

# Untersuchung und Modellierung des mikroskopischen Verformungsverhaltens von 3-dimensionalen Trägerstrukturen für den Aufbau von Knochengewebe

E. Karamuk, J. Mayer, E. Wintermantel

Professur für Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen, Departement Werkstoffe,  
ETH Zürich, Wagistrasse 23, 8952 Schlieren

## EINLEITUNG:

Bekanntes poröse Trägersysteme für das Züchten von Geweben (tissue engineering) nutzen weitgehend zufällig strukturierte Materialien wie Schäume oder Filze, welche in ihren Eigenschaften nur sehr begrenzt auf die Anwendung abgestimmt werden können [5, 6]. In diesem Projekt wurden nun textile Superstrukturen, sogenannte "Scaffolds" [4], welche aus textilen Gebilden wie Gestriken oder Geweben hergestellt wurden, auf ihre Eignung als Trägersysteme für Zellen zum Aufbau von Geweben *in vitro* untersucht. Es wird dabei davon ausgegangen, dass durch eine gezielte Strukturierung eines Scaffolds das einwachsende Gewebe spezifisch beeinflusst werden kann [4]. Das Ziel unserer Untersuchungen war die Beschreibung der Korrelation zwischen makroskopischer und mikroskopischer Verformung der Trägersysteme in Abhängigkeit der äusseren Last.

In der vorgelegten Studienarbeit wurde mit Hilfe bildanalytischer Methoden ein Testsystem aufgebaut, welches es erlaubte, die im Rasterelektronenmikroskop aufgenommenen mikroskopischen Verformungen der Porensysteme auszumessen und mit dem makroskopischen Verformungsverhalten zu korrelieren. Dabei wurden die Eigenschaften von synthetischen Schäumen, gestrick- und gewebeverstärkten Scaffolds mit jenem von mazeriertem, spongiösem Knochen verglichen.

Zur makroskopischen und mikroskopischen Beschreibung der Morphologie und des biomechanischen Verhaltens von spongiösem Knochen wurden verschiedene Ansätze, wie stereologische [1] und fraktale Beschreibung sowie zelluläre Modelle [1] angewandt. Da diese Verfahren einen direkten Vergleich von Scaffold und spongiösem Knochen nicht zulassen, musste für die Charakterisierung der Verformungseigenschaften neue Ansätze entwickelt werden. Diese werden im folgenden eingehender beschrieben. Dazu wurde das natürliche System des spongiösen Knochens mit einem hochperiodischen System auf der Basis von Geweben verglichen

## MATERIALIEN UND METHODEN:

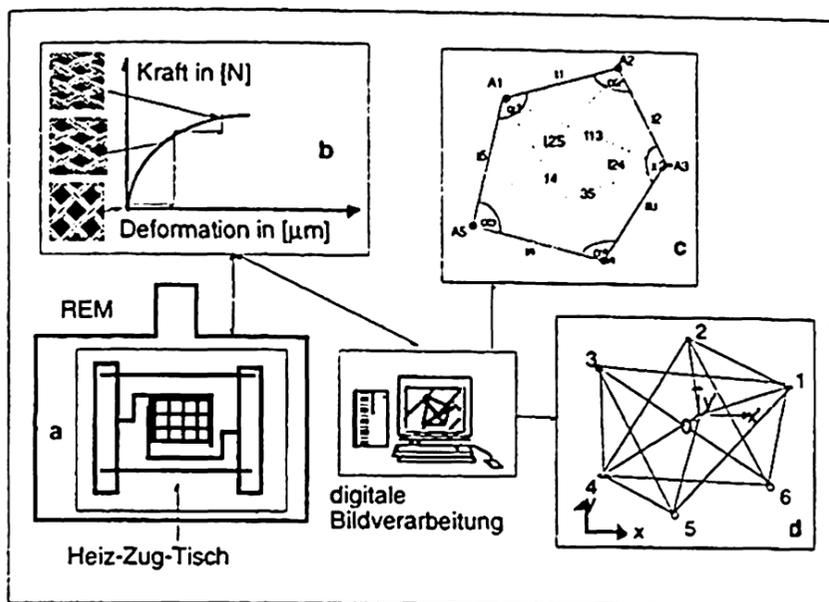
Es wurden in Anlehnung an die Literatur [2] Kompressionsversuche mit Spongiosa-Proben und Gewebe-Scaffolds gefahren. Für die mechanischen Untersuchungen wurden zylindrische Druckprüfkörper (Höhe 7mm, Durchmesser 6mm) verwendet. Spongiöse Knochenproben wurden mittels Kernbohrung aus einem frischen Kalbsfemurkopf entnommen und enzymatisch (Biozym SE, 10%) mazeriert. Als Beispiel für Zellträger wurden zylindrische Scaffolds aus Edelstahlgeweben verschiedener Maschenweiten (500µm, 200µm, 100µm) und Drahtstärken (250µm, 125µm, 50µm) hergestellt.

