshöhe waren alle Werte vorhanden, die für die Konstruktion des Dreiecks und die Bestimmung der Höhe (h) senkrecht zur Basis und der Basislänge (l) benötigt wurden.

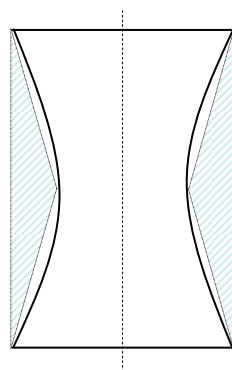


Abb. 2.5.

Zweidimensionale Skizze für die Bestimmung des Taillevolumens durch näherungsweise Interpolieren des Raums mit Dreiecken. Je kleiner die Taille ist, umso geringer fällt die Ungenauigkeit durch den nicht erfassten Raum zwischen den Dreiecken und dem Pressling aus.

Wird für die Beschreibung der Taille die geometrische Form eines Dreiecks verwendet, wird der zu tolerierende Fehler umso geringer, je weniger der Pressling schrumpft. Bei einem dimensionstreuem Pressling ohne Taille ergibt sich so kein Fehler mehr. Ein exaktes Berechnen des Volumens ist rechnerisch aufgrund der nicht vollständig regelmäßigen Tailleform nur schwer möglich. Auch ein Messen nach dem Prinzip der Verdrängung scheidet aufgrund der starken Porosität des gesinterten Copolymers aus.

Aus den Parametern Volumen und Gewicht konnte die Rohdichte, also die Dichte des porösen Presslings inklusive der luftgefüllten Poren errechnet werden. In Anlehnung an Hou et al. (2003) und Navarro et al. (2004) wurde aus der ermittelten Rohdichte und der zuvor ermittelten Dichte des soliden Copolymers (für PLA-PGA im Verhältnis 50:50 beträgt der Wert 1,365 g/cm³) sowie der Dichte des Copolymers mit Calciumcarbonatbeimischung die Porosität (in Prozent) ermittelt. Der Berechnung liegt die folgende Formel zugrunde:

$$P = 100 - ((\text{Rohdichte} * 100) / (\text{solide Dichte}))$$

Zusätzlich wurde der Mittelwert der Porosität der Presslinge einer Partikelgröße und die Abweichung der einzelnen Werte davon ermittelt. Mit diesem Verfahren sollte untersucht werden, wie weit die Abweichungen streuen.

2.2.2.2. Kontrolle von Schwellung und pH-Abfall

Um die Einsatzfähigkeit des Materials grob abzuschätzen, wurden jeweils ein Probekörper aus doppelt gesintertem und ungesiebttem PLA-PGA-Copolymer mit 20 % Calciumcarbonat und ein Probekörper ohne Pufferzusatz in vitro untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem spontanen Zerfall der Copolymere in wässriger Umgebung in die einzelnen sauren Monomere ohne den zusätzlichen Einfluss zellulärer Bestandteile. Durch die Verwendung des Zellmediums MMO, das auch im Zellversuch eingesetzt werden sollte, wurde ebenfalls das Verhalten der Copolymere im in vitro System erprobt. Von Interesse war dabei vor allem, in wie weit das Puffersystem im MMO für die Pufferung der sauren Zerfallsprodukte der Presslinge ausreicht.

Die Probekörper, nachfolgend Implantate genannt, wurden gemäß der angeführten Methoden der Sinterung bei 57 °C hergestellt. Dabei wurde eine Metallpressform mit einem Innendurchmesser von 5 mm verwendet (KBr-Pressform, Specac, Kent, UK).

Für das Kontrollimplantat wurde das Copolymergemisch Resomer[®] RG 50:50 H ohne Zusatz einer Puffersubstanz gesintert und zu Basismaterial gemörsert. Anschließend wurde das Material ungesiebt und somit ohne Bestimmung der Partikelgröße ein zweites Mal bei 57 °C gesintert.

Für das Implantat mit Pufferzusatz wurde Resomer[®] 50:50 H mit Calciumcarbonat im Verhältnis 4:1 (nach Gewicht) gemischt, gesintert, gemahlen und ungesiebt, also wie beim Kontrollimplantat auch ohne Bestimmung der Partikelgröße, erneut gesintert.

Die auf diese Weise gewonnenen Implantate hatten beide eine zylindrische Form und einen Durchmesser von 5 mm. Die Implantate wurden jeweils in 2 ml Medium (MMO) gegeben und der Probebehälter luftdicht verschlossen. Während des gesamten Versuches wurde das Medium nicht gewechselt, so dass die sauren Abbauprodukte des Copolymeren entweder vom Puffersystem neutralisiert werden mussten oder sich im Medium anreicherten.

Der Versuch wurde bei 37 °C im Durchluftwärmeschrank durchgeführt, um eine mit den Bedingungen im Körper vergleichbare temperaturabhängige Zerfallsgeschwindigkeit zu erhalten. Auf eine Berücksichtigung der in Zellversuchen üblicherweise für die Pufferung benutzten Kohlendioxidkonzentration (5 %) in der Umgebung wurde verzichtet, da die Probengefäße luftdicht verschlossen waren. Ein Einfluss des CO₂-Gehaltes der Umgebungsluft konnte somit ausgeschlossen werden.

Am 1., 2., 3., 8. und 14. Tag wurden die Probekörper auf Schwellung überprüft. Die Kriterien waren die Höhe und die Breite an 3 Stellen (Oberseite und Unterseite sowie mittig).

Der pH-Wert des Mediums wurde vom 1. bis 4. Tag, vom 7. bis 11. Tag und am 14. Tag nach dem Einsetzen der Probekörper gemessen. Die Messung des pH-Werts erfolgte mit Messstreifen (pH-Indikatorpapier, Fa. Merck, Darmstadt). Weiterhin wurde die Oberfläche der Probekörper im Umkehrlichtmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss Jena/Oberkochen) betrachtet.

2.2.2.3. Ermittlung der Porengröße in Abhängigkeit von der Partikelgröße

Für diesen Versuch wurde einfach gesintertes und gemahlene PLA-PGA-Copolymerbasisgranulat mit Analysesieben in die verschiedenen Partikelgrößen aufgeteilt. Anschließend wurden aus dem Granulat Presslinge mit definierter Partikelgröße gesintert.

Die Partikelintervalle 150 bis 315 μm und 315 bis 400 μm wurden jeweils anhand von 2 Probekörpern untersucht, das Partikelintervall 400 bis 600 μm wurde anhand von 3 Implantaten untersucht. Für die Intervalle 600 bis 800 μm sowie 800 bis 1000 μm wurde jeweils ein Implantat verwendet.

Um die durchschnittliche Porengröße zu bestimmen, wurden die Presslinge mittig gebrochen, so dass eine möglichst glatte Bruchkante entstand. Anschließend wurde jeweils eine Hälfte mit plastischer Silikonmasse (Provil novo Basispaste, Heraeus Kulzer, Hanau) so auf einem Objektträger fixiert, dass die Bruchkante oder eine Außenfläche parallel zum Träger und somit rechtwinklig zum Objektiv des Mikroskops ausgerichtet war.

Die einzelnen Bruchflächen wurden mit der am Auflichtmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss Jena/Oberkochen) angebauten Kamera (Axiocam, Carl Zeiss Jena/Oberkochen) fotografiert. Ein im Mikroskop eingeblendeter Maßstab (100 μm) wurde dabei zur Umrechnung der Werte eingefügt. Anschließend wurden die Bilder ausgedruckt und die Hohlräume zwischen den einzelnen Polymerkörnern ausgemessen. Der auf den Ausdrucken abgebildete Maßstab ermöglichte dabei ein Umrechnen der Werte auf dem Papier (in mm) in die Werte in vitro (in μm). Als Messwert wurde dabei die maximale Ausdehnung des Hohlraums in zwei Dimensionen (Länge*Breite) gewählt.

Eine Untersuchung der Bruchflächen im Rasterelektronenmikroskop (um die Ausdehnung der Poren zu ermitteln) erwies sich gegenüber der lichtmikroskopischen Auswertung nicht als vorteilhaft. da das thermosensible Copolymer bei höheren Beschleunigungsspannungen zu schmelzen drohte, bei geringerer Spannung aber zum Sputtern (Bildung von ladungsbedingten Artefakten) neigte.

2.2.2.4. Bestimmung der Permeabilität der Porenverbindung

Um die Möglichkeit des Flüssigkeitsaustauschs durch die Porenverbindung zu bestimmen, wurde der in Abbildung 2.6. dargestellte Aufbau für die Ermittlung der Menge an Flüssigkeit gewählt, die in einer bestimmten Zeit durch die porösen Implantate fließen kann.

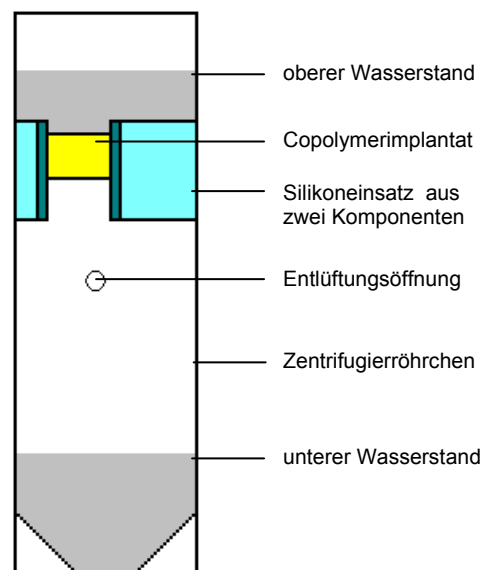


Abb. 2.6.
Schematischer Aufbau eines Versuchsgefäßes.
Oberhalb des dichten Silikoneinsatzes befindliches Wasser fließt durch das poröse Copolymerimplantat in die untere Kammer. Ist die Entlüftungsöffnung verschlossen, kann kein Druckausgleich erfolgen und es fließt kein Wasser durch das Copolymerimplantat.

Zu diesem Zweck wurden aus Dentsilsilikon (Provil Novo Putty und Provil Novo Light, Heraeus, Hanau) Einsätze für Kunststoffgefäße entwickelt, die das Einfügen eines 5 mm breiten zylindrischen Implantates erlaubten. Der Innendurchmesser des Einsatzes betrug dabei 4,9 mm, so dass ein Anpressen des elastischen Dentsilsilikons an das eingefügte

Implantat mit dem Außendurchmesser von 5 mm und somit ein dichter Randschluss erreicht wurde. Der Einsatz wurde in einem Abstand von 5 cm zum oberen Gefäßrand eingebracht, so dass er das Gefäß in eine obere nach oben offene Kammer und eine untere geschlossene Kammer aufteilte (siehe Abb. 2.6. und 2.7.). Die für diesen Versuch wichtige Voraussetzung der wasserdichten Verbindung von Einsatz und Gefäßwand sowie Implantat und Einsatzwand wurde mit einem soliden Prüfkörper mit einem Durchmesser von 5 mm erfolgreich getestet.

Ein weiteres Merkmal der Konstruktion war dabei eine verschließbare Entlüftungsöffnung, die im geöffneten Zustand den Druckausgleich für eintretendes Wasser gegen ausströmende Luft gewährleistete, im geschlossenen Zustand allerdings das Eintreten von Wasser durch das poröse Implantat im Austausch gegen die eingeschlossene Luft verhinderte. Ein zeitgleicher Start des Versuchs mit mehreren Versuchsgefäßen konnte durch simultane Öffnung der Entlüftungsöffnungen gewährleistet werden.



Abb. 2.7

Der Einsatz aus additionsvernetztem Silikon. Hervorzuheben ist der Ring aus niedrig gefülltem, elastischerem Material, um den Druck zum Versuchskörper trotz dichtem Kontakt zu diesem niedrig zu halten.

Als Flüssigkeit, die durch die Implantate fließen sollte, wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die Versuchsdauer wurde auf 120 Min. angesetzt, wobei alle 5 Min. die Menge des durchgelaufenen Wassers markiert und gemessen wurde. Da einige Implantate mit einem größeren Partikeldurchmesser schon nach 60 Min. das Maximalvolumen des Auffangbehälters durchließen, wurde der Versuch für diese Presslinge abgebrochen und das Ergebnis auf 120 Min. Versuchsdauer hochgerechnet.

Insgesamt wurden 20 Implantate mit einer Aufteilung der Partikelgröße in die Bereiche 150 bis 315 μm , 315 bis 400 μm , 400 bis 600 μm , 600 bis 800 μm und 800 bis 1000 μm verwendet.

2.2.2.5. Überprüfung der Doppelsinterpresslinge auf mechanische Stabilität

Die mechanischen Eigenschaften der Doppelsinterpresslinge wurden in einem Druckversuch ermittelt. Dazu wurde eine Materialprüfmaschine (Lloyd Instruments LF Plus, Version 3.96, Ametek Lloyd Instruments Ltd., Fareham, Hampshire, UK) benutzt. Die installierte Lastzelle (Typ 9918, Hersteller ebenfalls Ametek Lloyd) als Messinstrument besaß einen Messbereich bis 499 N. Die Steuerung und Überwachung des Versuchs erfolgte durch das Programm Nexygen Ondio (Batch Version 4.5, Issue 31, Ametek Lloyd Instruments Ltd., Fareham, Hampshire, UK). Die Software war auf einem PC (Betriebssystem Windows 2000 Professional, Prozessor Pentium II, 333 Mhz) installiert, der mit der Materialprüfmaschine verbunden war.

Durch die Darstellung der Messwerte in Echtzeit auf dem Monitor in graphischer Form in einem Koordinatensystem war eine exakte Kontrolle des Verhaltens der Prüfkörper unter Belastung möglich, etwa zur Unterscheidung langsamer Ermüdung oder eines plötzlichen kompletten Bruchs (siehe Abb. 3.13.).

Das Programm ermöglichte außerdem die Speicherung der wichtigsten Parameter für jeden Versuch. Neben der digitalen Speicherung war ein Ausdruck der Statistik und der individuellen Versuchskurven möglich.

Als Indikator für die mechanischen Eigenschaften wurde der Druck gewählt, bei dem der Prüfkörper seine Festigkeit verlor, also in einzelne Partikel zerfiel. Um eine definierte achsengerechte Belastung des Prüfkörpers sicherzustellen und so zum Beispiel Scherkräfte auszuschließen, wurde der Prüfkörper nicht direkt durch die Lastzelle belastet, sondern ein zylinderförmiger Stempel in einem Führungsring zwischen dem Prüfkörper und der Lastzelle installiert. Diese Funktion wurde durch den Einsatz einer überdimensionierten Pressform (deren Innendurchmesser größer war als der Durchmesser der Presslinge) sichergestellt (siehe Abb. 2.8.).

Durch den Einsatz eines transparenten Kunststoffrings als Platzhalter zwischen Führungsring und Boden der Materialprüfmaschine konnte in späteren Versuchen auch der korrekte Sitz des Stempels auf dem Prüfkörper visuell überprüft und vor dem Versuch gegebenenfalls korrigiert werden.

Zu Beginn eines Versuchslaufs wurde der Prüfkörper zwischen den planen polierten Boden des Versuchsaufbaus und den Stempel in die Mitte des transparenten Kunststoffrings eingelegt. Die Materialprüfmaschine wurde so programmiert, dass die Lastzelle den Stempel mit einer konstanten Geschwindigkeit auf den Prüfkörper drückte. Dabei wurde von der Lastzelle der Druck aufgezeichnet, der zwischen Lastzelle und Stempel und somit (zuzüglich des Eigengewichtes des Stempels) auch auf den Prüfkörper wirkte.

Als Punkt des Verlustes der Festigkeit wurde der Punkt im p/t-Spektrum definiert, an dem der Druckanstieg entweder gleich null oder negativ war (der Prüfkörper also stark nachgab).

Für den Druckversuch wurden eine Geschwindigkeit von 0,5 mm pro Minute und eine Vorlast von 1 N gewählt. Der Abbruch des Versuchs wurde für eine Belastung der Lastzelle mit 499 N programmiert, da dies dem maximalen Messbereich der Zelle entsprach.

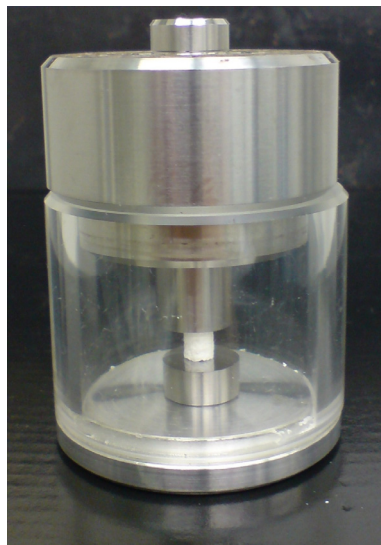


Abb. 2.8.
Pressling im Versuchsaufbau zur linearen Applikation des Pressdrucks bei visueller Kontrollmöglichkeit.

2.2.3. Zellversuch

2.2.3.1. Die Osteoblastenkultur – Gewinnen und Kultivieren der Osteoblasten

Für die Zellversuche wurden primäre osteoblastenähnliche Zellen verwendet. Die Zellen wurden aus dem Periost der Metacarpalia von Kälbern gewonnen.

Das für die Zellgewinnung benutzte Verfahren ist in der Arbeitsgemeinschaft Tissue Engineering und Biomineralisation standardisiert worden. Es geht auf Arbeiten von Jones und Boyde zurück (Jones et Boyde 1977).

Das Periost wurde unter sterilen Kautelen gewonnen und in verschiedenen Lösungen von „Earl’s Salzen“ (in den Arbeitsanweisungen der Arbeitsgruppe Earl’s Salze I und II genannt) bei einer Temperatur von 37 °C gespült. Die jeweiligen Lösungen unterschieden sich dabei durch die Konzentration von Salzen voneinander, einerseits durch den Zusatz von 7,5 % NaHCO₃ (Earl’s Salze I, Earl’s Salze, Merck, Darmstadt) sowie andererseits durch den Zusatz von Amphotericin B und Streptomycin (Earl’s Salze II, ebenfalls Merck, Darmstadt, Zusatzstoffe von Biochrom, Berlin). Die Kontaktdauer mit der Salzlösung betrug für beide Lösungen unter ständigem Rühren 10 Min.

Die so vorbehandelten Perioststreifen verfügten über eine glatte, ursprünglich dem Bindegewebe zugewandte Seite, und eine klebrige, osteogene Seite, die in vivo dem Knochen anlag. Mit dieser osteogenen Seite wurden sie nach weiterer Zerkleinerung in quadratische Stücke für 20 Min. ohne Medium in eine Zellkulturschale gelegt, um anzuhafte. Erst nach dem Anhaften, durch das ein guter Kontakt zwischen dem Periost und dem Boden der Zellkulturschale als neuem Substrat für die auswachsenden osteoblastenähnlichen Zellen entstand, wurde das Medium MMO f hinzugefügt.

Mit MMO f ist das filtrierte Medium MMO gemeint, das angehängte „f“ dient der besseren Unterscheidung während des Gebrauchs. Das verwendete MMO wurde aus 500 ml High GEM (ICN Biochemicals, Eschwege), 60 ml fetalem Kalbsserum (FKS, Biochrom, Berlin) sowie jeweils 5 ml Glutamin, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B (alle ebenfalls Biochrom, Berlin) angesetzt.

Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, einer Umgebungsluftfeuchtigkeit von 100 % und einem Kohlendioxidgehalt der Atmosphäre von 5 % im Brutschrank. Mit wöchentlichem Mediumwechsel von jeweils 20 ml MMO f wurden die Periostrücke nach 2 bis 3 Wochen entnommen. Die ausgewachsenen Zellen bildeten nach 3 bis 5 Wochen eine durchgängige einlagige Schicht (Monolayer).

Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen abgelöst und für den Versuch vorbereitet. Zu diesem Zweck wurde die Zellschicht 20 Min. mit dem Enzym Kollagenase behandelt, zweimal mit calcium- und magnesiumfreier Phosphatpufferlösung gewaschen und anschließend eine Thyrodelösung hinzugegeben. Die so abgelösten Zellen wurden 10 Min. bei 500 UpM zentrifugiert, der Thyrodeüberstand wurde anschließend abpipettiert. Zeitgleich erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration und die Bestimmung der durchschnittlichen Zellgröße (ein genereller Hinweis auf den Zustand der Zellen) im Casy1, Modell TT (Schärfe Systems, Reutlingen).

Durch die Ermittlung der Zellzahl war die Herstellung einer Zellsuspension mit definiertem Zellgehalt möglich, um die Presslinge im Zellversuch gleich stark mit Zellen zu besiedeln. Als Medium wurde dabei erneut MMO f verwendet.

2.2.3.2. Markieren von osteoblastenähnlichen Zellen mit CM-Dil

Durch die Behandlung der Zellen mit dem Carbocyaninmembranmarker CM-Dil war es möglich, die osteoblastenähnlichen Zellen langfristig zu markieren. Der Farbstoff wird in der Zellmembran eingelagert und verbleibt bei der Zellteilung in den daraus hervorgehenden Zellen. Somit kann beispielsweise im Tierversuch nachgewiesen werden, dass mit dem Substrat eingesetzte, markierte Zellen überlebt und für die Zellteilung geeignete Bedingungen auf dem Substrat vorgefunden haben. Außerdem kann so kontrolliert werden, dass die nach dem Ende des Versuches nachweisbaren Zellen auf die implantierten Zellen zurückgehen und nicht etwa direkt vom Versuchstier stammen.

Chloromethyl-Benzamidodialkylcarbocyanin (so die Langform von CM-Dil) soll das Verhalten der Zellen bei geeigneten Konzentrationen nicht verändern (Kruyt et al. 2003).

Eingefärbte Zellen können unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Durch Licht der Wellenlänge 553 nm (grün) angeregt, wird Licht der Wellenlänge 570 nm (orange) emittiert (siehe Abb. 2.9.). Eine wichtige Rolle beim Färbeprozess spielt DMSO (Dimethylsulfoxid), das die Zellmembran für den Farbstoff permeabel macht. Das Markieren der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen und nach mikroskopischer Kontrolle der zu bearbeitenden Zellen.

Nach Entfernung des Zellmediums und gründlichem Waschen der Zellen mit Phosphatpufferlösung (ohne Ca und Mg) wurden die Zellen mit einer Lösung von CM-Dil und Dimethylsulfoxid in Phosphatpuffer angefärbt. Die Einwirkzeit betrug 5 Min. bei 37° C und anschließend 15 Min. bei 4 °C. Nach erneutem gründlichem Waschen mit Phosphatpufferlösung wurden die Zellen zur Erholung 2 Tage lang im Brutschrank (37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂-Gehalt in der Luft) kultiviert, bevor sie für den Versuch benutzt wurden. Die Behandlung mit Färbungen für lichtmikroskopische Untersuchungen nach dem Fixieren wurde durch CM-Dil nicht beeinträchtigt.

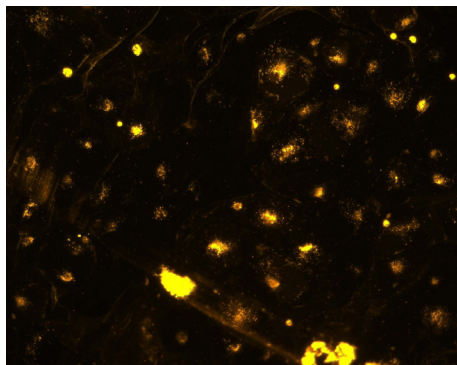


Abb. 2.9. Abgelöste, mit CM-Dil angefärbte Osteoblasten in Kulturschale unter dem Fluoreszenzmikroskop als Kontrollbild für die angefärbten Osteoblasten im Zellversuch (siehe Abb. 3.28. bis 3.40.) Gut erkennbar ist die Fluoreszenz der markierten Zellen.

2.2.3.3. Vorbereitung der Proben für die histologische Auswertung

Fixieren:

Die Proben aus dem Zellversuch wurden direkt nach dem Absaugen des Mediums zweimal jeweils für 5 Min. in Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 3,5 % Glutaraldehydlösung fixiert.

Nach erneutem Waschen (2 x 5 Min.) wurde das Wasser in einer aufsteigenden Alkoholreihe entfernt, jeweils bei einer Einwirkdauer von 10 Min. in 30 %, 50 %, 70 % und 80 % Ethanollösung. Anschließend erfolgte der Einsatz des Intermediums Isopropanol, um das Material optimal für die Einbettung vorzubereiten.

Die Implantate für die rasterelektronenmikroskopische Analyse wurden anschließend bei 1 bar Unterdruck im mit Phosphorpentoxid gefüllten Exsiccator für 24 Stunden getrocknet. Darauf erfolgte das Besputtern mit Gold.

