Synthese neuartiger Verbundwerkstoffe für den Knochenersatz aus Calciumphosphaten, Calciumcarbonaten und Polylactiden und deren mechanische und biologische Eigenschaften

Von der Fakultät für Georessourcen und Materialtechnik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Ingenieurwissenschaften

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Jessica Abert, M.Sc.

aus Heinsberg

Berichter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Horst Fischer Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Rainer Telle

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 2017

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

"Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist und im Allgemeinen ist es nicht der Fall."

~ Bertrand Russel ~

Danksagung

Diese Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehr- und Forschungsgebiet *Zahnärztlichen Werkstoffkunde und Biomaterialforschung* der RWTH Aachen. Viele Menschen haben durch ihre Hilfe und Unterstützung dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit umsetzen konnte.

Herrn Professor Dr. Horst Fischer danke ich für die Möglichkeit in einem interessanten Forschungsthema zu promovieren und das Vertrauen, mir die Projektverantwortung zu überlassen. Dadurch ermöglichte er mir, mich sowohl fachlich als auch persönlich weiterzuentwickeln, und trug damit maßgeblich bei der Findung meines weiteren Lebensweges bei.

Herrn Professor Dr. Rainer Telle, Leiter des *Lehrstuhls für Keramik und Feuerfeste Werkstoffe* am *Institut für Gesteinshüttenkunde* der RWTH Aachen, danke ich für das Interesse an meinem Forschungsthema und die Übernahme des Korreferats.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojektes *ActiveBone* angefertigt. Mein besonderer Dank gilt daher dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), das die Durchführung des Projektes durch eine umfangreiche finanzielle Förderung erst möglich machte. Auch den beteiligten Projektpartnern der Firmen Karl Leibinger Medizintechnik, Schaefer Kalk und EOS, sowie den assoziierten Partnern der Firmen Evonik und Biovision möchte ich für die Unterstützung danken. Christoph Gayer vom Fraunhofer Institut für Lasertechnik gilt mein besonderer Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die Zurverfügungstellung sämtlicher Laserschmelzprüfkörper sowie die Durchführung verschiedener Analysen.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Gesteinshüttenkunde: Peter König für die Korngrößenanalysen, Petra Schott für die XRD-Messungen, Margit Kehren, Lena Kalf und Jennifer Spitz für die Elementanalysen (ICP und RFA) und Nicolas Traon für die Resonanz-Frequenz-Dämpfungsanalysen. Ebenso großer Dank gilt Stephan Rütten von der Elektronenmikroskopie des Uniklinikums Aachen für die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Ermöglichung von unmöglichen Aufnahmen. Michael Kather vom Leibniz-Institut für Interaktive Materialien danke ich für die Unterstützung und die Mühen im Rahmen der GPC-Messungen. Dr. Dhirendar Chauhan vom Institut für Werkstoffanwendungen im Maschinenbau danke ich für die Unterstützung bei der Grindosonic-Methode. Dr. Rainer Dahlmann vom Institut für Kunststoffverarbeitung danke ich für die DSC-Messung.

Besonders bedanken möchte ich mich beim Team der Zahnärztlichen Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, das mich durch Tatkraft, Ratschläge und zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen unterstützt hat. Roswitha Davtalab möchte ich für die wunderbare Zusammenarbeit im Zellkulturlabor danken, aber genauso für die Freundschaft sowie den Beistand und den Mut nicht aufzugeben. Dr. Anne Hausmann und Dr. Ines Lauria danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur und die zahlreichen Diskussionen im Bereich des Mysteriums "Biologie". Michael Weber und Franz Jungwirth danke ich für die Unterstützung bei den biomechanischen Tests. Meinen studentischen Hilfskräften Laura Schulz, Sarah Böhme, Alexandra Tetzlaff, Marius Knieps und Fabian Abert möchte ich für die umfangreiche Unterstützung im Labor und die sehr langwierige Probenherstellung danken. Meinen Abschlussarbeitern Simone Weigelt (Masterarbeit) und Alessandro Amella (Bachelorarbeit) möchte ich für das Interesse an unserem Thema und die tollen Ergebnisse danken.

Miriam Höner und Marin Bilandzic möchte ich von ganzem Herzen danken, weil sie die besten Bürokollegen der Welt und unglaublich gute Freunde waren. Neben den fachlichen Ratschlägen und Diskussionen haben sie mich besonders durch Humor, Beistand und Dasein unterstützt. Miri danke ich besonders für das wortlose und blickkontaktlose Verstehen in jeglichen Situationen. Marin danke ich dafür, dass er der Übermacht des weiblichen Temperaments im Büro standgehalten hat und immer einen Ratschlag parat hatte.

Danken möchte ich auch allen anderen ehemaligen Kollegen für die wissenschaftlichen Diskussionen, neue Ideen und den Beistand. Besonders spannend waren die unterschiedlichen Herangehensweisen und Antworten bei Diskussionen zwischen Materialwissenschaftlern, Maschinenbauern, Biologen und Simulanten.

Meinen Kollegen vom Projektträger Jülich gilt besonderer Dank, da sie mir den Einstieg in den Job und das tolle Team sehr leicht gemacht haben und mich in der Endphase meiner Promotion durch Wort und Tat besonders unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei meiner besten Freundin Johanna Clauser bedanken, die mich seit Studienbeginn immer unterstützt hat und mein Ventil zum Dampf ablassen war, wenn der Druck zu hoch war.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die immer hinter mir standen und den Mut, die Motivation und die Lösung hatten, wenn ich sie nicht hatte. Meinen Brüdern Fabian und Jonas möchte ich dafür danken, dass sie mir einerseits Durchsetzungsvermögen und andererseits Humor gelehrt haben. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Aljoscha, der mich trotz so mancher stressiger Phase ertragen und dennoch unterstützt hat. Er hat immer die richtigen Worte gefunden, mich aufzubauen, mir bei Entscheidungen zu helfen und für alles eine Lösung zu finden.

Aus Platzgründen konnten leider nicht alle Personen aufgezählt werden, die mich im Rahmen meiner Arbeit unterstützt haben, denen aber trotzdem ein großer Dank gilt. Zum Schluss möchte ich mich aber noch bei den Menschen bedanken, die mich genau dadurch motiviert haben, dass sie nicht an mich geglaubt haben.

