

**UNTERSUCHUNGEN AN FESTKÖRPERCHEMISCH
DARSTELLBAREN BIODEGRADIERBAREN
POLYHYDROXYCARBONSÄUREN**

- SYNTHESE UND ANWENDUNG IN DER MEDIZINTECHNIK

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DES FACHBEREICHS CHEMIE
DER UNIVERSITÄT HAMBURG

VORGELEGT VON

**MICHAEL SIEDLER
AUS HAMBURG**

Hamburg 2001

**INSTITUT FÜR ANORGANISCHE UND ANGEWANDTE CHEMIE DER
UNIVERSITÄT HAMBURG**

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum April 1999 bis September 2001 im Institut für Anorganische und Angewandte Chemie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. M. Epple
- 2. Gutachter: Prof. Dr. D. Rehder

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2001

Die Hummel wiegt 4,8 Gramm. Sie hat eine Flügelfläche von $1,45 \text{ cm}^2$ bei einem Flächenwinkel von 6 Grad. Nach den Gesetzen der Aerodynamik kann die Hummel nicht fliegen. Aber die Hummel weiß das nicht.

Technologisches Phänomen

Diese Arbeit ist all denen gewidmet, die mir wichtig sind.

Inhaltsverzeichnis

A EINLEITUNG

A.I GRUNDLAGEN	1
A.I.I <i>Synthese von Polyhydroxycarbonsäuren</i>	2
A.I.II <i>Festkörperchemische Darstellung von Polyhydroxycarbonsäuren</i>	4
A.II DEGRADATIONSVERHALTEN VON POLYHYDROXYCARBONSÄUREN	6
A.III ANWENDUNGEN BIORESORBIERBARER POLYESTER IN DER MEDIZINTECHNIK	8

B POLYESTERSYNTHESE 12

B.I COPOLYMERISATION VON HALOGENCARBOXYLATEN	14
B.I.I <i>Grundlagen</i>	14
B.I.II <i>Präparative Arbeiten</i>	14
B.I.III <i>Ergebnisse</i>	17
B.I.IV <i>Zusammenfassung</i>	21
B.II DIE THERMISCH INITIIERTE POLYMERISATION CHIRALER HALOGENCARBOXYLATE	22
B.II.I <i>Grundlagen</i>	22
B.II.II <i>Präparative Arbeiten</i>	24
B.II.III <i>Ergebnisse</i>	27
B.II.IV <i>Zusammenfassung</i>	42
B.III FESTKÖRPERCHEMISCHE SYNTHESE FUNKTIONALISierter POLYESTER	45
B.III.I <i>Grundlagen</i>	45
B.III.II <i>Präparative Arbeiten</i>	47
B.III.III <i>Ergebnisse</i>	48
B.III.IV <i>Zusammenfassung</i>	58
B.III.V <i>Charakterisierung der verwendeten Materialien</i>	59

C DEGRADATIONSSTUDIEN AN POLYESTERSYSTEMEN 64

C.I ANALYSE DES ABBAUVERHALTENS VON FORMKÖRPERN AUS PLGA	64
C.I.I <i>Grundlagen</i>	64
C.I.II <i>Präparative Arbeiten</i>	71
C.I.III <i>Ergebnisse</i>	75
C.I.IV <i>Zusammenfassung</i>	89
C.I.V <i>Verwendete Materialien</i>	91
C.II BESCHLEUNIGTE DEGRADATION AN MEDIZINISCH OPTIMIERTEN POLYESTERN	93
C.II.I <i>Grundlagen</i>	93
C.II.II <i>Präparative Arbeiten</i>	97
C.II.III <i>Ergebnisse</i>	99
C.II.IV <i>Zusammenfassung</i>	107
C.II.V <i>Verwendete Materialien</i>	109

D	MEDIZINISCHE ANWENDUNGEN BIORESORBIERBARER POLYESTER	114
D.I	BIOLOGISCHE TESTUNG VON POLYESTER/CARBONATAPATIT-KOMPOSITMATERIALIEN	115
<i>D.I.I</i>	<i>Grundlagen</i>	<i>115</i>
<i>D.I.II</i>	<i>Präparative Arbeiten</i>	<i>122</i>
<i>D.I.III</i>	<i>Ergebnisse</i>	<i>123</i>
<i>D.I.IV</i>	<i>Zusammenfassung</i>	<i>132</i>
<i>D.I.V</i>	<i>Charakterisierung der verwendeten Materialien</i>	<i>134</i>
D.II	KONTROLLIERTE WIRKSTOFFFREISETZUNG	138
<i>D.II.I</i>	<i>Grundlagen</i>	<i>138</i>
<i>D.II.II</i>	<i>Präparative Arbeiten</i>	<i>145</i>
<i>D.II.III</i>	<i>Ergebnisse</i>	<i>148</i>
<i>D.II.IV</i>	<i>Zusammenfassung</i>	<i>158</i>
<i>D.II.V</i>	<i>Verwendete Materialien</i>	<i>161</i>
E	ZUSAMMENFASSUNG	163
F	SUMMARY	169
G	ANHANG	173
G.I	EINGESETZTE GERÄTE	173
G.II	SICHERHEIT UND ENTSORGUNG	176
G.III	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	180
G.IV	KURZZUSAMMENFASSUNG	181
G.V	VERÖFFENTLICHUNGEN	183
G.VI	LEBENSLAUF	185
G.VII	DANK	186
G.VIII	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNGEN	188

A Einleitung

A.1 Grundlagen

Polyhydroxycarbonsäuren wie Polyglykolid, Polylactid und Poly(ϵ -caprolacton) sind seit der ersten Synthese vor ca. 150 Jahren in zunehmendem Maße in den Blickpunkt der modernen Polymerchemie gerückt, da sie als biologisch abbaubare Polymerwerkstoffe eine Alternative zu herkömmlichen Polymeren, wie Polyvinylchlorid (PVC) oder Polyolefinen (PE, PP), darstellen. Zwar sind viele der verwendeten Polymere weitgehend ungiftig, doch stellen sie aufgrund ihrer Unempfindlichkeit gegen Verwitterung ein Problem bei der Abfallentsorgung dar (z.B. PVC). Biologisch abbaubare Polymere hingegen haben den Vorteil, dass sie sich bei Kontakt mit Wasser in ihre ungiftigen Monomere aufspalten. Diese können von Mikroorganismen zu Wasser und Kohlendioxid weiter umgesetzt werden, so dass es zu keiner Anreicherung von toxischen Abbau- oder Nebenprodukten im Boden kommt.^[1]

Die wichtigsten Vertreter dieser Stoffgruppe sind in **Abbildung A.1** dargestellt. Hierzu zählen neben Polyhydroxyessigsäure (Polyglykolid, PGA), Polymilchsäure (Polylactid, PLLA) und deren Copolymere auch die höheren Homologen, wie etwa Poly(3-hydroxybutyrat) und Poly(3-hydroxyvalerat) sowie deren Copolymere.

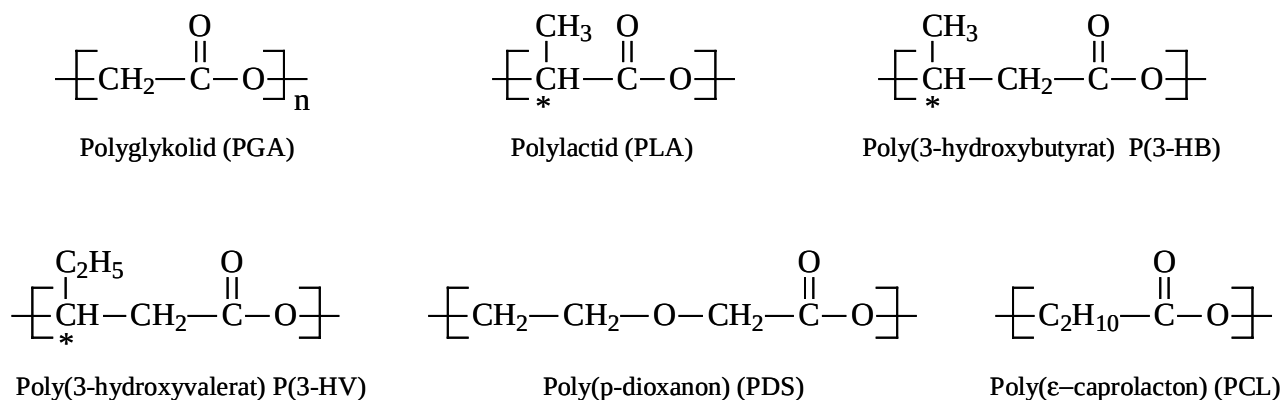


Abbildung A.1: Biologisch abbaubare Polyhydroxycarbonsäuren

Gegen eine breite Anwendung abbaubarer Polymere in der Industrie, beispielsweise als Verpackungsmaterial, sprechen bisher jedoch die im Vergleich zu konventionellen Polymeren höheren Herstellungskosten dieser Materialien.^{[2],[3]}

^[1] D. Seebach, A. Brunner, B.M. Bachmann, T. Hoffmann, F.N.M. Kühnle, U.D. Lengweiler, Biopolymers and – oligomers of (R)-3-Hydroxyalkanoic Acids – Contributions of synthetic chemists, *Lectures of the Ernst Schering Research Foundation*, **1995**, 28

^[2] P.J. Hocking, The classification, preparation, and utility of degradable polymers, *J.M.S.- Rev. Macrom. Chem. Phys.* **1992**, C32 (1), 35-54

^[3] J.-U. Ackermann, W. Babel, Approches to increase the economy of the PHB production, *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 59, 183-186

Ein vielversprechendes Anwendungsgebiet, bei dem die Herstellungskosten nur eine untergeordnete Rolle spielen, eröffnet sich bioabbaubaren Materialien in der Medizintechnik als Werkstoff für temporäre Implantate. Diese Implantate sollen nur solange eine Funktion im Körper erfüllen, bis sich der Körper regeneriert hat und diese Aufgabe wieder übernehmen kann. Hierfür erscheinen Polyhydroxycarbonsäuren als biokompatible und biodegradierbare Polymere besonders geeignet, da sie sich im Laufe der Zeit zersetzen und der Organismus in der Lage ist, die entstehenden Abbauprodukte zu resorbieren. Typische Beispiele für derartige Anwendungen sind zum Beispiel chirurgische Nahtmaterialien und Wundauflagen.^[4]

Ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet von resorbierbaren Polymeren ist die Verwendung als Trägermaterial im Bereich der kontrollierten Arzneimittelfreisetzung (*controlled drug release*).^[5] Hierbei sehen mögliche Konzepte vor, resorbierbare Polymere in einer geeigneten Weise mit einem Wirkstoff zu beladen, so dass sie als schützendes Trägermaterial und Wirkstoffreservoir dienen können. Das Ziel ist es, die Degradation des Polymers mit der Freisetzung des Wirkstoffs so zu koppeln, dass über einen bestimmten Zeitraum stets eine therapeutisch optimale Wirkstoffkonzentration erreicht wird.

Ein in naher Zukunft wichtiges Einsatzfeld zeichnet sich unter anderem auch im Bereich des „tissue engineering“ ab. Das Ziel dieser Schlüsseltechnologie ist es, lebendes funktionelles Gewebe *in vitro* zu erzeugen und zur Rekonstruktion von geschädigten Organen zu verwenden. Hierbei dienen Gewebestrukturen aus resorbierbaren Materialien als formgebende Gerüststrukturen für die eingebrachten lebenden Zellen.^[6]

A.I.I Synthese von Polyhydroxycarbonsäuren

Die Herstellung der einfachen Polyhydroxycarbonsäuren wie Polyglykolid und Polylactid sowie deren Copolymere kann auf mehrere Arten erfolgen. **Abbildung A.2** gibt einen Überblick über die verschiedenen Darstellungswege und die Art der erhaltenen Polymere am Beispiel von Polylactid. Im einfachsten Fall, der direkten Polykondensation von Milchsäure in Gegenwart von Antimonkatalysatoren (z.B. Sb_2O_3) unter Abspaltung von Wasser, erhält man lediglich Polymere mit sehr kurzen Ketten. Erst durch die Verwendung von speziellen Lösungsmitteln, die eine azeotrope Entfernung des während der Reaktion freigesetzten Wassers erlauben, sind auch Polymere mit höheren Molekulargewichten auf diesem Wege zugänglich.^[7]

^[4] J.P. Singhal, H. Singh, A.R. Ray, Absorbable suture materials: Preparation and properties, *J.M.S.- Rev. Macrom. Chem. Phys.* **1988**, C28 (384), 475-502

^[5] R. Langer, Drug delivery and targeting, *Nature* **1998**, 392, 5-10

^[6] C.W. Patrick jr., A.G. Mikos, L.V. McIntire, Prospectus of tissue engineering, in *Frontiers in tissue engineering*, Pergamon, Oxford, New York, **1998**, 3

^[7] K. Enomoto, M. Ajioka, A. Yamaguchi, *US Patent* 5,310,865 (**1994**)

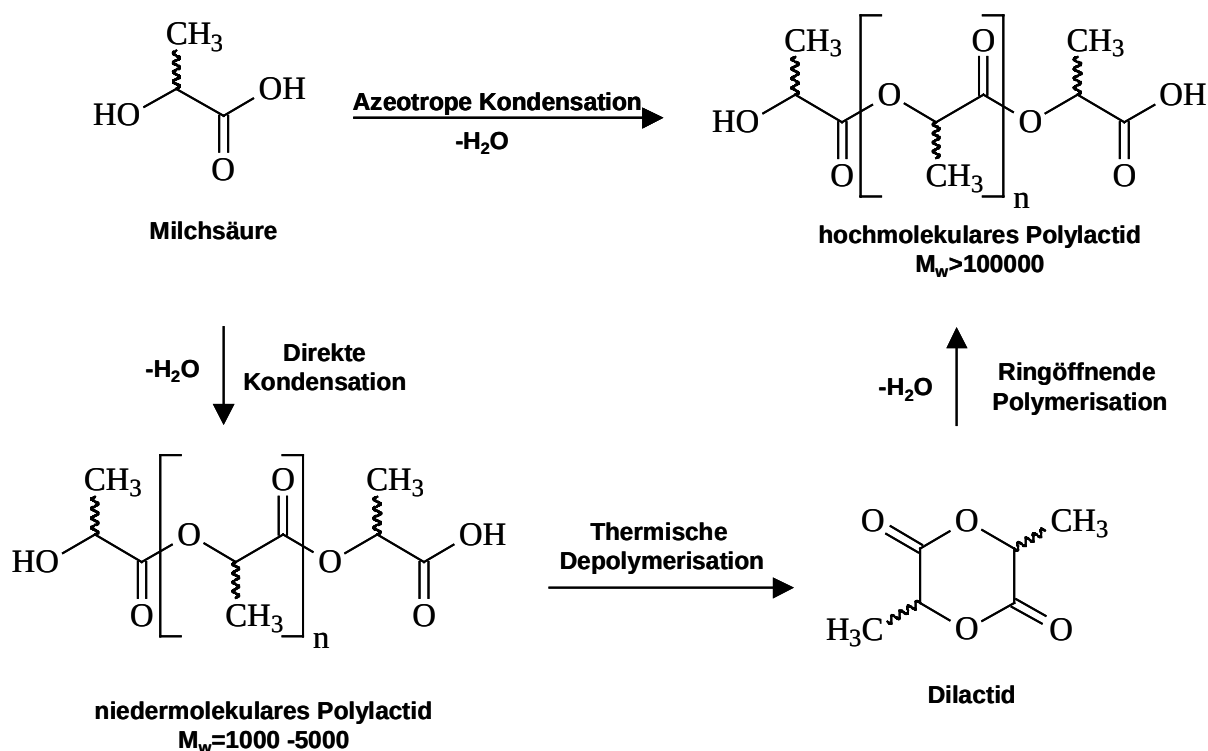


Abbildung A.2: Synthesewege zur Darstellung von Polylactid^[8]

Am weitesten verbreitet ist jedoch die lösungsmittelfreie Herstellung über die ringöffnende Polymerisation der cyclischen Lactone Glykolid und Lactid an Übergangsmetallkatalysatoren. Als besonders geeignet erwiesen sich komplexierende Katalysatoren wie Zinn(II)-ethylhexanoat (Zinn(II)-octanoate) und Zink(IV)-chlorid, aber auch metallisches Zink ist erfolgreich verwendet worden. Als Produkte erhält man Polymere mit kontrollierbaren Molekulargewichtsverteilungen.^[8]

Die Darstellung der höheren homologen Polyester wie Polyhydroxybuttersäure P(3-HB) oder Polyhydroxyvaleriansäure P(3-HV) erfolgt hingegen im Bioreaktor durch Mikroorganismen. Bereits 1926 entdeckte Lemoigne P(3-HB) als Zellinhaltsstoff von *Bacillus megaterium*. Es zeigte sich, dass eine Vielzahl von Bakterien höhere Polyhydroxycarbonsäuren in amorpher Form als Energiespeicher verwenden. Voraussetzung hierfür ist, dass Kohlenstoff z.B. in Form von Glucose im Überschuss zur Verfügung steht, zugleich aber andere essentielle Nährstoffe wie Stickstoff, Phosphor oder

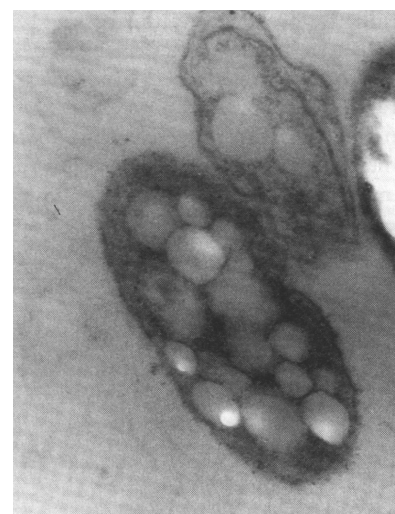


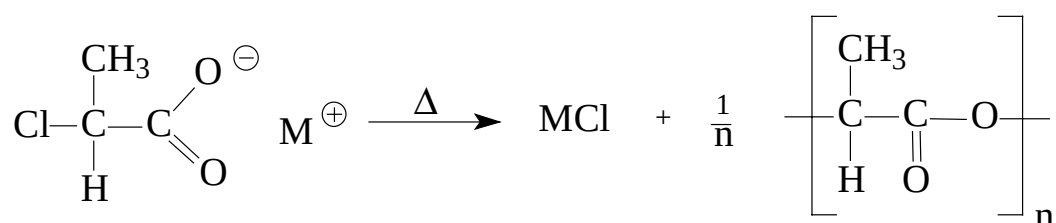
Abbildung A.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Bakterien mit eingelagerten P(3-HV) Granula.^[9]

^[8] J. Lunt, Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers, *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 59, 145-152

Sauerstoff nicht ausreichend vorhanden sind. Die Polymere werden in Form von Granula im Cytoplasma des Bakteriums eingelagert.^[9] Bei speziellen Bakterien ist ein Anteil an Polyhydroxycarbonsäuren von bis zu 90% der Zelltrockenmasse möglich.^[1] Es werden ausschließlich Polymere mit *R*-Konfiguration gebildet, so dass stets isotaktische Polymere entstehen. **Abbildung A.3** zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme dieser Polymer-Granula in einem Bakterium.

A.I.II Festkörperchemische Darstellung von Polyhydroxycarbonsäuren

Ein 1857 von R. Hoffmann entdeckter alternativer Darstellungsweg für Polyglykolid geht von Halogenacetaten aus. Diese lassen sich nach der in **Abbildung A.4** beschriebenen thermisch initiierten Polymerisationsreaktion zu Polyglykolid und dem entsprechenden Metallhalogenid umsetzen.^{[10],[11]}



mit M = Na, K, Rb, Ag, Cs

Abbildung A.4: Reaktionsgleichung der thermisch induzierten Polymerisation von Halogenacetaten

Durch die genauere Untersuchung der Reaktion seit 1994 im Arbeitskreis von Prof. M. Eppe ließ sich nachweisen, dass die Reaktion in einem einzigen Schritt erfolgt und vollständig im Festkörper abläuft. Aufgrund des Reaktionstyps ist das Reaktionsprodukt mit Kristalliten des eliminierten Metallhalogenids durchsetzt. **Tabelle A.1** gibt einen Überblick über alle Halogenacetatverbindungen, die bisher im Hinblick auf ihr Reaktionsvermögen untersucht wurden.^[12]

Tabelle A.1: Reaktionsvermögen verschiedener Halogenacetate^[12]

	Cl	Br	I
Li	-	-	-
Na	+	+	-
K	+	+	+
Rb	+	+	+
Ag	+	+	instabil
Cs	+	+	+

^[9] A. Steinbüchel, Mikrobielle und chemische Synthese von biologisch abbaubaren Polyestern, *Chiu*, **1995**, 29 (5), 260-271

^[10] R. Hoffmann, Über Monochloressigsäure, *Liebigs Ann. Chem.* **1857**, 102, 1

^[11] A. Kekulé, Bildung von Glykolsäure aus Essigsäure, *Liebigs Ann. Chem.* 1857, 105, 288

^[12] M. Eppe, O. Herzberg, Polyglycolide with controlled porosity: an improved biomaterial, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7 (6), 1037-1042

Es zeigte sich, dass für alle untersuchten Alkalihalogenacetate, außer den Lithiumverbindungen eine Reaktion im Festkörper gefunden wurde. Die mittlere Größe der als Nebenprodukt anfallenden Salzkristalle variiert je nach Ausgangsmaterial und Vorbehandlung zwischen 0.3 – 1.5 µm. Durch Waschen mit entionisiertem Wasser ist es möglich, das Salz quantitativ auszuwaschen, so dass eine Polymermatrix mit einem interkonnektierendem Porensystem und einer variablen Porosität zwischen 42 und 62 vol.% erhalten werden kann.

Anhand von Viskosimetriemessungen in 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) konnte die mittlere Kettenlänge des auf diese Weise hergestellten Polyglykolids mit $n \approx 40$ ermittelt werden. Als Grund für diese kurzen Ketten erwiesen sich die Reaktionsbedingungen. Am Beispiel des Natriumchloracetates konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Bildung des Polyesters um zwei konkurrierende Reaktionen handelt. Der Reaktion von Natriumchloracetat zum Polyglykolid und der Pyrolyse des gebildeten Polyesters. Eine Temperaturerhöhung führt zwar zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, begünstigt aber auch die Pyrolysereaktion, so dass die Veränderung der Reaktionstemperatur zwar einen Einfluss auf den zeitlichen Umsatz hat, aber nur im geringen Maße auf die mittlere Kettenlänge.^[13] Als Konsequenz des niedrigen Polymerisationsgrades erwiesen sich zudem die mechanischen Eigenschaften von Formkörpern aus reinem Polyglykolid als nicht geeignet, um zeitlich stabile Implantate zu konstruieren. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es möglich ist, durch die Variation der Precursorverbindung die Kettenlänge zu erhöhen. So sollte bei einer Verbindung, die bereits bei relativ tiefer Temperatur reagiert, die Geschwindigkeit einer pyrolytischen Kettenabbaureaktion deutlich vermindert sein.

Diese Betrachtungen führten zu dem Versuch, den Reaktionstyp auch auf andere Verbindungen zu übertragen.^[14] Die Adaption des Reaktionstyps gelang bisher für folgende Polymere:

- Poly(D,L-lactid) aus Alkali-2-chlorpropionaten^{[15],[16]}
- Copolymeren (Polylactid-co-glycolid) aus Kristallmischungen von Natriumchloracetat / Natrium-2-chlorpropionat und Kaliumchloracetat /Kalium-2-chlorpropionat.^[16]
- Poly(hydroxymethylbenzoesäure) aus m- und p-Halogenmethylbenzoaten^[17]

^[13] K. Schwarz, M. Eppe, A detailed characterization of polyglycolide prepared by solid-state polycondensation reaction, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200, 2221-2229

^[14] O. Herzberg, M. Eppe, Formation of polyesters by thermally induced polymerisation reactions of molecular solids, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1395-1406

^[15] Matthias Eppe, H. Kirschnick, Oligomerization and Polymerization in Sodium Salts of Chlorocarboxylic Acids, *Liebigs Ann /Recueil* **1997**, 81-85

^[16] M. Siedler, S.J. Kitchin, K.D.M. Harris, A.L. C. Lagoa, H.P. Diogo, M.E. Minas da Piedade, M. Eppe, Porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) produced by thermal salt elimination from halogenocarboxylates, *Dalton Transactions* (im Druck)

^[17] O. Herzberg, M. Eppe, Thermally induced polymerization polymerization in m- and p-halogenomethylbenzoates o poly(hydroxymethylbenzoic acid), *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200 (12), 2662-2666

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Untersuchungen zur thermisch induzierten Polymerisation von Halogencarboxylaten durchgeführt werden. Schwerpunkte dieser in Kapitel B beschriebenen Analysen waren neben der Synthese und Charakterisierung von Copolymeren aus Natriumchloracetat/Natrium-2-chlorpropionat und Kaliumchloracetat/Kalium-2-chlorpropionat, auch das Reaktionsverhalten von optisch aktiven Halogencarboxylaten. Ziel dieser Untersuchungen war es zu ermitteln, inwieweit die Konfiguration der eingesetzten Alkalihalogencarboxylat-Precursorverbindungen die Taktizität des entstehenden Polymers beeinflusst.

Hierzu wurden neben spektroskopischen Messungen auch kalorimetrische Messmethoden eingesetzt, um die thermodynamischen Vorgänge während der Polymerisation von Natrium-2-chlorpropionat zu untersuchen. Um zusätzliche Aussagen darüber treffen zu können, wie sich Änderungen an der Struktur der Precursormoleküle, im Sinne eines „*crystal engineering*“, ^[18] auf das Reaktionsverhalten und die Reaktionsprodukte auswirken, wurde das Reaktionsverhalten der Zink-2-chlorpropionate (Auswirkungen eines zweiwertigen Metallkations) und von Natrium-2-brom-3-methylbutyrat (Auswirkungen einer voluminösen Seitengruppe) näher untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt lag zudem darin, das Reaktionsprinzip der thermisch induzierten Polymerisation auch auf Moleküle zu übertragen, die zusätzlich eine funktionelle Gruppe tragen. Es sollte auf diese Weise ein funktionalisiertes Polymer hergestellt werden, bei dem die Möglichkeit besteht, die Materialeigenschaften durch nachträgliche Reaktionen an der Polymerkette zu verändern (z.B. Quervernetzung).

A.II Degradationverhalten von Polyhydroxycarbonsäuren

Nach der erstmaligen Darstellung von hochmolekularem Polyglykolid und Polylactid, mittels der ringöffnenden Polymerisation Mitte der 50er Jahre, ^[19] galten diese Polymere zunächst als unbrauchbar, da Feuchtigkeit und Hitze bei der Verarbeitung dieser Polymere zu einer hydrolytischen Kettenabbaureaktion führten. Diese Situation endete erst 10 Jahre später, als das Potential dieser Polymere als Materialien für biomedizinische Anwendungen entdeckt wurde. ^[20]

Mit einem resorbierbaren chirurgischen Nahtmaterial aus Polyglykolid kam 1970 schließlich das erste kommerzielle Produkt, unter dem Namen Dexon[®], auf den Markt. Die genaue Kenntnis der Vorgänge, die den Abbau des Polymers bewirken, ist dabei für eine erfolgreiche Entwicklung eines temporären Implantates eine unabdingbare Voraussetzung darstellt.

^[18] G.R. Desiraju, Supramolekulare Synthone für das Kristall-Engineering – eine neue organische Synthese, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2541-2558

^[19] C.E. Lowe, *US Patent* 2,668,162 (1954)

^[20] E.J. Frazza, E.E. Schmitt, A new absorbable suture, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* **1971**, 43 (1), 43-58

Es zeigte sich, dass die Vorstellung aus den 70er Jahren, der Abbaumechanismus würde hauptsächlich von der Kinetik der Esterbindungsspaltung bestimmt, die eigentlichen Vorgänge nur unzureichend beschreiben. In der Folge führten Untersuchungen zum Degradationsverhalten dieser Polymere zu der Erkenntnis, dass die Abbauprozesse weitaus komplizierter sind. So wurde unter anderem die beträchtliche autokatalytische Wirkung von sauren Endgruppen auf die Bindungsspaltung erkannt und zudem die Kristallinität der Polymere als wichtiger Einflussfaktor auf die Degradationsgeschwindigkeit beschrieben. **Tabelle A.1** gibt einen Überblick über die im Zuge von Degradationsstudien gefundenen phänomenologischen Auswirkungen auf Probekörper aus Polyglykolid, Polylactid und deren Copolymere.^[21]

Tabelle A.1: Beobachtete Phänomene während der Degradation von Probekörpern aus PGA, PLLA und PLGA-Copolymeren nach Vert *et al.*^[21]

Die Kristallisation von vollständig amorphen PLGA-Copolymeren im Verlauf der Degradation.
Größenabhängige Unterschiede in der Degradationsgeschwindigkeit von Probekörpern.
Katalytische Effekte von sauren und basischen Additiven auf die Degradation.
Das Auftreten von bimodalen Molekulargewichtsverteilungen (GPC).
Die Bildung von Hohlräumen im Verlauf der Degradation.
Auswirkungen des verwendeten Katalysators (bei der ringöffnenden Polymerisation) auf die Degradation.
Die langsamere Degradation von porösen Proben im Vergleich zu kompakten.

Generell lassen sich die Vorgänge, die zum Polymerabbau beitragen, in zwei Prozesse unterscheiden, die Degradation und die Erosion.

Die Degradation bezeichnet hierbei die Bindungsspaltung, die eine Verkürzung der Polymerketten in Oligomere und schließlich in einzelne Monomere bewirkt. Dies hat eine deutliche Verringerung der mittleren Molmasse zur Folge. Der Begriff Erosion beschreibt die Vorgänge, die bei fortgeschrittener Degradation zu einem Verlust an Material in Form von löslichen Oligomeren und Monomeren sowie von Polymerpartikeln führen.^[22]

Hieraus wird deutlich, dass der Degradation eine Schlüsselrolle beim Polymerabbau zufällt. Diese lässt sich ebenfalls in zwei unterschiedliche Mechanismen unterteilen. In die passive ungerichtete, hydrolytische Esterspaltung und in eine aktive enzymatische Reaktion.

Da sich gezeigt hat, dass dem Abbau von PGA, PLA und PLGA-Copolymeren eine passive Degradation zugrunde liegt, ist es möglich durch *in vitro* Experimente unter simulierten

^[21] M. Vert, S. Li, H. Garreau, J. Mauduit, M. Boustta, Complexity of the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters, *Angew, Makromol. Chem.* **1997**, 247, 239-253

^[22] A. Göpferich, Mechanismus of polymer degradation and erosion, *Biomaterials* **1996**, 17, 103-114

physiologischen Bedingungen, nahezu gleichwertige Erkenntnisse über das Abbauverhalten zu erhalten, wie durch *in vivo* Untersuchungen.^[23] Durch eine Vielzahl von Studien zu diesem Thema, mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen, zeigte sich, dass eine Reihe von Faktoren einen Einfluss auf die Degradation haben.^{[21],[22]}

Dieses beruht nicht zuletzt darauf, dass es unmöglich ist, diese Polymere mit einheitlichen Eigenschaften herzustellen.^[24] Da aber bereits geringe prozesstechnische Unterschiede zu signifikanten Veränderungen der Degradation führen können, lassen sich Ergebnisse somit nur bedingt übertragen.^[25] Dies gilt besonders für Polymere, deren Herstellung auf einer vollkommen neuartigen Syntheseroute beruht.

Da jedoch die genauen Kenntnisse der Abbauvorgänge eines resorbierbaren Polymers eine Grundvoraussetzung für einen möglichen Einsatz als Biomaterial sind, ist es notwendig, diese zuvor sorgfältig zu untersuchen. Ziel dieser in Kapitel C beschriebenen Studien war es, das Degradationsverhalten von festkörperchemisch hergestelltem Poly(D,L-lactid-co-glykolid) 15/85 zu analysieren, um Aussagen über die Eignung dieses Materials für biomedizinische Zwecke (z.B. als Knochenersatzmaterial) treffen zu können. Da diese Studien jedoch einen sehr hohen Material- und Zeitaufwand erfordern, wurde in einer weiterführenden Studie versucht, eine Methodik zu entwickeln, die mit relativ geringem Aufwand eine erste Abschätzung der Abbaugeschwindigkeit, besonders von sehr langsam degradierenden Polyestern wie PLLA oder P(3-HB) erlaubt.

A.III Anwendungen bioresorbierbarer Polyester in der Medizintechnik

Aufgrund ihrer Materialeigenschaften wurden Polymere bereits sehr früh, nach ihrer systematischen Beschreibung durch Staudinger, auch in der Medizin eingesetzt. So diente bereits ab 1937 Poly(methylmethacrylat) als Biomaterial in der Zahnmedizin. Während des zweiten Weltkrieges wurden Militärärzte zudem auf die erstaunlich geringen Fremdkörperreaktionen aufmerksam, die eingedrungene PMMA-Splitter aus beschädigten Flugzeugkanzeln bei Piloten der US Air-Force hervorriefen.^[26]

Seit dieser Zeit sind eine Vielzahl von Polymere auf ihre Eignung als Biomaterial untersucht worden, jedoch ist die Zahl der Verbindungen, die tatsächlich über das Stadium der klinischen

^[23] P. Mainil-Varlet, R. Curtis, S. Gogolewski, Effect of *in vivo* and *in vitro* degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 36, 360-380

^[24] M. Vert, G. Schwach, R. Engel, J. Coudane, Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers, *J. Controlled Release* **1998**, 53, 85-92

^[25] M. Vert, F. Chabot, J. Leray, P. Christel, Stereoregular bioresorbable polyesters for orthopaedic surgery, *Makromol. Chem. Suppl.* **1981**, 5, 30-41

^[26] A. Lendlein, Polymere als Implantatwerkstoff, *Chem. unserer Zeit* **1999**, 5, 279-295

Testung Eingang in die kommerzielle Anwendung gefunden haben, relativ gering. Die bekanntesten Materialien sind neben PMMA, das hauptsächlich als Knochenzement eingesetzt wird, Poly(ethylenterephthalat) (PET) für künstliche Blutgefäße, ultrahochmolekulares Polyethylen (UHPE) in Hüftgelenksprothesen und Polytetrafluorethylen (PTFE) als bioinertes Material für Gefäßimplantate. Hierbei handelt es sich um biostabile Polymere, die für Implantate verwendet werden, die für einen dauerhaften Einsatz vorgesehen sind (permanente Implantate), um langfristig eine bestimmte Körperfunktion, zu übernehmen. Diese Implantate treten in keine Interaktion mit dem umgebenden Gewebe und verhalten sich im Körper weitgehend inert.

In der Medizin gibt es jedoch auch eine Vielzahl von Anwendungen, bei denen ein Implantat nur über einen gewissen Zeitraum benötigt wird. In diesem Fall kommen Implantate aus bioresorbierbaren Materialien zum Einsatz, sogenannte temporäre Implantate. Diese Implantate übernehmen nur solange bestimmte Funktionen im Körper, bis dieser sich regeneriert hat.

Im Idealfall erfolgt hierbei der Heilungsprozess und der Abbau des Polymers parallel. Die während der Degradation entstehenden Abbauprodukte stellen dabei im Körper vorkommende Stoffwechselprodukte dar und können somit metabolisiert werden (vgl. **Abbildung A.5.**)^[27]

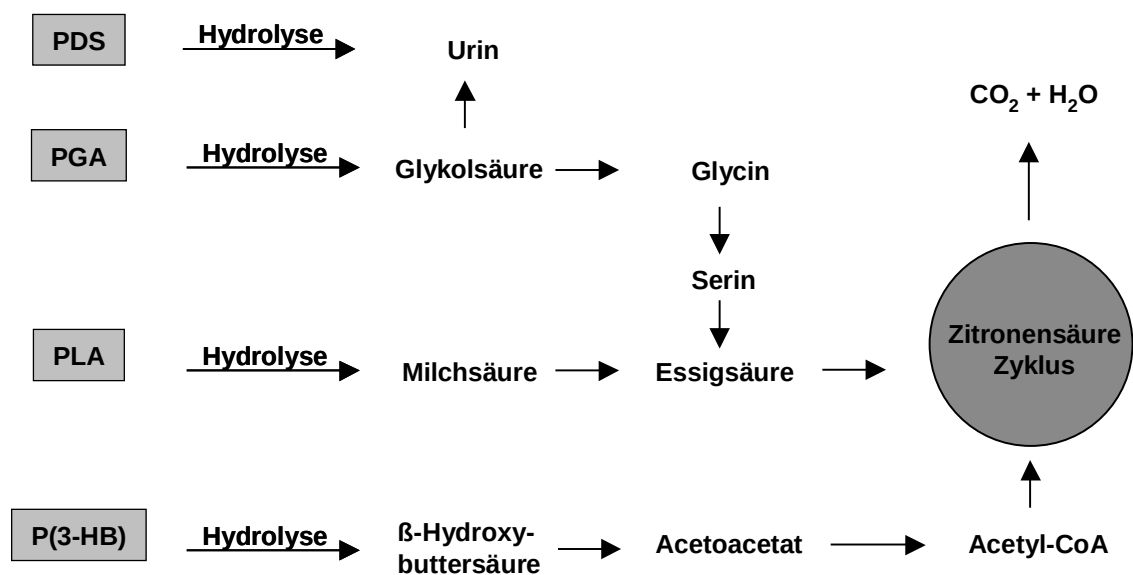


Abbildung A.5: Metabolismus von Polyglykolid und Polymilchsäure im menschlichem Körper nach An et al.^[27]

Die möglichen Einsatzgebiete von temporären Implantaten sind äußerst vielfältig. Eine Zusammenstellung von derzeit auf dem Markt befindlichen Produkten ist in **Tabelle A.2** aufgeführt.^[28]

^[27] Y.H. An, S.K. Woolf, R.J. Friedman, Pre-clinical *in vivo* evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices, *Biomaterials* **2000**, 21, 2635-2652

^[28] F.A. Barber, Resorbable fixation devices: a product guide, *Orthopedic Special Edition* **1998**, 4, 1111-1117

Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Schrauben und Stifte zur Frakturfixierung sowie zur Befestigung von Sehnen und Bändern (Interferenzschrauben). Diese Implantate haben den Vorteil, dass sie im Vergleich zu herkömmlichen aus Stahl keinen Zweiteingriff erfordern, um sie wieder zu entfernen. Dies verringert nicht nur die Belastungen für den Patienten, sondern führt zudem zu einer deutlichen Reduzierung der Behandlungskosten.

Tabelle A.2: Übersicht über kommerziell erhältliche resorbierbare Implantate und ihre Anwendung.^[28]

Produktbezeichnung	Anwendung	Material	Hersteller
SmartPins	Frakturfixierung	SR-PLLA	Bionix Implants
SmartScrew	Frakturfixierung	SR-PGA	Bionix Implants
Orthosorb Pin	Frakturfixierung	PDS	J & J Orthopedics
Polypin	Frakturfixierung	PLLA/PDLLA 70/30	Sulzer Orthopedics
Sysorb	Interferenzschrauben	PLLA	Sulzer Orthopedics
BioScrew	Interferenzschrauben	PLLA	Linovatec
SmartAnchor-D	Nahtanker	SR-PLLA	Bionix Implants
Panalok	Nahtanker	PLLA	Mitek Products
SD sorb	Nahtanker	PLGA 82/18	Surgical Dynamics

Ein Nachteil von resorbierbaren Materialien aus Polyhydroxycarbonsäuren, der bisher einer weiteren Verbreitung entgegensteht, ist das vereinzelte Auftreten von Fremdkörperreaktionen auf die Abbauprodukte dieser resorbierbaren Implantate.^[29] Hervorgerufen werden sie wahrscheinlich durch eine lokale pH-Wert-Absenkung, von am Implantationsort akkumulierten Monomeren.^[30]

Neuere Konzepte diese pH-Wert-Absenkung zu verhindern sehen vor, durch die Kombination von Polymer und basischen Substanzen zu sogenannten Kompositmaterialien, eine Stabilisierung des pH-Wertes zu erreichen.

Erste Studien, im Arbeitskreis von Prof. Epple, mit einem Kompositmaterial aus festkörperchemisch hergestelltem Polyglykolid und amorphem Calciumphosphat ergaben, dass auf diese Weise eine nachhaltige Stabilisierung des pH-Wertes, im physiologischen Bereich um pH 7.4, erzielt werden kann. Die hervorragende Biokompatibilität des Materials konnte anhand der Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen mit knochenbildenden Zellen von Mäusen nachgewiesen werden.^[31]

^[29] R. Hoffmann, A. Weiler, H.J. Helling, C. Krettek, K.E. Rehm, Lokale Fremdkörperreaktionen auf biodegradierbare Implantate. Eine Klassifikation., *Unfallchirurg* **1997**, 100, 658-666

^[30] C. M. Agrawal, K.A. Athanasiou, Technique to Control pH in Vicinity of Biodegrading PLA-PGA Implants, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* **1997**, 38, 105-114

^[31] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A.F. Schilling, M. Amling, J.M. Rueger, M. Epple, Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 54,162-171

Es zeigte sich jedoch, dass die mechanischen Eigenschaften des Materials nicht ausreichend sind, um zum Beispiel als Knochenersatzmaterial eingesetzt werden zu können.

Inwieweit sich das vielversprechende Konzept der pH-stabilisierten Kompositmaterialien auf mechanisch stabilere resorbierbare Polyhydroxycarbonsäuren übertragen lässt ist der Themenschwerpunkt von Kapitel D, das sich mit möglichen medizinischen Anwendungen von Polyhydroxycarbonsäuren beschäftigt. In einer ergänzenden Studie wurde witerhin untersucht, inwiefern die besondere μ -poröse Struktur von festkörperchemisch darstellbaren Polymeren, als Trägermatrix für Arzneistoffe, im Sinne einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung, eingesetzt werden kann.

B Polyestersynthese

Biodegradierbare Polyester, wie Polyglykolid oder Polylactid, finden mittlerweile eine breite Anwendung in Medizin und Pharmazie. Sie dienen unter anderem als chirurgisches Nahtmaterial,^[32] zur Frakturfixierung von Knochensegmenten,^[33] als formgebende Gerüstsubstanz für Gewebekulturen (*tissue engineering*)^{[34],[35]} und als Trägermaterial zur kontrollierten Arzneimittelfreisetzung.^{[36],[37]}

Ein Nachteil bei der Verwendung der Homopolymere ist die eingeschränkte Möglichkeit, die Eigenschaften des Materials, wie beispielsweise die Degradationsrate, an die gewünschten Anforderungen anzupassen. Durch die chemische Kombination der beiden Monomere Glykolsäure und Milchsäure zu einem Copolymer, dem Poly(D,L-lactid-co-glykolid), ist es möglich, durch Variation der Monomerzusammensetzung in der Polymerkette die mechanischen Eigenschaften und das Degradationsverhalten gezielt zu beeinflussen und an die gewünschten Vorgaben anzupassen.

Die Synthese dieser Polymere erfolgt in der Regel durch die ringöffnende Polymerisation aus den Lactonen Glykolid und Lactid an Übergangsmetallkatalysatoren.^[38] Aufgrund der höheren Reaktivität wird Glykolid bevorzugt in die Polymerkette eingebaut (vgl. **Abbildung B.1**), so dass die Polymerkette aus Blöcken von Glykolideinheiten besteht, die von einzelnen Lactideinheiten unterbrochen werden.^[32]

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von Polyglykolid ist die thermisch initiierte Festkörper-Polykondensation von Alkalihalogenacetaten.

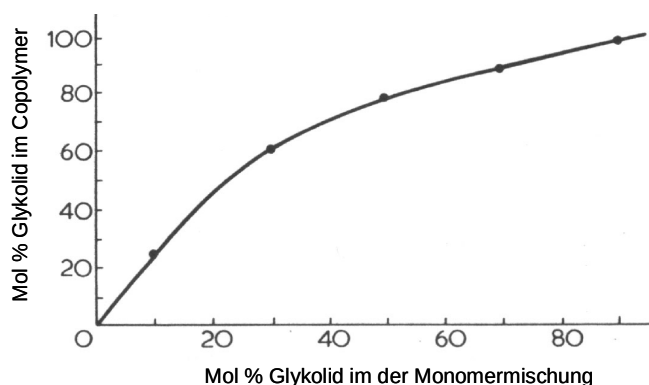


Abbildung B.1: Anteil von eingebautem Glykolid während der Copolymerisation mit Zinn(II)-Oktanoat bei 200 °C in Abhängigkeit vom Anteil in der Ausgangsmischung.^[32]

^[32] D.K. Gilding, A.M. Reed, Biodegradable polymers for use in surgery – polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1, *Polymer* **1979**, 20, 1459-1464

^[33] N. Ashammakhi, P. Rokkanen, Absorbable polyglycolide devices in trauma and bone surgery, *Biomaterials* **1997**, 18, 3-9

^[34] S.L. Ishaug-Riley, G.M. Crane, A. Gurlek, M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) foams implanted into the rat mesentery, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 36, 1-8

^[35] L.E. Niklason, J. Gao, W.M. Abbott, K.K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, R. Langer, Functional arteries grown *in vitro*, *Science* **1999**, 284, 489-493

^[36] R. Langer, Drug delivery and targeting, *Nature*, **1998**, 392, Suppl. 5-10

^[37] R. Langer, Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 94-101

^[38] H.R. Kricheldorf, J.M. Jonté, M. Berl, Polylactones 3. Copolymerization of glycolide with L,L-lactide and other lactones, *Makromol. Chem., Suppl.* **1985**, 12, 25-38

Die Reaktion erfolgt vollständig im Festkörper und führt zu einer Mischung aus Polyglykolid und dem als Nebenprodukt entstehendem Alkalihalogenid.^{[39],[40],[41]} Das im Verlauf der Reaktion eliminierte Salz bildet innerhalb des Polymers miteinander verbundene Kristallite im sub- μm -Bereich. Durch Waschen mit Wasser lassen sich diese quantitativ extrahieren, so dass eine Polyglykolidmatrix mit einer interkonnectierten, mikroporösen Strukturierung erhalten werden kann.

Der Versuch, das Reaktionsprinzip auf die höheren Homologen, wie Halogenpropionate und Halogenbutyrate, zu übertragen, führte zu Oligomeren^[42], wohingegen die *m*- und *p*-Halogenmethylbenzoate zum entsprechenden Polymer, der Poly(hydroxymethylbenzoesäure), reagierten.^{[43],[44]} Weitere mechanistische Untersuchungen zur Polymerisation von enantiomerenreinen Alkali-2-chlorpropionaten ergaben, dass im Verlauf der Polymerisation eine Racemisierung erfolgt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die gemeinsame Fällung von Chloracetaten und 2-Chlorpropionaten zu Kristallmischungen führt, die bei Erhitzen zu Poly(D,L-lactid-co-glykolid) und dem entsprechenden Alkalihalogenid reagieren.^[45]

Das Ziel der nachfolgenden Studien war es, einen genaueren Einblick in die Vorgänge während der Polymerisation zu erhalten. Hierzu wurden unter anderem Alkali-2-chlorpropionat / Alkalichloracetat Kristallmischungen und die jeweiligen Copolymere mittels hochaufgelöster ¹³C-Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Ein besonderes Interesse galt außerdem dem Reaktionsverhalten von optisch aktiven Halogencarboxylaten und der Möglichkeit, über die Precursorstruktur die Taktizität der entstehenden Polymere zu beeinflussen. Der Versuch, ein funktionalisiertes Polymer durch eine thermisch initiierte Festkörper-Polykondensation herzustellen, bildet den Abschluss der Untersuchungen zur thermisch initiierten Polyestersynthese aus Halogencarboxylaten.

^[39] M. Eppe, L. Tröger, Study of a solid-state polymerisation reaction: thermal elimination of NaCl from sodium chloroacetate, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1996**, 11-16

^[40] M. Eppe, H. Kirschnick, Silver chloroacetate: crystal structure and thermal polymerization mechanism *Chem. Ber.* **1997**, *130*, 291-294

^[41] M. Eppe O. Herzberg, Polyglycolide with controlled porosity: an improved biomaterial, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1037-1042

^[42] M. Eppe, H. Kirschnick, Oligomerization and polymerization in sodium salts of chlorocarboxylic acids, *Liebigs Ann. Chemie* **1997**, 81-85

^[43] O. Herzberg, M. Eppe, Thermally induced polymerization in *m*- and *p*-halogenomethylbenzoates to poly(hydroxymethylbenzoic acid), *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 2662-2666

^[44] O. Herzberg, M. Eppe, Formation of polyesters by thermally induced polymerization reactions of molecular solids, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1395-1406

^[45] Michael Siedler, Thermisch initiierte Copolymerisation von Halogencarboxylaten, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **1999**

B.I Copolymerisation von Halogencarboxylaten

B.I.I Grundlagen

Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, dass sich Alkalichloracetate und Alkali-2-chlorpropionate durch einfaches Erhitzen zu Polyglykolid bzw. Polylactid umsetzen lassen. In der Folge zeigte sich, dass es zudem möglich ist, durch die gemeinsame Fällung von Natriumchloracetat und Natrium-(RS)-2-chlorpropionat bzw. Kaliumchloracetat und Kalium-(RS)-2-chlorpropionat aus Methanol Kristallmischungen herzustellen, die bei thermischer Anregung zu den entsprechenden Copolymeren reagieren. Hierzu wurden Serien von Kristallmischungen aus Chloracetat und 2-Chlorpropionat hergestellt, charakterisiert und auf die Fähigkeit zur Polymerisation untersucht. Eine solche Polymerisationsreaktion wurde für alle untersuchten Kristallmischungen gefunden. Für Mischungen mit einem hohen Chloracetatanteil erfolgt die Reaktion im Festkörper, wohingegen für Systeme mit einem 2-Chlorpropionatgehalt von mehr als 10 Mol % die Reaktion in der Schmelze stattfindet. Die Analyse ergab, dass als Reaktionsprodukte lactid-terminierte Blockcopolymere mit mittleren Kettenlängen von ca. 40 Monomereinheiten bzw. Molekulargewichten zwischen 2000 bis 2500 g · mol⁻¹ entstehen, die analog zu den Homopolymeren Polyglykolid und Polylactid von einem Netzwerk des während der Reaktion eliminierten Alkalihalogenides durchsetzt sind.^[46] In der nachfolgenden Studie wurden die Kristallmischungen mit Hilfe von hochaufgelöster ¹³C-Festkörper-NMR-Spektroskopie (¹³C-CP-MAS-NMR) hinsichtlich der Möglichkeit untersucht, Mischkristallphasen zu bilden. Da sich diese Methode, im Gegensatz zur Röntgenpulverdiffraktometrie, auch für die Analyse amorpher Strukturen eignet, bildet sie eine optimale Ergänzung zur Charakterisierung der Precursormischungen sowie der entstehenden, weitgehend amorphen Copolymere.

B.I.II Präparative Arbeiten

Natrium- und Kaliumchloracetat

Zur Neutralisierung wurden die entsprechenden Alkalihydroxide bei Raumtemperatur in wenig Methanol gelöst und anschließend bis -40 °C gekühlt. Durch Zugabe zu einer ebenfalls in kaltem Methanol gelösten äquimolaren Menge an Chloressigsäure erfolgte die Neutralisation (vgl. **Tabelle B.1 und B.2**). Das auskristallisierte Produkt wurde abfiltriert und die Mutterlauge am Rotationsverdampfer eingeeengt, um noch im Lösungsmittel enthaltene Produktreste zurück zu

^[46] M. Siedler, S.J. Kitchin, K.D.M. Harris, A.L. C. Lagoa, H.P. Diogo, M.E. Minas da Piedade, M. Epple, Porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) produced by thermal salt elimination from halogenocarboxylates, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 3140-3148

gewinnen. Anschließend wurden die vereinigten Niederschläge bei Raumtemperatur im Vakuum bis zur vollständigen Trockenheit eingengt. Das weiße, kristalline Produkt wurde im Kühlschrank bei 5 °C gelagert und zeigte keinerlei Zersetzung.

Tabelle B.1: Einwaagen zur Herstellung von Natriumchloracetat

Komponente	Chloressigsäure	NaOH	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie
Quantität	94.5 g, 1.0 mol	40.0 g, 1.00 mol	≈ 1,5 l	112.3 g 0.96 mol	96 %

Tabelle B.2: Einwaagen zur Herstellung von Kaliumchloracetat

Komponente	Chloressigsäure	KOH	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie
Quantität	94.5 g, 1.00 mol	56.1 g, 1.00 mol	≈ 1 l	126.0 g 0.95 mol	95 %

Natrium- und Kalium-(RS)-2-chlorpropionat

Zur Neutralisierung wurden die entsprechenden Alkalihydroxide bei Raumtemperatur in wenig Methanol gelöst und anschließend bis 0 °C gekühlt. Durch Zugabe zu einer ebenfalls in kaltem Methanol gelösten äquimolaren Menge an 2-Chlorpropionsäure erfolgte die Neutralisation (vgl. **Tabelle B.3 und B.4**). Das Lösungsmittel wurde anschließend mit einem Rotationsverdampfer bei einer Temperatur von 40 °C und reduziertem Druck entfernt und schließlich im Ölpumpenvakuum (0.1 mbar) vollständig getrocknet. Das weiße, kristalline Produkt wurde mit Aceton gewaschen, um Reste der 2-Chlorpropionsäure zu entfernen. Die Endprodukte wurden bis zur weiteren Verarbeitung unter Stickstoff bei 5 °C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle B.3: Einwaagen zur Herstellung von Natrium-2-chlorpropionat

Komponente	2-Chlorpropion- säure	NaOH	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie
Quantität	108.5 g, 1.0 mol	40.0 g, 1.00 mol	≈600 ml	128.1 g 0.98 mol	98 %

Tabelle B.4: Einwaagen zur Herstellung von Kalium-2-chlorpropionat

Komponente	2-Chlorpropion- säure	KOH	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie
Quantität	108.5 g, 1.0 mol	56.1 g, 1.00 mol	≈ 400 ml	142.3 g 0.97 mol	97 %

Kristallmischungen

Zur Darstellung der unterschiedlichen Kristallmischungen wurden die jeweiligen Anteile der Alkali-2-chlorpropionate und Alkalichloracetate vollständig in Methanol gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer bei einer Temperatur von 40 °C entfernt und die erhaltenen Kristallmischungen im Ölpumpenvakuum bei einem Druck von 0.1 mbar vollständig getrocknet. Um die Identifizierung zu erleichtern, sind alle Kristallmischungen im weiteren mit dem Akronym L_XG_Y bezeichnet. Die Variablen X und Y entsprechen dem Mischungsverhältnis von 2-Chlorpropionat (X) und Chloracetat (Y) in Mol %.

Alle Kristallmischungen wurden mittels ^1H und ^{13}C Lösungs-NMR-Spektroskopie (in D_2O), IR-Spektroskopie (IR), Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD), Dynamischer Differenz-Kalorimetrie (DSC) und Thermogravimetrie (TG) charakterisiert.

Polymerisation

Die Polymerisation erfolgte im Rundkolben durch Erhitzen von ca. 40 g der jeweiligen Kristallmischung in einem Ölbad. Als Reaktionstemperaturen wurden jeweils die mit der DSC ermittelten Onsettemperaturen gewählt. Die Reaktionsmischung wurde während der gesamten Reaktionsdauer von ca. 2-3 Stunden mit einem Spatel umgerührt, um eine Überhitzung durch freiwerdende Reaktionswärme zu vermeiden. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels IR-Spektroskopie bis zum vollständigen Umsatz verfolgt.

B.I.III Ergebnisse

Röntgenpulverdiffraktogramme der Kristallmischungen

In den beiden nachfolgenden Abbildungen sind jeweils die Röntgenpulverdiffraktogramme der Kristallmischung im Verhältnis 50:50 ($L_{50}G_{50}$) zusammen mit den entsprechenden reinen Ausgangsverbindungen (2-Chlorpropionat und Chloracetat) aufgetragen. **Abbildung B.2** zeigt

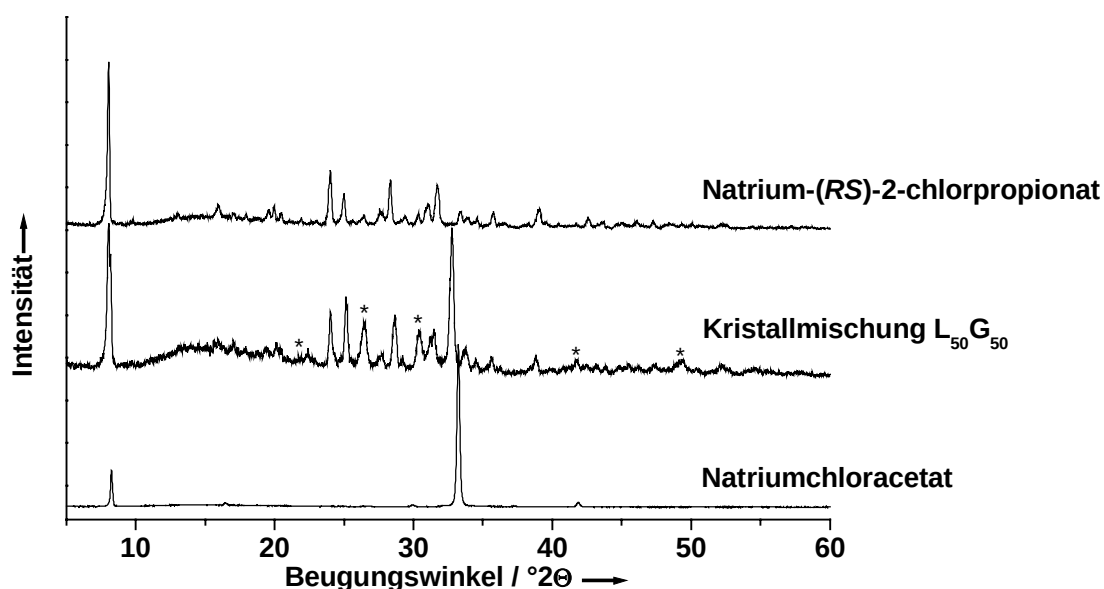


Abbildung B.2: Röntgenpulverdiffraktogramme von Natrium-(RS)-2-chlorpropionat (oben), der Kristallmischung $L_{50}G_{50}$ (mitte) und Natriumchloracetat (unten). Reflexe, die einer Mischkristallphase zugeordnet werden, sind markiert (*).

das Diffraktogramm der Natriumverbindung, während die Daten der Kaliumverbindung in **Abbildung B.3** dargestellt sind. Aus den geringeren Intensitäten lässt sich eine deutlich geringere Kristallinität der Kristallmischungen sowie der 2-Chlorpropionate im Vergleich zu den Chloracetaten ableiten. Ein Vergleich der Reflexlagen zeigt weiterhin, dass sowohl für die Natrium- als auch für die Kaliumverbindungen die Struktur des 2-Chlorpropionats im Diffraktogramm der Kristallmischungen dominiert. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den Mischungen hauptsächlich um eine physikalische Mischung der zwei reinen Precursor handelt und nicht um Mischkristalle. Auffällig ist in diesem Zusammenhang das Auftreten einiger Reflexe (markiert mit *), die sich weder der Chloracetat- noch der 2-Chlorpropionat-Phase zuordnen lassen und somit doch auf das Vorhandensein einer dritten Mischkristallphase hindeuten. Da aber der Anteil dieser neuen Phase in beiden Kristallmischungen relativ gering ist, ist weder eine Indizierung noch eine strukturelle Charakterisierung möglich.

Interessante Hinweise auf strukturelle Änderungen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Kristallmischungen lassen sich dem in **Abbildung B.3** vergrößert dargestellten Bereich von

5 bis $10^\circ 2\theta$ entnehmen. So erfolgt mit steigendem Anteil von 2-Chlorpropionat eine graduelle Verschiebung der Reflexe hin zu kleineren Beugungswinkeln und es kommt zur Ausbildung zusätzlicher Reflexe. Ob diese Reflexe aber nun tatsächlich einer Mischkristallphase zugeordnet werden können oder lediglich von verschiedenen polymorphen Phasen verursacht werden, lässt sich nicht mit Sicherheit feststellen.

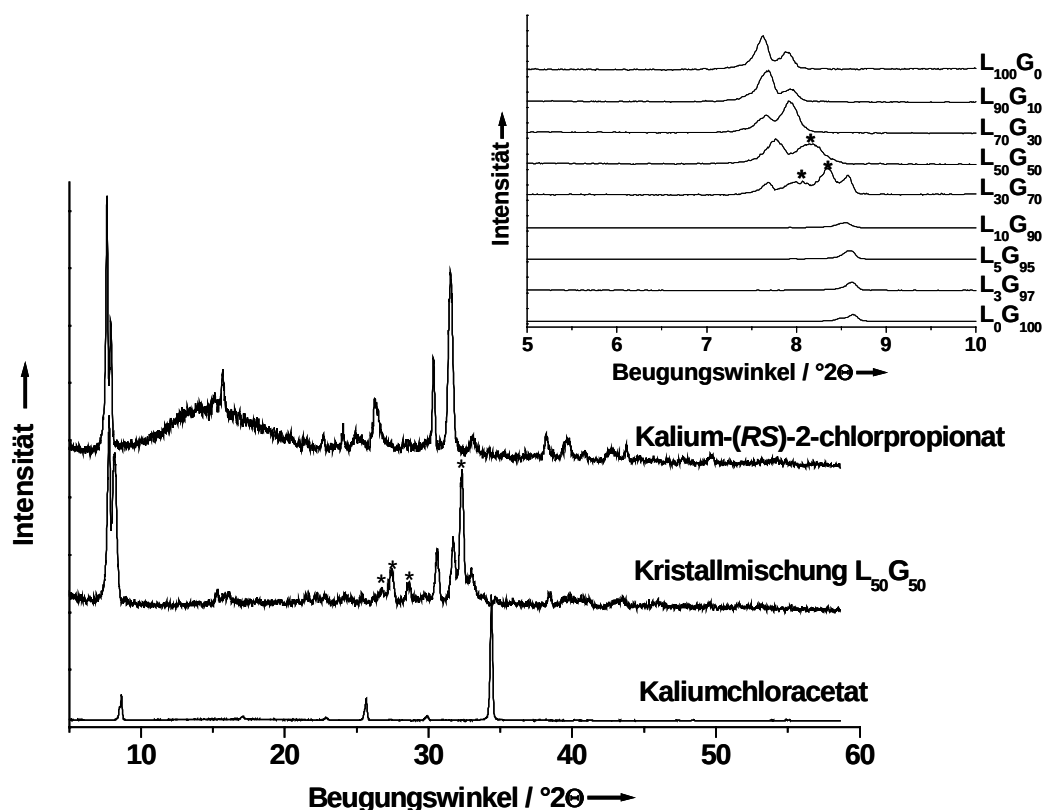


Abbildung B.3: Röntgenpulverdiffraktogramme von Kalium-(RS)-2-chlorpropionat (oben), der Kristallmischung $L_{50}G_{50}$ (mitte) und Natriumchloracetat (unten). Der Einschub zeigt die graduelle Änderung der Reflexlagen mit zunehmendem 2-Chlorpropionatanteil in der Vergrößerung. Reflexe, die einer Mischkristallphase zugeordnet werden, sind markiert (*).

Hochaufgelöste Festkörper- ^{13}C -NMR-Spektroskopie der Kristallmischungen

Um weitere Informationen über die strukturelle Beschaffenheit der Kristallmischungen, insbesondere möglicher amorpher Phasen zu erhalten, wurden die Kristallmischungen mittels hochauflösender ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Die Aufnahme der Spektren erfolgte unter den für eine hochauflösende Signalaufnahme nötigen Bedingungen der Kreuzpolarisation (*cross polarisation*, CP) und des *magic angle spinning* (MAS) sowie der Hochleistungs- ^1H -Entkopplung. Die erhaltenen Spektren sind zusammen mit denen der reinen Precursorverbindungen in **Abbildung B.4** dargestellt.

Analog zu den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse zeigen auch die Festkörper-NMR-Spektren nur die Signale, die für eine einfache Mischung der beiden Precursorverbindungen erwartet werden. So finden sich die Peaks des Methyl- (23.9 ppm), Methin- (59.3 ppm) und Carboxylat-Kohlenstoffatoms (drei Peaks im Bereich von 170-182 ppm) vom Natrium-2-chlorpropionat in den Kristallmischungen wieder. Dies gilt genauso für die beiden aufgespaltenen Signale vom Kohlenstoffatom der Methylen- (46.4 ppm) und Carboxylatgruppe (176.2 ppm) des Natriumchloracetats. Die Aufspaltung der Natriumchloracetatsignale entsteht durch die dipolare Kopplung zwischen den Kernen des ^{13}C -Atoms und der $^{35,37}\text{Cl}$ Isotope. Dieser Effekt ist aus der Literatur bekannt und somit kein Hinweis auf mögliche polymorphe Phasen.^[47] Der Grund, warum sich die in der Röntgenstrukturanalyse beobachtete Hinweise auf das Vorhandensein einer Mischkristallphase nicht auch in den NMR-Spektren widerspiegeln, liegt möglicherweise an den zu geringen Unterschieden in der chemischen Umgebung zwischen der möglichen Mischkristallphase und den reinen Precursorverbindungen, die vom Gerät nicht mehr aufgelöst werden können.

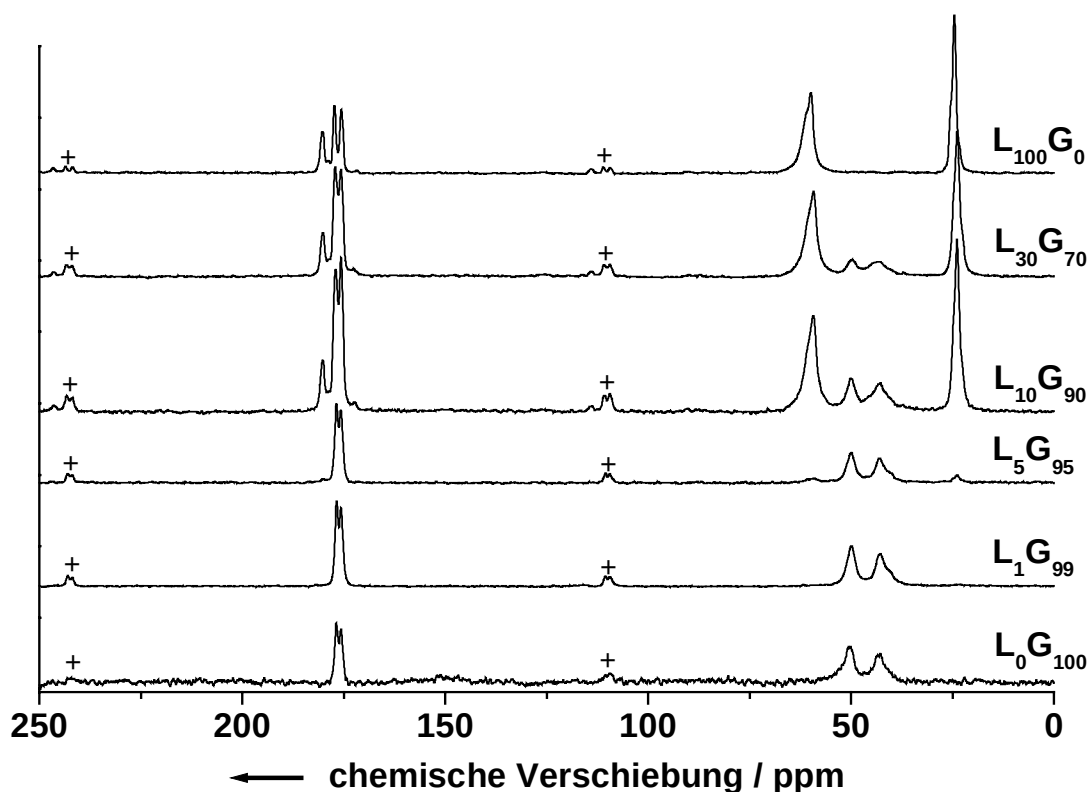


Abbildung B.4: Hochauflösende ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren von Natrium-(RS)-2-chlorpropionat (oben), verschiedenen Kristallmischungen (mitte) und Natriumchloracetat (unten). Die Bezeichnung entspricht dem molaren Anteil von 2-Chlorpropionat und Chloracetat in den Mischungen. Die Rotationsseitenbanden sind markiert (+).

^[47] S.H. Alcaron, A.C. Oliveri, S.A. Carss, R.K. Harris, Effects of $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$, ^{13}C residual dipolar coupling on the variable-temperature ^{13}C CP/MAS NMR spectra of solid, chlorinated sodium acetates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1624-1625

Neben den Kristallmischungen wurden zusätzlich auch die ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren der entsprechenden Copolymere aufgenommen. Diese Methode ist hierzu besonders geeignet, da die Copolymere vom Typ Poly(D,L-lactid-co-glykolid) mit einem Glykolsäure-Anteil zwischen 0-70 Mol % vollständig amorph sind und sich mit Hilfe der Röntgenbeugung somit keine Aussagen über die strukturelle Anordnung des Polymers im Festkörper treffen lässt. In **Abbildung B.5** sind die gemessenen Spektren zusammengestellt. Man erkennt deutlich die zwei für die Glykolsäureeinheiten erwarteten Peaks des Kohlenstoffatoms der Methylen- (62.5 ppm) und der Carbonyl-Gruppe (167.9 ppm). Die drei breiteren Signale lassen sich den Kohlenstoffatomen der Methyl- (16.8 ppm), Methin- (69.5) und der Carbonylgruppe (169.8 ppm) der Milchsäureeinheiten zuordnen. Die Spektren der Copolymere zeigen, den Mischungsverhältnissen der Monomere entsprechend, einen graduellen Übergang zwischen denen der Homopolymere. Damit entsprechen sie den in der Literatur angegebenen Daten für diese Copolyester.^[48]

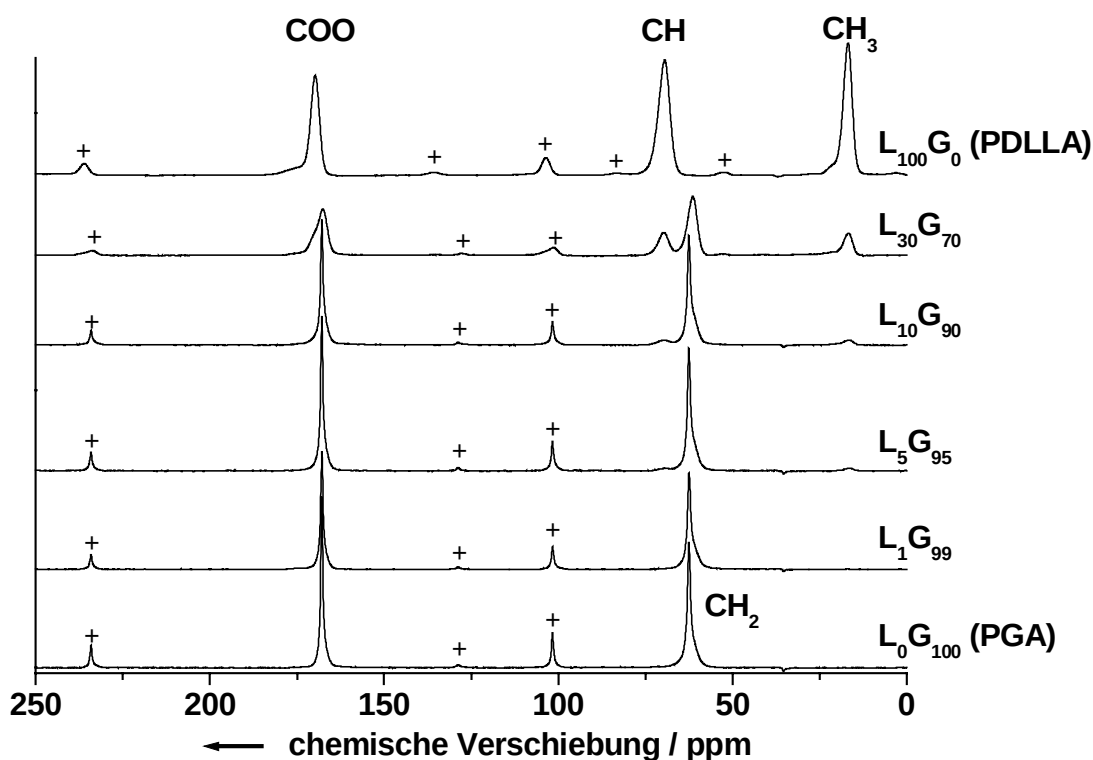


Abbildung B.5: Hochauflösende ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren der Polymer/NaCl Mischungen nach der Polymerisation von Natrium-(RS)-2-chlorpropionat (oben), verschiedenen Kristallmischungen (mitte) und Natriumchloracetat (unten). Die Rotationsseitenbanden sind markiert (+).

^[48] G. Kister, G. Cassanas, M. Vert, Structure and morphology of solid lactide-glycolide copolymers from ^{13}C n.m.r, infra-red and raman spectroscopy, *Polymer* **1998**, 39 (15), 3335-3340

B.I.IV Zusammenfassung

In dieser Untersuchung wurde die strukturelle Beschaffenheit von Kristallmischungen aus Natriumchloracetat und Natrium-2-chlorpropionat mittels hochaufgelöster ^{13}C -Festkörper-NMR Spektroskopie untersucht. Das Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, ob es tatsächlich zur Bildung einer Mischkristallphase kommt. Rückschlüsse auf das Vorhandensein einer solchen Phase ließen sich den Röntgenpulverdiffraktogrammen dieser Kristallmischungen entnehmen. Zwar entsprachen die gemessenen Diffraktogramme der Kristallmischungen hauptsächlich einer Kombination der reinen Verbindungen, doch zeigten sich auch Signale, die keiner der einzelnen Phasen zugeordnet werden konnten.

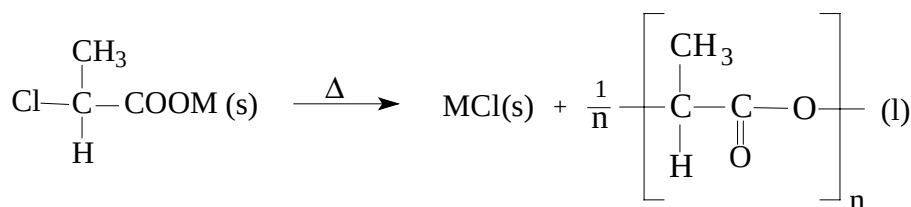
Zusätzliche ^{13}C -Festkörper-NMR-Messungen sollten zudem Aussagen über die Struktur und Zusammensetzung der jeweils korrespondierenden Polymere ermöglichen. Es zeigte sich, dass durch die aufgenommenen ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren das Vorhandensein einer Mischkristallphase nicht bestätigt werden konnte. Ähnlich wie schon die Diffraktogramme zeigen sie lediglich eine Kombination der Spektren der reinen Alkylchloracetat und Alkali-2-chlorpropionat Phasen. Die Ursache hierfür liegt womöglich an dem geringen Anteil dieser Mischkristallphase im Festkörper, so dass die Nachweisgrenze dieser Methode unterschritten wird. Möglicherweise sind aber auch die Unterschiede in der chemischen Umgebung der Kohlenstoffatome zwischen der Mischkristallphase und den reinen Phasen so gering, dass es zu keiner signifikanten Veränderung in den Spektren kommt. Die Festkörper-NMR-Daten der entsprechenden Polymere bestätigen frühere Untersuchungen zum Aufbau dieser Polymere mittels ^{13}C -Lösungs-NMR, die auf eine Blockstruktur der Copolymere schließen lassen. Diese Struktur führt dazu, dass die chemische Umgebung der Monomere innerhalb der einzelnen Blöcke weitgehend dem im Homopolymer entspricht, so dass die ^{13}C -Festkörper-NMR-Daten der Poly(D,L-lactid-co-glykolid) Copolymere gemäß ihrem Anteil eine Kombination der Spektren der Homopolymere zeigen. Anhand der Spektren lässt sich zudem aus der Zunahme der Halbwertsbreiten der einzelnen Peaks entnehmen, wie sich die Kristallinität der Copolymer mit zunehmendem Lactidgehalt verringert, wie es auch in der Literatur für solche Polymere beschrieben ist.^[48]

B.II Die thermisch initiierte Polymerisation chiraler Halogenocarboxylate

B.II.I Grundlagen

Die Übertragung des Reaktionsschemas zur Darstellung von Polyglykolid aus den Halogenacetaten auf die höheren Homologe erscheint auf den ersten Blick relativ einfach. Durch einfaches Variieren der Ausgangsverbindung sollte die Herstellung einer Vielzahl unterschiedlicher Polymere möglich sein. In der Tat ist eine solche Übertragung aber bisher nur für relativ wenige Verbindungen erfolgreich gelungen. So führt z. B. die thermische Anregung von den Alkalisalzen der 2-Halogenbuttersäure nicht zur Polymerisation, sondern zur Zersetzung des Moleküls zu den entsprechenden Crotonaten.^[49] Erfolgreich verlief hingegen die Umsetzung der 2-Halogenpropionate zu Polylactid dargestellt in **Gleichung B.1**.

Es zeigte sich aber, dass die Reaktion aufgrund der niedrigen Glasübergangstemperatur des entstehenden Poly-(D,L-lactids) in der



mit M = Na, K

Gleichung B.1: Polymerisationsreaktion der Alkali-2-chlorpropionate

Schmelze erfolgt und nicht, wie für die Halogenacetate beobachtet, im Festkörper. Die Ursache hierfür liegt in der Struktur des Monomers begründet. Aufgrund des stereogenen Zentrums am α -C-Atom der 2-Chlorpropionate existieren zwei Enantiomere. Dies hat zur Folge, dass die Methylgruppe innerhalb der Polymerkette zwei unterschiedliche Stellungen einnehmen kann.

Je nach Anordnung dieser Seitengruppe ist ein isotaktisches (alle Methylgruppen auf einer Seite), ein syndiotaktisches (alternierende Anordnung) und ein ataktisches Polymer (statistische Verteilung) die Folge (siehe **Abb. B.7**). Da die Taktizität einen großen Einfluss auf die Eigenschaften des Polymers hat, ergibt sich hier die Möglichkeit, die Materialeigenschaften dieses für die Medizintechnik so wichtigen Werkstoffes zu beeinflussen. So ist zum Beispiel das durch ringöffnende Polymerisation zugängliche isotaktische Poly(L-lactid) teilkristallin, während das entsprechende ataktische Poly(D,L-lactid) vollständig amorph ist.