Einbetten/Anfertigung von Schnitten:

Polylactid-Polyglycolid-Copolymer ist sehr empfindlich in Bezug auf das Einbettungsmaterial für die Anfertigung von Dünnschnitten. Vorversuche mit Technovit 9100 (auf PMMA-Basis) sowie Aralditharz waren nicht erfolgreich, da das Monomer von Technovit die Proben auflöste, während das Untersuchen der Proben mit den fluoreszierend eingefärbten Zellen durch die Eigenfluoreszenz und die dunkle Färbung des Araldit erheblich erschwert wurde. Lowicryl konnte ebenso nicht uneingeschränkt genutzt werden, da es in Vorversuchen in der Arbeitsgruppe zu Blasenbildung um das eingebettete PLA-PGA-Copolymer kam. Da Paraffin weder das Copolymer chemisch angreift noch eine Eigenfluoreszenz aufweist, wurde es zur Einbettung verwendet.

Durch die relativ schwache Stabilisierung der Proben im Paraffin und die geringe Adhäsion der selbst sehr harten Sinterpartikel untereinander ergaben sich Besonderheiten bei Einbettung und Schneiden der Proben. So musste eine größere Schnittdicke gewählt werden, um ein Zerkrümeln der Proben einzudämmen. Dennoch war auch bei einer Schichtdicke von 20 µm ein Verlust der Partikeladhäsion der Sinterkörper nicht komplett

zu verhindern. Auf den Paraffinschnitten waren daher vor allem Querschnitte von kleineren Copolymeraggregaten anzutreffen, deren Größe oft im Bereich der ursprünglichen Partikelgröße des gesinterten Materials lag (400 bis 600 μm).

Nach dem Anfertigen der Schnitte sowie der Färbung mit Hämatoxylin und Eosin bestand die nächste Herausforderung in dem Entwässern und Aufhellen der Schnitte vor dem Eindecken, da für diese Schritte nach der Alkoholreihe normalerweise Xylol zur Aufhellung verwendet wird. Xylol erwies sich allerdings als zu aggressiv und löste in Vorversuchen das Copolymer komplett auf, so dass auf Orangenöl als Ersatz zurückgegriffen wurde.

Das Bearbeiten der Proben ab der Alkoholreihe inklusive der Einbettung in Paraffin sowie die Anfertigung der Dünnschnitte erfolgte aus technischen Gründen im Anatomischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Sensitivität des PLA-PGA-Copolymers gegenüber dem in der Arbeitsgruppe eingesetzten Xylol und Ausweichen auf den Ersatzstoff Orangenöl, das die Proben weniger stark, aber immer noch leicht auflöste, sowie ein erhöhter Schwierigkeitsgrad beim Anfertigen der Schnitte aus dem sehr instabilen Polymer-Paraffin-Block).

Anfertigung der Färbung

Nach dem Befestigen der Dünnschnitte auf den Objektträgern wurden diese zur lichtmikroskopischen Auswertung mit Hämatoxylin-Eosin eingefärbt.

Dafür wurde zuerst das Paraffin mit Orangenöl aus den Schnitten herausgelöst (zweimal für jeweils 10 Min.). Anschließend erfolgte die Entfernung des Lösemittels in der absteigenden Alkoholreihe (zweimal für 5 Min. mit 100 % Alkohol, zweimal für 5 Min. mit 96 % Alkohol und einmal für 5 Min. mit 70 % Alkohol). Die restlichen Spuren des Lösemittels und des Alkohols wurden darauf mit destilliertem Wasser (einmal für 10 Min.) entfernt.

Auf das Färben mit Hämatoxylin (einmal für 10 Min.) folgte das Bläuen in fließendem Leitungswasser (für 20 Min.) und die Färbung mit Eosin (Einwirkzeit etwa 2 Min.) sowie das Abwaschen der überschüssigen Farbstoffe mit destilliertem Wasser.

Durch kurzen Kontakt mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 % und 96 % Alkohol jeweils nur sehr kurz) wurden die Proben zunächst differenziert (einmal für 5 Min. mit 96 % Alkohol), anschließend kontrolliert und dann dehydriert (zweimal für 10 Min. mit reinem Alkohol). Zuletzt wurde noch einmal mit Orangenöl geklärt, bevor die gefärbten Schnitte eingedeckt wurden.

Mikroskopieren:

Die Auswertung der Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch mit einem Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena/Oberkochen). Das Mikroskop bot die Möglichkeit, sowohl als konventionelles Durchlichtmikroskop als auch als Auflichtmikroskop mit Licht definierter Wellenlänge zu arbeiten, beispielsweise um fluoreszierende Färbungen wie CM-Dil sichtbar zu machen. Die eingebaute Digitalkamera (AxioCam, Carl Zeiss, Jena/Oberkochen) ermöglichte eine einfache Dokumentation. Die auf dem angeschlossenen PC (Prozessor Pentium 4, Betriebssystem Windows 2000) installierte Software (Axiovision, Carl Zeiss, Jena/Oberkochen) erlaubte sowohl die präzise Steuerung des Mikroskops als auch das Einfügen von Maßstäben in die aufzunehmenden Bilder.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der in der Alkoholreihe entwässerten, im Exsiccator getrockneten und mit Gold besputterten Presslinge wurden im Rasterelektronenmikroskop (PSEM 500 X, Philips) der Arbeitsgruppe angefertigt.

2.2.4. Herstellung einer individuellen defektbezogenen Sinterform

Mithilfe des zuvor seitlich mit Plattenwachs 1 mm dick isolierten Arbeitsmodells aus Mirapont (Hager & Werken, Duisburg, siehe Abb. 2.2.) wurde aus lichthärtendem Kunststoff (LightTray, Ivoclar, Schaan, Liechtenstein) in Scheibenform eine dreiteilige Form angefertigt. Diese wurde flexibel in einem Ring aus hochgefülltem additionsver-

netzendem Dentalsilikon (Provil Novo Putty, Heraeus Kulzer, Hanau) gesichert, der wiederum in eine Kulturschale eingebettet war. Das wenig flexible, hochgefüllte Silikon erfüllte dabei die Funktion der stabilen Einbettung, erlaubte aber dennoch eine leichte Entnahme der Sinterform. Die bei der Aushärtung der Sinterform entstandene Ungenauigkeit wurde mit einer dünnen Schicht leichtgefülltem additionsvernetzendem Dentalsilikon (Provil Novo Light, Heraeus Kulzer, Hanau) unterfüttert, so dass eine sehr genaue Sinterform entstand. Die theoretisch mögliche Genauigkeitsabweichung, die durch eine Verformung des elastischen Abformmaterials unter Druck entstanden sein könnte, wurde bewusst in Kauf genommen, da genau diese elastische Verformung bei der Entnahme der Werkstücke gebraucht wurde, um den Erfolg trotz möglicher leichter Unterschnitte in der Sinterform sicherzustellen. Um den nötigen Pressdruck beim Sintern gleichmäßig ausüben zu können, wurde mithilfe der Doppelmischabformung für das Arbeitsmodell ein Stempel aus Mirapont (Hager Werken, Duisburg) hergestellt, der den Umriss der Sinterform hatte. Die herstellungsbedingte Struktur an der Unterseite (sie stellt den Boden der Sinterform als Positiv dar) wurde plan geschliffen, so dass eine glatte Oberfläche senkrecht zu den Wänden des Stempels entstand. Die individuelle Pressform und der dazu passende Stempel sind in Abb. 2.10. zusammen mit dem Arbeitsmodell dargestellt.

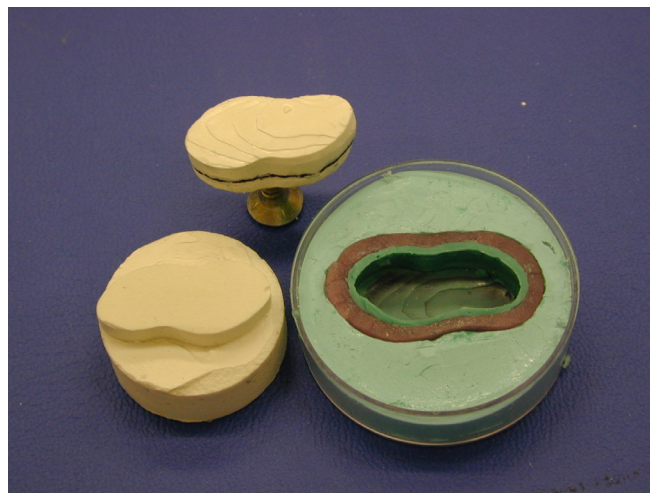


Abb. 2.10.
Kopie des Stereolithographiemodells (Arbeitsmodell) mit Pressform und dem plan geschliffenen Stempel.

2.2.5. Alternative Herstellung eines Implantates durch Aufschäumen

Eine weitere Möglichkeit der Erstellung eines individuell nach einem Knochendefekt mit Hilfe einer Form geschaffenen Knochenersatzes macht sich sowohl die Löslichkeit des PLA-PGA in Methylenchlorid als auch den niedrigen Siedepunkt der Chemikalie zunutze.

Da ein Gemisch aus Methylenchlorid und Methanol (reines Methylenchlorid löst PLA-PGA-Copolymer sehr rasch auf und kann für eine bessere Kontrolle im Verhältnis 1:1 mit Methanol verdünnt werden) bei 1 bar Unterdruck schon bei Raumtemperatur (22 °C) verdampft, kann das in dieser Mischung aufgelöste Copolymer unter diesen Bedingungen aufgeschäumt werden.

Zuerst wurde die individuelle Pressform benutzt, die schon für die Herstellung der individuellen Presslinge Verwendung fand (siehe Abb. 2.10.). Um ein gleichmäßigeres Entweichen des Lösemittels zu gewährleisten, wurde zudem eine Abformung (Provil Novo Putty und Light, Heraeus Kulzer, Hanau) mit eingeschnittenen Rillen verwendet. Diese Rillen werden nachfolgend Evakuierungskanäle genannt.

Das Copolymer (Resomer[®] RG 50:50 H) wurde in der Methylenchlorid-Methanol-Lösung (1:1) aufgelöst. Durch das Anlegen eines Unterdrucks von 1 bar im Exsiccator wurde die Siedetemperatur unter Raumtemperatur erniedrigt, so dass das Lösemittel in der Copolymerlösung verdampfte. Das Ergebnis war ein Schaum mit vielen Poren, der nach der vollständigen Entfernung des Methylenchlorids im mit Phosphorpentoxid gefüllten Exsiccator nach 24 Stunden bei 1 bar Unterdruck stabil war.

2.2.6. Mechanische Bearbeitung von Copolymerimplantaten

Einige der Doppelsinterpresslinge wurden für die Planung eines in vivo Versuchs mit runden Kanälen versehen. Diese besaßen einen Durchmesser von 1 mm und verbanden die Oberseite der angefertigten individuellen Presslinge mit deren Unterseite. Für die Schaffung der Kanäle wurde ein Rosenbohrer aus dem zahntechnischen Bereich (Hager

und Meisinger, Neuss) in einem zahntechnischen Mikromotorhandstück (MF Perfekta, W&H, Bürmoos, Österreich) verwendet. Aufgrund der relativ schwachen Partikeladhäsion wurden vor allem komplette Partikel aus dem Sintergefüge entfernt, was zu rauen Schnittkanten führte (vgl. Abb. 2.11.).



Abb. 2.11.
Individuelles Doppelsinterimplantat mit eingefrästen Kanälen.
Die Wände der Kanäle sind unregelmäßig und rau.
Zustand vor der Bearbeitung der Außenflächen.

Die Nachbearbeitung des aufgeschäumten individuellen Copolymerimplantates im Bereich der Evakuierungskanäle wurde ebenfalls teilweise mit dem zahntechnischen Mikromotorhandstück durchgeführt, allerdings wurde dafür eine grobe Hartmetallfräse (Hager und Meisinger, Neuss) verwendet.

Kleinere Kanten wurden außerdem mit einem Einmalskalpell bearbeitet.

3. Ergebnisse

Grundsätzliche Anforderungen an ein individuell anpassbares Knochenersatzmaterial sind Dimensionstreuung bei der Herstellung, ein funktionierendes Puffersystem, ausreichende mechanische Stabilität und interkonnektierende Porosität sowie Verträglichkeit des Materials gegenüber den anzusiedelnden Zellen.

3.1. Dimensionstreuung der Presslinge

Ausgehend von der Beobachtung, dass die aus PLA-PGA-Copolymer gesinterten Werkstücke alle mehr oder weniger stark schrumpften oder taillierte Einziehungen aufwiesen, ergab sich die Frage, welche Maßnahmen anzuwenden sind, um eine ausreichende Dimensionstreuung bei gleichzeitig optimierten biologischen Eigenschaften sicherzustellen.

Somit erscheint es sinnvoll, die Ergebnisse der Untersuchungen auf Dimensionstreuung für einfach und doppelt gesinterte Presslinge getrennt darzustellen. Um die Volumeneffekte der Presslinge besser beschreiben und einordnen zu können, wurde im Rahmen der Arbeit eine Klassifikation entwickelt.

Die Verformung der Presslinge in den KBr-Pressformen kann grob schematisch in 3 verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die komplette Abwesenheit von Volumenänderung - also ein gleichmäßiger Durchmesser - entspricht dabei der **Klasse 1**. In der **Klasse 2** werden die Presslinge zusammengefasst, die eine mittige Taille aufweisen, während Ober- und Unterseite den Durchmesser der Pressform beibehalten haben. Presslinge, die eine zusätzliche Veränderung des Durchmessers der Ober- oder Unterseite oder beider Seiten aufweisen, entsprechen der **Klasse 3**, bei diesen muss von einer stärkeren Kontraktion ausgegangen werden (siehe Abb. 3.1.).

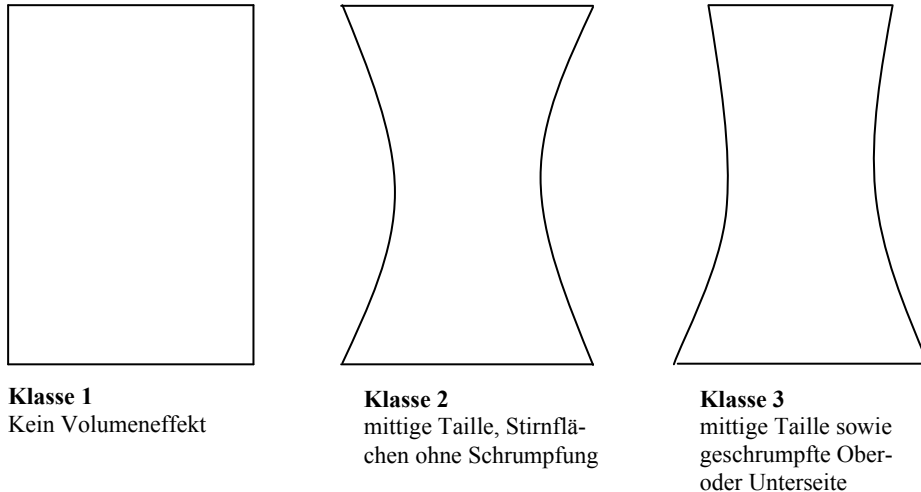


Abb. 3.1.
Klassifikation der Volumeneffekte an den Presslingen

3.1.1. Dimensionstreue der Presslinge aus einfach gesintertem Copolymer

Insgesamt wurden 82 zylindrische Presslinge aus einfach gesintertem Material vermessen, davon waren 7 mit dem Puffersystem aus Calciumcarbonat versetzt, 75 Presslinge bestanden also aus reinem Copolymer. Darüber hinaus wurden 70 der 82 Presslinge mit einem Durchmesser von 5 mm hergestellt und 12 mit einem Durchmesser von 13 mm. Besonderer Wert wurde auf die Dimensionstreue von 4 weiteren Presslingen aus der individuellen dem Stereolithografiemodell nachempfundenen Sinterform (CC 024 bis CC 027) gelegt. Da diese aufgrund ihrer dreidimensional komplexeren Form nicht mit der für die zylindrischen Presslinge angewandten Formel auswertbar waren, werden sie nicht in der Tabelle 1 aufgeführt.

Von den ersten 22 Presslingen (in Tabelle 1 „Erste Versuche“ genannt), die hergestellt wurden, um die Abhängigkeit von Pressdruck auf die Stabilität und die Porosität zu untersuchen, wies nur einer keine erkennbare Schrumpfung auf und hatte daher überall einen Durchmesser von 5 mm (Klasse 1). Die restlichen 21 Presslinge teilten sich in 7 Stück der Klasse 2 und 14 der Klasse 3 auf. Die ermittelte Porosität der Presslinge wich dabei um bis zu 87 % vom Durchschnitt (30,50 % Porosität) ab.

Anhand dieser Versuchsreihe wurde die Standardprozedur für die Sinterung von ungesintertem Copolymer erarbeitet. Diese sieht eine Sintertemperatur von 57 °C bei einer

Presszeit von 3 Min., eine Verweildauer der Form ohne zusätzlichen Druck im Durchluftwärmeschrank von 20 Min. und eine Abkühlzeit von 10 Min. vor, nach der der Pressling vorsichtig aus der Form entfernt werden konnte.

Die folgenden 32 Presslinge, die ebenfalls ohne den Zusatz von Calciumcarbonat hergestellt worden sind, wurden nach der Standardprozedur für Versuche innerhalb der Arbeitsgruppe angefertigt, sie tragen daher die Bezeichnung DV 01 bis DV 32:

- Von den 32 Presslingen waren 16 dimensionsstabil nach Klasse 1, bei den restlichen 16 konnte eine Taille oder auch ein verminderter Durchmesser an einer Kopfseite gemessen werden (je 8 Stück nach Klasse 2 und Klasse 3). Die mittlere Porosität betrug 59,23 %, die größte Abweichung (abgesehen von DV 01, an dem eine Überhitzung der Pressform nicht ausgeschlossen werden kann) betrug 26,78 %.

Bei weiteren 25 Presslingen, NV 2.1 bis NV 3.8 sowie SE 1.1 bis SE 2.4 wurden sowohl der Durchmesser der Sinterform als auch das Puffersystem variiert. Es kamen Durchmesser von 5 und 13 mm sowie PLA-PGA-Copolymer mit 20 % Calciumcarbonat und ohne Puffer zum Einsatz:

- Die 16 Presslinge der Reihe NV 2.1 bis NV 3.8 hatten einen Durchmesser von 5 mm und wurden ohne Calciumcarbonatzusatz angefertigt. Zwölf der Implantate gehörten der Klasse 1 an, 3 der Klasse 2 und einer war der Klasse 3 zuzuordnen. Die mittlere Porosität betrug 65,34 %, die größte Abweichung lag bei 17,70 %.
- Bei den 5 Implantaten SE 1.1 bis SE 1.5 (13 mm Durchmesser, kein Puffersystem) war keiner der Klasse 1 zuzuordnen, einer gehörte der Klasse 2 an, 4 Presslinge waren in die Klasse 3 einzuordnen. Die durchschnittliche Porosität betrug 69,10 %, die größte Abweichung davon betrug 6,90 %, alle anderen Presslinge dieser Reihe lagen innerhalb von 5 % Abweichung.
- Die 4 Presslinge SE 2.1 bis SE 2.4 (13 mm Durchmesser, Beimischung von 20 % Calciumcarbonat) gehörten alle vier der Klasse 3 an. Die mittlere Porosität betrug dabei 64,95 %, alle blieben innerhalb der Abweichung von 5 %.

Zusammengefasst waren von den mit der Standardprozedur bei 57 °C gesinterten Presslingen mit und ohne Pufferzusatz in der 5-mm-Form, also von den Versuchsreihen DV und NV, 58,3 % (28 von 48) ohne erkennbare Kontraktion, von den Presslingen mit und ohne Calciumcarbonatbeimischung in der 13-mm-Form (Versuchsreihe SE 1.1 bis 2.4) war keiner kontraktionsfrei. Es liegt also die Vermutung nahe, dass auch die Presslinge aus der 5-mm-Form nicht frei von Volumeneffekten waren, diese allerdings unterhalb der Messtoleranz (0,1 mm) lagen. Erst bei den größeren Presslingen war demnach die Schrumpfung ausgeprägt genug, dass sie mit der Schieblehre messbar war.

Ergänzend wurde in einem weiteren Versuch (SE 3.1 bis 3.3) mit der 13-mm-Form bei gleicher Zeitabfolge die Sintertemperatur auf 80 °C angehoben. Alle drei Presslinge waren dabei kontraktionsfrei (der Klasse 1 zuzuordnen), allerdings waren sie gelb verfärbt und glänzten an der Oberfläche, so dass ein kompletter Übergang des oberflächlichen Copolymers in den Glaszustand vermutet werden musste. Der Glanz an der Oberfläche wurde als Hinweis auf zumindest oberflächlich verschmolzene Poren und damit auf fehlende Eignung für die Besiedlung mit Zellen angesehen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse in Bezug auf Schrumpfung und Porosität noch einmal in tabellarischer Form (Tabelle 1) dargestellt:

Tabelle 1

Klassifikation der Presslinge aus Einfachintercopolymer nach ihrer Volumenänderung (siehe Abb. 3.1.). Während ein Großteil der Presslinge aus der 5 mm breiten Form der Klasse 1 zuzuordnen war, war keiner der Presslinge aus der 13 mm breiten Form ohne Schrumpfung gemäß Klasse 1. Ein Einfluss der Beimischung von CaCO₃ als Puffersystem auf die Schrumpfung kann nicht festgestellt werden. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Presslinge	Puffer (CaCO ₃)	Durchmesser	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	durchschnittliche Porosität	maximale Abweichung
Erste Versuche	ohne	5 mm	1	7	14	30,50 %	87,00 %
DV	ohne	5 mm	16	8	8	59,23 %	26,78 %
NV 2.1 - 3.8	ohne	5 mm	12	3	1	65,34 %	17,70 %
SE 1.1 - 1.5	ohne	13 mm	0	1	4	69,10 %	6,90 %
SE 2.1 - 2.4	mit	13 mm	0	0	4	64,95 %	3,11 %
SE 3.1 - 3.3 (80 °C)	mit	13 mm	3	0	0	55,32 %	8,35 %

Bei den vier Presslingen aus nicht vorgesintertem, mit Calciumcarbonat versetztem Material (cc024 bis cc027), die in der individuell nach dem Stereolithographiemodell hergestellten Pressform entstanden sind, war eine annähernd gleichmäßige Schrumpfung um 20 bis 30 % festzustellen, gleichzeitig waren sie leicht zur Seite des Bodens der Form gekrümmt (siehe Abb. 3.2.1.).



Abb. 3.2.1.

Individueller Pressling aus einfach gesintertem Material, darüber das Stereolithographiemodell. Auffällig sind die starke Schrumpfung und Torsion, aber auch die feine Zeichnung der Terrassen des Presslings (Länge des Stereolithographiemodells 2,2 cm, Maßstab ca. 2:1).

3.1.2. Dimensionstreuung der aus Doppelsintercopolymer hergestellten Presslinge

Insgesamt wurden 93 Presslinge aus vorgesintertem Copolymer in Sinterformen mit den Durchmessern 5 mm und 13 mm vermessen. Zusätzlich wurden 6 Presslinge (cc011 bis cc016, nicht in Tabelle 2 erfasst) in der individuell nach dem Stereolithographiemodell hergestellten Form gesintert und auf Volumeneffekte überprüft.

Drei zusätzliche Presslinge mit einem Formdurchmesser von 5 mm (cc017, cc018 und cc020) wurden ohne Pufferzusatz hergestellt, bei ihnen wurde außerdem das vorgesinterte und gemörserte Copolymer ungesiebt verwendet. Alle drei Presslinge hatten keine feststellbaren Kontraktionen, sie entsprachen alle der Klasse 1. Die durchschnittliche Porosität betrug 52,88 %, alle Presslinge blieben innerhalb von 5 % Abweichung. Auch diese Presslinge dienten der experimentellen Untersuchung der optimalen Bedingungen und sind deshalb nicht in Tabelle 2 erfasst.

Bei allen weiteren Presslingen in KBr-Pressformen wurde das Basisgranulat nach der Partikelgröße aufgeteilt, aus Anschaulichkeitsgründen wurde eine Unterteilung in sechs Gruppen gewählt.

Die **erste Gruppe** bestand aus 15 Presslingen mit der Partikelgröße von 150 bis 315 μm , der Druck betrug 20 N/cm^2 , die Parameter für Pressen, Sintern und Abkühlen betragen 3, 30 und 5 Min.. Insgesamt wurden 9 Presslinge mit dem Durchmesser von 13 mm und 6 Stück mit dem Durchmesser von 5 mm hergestellt. Die Presslinge mit 13 mm Durchmesser (DS 1.01 bis DS 1.04, DS 1.13 und DS 1.14 sowie DS 1.19 bis DS 1.21) waren alle frei von Volumeneffekten gemäß Klasse 1, die durchschnittliche Porosität betrug 51,13 %, die maximale Abweichung war 35,22 %, nur ein Pressling blieb innerhalb einer Abweichung von 5%. Die Presslinge mit 5 mm Durchmesser (DS 2.01 bis DS 2.03 sowie DS 2.12 bis 2.14) waren ebenfalls alle frei von (nicht maßstäblicher) Schrumpfung. Ihre durchschnittliche Porosität betrug 53,54 % bei einer maximalen Abweichung von 17,39 %. Drei Presslinge (also die Hälfte) blieben innerhalb einer Grenze von 5 % Abweichung.