Das Gewebe wurde dabei in Streifen geschnitten, aufgerollt und an den Enden verklebt. Es wurden Scaffolds mit Maschenorientierungen von 0°/90° und 90°/45° zur Zylinderachse untersucht. Wegen ihrer wohldefinierten, periodischen Struktur eignen sich diese Scaffolds besonders für die Beschreibung des Verformungsverhaltens. Zusätzlich wurden stereologische Parameter [1] wie Oberflächen- und Volumendichte sowie auch die mittlere freie Weglänge, als Mass für die Perfusionseigenschaften des Scaffolds bestimmt.

Die Untersuchung des Deformationsverhaltens wurde mittels einer in das Rasterelektronenmikroskop (REM) integrierten mechanischen Prüfvorrichtung (Raith, Heiz-Zug-Tisch) durchgeführt. In den Versuchen wurde das Kraft-Verformungsverhalten mit der mikroskopischen Verformung in der Bildebene anhand von seriellen, digitalen Aufnahmen bestimmt (Figur 1). Mit einer Bildgrösse von 512 x 512 Pixel ergab sich bei 400facher Vergrösserung eine Auflösung von 0.5µm pro Pixel. Das Deformationsverhalten wurden mit den folgenden Ansätzen analysiert.

1. **Differentieller Ansatz:** Das mikroskopische Deformationsverhalten wird über die Deformation eines charakteristischen Strukturmerkmals beschrieben. Dabei wird die differentielle Längen- und Winkeländerungen bildanalytisch zwischen zwei Momentaufnahmen bestimmt. Diese Methode setzt voraus, dass die Struktur kohärent ist und sich mittels ähnlicher Strukturelemente beschreiben lässt.
2. **Integraler Ansatz:** Das mikroskopische Deformationsfeld wird durch ein Gitter von sieben Punkten, welche durch arbiträre Merkmale (Strukturmerkmale, Verunreinigungen, Beschädigungen) festgelegt werden, bestimmt. Diese Punkte definieren sechs Dreiecke, für welche jeweils ein Dehnungsvektor [3] berechnet werden kann. Der Dehnungsvektor [e] berechnet sich dabei aus  $[e] = [B] [u]$ . [B] ist eine Abbildungsmatrix, die durch die Koordinaten der einzelnen Punkte bestimmt wird und [u] der Verschiebungsvektor, der durch Vergleich der Koordinaten zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern herausgelesen wird. Es wurde bei den Berechnungen stets von einem ebenen Verzerrungsfeld ausgegangen. Die Proben wurden anhand gemittelter Dehnungsvektoren verglichen.

Ergänzend zu den Messungen im REM wurden Kompressionsversuche in einer Universalprüfmaschine (Zwick) gefahren, um Festigkeit und E-Modul zu bestimmen.



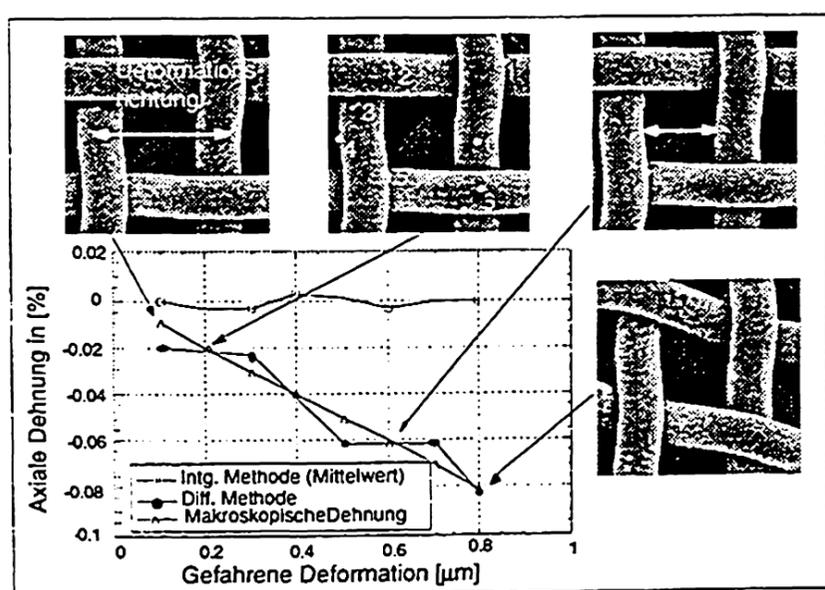
Figur 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Deformationsberechnung im REM (a). Digitale Bilder eines Druckversuches (b) werden mit der differentiellen (c) und der integralen (d) Methode ausgewertet.