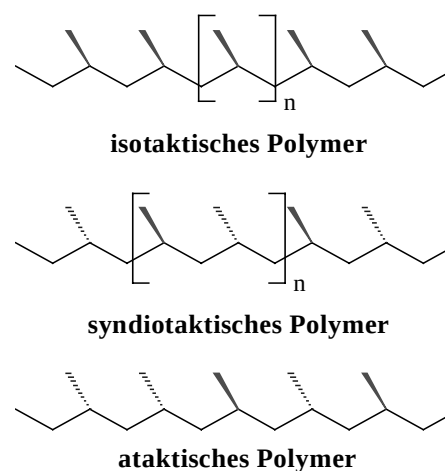


Abbildung B.6: Mögliche Taktizitäten bei Polymeren mit Seitengruppe

^[49] K. Schwarz, Biodegradable polyesters from solid-state precursors – basic components of biomedical materials concept, Dissertation, Universität Hamburg, 2001

Um zu untersuchen, ob isotaktisches Poly(L-lactid) durch die thermische Umsetzung von enantiomerenreinen Precursorverbindungen zugänglich ist, wurden in einer ersten Studie das Lithium-, Natrium- und das Kaliumsalz der (*R*)- und (*S*)-2-Chlorpropionsäure sowie der racemischen 2-Chlorpropionsäure hergestellt und hinsichtlich ihres Polymerisationsvermögens und des resultierenden Polymers charakterisiert. **Tabelle B.5** gibt einen Überblick über die ermittelten Reaktionstemperaturen (T_r) und Reaktionsenthalpien ($\Delta_r H_m$) der verschiedenen Verbindungen sowie über die erhaltenen Reaktionsprodukte. Es zeigte sich, dass bei der Verwendung enantiomerenreiner Precursor gegenüber den racemischen Verbindungen die Reaktionsenthalpien zwar etwas höher sind, dass als Produkt aber immer Poly(D,L-lactid) entsteht. Dies deutet auf eine wiederholte Substitution am α -Kohlenstoffatom während der Polymerisation hin. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Lithiumverbindungen keine Reaktion eingehen, sondern beim Erhitzen aufschmelzen und sich zersetzen. Diese Besonderheit der Lithiumverbindungen steht im Einklang mit Beobachtungen aus früheren Untersuchungen an Halogenacetaten und Halogenmethylbenzoaten, deren Lithiumsalze ebenfalls keine Reaktion eingehen. Bei diesen Verbindungen ließ sich das mangelnde Reaktionsvermögen anhand der Kristallstrukturen erklären. Das Lithium ist in diesen Verbindungen an vier Sauerstoffatome von vier verschiedenen Carboxylat-Gruppen koordiniert und somit eine Reaktion offenbar unmöglich.^{[50],[51]}

Tabelle B.5: Reaktionstemperaturen and Reaktionsenthalpien für die Polymerisation der Alkali-2-chlorpropionate, gemessen mittels DSC (Heizrate 5 K min⁻¹)

Precursor	T_r / °C	$\Delta_r H_m(2)$ / kJ·mol ⁻¹	Produkt
Lithium (<i>S</i>)-2-chloropropionat	177	-	Zersetzung
Natrium (<i>S</i>)-2-chloropropionat	165	-33.0	Poly(D,L-lactid)
Kalium (<i>S</i>)-2-chloropropionat	146	-35.9	Poly(D,L-lactid)
Natrium (<i>R</i>)-2-chloropropionat	165	-31.8	Poly(D,L-lactid)
Kalium (<i>R</i>)-2-chloropropionat	144	-35.3	Poly(D,L-lactid)
Lithium (<i>RS</i>)-2-chloropropionat	189	-	Zersetzung
Natrium (<i>RS</i>)-2-chloropropionat	169	-26.7	Poly(D,L-lactid)
Kalium (<i>RS</i>)-2-chloropropionat	142	-32.4	Poly(D,L-lactid)

^[50] H. Ehrenberg, B. Hasse, K. Schwarz, M. Eppe, Structure determination of lithium chloroacetate, lithium bromoacetate and lithium iodoacetate by powder diffraction, *Acta Crystallogr. B* **1999**, 55, 517-524

^[51] O. Herzberg, H. Ehrenberg, S.J. Kitchen, K.D.M. Harris, M. Eppe, Struktural aspects of the solid-state polycondensation reaction in alkali 4-halogenomethylbenzoates, *J. Solid State Chem.* **2001**, 156, 61-67

Da es nicht gelang, Einkristalle der 2-Chlorpropionate für die Einkristallstrukturanalyse herzustellen und eine Strukturlösung aus Röntgenpulverdaten wegen des Auftretens mehrerer polymorpher Phasen ebenfalls nicht möglich war, wurde die Thermodynamik der Polymerisationsreaktion mit Hilfe von Lösungs- und Verbrennungskalorimetrie untersucht. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, Aussagen darüber treffen zu können, ob der Grund für die mangelnde Reaktivität der Lithium-2-chlorpropionate thermodynamischer Natur ist oder sich (in Analogie zu den Halogenacetaten und Halogenmethylbenzoaten) auf die für eine Reaktion ungünstige Kristallstruktur zurückzuführen ist. Alle Precursor und Reaktionsprodukte wurden zudem mittels hochauflösender ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie charakterisiert, um mögliche Unterschiede in der Kristallstruktur der racemischen und enantiomerenreinen Precursorverbindungen aufzuzeigen, die sich auf das Reaktionsverhalten auswirken könnten. Zusätzlich wurde in zwei weiteren Studien am Beispiel von Zinkchloracetat, Zink-(*RS*)-2-chlorpropionat / Zink-(*S*)-2-chlorpropionat sowie Natrium-(*RS*)-2-brom-3-methylbutyrat / Natrium-(*S*)-2-brom-3-methylbutyrat untersucht, wie sich Änderungen in Zusammensetzung und Aufbau der Monomere im Sinne eines *crystal engineering* auf das Reaktionsverhalten auswirken.^{[52],[53]}

B.II.II Präparative Arbeiten

(*S*)-2-Chlorpropionsäure aus L-Alanin

Die Darstellung der (*S*)-2-Chlorpropionsäure erfolgte nach Fu *et al.* aus L-Alanin durch eine zweifache Walden-Umkehr (Retention) unter Erhalt der Konfiguration am α -C-Atom.^[54]

50.0 g (0.56 mol) L-Alanin wurden in 750 ml 6 N HCl gelöst und im Eisbad auf 0 °C temperiert. Unter ständigem Rühren wurden 62.5 g (0.91 mmol) Natriumnitrit innerhalb von vier Stunden so hinzugegeben, dass die Temperatur der Lösung 5 °C nicht überstieg. Anschließend wurde die Lösung weitere vier Stunden bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde dreimal mit je 300 ml Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über Calciumchlorid getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und die zurückgebliebene klare gelbe Flüssigkeit wurde zweimal bei einem Druck von ca. 1 mbar und einer Temperatur von 49 °C fraktioniert destilliert.

^[52] G.R. Desiraju, *Crystall Engineering. The design of organic solids*, Elsevier, Amsterdam **1989**

^[53] G.R. Desiraju, *Supramolekulare Synthese für das Kristall-Engineering – eine neue organische Synthese*, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2541-2558

^[54] S.C.J. Fu, M. Birnbaum, J.P. Greenstein, Influence of optically active acyl groups on the enzymatic hydrolysis of N-acylated-L-amino acids, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 6056-6058

Ausbeute: Es wurden 33.6 g (0.31 mmol) (S)-2-Chlorpropionsäure erhalten. Dies entspricht einer theoretischen Ausbeute von 55 %. ($\alpha_D^{25} = -17.5^\circ$ ($l = 10$ cm, unverdünnt), Lit.^[54] $\alpha_D^{25} = -18.2^\circ$).

Alkali-2-chlorpropionate und Alkali-2-brom-3-methylbutyrate

Zur Neutralisierung wurden die entsprechenden Alkalihydroxide bei Raumtemperatur in wenig Methanol gelöst und anschließend bis 0 °C gekühlt. Durch die langsame Zugabe zu einer ebenfalls in wenig kaltem Methanol gelösten äquimolaren Menge der entsprechenden Halogencarbonsäure erfolgte die Neutralisation (vgl. **Tabelle B.6, B.7 und B.8**). Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur im Vakuum bis zur vollständigen Trockenheit eingengt. Das weiße kristalline Produkt wurde mit Aceton gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung unter Stickstoff bei 5 °C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle B.6: Einwaagen zur Herstellung der Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze der (RS)-2-chlorpropionsäure

Komponente	(RS)-2-Chlorpropionsäure	Alkali-hydroxyd	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie (Bezogen a. d. Säure)
Lithium-(RS)-2-chlorpropionat	5.0 g 46 mmol	1.1 g LiOH 46 mmol	≈ 50 ml	5.2 g 45 mmol	98 %
Natrium-(RS)-2-chlorpropionat	20.0 g, 184 mmol	7.4 g NaOH 184 mmol	≈ 200 ml	23.8 g 182 mmol	99 %
Kalium-(RS)-2-chlorpropionat	20.0 g, 184 mmol	10.3 g KOH 184 mmol	≈ 150 ml	27.0 g 184 mmol	100 %

Tabelle B.7: Einwaagen zur Herstellung der Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze der (S)-2-Chlorpropionsäure

Komponente	(S)-2-Chlorpropionsäure	Alkali-hydroxyd	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie (Bezogen a. d. Säure)
Lithium-(S)-2-chlorpropionat	5.0 g 46 mmol	1.1 g LiOH 46 mmol	≈ 50 ml	5.0 44 mmol	96 %
Natrium-(S)-2-chlorpropionat	10.0 g, 92 mmol	3.7 g NaOH 92 mmol	≈ 200 ml	11.9 g 91 mmol	99 %
Kalium-(S)-2-chlorpropionat	10.0 g, 92 mmol	5.2 g KOH 92 mmol	≈ 150 ml	13.2 g 90 mmol	98 %

Tabelle B.8: Einwaagen zur Herstellung des Lithium- und Natriumsalzes der (RS)-2-Brom-3-methylbuttersäure und des Natriumsalzes der (S)-2-Brom-3-methylbuttersäure

Komponente	Einwaage Säure	Alkali-hydroxyd	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie (Bezogen a. d. Säure)
Lithium-(RS)-2-brom-3-methylbutyrat	(RS)-2-Brom-3-methylbuttersäure 5.43 g / 30.0 mmol	0.71 g LiOH 30.0 mmol	≈ 25 ml	5.40 g 28.9 mmol	96 %
Natrium-(RS)-2-brom-3-methylbutyrat	(RS)-2-Brom-3-methylbuttersäure 1.55 g / 8.5 mmol	0.34 g NaOH 8.5 mmol	≈ 25 ml	1.58 g 7.8 mmol	91 %
Natrium-(S)-2-brom-3-methylbutyrat	(S)-2-Brom-3-methylbuttersäure 3.77 g / 20.8 mmol	0.83 g NaOH 20.8 mmol	≈ 25 ml	4.02 g 19.8 mmol	95 %

Zinkchloracetat, Zink-(RS)-2-chlorpropionat und Zink-(S)-2-chlorpropionat

Die Zinkverbindungen wurden durch die Neutralisation der entsprechenden Säure in einer Methanol/Wasser-Lösung (10:1) mit festem Zinkcarbonat hergestellt. Die Lösung wurde drei Tage gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet werden konnte. Das überschüssige Zinkcarbonat wurde abfiltriert und das Lösungsmittel mit einem Rotationverdampfer bei einer Temperatur von 40 °C und reduziertem Druck entfernt. Im Anschluss wurden die erhaltenen weißen kristallinen Feststoffe im Vakuum bei einem Druck von 0.1 mbar vollständig getrocknet.

Tabelle B.9: Einwaagen zur Herstellung von Zinkchloracetat, Zink-(RS)-2-chlorpropionat und Zink-(S)-2-chlorpropionat

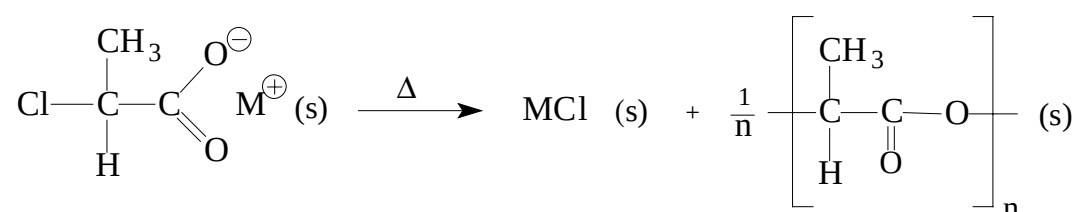
Komponente	Einwaage Säure	Zinkcarbonat	Lösungsmittel Methanol/Wasser	Ausbeute	% d. Theorie (Bezogen a. d. Säure)
Zinkchloracetat	Chloressigsäure 25.0 g / 0.26 mol	20.0 g 0.04 mol	≈ 200 ml	55.5 g 0.22 mol	85 %
Zink-(RS)-2-chlorpropionat	(RS)-2-Chlorpropionsäure 25.0 g / 0.23 mol	25.0 g 0.05 mol	≈ 300 ml	50.9 g 0.18 mol	78 %
Zink-(S)-2-chlorpropionat	(S)-2-Chlorpropionsäure 25.0 g / 0.23 mol	25.0 g 0.05 mol	≈ 300 ml	51.5 g 0.18 mol	78 %

B.II.III Ergebnisse

Kalorimetrische Untersuchungen

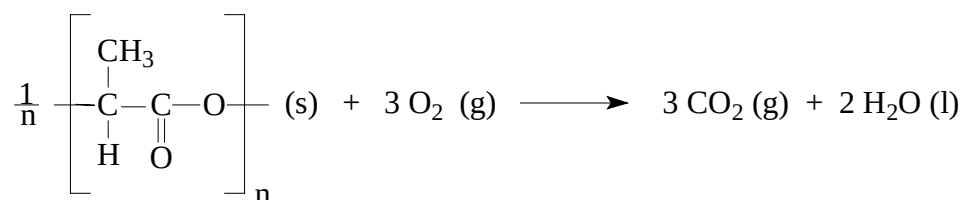
Die nachfolgenden Untersuchungen zur Thermodynamik der Polymerisation von Alkali-2-chlorpropionaten wurden in Zusammenarbeit mit Ana L. C. Lagoa, Hermínio P. Diogo und Manuel E. Minas da Piedade am Instituto Superior Técnico im Centro de Química Estrutural, Complexo Interdisciplinar, in Lissabon, Portugal durchgeführt.

Um die Enthalpien der in **Gleichung B.2** dargestellten Reaktion für die Lithium- und Natriumverbindungen zu bestimmen, wurden jeweils die Bildungsenthalpien von Lithium- und Natrium-(S)-2-chlorpropionat mit einem Lösungs-Reaktionskalorimeter und die Bildungsenthalpien von Poly(L-lactid) und Poly(D,L-lactid) durch Mikroverbrennungskolorimetrie bestimmt.



Gleichung B.2: Reaktionsgleichung der thermisch initiierten Polymerisation von Alkali-2-chlorpropionaten

Aus den Ergebnissen der Verbrennungskolorimetrie lässt sich die molare Verbrennungsenthalpie ($\Delta_c H_s^\circ$) von Poly(L-lactid) und Poly(D,L-lactid) für die in **Gleichung B.3** beschriebene Reaktion bestimmen:



Gleichung B.3: Reaktionsgleichung der Verbrennung von Polylactid

Mit Hilfe dieser Reaktionsgleichung und den tabellierten Werten für die molaren Standardbildungsenthalpien von $\Delta_f H_m^\circ (\text{CO}_2, \text{g}) = -(393.51 \pm 0.13) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[55] und

^[55] J.D. Cox, D.D. Wagman, V.A. Medvedev, *CODATA Key Values for Thermodynamics*, Hemisphere, New York 1989

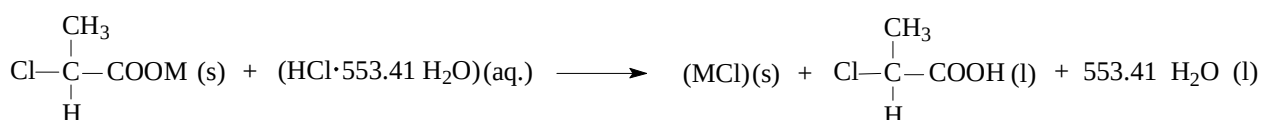
$\Delta_f H_m^\circ (\text{H}_2\text{O}, \text{l}) = -(285.830 \pm 0.040) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[56] lassen sich über den Born-Haber-Kreisprozess die molaren Standardbildungsenthalpien von Poly(L-lactid) und Poly(D,L-lactid) errechnen. Die in **Tabelle B.10** angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus jeweils sechs Messwerten und berücksichtigen bereits die Abweichungen durch die Kalibrierung mit Benzoesäure und die Fremdwärmemengen des Zündhilfsmittels.

Tabelle B.10: Ergebnisse der Verbrennungskalorimetrie an Poly(L-lactid) und Poly(D,L-lactid) bei 25 °C.

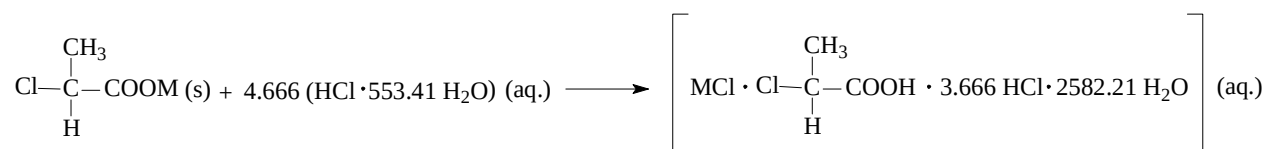
	$\Delta_c H_m^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta_f H_m^\circ (\text{s}) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
Poly(L-lactid)	-1352.4 ± 2.2	-399.8 ± 2.2
Poly(D,L-lactid)	-1363.4 ± 3.4	-388.4 ± 3.4

Zur Bestimmung der Standardbildungsenthalpien wurden Poly(D,L-lactid) und Poly(L-lactid) der Firma Aldrich mit einer mittleren Kettenlänge von 1500 bzw. 1700 Monomeren verwendet. Wie erwartet, ist die Bildungsenthalpie des vollständig amorphen Poly(D,L-lactid) geringer als die des teilkristallinen PLLA. Da als Reaktionsprodukte der Alkali-2-chlorpropionate ebenfalls amorphe Polymere vom Typ Poly(D,L-lactid) entstehen, sind für sie ebenfalls Standardbildungsenthalpien von ca. $-388 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ zu erwarten.

Um die Standardbildungsenthalpie von Lithium- und Natrium-(S)-2-chlorpropionat nach **Gleichung B.4** bestimmen zu können, wurde die Reaktion formal in die **Gleichungen B.5** bis **B.8** zerlegt.

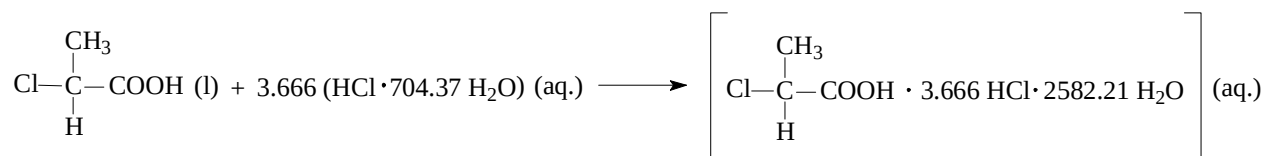


Gleichung B.4: Gesamtreaktion zur Ermittlung der Standardbildungsenthalpien von Lithium- und Natrium-(S)-2-chlorpropionat im Reaktionskalorimeter

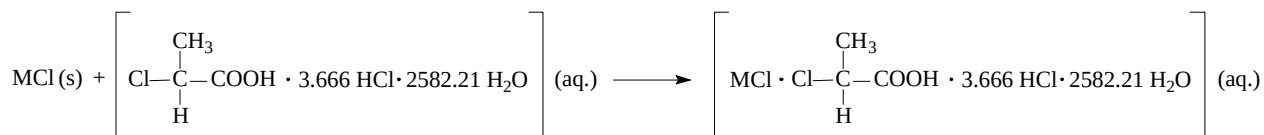


Gleichung B.5: Bestimmung der Reaktionsenthalpie im Kalorimeter

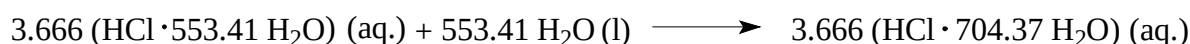
^[56] D.D. Wagman, W.H. Evans, V.B. Parker, R.H. Schumm, I. Halow, S.M. Bailey, K.L. Churney, R.L. Nuttall, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1982**, 11, Suppl. 2



Gleichung B.6: Ermittlung der Lösungsenthalpie von (S)-2-Chlorpropionsäure in der Reaktionslösung



Gleichung B.7: Bestimmung der Lösungsenthalpie des entstehenden Alkalichlorides in der Reaktionslösung



Gleichung B.8: Erfassung der Mischungsenthalpie der verdünnten Salzsäure in Wasser

Mit einem Reaktionskalorimeter wurden die Reaktionsenthalpien der **Gleichung B.5** und die Lösungsenthalpien der **Gleichungen B.6 und B.7** experimentell ermittelt. Zusammen mit dem tabellierten Wert von $(\Delta_{\text{dil}} H_{\text{m}}^{\circ}(\text{B. 8})) = -0.22 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[56] für die Lösungsenthalpie der verdünnten Salzsäure in Wasser (**Gleichung B.8**) kann die gesuchte molare Reaktionsenthalpie mit **Gleichung B.9** errechnet werden.

$$\Delta_{\text{r}} H_{\text{m}}^{\circ}(\text{B. 4}) = \Delta_{\text{r}} H_{\text{m}}^{\circ}(\text{B. 5}) - \Delta_{\text{sol}} H_{\text{m}}^{\circ}(\text{B. 6}) - \Delta_{\text{sol}} H_{\text{m}}^{\circ}(\text{B. 7}) - \Delta_{\text{dil}} H_{\text{m}}^{\circ}(\text{B. 8})$$

Gleichung B.9: Formel zur Berechnung der molaren Reaktionsenthalpie aus den Teilgleichungen B.5 bis B.8

Die Ermittlung der molaren Standardbildungsenthalpie von Lithium- und Natrium-(S)-2-chlorpropionat erfolgt schließlich aus **Gleichung B.10** mit Hilfe der tabellierten Werte für:

$$\Delta_{\text{f}} H_{\text{m}}^{\circ} [\text{LiCl, cr}] = -408.266 \pm 1.142 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}, \quad [56]$$

$$\Delta_{\text{f}} H_{\text{m}}^{\circ} [\text{NaCl, cr}] = -411.120 \pm 0.340 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}, \quad [56]$$

$$\Delta_{\text{f}} H_{\text{m}}^{\circ} [\text{ClCH}(\text{CH}_3)\text{COOH, l}] = -534.8 \pm 1.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}, \quad [57]$$

$$\Delta_{\text{f}} H_{\text{m}}^{\circ} [\text{HCl} \cdot 553.41 \text{ H}_2\text{O, aq}] = -166.598 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \quad [56]$$

^[57] A.L.C. Lagoa, L.M.P.F. Amaral, H.P. Diogo, M.E.M. da Piedade, M. Siedler, M. Eppele, unveröffentlichte Ergebnisse

$$\Delta_f H_m^\circ [\text{ClCH}(\text{CH}_3)\text{COOM}, \text{s}] = -\Delta_r H_m^\circ (4) + \Delta_f H_m^\circ [\text{MCl}, \text{s}] + \Delta_f H_m^\circ [\text{ClCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}, \text{l}] - \Delta_f H_m^\circ [\text{HCl} \cdot 553.41 \text{ H}_2\text{O}, \text{aq}]$$

Gleichung B.10: Formel zur Berechnung der molaren Standardbildungsenthalpie von Lithium-(S)-2-chlorpropionat and Natrium-(S)-2-chlorpropionat bei einer Temperatur von 25°C

Die Enthalpien aller Teilreaktionen, zusammen mit den errechneten molaren Standardbildungsenthalpien von Lithium- und Natrium-(S)-2-chlorpropionat, sind in **Tabelle B.11** dargestellt. Aus den Daten der **Tabelle B.10** und **Tabelle B.11** sowie den tabellierten Werten für die molaren Standardbildungsenthalpien von Natriumchlorid und Lithiumchlorid lässt sich die Reaktionsenthalpie der durch **Gleichung B.2** beschriebenen Polymerisationsreaktion errechnen. Anhand dieser in **Tabelle B.12** zusammengefassten Werte wird deutlich, dass im Falle des Natrium-(S)-2-chlorpropionats die Reaktion unabhängig von der Art des entstehenden Polymers (L bzw. D,L), immer exotherm ist.

Tabelle B.11: Ergebnisse der Lösungskalorimetrie von Li-(S)-2-chlorpropionat and Na-(S)-2-chlorpropionat bei einer Temperatur von 25°C

	$\text{ClC}^*\text{H}(\text{CH}_3)\text{COOLi}$	$\text{ClC}^*\text{H}(\text{CH}_3)\text{COONa}$
$\Delta_r H_m^\circ (\text{B. 4}) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-12.97 ± 0.20	-5.21 ± 0.15
$\Delta_{\text{sln}} H_m^\circ (\text{B. 5}) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-2.05 ± 0.13	-2.05 ± 0.13
$\Delta_{\text{sln}} H_m^\circ (\text{B. 6}) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-35.01 ± 0.29	4.15 ± 0.24
$\Delta_r H_m^\circ (\text{B. 7}) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	24.31 ± 0.38	-7.09 ± 0.31
$\Delta_f H_m^\circ (\text{s}) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-800.8 ± 1.6	-772.2 ± 1.2

Tabelle B.12: Aus Gleichung B.11 errechnete molare Reaktionsenthalpien für die Polymerisation von Lithium- und Natrium (S)-2-chlorpropionat zu festem Polylactid (bei 25°C) nach Gleichung 1

M	Produkt $[-\text{C}^*\text{H}(\text{CH}_3)-\text{COO}-]_n$	$\Delta_r H_m^\circ (1) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
Li	Poly(L-lactid)	-7.3 ± 3.0
	Poly(D,L-lactid)	4.1 ± 3.9
Na	Poly(L-lactid)	-38.7 ± 2.5
	Poly(D,L-lactid)	-27.3 ± 3.6

Bemerkenswert ist weiterhin, dass der errechnete Wert von $\Delta_r H_m^\circ (\text{B.1}) = -27.3 \pm 3.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei 25 °C für die Bildung des erwarteten amorphen Polymers gut mit den Reaktionsenthalpien aus den DSC-Messungen für die Polymerisation von Natrium-2-chlorpropionat aus **Tabelle B.5** übereinstimmt.

Die Tatsache, dass die mit der DSC ermittelten Enthalpien bei einer Temperatur von ca. 165 °C ermittelt wurden, hat nur einen geringen Einfluss auf die Höhe der Messwerte, wie die Umrechnung auf eine Temperatur von 25 °C belegt. Verwendet man hierzu für die molaren isobaren Wärmekapazitäten die folgenden Werte:

$$\begin{aligned} C_{p,m}^{\circ}(\text{NaC}_3\text{H}_4\text{O}_2\text{Cl, s}) &= 140.6 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}, \\ C_{p,m}^{\circ}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2, \text{s}) &= 89.8 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}, \\ C_{p,m}^{\circ}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2, \text{l}) &= 108.0 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ (nach der Koppschen Siedepunktsregel [56]) und} \\ C_{p,m}^{\circ}(\text{NaCl, s}) &= 50.509 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}, [57] \end{aligned}$$

ergeben sich folgende Änderungen für $\Delta_r C_{p,m}^{\circ}(1) \approx 18 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $\Delta_r C_{p,m}^{\circ}(2) \approx 0 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. Anhand dieser Berechnungen wird deutlich, dass die Reaktionsenthalpie $\Delta_r H_m^{\circ}(2)$ nahezu unabhängig von der Höhe der Reaktionstemperatur ist. Eine Umrechnung der Temperatur von 165 °C, bei der die DSC-Messungen durchgeführt wurden, auf die Standardtemperatur von 25 °C hätte nur eine relativ geringe Änderung der Reaktionsenthalpie von **Gleichung B.1** um -2.6 kJ·mol⁻¹ zur Folge. Im Gegensatz zu den Werten der Natriumverbindung wird anhand der berechneten Enthalpien für die theoretische Polymerisation von Lithium-(S)-2-chlorpropionat deutlich, dass die Reaktion nur dann thermodynamisch begünstigt ist, wenn als Reaktionsprodukt das teilkristalline Poly(L-lactid) entstehen würde. In diesem Fall verlief die Reaktion mit $\Delta_r H_m^{\circ}(2) = -7.3 \pm 3.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ schwach exotherm. Für den viel wahrscheinlicheren Fall, dass als Endprodukt Poly(D,L-lactid) gebildet würde, verlief die Reaktion mit $\Delta_r H_m^{\circ}(2) = 4.1 \pm 3.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ schwach endotherm. Da die Standardreaktionsenthalpien jedoch vom Betrag her sehr klein sind und im Bereich der Standardabweichung liegen, ist eine Aussage über die eigentlich ausschlaggebende Größe der freien Standardbildungsenthalpie ($\Delta_r G_m^{\circ}$) und somit über den freiwilligen Ablauf der Reaktion nicht sicher möglich.

Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass die Unterschiede in der Reaktivität zwischen dem Lithium- und dem Natrium-(S)-2-chlorpropionat tatsächlich thermodynamischer Natur sind. Offensichtlich ist das Lithium-(S)-2-chlorpropionat zu stabil für eine Polymerisation zum LiCl und Poly(D,L-lactid). Möglicherweise lässt sich die Ursache für diese hohe Stabilität auf das kleine, hochpolarisierende Lithiumkation zurückführen. Da es leider nicht gelang, Einkristalle der reinen Alkali-2-chlorpropionate herzustellen und auch eine Indizierung aus den Röntgenpulverdiffraktogrammen wegen des Auftretens mehrerer Phasen nicht möglich war, konnte die Kristallstruktur leider nicht bestimmt werden. Hasse konnte zeigen, dass dies auch auf die Bildung von unterschiedlichen Hydratphasen zurückzuführen ist. So führte der Versuch aus

wasserhaltigen Lösemitteln Einkristalle der Alkali-S-2-chlorpropionate herzustellen, zu den entsprechenden Monohydraten (Lithium- und Natrium-S-2-chlorpropionat), beziehungsweise zum Hemihydrat (Kalium-S-2-chlorpropionat), deren Strukturen gelöst werden konnten. Es konnte bei allen untersuchten Phasen ein sichtartiger Aufbau nachgewiesen werden, wobei sich jeweils Doppelschichten aus Propionationen mit Schichten aus Alkalimetallkationen und Wassermolekülen abwechseln.^[58] Diese Strukturen erklären jedoch nicht die Reaktivität der Verbindungen, da die berechneten Alkalimetall-Halogen-Abstände hierfür zu groß sind. Zudem erfolgt beim Aufheizen der 2-Chlorpropionate die Abgabe des Kristallwassers, so dass in der folgenden Rekristallisation die Bildung einer neuen Struktur zu erwarten ist, in der eine Interaktion zwischen Alkalimetallion und Halogenatom möglich ist. Die Bestimmung der Kristallstrukturen dieser Anhydratphasen gelang jedoch nicht.^[58] Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in der Reaktivität der Lithiumverbindungen kinetischer Natur sind und auf einer für die Polymerisationsreaktion ungünstigen Kristallstruktur beruhen, wie dies anhand der aus Röntgenpulverdaten berechneten Kristallstrukturen für die Lithiumhalogenacetate,^[50] die Lithium-4-halogenmethylbenzoate^[51] sowie von Natriumchloracetat^[59] und Natriumbromacetat^[60] nachgewiesen werden konnte. Um weitere Aussagen über den strukturellen Aufbau der Alkali-2-chlorpropionate treffen zu können und somit der Beziehung zwischen Struktur und Reaktivität nachzugehen, wurden sowohl die entsprechenden Precursorverbindungen als auch die entstehenden Reaktionsprodukte mit hochauflösender ¹³C-Festkörper NMR Spektroskopie charakterisiert.

Hochauflösende ¹³C-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die in **Abbildung B.7** zusammengestellten Spektren der Alkali-2-chlorpropionate zeigen wie erwartet je drei Signale, die sich jeweils dem Kohlenstoffatom der Methyl-, Methin- und der Carboxylatgruppe zuordnen lassen. Bei näherer Betrachtung zeigen sich aber deutliche Unterschiede in der Form und Lage der Signale zwischen den einzelnen Verbindungen. Bemerkenswert ist insbesondere die beobachtete Signalaufspaltung des Methyl- und Carboxylat-Kohlenstoffs. Aus den in **Abbildung B.7 A** und **B.7 B** vergrößert dargestellten Regionen der Spektren geht hervor, dass bis auf Kalium-(*RS*)-2-chlorpropionat alle Verbindungen eine

^[58] Bernd Hasse, Festkörperchemische Untersuchungen an Biomineralen und Alkali-S-2-chlorpropionaten, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2001**

^[59] L. Elizabé, B.M. Kariuki, K.D.M. Harris, M. Tremayne, M. Epple, J.M. Thomas, Topochemical rationalization of the solid-state polymerisation reaction of sodium chloroacetate: Structure determination from powder diffraction data by the Monte Carlo Method, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 8827-8831

^[60] A.E. Aliev, L. Elizabé, B.M. Kariuki, H. Kirschnick, J.M. Thomas, M. Epple, K.M.D. Harris, *In situ* monitoring of solid-state polymerisation reactions in sodium chloroacetate and sodium bromoacetate by ²³Na and ¹³C solid-state NMR spectroscopy, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1120-1126

Feinaufspaltung der Methylgruppenresonanz zeigen (vgl. **Abbildung B.7 B**). Betrachtet man die entsprechenden Carboxylat-Resonanzen, so zeigen nur die beiden Natriumverbindungen und das Kalium-(*RS*)-2-chlorpropionat eine Signalaufspaltung.

Für die Ursachen der gefundenen Aufspaltungen kommen nur zwei Gründe in Betracht: Entweder sind in der Elementarzelle zwei unterschiedlich angeordnete Molekülen enthalten, so dass die sich hieraus ergebenden Differenzen in der chemischen Umgebung eine unterschiedliche chemische Verschiebung zur Folge haben oder es handelt sich um mindestens zwei verschiedene polymorphe Phasen. Diese Vermutung wird durch die Schwierigkeiten, die bei der Indizierung der entsprechenden Röntgenpulverdiffraktogramme auftraten, gestützt. Die Aufspaltung oder Signalverbreiterung des Kohlenstoffatoms der Methingruppe ist hingegen bereits aus früheren Messungen bekannt und lässt sich auf die Kopplung mit dem direkt gebundenen Chloratom ($^{13}\text{C} - ^{35/37}\text{Cl}$) zurückführen.^[47]

Eine weitere interessante Beobachtung zeigt sich, wenn man die Lage der Carboxylatresonanz des Lithium-(*S*)-2-chlorpropionats mit den übrigen Signalen vergleicht. Es fällt auf, dass dieser

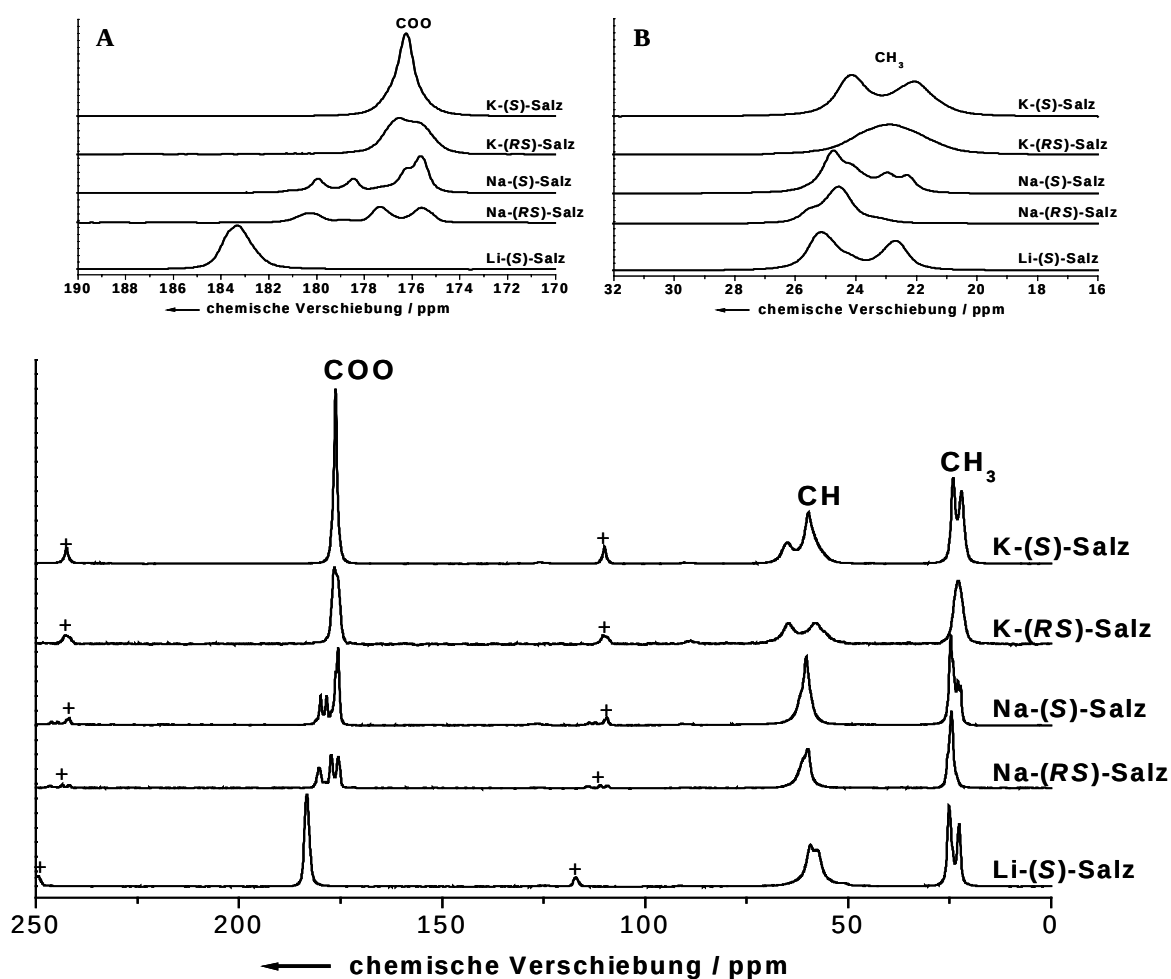


Abbildung B.7: Hochauflösende ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren der Lithium-, Natrium-, und Kalium-2-chlorpropionate. Die Rotationsseitenbanden sind markiert (+). Die Einschübe zeigen die Signallage der Methyl- (A) und Carboxylatresonanz (B) in der Vergrößerung.

Peak mit einer chemischen Verschiebung von 183.3 ppm deutlich weiter Tieffeldverschoben ist als die Signale der Natrium- und Kaliumverbindungen. Diese auch bei den Alkali-4-Halogenmethylbenzoaten festgestellte Tieffeldverschiebung des Carboxylatpeaks unterstreicht die Sonderrolle der Lithiumverbindungen, da die Unterschiede der chemischen Verschiebung der Carboxylatgruppe hauptsächlich auf das koordinierte Metallkation zurückzuführen sind. Da es im Fall der Alkali-4-halogenmethylbenzoate und Alkalihalogenacetate gelang, die Kristallstrukturen von Lithium-4-chlormethylbenzoat, Lithium-4-brommethylbenzoat, Lithiumchloracetat, Lithiumbromacetat und Lithiumiodacetat aus den Röntgenpulverdiffraktogrammen zu ermitteln, ließ sich nachweisen, dass die Unterschiede in der Reaktivität auf die besondere Struktur der Lithiumsalze zurück zu führen sind. Da sich die Strukturen aller Lithiumverbindungen stark ähneln, ließe sich vermuten, dass auch das Lithium-2-chlorpropionat neben den ermittelten thermodynamischen Gründen, auch aufgrund einer ungünstigen Kristallstruktur, nicht in der Lage ist zu polymerisieren.

Neben den Alkali-2-chlorpropionaten wurden auch die ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren der entstehenden Reaktionsprodukte aufgenommen, um Aussagen über ihre sterische Konfiguration treffen zu können. In **Abbildung B.8** sind die Spektren des erhaltenen Polylactids aus Natrium-(S)-2-chlorpropionat und Natrium-(RS)-2-chlorpropionat aufgetragen.

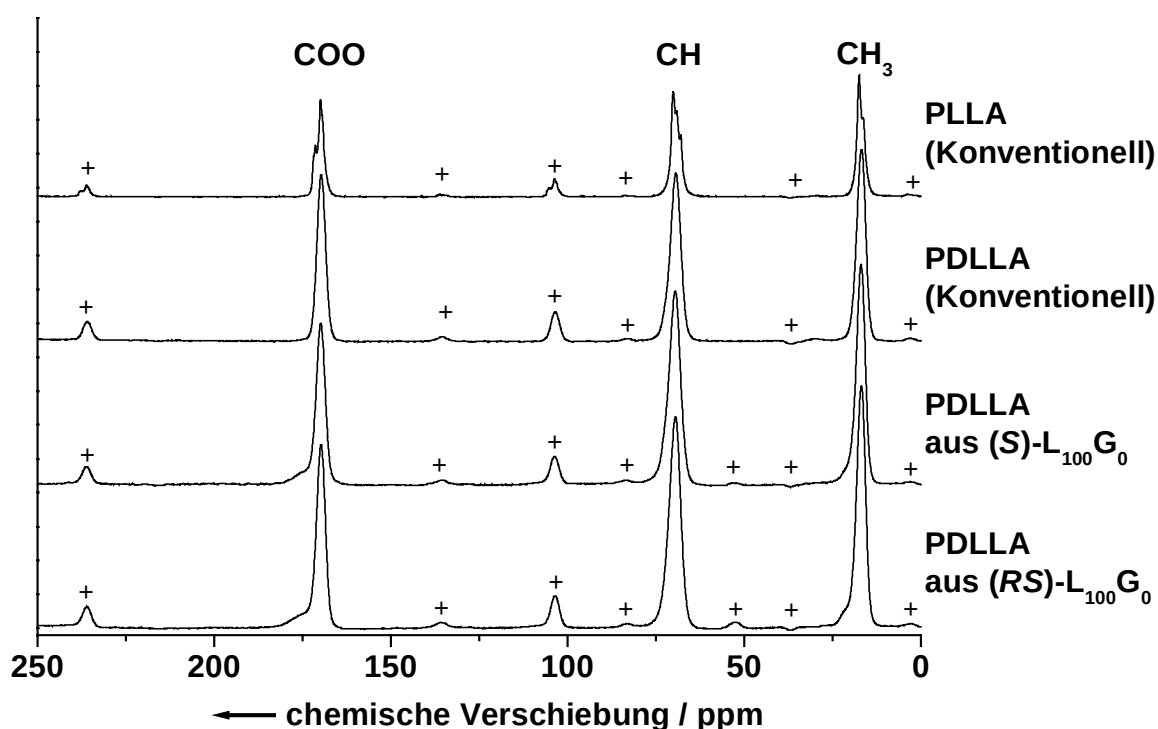
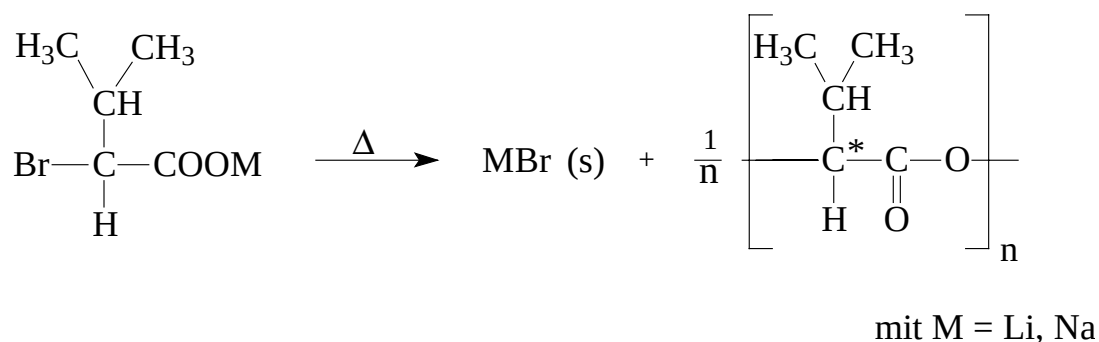


Abbildung B.8: Hochauflösende ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren (von unten nach oben) von Poly(D,L-lactid) aus Natrium-(RS)-2-chlorpropionat, Poly(D,L-lactid) aus Natrium-(S)-2-chlorpropionat und der kommerziell erhältlichen Polymere Poly(D,L-lactid) und Poly(L-lactid). Die Rotationsseitenbanden sind markiert (+).

Als Referenzsubstanzen wurden zusätzlich auch die Spektren von kommerziell erhältlichen, isotaktischem (PLLA) und ataktischen (PDLLA) Polylactid aufgenommen. Der Vergleich mit diesen Referenzsubstanzen zeigt, dass die Spektren der beiden Reaktionsprodukte, hinsichtlich der Lage und der Form der Signale identisch mit dem Spektrum des Poly(D,L-lactid) sind. Eine Feinaufspaltung der Signale, wie beim Poly(L-lactid) wird nicht beobachtet. Dies belegt, dass als Reaktionsprodukt, unabhängig von der sterischen Konfiguration der eingesetzten Eduktverbindung, immer Poly(D,L-lactid) erhalten wird.

Auswirkungen großer Seitengruppen auf das Reaktionsverhalten

In Ergänzung zu diesen Ergebnissen wurde in einer weiteren Studie den Einfluss der Seitengruppe auf den Reaktionsmechanismus und die Taktizität des entstehenden Polymers untersucht. Hierzu wurde das Reaktionsverhalten der Natriumsalze der (S)-2-Brom-3-methylbuttersäure und (RS)-2-Brom-3-methylbuttersäure auf eventuelle Unterschiede analysiert. Diese Verbindung unterscheiden sich im wesentlichen nur in der Größe der Seitengruppe von den bereits untersuchten Alkali-2-chlorpropionaten, so dass sich Unterschiede in der Reaktivität und der Reaktionsprodukte weitgehend auf den Einfluss dieser Seitengruppe zurückführen lassen.



Gleichung B.11: Reaktionsgleichung der Polymerisation von Alkali-2-brom-3-methylbutyrat

Anhand der in **Abbildung B.9** dargestellten DSC-Messungen ließ sich eine exotherme Polymerisationsreaktion für die Natriumsalze 2-Brom-3-methylbuttersäure gemäß **Gleichung B.11** nachweisen, während die entsprechende Lithiumverbindung keinerlei Reaktivität zeigt und lediglich ein endothermes Signal bei einer Onsettemperatur von 167.0 °C beobachtet werden kann, das sich dem Aufschmelzen der Verbindung zuordnen lässt.

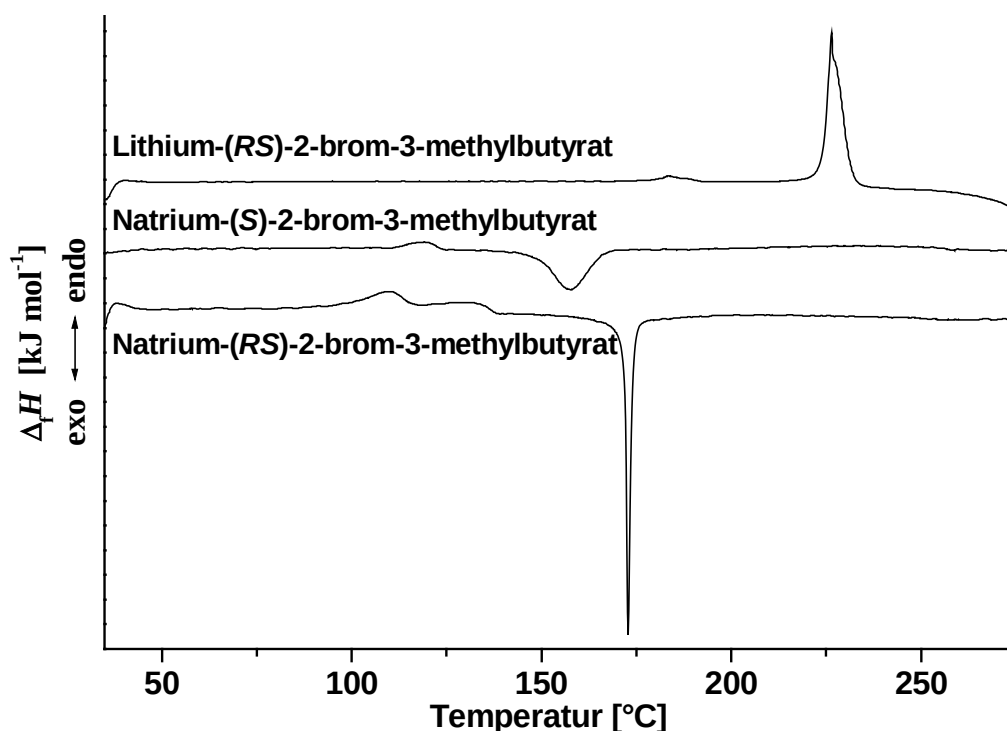


Abbildung B.9: DSC-Thermogramme von Lithium-(S)-2-brom-3-methylbuttersäure, Natrium-(S)-2-brom-3-methylbuttersäure und Natrium-(RS)-2-brom-3-methylbuttersäure

Tabelle B.13: Reaktionstemperaturen and Reaktionsenthalpien für die Polymerisation der Alkali-2-brom-3-methylbutyrate, gemessen mittels DSC (Heizrate 5 K min⁻¹)

Precursor	$T_r / ^\circ\text{C}$	$\Delta_r H_m(2) / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Produkt
Lithium-(RS)-2-brom-3-methylbuttersäure	219.3	-	Schmelzen
Natrium-(S)-2-brom-3-methylbuttersäure	147.6	-19.4	2-Polyhydroxy- isovaleriansäure
Natrium-(RS)-2-brom-3-methylbuttersäure	167.0	-28.2	2-Polyhydroxy- isovaleriansäure

Tabelle B.13 kann man entnehmen, dass sowohl die Onsettemperatur als auch die Reaktionsenthalpien der racemischen Precursor höher liegen als die der enantiomerenreinen Verbindung. Diese Unterschiede lassen sich wahrscheinlich auf die Anordnung der chiralen Moleküle im Kristall zurückführen, da im festen Zustand ein chirales Molekül mit einem identischen Molekül in einer anderen Wechselwirkung steht als mit seinem Enantiomer.^[61]

^[61] Bernard Testa, *Grundlagen der Organischen Chemie*, VCH, Weinheim, **1983**, 162-167

Diese unterschiedlichen Wechselwirkungen bewirken häufig Abweichungen vom idealen Mischungsverhalten im Kristall, so dass sich drei Typen von Racematen unterscheiden lassen.

Ein racemisches Gemisch (Konglomerat) entsteht, wenn die Wechselwirkungen zwischen gleichartig drehenden Molekülen [(+) und (+)] stärker sind als zwischen Molekülen mit unterschiedlichem Drehsinn [(+) und (-)]. Aufgrund dessen bilden die beiden Enantiomere diskrete Kristalle. Ein berühmtes Beispiel für ein solches racemisches Gemisch ist das von Louis Pasteur entdeckte Natriumammoniumtartrat (unterhalb von 27 °C aus Wasser kristallisiert).

Häufiger als racemische Gemische treten racemische Verbindungen auf. Sie enthalten in ihrer Elementarzelle eine gleich große Anzahl beider Enantiomere. Sie entstehen, wenn die Anziehungskräfte zwischen Molekülen mit entgegengesetztem Drehsinn größer sind als zwischen identischen Molekülen. Dies hat zur Folge, dass sie thermodynamisch stabiler sind als die entsprechenden reinen Enantiomere. Racemische Verbindungen unterscheiden sich sehr oft in ihren physikalischen Eigenschaften von Kristallen, die aus Molekülen mit gleichem Drehsinn aufgebaut sind. Der letzte eher seltene Fall tritt ein, wenn Racemate ein nahezu ideales Mischungsverhalten aufweisen und als racemische feste Lösungen in Form racemischer Mischkristalle vorliegen. Da es in diesen Mischkristallen nur minimale Unterschiede in der Wechselwirkung zwischen identischen und enantiomeren Molekülen gibt, stimmen meist, mit Ausnahme des Drehwinkels, alle physikalischen Eigenschaften mit Kristallen aus reinen Enantiomeren weitgehend überein.^[62]

Aus diesen Aussagen lässt sich vermuten, dass die beobachteten Unterschiede in den DSC-Thermogrammen darauf zurückzuführen sind, dass die beiden Enantiomere der Natrium-(*RS*)-2-brom-3-methylbuttersäure eine racemische Verbindung bilden. Zusätzlich zeigten Messungen mittels temperaturlösender Röntgenpulverdiffraktometrie, dass diese Verbindung unterschiedliche Phasen bildet. Diesen in **Abbildung B.10** zusammengestellten Ergebnissen lässt sich entnehmen, dass Natrium-(*RS*)-2-brom-3-methylbutyrat bei Raumtemperatur in zwei kristallinen Phasen auftritt. Bei steigender Umgebungstemperatur geht die Tieftemperaturphase, die bei Raumtemperatur (25 °C) anhand von zwei Reflexen bei 6.0 und 12.0 °2 θ erkennbar ist, in die Hochtemperaturphase über. Dieser Übergang lässt sich sehr schön in den vergrößerten Einschüben in **Abbildung B.10 A** und **B.10 B** beobachten. Sie belegen, dass es sich um einen enantiotropen Phasenübergang handelt, da sich die Tieftemperaturphase beim Abkühlen auf 25 °C wieder ausbildet.^[63]

^[62] E.L. Eliel, *Stereochemie der Kohlenstoffverbindungen*, VCH, Weinheim, **1966**, 51-56

^[63] J. D. Dunitz, J. Bernstein, Disappearing polymorphs, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 193-200

Weiterhin belegen diese Messergebnisse, dass die Verbindung im Temperaturbereich von 25 - 75 °C stabil ist und keine vorzeitige Reaktion eingeht, wie die fehlenden Reflexe des bei der Reaktion entstehenden Natriumbromids belegen.

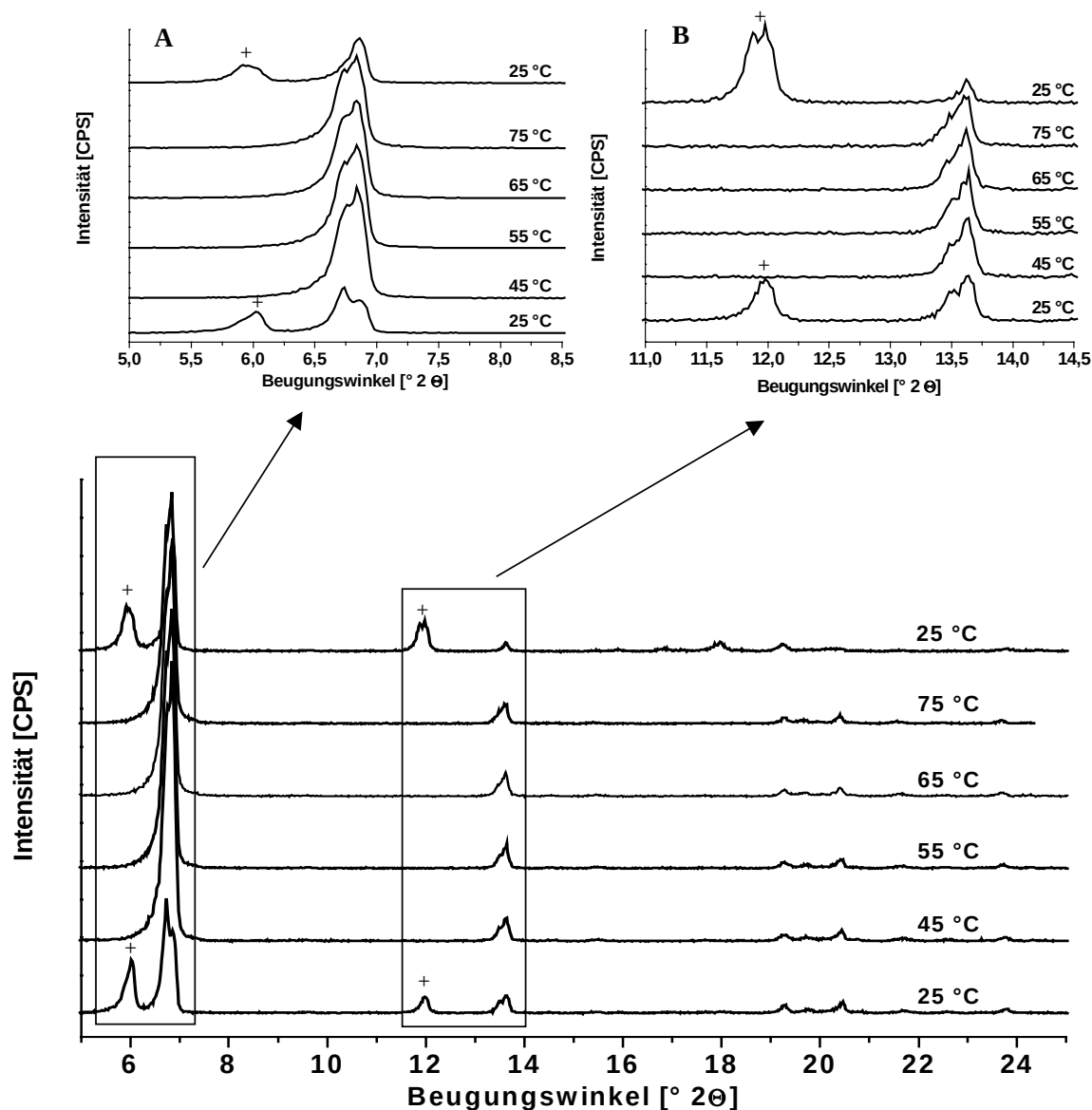


Abbildung B.10: Ergebnisse der Heiz-Röntgenpulverdiffraktometrie zur enantiotropen Phasenumwandlung von Natrium-(RS)-2-brom-3-methylbutyrat. Die Reflexe der Tieftemperaturphase sind markiert (+).

Das tatsächlich eine Reaktion bei höheren Temperaturen unter Eliminierung von Natriumbromid erfolgt, belegen die Untersuchungen mittels Heiz-Röntgenpulverdiffraktometrie im Temperaturbereich von 110 bis 180 °C, dargestellt in **Abbildung B.11**.

Aus dieser Abbildung geht hervor, dass die Reaktion bereits bei einer Temperatur von 110 °C beginnt und sich der Reaktionsumsatz mit zunehmender Temperatur und Reaktionsdauer erhöht.

Ab einer Temperatur von 150 °C ist die Reaktion abgeschlossen, so dass keine Reflexe der Precursorverbindung mehr in den Diffraktogrammen zu erkennen sind. Dass sich keine Reflexe des entstehenden Polymers im Diffraktogramm detektieren lassen liegt daran, dass die Reaktionstemperatur wahrscheinlich über der Glasübergangstemperatur des entstehenden Polymers liegen und es bei diesen Temperaturen somit als Schmelze vorliegt.

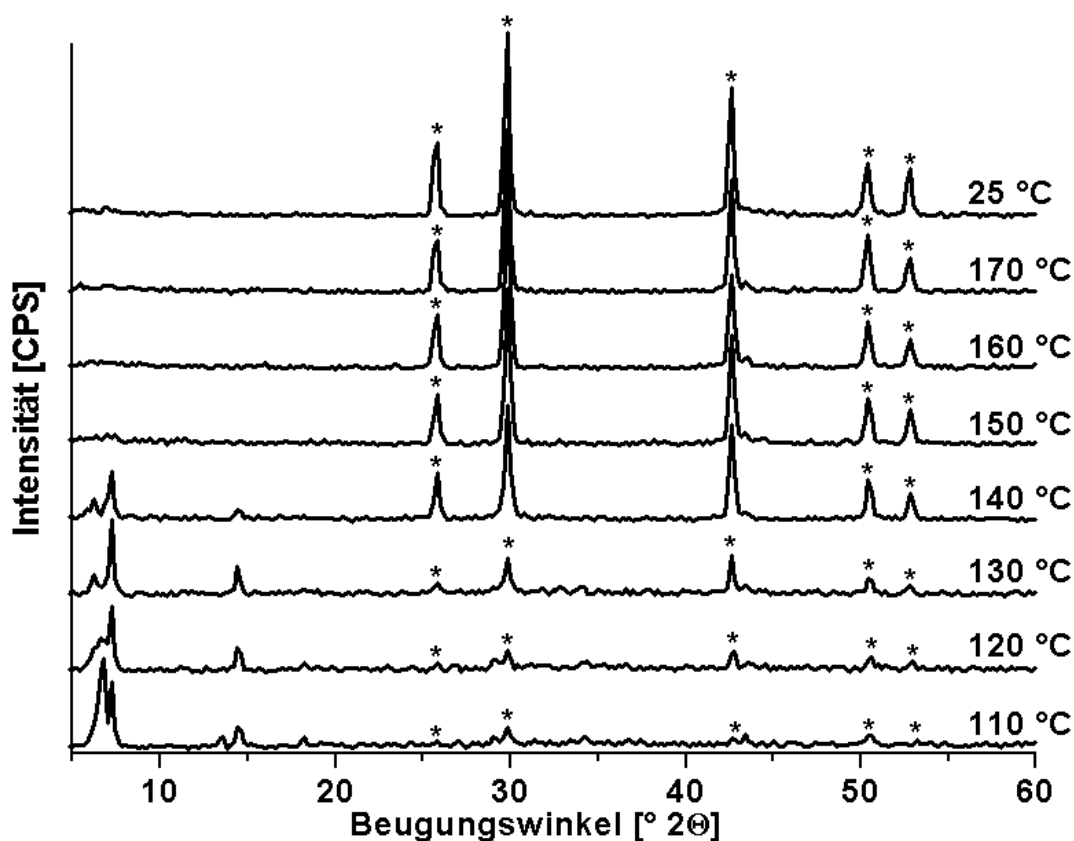


Abbildung B.11: *In-situ* Heiz-Röntgenpulverdiffraktogramme der Polymerisationsreaktion von Natrium-(RS)-2-brom-3-methylbutyrat. Die Reflexe des während der Reaktion gebildeten Natriumbromids sind markiert (*).

Aus **Abbildung B.11** geht weiterhin hervor, dass das entstehende Polymer im festen Zustand bei Raumtemperatur vollständig amorph ist. Diese Ergebnisse deuten schon an, dass als Reaktionsprodukt, wie bei den Alkali-2-chlorpropionaten, unabhängig von der Konfiguration des eingesetzten Precursors, immer ein ataktisches Polymer entsteht. Diese Aussagen konnten leider nicht anhand der ^{13}C -Lösungs-NMR-Spektren der Polymere aus Natrium-(RS)-2-brom-3-methylbutyrat und Natrium-(S)-2-brom-3-methylbutyrat bestätigt werden, da es offensichtlich während der Reaktion auch zu unspezifischen, pyrolytischen Abbaureaktionen kommt, wie sich anhand von TG-DTA-Messungen nachweisen lässt.

Sie belegen einen ab 50 °C einsetzenden kontinuierlichen Massenverlust mit zwei überlagerten Stufen bei 100 °C (Verlust von Wasser) und während der Polymerisation bei 170 °C sowie einer großen Stufe bei ab 260 °C.

Durch die Überlagerung von Signalen dieser Nebenprodukte mit denen des Polymers ist eine zuverlässige Zuordnung der einzelnen Peaks und somit eine Aussage über die Taktizität der Polymere nicht möglich.

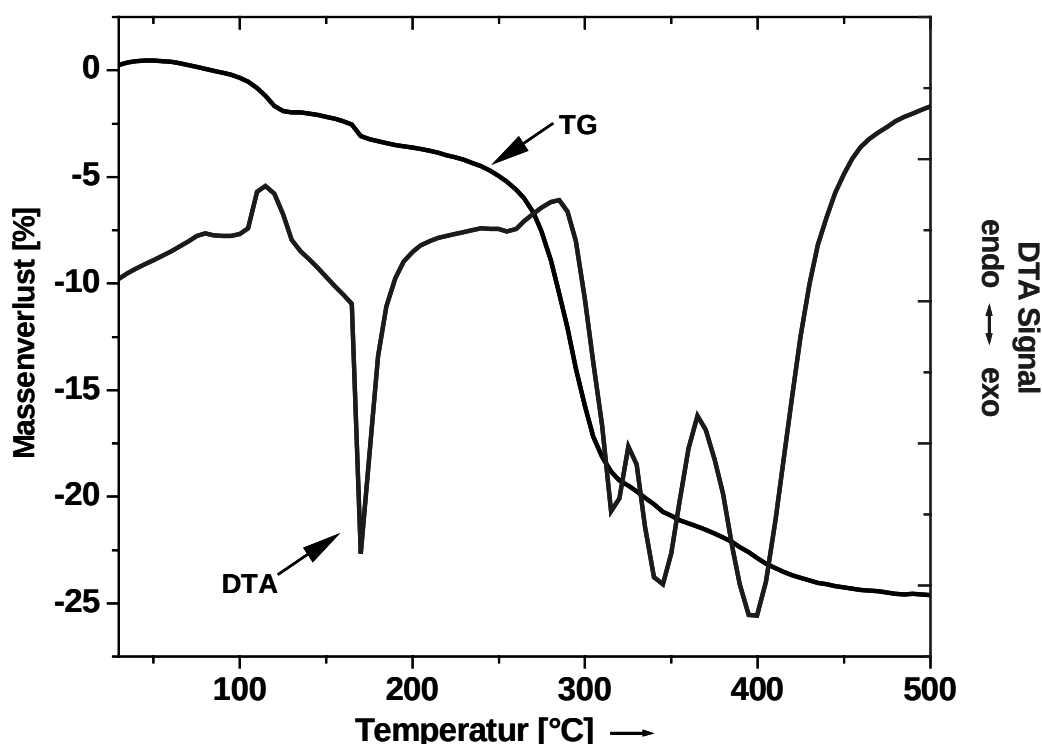
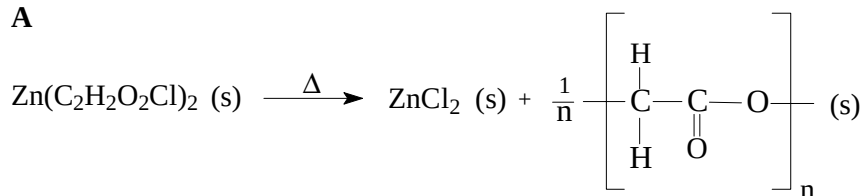


Abbildung B.12: Ergebnisse der TG-DTA-Messungen von Natrium-(*RS*)-2-brom-3-methylbutyrat

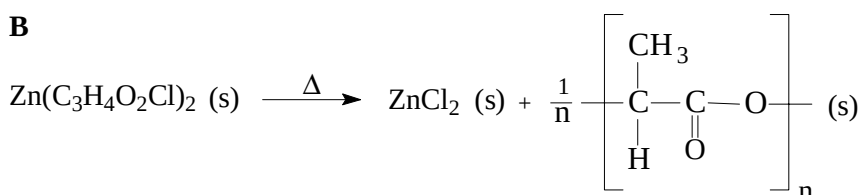
Auswirkungen zweiwertiger Kationen auf das Reaktionsverhalten

Die folgenden Untersuchungen dienen dazu herauszufinden, wie sich Änderungen in der Zusammensetzung der Precursorverbindungen auf das Reaktionsverhalten und die Produkte auswirken. Zu diesem Zweck wurde das Reaktionsverhalten der Zinksalze der 2-Chlorpropionsäure und der Chloressigsäure untersucht. Die Untersuchungen an den Zinkverbindungen hatten das Ziel zu klären, ob durch die Verwendung eines Übergangsmetallkations

A



B



Gleichung B.12: Reaktionsgleichung der möglichen Polymerisation von Zinkchloracetat (A) und Zink-2-chlorpropionat (B)

statt eines Alkalimetalls eine Polymerisation gemäß Gleichung **B.12 A** und **B** erfolgt und welchen Einfluss das Zinkkation auf die Kettenlänge der entstehenden Polymere hat. Die Zinkverbindungen

wurden ausgewählt, da es sich bei Zink und Zink(II)-Salzen um bekannte Katalysatoren der ringöffnenden Polymerisation von Glykolid und Lactid handelt.^[64] In der Literatur ist zudem die katalytische Wirkung von Zn(II)-Verbindungen auf die Umwandlung von niedermolekularem zu hochmolekularem Polyglykolid im Festkörper beschrieben ist.^[65]

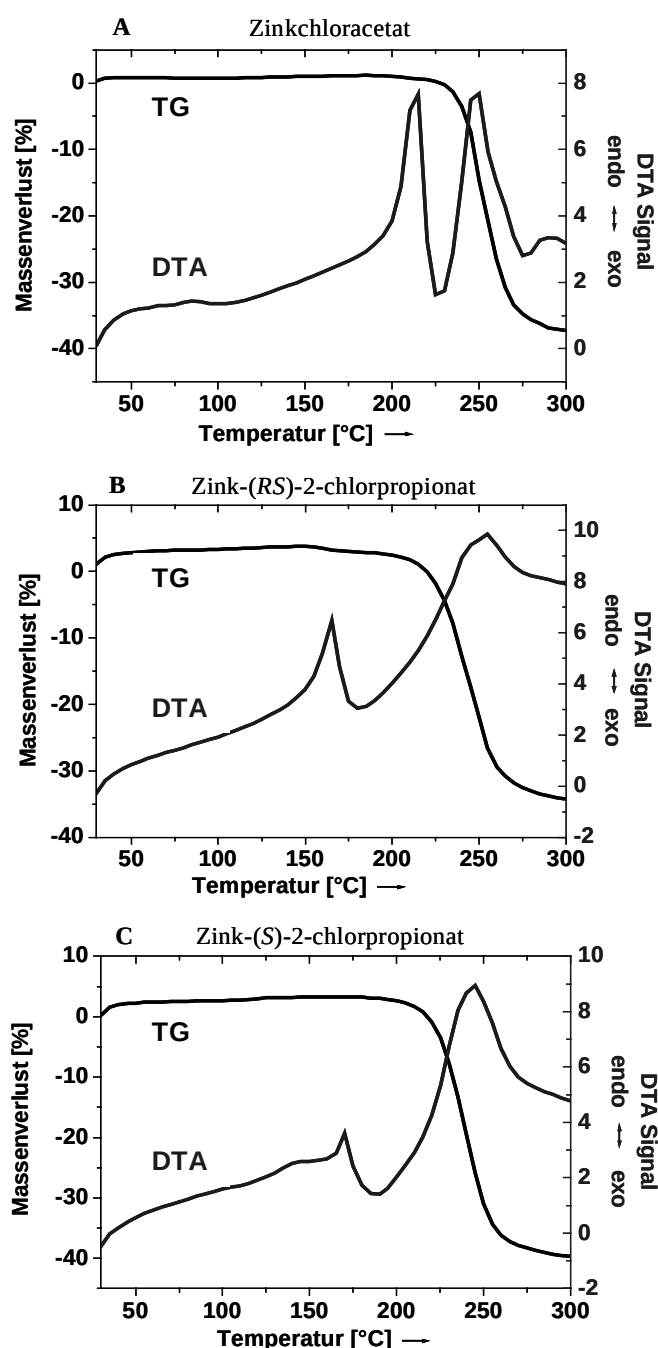


Abbildung B.13: Ergebnisse der TG-DTA-Messungen an Zinkchloracetat (A), Zink-(RS)-2-chlorpropionat (B) und Zink-(S)-2-chlorpropionat (C).

Aufgrund dieser katalytischen Eigenschaften erschien dieses Metall als vielversprechendes Kation, um besonders hohe Kettenlängen während der Polymerisationsreaktion aus den 2-Chlorpropionaten und Chloracetaten zu erzielen. Die Polymere, die aus der Umsetzung von Alkalihalogenacetaten und Alkali-2-chlorpropionaten gewonnen werden können, bestehen in der Regel aus relativ kurzen Ketten von ca. 30-50 Monomeren, wohingegen Polymere, die durch ringöffnende Polymerisation von Lactid und Glykolid hergestellt werden, mittlere Kettenlängen von ca. 1000-2500 Monomereinheiten aufweisen. Da die Kettenlänge einen großen Einfluss auf die Materialeigenschaften eines Polymers hat, sollte versucht werden, durch eine Steigerung der Kettenlänge die mechanischen Eigenschaften und das Degradationsverhalten der Polymere aus den Halogenacetaten und 2-Halogenpropionaten zu optimieren.

Um Aussagen über das Reaktionsvermögen der Zinkprecursor treffen zu können, wurden die Zinksalze

^[64] M. Vert, G. Schwach, R. Engel, J. Coudane, Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers, *J. Controlled Release* **1998**, 53, 85-92

^[65] K. Takahashi, I. Taniguchi, M. Miyamoto, Y. Kimura, Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid), *Polymer* **2000**, 41, 8725-8728

der (RS)- und (S)-2-Chlorpropionsäure sowie Zinkchloracetat mittels kombinierter Thermogravimetrie-Differenzthermoanalyse (TG-DTA) untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in **Abbildung B.13** zusammengestellt. Den Messergebnissen ist zu entnehmen, dass keine der untersuchten Verbindungen eine Polymerisationsreaktion zeigt. Der DTA-Kurve lässt sich entnehmen, dass die Salze bei höheren Temperaturen lediglich aufschmelzen. Wird die Temperatur weiter erhöht, kommt es im weiteren Verlauf zur pyrolytischen Zersetzung der Schmelzen und somit zu einem Massenverlust, der sich in der TG-Kurve widerspiegelt. Diese Ergebnisse lassen sich in Beziehung setzen zu früheren Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von Calciumchloracetat-Monohydrat.^[66] Dieses Molekül besitzt, ebenso wie die untersuchten Zinksalze, ein zweiwertiges Metallkation und zeigte, wie die Zinkverbindungen, keine Reaktivität. Im Gegensatz dazu wurde eine solche Reaktion für die Silbersalze der Chlor- und Bromessigsäure sowie der 3-Chlorbuttersäure gefunden.^[49] Anhand dieser Aussagen lässt sich vermuten, die zweiwertige Metallkationen in der Kristallstruktur der Halogenocarboxylate Änderungen bewirken, die dazu führen, dass eine Polymerisationsreaktion verhindert wird. Um diese Aussagen zu bestätigen, ist es aber prinzipiell notwendig, die Kristallstruktur der Precursor und gegebenenfalls die thermodynamischen Parameter der Reaktion zu bestimmen.

B.II.IV Zusammenfassung

In dieser Studie wurde das Reaktionsverhalten von kristallinen, chiralen Precursorverbindungen am Beispiel der thermisch initiierten Polymerisation der Alkalisalze der 2-Chlorpropionsäure und der Natriumsalze der 2-Brom-3-methylbuttersäure dahingehend untersucht, inwieweit sich die hochgeordnete Anordnung der Moleküle innerhalb der Monomerkristalle auf die Reaktion und die Struktur der entstehenden Polymere übertragen lässt. Insbesondere das Reaktionsverhalten enantiomerenreiner Monomere wurde mit der Hoffnung untersucht, ob es gelänge, die Konfiguration im Sinne einer topotaktischen Reaktion auf die Reaktionsprodukte zu übertragen, so dass Polymere mit einer stereospezifischen Struktur entstehen. Aus den vorliegenden Ergebnisse lässt sich jedoch entnehmen, dass in keiner der untersuchten Polymerisationsreaktionen eine solche stereoregulierte Polymerisation beobachtet werden konnte. In allen untersuchten Fällen erfolgte während der Reaktion stets eine Racemisierung, so dass als Reaktionsprodukte immer amorphe, ataktische Polymere erhalten wurden. Erklären lässt sich diese Racemisierung durch eine wiederholte Substitution am chiralen Kohlenstoffatom während der Reaktion. Einen entscheidenden Einfluss könnte aber auch den Vorgängen im Festkörper während der Reaktion zufallen.

^[66] M. Eppe, H. Kirschnick, The thermally induced solid-state polymerization reaction in halogenoacetates, *Chem. Ber.* **1996**, 129, 1123-1129

Mit großer Wahrscheinlichkeit kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktion an den Fehlstellen im Monomerkristall beginnt. Dieses führt zur Ausbildung einer Phasengrenze zwischen dem neu gebildeten, bei den Reaktionstemperaturen flüssigen, Polymer und dem restlichen Monomer. Da diese Phasengrenze ebenfalls, wie die ursprünglichen Fehlstellen, einen Bereich erhöhter Energie im Monomerkristall darstellt, ist es denkbar, dass die weitere Polymerisation bevorzugt entlang dieser Phasengrenze erfolgt und nicht in dem Kristallgitter des Monomeren, so dass dessen Kristallstruktur keinen oder nur noch einen geringen Einfluss auf die Polymerstruktur ausüben kann, vergleichbar einer Polymerisation in Lösung. Dieser erstmals von Adler *et al.* für strahlungsinduzierte Festkörper-Polymerisationsreaktionen formulierte Mechanismus liefert eine Erklärung dafür, dass die Kristallstruktur keinen Einfluss auf die Reaktionsprodukte im Sinne einer topotaktischen Reaktion haben muss.^[67] Inwieweit sich diese mechanistischen Überlegungen auch auf die beobachtete Racemisierung chiraler Precursor, während thermisch initiiert Polymerisationsreaktionen übertragen lassen, ist unklar. Dass eine stereospezifische Steuerung jedoch prinzipiell möglich ist, zeigen in der Literatur beschriebenen Photopolymerisationsreaktionen.^[68]

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es zu klären, ob die Ursache für die fehlende Reaktivität des Lithiumsalzes der 2-Chlorpropionsäure möglicherweise thermodynamischen Ursprungs ist. Aus den thermochemischen Messergebnissen der Lösungskalorimetrie an der Säure, dem entsprechenden Natrium- und Lithiumsalz sowie den Daten der Verbrennungskalorimetrie an den korrespondierenden Polymeren Poly(D,L-lactid) und Poly(L-lactid) konnten die molaren Reaktionsenthalpien für die Polymerisationsreaktion ermittelt werden. Die Daten belegen, dass die Reaktionsenthalpie für das Lithiumsalz deutlich geringer ist und bei Bildung von Poly(D,L-lactid) sogar schwach endotherm. Aufgrund des geringen Betrags von $\Delta_r H_m^\circ$ lässt sich jedoch keine genaue Aussage über die Größe der freien Reaktionsethalpie $\Delta_r G_m^\circ$ treffen und somit darüber, ob die fehlende Reaktivität tatsächlich thermodynamisch begründet ist.

Die Daten lassen jedoch die Vermutung zu, dass die Lithiumverbindung im Gegensatz zur Natriumverbindung zu stabil ist, um eine Polymerisationsreaktion eingehen zu können. Dieser Umstand ergibt sich wahrscheinlich aus der hohen Polarisierung des sehr kleinen Lithium-Kations und stellt ein generell beobachtetes Phänomen bei der thermisch initiierten Polymerisation von Halogencarboxylaten dar.

^[67] G. Adler, W. Reams, Heterogeneous nature of reaction in radiation-induced solid-state polymerisation of acrylamide, *J. Chem. Phys.* **1960**, 32, 1698-1700

^[68] A. Matsumoto, K. Yokoi, S. Aoki, K. Tashiro, T. Kamae, M. Kobayashi, Crystalline-state polymerisation of diethyl (Z,Z)-2,4-hexadienedioate via a radical chain reaction mechanism to yield an ultrahigh-molecular-weight and stereoregular polymer, *Macromolecules* **1998**, 31, 2129-2136

Dies demonstriert, welchen entscheidenden Einfluß das Kation auf die Reaktivität der Halogencarboxylate ausüben kann.

Dies zeigen auch die Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von Zinkchloracetat und der Zink-2-chlorpropionaten. Für keine der untersuchten Verbindungen konnte eine Polykondensationsreaktion gefunden werden. Ähnlich den Lithiumsalzen schmelzen diese Verbindungen beim Erhitzen lediglich auf und beginnen sich bei weiterer Temperaturerhöhung zu zersetzen, wie die Messkurven der Thermogravimetrie und Differenzthermoanalyse belegen.