Kurzfassung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung und Charakterisierung eines biodegradierbaren Verbundwerkstoffes aus Polylactid (PDLLA bzw. PLLA), ß-Tricalciumphosphat und Calciumcarbonat für den Knochenersatz, der sich zur Verarbeitung zu 3D-Scaffolds mittels Laserschmelzprozess eignet. Polylactid diente als schmelzfähige, adhäsive Komponente, β-TCP als knochenähnliche Mineralphase und Calciumcarbonat zur Pufferung der aciden Degradation des Polylactids. Werkstoffkundliche Herausforderungen bei diesem Mehrstoffsystem waren insbesondere eine zu schnelle Degradation und die prinzipielle Neigung zur Quellung. Ein Anteil von 60 Gew.-% Polymer wies den besten Kompromiss bezüglich Verarbeitbarkeit und Prüfkörperfestigkeit aufgrund des starken Schmelzverbundes sowie knochenähnlicher Eigenschaften durch den keramischen Anteil auf. Es konnte eine Biegefestigkeit von bis zu 90 MPa der Prüfkörper aus den PDLLA-basierten Werkstoffen erreicht werden. Während der Lagerung in Phosphat-Puffer zeigte sich jedoch bereits innerhalb der ersten acht Wochen ein starker Abfall der Biegefestigkeit aufgrund einer Matrixquellung von bis zu 60 Vol.-%. Die für eine Herstellung von maßgeschneiderten 3D-Implantatgeometrien kritische Quellung konnte bei einem PLLA-Calciumcarbonat-Verbundwerkstoff nahezu verhindert werden. Während die Aktivität humaner mesenchymaler Stammzellen auf allen PDLLA-basierten Werkstoffen aufgrund der starken Volumenquellung stark abnahm, zeigten die Zellen auf dem PLLA-basierten Verbundwerkstoff eine sehr gute Viabilität.

Abstract

Biodegradable composite materials consisting of polylactide (PDLLA and PLLA), β tricalcium phosphate (β-TCP), and calcium carbonate were developed as a novel bone substitute candidate aiming to manufacture 3D scaffolds via selective laser melting (SLM). Polylactide was chosen as a biodegradable, meltable and adhesive component. B-TCP was used because of its bone-like mineral phase, calcium carbonate for buffering the acidic degradation of the polylactide component. Critical aspects were a vast volumetric swelling and an accelerated degradation of the polymeric component during the SLM process. Concerning to processing, mechanical strength and bone-like properties the polymeric content was set to 60 wt%. The prepared test specimens indicated a bending strength up to 90 MPa. Because of a vast volumetric swelling the bending strength of PDLLA-containing specimens decreased about 60 vol% after storage of 8 weeks in phosphate buffer. A swelling and thus a volume increase could be critical, especially for using the triphase bone substitute compound as 3D scaffold with defined dimensions. The swelling of the specimens was almost completely prevented by using PLLA instead of PDLLA. The viability of human mesenchymal stem cells cultivated on PDLLA-based materials decreased due to the volumetric swelling, while the cells cultivated on PLLA-based materials indicated a good viability.

Teile der vorgelegten Promotionsschrift wurden vorab in den folgenden Originalarbeiten [1], [2] veröffentlicht:

- Abert J, Amella A, Weigelt S, Fischer H (2016) Degradation and swelling issues of poly-(D,L-ladide)/β-tricalcium phosphate/calcium carbonate composites for bone replacement. J Mech Behav Biomed Mater 54:82-92.
- **Abert J**, Bergmann C, Fischer H (2014). Wet chemical synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite and its influence on the mechanical and biological properties. Cer Int 40:9195-9203.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung			
2	Stand der Erkenntnisse			
	2.1 Anatomie des Knochens	3		
	2.1.1 Aufbau und Funktion2.1.2 Knochenstoffwechsel2.1.3 Knochenerkrankungen	3 5 6		
	2.2 Biowerkstoffe für den Knochenersatz	10		
	2.2.1 Calciumphosphate2.2.2 Polylactide und Polylactid-basierte Verbundwerkstoffe2.2.3 Strontium im Einsatz bei Knochenersatzwerkstoffen	12 12 18		
	2.3 Degradation und Resorption von Biowerkstoffen	20		
	2.4 Generative Fertigung zur Implantatherstellung	26		
3	Material und Methoden	29		
	3.1 Werkstoffaufbereitung	29		
	 3.1.1 Pulverherstellung 3.1.1.1 Einfluss des Polymergehalts 3.1.1.2 Einfluss der Struktur der Calciumcarbonatpartikel 3.1.1.3 Einfluss der Anteile der keramischen Komponenten 	29 30 31 32		
	 3.1.1.4 Materialoptimierung für die Anwendung im Laserschmelzprozess 3.1.1.5 Zugabe von Strontium-haltigen Komponenten 3.1.2 Charakterisierung der Werkstoffe 3.1.3 Herstellung der Prüfkörper 	33 34 35 36		
	3.2 Mechanische Charakterisierung	38		
	 3.2.1 Bestimmung der elastischen Konstanten	38 39 40 41 41 41 42 42 42		
	3.2.4.2 Druckfestigkeit der SLM-Prüfkörper	42		
	3.3 Degradation	43		
	 3.3.1 Untersuchung des pH-Wertes bei beschleunigter Degradation 3.3.2 Untersuchung des pH-Wertes bei Raum- und Körpertemperatur 3.3.3 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit 3.3.4 Dynamische Beanspruchung in flüssiger Umgebung 	43 45 45 46		