Die **zweite Implantatgruppe** bestand aus 14 Presslingen, deren Basisgranulat die Partikelgröße von 315 bis 400 μm abdeckte. Die Parameter für Pressen, Sintern, Abkühlen und Druck waren mit denen der ersten Reihe (20 N/cm^2) identisch. Auch in dieser Versuchsreihe wurden wieder 9 Presslinge mit einem Durchmesser von 13 mm hergestellt, aber nur 5 Stück mit einem Durchmesser von 5 mm. Die Presslinge mit 13 mm Durchmesser (DS 1.05 bis DS 1.08, DS 1.15 und DS 1.16 sowie DS 1.22 bis DS 1.24) entsprachen alle der Klasse 1, die durchschnittliche Porosität lag bei 56,74 %. Nur 3 der insgesamt 9 Presslinge (33 %) lagen innerhalb einer Toleranz von 5 % zu diesem Wert, 4 weitere lagen unterhalb von 6 % und auch die maximale Abweichung war mit 13,73 % (DS 1.22) eher gering. In den Versuchen mit derselben Partikelgröße, aber 5 mm Durchmesser (DS 2.04, DS 2.05 sowie DS 2.15 bis DS 2.17), entsprachen ebenfalls alle fünf Presslinge der Klasse 1, die durchschnittliche Porosität lag mit 56,25 % sehr nah am Wert der Presslinge mit 13 mm Durchmesser. Nur einer der fünf Presslinge lag innerhalb einer Toleranz von 5 % zu diesem Wert, ein weiterer wich davon nur unwesentlich (5,20 % bei DS 2.17) ab, alle weiteren lagen innerhalb von 8 % Toleranz, der maximale Wert der Abweichung betrug 7,97 % (DS 2.04).

In der **dritten Gruppe** wurde vorgesintertes PLA-PGA-Copolymer mit zwanzigprozentigem Zusatz von Calciumcarbonat mit einer Partikelgröße zwischen 400 und 600 μm verwendet. Die Parameter für Pressdruck sowie alle zeitlichen Parameter waren mit den anderen Versuchsreihen identisch. 9 Presslinge wurden mit einem Durchmesser von

13 mm hergestellt, 14 mit 5 mm Durchmesser. Weitere 9 Presslinge mit 5 mm Durchmesser wurden für den Zellversuch der Arbeit hergestellt (daher die Bezeichnung CV), sie werden separat beschrieben. Alle Presslinge mit dem Durchmesser von 13 mm (DS 1.09 bis DS 1.12, DS 1.17 und DS 1.18 sowie DS 1.25 bis DS 1.27) waren frei von Volumeneffekten gemäß Klasse 1. Die durchschnittliche Porosität lag bei 56,58 %, 6 der 9 Presslinge (66 %) lagen innerhalb der Abweichungsgrenze von 5 %, die maximale Abweichung betrug 10,89 %. Die Presslinge mit 5 mm Durchmesser dieser Partikelgröße (DS 2.06, DS 2.07, DS 2.18 bis DS 2.20 sowie CV 1.01 bis CV 1.09) entsprachen ebenfalls alle der Klasse 1, hatten also keine Taille durch Schrumpfung. Die mittlere Porosität der Reihe DS mit 5 mm Durchmesser betrug 55,34 %, die maximale Abweichung lag bei 14,03 %. Drei der 14 Presslinge (21 %) lagen innerhalb einer Abweichung von 5 %. Die durchschnittliche Porosität der Reihe CV betrug 54,85 %, die maximale Abweichung 20,12 %. Drei der 9 Presslinge (33 %) lagen innerhalb einer Abweichung von 5 %. Ein weiterer Pressling (CV 1.10) wurde nicht in die Statistik aufgenommen, da die Porosität von 12,63 % außergewöhnlich stark (um 76,86 %) vom Mittelwert abweicht.

Die **vierte Gruppe** bestand aus 6 Presslingen mit einem Durchmesser von 13 mm und 17 Presslingen mit einem Durchmesser von 5 mm. Das Basisgranulat hatte dabei eine Partikelgröße von 600 bis 800 µm, die Parameter für die Behandlung waren identisch mit denen der anderen Doppelsinterversuchsreihen. Sämtliche Presslinge mit dem Durchmesser von 13 mm (DS 1.28 bis DS 1.33) entsprachen der Klasse 1. Die durchschnittliche Porosität betrug 57,80 %, 2 von 6 Presslingen (33 %) blieben innerhalb einer Abweichung von 5 %, die maximale Abweichung lag bei 17,97 %. Die Presslinge mit 5 mm Durchmesser (DS 2.08, DS 2.09, DS 2.21 bis DS 2.23 sowie DS 3.02 bis DS 3.13) hatten ebenfalls alle keine Taille (entsprechend Klasse 1). Die durchschnittliche Porosität lag bei 56,50 %, die maximale Abweichung betrug 17,72 %. Bezogen auf ihre Porosität lagen 9 der 13 Presslinge (69 %) innerhalb einer Abweichung von 5 %. Ein Pressling (DS 3.01) wurde aufgrund seiner starker Abweichung (um 54,43 %) nicht in die Statistik aufgenommen.

In der **fünften Implantatgruppe** wurden 4 Presslinge mit einem Durchmesser von 13 mm und 5 mit 5 mm Durchmesser aus Granulat mit einer Partikelgröße zwischen 800 und 1000 µm mit den etablierten Parametern für Druck (20 N/mm²) und Zeit

(3-30-5) hergestellt. Die 13-mm-Presslinge (DS 1.34 bis DS 1.37) wiesen alle keine Volumeneffekte gemäß Klasse 1 auf. Die mittlere Porosität betrug 57,17 %, nur einer von vier Presslingen (25 %) lag innerhalb von 5 % Abweichung, die maximale Abweichung betrug 12,45 %. Die 5-mm-Presslinge (DS 2.10 und DS 2.11 sowie DS 2.24 bis DS 2.26) hatten ebenfalls alle keine Taille (Klasse 1). Die mittlere Porosität betrug 47,82 %, zwei von fünf Presslingen lagen innerhalb von 5 % Abweichung und die maximale Abweichung betrug 12,27 %.

Die Ergebnisse der ersten fünf nach Partikelgröße eingeteilten Gruppen können tabellarisch wie folgt ausgewertet werden (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2

Klassifikation der Presslinge aus vorgesintertem PLA-PGA-Copolymer nach ihrer Volumenänderung (s. Abb. 3.1.). Die einzelnen Versuchsreihen wurden dem Durchmesser entsprechend unterteilt. Alle Presslinge mit dem Durchmesser 5 mm und 13 mm waren frei von Volumeneffekten und somit der Klasse 1 zuzuordnen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Presslinge	Puffer (CaCO ₃)	Durchmesser	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	durchschnittliche Porosität	maximale Abweichung
DS 150 - 315 µm	mit	13 mm	9	0	0	51,13 %	35,22 %
DS 150 - 315 µm	mit	5 mm	6	0	0	53,54 %	17,39 %
DS 315 - 400 µm	mit	13 mm	9	0	0	56,74 %	13,73 %
DS 315 - 400 µm	mit	5 mm	5	0	0	56,25 %	7,97 %
DS 400 - 600 µm	mit	13 mm	9	0	0	56,58 %	10,89 %
DS 400 - 600 µm	mit	5 mm	14	0	0	55,34 %	14,03 %
CV (400 - 600 µm)	mit	5 mm	9	0	0	54,85 %	20,12 %
DS 600 - 800 µm	mit	13 mm	6	0	0	57,80 %	17,97 %
DS 600 - 800 µm	mit	5 mm	17	0	0	56,50 %	17,72 %
DS 800 - 1000 µm	mit	13 mm	4	0	0	57,17 %	12,45 %
DS 800 - 1000 µm	mit	5 mm	5	0	0	47,82 %	12,27 %

In der **sechsten Gruppe** aus vorgesintertem Copolymer mit Pufferzusatz, allerdings ohne Verwendung einer definierten Partikelgröße, wurden 6 Presslinge (cc011 bis cc016) in der individuellen nach dem Stereolithographiemodell geformten Pressform hergestellt. Alle 6 Presslinge wiesen keine Schrumpfung auf, die Stabilität war verglichen mit den Presslingen aus ungesintertem Copolymer etwas schlechter. Eine Krümmung der Presslinge, die auf einen nicht maßstäblichen Volumeneffekt hinweisen könnte, wurde nicht festgestellt (siehe Abb. 3.2.2.).



Abb. 3.2.2.
Individueller Pressling aus Doppelsintercopolymer, darüber das Stereolithographiemodell.
Der Pressling entspricht in seinen Abmessungen exakt dem Originalmodell (Länge der Presslinge jeweils 2,2 cm, Maßstab ca. 2:1).
Auffällig sind die feine Zeichnung der Terrassen sowie die grobe Körnung des Presslings.

3.2. Schwellung und pH-Variation

Während des 14-tägigen Versuchs sank der pH-Wert des Mediums um den Pressling ohne Calciumcarbonat (cc018) von 7,4 auf 6,1. Die größte Veränderung ereignete sich dabei zwischen dem 4. und 7. Tag (Abfall von 7,1 auf 6,4), während sich der pH-Wert zwischen dem 7. und 14. Tag nicht mehr so stark wie zuvor veränderte (von 6,4 auf 6,1).

Der pH-Wert des Mediums im Gefäß des Presslings mit zusätzlichem Calciumcarbonat-Puffersystem (cc020) sank im selben Zeitraum von 7,4 auf 7,0. Die Veränderung erfolgte dabei fast linear. Auffällig war lediglich ein wieder angestiegener Wert am 3. (von 7,4 auf 7,5) und 10. Tag (von 7,2 auf 7,3). Dabei kann es sich allerdings auch um einen Fehler der Interpretation der Farbveränderung des Messstreifens handeln.

Der Verlauf der pH-Werte ist in Abbildung 3.3. graphisch dargestellt.

Das Volumen des ungepufferten Presslings (cc018) stieg von 227,73 mm³ auf 289,49 mm³ an. Das entspricht einem Anstieg um 26 %. Parallel veränderte sich das Volumen des gepufferten Presslings (cc020) um 24 % von 184,57 mm³ auf 229,51 mm³.

Die Volumenzunahme des ungepufferten Presslings war im Vergleich zum gepufferten Pressling am 2. Tag (9 zu 3 %) und am 3. Tag (10 zu 4,1 %) viel stärker. Gerade aufgrund der unterschiedlich starken Schwellung am Anfang ist die annähernd gleich große Schwellung nach 8 Tagen (18 zu 17 %) und am 14. Tag (26 zu 24 %) sehr auffällig.

Der Vergleich der Volumina und ihrer Zunahme ist in Abbildung 3.4. absolut und in Abbildung 3.5. prozentual dargestellt.

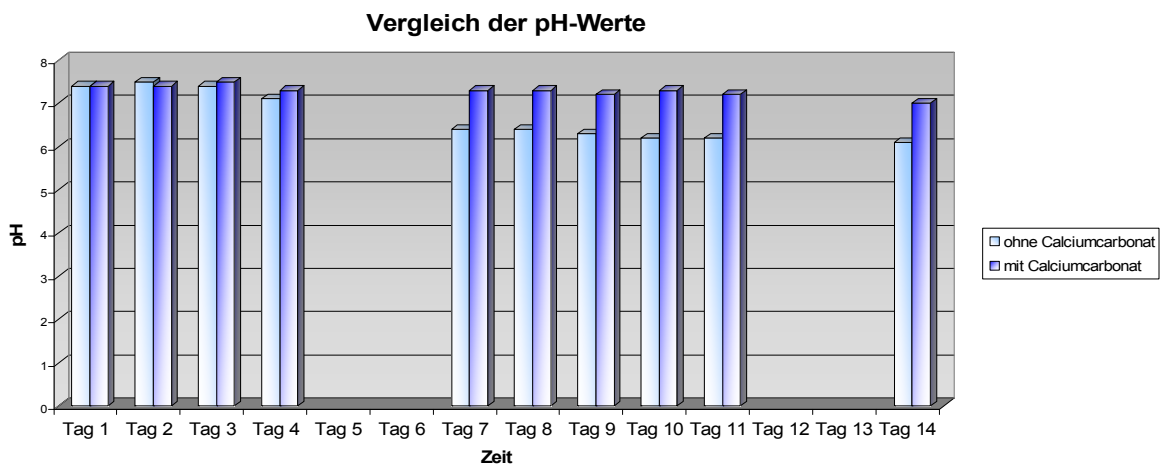


Abb. 3.3.

Verlauf der pH-Werte im direkten Vergleich zwischen ungepuffertem (in hellblau dargestellt) und mit Calciumcarbonat gepuffertem Material (in dunkelblau dargestellt). Es fällt auf, dass der Abfall des pH-Wertes für beide Materialien hauptsächlich in der ersten Versuchswochen erfolgt und sich in der zweiten Woche nur noch gering ändert. Insgesamt sinkt der pH-Wert in der Umgebung des ungepufferten Presslings stärker ab.

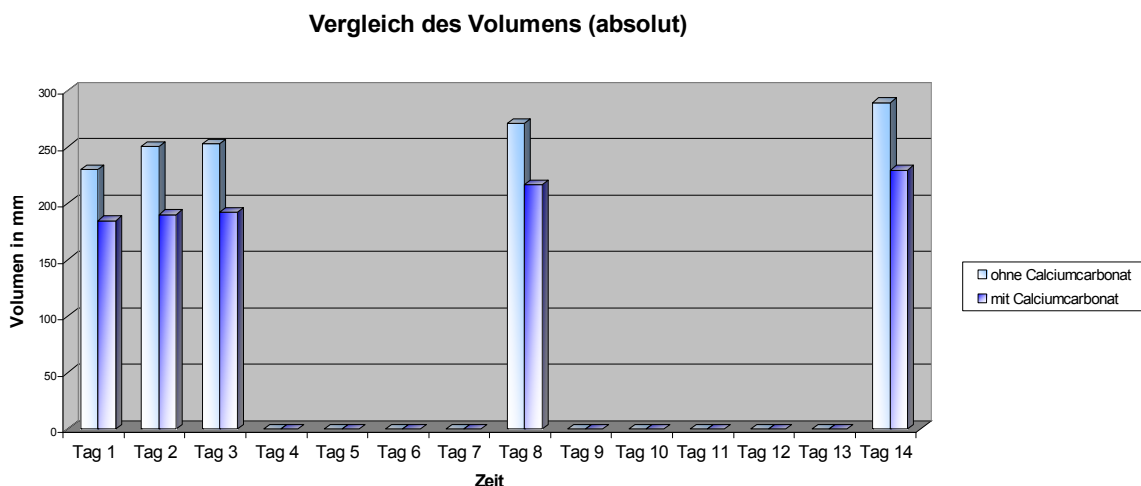


Abb. 3.4.

Anstieg des Volumens des Presslings ohne Puffer (hellblau) und mit CaCO_3 -Puffer (dunkelblau). Die Presslinge haben unterschiedliche Anfangsvolumina. Das Volumen des ungepufferten Presslings nimmt in der Zeit vom ersten zum zweiten Tag stärker zu als das Volumen des gepufferten Presslings.

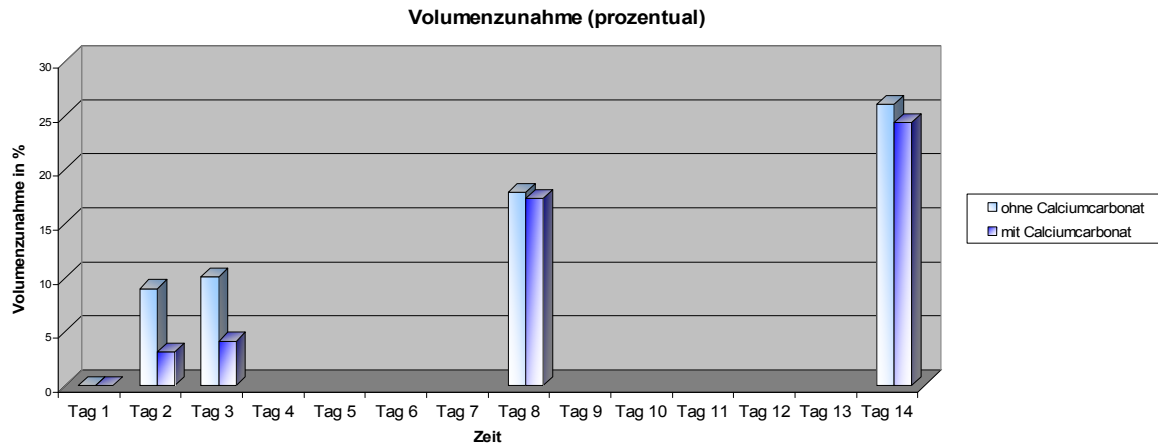


Abb. 3.5.

Prozentuale Volumenzunahme der Presslinge ohne Puffer (in hellblau) und mit CaCO_3 -Puffersystem (dunkelblau). Das Volumen des Presslings ohne Puffer steigt vom ersten zum zweiten Tag stark an, während der gepufferte Pressling in diesem Zeitraum nur schwach anschwillt. Am achten Tag ist die Volumenzunahme des gepufferten Presslings allerdings annähernd identisch mit der des ungepufferten Presslings. Auch am 14. Tag besteht nur ein geringer Unterschied zwischen beiden Presslingen.

3.3. Größe der Poren in Abhängigkeit von der Partikelgröße

Der Versuch hatte das Ziel, die Größe der Poren zu ermitteln, die zwischen den einzelnen aneinander gesinterten Partikeln im Pressling entstanden. Im Vordergrund stand die Beantwortung der Fragen, ob sich der Durchmesser der Poren mit Anstieg der Partikelgröße gleichfalls verändert und bei welcher Partikelgröße eine ausreichende oder optimale Porengröße erreicht werden kann. Deshalb werden nachfolgend zuerst die Ergebnisse der einzelnen Partikelgrößen vor einer abschließenden Zusammenfassung dargestellt.

Da die einzelnen Doppelsintergranulartartikel im Idealfall annähernd rund sind, entstehen bei der Sinterung dieser Partikel keine kugelförmigen Hohlräume, sondern schmale Zwischenräume, die am besten mit Angabe der maximalen Länge (größerer Wert der beiden gemessenen Parameter) und der maximalen Breite (der kleinere Wert) anzuzeigen sind. Die Verbindungslinie zwischen den beiden Punkten der maximalen Breite verläuft dabei senkrecht zur Längelinie.

Um die Porengröße der Presslinge mit der Partikelgröße zwischen 150 und 315 μm zu ermitteln, wurden 3 Presslinge (DS 1.03, DS 1.14a und DS 1.14b) jeweils seitlich und an einer Bruchstelle rechtwinkelig zur Seite untersucht. Dabei konnten 184 Zwischenräume dargestellt und vermessen werden. Der Mittelwert der Porengröße der Presslinge betrug 81 μm in der Länge und 48 μm in der Breite. Die maximale Abweichung des Durchschnittswertes einer Fläche betrug 26 μm für die Länge und 6 μm für die Breite (32,1 % und 7,41 %).

Die Porengröße von Presslingen aus Partikeln mit einem Durchmesser von 315 bis 400 μm wurde an 3 Exemplaren (DS 1.15a, DS 1.15b und X 01) überprüft. Insgesamt wurden 119 Zwischenräume erfasst. Der Mittelwert der Porengröße für diese Presslinge betrug 198 μm für die Länge und 95 μm für die Breite. Die maximale Abweichung des Durchschnittswertes einer Fläche waren 48 μm (24,24 %) für die Länge, gemessen an der Oberfläche des Presslings DS 1.15a, und 11 μm (5,56 %) für die Breite, gemessen an der Bruchfläche an DS 1.15b. Wie auch bei den Presslingen der Partikelgröße 150 bis 315 μm waren die Werte der Bruchflächen etwas kleiner.

Für die 5 untersuchten Presslinge (DS 1.17a, DS 1.17b, DS 1.18a, DS 1.18b und X 02) aus Copolymer mit einem Partikeldurchmesser von 400 bis 600 μm wurde an 167 Zwischenräumen eine durchschnittliche Länge der Poren von 221 μm und eine mittlere Breite von 121 μm ermittelt. Die maximalen Abweichungen des Durchschnittswertes für eine Fläche waren 108 μm (48,87 %) in der Länge an der Oberfläche des Presslings DS 1.17b und 32 μm (26,45 %) in der Breite an der Bruchfläche des Implantats DS 1.17b.

Der Mittelwert der Porengröße des Presslings DS 1.33 mit der Partikelgröße 600 bis 800 μm betrug 328 μm für die Porenlänge und 137 μm für die Porenbreite. Es konnten mikroskopisch 12 Zwischenräume dargestellt und vermessen werden. Die Abweichung der Werte war dabei 114 μm (34,76 %) für die Länge und 11 μm (8,03 %) für die Breite. Der größere Durchschnittswert wurde dabei jeweils an der Oberfläche des Presslings ermittelt, der kleinere an der Bruchfläche.

Die mittlere Länge der 15 vermessenen Poren im Implantat DS 1.37 mit dem Partikeldurchmesser von 800 bis 1000 μm betrug 332 μm , die mittlere Porenbreite lag bei 148 μm . Die Abweichungen waren 135 μm (40,6 %) in der Länge und 12 μm (8,11 %) in der Breite. Auch bei dieser Partikelgröße konnte der größere Durchschnittswert von Länge und Breite auf der Oberfläche festgestellt werden, der kleinere also an der Bruchfläche.

Zur besseren Veranschaulichung werden die genannten Werte in den folgenden Diagrammen (Abb. 3.6. bis 3.11.) dargestellt. Die dargestellten Werte für Länge und Breite (in dunkelblau) sind Durchschnittswerte jeweils einer Seite eines Presslings.

Eine farbige Unterscheidung zwischen Seitenfläche und Bruchkante erfolgt nicht.

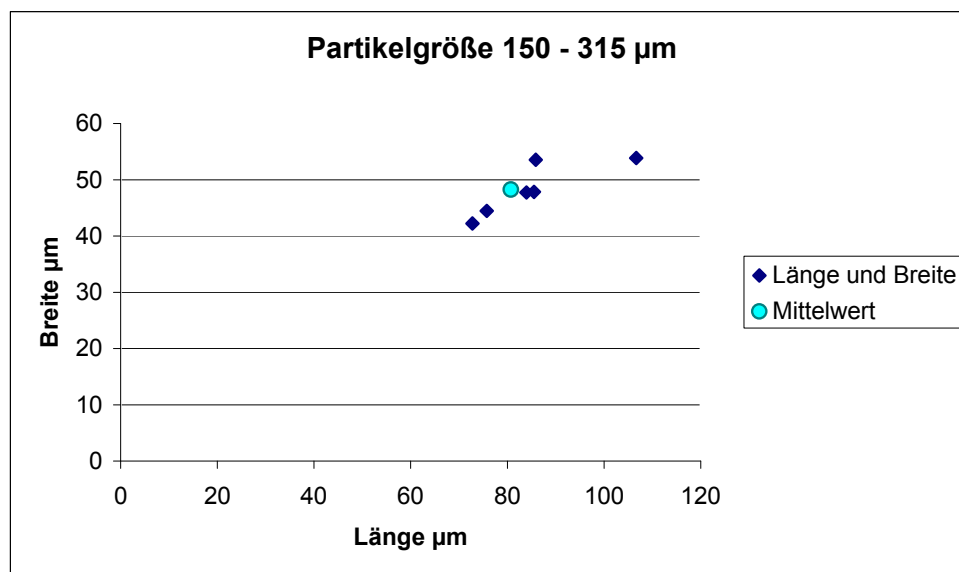


Abb. 3.6.
Ausdehnung der Poren der Presslinge mit der Partikelgröße 150 bis 315 μm .
Der Mittelwert der Porengröße (Länge * Breite) beträgt 81 μm * 48 μm .

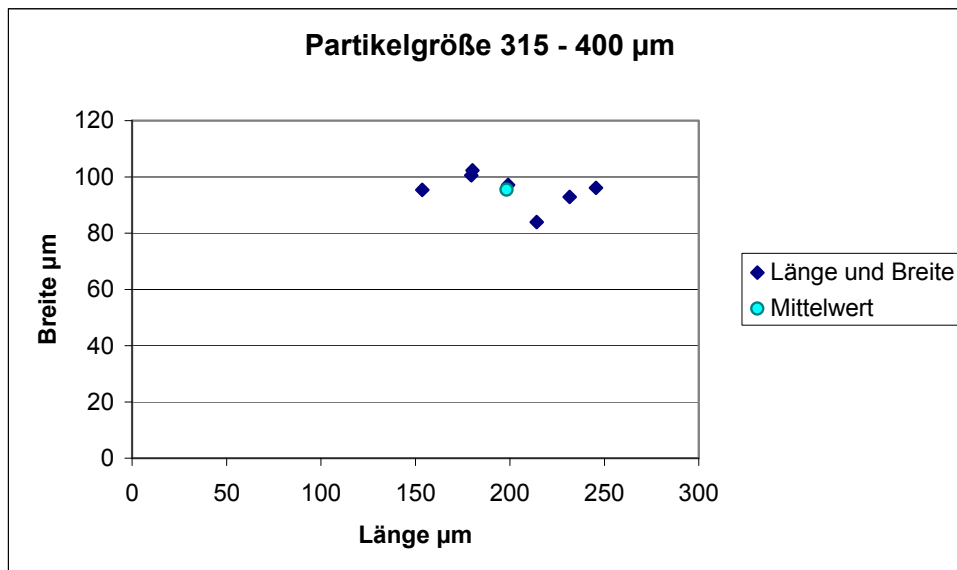


Abb. 3.7.
 Ausdehnung der Poren der Presslinge mit der Partikelgröße 315 bis 400 µm.
 Der Mittelwert der Porengröße (Länge * Breite) beträgt 198 µm * 95 µm.