Dieses Verhalten ließ sich auch in einer früheren Untersuchung bei Calciumchloracetat-Monohydrat, dem einzigen bis dato untersuchten Chloracetat Verbindung mit einem zweiwertigen Metallkation, beobachten. Dieses Verhalten ist um so erstaunlicher, da in der Literatur durchaus thermisch initiierte Festphasen-Polymerisationsreaktionen mit zweiwertigen Kationen, wie zum Beispiel Magnesium, Calcium, Strontium und Barium, am Beispiel der n-2-Brombuttersäure beschrieben sind.^[69] Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass eine Korrelation zwischen der Größe des Kations und der Kettenlänge des entstehenden Polymers besteht. Takao *et al.* konnten zeigen, dass die mittlere Kettenlänge des Polymers mit zunehmender Größe des Kations steigt. Da Zink und Zinksalze zudem noch bekannte Katalysatoren für die Polymerisationsreaktion von Hydroxyessigsäure und Milchsäure sind, hätte ein positiver Einfluss auf die Kettenlänge und möglicherweise die Taktizität der Polymere erwartet werden können.

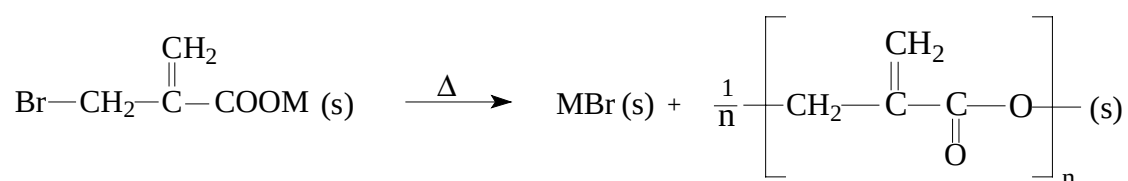
^[69] Y. Takao, Y. Kasashima, M. Inoki, F. Akutsu, K. Naruchi, Y. Yamaguchi, Thermal polymerisation of alkali and alkaline earth 2-bromon-n-butyrate in the solid state, *Polym. J.* **1995**, 27, (7), 766-771

B.III Festkörperchemische Synthese funktionalisierter Polyester

B.III.I Grundlagen

Da die Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften von Formkörpern aus festkörperchemisch hergestellten Polyglykolid und Poly(D,L-lactid-co-glykolid) gezeigt haben, dass diese Materialien nicht für Implantate im belasteten Bereich geeignet sind (siehe Kapitel C), sollte mit dieser Studie untersucht werden, ob es in einer Erweiterung des Konzeptes zur thermisch initiierten Polykondensation von Halogencarboxylaten möglich ist, Polymere herzustellen, die aufgrund ihrer chemischen Struktur verbesserte mechanische Eigenschaften besitzen und zudem unempfindlicher gegenüber einer Hydrolyse bei Kontakt mit wässrigen Medien sind. Da sich in den vorangegangenen Untersuchungen herausgestellt hat, dass eine Optimierung der Materialeigenschaften der Polymere über strukturelle Veränderungen an den entsprechenden Monomerstrukturen nur in relativ geringen Umfang möglich ist, war es der Ansatz der folgenden Studie, durch geeignete Reaktionen am Polymer nachträglich eine möglichst steuerbare Verbesserung der Materialeigenschaften zu erzielen. Dies sollte durch die Einführung von funktionellen Gruppe in die Polymerkette erreicht werden, über die eine Quervernetzung der einzelnen Kettenstränge ermöglicht werden sollte.

Zu diesem Zweck wurde das Reaktionsverhalten der Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze der α -Brommethacrylsäure dahingehend untersucht, ob eine Polykondensationsreaktion zum Poly- α -methylen- β -propiolacton, wie sie in **Gleichung B.13** dargestellt ist, erfolgt und wie sich die Doppelbindungsfunktion während der Polymerisationsreaktion verhält. Wenn sich die Reaktionen zum Polyester und über die Doppelbindung trennen ließen und somit auf diese Weise ungesättigte Polyester darstellbar wären, könnte es vielleicht möglich sein, durch eine nachträgliche, strahlungsinduzierte Polymerisation über die Doppelbindung eine dreidimensionale Quervernetzung zu erreichen. Über die Dauer der Bestrahlung mit UV oder γ -Strahlen könnte es möglich sein, das Ausmaß der Quervernetzung einzustellen und somit eine Steuerung der Materialeigenschaften zu erreichen.



mit M = Na, K

Gleichung B.13: Polymerisationsreaktion der Alkali- α -brommethacrylate

Obwohl das Konzept der Quervernetzung zur Verbesserung der Materialeigenschaften von polymeren Biomaterialien erst seit einiger Zeit das Ziel intensiver Forschung ist, so gibt es doch schon einige bemerkenswerte Fortschritte auf diesem Gebiet.^{[70],[71]} So wurde zum Beispiel von Anseth *et. al.* ein Knochenzement aus Polyanhydrid entwickelt, der durch eine nachträgliche Quervernetzung mittels Photopolymerisation *in situ* die zur Auffüllung von Knochendefekten erforderlichen mechanischen Eigenschaften besitzt.^[72]

Neben der Möglichkeit zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften erscheinen funktionalisierte Polymere auch besonders geeignet, um bioaktive Substanzen wie Peptide, Proteine oder Kohlenhydrate zu binden, um gezielt bestimmte physiologische Prozesse an der Grenzfläche zwischen dem Biomaterial und dem umgebenden Gewebe hervorzurufen. Die Vorgänge an dieser Grenzfläche sind bisher nur im Ansatz verstanden, obwohl der Anbindung der Zellen an das Material eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Funktionsfähigkeit des jeweiligen Implantates zufällt. Dies zeigt sich besonders bei Implantaten aus biostabilen Materialien, beispielsweise bei Gefäßprothesen aus Polytetrafluorethylen (Teflon®). Im direkten Kontakt mit dem Blut wird durch die Polymeroberfläche die Blutgerinnung stimuliert. In der Folge kommt es zur Bildung von Thromben und einer möglichen Verstopfung der Prothese. In natürlichen Adern wird dieser Prozess durch eine Monoschicht von Endothelzellen verhindert. Ein vielversprechender Lösungsansatz, der schematisch in **Abbildung B.14** dargestellt ist, sieht vor, durch die Beschichtung der Implantatoberfläche mit integrinspezifischen, zellselektiven Molekülen (Zelladäsionsmediatoren), wie zum Beispiel Fibronectin, menschliche Endothelzellen an die Implantatoberfläche zu binden und somit eine Thrombenbildung zu verhindern.^[73]

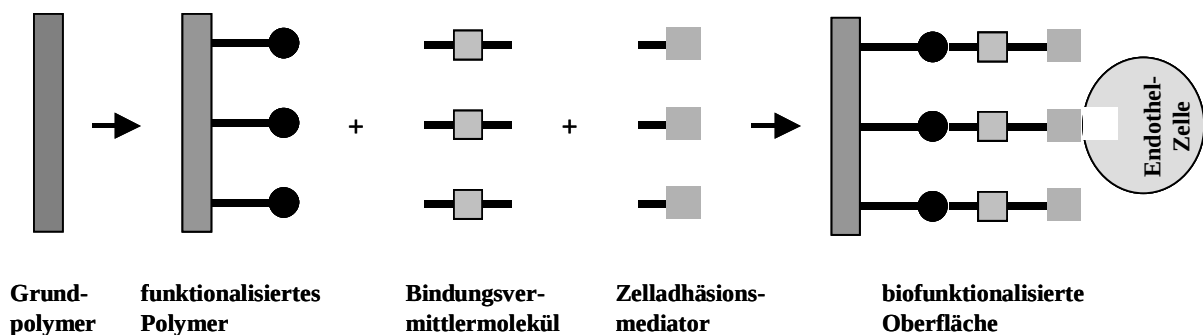


Abbildung B.14: Schema der Biofunktionalisierung von Polymeroberflächen zur Optimierung der Bioverträglichkeit von Gefäßprothesen.

^[70] D.S. Muggli, A.K. Burkoth, K.S. Anseth, Crosslinked polyanhydrides for use in orthopedic applications: degradation behavior and mechanics, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 46, 271-278

^[71] D.D. Frazier, V.K. Lathi, T.N. Gerhart, W.C. Hayes, *Ex vivo* degradation of a poly(propylene glycol-fumarate) biodegradable particulate bone cement, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 35, 382-389

^[72] K.S. Anseth, V.R. Shastri, R. Langer, Photopolymerizable degradable polyanhydrides with osteocompatibility, *Nature Biotech.* **1999**, 17, 156-159

^[73] D. Klee, H. Höcker, Polymers for biomedical applications: improvement of the interface compatibility, *Adv. Polym. Sci.* **1999**, 149, 1-57

Erste klinische Tests mit solchen endothelzellenbeschichteten Gefäßprothesen aus Tetrafluorethylen, zeigten im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten eine verbesserte Bioverträglichkeit.^[74] Dieses Konzept lässt sich im Prinzip auf alle Implantatmaterialien übertragen, um deren Biokompatibilität zu erhöhen, zum Beispiel auf Knochenimplantate. So ist es Kessler *et al.* gelungen, integrinspezifische Peptidliganden kovalent an die Oberfläche von Polymethylmethacrylat, einem gängigen Knochenzement, zu binden. Die so behandelten Implantatoberflächen zeigten in Zellkulturen tatsächlich eine erhöhte Adhäsion von knochenbildenden Zellen (Osteoblasten).^[75] Im Tierexperiment konnte für derartig peptidbeschichtete Implantate eine verbesserte Integration im Knochengewebe nachgewiesen werden.^[76] Ein weiteres potentiell Anwendungsgebiet von funktionalisierten bioabbaubaren Polymeren eröffnet sich im Bereich der kontrollierten Wirkstofffreisetzung. Durch die Kopplung eines Wirkstoffes über eine hydrolysierbare, chemische Bindung an einen Polymerträger könnte die vorzeitige Freisetzung des Wirkstoffes durch Auswascheffekte während des Abbaus des Polymerträgers vermieden werden.

B.III.II Präparative Arbeiten

Alkali- α -brommethacrylat

Zur Neutralisierung wurden die entsprechenden Alkalihydroxide bei Raumtemperatur in wenig Methanol gelöst und anschließend auf 0 °C gekühlt. Durch die langsame Zugabe zu einer ebenfalls in wenig kaltem Methanol gelösten äquimolaren Menge α -Brommethacrylsäure erfolgte die Neutralisation. Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur im Vakuum bei einem Druck von 0.1 mbar vollständig getrocknet.

Tabelle B.14: Einwaagen zur Herstellung der Alkali- α -brommethacrylate

Komponente	α -Brommeth- acrylsäure	Alkali- hydroxyd	Methanol	Ausbeute	% d. Theorie
Lithium- α - brommethacrylat	2.48 g 15.0 mmol	0.36 g LiOH 15.0 mmol	$\approx$ 25 ml	2.32 g 13.6 mmol	91 %
Natrium- α - brommethacrylat	0.99 g, 6.0 mmol	0.24 g NaOH 6.0 mmol	$\approx$ 25 ml	1.09 g, 5.8 mmol	97 %
Kalium- α - brommethacrylat	1.03 g, 6.2 mmol	0.35 g KOH 6.2 mmol	$\approx$ 25 ml	1.19 g, 5.9 mmol	95 %

^[74] H.R. Laube, J. Duwe, W. Rutsch, W. Konertz, Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2000**, 120, (1) 134-141

^[75] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, Selektive RGD-vermittelte Adhäsion von Osteoblasten an Implantat-Oberflächen, *Angew. Chem.* **1999**, 111, (4), 587-590

^[76] M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation, *CHEMBIOCHEM* **2000**, 1, 107-114

B.III.III Ergebnisse

Röntgenpulverdiffraktogramme der Alkali- α -brommethacrylate

Um Informationen über Kristallinität und Stabilität der Alkali-2-brommethacrylate zu erhalten, wurden von allen hergestellten Verbindungen Röntgenpulverdiffraktogramme aufgenommen. Die in **Abbildung B.15** dargestellten Diffraktogramme für das Natriumsalz und das Kaliumsalz der α -Brommethacrylsäure zeigen lediglich Reflexe, die sich dem jeweils entstehenden Alkalihalogenid (NaBr und KBr) zuordnen lassen. Dies bedeutet, dass die dargestellten Verbindungen bei Raumtemperatur nicht stabil sind und eine vorzeitige Polykondensation während der Präparation oder während der Röntgenbestrahlung im Pulverdiffraktometer stattgefunden hat. Da jedoch weder den IR-Spektren noch die ^1H - und ^{13}C -Lösungs-NMR-Daten der Salze ein Anzeichen für eine vorzeitige Polymerisation zu entnehmen ist, folgt hieraus, dass die Röntgenstrahlung des Pulverdiffraktometers eine Polymerisation initiiert haben muss. Das Diffraktogramm der entsprechenden Lithiumverbindung zeigt hingegen keinerlei Reflexe und ist vollständig röntgenamorph.

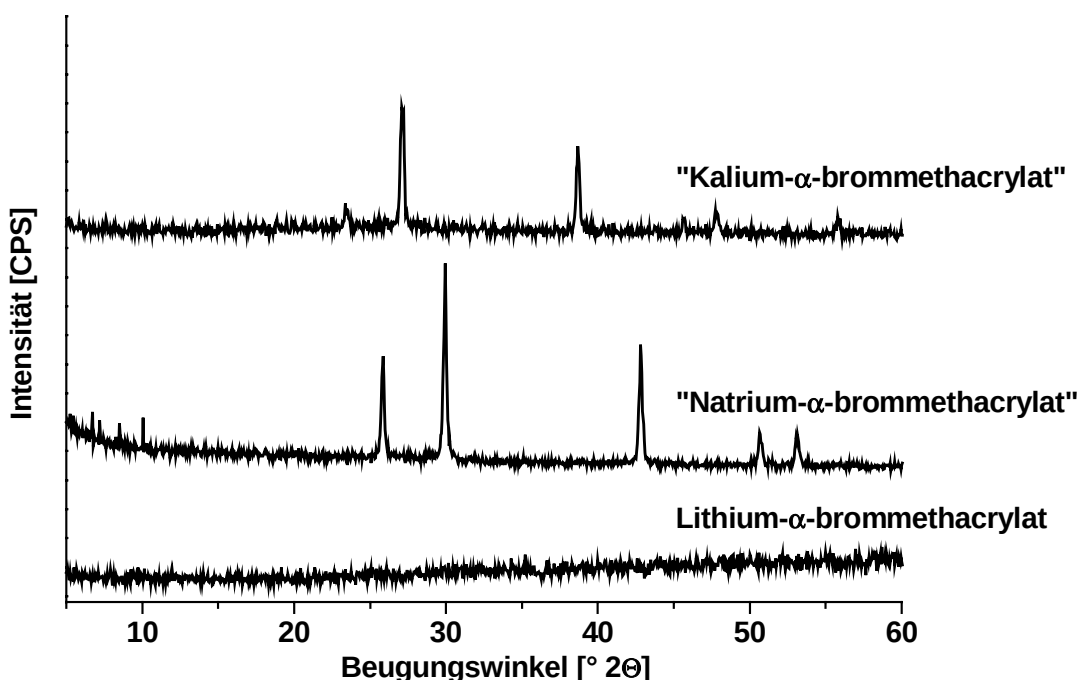


Abbildung B.15: Röntgenpulverdiffraktogramme von Lithium-2-brommethacrylat (unten), „Natrium-2-brommethacrylat“ (mitte) und „Kalium- α -brommethacrylat“ (oben).

Thermische Analyse

Um zu ermitteln, ob die Alkali- α -brommethacrylate eine thermisch initiierte Polykondensation gemäß **Gleichung B.13** eingehen, wurden alle Salze hinsichtlich ihrer Reaktivität mittels DSC und TG-DTA untersucht. Die Ergebnisse der DSC-Messungen in **Abbildung B.16** und **Tabelle B.15** zeigen, dass eine solche Reaktion sowohl für das Natrium- und das Kaliumsalz der 2-Brommethacrylsäure gefunden werden konnte. Beide Thermogramme zeigen ein einzelnes exothermes Signal, das auf eine Polymerisation schließen lässt.

Bemerkenswert sind die niedrigen Onsettemperaturen von 105.8 °C für die Natriumverbindung und 99.4 °C für das entsprechende Kaliumsalz. Das Lithiumsalz hingegen zeigt keinerlei Reaktion und zersetzt sich lediglich bei höheren Temperaturen.

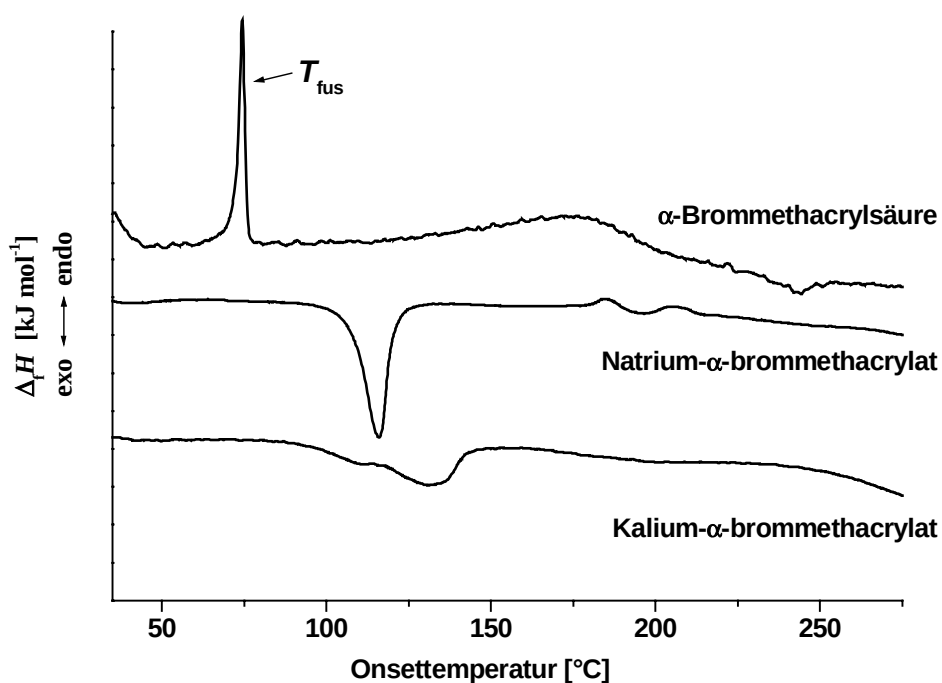


Abbildung B.16: DSC Thermogramme der 2-Brommethacrylsäure und Natrium- und Kalium- α -brommethacrylat.

Tabelle B.15: Reaktionstemperaturen und Reaktionsenthalpien für die Polymerisation der Alkali- α -brommethacrylsäure, gemessen mittels DSC (Heizrate 5 K min⁻¹)

Precursor	$T_r / ^\circ\text{C}$	$\Delta_r H_m(2) / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Produkt
Lithium- α -brommethacrylsäure	-	-	keine Reaktion
Natrium- α -brommethacrylsäure	105.8	-37.4	Poly- α -methylen- β -propiolacton
Kalium- α -brommethacrylsäure	99.4	-34.9	Poly- α -methylen- β -propiolacton

Die Messergebnisse der Thermogravimetrie sind am Beispiel des Natrium-2-brommethacrylats in **Abbildung B.17** dargestellt. Aus ihnen geht hervor, dass die Masse während der Polymerisation konstant bleibt und es zu keiner pyrolytischen Zersetzung während der Reaktion kommt. Es lässt sich gut anhand der Massenverringerung erkennen, dass erst ab einer Temperatur von oberhalb 200 °C ein pyrolytischer Abbau des gebildeten Polyesters einsetzt. Die massenspektroskopische Analyse der flüchtigen Abbauprodukte in **Abbildung B.18**, ergab die für Polyester typischen Fragmente von $m/z = 16$ (O^+), $m/z = 17$ (OH^+), $m/z = 18$ (H_2O^+), $m/z = 40$ ($H_2C=C-CH_2^+$) und $m/z = 44$ (CO_2^+). Bei der Endtemperatur von 500 °C beträgt der Massenverlust 32 Gew.-%. Da ein theoretischer Verlust von 44 Gew.-% erwartet wurde, deutet dies auf eine bei diesen Temperaturen unvollständige Pyrolyse hin.

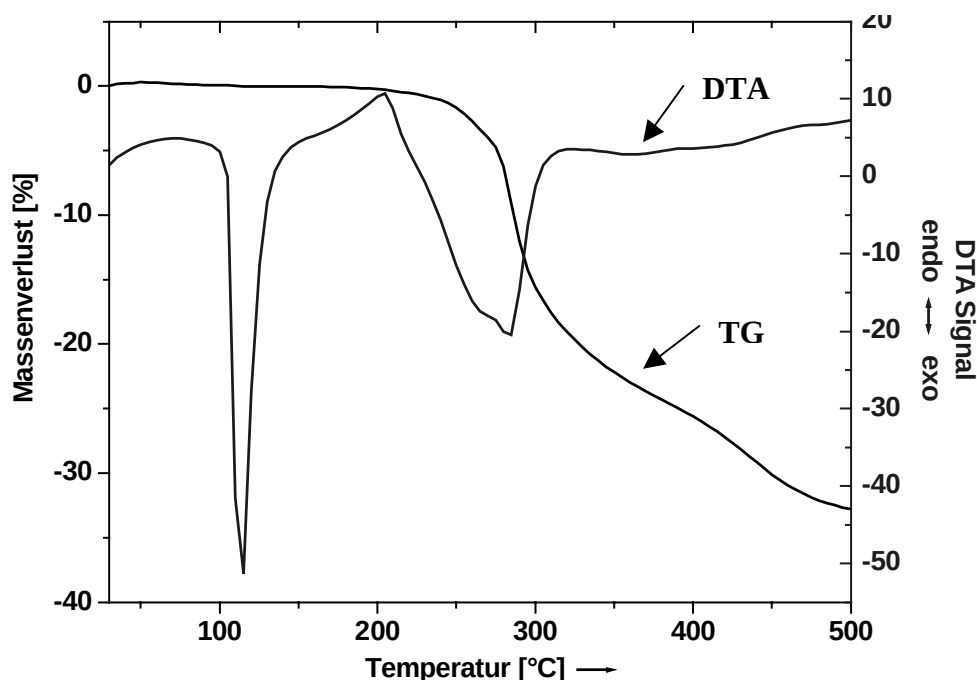


Abbildung B.17: Ergebnisse einer TG-DTA-Messung an Natrium- α -brommethacrylat

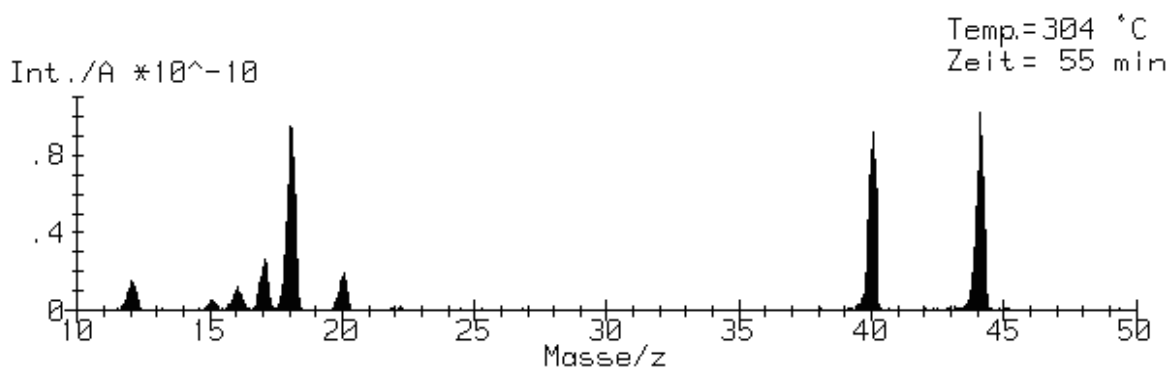


Abbildung B.18: Massenspektrum der flüchtigen Zerfallsprodukte während des pyrolytischen Abbaus von Poly- α -methylen- β -propiolacton bei einer Temperatur von 304 °C.

In einer ergänzenden Messung wurde das thermische Verhalten des Poly- α -methylen- β -propiolacton aus Natrium- α -brommethacrylat untersucht. Besonderes Interesse galt hierbei dem Schmelzpunkt und der Kristallinität. Die in **Abbildung B.19** präsentierten Ergebnisse der

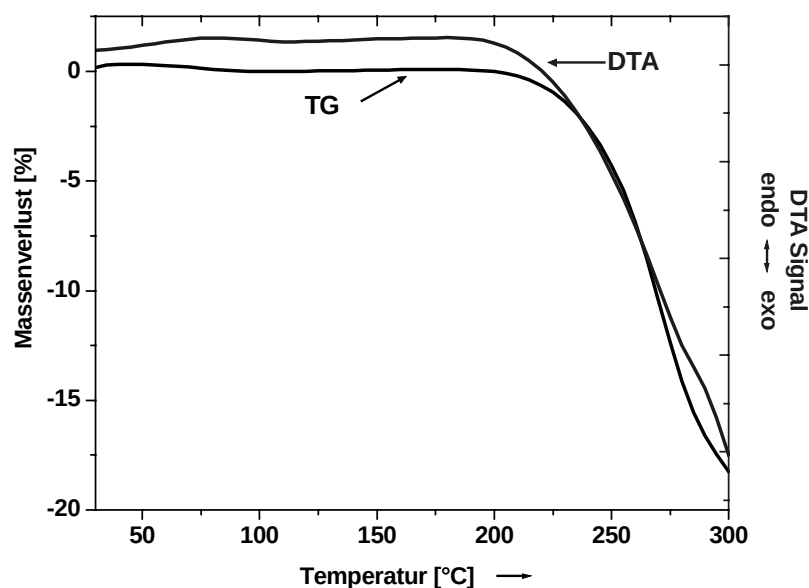


Abbildung B.19: Ergebnisse einer TG-DTA-Messung an 2-Polyhydroxymethacrylat

kombinierten Thermogravimetrie-Differenzthermoanalyse geben jedoch keinerlei Hinweis darauf, ob und bei welcher Temperatur das Polymer zu schmelzen beginnt. In der Literatur wird dieses Polymer jedoch, aufgrund von DSC-Messungen, als hoch kristallin mit einem Schmelzpunkt je nach Kettenlänge zwischen 195 und 254 °C beschrieben.^[77]

Interessanterweise führten jedoch Versuche, bei denen das Polymer über einen Zeitraum von 40 Minuten bei Temperaturen von 195 bis 213 °C erwärmt wurde, zu einem Verschwinden des endothermen Schmelzsignals (vgl. **Abbildung B.20**). Die Autoren vermuten als Ursache hierfür eine mögliche Quervernetzung über die Methylengruppe. Einen weiteren Hinweis auf diese Theorie ergibt sich aus dem Lösungsverhalten des Polymers. Obwohl in der Literatur als löslich in Trifluoressigsäure beschrieben, erwies sich das festkörperchemisch hergestellte Polymer als vollständig unlöslich. Um eine mögliche Quervernetzung nachzuweisen, wurde der Reaktionsverlauf und das entstandene Polymer mit Infrarot- und hochaufgelöster ^{13}C -Festkörper-NMR Spektroskopie untersucht.

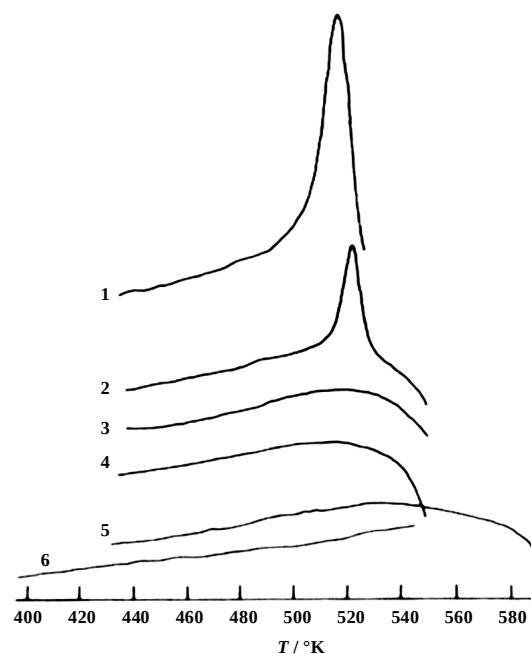


Abbildung B.20: DSC-Thermogramme des Schmelzbereiches von Poly- α -methylen- β -propiolacton nach der Temperung (40–60 Min.) nahe dem Schmelzpunkt nach Lenz *et al.*^[77]

^[77] R.W. Lenz, S.K. Pluzhnov, The preparation and properties of poly- α -methylene- β -propiolactone and α -ammoniummethacrylic acid salts, *Polym. Bull.* **1981**, 4, 725-729

Spektroskopische Untersuchungen

Während der Polymerisation im Labormaßstab wurden zu verschiedenen Zeitpunkten IR-Spektren der Reaktionsmischung aufgenommen, um den Verlauf und den Umsatz der Polymerisation zu charakterisieren. Eine Zusammenstellung der Spektren der Reaktion von Natrium- α -brommethacrylat ist in **Abbildung B.21** dargestellt. In dieser Zusammenstellung ist gut zu erkennen, wie die Salzbande bei 1558 cm^{-1} mit fortschreitender Reaktion langsam schwächer wird. Im Gegenzug entsteht bei 1727 cm^{-1} die Esterbande des Polymers, die mit zunehmendem Umsatz an Intensität gewinnt. Besonderes Interesse galt zudem der Bande der Doppelbindung bei 1637 cm^{-1} . Diese zeigt im Verlauf der Reaktion eine geringfügige Verschiebung zu höheren Wellenzahlen (von 1637 cm^{-1} zu 1642 cm^{-1}), doch bleibt die Intensität dieser Bande während der gesamten Polymerisation unverändert. Diese Daten belegen, dass es sich tatsächlich um eine Polykondensation handelt. Eine Polymerisation über die π -Bindung, die zu einer Quervernetzung führen würde, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht ableiten.

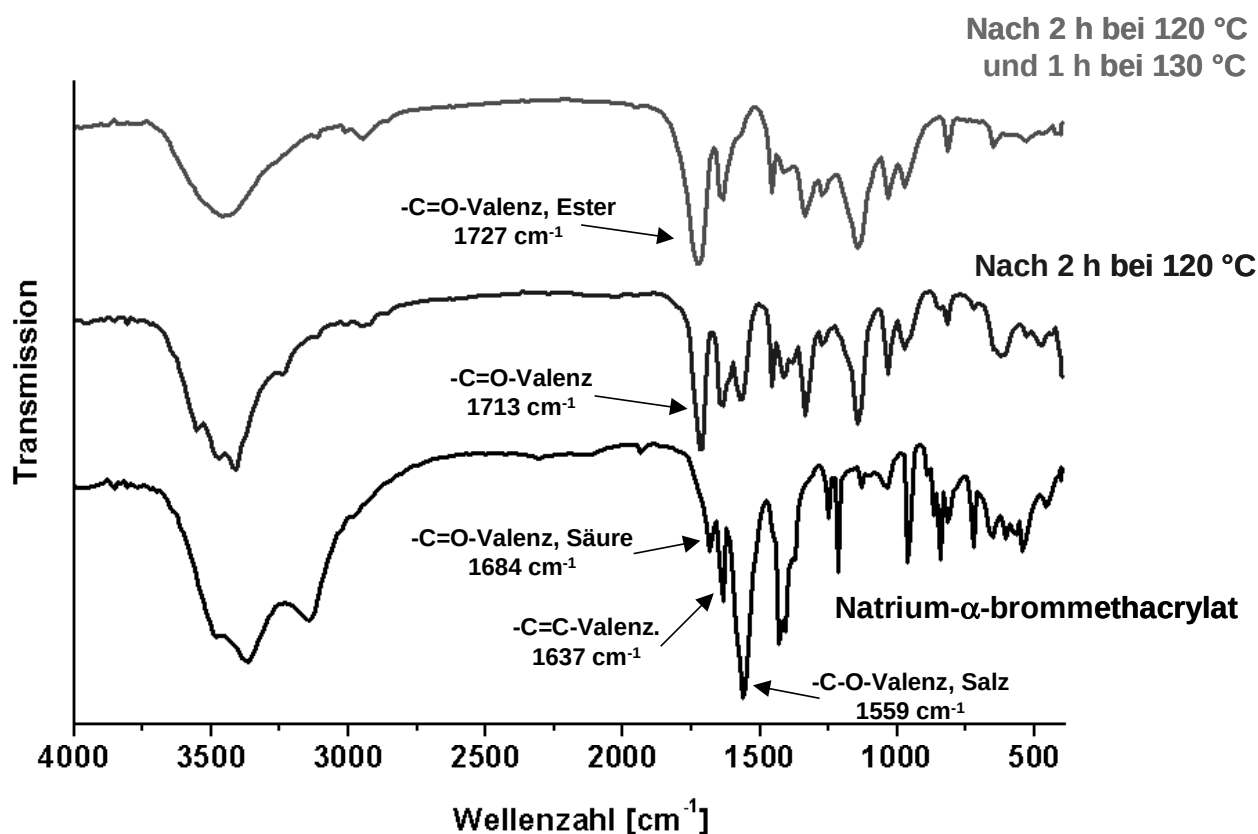


Abbildung B.21: *Ex-situ* IR-Spektren der Polymerisationsreaktion von Natrium- α -brommethacrylat.

Hochauflösende ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Da aufgrund der schlechten Lösungseigenschaften des Poly- α -methylen- β -propiolactons eine strukturelle Analyse mittels Lösungs-NMR nicht möglich war, wurde das Polymer stattdessen mittels hochauflösender ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Das in **Abbildung B.22 A** dargestellte Spektrum wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Kenneth D.M. Harris von der School of Chemistry der University of Birmingham von Simon J. Kitchen gemessen.

Es zeigt die für Poly- α -methylen- β -propiolacton erwarteten Signale der Kohlenstoffatome der beiden Methylengruppe bei 65.4 ppm ($=\text{CH}_2$) und 123.4 ppm ($-\text{OCH}_2-$), des quartären Kohlenstoffs bei 135.3 ppm ($-\text{C}-\text{COO}-$) sowie der Carbonylgruppe bei 166.4 ppm ($-\text{COO}-$). Signale die sich der Precursorverbindung zuordnen lassen (vgl. **Tabelle B.16**) sind im Spektrum nicht zu erkennen. Eine Aufspaltung der einzelnen Signale, die auf eine Überstruktur schließen ließe, ist dem Spektrum nicht zu entnehmen. Die Identifizierung der schwachen Signale bei 48.1 ppm und 172.2 ppm ist nicht sicher möglich. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Signale der Polymerendgruppen.

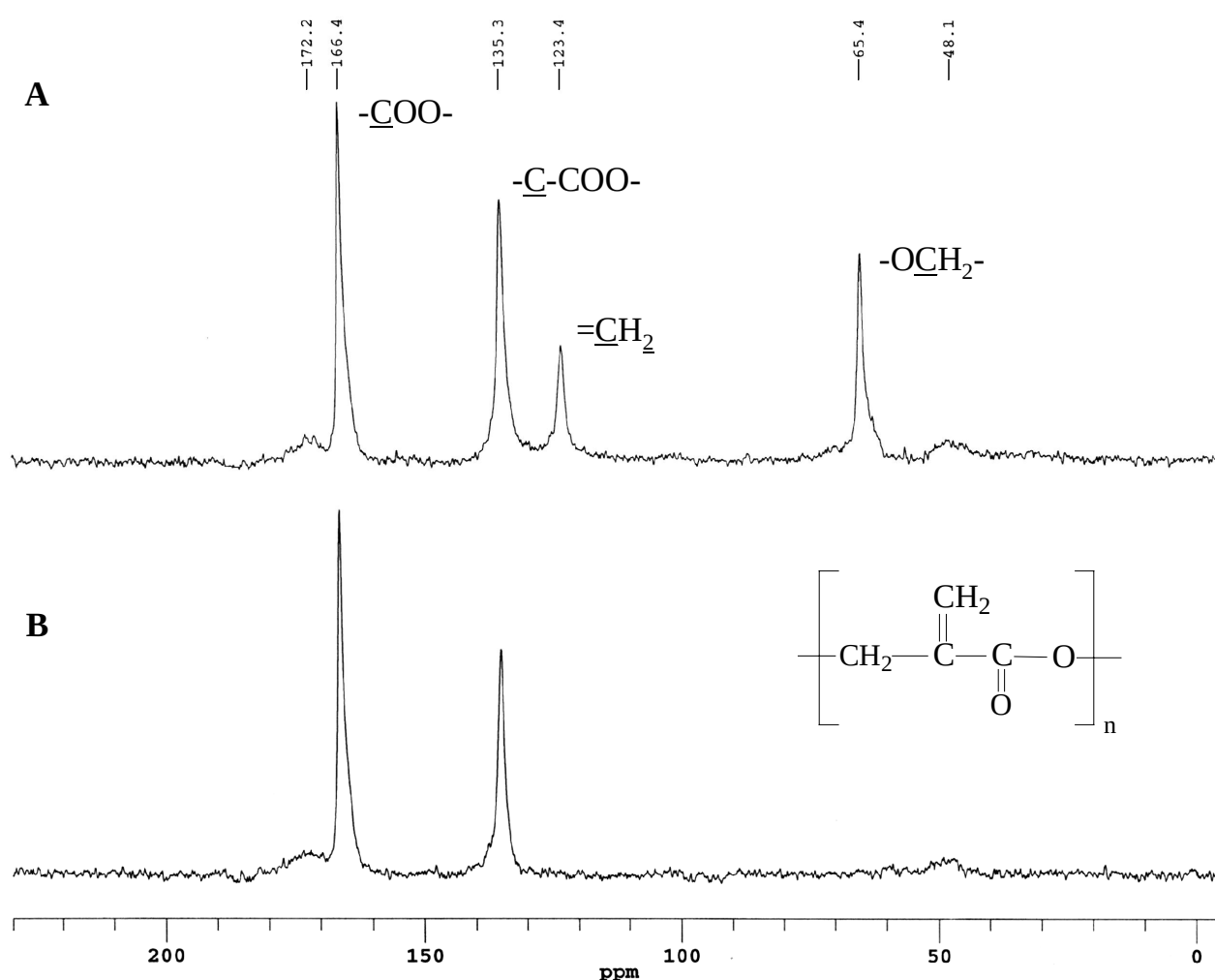


Abbildung B.22: Hochauflösende CP-MAS- ^{13}C -Festkörperspektren des Poly- α -methylen- β -propiolactons aus Natrium- α -brommethacrylsäure (oben) und mit NQS-Pulssequenz (*non quarternary carbon suppression*) (unten).

Tabelle B.16: Signallagen des Lösungs- ^{13}C -NMR-Spektrums von Natrium- α -brommethacrylsäure aufgenommen mit 50.28 MHz in D_2O .

Signallage δ [ppm]	Zuordnung
32.0	s, CH_2Br
122.8	s, CH_2
144.3	s, $\underline{\text{C}}\text{-COO}$
171.7	s, COO

Das untere Spektrum (**Abb. B.22 B**) zeigt eine Messung, die mit einer *non quaternary carbon suppression* Pulssequenz aufgenommen wurde. Hierdurch lassen sich die Resonanzen von CH - und CH_2 -Gruppen unterdrücken, so dass nur Signale von primären und quartären Kohlenstoffatomen detektiert werden, wodurch die Zuordnung der einzelnen Signale vereinfacht wird. Das Spektrum zeigt demzufolge auch nur die Signale des quartären Kohlenstoffs sowie der Carbonylgruppe. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass auch die Signale bei 48.1 ppm und 172.2 ppm detektiert werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich um Signale der endständigen Kettenglieder handelt und nicht um Signale, die von einer möglichen Quervernetzung über die Methylengruppe stammen, da sie sonst nicht im aufgenommenen Spektrum detektiert werden könnten.

Eine weiteren Beweis dafür, dass tatsächlich ein Polymer vorliegt zeigte sich bei basenkatalysierten Esterspaltung des Polymers mit Natriumhydroxid. Anhand der in Tabelle B.17 aufgeführten ^1H -NMR-Daten lässt sich zeigen, dass hierbei das Polymer in die entsprechenden α -Hydroxymethacrylsäure-Monomere überführt wird.

Tabelle B.17: Signallagen des Lösungs- ^1H -NMR-Spektrums von α -Hydroxymethacrylsäure nach der Verseifung von Poly- α -methylen- β -propiolacton mit NaOH aufgenommen mit 100 MHz in D_2O .

Signallage δ [ppm]	Zuordnung
4.3	s, $-\underline{\text{CH}}_2\text{OH}$
5.6	d, $=\text{CH}_\text{A}$
5.9	d, $=\text{CH}_\text{B}$

Morphologische Untersuchungen

Mittels Rasterelektronen-Mikroskopie wurde die Morphologie des entstandenen Polymers untersucht. Da die Reaktion unter Eliminierung von Natriumbromid erfolgt, sollte eine intensive Mischung zwischen dem entstehenden Polymer und Natriumbromidkristallen die Folge sein, wie sie beispielsweise auch für die Darstellung von Polyglykolid aus Natriumchloracetat beobachtet

wird.^[78] Durch den lösungsmittelfreien Herstellungsprozess sind die entstehenden Natriumchloridkristalle miteinander verknüpft und bilden eine dreidimensionale Netzwerkstruktur innerhalb des umgebenden Polymers. Aufgrund dieser besonderen Struktur ist es möglich, das gesamte Natriumchlorid mit Wasser zu extrahieren, so dass eine poröse Polymermatrix mit einem interkonnektierenden Porensystem erhalten werden kann. Die REM Aufnahme des aus Natrium- α -brommethacrylat hergestellten Poly- α -methylen- β -propiolactons in **Abbildung B.23 A** belegt, dass auch in diesem Fall eine intensive Durchmischung von Polymer und Alkalihalogenid erfolgt. Die Größe der Natriumbromidkristalle beträgt ca. 1 μm bis 5 μm .

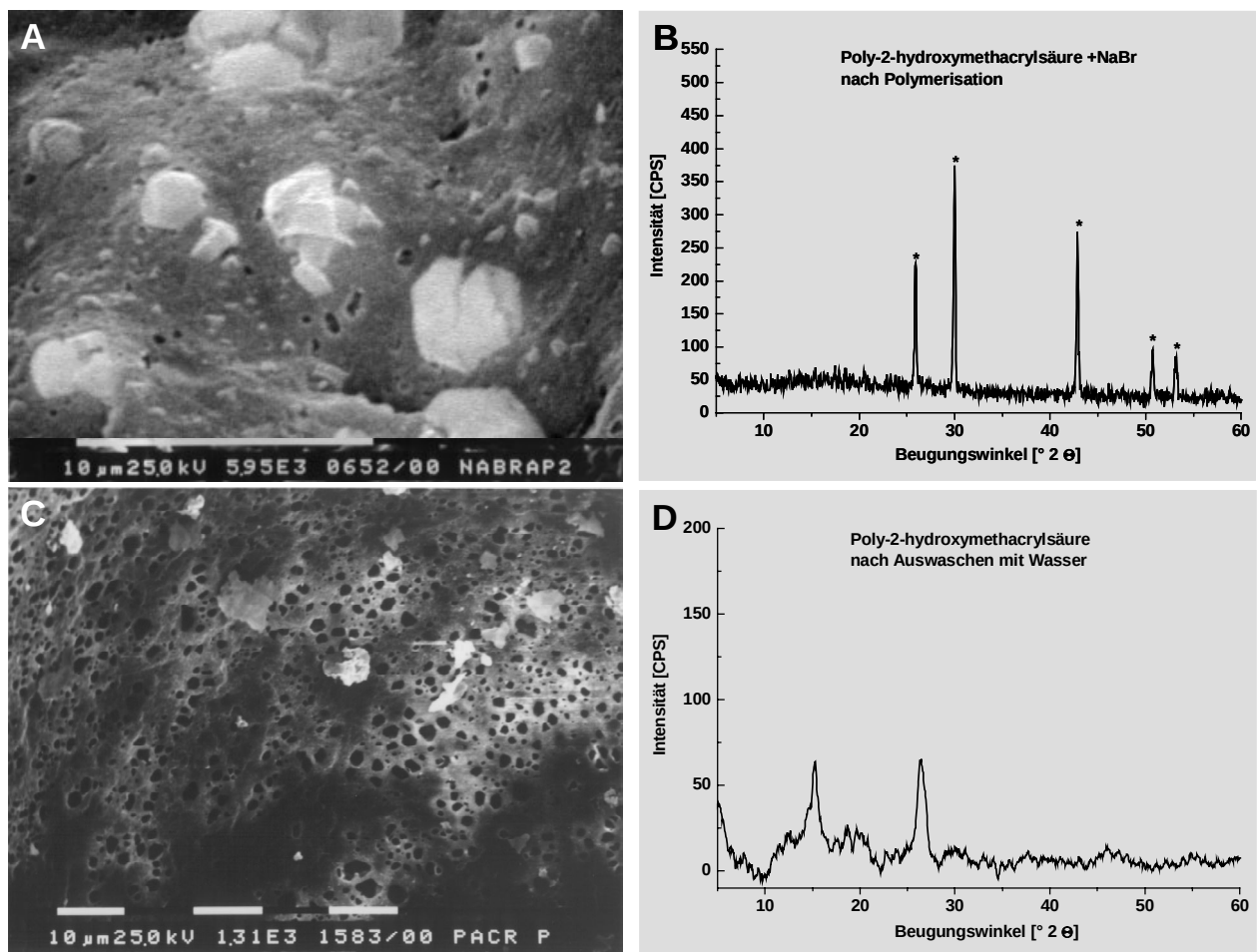


Abbildung B.23: REM Aufnahmen mit den zugehörigen XRD-Messungen des Poly- α -methylen- β -propiolactons aus Natrium- α -brommethacrylat direkt nach der Polymerisation (A und B) und nach dem Auswaschen mit Wasser (C und D). Die Reflexe von Natriumbromid in Diagramm B sind markiert (*).

Anhand des zugehörigen Röntgenpulverdiffraktogramms in **Abbildung B.23 B** und **Tabelle B.18** lässt sich zweifelsfrei bestätigen, dass es sich bei den Kristallen um Natriumbromid

^[78] M. Epple, O. Herzberg, Polyglycolide with controlled porosity: an improved biomaterial, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7 (6), 1037-1042

handelt. **Abbildung B.23 C** zeigt in 1300facher Vergrößerung das gleiche Polymer nach dem Waschen mit entionisiertem Wasser. Es lassen sich deutlich Poren mit einem Durchmesser zwischen ca. 1 μm bis 5 μm erkennen, in denen vorher die Natriumbromidkristalle saßen. Dass es tatsächlich gelingt, das inkorporierte Natriumbromid quantitativ auszuwaschen, belegt das zugehörige Pulverdiffraktogramm in **Abbildung B.23 D**, in dem lediglich die Reflexe des Polymers zu erkennen sind (vgl. **Tabelle B.18**).

Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass die einzelnen Natriumbromidkristalle miteinander verbunden sind und nach dem Auswaschen mit Wasser eine dreidimensional vernetzte Porenstruktur im Polymer zurück bleibt.

Tabelle B.18: Reflexlagen des Poly- α -methylen- β -propiolactons aus den Diffraktogrammen in **Abbildung B.23 B** und **D** im Vergleich zu Natriumbromid.

NaBr (Hauptreflexe) [° 2 Θ]	Poly- α -methylen- β -propiolacton nach der Reaktion (Hauptreflexe) [° 2 Θ]	Poly- α -methylen- β -propiolacton nach dem Auswaschen (Hauptreflexe) [° 2 Θ]
-	-	-
-	-	15.3
25.8	26.0	25.5
29.9	30.0	-
42.8	43.1	-
50.6	50.9	-
53.1	53.5	-

Quervernetzung durch γ -Bestrahlung im Festkörper

Um zu untersuchen, ob eine nachträgliche Vernetzung des festkörperchemisch hergestellten Poly- α -methylen- β -propiolactons möglich ist, ohne dabei die mikroporöse Struktur des Polymers zu zerstören, wurde das Polymer mit γ -Strahlen einer ^{60}Co -Strahlungsquelle ($E=1.17\text{ MeV}$ und 1.33 MeV) bestrahlt. Der Zweck dieser Bestrahlung war es, eine Quervernetzung der einzelnen Polymerketten über die Doppelbindungsfunktion zu erreichen, so dass ein Polymernetzwerk mit hydrolysierbaren Netzmaschen entsteht. Grundlage für diesen Versuch waren die Arbeiten von Morawetz *et al.* zur strahlungsinduzierten Polymerisation von Alkali- und Erdalkali Acrylaten und Methacrylaten im Festkörper.^{[79],[80]} Um die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Molekülstruktur zu dokumentieren, wurde das Polymer über einen Zeitraum von einer Woche

^[79] H. Morawetz, I.D. Rubin, Polymerization in the crystalline state. II. Alkali acrylates and methacrylates, *J. Polym.Sci.* **1962**, 57, 669-686

^[80] J.B. Lando, H. Morawetz, Polymerization in the crystalline state. IV. Calcium acrylate and barium methacrylate, *J. Polym. Sci. Part C: Polym Symp.* **1963**, 4, 789-803

bestrahlt und die strukturellen Veränderungen im Molekül mit Hilfe der IR-Spektroskopie analysiert.

In **Abbildung B.24** sind die Auswirkungen auf die Intensitäten der wichtigsten Absorptionsbanden graphisch dargestellt. Im einzelnen sind dies die --C=O-- -Valenz (1726.9 cm^{-1}), die --C=C-- -Valenz (1642.3 cm^{-1}), die $\text{--CH}_2\text{--}$ -Deform. (1457.0 cm^{-1}) und die --C-O-C-- -Valenz (1141.1 cm^{-1}). Die Graphik zeigt, dass bereits nach einem Tag Veränderungen im IR-Spektrum zu erkennen sind. Die Zunahme der Intensitäten der --C=O-- -Valenz von 56.8 % auf 58.5 % und der --C-O-C-- -Valenz von 55.7 % auf 55.9 % nach einem Tag Bestrahlung lässt eine geringfügige Nachpolymerisation zum Polyester vermuten. Mit zunehmender Dauer der Bestrahlung nehmen die Intensitäten der beiden Schwingungsbanden jedoch wieder ab und betragen nach sieben Tagen nur noch 54.6 % (--C=O-- -Valenz) beziehungsweise 50.6 % (--C-O-C-- -Valenz).

Diese Abnahme ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine strahlungsbedingte Bindungsspaltungsreaktion (γ -Radiolyse) zurückzuführen die zu einer Kettenabbaureaktion führt. Solche Abbaureaktionen sind bereits aus der Literatur für Polyglykolid, Polylactid und Poly(lactid-co-glykolid) bekannt und eine generelles Problem bei der Sterilisation von Medizinprodukten aus diesen Materialien.^[81]

Besonders deutlich zeigt sich der Kettenabbau anhand der Banden der --C=C-- -Valenzschwingung und der $\text{--CH}_2\text{--}$ -Deformationsschwingung. Innerhalb von sieben Tagen sinken die Intensitäten der --C=C-- -Valenzschwingung von 48.3 % auf 40.4 % und die der $\text{--CH}_2\text{--}$ -Deformationsschwingung von 46.1 % auf 36.7 %. Im Zuge einer strahlungsinduzierten Quervernetzung, wäre eine deutlich stärkere Abnahme der Intensität der --C=C-- -Valenzschwingung im Vergleich zur $\text{--CH}_2\text{--}$ -Deformationsschwingung erwartet worden. Anhand dieser Daten lässt sich eine Quervernetzung über die Doppelbindung, im Zuge der γ -Bestrahlung, nicht nachweisen.

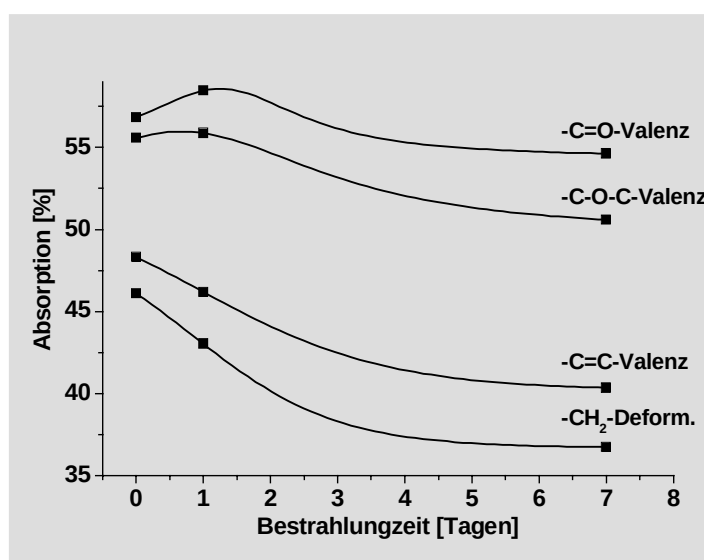


Abbildung B.24: Auswirkungen der γ -Bestrahlung auf die Intensitäten der Schwingungsbanden im IR-Spektrum.

^[81] A. Babanalbandi, D.J.T. Hill, A.K. Whittaker, Volatile products and new polymer structures formed on ^{60}Co γ -radiolysis of poly(lactic acid) and poly(glycolic acid), *Polym. Degrad. Stab.* **1997**, 58, 203-214

B.III.IV Zusammenfassung

Es konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass es möglich ist, das Konzept der thermisch initiierten Festphasenpolykondensation von Halogencarboxylaten auch auf Moleküle mit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe zu übertragen. Als Modellverbindungen wurden hierzu die Alkalisalze der α -Brommethacrylsäure ausgewählt und deren Reaktionsverhalten am Beispiel des Natrium- α -brommethacrylates untersucht. Die vorliegenden Daten belegen, dass sowohl das Natrium- als auch das Kaliumsalz eine Polymerisationsreaktion zum Poly- α -methylen- β -propiolacton eingehen können. Während der Reaktion, die vollständig im Festkörper verläuft, kommt es zur Eliminierung des entsprechenden Alkalihalogenids in Form von 1 μm bis 5 μm großen Kristalliten. Die Eliminierung ist charakteristisch für diese Art von Reaktion und führt zu einem Polymer, das vollständig mit diesen Kristalliten durchsetzt ist. Da es möglich ist, dass Alkalibromid quantitativ mit Wasser zu extrahieren, ist auf diese Weise eine μ -poröse Strukturierung des erhaltenen Poly- α -methylen- β -propiolactons möglich, wie sie zum Beispiel auch für festkörperchemisch hergestelltes Polyglykolid erreicht werden kann. Spektroskopisch ließ sich kein Hinweis auf eine Reaktion an der Doppelbindung finden, wenngleich die mangelnde Löslichkeit des Polymers in Trifluoressigsäure (TFA) und das fehlende Schmelzsignal in der DTA-Kurve auf eine geringfügige Quervernetzung schließen lassen. Das Ziel dieser Studie, die thermisch initiierte Festkörperpolymerisation auch auf die Synthese funktionalisierter Polyester zu übertragen, ist somit erfolgreich gelungen.

In einer ergänzenden Untersuchung sollte zusätzlich die Möglichkeit der strahlungs-induzierten Quervernetzung des Poly- α -methylen- β -propiolactons überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde der Polyester über einen Zeitraum von einer Woche den γ -Strahlen einer ^{60}Co -Strahlungsquelle ausgesetzt, in der Hoffnung eine Quervernetzung der einzelnen Polymer über die Doppelbindung zu erreichen. Die IR-Spektren des bestrahlten Polymers zeigten jedoch keinen Hinweis auf eine Reaktion an der Doppelbindung. Im Verlauf der Bestrahlung, konnte nach einem Tag lediglich eine geringfügige Nachpolymerisation zum Polyester nachgewiesen werden, die jedoch von parallel ablaufenden Kettenabbaureaktionen überlagert wird. Abschließend bleibt festzustellen, dass die Bestrahlung mit γ -Strahlen keine geeignete Methode darstellt, um eine Quervernetzung des Poly- α -methylen- β -propiolactons zu erreichen und somit Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften dieses Materials zu nehmen. Dennoch bietet dieses Polymer aufgrund seiner funktionellen Gruppen interessante Möglichkeiten. Denkbar wäre zum Beispiel eine radikalische Quervernetzung des Precursors in Lösung während der Neutralisation der α -Brommethacrylsäure oder die festkörperchemische Copolymerisation mit Halogenacetaten und 2-Chlorpropionaten mit dem Zweck die Löslichkeit und Bioverträglichkeit zu erhöhen.

B.III.V Charakterisierung der verwendeten Materialien

(S)-2-Chlorpropionsäure

IR [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2993/2939 (w, C-H), 1727 (s, C=O), 1454/1420/1382 (m, COO, C-H₃), 1289/1256/1212 (m, C-O), 1076 (m, C-OH), 989 (w), 922 (w) - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃+TMS) [ppm]: δ =1.73 (d, J =7.12 Hz, 3 H, CH₃), δ =4.46 (q, J =7.12 Hz, 1 H, CH). - ¹³C NMR (100.69 MHz, CDCl₃+TMS) [ppm]: δ =21.40 (s, CH₃), δ =52.41 (s, CH), δ =176.36 (s, COO). - EA: theor. C 33.20 %, H 4.64 %; gefunden C 32.92 %, H 4.83 %. - $\alpha_D^{25} = -17.5^\circ$ ($l = 10$ cm, unverdünnt) (lit. ^[54] $\alpha_D^{25} = -18.2^\circ$).

Chloressigsäure und *(RS)*-2-Chlorpropionsäure wurden bei der Firma Merck und *(S)*-2-Brom-3-methylbuttersäure, *(RS)*-2-Brom-3-methyl-buttersäure und 2-Brommethacrylsäure bei der Firma Aldrich gekauft und ohne weitere Aufbereitung verwendet.

Lithium-(RS)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2989/2942 (w, C-H), 1602 (s, C=O), 1457/1422/1368 (m, COO, C-H₃), 1278/1229 (m, C-O), 1081 (m, C-OH), 990 (w), 889 (w) - ¹H NMR [200 MHz, D₂O] [ppm]: δ =1.6 (d, 3 H, CH₃), δ =4.4 (q, 1 H, CH). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =22.2 (s, CH₃), δ =57.5 (s, CH), δ =178.2 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: endothermes Schmelzsignal geht über in exotherme Zersetzung: Onsettemperatur 189.3 °C - EA: theor. C 31.48 %, H 3.52 %; gefunden C 31.24 %, H 3.86 %.- XRD [Cu K α $\lambda = 154.178$ pm, Hauptreflexe in $^\circ 2\theta$]: 8.8, 17.6, 25.4, 26.4, 29.1, 32.3, 44.9

Natrium-(RS)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2990/2935 (w, C-H), 1605 (s, C=O), 1455/1404/1365 (m, COO, C-H₃), 1269/1245 (m, C-O), 1076 (m, C-OH), 985 (w), 881 (w) - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =1.7 (d, 3 H, CH₃), δ =4.5 (q, 1 H, CH). - ¹³C NMR [50.28 MHz, D₂O] [ppm]: δ =22.0 (s, CH₃), δ =58.0 (s, CH), δ =178.0 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak: Onsettemperatur 168.9 °C, $\Delta_r H_m = -26.7$ kJ mol⁻¹ - EA: theor. 27.61 %, H 3.09 %; gefunden C 26.96 %, H 3.09 %. - XRD [Cu K α $\lambda = 154.178$ pm, Hauptreflexe in $^\circ 2\theta$]: 8.0, 15.9, 20.0, 24.0, 25.0, 28.3, 23.7

Kalium-(RS)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2991/2972 (w, C-H), 1586 (s, C=O), 1472/1451/1396 (m, COO, C-H₃), 1240 (m, C-O), 1096 (m, C-OH), 1069 (w), 873 (w) - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =1.7 (d, J =7.0

Hz, 3 H, CH₃), $\delta=4.5$ (q, $J=7.0$ Hz, 1 H, CH). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: $\delta=22.15$ (s, CH₃), $\delta=57.41$ (s, CH), $\delta=178.07$ (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak: Onsettemperatur 142.2 °C, $\Delta_r H_m = -32.4$ kJ mol⁻¹ - EA: theor. 24.58 %, H 2.75 %; gefunden C 23.43 %, H 2.94 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 7.6, 15.7, 26.3, 30.3, 31.5

Lithium-(S)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm⁻¹]: 2989/2943 (w, C-H), 1600 (s, C=O), 1454/1423/1368 (m, COO, C-H₃), 1277/1230 (m, C-O), 1082 (m, C-OH), 991 (w), 890 (w) - ¹H NMR [200 MHz, D₂O] [ppm]: $\delta=1.6$ (d, 3 H, CH₃), $\delta=4.4$ (q, 1 H, CH). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: $\delta=22.2$ (s, CH₃), $\delta=57.5$ (s, CH), $\delta=178.2$ (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: endothermes Schmelzsignal gefolgt von exothermer Zersetzung: Onsettemperatur 177.3 °C. - EA: theor. C 31.48 %, H 3.52 %; gefunden C 31.20 %, H 4.82 %.- XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 8.8, 17.6, 25.4, 26.4, 29.1, 32.3, 44.9

Natrium-(S)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm⁻¹]: 2990/2935 (w, C-H), 1605 (s, C=O), 1455/1404/1365 (m, COO, C-H₃), 1269/1245 (m, C-O), 1076 (m, C-OH), 985 (w), 881 (w) - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: $\delta=1.7$ (d, 3 H, CH₃), $\delta=4.5$ (q, 1 H, CH). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: $\delta=22.0$ (s, CH₃), $\delta=58.0$ (s, CH), $\delta=178.0$ (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak: Onsettemperatur 168.9 °C, $\Delta_r H_m = -26.7$ kJ mol⁻¹ - EA: theor. C 27.61 %, H 3.09 %; gefunden C 27.33 %, H 3.64 %. - $\alpha_D^{25} = +3.2^\circ$ ($l=10$ cm, $c=10$ mg mL⁻¹ H₂O) - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 8.0, 15.9, 20.0, 24.0, 25.0, 28.3, 23.7

Kalium-(S)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm⁻¹]: 2990/2973/2950 (w, C-H), 1587 (s, C=O), 1469/1395/1362 (m, COO, C-H₃), 1238 (m, C-O), 1095 (m, C-OH), 1070 (w), 997 (w), 873 (w) - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: $\delta=1.7$ (d, $J=7.1$ Hz, 3 H, CH₃), $\delta=4.5$ (q, $J=7.1$ Hz, 1 H, CH). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: $\delta=22.23$ (s, CH₃), $\delta=57.56$ (s, CH), $\delta=178.28$ (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak: Onsettemperatur 146.0 °C, $\Delta_r H_m = -35.9$ kJ mol⁻¹ - EA: theor. C 24.58 %, H 2.75 %; gefunden C 24.42 %, H 2.84 %. - $\alpha_D^{25} = +2.8^\circ$ ($l=10$ cm, $c=10$ mg mL⁻¹ H₂O) - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 7.9, 15.7, 31.7, 36.7, 57.3

Lithiumchloracetat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 3007/2955 (w, C-H), 1610 (s, C=O), 1433/1399 (m, COO, C-H₃), 1263 (m, C-O), 945 (w), 788 (w). - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =3.9 (s, 2 H, CH₂) - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =43.69 (s, CH₂), δ =181.3 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: endothermes Schmelzsignal geht über in exotherme Zersetzung: Onsettemperatur 209.3 °C. - EA: theor. C 23.92 %, H 2.01 %; gefunden C 23.59 %, H 2.48 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in $^{\circ}2\theta$]: 9.3, 19.6, 26.4, 28.2, 38.3

Natriumchloracetat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 3007/2972 (w, C-H), 1602 (s, C=O), 1420/1399 (m, COO, C-H₃), 1258/1249 (m, C-O), 933 (w), 771 (w). - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =3.9 (s, 2 H, CH₂) - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =43.69 (s, CH₂), δ =176.4 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak: Onsettemperatur 202.0 °C, $\Delta_{\text{r}}H_{\text{m}} = -24.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ - EA: theor. C 20.62 %, H 1.73 %; gefunden C 20.59 %, H 1.78 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in $^{\circ}2\theta$]: 8.3, 16.4, 29.9, 33.2, 41.9

Kaliumchloracetat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2991/2963 (w, C-H), 1607 (s, C=O), 1401/1340 (m, COO, C-H₃), 1248 (m, C-O), 933 (w), 920 (w), 768 (w). - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =3.9 (s, 2 H, CH₂) - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =43.69 (s, CH₂), δ =174.79 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak Onsettemperatur 185.1 °C, $\Delta_{\text{r}}H_{\text{m}} = -35.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ - EA: theor. C 18.12 %, H 1.52 %; gefunden C 18.10 %, H 1.58 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in $^{\circ}2\theta$]: 8.6, 17.1, 22.9, 25.7, 29.9, 34.4

Lithium-(RS)-2-brom-3-methylbutyrat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2964/2828 (w, C-H), 1610 (s, C=O), 1469/1403 (m, COO, C-H₃), 729 (w), 684 (w) - ¹H NMR (400 MHz, D₂O) [ppm]: δ =1.1 (m, 6 H, 2 CH₃), δ =2.2 (m, 1 H, CH), δ =4.1 (d, 1 H, CHBr). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =20.2 (s, 2 CH₃), δ =33.7 (s, CH), δ =63.2 (s, CHBr), δ =172.1 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: endothermes Signal Onsettemperatur 173.7 °C, $\Delta H = +1.8 \text{ kJ mol}^{-1}$, Schmelzsignal Onsettemperatur 219.3 °C, $\Delta_{\text{fus}}H_{\text{m}} = +33.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, exotherme Zersetzung Onsettemperatur 261.3 °C, $\Delta H = -18.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ - EA: theor. C 32.1 %, H 4.3 %; gefunden C 31.9 %, H 4.39 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in $^{\circ}2\theta$]: 19.2, 21.2, 28.5, 31.5

Natrium-(RS)-2-brom-3-methylbutyrat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2959/2871 (w, C-H), 1614 (s, C=O), 1457/1394 (m, COO, C-H₃), 717 (w), 671 (w) - ¹H NMR (400 MHz, D₂O) [ppm]: δ =0.8 (m, 6 H, 2 CH₃), δ =1.9 (m, 1 H, CH), δ =3.9 (d, 1 H, CHBr),. - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =20.1 (s, 2 CH₃), δ =33.5 (s, CH), δ =63.1 (s, CHBr), δ =178.5 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]:]: exothermer Reaktionpeak Onsettemperatur 167.0 °C, $\Delta_r H_m = -28.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ - EA: theor. C 29.60 %, H 3.90 %; gefunden C 26.5 %, H 4.48 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 Θ]: 7.0, 13.0, 19.9, 21.7, 22.2, 23.8, 26.2, 27.1, 29.3, 30.2

Natrium-(S)-2-brom-3-methylbutyrat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2931/2875 (w, C-H), 1580 (s, C=O), 1459/1403 (m, COO, C-H₃), 680 (w) - ¹H NMR (400 MHz, D₂O) [ppm]: δ =0.7 (m, 6 H, 2 CH₃), δ =1.8 (m, 1 H, CH), δ =3.9 (d, 1 H, CHBr),. - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =20.0 (s, 2 CH₃), δ =33.2 (s, CH), δ =63.3 (s, CHBr), δ =178.3 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]:]: exothermer Reaktionpeak Onsettemperatur 147.6 °C, $\Delta_r H_m = -19.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ - EA: theor. C 29.60 %, H 3.90 %; gefunden C 27.2 %, H 4.37 %.

Zinkchloracetat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 3013/2955 (w, C-H), 1605 (s, C=O), 1407/1390 (m, COO, C-H₃), 1246 (m, C-O), 1173 (w), 938 (w), 979 (w), 690 (w). - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =4.0 (s, 2 H, CH₂) - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =43.14 (s, CH₂), δ =174.62 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: endothermes Schmelzsignal geht über in exotherme Zersetzung: Onsettemperatur 209.3 °C - EA: theor. C 21.04 %, H 1.77 %; gefunden C 20.64 %, H 1.58 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 Θ]: 8.9, 13.5, 20.6, 24.4, 28.2, 30.4, 36.2

Zink-(RS)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2991/2937 (w, C-H), 1625/1564 (s, C=O), 1454/1409/1367 (m, COO, C-H₃), 1283/1241 (m, C-O), 1075 (m, C-OH), 986 (w), 891 (w), 723 (s) - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =1.3 (d, 3 H, CH₃), δ =4.2 (q, 1 H, CH). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =22.12 (s, CH₃), δ =57.39 (s, CH), δ =179.2 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: endothermes Schmelzsignal geht über in exotherme Zersetzung: Onsettemperatur 161.0 °C. - EA: theor. C 25.70 %, H 2.88 %; gefunden C 25.22 %, H 3.04 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 Θ]: 7.9, 15.9, 20.3, 28.6

Zink-(S)-2-chlorpropionat

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2990/2937 (w, C-H), 1629 (s, C=O), 1452/1403/1367 (m, COO, C-H₃), 1281/1242 (m, C-O), 1075 (m, C-OH), 986 (w), 913 (w), 715 (w) - ¹H NMR (200 MHz, D₂O) [ppm]: δ =1.3 (d, 3 H, CH₃), δ =4.1 (q, 1 H, CH). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =22.19 (s, CH₃), δ =57.42 (s, CH), δ =177.6 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹ endothermes Schmelzsignal geht über in exotherme Zersetzung: Onsettemperatur 163.8 °C. - EA: theor. C 25.70 %, H 2.88 %; gefunden C 26.12 %, H 2.92 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 9.3, 10.1, 14.2, 20.2, 20.3, 21.9, 24.0, 24.8, 31.0

Lithium-2-brommethacrylsäure

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2995 (w, C-H), 1639/1556 (s, C=O), 1456/1417 (m, COO, C-H₃), 1386/1332 (m, C-O), 1162 (m, C-OH), 958 (w), 841 (w) - ¹H NMR (400 MHz, D₂O) [ppm]: δ =3.3 (m, 6 H, 2 CH₃), δ =4.6 (m, 1 H, CH), δ =4.8 (d, 1 H, CHBr). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =32.0 (s, CH₂Br), δ =122.7 (s, CH₂), δ =144.3 (s, C-COO), δ =171.5 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹ endothermes Schmelzsignal gefolgt von exothermer Zersetzung: Onsettemperatur 175.3 °C. - EA: theor. C 28.11 %, H 2.36 %; gefunden C 29.3 %, H 2.19 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: -

Natrium-2-brommethacrylsäure

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2978/2958 (w, C-H), 1637/1558 (s, C=O), 1431/1408 (m, COO, C-H₃), 1377/1255/1218 (m, C-O), 961 (w), 843 (w), 726 (w) - ¹H NMR (400 MHz, MeOD) [ppm]: δ =3.6 (s, 2 H, CH₂Br), δ =4.6 (s, 1 H, CH_B), δ =4.7 (s, 1 H, CH_A). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =32.0 (s, CH₂Br), δ =122.8 (s, CH₂), δ =144.3 (s, C-COO), δ =171.7 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak Onsettemperatur 105.8 °C, $\Delta_r H_m$ = -37.4 kJ mol⁻¹ - EA: theor. C 25.7 %, H 2.10 %; gefunden C 23.7 %, H 2.46 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 6.7, 8.5, 10.1, 25.8, 30.0, 42.8, 50.7, 53.2

Kalium-2-brommethacrylsäure

IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2920 (w, C-H), 1640/1589 (s, C=O), 1430/1401 (m, COO, C-H₃), 598 (w) - ¹H NMR (400 MHz, D₂O) [ppm]: δ =3.7 (s, 2 H, CH₂Br), δ =4.5 (s, 1 H, CH_B), δ =4.8 (s, 1 H, CH_A). - ¹³C NMR (50.28 MHz, D₂O) [ppm]: δ =32.7 (s, CH₂Br), δ =123.1 (s, CH₂), δ =142.8 (s, C-COO), δ =172.4 (s, COO). - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: exothermer Reaktionpeak Onsettemperatur 99.4 °C, $\Delta_r H_m$ = -34.9 kJ mol⁻¹ - EA: theor. C 23.6 %, H 2.00 %; gefunden C 23.6 %, H 2.26 %. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 24.3, 28.4, 39.4, 48.5

C Degradationsstudien an Polyestersystemen

C.I Analyse des Abbauverhaltens von Formkörpern aus PLGA

C.I.I Grundlagen

Die wichtigste Eigenschaft bioresorbierbarer Polymere ist ihr Degradationsvermögen. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von Bindungen innerhalb der Polymerkette, deren chemische Spaltung über Oligomere schließlich zu den Monomeren führt. Dieser Prozess der zur Verringerung der mittleren Molmasse führt, wird in der Literatur als Degradation definiert. Die fortschreitende Degradation führt zur Abnahme der mechanischen Stabilität und schließlich zur Fragmentierung des Polymers. Der nach der Fragmentierung des Polymers einsetzende Massenverlust wird als Erosion bezeichnet und beruht auf dem Austrag löslicher Abbauprodukte. In **Abbildung C.1** ist die zeitliche Abfolge von Degradation und Erosion schematisch dargestellt.^[82]

Man unterscheidet zwischen zwei prinzipiellen Mechanismen der Bindungsspaltung, die zum

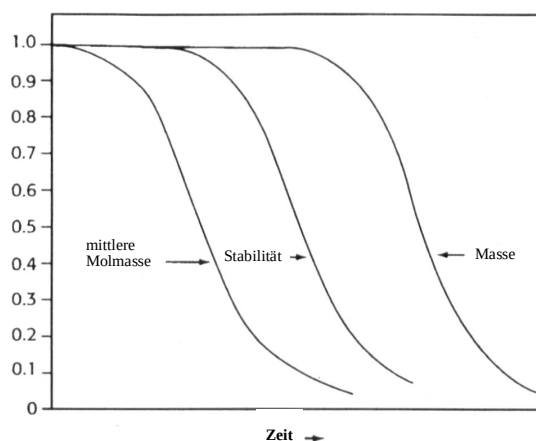


Abbildung C.1: Auswirkungen der Degradation auf die mittlere Molmasse, Stabilität und Masse eines Formkörpers nach Pietrzak et al.^[82]

Kettenabbau führen: Der passiven Spaltung durch Hydrolyse und der aktiven enzymatischen Spaltung. Es ist seit einiger Zeit allgemein akzeptiert, dass die Degradation von Polyglykolid und Polylactid in wässrigem Medium durch eine ungerichtete Hydrolyse der Esterbindung erfolgt und die Reaktion durch die hierbei entstehenden Abbauprodukte katalysiert wird.^{[83],[84]} Der Abbau *in vivo* beruht ebenfalls weitgehend auf einer ungerichteten, hydrolytischen Kettenspaltung und nur im letzten Stadium der Degradation kann eine

zelluläre Interaktion beobachtet werden^[85] Einige Studien führen dies auf Enzyme^[86] und eine gesteigerte zelluläre Aktivität zurück. Aber auch lokale pH-Wert Absenkungen im angrenzenden

^[82] W.S. Pietrzak, B.S. Verstynen D.R. Sarver, Bioabsorbable fixation devices: status for the Craniomaxillofacial surgeon, *J. Craniofacial Surg.* **1997**, 2, 92-96

^[83] K.R. Huffman, D.J. Casey, Effects of carboxylic endgroups on hydrolysis of polyglycolic acid, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1985**, 23, 1939-1954

^[84] C.C. Chu, The effect of pH on the in vitro degradation of poly(glycolide-lactide) copolymer absorbable sutures, *J. Biomed. Mater. Res.* **1982**, 16, 117-124

^[85] M. Vert, G. Schwarch, J. Coudane, Present and Future of PLA Polymers, *Pure Appl. Chem.* **1995**, A32 (4), 787-796

^[86] M. Vert, S. Li, G. Spenlehauer, P. Guérin, Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1992**, 3, 432-446

Gewebe durch aktivierte Makrophagen,^[87] unterhalb des physiologischen Bereiches um pH 7.4, werden diskutiert. Die höheren Polyester wie Poly-3-hydroxybuttersäure und Poly-3-hydroxyvaleriansäure zeigen hingegen eine deutliche Abhängigkeit gegenüber extrazellulären Depolymerasen,^[88] Sie dienen vielen Pilzen und Bakterien als Kohlenstoffvorrat. So verfügt z. B. das Bakterium *A. faecalis* über zwei spezielle Esterasen, die 3-PHB Depolymerase und einer Oligomer Hydrolase, um 3-PHB metabolisieren zu können.^[89]

Generell ist die Degradation von Formkörpern aus Polyhydroxycarbonsäuren ein komplexer Prozess und wird von vielen Faktoren beeinflusst. Die chemische Zusammensetzung des Polymers ist hierbei eines der wichtigsten Kriterien. Je nach Monomerart lassen sich aufgrund

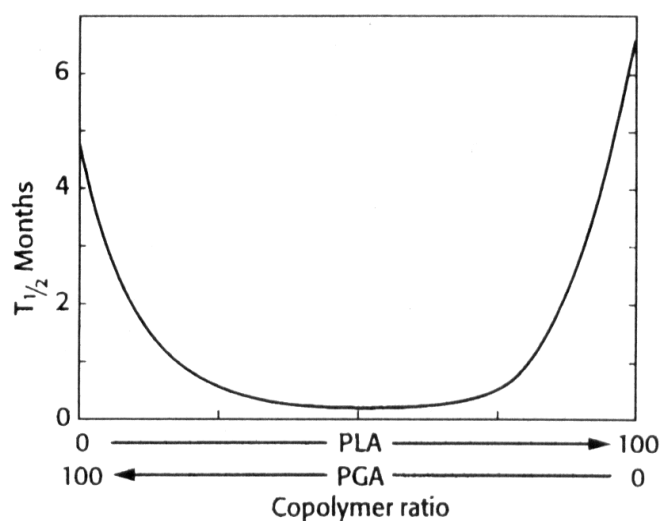


Abbildung C.2: Halbwertszeiten der *in vivo* Degradation von PLGA Implantaten in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung nach Goupil^[95]

der unterschiedlich stark ausgeprägten Interaktion mit Wasser verschieden schnell degradierbare Polymere darstellen. So baut sich Polyglykolid in ca. 3-9 Monaten^[90] relativ schnell ab, während für den vollständigen Abbau von Poly(DL-lactid) 1-1½ Jahre und für Poly(L-lactid) ca. 2-4 Jahren benötigt werden.^[91] Die höheren Polyhydroxycarbonsäuren zeigen sich hier aufgrund ihrer hydrophoben Natur deutlich resistenter gegenüber dem Eindringen von Wasser und benötigen deutlich länger, um vollständig abgebaut

zu werden. Holland *et al.* ermittelten für P(3-HB) *in vitro* (pH 7.4 und 37 °C) einen Massenverlust von 1 %, innerhalb von 200 Tagen.^[92] Der Einfluss der chemischen Zusammensetzung wird besonders deutlich bei der Einführung eines zweiten Monomers in die Polymerkette. So zeigt das Copolymer Poly(lactid-co-glycolid) eine Beschleunigung der

^[87] C.M. Black, M. Paliesscheskey, B.L. Beaman, R.M. Donovan, E. Goldstein, Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by Nocardia asteroides, *J. Infect. Dis.* **1986**, 154 (6), 952-958

^[88] Y. Doi, K. Kamagai, N. Tanahashi, K. Mukai, *Biodegradable Polymers and Plastics*, Royal Society of Chemistry (Hrsg.: M. Vert, J. Feijen, A.C. Albertsson, G. Scott, E. Chiellini), Cambridge, **1992**, S. 139

^[89] T. Tanio, T. Fukui, Y. Shirakura, T. Saito, K. Tomita, T. Kaio, S. Masamune, An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 124, 71-77

^[90] N. Ashammakhi, P. Rokkanen, Absorbable polyglycolide devices in trauma and bone surgery, *Biomaterials*, **1997**, 18, 3-9

^[91] A.S. Koelling, N.J. Ballintyn, A. Salehi, D.J. Darden, M.E. Taylor, J. Varnavas, D.R. Melton, in vitro real-time aging and characterization of poly(L/D,L-lactic acid), *Proceedings of the Sixteenth Biomedical Engineering Conference*, **1997**, 197-201

^[92] S.J. Holland, A. Jolly, M. Yasin, B.J. Tighe, *Biomaterials* **1985**, 8, 289-295

Degradation mit zunehmendem Glykolsäureanteil.^{[93],[94]} Der Einfluss der Zusammensetzung auf die Degradationsgeschwindigkeit von PLGA-Copolymeren ist in **Abbildung C.2** schematisch wiedergegeben.^[95] Die Einführung eines zweiten Monomers führt hierbei zu einer drastischen Änderung der physikalischen Eigenschaften wie z. B. der Kristallinität. So sind alle Copolymere vom Typ Poly(L-lactid-co-glycolid) mit einem Glykolsäure-Anteil von 25-70 mol% vollständig amorph. Bei der Verwendung des DL-Lactids vergrößert sich dieser Bereich sogar auf 0–70 mol %.^[96] Die Kristallinität beeinflusst ihrerseits die Degradationsgeschwindigkeit, da der Degradationsprozess in den amorphen Bereichen durch eine beschleunigte Diffusion von Wasser begünstigt wird. Eine Verringerung der Kristallinität führt somit zu einer Beschleunigung der Degradation.