	3.3.5 Lagerung verfärbter SLM-Proben in flüssiger Umgebung	. 46
	3.4 Biologische Verträglichkeit	. 47
	 3.4.1 Verwendete Zelltypen 3.4.2 Abschätzung der Zytotoxizität 3.4.3 Viabilität 3.4.4 Zytotoxizität. 	47 47 50 52
	3.4.5 Zelldifferenzierung	. 54
	 3.4.5.1 Visualisierung Osteoblasten-ähnlicher Zellen 3.4.5.2 Differenzierung von hMSCs zu Osteoblasten 3.4.5.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung 3.4.6 Resorptionsuntersuchungen 	54 56 56 56
4	Ergebnisse	. 61
	4.1 Aufbereitung und Charakterisierung der Werkstoffe	. 61
	 4.1.1 Analyse der Verbundwerkstoffe	61 66 69 70 70
	4.2 Herstellung der Prüfkörper	. 70
	 4.2.1 Herstellung warmgepresster Prüfkörper 4.2.2 Charakterisierung der warmgepressten Prüfkörper 4.2.3 SLM-Prüfkörper 4.2.4 Kurzzusammenfassung Ergebnisse Prüfkörperherstellung 	70 72 75 75
	4.3 Mechanische Charakterisierung	. 76
	 4.3.1 Bestimmung der elastischen Konstanten 4.3.2 Biegefestigkeit 4.3.2 A Die gefestigkeit warmannen Drüfkingen en 	. 76 . 77 . 77
	4.3.2.1 Biegefestigkeit der SLM-Prüfkörper 4.3.3 Druckfestigkeit	. 80 . 82
	 4.3.3.1 Druckfestigkeit warmgepresster Prüfkörper 4.3.3.2 Druckfestigkeit der SLM-Prüfkörper 4.3.4 Dynamische Beanspruchung	82 83 85 85 85 85
	4.4 Degradation	. 86
	 4.4.1 Untersuchung des pH-Wertes bei beschleunigter Degradation 4.4.2 Untersuchung des pH-Wertes bei Raum- und Körpertemperatur 4.4.3 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit 4.4.3.1 Warmgepresste Prüfkörper aus PDLLA-Werkstoffen 4.4.3.2 SLM-Prüfkörper aus PDLLA-Werkstoffen 	86 88 90 90 90

	4	.4.3.3 SLM-Prüfkörper aus dem PLLA-Werkstoff		
	4.4	.4 Dynamische Beanspruchung in flüssiger Umgebung		
	4.4	.5 Lagerung verfärbter SLM-Proben in flüssiger Umgebung		
	4.4	.6 Kurzzusammenfassung Ergebnisse Degradation	102	
	4.5	Biologische Verträglichkeit	102	
	4.5	.1 Abschätzung der Zytotoxizität	102	
	4.5	.2 Viabilität und Zytotoxizität	104	
	4	.5.2.1 PDLLA-Werkstoffe		
	4.5.2.2 PLLA-Werkstoffe			
	4.5 4	5 3 1 Visualisierung Osteoblasten-äbnlicher Zellen und hMSCs	114	
	4	.5.3.2 Nachweis der osteogenen Differenzierung		
	4.5	4 Resorptionsuntersuchungen		
	4.5	.5 Kurzusammenfassung Ergebnisse Zellverträglichkeit	124	
5	Disku	ussion	125	
	5.1	Charakterisierung der Werkstoffe und Prüfkörper	125	
	5.2	Degradation	140	
	5.3	Biologische Verträglichkeit	154	
	5.3	.1 Viabilität		
	5.3	.2 Differenzierung zu Osteoblasten	170	
	5.3	.3 Resorptionsuntersuchungen	173	
6	Zusa	mmenfassung	177	
7	Litera	aturverzeichnis	179	
8	Anha	ng		
	8.1	Analyse der Verbundwerkstoffe		
	8.2	Prüfkörperherstellung	194	
	8.2	1 Aufschmelzen Kaltgepresster Prüfkörper		
	8.2	.2 Verteilung der Materialien in den warmgepressten Prüfkörpern		
	8.2	.3 Prüfkörperoberfläche		
	8.3	Degradation		
	8.3	.1 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit		
		warmgepresster Prüfkörper	196	
	8.3	2 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit von		
		SLM-Prüfkörpern	197	
	8.4	Biologische Verträglichkeit	198	
	8.4	.1 Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung	198	
	8.4	.2 Viabilität und Zytotoxizität	199	

<u>X</u>_____

1 Einleitung und Zielsetzung

Knochendefekte oberhalb einer kritischen Größe können oftmals nicht selbstständig vom Körper regeneriert werden. Da jedoch der Versorgung von Knochendefekten durch körpereigenes Gewebe aus gesunden Arealen hinsichtlich der Menge klare Grenzen gesetzt sind, kommt synthetisch hergestellten Knochenersatzwerkstoffen eine große Bedeutung zu. Der synthetische Ersatz bietet zudem den Vorteil, dass das Operations- und Narkoserisiko für den Patienten durch Vermeidung eines minimiert wird. zweiten Operationsgebietes Besonders der Einsatz von biodegradierbaren Knochenersatzwerkstoffen ist von großem Interesse, da diese sukzessive vom Körper abgebaut und durch neues Knochengewebe ersetzt werden können. Im Idealfall entspricht die Abbaurate des Ersatzwerkstoffes der Aufbaurate des sich neubildenden Knochens.

Milchsäurebasis. Werkstoffe auf sogenannte Polylactide, haben sich als bioresorbierbares Knochenersatzmaterial bereits etabliert. Problematisch ist jedoch der acide Abbau des Polymers. Bei kleinen Implantatgrößen ist der Körper in der Lage, die saure Umgebung zu puffern. Ab einer kritischen Implantatgröße jedoch kann die Säurebildung überschießende Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Um diesem Phänomen entgegenzuwirken, ist es vorteilhaft, einen Verbundwerkstoff Polylactid und einer pufferfähigen Komponente aus zu synthetisieren. Diesbezüglich eignet sich besonders Calciumcarbonat, da dieser Stoff bereits knapp unterhalb des neutralen pH-Wertes puffert.

Ein weiterer Nachteil von Polylactiden sind die fehlenden osteokonduktiven Eigenschaften. Hinsichtlich der Entwicklung eines Knochenersatzwerkstoffes wäre es daher hilfreich, zusätzlich eine Knochenmineral-ähnliche und osteokonduktive Komponente in den Verbundwerkstoff einzubringen. Besonders geeignet ist diesbezüglich β -Tricalciumphosphat, da es biodegradierbar ist und zudem bereits als Knochenersatzwerkstoff etabliert ist. Verschiedene *In-Vivo*-Studien haben bereits gezeigt, dass sich um Implantate aus reinem Polylactid eine Bindegewebskaspel bildet. Dies behindert das Einwachsen des Knochengewebes in das Implantat. Es wurde gezeigt, dass erst durch die Einbringung von Calciumphosphat in die Polylactidmatrix das umliegende Gewebe in das Implantat einwachsen konnte, so dass sich nach dem Implantatabbau neues Knochengewebe im Defektbereich gebildet hatte.