## RESULTATE:

Versuche an spongiösem Knochen: Aufgrund der hohen Steifigkeit konnten mit der integralen Methode keine Deformationen beschrieben werden, während die differentielle Methode eine direkte Korrelation von mikroskopischer und makroskopischer Deformation erlaubte.

Versuche an Gewebe-Scaffolds: Mit der integralen Methode ergaben sich grosse Streuungen bei den Werten der einzelnen Dreiecke. Dies ist auf die Inkohärenz des Gewebes zurückzuführen. Die einzelnen Drähte sind (gegen Reibung) frei verschiebbar und es existiert keine Elastizität im Sinne der Kontinuumsmechanik. Die differentielle Methode lieferte eine gute Korrelation des Deformationsverhaltens einer einzelnen Masche (an der Oberfläche des Scaffolds) mit der Gesamtdeformation des Scaffolds.

Im Vergleich ergab die differentielle Methode bessere Korrelationen zwischen makroskopischen und mikroskopischen Dehnungen in den untersuchten Strukturen (Figur 2).



Figur 2: Beispiel eines Kompressionsversuchs an einem Scaffold mit 90°/45° Maschenorientierung (Maschenweite 200µm, Drahtstärke 125µm, Vergrößerung 170x). Die Deformationsrichtung (links oben), die Gitterpunkte für die integrale Methode (mitte oben) und die Maschenweite

als Merkmal in der differentiellen Methode (rechts oben) sind eingezeichnet. Die Graphik zeigt den berechneten Deformationsverlauf mit beiden Methoden.

Die E-Modul- und Druckfestigkeitsmessungen ergaben für die Gewebe-Scaffolds Werte zwischen 100MPa, 4MPa (Maschenweite 100µm, Drahtstärke 50µm bei 90°/45° Maschenorientierung) und 2000MPa, 23MPa (Maschenweite 200µm, Drahtstärke 125µm bei 0°/90° Maschenorientierung). Das Deformations- und Versagensverhalten der Scaffolds wird durch die verschiedenen Maschenorientierungen bestimmt. Bei den Spongiosa-Proben ergaben in Einklang mit der Literatur [2] E-Modul Werte zwischen 60MPa und 650MPa je nach Orientierung (frontal/lateral) und scheinbarer Dichte (0.25 bis 0.7g/cm<sup>3</sup>) der Proben.

Es liessen sich je nach Drahtstärke und Maschenweite der Scaffolds Festigkeits- und E-Modulwerte erreichen, die den geprüften Spongiosa-Proben entsprachen, wobei die Gewebe-Scaffolds aufgrund ihrer Inkohärenz eine viel geringere Eigenelastizität aufwiesen.

## DISKUSSION UND AUSBLICK:

Der Versuchsaufbau und die vorgeschlagenen Berechnungsmethoden erlauben die Identifizierung des mikroskopischen Deformationsverhaltens von Scaffolds. Die Inkohärenz der untersuchten Gewebe beschränkte jedoch die Genauigkeit der Deformationsberechnungen nach der integralen Methode an den Gewebe-Scaffolds. Durch Einbringen eines 'Gedächtnisses' in Form einer Feder kann jedoch der fehlenden Eigenelastizität entgegengewirkt werden; dies wird bei der neuen Generation von Zellträgern aus Edelmetallgeweben ausgenutzt.

Die differentielle Methode erlaubt eine gute Korrelation von makroskopischer und mikroskopischer Dehnung. Die globalen mechanischen Eigenschaften der Scaffolds lassen sich über die Wahl und Ausrichtung des Gewebes steuern und können dem spongiösen Knochen angepasst werden. Die Identifikation der notwendigen mechanischen und strukturellen Eigenschaften von Scaffolds für Knochengewebe ist Gegenstand weiterer Forschung. Die Ergebnisse der vorgestellten Untersuchungen bildeten die Basis zum Aufbau einer Prüfapparatur, welche es erlaubt in vitro die Wirkung mechanischer Stimulation auf Proliferation, Differenzierung und Metabolismus von Osteoblasten in 3-dim. Scaffolds zu charakterisieren.

## LITERATUR:

- [1] P. Zysset; A Constitutive Law for Trabecular Bone, Diss EPFL N°1252, Lausanne, 1994.
- [2] F. Linde; Elastic and Viscoelastic Properties of Trabecular Bone by a Compression Testing Approach, Kopenhagen, 1993.
- [3] O.C. Zienkiewicz; The Finite Element Method in Structural and Continuum Mechanics, London, 1967.
- [4] E. Wintermantel et al.; Biomaterials, 17 (1996)
- [5] Mikos et al.; J. Biomed. Mater. Res. 27, 183 (1993).