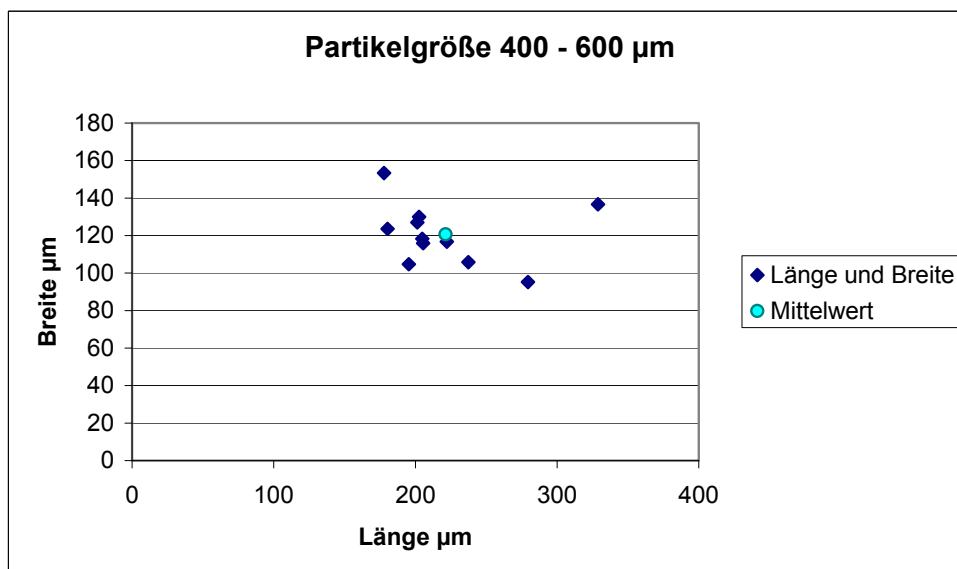


Abb. 3.8.
 Ausdehnung der Poren der Presslinge mit der Partikelgröße 400 bis 600 µm.
 Der Mittelwert der Porengröße (Länge * Breite) beträgt 221 µm * 121 µm.

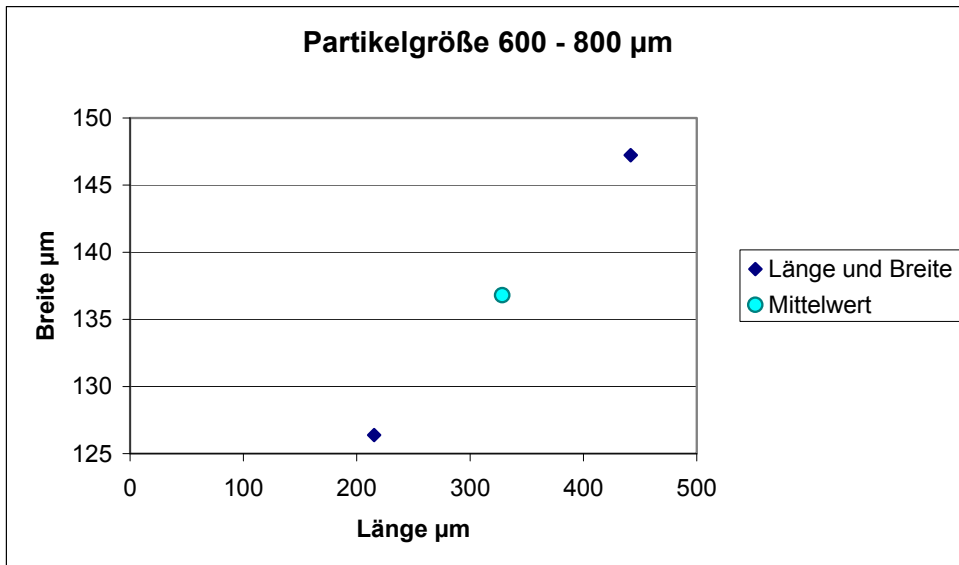


Abb. 3.9.

Ausdehnung der Poren des Presslings mit der Partikelgröße 600 bis 800 µm.

Der Mittelwert der Porengröße (Länge * Breite) beträgt 328 µm * 137 µm.

Die an der Bruchfläche gemessene Porengröße ist erheblich kleiner als die Porengröße an der Oberfläche des Presslings.

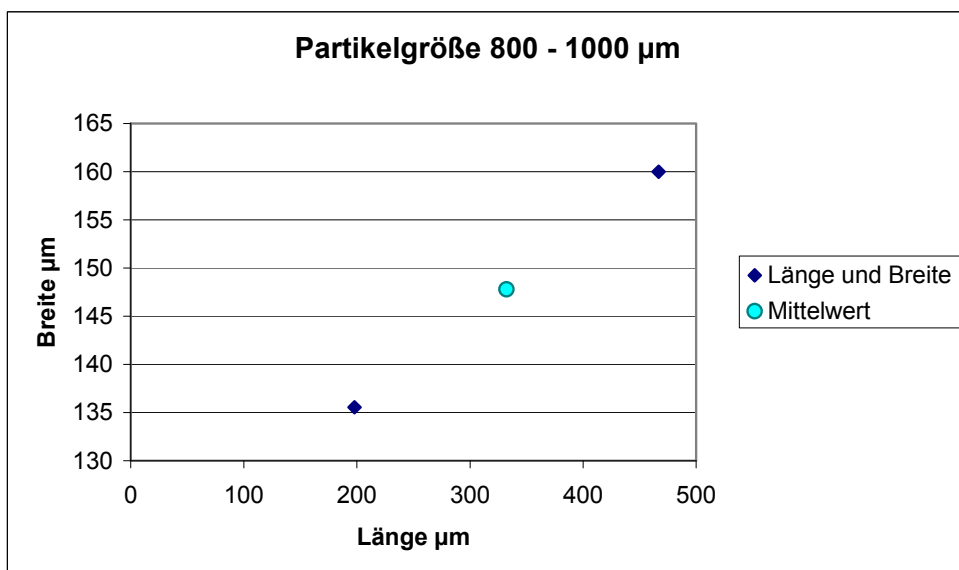


Abb. 3.10.

Ausdehnung der Poren des Presslings mit der Partikelgröße 800 bis 1000 µm.

Der Mittelwert der Porengröße (Länge * Breite) beträgt 332 µm * 148 µm.

Auch bei dem Pressling mit dieser Partikelgröße ist der an der Bruchkante gemessene Wert für die Porengröße kleiner als der an der Oberfläche gemessene.

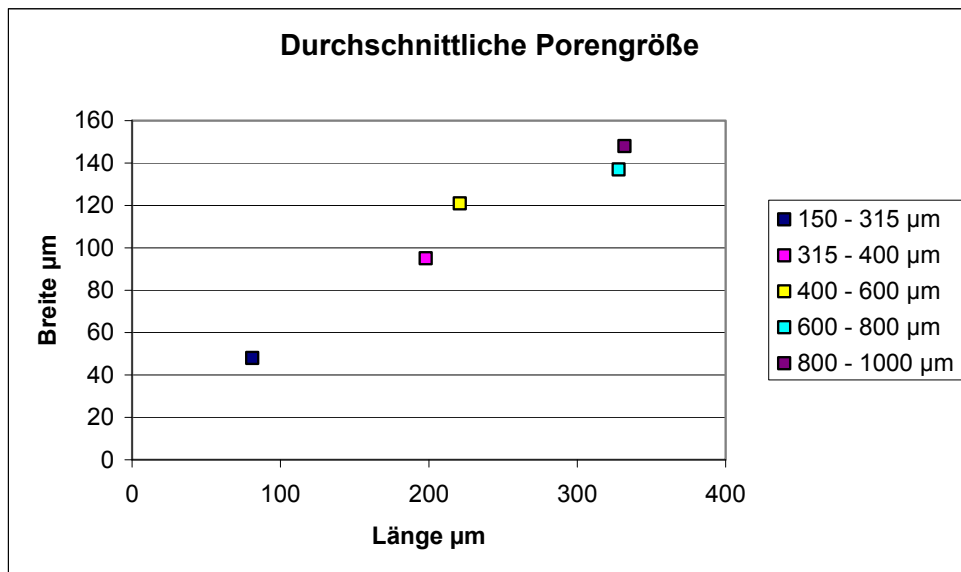


Abb. 3.11.

Die durchschnittliche Porengröße der Presslinge aus Doppelsintercopolymer mit definierten Partikelintervallen. Ein Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Porengröße ist erkennbar.

3.4. Durchgängigkeit der Poren

Die Durchflussrate, also die Menge an Wasser, die nach 120 Min. durch die Presslinge geflossen war, diente der Veranschaulichung der Durchgängigkeit der Poren in den Implantaten (siehe Abb. 3.12). Eine gute Durchgängigkeit stellt die Einwanderung von Zellen sicher und gewährleistet den Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten.

Die Presslinge mit der Partikelgröße 150 bis 315 μm hatten eine Durchflussrate von 10,8 ml pro 120 Min. Die maximale Abweichung betrug dabei 2,1 ml/120 Min. (19,44 %).

Die Partikelgröße 315 bis 400 μm korrelierte mit einer durchschnittlichen Durchflussrate von 16,1 ml in 120 Min. Die Abweichung lag bei 0,8 ml/120 Min. (4,97 %).

Die Implantate aus Copolymer mit einem Partikelintervall von 400 bis 600 μm besaßen eine Durchflussrate von 21,2 ml pro 120 Min. Die größte Abweichung von diesem Durchschnittswert betrug 11,9 ml/120 Min. (56,13 %).

Im Bereich von 600 bis 800 μm Partikeldurchmesser wurde eine durchschnittliche Menge von 22,5 ml bidestilliertem Wasser nach 120 Min. Versuchsdauer im Behälter unter den Presslingen gemessen. Als größte Abweichung wurde 22,1 ml/120 Min. (98,22 %) gemessen.

Die Presslinge aus dem grobkörnigsten Material (Partikelgröße 800 bis 1000 μm) hatten eine mittlere Durchflussrate von 35,7 ml in 120 Min. Die maximale Abweichung betrug 8,2 ml/120 Min. Das entspricht einer prozentualen Abweichung von 22,97 %.

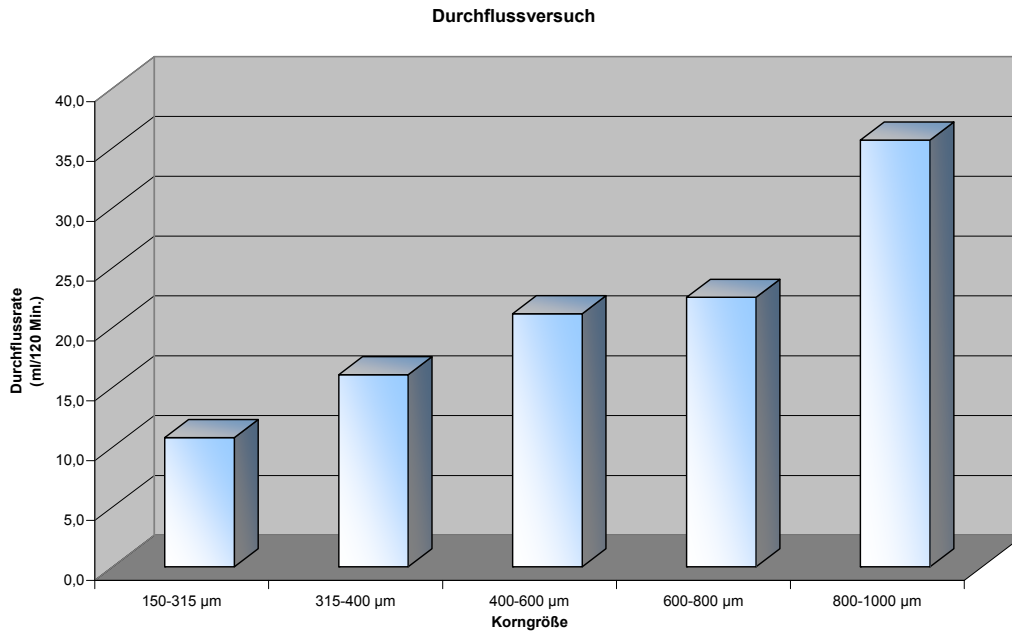


Abb. 3.12. Durchflussrate (gemessen in ml/120 Min.). Die Durchflussrate ist für die einzelnen Partikelgrößen getrennt dargestellt.

3.5. Stabilität der Proben in Abhängigkeit von der verwendeten Partikelgröße

Eine ausreichende Stabilität der Presslinge ist aus mehreren Gründen essentiell für den Einsatz als Knochenersatzmaterial, das im Körper graduell ab- und umgebaut wird. An das Material sollten deshalb bestimmte Mindestanforderungen gestellt werden: Diese sind die Funktion des Materials als Stabilisator einer eventuell über den ausgefüllten Defekt gelegten Membran, eine solide Ortsständigkeit des Materials, die eine gewisse Stabilität voraussetzt und hilfreich für die Osteokonduktivität zu sein scheint, sowie gleich bleibend große stabile Poren, die zudem noch die Stoffwechselfunktion der eingewachsenen Zellen unterstützen können.

Eine gute Druckstabilität des Materials erscheint auch deshalb ideal, da auf diesem Weg ein aufgefüllter Knochendefekt den umgebenden Knochen gegen Druckbelastung entlasten könnte.

Durch die Ermittlung der Stabilität der Presslinge aus den unterschiedlichen Partikelintervallen wurde die ideale Porengröße im Verhältnis zur Stabilität des porösen Materials bestimmt.

Aus diesem Grund wurden die Presslinge einem Test auf Druckbelastung in einer Materialprüfmaschine unterzogen. Die ermittelten Parameter wurden für jeden Pressling in einem Kurvendiagramm ausgewertet.

Im Partikelintervall zwischen 150 und 315 μm wurden 4 Presslinge mit einem Durchmesser von 5 mm auf ihre Stabilität geprüft (DS 2.01a und DS 2.01b, a und b benannt, da in dieser Versuchsreihe zwei Presslinge mit DS 2.01 bezeichnet wurden, sowie DS 2.02 und DS 2.03). Der bei dem Versuch maximal erreichte Druck vor dem Verlust der Integrität lag zwischen 5 N und 40 N. Ein Pressling (DS 2.01a) erreichte zwar eine Belastung von 500 N, der Verlauf der Kurve zeigt aber nach etwa 50 Sekunden bei 20 N eine Abflachung der Kurve mit erst späterem steilen Anstieg, so dass bei einer Druckbelastung von 20 N von einem Bruch mit anschließendem linearen Zerfall in die einzelnen Partikel ausgegangen werden muss. Dafür spricht auch, daß der Pressling nach dem Versuch nicht mehr intakt war (vgl. Abb. 3.13.).

Bei den anderen Presslingen in dieser Reihe fällt der stark gezackte, nicht lineare Kurvenverlauf auf, der ebenfalls ein Zeichen für ein frühes Versagen des Sinterverbundes darstellt (Druckapplikation mit Anstieg der Kurve und nachfolgendem partiellen Ausgleich).

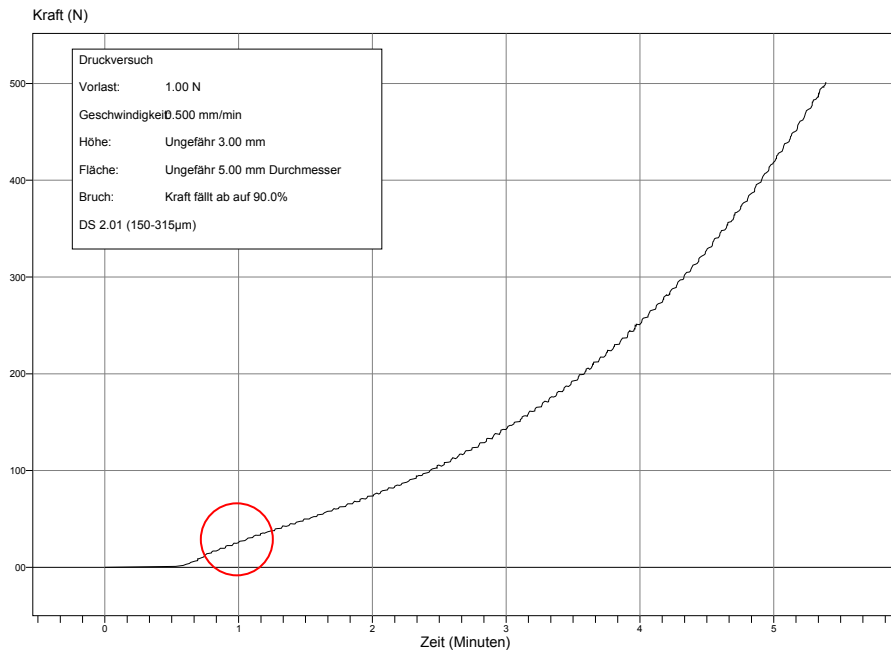


Abb. 3.13.
Dem Pressling DS 2.01a kann zwar eine Druckbelastungskurve bis 500 N zugeordnet werden, bei 20 N Belastung flacht die Kurve allerdings für 1 Min. ab. Daher liegt nahe, dass das Material bei 20 N Belastung die Stabilität verloren hat. Der spätere Anstieg der applizierten Kraft kann durch den Zerfall in einzelne Partikel erklärt werden.

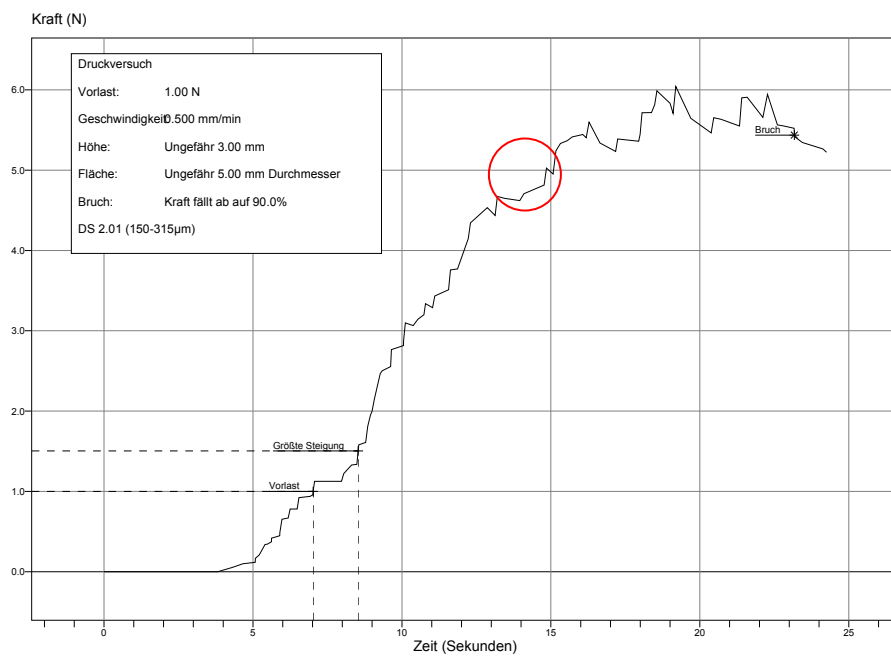


Abb. 3.14.
Das Implantat DS 2.01b verlor bei einer Belastung von 5 N die Festigkeit.

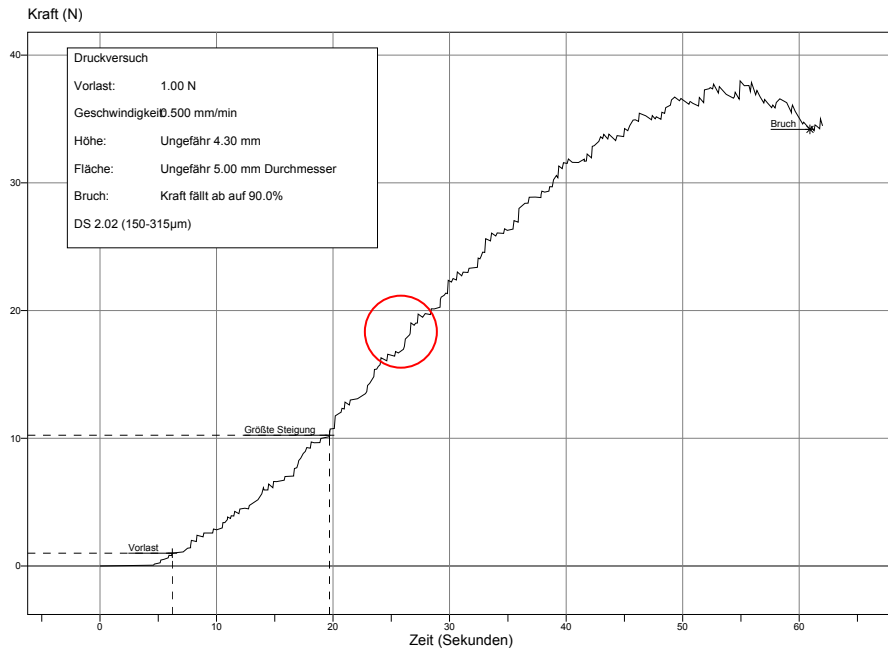


Abb. 3.15.
Die Steigung der Kurve der Druckbelastung des Implantats DS 2.02 als Indikator für den Verlust der mechanischen Festigkeit flachte beginnend bei einer Belastung von ca. 20 N ab.

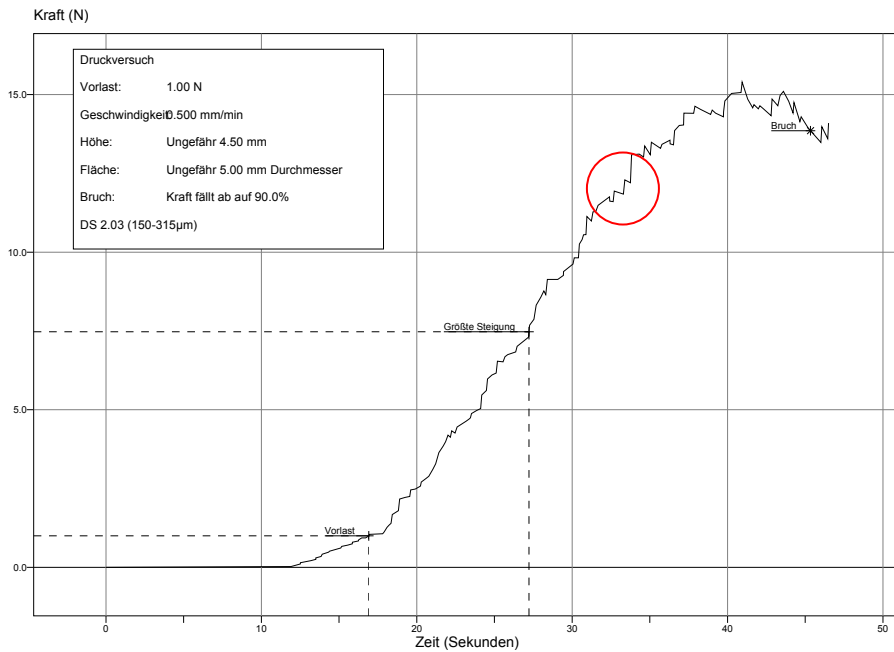


Abb. 3.16.
Der Pressling DS 2.03 verlor seine Stabilität bei 12 N. An diesem Punkt wird die Druckbelastungskurve vermehrt zackenförmig dargestellt.

Die Presslinge mit der Partikelgröße 315 bis 400 μm und einem Durchmesser von 5 mm besaßen eine Stabilität bis 25 N (DS 2.04) oder 125 N (DS 2.05). Auch bei diesen zwei Proben ist der gezackte Verlauf der Druckkurve kurz nach dem festgesetzten Punkt der Desintegration auffällig (vgl. Abb. 3.17. und Abb. 3.18.). Es besteht außerdem ein auffälliger zeitlicher Unterschied von 25 Sek. (DS 2.04) zu 2 Min. und 20 Sek. (DS 2.05) als Beginn des Zerfalls.