Neben der Werkstoffauswahl spielt die Implantatgeometrie eine große Rolle bei der Einheilung von Knochenersatzimplantaten. So kann durch eine definierte Porenstruktur das Einwachsen des Knochens in das Implantat stimuliert werden, so dass Verankerung und Einheilung optimiert werden können. Außerdem ist die gezielte Einbringung einer offenen Porenstruktur mit der Einstellung einer definierten Oberfläche verbunden, Abbau-Freisetzungsverhalten SO dass das und Implantatwerkstoffe degradierbarer gezielt gesteuert werden können. Der sogenannte Laserschmelzprozess gestattet die Generierung patientenspezifischer offenporöser Knochenersatzstrukturen. Durch den schichtweisen Aufbau können mit Hilfe dieser generativen Fertigungstechnik auch komplexe Geometrien erzeugt werden. Durch die Aufschmelzung der schmelzfähigen Matrixkomponente mittels Laser ist kein zusätzliches Bindersystem notwendig. Zudem können durch einen guten Schmelzverbund höhere Festigkeiten erreicht werden als mittels herkömmlicher Bindersysteme.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein bioresorbierbarer Verbundwerkstoff erforscht werden, der zur Verarbeitung im Laserschmelzprozess zur Herstellung maßgeschneiderter Implantatstrukturen geeignet ist. Es wurden verschiedene Mischungsvarianten aus Polylactid (PDLLA bzw. PLLA), β-Tricalciumphosphat und Calciumcarbonat umfassend charakterisiert. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass durch eine optimale Werkstoffzusammensetzung die Degradationsrate gezielt beeinflusst und eine gewünschte Zellreaktion *in vitro* hervorgerufen werden können. Im Hinblick auf künftige *In-Vivo*-Anwendungen könnten mit Hilfe dieser Arbeit maßgeschneiderte Knochenersatzimplantate entwickelt werden, mit denen die Einheilung stimuliert und ein Gleichgewicht zwischen Implantatabbau und Knochenneubildung eingestellt werden können.

2 Stand der Erkenntnisse

2.1 Anatomie des Knochens

2.1.1 Aufbau und Funktion

Neben der mechanischen Stützung dienen die Knochen der Bewegung des Körpers und dem Schutz der inneren Organe [117, S. 75]. Eine wichtige Funktion ist zudem die Speicherung von Mineralien [117, S. 75]. Nach dem Zahnschmelz ist der Knochen das härteste Material im Körper [49, S. 93]. Ein gesunder Knochen weist eine Druckfestigkeit zwischen 14-16 kp/mm² (140-160 MPa), und eine Zugfestigkeit von etwa 10 kp/mm² (100 MPa) auf [117, S. 76]. Insgesamt besitzt der Mensch etwa 200 Knochen. Dabei wird zwischen langen, kurzen, flachen und unregelmäßigen Knochen unterschieden [49, S. 134]. Lange Knochen sind Röhrenknochen, z. B. Oberarm und Oberschenkel, wohingegen zu kurzen Knochen Hand- und Fußwurzelknochen zählen. Flache Knochen findet man in Form des Brustbeins, der Rippen oder des Schulterblatts. Wirbel oder Schädelbasisknochen gelten als unregelmäßige Knochen [49, S. 135]. Der Knochen selbst besteht aus einer Grundmatrix, in die die Knochenzellen eingelagert sind. Diese Matrix besteht zu 45-60 % aus anorganischen Mineralien und zu 25 % aus organischen Bestandteilen. Zudem sind in den Verbund bis zu 30 % Wasser eingelagert, wobei der Wasseranteil mit zunehmendem Alter sinkt [117]. Der anorganische Anteil besteht zu 85 % aus Calciumphosphaten (überwiegend Hydroxylapatit), bis zu 10 % aus Calciumcarbonat und aus weiteren Alkalisalzen [25]. Durch die Einlagerung dieser kristallinen Mineralien erhält der Knochen seine hohe Härte und Steifigkeit [49]. Die organische Substanz wird als Osteoid bezeichnet und besteht aus 98 % Grundsubstanz und 2 % Knochenzellen [128]. Die Grundsubstanz beinhaltet überwiegend Kollagen und in geringen Anteilen Glykosaminoglykane und Glycoproteine [25]. Knochen kann auf zwei verschiedene Weisen entstehen. Im Wachstum entsteht Knochen überwiegend indirekt über eine knorpelige Zwischenstufe [49, S. 97]. Diese Vorstufe wird im Weiteren durch Mineralisierung in Geflechtknochen umgewandelt, der wiederum schließlich in Lamellenknochen umgebaut wird [128, S. 151]. Man spricht dabei von indirekter bzw. chondraler Ossifikation [49, S. 97]. Im Erwachsenenalter wird der Knochen in der Regel direkt aus dem Mesenchym (Grundgewebe) gebildet werden, wobei zunächst Bindegewebe entsteht, das dann verknöchert wird [49, S. 97]. Dieser Prozess wird als direkte bzw. desmale Ossifikation bezeichnet [49, S. 97], [117, S. 75].

Im folgenden Abschnitt wird der Aufbau des Knochens am Beispiel eines Röhrenknochens genauer betrachtet. Der Röhrenknochen kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Die äußere Schicht, die Kompakta, ist sehr hart und dicht, während die innere eher weiche Schicht, die Spongiosa, schwammartig porös ist (Abb. 1) [160, S. 77]. Im Inneren des Knochens befindet sich das Knochenmark. Die Grundeinheiten der Kompakta bilden die sogenannten Osteonen. Ein Osteon besteht

