

Appendix

Zusammenfassung (summary in German)

Poly(α -hydroxycarbonsäuren) bilden eine Polyester-Stoffgruppe mit einer langen Geschichte im Bereich der biomedizinischen Anwendung. Die Polyester, allen voran Polyglycolid und Polylactid als deren wichtigste Vertreter, sind chemisch (durch einfache Hydrolyse) und/oder biologisch abbaubar. Die entstehenden Degradationsprodukte können durch Zellen und Bakterien aufgenommen und auf herkömmlichen Stoffwechselwegen metabolisiert werden. Die Materialien zeigen *in vivo* anfänglich eine exzellente Biokompatibilität im Kontakt mit Zellen und Geweben des Implantationsortes. Für verschiedene Zell-Phänotypen wurde eine gute Adhärenz, Proliferation und unveränderte Differentiation auf diesen Materialien bereits mehrfach nachgewiesen. Diese Eigenschaften qualifizieren Poly(α -hydroxycarbonsäuren) (Homo- und Copolyester) für den *in vivo* Einsatz und eröffneten den Einzug in das Feld der klinisch verwendeten Biomaterialien. Die bekanntesten Beispiele hierfür sind zum einen Matrices als Gerüstsubstanzen im Bereich des *Tissue Engineering*, einer neuen Disziplin innerhalb der molekularen Zellbiologie, zur *in vitro/in vivo* Rekonstruktion von Geweben und Organen. Degradierbare Nägel, Platten und Schrauben dienen der Fixierung und Verstärkung von Knochensegmenten. Im Gegensatz zu Metallen und anderen Permanentimplantaten erübrigt sich eine zweite Operation zur Entfernung der eingebrachten Materialien. Des weiteren dienen Polyester als Trägersubstanzen in der Entwicklung von Systemen zur kontrollierten Freisetzung von Arzneimitteln. Die Freisetzungsrates kann dabei als Funktion der Degradationsgeschwindigkeit eingestellt werden.

Komplikationen im klinischen Einsatz können im Zuge des fortschreitenden Degradationsprozesses auftreten. Die Akkumulation von Abbauprodukten und die damit einhergehende lokale Übersäuerung sind inkompatibel mit den Anforderungen eines physiologischen pH-Wertes. Beobachtete Konsequenzen sind Gewebeschädigungen, Zelltod oder die Auflösung von umgebendem Knochenmineral. Die thermisch initiierte Festkörper-Polykondensation von Natriumchloracetat (und anderer Metallhalogenacetate) führt zu Polyglycolid mit eingeschlossenen Kochsalz-Kristalliten. Das Kochsalz kann durch Waschen mit Wasser komplett ausgewaschen werden. Es resultiert eine interkonnektierte Porosität mit Porendurchmessern im

sub- μm -Bereich. Die inhärente Mikroporosität stellt (in Form einer Strukturierung) eine zusätzliche Qualifikation für das Biomaterial Polyglycolid dar.

Die Eignung und das Verhalten eines biodegradierbaren Polyesters *in vivo* hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, von denen die Art des Polyesters, das mittlere Molekulargewicht, der Grad der Kristallinität, die Porosität, die Materialeigenschaften und das Degradationsverhalten die Schlüsselparameter auf der Materialseite darstellen.

Die Synthese von Polyglycolid aus Natriumchloracetat wurde *ex situ* mit diversen Methoden verfolgt, um mehr über den Charakter der Reaktion selbst zu erfahren und das resultierende Produkt in seinen Eigenschaften zu charakterisieren.

Die Reaktion verläuft als Polycondensation ohne das Auftreten von detektierbaren Zwischenprodukten. Der Umsatz erweist sich als stark temperaturabhängig und kann mit einem sigmoidalen Verlauf beschrieben werden. Bei einer Temperatur von 180°C ist die Reaktion bereits nach zwei Stunden vollständig abgelaufen, während etwa 15 Stunden bei 160° nötig sind, um den gleichen Umsatz zu erzielen.