Der bevorzugte Abbau der amorphen Domänen im Polymer führt im Verlauf der Degradation zu einer Zunahme der Kristallinität des Polymers. Schreitet die Degradation weiter voran und nimmt die Stabilität ab, so kann es zur Erosion von kristallinen Polymerfragmenten kommen. In einer *in vivo* Studie konnten Winet *et al.* nachweisen, dass solche PLGA-Partikel die Fresszellen des Immunsystems aktivieren (Makrophagenstimulation) und somit zu einer Immunreaktion führen können (Phagozytose).^[97] Inwieweit es sich hierbei um eine generelle Folgereaktion auf erodierte Polymerpartikel handelt und ob eine Korrelation mit der Größe der Partikel besteht, ist noch unklar. Nach Steinman *et al.* gibt es Anzeichen dafür, dass Makrophagen nur Partikel aufnehmen, die größer 0.5 µm sind.^[98] Rozema *et al.* berichten, dass es eine kritische Größe von < 10 µm für solche Partikel gibt, unterhalb derer es zu einer chronischen Stimulation der Makrophagen kommt.^[99] Der Einfluss der Kristallinität auf die Abbaugeschwindigkeit zeigt sich besonders deutlich in den unterschiedlichen Zeiträumen, die für den vollständigen Abbau von amorphen Poly(DL-lactid) und dem teilkristallinen Poly(L-lactid) im wässrigen Medium benötigt werden.

^[93] R. Miller, J. Brady, D. Cutright, Degradation rates of oral resorbable implants (polyacetates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/-GA copolymer ratios, *J. Biomed. Mater. Res.* **1977**, *11*, 711-719

^[94] S. M. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relations in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxyacids) in aqueous media, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1990**, *1*, 131-139

^[95] D. Goupil, Sutures, *Biomaterials science* (Hrsg.: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons), New York Academic Press, **1996**, S. 356-360

^[96] D.K. Gilding, A.M. Reed, Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1, *Polymer* **1979**, *20*, 1459-1464

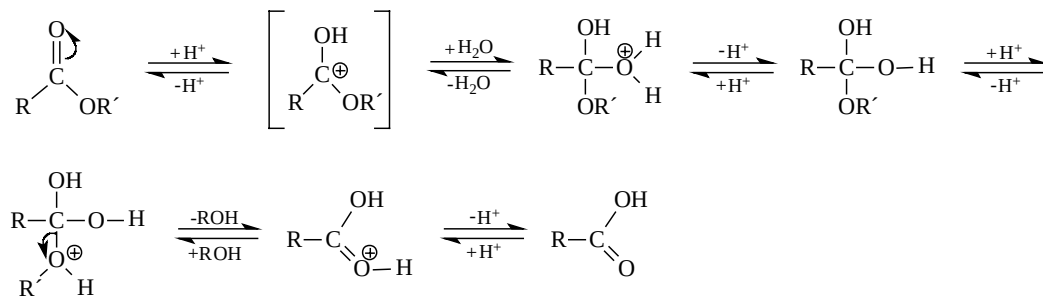
^[97] H. Winet, J.Y. Bao, Comparative bone healing near eroding polylactide-polyglycolide implants of differing crystallinity in rabbit tibial bone chamber, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **1997**, *8* (7), 517-532

^[98] R.M. Steinman, I.S. Mellman, W.A. Muller, Z.A. Cohn, Endocytosis and the recycling of plasma membrane, *J. Cell. Biol.* **1983**, *96*, 1-27

^[99] F.R. Rozema, J.E. Bergsma, R.R.M. Bos, G. Boehring, A.J. Nijenhuis, A.J. Pennings, W.C. De Bruin, Late degradation simulation of poly(L-lactide), *J. Mater. Science: Mater. Med.* **1994**, *5*, 575

Einen weiteren wichtigen Einflussfaktor auf die Abbaugeschwindigkeit von Polyestern, stellt der pH-Wert des umgebenden Mediums dar. Die Geschwindigkeit der Esterhydrolyse zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Mediums, da sowohl H^+ - als auch OH^- -Ionen einen katalytischen Einfluss auf die Reaktion ausüben (vgl. **Abbildung C.3**).^[100] *In vitro* Untersuchungen an Nahtmaterialien aus Polyglykolid und Poly(lactid-co-glykolid) belegen, dass die Degradationsgeschwindigkeit bei pH 7 ihren geringsten Wert erreicht und sowohl bei niedrigeren als auch höheren pH-Werten deutlich beschleunigt wird.^[101]

Säurekatalysierte Esterspaltung:



Basenkatalysierte Esterspaltung:

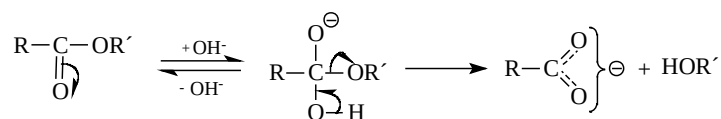


Abbildung C.3: Mechanismen der säuren- bzw. basenkatalysierten Polyesterhydrolyse

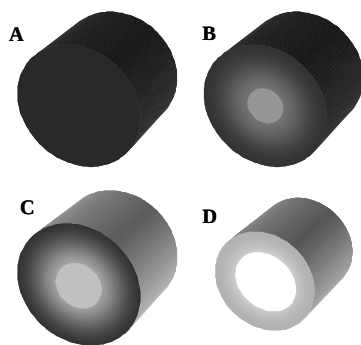


Abbildung C.4: Schematische Darstellung eines heterogenen Degradationsmechanismus

Dieser Umstand erklärt auch den von sauren Abbauprodukten hervorgerufenen Effekt der Autokatalyse. Hierbei beschleunigen die während der Degradation frei gesetzten löslichen sauren Abbauprodukte den Degradationsprozess. Weiterhin konnte eine pH-Wert-Abhängigkeit der Wasseraufnahme von Poly(D,L-lactid) beobachtet werden. Im neutral gepufferten Medium führen der erhöhte osmotische Druck und das Bestreben des Puffers, saure Carboxylat-Endgruppen zu neutralisieren, zu einer verstärkten Diffusion

^[100] C.H. Holten, *Lactic Acid: Properties and Chemistry of Lactic Acid and Its Derivates*, Verlag Chemie, Berlin, **1971**

^[101] C.C. Chu, A comparison of the effect of pH on the biodegradation of two synthetic absorbable sutures, *Arch. Surg.* **1982**, 195, 55-59

von Wasser in das Polymer und somit zu einer Beschleunigung der Degradation.^[102]

Ein Einfluss der Form und Größe eines Körpers auf den Degradationsmechanismus konnte erstmals 1990 von Vert *et al.* an Formkörpern aus Poly(DL-lactid) beobachtet werden. Dieser als "bulk" oder heterogene Degradation bezeichnete Mechanismus ist typisch für größere Formkörper

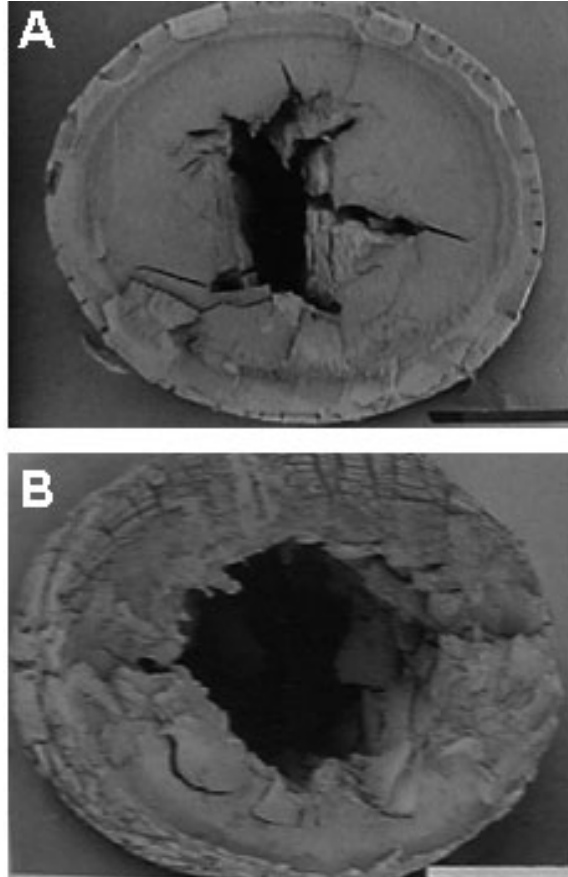


Abbildung C.5: Aufnahmen von Formkörpern aus Poly(DL-lactid) nach 3 (A) und 6 (B) Monaten Degradation *in vitro*, nach Gogolewski *et al.*^[104]

aus Polyhydroxycarbonsäuren.^[103] Kennzeichen eines bulk-Mechanismus ist die signifikant schnellere Degradation im Inneren des Formkörpers, schematisch dargestellt in **Abbildung C.4**. Im ersten Stadium dringt hierbei Wasser in den Körper ein. Dies führt zu einer Spaltung der Esterbindungen und zur Bildung von Carboxylat-Endgruppen. Diese sauren Endgruppen katalysieren im weiteren Verlauf die Esterspaltung. In den Randbereichen des Formkörpers, die im direkten Kontakt mit dem umgebenden Medium stehen, ist ein Austrag von löslichen Oligomeren möglich. Im Inneren des Körpers ist dies nicht mehr möglich, so dass sich immer mehr saure Abbauprodukte ansammeln. Diese beschleunigen die Kettenspaltung immer stärker, so dass sich die Struktur im Körperinneren auflöst und sich ein mit flüssigen Abbauprodukten gefüllter Hohlraum bildet (siehe

Abb. C.5). Der Verlust der strukturellen Integrität führt schließlich zu einem plötzlichen Austrag der Degradationsprodukte (*burst*).

Inwieweit die Verarbeitungsmethoden wie Schmelzpressen oder Spritzgießen einen Einfluss auf den Degradationsmechanismus ausüben, ist nicht abschließend geklärt. Gogolewski *et al.* führen die beschleunigte innere Degradation auf eine Kettenausrichtung der äußeren Randschichten während der Verarbeitung zurück.^[104] Generell lässt sich ein heterogener Degradationsmechanismus an solchen Polymeren beobachten, bei denen die Diffusion von Wasser in das

^[102] S. Li, S. McCarthy, Further investigations on the hydrolytic degradation poly(DL-lactide), *Biomaterials*, **1999**, 20, 35-44

^[103] S.M. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationship in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. part 1: poly(DL-lactic acid), *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1990**, 1, 123-130

^[104] P. Mainil-Varlet, R. Curtis, S. Gogolewski, Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 36, 360-380

Polymer schneller erfolgt als die Bildung löslicher Abbauprodukte, wie z. B. Polyglykolid und Polylactid. Erfolgt die Diffusion von Wasser in die Polymerstruktur langsamer als die Konversion in lösliche Oligomere so wird ein homogener bzw. *surface erosion*-Mechanismus beobachtet. Dies ist immer der Fall, wenn das Polymer einen stark hydrophoben Charakter hat, die chemischen Bindungen zwischen den Monomereinheiten aber sehr hydrolyseempfindlich reagieren, wie beispielsweise bei Polyanhydriden und Polyorthoestern.^[105] Im Verlauf einer homogenen Degradation verliert der Formkörper durch einen Materialaustrag an der Oberfläche an Größe. Seine Geometrie und innere Struktur bleiben jedoch weitgehend erhalten.

Die heterogene Degradation von Implantaten aus PGA, PLA und Copolymeren bietet eine Erklärung für die beobachteten Unverträglichkeiten und Entzündungen von Implantaten aus Polyglykolid/Polylactid. Der massive Austrag führt dazu, dass der pH-Wert im umgebenden



Abbildung C.6: Röntgenaufnahme einer Osteolyse am Schafsknie nach Refixation eines Knochenfragments mit PGA und PLLA-Stiften nach R. Hoffmann *et al.*^[107]

Gewebe unter den für die Zellfunktion notwendigen physiologischen Wert von 7.4 ± 0.2 pH fällt.^[106] Dies kann im Bereich des Implantates zu Gewebereaktionen führen, wenn kein Austausch mit zirkulierenden Körperflüssigkeiten erfolgt. Eine solche lokale Übersäuerung (Acidose) führt, je nach Dauer, bis zur irreversiblen Schädigung der Zellfunktionen und somit zum Absterben des Gewebes (Nekrose). Handelt es sich bei dem umgebenden Gewebe um Knochen z. B. bei der Frakturfixation, so kann ein dauerhaft erniedrigter pH-Wert das Gewebe schädigen und den

mineralischen Knochenanteil auflösen. Die Knochenstruktur um das Implantat wird geschwächt und eine Osteolyse ist die Folge, dargestellt in **Abbildung C.6.**^[107] Klinische Untersuchungen ergaben, dass solche Reaktionen bei bis zu 50 % der mit Polyglykolid-Implantaten behandelten Patienten auftreten können.^{[108],[109]} Anhand von Radiographien ließ sich jedoch belegen, dass die Osteolyse nur ein vorübergehendes Phänomen während des Heilungsprozesses darstellt und sich

^[105] J. Kohn, R. Langer, Bioresorbable and bioerodible materials, *Biomaterials science* (Hrsg.: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons), New York Academic Press, **1996**, S. 64-72

^[106] C. M. Agrawal, K.A. Athanasiou, Technique to Control pH in Vicinity of Biodegrading PLA-PGA Implants, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* **1997**, 38, 105-114

^[107] R. Hoffmann, A. Weiler, H.J. Helling, C. Krettek, K.E. Rehm, Lokale Fremdkörperreaktionen auf biodegradierbare Implantate. Eine Klassifikation., *Unfallchirurg* **1997**, 100, 658-666

^[108] O.M. Böstman, Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants, *J. Bone Jt. Surg.* **1991**, 73, 679-682

^[109] R.K. Fraser W.G. Cole, Osteolysis after biodegradable pin fixation of fractures in children, *J. Bone Jt. Surg.* **1992**, 74, 929-930

die Knochenstruktur innerhalb eines Jahres nach der Behandlung wieder vollständig regeneriert.^[110]

Der Einfluss der Morphologie auf den Degradationsmechanismus zeigt sich bei der Verwendung poröser Materialien. Athanasiou *et al.* berichteten 1998, dass poröse Formkörpern aus PDLGA 50/50 im Vergleich zu kompakten langsamer degradieren.^[111] Mikos *et al.* konnten ebenfalls durch die *in vitro* Degradation an porösen Körpern aus Poly(L-lactid) anhand von Messungen des Molekulargewichts nachweisen, dass die Degradation mit zunehmender Porosität der Körper verzögert wird.^[112] Die poröse Morphologie verhindert eine Akkumulation von Abbauprodukten im Inneren des Formkörpers. Eine Autokatalyse findet nur noch lokal in den Porenwänden statt. In den massiveren Porenwänden der weniger porösen Körper wird die Degradation erneut dadurch beschleunigt, dass die Diffusion von löslichen Abbauprodukte in die Lösung gehemmt ist. Durch eine weitere *in vitro* Studie an Filmen unterschiedlicher Schichtdicke aus Poly(DL-lactid-co-glykolid), ließen sich diese Aussagen belegen. Es zeigte sich auch in diesem Fall eine Steigerung der Degradationsgeschwindigkeit mit der Schichtdicke der Filme.^[113] Durch die Verwendung poröser Implantate wird somit nicht nur die Menge des zu resorbierenden Materials deutlich verringert, sondern zudem eine kontinuierliche Abgabe von löslichen Abbauprodukten aus dem Implantat an die umgebenden Körperseren ermöglicht. Eine Akkumulation von Degradationsprodukten und somit eine Absenkung des lokalen pH-Wertes unter ein zelltoxisches Niveau läßt sich somit verhindern.

Die hier vorgestellte Studie hatte zum Ziel, das Abbauverhalten von Formkörpern aus festkörperchemisch hergestelltem PDLGA-Copolymer zu untersuchen. In Folge seiner Darstellungsart lassen sich Formkörper mit einer mikroporösen interkonnektierenden Porenstruktur präparieren. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Medizintechnik, z. B. als Knochenersatzmaterial, sollte diese Studie das Degradationsverhalten von Formkörpern aus diesem Material untersuchen. Um die Auswirkungen dieser speziellen Morphologie auf Degradationsverhalten beurteilen zu können, wurden sowohl poröse als auch kompakte Probenkörper hergestellt und vergleichend untersucht. Um zusätzlich Aussagen über den Einfluss des pH-Wertes auf die Abbaugeschwindigkeit treffen zu können, wurde das Verhalten beider Formkörperarten sowohl in Wasser als auch in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 analysiert. Die

^[110] O.M. Böstman, Osteoarthritis of the ankle after foreign-body reaction to absorbable pins and screws. A three-to nine-year follow-up study. *J. Bone Jt. Surg.* **1998**, *80*, 333-338

^[111] K. A. Athanasiou, J.B. Schmitz, C.M. Agrawal, The effect of porosity on degradation of PLA-PGA implants, *Tissue Engng* **1998**, *4*, 53-63

^[112] L. Lu, S.J. Peter, M.D. Lyman, H.-L. Lai, S.M. Leite, J.A. Tamada, J.P. Vacanti, R. Langer, A.G. Mikos, In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams, *Biomaterials* **2000**, *21*, 1595-1605

^[113] L.Lu, C.A. Garcia, A.G. Mikos, In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *46*, 236-244

Degradation in Wasser sollte einen Aufschluss über den Verlauf und das Ausmaß einer pH-Werniedrigung aufgrund der Freisetzung saurer Degradationsprodukte geben. Die Degradation in der Puffer-Lösung bei pH 7.4 und 37 °C simuliert eine Degradation unter physiologischen Bedingungen. Besonderes Augenmerk wurde auch auf die Auswirkungen der einzelnen Verarbeitungsschritte auf das Polymere während der Probenpräparation gerichtet.

C.I.II Präparative Arbeiten

Degradationsmedien

Als Degradationsmedien wurden in der folgenden Studie entionisiertes Wasser und ein Phosphat-Puffer ausgewählt. Anhand der Untersuchung in Wasser sollten die Auswirkungen einer freien pH-Wert-Entwicklung und deren Einfluss auf die Degradation dokumentiert werden (Autokatalyse). Da die Spaltung der Esterbindungen hauptsächlich auf eine ungerichtete Hydrolyse zurückzuführen ist, erlauben *in vitro* Degradationsstudien unter simulierten physiologischen Bedingungen (pH 7.4 und 37 °C) einen Rückschluss auf das Abbauverhalten *in vivo*, wie Gogolewski *et al.* durch vergleichende Studien nachweisen konnten.^[104] *In vitro* Untersuchungen zum generellen Abbauverhalten von Polymeren stellen somit gegenüber *in vivo* Studien eine Alternative dar und helfen, unnötige Tierversuche zu vermeiden. Um eine möglichst genaue Annäherung an physiologische Bedingungen zu erreichen, wurden im Laufe der Zeit unterschiedliche Medien entwickelt, die in ihrer chemischen Zusammensetzung die Gegebenheiten im Körper simulieren. Nahezu alle etablierten Medien beruhen auf Phosphat-Puffern. Hierzu gehören die reinen Phosphatpuffer-Lösungen wie z. B. Sörensen-Puffer und die gepufferten Salzlösungen „*phosphate buffered saline*“ (PBS), die mit Natriumchlorid auf eine physiologische Ionenstärke eingestellt werden. Um die Lösungen weiter an die physiologischen Bedingungen anzugleichen, enthalten einige Medien zusätzliche Salze wie etwa „*Earle's buffered saline solution*“ (EBBS), „*Gey's buffered saline solution*“ (GBSS) und „*Hank's buffered saline solution*“ (HBSS). Ein sehr bekanntes Medium stellt das von Kokubu *et al.* entwickelte „*simulated body fluid*“ (SBF) dar.^[114] In diesem Medium entsprechen Art und Konzentration der gelösten Salze weitgehend der Zusammensetzung im menschlichen Blutplasma. Da dieses Medium übersättigt ist, eignet es sich besonders, um Kristallisationsphänomene auf Biomaterialoberflächen zu simulieren. Weitere gängige Medientypen sind Zellkulturmedien wie z. B. „*minimum essential medium*“ (α -MEM).

^[114] T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, 24, 331-343

Da aus früheren Untersuchungen bekannt war, dass Polymerkörper aus festkörperchemisch hergestelltem PGA/PLGA während der Degradation sauer reagieren und nach kurzer Zeit in Wasser ein Absinken des pH-Wertes auf ca. 4 verursachen,^[115] wurde für diese Studie ein Hank's-Puffer mit erhöhter Pufferkapazität verwendet (siehe **Tabelle C.1**). Die verwendeten Medien (entionisiertes Wasser und modifizierter Hank's-Puffer) wurden wöchentlich gewechselt, um ein Überschreiten der Pufferkapazität auszuschließen. Um eine Kontamination durch Mikroorganismen zu vermeiden, wurden zusätzlich Antibiotika zur Lösung gegeben (Penicillin/Streptomycin; c = 1.0 vol.-%).

Tabelle C.1: Zusammensetzung des modifizierten Hank's-Puffers (HBSS)

Komponente	Salzkonzentration Hank's-Puffer [g l ⁻¹]	Salzkonzentration modifizierter Hank's-Puffer [g l ⁻¹]
Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O	0.090	11.88
KH ₂ PO ₄	0.060	9.080
NaCl	8.000	8.000
D-Glucose	1.000	1.000
KCl	0.400	0.400
CaCl ₂	0.140	0.140
MgCl · 6 H ₂ O	0.100	0.100
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.100	0.100

Probenpräparation

Um die Einflüsse der Morphologie und des pH-Wertes auf den Degradationsverlauf dokumentieren und die mechanischen Eigenschaften bestimmen zu können, wurden acht Kategorien von Formkörper-Medium-Kombinationen benötigt. Als Standard-Formkörper wurde eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Höhe von 5 mm ausgewählt. An diesem Formkörper sollten weitgehend alle physikalisch/-chemischen Untersuchungen durchgeführt werden. Zur Messung der mechanischen Eigenschaften des Polymers während der Degradation wurden in Anlehnung an internationale Normen zur Ermittlung von Druckfestigkeiten (ISO 604) zusätzlich Formkörper mit den Abmessungen 30 mm · 5 mm · 5 mm hergestellt. Hierbei wurde vorausgesetzt, dass der geringfügige Unterschied in der Form der Körper keinen Einfluss auf die Degradation ausübt. Diese Körper dienten auch zur Analyse am Raster-Elektronenmikroskop (REM).

^[115] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A.F. Schilling, M. Amling, J.M. Rueger, M. Eppler, Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 54,162-171

Um den Einfluss der Morphologie auf den Abbau des Polymers zu ermitteln, wurden von beiden Formen sowohl poröse als auch kompakte Körper hergestellt.

Zur Präparation der porösen Körper wurde das salzbeladene Polymer direkt nach der Reaktion mit einer Schmelzpresse verpresst. Das in den Körpern inkorporierte Natriumchlorid wurde anschließend drei Tage im Wasserbad bei 5 °C ausgewaschen. Zur Herstellung kompakter Körper wurde das Copolymer erst mit Wasser ausgewaschen, getrocknet und im Anschluß schmelzgepresst. Die unterschiedlichen Herstellungsmethoden sind in **Abbildung C.7** schematisch gezeigt. Die Elektronenmikroskopaufnahmen in **Abbildung C.8** zeigen den Unterschied in der Struktur von porösen (**Abb. C.8 A**) und kompakten Probekörpern (**Abb. C.8 B**) nach der Formgebung.

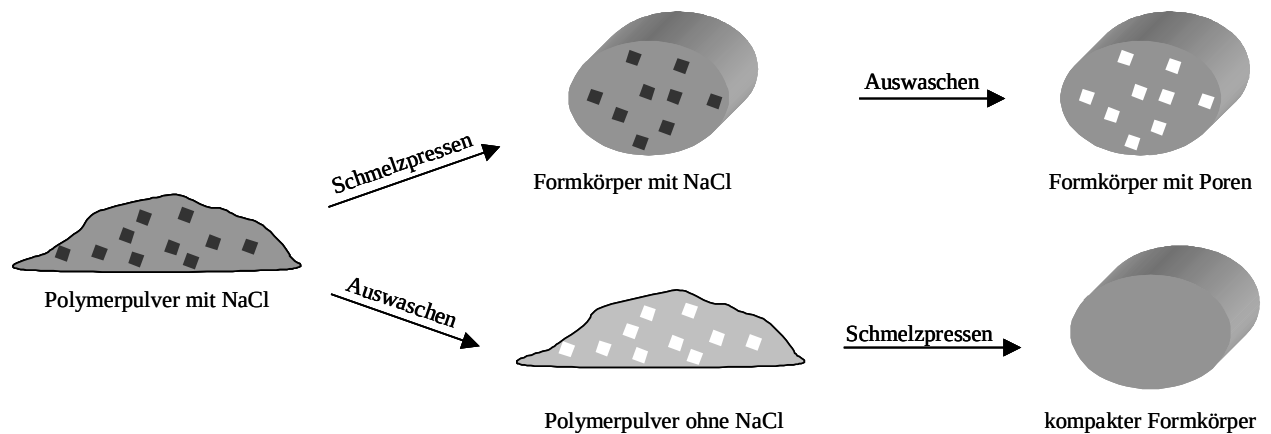


Abbildung C.7: Präparation von porösen und kompakten Formkörpern

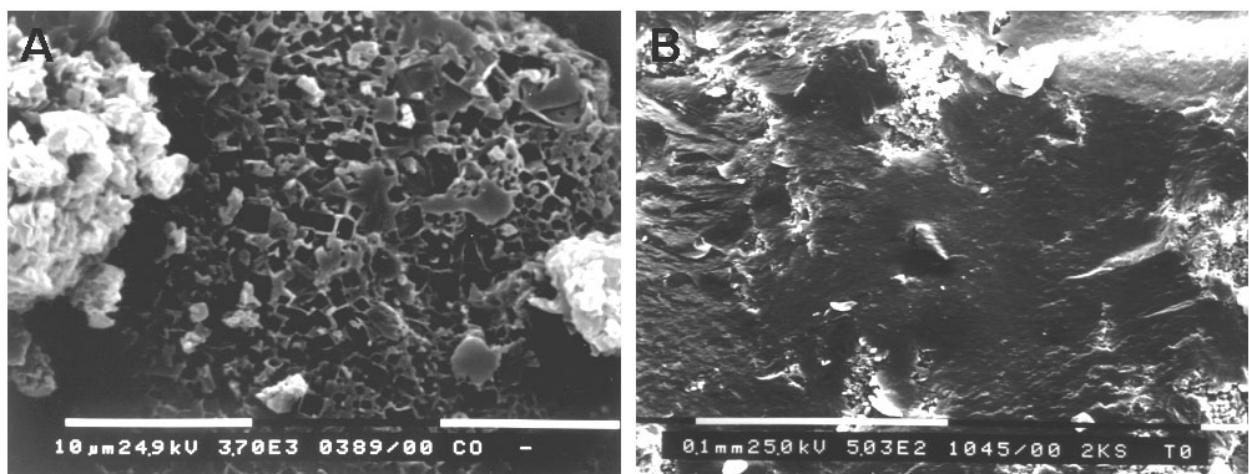


Abbildung C.8: Morphologie eines μ -porösen (A) und eines kompakten Formkörpers (B)

Da sich die Studie über einen Zeitraum von neun Wochen erstrecken sollte und innerhalb dieser Zeit eine Probenentnahme an 11 Zeitpunkten geplant war, wurden für die Studie insgesamt 88 Probenkörper benötigt. **Abbildung C.9** gibt einen Überblick über die Probenverteilung.

Die Proben wurden einzeln in verschließbare Polyethylengefäßen mit je 100 ml des jeweiligen Mediums eingebracht. Um einen homogenen Austausch mit dem Degradationsmedium zu gewährleisten, wurden die Proben in der Lösung auf etwas Glaswolle gelagert.

Die Probenentnahme erfolgte nach einem Tag und im anschließend in wöchentlichen Abständen. Zu jedem Messzeitpunkt wurde der pH-Wert der Lösung gemessen und der Zustand der Probenkörper photographisch dokumentiert. Zur weiteren Analyse wurde jeweils ein Formkörper entnommen und mit entionisiertem Wasser gewaschen.

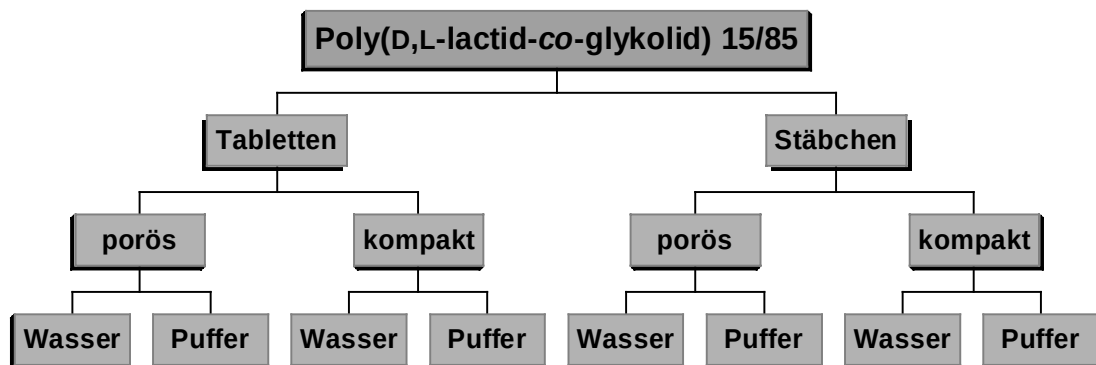


Abbildung C.9: Verwendungsschema der Probenkörper

Zur Untersuchung des Quellverhaltens und der Erosion mussten die Massen der feuchten und trockenen Körper bestimmt werden. Aus den für die Messung der mechanischen Eigenschaften vorgesehenen Körpern wurden Quader mit den Abmessungen 14 mm · 5 mm · 5 mm präpariert und Querschnittsproben zur Analyse am REM gewonnen (**Tabelle C.2**). Die zylindrischen Körper wurden fein gemörsert und die Kristallinität mittels DSC gemessen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der mittleren Kettenlänge durch Viskosimetrie.

Tabelle C.2: Aufstellung der verwendeten Untersuchungsmethoden

Formkörper	Methode	Aussage
Tabletten	Photos	Erosion (qualitativ), Fragmentierung
	pH-Messung	Degradationsmechanismus
	Massenbestimmung	Quellverhalten, Erosion (quantitativ)
	DSC	Kristallinität
	Viskosimetrie	Kettenlänge
Stäbchen	REM	Änderungen der Mikrostruktur
	Messung der Druckfestigkeit	Mechanische Eigenschaften

C.I.III Ergebnisse

Entwicklung der pH-Werte

In **Abbildung C.10** ist der Verlauf des pH-Wertes von Formkörpern mit poröser und kompakter Struktur in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Wasser aufgetragen. Beide Formkörperarten

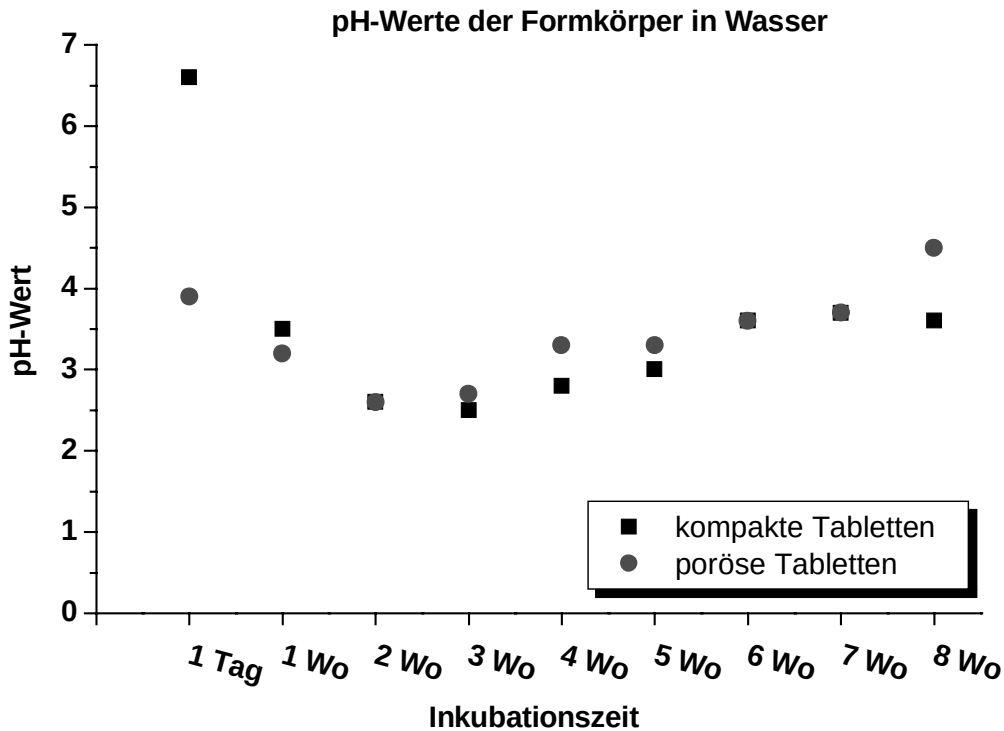


Abbildung C.10: Diagramm des pH-Verlaufs von kompakten und porösen Probekörpern in Wasser

zeigen eine rasche Absenkung des pH-Wertes. Nach einer Woche beträgt der pH-Wert 3.1 - 3.2, wobei die Absenkung der kompakten Proben zu Beginn der Messung etwas langsamer erfolgt. Im weiteren Verlauf der Inkubation gleichen sich die Werte der beiden Proben stark an und erreichen nach 2-3 Wochen mit 2.5 ihren tiefsten Wert. Hiernach folgt ein langsames Ansteigen der Werte, so dass nach acht Wochen ein pH-Wert um 4.0 erreicht wird. Der Anstieg der pH-Werte beruht auf dem Massenverlust durch Erosion und dem wöchentlichen Wechsel des Mediums. Lösliche saure Degradationsprodukte besonders aus den amorphen Bereichen werden somit ständig aus dem System entfernt und verringern somit die Gesamtmenge an Polymer. In der Folge führt dieses zu einem leichten Anstieg des pH-Wertes. Der pH-Wert der Proben im modifizierten Hank's-Puffer blieb wie vorgesehen im Verlauf der gesamten Studie unverändert bei pH 7.4.

Visuelle Untersuchungen des Degradationsmechanismus und der Formstabilität

Die folgenden Abbildungen (**Abb. C.11** und **C.12**) dokumentieren den Einfluss der Degradation auf die Geometrie der Probenkörper in Wasser und Medium anhand von Photographien. Auffällig ist die anhaltende Stabilität der Proben in Wasser. Erst nach acht Wochen ist ein Verlust der Struktur der kompakten Probenkörper durch Erosion von Fragmenten aus den Randbereichen festzustellen.

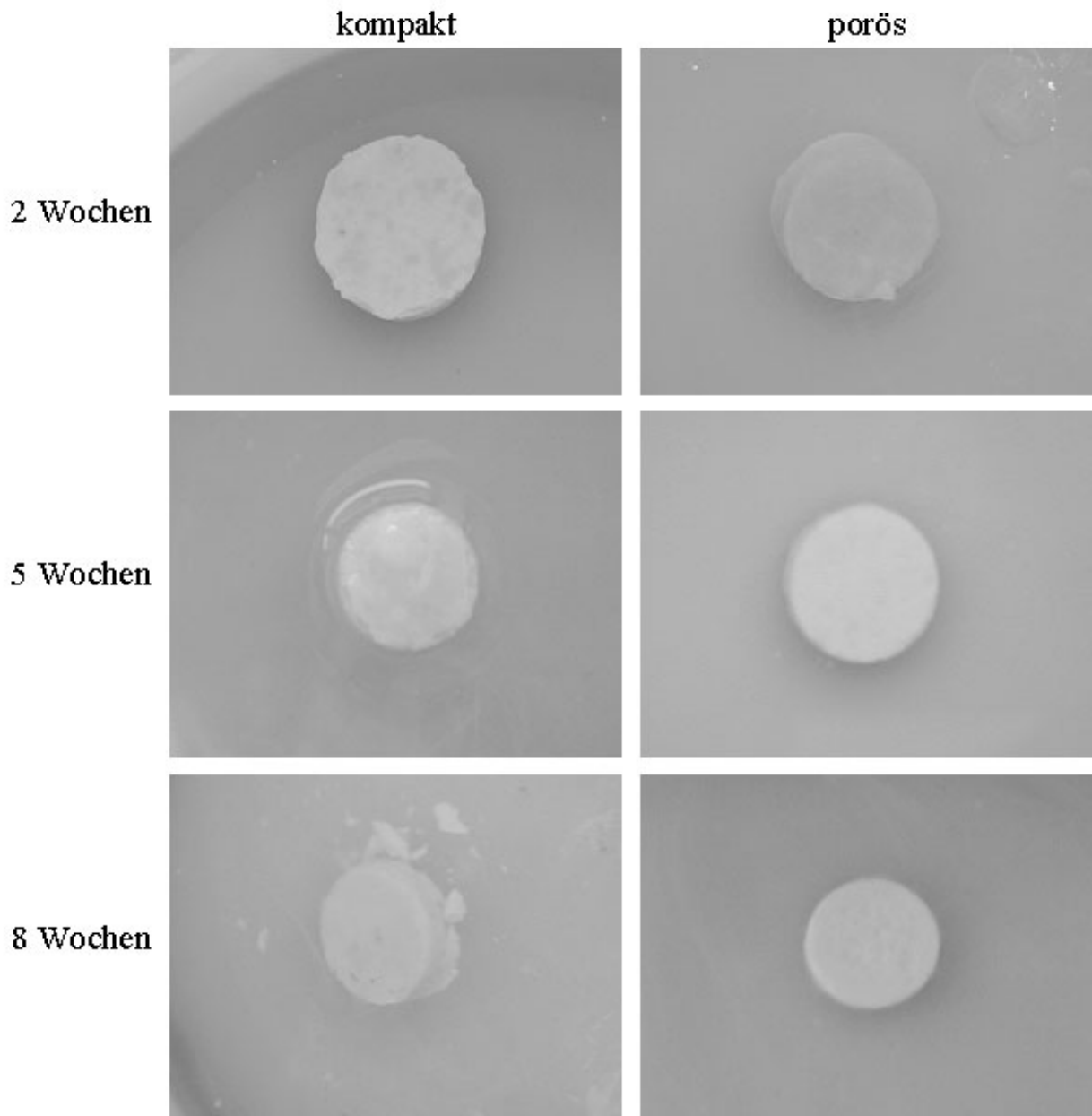


Abbildung C.11: Aufnahmen des Degradationsverlaufs von kompakten und porösen Formkörpern aus PLGA 15/85 in Wasser

Die Körper mit einer porösen Morphologie zeigen äußerlich keinerlei Anzeichen einer Degradation und erscheinen formstabil. Im Gegensatz dazu zeigen die Probenkörper in modifizierten HBSS bereits nach einem Tag kleine radiale Risse an der Oberfläche, erscheinen

aber noch nach einer Woche formstabil. Nach zwei Wochen in Lösung hat sich die Situation dramatisch verändert. Die kompakten Körper sind vollständig fragmentiert und zeigen deutliche Spuren einer fortschreitenden Erosion. Die einzelnen Fragmente wirken hierbei stark gequollen. Die Probenkörper mit poröser Morphologie erscheinen insgesamt formstabiler, obwohl auch hier eine Erosion von kleinen Fragmenten beobachtet werden kann, die aber deutlich geringer ausgeprägt ist.

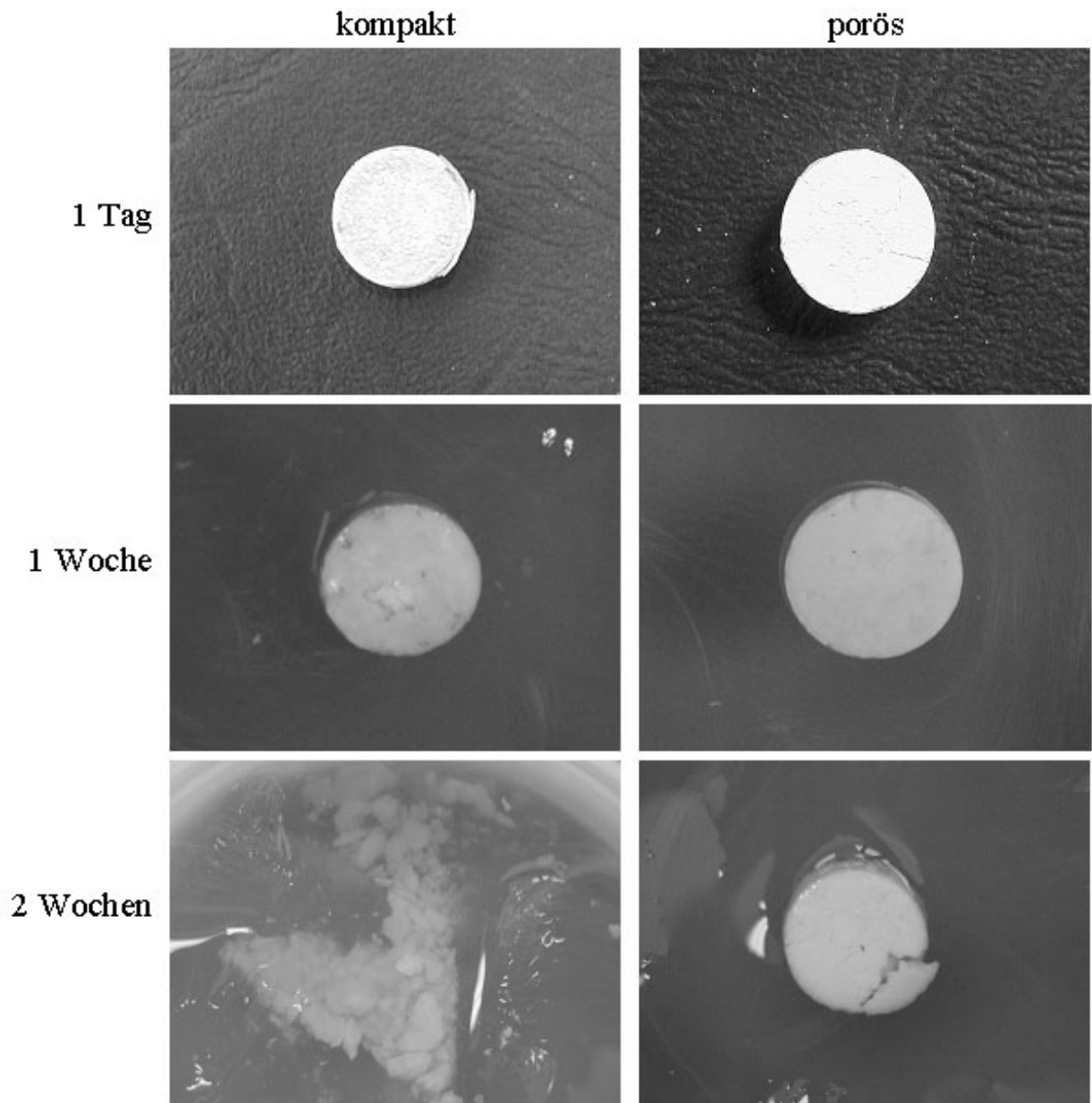


Abbildung C.12: Aufnahmen des Degradationsverlaufs von kompakten und porösen Formkörpern aus PLGA 15/85 in Puffer-Medium

Analyse der Morphologie

Um die Auswirkungen der Degradation auf die innere Struktur der Formkörper zu dokumentieren, wurden Querschnitte der stäbchenförmigen Probekörper am Raster-Elektronenmikroskop untersucht. In **Abbildung C.13** und **C.14** sind die Ergebnisse für Körper

mit kompakter und poröser Morphologie in Wasser dargestellt. Die Aufnahmen nach einer Woche (**Abb. C.13 A/B**) lassen eine feine Rissbildung an der Oberfläche erkennen. Diese Risse entstehen während der Trocknung und sind auf das Eindringen von Wasser in die oberflächennahen Randbereiche der Körper zurückzuführen. Die Struktur im Inneren der Proben weist keinerlei Veränderungen auf und erscheint unverändert kompakt. Im Laufe der weiteren Degradation weiten sich die Risse aus und erstrecken sich nach 2 Wochen über den gesamten Körper (**Abb. C.13 C/D**). Dieses deutet auf ein Eindringen von Wasser in den gesamten Formkörper hin. Die innere Struktur erscheint etwas weniger kompakt und die Bruchkanten wirken rauer.

Nach fünf Wochen in Wasser zeigen die Körper besonders an den Kanten leichte Anzeichen einer Erosion (**Abb. C.13 E/F**). Die vormals durchlaufenden Risse zeigen eine leichte radiale Ausrichtung um den Kern des Körpers. Die Morphologie erscheint nicht mehr kompakt, sondern rau und angegriffen. Eine auffällige Änderung zeigt sich nach acht Wochen (**Abb. C.13 G/H**). Es hat sich eine scharf abgegrenzte Schichtstruktur um die Längsachse des Körpers ausgebildet, mit Schichtdicken zwischen 100–150 μm . Eine solche Zwiebschalenstruktur (*onion-like pattern*) infolge der Degradation wurde auch von Gogolewski *et al.* an Körpern aus PDLA beobachtet.^[104] Sie führte dieses Phänomen auf eine Kettenausrichtung während der Probenpräparation zurück. Die in dieser Studie eingesetzten Probekörper wurden durch Schmelzpressen geformt. Hierbei erfolgt ein Wärmeübergang von den Heizplatten der Pressapparatur auf die metallische Form und von dieser auf das Pressgut. Dies führt zu einem Temperaturgradienten innerhalb des Pressgutes und zu Anisotropien innerhalb des Körpers. Inwieweit diese Anisotropien zur Ausbildung einer Schichtstruktur, während der Degradation beitragen, ist unklar. Möglicherweise führt auch die radiale Diffusion von Wasser in den Probenkörper zu einem Gradienten im Wassergehalt. Dieser kann zu einem gradierten Quellen/Degradieren innerhalb der Formkörper beitragen und somit zu einer Schichtstruktur.

Die Aufnahmen der porösen Proben zeigen deutliche Unterschiede im Abbauverhalten. Es lässt sich hier im Gegensatz zu den Proben mit kompakter Struktur zu keinem Zeitpunkt eine schichtartige Struktur erkennen. Die Degradation erfolgt innerhalb des gesamten Probenkörpers weitgehend homogen. Weiterhin weisen die porösen Proben deutlich weniger Risse auf. Dieses deutet darauf hin, dass auftretende Spannungen während des Inkubierens, z. B. aufgrund eines unterschiedlichen Wassergehaltes, durch die Porenstruktur ausgeglichen werden können. Besonders auffallend ist die Veränderung der Querschnittsfläche und somit des Volumens der Körper im Verlauf der Degradation. Misst die Querschnittsfläche zu Beginn der Degradation und nach einer Woche noch 25 mm^2 , so nimmt sie im Verlauf der Degradation stark ab und beträgt nach fünf bzw. acht Wochen nur noch 12 mm^2 . Dies entspricht einer Verringerung der

Querschnittsfläche um 52 %. Diese Veränderungen spiegeln sich in der Morphologie der Proben wieder. Während die Porenstruktur nach einer Woche nahezu unverändert erscheint, so wirkt sie nach fünf bzw. acht Wochen stark angegriffen und kompakter als zuvor. Die Volumenabnahme lässt sich somit wohl auf das partielle Kollabieren der Porenstruktur zurückführen.

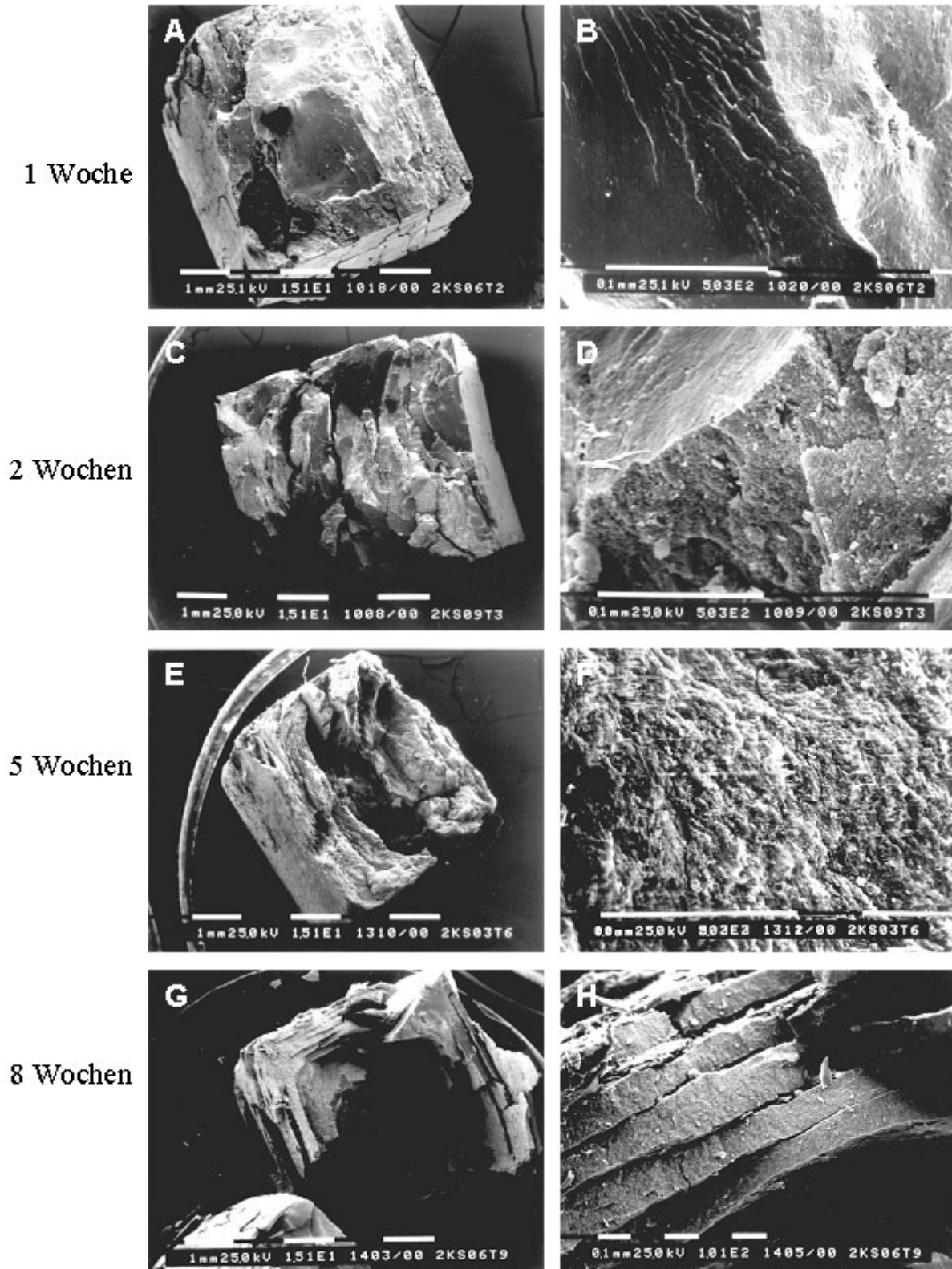


Abbildung C.13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Degradation von Formkörper mit kompakter Morphologie in Wasser .

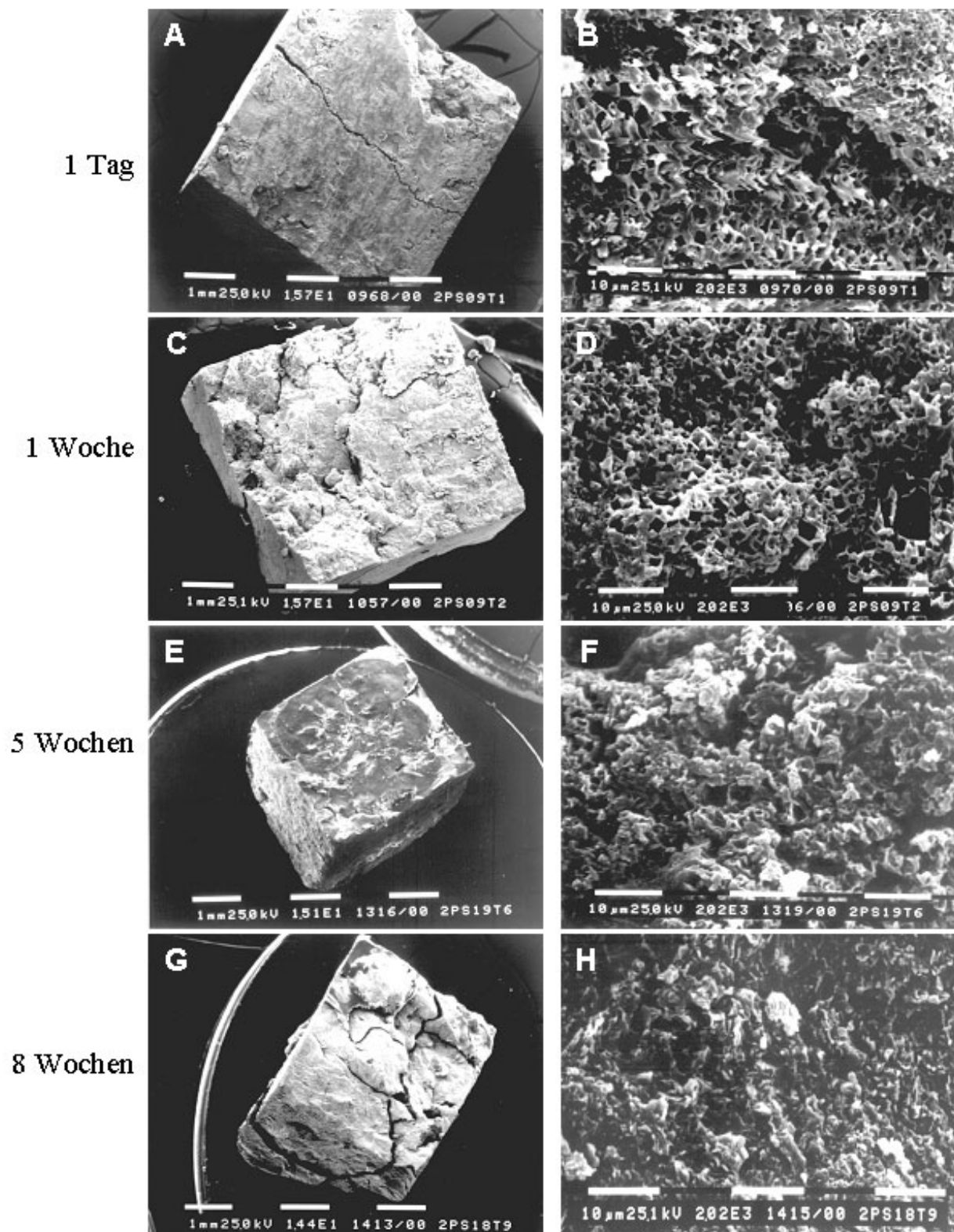


Abbildung C.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Degradation von Formkörper mit poröser Morphologie in Wasser

Die REM-Aufnahmen der Proben in modifiziertem HBSS bestätigen die Aussage der Photographien, dass die Degradation im Puffer signifikant schneller verläuft, als in Wasser. Bereits nach einer Woche wirken die in **Abbildung C.15 C/D** dargestellten Proben mit kompakter Struktur deutlich angegriffen. Während die Querschnittsaufnahme eine weitgehend intakte innere Struktur zeigt, erfolgt eine Erosion von Oberflächenfragmenten. Nach zwei Wochen hingegen tritt ein vollständiger Verlust der äußeren Form und Struktur auf (**Abb. C.15 E/F**).

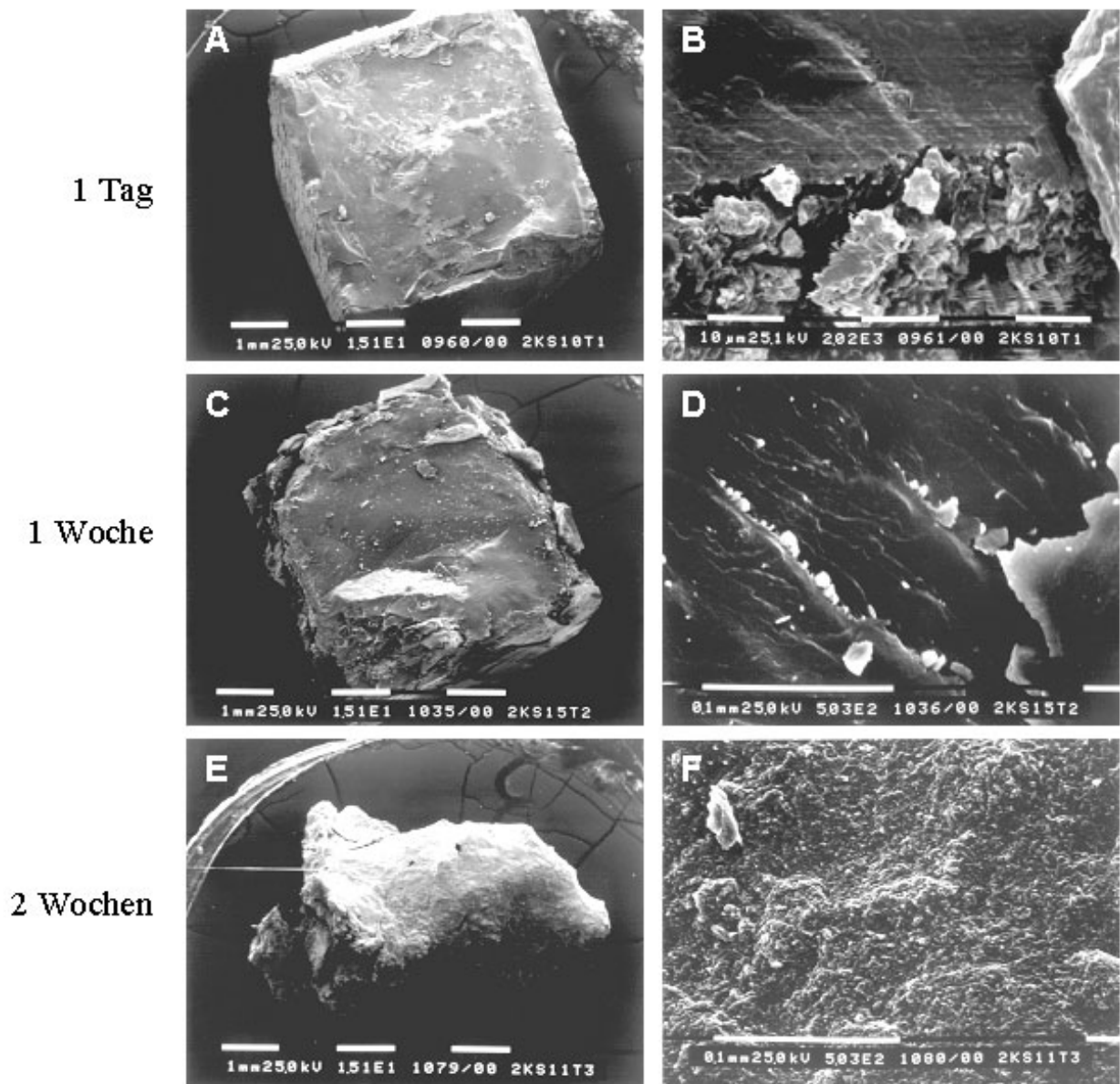


Abbildung C.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Degradation von Formkörpern mit kompakter Morphologie in modifiziertem Hank's Puffer

Die Aufnahmen der porösen Formkörper zeigen ein ähnlich rasches Fortschreiten der Degradation. Wirkt die äußere Form und Porenstruktur nach einem Tag noch unverändert (**Abb. C.16 A/B**), so zeigt sich nach einer Woche eine deutliche Änderung der Morphologie. Obwohl die äußere Form weitgehend intakt erscheint, ist die Porenstruktur nicht mehr zu erkennen und wirkt koagulierte und flockig. Nach zwei Wochen erfolgt der vollständige Strukturverlust (nicht dargestellt, vgl. **Abb. C.15 E/F**)

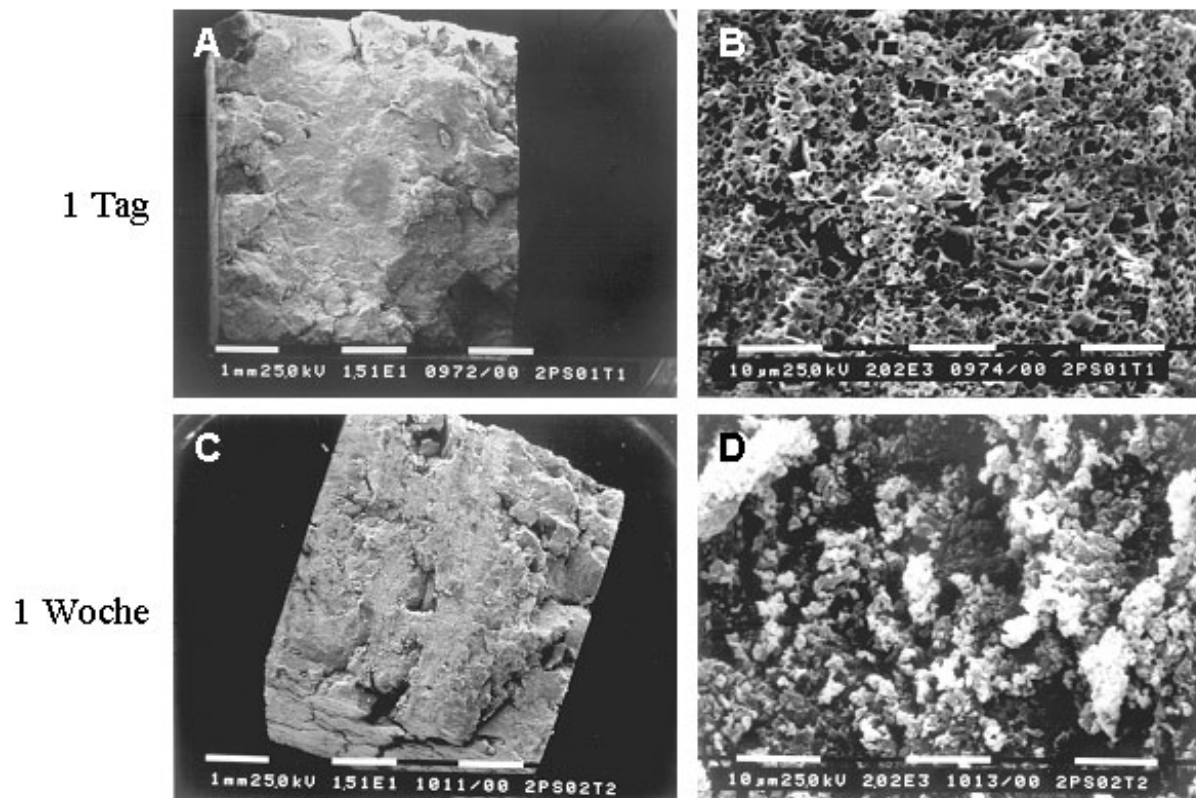


Abbildung C.16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Degradation von Formkörpern mit poröser Morphologie in modifiziertem Hank's Puffer

Analyse der mittleren Kettenlänge

Die zusammengestellten Diagramme in Abbildung 21 beschreiben die Auswirkungen der Probenpräparation und Degradation auf die mittlere Kettenlänge der vier untersuchten Proben/Medium Kombinationen. Auffällig ist das Ansteigen der mittleren Kettenlänge im Zuge der Formkörperpräparation. Dieser Trend gilt für die Probenkörper sowohl mit kompakter als auch poröser Struktur. So wird für alle Proben der Maximalwert der mittleren Kettenlänge nach der Formgebung in der Schmelzpresse gemessen (der Messwert nach einem Tag in **Abb. C.17 D** ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Artefakt). Inwiefern diese Beobachtung auf eine Nachpolymerisation während des Schmelzpressens zurückzuführen ist, bleibt unklar.

Die Messergebnisse der kompakten Proben belegen weiterhin eine Steigerung der mittleren Kettenlänge nach dem Auswaschen des inkorporierten Natriumchlorids.

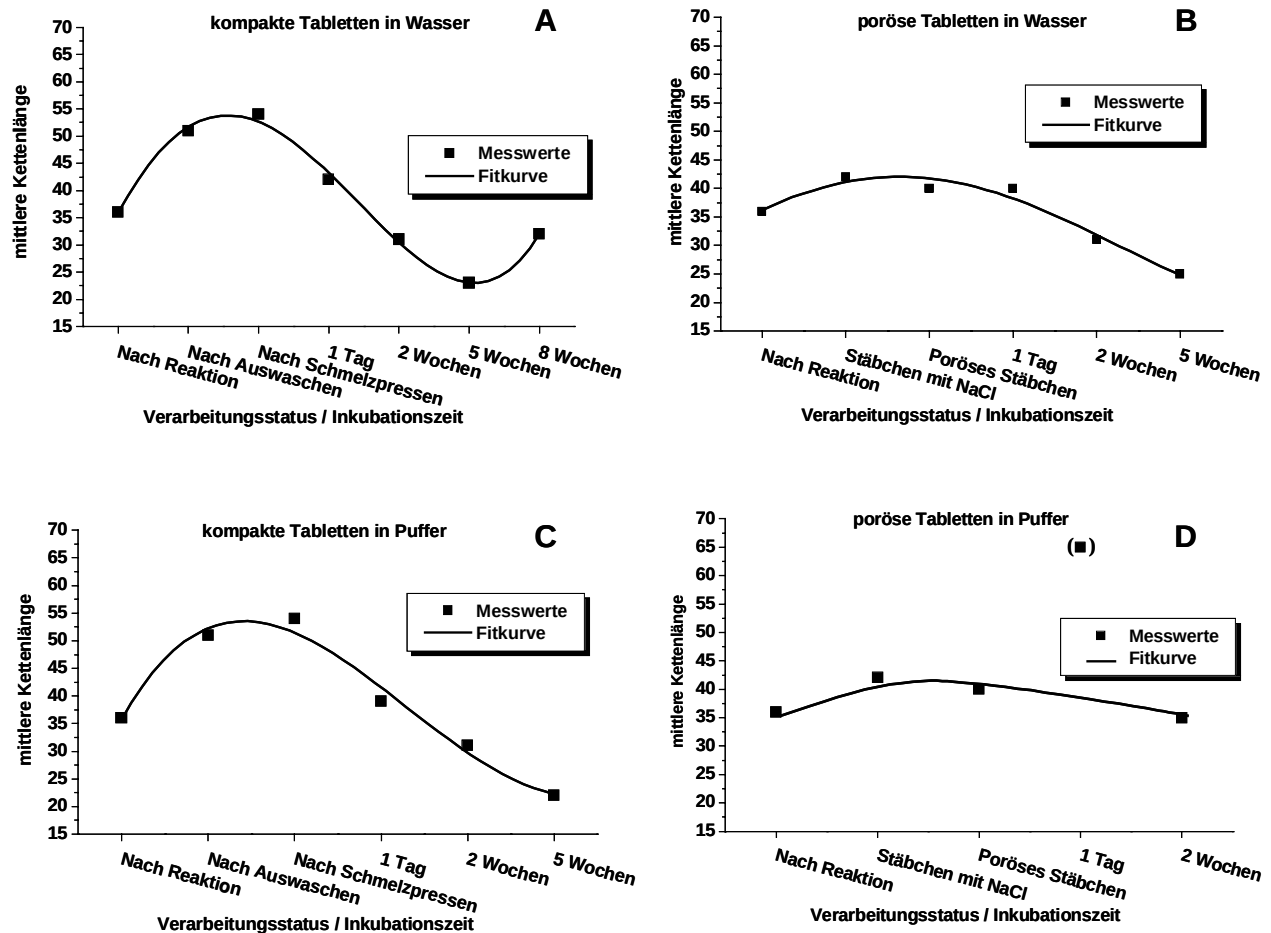


Abbildung C.17: Darstellung des Einflusses der einzelnen Verarbeitungsschritte und der Inkubationszeit auf die mittlere Kettenlänge der Probenkörper.

Durch den gleichzeitigen Austrag kurzkettiger Oligomere und pyrolytischer Nebenprodukte erhöht sich die mittlere Kettenlänge von 36 auf 51 Monomereinheiten. Dieses entspricht einer Steigerung um 29 %. Das nachfolgende Schmelzpressen bewirkt eine weitere Steigerung der mittleren Kettenlänge um drei auf 54 Monomereinheiten. Interessant ist bei der Präparation der porösen Formkörper, dass ein Auswaschen der salzbeladenen Formkörper zu einer geringfügigen Verringerung der mittleren Kettenlänge von 42 auf 40 Monomereinheiten führt und nicht zu einem Anstieg, wie beim Auswaschen des pulverförmigen Polyglykolids. Dieses Ergebnis ist sicherlich auf die erschwerte Diffusion von löslichen Oligomeren aus dem Formkörper in Folge der Verschmelzung der kurzkettigen Moleküle mit den längerkettigen Molekülen während der Formgebung zurückzuführen. Alle Körper zeigen eine Abnahme der mittleren Kettenlänge nach Inkubation und mit zunehmender Dauer. Die Abnahme der Kettenlänge zeigt sich besonders deutlich anhand der Messwerte für die kompakten Formkörper. Bereits nach einem Tag sinkt die mittlere Kettenlänge der Proben in Wasser um 12 auf 42 Monomereinheiten und verringert sich somit um 22 %.

Noch schneller erfolgt die Degradation im Puffer. Hier reduziert sich die mittlere Kettenlänge auf 39 Monomere. Dieses entspricht einer Abnahme von 28 %. Im weiteren Verlauf der Degradation nimmt die mittlere Kettenlänge kontinuierlich ab, obwohl sich die Geschwindigkeit der Kettenspaltung verringert. Nach fünf Wochen in Lösung hat sich die mittlere Kettenlänge der Körper in beiden Degradationsmedien auf 23 Monomereinheiten nahezu halbiert.

Inwieweit der Anstieg der mittleren Kettlänge der kompakten Proben in Wasser nach acht Wochen auf einen verstärkten Austrag niedermolekularer Abbauprodukte aufgrund eines „burst“-Phänomens zurückführen ist, bleibt ungeklärt. Die porösen Formkörper zeigen generell eine verlangsamte Degradation. Zwar sinkt auch hier die mittlere Kettenlänge der Proben in Wasser nach fünf Wochen um 38 % von Initial 40 auf 25 Monomereinheiten, doch fällt diese Abnahme im Vergleich zu den Proben mit kompakter Morphologie mit einer Abnahme von 57 % deutlich geringer aus. Aufgrund der Porenstruktur ist ein Austrag niedermolekularer Degradationsprodukte aus dem gesamten Formkörper möglich. Dieses spiegelt sich in der anscheinend, langsamer ablaufenden Degradation der porösen Körper wieder. Bemerkenswert ist der Einfluss des Puffersystems auf die Entwicklung der mittleren Kettenlänge. Im Gegensatz zu den Messergebnissen der kompakten Proben erfolgt hier eine Reduzierung der Degradationsgeschwindigkeit. Dieses lässt vermuten, dass der frühe Verlust der äußeren Form, wie er für die Formkörper in Phosphatpuffer festgestellt werden konnte, möglicherweise nicht auf einer beschleunigten Degradation beruht, sondern das Ergebnis einer gesteigerten Diffusion von Puffer in die Probenkörper ist. Die Triebkraft hierfür könnte das Bestreben des Puffers sein, die sauren Endgruppen im Inneren der Proben zu neutralisieren. In der Folge zerstört das eindringende Wasser die innere Struktur des Formkörpers.

Quellverhalten/Wasseraufnahme und Massenentwicklung

Durch die Massenbestimmung im feuchten und getrockneten Zustand lassen sich Aussagen über das Quellverhalten der Körper in Lösung treffen. Durch einen Vergleich mit der Ausgangsmasse lässt sich auch das Ausmaß der Erosion quantifizieren. Die Messwerte der Proben in Wasser sind in den Graphiken A und B von **Abbildung C.18** zusammengefasst. Die in **Abbildung C.18 A** dargestellten Messwerte der Wasseraufnahme von Formkörpern mit kompakter Morphologie lassen sich grob in drei Phasen unterteilen:

<i>Phase 1</i> (bis 1. Woche):	Eindringen von Wasser in die Oberfläche der Proben
<i>Phase 2</i> (1. bis zur 3. Woche):	Diffusion von Wasser in den gesamten Formkörper
<i>Phase 3</i> (3. bis 8. Woche):	Saturierung der Wasseraufnahme

Innerhalb der ersten Woche erfolgt in der ersten Phase die Benetzung der Polymeroberfläche und die Diffusion von Wasser in die oberflächennahen Schichten. Die Wasseraufnahme ist zu dieser Zeit mit 5.9 % bezogen auf die Ausgangsmasse relativ gering. Die Abnahme der Probenmasse infolge von Erosion ist in dieser Zeit mit 3.0 % ebenfalls sehr niedrig. Die zweite Phase, in der eine Diffusion von Wasser in den gesamten Formkörper erfolgt, erstreckt sich von der ersten bis zur dritten Woche. Sie ist durch eine deutliche Steigerung der Wasseraufnahme auf 50.2 % nach drei Wochen gekennzeichnet. Dieser Quellvorgang ermöglicht einen Austrag löslicher Abbauprodukte auch aus dem Inneren des Probekörpers und erklärt den beschleunigten Massenverlust von 35.3 %. Interessant ist, dass parallel hierzu der pH-Wert der Probe ein Minimum durchläuft. In der dritten Phase nach ca. drei Wochen ist eine Sättigung in der Wasseraufnahme durch den Körper erreicht. In der Folgezeit schwanken die Messergebnisse um einen Wert von ca. 50 %. Der Körper ist nun vollständig von Wasser durchdrungen und kann nur noch in geringem Maße weiteres Wasser binden. Dieses führt auch zu einer Verringerung der Erosion, so dass sich auch hier die Messwerte im Bereich von 60 % stabilisieren.

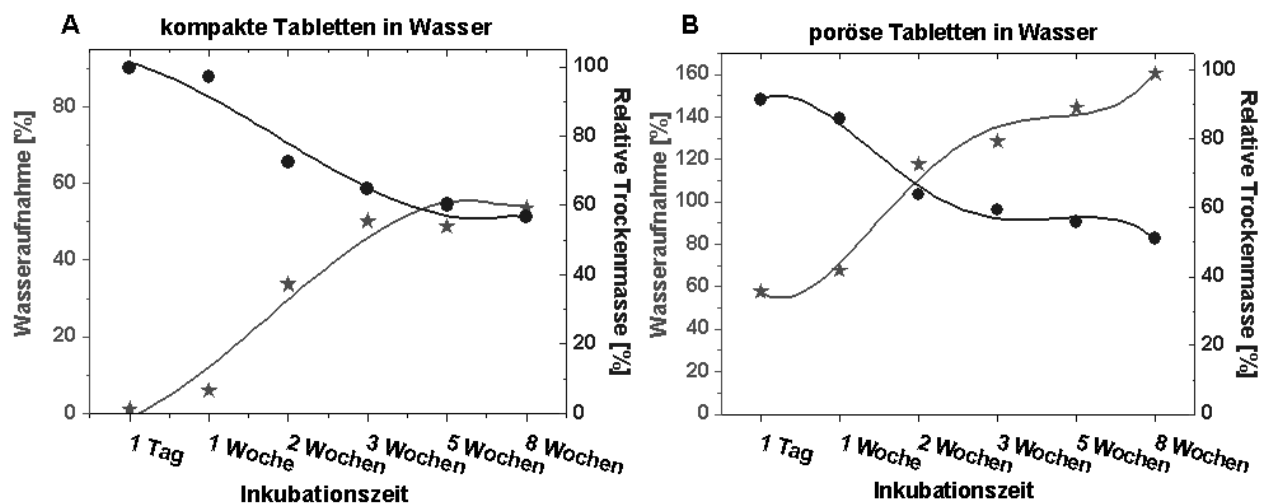


Abbildung C.18: Darstellung der Wasseraufnahme von kompakten (A) und porösen Körpern (B), bezogen auf das Ausgangsgewicht und relative die Trockenmasse.

Die Daten der porösen Formkörper in Wasser zeigen einen etwas anderen Verlauf (siehe **Abb. C.18 A**). Zwar lässt sich auch hier das Quellverhalten grob in die oben beschriebenen drei Phasen der Wasseraufnahme einteilen, doch erfolgt die Diffusion hier aufgrund der Porenstruktur deutlich schneller. Dieses gilt besonders für die Messergebnisse der Wasseraufnahme. Bereits nach einem Tag beträgt der Wassergehalt der Proben 58 %. Nach einer Woche erhöht sich dieser Wert vergleichsweise wenig auf 68 %. Hiernach folgt in der 2. Phase ein beachtlicher Anstieg des gemessenen Wassergehalts auf 118 % innerhalb der zweiten Woche. Dieser Anstieg setzt sich leicht abgeschwächt kontinuierlich fort, so dass nach acht Wochen ein maximaler Wassergehalt von 161 % erreicht wird.

Im Gegensatz zu dem Verhalten der kompakten Körper ist hier keinerlei Sättigung der Wasseraufnahme festzustellen. Die Abnahme der Probenmasse innerhalb der ersten Woche ist verhältnismäßig gering, obwohl im Vergleich zu den kompakten Körpern diese Abnahme um 14 % auf 86 % deutlicher ausgeprägt ist. Die verstärkte Erosion während der 2. Phase (zwischen 1. und 2. Woche) erfolgt im Vergleich zu den kompakten Körpern eine Woche früher und deutet auf das vollständige Eindiffundieren von Wasser in den gesamten Formkörper hin. Da hierdurch ein Austrag von löslichen Degradationsprodukten aus dem gesamten Formkörper erfolgen kann, sinkt die Masse auf 64 % der Ausgangsmasse. Ab der zweiten Woche erfolgt der Massenverlust deutlich langsamer und nahezu linear. Nach acht Wochen in Lösung hat sich die Masse auf 51 % der ursprünglichen Masse verringert und beträgt somit ca. 10 % mehr, verglichen mit den kompakten Proben.