aus einem zentralen Kanal, dem Havers-Kanal, und darum angeordnete Lamellen [63, S. 21]. Der Havers-Kanal enthält Blutgefäße und Nerven [63, S. 21]. Die Havers-Kanäle sind untereinander durch Querverstrebung verbunden [91, S. 102]. Diese sogenannten "Volkmannschen Kanäle" bilden eine geschlossene Gefäßstruktur, die die Nährstoffversorgung und den Stofftransport für die ständigen Umbau- und Regenerationsprozesse des Knochens ermöglicht [49]. Veränderte Belastungssituationen führen dazu, dass die Knochenstruktur durch die Knochenzellen an die neuen Anforderungen angepasst wird [25, S. 171], [134, S. 782], [153, S. 20]. So wird der Knochen bei höherer Beanspruchung zwecks Stabilität verstärkt und bei länger andauernder Entlastung resorbiert [95]. Der Knochenumbau erfolgt mit Hilfe knochenaufbauender und knochenabbauender Zellen. Muss also ein Bereich umgebaut werden, so resorbieren die knochenabbauenden Zellen, die Osteoklasten, die Lamellen der Osteonen, die dann anschließend von den knochenaufbauenden Zellen, den Osteoblasten, neu aufgebaut werden [153, S. 20]. Befinden sich die Aktivitäten dieser beiden Zellen nicht im Gleichgewicht, kommt es zu Störungen in der Knochenstruktur. Der Knochenumbau richtet sich nach den Zug- und Druckspannungslinien, den Trajektorien (Abb. 2) [162, S. 97], [181]. Die Trajektorien entsprechen Zonen gleicher Spannungen.



Abb. 1: Schematischer Aufbau des Röhrenknochens [160, S. 77].



Abb. 2: Schematische Verteilung der Zug- und Druckspannungslinien (links) [181], und am Beispiel eines Femurknochens (rechts) [162, S. 97].

2.1.2 Knochenstoffwechsel

Bei den Knochenzellen handelt es sich um knochenaufbauende (Osteoblasten) und (Osteoklasten) knochenabbauende Zellen, sowie um reife Knochenzellen (Osteozyten). Osteoblasten weisen eine Größe von etwa 20 µm auf [173]. Ihre Knochengewebe zu bilden Aufgabe ist es, neues und zu Osteozyten auszudifferenzieren. Osteoblasten produzieren die für die spätere Mineralisierung nötigen Enzyme Osteocalcin und Osteonectin [157]. Osteocalcin ist in der extrazellulären, nichtkollagenen Matrix enthalten und Osteonectin ist ein Ca²⁺bindendes Glykoprotein [157]. Osteoblasten produzieren zunächst Osteoid, das bereits nach wenigen Tagen durch Einlagerungen von Calciumphosphat-Kristallen bis zu 70 % und nach einigen Monaten schließlich vollständig mineralisiert ist [25]. Ist ein Osteoblast vollständig von dieser neu gebildeten mineralisierten Matrix umgeben, ist seine Syntheseaktivität stark eingeschränkt und es entsteht ein Osteozyt [117]. Die räumliche Begrenzung führt im Weiteren dazu, dass die eingeschlossenen Osteozyten nicht mehr proliferieren können [5]. Die Größe eines Osteozyten liegt zwischen 20 und 60 µm [173, S. 171]. Die Osteozyten tragen die Verantwortung dafür, dass der Knochen bei Belastungssituationen entsprechend umgebaut wird, um eine ausreichende Stabilität zu gewährleisten [95, S. 183]. Im Weiteren kommt den Osteozyten eine wichtige Aufgabe beim Mineralstoffwechsel zu [128]. Sie haben viele Zellausläufer, wodurch die Oberfläche und somit die Kontaktfläche zum umliegenden Knochen vergrößert wird. Dies ermöglicht einen schnellen Austausch von Calcium zwischen Blut und sich neubildendem Knochen [173, S. 171].

Osteoklasten sind für den Knochenabbau verantwortlich. Sie besitzen mehrere Zellkerne (bis zu 20) und weisen eine Größe von etwa 100 µm auf [5], [173, S. 172]. Sie lagern sich auf dem Knochen ab und bilden einen Aktinring, um fest an der Oberfläche anzuhaften. Daraufhin bilden die Osteoklasten an der Kontaktfläche zum Knochen Falten, um ihre Oberfläche zu vergrößern [108, S. 158]. In diesen Falten wird Salzsäure gebildet, mit Hilfe derer der Knochen lokal aufgelöst wird. Auf diese

Weise entsteht eine sogenannte Resorptionslakune bzw. eine *Howship*-Lakune [117, S. 77]. Durch Auflösen des Aktinrings löst sich der Osteoklast von der Knochenoberfläche und haftet an einer anderen Stelle erneut an. Der Knochenabbau erfolgt sehr viel schneller als der Knochenaufbau [16]. Daher sind bei einem gesunden Knochenstoffwechsel deutlich mehr Osteoblasten aktiv als Osteoklasten. Das Verhältnis liegt bei etwa 100:1 [117, S. 77].

Die Steuerung der Knochenzellen erfolgt in erster Linie hormonell [117, S. 76, 77], [128, S. 155]. So spielen neben dem Parathormon und Kalzitonin auch Östrogene bzw. Testosteron und Schilddrüsenhormone eine große Rolle [128]. Das Parathormon wird in der Nebenschilddrüse gebildet und ist an der Regulation des und Phosphatstoffwechsels beteiligt [49]. Calcium-Bei Erniedrigung des Calciumspiegels im Plasma wird es verstärkt ausgeschüttet [95 S. 185]. Im Knochen führt es zur Aktivierung der Osteoklasten und zur Transformation der Osteoblasten in Fibroblasten [128]. Als Folge daraus ergibt sich eine erhöhte Calcium-Freisetzung aus dem Knochen, um die Calciumkonzentration im Blut zu erhöhen [139]. Calcitonin wird in der Schilddrüse gebildet und gilt als Gegenspieler des Parathormons [128]. Durch Hemmung der Osteoklasten und Steigerung der Osteoblasten-Anzahl wird die Calcium-Freisetzung aus dem Knochen vermindert und senkt so den Blutcalciumspiegel [139]. Auf diese Weise verhindert das Calcitonin, dass zu viel Knochen abgebaut wird. Östrogen fördert die Knochenneubildung, indem es die Osteoblasten stimuliert [81, S. 7], [99, S. 38]. Eine Verringerung der Östrogenkonzentration (z. B. in der Menopause) kann zu einem Abfall der Knochendichte führen. Östrogen beeinflusst die Osteoklasten indirekt, indem es in den Osteoblasten Osteoklasten-aktivierende Faktoren hemmt [51, S. 50]. Die Wirkung und Funktion, die Östrogen bei der Frau hat, übernimmt Testosteron beim Mann [42, S. 56]. Eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung der Calcium-Ionen kommt Vitamin D zu [128, S. 156]. Es ermöglicht den Einbau des Calciums in das Knochengewebe. Es wird ausgeschüttet, wenn der Blut-Calcium-Spiegel zu gering ist. Es regelt in der Nebenschilddrüse, weniger Parathormon zu produzieren [84, S. 36].