Der Polymerisationsgrad steigt bei beiden Temperaturen mit der Zeit an, erreicht ein Maximum von etwa durchschnittlich 40 Monomereinheiten pro Kette, um schließlich wieder zu sinken. Dieser Verlauf erklärt sich durch die Überlagerung von thermisch initiiertem Kettenwachstum und gleichzeitiger thermischer Zersetzung der entstandenen Ketten.

Der Kristallisationsgrad steigt ebenfalls im Laufe der Reaktion an und bewegt sich final bei Werten von $55 \pm 10 \%$ im Rahmen von konventionell hergestelltem Polyglycolid.

Die resultierende Porosität des Polymers ergibt sich aus der Anzahl, dem Volumen und der äußeren Form der Kochsalz-Kristallite. Durch die anhaltende thermische Aktivierung kommt es zu Reifungsprozessen (Minimierung von Oberflächenenergie), so dass größere Kristalle auf Kosten kleinerer Kristallite wachsen. Dieser Prozess endet bei Durchmessern von 300-400 μm .

Die auf dem beschriebenen Weg erzielbaren Molekulargewichte stellen eine Einschränkung des synthetische Potentials der Reaktion dar. Der Einfluss mehrerer Faktoren (wie z.B. Kristallinität, Reinheit und Korngrößen des Precursors, Wärmegradienten, Schüttdichte) auf die Reaktivität dieser Festkörperreaktion erschwert die reproduzierbare Synthese von Polyglycolid mit kontrollierten

Eigenschaften.

Das *in vitro* Degradationsverhalten von so erhaltenem Polyglycolid wurde an porösen und massiven Körpern in Wasser (ungepuffert) und Zell-Nährmedium (gepuffert bei pH 7.4) untersucht. Die Studie wurde bei 37°C über einen Zeitraum von acht Wochen durchgeführt. Die Medien wurden wöchentlich gewechselt, wobei die Pufferkapazität des Nährmediums ausreichte, ein Absinken des pH-Wertes zu verhindern. Im Wasser zeigte sich die saure Degradation in Werten von bis zu 2.5 nach 2-3 Wochen Inkubation. Zu späteren Zeitpunkten wurden höhere Werte im Bereich zwischen 4 und 6 gemessen, was mit dem Massenverlust der Proben (Verlust des aziden Potentials) und stetigem Medienwechsel erklärt werden kann. Poröse Tabletten erwiesen sich in beiden Medien als die stabileren Körper. In Nährmedium zeigte sich eine schnellere Erosion als im ungepufferten Wasser, in dem die Geometrie der Tabletten länger stabil erhalten blieb. Ein Degradationsgradient mit einer autokatalytisch beschleunigten Degradation im Inneren und einer langsameren in Randbereichen der Körper wurde nicht beobachtet. Ein solches Verhalten hatte in vergleichbaren Studien an massiven, voluminösen Polylactid-Körpern zu hohlen Strukturen geführt und gilt als anerkannter Mechanismus.

Die Kristallinität bewegte sich relativ konstant um einen Wert von 60 % herum. Der schnellere Abbau amorpher Anteile wird durch die parallele Degradation kristalliner Domänen kompensiert. Für die Parameter mittleres Molargewicht, Elastizitätsmodul und Bruchfestigkeit ergab sich erwartungsgemäß ein rapider exponentieller Abfall.

Verglichen mit Polylactid oder Poly(3-hydroxybuttersäure) verläuft die Degradation von Polyglycolid sehr schnell und ist verbunden mit einer nachhaltig sauren Wirkung. Letztere steht im Gegensatz zu der Anforderung eines möglichst physiologischen pH-Wertes an einem potentiellen Implantationsort.