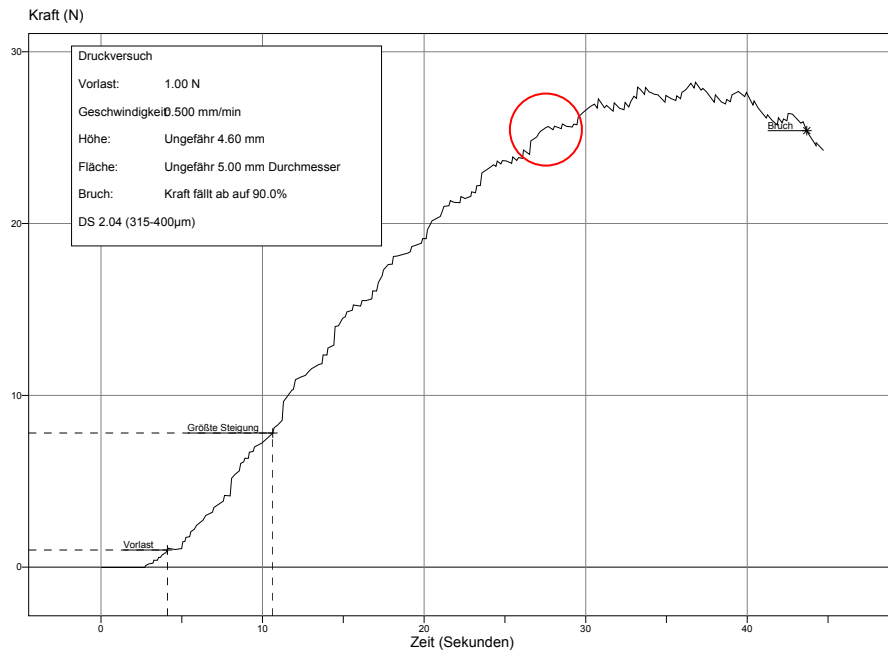


Abb. 3.17.
Die maximale mechanische Belastbarkeit des Implantates DS 2.04 betrug 25 N.
Der Zerfall begann nach 25 Sek.

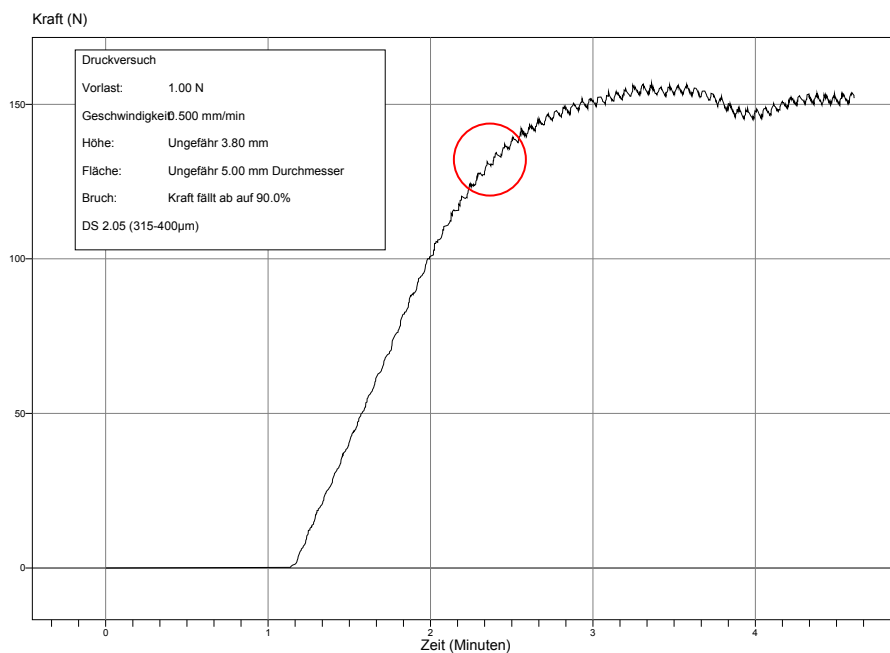


Abb. 3.18
Das Implantat DS 2.05 verlor seine Festigkeit bei einer Belastung von 125 N.
Der Zerfall begann nach 2 Min. und 20 Sek.

Im Bereich der Partikelgröße von 400 bis 600 μm wurden für die zwei getesteten Presslinge mit dem Durchmesser von 5 mm stark abweichende Resultate erzielt. Während die Probe DS 2.06 erst bei einem Druck von 200 N merklich an Stabilität verlor, zerfiel der andere Pressling DS 2.07 bereits bei 30 N. Dies wird in den Abbildungen 3.19. und 3.20. deutlich.

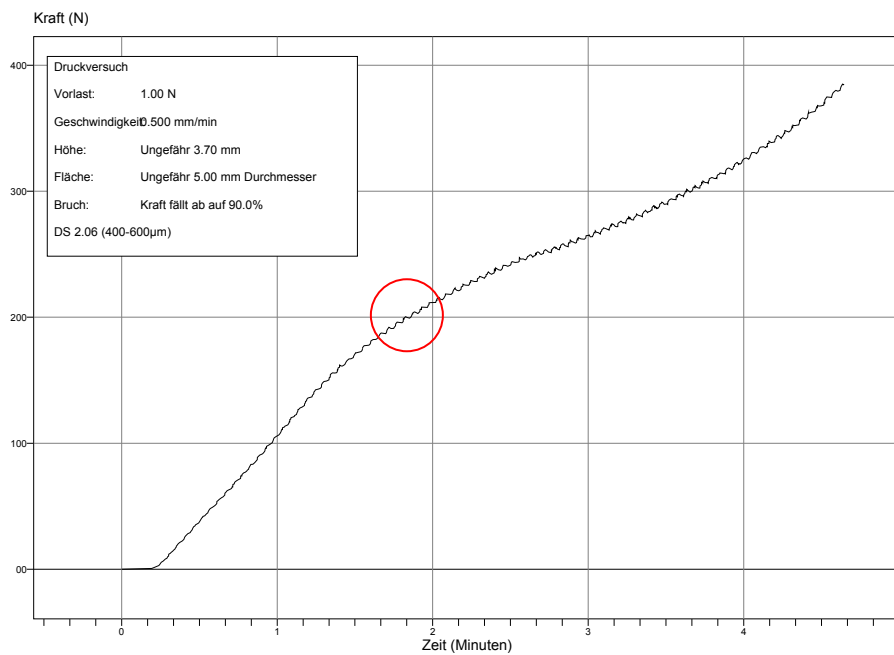


Abb. 3.19.
Das Implantat DS 2.06 war bis 200 N belastbar, bevor es die mechanische Stabilität verlor.

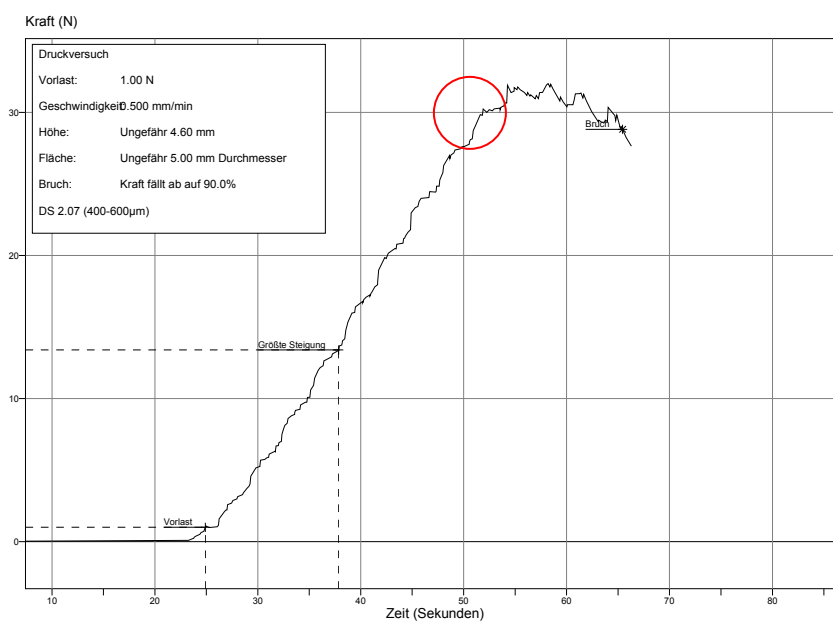


Abb. 3.20.
Das Partikelgefüge des Prüfkörpers DS 2.07 verlor bei einer Druckapplikation von 30 N seine Stabilität.

Da einer der zwei Presslinge (Durchmesser 5 mm), mit denen die Druckbeständigkeit der Partikelgröße 600 bis 800 μm ermittelt werden sollte, beim Aufbau des Versuchs beschädigt wurde, kamen für diese Partikelgröße sowohl ein Pressling mit 5 mm Durchmesser als auch 2 Ersatzpresslinge mit 13 mm Durchmesser zum Einsatz.

Während der schmalere Pressling (DS 2.08) schon ab einer Druckbelastung von 50 N an Festigkeit verlor, hielten die breiteren 13-Millimeter-Presslinge (DS 1.29 und DS 1.35) einem Druck von 500 N ohne erkennbaren Strukturverlust stand (vgl. Abb. 3.21. bis 3.23.).

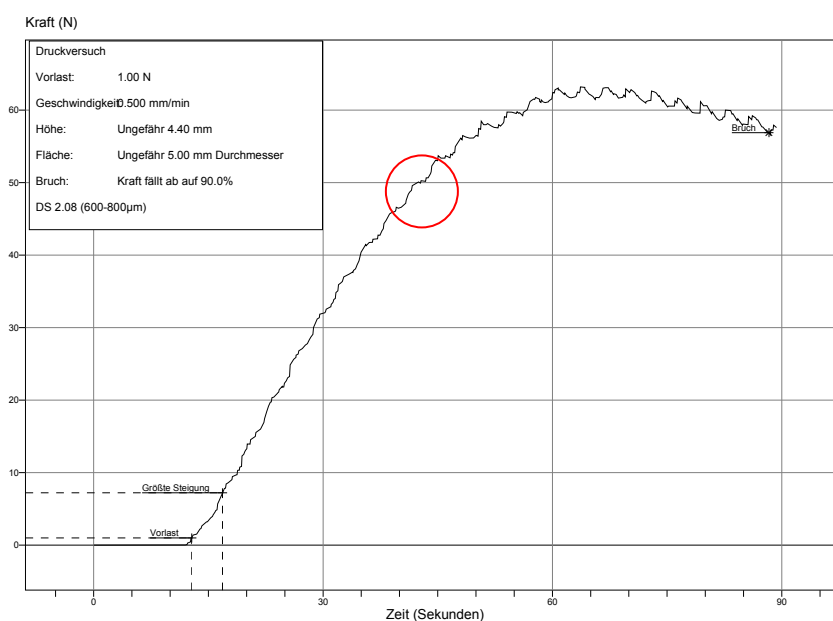


Abb. 3.21.
Der Sinterverbund des Implantats DS 2.08 verlor seine Stabilität ab einer Belastung von 50 N.

Im Bereich der Partikelgröße 800 bis 1000 μm wurden zwei Presslinge mit einem Durchmesser von 5 mm auf ihre Belastbarkeit getestet. Beide Proben, sowohl DS 2.10 als auch DS 2.11, wiesen im Bereich von 220 N einen Abfall des Druckanstiegs auf, der als beginnendes Zerfallen gedeutet werden kann. Zudem reduzierte sich die Höhe von DS 2.11 innerhalb der Versuchszeit von 3,4 mm auf 1,4 mm. Diese Ergebnisse werden in den Abbildungen 3.24. und 3.25. graphisch verdeutlicht.

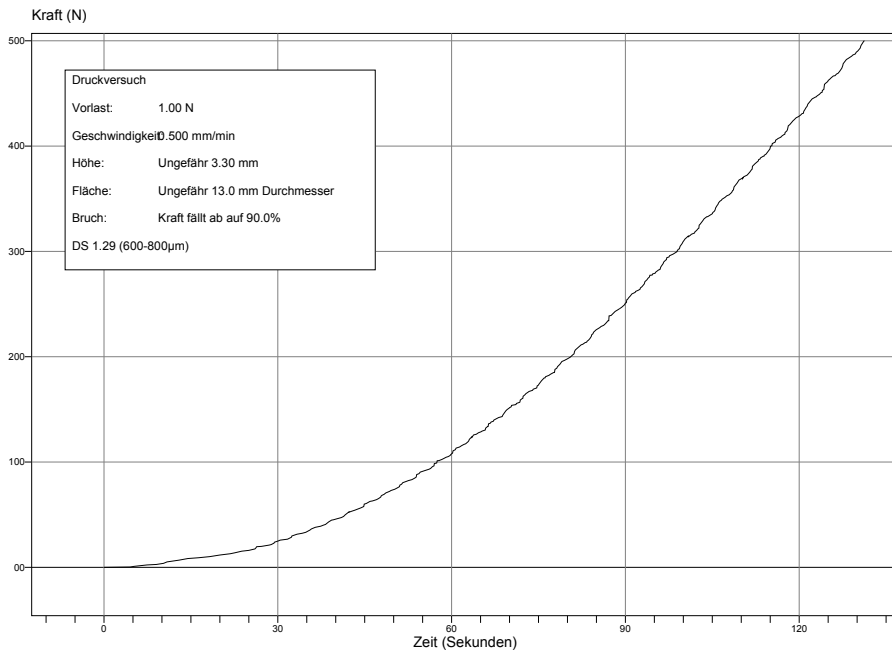


Abb. 3.22.
 Das Implantat DS 1.29 konnte mit 499 N belastet werden, ohne auseinander zu brechen. Da es als Ersatz-implantat aufgrund des Durchmessers von 13 mm statt 5 mm eine größere Fläche aufwies, muss dieser Wert umgerechnet werden. Er entspricht dann einer Belastung von mindestens 74 N.

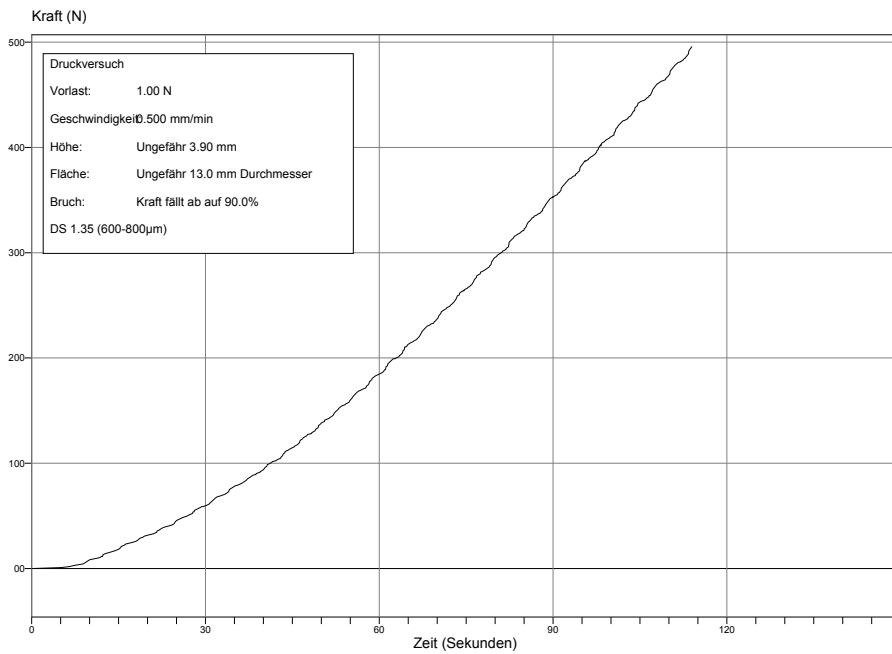


Abb. 3.23.
 Das Implantat DS 1.35 wurde mit 499 N belastet, ohne in einzelne Partikel zu zerfallen. Wie auch beim Implantat DS 1.29 entspricht dies einer erfolgreichen Belastung von mindestens 74 N.

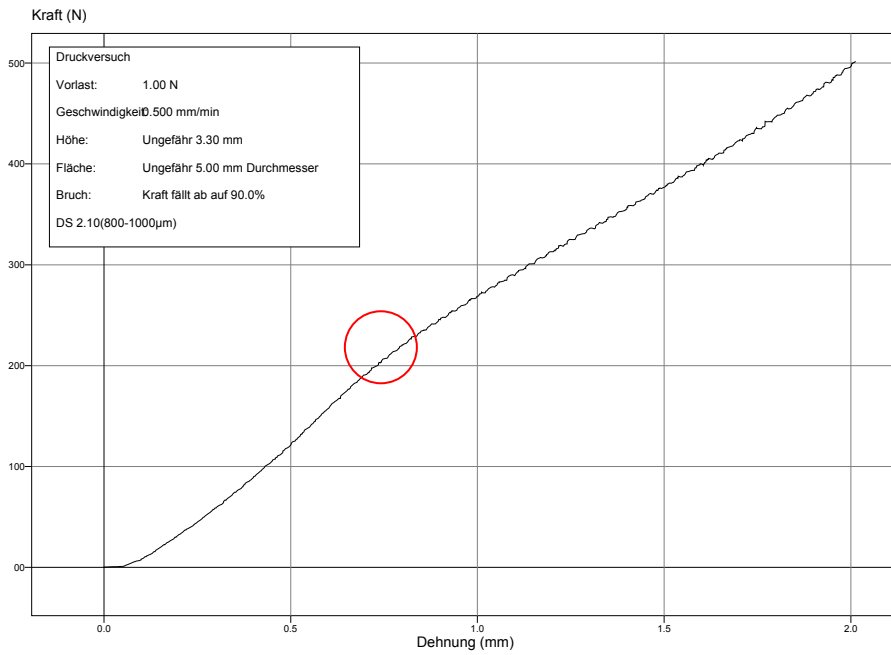


Abb. 3.24.

Der Prüfkörper DS 2.10 war bis zu einer Belastung von 220 N stabil. Zwar steigt auch danach die Druckaufnahme an, die kurzzeitig flachere Steigung spricht aber für einen Verlust der Stabilität mit anschließendem Kriechen des Materials.

Im oben dargestellten Diagramm steht der applizierten Kraft die Dehnung in mm gegenüber, statt wie in den vorherigen Diagrammen die Zeit. Bei einer konstanten Geschwindigkeit von 0,5 mm/Min. kann man Zeit und Dehnung aber gleichsetzen.

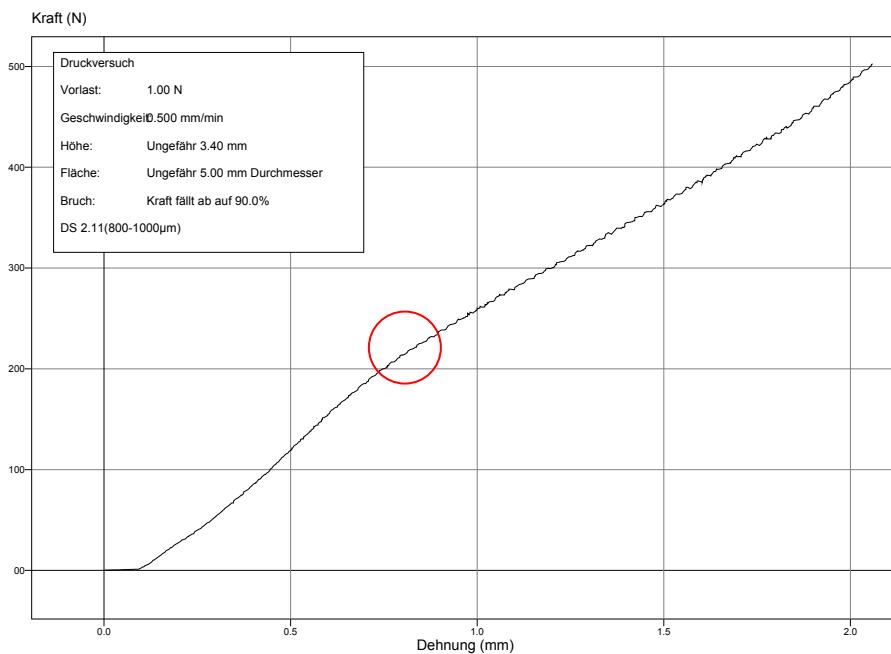


Abb. 3.25.

Das Implantat DS 2.11 verlor seine Stabilität ähnlich wie DS 2.10 im Bereich um 220 N. Auch in diesem Diagramm ist die Dehnung der eingesetzten Kraft gegenübergestellt, wie bei Abb. 3.24 lassen sich Zeit und Dehnung aber dank konstanter Geschwindigkeit der Materialprüfmaschine von 0,5 mm/Min. gleichsetzen.

Nach der Entnahme aus dem Versuchsaufbau waren nur noch die beiden 13-mm-Presslinge DS 1.29 und DS 1.35 intakt. Um die Werte aller Presslinge miteinander zu vergleichen, muss allerdings die größere Fläche der 13-mm-Presslinge ($132,73 \text{ mm}^2$) gegenüber der Fläche der regulären 5-mm-Presslinge ($19,63 \text{ mm}^2$) berücksichtigt werden. Demnach widerstanden die beiden noch intakten Presslinge noch immer mindestens einem vergleichbaren Druck von $73,96 \text{ N pro } 19,63 \text{ mm}^2$ ohne zu zerfallen.

3.6. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Partikeloberfläche

Durch die rasterelektronischen Aufnahmen wurde die Oberfläche des thermosensiblen und mechanisch etwas instabilen Copolymerpartikelgefüges auf ihre Mikrostruktur untersucht.

Zu diesem Zweck wurden zwei Presslinge aus ungesiebttem Doppelsintercopolymer verwendet. Die erforderliche Entwässerung in der Alkoholreihe sowie die Trocknung im Exsiccator waren ebenfalls für den Test auf Eignung der eingesetzten Methoden wichtig.

Auf den Aufnahmen konnten die einzelnen Partikel gut abgegrenzt werden. Zwar ist an einigen Stellen ein Sputtern auszumachen, dieses stört aber nur geringfügig. Eine Strahlenschädigung des Copolymers wurde durch sehr geringe Beschleunigungsspannungen vermieden.

Insbesondere konnten die zahlreichen Mikroporen auf den Partikeln ausgemacht werden. Einige Partikel besaßen rauere Oberflächen, während andere verhältnismäßig glatt geschliffen wirkten. Zwischen den einzelnen Partikeln waren die Poren und Spalten gut auszumachen, obwohl die Aufnahmen keinen Anhalt auf die Beschaffenheit der PLA-PGA-Sinterkontakte boten (siehe Abb. 3.26. und 3.27.).



Abb. 3.26.
Das Doppelsintercopolymer:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme.
Man beachte die Mikroporosität der Partikel.
Ein weißer Abschnitt der schwarz-weißen
Linie im Bild entspricht 100 μm .

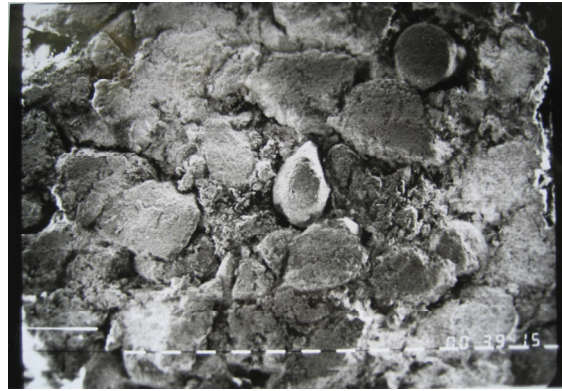


Abb. 3.27.
Aufnahme eines weiteren Presslings.
Die Oberfläche einiger Partikel ist vom
Mahlvorgang rund und abgeschliffen.
Ein weißer Abschnitt der schwarz-weißen
Linie im Bild entspricht 100 μm .

3.7. Zellversuch

Auf Basis der Ergebnisse aus den werkstofftechnischen Vorversuchen wurde doppelt gesintertes PLA-PGA-Copolymer mit der Partikelgröße 400 bis 600 μm als Material für die Presslinge, die mit Zellen besiedelt werden sollten, ausgewählt (Presslinge CV 01 bis CV 09). Die mittlere Porengröße dieses Partikelintervalls (221 μm Länge und 121 μm Breite) liegt genau innerhalb der von Borden et al. (2002) publizierten idealen Porengröße von 100 bis 250 μm . Eine Stabilisierung des pH-Wertes während der Versuchsdauer wurde durch den Zusatz von 20 % Calciumcarbonat (nach Gewicht) sowie durch einen täglichen Austausch des gepufferten Mediums erreicht.

Abweichend vom erwarteten Ergebnis konnte auch durch die Verwendung des Orangenöls anstelle von Xylol nach der Alkoholreihe die Partikelstruktur nicht erhalten werden. Auf den Schnitten war daher nicht wie geplant das Material in der Ursprungsform zu erkennen, sondern aufgelöste blasenförmige Reste des Copolymers. Dass es sich bei dem Material tatsächlich um PLA-PGA handelte und nicht um Einbettungsmaterial, konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die charakteristische Fluoreszenz des Polylactid-Polyglycolid-Copolymers nachgewiesen werden.