Das Quellverhalten und die Erosion der Formkörper in modifiziertem Hank's-Puffer sind in **Tabelle C.3** zusammengefasst. Aufgrund des raschen Verlustes der äußeren Form durch Fragmentierung konnten nur Messwerte bis zu einer Woche gewonnen werden. Die Messwerte der kompakten Proben sind nahezu identisch mit den Werten der Proben in Wasser. Die porösen Körper zeigen hier einen leichten Unterschied. Entsprechen die Messwerte nach einem Tag noch denen in Wasser, so liegen die Werte der Wasseraufnahme nach einer Woche 21 % unter den in Wasser gemessenen Werten. Der Massenverlust der Proben in Puffer erfolgt ebenfalls verzögert, die gemessenen Werte liegen 7 % unter den in Wasser gemessenen.

Tabelle C.3: Wasseraufnahme und Massenentwicklung der Formkörper in HBSS

		Inkubationszeit	
		1 Tag	1 Woche
kompakte Körper	Wasseraufnahme [%]	0.9	7.4
	relative Trockenmasse[%]	98.9	96.6
poröse Körper	Wasseraufnahme [%]	61.2	86.2
	relative Trockenmasse [%]	91.0	80.2

Diese Daten belegen für die Degradation der kompakten und porösen Proben in Wasser einen kontinuierlichen Verlauf. Ein für den bulk-Mechanismus typischer, plötzlich auftretender Massenverlust lässt sich für keine der Proben beobachten. Die Degradation vollzieht sich kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Inkubation und lässt sich in die zu Anfang beschriebenen drei Phasen einteilen. Aussagen über den Degradationsverlauf in Puffer-Lösung sind aufgrund der wenigen Messwerte nur bedingt möglich. Die Ergebnisse lassen jedoch keinen Rückschluss auf die Mechanismen zu, mit der die beschleunigte Erosion der Proben bei pH 7.4 erklärt werden kann.

Entwicklung der Kristallinität

Die Graphiken A bis D in **Abbildung C.19** zeigen die Onsettemperatur und Schmelzenthalpien der DSC-Messungen. Die ersten drei Messwerte jeder Graphik zeigen die Auswirkungen des Herstellungsprozesses auf das Polymer.

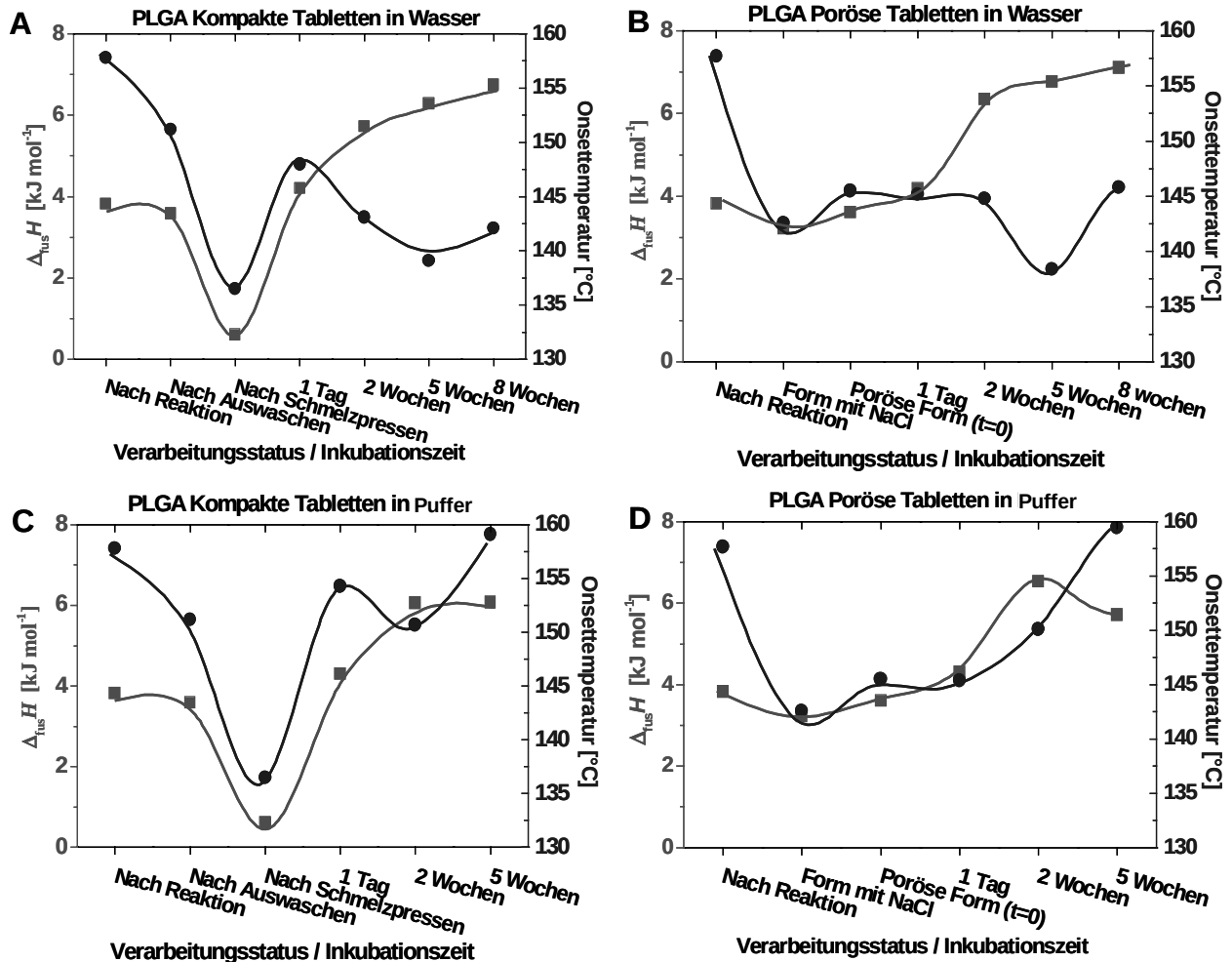


Abbildung C.19: Entwicklung der Schmelzenthalpie im Verlauf der Probenpräparation und Inkubation

Besonders auffällig ist die Abnahme der Kristallinität und der Onsettemperatur während des Schmelzpressens. Durch das relativ schnelle Abkühlen nach dem Pressen hat das Polymer keine Gelegenheit zur Rekristallisation. Besonders prägnant lässt sich dieses am Beispiel der kompakten Formkörper zeigen (vgl. **Abb. C.19 A und C**). Hier nimmt die Schmelzenthalpie nach dem Schmelzpressen von $3.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ auf $0.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ab. Deutlich weniger stark ausgeprägt ist dieser Effekt bei den salzbeladenen Formkörpern. Hier verringert sich die Schmelzenthalpie nur sehr gering von $3.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ auf $3.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Interessant ist der Einfluss des Auswaschens auf die Probenkörper. Dieser Präparationsschritt führt sowohl vor dem Schmelzpressen (kompakte Körper), als auch danach (poröse Körper) zu

einer Schmelzenthalpie von $3.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Im weiteren Verlauf der Degradation zeigen alle Proben eine Steigerung der Schmelzenthalpie und nähern sich asymptotisch einem Maximalwert von ca. $7.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Steigerung der Kristallinität im Laufe der Degradation ist vielfach in der Literatur beschrieben. Hervorgerufen wird sie durch zwei Effekte:

- Rekristallisation aufgrund der Senkung der Glasübergangstemperatur durch die Aufnahme von Wasser (Additivwirkung)
- Die beschleunigte Degradation/Erosion der amorphen Bereiche des Polymers

Dem Bestreben zu höherer Kristallinität wirken nur die Zusammensetzung und Struktur des Copolymers sowie die Amorphisierung kristalliner Domänen, im Zuge der Degradation entgegen. Aus den Messungen der Onsettemperatur lässt sich kein genereller Trend ableiten. Während sich die Onsettemperaturen der kompakten Formkörper in Wasser geringfügig verringern, bleiben die Werte der porösen Körper weitgehend konstant. Im Puffer ist der Verlauf gegenläufig, sowohl für die kompakten als auch für die porösen Proben lässt sich eine Zunahme der Onsettemperaturen registrieren

Mechanische Eigenschaften

Zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften in Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen und der Inkubationszeit wurde an den quaderförmigen Probenkörpern der E-Modul und die Bruchfestigkeit bestimmt. **Abbildung C.20** faßt die Ergebnisse der mechanischen Untersuchung zusammen. Alle Proben zeigen einen deutlichen Stabilitätsverlust im Laufe der Degradation. Wie erwartet bewirkt das Auswaschen des Natriumchlorids der porösen Formkörper eine dramatische Verringerung des E-Moduls von 1.1 GPa auf 0.26 GPa. Dieses entspricht einer Abnahme um 76.4 %. Im weiteren Verlauf erfolgt die Abnahme kontinuierlich und beträgt für die Körper in Wasser nach 1 Tag 0.19 GPa und nach 5 Wochen nur noch 0.02 GPa.

Die porösen Proben in Puffer-Lösung zeigen einen nahezu identischen Verlauf. Die kompakten Proben haben aufgrund ihrer Morphologie eine circa dreifach höhere Ausgangsstabilität.

Interessant ist die für beide Medien nach einem Tag beobachtete Zunahme der Bruchfestigkeit. Diese Steigerung lässt sich durch die Rekristallisierung des Polymers innerhalb des ersten Tages erklären. Im Verlauf der Inkubation steigt die Kristallinität zwar weiter an, aber schon nach einer Woche überwiegt der Einfluss der Degradation, so dass insgesamt die Bruchfestigkeit und der E-Modul abnehmen.

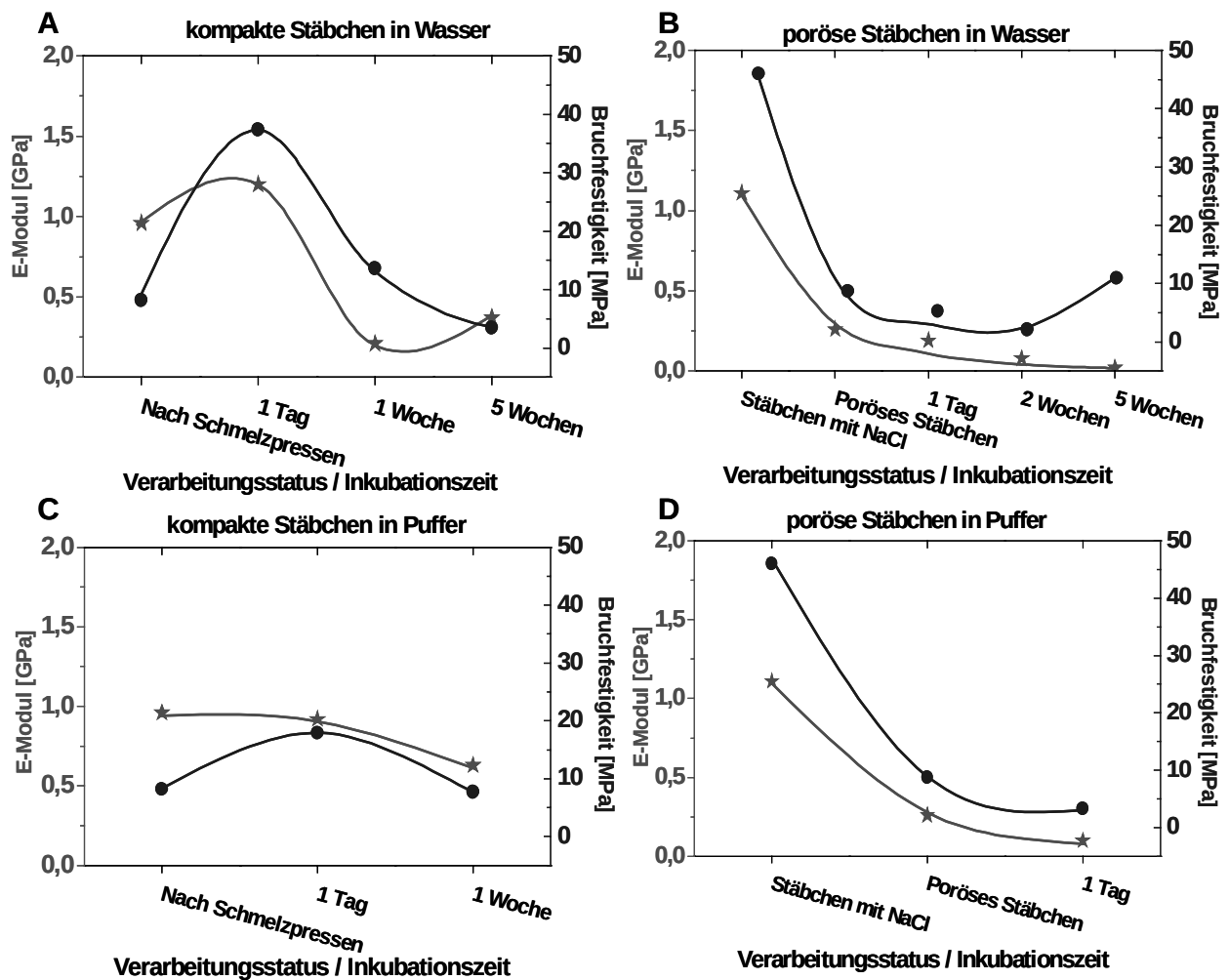


Abbildung C.20: Entwicklung der mechanischen Eigenschaften (Druckversuch)

C.I.IV Zusammenfassung

Die Studie konnte zeigen, dass die Morphologie und die Art des Mediums einen deutlichen Einfluss auf die Degradation ausüben. Anhand der Untersuchungsergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Degradation von Körpern mit poröser Morphologie langsamer erfolgt, als die der Proben mit kompakter Struktur. Diese Aussagen bestätigen somit die Ergebnisse von Athanasiou und Mikos.^{[111],[112]} Interessant ist, dass für keine der untersuchten Proben ein heterogener Degradationsmechanismus beobachtet werden konnte wie dies für kompakte Formkörper in der Literatur mehrfach beschrieben ist. Inwieweit dies, auf die relativ kurzen Polymerketten der festkörperchemischen Synthese zurückzuführen ist, lässt sich nicht eindeutig beurteilen. Die auffällige Ausbildung einer Schichtstruktur, wie sie für die kompakten Proben in Wasser gefunden wurde, ist in diesem Ausmaß bisher nicht in der Literatur beschrieben und könnte das Resultat eines Degradationsgradienten sein. Inwieweit dieser durch die Diffusion von Wasser hervorgerufen wird, oder schon durch die Formgebung während des

Schmelzpressens induziert wird, ist nicht eindeutig zuzuordnen. Bemerkenswert ist der überraschend schnelle Verlust der äußeren Form und der inneren Struktur im modifizierten Hank's-Puffer. Dieser steht in deutlichem Widerspruch zu den aus der Literatur bekannten Erkenntnissen, die eine langsamere Degradation im pH-neutralen Bereich vorhersagen. Die Messungen der mittleren Kettenlänge zeigen dann auch, dass dieses Phänomen nicht durch eine beschleunigte Kettenspaltung hervorgerufen wird. Vielmehr erfolgt der Kettenabbau bei pH 7.4 den Vorhersagen entsprechend etwas langsamer. Wahrscheinlich ist der frühe Strukturverlust, auf eine beschleunigte Diffusion von Wasser in die Körper zurückzuführen. Die Ursache hierfür liegt in der pH-Abhängigkeit des osmotischen Drucks, mit dem der Puffer in den Polymerkörper eindringt. Vert *et al.* konnten als Folge dieser Abhängigkeit für Körper aus Poly(D,L-lactid), bei pH 7.4 eine 10fach höhere Wasseraufnahme messen als bei pH 3.7 unter sonst ähnlichen Bedingungen.^[116] Die verstärkte Wasseraufnahme lässt das Polymer aufquellen, wodurch Spannungen entstehen. Im weiteren Verlauf zerstören diese Spannungen die inneren Strukturen der Körper und führen letztendlich zur Fragmentierung. Dieser Mechanismus erklärt unter anderem die höhere Stabilität der Körper mit poröser Morphologie. Aufgrund der geringeren Polymermenge neigen diese Körper weniger stark zum Quellen. Zudem erlaubt die poröse Struktur einen besseren Ausgleich der inneren Spannungen. Das Quellverhalten und die Massenentwicklung der Proben in Wasser vollzieht sich aufgrund des niedrigeren pH-Wertes deutlich langsamer als in Medium und lässt sich in drei Phasen unterscheiden. In der ersten Woche dringt das Wasser nur in die Oberflächenregionen ein. In der zweiten Phase dringt das Wasser in den gesamten Formkörper ein und in der dritten Phase erfolgt nur noch eine langsame Wasseraufnahme durch Aufquellen des Polymers.

Wie aus der Literatur bekannt, steigt die Kristallinität aller Proben im Verlauf der Degradation an. Bemerkenswert ist das Vermögen der kompakten Körper, bereits nach einem Tag in Lösung, aus einem nahezu vollständig amorphen Zustand nach dem Schmelzpressen, wieder zu kristallisieren. Besonders wichtig, im Hinblick auf eine mögliche spätere Anwendung, sind die Ergebnisse der Druckfestigkeitsmessungen.

Hier zeigt sich, dass die mechanischen Eigenschaften von Formkörpern aus diesem Material schon nach einem Tag in wässriger Lösung deutlich abnehmen. Formkörpern aus diesem Material können demnach nur dort verwendet werden, wo sie keinen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, z. B. als formgebendes Gerüst im „*tissue engineering*“.

^[116] S.M. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationship in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. part 1: poly(DL-lactic acid), *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1990**, 1, 123-130

Ein weiteres Problem für eine Anwendung ist die Entwicklung des pH-Wertes im Verlauf der Degradation. Aus den Messungen wird deutlich, dass sowohl poröse als auch kompakte Formkörper aus festkörperchemisch hergestelltem Poly(D,L-lactid-co-glykolid) in Wasser stark sauer reagieren. Die gemessene Absenkung des pH-Wertes auf 2.5 würde *in vivo*, trotz der Pufferung durch Körperseren, zu einer Schädigung des umgebenden Gewebes führen, so dass eine Verwendung nur in Kombination mit einer pH-wertausgleichenden Komponente, in einem Kompositmaterial möglich erscheint.

C.I.V Verwendete Materialien

Polymersynthese

Poly(D,L-lactid-co-glykolid) 15/85 wurde durch die thermisch induzierte Festkörper-Polykondensation aus Kristallmischungen von Natrium-2-chlorpropionat und Natriumchloracetat gewonnen. Hierzu wurden die Edukte im Verhältnis 15:85 zusammen in Methanol vollständig gelöst und anschließend wieder ausgefällt. Die Polymerisierung der Kristallmischungen erfolgte in einem Rundkolben unter ständigem Rühren bei einer Temperatur von 150 °C über einen Zeitraum von vier Stunden. Zur Herstellung von salzfreiem Copolymer wurde das Produkt nach der Reaktion, 12 Stunden bei einer Temperatur von 5 °C, in destilliertem Wasser ausgewaschen. Das unlösliche Copolymer wurde abfiltriert und anschließend im Vakuum bei einem Druck von 0.1 mbar getrocknet.

Formkörperpräparation

Die Formgebung der quader- und zylinderförmigen Probekörper erfolgte mit einer Heißpresse.

Tabelle C.4 gibt einen Überblick über die einzelnen Pressbedingungen.

Tabelle C.4: Abmessungen und Herstellungsparameter der verwendeten Proben

Zylinder	Geometrie	Durchmesser = 13 mm Höhe = 7 mm
	Druckfläche [mm ²]	133
	Druckkraft [kN]	10
	Druck [MPa]	75.2
Quader	Geometrie	Höhe = 5 mm Breite = 5 mm Länge = 30 mm
	Druckfläche [mm ²]	150
	Druckkraft [kN]	10
	Druck [MPa]	66.7

Zur Herstellung der kompakten Probekörper wurden 1.12 g ausgewaschenes Copolymer eingewogen und 10 Minuten, bei einer Temperatur von 115 °C und mit einer Kraft von 10 kN verpresst. Zur Präparation der porösen Formkörper betrug die Einwaage 1.3 g salzbeladenes Polymer. Das Pressgut wurde ebenfalls 10 Minuten mit einer Kraft von 10 kN verpresst, die Temperatur betrug aber nur 115 °C.

Degradationmedien

Wasser: Die Degradation erfolgte in destilliertem Wasser mit einem Zusatz von 1 vol. % Penicillin/Streptomycin-Lösung, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden. Die Lösung wurde wöchentlich gewechselt und der pH-Wert gemessen.

Puffer: Es wurde ein modifizierter Hank's-Puffer mit erhöhter Pufferkapazität verwendet (vgl. **Tabelle C.1**). Die Lösung wurde mit Natriumhydroxyd-Lösung (1 M) auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Die Pufferlösung wurde ebenfalls wöchentlich gewechselt. Zeigte der in der Lösung enthaltene Indikator Phenolrot eine vorzeitige pH-Wertveränderung an, so wurde früher ausgetauscht. Zusätzlich enthielt auch die Puffer-Lösung einen Gehalt von 1 vol. % Penicillin/Streptomycin-Lösung.

C.II Beschleunigte Degradation an medizinisch optimierten Polyestern

C.II.I Grundlagen

Wie das vorangegangene Kapitel bereits gezeigt hat, ist bei der Konzeption eines temporären Implantats auf der Basis biodegradierbarer Polymere eine genaue Kenntnis des Degradationsverhaltens des verwendeten Materials unerlässlich. Dies gilt für bekannte Materialien, wie zum Beispiel PGA oder PLLA, deren Abbauverhalten signifikante, herstellungsbedingte Unterschiede zwischen einzelnen Chargen zeigen kann.^[117] Im Besonderen gilt dieses jedoch für alle neuartigen Materialien. Da Untersuchungen zum Degradationsverhalten jedoch mit einem hohen Material- und Zeitaufwand verbunden sind (vgl. Kapitel C.I), lässt sich auf diese Weise nur eine begrenzte Anzahl von potentiellen Materialien testen. Das Ziel der im folgenden präsentierten Studie war es, eine Methodik zu entwickeln, mit der in relativ kurzer Zeit und mit geringem Materialeinsatz ein Screening des hydrolytischen Abbauverhaltens möglichst vieler Materialien im Rahmen einer Vorstudie durchführbar ist. Anhand der Ergebnisse dieser Voruntersuchung sollte es möglich sein, die Degradationsdauer von neuen Materialien im Vergleich zu bekannten abzuschätzen. Aus **Tabelle C.5** geht hervor, dass die Länge der Degradationszeiten, besonders von höheren Polyestern wie Poly(3-*R*-hydroxybutyrat), einen kritischen Faktor bei deren Untersuchung darstellt.

Tabelle C.5: Benötigte Zeitspannen für den vollständigen Abbau unterschiedlicher biodegradierbarer Polymere in Phosphatpuffer bei pH 7.4.

Polymer	Zeit [Monate]
Poly(3- <i>R</i> -hydroxybutyrat)	>>36 ^[118]
Poly(ε-caprolacton)	>24 ^[119]
Poly(L-lactid)	18-24 ^[120]
Poly(D,L-lactid)	12-16 ^[120]
Poly(D,L-lactid-co-glykolid) 85:15	5 ^[120]
Polyglykolid	2-4 ^[120]
Poly(L-lactid-co-glykolid) 50:50	2 ^[120]
Poly(D,L-lactid)-co-(ε-caprolacton) 90:10	2 ^[120]

^[117] M. Vert, F. Chabot, L. Leray, P. Christel, Stereoregular bioresorbable polyesters for orthopaedic surgery, *Makromol. Chem. Suppl.* **1981**, 5, 30-40

^[118] C.W. Pouton, S. Akhtar, Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, 18, 133-162

^[119] C.G. Pitt, *Biodegradable polymers as drug delivery systems* (Herg.: M. Chasin, R.S. Langer), Marcel Dekker, New York, **1990**, S. 71-120

^[120] X.S. Wu in *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering* (Herg.: D.L. Wise, D.J. Trantolo, D.E. Altobelli, M.J. Yaszemski, J.D. Gresser, E.R. Schwarz), Marcel Dekker, New York, **1995**, S. 1015-1054

Eine Möglichkeit, diese Untersuchungszeiträume zu verkürzen, ist eine Erhöhung der Temperatur des Degradationsmediums von üblicherweise physiologischen 37 °C auf Werte zwischen 60 und 70 °C. Diese Methode der beschleunigten Degradation bei höheren Temperaturen stellt ein übliches Verfahren dar und ist für Implantate aus Poly(L-lactid) mit der ISO 13781 einheitlich geregelt.^[121] Der Vorteil dieser Methode ist, dass eine Versuchsreihe in relativ kurzer Zeit phänomenologische Ergebnisse über das Degradationsverhalten des jeweiligen Materials liefert. Diese Methode eignet sich somit besonders in der Qualitätskontrolle, um Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen eines Polymers zu ermitteln oder um die Auswirkungen von Verarbeitungsschritten auf das Degradationsverhalten zu dokumentieren.

Im Folgenden wurde diese Methode verwendet, um den Abbau von Formkörpern aus verschiedenen Polyester- und Kompositmaterialien zu untersuchen. Bei den getesteten Materialien handelt es sich um biokompatible und bioabbaubare Werkstoffe, die für den Einsatz als Knochenersatzmaterial konzipiert wurden und deren Degradationsverhalten mit Hilfe der beschleunigten Degradation untersucht und dokumentiert werden sollte. Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war die erfolgreiche Kombination von festkörperchemisch hergestelltem mikroporösen Polyglykolid mit einem amorphen Calciumphosphat zu einem, in biologischer und chemischer Weise, optimierten Knochenersatzmaterial.^[122] Dieses Konzept lehnt sich an den Aufbau des natürlichen Knochens an. Dieser stellt ebenfalls ein Kompositmaterial aus einem Polymer (Collagen) und nanokristallinem Calciumphosphat dar. Die Kombination des Polyesters mit einem basischen Calciumphosphat (Carbonat-Apatit) hat zudem den Vorteil, dass saure Abbauprodukte, die durch die Hydrolyse des Polymers entstehen, neutralisiert werden und somit ein Absinken des lokalen pH-Wertes auf ein zelltoxisches Niveau verhindert wird.^[123] Durch die interkonnektierende mikroporöse Struktur wird zudem eine Akkumulation von Degradationsprodukten vermieden. Durch Besiedlungsexperimente mit knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) von Mäusen konnte für dieses Material tatsächlich eine hervorragende Biokompatibilität nachgewiesen werden.^[122]

Um die Biokompatibilität von Implantaten aus diesem Material noch zu steigern, sollten in einem weiteren Schritt neben den bereits vorhandenen Mikroporen (<1 µm) mit Hilfe der *salt leaching technique* zusätzliche Makroporen (>200 µm) eingeführt werden.

^[121] Poly(L-lactide) resins and fabricated forms for surgical implants – *In vitro* degradation testing, ISO 13781:1997 (E), 3-4

^[122] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A.F. Schilling, M. Amling, J. M. Rueger, M. Epple, Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 54, 162-171

^[123] M.S. Taylor, A.U. Daniels, K.P. Andriano, J. Heller, Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products, *J. Appl. Biomater.* **1994**, 5, 151-157

Durch diese Makroporen sollte ein Einwachsen von Osteoblasten in das gesamte Implantat ermöglicht werden und zudem die Menge des abzubauenen Materials verringert werden. Da natürlicher Knochen zudem ein hochgradig strukturiertes Material darstellt, mit einer gradierten Änderung der chemischen Zusammensetzung und Porosität, sollte versucht werden, dies bei der Weiterentwicklung von Knochenersatzmaterialien zu berücksichtigen. In **Abbildung C.21** ist schematisch dargestellt, wie eine solche Optimierung aussehen könnte. Ansatzpunkt für die Optimierung des Knochenersatzmaterials ist hierbei die Struktur von natürlichem Knochen. Dieser besteht aus einer kompakten, äußeren Schicht der *Substantia corticalis* (Corticalis), die an der Oberfläche von der Knochenhaut (Periost) überzogen ist. Die Corticalis geht schließlich über in ein schwammartiges Gerüstwerk aus feinen Knochenbälkchen, der *Substantia spongiosa* (Spongiosa), die das Innere des Knochens ausfüllt.

Ein ideales Implantat zur Auffüllung eines Knochendefektes, wie er zum Beispiel nach der operativen Entfernung eines Tumors entsteht, sollte sich an der natürlichen Struktur des Knochens orientieren. So könnte durch die Einführung eines Porositätsgradienten im Implantat ein Einwachsen von unerwünschten fibrösem Bindegewebe aus dem angrenzenden Weichgewebe verhindert werden,

während im Inneren, durch eine der Spongiosa angepassten Porosität eine Migration von Osteoblasten ermöglicht wird. Wünschenswert wäre es weiterhin, wenn das Implantat zudem auch eine gradierte Degradationsgeschwindigkeit hätte, so dass der Abbau im Bereich der Spongiosa schneller erfolgt als im Bereich der Corticalis. Das Implantat könnte in diesem Fall im Bereich der Corticalis weiterhin eine Stützfunktion erfüllen, während es aus der Spongiosa bereits zu einer gerichteten Knochenneubildung in Richtung Corticalis kommt. Die

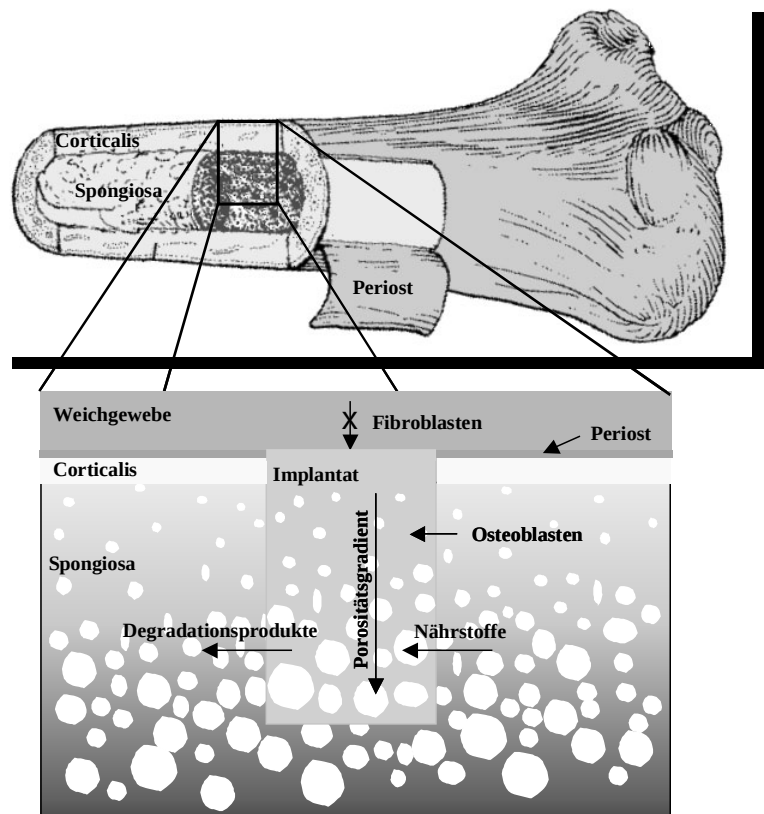


Abbildung C.21: Darstellung der Knochenstruktur und eines an die Defektstruktur angepassten Knochenersatzmaterials mit Porositätsgradienten.

nachfolgend präsentierten Versuchsreihen dienten dazu, die Auswirkungen von unterschiedlichen Strukturierungen auf den Abbau von Formkörpern zu untersuchen und zu klären, ob und

inwieweit durch Gradienten in der Porosität und chemischen Zusammensetzung eine gradierte Degradation von Formkörpern erreicht werden kann.

Um dies zu untersuchen, wurden in den folgenden Versuchsreihen unterschiedlich strukturierte Formkörper hergestellt und ihr Abbau mit Hilfe der beschleunigten Degradation photographisch dokumentiert. **Tabelle C.6** gibt einen Überblick über die Art und Strukturierung der im einzelnen untersuchten Formkörper.

Tabelle C.6: Überblick über die Zusammensetzung und Struktur der untersuchten Formkörper

Nr	Bezeichnung des Formkörpers	Aufbau des Formkörpers
1	PGA-massiv	Aus PGA ohne Poren
2	PGA- μ -porös	Aus PGA mit μ -Poren
3	PGA-makro-grad- μ -porös	Aus PGA mit μ -Poren und einem Gradienten in der Makroporosität
4	PGA-ACP-massiv	Aus einer homogenen Mischung von PGA und amorphem Calciumphosphat (ACP) ohne Poren
5	PGA-ACP- μ -porös	Aus einer homogenen Mischung von PGA und amorphem Calciumphosphat (ACP) mit μ -Poren
6	PGA-ACP- μ -makro-porös	Aus einer homogenen Mischung von PGA und amorphem Calciumphosphat (ACP) mit μ - und Makroporen
7	PGA-ACP-grad-massiv	Aus PGA mit einer gradierten ACP-Verteilung ohne Poren
8	PGA-ACP-grad- μ -porös	Aus PGA mit einer gradierten ACP-Verteilung mit μ -Poren
9	PGA-ACP-grad- μ -makro-porös	Aus PGA mit einer gradierten ACP-Verteilung mit μ - und Makroporen
10	PGA-ACP-massiv-scharfe Grenze	Aus PGA mit einer scharfen Trennung von einem Bereich mit homogener ACP-Verteilung ohne Poren
11	PGA-PLLA-grad-massiv	Aus PGA mit einer gradierten PLLA-Verteilung ohne Poren
12	PLLA-massiv	Aus PLLA ohne Poren
13	PLLA-ACP-massiv	Aus einer homogenen Mischung von PLLA und (ACP) ohne Poren
14	3-PHB-massiv	Aus 3-PHB ohne Poren
15	3-PHB/HV 9:1-massiv	Aus 3-PHB/HV 9:1 ohne Poren

C.II.II Präparative Arbeiten

Formkörperpräparation

Als geometrische Form der Probekörper ein Stäbchen mit den Maßen 30 mm · 5 mm · 5 mm gewählt. Um einheitliche Formkörper zu gewährleisten, wurden alle Formkörper mit einem Presswerkzeug aus Stahl, wie es in **Abbildung C.22** dargestellt ist, durch Heisspressen hergestellt. Hierbei wurden die Einwaagen des Pressgutes so gewählt, dass die Höhe der fertigen Formkörper ca. 5 mm betrug.

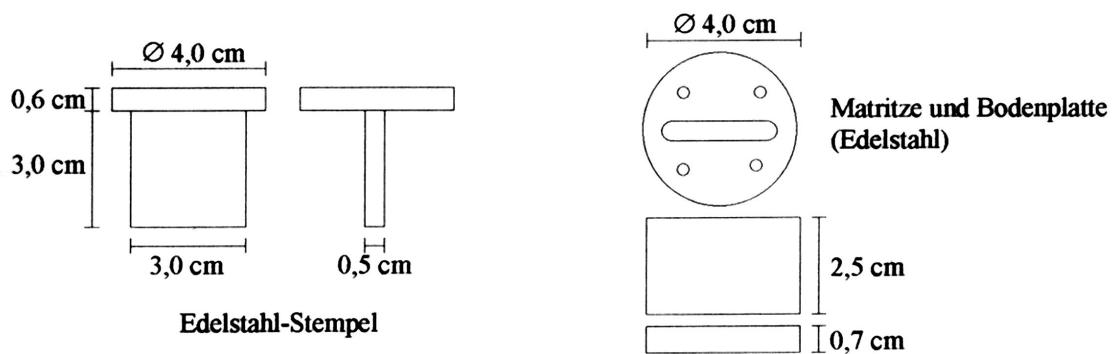


Abbildung C.22: Zeichnung des zur Herstellung der Formkörper verwendeten Presswerkzeuges

Die optimalen Pressbedingungen wie Temperatur, Pressdauer und Presskraft, wurden zuvor an Probepresslingen der jeweiligen Materialzusammensetzung ermittelt. Die Herstellung von μ -porösen Formkörpern erfolgte durch das Verpressen von salzbeladenem Polyglykolid (wie es direkt nach der Reaktion vorliegt) und anschließendem Auswaschen in entionisiertem Wasser. Massive PGA-Körper waren durch das Verpressen des zuvor mit Wasser ausgewaschenem Polymers zugänglich. Formkörper mit Makroporosität wurden durch das Verpressen einer Mischung von salzbeladenem PGA und Saccharosekristallen definierter Korngröße (250-400 μ m) gewonnen, die anschließend ebenfalls in entionisiertem Wasser ausgewaschen wurden. **Abbildung C.23** zeigt die Ähnlichkeit zwischen der so erzeugten Porenstruktur im Vergleich zu der von natürlichem, spongiösem Knochen.

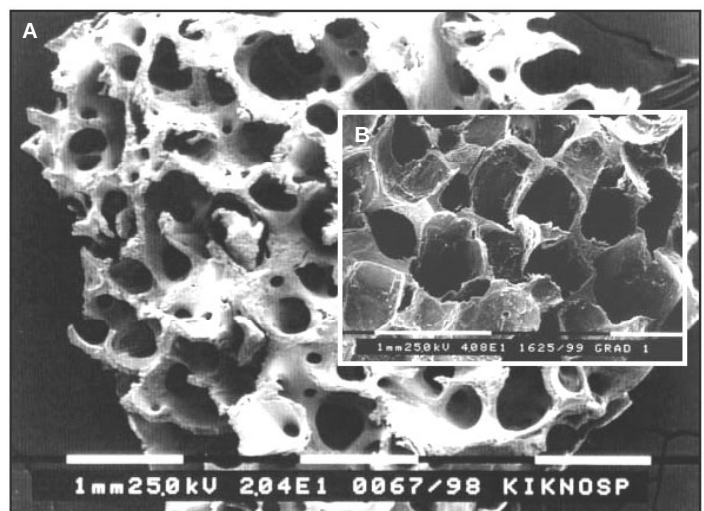


Abbildung C.23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von natürlichem spongiösem Knochen bovinen Ursprungs (A) im Vergleich zu makroporösem Polyglykolid (B) bei gleicher Vergrößerung (20 fach).

Im Falle einer hierarchischen Strukturierung der Makroporen wurde das Pressgut in sechs Segmente mit unterschiedlichem Saccharoseanteil aufgeteilt (siehe **Abb. C.24 A**). Mittels eines speziellen Einfüllstutzens wurde

das Pressgut so in die Pressform eingebracht, dass an den Segmentgrenzen eine geringe Vermischung zu quasi-kontinuierlichen Segmentübergängen führte. In **Abbildung C.24 A** ist dies graphisch dargestellt. Zur Herstellung von PGA–Carbonat-ACP Kompositkörpern wurde ein Mischungs-

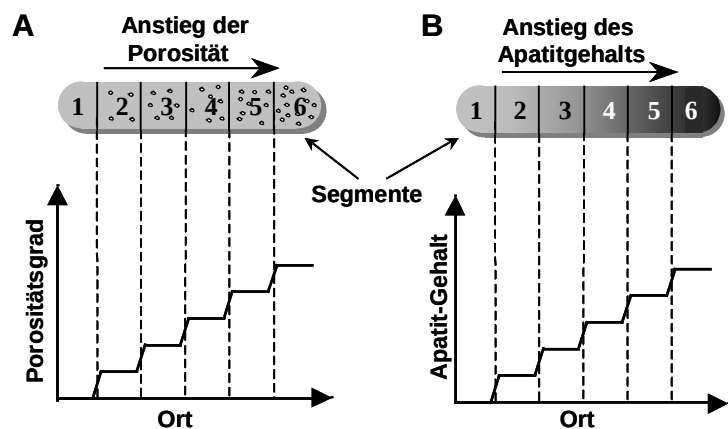


Abbildung C.24: Schematische Darstellung zweier Formkörper mit einem Gradienten in der Porosität (A) und des Apatitgehaltes (B).

verhältnis von 5:2 (PGA:Carbonat-ACP) verwendet. Dieses Verhältnis entspricht demjenigen, welches bei einer Temperatur von 37 °C zu einem stabilen pH-Wert von 7.4 führt.^[122]

Formkörper mit einer gradierten Carbonat-ACP Verteilung wurden durch die Aufteilung des Presskörpers in sechs Segmente erhalten, die mit Mischungen mit kontinuierlich veränderten Carbonat-ACP-Anteil befüllt und anschließend verpresst wurden (siehe **Abb. C.24 B**). Hierbei ist zu erwähnen, dass auch diese Körper insgesamt ein Verhältnis von PGA zu Carbonat-ACP von 5:2 besaßen. Die Pressbedingungen der verschiedenen Formkörper sind detailliert in **Abschnitt C.II.V** angegeben.

Degradationsmedium

Als Degradationsmedium wurde eine Phosphat-Pufferlösung verwendet, wie sie in der ISO 13781 angegeben ist. Hierbei handelt es sich um einen modifizierten Sørensen-Puffer mit einem Puffersystem aus $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$. Zur Herstellung wurden jeweils 9.078 g KH_2PO_4 und 11.876 g Na_2HPO_4 in einem Liter entionisierten Wasser gelöst ($c = \frac{1}{15} \text{ mol/l}$). Die eigentliche Pufferlösung wurde anschließend durch Mischen von 18.2 Vol.-% der KH_2PO_4 -Lösung und 81.8 Vol.-% der Na_2HPO_4 -Lösung erhalten. Der pH-Wert der fertigen Pufferlösung betrug 7.4.

Versuchsbedingungen

Die Probekörper wurden jeweils in verschließbare Polyethylengefäße mit 150 ml Pufferlösung gegeben und in einem Ofen bei 70 °C gelagert. Um die morphologischen Änderungen während des hydrolytischen Abbaus zu dokumentieren, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Photos der

Formkörper aufgenommen. Zusätzlich wurden Degradationstests mit ausgewählten Probekörpern mit 10 ml Pufferlösung durchgeführt, bei denen jedoch der Puffer täglich gewechselt wurde. Diese Versuchsbedingungen wurden gewählt, um die begrenzte Pufferkapazität *in vivo* zu simulieren und die Auswirkungen des hydrolytischen Abbaus der Formkörper auf den lokalen pH-Wert zu analysieren.

C.II.III Ergebnisse

Einfluss der Porosität auf die Degradation von Körpern aus PGA und PGA/Carbonat-ACP

Abbildung C.25 zeigt die Auswirkungen unterschiedlicher Porositäten auf den hydrolytischen Abbau von Formkörpern aus PGA und dem Kompositmaterial aus Polyglykolid/Carbonat-ACP. Es ist deutlich zu erkennen, dass jeweils die Formkörper aus dem massiven Material (ohne Poren) mit ungefähr einem Tag am längsten formstabil bleiben, während sowohl die μ -porösen Probekörper als auch die μ - und makroporösen Körper bereits nach einem Tag in Pufferlösung vollständig erodiert und teilweise aufgelöst sind. Diese Beobachtungen decken sich interessanterweise nicht mit den Ergebnissen der Degradation von PLGA Formkörpern bei 37 °C aus Kapitel C.I. Dort zeigten μ -poröse Formkörper aus Poly(D,L-lactid-co-glykolid) 15:85 eine signifikant längere Formstabilität als massive Körper. Analog durchgeführte Degradationsstudien an massiven und μ -porösem PGA bei 37 °C bestätigen diese Beobachtungen.^[124] Da sich die beiden Degradationsstudien im wesentlichen nur in der Temperatur der Pufferlösung unterscheiden, zeigt diese Studie, welchen entscheidenden Einfluss die Temperatur auf den Abbaumechanismus der Probekörper ausübt.

Diese Unterschiede zeigen zudem die begrenzte Möglichkeit Daten die mittels der beschleunigten Degradation gewonnen wurden, auf Studien unter physiologischen Bedingungen zu übertragen. Ein weiteres Untersuchungsergebnis zeigt sich bei der Betrachtung der Formkörper aus dem PGA/Carbonat-ACP Kompositmaterial. Offensichtlich scheint die enthaltene Apatitphase nur geringe Auswirkungen auf die Degradation zu haben. Lediglich der massive Probekörper (vgl. **Abb. C.25 D2**) lässt strukturelle Schädigungen erkennen, die sich auf das Aufquellen des enthaltenen Carbonat-ACPs zurückführen lassen.

^[124] K. Schwarz, *Biodegradable polyesters from solid-state precursors – basic components of biomedical materials concept*, dissertation, Universität Hamburg, 2001

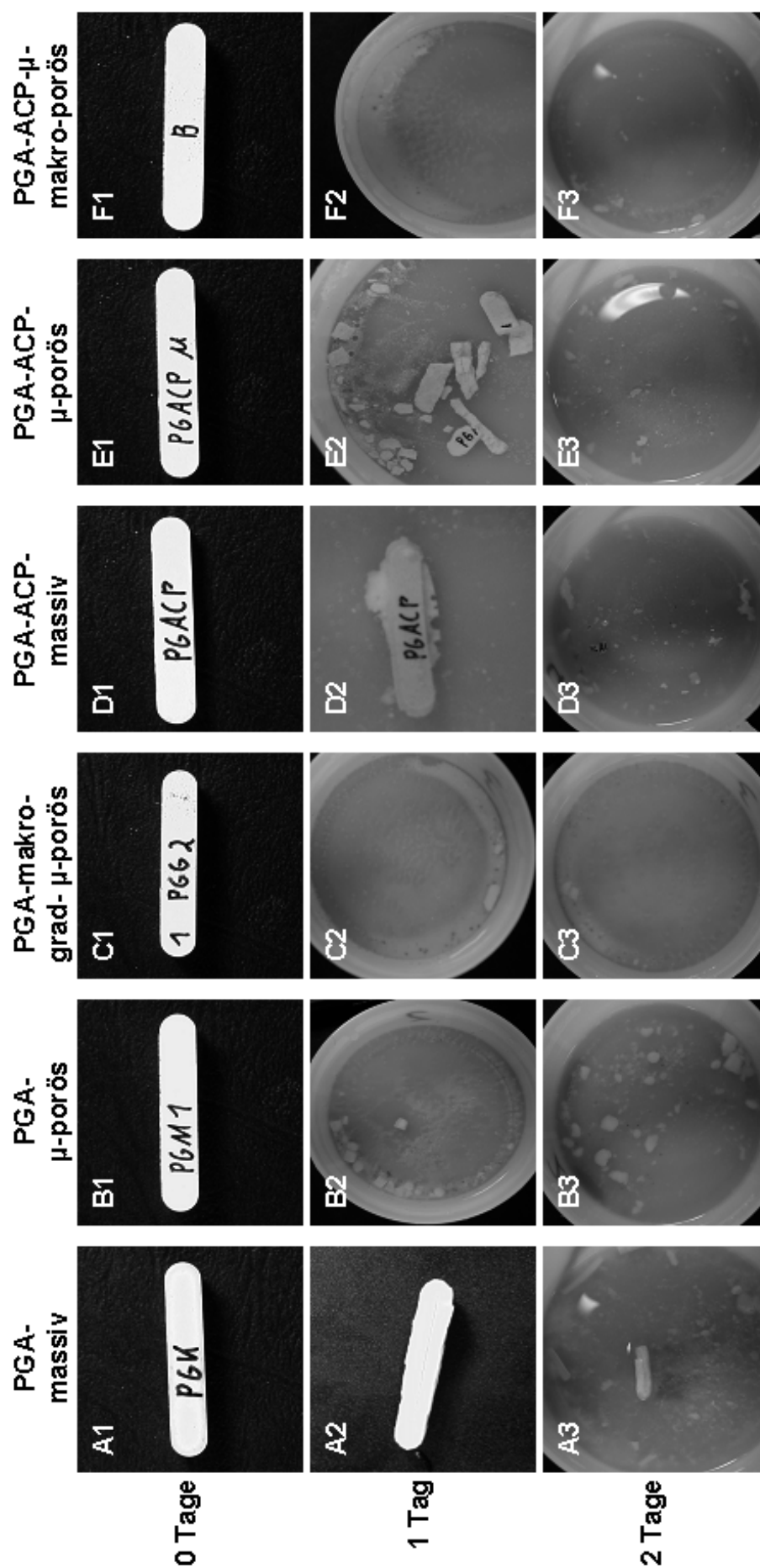


Abbildung C.25: Auswirkungen unterschiedlicher Porositäten auf die Degradation von Formkörpern aus Polyglykolid und Polyglykolid/Carbonat-ACP-Kompositmaterial

Degradation von gradierten Körpern aus PGA und PGA/Carbonat-ACP

Die Auswirkungen, die eine gradierte Verteilung einer enthaltenen Carbonat-ACP-Phase auf das Abbauverhalten von Formkörpern mit unterschiedlichen Porositäten hat, zeigen die ersten drei Spalten in **Abbildung C.26**. Im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen bleibt der Formkörper aus dem massiven Material am längsten formstabil. Zwar zeigt auch dieser Körper bereits nach einem Tag deutliche Anzeichen einer Degradation, doch ist die äußere Form im direkten Vergleich mit porösen Formkörpern weitgehend erhalten geblieben.

Die übrigen Körper mit μ -Poren sowie μ - und Makroporen weisen zu diesem Zeitpunkt bereits einen vollständigen Verlust ihrer äußeren Form auf. Dies gilt ebenso für den Fall eines in zwei Bereiche unterteilten, massiven Probekörpers, dargestellt in **Abbildung C.26 D1-D3**.

Dieser Körper weist im Gegensatz zu den übrigen Körpern keine gradierte Verteilung des Carbonat-ACP auf, sondern besteht aus zwei scharf abgegrenzten Bereichen ohne Carbonat-ACP (linke Hälfte) und mit Carbonat-ACP (rechte Hälfte).

Die Gesamtmenge des enthaltenen Apatits ist jedoch mit denen der übrigen Körper identisch. Das auch dieser massive Körper bereits nach einem Tag in der Pufferlösung vollständig erodiert ist zeigt, dass die Art der Verteilung des Apatits in den Formkörpern durchaus den Degradationsverlauf beeinflussen kann. Eine gerichtete Degradation, hervorgerufen durch die gradierte Verteilung der Apatitphase, konnte jedoch an keinem der untersuchten Modellkörper beobachtet werden. Der Versuch eine solche gerichtete Degradation durch die Kombination zweier Polymere mit unterschiedlich langen Degradationszeiten zu realisieren, zeigt die **Abbildung C.26 E1 – E3**. Hierbei handelt es sich um einen massiven Formkörper aus Polyglykolid mit einem von links nach rechts kontinuierlich steigendem Anteil von Poly(L-lactid). Da die Degradationsgeschwindigkeit von PLLA wesentlich langsamer ist, als die von PGA, sollte mit zunehmendem Anteil von PLLA die Degradation verzögert werden und so ein gradierter Abbau des Formkörpers erreicht werden. **Abbildung C.26 E1 - E3** ist zu entnehmen, dass ein solcher Körper zwar geringfügig stabiler ist als ein vergleichbarer Körper mit einem Apatitgradienten (**Abb. C.26 A1-A3**), jedoch zeigt auch dieser Körper unter den Versuchsbedingungen keinen gradierten Abbaumechanismus.

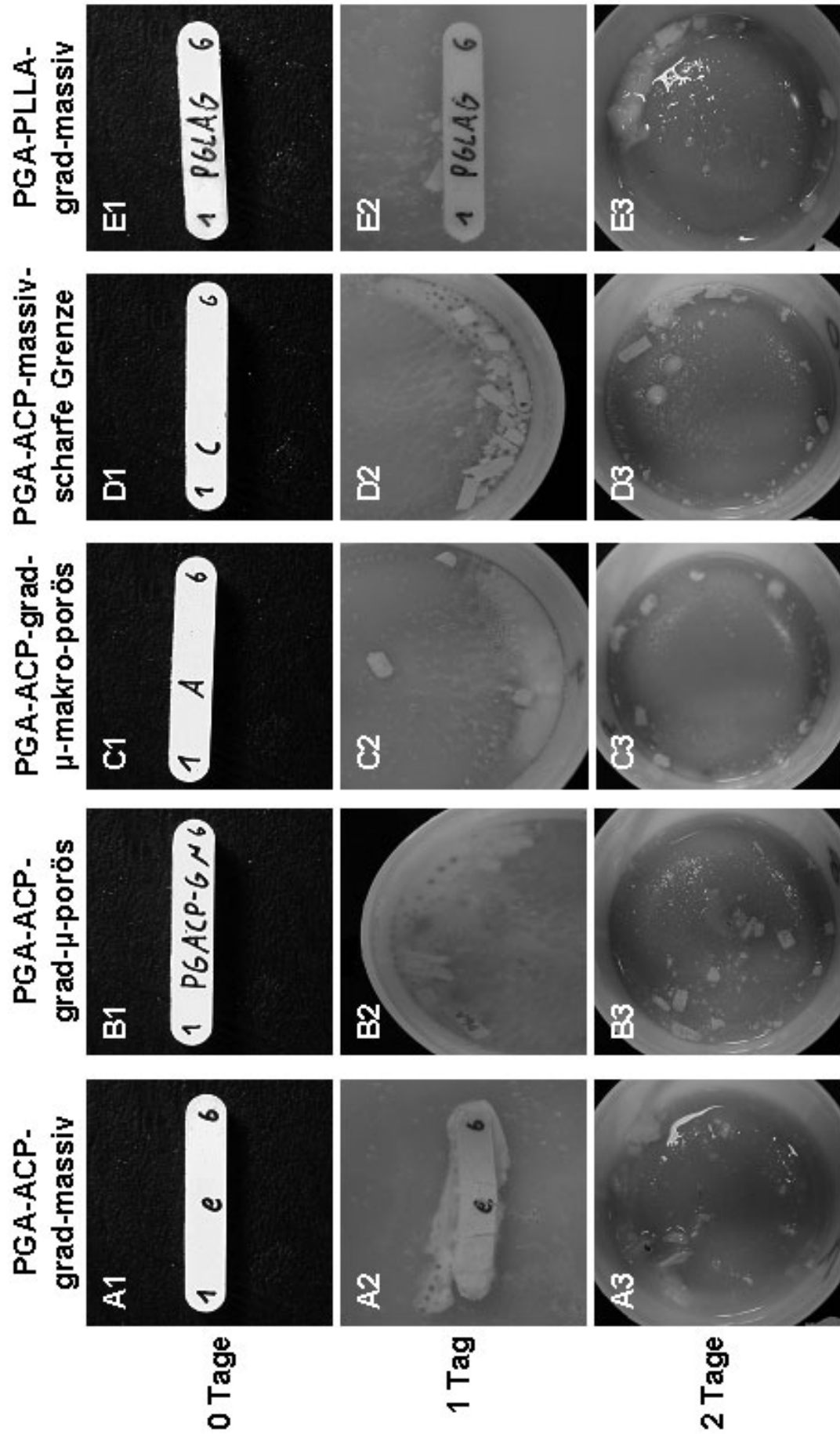


Abbildung C.26: Degradation von Formkörpern aus Polyglykolid/Carbonat-ACP-Kompositmaterial.

Degradation von Körpern aus PGA und PGA/Carbonat-ACP mit reduzierter Puffermenge

Um das Abbauverhalten von PGA/Carbonat-ACP-Kompositmaterialien *in vivo* zu simulieren, wo eine Pufferung des pH-Wertes nur im begrenzten Rahmen durch umgebende Körperseren erfolgen kann, wurde in der in **Abbildung C.27** abgebildeten Versuchsreihe das Volumen der Pufferlösung von 150 mL auf 10 mL verringert, wobei diese jedoch täglich gewechselt wurde. Getestet wurde das Abbauverhalten einiger ausgewählter Implantate aus den beiden vorherigen Degradationsexperimenten, die hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und Porenstruktur an die Knochenstruktur angepasst wurden.

Tabelle C.7: Gemessene pH-Werte während der in Abbildung C.27 dargestellten beschleunigten Degradation von Formkörpern in 10 mL Pufferlösung

Bezeichnung des Formkörpers	25 h pH-Wert	48 h pH-Wert	72 h pH-Wert
PGA-ACP- μ -porös (A1-A4)	4.1	4.5	5.3
PGA-ACP- μ -makro-porös (B1-B4)	4.3	5.0	5.8
PGA-ACP-grad- μ -porös (C1-C4)	4.2	4.9	5.5
PGA-ACP-grad- μ -makro-porös (D1-D4)	4.3	5.3	6.1
PGA-ACP-massiv-scharfe Grenze (E1-E4)	3.7	4.3	5.1
PGA-PLLA-grad-massiv (F1-F4)	3.1	3.6	4.4

Es fällt bei der Betrachtung dieser Abbildung auf, dass die Probekörper im Vergleich zu den beiden vorhergehenden Studien ca. einen Tag länger formstabil bleiben. Bei einer Gesamtdauer von 2 – 3 Tagen bis zur vollständigen Erosion ist dies eine deutliche Steigerung der Degradationszeit.

Dass sich die Ursache dieser längeren Degradationszeiten auf die begrenzte Kapazität der Pufferlösung zurückzuführen lässt, wird deutlich, wenn man die während der Degradation gemessenen pH-Werte aus **Tabelle C.7** berücksichtigt. Diese belegen, dass bereits nach einem Tag bei allen untersuchten Probekörpern die Kapazität der Pufferlösung überschritten ist, so dass pH-Werte zwischen 3.1 und 4.3 gemessen werden. An dieser Übersäuerung der Pufferlösung ändert auch die tägliche Erneuerung der Pufferlösung wenig. Zwar steigen die pH-Werte in der Folge etwas an, doch bleiben sie auch weiterhin im sauren Bereich.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit ähnlichen Beobachtungen aus Kapitel C.I, wo für Formkörper in wässriger Lösung mit einem pH-Wert von 2.5 bis 4.0 ebenfalls eine erhöhte Formstabilität gefunden wurde, verglichen mit Körpern in pH-neutraler Pufferlösung. Die Absenkung des pH-Wertes überrascht insofern, da der Anteil an basischem Carbonat-ACP im Kompositmaterials so gewählt wurde, dass eine dauerhafte pH-Wertstabilisierung bei pH 7.4 erreicht werden sollte.

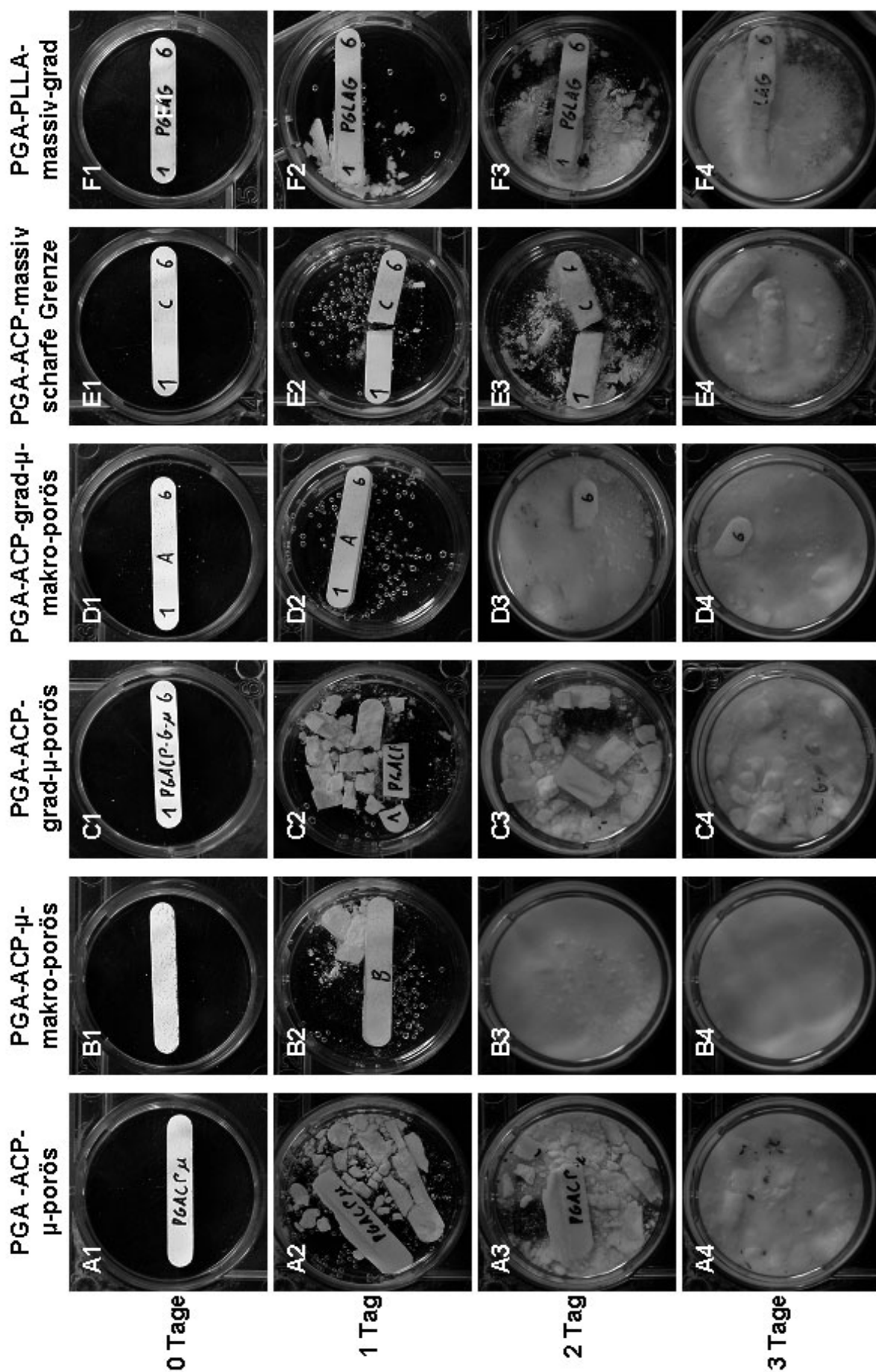


Abbildung C.27: Degradation von Formkörpern aus Polyglykolid/Carbonat-ACP Kompositmaterial bei reduzierter Pufferkapazität.

Das es trotzdem zu einem Absinken des pH-Wertes kommt, ist als Beleg für die deutliche Zunahme der hydrolytischen Esterspaltung bei einer Temperatur von 70 °C zu werten. Dies führt zu einer so hohen Freisetzung von sauren Degradationsprodukten, dass der in den Formkörpern enthaltene Anteil an basischem Carbonat-ACP nicht mehr in der Lage ist, diese zu neutralisieren.

Bei ähnlichen Degradationsstudien, die jedoch bei einer Temperatur von 37 °C in 10 ml eines gepufferten Zellnährmediums (α -MEM; *minimum essential medium*) durchgeführt wurden, blieb der pH-Wert indes über einen Zeitraum von 30 Tagen konstant zwischen pH 7.2 und 7.6.^[125]

Dies zeigt erneut die begrenzte Korrelation zwischen Ergebnissen von Degradationsstudien bei erhöhten Temperaturen und Studien bei 37 °C. Diese Studie zeigt jedoch auch, dass die in den Formkörpern enthaltene Menge an Carbonat-ACP allein nicht ausreicht, um die während der vollständigen Degradation freigesetzten sauren Abbauprodukte zu neutralisieren. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass auch bei einer Degradation bei 37 °C ab einem gewissen Zeitpunkt ein Absinken des pH-Wertes beobachtet werden würde.

Betrachtet man den Abbau der einzelnen Kompositmaterial-Formkörper genauer, so zeigt der direkte Vergleich von Körpern mit unterschiedlicher Porosität (**Abbildung C.27 A1-A4 und B1-B4**), dass die Einführung zusätzlicher Makroporen zu einer beschleunigten Erosion des Probekörpers führt. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass es in zwei Fällen zu einem gradierten Abbau des Formkörpers kommt. Besonders gut erkennen lässt sich dieses Phänomen am Probekörper mit einem gradierten Übergang des Polymers von reinem Polyglykolid zu reinem Poly(L-lactid) (**Abbildung C.27 F1-F4**). Hier erfolgt die Zersetzung des Körpers auf der PGA-reichen Seite (links) deutlich schneller als auf der PLLA reichen Seite (rechts).

Einen ähnlichen Verlauf zeigt auch die Zersetzung des Formkörpers in den Bildern **D1 – D4**. Hierbei handelt es sich um einen μ -porösen Körper mit zusätzlichen Makroporen und einer gradierten Verteilung des Carbonat-ACP. Wie die Bilder belegen, erfolgt die Zersetzung des Körpers bevorzugt auf der linken Seite des Körpers mit einem geringen Carbonat-ACP-Anteil. Dies führt dazu, dass diese bereits nach zwei Tagen vollkommen erodiert ist, während das Fragment der rechten Seite mit einem hohen Carbonat-ACP-Anteil noch relativ intakt erscheint. Dies deutet darauf hin, dass durch die hierarchische Strukturierung des Apatits eine gradierte Steuerung des Abbauverhaltens induziert werden kann. Belegt wird dies auch durch den Vergleich mit einem analogen Formkörper ohne Apatit-Gradient (**Abb. C.27 B1–B4**), der eine homogene Zersetzung zeigt.

^[125] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A.F. Schilling, M. Amling, J. M. Rueger, M. Eppler, Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 54, 162-171

Die Ursache dafür, dass der in **Abbildung C.26 C1-C3** dargestellte Abbau eines identisch präparierten Körpers nicht graduell erfolgt, ist auf die unterschiedlichen pH-Werte der Degradationslösungen und der damit verbundenen unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Erosion zurückzuführen.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich hierbei um ein generelles Phänomen, dass die Formkörper in einer Lösung mit niedrigem pH-Wert langsamer erodieren, als bei einem pH-Wert von 7.4.

Da die gradierte Verteilung des Carbonat-ACPs nicht nur zu einer gerichteten Erosion der Probekörper führt, sondern auch Vorteile hinsichtlich der Stabilität der Körper hat, wird deutlich, wenn man den Abbau eines Körpers mit einer sprunghaften Veränderung des Apatitgehalts betrachtet (**Abb.C.27 D1-D4**). Bereits nach einem Tag kommt es genau an der Grenzfläche der beiden unterschiedlichen Zusammensetzungen (in der Mitte) zum Bruch des Formkörpers.

Beschleunigte Degradation von Formkörpern aus höheren Polyhydroxycarbonsäuren

Die in **Abbildung C.28** dargestellte Degradationsreihe zeigt den Abbau von Formkörpern aus den höheren homologen Polyestern Poly(L-lactid), Poly(3-*R*-hydroxybutyrat) und Poly(3-*R*-hydroxybutyrat-co-*R*-valerat).

Diese Versuchsreihe diente dazu, die Unterschiede in den Degradationszeiträumen zwischen Formkörpern aus Polyglykolid und den höheren Polyestern aufzuzeigen. Wie erwartet verläuft bei diesen Materialien die Degradation deutlich langsamer als bei Polyglykolid.

So zeigen die Probekörper aus reinem PLLA (**Abb. C.28 A1-A4**) und PLLA/Carbonat-ACP-Kompositmaterial (**Abb. C.28 B1-B4**) nach zwei Wochen so gut wie kein Anzeichen einer Erosion. Erst nach sechs Wochen kommt es bei beiden Materialien zu einzelnen Fragmentierungen in größere Bruchstücke, die jedoch bis zum Ende der Versuchsreihe nach 10 Wochen weitgehend formstabil bleiben. Nahezu inert verhalten sich die Formkörper aus Poly(3-*R*-hydroxybutyrat) (**Abb. C.28 C1-C4**) und Poly(3-*R*-hydroxybutyrat-co-*R*-valerat) (**Abb. C.28 D1-D4**) unter den Bedingungen der beschleunigten Degradation. Im gesamten Verlauf zeigen diese beiden Materialien keinerlei Veränderung der äußeren Form und sind auch nach 10 Wochen äußerlich vollkommen intakt.

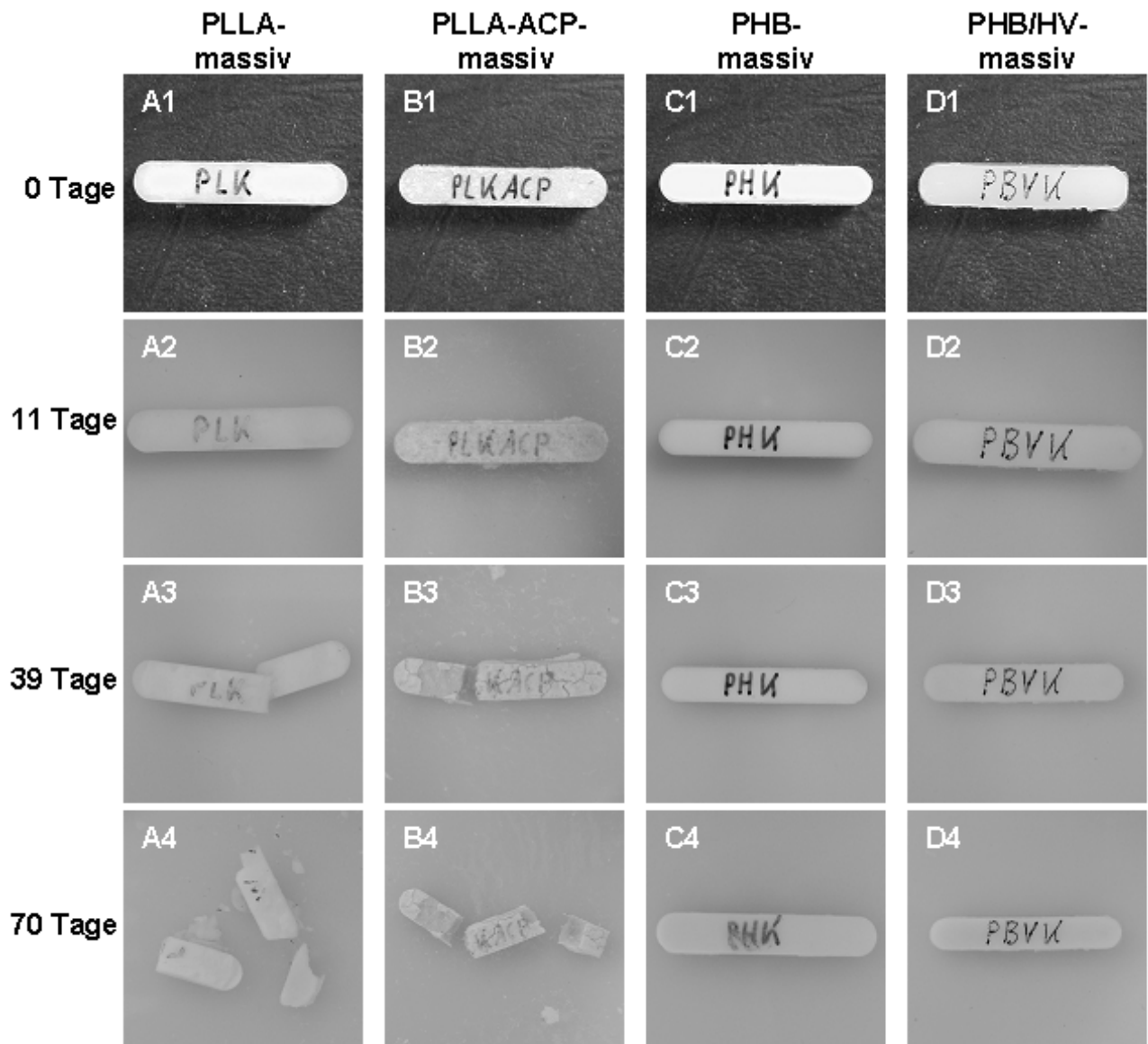


Abbildung C.28: Langzeitstudien zum Degradationsvermögen von Probekörpern aus höheren Polyestern.

C.II.IV Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die Auswirkungen verschiedener Porositäten und chemischer Zusammensetzungen auf das Abbauverhalten von Formkörpern aus Polyglykolid und dem Verbundmaterial Polyglykolid/Carbonat-ACP mit Hilfe der beschleunigten Degradation bei 70 °C untersucht. Diese Methode erlaubt es mit einem relativ geringen Materialaufwand das Degradationsverhalten einer großen Zahl unterschiedlicher Formkörper zu analysieren. Das Ziel dieser Versuchsreihe war es mit dieser Methode, die Unterschiede im Abbauverhalten von biologisch und chemisch optimierten Knochenersatzmaterialien aufzuzeigen und mit der jeweiligen Strukturierung des Körpers in Beziehung zu setzen. Es zeigte sich, dass die Bedingungen der beschleunigten Degradation einen so schnellen Abbau des Polyglykolids bewirkten, dass dies innerhalb von drei Tagen zu einer vollständigen Erosion der Formkörper

aus PGA bzw. PGA/Carbonat-ACP führte. Im Vergleich zu Degradationsstudien bei 37 °C bedeutet dies eine ca. 10fache Beschleunigung der Abbauprozesse.^[124] Dennoch ließen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Formkörpern beobachten. So zeigten sich massive Körper entgegen den Beobachtungen aus Kapitel C.I mit ungefähr einem Tag weitgehend formstabil, während alle porösen Formkörper zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig erodiert vorlagen. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die reduzierte Oberfläche und das erschwerte Eindringen der Pufferlösung in das kompakte Material zurückführen. Interessanterweise ließen sich nur geringfügige Unterschiede im Abbauverhalten zwischen Körpern aus PGA und PGA/Carbonat-ACP feststellen, so konnte lediglich bei massiven Körpern ein seitliches Aufquellen des enthaltenen Carbonat-ACP beobachtet werden. Auswirkungen einer gradierten Strukturierung der Formkörper hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung und Porosität konnten aufgrund der hohen Degradationsgeschwindigkeit bei den Degradationsexperimenten mit einem konstanten pH-Wert von 7.4 nicht festgestellt werden. Unterschiede zeigten sich erst bei einer Reduzierung der Pufferlösung von 150 ml auf 10 ml. Diese Experiment dienten dazu die begrenzte Pufferkapazität in vivo zu simulieren und Aussagen über das Ausmaß der zu erwartenden pH-Wertabsenkung treffen zu können.

Im Verlauf dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die Esterspaltung bei einer Temperatur von 70 °C so beschleunigt wird, dass die Pufferlösung und die Carbonat-ACP-Phase nicht in der Lage sind, die sauren Abbauprodukte zu neutralisieren, so dass in der Folge der pH-Wert der Pufferlösung trotz täglicher Erneuerung bis auf Werte von pH 3 bis 4 absank. Im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen aus Kapitel C.I erwiesen sich die Formkörper bei diesen niedrigen pH-Werten generell formstabiler.

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Absinken des pH-Wertes eine Verringerung der Wasseraufnahme bewirkt.^[126] Als Ursache gilt die Verringerung des osmotischen Druckes mit dem der Puffer in die Polymermatrix eindringt um saure Endgruppen zu Neutralisieren. Dies bremst somit die Prozesse die zur Erosion der Formkörper führen.^[127] Diese verzögerte Erosionsgeschwindigkeit führt dazu, dass nun Einflüsse der Struktur auf den Abbau beobachtet werden können. So weisen gradierte Formkörper in Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung unter diesen Bedingungen eine gradierte Erosion auf. Deutlich lässt sich dies bei dem Formkörper mit einem Gradienten im Carbonat-ACP-Gehalt erkennen. Dieser erodiert auf der Seite mit einem hohen Apatitgehalt langsamer als auf der Seite mit einem geringeren

^[126] S.M. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationship in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. part 1: poly(DL-lactic acid), *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1990**, 1, 123-130

^[127] S. Li, S. McCarthy, Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide), *Biomaterials* **1999**, 20, 35-44

Anteil. Offensichtlich wird dies durch die lokale Pufferung durch das Carbonat-ACP bewirkt. Einen ähnlichen Abbau zeigt auch ein Formkörper mit einem Poly(L-lactid)-Gradienten. Diese Materialien erscheinen somit prinzipiell geeignet, um ein Knochenimplantat mit einem Gradienten in der Abbaugeschwindigkeit zu konstruieren. Die ebenfalls Untersuchten höheren Polyester 3-PHB und PHB/HV zeigten keinerlei Auswirkungen auf die Degradationsbedingungen und verhielten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 70 Tagen vollständig inert.

Da es sich jedoch gezeigt hat, dass sich die Ergebnisse der beschleunigten Degradation nur begrenzt auf eine Degradation unter physiologischen Bedingungen übertragen lassen, ist eine genauere Beurteilung des Degradationsverhaltens bei 37 °C unbedingt erforderlich.

Insgesamt gesehen lassen sich mit der Methode der beschleunigten Degradation in relativ kurzer Zeit Informationen über das Degradationsverhalten von hydrolysierbaren Polymeren erhalten. Aufgrund der unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten der Polymere ist jedoch eine individuelle Anpassung der Degradationsbedingungen sinnvoll, damit der Abbau nicht zu schnell (wie bei den Formkörpern aus Polyglykolid) und nicht zu langsam (wie im Fall der Körper aus 3-PHB und PHB/HV) erfolgt. Im Fall von Polyglykolid könnte dieses zum Beispiel durch eine Reduzierung der Temperatur auf 40 – 50 °C erreicht werden.

Eine in der Literatur beschriebene Möglichkeit die Abbauprozesse bei Formkörpern aus 3-PHB oder PHB/HV zu beschleunigen ist durch eine Erhöhung des pH-Wertes der Degradationslösung anstelle der Temperatur. Wie vergleichende Studien bei pH 10.6 und 37 °C sowie pH 7.4 und 70 °C gezeigt haben, ist der Degradationsverlauf unter den zuerst genannten Bedingungen, dem Verlauf unter physiologischen Bedingungen ähnlicher.^[128]

C.II.V Verwendete Materialien

Polyglykolid

Die Synthese von Polyglykolid erfolgte durch die thermisch initiierte Festkörper-Polykondensation von Natriumchloracetat. Hierzu wurden 50.0 g (0.43 mol) des pulverförmigen Eduktes im Rundkolben mit einem Ölbad auf 180 °C erwärmt. Zur Vermeidung eines Wärmestaus durch die freiwerdende Reaktionsenthalpie und damit verbundener Pyrolyse wurde der Reaktionsansatz während der Reaktion mit einem Rotationsverdampfer ständig gerührt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde IR-spektroskopisch verfolgt und zeigte nach 4 h einen vollständigen Umsatz. Im Verlauf der Reaktion färbte sich die Reaktionsmischung leicht grau.

^[128] S.J. Holland, A.M. Jolly, M. Yasin, B.J. Tighe, Polymers for biodegradable medical devices, *Biomaterials* **1987**, 8, 289-295

Durch Waschen mit kaltem, entionisiertem Wasser wurde das als Nebenprodukt entstandene Natriumchlorid herausgelöst und eine μ -poröse Matrix erhalten.