2.1.3 Knochenerkrankungen

Bei einem gesunden Menschen liegen Aufbau und Abbau des Knochengewebes im Gleichgewicht. Kommt es zu Störungen in den Funktionen von Osteoblasten und Osteoklasten, können Knochenerkrankungen die Folge sein [95, S. 183]. In den folgenden Abschnitten werden die häufigsten Knochenerkrankungen und Therapiemöglichkeiten erläutert.

<u>Rachitis</u> ist eine Krankheit, die hauptsächlich bei Kindern auftritt. Die Mineralisation des wachsenden Knochens ist gestört, so dass der Knochen unverkalkt als Osteoid verbleibt [128, S. 157]. Die Krankheit ist in der Regel nicht mit einem generellen Calciummangel verbunden, sondern mit einem Mangel an Vitamin D [128, S. 157]. Dadurch wächst der Knorpel unkontrolliert weiter und es kann zu starken Verformungen kommen [134, S. 297]. Im Erwachsenenalter führt Vitamin-D-Mangel zu

Osteomalazie. Durch Calciumverarmung kommt es zu einer Abnahme der Knochendichte und der Knochen wird nachgiebiger [128, S. 192]. Neben der krankhaften Abnahme des Knochengewebes kann auch eine verstärkte Knochenbildung zu Störungen führen. Bei der Osteosklerose führt eine starke Verdichtung der Spongiosa dass der Knochen seine Elastizität verliert dazu. und das Knochenbruchrisiko deutlich erhöht wird [136, S. 1527]. Diese Verdichtung kann in manchen Fällen auch auf die Kortikalis übergehen [136, S. 1527]. Im späten Stadium besteht die Gefahr, dass das Knochenmark verdrängt wird [95, S. 191]. Osteopetrose (Mamorknochenkrankheit) ist eine andere Knochenerkrankung. Ursache für diese Erkrankung ist eine zu geringe Osteoklastenfunktion, die zu einer starken Zunahme der Knochenmasse führt [95, S. 116], [128, S. 170]. Dadurch verändert sich die Mikrostruktur des Knochens und die mechanische Stabilität wird verringert. Im schlimmsten Fall werden Blutgefäße und Nerven eingeklemmt, wodurch es besonders im Bereich des Schädels zu Funktionsausfällen des Gehirns kommen kann [180, S. 322]. Osteoporose tritt besonders häufig bei älteren Menschen auf. Ursache für diese Krankheit ist, dass der Körper mit zunehmendem Alter vermindert Calcium aufnimmt [120, S. 47]. Durch ein Ungleichgewicht der Osteoblasten- und der Osteoklasten-Aktivitäten kommt es zu schweren Störungen im Knochenstoffwechsel [157]. Langfristig wird durch eine enorme Abnahme der Knochendichte auch die Festigkeit herabgesetzt, so dass das Risiko von Knochenbrüchen stark ansteigt [13, S. 23]. Bei einer Abnahme der Knochendichte um 10-15 % verdoppelt sich in etwa das Frakturrisiko [13, S. 23]. Auch bei Frauen nach der Menopause treten aufgrund von Calciummangel häufig osteoporotische Erkrankungen auf. Die Abnahme der Knochendichte beginnt in den spongiösen Bereichen und geht mit fortschreitender Krankheit auch auf die kompakten Randbereiche über (Abb. 3) [182]. Daraus resultiert eine abnehmende Dicke der Kompakta.





Zur Behandlung von Osteoporose werden meist Strontium-haltige Medikamente wie Strontiumranelat verwendet, da die positive Wirkung von Strontium auf die Knochenneubildung mehrfach nachgewiesen wurde [22], [98], [132], [176]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts führte Lehnerdt verschiedene *In-Vivo*-Studien zum Einfluss von Strontium auf die Knochendichte durch [98]. Unter anderem stellte er fest, dass die Einnahme von Strontiumphosphat bei gleichzeitig Calcium-armer Ernährung bei Doggen zu einer starken Knochenneubildung führte, der neue Knochen aber überwiegend unverkalkt und somit sehr nachgiebig blieb [98]. Eine ausreichende Mineralisierung zeigte sich erst bei einer gleichzeitigen Medikation mit Strontium- und Calciumphosphat [98]. So konnte Lehnerdt anhand seiner Studien folgern, dass Strontium das Calcium nicht gänzlich ersetzen konnte. Eine In-Vitro-Studie zeigte, dass die Zugabe von Strontiumranelat in das Nährmedium einer Kultur von Knochenzellen auf einer Apatit-Kollagen-Matrix die Aktivität der Osteoklasten hemmte [22]. Dies wurde anhand der TRAP-Aktivität (Tartrat-resistente saure Phosphatase-Aktivität) nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Osteoklasten mit steigendem Sr²⁺-Gehalt (0,1 bis 24 mM) abnahm [22]. Bei einer Sr²⁺-Konzentration von 24 mM war die TRAP-Aktivität nach 48 h um 90 % gesenkt und die Bildung reifer Osteoklasten war zu 100 % unterbunden. Der Funktion von Strontium beruht darauf, dass es die Fähigkeit besitzt, in bestimmte im Körper ablaufende, die Osteogenese betreffende Signalwege einzugreifen. Einer der wichtigsten Prozesse hinsichtlich der Selbsterneuerung von Stammzellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten ist der Wnt/β-Catenin-Signalweg. Durch diesen Signalweg werden im Körper bestimmte Zielgene in Ribonukleinsäure (RNA) umgeschrieben. Durch RNA wiederum werden dann im Weiteren genetische Informationen in Proteine zur Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung umgewandelt [62]. Im Normalzustand ist der Wnt/β-Catenin-Signalweg im Körper inaktiv (Abb. 4 links). Im Zytoplasma der Zellen bildet sich aus β-Catenin, Axin, APC (Adenomatöse Polyposis Coli), GSK3β (Glykogen Synthase Kinase 3β) und CK1α (Casein Kinase 1) der Destruction-Komplex [121, S. 491]. In diesem Komplex wird β-Catenin phosphoryliert. Durch Übertragung von Ubiquitin-Peptiden auf das β-Catenin ist das Proteasom in der Lage das β-Catenin zu erkennen. Das Proteasom hat die Funktion das β-Catenin abzubauen, um eine Anhäufung zu verhindern. Gleichzeitig findet im Zellkern eine Hemmung der Genexpression statt. Der Wnt/β-Catenin-Signalweg wird aktiviert (Abb. 4 rechts), wenn das Wnt-Gen an den Frizzled-Rezeptor (Transmembrandomänenrezeptor) [121, S. 491] und an die Korezeptoren LRP5 und LRP6 ankoppelt [6, S. 1072]. Durch Aktivierung des Dishevelled-Proteins (DVL) wird GSK3ß gehemmt, in dessen Folge der Destruction-Komplex zerfällt. Dadurch übertragen werden kann und das Proteasom das β-Catenin nicht mehr erkennt. Daraus ergibt sich eine Anhäufung des β-Catenins im Zytoplasma. Ist die Anhäufung so hoch, dass es zu einer Sättigung kommt, breitet sich das β-Catenin auch auf den Zellkern aus. Dort lagert es sich in Verbindung mit anderen Proteinen an den TCF/LEF-Transkriptionsfaktor an und aktiviert diesen. Dieser wiederum aktiviert dann eine RNA-Polymerase, durch welche im Weiteren die Osteogenese-betreffende Gene in Proteine umgeschrieben werden [6, S. 1072].