Am ersten Tag nach Besiedelung der Proben konnten nur wenige Zellen auf den Partikeln festgestellt werden. Die Verteilung der Zellen auf den Partikeln war in einem Fall

inhomogen (CV 09, Abb. 3.28.) und in einem anderen Fall relativ gleichmäßig (CV 08, Abb. 3.29.). Ihre häufigste Lage war in Nischen an der Oberfläche. Die Zellen waren sehr kompakt, rund oder flach und besaßen nur kleine Ausläufer. Eine Verbindung der Zellen untereinander war aufgrund der weit verstreuten Lage unwahrscheinlich. Ein Zellkern war bei den Osteoblasten nicht abzugrenzen. Alle konventionell angefärbten Zellen konnten auch unter fluoreszierendem Licht erkannt werden.

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

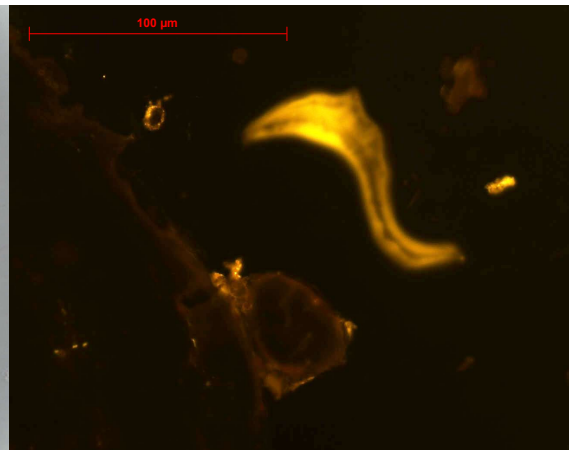
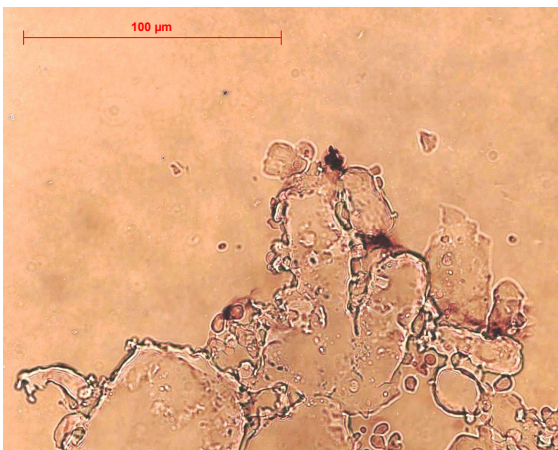


Abb. 3.28.

Tag 1, Implantat CV 09, 400-fache Vergrößerung.

Es sind sowohl in Nischen zwischen einzelnen Partikeln als auch frei in dem Schnitt Zellen erkennbar. Die Zellen erscheinen sehr kompakt, es sind kaum Zellfortsätze zu erkennen.

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

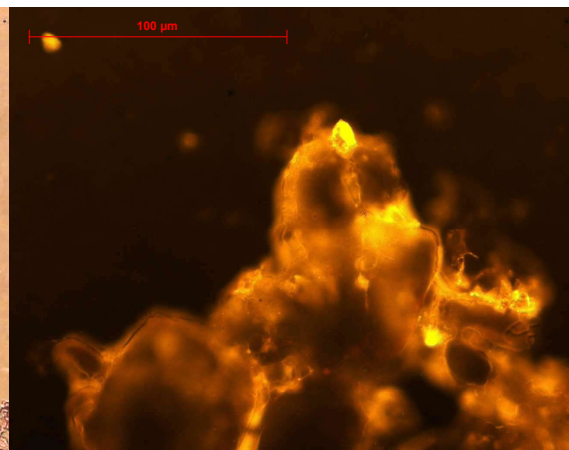


Abb. 3.29.

Tag 1, Implantat CV 08, 400-fache Vergrößerung.

Die auf dem Material angesiedelten Zellen befinden sich ausschließlich in Nischen zwischen den Partikeln des Materials. Wieder sind die Zellen sehr kompakt und ein Zellkern kann nicht abgegrenzt werden.

Am dritten Tag konnten mehrere Zellen auf den Copolymerpartikeln beobachtet werden. Bei beiden Presslingen waren die Osteoblasten immer noch vor allem in den Nischen angesiedelt, aber schon weitaus besser verteilt. Insgesamt waren die Zellen etwas größer. Erstmals war teilweise ein Zellkern abgrenzbar. Die wichtigste Veränderung jedoch war die beginnende Bildung von Zellausläufern sowohl an CV 05 als auch an CV 06. Durch die Zellausläufer kamen erste Verbindungen zwischen den Zellen zustande.

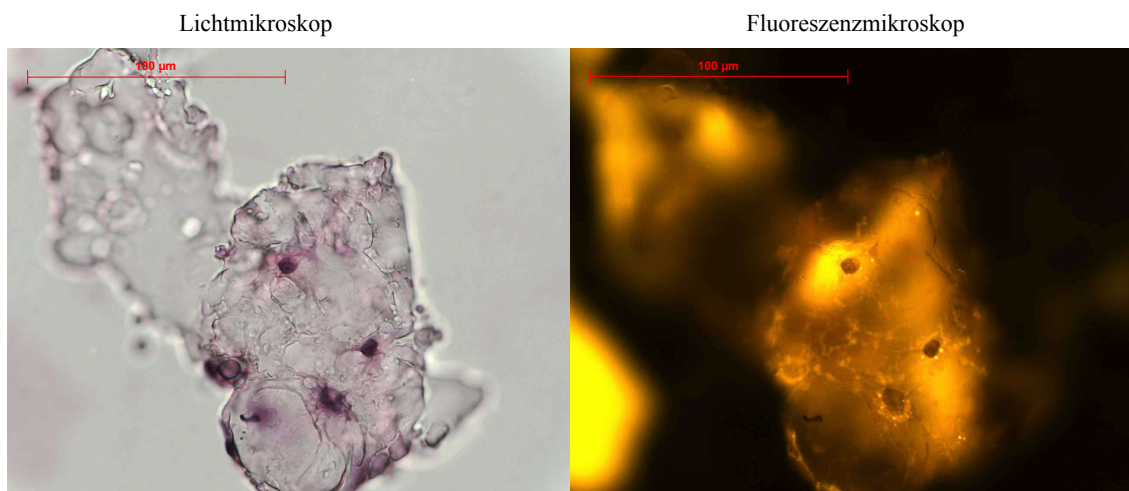


Abb. 3.30.

Tag 3, Implantat CV 05, 400-fache Vergrößerung.

Die angesiedelten Zellen sind relativ kompakt. Sowohl mit der konventionellen Färbung als auch fluoreszenzmikroskopisch können Zellausläufer um die einzelnen Zellen dargestellt werden.

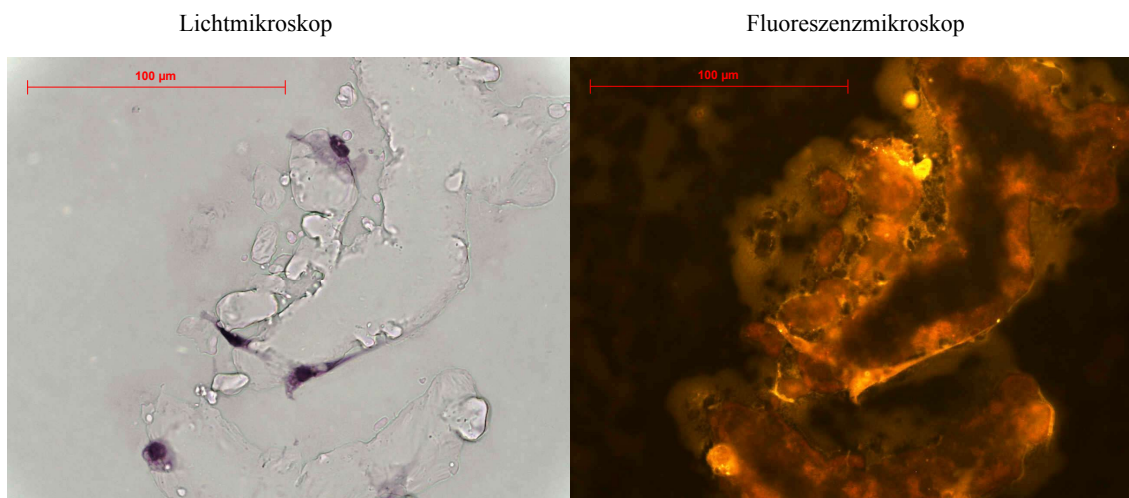


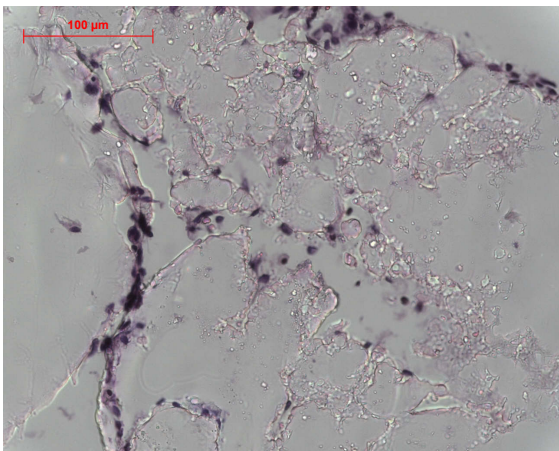
Abb. 3.31.

Tag 3, Implantat CV 06, 400-fache Vergrößerung.

Die Zellen erscheinen gestreckter, es sind längere Zellausläufer erkennbar, die teilweise schon Verbindungen zwischen den Zellen herstellen.

Nach 5 Tagen waren viele Zellen auf der Oberfläche erkennbar, teilweise sogar im Multilayer. Ein Großteil der Oberfläche der Partikel war mit einem Monolayer von Zellen besiedelt (siehe Abb. 3.32.). Insgesamt konnten sowohl kompakte Zellen ohne große Ausläufer als auch größere Zellen mit langen Ausläufern beobachtet werden (siehe Abb. 3.33.). Das Vorhandensein von Interzellularverbindungen war erkennbar. Insgesamt gab es Hinweise auf einen guten Zustand vieler Zellen. Am Implantat CV 03 konnte eventuell sogar eine Zellteilung beobachtet werden (siehe Abb. 3.34.).

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

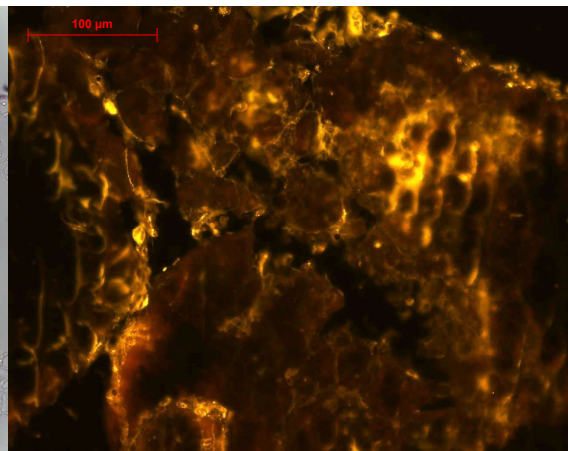
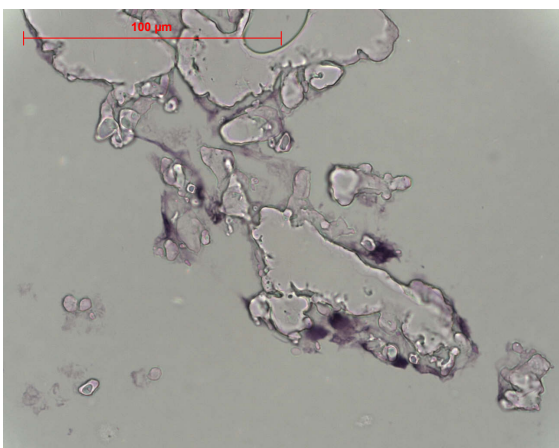


Abb. 3.32.

Tag 5, Implantat CV 04, 200-fache Vergrößerung

Ein Großteil der Oberfläche der Partikel ist mit Zellen besiedelt, teilweise im Multilayer. Vereinzelt können Zellen tief in Spalten zwischen den Partikeln gefunden werden.

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

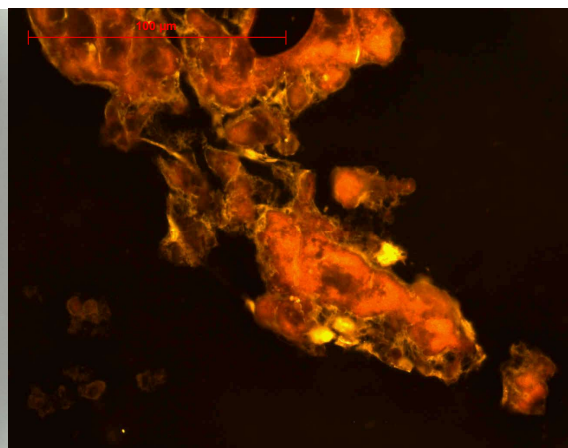


Abb. 3.33.

Tag 5, Implantat CV 03, 400-fache Vergrößerung.

Es sind dicht aneinander liegende Zellen mit ausgeprägten Fortsätzen zu erkennen, die die Zellen verbinden.

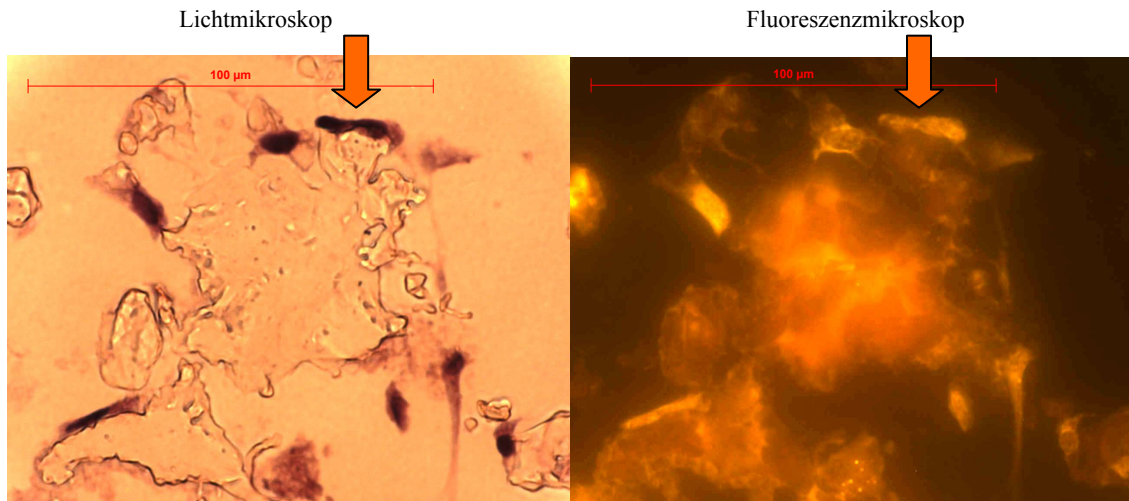


Abb. 3.34.

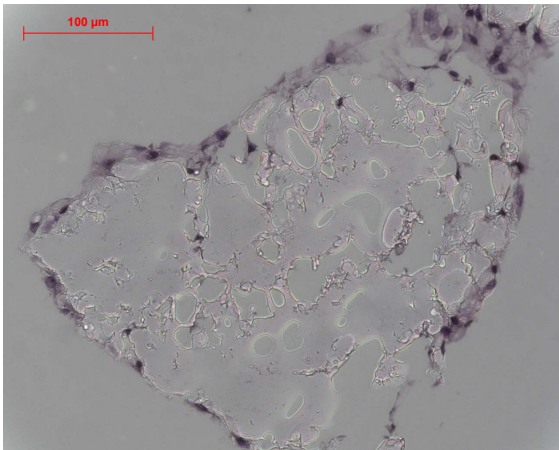
Tag 5, Implantat CV 03, 630-fache Vergrößerung.

Die dargestellten langen Zellausläufer weisen auf einen guten Zustand der Zellen hin. Bei der im oberen Teil der Bilder dargestellten Struktur kann es sich um eine Zellteilung handeln.

Am 7. Tag nach der Besiedlung der Implantate mit Osteoblasten konnten viele Zellen auf der Oberfläche und in den Spalten der Presslinge dargestellt werden. Einige Partikel waren komplett mit einer Monolayerzellschicht besiedelt. An vielen Stellen war sogar eine Multilayerschicht zu beobachten (siehe Abb. 3.35.).

Insgesamt war der Unterschied zwischen den Zellen noch stärker als zuvor erkennbar. Gerade an Stellen, die nicht direkt an der Oberfläche lagen, wo also Zellen tiefer in Spalten einwanderten, waren eher kleine Zellen ohne große Ausläufer zu sehen, während an etablierten, wahrscheinlich früher besiedelten Stellen große Zellen mit gut differenzierbarem Kern und langen, ausgeprägten Ausläufern aufzufinden waren. An Stellen, an denen die Zellen nur einlagig angesiedelt waren, waren sie flach und gestreckt, wobei einzelne Verbindungen zwischen den Zellen aber erkennbar waren. In großen Poren zwischen einzelnen Partikeln konnten große, gut differenzierte Zellen dargestellt werden, die die Poren komplett ausfüllten (siehe Abb. 3.36. und 3.37.).

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

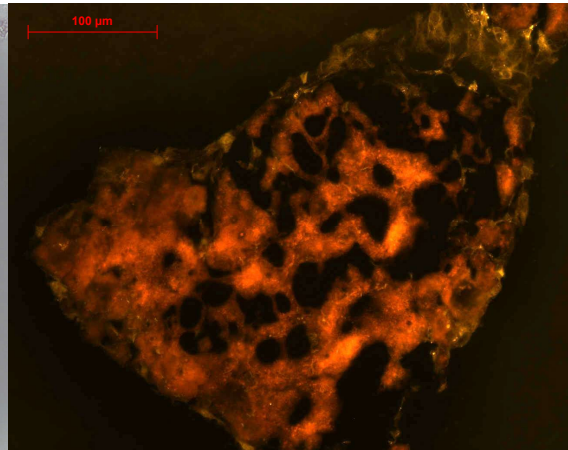
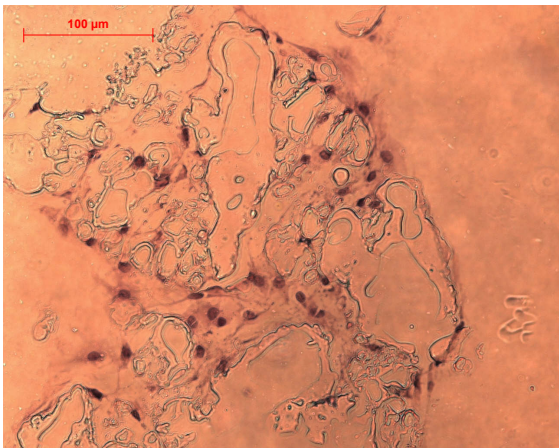


Abb. 3.35.

Tag 7, Implantat CV 01, 200-fache Vergrößerung.

Der Rand des Implantates ist komplett von einer Zellschicht umgeben, teilweise im Multilayer. Die Zellen an der Oberfläche sind groß und gut differenziert, während die Zellen in den engeren Spalten zwischen einzelnen Partikeln kleinere Zellkerne aufweisen und eher lang gestreckt erscheinen.

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

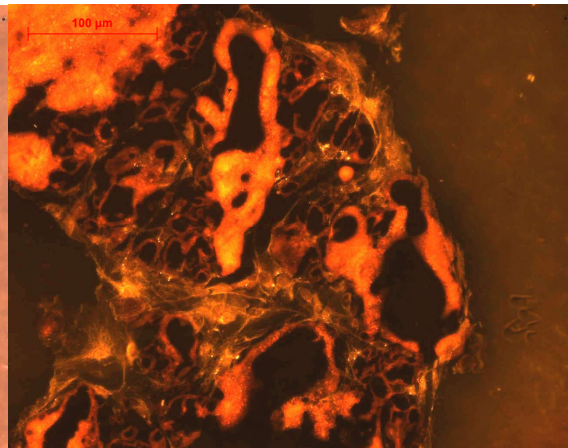
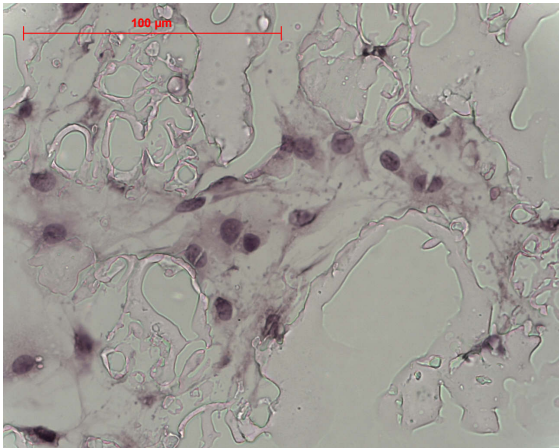


Abb. 3.36.

Tag 7, Implantat CV 01, 200-fache Vergrößerung.

Die großen Poren zwischen den einzelnen Partikeln sind vollständig mit großen, gut differenzierten, mehrlagigen Zellen gefüllt. An der Oberfläche sind die Zellen flach und lang gestreckt.

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

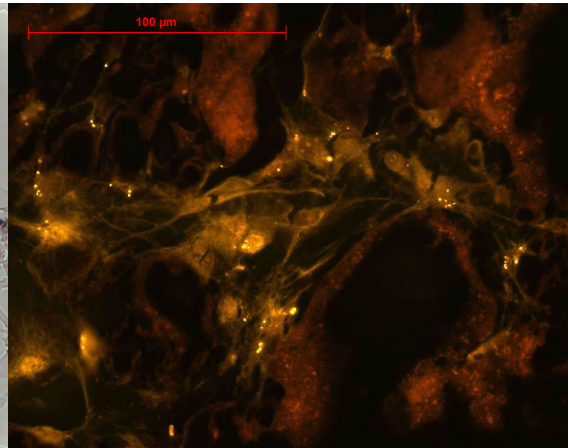


Abb. 3.37.

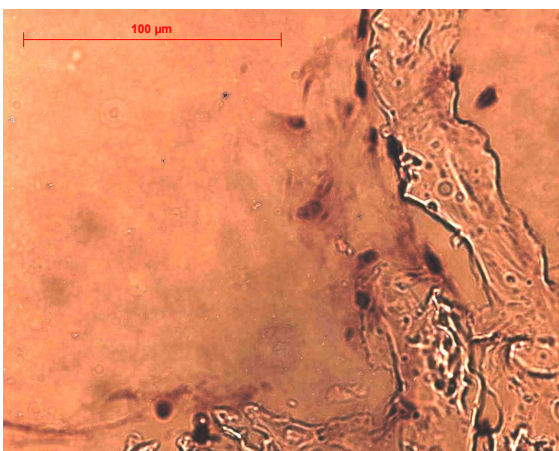
Tag 7, Implantat CV 01, 400-fache Vergrößerung.

Die Abbildung stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 3.36. dar.

Gut zu erkennen sind die Verbindungen der Zellen untereinander sowie der gute Zustand der Zellen.

Am 14. Tag war ein Großteil der Oberfläche mehrlagig mit Osteoblasten besiedelt. Mehr Zellen als zuvor waren gut differenziert und hatten lange, ausgeprägte Ausläufer (siehe Abb. 3.38.). Gleichzeitig waren einige Zellen im Multilayer nicht mehr so gut fluoreszenzmikroskopisch darstellbar (siehe Abb. 3.39.). Diese Beobachtung kann mit der Abnahme der Konzentration des Fluoreszenzmarkers bei der Zellteilung erklärt werden. An einigen Stellen, an denen die Besiedlung mit Osteoblasten eher dünn war, konnten lang gestreckte Zellen, die über Ausläufer miteinander verbunden waren, beobachtet werden (siehe Abb. 3.40.).

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

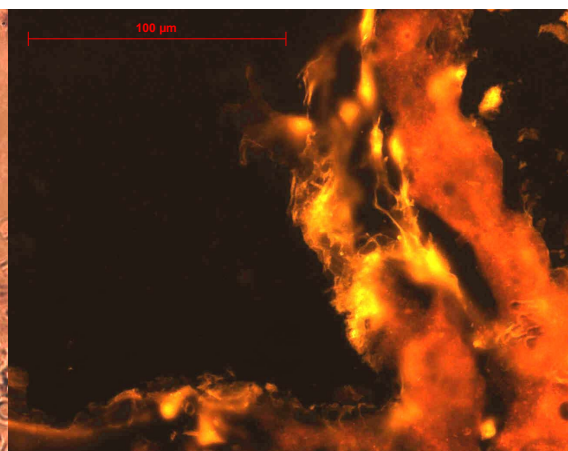
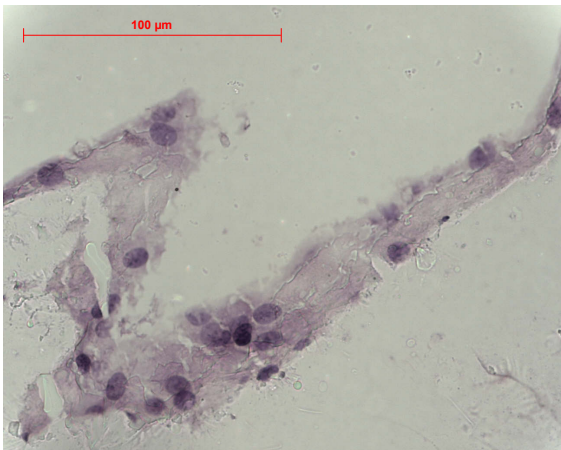


Abb. 3.38.