Ausbeute: 49.2 g (98.4 % d. Theorie)

Charakterisierung: IR: [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2992/2962 (cm^{-1}) (w, C-H), 1747 (s, C=O Ester), 1627 (w, C=O Acetat-Endgruppe), 1419 (m, COO, C-H), 1229 (s, C-O, Ester), 1096 (m, C-OH Endgruppe), 974 (w), 904 (w), 808 (w), 628 (w), 594 (w) – XRD [Cu K_{α} λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in $^{\circ} 2\theta$]: 22.4, 25.8, 29.2, 31.4, 42.5, 45.5 – DSC [Heizrate 5 K min^{-1}]: T_{fus} = 194.4 $^{\circ}\text{C}$, $\Delta_{\text{fus}}H_{\text{m}}$ = 6.2 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ – EA: 39.44 % Kohlenstoff (theoretisch 41.39 %); 3.45 % Wasserstoff (theoretisch 3.47 %) – Mittleres Molekulargewicht aus Viskosimetriedaten: 1560 g mol^{-1}

Poly(L-lactid), Poly(3-R-hydroxybutyrat) und Poly(3-R-hydroxybutyrat-co-3-R-hydroxyvalerat) 9:1

Für die Präparation von Formkörpern aus diesen Materialien wurden kommerziell erhältliche Polymere verwendet. Nähere Angaben der verwendeten Polymere finden sich hierzu im Kapitel D.I [Poly(3-R-hydroxybutyrat) und Poly(3-R-hydroxybutyrat-co-3-R-hydroxyvalerat) 9:1] und im Kapitel D.II [Poly(L-lactid)]

Carbonat-ACP (B-Typ)^[129]

Das Calciumphosphat wurde von Herrn Dr. Fabian Peters zur Verfügung gestellt und wie im folgenden beschrieben hergestellt.

Eine Vorlage aus 250 mL 0.0108 M KH_2PO_4 -Lösung mit wechselnden Anteilen K_2CO_3 wurde mit einer 0.1 M KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Durch schnelles hinzugeben von 250 mL einer 0.018 molaren Lösung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ entstand ein Niederschlag, der mit einem Blaubandfilter abfiltriert wurde. Der Niederschlag wurde anschließend 12 h bei einer Temperatur von 80 $^{\circ}\text{C}$ getrocknet.^[130]

Charakterisierung: XRD [Cu K_{α} λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in $^{\circ} 2\theta$]: Das Diffraktogramm zeigt keine scharfen Reflexe, sondern zwei breite Reflexe. Einen kleinen Reflex bei 26 $^{\circ} 2\theta$ und einen größeren Reflex bei 32 $^{\circ} 2\theta$ – IR [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 1637 (OH), 1452/1420 (s, CO_3), 1038 (m, PO_4), 873 (m, CO_3), 603/565 (PO_4)

^[129] J.C. Elliot, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, in *Studies in inorganic chemistry*, 18, Elsevier, Amsterdam, London, Tokyo, **1994**

^[130] F. Peters, *Biologische Kristallisation von Calciumphosphaten – Untersuchung und Simulation*, Dissertation, Universität Hamburg, **2001**

Formkörperpräparation

PGA-massiv: Einwaage 1.12 g PGA ausgewaschenes PGA

PGA- μ -porös: Einwaage 1.30 g PGA + μ -NaCl

PGA-makro-grad- μ -porös: Einwaage von insgesamt 0.868 g PGA + μ -NaCl und 0.381 g Saccharose in sechs Segmente mit der in **Tabelle C.8** aufgeführten Zusammensetzung.

Tabelle C.8: Zusammensetzung der einzelnen Segmente eines μ -porösen Formkörpers mit einem Makroporengradienten

Segment-Nr.	Masse PGA+ μ -NaCl [g]	Masse Saccharose [g]	Volumenanteil Saccharose [%]	Gesamtporosität des Segments [%]
1	0.217	0	0	42.0
2	1.188	0.025	13.3	49.7
3	0.159	0.051	26.6	57.4
4	0.130	0.076	40.0	65.2
5	0.102	0.102	53.3	72.9
6	0.072	0.127	66.7	80.7

PGA-ACP-massiv: Einwaage von insgesamt 0.500 g PGA und 0.200 g Carbonat-ACP

PGA-ACP- μ -porös: Einwaage von insgesamt 1.000 g PGA + μ -NaCl und 0.200 g Carbonat-ACP

PGA-ACP- μ -makro-porös: Einwaage von insgesamt 0.607 g PGA + μ -NaCl, 0.122 g Carbonat-ACP und 0.267 g Saccharose

PGA-ACP-grad-massiv: Einwaage von insgesamt 0.500 g PGA und 0.200 g Carbonat-ACP in sechs Segmente mit der in **Tabelle C.9** aufgeführten Zusammensetzung.

Tabelle C.9: Zusammensetzung der einzelnen Segmente eines massiven Formkörpers mit einem Carbonat-ACP-Gradienten

Segment-Nr.	Masse PGA [g]	Masse ACP [g]	Gesamtmasse [g]	Gewichtsanteil ACP [%]
1	0.117	-	0.117	0
2	0.104	0.013	0.117	11.1
3	0.090	0.027	0.117	23.1
4	0.077	0.040	0.117	34.2
5	0.064	0.053	0.117	45.3
6	0.050	0.067	0.117	57.3

PGA-ACP-massiv-scharfe Grenze: Einwaage von insgesamt 0.500 g PGA und 0.200 g Carbonat-ACP in zwei Segmente mit der in **Tabelle C.10** aufgeführten Zusammensetzung.

Tabelle C.10: Zusammensetzung der zwei Segmente eines massiven Formkörpers mit einer scharfen Abgrenzung zwischen zwei Bereichen mit und ohne Carbonat-ACP.

Seg-Nr.	Masse PGA [g]	Masse ACP [g]	Gesamtmasse [g]	Gewichtsanteil ACP [%]
1	0.350	0	0.350	0
2	0.150	0.200	0.350	57.1

PGA-ACP-grad- μ -porös: Einwaage von insgesamt 1.000 g PGA + μ -NaCl und 0.200 g Carbonat-ACP in sechs Segmente mit der in **Tabelle C.11** aufgeführten Zusammensetzung.

Tabelle C.11: Zusammensetzung der einzelnen Segmente eines μ -porösen Formkörpers mit einem Carbonat-ACP-Gradienten

Segment-Nr.	Masse PGA+ μ -NaCl [g]	Masse ACP [g]	Gesamtmasse Ausgewaschener Körper [g]	Gewichtsanteil ACP Im ausgewaschenen Körper [%]
1	0.2	-	0.100	0
2	0.187	0.013	0.107	13.9
3	0.173	0.027	0.114	23.7
4	0.160	0.040	0.120	33.3
5	0.147	0.053	0.127	41.7
6	0.133	0.067	0.134	50.0

PGA-ACP-grad- μ -makro-porös: Einwaage von insgesamt 0.607 g PGA + μ -NaCl + 0.267 g Saccharose und 0.122 g Carbonat-ACP in sechs Segmente mit der in **Tabelle C.12** aufgeführten Zusammensetzung.

Tabelle C.12: Zusammensetzung der einzelnen Segmente eines μ - und makroporösen Formkörpers mit einem Carbonat-ACP-Gradienten

Seg-Nr.	Masse PGA+ μ -NaCl [mg]	Masse Saccharose [mg]	Masse ACP [mg]	Gewichtsanteil ACP Im ausgewaschenen Körper [%]	Gesamtporosität des Segments [%]
1	152	-	-	0	42
2	132	17.5	8.12	10.8	49.7
3	111	35.6	16.2	22.6	57.4
4	91	53.2	24.4	34.9	65.2
5	71	71.4	32.5	47.8	72.9
6	50	88.9	40.6	61.9	80.7

PGA-PLLA-grad-massiv: Einwaage von insgesamt 0.900 g PGA und 0.300 g Poly(L-lactid) in sechs Segmente mit der in **Tabelle C.13** aufgeführten Zusammensetzung.

Tabelle C.13: Zusammensetzung der einzelnen Segmente eines massiven Formkörpers mit einem gradierten Anteil von Poly(L-lactid)

Seg-Nr.	Masse PGA [g]	Masse PLLA [g]	Gesamtmasse [g]	Gewichtsanteil PLLA Im ausgewaschenen Körper [%]
1	0.200	-	0.200	0
2	0.180	0.020	0.200	10
3	0.160	0.040	0.200	20
4	0.140	0.060	0.200	30
5	0.120	0.080	0.200	40
6	0.100	0.100	0.200	50

PLLA-massiv: Einwaage von insgesamt 0.886 g Poly(L-lactid)

PLLA-ACP-massiv: Einwaage von insgesamt 0.677 g Poly(L-lactid) und 0.203 g Carbonat-ACP

3-PHB-massiv: Einwaage von insgesamt 0.872 g Poly(3-R-hydroxybutyrat)

3-PHB/HV 9:1-massiv: Einwaage von insgesamt 0.872 g Poly(3-R-hydroxybutyrat-co-3-R-hydroxyvalerat) 9:1

Die Formgebung der einzelnen Materialien erfolgte durch Heißpressen bei den in **Tabelle C.14** aufgelisteten Bedingungen.

Tabelle C.14: Verwendete Pressbedingungen zur Herstellung der Formkörper

Nr.	Bezeichnung des Formkörpers	Temperatur der Druckplatten [°C]	Druckkraft [kN]	Pressdauer [Minuten]
1	PGA-massiv	150	11	10
2	PGA-μ-porös	150	11	10
3	PGA-makro-grad-μ-porös	150	11	10
4	PGA-ACP-massiv	150	11	3
5	PGA-ACP-μ-porös	150	11	3
6	PGA-ACP-μ-makro-porös	150	11	3
7	PGA-ACP-grad-massiv	150	11	3
8	PGA-ACP-grad-μ-porös	150	11	3
9	PGA-ACP-grad-μ-makro-porös	150	11	3
10	PGA-ACP-massiv-scharfe Grenze	150	11	3
11	PGA-PLLA-grad-massiv	135	11	10
12	PLLA-massiv	125	11	10
13	PLLA-ACP-massiv	125	11	10
14	3-PHB-massiv	130	11	10
15	3-PHB/HV 9:1-massiv	115	11	10

D Medizinische Anwendungen bioresorbierbarer Polyester

Die ersten Versuche synthetische, biologisch abbaubare Polymere für Anwendungen in der Medizintechnik zu nutzen, begann in den frühen siebziger Jahren mit der Markteinführung von resorbierbaren, chirurgischen Nahtmaterialien (Dexon[®] aus Polyglykolid^[131] und Vicryl[®] aus Polylactid-co-glykolid 8:92^{[132],[133]}). Diese synthetischen Nahtmaterialien haben seitdem die bis dahin für Nähte im menschlichem Körper verwendeten Seiden- und Catgutfäden nahezu vollständig verdrängt. Die Fähigkeit des Körpers, diese Polymere vollständig zu resorbieren, führte in der Folgezeit zu einer rasanten Entwicklung dieser Materialien in zahlreichen Bereichen der Medizintechnik. Als besonders zukunftssträngige Anwendungsfelder resorbierbarer Materialien gelten:

- Die Unfallchirurgie und Orthopädie, in denen resorbierbare Stifte, Schrauben und Platten zur Frakturfixation Implantate aus Stahl ersetzen können.^{[134],[135]}
- In der kontrollierten Arzneimittelfreisetzung als Trägermaterial.^[136]
- In Rahmen des *tissue engineering* von Organen als temporär formgebende Gerüstmaterialien.^[137]

Die in den folgenden Kapitel D.I und D.II beschriebenen Untersuchungen dienten dazu, die Möglichkeiten, die diese Materialien im Bereich der Knochenersatzmaterialien und der kontrollierten Wirkstofffreisetzung bieten, aufzuzeigen und zu untersuchen. Hierbei liegt ein besonderes Augenmerk auf der Verwendung von lösungsmittelfrei hergestelltem μ -porösem Polyglykolid und Poly(lactid-co-glykolid).

^[131] E.J. Frazza, E.E. Schmitt, A new absorbable suture, *J. Biomed Mater Res Symp*, **1971**, 1, 43-58

^[132] G.L. Racy, W.R. Wallace, J. Cavalaris, J.V. Marguard, Comparison of a polyglycolic-polylactic acid suture to black silk and plain catgut in human oral tissues, *J. Oral. Surg.* **1978**, 36, 766-770

^[133] D.E. Cutright, J.D. Beasley, B. Perez, Histologic comparison of polylactic and polyglycolic acid sutures, *J. Oral. Surg.* **1971**, 32, 165-173

^[134] G.O. Hofmann, Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art, *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* **1995**, 114, 123-132

^[135] P. U. Rokkanen, O. Böstman, E. Hirvensalo, E.A. Mäkelä, E. K. Partio, H. Päätiälä, S. Vainionpää, K. Vihtonen, P. Törmälä, Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology, *Biomaterials* **2000**, 21, 2607-2613

^[136] R. Langer, New methods of drug delivery, *Science* **1990**, 249, 1527-1533

^[137] M. Sittinger, J. Bujia, N. Rotter, D. Reitzel, W.W. Minuth, G.R. Burmester, Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques, *Biomaterials* **1996**, 17, 237-242

D.I Biologische Testung von Polyester/Carbonatapatit-Kompositmaterialien

D.I.I Grundlagen

Seit Ende der sechziger Jahre gab es immer wieder Versuche, die Vorteile bioresorbierbarer Polymere auf eine Anwendung in der Osteosynthese zu übertragen. Die Idee war, Implantate aus diesen Materialien überall dort einzusetzen, wo die Funktion eines Implantates nur über einen bestimmten Zeitraum benötigt wird (temporäre Implantate). Ein solches Einsatzfeld stellt zum Beispiel die Frakturfixation von Knochenfragmenten dar.

Hierbei werden nach einer Knochenfraktur mittels Schrauben, Stiften und Platten aus Implantatstahl die Knochen so miteinander verbunden und ausgerichtet, dass ein optimales Zusammenwachsen der Knochen ermöglicht wird. Der Nachteil bei der Verwendung von konventionellen Implantaten aus Stahl ist die Notwendigkeit einer Zweitoperation, um die eingesetzten Implantate wieder zu entfernen. Bei der Verwendung von Implantaten aus einem resorbierbaren Material ist ein solcher Zweiteingriff unnötig, da sich die Implantate im Körper auflösen und metabolisiert werden. Hieraus ergäben sich nicht nur Vorteile für den Patienten (durch eine Verkürzung der Behandlungsdauer, Ersparnis des zweiten Eingriffs), sondern auch für das Gesundheitswesen (Kosteneinsparungen beim Wegfall einer Nachoperation).

Einer Verwendung von Polyhydroxycarbonsäuren als Knochenersatzmaterial stand lange Zeit eine mangelnde mechanische Stabilität gegenüber, so dass der erste Einsatz derartiger Implantate aus Polyglykolid am Menschen erst 1984 durch P. Rokkanen und P. Törmälä erfolgte.^[138]

Sie konnten im Rahmen einer Studie mit 56 Patienten zeigen, dass Implantate aus faserverstärktem Polyglykolid (*self-reinforced* PGA) anstelle von Stahl bei Frakturen im oberen Sprunggelenk ohne Nachteil für die Patienten verwendet werden konnten. Die eingesetzten Implantate waren nach ca. 36 Monaten vom Körper nahezu vollständig abgebaut. Die im Zuge der Degradation abnehmende mechanische Stabilität der Knochenschrauben erwies sich aus biomechanischer Sicht als förderlich für die Knochenneubildung (Osteosynthese). Durch den mechanischen Impuls auf die sich neu bildende Knochenstruktur wurde eine zusätzliche Wachstumsstimulation induziert.^[139]

Obwohl Implantate aus resorbierbaren Materialien in zahlreichen Studien keine Komplikationen zeigten, gibt es auch Studien, die auf Probleme während des Heilungsprozesses hinweisen. So führte beispielsweise die Verwendung von Stiften und Schrauben aus Polyglykolid im Bereich des Knöchels bei Patienten zu Dejustierungen der Fraktur, Entzündungen und zum völligen

^[138] P. Rokkanen, O. Böstman, S. Vainionpää et al., Biodegradable implants in fracture fixation: early results in treatment of fractures of the ankle, *Lancet* **1985**, 1422-1424

^[139] O. Böstman, S. Vainionpää, E. Hirvensalo, Biodegradable internal fixation for malleolar fractures, *J. Bone Joint Surg.* **1987**, 69-B, 615-619

Versagen des Implantates.^[140] Weiterhin konnten während des Abbaus dieser Implantate, besonders bei älteren Patienten unspezifische Fremdkörper-Reaktionen sowie osteolytische Knochenveränderungen beobachtet werden.^{[141],[142],[143]}

Solche Immunreaktionen lassen sich unter anderem auf die Akkumulation von zelltoxischen Abbauprodukten im Zuge der Degradation zurückführen. So werden im Verlauf des Degradationsprozesses Hydroxycarbonsäure-Monomere freigesetzt, die zu einer gewebeschädigenden lokalen pH-Wert Absenkung deutlich unter das physiologische Niveau von pH 7.4 führen können.^[144]

In vitro Tests an Bakterienkulturen mit verschiedenen bioresorbierbaren Polymeren bestätigten die toxische Wirkung der oben beschriebenen Degradationsfolgen.^[145] Inwieweit sich diese Ergebnisse auf die Verhältnisse im menschlichen Körper übertragen lassen, bleibt jedoch unklar.

Neuere Konzepte, die diesen Erkenntnissen Rechnung tragen, sehen eine Materialreduktion durch die Verwendung poröser Materialien vor, mit dem Ziel, die Gesamtmenge des vom Körper abzubauenen Materials drastisch zu verringern.^[146]

Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die mit einer Materialreduktion einhergehende Abnahme der mechanischen Stabilität (vgl. **Abb. D.1**).^[147]

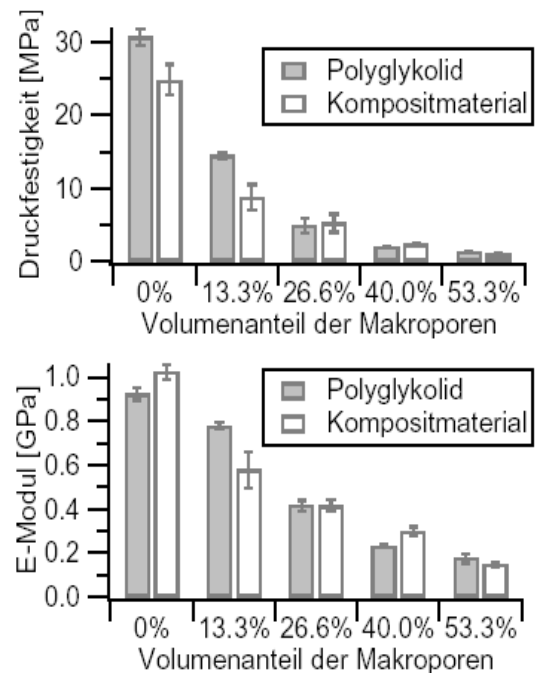


Abbildung D.1: Druckfestigkeit und E-Modul von μ -porösen PGA und μ -porösen PGA/Carbonat-ACP-Kompositmaterial 5:2 in Abhängigkeit vom Volumenanteil zusätzlicher Makroporen von 250-400 μ m Größe.^[147]

^[140] O. Böstman, E. Hirvensalo, S. Vainionpää, Ankle fractures treated using biodegradable internal fixation, *Clin. Orthop. Related. Res.* **1989**, 238,195-203

^[141] O. Böstman, Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants, *J. Bone Joint Surg* **1991**, 73-B, 679-682

^[142] U. Pääväranta, O. Böstman, A. Majola, T. Toivonen, P. Törmälä, P. Rokkanen, Intraosseous cellular response to biodegradable fracture fixation screws made of polyglycolide or polylactide, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **1993**, 112, 71-74

^[143] A. Weiler, H. Helling, U. Kirch, T. Zirbes, K.E. Rehm, Foreign-body reactions and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation – Experimental study in sheep, *J. Bone. Joint. Surg.* **1996**, 78 B, 369-376

^[144] F. W. Cordewener, M.F. van Geffen, C.A.P. Joiasse, J.P. Schmitz, R.R.M. Bos, F.R. Rozema, A.J. Pennings, Cytotoxicity of poly(96L/4D-lactide): the influence of degradation and sterilization, *Biomaterials* **2000**, 21, 2433-2442

^[145] M.S. Taylor, A.U. Daniels, K.P. Andiano, J. Heller, Six bioabsorbable polymers: *in vitro* acute toxicity of accumulated degradation products, *J. Appl. Biomater.* **1994**, 5, 151-157

^[146] J.W. Leenslag, A.J. Pennings, R.R.M. Bos, F.R. Rozema, G. Boering, Resorbable materials of poly(L-lactide). VI. Plates and screws for internal fracture fixation, *Biomaterials* **1987**, 8, 70-73

^[147] C. Schiller, M. Siedler, F. Peters, M. Eppe, Functionally graded materials of biodegradable polyesters and bone-like calciumphosphates for bone replacement, *Ceramic Trans.* (im Druck)

Um die Anwendungsmöglichkeit von Implantaten aus resorbierbaren Polymere auch um die Auffüllung größerer Knochendefekte zu erweitern, wie sie zum Beispiel bei Trümmerfrakturen oder nach der Behandlung von Knochentumoren entstehen, ist somit erst eine Steigerung der mechanischen Eigenschaften und die Erhöhung der biologischen Verträglichkeit notwendig.

Die Behandlung solch ausgedehnter Knochendefekte stellt in der Medizin nach wie vor ein besonderes Problem dar.^[148] Üblicherweise wird ein solcher Defekt mit autologem Knochen aus dem Beckenkamm des Patienten aufgefüllt, dessen Menge somit nur begrenzt zur Verfügung steht und einen zusätzlichen Entnahmeeingriff erfordert. In bis zu 70 % dieser Fälle kommt es dabei zu Komplikationen.^[149]

Die Verwendung keramischer Knochenersatzmaterialien aus Hydroxylapatit, zum Beispiel des Produkts ENDOBON[®] der Firma Merck Biomaterialien, gewährleistet zwar die notwendige Stabilität am Implantationsort, im Langzeitversuch zeigte sich jedoch, dass dieses Material aufgrund seiner chemischen Struktur nicht geeignet ist, vom Körper in eigenen Knochen umgewandelt zu werden (*remodeling*).^[150] Es besteht daher weiterhin ein Bedarf an einem Knochenersatzmaterial, welches unbegrenzt verfügbar ist und folgende Anforderungen erfüllen sollte:

1. Interkonnektierende Porosität, um einen Stoffaustausch von einwachsenden knochenbildenden Zellen zu ermöglichen (Bioaktivität). Dies ist Voraussetzung für eine gute Bindung zum Knochen (Osteokonduktivität).
2. Knochenähnliche Festigkeit und konstante Stabilität des Verbundes Implantat/neu wachsender Knochen während der gesamten Implantationszeit.
3. Eine Substratwirkung durch die Freisetzung von Abbauprodukten (z.B. Calcium-Freisetzung) aus dem Implantat, die den Knochenneuaufbau beschleunigen (Osteoinduktion).
4. Reproduzierbar gleichbleibende Materialeigenschaften (Qualitätssicherung) und die Möglichkeit der Formgebung durch übliche Prozesstechniken, z.B. Extrusion oder Schmelzpressen.
5. Die Möglichkeit einer kontinuierlichen Freisetzung von Antibiotika und/oder Wachstumsfaktoren, um Infektionen zu verhindern und die Heilungsdauer zu senken.

^[148] G.O.Hofmann, M.H. Kirschner, O. Gonschorek, V. Bühren, Überbrückung langstreckiger Knochen- und Gelenkdefekte durch allogene vaskularisierte Transplantate, *Unfallchirurg* **1999**, 102, 458-465

^[149] B.W. Wippermann, H.E. Schratt, S. Steeg, H. Tscherne, Komplikationen der Spongiosaentnahme am Beckenkamm. Eine retrospektive Analyse von 1191 Fällen, *Chirurg*. **1997**, 68, 1286-1291

^[150] W. Linhart, N.M. Meenen, J. M. Rueger, Knochenersatzmaterialien: Neue Möglichkeiten und Techniken, *OP-Journal* **2000**, 16, 294-298

Es erweist sich als äußerst schwierig, ein einzelnes Material zu finden, welches all diesen Anforderungen gerecht wird, so dass ein vielversprechender Ansatz daher die Kombination von verschiedenen Werkstoffen zu sogenannten Kompositmaterialien darstellt. Besonders vielversprechend erscheint die Kombination aus resorbierbaren Polyestern mit knochenähnlichen Keramiken, wie zum Beispiel Hydroxylapatit, dem Hauptbestandteil des menschlichen Skeletts.^[151]

Hierbei ist das Ziel, durch Anpassung an die Struktur des Knochens eine Materialoptimierung zu erzielen, insbesondere im Hinblick auf die Stabilität. Natürlicher Knochen ist ebenfalls ein Kompositmaterial und besteht aus einem porösen Verbund von hartem Hydroxylapatit (70 Gew.-%), verantwortlich für die Druckfestigkeit und Collagenfasern, die als Faserverstärkung wirken und Zug sowie Torsionskräfte aufnehmen.

Entsprechende Messungen an Kompositmaterialien aus Poly(L-lactid) und Hydroxylapatit ergaben, dass sich auf diese Weise tatsächlich eine Steigerung der mechanischen Eigenschaften, im Vergleich zum reinem Polymer erzielen lässt.^[152] Als Problem während der Resorption könnte sich hierbei die Verwendung von reinem Hydroxylapatit als keramische Komponente erweisen. Im menschlichen Knochen erfolgt die Knochenneubildung durch spezielle Zellen, den Osteoblasten. Bei der von ihnen produzierten mineralischen Phase handelt es sich um einen röntgenamorphen, nanokristallinen Carbonatapatit (Dahllit).^[153] Der Knochenabbau erfolgt durch Osteoklasten, die in der Lage sind, mittels Ionenpumpen auf der Knochenoberfläche ein lokales, saures Milieu zu erzeugen, wodurch der Apatit aufgelöst wird. Diese beiden Prozesse stehen miteinander im Gleichgewicht und bewirken eine ständige Erneuerung des Knochens (*remodeling*). Da jedoch, wie die XRD-Messungen in **Abbildung D.2** zeigen, synthetischer Hydroxylapatit deutlich kristalliner und somit thermodynamisch wesentlich stabiler

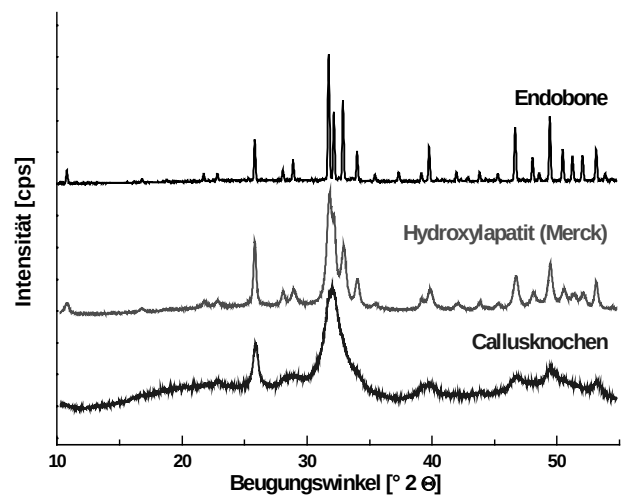


Abbildung D.2: Unterschiede in der Kristallinität von Hydroxylapatit-Keramiken und humanem Knochenmineral.

^[151] P. Ylinen, Filling of bone defects with porous hydroxyapatite reinforced with polylactide or polyglycolide fibers, *J. Mater. Sci., Mater. Med.* **1994**, 5, 522-528

^[152] N. Ignjatovic, S. Tomić, M. Dakić, M. Miljković, M. Plavšić, D. Uskoković, Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials, *Biomaterials* **1999**, 20, 809-816

^[153] S. Weiner, H.D. Wagner, The material bone: structure-mechanical function relations, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **1998**, 28, 271-298

ist als Dahllit, sind die Osteoklasten nicht mehr in der Lage, diesen zu resorbieren.^[154]

Im Arbeitskreis von Prof. Epple sollte durch die Entwicklung von amorphen Calciumphosphaten (ACP), die in ihrer Struktur der des Knochens angenähert sind, eine Resorption durch Osteoklasten ermöglicht werden. In Kombination mit porösem, festkörperchemisch dargestelltem Polyglykolid erwies es sich als zusätzlicher Vorteil, dass das verwendete Carbonat-ACP in wässriger Lösung basisch reagiert. So wird eine Absenkung des pH-Wertes während der Degradation des Polyglykolids durch das Carbonat-ACP verhindert und dauerhaft auf physiologischem Niveau stabilisiert. Die sehr gute Bioverträglichkeit von solchen porösen Polyglykolid / Carbonat-ACP-Kompositen konnte bereits *in vitro* an Osteoblastenkulturen erfolgreich nachgewiesen werden.^[155]

Es zeigte sich jedoch, dass bei einer Verwendung von Polyglykolid als Polymerkomponente die mechanische Stabilität sehr schnell nachlässt und eine mögliche Nutzung nur bei geringer Belastung über relativ kurze Zeiträume erfolgen kann (vgl. **Abb. D.1**). Eine Anwendung dieses Materials wäre somit auf unbelastete Defekte oder das *tissue engineering* beschränkt. Hierbei dienen abbaubare Polyester über einen gewissen Zeitraum als formgebende Gerüststrukturen von unterschiedlichen Geweben.

Die folgenden Untersuchungen hatten somit das Ziel, die Möglichkeiten zu überprüfen, inwieweit sich das Konzept der pH-stabilisierten Polymer/Carbonat-ACP-Kompositmaterialien auf mechanisch und hydrolytisch stabilere, höhere Polyester wie Poly(3-*R*-hydroxybutyrat) [P(3-HB)] und Poly(3-*R*-hydroxybutyrat-co-3-*R*-hydroxyvalerat) [P(3-HB/3-HV)], übertragen lässt.

Die Herstellung dieser Polyester erfolgt im Gegensatz zu PGA und PLLA nicht durch eine ringöffnende Polymerisation, sondern im Bioreaktor durch Mikroorganismen. Durch dieses Herstellungsverfahren gelingt es, diese Polymere mit hohen Kettenlängen herzustellen, so dass besonders die gewonnenen P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) interessante Materialeigenschaften aufweisen. Die in **Tabelle D.1** aufgeführten mechanischen Eigenschaften dieser beiden Polymere liegen dabei in etwa im Bereich der bekannten Materialien PGA, PLLA und PDLLA. Da sie jedoch wesentlich unempfindlicher gegenüber einer hydrolytischen Kettenspaltung sind (vgl. Kapitel C.II), bleiben ihre mechanischen Eigenschaften über einen deutlich längeren Zeitraum erhalten.

^[154] F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis, *Thermochim. Acta.* **2000**, 361, 131-138

^[155] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A.F. Schilling, M. Amling, J.M. Rueger, M. Epple, Biologically and chemically optimised composites of carbonate apatite and polyglycolide as bone substitution materials, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 54, 162-171

Tabelle D.1: Übersicht der mechanischen Eigenschaften verschiedener bioabbaubarer Polyester im Vergleich zu Polypropylen (PP), Polyethylenterephthalat (PET), Stahl und Knochen.

Polymer	Elastizitätsmodul (Young's modulus) [GPa]	Zugfestigkeit [MPa]	Bruchdehnung [%]
P(3-HB)	2.8 ^[156] –3.5 ^[157]	36 ^[156] –40 ^[157]	2.5 ^[156] –8 ^[157]
P(3-HB/3-HV) 9:1	1.2 ^[157] –1.3 ^[156]	32 ^[157]	17 ^[156] –50 ^[157]
SR-PGA	12 ^[158]	360 ^[158]	-
PLLA	1.4–3.3 ^[156]	28–50 ^[156]	2.0–6.0 ^[156]
PDLLA	2.0–2.4 ^[156]	29–35 ^[156]	6.0–5.0 ^[156]
PP	1.7 ^[157]	38 ^[157]	400 ^[157]
PET	2.9 ^[157]	70 ^[157]	100 ^[157]
Stahl	200 ^[158]	280 ^[158]	-
Knochen	18 ^[159]	180 ^[158]	-

Ein weiterer Vorteil dieser langsamen Degradationsrate lässt sich den in **Abbildung D.3** aufgetragenen pH-Wert Messungen der reinen Polymere entnehmen. Im Vergleich zu PGA, dessen pH-Wert innerhalb von 16 Stunden auf pH 4.2 absinkt, belegen die Messkurven, dass die pH-Werte von P(3-HB) mit pH 6.0 und P(3-HB/3-HV) mit pH 7.7 relativ konstant in der Nähe des physiologischen Bereichs von 7.2 –7.6 bleiben. Dies gilt zwar auch für Poly(L-lactid), dessen pH-Wert mit pH 7.8 in einem ähnlichen Bereich liegt. Im Vergleich zu diesem Material zeichnen sich jedoch P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) zusätzlich durch eine relativ hohe thermische Stabilität aus, so dass eine Verarbeitung dieser Materialien mit konventionellen Prozesstechniken wie Extrudieren, Schmelzpressen und Spritzgießen möglich ist.^{[160],[161]}

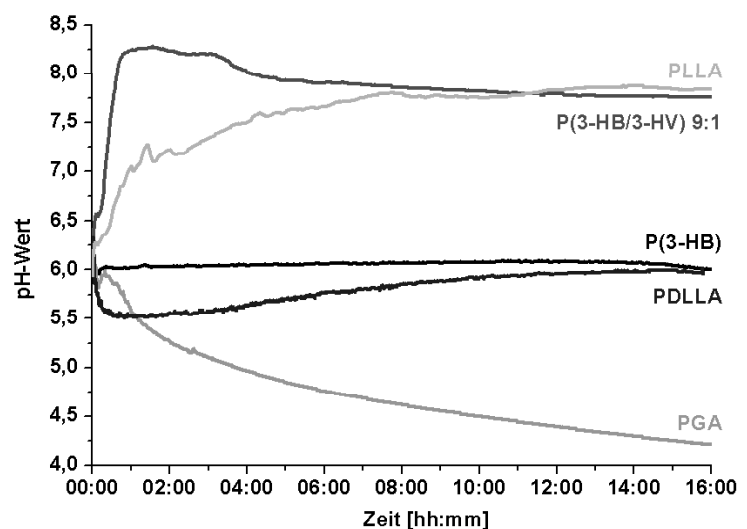


Abbildung D.3: pH-Wert-Verlauf verschiedener bioresorbierbarer Polymere in entionisiertem Wasser.

^[156] I. Engelberg, J. Kohn, Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study, *Biomaterials* **1991**, 12, 292–304

^[157] D. Seebach, A. Brunner, B.M. Bachmann, T. Hoffmann, F.N.M. Kühnle, U.D. Lengweiler, Biopolymers and – oligomers of (R)-3-hydroxyalcanoic acids – Contributions of synthetic organic chemists, *Lectures of the Ernst Schering Foundation*, **1995**, 28, S. 11

^[158] P. Törmälä, P. Rokkanen, Biodegradable polymers in orthopaedics: Experimental and clinical in *Materials in Clinical Applications* (Hrsg.: P. Vincenzini), Techna Srl. **1995**, S. 639–651

^[159] J.C. Keller, E.P. Lautenschlager in *Handbook of biomaterials evaluation* (Hrsg.: A.F. Recum), Macmillan Publishing Company, New York, **1986**, 7

^[160] S. Gogolewski, M. Jovanovic, S.M. Perren, J.G. Dillon, M.K. Hughes, The effect of melt processing on degradation of selected poly(hydroxyacids): polylactides, polyhydroxybutyrate, polyhydroxybutyrate-co-valerates, *Polymer Degradation and Stability* **1993**, 40, 313–322

^[161] M. Kunioka, Y. Doi, Thermal degradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules* **1990**, 23, 1933–1936

Im Gegensatz hierzu führt die hohe Empfindlichkeit von Poly(L-lactid) gegenüber hohen Temperaturen, besonders in Verbindung mit Feuchtigkeit und Katalysatorrückständen, zu einer Verringerung der Kettenlänge und somit zu einer signifikanten Verschlechterung der Materialeigenschaften.^{[162],[163]} Aufgrund ihrer beschriebenen, vorteilhaften Eigenschaften und der potentiellen Möglichkeit P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) auch auf festkörperchemischem Weg zu synthetisieren,^[164] dienten die folgenden Untersuchungen dazu, die Bioverträglichkeit von Kompositmaterialien aus diesen Polyestern und knochenähnlichem Carbonat-ACP *in vitro* durch Zellbesiedlungsexperimente zu überprüfen.

In der Literatur beschriebene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu diesem Thema bescheinigen diesen Polyestern zwar eine durchweg gute Verträglichkeit und keinerlei Anzeichen von schädlichen Gewebereaktionen, jedoch wurde in keiner dieser Untersuchungen speziell die Reaktion der knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, gegenüber diesen Materialien und ihren Degradationsprodukten überprüft.^{[165],[166],[167]} Dieses scheint aber um so wichtiger, da es signifikante Unterschiede im Verhalten von vielfach verwendeten Fibroblasten sowie Osteoblasten-ähnlichen Zelllinien (MC3T3-E1) und Primärkultur-Osteoblasten auf verschiedene Biomaterialien gibt^[168] und diese Zellen für die Verbindung zwischen Implantat und Knochen verantwortlich sind.^[169] Die im folgenden beschriebenen Zellbesiedlungsexperimente wurden deshalb mit primären Mäuse-Osteoblasten durchgeführt, die im Gegensatz zu Osteoblasten-ähnlichen immortalisierten Zelllinien noch zu allen biologischen Reaktionen in der Lage sind und somit das physiologische Verhalten von authentischen Zellen auf die zu untersuchenden Materialien widerspiegeln.

Alle durchgeführten Zellbesiedlungsexperimente sowie alle histologischen Aufnahmen wurden im Rahmen einer Kooperation an der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durchgeführt.

^[162] S. Gogolewski, Resorbable materials in orthopedic surgery in *Die Plattenosteosynthese und ihre Konkurrenzverfahren*, (Hrsg.: D. Wolter und W. Zimmer), Springer Verlag, Berlin, **1991**, S. 340-349

^[163] K. Jamshidi, S.-H. Hyon, Y. Ikada, Thermal characterization of polylactides, *Polymer* **1988**, 29, 2229-2234

^[164] K. Schwarz, Biodegradable polyesters from solid-state precursors – basic components of a biomedical materials concept, Dissertation, Universität Hamburg, **2001**

^[165] C. Doyle, E.T. Tanner, W. Bonfield, *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite, *Biomaterials* **1991**, 12, 841-847

^[166] Z.B. Luklinska, W. Bonfield, Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 8, 379-383

^[167] S. Gogolewski, M. Jovanovic, S.M. Perren, J.G. Dillon, M.K. Hughes, Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA), *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, 27, 1135-1148

^[168] O.A. Trentz, R. Zellweger, M.G. Amgwerd, G.K. Uhlschmid, Testung von Knochenimplantaten auf Zelllinien und humanen Osteoblasten, *Unfallchirurg* **1997**, 100, 39-43

^[169] D.A. Puelo, L.A. Holleran, R. H. Doremus, R. Bizios, Osteoblast responses to orthopedic implant materials *in vitro*, *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, 25, 711-723

D.I.II Präparative Arbeiten

Präparation der Kompositformkörper

Zur Ermittlung eines geeigneten Mischungsverhältnisses von Polyester und Carbonat-ACP mit einem pH-Wert im physiologischen Bereich von pH 7.2 bis 7.6 wurde in einem Vorversuch die pH-Entwicklung verschiedener Zusammensetzungen gemessen. Als geeignetes Verhältnis wurde schließlich eine Zusammensetzung von jeweils 150 mg Polymer und 30 mg Carbonat-ACP ermittelt. Die entsprechenden pH-Messkurven von Tabletten dieser Zusammensetzung sind in **Abbildung D.4** aufgetragen.

Man erkennt, dass sich die pH-Werte bei 7.6 [P(3-HB/3-HV) / Carbonat-ACP] und 7.1 [P(3-HB)/Carbonat-ACP] stabilisieren. Diese pH-Werte liegen noch innerhalb des physiologischen Bereichs und sollten von dem im Zellnährmedium enthaltenen Carbonat-Puffersystem sehr leicht auf pH 7.4 stabilisiert werden. Es wurde bewusst für beide Polyester ein identisches Mischungsverhältnis gewählt, so dass sich die beiden Materialien nur in der Art des verwendeten Polymers unterscheiden und so eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Kompositmaterialien gewährleistet ist.

Zur Herstellung der kompakten Kompositprobekörper aus P(3-HB)/Carbonat-ACP und P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP wurden Polymer und Apatit durch Mörsern miteinander vermischt und anschließend

10 Minuten in einer runden Form aus Stahl mit einer Druckkraft von 120 kN zu runden Tabletten mit einem Durchmesser von 13 mm und ungefähr 1 mm Höhe verpresst. Vor dem Einbringen in die Zellkulturen wurden die Probekörper im Autoklaven 10 Minuten bei einer Temperatur von 120 °C sterilisiert.

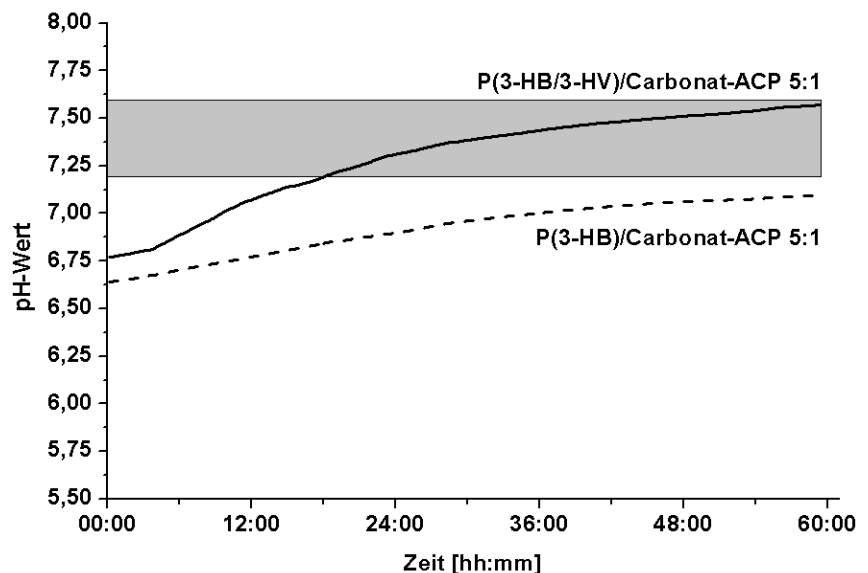


Abbildung D.4: Entwicklung der pH-Werte von Tabletten aus den jeweiligen Kompositmaterialien P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP und P(3-HB)/Carbonat-ACP in entionisiertem Wasser

Zellkulturtechnik

Die verwendeten primären Osteoblastenzellen wurden durch den sequenziellen, enzymatischen Abbau von Calvarien drei Tage alter Mäuse in einer Lösung aus 0.1 % Clostridial Collagenase Ia (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) und 0.2 % Dispase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany) gewonnen. Die Kultivierung, der so gewonnen Zellen auf den Kompositmaterialien erfolgte im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ in einer Lösung aus α -MEM (*α -modification of Eagle's minimum essential medium*) mit 10 % fetal bovine serum (FBS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (PS) in six-well plates (Falcon Labware, Oxon, CA).^[170] Die Osteoblasten wurden hierzu in einer Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen/Well zu den auf Glasplättchen fixierten Kompositkörpern gegeben. Ein Austausch des Nährmediums erfolgte anfangs nach dem ersten und dritten Tag. Nach dieser Zeit wurden dem Nährmedium zusätzlich 5 mmol β -Glycerolphosphat und 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ascorbinsäure (Mineralisationsmedium) beigelegt und täglich erneuert.

D.1.III Ergebnisse

Mikroskopie

Die Vitalität und Proliferation der Osteoblastenkulturen in Gegenwart der Komposite wurde mikroskopisch dokumentiert. Wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Osteoblastenkulturen in **Abbildung D.5** zeigen, lässt sich ein deutlicher Unterschied in der Aktivität der Osteoblasten als Reaktion auf die beiden untersuchten Materialien feststellen.

Während die Osteoblasten in Gegenwart von Formkörpern aus P(3-HB)/Carbonat-ACP bereits nach einer Woche eine konfluente Zellschicht bilden (**Abb. D.5 A**) und die weitere Proliferation der Zellen nach sechs Wochen zur Bildung von dichten Lagen extrazellulärer Matrix führt (**Abb. D.5 B**), reagieren die Osteoblasten auf die Tabletten aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP mit einer stark reduzierten Aktivität. Hierbei sind die nach vier Tagen beobachtete Ausbildung zahlreicher intrazellulärer Vakuolen sowie die Veränderung der äußeren Gestalt und des Zytoskeletts in **Abbildung D.5 C** deutliche Hinweise auf eine Stresssituation der Zellen. Im weiteren Verlauf der Zellbesiedlung führt diese Stresssituation schließlich zum Absterben der Zellen, so dass nach neun Tagen nur noch sehr wenige vitale Zellen beobachtet werden können (**Abb. C.5 D**). Nach zehn Tagen sind schließlich alle Osteoblasten abgestorben.

^[170] M. Amling, L. Neff, S. Tanaka, D. Inoue, K. Kuida, E. Weir, W.M. Philbrick, A.E. Broadus, R. Baron, Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone related peptide in a signalling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development, *J. Cell Biology* **1997**, 136, 205-213

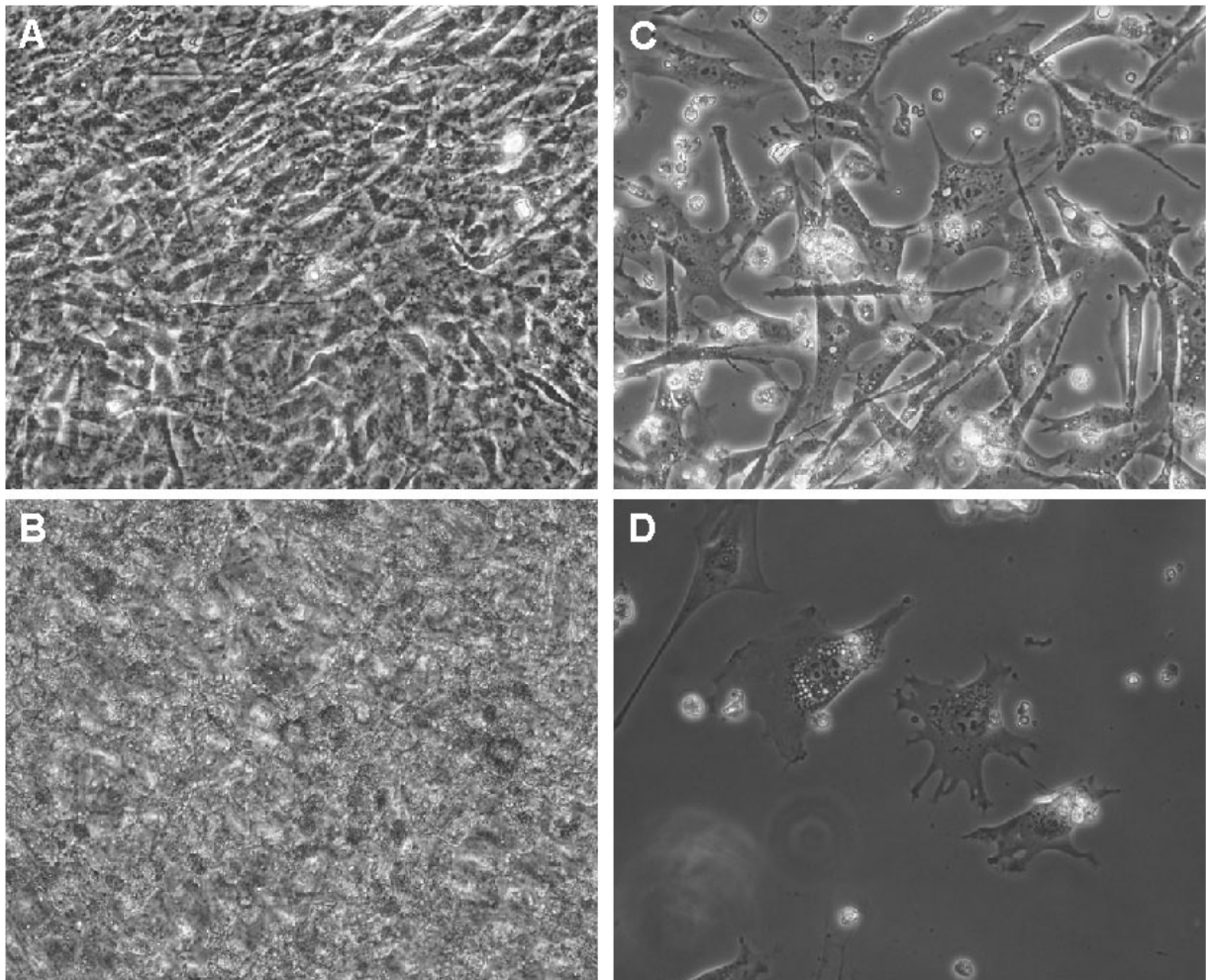


Abbildung D.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Osteoblastenkulturen in Gegenwart von P(3-HB)/Carbonat-ACP (Abb. A und B) und P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP (Abb. C und D). Konfluente proliferierende Osteoblasten nach einer Woche (A) und sechs Wochen (B) in Kultur mit Tabletten aus P(3-HB)/Carbonat-ACP (Aufnahmen in 100facher Vergrößerung). Abnehmende Osteoblastenaktivität nach vier (C) und neun Tagen (D) in Kultur mit Tabletten aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP (Aufnahmen in 200facher Vergrößerung).

Ein entsprechendes Bild ergibt auch die REM-Analyse der besiedelten Kompositformkörper. Die Aufnahmen in **Abbildung D.6 A–D** zeigen die mit Hilfe der *critical point drying technique* (Gefriertrocknung mit überkritischem CO₂) präparierten Oberflächen von Formkörpern aus P(3-HB)/Carbonat-ACP nach einer Woche (**Abb. D.6 A**) und acht Wochen (**Abb. D.6 B**) sowie von Probekörpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP nach neun Tagen (**Abb. D.6 C und D**) in Kultur. Die Aufnahmen der Formkörper aus P(3-HB)/Carbonat-ACP zeigen, dass die Oberfläche bereits nach einer Woche mit einer dichten Schicht von Osteoblasten und Kollagen bedeckt ist. Hierbei sind die gespreizte, ausgebreitete Form der adhären Osteoblasten auf der Materialoberfläche und die hohe Proliferationsrate Indikatoren für eine gute Verträglichkeit des Materials. Die hohe Proliferationsrate der Zellen hat zur Folge, dass sich nach acht Wochen in Kultur eine kompakt wirkende Schicht aus extrazellulärer Matrix gebildet hat, gut sichtbar in **Abbildung D.6 B**.

Ein vollkommen Gegenteiliges Bild zeigt sich bei Körpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP. Die REM-Aufnahme der Oberfläche eines solchen Formkörpers nach neun Tagen in Kultur zeigt keinen einzigen Osteoblasten und nur eine teilweise Bedeckung mit einer sehr dünnen Kollagenschicht (vgl. **Abb. D.6 C**). Dies deutet auf eine stark gehemmte Proliferation hin und ist nur mit einer Unverträglichkeitsreaktion der Osteoblasten auf das P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP-Kompositmaterial zu erklären. Diese Unverträglichkeit konnte in zwei weiteren unabhängigen Wiederholungen der Besiedlungsexperimente mit Formkörpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP bestätigt werden. Die genaue Ursache dieser Unverträglichkeit ließ sich indes nicht ermitteln. Eine mögliche Ursache lässt sich der REM-Aufnahme in **Abbildung D.6 D** entnehmen. Sie zeigt ein Bild der Oberflächenmorphologie von Formkörpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP in 2000 facher Vergrößerung.

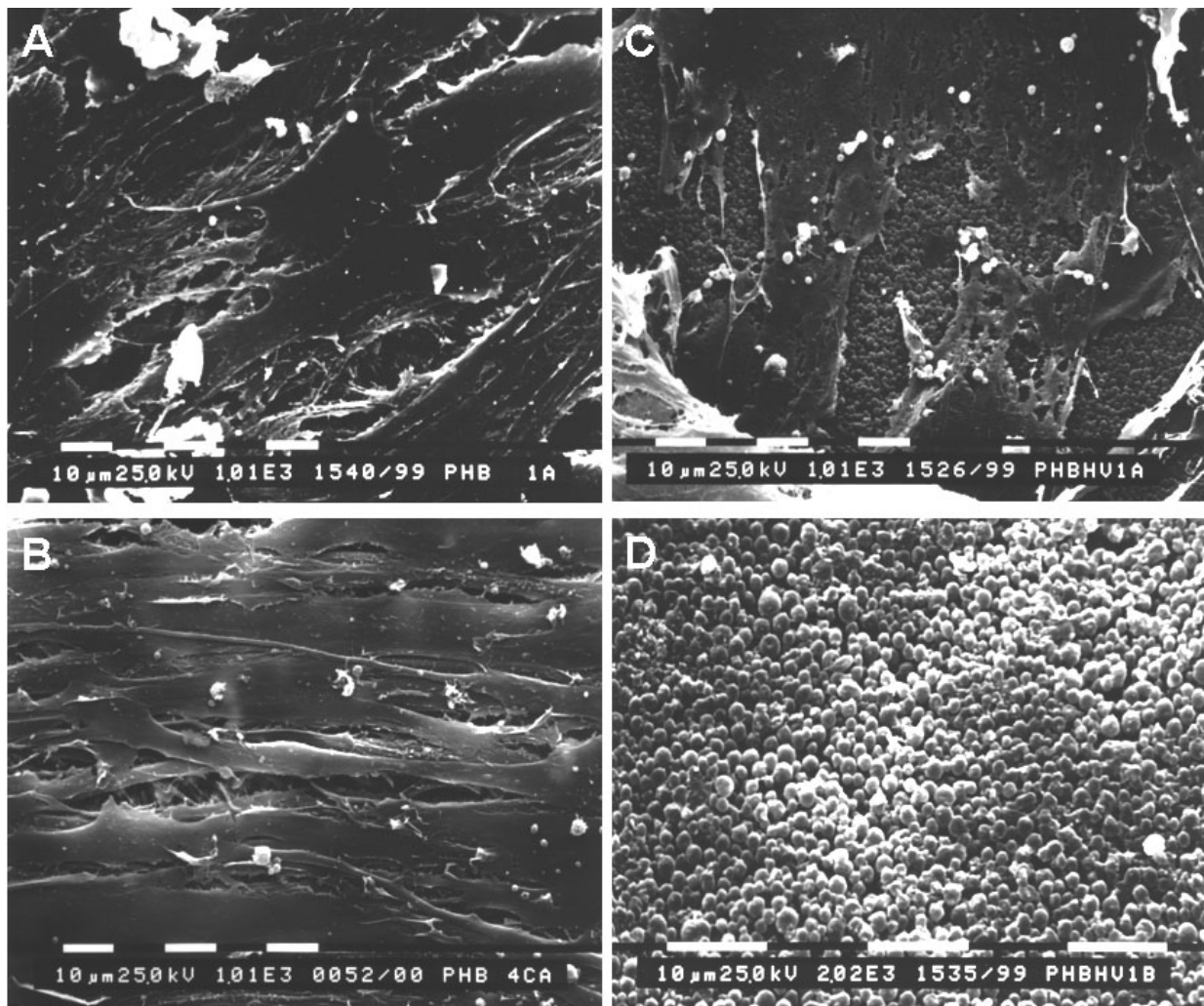


Abbildung D.6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche von Kompositformkörpern aus P(3-HB)/Carbonat-ACP (Abb. A und B) und P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP (Abb. C und D). Konfluente proliferierende Osteoblasten nach einer Woche (A) und acht Wochen (B) in Kultur mit Tabletten aus P(3-HB)/Carbonat-ACP (Aufnahmen in 1000facher Vergrößerung). Subkonfluente Osteoblastenschicht nach neun Tagen (C) in Kultur (Aufnahme in 1000facher Vergrößerung). Morphologie der Oberfläche von Formkörpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP nach neun (D) Tagen in Kultur (Aufnahme in 2000facher Vergrößerung).

In diesem Bild ist die Morphologie des verwendeten Polymers P(3-HB/3-HV) deutlich zu erkennen. Es liegt in Form kleiner kugelförmiger Aggregate mit einem Durchmesser von 2 bis 4 μm vor. Diese Morphologie erklärt sich aus der mikrobiellen Herstellung dieses Polymers.

Aus Untersuchungen ist jedoch bekannt, dass Teilchen in der Größenordnung von 0.5 μm bis $<10 \mu\text{m}$ zu einer Immunreaktion führen können (Phagozytose).^{[171],[172],[173]} Von Osteoblasten ist zudem bekannt, dass auch sie in Gegenwart von Hydroxylapatit in der Lage sind, Calciumphosphatpartikel zu phagozytieren.^[174] Inwieweit sich diese Aussagen auf die hier vorliegenden Polymerteilchen übertragen lassen und somit die beobachtete Unverträglichkeit erklären, bleibt unklar. Eventuell könnte eine Wiederholung der Experimente mit schmelzgepressten oder extrudierten Formkörpern einen weiteren Aufschluss bringen.

Histologie

Die histologischen Untersuchungsergebnisse von Dünnschnitten aus P(3-HB)/Carbonat-ACP nach sechs Wochen in Zellkultur sind in **Abbildung D.7** abgebildet.

Die Aufnahme in von Kossa-/van Gieson-Färbung (**Abb. D.7 A**) lässt erkennen, dass die Oberfläche der Körper von mehreren Lagen dunkelviolett gefärbten Kollagens bedeckt ist. Dies ist als weiterer Beleg für die gute Biokompatibilität des Materials zu werten. Man erkennt in dieser Aufnahme weiterhin sehr gut, wie das Calciumphosphat in der typischen schwarzen von Kossa-Färbung in dem weißen Polymer eingebettet ist.

Bei den in der Kollagenschicht enthaltenen Calciumphosphatpartikeln handelt es sich jedoch nicht um von Osteoblasten mineralisierte Apatitablagerungen, sogenannte *nodules*, sondern wahrscheinlich um während der Probenpräparation herausgelöste Carbonat-ACP-Partikel.

Die Darstellung des mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie aufgenommenen Fluoreszenz-Immunoassays des Markers Osteocalcin (grün) in **Abbildung D.7 B** belegt, dass es sich bei den kultivierten Zellen tatsächlich um Osteoblasten handelt, und dass Material somit keine ungewollte Differenzierung der Zellen induziert. Bei diesem Marker handelt es sich gegenwärtig um den einzigen spezifischen Marker zur Identifizierung von Zellen mit einem Osteoblastenphänotyp.

^[171] H. Winet, J.Y. Bao, Comparative bone healing near eroding polylactide-polyglycolide implants of differing crystallinity in rabbit tibial bone chamber, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **1997**, 8 (7), 517-532

^[172] R.M. Steinman, I.S. Mellman, W.A. Muller, Z.A. Cohn, Endocytosis and the recycling of plasma membrane, *J. Cell. Biol.* **1983**, 96, 1-27

^[173] F.R. Rozema, J.E. Bergsma, R.R.M. Bos, G. Boehring, A.J. Nijenhuis, A.J. Pennings, W.C. De Bruin, Late degradation simulation of poly(L-lactide), *J. Mater. Science: Mater. Med.* **1994**, 5, 575-581

^[174] B. Alliot-Licht, M. Gregoire, I. Orly, J. Menanteau, Cellular activity of osteoblasts in the presence of hydroxyapatite: an *in vitro* experiment, *Biomaterials* **1991**, 12, 752

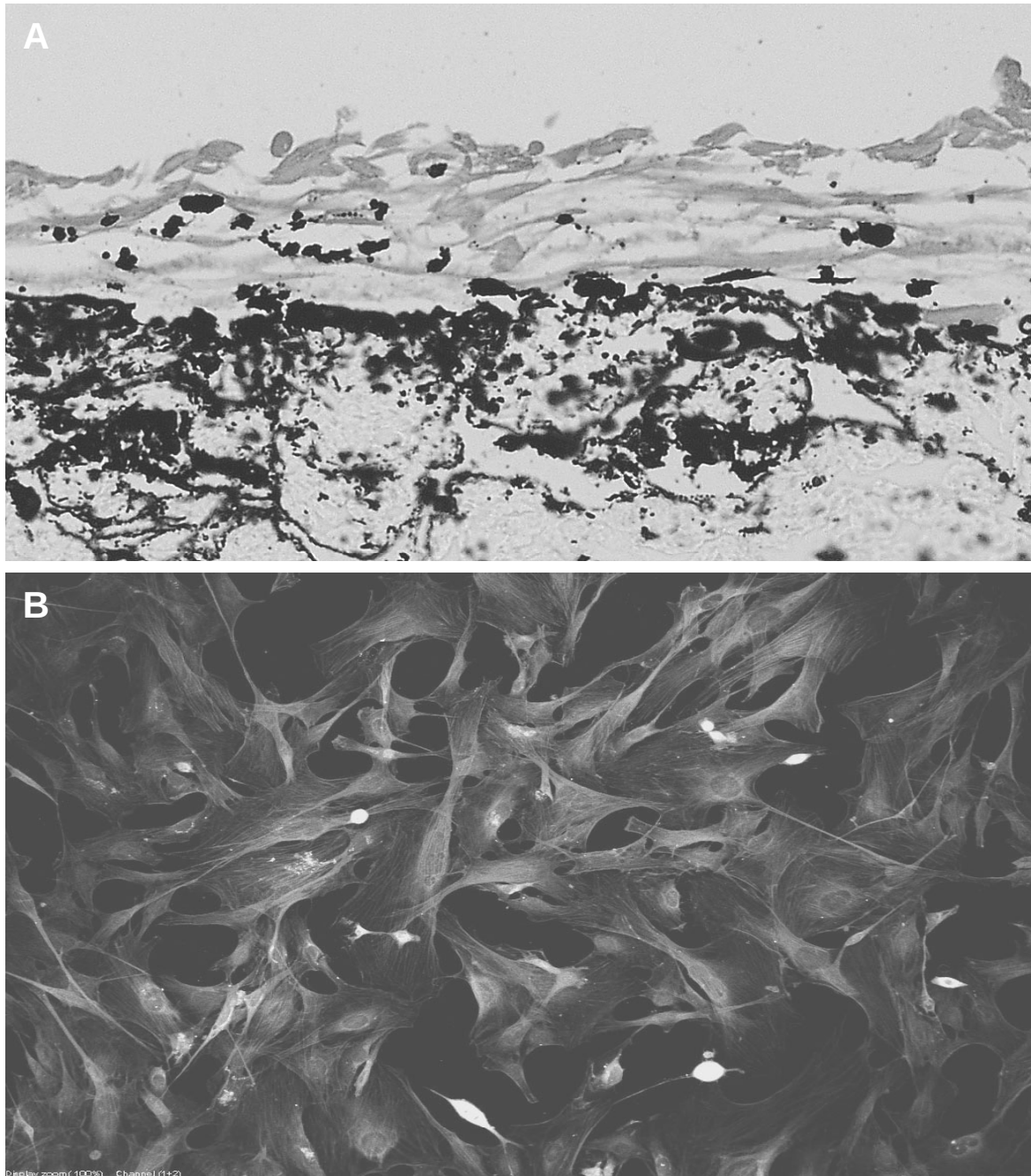


Abbildung C.7: (A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Schnittpräparats aus P(3-HB)/Carbonat-ACP nach sechs Wochen in Zellkultur in von Kossa- und van Gieson- Färbung. (B) Die Konfokale Lasermikroskopische Aufnahme zeigt das osteoblastenspezifische Immunolabeling von Osteocalcin (grün). Die rote Färbung entspricht Actin.

pH-Werte

Die in **Abbildung D.8** aufgetragenen Messkurven zeigen die Entwicklung der pH-Werte des Nährmediums während der Kultivierung. Die pH-Messungen erfolgten jeweils beim Wechsel des Nährmediums, um einen Eintrag von Mikroorganismen zu vermeiden. Die Messwerte bewegen sich im Fall der Probekörper aus P(3-HB)/Carbonat-ACP zwar zu Beginn der Zellbesiedlung auf einem erhöhten Niveau, doch stabilisiert sich der pH-Wert innerhalb kurzer

Zeit dauerhaft im physiologischen Bereich von 7.2-7.6. Im Gegensatz dazu zeigen die Messungen des Nährmediums von Osteoblastenkulturen in Gegenwart von Formkörpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP einen dauerhaften Anstieg des pH-Werts auf pH 7.9. Dieser Wert liegt geringfügig außerhalb des zellphysiologischen Bereichs und erklärt möglicherweise die Unverträglichkeit der Osteoblasten auf dieses Material. Weiterführende Untersuchungen an Formkörpern mit einem verringerten Anteil an Carbonat-ACP, beziehungsweise des reinen Polymers P(3-HB/3-HV) könnten hierüber näheren Aufschluss geben.

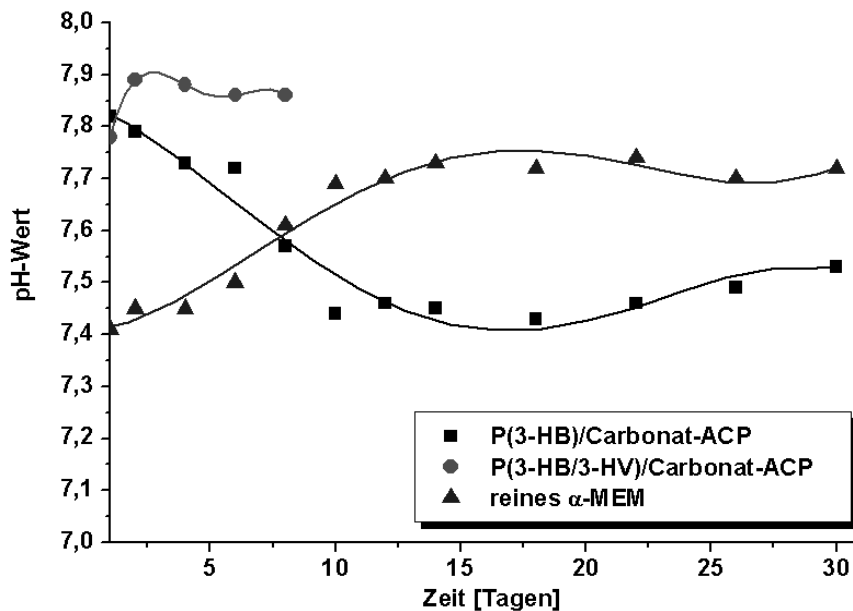


Abbildung D.8: Entwicklung der pH-Werte des Nährmediums (α -MEM) während der Zellkultivierung auf den Kompositmaterialien.

Chemische Veränderungen der Kompositmaterialien während der Zellbesiedlung

Um die chemischen Auswirkungen der Zellbesiedlungsexperimente auf die getesteten Kompositmaterialien zu analysieren, wurden Proben der Materialien nach definierten Zeitpunkten entnommen und mittels XRD, IR, DSC, TG-DTA-MS und Viskosimetrie untersucht.

Röntgenpulverdiffraktometrie

Die XRD-Untersuchung ergab hierbei weder Anzeichen für eine Auflösung der eingesetzten amorphen Calciumphosphatphase, noch konnte eine Konversion zum thermodynamisch stabileren Hydroxylapatit beobachtet werden, wie dies für Kompositmaterialien aus Polyglykolid/Carbonat-ACP beschrieben wurde.^[155] Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich auf die erschwerte Diffusion von Wasser in die im Vergleich zu Polyglykolid wesentlich hydrophoberen Polymere P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) zurückzuführen, so dass eine

Kristallisation zum Hydroxylapatit stark inhibiert wird. Eine Veränderung der in den Kompositen enthaltenen Polymere anhand der nach zwei, vier und sechs Wochen aufgenommenen Röntgenpulverdiffraktogramme konnte nicht festgestellt werden.

Im Einklang zu diesen Ergebnissen stehen auch die Röntgenaufnahmen von Tabletten aus P(3-HB)/Carbonat-ACP direkt nach der Probenpräparation und nach acht Wochen in Zellkultur. Die in **Abbildung D.9** dargestellten Aufnahmen belegen nicht nur den Verbleib des Calciumphosphats in den Formkörpern nach dieser Zeit, sondern geben auch einen interessanten Eindruck über die Verteilung des Calciumphosphats innerhalb der Formkörper. Es fällt dabei auf, dass sich ein großer Teil des Calciumphosphats in der Mitte der Tabletten befindet. Diese Anreicherung ist vermutlich auf eine geringfügige Separierung während des Einfüllens des gemahlten Pressgutes in die Pressform aufgrund der unterschiedlichen Dichten von Polymer und Calciumphosphat zurückzuführen.

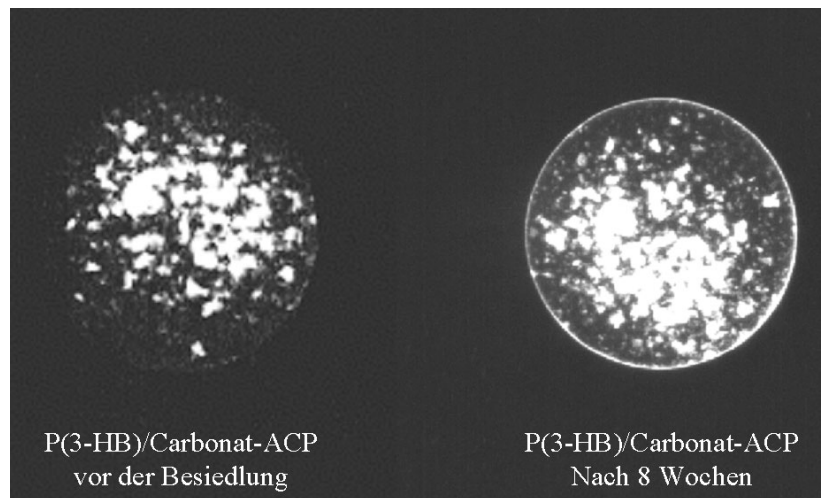


Abbildung D.9: Röntgenaufnahmen der Komposit-Probekörper direkt nach dem Verpressen zeigen die Verteilung des Carbonat-ACP (weiße Flecken) innerhalb der Formkörper .

Thermische Analyse

Der quantitative Verbleib des Calciumphosphates in den Formkörpern konnte schließlich durch thermogravimetrische Messungen bestätigt werden. So ergab sich nach dem Erhitzen von Proben beider Kompostmaterialien in einer Luftatmosphäre auf 500 °C (Verbrennung der Polyester) ein Calciumphosphat-Rückstand von 18.9 Gew.% [P(3-HB)/Carbonat-ACP] beziehungsweise 23.9 Gew.% [P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP], der im Einklang mit dem Anfangsgehalt von 16.7 Gew.% Carbonat-ACP in den Kompositmaterialien steht.

Um die Auswirkungen der Probenpräparation und der Zellbesiedlung auf die verwendeten Polymere eingehender zu untersuchen, wurden die Kompositmaterialien zusätzlich mittels IR-Spektroskopie, DSC und Viskosimetrie analysiert. Während die Ergebnisse der IR-Spektroskopie keinen sichtbaren Hinweis auf eine Veränderung der Polymere während der Formkörperpräparation und Zellbesiedlung ergaben, konnte anhand der DSC-Thermogramme eine deutliche Veränderung sowohl der Onsettemperaturen als auch der Schmelzenthalpien festgestellt werden.

Der graphischen Darstellung der DSC-Daten von P(3-HB)/Carbonat-ACP in **Abbildung D.10** lässt sich entnehmen, dass besonders die Dampfdrucksterilisation massive Auswirkungen auf das Polymer hat und eine deutliche Verringerung der Kristallinität bewirkt, wie sich anhand der gemessenen Schmelzenthalpien nachvollziehen lässt. Wie sich aus den langsam wieder ansteigenden Werten der Schmelzenthalpie ableiten lässt, erfolgt jedoch unter den Bedingungen der Zellbesiedlung eine Rekristallisation des Polymers, die dazu führt, dass bereits nach zwei Wochen die ursprünglichen Schmelzenthalpiewerte überschritten werden, nach vier Wochen einen Höchstwert durchlaufen, um schließlich nach sechs Wochen erneut langsam zu sinken. Aus diesen Daten und dem analogen Verlauf der Onsettemperaturen zeigt sich, dass auch so thermisch stabile Polymere wie P(3-HB) sehr empfindlich auf einzelne Verarbeitungsschritte reagieren können.

Dies ist besonders zu berücksichtigen, wenn eine zusätzliche thermische Beanspruchung der Kompositmaterialien, zum Beispiel während der Formgebung durch Heißpressen oder Extrudieren erfolgt. In diesem Zusammenhang könnte es auch notwendig werden, den Einfluss der verwendeten Calciumphosphat-Phase auf das Polymer zu berücksichtigen und im Rahmen einer vergleichenden Degradationsstudie zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang bleibt zu erwähnen, dass den DSC-Messungen des P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP-Kompositmaterials zufolge die Auswirkungen der Sterilisierung im Autoklaven auf das Poly(3-*R*-hydroxybutyrat-co-3-*R*-hydroxyvalerat) im Vergleich zum Poly(3-*R*-hydroxybutyrat) deutlich geringer ausfallen (vgl. **Tabelle D.2**). Diese erhöhte Stabilität steht im Einklang mit den erwarteten Materialeigenschaften aufgrund des stärkeren hydrophoben Charakters dieses Polymers. Eine Aussage über mögliche Veränderungen des Polymers während der Zellbesiedlung ist aufgrund der kurzen Besiedlungsdauer nicht möglich.

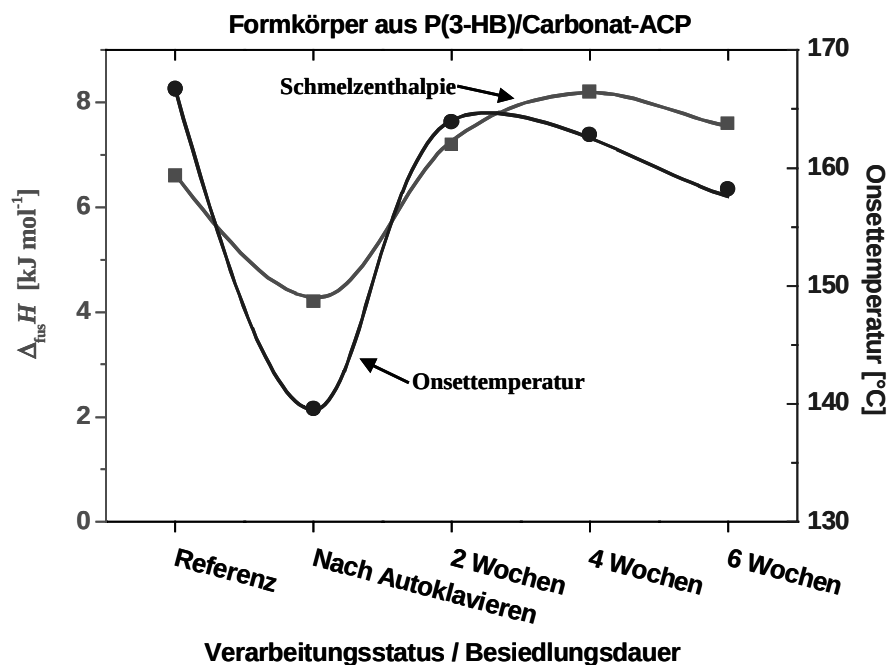


Abbildung D.10: Ergebnisse der DSC-Messungen an Formkörpern aus P(3-HB)/Carbonat-ACP über die Auswirkungen der Probenpräparation und Kultivierung auf die Schmelzenthalpie und Onsettemperatur des verwendeten Polymers.

Tabelle D.2: Ergebnisse der DSC-Messungen an Formkörpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP

Verarbeitungsstatus P(3-HB/3-HV) 9:1	$T_{\text{Onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{\text{fus}}H_m / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
Referenz	130.2	3.2
Nach Autoklavieren	140.0	3.9
Nach neun Tagen	130.9	2.8

Viskosimetrie

Die Hinweise aus den DSC-Messungen auf Veränderungen innerhalb der Polymere, auf die einzelnen Verarbeitungsschritte und die anschließende Zellbesiedlung spiegeln sich noch deutlicher in den Messergebnissen der Viskosimetrie wieder. Der in **Abbildung D.11** aufgetragene graphische Verlauf der mittleren Kettenlänge des jeweiligen Polymers in Abhängigkeit von der Behandlung der Kompositmaterialien zeigt eine unerwartet schnelle Degradation der Polymere.

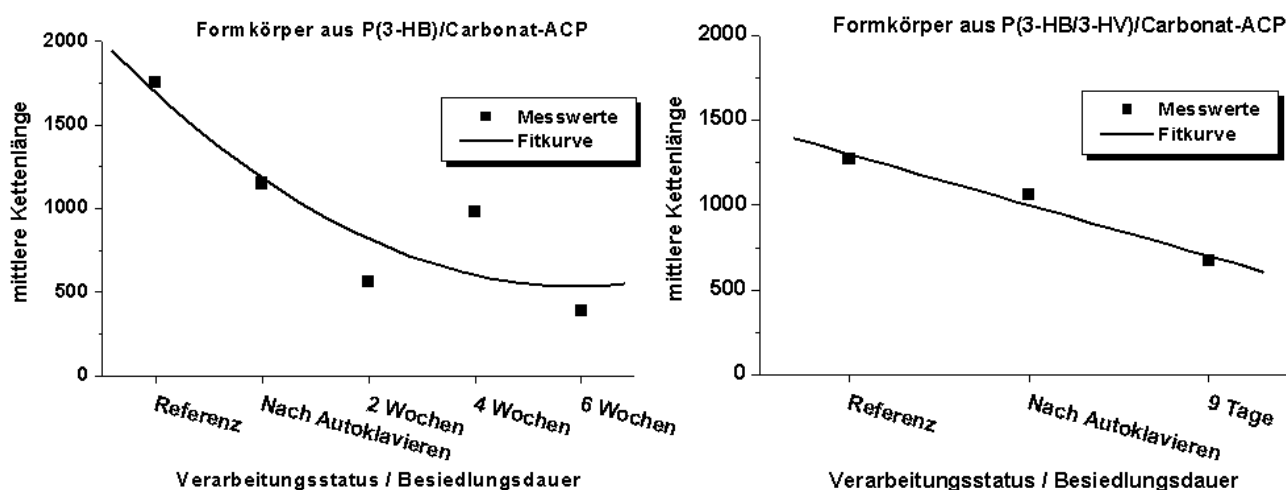


Abbildung D.11: Auswirkung der Probenpräparation und Besiedlungsdauer auf die mittlere Kettenlänge der verwendeten Polymere.

So verringert sich im Falle von P(3-HB)/Carbonat-ACP die mittlere Kettenlänge des P(3-HB) von ursprünglich 1750 nach der Probenherstellung auf 1150 nach der Dampfdrucksterilisation. Während der Zellbesiedlung sinkt dieser Wert schließlich auf 390 nach sechs Wochen in der Zellkultur. Eine ganz ähnliche Entwicklung lässt sich auch dem Graphen für Formkörper aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP entnehmen.

Auch in diesem Fall bewirkt das Autoklavieren eine Verringerung der mittleren Kettenlänge des Polymers von 1270 auf 1060. Innerhalb der Besiedlungsdauer von neun Tagen erfolgt schließlich eine weitere Abnahme auf 670 Monomereinheiten. Diese im Vergleich zum P(3-HB) geringere Degradationsrate spiegelt die höhere Stabilität von P(3-HB/3-HV) gegenüber einer hydrolytischen Bindungsspaltung wieder.