In der Erwartung, das Reaktionsprinzip der Polykondensation im Festkörper auf höhere Analoga zu übertragen und poröse Polyester zu erhalten, wurden Natrium und Silber-3-chlorbutyrat sowie Natriumchlorpivalat auf das Auftreten dieser Reaktion hin untersucht. Die entsprechenden Polymere, Poly(3-hydroxybuttersäure) und Poly(pivalolacton), sollten biodegradierbar und biokompatibel sein. Zudem besitzen sie, verglichen mit Polyglycolid, eine höhere Stabilität bezüglich des hydrolytischen Abbaus.

Im Falle der Butyrate erwies sich die Halogenfunktion in der β -Position als empfindlich gegenüber der thermisch induzierten Eliminierung, welche zur Bildung einer α/β -Doppelbindung führt. Für das Natriumsalz wurden als Hauptprodukte bei einer Reaktionstemperatur von 130°C Natriumcrotonat und Crotonsäure erhalten. Als Nebenprodukt entstanden Oligomere der gewünschten Poly(3-hydroxybuttersäure). Bei dieser Temperatur überwiegt die Eliminierung von HCl gegenüber der intermolekularen Substitution. Eliminierung und Polykondensation treten parallel auf unter Verflüssigung des Reaktionsansatzes. Die Variation der Heizrate und der Endtemperatur führen nicht zu einer Trennung der thermischen Ereignisse. Die Reaktion wird begleitet von einem einstufigen Massenverlust, der dem Abgang organischer Molekülfragmente entspricht. Natriumchlorid und Natriumcrotonat verbleiben als Restsubstanzen.

Beim reaktiveren Silbersalz hingegen, das bei einer Temperatur von 100° umgesetzt wurde, ergab sich ein umgekehrtes Verhältnis. Poly(3-hydroxybuttersäure) konnte als Hauptprodukt identifiziert werden. Geringe Mengen an Crotonsäure wurden als Nebenprodukt gebildet. Der Ansatz zeigte keine Verflüssigung.

Das Erhitzen des Natriumchlorpivalats lieferte eine Mischung aus unreaktiertem Precursor und Poly(pivalolacton). Die Polykondensation trat isoliert von anderem Ereignissen auf und war von keinem Massenverlust begleitet. Die Precursor-Synthesen zeigten für beide Systeme eine starke Tendenz zur Solvatbildung. Die Lösungsmittelmoleküle können im Falle des Pivalats durch thermische Vorbehandlung entfernt werden. Beim Butyrat ist ein solches Vorgehen aufgrund der thermischen Instabilität ausgeschlossen. Die explorativen Studien zeigten eine teilweise erfolgreiche Übertragung des Reaktionsprinzips im Festkörper. Raum für Optimierung bilden die solvatreie Synthese und die Aufklärung der Beziehung zwischen Struktur und Reaktivität der Precursor.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Entwicklung von Kompositen aus Polyglycolid und Calciumphosphat als potentielle Knochenersatzmaterialien beschrieben. Das Konzept orientiert sich an dem Komposit-Charakter des natürlichen Knochens mit Polyglycolid als dem Kollagen-Analogen und Calciumphosphat als mineralischer Phase. Das Material wurde im Hinblick auf den erzeugten pH-Wert in destilliertem Wasser untersucht. Komposite mit synthetischem Hydroxylapatit waren nicht in der

Lage, den pH-Wert in einem physiologischen Bereich zu halten. Die saure Degradation des Polyesters überwog die basische Auflösung des Apatits. In einer zweiten Serie wurde ein amorpher carbonathaltiger Apatit verwendet, der dem Knochenmineral in Kristallinität, Carbonatgehalt und Löslichkeit sehr ähnelt.

Aus diesem Material hergestellte Tabletten wurden in destilliertem Wasser optimiert. Inkubiert in Zell-Nährmedium zeigten die optimierten Tabletten einen nachhaltig physiologischen pH-Wert. Damit ist eine wichtige Voraussetzung für eine vitale Zellaktivität am Implantationsort für eine biologische Integration des Materials in das Wirtsgewebe erreicht.