Tag 14, Implantat CV 07, 400-fache Vergrößerung.

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung zeigt die ausgeprägte Ausdehnung der Zellausläufer.

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

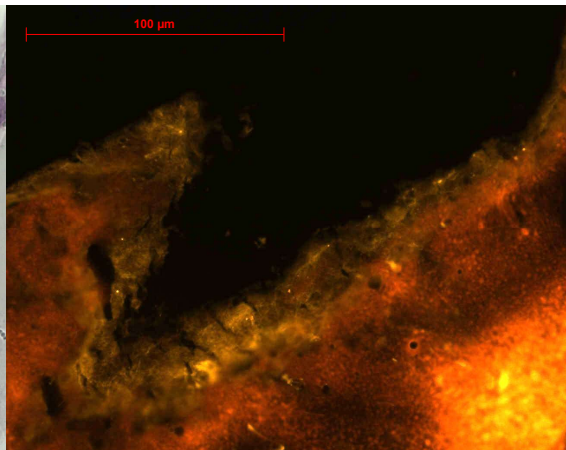
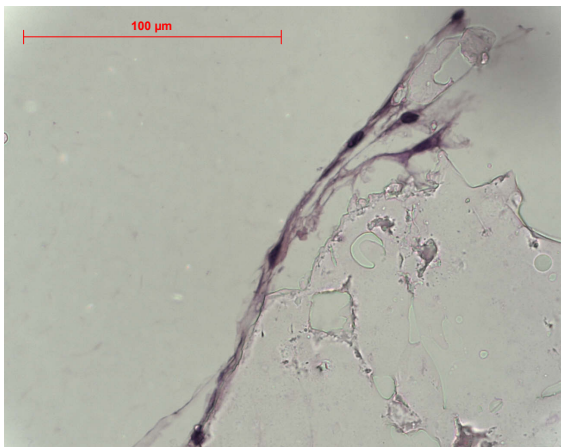


Abb. 3.39.

Tag 14, Implantat CV 07, 400-fache Vergrößerung.

Die Zellen liegen im Multilayer der Implantatoberfläche auf. Die Intensität des Fluoreszenzmarkers ist bedeutend schwächer als bei einzelnen Zellen (siehe Abb. 3.40.).

Lichtmikroskop



Fluoreszenzmikroskop

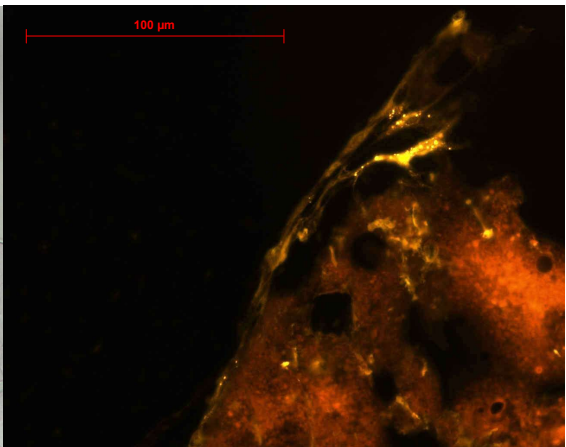


Abb. 3.40.

Tag 14, Implantat CV 07, 400-fache Vergrößerung.

Monolayer von lang gestreckten, flachen Zellen auf der Implantatoberfläche mit ausgeprägten Fortsätzen.

3.8. Ergebnis des Aufschäumversuchs

Die Stabilität des durch Aufschäumen mit Methylenchlorid gewonnenen Materials war der des Doppelsintermaterials überlegen. Ein Abfallen einzelner Copolymerpartikel konnte durch die alternative Technik ausgeschlossen werden.

Allerdings war die Porosität im Inneren nicht durchgängig und mit einer Porengröße von 300 bis 400 μm auch größer als optimal. Bei der Verwendung der individuellen Sinterform als Form für das Aufschäumen traten an der Unterseite, an der ein Entweichen des verdampfenden Lösemittels nicht möglich war, erheblich größere Poren als an der Oberseite auf. Durch das Anfertigen einer Form, die auch auf der Unterseite das Entweichen des Methylenchlorids ermöglichte, konnte eine gleichmäßigere Porosität im gesamten Implantat erreicht werden (siehe Abb. 3.41. und Abb. 3.42.).

Generell waren die durch Aufschäumen hergestellten individuellen Implantate den gesinterten Presslingen in Bezug auf Volumentreue und Detailgenauigkeit annähernd ebenbürtig. Einzig die durch das Anbringen von Evakuierungskanälen für das Lösemittel bedingten Überschüsse (siehe Abb. 3.41.) waren als Nachteil in Bezug auf die Formtreue zu nennen, wobei diese leicht mit einem Skalpell am getrockneten Implantat entfernt werden konnten.

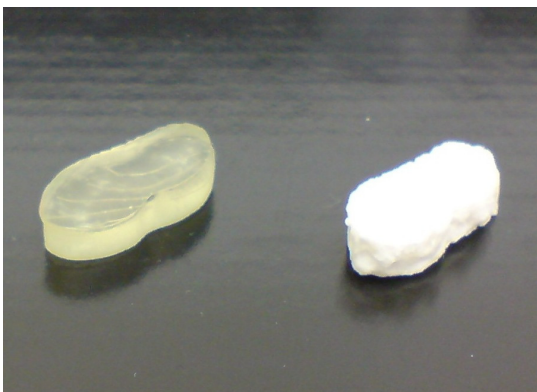


Abb. 3.41.
Das aufgeschäumte Copolymer im Vergleich zum Stereolithographiemodell. Am aufgeschäumten Implantat sind noch Überschüsse vom Einfließen des aufgelösten Copolymer in die Evakuierungskanäle zu sehen.

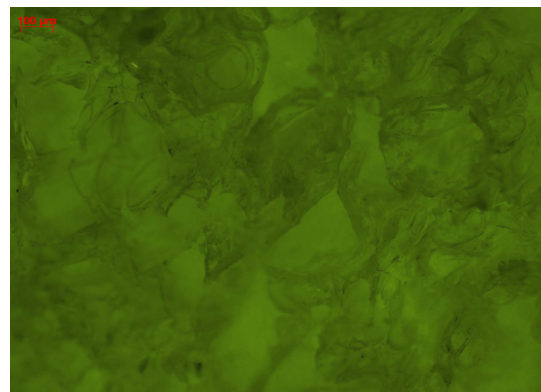


Abb. 3.42.
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des aufgeschäumten Materials, hervorzuheben sind die Septen der Poren.

4. Diskussion

Im Rahmen der Arbeit wurde ein grobkörniges, groß- und offenporiges Knochenersatzmaterial aus einem zweifach gesintertem Polylactid-Polyglycolid-Copolymer entwickelt, etabliert und hinsichtlich seiner Materialeigenschaften und Einsatzmöglichkeiten in vitro getestet.

4.1. Knochenersatzmaterial aus Doppelsintercopolymer

Die auf den Vorarbeiten mit nicht thermisch vorbehandeltem Copolymer aufbauende Methode der Sinterung von Polylactid-Polyglycolid in verschiedenen Mischungsverhältnissen ober- oder leicht unterhalb der Glasstemperatur der beiden polymeren Komponenten, aber weit unterhalb deren Schmelztemperatur, wurde im Rahmen der Arbeit weiter verfeinert und den speziellen Anforderungen an individuell dreidimensional konfigurierbares und bioresorbierbares Knochenersatzmaterial angepasst.

4.1.1. Volumentreue durch Verwendung von Doppelsintercopolymer

Einer der wichtigsten Eckpfeiler dieser Arbeit ist die Möglichkeit der präoperativen computergestützten Planung und Anfertigung des Knochenersatzes mit dem Vorteil der besseren Anpassbarkeit der Materialeigenschaften. Hierzu gehören eine kontrollierbare Porengröße, die mechanische Stabilität und eine zeitlich angepasste Resorption durch die Variation der verwendeten Polymere. Daher ist es grundlegend wichtig, ein möglichst volumentreues Ergebnis zu erzielen.

Die radiologische Erfassung und maßstabsgetreue extrakorporale Darstellung von Knochendefekten kann inzwischen als etabliert angesehen werden (Zeilhofer 2005).

Aus den computertomographisch ermittelten Daten und dem daraus hergestellten Modell wurde im Rahmen der Arbeit eine individuelle Sinterform entwickelt, die das Sintern von Knochenersatz aus PLA-PGA-Copolymer auch für unregelmäßig geformte Defekte ermöglicht.

Innerhalb der Arbeitsgruppe Tissue Engineering und Biomineralisation wurde als Herstellungsmethode für Knochenersatzmaterial aus PLA-PGA-Copolymer die Sinterung von pulverförmigem Copolymer bei moderaten Temperaturen und mit moderatem Pressdruck unter normalen atmosphärischen Bedingungen entwickelt.

Sintern gilt als der direkteste Weg, ein poröses Material zu erhalten (Hou 2003). Dabei werden die Partikel des vorverdichteten Pulvers bei einer Temperatur unterhalb des Schmelzpunktes des Materials miteinander verbunden. Auf diese Weise und durch den Einsatz von Pulver mit definierter Partikelgröße lässt sich ein durchgängig poröses Basismaterial herstellen, das mit einer entsprechenden Form auch für spezielle Einsatzorte maßgeschneidert angefertigt werden kann.

Die Haftung der Partikel aneinander ist verhältnismäßig schwach und abhängig von der Anzahl und Größe der Kontaktflächen sowie der Sintertemperatur.

Bei der Sinterung von PLA-PGA-Copolymer kommt es zu zwei verschiedenen Volumeneffekten, zum einen zu der thermischen Kontraktion des Materials beim Abkühlen der Presslinge von Sintertemperatur (in dieser Arbeit 57 °C) auf Raumtemperatur und zum anderen zu einem irreversiblen Volumeneffekt beim Übergang des Copolymers vom Normal- in den Glaszustand.

Polyglycolid hat eine Glasübergangstemperatur (also die Temperatur, bei der es irreversibel in den Glaszustand übergeht) von 32 °C, Polylactid von 65 °C. Der Übergang in den Glaszustand ist mit einer Schrumpfung verbunden. Bei einer Sintertemperatur von 57 °C geht also ein Teil des Copolymers (der Polyglycolidanteil) in den Glaszustand über, es kommt zu einer Schrumpfung. Erhitzt man den Pressling nochmals auf 57 °C, tritt abgesehen von der thermischen Kontraktion keine weitere sichtbare Kontraktion beim Abkühlen auf Raumtemperatur auf (siehe Abb. 4.2.).

Durch Adhäsion an der Ober- und Unterseite kommt es bei den Presslingen zu nicht gleichmäßigen Volumeneffekten. Würden die Presslinge als solide Körper ohne Adhäsion an einem Punkt schrumpfen, wäre ihre unbehinderte Volumenänderung wahrscheinlich linear und maßstäblich.

In der KBr-Pressform, in der der Pressdruck beim Sintern senkrecht auf die Ober- und Unterseite trifft, bildet sich im Vergleich zu den Seitenwänden, auf die kein direkter Pressdruck einwirkt, an diesen Stellen eine stärkere Adhäsion des Presslings zur Form. Daher kommt es zu einer behinderten Volumenänderung (siehe Abb. 4.1.). Der Pressling kann sich an der Ober- und Unterseite aufgrund der stärkeren Adhäsion nicht maßstäblich kontrahieren, während die nicht so stark an der Form haftende Seitenwand des Presslings eine Schrumpfung der Seite bis zur Tailenbildung zulässt. In einem solchen Fall sind Spannungen innerhalb des Presslings und seines Partikelgefüges zu erwarten (Marxkors et Meiners 2001), auch deswegen, weil die Verformung durch den irreversiblen Übergang des Materials in den Glaszustand plastisch ist.

Der früher durchgeführte und beschriebene Lösungsversuch durch rotierende Verdichtung des Copolymers in der Form vor dem Sintern ermöglicht eine Reduktion des nichtlinearen Volumeneffektes, eventuell durch eine Adhäsion des seitlich stärker verdichteten Pulvers an den Pressformwänden. Die Grenzen des einfach gesinterten Materials zeigen sich allerdings bei der Herstellung komplexerer dreidimensionaler Inserts, wie den in der Arbeit verwendeten individuellen Presslingen aus der nach dem Stereolithographiemodell hergestellten Form.

Da das Copolymer an den mit Silikon beschichteten Seiten und dem dreidimensional geformten Boden keine so starke Adhäsion aufweist wie am plan geschliffenen, aber nicht mit Silikon beschichteten Stempel, findet auch in der individuellen Sinterform eine behinderte Schrumpfung an allen Seiten außer am Stempel statt.

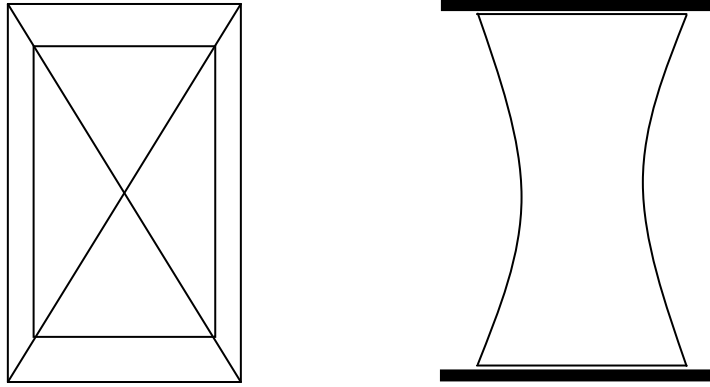


Abb. 4.1.
Gedankenmodell zur unbehinderten (links) und behinderten Volumenänderung (rechts). Während ohne Adhäsion an einer Fläche eine maßstäbliche, winkeltreue Schrumpfung stattfindet, führt die Adhäsion an Ober- und Unterseite zu nichtlinearer Taillenbildung. (Nach Marxkors et Meiners 2001)

Eine Möglichkeit, die Schrumpfung durch den Übergang in den Glaszustand während der Sinterung zu umgehen, so dass nur noch ein thermisch bedingter Volumeneffekt auftritt, ist die Verwendung von vorgesintertem (und damit schon im Glaszustand befindlichem) Copolymer. Wie die Ergebnisse der Arbeit zeigen konnten, ist die nicht maßstäbliche behinderte Volumenänderung bei der Verwendung des Doppelsintercopolymer nicht mehr nachzuweisen (siehe Abb. 4.2.).

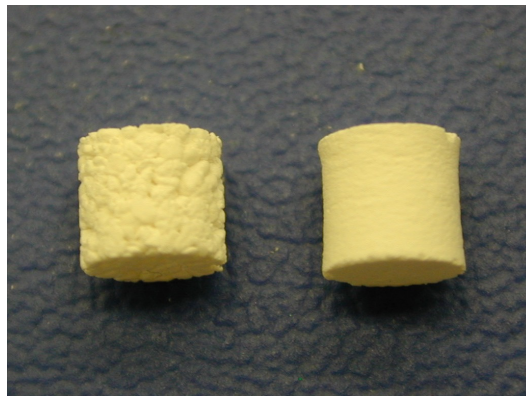


Abb. 4.2.
Vergleichende Abbildung von Presslingen aus einfach gesintertem (rechts) und doppelt gesintertem Polylactid-Polyglycolid-Copolymer. Beide Presslinge wurden in derselben Form angefertigt. Am rechten Pressling ist der Effekt der behinderten Volumenänderung gut zu erkennen, die Taille ist außerdem nicht gleichmäßig geformt. Da das Basismaterial des linken Presslings vorgesintert war, ist eine nicht maßstäbliche, durch Übergang in den Glaszustand bedingte, behinderte Volumenänderung nicht feststellbar.

Gleichzeitig ist an den aus dem neu entwickelten Material hergestellten individuell dreidimensional geformten Presslingen trotz des Materialunterschieds zwischen der konfektionierten Edelstahlform und der individuellen Sinterform keine Torsion zu einer Seite zu erkennen. Als weiterer Vorteil ist unbedingt die Dimensionstreuung des Doppelsintercopolymers hervorzuheben. Keiner der aus vorgesintertem Material hergestellten Presslinge unterlag einer nachweisbaren Schrumpfung. Zwar muss mit einer thermischen Kontraktion gerechnet werden; das Copolymer wird beim Sintern allerdings in die erwärmte (und damit thermisch expandierte) Form gegeben, so dass die Kontraktion - vorausgesetzt, sie verläuft maßstäblich - teilweise ausgeglichen werden kann. Ein Indiz dafür ist das von Volumeneffekten freie (unterhalb der Sensitivität von 0,1 mm) Sintern der Doppelsintercopolymerpresslinge. Weiterhin kann eine mäßige lineare Kontraktion sogar sinnvoll sein, um ein komplikationsarmes Einsetzen des dann leicht kleineren Knochenersatzmaterials in den berechneten Defekt zu erleichtern, wobei der immer vorhandene Spalt zwischen Defekt und Knochenersatz möglichst klein sein sollte, um eine rasche Besiedlung von Zellen aus dem anliegenden Knochen und ein einfaches Einsprossen von kleineren Blutgefäßen zu erleichtern. Die im Rahmen der Versuche (siehe Kapitel 3.2.) festgestellte Expansion des Copolymers bei Wasseraufnahme kann für eine Minimierung des Spaltes nach dem Einsetzen dienlich sein.

Des Weiteren kann es dabei nützlich sein, die Abdeckung des porösen Blocks gegen unerwünscht einsprossende und übermäßig schnell proliferierende Fibroblasten (diese haben eine etwa 10 Mal schnellere Wachstumsrate als Osteoblasten) sicherzustellen, zum Beispiel durch eine dünne, aber undurchdringbare Schicht aus ebenfalls resorbierbarem heißgepresstem und nicht porösem Copolymer. Diese Schicht kann auf das poröse Material aufgesintert werden und sich so stabil mit dem Knochenersatz verbinden. Alternativ kann diese Schutzfunktion auch durch herkömmliche marktreife Membransysteme aus verschiedenen resorbierbaren Materialien übernommen werden, beispielsweise aus Kollagen (Bioguide, Geistlich Biomaterials) oder auch aus bioresorbierbaren Polymeren.

4.1.2. Die ideale Partikelgröße

Das in der Arbeit vorgestellte Material Doppelsintercopolymer bietet die Möglichkeit, die Eigenschaften des fertigen Presslings durch die Variation der Partikelgröße maßgeblich zu beeinflussen.

Um als Knochenersatz einsetzbar zu sein, müssen vom Polylactid-Polyglycolid-Copolymer neben der grundlegenden Kompatibilität mit dem Einsatzort und den eingesetzten Zellen folgende Eigenschaften erfüllt werden:

- gute chemische Stabilität und Pufferung der Zerfallsprodukte
- gute Porengröße für die Besiedlung und den Stoffwechsel der besiedelnden Zellen
- ausreichende mechanische Stabilität (gegen Druck)

Die chemische Stabilität und Abbaugeschwindigkeit ist vor allem vom verwendeten Material und dessen individueller Zusammensetzung abhängig. Durch das Mischungsverhältnis, aber auch durch die Art des Copolymeraufbaus (Blockpolymer oder statistisches Copolymer) und die chemische Zusammensetzung des verwendeten Polylactids (PLLA oder PDLLA) ist eine große Einstellungsmöglichkeit der Abbaugeschwindigkeit im Bereich von Wochen bis Jahren gegeben. Auch die Porosität kann einen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit haben.

Diese Parameter sollten an den individuellen Einsatzbereich des Materials angepasst werden. Üblicherweise wird der Abbau von Knochenersatzmaterial nach einem stabilen Zeitraum von 6 bis 8 Wochen als erstrebenswert angesehen (Wallkamm et al. 2003, Merolli et al. 2001). Ein Anteil von mindestens 75 % Polylactid im Copolymer gilt dafür als zielführend (Borden et al. 2003).

Für das entwickelte Doppelsintercopolymer sollten die Werte individuell angepasst werden, da die Größe der Partikel von anderen Studien abweicht und auch die mehrfache Wärmebehandlung Einfluss auf das Abbauverhalten haben kann.

Da in der Arbeit gezeigt werden konnte, dass die dem Copolymer beigemischte Menge von 20 Gewichtsprozent Calciumcarbonat ein ausreichendes und funktionierendes

Puffersystem in vitro darstellt, liegt der Fokus eher auf der Ermittlung der idealen Partikelgröße, da diese sowohl die Druckbeständigkeit als auch die Porengröße zwischen den Partikeln beeinflusst.

Die „ideale“ Porengröße für Knochenersatzmaterial liegt im Bereich zwischen 100 und 250 μm (Borden et al. 2002). Dieses Kriterium wird von der Partikelgröße 400 bis 600 μm optimal mit einer mittleren Porengröße von 221 μm in der Länge und 121 μm in der Breite erfüllt. In der Arbeit konnte dargestellt werden, dass Poren dieser Größe gut mit Osteoblasten besiedelt werden (siehe Abb. 3.35.) und ebenfalls eine Proliferation der Zellen innerhalb der Materialporen ermöglichen.

Im Rahmen der Arbeit konnte allerdings auch gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Partikelgröße und mechanischer Stabilität existiert. Anders als ursprünglich angenommen, ist die größere Anzahl der Sinterkontakte, die bei kleineren Partikeln im Pressling mit einem definierten Volumen auftreten müssten, nicht deutlich vorteilhaft gegenüber einem im Bezug auf das Volumen und den Pressdruck vergleichbaren Pressling aus grobkörnigerem Material, dessen größere Partikel aufgrund der geringeren Anzahl nicht so viele Sinterkontakte aufweisen können. Während die Presslinge aus dem sehr feinen Doppelsintercopolymer mit der Partikelgröße von 150 bis 315 μm relativ wenig Druckbelastung überstanden, stieg die mechanische Belastbarkeit bis zur größten Partikelgröße (800 bis 1000 μm) kontinuierlich an.

Im dritten werkstoffkundlichen Versuch, dem Durchflussversuch, konnte gezeigt werden, dass die Presslinge aus Doppelsintercopolymer unabhängig von der Partikelgröße im Bereich zwischen 150 und 1000 μm durchgängige miteinander verbundene Poren aufweisen. Aufgrund der mit steigender Partikelgröße zunehmenden Porengröße und der verminderten Partikel- und Porenanzahl kann in einem vorgegebenen Zeitraum auch mehr Flüssigkeit durch das interkonnektierend poröse Material fließen.

Da die mechanische Stabilität neben dem Pressdruck, der Sintertemperatur und der Partikelgröße von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, sollte das Ergebnis des Druckversuchs nur als Anhaltspunkt dienen, um die folgende Tendenz aufzuzeigen:

Mit der Partikelgröße steigt die Stabilität gegen Druckbelastung.

Auch der Durchflussversuch stellt nur die Durchlässigkeit und damit Interkonnektivität der Poren dar, die Daten zur Durchflussrate zeigen somit ebenfalls nur eine Tendenz auf: Mit zunehmender Partikelgröße steigt die Möglichkeit für Flüssigkeiten, durch das entstandene Porengefüge hindurch zu fließen. Wie auch bei Ermittlung der Porengröße im Verhältnis zur Partikelgröße tritt eine erkennbare Varianz der Ergebnisse für ein Partikelintervall auf.

Die Partikelgröße zwischen 400 und 600 μm ergibt den Versuchen zufolge die besten Eigenschaften in Bezug auf die optimale Porengröße bei ausreichender mechanischer Stabilität und vorhandener Verbindung der Poren im Material als Voraussetzung für einen Flüssigkeitsaustausch. Die Sinterung des Doppelsintercopolymers mit diesem Partikelintervall nach der in der Arbeit entwickelten Methode führt zu einer durchgängigen, optimal dimensionierten Porosität bei gleichzeitiger akzeptabler Druckstabilität. Während der Versuche konnte immer wieder beobachtet werden, dass bei der Handhabung der Werkstücke einzelne Partikel von den Presslingen abfielen. Dieser Vorgang war unabhängig von der Partikelgröße der verwendeten Presslinge. Obwohl dieses Verhalten ein Hinweis auf eine nicht optimale Verbindung der Partikel untereinander ist, wurde die Relevanz als niedrig eingestuft, da die Presslinge insgesamt stabil waren. Als Konsequenz wurde auf eine vorsichtigeren Handhabung der Stücke geachtet.

4.1.3. Sterilisierbarkeit des Copolymers

Sterilisierbarkeit ist eine Grundvoraussetzung für Knochenersatzmaterial, das nur im Rahmen aseptischer Bedingungen überhaupt einsetzbar ist. Gleichzeitig soll der Sterilisationsvorgang möglichst einfach und ohne den zwingenden Einsatz teurer Großanlagen durchführbar sein.