Abb. 4: Schematische Darstellung des inaktiven (links) und des aktivierten (rechts) Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Durch die Phosphorylierung des β -Catenins erkennt das Proteasom es und baut es ab. Bei Aktivierung des Signalwegs unterbleiben die Phosphorylierung und der Abbau des β -Catenins, so dass es sich in den Zellkern ausbreitet. Infolgedessen werden Gene in Proteine umgeschrieben. (nach [124, S. 517]).

Der Wnt/β-Catenin-Signalweg kann durch Strontium aktiviert werden. Die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten und folglich die Aktivität der Osteoblasten wird stimuliert [176]. Infolgedessen wird die Knochenneubildung gefördert. Bei der Behandlung von Osteoporose mit Strontiumranelat wird genau dieser Effekt genutzt, so dass die Knochendichte systemisch erhöht wird [176]. Durch die Dosierung und die Einnahmedauer kann die Wirkung gezielt eingestellt werden. Der Mechanismus dahinter ist, dass Strontium in der Lage ist, durch die Havers-Kanäle der Osteonen, den Grundeinheiten des Knochens, zu diffundieren [38] (vgl. Kap. 2.1.1). So gelangt das Strontium in die intrazelluläre Flüssigkeit [102]. Es kann dann entweder an der Knochenoberfläche absorbiert oder auf Calcium-Plätzen in den Knochen eingelagert werden [103]. Im Knochen stimuliert Strontium aktiv die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten und die Proliferation der Osteoblasten [22], [176]. Es hat jedoch nicht nur eine aktive Wirkung auf den Knochenaufbau, sondern auch einen passiven Einfluss auf den Knochenabbau durch die Hemmung der Aktivität der knochenabbauenden Zellen [22], [111]. Der Mechanismus dahinter ist, dass die Anhaftung der Osteoklasten an den Knochen unterbunden wird, indem der Aufbau der Dichtungszone gestört wird. Die Dichtungszone ist aktinreich und dient dem Kontakt zwischen Knochen und Osteoklast. Bei Aktin handelt es sich um ein Strukturprotein im Zytoskelett, welches Form, Stabilität, Materialtransport, Bewegung, Teilung und Differenzierung der Zelle bestimmt [64, S. 632]. Die feste Verbindung zwischen Knochen und Zelle ist für den Resorptionsprozess zwingend erforderlich. Ein aktiver Osteoklast (Abb. 5 links) lagert sich an die Knochenoberfläche an und baut den Knochen lokal ab, indem er an der Kontaktfläche Falten ausbildet und Salzsäure produziert. Dieser Prozess wurde in Kapitel 2.1.2 bereits ausführlich erläutert. Strontium ist in der Lage diese Dichtungszone zu zerstören, so dass der feste Kontakt zwischen Knochen und Osteoklast verhindert wird und folglich keine Knochenresorption stattfinden kann (Abb. 5 rechts).



Abb. 5: Aktiver Osteoklast (links) und ein passiver Osteoklast (rechts). Die Dichtungszone wird durch Strontium zerstört.

2.2 Biowerkstoffe für den Knochenersatz

Da dem autologen Ersatz durch seine begrenzte Verfügbarkeit Grenzen gesetzt sind, wird der Bedarf an synthetisch hergestelltem Knochenersatz immer größer. Für den medizinischen Einsatz müssen diese Materialien jedoch strenge Anforderungen erfüllen. So dürfen sie weder toxische, noch antigene oder kanzerogene Reaktionen hervorrufen. Man spricht diesbezüglich davon, dass die Materialien biokompatibel sein müssen. Der Begriff der Biokompatibilität definiert die Verträglichkeit von Gewebe und Implantat und die Fähigkeit des Materials eine bestimmte Gewebereaktion hervorzurufen [169]. Je nach Anwendung kann es aber auch von Vorteil sein, eine bestimmte Gewebereaktion hervorzurufen. So werden drei verschiedene Reaktionstypen unterschieden: bioinerte, bioaktive und biotolerante Kontaktreaktionen [131]. Bei einem bioinerten Verhalten kommt es beim Kontakt von Implantat und Gewebe zu keiner chemischen Reaktion, so dass Gewebe und Implantat keine Verbindung miteinander eingehen und nebeneinander vorliegen [131]. Man spricht dabei auch von einer Kontaktosteogenese [131] (Abb. 6a). Gehen Gewebe und Implanat eine feste Verbindung ein, indem das Gewebe in das Implantat einwächst, spricht man von einer bioaktiven Gewebereaktion bzw. von einer Verbundosteogenese [131] (Abb. 6b). Die Verwachsung beruht darauf, dass Calcium und Phosphat aus den Implantatwerkstoffen (z. B. Calciumphosphat oder Bioglas) freigesetzt werden und in den Körperorganismus gelangt [109]. Im Rahmen der Knochenneubildung kommt es zu einer festen chemischen Verbindung zwischen Gewebe und Implantat, in die freigesetzte Calcium- und Phosphat-Ionen integriert werden [131]. Bei einer biotoleranten Kontaktreaktion bildet sich zwischen Gewebe und Implantat eine fibröse Grenzschicht (Abb. 6c). Bei dieser Art von Reaktion spricht man von einer Distanzosteogenese [131].