Die Komposit-Tabletten wurden einer Biokompatibilitäts-Testung mit murinen Osteoblasten unterzogen. Die kultivierten Zellen zeigten eine gute Adhärenz auf dem Material und proliferierten bis zur Bildung einer konfluenten Schicht. Die Osteoblasten erhielten ihren differenzierten Phänotyp über die vierwöchige Dauer des Experiments. Als Folge der Erhaltung der Zellfunktionen wurde ein mehrschichtiger Kollagenrasen auf der Kompositoberfläche von den Zellen gebildet. Darüber hinaus konnten mineralisierte Bereiche innerhalb des Kollagens nachgewiesen werden, die eine aktive Calcifikation anzeigen. Die Biokompatibilität der getesteten Komposite erwies sich als exzellent und führte im *in vitro* Experiment zur Bildung von knochenähnlichem Gewebe.

Die chemische Transformation des carbonathaltigen Apatits in Zellkultur wurde mit Hilfe der Roentgenpulverdiffraktometrie an den zurückgewonnenen Proben in Hinblick auf die Kristallinität untersucht. Trotz der thermodynamische Instabilität des amorphen Carbonatapatits konnte eine Konversion zu höher kristallinem Hydroxylapatit nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich verhindern der Kontakt zum Polyglycolid und/oder die im Nährmedium gelösten Moleküle (z.B. Serumalbumin, Aminosäuren, Glukose) den Kristallisationsprozess durch Inhibierung des Kristallwachstums. Durch eine derartige Stabilisierung (Koordination von Makromolekülen an kristallographischen Flächen der Calciumphosphat-Kristallkeime) wird im Knochen die nanokristalline Natur der Mineralphase erhalten, um ein anhaltendes *Remodeling* durch zelluläre Aktivität zu ermöglichen.

In Bezug auf die anzustrebende Porosität eines Implantatmaterials ist der poröse Knochen (Spongiosa) das Idealbild. Die Knochenstruktur erlaubt Zell-Migration, -

Versorgung und Kommunikation. Das Porensystem des Polyglycolids aus Festkörperreaktion (mit Porendurchmessern im sub- μm -Bereich) ist für diese Aufgabe nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde die Einführung einer Makroporosität für Polymer-Körper versucht. Das Auswaschen von extern zugeführtem Kochsalz mit größeren Kristallen ($\approx 300 \mu\text{m}$) führte zu einer Porosität, die in Porendurchmesser und -verteilung dem natürlichen Vorbild sehr ähnlich ist. Dieser Strukturierungsversuch liefert jedoch isolierte Poren und kein interkonnektiertes Porensystem. Die Verwendung von wasserlöslichen Fäden aus PVA als Porogen schlug aufgrund der starken Quellung in Wasser fehl. Das ideale Porogen sollte ein wasserlösliches Fadenmaterial sein, welches sich unter geringer Volumenveränderung auflöst.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass der natürliche Knochen ein hochoptimiertes Kompositmaterial ist, welches zugleich mehreren Aufgaben erfolgreich dient. Die Erzeugung eines synthetischen Äquivalents mit vergleichbaren Eigenschaften für den Knochenersatz erscheint in seiner Komplexität unmöglich. Aussichtsreicher erscheint die Strategie, den natürlichen Funktionen im Körper ein Material anzubieten, das den zellulären Umbau zu Knochengewebe erlaubt und fördert. Diese Konvertierung kann im Rahmen des *Tissue Engineering* innerhalb oder außerhalb des Körpers erfolgen.

Das verfolgte Konzept der Komposite aus Polyglycolid und Carbonatapatit erwies sich als sehr erfolgreich und führte zur Bildung von knochenähnlichem Gewebe außerhalb des Körpers. Weitere Forschung ist notwendig zur Ermittlung der idealen Materialkombination (Wahl des am besten geeigneten Polyesters) und zur Einführung einer biomimetischen Makroporosität, die als Kompromiss noch genügend Stabilität des Implantats zulässt. Die Erreichung dieser Ziele würde die bewiesene Biokompatibilität des Materials abrunden.