Das in dieser Arbeit verwendete Copolymer ist sehr temperatursensibel. Durch die Applikation von Hitze ändern sich die Materialeigenschaften irreversibel. Dabei spielt der Übergang in den Glaszustand (siehe Kapitel 4.1.1.) eine große Rolle. Bei der gewählten Sintertemperatur von 57 $^{\circ}\text{C}$ geht das Copolymer nur teilweise in den Glaszustand über, erst ab 65 $^{\circ}\text{C}$ ist auch die Glasübergangstemperatur von Polylactid erreicht. Eine Erwärmung über diese Schwelle hinaus bewirkt dann eine weitergehende Änderung der

Materialeigenschaften. Dabei wird vor allem die Abbaurate, aber auch die Porosität der Presslinge, wie der Pressversuch bei 80 °C andeutet (siehe Kapitel 3.1.1. und Tabelle 1.), beeinflusst. Die verhältnismäßig niedrige Schmelztemperatur von 140 °C des PLA-PGA-Copolymers bedeutet, dass bei einer Erhitzung über diese Temperatur hinaus auch die Porosität durch Einschmelzen stark abnehmen kann.

Aufgrund der Hitzelabilität der Presslinge scheidet für ihre Sterilisierung eine thermische Behandlung (thermische Sterilisierung durch übersättigten Wasserdampf bei Temperaturen von 121 °C und 1 bar oder bei 134 °C und 2 bar, bzw. trockener Hitze bei 160 °C bis 180 °C, nach Kayser 2005) aus.

Für die Sterilisation durch Strahlung wird entweder UV-Licht bei einer Wellenlänge von 200 bis 280 nm oder Gammastrahlung aus dem Kernzerfall des Radioisotops ⁶⁰Cobalt verwendet. UV-Licht wirkt über eine Veränderung der DNA (genauer der Thymin-Dimere) sterilisierend. Die Wirkung ist allerdings unter normalem Tageslicht reversibel (Photoreaktivierung). Gammastrahlung bildet reaktive Gruppen, die die DNA irreversibel chemisch schädigen. Anlagen zur Erzeugung von Gammastrahlung sind allerdings teuer und auch deshalb relativ selten. Hauptverwendung für diese Art der Sterilisation ist die industrielle Herstellung von Verbandsmaterial sowie hitzeempfindlicher Medikamente und Kunststoffartikel.

Neben den hohen Anschaffungskosten scheinen Gammastrahlen möglicherweise einen weiteren Nachteil auf die in dieser Arbeit hergestellten Presslinge zu haben: Nach Gleason (1998) beeinflussen Gammastrahlen die Abbaurate des PLA-PGA-Copolymers, der Abbau erfolgt beschleunigt. Ultraviolette Strahlung dagegen kann aggressiv auf Polymere wirken, bei Versuchen im Rahmen der Arbeit nahm die mechanische Stabilität nach einer Behandlung mit UV-Licht der Wellenlänge 264 nm merklich ab. Obwohl sowohl Gammastrahlung als auch ultraviolettes Licht die Eigenschaften des Materials verändern, können diese Methoden eingesetzt werden, wenn die Nebenwirkungen akzeptabel für den Einsatzzweck des Materials sind.

Generell werden Produkte aus PLA-PGA-Copolymer wie Nahtmaterial oder Osteosynthesematerial standardmäßig mit Gammastrahlung sterilisiert. Der von Gleason (1998)

beschriebene Einfluss der Strahlung auf das Abbauverhalten des Copolymers wird dabei billigend in Kauf genommen.

Neben der Sterilisation durch Hitze und Strahlung ist auch die chemische Sterilisation durch Alkohole, Phenole, Aldehyde und Ethylenoxid möglich. Die ersten drei Verfahren denaturieren die Proteine von Mikroorganismen und Viren, während Ethylenoxid hochreaktiv, giftig, mutagen, stark schleimhautreizend und brennbar ist. Da Alkohole und Phenole gewöhnlich nur zur Desinfektion benutzt werden und Aldehyde, beispielsweise Glutaraldehyd, bei einer späteren Zellbesiedlung nicht ohne Weiteres vollständig aus dem sterilisierten porösen Copolymer zu entfernen sind, ließe sich von den erwähnten chemischen Sterilisationsmitteln nur Ethylenoxid eventuell für die Sterilisation von Polylactid-Polyglycolid-Copolymer einsetzen. Ethylenoxid hat einen verlangsamenden Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit von Polylactid und schwächt dessen mechanischen Eigenschaften nicht (Smit 2007).

Da die Sterilisation des thermolabilen Copolymers durch Wärme nicht realisierbar ist, die chemische Sterilisation durch Ethylenoxid trotz guter Effektivität aufgrund der Giftigkeit und Reaktionsfreude des Gases als problematisch angesehen wurde und auch Gammastrahlung durch den hohen Aufwand zumindest für die ersten Versuche ausschied, wurde für die Versuche der vorliegenden Arbeit eine Keimreduktion durch ultraviolette Strahlung als Methode der Wahl eingesetzt. Für eine weitere Erprobung des Materials beispielsweise im lebenden Organismus sollte eine der oben genannten Sterilisationsmethoden (Gammastrahlung oder Ethylenoxidbegasung) angewendet werden.

4.1.4. Das in vitro Modell

Die in der Literatur hinlänglich beschriebenen Vorteile des Polylactid-Polyglycolid-Copolymers wie schnelle Besiedlung durch Zellen im Vergleich zu anderen Materialien (el Amin et al. 2003) und gute Proliferationsrate der angewachsenen Zellen wurden im Zellversuch auf ihre Anwendbarkeit für das neu entwickelte Material überprüft und konnten bestätigt werden.

Die auf den Presslingen angesiedelten Zellen wuchsen rasch an und konnten sich gut entwickeln. Der Übergang der Zellmorphologie von klein und rund am 1. Tag überflach mit langgestreckten Ausläufern am 3. Tag und dem Ausbilden von mehrschichtigen Zellanlagerungen am 5. Tag bis zum morphologisch gut ausgeprägten Osteoblastenteppich am 7. und 14. Tag, der die Poren des Materials komplett ausfüllte, war gut zu erkennen und spricht für eine gute Besiedlungsfähigkeit des Doppelsintercopolymers.

Die histologische Auswertung des *in vitro* Versuchs wurde dadurch, dass die Partikel des Copolymers sehr hart waren und durch den Druck der Klinge beim Schneiden den Halt aneinander verloren, erheblich erschwert. Da das verwendete Paraffin als einziges Einbettungsmaterial die Partikel des Copolymers nicht anlöste oder mit der Fluoreszenz des Basismaterials und des Fluoreszenzfarbstoffs CM-Dil interferierte (wie es in Bezug auf das Copolymer bei dickeren Schnitten aus Araldit der Fall war), wurde es als akzeptable Alternative angesehen.

Für weitere Versuche sollte allerdings nach einem Einbettungsmaterial gesucht werden, das die gewünschten Eigenschaften (keine Behinderung der mikroskopischen Auswertung durch Eigenfluoreszenz oder fehlende Lichtdurchlässigkeit, kein Auflösen des Polymers sowie gute Anfertigung von Schnitten des Materials) mit der nötigen mechanischen Stabilisierung der Proben verbindet.

Bei der Auswertung der Schnitte des Zellversuchs unter dem Mikroskop konnten keine intakten Partikel des Doppelsintercopolymers gefunden werden. Sämtliche Partikel waren zu Blasen zusammengeschmolzen, lagen aber an den Zellen an und konnten aufgrund der typischen Eigenfluoreszenz des Materials als PLA-PGA-Copolymer identifiziert werden. Daher muss vermutet werden, dass eine Komponente, beispielsweise das nach der Alkoholreihe im Anschluss an die Färbung verwendete Orangenöl, das Copolymer aufgelöst hat. Vor einem weiteren Versuch mit dem Doppelsintercopolymer sollten daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Ursache zu ermitteln. Durch die somit mögliche Darstellung einer intakten Oberflächenstruktur der Presslinge könnte die Anheftung der Zellen an die Oberfläche der Partikel untersucht werden.

Durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die durch das Sintern des feinen Copolymerpulvers entstandenen mikrofeinen Porositäten beim Mahlen und bei dem anschließenden endgültigen zweiten Sintervorgang zu einem großen Teil erhalten bleiben. Durch die offensichtliche Eignung des Copolymers für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung ist es möglich, diese Methode in weiteren Arbeiten zur plastischen Darstellung der Osteoblastenadhäsion auf dem Doppelsintercopolymer zu verwenden. Deshalb wäre es empfehlenswert, die Effekte der feinen Mikroporen auf die Osteoblastenadhäsion und –proliferation in weiteren Arbeiten genauer zu untersuchen.

4.2. Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es grundsätzlich ermöglicht, ein Copolymer aus Polylactid und Polyglycolid als interkonnektierendes, poröses, vorgefertigtes, dreidimensional auf einen radiologisch vermessenen, errechneten Knochendefekt anpassbares Ersatzmaterial zu verwenden. Dabei wurde ein Puffersystem aus Calciumcarbonat integriert, das zusammen mit der Porosität des Materials bei Elimination und Abtransport der Stoffwechselprodukte der Zellen und der Abbauprodukte des Materials für eine gute Zellbesiedlung sorgt.

Durch den speziellen Aufbau der Doppelsintercopolymerpartikel aus kleineren, zusammen gesinterten Partikeln des amorphen Basispulvers besitzen diese eine einzigartige Oberflächenbeschaffenheit. In weiteren Arbeiten sollte der Effekt dieser Mikroporosität auf die Zellbesiedlung untersucht werden.

Trotz der guten Resultate in Bezug auf die Dimensionsstabilität und Porosität sowie der guten und schnellen Besiedlung mit Osteoblasten stellte sich das Material in der Vorbereitung auf einen in vivo Versuch am Minischwein als nicht uneingeschränkt einsetzbar heraus.

Für den Versuch sollte Doppelsintercopolymer mit Löchern zur Aufnahme des Materials versehen als Materialträger in vorher errechnete und als Negativ in Stereolithographiemodelle umgesetzte Knochendefekte integriert werden. Die Durchführung der

Vorarbeiten wie Herstellung von Arbeitsmodellen zum Schutz der Stereolithographie-Modelle sowie die Anfertigung der Sinterformen und auch die Vorbereitung des Basisgranulats verlief wie geplant. Die Anfertigung der Doppelsinterpresslinge mit den erarbeiteten Parametern für Temperatur, Sinterdruck und Sinterintervalllänge konnte als Erfolg gewertet werden. Ebenso war es möglich, je zwei Löcher in die Presslinge zu bohren, ohne dass diese dabei zu stark zerbröselten. Nach der Herstellung wurden die Presslinge gemäß dem in der Arbeit untersuchten Protokoll für jeweils 20 Min. auf der Ober- und Unterseite im UV-Licht mit einer Wellenlänge von 264 nm im Herolab UV sterilisiert. Im Anschluss an diese Behandlung erschienen die Presslinge erheblich instabiler als zuvor (das gelegentliche Ablösen einzelner Partikel wurde bei Doppelsintercopolymer immer wieder beobachtet). Insbesondere fiel auf, dass die Presslinge sehr sensibel auf punktuellen Druck wie bei Manipulation mit einer Pinzette waren. Das Einsetzen der individuell angefertigten Knochenersatzmodelle in das Operationsgebiet war trotz der schwierigen Handhabbarkeit zwar möglich, erforderte aber sehr große Vorsicht.

Eine Optimierung des Materials in Bezug auf die mechanische Stabilität scheint also notwendig, um die Druckbeständigkeit in der Wunde und auch die mechanische Handhabbarkeit zu erhöhen.

Um einen guten Halt der einzelnen Partikel zueinander zu behalten, könnten zwei Verbesserungsmöglichkeiten die alternativen Methoden der Sterilisation mit Gammastrahlung (Standard für die Sterilisation von Nahtmaterial aus PLA-PGA) oder Ethylenoxid sein, wie sie von Gleason (1998) und Smit et al. (2007) beschrieben wurden, da diese das Polymer eventuell nicht im selben Ausmaß wie UV-Strahlung beeinflussen. Die beiden alternativen Methoden Gammastrahlung und Ethylenoxid sind auch aufgrund der Möglichkeit der vollständigen Sterilisation des Materials der desinfizierenden (lediglich keimreduzierenden) Bestrahlung mit UV-Licht vorzuziehen.

Grundsätzlich sollte die Adhäsion der Partikel untereinander schon vor dem Sterilisationsvorgang verbessert werden, da diese die Achillesferse des Materials darstellt. Ansatzweise erscheint es möglich, die einzelnen Partikel auf chemischem Weg oberflächlich anzulösen und so miteinander zu verkleben. Es ist allerdings schwer, die passenden Chemikalien auszuwählen und zu dosieren. Versuchsweise wurde eine

Mischung aus Methylenchlorid und Methanol (50:50 nach Volumen) getestet. Dieses Mischungsverhältnis löst das Copolymer allerdings sehr schnell komplett auf (ein Effekt, der das Aufschäumen des Copolymers mit Methylenchlorid erst ermöglicht), statt nur die Oberfläche anzulösen, so dass geringere Konzentrationen oder andere Stoffe ausprobiert werden sollten. Weiterhin ist zu bedenken, dass durch ein oberflächliches Anlösen auch die eigene mikrostrukturierte Oberfläche der Partikel verklebt werden könnte.

Wenn eine Verbesserung der Partikeladhäsion für das Doppelsintercopolymer nicht möglich ist, könnte also das Aufschäumen von PLA-PGA-Copolymer einen weiteren Weg des Einsatzes des Materials als individuell dreidimensional konfigurierbares und bioresorbierbares Knochenersatzmaterial darstellen.

5. Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit konnte eine Weiterentwicklung des Copolymers aus Polylactid und Polyglycolid für den Einsatz als Knochenersatzmaterial erreicht werden. Hierbei standen insbesondere die Dimensionstreu bei der Herstellung, das Ermöglichen der Besiedlung des Materials mit Zellen durch interkonnektierende Porosität, und die Vermeidung von lokaler Übersäuerung der Implantationsstelle aufgrund saurer Abbauprodukte durch Abpufferung im Vordergrund.

Durch das Vorsintern und das anschließende Mahlen konnten Partikel gewonnen werden, die bei einer erneuten Sinterung keine weitere Schrumpfung im Bereich des Übergangs in den Glaszustand aufwiesen. Bei insgesamt 93 in Formen mit definierten Abmessungen aus dem Doppelsintercopolymer hergestellten Presslingen konnte kein Volumeneffekt festgestellt werden, so dass die Methode der Doppelsinterung gegenüber dem einfachen Sintern des Copolymers eine zuverlässige, reproduzierbare Verbesserung darstellt.

Mit Analysesieben gelang die Aufteilung des Materials in verschiedene Partikelgrößen. Der Effekt der Partikelgrößen auf die wichtigen Parameter Porengröße, Flüssigkeitsaustausch innerhalb der Poren und mechanische Stabilität wurde untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine geeignete Porengröße bei guter Durchspülbarkeit und mittelmäßiger mechanischer Stabilität mit Partikelgrößen von 400 bis 600 μm zu erreichen ist.

Im Zellversuch wurde das in dieser Arbeit neu entwickelte Material auf seine Einsatzfähigkeit hin überprüft. Es wurden jeweils zwei Presslinge aus Doppelsintercopolymer mit osteoblastenähnlichen Zellen besiedelt und einen, drei, fünf, sieben und vierzehn Tage kultiviert. Die Zellen wurden anschließend auf den Presslingen für die histologische Auswertung fixiert, eingebettet und gefärbt (Hämatoxylin-Eosin, Fluoreszenzfarbstoff CM-Dil).

Nach fünf Tagen war eine deutliche Proliferation der angesiedelten Zellen erkennbar. Ab dem siebten Tag nach Ansiedlung konnten große Multilayer beobachtet werden.

Auch in den Poren des Doppelsintercopolymers konnte eine Ausbreitung der osteoblastenähnlichen Zellen nachgewiesen werden. Gerade die Morphologie der Zellen mit ausgeprägten Zellausläufern und die großflächige Besiedlung der Poren lässt auf eine gute Zellkompatibilität des neuen Materials und seine Eignung als individuell dreidimensional konfigurierbares und bioresorbierbares Knochenersatzmaterial schließen.

Um das Doppelsintercopolymer für den Einsatz als Knochenersatzmaterial zu optimieren, sollte allerdings in weiteren Studien unter anderem die mechanische Stabilität weiter verbessert werden und insbesondere der Druckfestigkeit bei punktueller Belastung weitere Beachtung geschenkt werden, bevor das Material alle Bedingungen für einen Einsatz im Tissue Engineering optimal erfüllen kann.

6. Quellenangabe

6.1. Literatur

Agrawal CM, Athanasiou KA (1997)

Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA-Implants.
J Biomed Mater Res (Appl. Biomater.) 38: 105-114

Anderson JM, Shive MS (1997)

Biodegradation and biocompatibility of PLA and PGA microspheres.
Adv Drug Delivery Reviews 28: 5-24

Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T, di Silvio L (2004)

Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study.
Journal of Microscopy 215: 100-110

Böstman OM (1991)

Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants.
J Bone Joint Surg 73B: 679-682

Büchter A, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U (2004)

Treatment of severe peri-implant bone loss using autogenous bone and a bioabsorbable polymer that delivered doxycycline (Atridox™).
British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 42: 454-456

Chan C, Thompson I; Robinson P; Wilson J; Hench L (2002)

Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute.
Int J Oral Maxillofac Surg 31: 73-77

Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS (1993)

Periodontal regeneration of human intrabony defects.
I. Clinical measures, J Periodontol 64: 254-260

Ehmke B, Rüdiger SG, Hommens A, Karch H, Flemmig TF (2003)

Guided tissue regeneration using a polylactic acid barrier, Part II: Predictors influencing treatment outcome.

J Clin Periodontol 30: 368-374

El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS, Laurencin CT (2003)

Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering.

Biomaterials 24: 1213-1221

Epple M (2003)

Biomaterialien und Biomineralisation, Teubner, Wiesbaden.

ISBN: 3-519-00354-6

Flemmig ThF (1999)

Chirurgische Therapie marginaler Parodontitiden.

Dtsch Zahnärztl Z 54: 360–365

Gleason WB (1998)

Bioabsorbable Polymers

URL: <http://www.courses.ahc.umn.edu/medical-school/BMEn/5001/notes/bioabs.html>

am 11.03.2005, 9:24 Uhr gespeichert

Haller O (2005)

Viren als Krankheitserreger / Prionen

In: Kayser FH (Hrsg) Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie Thieme,

Stuttgart, New York, 11. Auflage, 551-553

Hou Q, Grijpma DW, Feijen J (2003)

Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique.

Biomaterials 24: 1937-1947

Jones SJ, Boyde A (1977)

The migration of osteoblasts.

Cell Tissue Res. 184: 179-93

Kayser FH, Böttger EC (2005)

Sterilisation und Desinfektion

In: Kayser FH (Hrsg) Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie Thieme, Stuttgart, New York, 11.Auflage, 55-63

Kricheldorf H (2001)

Syntheses and application of polylactides.

Chemosphere 43 (1): 49-54

Kruyt M, de Bruijn J, Veenhof M, Oner FC, van Bitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJA (2003)

Application and limitations of Chloromethylbenamidodialkylcarbo-cyanine for tracing cells in bone tissue engineering.

Tissue Engineering, February 1, 9(1): 105-115

Marxkors R, Meiners H (2001)

Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde,

5. Auflage, Dt. Zahnärzte Verl. Köln, München

Merolli A, Gabbi C (2001)

Bone response to polymers based on polylactic acid and having different degradation times.

Journal of Materials Science; Materials in Medicine 12: 775-778

Miller RA, Brady JM, Cutright DE (1977)

Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios.

J Biomed Mater Res 11(5): 711-719

Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Zeppetelli S, Ambrosio L (2004)

Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine 15: 419-422

Petrides PE (1998)

Prionkrankheiten,

In: Löffler G, Biochemie und Pathobiochemie/G.Löffler; Petro E. Petrides,

6. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 312-313

Hildebrandt H (1998)

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch

258. Aufl., de Gruyter, Berlin

Sándor GKB (2003)

The minimization of morbidity in cranio-maxillofacial osseous reconstructions. Bone graft harvesting and coral-derived granules as a bone graft substitute,

Institute of Dentistry, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Oulu, P.O.Box 5281, FIN-90014

URL: <http://herkules.oulu.fi/Issn03553221/>)

Schiebler TH (1996)

Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie/L.C.Junqueira, J. Carneiro. Übers., überarb. und erg. von Theodor H. Schiebler, 4. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Schwenzer N, Ehrenfeld M (2000)

Plastische und wiederherstellende Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie, In: Schwenzer N, Ehrenfeld M, (Hrsg.), Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Band 2: Spezielle Chirurgie, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York, 379-419

Smit TH, Thomas KA, Hoogendoorn RJ, Strijkers GJ, Helder MN, Wuisman PI (2007)

Sterilization and strength of 70/30 polylactide cages: e-beam versus ethylene oxide.
Spine 32 (7): 742-7

Stancari F, Zanni B, Bernardi F, Calandriello M, Salvatorelli G (2000)

Use of PLA-PGA (Copolymerised Polylactid/Polyglycolic Acids) as a bone filler.
Clinical experience and histologic study of a case.
Quintessenz 51 (1): 47-52

van der Elst M, Klein C, de Blik-Hogervorst JM, Patka P, Haarman HJThM (1999)

Bone tissue response to biodegradable polymers used for intra medullary fracture fixation: A long term study in sheep femora.
Biomaterials 20: 121-128

Wallkamm B, Schmid J; Hämmerle CHF, Gogolewski S, Lang NP (2003)

Effekt of bioresorbable fibres (Polyfibre) and a bioresorbable foam (Polyfoam) on new bone formation. A short term experimental study on the rabbit skull.
Clin Oral Impl Res 14: 734-742

Weihe S, Wehmöller M, Tschakaloff A, von Oepen R, Schiller C; Epple M, Eufinger H (2001)

Alternative Knochenersatzmaterialien zur präoperativen Fertigung individueller CAD-CAM-Schädelimplantate.
Mund Kiefer GesichtsChir 5: 299-304

Zeilhofer HF (2005)

Innovative dreidimensionale Techniken zur Schädelmodellherstellung und Operationsplanung, in: Hoch HH (Hrsg.), Praxis der Zahnheilkunde, Band 10/1 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, 3.Auflage, Urban & Fischer, München, Jena, 33-52

6.2. Abbildungen

S. 15. Modifiziert nach

Gleason WB (1998) Bioabsorbable Polymers

URL: <http://www.courses.ahc.umn.edu/medical-school/BMEn/5001/notes/bioabs.html>

am 11.03.2005, 9:24 Uhr gespeichert

S. 34: Modifiziert nach

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V.

Hans-Knöll-Institut, Praktikumsleiter Dr. Christian Hertweck

Praktikum Naturstoffchemie WS 2007/2008

URL: <http://www.hki-jena.de/index.php/209b077a3c4d86d098bdc03f1b166852/2/442/download/2139.pdf>

am 23.02.2009, 20.29 Uhr gespeichert

S. 90. Modifiziert nach

Marxkors R, Meiners H (2001)

Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde,

5. Auflage, Dt. Zahnärzte Verl. Köln, München

7. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name, Vorname:	Cuhlmann, Christian
Geburtsdatum,-ort:	22.04.1979 in Hamburg
Familienstand:	verheiratet mit Ramona Cuhlmann, geb. Müller
Kind:	Helen Sophia

SCHULAUSSBILDUNG

1985 - 1989	Don-Bosco-Grundschule in Dorsten (Lembeck)
1989 – 1996	Gymnasium der Marianhiller Missionare in Maria Veen
1996 - 1997	Terry Highschool in Terry/Mississippi (Freistellung vom Gymnasium, Highschool Diplom)
1997 - 1999	Gymnasium Petrinum in Dorsten Abitur

STUDIUM DER ZAHNMEDIZIN

Okt. 2000	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Sep. 2001	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
25. März 2003	Zahnärztliche Vorprüfung
14. - 25.02.2005	Famulatur in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Knappschaftskrankenhauses in Recklinghausen
Feb.– Juni 2006	Staatsexamen der Zahnheilkunde
29.06.2006	Approbation als Zahnarzt

Haltern am See, 22. Juli 2009

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

8. Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tissue Engineering und Biomineralisation und des Instituts für Anatomie, sowie weiteren Arbeitsgruppen, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Besonders hervorzuheben sind dabei die Herren Dr. Wiesmann, Dr. Plate, Professor Reinhard, Dr. Dirksen, Dr. Szuwart, Dipl. Ing. Huda, Nazer und Sommer sowie Frau Dr. Lüttenberg, Frau Grabiniok, Frau Schütte und Frau Kramer, die alle mit Rat und Tat zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Auch bei meinen Eltern und Schwiegereltern bedanke ich mich für Motivation und Unterstützung.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gebührt meiner Frau Ramona für die beste konstruktive Kritik und Motivation sowie unserer Tochter Helen Sophia.