Insgesamt überraschen die ermittelte Werte jedoch nicht. Sie stehen zwar im Gegensatz zu der in der Literatur angegebenen, sehr langsamen Degradationsgeschwindigkeit für die reinen Polymere, doch stimmen sie mit den Beobachtungen von Doyle *et al.* an Kompositen aus P(3-HB) und Hydroxylapatit überein.^[175] Auch diese Arbeitsgruppe stellte bei Zellbesiedlungsexperimenten eine deutlich Steigerung der Degradationsrate des P(3-HB) bei Verbundmaterialien fest, so dass es sich wahrscheinlich um ein generelles Phänomen handelt. Diese hohen Degradationsraten lassen sich vermutlich nicht mit einer katalytischen Wirkung von Enzymen erklären, die von den Osteoblasten freigesetzt wurden, vielmehr deutet die starke Verringerung der Kettenlänge während der Sterilisation auf einen Zusammenhang mit der Calciumphosphat-Phase hin. So ist neben einer basenkatalysierten Zunahme der Hydrolyserate aufgrund des alkalisch reagierenden Carbonat-ACP auch eine katalytische Wirkung an der Oberfläche des festen Calciumphosphates nicht gänzlich auszuschließen. Zur Klärung der genauen Ursache der hohen Hydrolyserate ist jedoch eine vergleichende Degradationsstudie der reinen Polymere und der entsprechenden Composite, zum Beispiel im Rahmen einer beschleunigten Degradation nötig (siehe hierzu Kapitel C.II).

D.I.IV Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die Biokompatibilität von Kompositmaterialien aus knochenähnlichem Carbonat-ACP und Poly(3-*R*-hydroxybutyrat) beziehungsweise Poly(3-*R*-hydroxybutyrat-co-3-*R*-hydroxyvalerat) untersucht. Diese beiden neuartigen resorbierbaren Materialien sind aufgrund ihrer guten Materialeigenschaften vielversprechende Kandidaten für einen Einsatz als Knochenersatzmaterial. Um die biologischen Auswirkungen dieser Materialien speziell auf die knochenbildenden Zellen zu charakterisieren, wurden diese Materialien in einem *in-vitro* Versuch bis zu acht Wochen mit primären Mäuseosteoblasten besiedelt. Die Reaktion der Zellen wurde während dieser Zeit mittels Lichtmikroskopie (Zellmorphologie), Histologie (Expression von Kollagen und Osteocalcin) und Elektronenmikroskopie verfolgt. Hierbei reagierten die Osteoblasten mit deutlichen Unterschieden auf die beiden getesteten Materialien. Die sehr gute Verträglichkeit der Zellen auf Formkörpern aus P(3-HB)/Carbonat-ACP und die hiermit verbundene hohe Proliferation führte bereits nach einer Woche zu einer konfluenten Zellschicht. Insgesamt ließen sich während der gesamten Besiedlungsdauer von acht Wochen keinerlei Hinweise auf eine zellschädigende Wirkung des Materials finden, so dass dem Material

^[175] C. Doyle, E.T. Tanner, W. Bonfield, *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite, *Biomaterials* **1991**, 12,841-847

insgesamt, wie bereits in der Literatur beschrieben, eine hervorragende Biokompatibilität bescheinigt werden kann.^[176]

Ein vollkommen anderes Bild zeigte die Besiedlung von Osteoblasten auf Formkörper aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellen zeigen bereits nach vier Tagen Symptome die auf eine Stresssituation hindeuten (Veränderungen des Zytoskeletts, Vakuolenbildung). Innerhalb von zehn Tagen führen diese Bedingungen schließlich zum sukzessiven Absterben der gesamten Zellkultur. Die genaue Ursache für das Absterben der Zellen konnte indessen nicht eindeutig ermittelt werden. So besteht die Möglichkeit, dass der vom Kompositmaterial hervorgerufene hohe pH-Wert von 7.9 zum Absterben der Zellen führte. Gegen diese Theorie spricht, dass sich innerhalb der ersten vier Tage der pH-Wert der beiden getesteten Materialien nur um maximal 0.15 unterscheidet. Bei einem so geringen Unterschied der pH-Werte sollten auch die Zellen auf P(3-HB)/Carbonat-ACP eine Reaktion zeigen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der besonderen Morphologie des biotechnologisch hergestellten P(3-HB/3-HV). Wie die Aufnahmen am Elektronenmikroskop zeigen liegt das Polymer im Gegensatz zum P(3-HB), das keine spezifische Morphologie aufweist, in Form kleiner kugelförmiger Aggregate vor, die einen Durchmesser von circa 2 bis 4 µm haben. Da jedoch Zellen, auf Teilchen in dieser Größenordnung, mit einer Phagozytose reagieren können und diese Reaktion auch bei Osteoblasten bereits beobachtet wurde, besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine Immunreaktion der Osteoblasten auf das P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP-Kompositmaterial handelt. Einen Aufschluss über die genaue Ursache für die beobachteten Unterschiede können nur weiterführende Besiedlungsexperimente mit schmelzgepressten oder extrudierten Formkörpern erbringen, so dass die Morphologie des Polymers verändert wird. Durch einen ebenfalls verringerten Anteil an Carbonat-ACP ließe sich auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Zellen überprüfen.

Zusätzlich zur Reaktion der Osteoblasten auf die Materialien wurden auch die chemischen Auswirkungen der Zellbesiedlung auf die Komposite untersucht. Wie die XRD-Analyse der verwendeten amorphen Calciumphosphat-Phase ergab, bleibt diese während der gesamten Besiedlungsdauer vollständig amorph und konvertiert nicht zum thermodynamisch stabileren Hydroxylapatit.

Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich im hydrophoben Charakter der verwendeten Polymere, der die Diffusion von Wasser in die Formkörper behindert. Die Thermoanalyse der Komposite mittels TG-DTA-MS konnte den quantitativen Verbleib des Apatits in den Formkörpern belegen,

^[176] Z.B. Luklinska, W. Bonfield, Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, 8, 379-383

so dass eine mögliche Auflösung des Apatits ausgeschlossen werden kann. Zudem zeigten die Thermogramme der DSC-Messungen die deutlichen Auswirkungen der Dampfdrucksterilisation, auf die Kristallinität der jeweiligen Polymere. Wie sich anhand der Verringerung der Schmelzenthalpien zeigen ließ, stellt diese Form der Sterilisation nicht nur eine besondere strukturelle Belastung besonders des P(3-HB) dar, sondern führt auch zu einer deutliche Abnahme der mittleren Kettenlänge, dies belegen zusätzliche Viskosimetrie-Messungen. Hierbei ist nicht nur die hohe Abnahme während der Sterilisation bemerkenswert, sondern auch die weitere hohe Verringerung der mittleren Kettenlänge während der Zellbesiedlung. Ähnlich hohe Degradationsraten von P(3-HB) in Kompositmaterialien mit Hydroxylapatit sind in der Literatur bereits beschrieben,^[177] so dass offensichtlich ein bisher noch nicht identifizierter Mechanismus hierfür verantwortlich ist. Da diese hohen Degradationsraten nur bei Apatit-Kompositmaterialien beobachtet werden, deutet dies auf eine Schlüsselrolle des Calciumphosphats hin. Ob dies jedoch auf eine katalytische Wirkung, eine erhöhte Diffusion von Wasser in die Materialien entlang von Apatit/Polymer-Phasengrenzen oder auf ein bisher noch unbekanntes Phänomen bei der Kombination dieser beiden Materialien zurückzuführen ist, bleibt unklar. Dennoch ist eine Klärung der genauen Vorgänge, durch eine eingehende Untersuchung, nicht nur von akademischen Interesse, sondern möglicherweise eröffnen sich hierdurch Möglichkeiten, die Degradationszeiten dieser Materialien gezielt zu steuern.

D.I.V Charakterisierung der verwendeten Materialien

Poly(3-R-hydroxybutyrat), P(3-HB) aus mikrobieller Herstellung wurde von Aldrich (36,350-2) bezogen und ohne weitere Aufbereitung verwendet.

IR [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2977/2934 (w, C-H), 1723 (s, C=O), 1458/1420/1382 (m, COO, C-H₃), 1289/1256/1212 (m, C-O), 1076 (m, C-OH), 980/895/826/516 (w). - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃+TMS) [ppm]: δ =1.2 (d, J =6.1 Hz, 3 H, CH₃), δ =2.5 (m, 2 H, CH₂), δ =5.2 (m, 1 H, CH). - ¹³C NMR (100.69 MHz, CDCl₃+TMS) [ppm]: δ =20.12 (s, CH₃), δ =41.16 (s, CH₂), δ =68.08 (s, CH), δ =169.68 (s, COO). Zusätzliche zeigen die Spektren einige kleine nicht weiter identifizierbare Peaks. - DSC [Heizrate 5 K min⁻¹]: endothermes Schmelzsignal: T_{Onset} =166.7 °C, $\Delta_{\text{fus}}H_m$ =6.6 kJ · mol⁻¹, endotherme Pyrolyse: T_{Onset} =267.5 °C, $\Delta_{\text{fus}}H_m$ =53.5 kJ · mol⁻¹. - XRD [Cu K α λ = 154.178 pm, Hauptreflexe in °2 θ]: 13.7, 17.1, 20.3, 21.8, 22.7, 25.7, 27.3, 30.1, 37.2, 44.4 – EA: theor. C 55.2 %, H 8.1 %; N 0 %, gefunden C 55.5 %, H 7.1 %, N 0.6 %.

^[177] C.Doyle, E.T. Tanner, W. Bonfield, In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxylapatite, *Biomaterials* **1991**, 12, 841-847

Der unerwartete Anteil von Stickstoff, ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf den biotechnologischen Herstellungsprozess des Polymers zurückzuführen.^[178] – Viskosimetrie: intrinsische Viskosität $[\eta]=1.02 \text{ dl g}^{-1}$, aus der Mark-Houwink-Gleichung ergibt sich einer mittlere Molmasse von $M_v=111525 \text{ g mol}^{-1}$, dies entspricht einer mittleren Kettenlänge von 1274.

Poly(3-R-hydroxybutyrat-co-3-R-hydroxyvalerat) [9:1=n:n; P(3-HB/3-HV)] aus mikrobieller Herstellung wurde von der Firma Fluka (27826) bezogen und ohne weitere Aufbereitung verwendet.

IR [$\tilde{\nu}$ in cm^{-1}]: 2975/2934 (w, C-H), 1724 (s, C=O), 1457/1380/1281 (m, COO, C-H₃), 1229/1184/1133 (m, C-O), 1057 (m, C-OH), 980/896/826/515 (w). – ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃+TMS) [ppm]: $\delta=0.8$ (m, 3 H, CH₃-PHV), $\delta=1.2$ (d, $J=6.1 \text{ Hz}$, 3 H, CH₃-PHB), $\delta=1.6$ (m, 2 H, CH₂-PHV), $\delta=2.5$ (m, 2 H, CH₂-PHB, 2 H CH₂-PHV), $\delta=5.1$ (m, 1 H, CH-PHV), $\delta=5.2$ (m, 1 H, CH-PHB). – ¹³C NMR (100.69 MHz, CDCl₃+TMS) [ppm]: $\delta=9.74$ (s, CH₃-PHV), $\delta=20.14$ (s, CH₃-PHB), $\delta=27.23$ (s, CH₃-CH₂-PHV), $\delta=39.18$ (s, CH₂-COO-PHV), $\delta=41.18$ (s, CH₂-PHB), $\delta=68.00$ (s, CH-PHB), $\delta=72.27$ (s, CH-PHV), $\delta=169.52$ (s, COO-PHB), $\delta=169.71$ (s, COO-PHV). Zusätzliche zeigen die Spektren einige kleine nicht weiter identifizierbare Peaks. – DSC [Heizrate 5 K min^{-1}]: endothermes Schmelzsignal: $T_{\text{Onset}}=130.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta_{\text{fus}}H_m=3.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, endotherme Pyrolyse: $T_{\text{Onset}}=260.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta_{\text{fus}}H_m=52.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. – XRD [Cu K α $\lambda = 154.178 \text{ pm}$, Hauptreflexe in $^{\circ}2\theta$]: 13.5, 16.8, 20.0, 21.4, 25.4, 27.1, 30.2, 37.1, 43.9 – EA: theor. C 56.2 %, H 7.1 %; N 0 %, gefunden C 56.7 %, H 7.5 %, N 0 %. – Viskosimetrie: intrinsische Viskosität $[\eta]=1.29 \text{ dl g}^{-1}$, aus der Mark-Houwink-Gleichung ergibt sich einer mittlere Molmasse von $M_v=111000 \text{ g mol}^{-1}$, dies entspricht einer mittleren Kettenlänge von 1270.

Carbonat-ACP (B-Typ): Die Darstellung und Charakterisierung der eingesetzten Calciumphosphat-Phase ist in Kapitel C.II.V beschrieben.

Histologie: Zur histologischen Analyse wurden Proben der besiedelten Materialien entnommen und bei Raumtemperatur für zehn Minuten in eine Lösung aus 3.7 % Formaldehyd in *phosphate-buffered saline solution* (PBS) gegeben und anschließend mit einer reinen PBS-Lösung

^[178] J.C. Quagliano, S.S. Miyazaki, Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- β -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 48, 662-664

gewaschen. Von den so fixierten Proben wurden Dünnschnitte angefertigt und nach Standardmethoden eine Färbung nach von Kossa und van Gieson durchgeführt.^[179]

Zum Nachweis des osteoblastenspezifischen Membranproteins Osteocalcin wurde ein Maus Anti-Ziege Antikörper (Verdünnung 1:100) der Firma Biotrends sowie ein zweiter AlexaFluor 488 Antikörper der Firma Molecular Probes verwendet. Zur spezifischen Färbung von Actin diente Rhodamin in Verbindung mit Phalloidin (Molecular Probes).

Die durchgeführte Doppel-Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte auf den Komposit-Tabletten und auf Glasplättchen mit den entsprechenden Zellen bei Raumtemperatur.

Die Zellen wurden wie bereits beschrieben mit einer 3.7 %-igen Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert und anschließend 30 Minuten in eine PBS-Lösung gegeben, die zusätzlich 0.05% Saponin, 0.1% BSA und 5% *normal goat serum* (NGS) enthielt, um alle unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Proben für zwei weitere Stunden in die Lösung mit dem Maus Anti-Zeige Antikörper gelegt und erneut mit PBS-Saponin-BSA gewaschen. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten alle unter Lichtausschluss. Nach einem erneuten Waschen, wurden die Proben nun für eine Stunde in die Lösung des AlexaFluor 488 Antikörper gegeben. Nach erneutem Waschen erfolgte die Markierung von Actin durch einstündiges Einbringen der Proben in die mit Rhodamin versetzte Phalloidine-Lösung. Nach einem letzten Waschen in PBS wurden die Proben in FluorSave fluorescent mounting media (Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA) inkubiert.

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem konfokalen Raster-Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Olympus (Typ IX70 inverted Olympus microscope and Olympus Fluoview confocal imaging system), ausgerüstet mit einem Krypton/Argon-Laser. Die Schichtdicke der Fokussierungsebene betrug jeweils 2 μm . Die digitalen Aufnahmen wurden gesammelt und am Computer aufbereitet. Hierzu wurde das Programm Adobe Photoshop verwendet.

Viskosimetrie: Alle Messungen wurden mit einem Ubbelohde-Viskosimeter (DIN 51562) der Firma Schott durchgeführt. Hierzu wurde das jeweilige Polymer mit Chloroform aus den Kompositen extrahiert (durch 4 Stunden Kochen unter Rückfluss) und das zurückbleibende biologische Material und Calciumphosphat abfiltriert, getrocknet und gewogen. Aus dem erhaltenen Filtrat wurde eine Verdünnungsreihe aus vier Lösungen hergestellt, die reduzierten Viskositäten (η_{spez}/c) ermittelt und aus der graphischen Extrapolation von η_{spez}/c gegen c , die intrinsische Viskosität $[\eta]$ bestimmt. Zur Errechnung der mittleren Molmasse aus der Mark-

^[179] M. Amling, L. Neff, S. Tanaka, D. Inoue, K. Kuida, E. Weir, W.M. Philbrick, A.E. Broadus, R. Baron, Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone related peptide in a signalling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development, *J. Cell Biology* **1997**, 136, 205-213

Houwink-Beziehung wurden für beide Polymere die in der Literatur angegebenen Werte von $\alpha = 0.78$ und $K = 1.18 \cdot 10^{-4}$ verwendet.^{[180],[181]}

Rasterelektronen-Mikroskopie: Zur Probenpräparation wurden die zellbesiedelten Komposite mit einer Lösung 3.5 %iger Glutaraldehyd-Lösung in PBS fixiert. Hierzu wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 Minuten in diese Lösung eingetaucht und anschließend mit PBS gewaschen. Das in den Proben enthaltene Wasser wurde durch Eintauchen in wässrige Lösungen mit steigendem Ethanolanteil (Wasser-Ethanol Mischungen von 40/60, 60/40, 80/20, 90/10, 100/0 (v:v)) schrittweise entfernt. Das Ethanol wurde hiernach ebenfalls durch Eintauchen in eine Lösungsreihe mit steigender Amylacetatkonzentration ausgetauscht und mittels überkritischem Kohlendioxids (40°C, 100 bar), in einem Gerät der Firma Balzers (Union Critical Point Dryer), getrocknet. Die Untersuchungen wurden, an den zuvor mit einer Goldschicht überzogen Proben, an einem Gerät vom Typ SEM 515, der Firma Philips vorgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug 25 kV.

^[180] S. Akita, Y. Einaga, Y. Miyaki, H. Fujita, Solution properties of poly(d- β -hydroxybutyrate). 1. Biosynthesis and Characterization, *Macromolecules* **1976**, 9 (5), 774-780

^[181] S. Bloembergen, D.A. Holden, T.L. Bluhm, G.K. Hamer, R.H. Marchessault, Isodimorphism in synthetic poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate): stereoregular copolyesters from racemic β -lactones, *Macromolecules* **1989**, 22 (4), 1663-1669

D.II Kontrollierte Wirkstofffreisetzung aus Polyestermatrices

D.II.I Grundlagen

Ein sehr vielversprechendes Anwendungsgebiet von resorbierbaren Materialien liegt im Bereich der kontrollierten Arzneimittelfreisetzung. Das Ziel einer Freisetzung aus polymerbasierenden Systemen ist die kontrollierte Freisetzung von Arzneistoffen im Körper auf einem therapeutisch optimalen Niveau. Konventionelle Verabreichungsformen von Medikamenten per Injektion oder

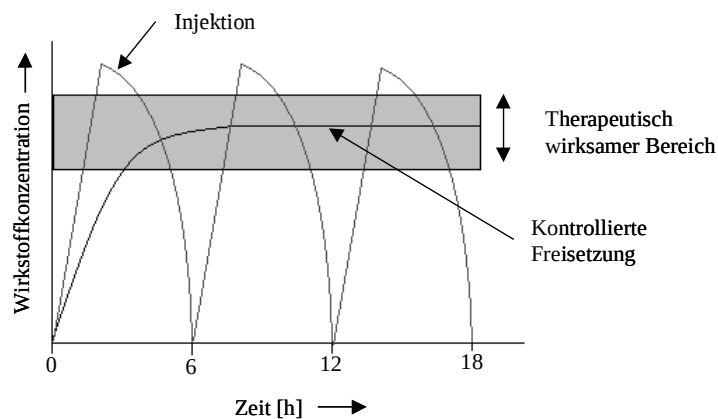


Abbildung D.12 Konzentrationsverlauf eines Wirkstoffes im Körper in Abhängigkeit von der Verabreichungsform

oralen Einnahme haben den Nachteil, dass die Wirkstoffkonzentration im Körper wie in **Abbildung D.12** dargestellt um die therapeutisch optimale Dosis schwingt. Hierbei können schädigende Nebenwirkungen durch eine zu hohe Konzentration, ebenso wie durch eine Unterschreitung der pharmazeutisch wirksamen Konzentration auftreten. Durch eine

kontinuierliche Abgabe ließe sich zudem die Gesamtmenge des eingesetzten Wirkstoffes deutlich reduzieren, und somit auch die Gefahr möglicher Nebenwirkungen. Als Beispiele für Arzneistoffe, die auf Grund ihrer starken Nebenwirkungen besonders von einer kontrollierten Freisetzung profitieren könnten, gelten:

Chemotherapeutika^[182], Immunsuppressiva^[183], Antibiotika^[184], Steroide^[185], Hormone^[186] und Anästhetika in der Schmerztherapie.^[187]

Eine weitere Möglichkeit der Dosisverringerng ließe sich durch eine lokal begrenzte Freisetzung erzielen, d.h. dass die Wirkstoffabgabe direkt in der betreffenden Körperregion

^[182] G. Spenlehauer, M. Vert, J.P. Benoit, A. Boddaert, *In vitro* and *in vivo* degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method, *Biomaterials* **1989**, 10, 557-563

^[183] N. Katayama, R. Tanaka, Y. Ohno, C. Ueda, T. Houjou, K. Takada, Implantable slow release cyclosporin A(CYA) delivery system to thoracic lymph duct, *Int. J. Pharm.* **1995**, 115, 87

^[184] R.P. del Real, S. Padilla, M. Vallet-Regi, Gentamicin release from hydroxyapatite/poly(ethylmethacrylate)/poly(methyl methacrylate)composites, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 52, 1-7,

^[185] T. Mogi, N. Ohtake, M. Yoshida, R. Chimura, Y. Kamaga, S. Ando, T. Tsukamoto, T. Nakajima, H. Uenodan, M. Otsuka, Y. Matsuda, H. Ohshima, K. Makino, Sustained release of 17 β -estradiol from poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vitro and in vivo, *Colloids Surf., B*, **2000**, 17, 153-165

^[186] O.L. Johnson, J-L. Cleland, H.J. Lee, M. Charnis, E. Duenas, W. Jaworowicz, D. Shepard, A. Shahzamani, A.J.S. Jones, S.D. Putney, A month-long, effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone, *Nature Med.* **1996**, 2, 795-799

^[187] D.S. Kohane, J. Yieh, N.T. Lu, R. Langer, G.R. Strichartz, C.B. Berde, A re-examination of tetrodotoxin for prolonged duration local anesthesia, *Anesthesiology* **1998**, 89, (1), 119-1331

erfolgt, z. B. bei der Chemotherapie von Tumoren^[188] oder bei der Behandlung chronischer Entzündungsreaktionen. Die systemische Verabreichung von Antibiotika mittels Injektion ist hierzu ungeeignet eine hohe Konzentration des Wirkstoffes im betreffenden Gewebe zu erzielen, da der Wirkstoff über den Blutkreislauf im gesamten Körper verteilt wird und nur ein geringer Anteil am Infektionsherd wirksam werden kann. Die aufgrund dieses Verteilungsmechanismus notwendige höhere Dosierung kann zu Organschäden führen, wobei besonders die Nieren betroffen sind.^[189] Statistische Untersuchungen in den USA verdeutlichen den Bedarf an sicheren Verabreichungsformen von Arzneimitteln. Nach dortigen Schätzungen lassen sich 15 % aller Todesfälle in Kliniken auf Komplikationen während der Medikation zurückführen.^[190] Weiterhin werden die Folgekosten einer falschen Dosierung von Medikamenten auf ca. \$136 Mrd. geschätzt.^[191]

Eine besondere Bedeutung könnten Systeme zur kontrollierten Freisetzung für die Verabreichung von Wirkstoffen auf Proteinbasis erlangen. Proteine reagieren aufgrund ihrer chemischen Struktur sehr empfindlich auf das sie umgebende Milieu und werden daher bei einer oralen Applizierung im Verdauungstrakt stark angegriffen (Denaturierung), wodurch sie ihre Wirksamkeit verlieren.^[192] Zudem haben sie eine relativ kurze Verweildauer im menschlichen Körper, da sie üblicherweise sehr schnell metabolisiert werden.^[193] Durch die Fortschritte in der Biotechnologie und der Gentherapie ist es aber abzusehen, dass es in naher Zukunft einen steigenden Bedarf an Depot-Systemen zur parenteralen Freisetzung von Proteinen geben wird.^[194] So bestimmt nicht zuletzt die Art der Verabreichung (Formulierung) über den Erfolg eines potentiellen Wirkstoffes.^[195]

Ein vielversprechender Ansatz, eine kontrollierte Freisetzung von Arzneimitteln zu erreichen, ist die Kombination von Wirkstoff und biodegradierbaren Polymeren. Obwohl die Darstellung von biologisch abbaubaren Polymeren schon seit den frühen 50er Jahren bekannt ist,^[196] dauerte es bis Mitte der 70er Jahre, bis das Potential dieser Materialien im Bezug auf eine Nutzung zur

^[188] O. Ike, Y. Shimizu, Y. Ikada, S. Watanabe, T. Natsume, R. Wada, S.-H. Hyon, S. Hitomi, Biodegradation and antitumour effect of adriamycin-containing poly(L-lactic acid) microspheres, *Biomaterials* **1991**, 12, 757-762

^[189] A.A. Frisov, D.N. Alexey, P.F. Inessa, Biodegradable implants containing gentamicin: Drug release and pharmacokinetic, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **1987**, 13, 1651-1674

^[190] D.C. Classen, L.S. Pestotnik, S.R. Evans, J.P. Burke, Adverse drug events in hospitalized patients, *J. Am. Med. Assoc.* **1997**, 277, 301-306

^[191] M.P. Cramer, S.R. Saks, Value of controlled release dosage forms, *Pharmaco Economics* **1994**, 5, 482-504

^[192] A.K. Oral heparin results in the appearance of heparin fragments in the plasma of rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1986**, 83, 2964-2968

^[193] R.A. Siegel, R. Langer, Controlled release of polypeptides and other macromolecules, *Pharm. Res.* **1984**, 1, 210

^[194] R. Langer, New methods of drug delivery, *Science* **1990**, 249, 1527-1533

^[195] K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K. Shakesheff, Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 3181-3198

^[196] N.A. Higgins, Condensation polymers of hydroxyacetic acid", *U.S. Patent 2 676 945*, **1954**

kontrollierten Arzneimittelabgabe erkannt wurde.^[197] Seit dieser Zeit hat die Forschungstätigkeit an polymerbasierenden Systemen zur kontrollierten Freisetzung stark zugenommen.

Freisetzungssysteme auf der Basis resorbierbarer Polymere basieren je nach Polymertyp auf der Diffusion des Wirkstoffes aus dem Polymer (diffusionskontrolliert) oder auf der Kopplung der Freigabe des physikalisch eingeschlossenen oder chemisch gebundenen Wirkstoffes an die Degradation des Polymers (degradationskontrolliert).

Ein vielversprechender Ansatz sieht z. B. die Verwendung von mikroskopisch kleinen Hohlkugeln, sogenannten Mikrokapseln (*microspheres*), aus resorbierbaren Polymeren vor. Diese enthalten in ihrem Inneren den freizusetzenden Wirkstoff und sind aufgrund ihrer geringen Größe ($< 250 \mu\text{m}$) in einer Dispersion injizierbar. Dies hat den Vorteil, dass sie sich relativ

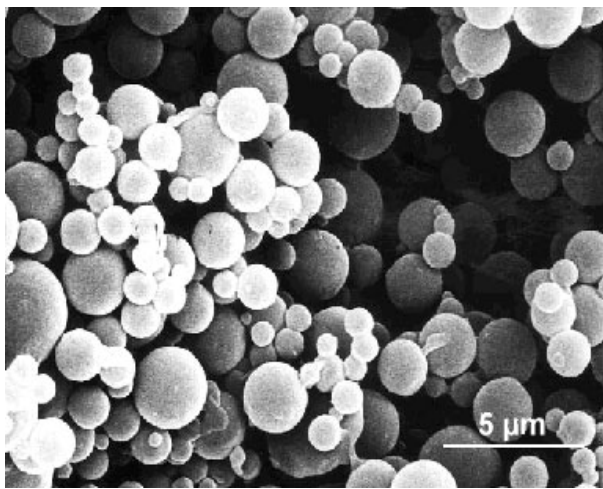


Abbildung D.13 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mikrokapseln nach M. Dunne *et al.*^[144]

unkompliziert verabreichen lassen. Im Körper erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffes durch Diffusion und die langsame Degradation der *Mikrokapseln*. Durch die Variation der verwendeten Polymere sowie der Herstellungsbedingungen lassen sich das Degradationsverhalten und somit die Freisetzungsraten variieren.^[198] Ein Nachteil dieses Systems ist die Notwendigkeit von organischen Lösungsmitteln (im allgemeinen Dichlormethan oder Chloroform) während der

Herstellung.^[199] Diese verbleiben zum Teil in den *Mikrokapseln* und werden im Verlauf der Degradation mit dem jeweiligen Wirkstoff freigesetzt. Ein weiteres häufig auftretendes Problem ist die Freisetzung des Wirkstoffes in mehreren Phasen aufgrund eines heterogenen Degradationsmechanismus innerhalb der *Mikrokapseln*.^[200] Typischerweise erfolgt die Freisetzung des jeweiligen Wirkstoffes in drei Phasen: einer erhöhten initialen Freisetzung, gefolgt von einer Phase mit verringerter Freisetzungsraten und schließlich einer degradationsgesteuerten Abgabe. Die erhöhte Freisetzungsraten zu Beginn wird besonders häufig

^[197] G.A. Boswell, R.M. Scriber, Polylactic drug mixtures, *U.S. Patent* 3 773 919, **1973**

^[198] M. Dunne, O.I. Corrigan, Z. Ramtoola, Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles, *Biomaterials* **2000**, 21, 1659-1668

^[199] R. Jeyanthi, B.C. Thanoo, R.C. Metha, P.P. DeLuca, Effect of solvent removal technique on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery, *J. Controlled Release* **1996**, 38, 235-244

^[200] J.F. Fitzgerald, O.I. Corrigan, Investigation of the mechanism governing the release of levamisole from polylactide-co-glycolide delivery systems, *J. Controlled Release* **1996**, 42, 125-132

beobachtet und als *burst effect* bezeichnet.^{[201],[202]} Er beruht auf der Freisetzung von oberflächennah gebundenen Wirkstoffen und ist im hohen Maße von dem Anteil des eingebrachten Wirkstoffes, dem Beladungsgrad, abhängig.^[203] Im Verlauf der zweiten Phase mit verringerter Freisetzungsrage beginnt die Degradation des Polymers. Die mittlere Molmasse nimmt deutlich ab, erlaubt aber noch keine verstärkte Diffusion des Wirkstoffes aus der noch intakten Mikrosphäre. In der dritten Phase ist die Molmasse des Polymers so stark gesunken, dass es partiell löslich wird und erodiert. Im Zuge der Erosion des Polymers erhöht sich auch die Freisetzungsrage wieder.^[204]

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung größerer wirkstoffbeladener Implantate. Hierbei handelt es sich um Formkörper, in denen der Wirkstoff in Partikelform fest im Polymer eingeschlossen ist. Dieses wird häufig durch ein gemeinsames Extrudieren von Polymer und Wirkstoff erreicht. Die Freisetzung erfolgt auch hier je nach Größe des Moleküls entweder durch Diffusion des Wirkstoffes aus der Polymermatrix oder aufgrund von Degradation und Erosion des Polymerträgermaterials. Da die Verwendung von Implantaten als Trägersystem meist mit einem operativen Eingriff verbunden ist, eignen sich solche Systeme bei Erkrankungen, bei denen ohnehin eine Operation notwendig ist. Eine denkbare Anwendung wäre z. B. die präventive lokale Freisetzung von Antibiotika nach chirurgischen Eingriffen oder bei chronischen Entzündungen z. B. Knochenmarkentzündung (Osteomyelitis). Eine weitere denkbare Anwendung solcher Implantate besteht in der Knochenersatzforschung. Durch eine kontinuierliche Freisetzung von speziellen Knochen-Wachstumsfaktoren (*bone morphogenetic proteins*; BMP) aus einem resorbierbaren Knochenersatzimplantat ließe sich der Heilungsprozess deutlich beschleunigen und der Behandlungszeitraum verkürzen. Bei den von Urist entdeckten BMPs handelt es sich um spezielle Proteine, die im Körper unter anderem eine wichtige Rolle bei der Knochenbildung einnehmen.^[205] Sie induzieren eine Kaskade zur Differenzierung von knochenbildenden Zellen aus mesenchymalen Stammzellen.^[206] Bis heute sind 15 verschiedene BMPs bekannt, von denen BMP-2 und BMP-9 nachweislich osteoinduktiv

^[201] B.W. Wagenaar, B.W. Müller, Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres, *Biomaterials*, **1994**, 15, 49-54

^[202] M.R. Kreitz, J.A. Domm, E. Mathiowitz, Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. *In vitro* degradation and release of heparin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide), *Biomaterials* **1997**, 18, 1645-1651

^[203] Y.Y. Yang, T.S. Chung, N.P. Ng, Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials* **2001**, 22, 231-241

^[204] D.A. Eppstein, J.P. Longenecker, Alternative delivery systems for peptides and proteins as drugs, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* **1988**, 5, 99-139

^[205] M.R. Urist, Bone: formation by autoinduction, *Science* **1965**, 150, 893-899

^[206] A. H. Reddi, Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration, *Nature Biotechnology*, **1998**, 16, 247-252

wirken.^[207] Im Tierversuch zeigte sich, dass durch die Kombination von BMPs und resorbierbaren Polymeren, zu einem temporären Knochenersatzmaterial, der Heilungsprozesses beschleunigt werden kann.^[208] In den meisten Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit dieser Wachstumsfaktoren erfolgte die Applikation systemisch, d.h. durch eine einmalige Injektion. Hierbei wurden die Dosierungen bis um den Faktor 10^6 über der physiologischen Konzentration im Gewebe gewählt, hauptsächlich um Auswascheffekte durch Körperseren zu kompensieren.^{[209],[210]} Anhand dieses Beispiels werden die Vorteile einer kontrollierten Freisetzung besonders deutlich. Da zudem bekannt ist, dass BMPs auch auf andere Gewebearten stimulierend wirken können, sind bei einer hohen Dosierung Nebenwirkungen zu befürchten. Der wichtigste Aspekt bei der Herstellung von Wirkstoffträgern auf der Basis resorbierbarer Implantate ist die Art der Beladung. Die einfachste Methode der Herstellung ist das gemeinsame Verpressen einer homogenen Pulvermischung des Polymers mit dem einzubringenden Wirkstoffe unter hohem Druck.^[211]

Weitere vielfach verwendete Methoden sind das Schmelzpressen oder Extrudieren von Polymer/Wirkstoff-Mischungen zu den gewünschten Implantatformen.^{[212],[213]}

Einen entscheidenden Einfluss auf die Freisetzungskinetik hat neben der Art des verwendeten Polymers auch der Mengenanteil des Wirkstoffes (Beladungsgrad). Im allgemeinen führt eine Steigerung der Beladung zu einer Erhöhung der initialen Freisetzung und im weiteren Verlauf zu einer gesteigerten Freisetzungsrate. Dieses beruht auf der Verteilung des Wirkstoffes in der Polymermatrix. Solange der Beladungsgrad niedrig ist, liegen die einzelnen Wirkstoffpartikel isoliert voneinander in der Polymermatrix und sind nicht permeabel (siehe **Abb. D.14 A**).

Mit zunehmender Beladung bilden sich Verbindungsstellen zwischen einzelnen Wirkstoffpartikeln, wodurch sich die Freisetzungsrate nur relativ wenig erhöht.

^[207] J.O. Hollinger, K. Leong, Poly(α -hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins, *Biomaterials* **1996**, 17, 187-194

^[208] K. Whang, D.C. Tsai, E.K. Nam, A. Aitken, S.M. Sprague, P.K. Patel, K.E. Healy, Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 42, 491-499

^[209] L.S. Beck, E.P. Amento, Y. Xu, L. Deguzman, W.P. Lee, T. Nguyen, N.A. Gillett, TGF-beta 1 induced bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1, *J. Bone. Miner. Res.* **1998**, 8, 753-761

^[210] P.M. Vogt, M. Lehnhardt, D. Wagner, V. Janson, M. Krieg, H.U. Steinmann, Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion, *Plast. Reconstr. Surg.* **1998**, 102, 117-123

^[211] C. Schmidt, R. Wenz, B. Nies, F. Moll, Antibiotic in vivo/in vitro release, histocompatibility and biodegradation of gentamicin implants based on lactic acid polymers, *J. Controlled Release* **1995**, 37, 83-94

^[212] N. Kunou, Y. Ogura, M. Hashizoe, Y. Honda, S.-H. Hyon, Y. Ikada, Controlled delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits, *J. Controlled Release* **1995**, 37, 143-150

^[213] J.H. Kou, C. Emmett, P. Shen, S. Aswani, T. Iwamoto, F. Vaghefi, G. Cain, L. Sanders, Bioerosion and biocompatibility of poly(*d,l*-lactic-co-glycolic acid), *J. Controlled Release* **1997**, 43, 123-130

Erst ab einer kritischen Beladung bildet sich ein System von untereinander verbundenen Wirkstoffpartikeln aus und es kommt zur Cluster-Bildung (**Abb. D.14 B**).

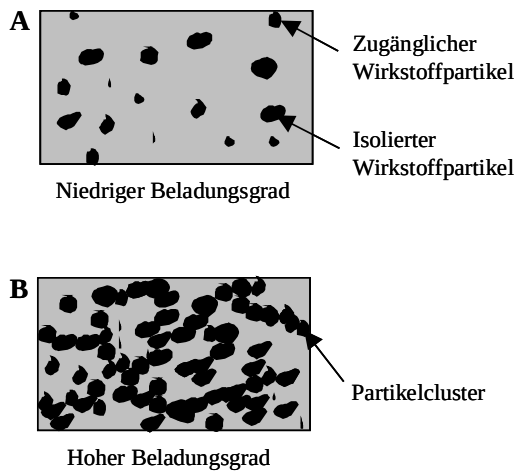


Abbildung D.14 Schematische Darstellung der Wirkstoffverteilung in Körpern mit niedrigem (A) und hohem (B) Beladungsgrad

Das Lösen von oberflächennahen Wirkstoffpartikeln dieser Cluster führt aufgrund der miteinander verbundenen Partikel zu einer beschleunigten Freisetzung aus dem gesamten Cluster und somit zu einer sprunghaften Steigerung der Freisetzungsrates.^[214] Mathematisch lässt sich dieses Phänomen mit der Perkulations-Theorie beschreiben.^[215]

Ein Nachteil der üblichen polymertechnischen Verarbeitungsmethoden ist die thermische Belastung des Wirkstoffes während der Fertigung, da die Prozesstemperaturen während

des Extrudierens für die häufig verwendeten Poly(lactid-co-glykolid)-Copolymere zwischen 70 und 90 °C liegen.^[216] Solche Verfahren eignen sich somit nur für die Verarbeitung von thermisch stabilen Wirkstoffen.

Da aber besonders Arzneistoffe auf Proteinbasis von einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung profitieren würden, diese aber je nach Größe und Struktur empfindlich auf Temperaturerhöhungen reagieren, eignen sich herkömmliche Polymerverarbeitungsmethoden nur bedingt für das Design von wirkstoffbeladenen Implantaten.

Um auch thermisch instabile Stoffe in Implantate einbringen zu können, muss entweder ein Polymer mit einer sehr niedrigen Schmelz- bzw. Glasübergangstemperatur gewählt werden (z.B. PDLA), oder die Beladungsmethode muss im Hinblick auf die Prozesstemperaturen optimiert werden. Ein hierzu geeignetes Verfahren ist z. B. die Beladung durch gemeinsames Lösen von Wirkstoff und Polymer in einem Lösungsmittel (z.B. Dichlormethan oder Eisessig) und anschließender Gefriertrocknung. Eine Variante dieser Methode verwendet überkritisches Kohlendioxid als Lösungsmittel.^[217]

^[214] R.A. Siegel, J. Kost, R. Langer, Mechanistic studies of macromolecular drug release from macroporous polymers. I. Experiments and preliminary theory concerning completeness of drug release, *J. Controlled Release*, **1989**, 8, 223-236

^[215] K.K. Mohanty, J.M. Ottino, H.T. Davis, Reaction and transport in disordered composite media: Introduction of percolation concepts, *Chem. Eng. Sci.* **1982**, 37, 905

^[216] I. Kaetsu, Biodegradable implant composites for local therapy, *J. Controlled Release* **1987**, 6, 249-263

^[217] R. DePonti, C. Torricelli, A. Martini, E. Lardinii, Use of supercritical fluids to obtain porous spongy biodegradable polymers, *Europäisches Patent*, **1991**, EP 90/01895

Als Produkt erhält man einen porösen Polymerformkörper, in dem der Wirkstoff weitgehend homogen verteilt ist. *In vivo* Studien, in denen Implantate auf diese Weise mit rhBMP's beladen wurden, belegen zwar eine gesteigerte Knochenneubildung, doch zeigen Untersuchungen zur Freisetzungskinetik, dass solche porösen Formkörper aufgrund ihrer großen Oberfläche zu einem starken *burst effect* und zu einer relativ kurzen Freisetzungsdauer neigen.^{[218],[219]} Eine weitere Formgebung zur Minimierung der Oberfläche ist somit meist nötig, um eine relativ gleichmäßige Freisetzung zu erzielen. In der Regel erfolgt dies durch das Verpressen bei hohen Drücken und möglichst geringen Temperaturen.^[220]

Ziel der nachfolgenden Untersuchung war es, die Eignung von festkörperchemisch hergestellten mikroporösen Polyglykolid als Trägermaterial zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung zu untersuchen und zu optimieren. Aus vorhergehenden Untersuchungen zu diesem Thema war bekannt, dass sich wirkstoffbeladene Formkörper relativ einfach herstellen lassen, aber die Freisetzung bereits nach 60 Stunden abgeschlossen ist.^[221] Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte geprüft werden, inwieweit sich durch die Optimierung der Wirkstoffbeladung und

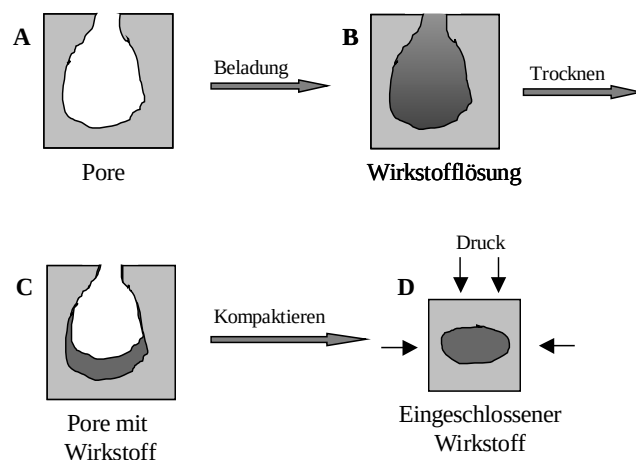


Abbildung D.15: Schemata zur Wirkstoffbeladung von porösen Materialien

die Formkörperpräparation die Freisetzungzeiten verlängern lassen. Die angestrebte Beladungsmethode sah vor, den Wirkstoff gezielt in die mikroporöse Struktur des festkörperchemisch gewonnenen Polyglykolids einzulagern (vgl. **Abb. D.15**). Hierzu sollte der Wirkstoff in Lösung in die Poren eingebracht werden. Durch eine geeignete Trocknungsmethode sollte das Lösungsmittel entfernt werden und der Wirkstoff in den Poren verbleiben. Durch die anschließende Kompaktierung, mit unterschiedlichen Formgebungsverfahren, sollte der Wirkstoff physikalisch in das Polymer eingeschlossen werden. Der Vorteil dieses Konzeptes ist die Vermeidung jeglicher thermischer Belastung während der Implantatpräparation, so dass auch

^[218] K. Whang, T.K. Goldstick, K.E. Healy, A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors, *Biomaterials*, **2000**, 21, 2545-2551

^[219] A. Tschakaloff, R. von Oepen, S. Seibt, M. Vieting, W. Michaeli, Das Begasungsverfahren zur Beladung resorbierbarer Polymere mit thermolabilen Substanzen, *Dtsch. Z. Mund. Kiefer. GesichtsChir.* **1996**, 20, 47-50

^[220] R. Nakaoka, Y. Tabata, Y. Ikada, Antibody production by administration of biodegradable granules incorporate antigen through different injection routes, *J. Controlled Release* **1996**, 40, 11-21

^[221] Michael Siedler, Thermisch initiierte Copolymerisation von Halogencarboxylaten, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **1999**

temperaturempfindliche Wirkstoffe wie z. B. Proteine verwendet werden könnten sowie die Minimierung des Einsatzes von organischen Lösungsmitteln. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit sich die Freisetzungskinetik durch die Verwendung von ebenfalls festkörperchemisch synthetisierten Copolymeren vom Typ Poly(lactid-co-glykolid) beeinflussen lässt.

D.II.II Präparative Arbeiten

Polymere

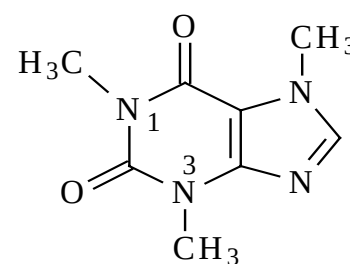
Die verwendeten Polymere Polyglykolid und Poly(lactid-co-glykolid) 85:15 wurden aus Natriumchloracetat bzw. aus Kristallmischungen von gemeinsam gefälltem Natriumchloracetat und Natrium-(R,S)-2-chlorpropionat durch thermisch induzierte Polykondensation im Festkörper gewonnen.^{[222],[223]} Nach Abschluss der Reaktion wurden die pulverförmigen Produkte in entionisiertem Wasser bei ca. 5 °C acht Stunden ausgewaschen, um das als Nebenprodukt entstandene Natriumchlorid zu entfernen. Die wasserunlöslichen Polymere wurden abfiltriert und im Vakuum bei einem Druck von 0.1 mbar vollständig getrocknet.

Beladung

Als Modellsubstanz zur Untersuchung der Freisetzungskinetik wurde Coffein (99% Merck Ph. Eur.) verwendet, da es sich um ein tertiäres Amin handelt, wie eine Vielzahl der in der Literatur verwendeten Wirkstoffe z. B. Thioridazin (Neuroleptikum), Cinnarizin (Antihistaminikum) und Clonidin (Antihypertonikum).^{[224],[225]}

Ein weiterer Vorteil ist die vergleichsweise einfache Quantifizierung mittels UV/VIS-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 273 nm.

Zur Beladung wurde das entsprechende Polymer mit einer wässrigen Coffein-Lösung benetzt, im Eis/Kochsalzgemisch eingefroren und im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet. Die Formgebung erfolgte mit einer hydraulischen Presse bei einer Kraft von 120 kN, über eine Dauer von fünf Minuten, in einer runden Pressform aus Stahl mit einem Durchmesser von 13 mm.



Coffein

Abbildung D.16: Strukturformel von Coffein

^[222] M. Epple, H. Kirschnick, The thermally induced solid-state polymerization reaction in halogenoacetates, *Chem. Ber.* **1996**, 129, 1123-1129

^[223] M. Siedler, S.J. Kitchin, K.D.M. Harris, A.L.C. Lagoa, H.P. Diogo, M.E.M. da Piedade, M. Epple, Porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) by thermal salt elimination from halogenocarboxylates, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 3140-3148

^[224] H.V. Maulding, T.R. Tice, D.R. Cowsar, J.W. Fong, J.E. Pearson, J.P. Nazareno, Biodegradable micro-capsuls: acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medicament, *J. Controlled Release* **1986**, 3, 103-117

^[225] Y. Cha, C.G. Pitt, The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres, *J. Controlled Release* **1989**, 8, 259-265

Dies entspricht einem Pressdruck von 900 MPa. Die Formkörper wurden, um eine homogene Diffusion von allen Seiten zu gewährleisten, in eine Tasche aus Filterpapier (Schleicher & Schuell / 595) eingenäht und an einem Faden hängend in der Freisetzungslösung fixiert (siehe **Abb. D.17**). Die Freisetzung erfolgte in einem verschlossenen Glaskolben, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu minimieren. Als Freisetzungsmedium diente eine Phosphatpuffer-Lösung (600 ml, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$) mit physiologisch eingestelltem pH-Wert ($\text{pH} = 7,4$), bei einer Temperatur von 37°C . Zur Simulation des Stofftransportes durch Körperseren im menschlichem Körper wurden die Proben leicht gerührt.

Die Aufnahme der Freisetzungskinetik von Coffein, aus den hergestellten Implantaten, erfolgte



Abbildung D.17: Aufnahme des Versuchsaufbaus zur Ermittlung der Freisetzungskinetik von Coffein.

durch die Bestimmung der Coffein-Konzentration in der Puffer-Lösung. Gemessen wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 272.8 nm. Hierzu wurden je nach verwendeter Meßküvette 1-5 ml Lösung entnommen und nach der Messung dem System zurückgeführt. Mit Hilfe einer zuvor ermittelten Kalibriergeraden wurde der molare Extinktionskoeffizient bestimmt und die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. **Tabelle D.3** gibt einen Überblick über die gesamten in der Studie untersuchten Formkörper und deren Beladung.

Tabelle D.3: Übersicht der dargestellten Formkörper zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung

Versuchs-Nr.	Bezeichnung	Polymer	m_{Polymer} [mg]	m_{Coffein} [mg]	m_{gesamt} (nach Pressen und Beschichten) ¹ [mg]	$m_{\text{inkorp. Coffein}}$ [mg]	Beladung [%]
1	PLGA 5/95	PLGA 5/95	150	15	150	13.6	9.1
2	PLGA 10/90	PLGA 10/90	190	20	200	19.4	9.7
3	PGA schmelzgepresst	PGA	190	20	190	18.1	9.5
4	PGA mit PLLA Überzug	PGA-Kern PLLA-Mantel	190 56	20	246	17.5	7.1
5	PGA mit PDLLA Überzug	Kern: PGA Mantel: PDLLA	150 51	20	176	14.6	8.3
6	PGA mit PDLLA Folie	PGA-Kern Folie: PDLLA	150 70	20	180	10.7	5.9
7	PGA mit präporöser Folie	Kern: PGA Folie: PDLLA	190 66	25	256	21.6	11.4
8	PLGA 10/90 umkapselt mit PLLA	Kern: PLGA 10/90 Kapsel: PLLA	11.2 195	1.1 -	203	1.1	0.5 ²
9	Coffein-Tablette umkapselt mit PLLA	Kern: Kapsel: PLLA	- 405	2.5 -	400	2.5	0.6 ²

¹ Aufgrund des Einfüllens in die Pressform und des Entgratens der Implantate nach der Formgebung ergeben sich Differenzen zu den theoretischen Gesamtmassen.² Aufgrund der Vorgabe, gleiche Formkörpervolumen, ergibt sich eine präparationsabhängige, geringere Beladung.

D.II.III Ergebnisse

Einfluss des Polymers und der Beladungsart auf die Freisetzungskinetik

Ziel der beiden folgenden Freisetzungsversuche war es, den Einfluss der Art der Beladung und des verwendeten Polymers zu untersuchen. Anhand einer früheren Untersuchung zu diesem

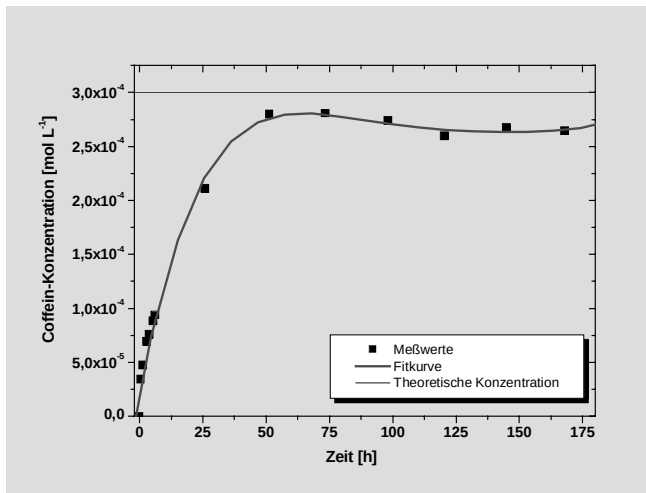


Abbildung D.18: Freisetzungskinetik von Coffein aus einer PGA-Matrix ^[27]

Thema war bekannt, dass die Freisetzung aus einer coffeinbeladenen Polyglykolid-Matrix innerhalb von 48 Stunden erfolgt (vgl. **Abb. D.18**).^[226] Die Ursache der schnellen Freisetzung, nahezu des gesamten inkorporierten Coffeins innerhalb dieser Zeitspanne, ließ sich damals nicht genau ermitteln. Wahrscheinlich lässt sich dieser Umstand auf die Beladung, durch in Chloroform gelöstes Coffein, zurückführen. Während

der Trocknung bei reduziertem Druck erfolgte die Kristallisation des Coffeins überwiegend an der Porenoberfläche. Nach der anschließenden Kompaktierung, bei Raumtemperatur in einer hydraulischen Presse, führte dies zu Formkörpern einer einfachen Mischung aus Coffein und Polymer. Von diesen ist bekannt, dass die Freisetzung des Wirkstoffes vergleichsweise schnell erfolgt.^[227] Ausgehend von diesen Daten sollte untersucht werden, inwieweit sich die Freisetzungskinetik verändert, wenn die Beladung durch Gefriertrocknung erfolgt.

Weiterhin sollte der Einfluß des für die Matrix verwendeten Polymers untersucht werden. Hierzu wurden statt μ -porösem PGA zwei μ -poröse Copolymere vom Typ Poly(D,L-lactid-co-glykolid) (PLGA 55:95 und 10/90), als Matrix verwendet. Die in **Abbildung D.19** dargestellten Kurven zeigen die Freisetzungskinetik der beiden untersuchten Matrices. In beiden Fällen erfolgt die Freisetzung innerhalb von zwei Stunden nahezu vollständig. Die Freisetzung aus den Copolymer-Matrices erfolgt überraschenderweise deutlich schneller, als aus der Polyglykolid-Matrix. Es lassen sich weiterhin keine signifikanten Unterschiede zwischen den Matrices aus PLGA 5:95 (**Abb. D.19 A**) und PLGA 10:90 (**Abb. D.19 B**) erkennen. Dies zeigt, dass der verwendete Polymertyp keinen dirigierenden Einfluss auf die Freisetzung ausübt.

^[226] Michael Siedler, Thermisch initiierte Copolymerisation von Halogencarboxylaten, Diplomarbeit, Universität Hamburg, 1999

^[227] R. Ries, F. Moll, Matrix formation of polyglycolic acid tablets by annealing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1994, 40, (1), 14-18

Die Ursache hierfür liegt unter Umständen in der Verarbeitungsmethode. Durch das Verpressen bei Raumtemperatur werden die beladenen Polymerpulver nicht zu vollständig homogenen Körpern kompaktiert, wie dieses bei einer Formgebung durch Schmelzpressen der Fall wäre. Es verbleiben vermutlich, besonders im Inneren der Körper, Korngrenzen zwischen den einzelnen Polymerpartikeln untereinander und dem inkorporierten Coffein. Es ist vorstellbar, dass Wasser bevorzugt entlang dieser Korngrenzen in die Körper eindringt und das Coffein herauslöst. Hierdurch entsteht ein wassergefülltes Netzwerk, welches in der Lage ist, aus dem gesamten Formkörper das Coffein herauszulösen. Das Ziel einer Verlängerung der Freisetzungsdauer durch die Variation der Beladungsart und der Polymermatrix ließ sich somit nicht erreichen.

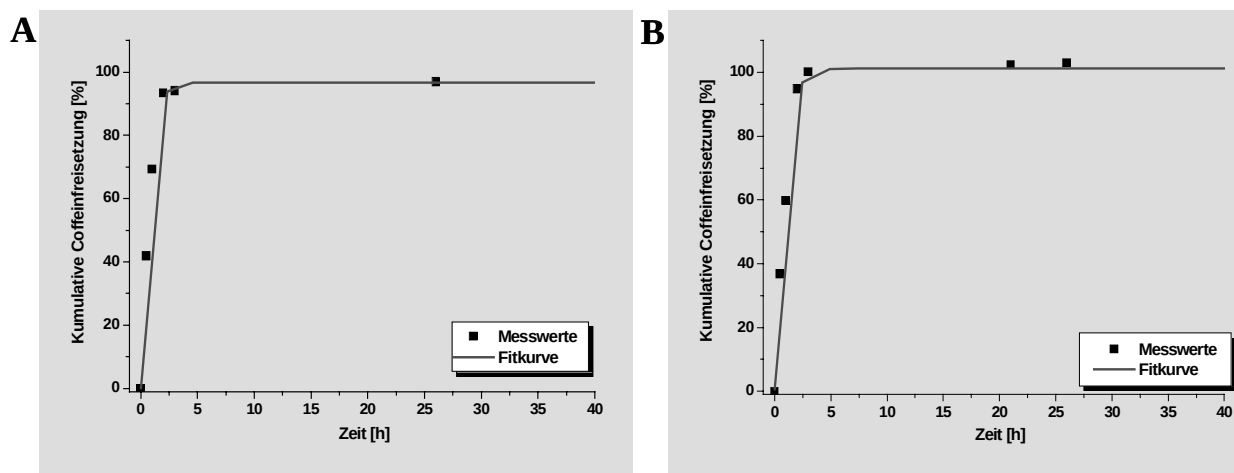


Abbildung D.19: Freisetzungskinetik von Coffein aus einer Polymermatrix aus PLGA 5/95 (A) (Versuchs-Nr. 1) und PLGA 10/90 (B) (Versuchs-Nr. 2).

Einfluss der Pressbedingungen

Um zu untersuchen, inwieweit sich durch Schmelzpressen homogene coffeinbeladene Polymer-Matrices präparieren lassen und welchen Einfluss diese Präparationsart auf das Freisetungsverhalten hat, wurde die nachfolgende Untersuchung durchgeführt. **Abbildung D.20** zeigt die Auswirkungen auf die Freisetzung, wenn die Formgebung der Matrix durch Schmelzpressen erfolgt. Der Kurvenverlauf entspricht den bei Raumtemperatur präparierten Körpern. Bereits nach drei Stunden ist das gesamte Coffein aus der Matrix herausgelöst. Der Grund der schnellen Freisetzung wird durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Polymer-Matrix nach der Freisetzung deutlich (siehe **Abbildung D.21**).

In **Aufnahme D.21 A** ist die Oberfläche der Matrix in einer 200fachen Vergrößerung dargestellt. Die Oberfläche wirkt nicht, wie nach dem Schmelzpressen zu erwarten wäre, homogen und glatt, sondern angegriffen und rauh.

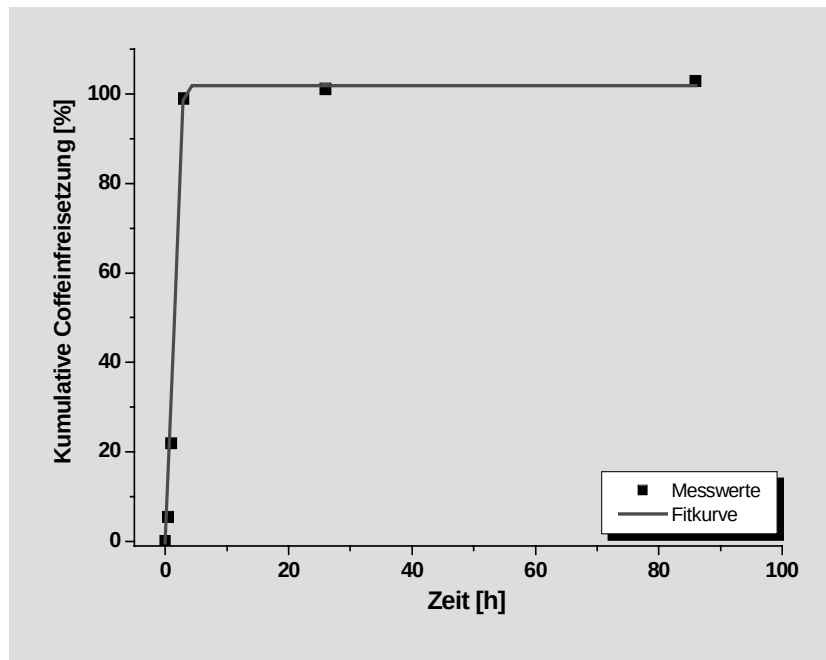


Abbildung D.20: Freisetzungskinetik von Coffein aus einer schmelzgepressten PGA-Matrix (Versuchs-Nr. 3).

Die im rechten Bildteil erkennbaren Risse sind aber wahrscheinlich auf den Trocknungsprozess während der Präparation der REM-Proben zurückführen und sind demnach nicht verantwortlich für die schnelle Freisetzung. In **Abbildung D.21 B** ist die Oberfläche nochmals in einer 1000fachen Vergrößerung dargestellt.

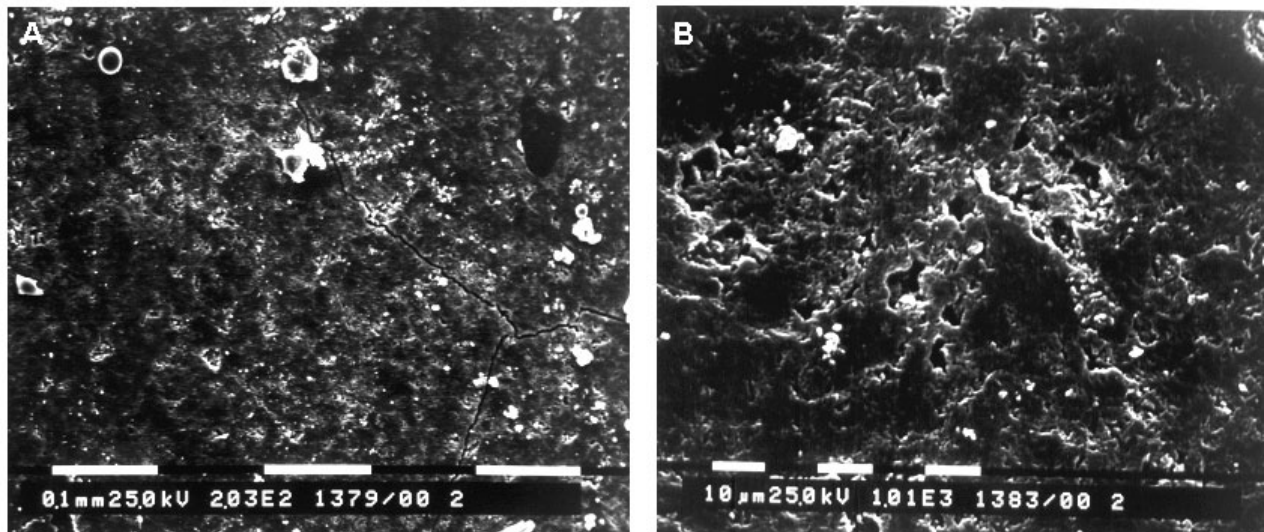


Abbildung D.21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der schmelzgepressten PGA-Matrix nach der Freisetzung (links 203fach, rechts 1010fach)

In dieser Vergrößerung lassen sich deutlich bis zu 10 μm große Löcher in der Oberfläche erkennen, die teilweise miteinander verbunden sind. Ob diese Oberflächenstruktur auf ausgewaschenes Coffein zurückzuführen ist oder auf einer unvollständigen Kompaktierung während des Schmelzpressens beruht, lässt sich nicht eindeutig beantworten.

Denkbar wäre auch eine beschleunigte Degradation des Polyesters durch das inkorporierte basische Coffein unter den Bedingungen des Schmelzpressens zu löslichen Oligomeren. Diese Vermutung erscheint angesichts der geringen mittleren Kettenlänge des verwendeten festkörperchemisch synthetisierten Polymers denkbar, zumal ein beschleunigender Effekt von dispergiertem Coffein auf die Degradation von Polyestern bereits von Li *et al.* beschrieben wurde.^[228]

Dieser Versuch zeigt, dass sich durch die Veränderung der Pressbedingungen (Schmelzpressung statt Hydraulik-Pressen) keine signifikante Verlängerung der Freisetzungsdauer erzielen lässt.

Einfluss von Polymer-Beschichtungen

Da die bisherigen Präparationsmethoden zu keiner Verlängerung der Freisetzungsdauer führten, wurde versucht, die Diffusion des Coffeins aus der Polymer-Matrix mit Hilfe von verschiedenen Beschichtungsverfahren zu verzögern. Hierzu wurden 10 g kommerzielles Poly-L-lactid (Sigma) bzw. Poly(D,L-lactid) (Sigma) in 100 ml Chloroform gelöst, so dass eine viskose Lösung vorlag. Die Beschichtung erfolgte durch Eintauchen der coffeinbeladenen PGA-Tabletten in die jeweilige Lösung. Danach wurden die beschichteten Tabletten 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Um eine gleichmäßige Beschichtung zu gewährleisten, wurden die Proben noch zwei weitere Male in der gleichen Weise beschichtet. Dieses Beschichtungsverfahren hat den Vorteil, dass es sich auch zu Präparation von proteinbeladenen Formkörpern eignet, da es während der Präparation zu keiner thermischen Belastung kommt.

Erste Versuche mit solchen Beschichtungen von Soriano *et al.* zeigten, dass sich mit Hilfe solcher Beschichtungen die Freisetzungzeiten beeinflussen lassen, es aber weiterhin zu Beginn zu einer beschleunigten Freisetzung kommt.^[229] Anhand der in **Abbildung D.22 A** dargestellten Freisetzungskinetik werden die Auswirkungen einer PLLA-Beschichtung auf den Freisetzungsprozess deutlich. Im Vergleich zu den bisherigen Untersuchungen erfolgt in diesem Versuch die Freisetzung des Coffeins über einen Zeitraum von sieben Tagen. Auffällig ist der Kurvenverlauf, der auf eine Freisetzung in drei Phasen schließen lässt, wie dies bereits für schmelzgepresste Freisetzungskörper aus der Literatur bekannt ist.^{[230],[231]}

^[228] S. Li, S. Girod-Holland, M. Vert, Hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid) in the presence of caffeine base, *J. Controlled Release* **1996**, 40, 41-53

^[229] I. Soriano, C. Évora, Formulation of calcium phosphates/poly(D,L-lactide) blends containing gentamicin for bone implantation, *J. Controlled Release* **2000**, 68, 121-134

^[230] C.G. Pitt, M.M. Gratzl, A.R. Jeffcoat, R. Zweidinger, A. Schindler, Sustained drug delivery systems: Factors affecting release rates from poly(ϵ -caprolactone) and related biodegradable polyesters, *J. Pharm. Sci.* **1979**, 68, 1534-1538

^[231] N. Kunou, Y. Ogura, M. Hashizoe, Y. Honda, S.H. Hyon, Y. Ikada, Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implants in rabbits, *J. Controlled Release* **1995**, 34, 143-150

In der ersten Phase, innerhalb der ersten $1\frac{1}{2}$ Tage, kommt es zu einer beschleunigten Freisetzung (*initial burst*) von ca. 85 % des enthaltenen Coffeins. Hiernach ist während der zweiten Phase, bis Tag $3\frac{1}{2}$, eine verzögerte Freisetzung des Coffeins zu beobachten. Innerhalb der dritten Phase steigt die Freisetzungsrates erneut an, bis nach ca. $5\frac{1}{2}$ Tagen das gesamte Coffein gelöst ist. Durch die Beschichtung mit PLLA konnte somit eine signifikante Steigerung der Freisetzungsdauer erzielt werden, wenngleich die Freisetzung nicht wie gewünscht mit einer konstanten Rate erfolgt.

Abbildung D.22 B zeigt die Ergebnisse der Beschichtung mit PDLLA. Die Freisetzung erstreckt sich über einen Zeitraum von acht Tagen. Innerhalb der ersten sieben Tage erfolgt die Freisetzung mit einer nahezu konstanten Rate von ca. 10 %/Tag. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass es zu Beginn der Freisetzung zu keinem *burst effect* kommt, wie er bei der mit PLLA beschichteten Probe beobachtet wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass PLLA/PDLLA-Beschichtungen prinzipiell in der Lage sind, die Diffusion von Wirkstoffen aus PGA/PLGA Formkörpern zu verlangsamen.

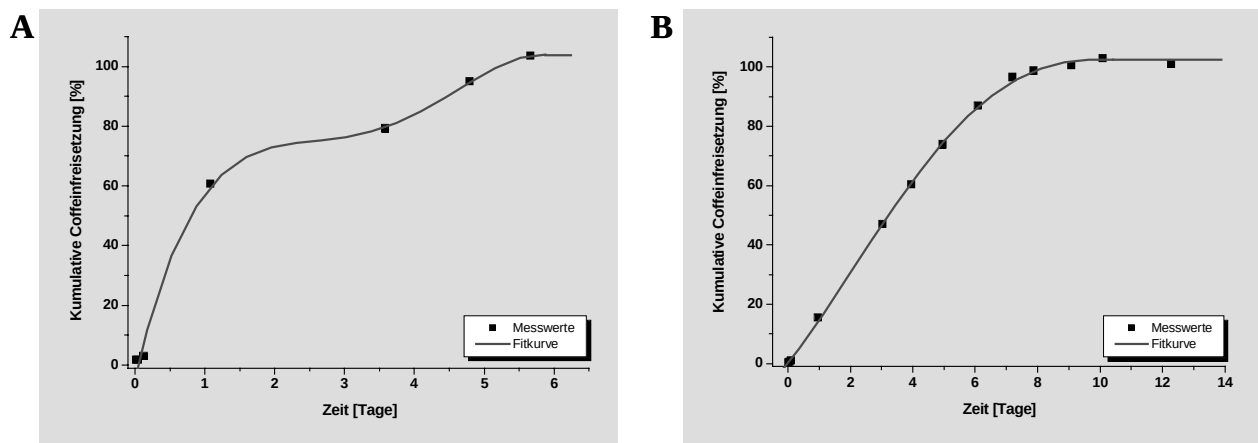


Abbildung D.22: Freisetzungskinetik von Coffein aus einer PGA-Matrix mit Beschichtung aus PLLA- (A) (Versuchs-Nr. 4) und PDLLA (B) (Versuchs-Nr. 5).

Einfluss von Polymer-Folien

Da gezeigt werden konnte, dass die Beschichtungen mit PLLA/PDLLA ein geeignetes Verfahren darstellen, um die Freisetzungsdauern zu erhöhen, war das Ziel der nachfolgenden Experimente, die Auswirkungen verschiedener Beschichtungsarten auf die Coffein-Freisetzung zu untersuchen. Da die Beschichtungen, die durch Eintauchen von beladenen PGA/PLGA-Formkörpern in entsprechende Polymerlösungen erzeugt werden, aufgrund des Herstellungsprozesses variieren können, wurden für die weiteren Untersuchungen Folien aus PLLA/PDLLA verwendet.

Folien haben den Vorteil, dass sie sich aufgrund der einfachen Herstellungsbedingungen leicht reproduzieren lassen und das Variieren von einzelnen Parametern z. B. der Schichtdicke erlauben.

Die Herstellung der Folien erfolgte durch Lösen von 1.5 g kommerziellen PDLLA in 7.5 ml Chloroform. Die Lösung wurde in eine Petrischale (d = 9.0 cm) gegeben und bei Raumtemperatur 24 Stunden getrocknet. Die so erhaltene Polymerfolie wurde anschließend mit flüssigem Stickstoff aus der Petrischale herausgelöst (siehe **Abbildung D.23 A**) und am Elektronenmikroskop hinsichtlich ihrer Morphologie und Schichtdicke analysiert. **Abbildung**

D.23 B zeigt die Schnittkante einer solchen Folie in 1250facher Vergrößerung. Anhand dieser Aufnahme lässt sich die Schichtdicke der kompakt und homogen erscheinenden Folie mit ca. 30 μm bestimmen.

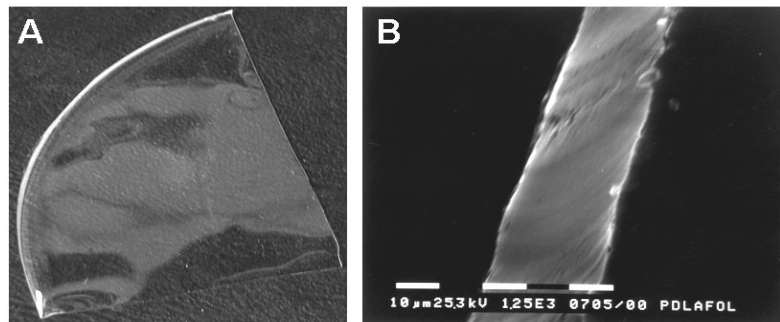


Abbildung D.23: Lichtbild der PDLLA-Folie nach der Herstellung (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme in 1250facher Vergrößerung (B)

Zur Präparation der Freisetzungskörper wurden die coffeinbeladenen Formkörper mit der entsprechend zurechtgeschnittenen Folie umschlossen. Um ein vorzeitiges Eindringen von Wasser zu verhindern, wurden die Nahtstellen der Folien durch vorsichtiges Erhitzen sorgfältig verschweißt. In **Abbildung D.24** ist ein auf diese Weise präparierter Formkörper dargestellt.

Die Auswirkungen dieser Präparationsmethode auf den Verlauf der Freisetzung sind in **Abbildung D.25 A** deutlich zu erkennen. Auffallendstes Merkmal der Freisetzung ist der verzögerte Beginn nach ca. 16 Tagen. Sind bis zu diesem Zeitpunkt erst 1.1 % des Coffeins abgegeben worden, so steigt die Freisetzungsrates nach dieser Zeit sprunghaft an. Im weiteren Verlauf erfolgt die Freisetzung nach einer sigmoidalen Funktion, bis nach weiteren drei Wochen nahezu das gesamte Coffein aus der Matrix gelöst ist. Die Ursache für den verzögerten Freisetzungsbeginn beruht auf der Interaktion zwischen der PDLLA-Folie und der Pufferlösung. Wie Studien von Vert *et al.* zu diesem Thema belegen, beginnt das Polymer bei Kontakt mit wässriger Pufferlösung innerhalb der ersten sieben Wochen mit einer nahezu konstanten Rate zu

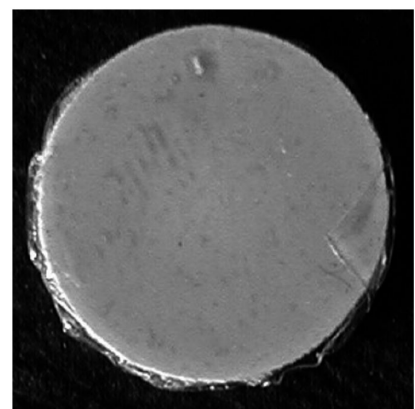


Abbildung D.24: PGA-Tablette mit PDLLA-Ummantelung

quellen.^[232] Dieses Quellen führt ab einem gewissen Zeitpunkt dazu, dass Wasser durch die PDLLA-Folie in den beladenen Formkörper eindringen kann und das enthaltene Coffein gelöst wird. Inwieweit der hierdurch entstehende osmotische Druck zu der hohen anfangs beobachteten Freisetzungsrates nach 16 Tagen führt, konnte nicht mit Sicherheit geklärt werden. Aufgrund ihrer Größe ist es aber den gelösten Coffeinmolekülen nicht möglich, ungehindert durch die gequollene PDLLA-Folie in die Pufferlösung überzutreten.

Dieser diffusionskontrollierte Vorgang erstreckt sich in der Folge über einen Zeitraum von ca.

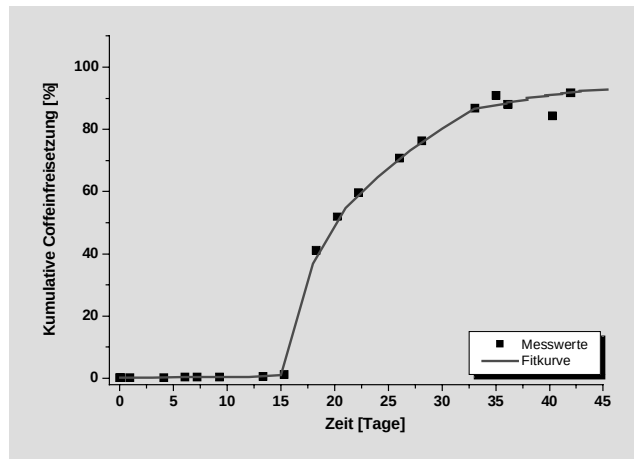


Abbildung D.25: Freisetzungskinetik von Coffein aus einer PGA-Matrix mit einem Folienüberzug aus PDLLA (Versuchs-Nr. 6).

vier Wochen, wobei die Freisetzungsrates stetig abnimmt. Die in **Abbildung D.26 A und B** dargestellten Aufnahmen zeigen den Probenkörper nach der Freisetzung. Die Aufnahme in **Abbildung D.26 A** zeigt den Körper direkt nach der Freisetzung. Es lassen sich deutliche Spuren erkennen, die ein Quellen während der Freisetzung belegen. Die Oberfläche wirkt wellig und im Vergleich zu **Abbildung D.24** aufgebläht und undurchsichtig. Unter dem

Elektronenmikroskop in **Abbildung D.26 B** erkennt man bei 1000facher Vergrößerung, dass die vormals homogene Folie im Inneren nun eine Porenstruktur aufweist und die Schichtdicke der getrockneten PDLLA-Folie aufgrund des Quellens nun ca. 45 µm beträgt.

Obwohl der Verlauf der Freisetzung nicht wie gewünscht von Anfang bis zum Ende mit konstanter Rate erfolgt, erscheint der verzögerte Start wiederum interessant im Hinblick auf eine programmierte Wirkstofffreisetzung, d.h. wenn die Abgabe des Wirkstoffs erst nach einer bestimmten Zeit erfolgen soll.

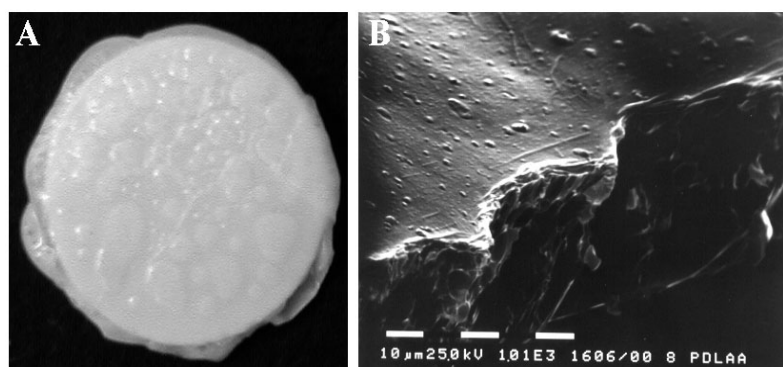


Abbildung D.26: PGA-Tablette mit PDLLA-Ummantelung nach der Freisetzung (A) und REM-Aufnahme der PDLLA-Ummantelung in 1000facher Vergrößerung (B).

^[232] S.M. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media, Part 1: Poly(DL-lactic acid), *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1990**, *1*, 123-130

Denkbar wäre auch die Kopplung zweier Freisetzungsarten, um einen Arzneistoff in zwei Phasen oder zwei Wirkstoffe nacheinander freizusetzen. Anwendungen, die von einer solchen programmierten Freisetzung besonders profitieren würden, wären z. B. die Chemotherapie^[233] und verschiedene Schutzimpfungen.^[234]

Um dennoch eine kontinuierliche Freisetzung zu erzielen, wurde in einem weiteren Versuch eine coffeinbeladen PGA-Tablette mit einer μ -porösen PDLLA-Folie ummantelt. Durch die Einführung definierter Poren in die Folie sollte eine gezielte Diffusion von Coffein aus der Matrix ohne Verzögerung ermöglicht werden. Die Herstellung der μ -porösen Polymerfolie erfolgte analog zu der bereits geschilderten Methode mit dem Unterschied, dass in der Chloroform/PDLLA-Lösung 0.1 mg Natriumchlorid dispergiert wurden. Das Natriumchlorid hatte durch vorheriges Sieben eine Korngröße von $< 63 \mu\text{m}$ und sollte als Porogen fungieren. Hierzu wurde die Folie nach der Präparation drei Tage in entionisiertes Wasser eingelegt, um das inkorporierte Salz auszuwaschen und eine definierte Porosität einzuführen. **Abbildung D.27** zeigt die PDLLA-Folie vor (**Abb. D.27 A**) und nach dem Auswaschen (**Abb. D.27 B**) mit Wasser.

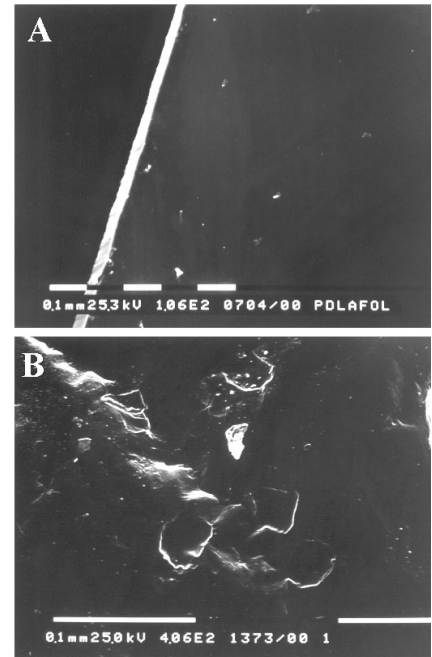


Abbildung D.27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der PDLLA-Folie vor (A, 106fach) und nach dem Auswaschen (B, 406fach).

Der Kurvenverlauf der Coffeinfreisetzung eines auf diese Weise präparierten Implantates ist in **Abbildung D.28** aufgetragen. Es ist unschwer zu erkennen, dass aufgrund der Poren in der Folie die Freisetzung des Coffeins ohne Verzögerung und mit hoher Rate beginnt. Innerhalb von fünf Tagen ist das gesamte Coffein in die Lösung übergetreten. Offenbar ist die Porosität der Folie so groß, dass das enthaltene Coffein relativ ungehindert durch

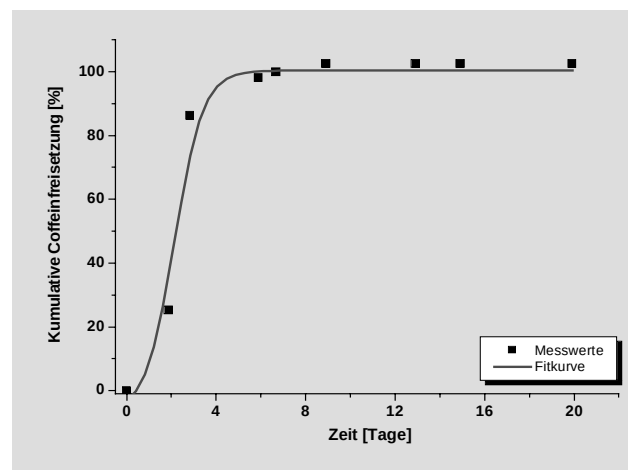


Abbildung D.28: Freisetzungskinetik von Coffein aus einer PGA-Matrix mit einem μ -porösen Folienüberzug aus PDLLA (Versuchs-Nr. 7).

^[233] D. Huhn, *Zytostatikatherapie maligner Erkrankungen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany, 1986

^[234] D.L. Wise, D.J. Trantolo, R.T. Marino, J.P. Kitchell, Opportunities and challenges in the design of implantable biodegradable polymeric systems for the delivery of antimicrobial agents and vaccines, *Adv. Drug. Del. Rev.* 1987, 1, 19-39

diese Poren in die Lösung diffundieren kann. Diese Untersuchung erfüllt zwar nicht die Erwartungen hinsichtlich des angestrebten Verlaufes, aber sie zeigt, dass eine Beeinflussung der Freisetzung auf diese Weise möglich ist. Durch eine Verringerung der Porosität in der Polymer-Folie und eine Optimierung hinsichtlich der Korngröße des Porogens erscheint eine gezielte Steuerung der Freisetzungskinetik möglich.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen wurde in einer weiteren Studie der Einfluss von Polymer-Ummantelungen untersucht, die durch einfaches Verpressen von wirkstoffbeladenen Formkörpern in eine entsprechende Polymerummantelung entstehen. Die Präparationsmethode ist schematisch in **Abbildung D.29** dargestellt. Um möglichst reproduzierbare Ummantelungen herzustellen, wurde in einem ersten Schritt durch gemeinsames Verpressen ein Teilstück coffeinbeladener PLGA-Matrix mit einem PLLA-Rahmen versehen.

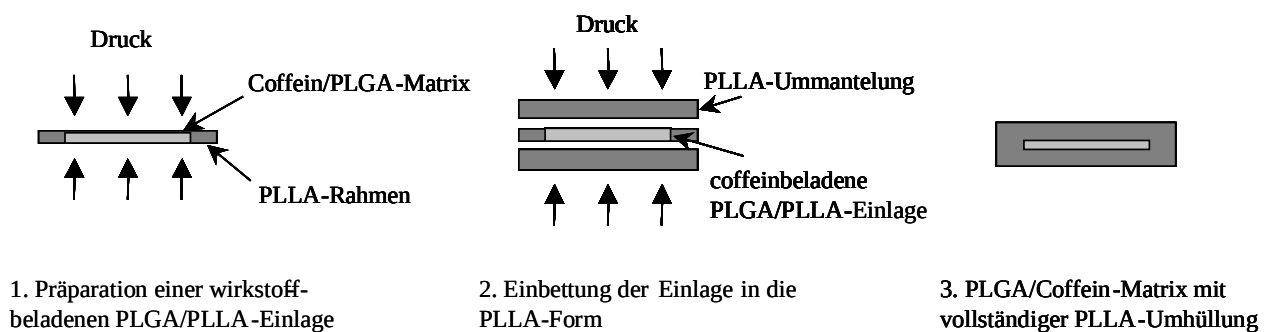


Abbildung D.29: Schematische Darstellung der PLLA-Beschichtung durch Verpressen

Anschließend wurde die so erhaltene kreisrunde Einlage zwischen zwei weitere Schichten aus PLLA eingepresst, so dass eine gleichmäßige und vollständige Einbettung in den PLLA-Körper erreicht wird. **Abbildung D.30** zeigt die coffeinbeladene Einlage und die beiden PLLA-Abdeckungen vor dem Verpressen zu einem kompakten Formkörper.

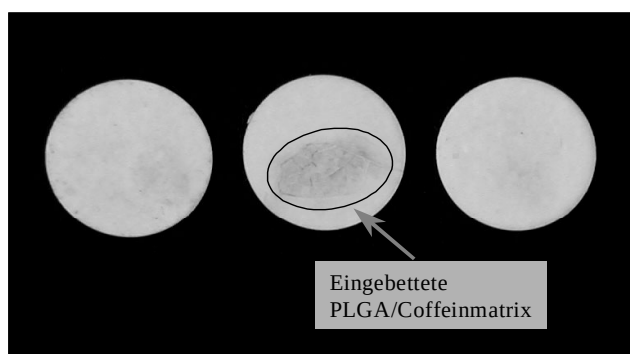


Abbildung D.30: Beladene Einlage (Mitte) und PLLA-Abdeckungen vor der Beschichtung

Die Markierung zeigt, dass die coffeinbeladene PLGA-Matrix nicht vollständig in die Mitte des PLLA-Rahmens eingepasst worden ist. Da aber der Abstand zu den Rändern des Rahmens größer ist als die Schichtdicke der Abdeckungen von 0,4 mm und die Oberfläche des äußeren Randes ebenfalls

deutlich geringer ist als die der PLLA-Abdeckungen, wurde vereinfachend vorausgesetzt, dass die Diffusion des Coffeins durch die Randbereiche vernachlässigbar ist.

Die Freisetzungskinetik eines auf diese Weise beschichteten Implantats ist in **Abbildung D.31 A** graphisch dargestellt. Der Kurvenverlauf belegt, dass die Freisetzung des Coffeins über einen Zeitraum von ca. 13 Tagen mit einer nahezu konstanten Rate erfolgt. Ein verzögerter Beginn der Coffeinabgabe wie im Falle der Beschichtung mit PDLA-Folie ist nicht zu beobachten. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich die Dauer der Coffeinfreisetzung durch eine Erhöhung der Schichtdicken der PLLA-Abdeckungen verlängern lässt. Hierzu wurde ein ähnlich präparierter Probekörper verwendet, dessen PLLA-Schichtdicken je 1.1 mm betrugen. Der Unterschied besteht darin, dass für die Präparation des Inlays eine kleine Tablette aus reinem Coffein verwendet wurde anstatt einer beladenen PLGA-Matrix. Diese Modifikation wurde möglich, da der Körper aufgrund des Inlays und der vergrößerten PLLA-Beschichtungen über eine ausreichende Primärfestigkeit verfügt. In **Abbildung D.31 B** ist der Freisetzungsverlauf eines solchen modifizierten Körpers dargestellt.

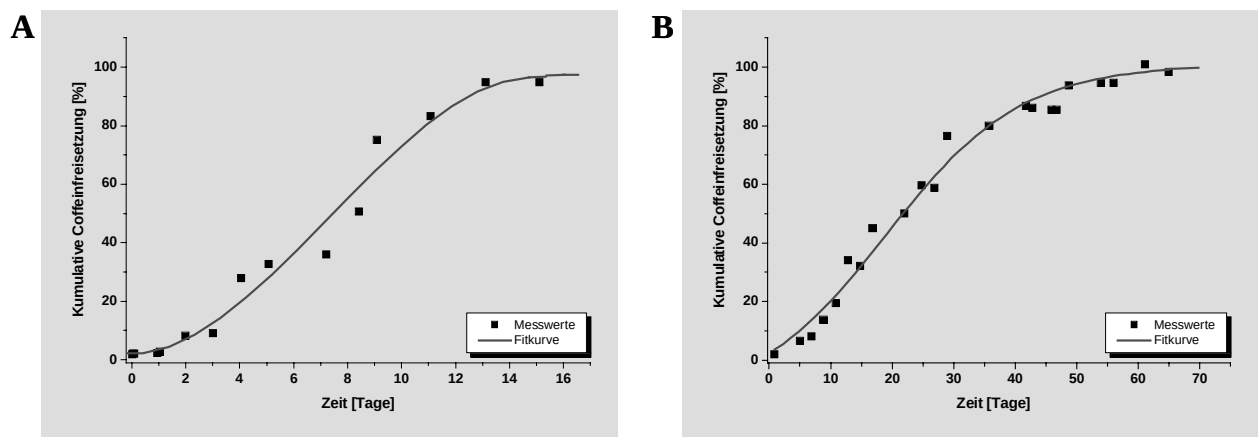


Abbildung D.31: Freisetzungskinetiken von Coffein aus einer PLGA-Matrix beschichtet mit PLLA (A) (Versuchs-Nr. 8) und reinem Coffein mit einer größeren Schichtdicke (B) (Versuchs-Nr. 9).

Die Kurve zeigt eine ähnlich gleichmäßige Freisetzung wie die des zuvor getesteten Körpers bei einer gleichzeitigen Steigerung der Freisetzungsdauer von 13 auf ca. 50 Tage. Dieses Experiment belegt, dass durch die Variation der Schichtdicken der Verlauf der Freisetzungskinetik gesteuert werden kann. Bemerkenswert bleibt die Tatsache, dass die Freisetzung trotz der Modifikation in der Schichtdicke weiterhin ohne erkennbare Verzögerung startet.

D.II.IV Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde anhand von *in vitro* Freisetzungsexperimenten untersucht, inwieweit biokompatible, μ -poröse Polyestermaterialien ein geeignetes Trägermaterial für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung darstellen. Aufgrund der festkörperchemischen Synthesemethode lassen sich sowohl μ -poröse Pulver als auch größere Formkörper aus biodegradierbaren PGA und PLGA mit einer interkonnektierten Porenstruktur erhalten. Ziel der Untersuchungen war es, Wirkstoffe in diese Porenstruktur einzulagern und durch geeignete Formgebungsverfahren Implantate herzustellen, in denen der Wirkstoff immobilisiert vorliegt. Durch die bei Kontakt mit Wasser einsetzende Degradation der Polymermatrix sollte der eingeschlossene Wirkstoff langsam und möglichst kontinuierlich freigesetzt werden. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung dieser Wirkstoff/Polymermatrices zur Freisetzung von Proteinen und anderen thermisch instabilen Wirkstoffen wurde ein besonderes Augenmerk auf eine möglichst schonende Probenpräparation ohne thermische Belastung gerichtet. Die Ergebnisse der vorliegenden *in vitro* Studien zeigen, dass sich μ -poröse PGA bzw. PLGA-Matrices grundsätzlich ohne thermische Belastung mit einem Wirkstoff beladen lassen und in der Lage sind, als formgebendes Trägermaterial zu fungieren. Weiterhin ist durch einfaches Verpressen des beladenen μ -porösen Polymerpulvermaterials eine nahezu beliebige Formgebung der beladenen Implantate möglich.

Die Untersuchungen haben weiterhin zeigen können, dass die Freisetzung aus derart präparierten Polymer/Wirkstoffmatrices nahezu vollständig innerhalb weniger Stunden erfolgt. Ausgehend von einer früheren Untersuchung war vermutet worden, dass die Ursache hierfür die Art der Wirkstoffbeladung war. Diese erfolgte durch Benetzen des porösen Ausgangsmaterials mit einer Wirkstoff/Chloroform Lösung. Die Hypothese war, dass während des Trocknens bei reduziertem Druck, die Kristallisation des Coffeins bevorzugt an den Porenöffnungen erfolgte und nicht innerhalb der Porenstruktur. Dies führte während des Verpressens zu einer Einlagerung des Coffeins zwischen die Korngrenzen des beladenen PGA/Pulvers und somit zu einem verbundenen Netzwerk von Coffein in der Polymermatrix. Bei Kontakt mit Wasser kann das auf diese Weise vernetzte Coffein relativ ungehindert aus dem Formkörper diffundieren. Aufgrund der vorliegenden Daten zeigt sich aber, dass weder die Veränderung der Art der Wirkstoffbeladung (Gefriertrocknen), noch die Verarbeitung durch Schmelzpressen und die Verwendung von Poly(lactid-co-glykolid) anstatt PGA, zu einer signifikanten Veränderung der Freisetzungzeiten führen. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Ursache der beschleunigten Freisetzung im Aufbau der Porenstruktur liegt.

Aufgrund der interkonnektierenden Porosität der Polymermatrix erscheint es wahrscheinlich, dass die Einlagerung des Wirkstoffes ebenfalls in miteinander verbundenen Clustern erfolgt und nicht in isolierten Partikeln. Diese Struktur bleibt offensichtlich auch nach dem Verpressen erhalten und führt bei Kontakt mit der Pufferlösung zu einer raschen Freisetzung des inkorporierten Wirkstoffs. Dies erklärt die unverändert kurzen Freisetzungzeiten trotz der Modifikation in den Herstellungsbedingungen.

Um die Diffusion des Wirkstoffes aus den Polymermatrices zu bremsen und somit längere Freisetzungzeiten zu erzielen, wurde versucht die Diffusion des Coffeins aus den Matrices durch die Einführung einer zusätzlichen Beschichtung zu bremsen. Als besonders geeignet erschienen Beschichtungen aus PDLLA und PLLA, da es sich ebenfalls um bekannte biokompatible Polyester handelt. Um den Einfluss dieser Beschichtungen auf den Verlauf der Freisetzungen zu untersuchen, wurden beladene PGA- bzw. PLGA-Matrices auf unterschiedliche Weisen mit einer zusätzlichen Beschichtung aus diesen Materialien versehen. Im einzelnen wurden folgende Beschichtungsmethoden untersucht:

- Eintauchen in verdünnte Chloroform/PLLA bzw. Chloroform/PDLLA-Lösung
- Ummantelung mit Folien aus PDLLA
- Ummantelung mit μ -porösen Folien
- Umkapselung in PLLA-Presskörper

Nahezu alle untersuchten Beschichtungsmethoden waren in der Lage, die Diffusion des Coffeins aus der PGA-Matrix zu verzögern, obwohl es je nach Art der Beschichtung zum Teil deutliche Unterschiede im Verlauf und der Dauer der Freisetzung gab.

Die Beschichtung von beladenen PGA-Formkörpern durch Eintauchen in Chloroform/Polymer-Lösungen führte zu einer deutlichen Erhöhung der Freisetzungzeiten. So ließen sich gute Ergebnisse mit PDLLA Beschichtungen erzielen. Die Freisetzung erfolgte mit einer nahezu konstanten Rate von 10 Gew.-%/Tag ohne anfänglichen „burst effect“ über einen Zeitraum von acht Tagen. Eine analoge Beschichtung mit PLLA führte ebenfalls zu einer Verlängerung der Freisetzungzeiten, wobei die Coffeinabgabe aber nicht kontinuierlich, sondern in drei Phasen erfolgt. Diese Freisetzung in mehreren Phasen entspricht dem in der Literatur beschriebenen Freisetzungsprofil für schmelzgepresste Freisetzungskörper.

Durch die Beschichtung mit Folien aus PDLLA ließ sich ebenfalls eine verlängerte Freisetzungdauer erreichen. Zwar erfolgte die Freisetzung nicht mit einer konstanten Rate, wie dies bei den tauchbeschichteten Implantaten der Fall war, dafür erfolgte sie mit ca. 35 Tagen deutlich länger. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Freisetzung mit einer

Verzögerung von 15 Tagen beginnt. Hieraus ergeben sich interessante Perspektiven im Hinblick auf eine programmierte Freisetzung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Freisetzung durch die Einführung definierter Poren in die Folien im Hinblick auf Dauer und Freisetzungsgeschwindigkeit variieren lassen.

Besonders vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich Dauer und Linearität der Freisetzungskinetik wurden durch die Umkapselung von beladenen Matrices bzw. reinem Wirkstoff durch mechanisches Verpressen in PLLA erzielt. Auf diese Weise ließen sich ohne „burst effect“ nahezu konstante Freisetzungsraten von Beginn an über einen Zeitraum von ca. 50 Tagen erzielen. Die Präparationsmethode hat unter anderem den Vorteil, dass es sich hierbei um gängige pharmazeutische Verarbeitungsmethoden handelt.

Zusammenfassend konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass es gelingt durch die Beschichtung von wirkstoffbeladenen Polymermatrices Implantate herzustellen, die aufgrund ihrer Freisetzungseigenschaften für pharmazeutische Anwendungen im Bereich der kontrollierten Wirkstofffreisetzung interessant sind.

Das Konzept der Kombination einer formgebenden Gerüstsubstanz mit einer diffusionssteuernden Beschichtung erlaubt eine relativ einfache Anpassung der äußeren Form der Implantate, als auch eine Feineinstellung des Freisetzungsprofils entsprechend der therapeutisch gewünschten Vorgaben. Durch die Kopplung verschiedener Beschichtungsarten könnten sich auf diese Weise auch komplexe Freisetzungskinetiken von mehreren Wirkstoffen realisieren lassen, wie sie z. B. in der Chemotherapie eingesetzt werden. Da alle Präparationsschritte ohne thermische Belastung des Wirkstoffes erfolgen, eignet sich das Verfahren auch zur Freisetzung von thermisch labilen Wirkstoffen auf Proteinbasis. Bei der Übertragung des Konzeptes auf weitere Wirkstoffe ist zu beachten, dass es sich um eine diffusionskontrollierte Freisetzung handelt und somit weitere Studien notwendig sind um die Auswirkungen, der jeweiligen Molekülgröße und deren mögliche Interaktion mit den Polyestermaterialien, auf das Freisetzungsprofil zu untersuchen. Eine weitere interessante Möglichkeit, im Hinblick auf die Realisierung einer degradationsgesteuerten Wirkstofffreisetzung, ist die direkte Kopplung von Wirkstoffen an eine entsprechende Polymermatrix, über eine spaltbare chemische Bindung. Inwieweit sich die Hydroxid- bzw. Carboxylat-Endgruppen von Polyglykolid für eine solche Kopplung nutzen lassen, müssen weitere Studien klären. Vielversprechende Ansatzmöglichkeiten in dieser Hinsicht bieten sicherlich auch maßgeschneiderte, funktionalisierte Polymere.

D.II.V Verwendete Materialien

Polyglykolid

Die Synthese von Polyglykolid erfolgte durch die thermisch initiierte Festphasen-Polykondensation von Natriumchloracetat. Hierzu wurden 50.0 g (0.43 mol) des pulverförmigen Eduktes im Rundkolben mit einem Ölbad auf 180 °C erwärmt. Zur Vermeidung eines Wärmestaus durch die freiwerdende Reaktionsenthalpie und damit verbundener Pyrolyse wurde der Reaktionsansatz während der Reaktion ständig gerührt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde IR-spektroskopisch verfolgt und zeigte nach 4 h einen vollständigen Umsatz. Im Verlauf der Reaktion färbte sich die Reaktionsmischung leicht grau. Durch Waschen mit kaltem, entionisiertem Wasser wurde das als Nebenprodukt entstandene Natriumchlorid herausgelöst und eine μ -poröse Matrix erhalten.

Ausbeute: 49.2 g (98.4 % der Theorie)

Charakterisierung: IR (KBr): $\tilde{\nu} = 2992/2962 \text{ cm}^{-1}$ (w, C-H), 1745 (s, C=O Ester), 1630 (w, C=O Acetat-Endgruppe), 1419 (m, COO, C-H), 1229 (s, C-O, Ester), 1096 (m, C-OH Endgruppe), 974 (w), 904 (w), 808 (w), 628 (w), 594 (w)

Onsettemperatur / Schmelzenthalpie aus DSC-Messungen: $T_{\text{fus}} = 194 \text{ °C}$, $\Delta_{\text{fus}}H_{\text{m}} = 6.2 \text{ kJ mol}^{-1}$

Mittleres Molekulargewicht aus Viskosimetriedaten: 1560 g mol^{-1}

Elementaranalyse: 39.44 % Kohlenstoff (theoretisch 41.39 %); 3.45 % Wasserstoff (theoretisch 3.47 %)

Poly(D,L-lactid-co-glykolid) 5/95 und 10/90

Die Herstellung und Charakterisierung der Copolymere ist in Kapitel B.I beschrieben:

Poly(L-lactid) und Poly(D,L-lactid)

Für die Beschichtungen wurden Poly(L-lactid) (Molmasse: $85000 - 160000 \text{ g mol}^{-1}$) und Poly(D,L-lactid) (mittlere Molmasse $106000 \text{ g mol}^{-1}$) der Firma SIGMA ohne eine weitere Aufbereitung verwendet.

Präparation der verwendeten Implantate

Zur Beladung mit Coffein wurden die μ -porösen Polymermatrices mit einer wässrigen Coffeinelösung benetzt, in einem Eis/Kochsalzgemisch eingefroren und im Ölpumpenvakuum bei einem Druck von 0.1 mbar gefriergetrocknet.

Die beladenen, pulverförmigen Polymermatrices wurden (mit Ausnahme des schmelzgepressten PGA-Implantats) mittels einer konventionellen IR-Pressen zu Tabletten mit einem Durchmesser von 13 mm gepresst (10 Minuten in einem Presswerkzeug aus Stahl mit einer Kraft von 120 kN).

Zum Schmelzpressen wurde eine Presse der Firma Paul-Otto Weber GmbH von Typ PW 10 verwendet. Das Gerät war mit einer Temperaturkontrolle des Typs TG2E/PT100 ausgerüstet. Das coffeinbeladene Polyglykolid wurde drei Minuten, bei einer Druckkraft von 10 kN und einer Temperatur von 150 °C, zu einer Tablette mit einem Durchmesser von 13 mm verpresst.

Pufferlösung

Die Freisetzungsexperimente erfolgten jeweils in 600 ml einer Phosphatpuffer-Lösung ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $c=0,1 \text{ mol l}^{-1}$) bei einem eingestellten pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 37 °C.

E Zusammenfassung

Polyhydroxycarbonsäuren stellen als biologisch abbaubare Polyester eine Stoffklasse mit interessanten Möglichkeiten dar. Diese Materialien, deren bekannteste Vertreter Polyglykolid und Polylactid sind, unterliegen bei Kontakt mit Feuchtigkeit einer Kettenabbaureaktion, die durch eine hydrolytische Esterbindungsspaltung hervorgerufen wird. Als Endprodukte dieses, als Degradation bezeichneten Prozesses, erhält man schließlich die entsprechenden Hydroxycarbonsäuren. Da es sich bei diesen Degradationsprodukten um Verbindungen handelt, die am Stoffwechsel von Bakterien und Zellen aktiv beteiligt sind, können sie von diesen Organismen aufgenommen und metabolisiert werden. Diese Eigenschaft eröffnet zahlreiche Anwendungsgebiete, nicht nur in der Verpackungsindustrie und Landwirtschaft, sondern auch in der Medizintechnik, als Werkstoff für temporäre Implantate. Anhand von zahlreichen Studien ließ sich für diese Polymere im direkten Kontakt mit unterschiedlichen Gewebearten eine hervorragende Biokompatibilität nachweisen.

Dies führte zur Entwicklung erster kommerzieller Produkte. Angefangen mit resorbierbaren chirurgischen Nahtmaterial, gibt es mittlerweile auch zahlreiche Implantate zur Fixierung von Knochenfrakturen aus diesen Materialien. Hierdurch wird dem Patienten ein Zweiteingriff erspart, der bei herkömmlich verwendeten Implantaten aus Stahl notwendig ist.

Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet und Ziel intensiver Forschung stellt seit geraumer Zeit die kontrollierte Wirkstofffreisetzung dar. Bioresorbierbare Polymere dienen hierbei als temporäre Trägermatrix, um empfindliche Wirkstoffe (z. B. Proteine) zu schützen und gekoppelt an den Degradationsprozess kontrolliert freizusetzen.

Trotz dieser vielversprechenden Perspektiven haben Polyhydroxycarbonsäuren bisher nur wenig Eingang in biomedizinische Anwendungen gefunden. Die Hauptursache hierfür liegt an unspezifischen Entzündungsreaktionen, die in Einzelfällen beobachtet wurden. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Reaktion des Körpers auf saure Abbauprodukte, die zu einer toxischen pH-Wertabsenkung im umgebenden Gewebe führen können.

Neuere Konzepte sehen vor, durch die Verwendung poröser Materialien die Gesamtmenge an Polymer zu reduzieren und durch einen veränderten Degradationsmechanismus einen gleichmäßigen Austrag an Abbauprodukten zu gewährleisten. Möglich wäre auch die Kombination mit einer basisch reagierenden Keramik um entstehende saure Abbauprodukte zu neutralisieren und zusätzlich die mechanischen Eigenschaften zu verbessern. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Copolymeren, deren Abbauverhalten entsprechend ihrer chemischen Zusammensetzung kontrollierbar ist.

In der vorliegenden Arbeit war es zunächst das Ziel, die für Alkalihalogenacetate bekannte thermisch initiierte Festkörperreaktion zu Polyglykolid und Alkalihalogenid auf weitere Halogencarboxylate zu übertragen. Aufgrund der festkörperchemischen Darstellung fällt das als Nebenprodukt entstehende Salz, in Form inkorporierter sub- μm kleiner Kristalle an. Durch Waschen mit Wasser lässt sich das Salz quantitativ extrahieren und hinterlässt das Polymer mit einer interkonnektierenden Porosität. Aufgrund dieser Mikrostrukturierung stellt dieses Polymer ein interessantes Material für biomedizinische Anwendungen dar.

Hinsichtlich ihres Reaktionsvermögens wurden hierbei zunächst das Lithium-, Natrium- und Kaliumsalz der 2-Chlorpropionsäure untersucht sowie Kristallmischungen aus Alkali-2-chlorpropionaten und Alkalichloracetaten. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, dass diese Carboxylate, bis auf die Lithiumverbindung, ebenfalls eine Polymerisationsreaktion zeigen und als Reaktionsprodukt Poly(D,L-lactid) bzw. Poly(D,L-lactid-co-glykolid) entsteht.

Im Verlauf der Reaktion kommt es jedoch zum Aufschmelzen der Produkte, so dass es sich bei der Reaktion um keine reine Festkörperreaktion handelt. Eine interessante Beobachtung bei dieser Reaktion ist, dass unabhängig von der Konfiguration der eingesetzten Precursorverbindung immer eine Racemisierung erfolgt und ataktisches PDLA entsteht.

Um die Frage zu klären, ob die Ursache der mangelnden Reaktivität der Lithiumverbindung kinetisch oder thermodynamisch bedingt ist, wurden in Kooperation mit Ana L. C. Lagoa, Hermínio P. Diogo und Manuel E. Minas da Piedade vom Instituto Superior Técnico im Centro de Química Estrutural, Complexo Interdisciplinar, in Lissabon, Portugal kalorimetrische Untersuchungen zur Thermodynamik der Polymerisationsreaktion der Alkali-2-chlorpropionate durchgeführt.

Die Ergebnisse belegen, dass die Unterschiede tatsächlich thermodynamischer Natur sind. Offensichtlich ist die Lithiumverbindung, im Gegensatz zur ebenfalls untersuchten Natriumverbindung, so stabil, dass die Reaktion endotherm verlaufen müsste. Interessanterweise zeigen die Messungen auch, dass bei der Reaktion das energetisch ungünstigere Polymer (PDLA) gebildet wird.

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss der Molekülstruktur auf das Reaktionsverhalten von kristallinen, chiralen Precursorverbindungen mit dem Ziel untersucht, die Konfiguration im Sinne einer topotaktischen Reaktion auf die Reaktionsprodukte zu übertragen und Polymere mit einer stereospezifischen Struktur zu erhalten. Hierzu wurden am Beispiel des Natriumsalzes der 2-Brom-3-methylbuttersäure die Auswirkungen einer großen Seitengruppe und am Beispiel der Zink-2-chlorpropionate der Effekt eines zweifach geladenen Kations auf die Reaktion analysiert. Anhand der Aussagen der thermischen Analyse konnte zwar für das Natrium-2-brom-3-methylbutyrat eine Polymerisationsreaktion bestätigt werden, jedoch zeigten die TG-DTA-MS

Messungen, dass die Polymerisation mit einer gleichzeitigen, geringfügigen, pyrolytischen Zersetzung einhergeht. Zusätzlich durchgeführte DSC-Messungen zeigen auch Unterschiede in Reaktionstemperatur und Enthalpie zwischen der racemischen und der enantiomerenreinen Verbindung, jedoch ließen sich anhand von thermischen und spektroskopischen Daten keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Reaktionsprodukten ermitteln.

Für die ebenfalls untersuchten Zinkverbindungen konnte weder für die Zink-2-chlorpropionate, noch für das zusätzlich untersuchte Zinkchloracetat eine Reaktion gefunden werden.

In einer ergänzenden Untersuchung wurde das Reaktionsverhalten von ungesättigten Halogencarboxylaten mit dem Ziel analysiert, Polymere mit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe darzustellen. Als Modellsubstanzen dienten hierzu das Natrium- und Kaliumsalz der α -Brommethacrylsäure. Die Untersuchungen ergaben, dass beide Verbindungen eine thermisch initiierte Polymerisationsreaktion zum Poly- α -methylen- β -propiolacton eingehen können. Während der vollständig im Festkörper verlaufenden Reaktion kommt es zur Eliminierung des korrespondierenden Alkalihalogenids in Form von 1 – 5 μm kleinen Kristallen. Durch einfaches Waschen mit entionisiertem Wasser lässt sich das Alkalihalogenid quantitativ auswaschen, so dass auf diese Weise analog zur Herstellung von Polyglykolid, eine μ -poröse Strukturierung des Polymers möglich ist. Spektroskopisch ließ sich kein Nachweis für eine Reaktion an der Doppelbindung finden, wenngleich die festgestellte mangelnde Löslichkeit und das Fehlen eines Schmelzsignals in der DTA-Kurve auf eine geringfügige Quervernetzung schließen lassen.

Um die Möglichkeit einer strahlungsinduzierten nachträglichen Quervernetzung über die Doppelbindung zu überprüfen, wurde das Polymer den γ -Strahlen einer ^{60}Co -Strahlenquelle ausgesetzt. Anhand der IR-Spektren konnte jedoch lediglich eine geringfügige Nachpolymerisation zum Polyester nachgewiesen werden.

Das Thema des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war es, das Degradationsverhalten von Formkörpern aus verschiedenen Polyestermaterialien zu analysieren. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag dabei auf der Untersuchung von Formkörpern aus Poly(D,L-lactid-co-glykolid) 15/85. Das verwendete Copolymer wurde auf festkörper-chemischem Weg aus Kristallmischungen aus Natrium-2-chlorpropionat und Natriumchloracetat hergestellt. In Folge dieser Herstellungsart lassen sich aus diesem Material Formkörper mit einer μ -poröse Morphologie präparieren, deren *in vitro* Degradationsverhalten im Hinblick auf eine mögliche biomedizinische Anwendung analysiert wurde. Um die Auswirkungen dieser speziellen Strukturierung auf das Degradationsverhalten der Probekörper beurteilen zu können, wurden diese in einer vergleichenden *in vitro* Studie mit kompakten Formkörpern untersucht. Um zusätzliche Aussagen über die Auswirkungen des pH-Wertes auf die Abbaugeschwindigkeit

treffen zu können, wurde das Verhalten beider Formkörperarten über einen Zeitraum von acht Wochen in Wasser (ungepuffert) und Phosphatpuffer (pH 7.4) analysiert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen einen deutlichen Unterschied zwischen den untersuchten Formkörpern. Es konnte ein deutlicher Einfluss der Morphologie und des pH-Wertes auf die Degradation nachgewiesen werden. So bleiben die μ -porösen Probekörper in beiden Lösungen deutlich länger formstabil als die kompakten Proben. Es zeigte sich, dass die Erosion im Puffer bei pH 7.4, entgegen den Erwartungen, schneller erfolgt als im ungepufferten Wasser. Die Messungen der mittleren Kettenlänge ergaben, dass diese beschleunigte Erosion nicht auf eine beschleunigte Kettenspaltung zurückzuführen ist, sondern die Folge einer gesteigerten Wasseraufnahme ist. Die einzig auffällige Veränderung der Morphologie war die Ausbildung einer Schichtstruktur bei kompakten Proben in Wasser.

Die Messung der mechanischen Eigenschaften (Elastizitätsmodul und Bruchfestigkeit) ergab eine schnelle Abnahme der Stabilität im Verlauf der Degradation. In Wasser sinkt der pH-Wert bei beiden Formkörpern relativ schnell, innerhalb der ersten zwei Wochen, auf pH 2.5. Nach dieser Zeit erhöht sich der pH-Wert langsam und erreicht nach acht Wochen einen pH-Wert von 4.0. Dieser Anstieg beruht auf dem Massenverlust durch Erosion und den wöchentlichen Lösungswechsel. Diese niedrigen pH-Werte würden *in vivo* mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Gewebeschädigung führen und stehen einem möglichen Einsatz als Biomaterial entgegen. Eine Verwendung dieses Copolymers erscheint somit nur in Verbindung mit einer weiteren basischen Komponente möglich, die in der Lage ist, den pH-Wert zu stabilisieren.

Diese Überlegungen waren der Ausgangspunkt für eine weitere Versuchsreihe, in der die Auswirkungen verschiedener Porositäten und chemischer Zusammensetzungen auf das Abbauverhalten von Formkörpern aus Polyglykolid, dem Verbundmaterial Polyglykolid/Carbonat-ACP und verschiedener höherer Polyhydroxycarbonsäuren untersucht wurden. Um die Untersuchungszeiträume zu verkürzen, erfolgte die Degradation bei einer Temperatur von 70 °C. Diese Art der beschleunigten Degradation erlaubt es, mit einem vergleichsweise geringen Materialaufwand, das Abbauverhalten von mehreren unterschiedlichen Proben zu analysieren. Diese Versuchsreihe hatte zudem das Ziel, die Auswirkungen verschiedener Strukturierungsmaßnahmen zu dokumentieren, mit denen unter anderem eine gradierte Degradation erreicht werden sollte, um die Biokompatibilität dieser Materialien zu erhöhen.

Die Versuche wurden jeweils mit 150 ml Phosphatpuffer bei einem konstanten pH-Wert von 7.4 durchgeführt und zusätzlich mit einer reduzierten Puffermenge von 10 ml, um die begrenzte Pufferkapazität *in vivo* zu simulieren und Aussagen über das Ausmaß der zu erwartenden pH-Wertabsenkung treffen zu können.

Es zeigte sich auch unter den Bedingungen der beschleunigten Degradation eine pH-wertabhängige Erosionsgeschwindigkeit. Während bei einem konstanten pH-Wert bei allen untersuchten Probekörpern aus PGA bzw. PGA/Carbonat-ACP bereits nach ca. 24 h eine vollständige Erosion beobachtet werden konnte, zeigten sich die Formkörper in der reduzierten Puffermenge im Durchschnitt einen Tag länger formstabil. Dies lässt sich mit dem Absinken des pH-Wertes auf Werte zwischen pH 3 und 4 erklären. Das trotz des basischen Carbonat-ACPs eine derartige pH-Wertverringerung beobachtet werden kann, beruht wahrscheinlich auf einer deutlichen Beschleunigung der Esterspaltungsreaktion.

Weitere Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Einführung zusätzlicher Porosität (Makroporen) zu einer beschleunigten Erosion der Probekörper führt und die Einführung eines geeigneten Gradienten (Polymer/Polymer-Gradient oder Polymer/Carbonat-ACP-Gradient) eine gradierte Erosionsgeschwindigkeit zur Folge hat. Die ebenfalls Untersuchten höheren Polyester P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) verhielten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 70 Tagen vollständig inert.

Das Thema des letzten Teils dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten verschiedener bioresorbierbarer Polyester im Hinblick auf eine mögliche medizinische Anwendung zu untersuchen. Im ersten Teil dieser Studien wurde die Eignung von Kompositmaterialien aus knochen-ähnlichem Calciumphosphat (Carbonat-ACP) und Poly(3-*R*-hydroxybutyrat) beziehungsweise Poly(3-*R*-hydroxybutyrat-co-3-*R*-hydroxyvalerat) untersucht. Diese beiden resorbierbaren Materialien besitzen im Vergleich zu Polyglykolid und Polylactid bessere mechanische Eigenschaften und sind vielversprechende Kandidaten für einen Einsatz als Knochenersatzmaterial. Um die Biokompatibilität dieser Materialien speziell auf knochenbildende Zellen zu testen, wurden Tabletten aus diesen Stoffen *in vitro* mit murinen Osteoblasten besiedelt. Die Reaktionen der Zellen auf diese Materialien wurden über einen Zeitraum von bis zu acht Wochen verfolgt. Hierbei ergaben sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom untersuchten Material. Die Zellen reagierten auf Formkörper aus P(3-HB)/Carbonat-ACP mit einer hohen Proliferation, die innerhalb einer Woche zur Ausbildung einer konfluenten Zellschicht führte. Über einen Zeitraum von acht Wochen behielten die Osteoblasten ihren Phänotyp und bildeten während dieser Zeit, als Folge der ungestörten Zellfunktionen, eine dichte Schicht von extrazellulärer Matrix.

In Gegenwart von Formkörpern aus P(3-HB/3-HV)/Carbonat-ACP wiesen die Osteoblasten bereits nach vier Tagen Symptome einer Stresssituation (Vakuolenbildung) auf und starben innerhalb von 10 Tagen. Die Ursache für das beobachtete Absterben der Zellen könnte an einer leichten Erhöhung des pH-Wertes durch das Kompositmaterial liegen oder an einer möglichen Phagozytosereaktion der Osteoblasten auf die Morphologie des verwendeten Polymers.

Aufgrund seiner biotechnologischen Herstellung liegt das P(3-HB/3-HV) in Form von 2 – 4 µm großer kugelförmiger Aggregate vor.

Zusätzlich zur Reaktion der Osteoblasten auf die Kompositmaterialien wurden auch die chemischen Auswirkungen der Besiedlung untersucht. Wie die XRD-Analyse ergab, bleibt die Calciumphosphat-Phase während der gesamten Besiedlungsdauer vollständig amorph und konvertiert nicht zum thermodynamisch stabileren Hydroxylapatit.

Die Thermoanalyse an den Kompositen konnte weiterhin den quantitativen Verbleib des Apatits in den Formkörpern belegen. Zudem zeigten DSC-Messungen die deutlichen Auswirkungen der Dampfdrucksterilisation auf die Kristallinität der jeweiligen Polymere. Diese Form der Sterilisation stellt nicht nur eine besondere strukturelle Belastung der Polymere dar, sondern führte auch zu einer deutlichen Abnahme der mittleren Kettenlänge. Bemerkenswert ist zudem die weitere hohe Verringerung der mittleren Kettenlänge im Verlauf der Zellbesiedlung. Diese hohe Degradationsgeschwindigkeit wird für die reinen Polymere nicht beobachtet, so dass hier ein Zusammenhang mit der enthaltenen Calciumphosphat-Phase bestehen muss. Dieser Umstand ermöglicht vielleicht eine Steuerung der Degradationsgeschwindigkeit und ermöglicht es, die für biomedizinische Anwendungen sehr langen Degradationszeiten von P(3-HB) zu verkürzen.

Der mögliche Einsatz von µ-porösen Polyglykolid als Trägermaterial in der kontrollierten Wirkstofffreisetzung war das Thema einer weiteren Studie.

Es sollte die Möglichkeit validiert werden, inwiefern es möglich ist, einen Wirkstoff in die µ-poröse Struktur des Polyglykolids einzubringen und durch eine anschließende formgebende Kompaktierung so einzuschließen, dass die Freisetzung des Wirkstoffs mit der Degradation des Polymers gekoppelt ist und kontinuierlich erfolgt. Hierzu wurde das poröse Ausgangsmaterial auf verschiedene Arten mit Coffein als Modellsubstanz beladen und zu Tabletten verpresst. Die Freisetzungskinetiken wurden durch Einbringen der Tabletten in eine Phosphatpuffer-Lösung mittels UV-Spektroskopie gemessen. Es zeigte sich, dass weder die Beladungsart noch die Verwendung von PGLA 15/85 anstelle von PGA zu einer signifikanten Veränderung der Freisetzungsraten führte. Es erfolgt immer innerhalb weniger Stunden eine vollständige Freisetzung des enthaltenen Coffeins. Eine erfolgreiche Verzögerung der Freisetzung konnte erst mit Hilfe von zusätzlichen Beschichtungen aus PDLLA und PLLA erreicht werden. Mit Hilfe dieser Beschichtungen ist es möglich, die Diffusion des Coffeins aus der Polymermatrix zu bremsen und eine gleichmäßige Freisetzung des Coffeins über einen Zeitraum von bis zu 70 Tagen ohne einen anfänglichen *burst effect* zu erreichen.

Diese beiden Studien demonstrieren die vielfältigen Möglichkeiten, die bioresorbierbare Polyhydroxycarbonsäuren für biomedizinische Anwendungen bieten.

F Summary

The compound class of poly(hydroxy acids) has interesting application prospects due to their intrinsic biodegradability. These materials of which poly(glycolic acid) (PGA) and poly(L-lactic acid) (PLLA) are the most prominent undergo hydrolytic chain cleavage (degradation) in a moist environment. Sustained degradation finally leads to the corresponding hydroxy acid units. Most of these hydrolytic end products occur as metabolites of many bacteria and cells phenotypes.

The degradation potential offers application opportunities for commercial and agricultural packages and further, as an example for a non commodity, the use as substrates for temporary implants in medical technology. Studies for various polymers in different tissues document the excellent biocompatibility of these compounds forming the bases for the development of commercial implants as medical devices. In the meantime degradable sutures, plates, pin and screws for bone fracture fixation or augmentation out of poly(hydroxy acids) are well established devices in the medical market. The major feature of absorbable polymers in application is the lacking necessity for a removal operation.

In tissue engineering polyester are used as structured matrices for cell adherence and cultivation. In pharmaceutical technology polyester serves as carrier materials for the controlled release of drugs. Release rates and profiles can be influenced by the degradation speed and mechanism.

An important drawback in polyester application is the possible accumulation of degradation products reaching cytotoxic levels and the accompanying acidification at the implant site due to the release of acid monomers.

To avoid such negative consequences modern concepts provide the use of porous materials to reduce the total amount of polymer and guarantee the continuous removal of degradation products. Other approaches employs basic ceramic like calcium phosphates in composite with polyesters to balance the local pH value and increase the mechanical stability. As an alternative one can use polymers with higher hydrolytic stability like poly-(R)-3-hydroxybutyrate [P(3-HB)]. The aim of the present work was to transpose the solid-state formation of poly(glycolic acid) from alkali halogenoacetates to higher homologues.

Due to the nature of the solid-state reaction the formed salt byproduct is incorporated in the polymer as sub micrometer cubic crystals. Washing with water extracts the salt completely and yielding a porous polymer structure. The microstructure is a promising aspect for biomedical use. Following increasing reactivity, the lithium, sodium and potassium salts of 2-chloropropionic acid were analyzed. In addition crystal mixtures of alkali 2-chloropropionates and alkali chloroacetates were analyzed as well. Pre-studies showed a reaction for all salts except the lithium compounds to give PDLA or PLGA-Copolymer, respectively.

Partial melting of the precursors during reaction excludes a pure solid state reaction. As a consequence stereo homogenous precursors give a racemat yielding atactic PDLLA. To clarify whether the non reactivity of the lithium compounds is of thermodynamic or kinetic origin calorimetric measurements were carried out in cooperation with the Instituto Superior Técnico, Centro de Química Estrutural, Complexo Interdisciplinar, in Lisboa (Portugal). The result proofed a thermodynamic inhibition of the reaction.

A further aspect was the investigation of chiral precursors to determine the configuration and to check for the occurrence of a topotactic reaction. For that purpose the effect of 2-Brom-3-methylbuttersäure as an example for a precursor with a voluminous side-group and Zink-2-chlorpropionate as an example for a substance with a double charged cation were reacted. The thermal analysis of the Natrium-2-brom-3-methylbutyrats confirmed the occurrence of a polymerization reaction parallel to a partial pyrolytic combustion.

Additional DSC-measurements show a difference of the reaction temperature and enthalpy between the racemic and enantiomeric pure compound. A difference between the formed reaction products was not observed. The zinc compounds did not react. Analogue to the lithium compound they just melt and decomposed during heating.

With the aim to obtain an unsaturated polyester the sodium and potassium salts were synthesized and used as starting materials. The double bond bears the opportunity to render the properties of the polymer by cross linking. Thermodynamic and spectroscopic data confirmed poly- α -methylen- β -propiolactone as the desired reaction product. Comparable to the halogenoacetates solid-state reaction leads to micrometer sized crystals. Through extraction with water a porous polymer is accessible. Spectroscopic data gave no evidence for a reaction of the double bond. In contrast DTA data (lacking melting peak) points to a low cross linking degree. This assumption is underscored by the low solubility untypical for the unreacted polymer. Exposition to gamma radiation (^{60}Co source) resulted only in a slight post polymerization a cross linking was not induced.

The second part of the present thesis had the scope to determine the degradation behavior of various polyester materials. The main focus laid on the copolymer PLGA 15/85. To evaluate the influence of the porous structure on the degradation behavior compact and porous bodies were incubated in aqueous solutions. Further categories were obtained by variation of the incubation medium (water vs. phosphate buffers), buffered- and unbuffered-media.

Porosity and pH value had significant influence on the degradation. Microporous bodies retained geometric stability longer then compact ones. Mass loss (erosion) showed to be faster in buffered medium (pH 7.4) compared to unbuffered water. This result can be explained by an increased water uptake at pH 7.4, rather than with different chain degradation.

A heterogeneous degradation mechanism as reported in literature for this polymers with an inner/outer differentiation was not observed. For compact samples in water a layered structure was found. Crystallinity of the samples increased during incubation, deduced from higher melting enthalpies. As expected a rapid loss in the young modulus and fracture toughness was measured. The pH value for bodies in water drops down to 2.5 during the second week. After that the value increased slowly to pH 6, because of repeated solution changes and mass loss. *In vivo* this measured pH would lead to cell damage and tissue necrosis. To avoid such consequences by the use of this material one must combine it with a basic compound to neutralize the acetic degradation products and stabilize the pH at physiological values.

Considering these results and to investigate how changes in chemical composition and porosity influence the degradation behavior of poly(glycolic acid), the composite material poly(glycolic acid)/calcium phosphate and higher homologous polyesters a second study was carried out. A main focus laid on the behavior of materials with a gradient in structure and composition to achieve a gradient in the degradation profile.

These degradation studies were carried out in phosphate buffer at a constant pH value of 7.4 under accelerated conditions at 70 °C. To simulate the limited buffer capacity *in vivo* additional investigation with a reduced amount of buffer solution were also carried out.

Under these conditions the erosion is extremely accelerated that all samples at constant pH value show a complete erosion within 24 h. In the case of the reduced buffer experiments a drop in pH down between 3 – 4 leading to prolonged stability (48 h) of the materials. The observed drop of the pH value even of the PGA/carbonated apatite composite materials is due to an increased speed of the hydrolytic chain cleavage under these conditions. The observation of samples with variations in overall porosity give an indication that additional introduced pores yield to a faster erosion. Samples with a gradient in the chemical composition (PGA/PLLA and polymer/carbonated apatite) show the possibility to achieve a gradient erosion profile. The investigated higher homologous P(3-HB) and poly-[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] [P(3-HB/3-HV)] show no signs of degradation within the whole incubation time of 70 days.

The last part of this work deals with the use of biodegradable polymers in biomedical applications as bone replacement materials and for the controlled release of drugs.

The goal of the first part was to check the biocompatibility of composite materials made from carbonated apatite and P(3-HB) or P(3-HB/3-HV). These materials have, in comparison with poly(glycolic acid) better mechanical properties and therefore great potential for the use as bone replacement substitute.

To increase the biocompatibility of these composites pellets with an optimal amount of basic carbonated apatite were prepared to receive a sustainable pH value in water.

To testify the biocompatibility of these optimized composites especially with bone forming cells murine osteoblasts were cultured on these pellets. The osteoblasts show an excellent proliferation rate in the presence of P(3-HB)/carbonated apatite yielding to a confluent layer after one week and to multilayers of formed extra cellular matrix after eight weeks. In contrast to that the osteoblasts seeded on P(3-HB/3-HV)/carbonated apatite show symptoms of a stress situation after four days leading to complete cell death after 10 days. The reason for this observation may lay in an increased pH of about 7.9 or could be ascribed to a phagozytation reaction caused by the special morphology of this polymer. Due to the biotechnological production this polymer occurs as μm spherical aggregates. From literature it is known that this particle size could induce a phagoytosis even for osteoblasts.

Chemical and physical changes of the materials during cell seeding experiments were also analyzed. X-ray diffraction data gave no indication of a chemical transformation of the carbonated apatite to the more stable hydroxy apatite. Thermal analyses show the complete remains of the calcium phosphate during the entire incubation time and the dramatic effect of the steam sterilization on the crystallinity of the polymers. Viscosity measurements show an unusual high degradation rate in relation to the calcium phosphate content. Such additional factors have to be considered to control the degradation time of these composites.

The possible use of μ -porous poly(glycolic acid) made from solid-state reaction in medicine as a carrier for controlled release of therapeutic agents was the subject of the last study. The main focus of these experiments was to develop a method to load even highly sensitive drugs in the μ -porous structure and to make devices of a useable shape with a long lasting release profile. Various procedures were investigated to load the polymers with caffeine as a model substance and the *in vitro* release kinetics were measured by UV-spectroscopy. No significant influence was observed by varying the preparation methods (freeze drying, melt pressing) and even the polymer (PGA vs. PLGA 15/85). All experiments show the complete release of incorporated caffeine within several hours. A successful slow down of the caffeine release was achieved only by the use of additional coatings made by PDLLA and PLLA. These coatings act as a diffusions barrier and enable a continuous release of the caffeine up to 70 days without an initial burst. These studies show the great potential of poly(hydroxy acids) in the field of biomedical applications.

G Anhang

G.I Eingesetzte Geräte

Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

Es wurde für alle Messungen ein Diffraktometer der Firma Philips Typ „PW1050/25“ verwendet. Das Gerät arbeitet mit einer Röntgenröhre vom Typ Seifert SF 60 unter Verwendung einer Kupferanode. Die Beschleunigungsspannung betrug 40 kV bei einem Anodenstrom von 30 mA. Die resultierende $\text{Cu}_{K\alpha}$ -Röntgenstrahlung hatte eine Wellenlänge von 154.217 pm und wurde mit einem Nickelfilter monochromatisiert. Die Detektion erfolgte mit einem Xenonbefüllten Proportionalzählrohr vom Typ PW 1965/50 der Marke Philips. Gemessen wurde mit einer Schrittweite von $0.02^\circ 2\theta$, bei einer Meßzeit von einer Sekunde. Zur Aufnahme der temperaturaufgelösten Röntgenpulverdiffraktogramme wurde ein Gerät der Firma Siemens D-5000 ($\text{Cu-K}\alpha$ $\lambda = 154.178$ pm) verwendet.

DSC-Messungen

Es wurde ein Gerät der Firma Mettler des Typs TA 4000 benutzt. Die Messungen erfolgten unter Luft in offenen Aluminium-Tiegeln mit einer Heizrate von 5 K min^{-1} mit einer mittleren Probenmasse von 5-8 mg.

Kombinierte Thermogravimetrie-Differenzthermoanalyse-Massenspektrometrie (TG-DTA-MS)

Alle Messungen wurden an einem Gerät vom Typ „STA 409/Balzers QMS 421“ der Firma Netzsch durchgeführt. Alle Messungen erfolgten unter einer dynamischen Luftatmosphäre ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) und einer Heizrate von 5 K min^{-1} in offenen Tiegeln aus Aluminiumoxid.

Rasterelektronen-Mikroskopie

Alle Untersuchungen wurden an einem Gerät vom Typ „SEM 515“ der Firma Philips vorgenommen. Alle Proben wurden zuvor einer Goldschicht überzogen (*sputtering*). Die Beschleunigungsspannung betrug 25 kV.

Lösungs- ^1H und ^{13}C NMR-Spektroskopie

Die ^1H -Messungen wurden mit einem Gerät Varian Gemini 200 (200 MHz) mit dem Puls-Fourier-Verfahren aufgenommen. Die ^{13}C - Messungen wurden unter sonst gleichen Bedingungen bei einer Frequenz von 50.31 MHz mit ^1H - Entkopplung vermessen.

Die höher aufgelösten Spektren wurden mit einem Gerät vom Typ WM 400 der Firma Bruker bei einer Frequenz von 400.13 MHz (^1H) bzw. 100.69 MHz (^{13}C) aufgenommen.

Hochaufgelöste ^{13}C Festkörper-NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden bei einer Frequenz von 75.49 MHz ($B_0=7.05$ T) mit einem „Chemagnetics CMX Infinity 300“ Spektrometer gemessen. Als Probenhalter diente ein Chemagnetics 7.5 mm *magic angle spinning* (MAS) Träger. Alle Spektren wurden von Probenpulvern bei einer Temperatur von 25 °C unter Bedingungen des *magic angle spinning* (typische Frequenz von 5000 ± 3 Hz) und der $^{13}\text{C}\leftarrow ^1\text{H}$ Kreuzpolarisation (cross-polarisation, CP) mit typischen Kontaktzeiten von 8 ms und einer Hochleistungs- ^1H -Entkopplung aufgenommen. Hierzu wurde eine TPPM Entkopplungssequenz mit einer typischen ^1H -Entkopplungsfeldstärke von ca. 62.5 kHz verwendet (typischer *recycle delay* ca. 7 s). Die isotrope chemische Verschiebung ist bezogen auf Tetramethylsilan. Die Kalibrierung erfolgte mit Adamantan als externen Standard, über das Methin-Kohlenstoffatom bei $\delta=29.47$ ppm.

Infrarot Spektroskopie

Zur Aufnahme der IR-Spektren wurde ein Gerät der Firma Perkin Elmer des Typs FT-IR spectral photometer 1720 verwendet.

Verbrennungskalorimetrie

Die verwendeten Polymere [Poly(D,L-lactid), PDLLA und Poly(L-lactid), PLLA] wurden von der Firma Sigma geliefert. Die molare Massen betrugen $90000\text{--}120000\text{ g mol}^{-1}$ (PDLLA) und $85000\text{--}160000\text{ g mol}^{-1}$ (PLLA). Das als Zündhilfsmittel verwendete *n*-Hexadecan wurde von B.D.H. bezogen und hatte eine spezifische Verbrennungswärme von $\Delta_c u^\circ = -(47150.10\pm 1.33\text{ J g}^{-1})$. Eine Tablette des jeweiligen Polymers wurde zusammen mit *n*-Hexadecan in einen Platintiegel eingewogen. Dieser wird in den Bombenbehälter aus Edelstahl (Volumen= 17.95 cm^3) eingesetzt, der zusätzlich 50 μL entionisierten und destillierten Wassers enthielt. In einer reinen Sauerstoffatmosphäre, bei einem Druck von 3.04 Mpa wurden die Substanzen schließlich verbrannt. Die Einwaage der Proben und des Zündhilfsmittels erfolgte auf einer Sartorius 4504 Mp8-1 Feinwaage mit einer Genauigkeit von 0.1 μg . Die Einwaagen betrugen in Fall von PDLLA zwischen 14-20 mg Polymer und 3-4 mg *n*-Hexadecan und im Fall von PLLA 30-45 mg Polymer und 3-5 mg *n*-Hexadecan. Die Menge an HNO_3 , die sich während der Verbrennung in der Bombe aus Spuren von N_2 bildet, wurde mit einem Dionex 4000i Ionen Chromatograph gemessen. Detaillierte Informationen über den Messaufbau sind in der angegebenen Literatur beschrieben.^[230]

^[230] H. P. Diogo, M. E. Minas da Piedade, J. J. Moura Ramos, J. A. Simoni, J. A. Martinho Simões, A reaction-solution calorimeter for the undergraduate laboratory, *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, 940-942

Reaktions-Kalorimetrie

Als Kalorimeterflüssigkeit diente eine wässrige $\text{HCl} \cdot 553.41 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Lösung (0.1 M, Riedel de Haën, Fixanal[®]). Zusätzlich wurden NaCl (José Manuel Gomes dos Santos, 99.8%) und LiCl (Aldrich, 99.99+%) verwendet. Die Salze wurden bei 100 °C getrocknet und bis zur Messung in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid gelagert.

Das Kalorimeter besteht aus einem transparenten Dewar mit verschließbarem Deckel. In den Deckel integriert sind ein Rührer, ein Quartzthermometer, ein elektrischer Widerstand zur Kalibrierung und ein Brecher für Ampullenproben. Das Kalorimetergefäß sitzt in einem thermostatisierten Wasserbad (Thermostat Tronac PTC-40) bei einer Temperatur von 25.000 ± 0.001 °C. Zur Messung wurde die Probensubstanz mit einer Feinwaage ($\pm 10^{-5}$ g on a Mettler AT201) in eine dünne Glasampulle eingewogen und in die Brechvorrichtung des Kalorimeters eingesetzt und das Kalorimeter mit 125 ml der Kalorimeterflüssigkeit befüllt. Durch das Zerschlagen der Messampulle wird die Messung gestartet und die Temperaturerhöhung gemessen und aufgezeichnet. Im Anschluss an die Messung erfolgte die Kalibrierung indem über einen Zeitraum von ca. 200 s, eine Spannung von 2.6 V an den ohmschen Widerstand ($R=48 \Omega$) angelegt wurde.

Elementaranalyse

Die Bestimmung erfolgte mit einem Elementanalysator der Firma Heraeus Modell XHN-O-Rapid. Die Genauigkeit der Meßwerte wird vom Hersteller mit 0,2 % absolut angegeben.

UV-Spektroskopie

Zur Aufnahme der UV-Spektren wurde ein Gerät der Firma Varian von Typ Carey 5e benutzt.

G.II Sicherheit und Entsorgung

Verbindung	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze	Entsorgungsschlüssel
2-Brom-3-methylbuttersäure	ätzend gesundheitsschädlich	R: 34-22 S: 26-28.1-36/37/39-45	4
2-Brommethacrylsäure	ätzend	R: 34 S: 26-28.1-36/37/39-45	3
2-Chlorpropionsäure	ätzend	R: 22-35 S: 23-26-28-36-45	4
Aceton	leicht entzündlich	R: 11 S: 9-16-23-33	1
Calciumchlorid	reizend	R: 36 S: 22-24	7
Calciumphosphat	-	S: 22-24/25	8
Chloressigsäure	giftig; umweltgefährlich	R: 25-34-50 S: 23.2-37-45-61	4
Chloroform	gesundheitsschädlich	R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	3
Chloroform-d ¹	gesundheitsschädlich	R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	3
Coffein	gesundheitsschädlich	R: 22	2
Deuteriumoxid-d ²	-	-	1
D-Glucose	-	-	-
Dichlormethan	gesundheitsschädlich	R: 40 S: 23.2-24/25-36/37	3
Diethylether	hoch entzündlich	R: 12-19 S: 9-16-29-33	1
Dinatriumhydrogenphosphat	-	-	7
Ethanol	leicht entzündlich	R: 11 S: 7-16	1
Hexafluorisopropanol	gesundheitsschädlich	R: 22-26/27/28 S: 26-28A	3
Kalium-2-brommethacrylat	keine Daten	keine Daten	4
Kalium-2-chlorpropionat	keine Daten	keine Daten	4
Kaliumbromid	reizend	R: 36/37/38 S: 26-36	7

Verbindung	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze	Entsorgungsschlüssel
Kaliumchloracetat	giftig	R: 25-34 S: 23-37-44	4
Kaliumchlorid	reizend	R: 36/37/38 S: 26-36	7
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	7
L-Alanin	-	-	2
Lithium-, Natrium-, Kaliumhydroxid	Ätzend	R: 35 S: 2-26-37/39	6
Lithium-2-brom-3-methylbutyrat	keine Daten	keine Daten	4
Lithium-2-brom-methacrylat	keine Daten	keine Daten	4
Lithium-2-chlorpropionat	keine Daten	keine Daten	4
Lithiumchloracetat	giftig	R: 25-34 S: 23-37-44	4
Magnesiumchlorid Hexahydrat	-	-	7
Magnesiumsulfat Heptahydrat	-	-	7
Methanol	giftig; leicht entzündlich	R: 11-23/25 S: 7-16-24-45	1
Natrium-2-brom-3-methylbutyrat	keine Daten	keine Daten	4
Natrium-2-brom-methacrylat	keine Daten	keine Daten	4
Natrium-2-chlorpropionat	keine Daten	keine Daten	4
Natriumbromid	reizend	R: 36/37/38 S: 26-36	7
Natriumchloracetat	giftig	R: 25-34 S: 23-37-44	4
Natriumchlorid	-	-	7
Natriumdihydrogenphosphat	-	-	7
Penicillin/ Streptomycin	-	R: 20/21/22-42/43-61 S: 23-36/37/39	13

Verbindung	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze	Entsorgungsschlüssel
PGA, PLGA, PLA, P(3-HB), P(3-HB/3-HV)	-	-	8
Poly- α -methylen- β -propiolacton	keine Daten	keine Daten	8
Polyhydroxyisovaleriansäure	keine Daten	keine Daten	8
Saccharose	-	-	-
Salzsäure	ätzend	R: 34-37 S: 26-36/37/39-45	6
Zink-2-chlorpropionat	keine Daten	keine Daten	4
Zinkcarbonat	reizend	R: 36/37/38 S: 26-36	7
Zinkchloracetat	keine Daten	keine Daten	4

R-Sätze

R 11:	Leichtentzündlich	R 20/21/22:	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 12:	Hochentzündlich		
R 14:	Reagiert heftig mit Wasser		
R 19:	Kann explosionsfähige Peroxide bilden	R 23/25:	Giftig beim Einatmen und Verschlucken
R 20:	Gesundheitsschädlich beim Einatmen	R 23/24/25:	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 22:	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken	R 26/27/28:	Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 25:	Giftig beim Verschlucken		
R 26:	Sehr giftig beim Einatmen		
R 34:	Verursacht Verätzungen	R 36/37:	Reizt die Augen und die Atmungsorgane
R 35:	Verursacht schwere Verätzungen	R 36/37/38:	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R 36:	Reizt die Augen		
R 37:	Reizt die Atmungsorgane	R 42/43:	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R 38:	Reizt die Haut		
R 40:	Irreversibler Schaden möglich		
R 41:	Gefahr ernster Augenschäden	R 48/20/22:	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 50:	Sehr giftig für Wasserorganismen		
R 61:	Kann das Kind im Mutterleib schädigen		

S-Sätze

- S 2: Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen
S 7: Behälter dicht geschlossen halten
S 9: Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 16: Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen
S 22: Staub nicht einatmen
S 23: Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen. (Geeignete Bezeichnungen sind von Hersteller anzugeben)
S 24: Berührung mit der Haut vermeiden
S 26: Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 28: Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen
S 29: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
S 33: Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen
S 36: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S 37: Geeignete Schutzhandschuhe tragen
S 43: Zum Löschen (geeignetes Löschmittel vom Hersteller anzugeben) verwenden
S 45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen
S 61: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/
Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
S 24/25: Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
S 36/37: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
S 36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
S 37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

Entsorgungsschlüssel:

- 1 In den Kanister für halogenfreie Lösemittelabfälle geben
- 2 Als Lösung neutralisiert in den Kanister für halogenfreie Lösemittelabfälle geben
- 3 In den Kanister für halogenhaltige Lösemittelabfälle geben
- 4 Als Lösung neutralisiert in den Kanister für halogenierte Lösemittelabfälle geben
- 5 Wiederaufbereiten und wiederverwenden, Reste angesäuert in den Behälter für Silberabfälle geben
- 6 Neutralisieren und in den Behälter für anorganische Salzlösungen geben
- 7 In Wasser lösen und in den Behälter für anorganische Salzlösungen geben
- 8 In den Sammelbehälter für Feststoffabfälle geben
- 9 Angesäuert in den Behälter für schwermetallhaltige Säureabfälle geben
- 10 Reduzieren, neutralisieren und in den Behälter für anorganische Salzlösungen geben
- 11 Reduzieren und die Lösung angesäuert in den Behälter für chromhaltige Säurelösungen geben
- 12 Oxidieren, neutralisieren und in den Behälter für anorganische Salzlösungen geben
- 13 Zell-Nährmedien und deren Zubereitungen wurden am Zentrum für Biomechanik des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) gesammelt, autoklaviert und entsorgt

G.III Verwendete Abkürzungen (in alphabetischer Reihenfolge)

α -MEM	minimum essential medium	PTFE	Polyfluorethylen
Abb.	Abbildung	PVC	Polyvinylchlorid
ACP	amorphes Calciumphosphat	REM	Rasterelektronen-Mikroskopie
CP	cross polarisation	SR-PGA	self reinforced Poly(glycolic acid)
DSC	differential scanning calorimetry	SR-PLLA	self-reinforced Poly(L-lactic acid)
DTA	Differenz Thermoanalyse	TG	Thermogravimetrie
EA	Elementaranalyse	UHPE	Ultrahochmolekulares Polyethylen
EBBS	Earle's buffered saline solution	UV	Ultraviolett
GBSS	Gey's buffered saline solution	XRD	X-ray powder diffraction
GPC	Gelpermeabilitäts Chromatographie		
HBSS	Hank's buffered saline solution		
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol		
IR	Infrarot		
ISO	international standardisation organisation		
MAS	magic angle spinning		
MS	Massenspektrometrie		
NMR	nuclear magnetic resonance		
P(3-HB)	Poly(3-hydroxybutyrat)		
P(3-HV)	Poly(3-hydroxyvaleriansäure)		
PBS	phosphate buffered saline		
PCL	Poly(ϵ -caprolacton)		
PDLLA	Poly(D,L-lactic acid)		
PDS	Poly(p-dioxanon)		
PE	Polyethlen		
PET	Polyethylenterephthalat		
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)		
PLLA	Poly(L-lactid acid)		
PMMA	Poly(methylmethacrylat)		
PP	Polypropylen		

G.IV Kurzzusammenfassung

Untersuchungen an festkörperchemisch darstellbaren biodegradierbaren Polyhydroxycarbonsäuren - Synthese und Anwendung in der Medizintechnik

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Epple

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Rehder

Thema der vorliegenden Dissertation war die Synthese und Charakterisierung der thermisch initiierten Polymerisationsreaktion von Alkalihalogenocarboxylaten zu bioresorbierbaren Polyhydroxycarbonsäuren. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Untersuchung dieser Polymere im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Biomaterial in der Medizintechnik.

Aufgrund des lösungsmittelfreien Syntheseverfahrens wird bei dieser Reaktionsart das als Nebenprodukt eliminierte Alkalihalogenid in Form sub- μm kleiner interkonnektierter Kristalle in das Polymer eingelagert. Durch Waschen mit Wasser lässt sich das Salz quantitativ extrahieren und eine mikrostrukturierte Polymermatrix erzeugen. Das Ziel war es, das Schema dieser für Halogenacetate im Festkörper ablaufenden Reaktion auf weitere Halogenocarboxylate zu übertragen, um auch höhere homologe Polymere darstellen zu können.

Hierzu wurde das Reaktionsvermögen von Alkali-2-chlorpropionaten, Alkali-2-brommethacrylaten, Natrium-2-brom-3-methylbutyrat, Zink-2-chlorpropionat, Zinkchloracetat sowie Kristallmischungen aus Chloracetaten und 2-Chlorpropionaten untersucht.

Mit Ausnahme der Lithium- und Zinkverbindungen konnte für alle Precursor eine solche Polymerisationsreaktion nachgewiesen werden. Bis auf die Reaktion der Alkali-2-brommethacrylate, die vollständig im Festkörper verläuft, schmelzen alle übrigen Verbindungen während der Polymerisation auf. Bei den untersuchten chiralen Verbindungen konnte ein dirigierender Einfluss der Konfiguration auf die Taktizität der gebildeten Polymere, im Sinne einer topotaktischen Reaktion, nicht nachgewiesen werden.

Das Abbauverhalten von auf diese Weise hergestellten Poly(lactid-co-glykolid) 15/85 wurde *in vitro* über einen Zeitraum von acht Wochen bei 37 °C in Wasser und Phosphatpuffer analysiert. Ziel dieser Studie war es, nähere Informationen über die Vorgänge und Auswirkungen der Degradation auf die Formstabilität, die pH-Wertentwicklung, das Molekulargewicht, die Kristallinität, das Quellverhalten, die Erosion und die mechanische Stabilität zu erhalten. Die Auswertung dieser Parameter ergab, dass dieses Material innerhalb weniger Wochen abgebaut wird und nachhaltig sauer reagiert.

Zusätzliche Experimente unter beschleunigten Degradationsbedingungen an gradiert strukturierten Materialien ergaben, dass auf diese Weise eine Steuerung der Erosionsgeschwindigkeit möglich ist.

Um die Eignung von Polyhydroxycarbonsäuren für biomedizinische Anwendungen zu validieren, wurde die Biokompatibilität von potentiellen Knochenersatzmaterialien aus carbonathaltigen, amorphen Calciumphosphat und P(3-HB) bzw. P(3-HB/3-HV) mittels Zellbesiedlungsexperimenten mit murinen knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) überprüft und die chemischen und physikalischen Auswirkungen während der Zellkultivierung auf die Materialien untersucht.

Während für das Kompositmaterial aus P(3-HB)/Carbonat-APC eine hervorragende Bioverträglichkeit nachgewiesen werden konnte, erwies sich das Kompositmaterial aus dem Copolymer als zelltoxisch und führte innerhalb von 10 Tagen zum vollständigen Absterben der Osteoblasten. Inwieweit dieses eine Reaktion auf eine geringe pH-Werterhöhung durch das Material oder eine Immunantwort auf die spezielle Morphologie des verwendeten biotechnologisch hergestellten Polymers ist, konnte nicht sicher geklärt werden.

Die Eignung von festkörperchemisch erzeugten μ -porösen Polyestern als Wirkstoffträger konnte im Rahmen einer ergänzenden Studie nachgewiesen werden. In Verbindung mit diffusionshemmenden Beschichtungen konnte eine einstellbare kontinuierliche Freisetzungsrate von Coffein als Modellsubstanz über einen Zeitraum von bis zu 70 Tagen erreicht werden.

G.V Veröffentlichungen

Artikel in referierten Zeitschriften

M. Siedler und M. Epple
„Festkörperchemie im Experiment“
Chem. unserer Zeit **2000**,34, 84-89

C. Schiller, M. Siedler, F. Peters, M. Epple
„Functionally graded materials of biodegradable polyesters and bone-like calcium phosphates for bone replacement”
Ceramic Transactions (im Druck).

M. Siedler, S.J. Kitchin, K.D.M. Harris, A.L C. Lagoa, H.P. Diogo, M.E. Minas da Piedade, M. Epple
“Porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) produced by thermal salt elimination from halogenocarboxylates”
J. Chem. Soc., Dalton Trans. **2001**, 3140-3148

Zitierfähige Veröffentlichungen

M. Siedler
Bericht „4th Symposium and Workshop on Pharmacy and Thermal Analysis“
Mitteilungen der Gesellschaft für Thermische Analyse e.V., **1/2000**

W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, M. Amling, M. Siedler, J. M. Rueger, M. Epple
“New scaffolds for tissue engineering: biocompatible composites of carbonated apatite and biodegradable polyesters”
Cells Tissues Organs **2000**, 166, 73.

W. Linhart, W. Lehmann, K. Schwarz, F. Peters, M. Siedler, M. Epple, M. Amling, J. M. Rueger
„Entwicklung eines biodegradierbaren Knochenersatzmaterials aus Carbonatapatit und Poly-3-Hydroxybutyrat“
Osteologie Band 9/Supplement 1, **2000**; 2.

Vorträge

M. Siedler, M. Epple
„Thermisch initiierte Copolymerisation von Halogencarboxylaten“
Zentrum für Biomechanik, **12.05.1999**, Hamburg

M. Siedler, M. Epple
„Biodegradierbare Copolymere durch Festkörperreaktion“
GEFTA-Jahrestagung, **15.09. – 17.09.1999**, Weinheim

M. Siedler, C. Schiller, M. Epple
„Funktionalisierte Polyester durch Festkörperreaktion“
GEFTA-Jahrestagung, **10.09. – 13.09.2001**, München

Posterpräsentationen

M. Siedler, M. Epple
“Biodegradable Polymers from solid-state reaction : Preparation of copolyester poly(DL-lactide-co-glycolide) PDLGG in the solid state”
XVIII IUCR Congress, **04.08 – 13.08.99**, Glasgow

W. Linhart ,F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, M. Amling, M. Siedler, A. Schilling,
J.M. Rueger, M. Epple
“New scaffolds for tissue engineering: biocompatible composites of carbonated apatite
and biodegradable polyester”
2nd BioValley Tissue Engineering Symposium, **25.11. – 27.11.1999**, Freiburg

K. Schwarz, M. Siedler, M. Epple
„Porous polyesters from solid-state reaction”
6th World Biomaterials Congress, **15.05. – 20.05.2000**, Kamuela, Hawaii

F. Peters, M. Siedler, K. Schwarz, M. Epple
“pH-WERT-Studien an resorbierbaren Biomaterialien”
*Gemeinsame Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, der Chirurgischen
Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien und dem 3. Kolloquium der Kompetenzzentren für
Biomaterialien*, **24.11. – 25.11.2000**, Ulm

C. Schiller, M. Siedler, S. Weihe, C. Rasche, H. Eufinger, M. Wehmöller, M. Epple
“Gradierte Werkstoffe für den Einsatz als Knochenersatzmaterial”
*Gemeinsame Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, der Chirurgischen
Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien und dem 3. Kolloquium der Kompetenzzentren für
Biomaterialien*, **24.11. – 25.11.2000**, Ulm

M. Epple, O. Herzberg, K. Schwarz, M. Siedler
“Solid state polymerization reactions leading to biomaterials”
ECM 2000, **25.08. – 31.08.2000**, Nancy, Frankreich

G.VI Lebenslauf

Zur Person Michael Siedler

Geburtsort	Hamburg
Geburtsdatum	02.02.1972
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1979 – 1992	Grundschule Edwin-Scharf-Ring
1979 – 1992	Realschule und
1979 – 1992	Gymnasium
1992	Abitur, Note 2,1

Wehrdienst

1992 – 1993	geleistet in der Radarführungskompanie 131, in Brekendorf, Schleswig-Holstein
-------------	---

Hochschulausbildung

01.10.1993	Studium der Chemie an der Universität Hamburg
20.09.1995	Diplomvorprüfung
21.09. 1998	mündliche Diplomhauptprüfung
Sep. 1998 – März 1999	Diplomarbeit am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie, Universität Hamburg, Betreuung von Prof. Dr. M Epple.

Thema:

„Thermisch initiierte Copolymerisation von Halogencarboxylaten“

22.03.1999	Zuerkennung des Diploms
------------	-------------------------

April 1999	Beginn der Dissertation im Arbeitskreis Epple und Stipendiat im Graduiertenkolleg 471 „Molekularbiologie der Osteolyse“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft
------------	--

Thema:

*„Untersuchungen an festkörperchemisch darstellbaren biodegradierbaren Polyhydroxycarbonsäuren
- Synthese und Anwendungen in der Medizintechnik“*

G.VII Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all die Personen namentlich nennen, die auf die eine oder anderen Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich für ihre Unterstützung bedanken.

Professor Dr. Matthias Epple danke ich herzlich für die Überlassung der Themenstellung, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die äußerst interessante und lehrreiche Promotionszeit.

Meinen Kollegen Dr. Karsten Schwarz, Dr. Oliver Herzberg, Dr. Fabian Peters und Drazen Tadic für ihre Zusammenarbeit, Freundschaft und die wunderbare Zeit, die wir hatten.

Meinen Kollegen Carsten Schiller, Bernd Hasse und Markus Rehbein für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit und die wertvollen fachlichen Diskussionen.

Weiterhin danken möchte ich Markus Brunnbauer, Nicolai Nagorny und Oliver Petermann dafür, dass sie so sind, wie sie sind.

Dr. med. W. Linhart, Dr. med. M. Amling, Dr. med. W. Lehmann, Dr. med. A. Schilling und Prof. Dr. med. J.M. Rueger aus der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf für die gute Kooperation im Bereich der Knochenersatzmaterialien.

Den Praktikanten Thomas Kühnemund, Colin von Lossow, Maren Göwert und besonders Winrich Scherres für ihr Interesse und ihr Engagement bei der Anfertigung ihrer Arbeiten sowie ihren Mutes, sich trotz des Arbeitspensums von mir betreuen zu lassen.

Frau Nina Schober, die trotz der Anfertigung einer dreistelligen Anzahl von Röntgenpulverdiffraktogrammen immer noch Zeit fand, eine vierstellige Anzahl von Kaffees zu kochen und mit mir zu trinken.

Frau Heffter für ihre besonders freundliche und kompetente Unterstützung bei der UV/VIS-Spektroskopie.

Frau Warncke, Frau Ralya, Herrn Ludwig, und den Glasbläsern T. Roth und J. Köster für die ausgeführten Messungen oder den freundlichen Service.

Allen Mitarbeitern des NMR-Teams und der Elementaranalyse für die durchgeführten Messungen.

Manuel Minas da Piedade, Herminio Diogo und insbesondere Ana Lagoa für die hervorragende Zusammenarbeit und ihre Gastfreundschaft während meiner Aufenthalte in Lissabon sowie für die Einblicke in die portugiesische Kultur, die zu den angenehmsten Erinnerungen meiner Promotionszeit zählen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei David Rauth, für seine Freundschaft und Unterstützung auch in schwierigen Zeiten, sowie bei der ganzen Familie Rauth.

Ferner möchte ich mich bei Marion und Bernd Malerius bedanken, für ihren steten Zuspruch und großzügige finanzielle Unterstützung.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Frau Miriam Malerius für ihre Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit wahrscheinlich nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet habe.

Hamburg, im September 2001

Michael Siedler

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Hamburg, im September 2001

Michael Siedler