Abb. 6: Gewebereaktionen bei Kontakt mit einem Biomaterial: bioinert (a), bioaktiv (b) und biotolerant(c). (nach [131]).

Werkstoffe, die die jeweiligen Reaktionen auslösen, sind zum Beispiel Hydroxylapatit (bioaktiv), Knochenzement und rostfreier Stähle (biotolerant) und Titan und Aluminiumoxid (bioinert) [170, S. 1601], [173, S. 109]. Bei guter Biokompatibilität wird das Risiko von Entzündungen und Abstoßungsreaktionen nach Implantation verringert und eine Folgeoperation kann vermieden werden. Neben dem jedoch Implantatmaterial spielen auch Größe und Implantationsort eine entscheidende Rolle.

Zahlreiche Studien befassen sich mit der Entwicklung von Knochenersatzwerkstoffen. In Abhängigkeit von der Verweildauer des Implantats im Körper unterscheidet man zwischen resorbierbaren und dauerhaften Implantaten. Weist ein Knochendefekt eine Größe auf, die innerhalb einer angemessenen Zeit durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden kann, werden biodegradierbare Implantate zur Überbrückung eingesetzt. Überschreitet ein Knochendefekt eine kritische Größe und kann nicht innerhalb eines angemessenen Zeitraums durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden, werden Defekte mit dauerhaft im Körper verbleibenden Implantaten gefüllt. Wenn zudem vollständige Teile ausgetauscht werden müssen oder keine Zeit zur Regeneration bleibt (z. B. Hüftpfannen oder -kugeln), kommen ebenfalls Dauerimplantate zum Einsatz. Die am häufigsten verwendeten Biowerkstoffe sind Calciumphosphate (biodegradierbar), Aluminiumoxid und Titan (beide beständig) [170, S. 1601], [173, S 109]. Aluminiumoxid weist einen vergleichsweise hohen Elastizitätsmodul auf, wodurch die Einsatzgebiete begrenzt sind [173, S. 193]. Titan wird aufgrund der hohen Korrosionsbeständigkeit, der guten mechanischen Eigenschaften und der hohen Dauerfestigkeit in der Implantologie verwendet [173, S. 193]. Titan weist ähnliche mechanische Eigenschaften auf wie rostfreie Stähle, aber nur eine halb so hohe Dichte und folglich einen deutlich geringeren Elastizitätsmodul [173, S. 213]. Nachteilig an Titan ist die fehlende Ähnlichkeit zur natürlichen Knochenstruktur. Daher werden Titanimplantate je nach Einsatzgebiet durch die Beschichtung mit Calciumphosphaten bioaktiviert [48, S. 68].

Die folgenden Unterkapitel befassen sich in erster Linie mit biologisch abbaubaren Implantaten.

2.2.1 Calciumphosphate

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur natürlichen Knochenstruktur spielen Calciumphosphate im Hinblick auf den Knochenersatz eine große Rolle in der Implantologie [84, S. 22]. Der Vorteil ist, dass das Risiko einer Abstoßungsreaktion minimiert und das Anwachsen des Gewebes stimuliert werden [43]. Neben der bereits erwähnten guten Biokompatibilität gelten Calciumphosphate als osteokonduktiv [113]. Osteokonduktivität bedeutet, dass das Implantatmaterial dem einwachsenden Knochen als Leitschiene dient und somit das Gewebeeinwachsen begünstigt [84, S. 134]. Zu den Nachteilen der Calciumphosphate gehören die vergleichsweise schlechten mechanischen Eigenschaften [173, S. 281].

Hydroxylapatit (Ca₅(PO₄)₃OH) ist der mineralischen Phase des Knochens chemisch zwar am ähnlichsten, ist jedoch nur sehr schwer löslich. Insbesondere hinsichtlich resorbierbarer Implantatmaterialien eignet sich daher β -Tricalciumphosphat besser, da es eine höhere Löslichkeit aufweist. Die chemische Formel lautet Ca₃(PO₄)₂ [126]. Es weist somit ein geringeres Ca/P-Verhältnis auf als Hydroxylapatit [145]. Die Löslichkeit ist materialspezifisch und durch die im Medium lösliche Konzentration des Materials bestimmt. Der Materialabbau durch Lösung wird durch Biodegradation (vgl. Kap. 2.3) verstärkt, die insbesondere von der Porosität der Werkstoffe abhängig ist. Dabei unterscheidet man zwischen Mikro- und Makroporosität. Ab einer Porengröße von 100 µm spricht man von Makroporosität, die das Einwachsen von Gewebe ermöglicht [119]. Die Mikroporosität dagegen ist vor allem für das Abbauverhalten der Werkstoffe ausschlaggebend (Tab. 1) [65].

Werkstoff	Makroporosität (%)	Mikroporosität (%)	Biodegradationsrate (Vol%/3 Monate)	
	30	40	0 <u>+</u> 10	
Hydroxyapatit	50	< 5	0 <u>+</u> 5	
	0	< 5	0 <u>+</u> 5	
	20	40	30 <u>+</u> 10	
β-ΤϹΡ	50	< 5	15 <u>+</u> 5	
	0	< 5	0 <u>+</u> 5	

Tab. 1: Biodegradationsrate von gesintertem Hydroxylapatit und β-Tricalciumphosphat in Abhängigkeit der Mikro- und Makroporosität [65].

2.2.2 Polylactide und Polylactid-basierte Verbundwerkstoffe

Polylactide

Polylactide haben sich als Implantatmaterial in der medizinischen Anwendung bereits etabliert. Sie zeichnen sich durch eine gute Zellverträglichkeit und Degradierbarkeit aus. Aufgrund der Abbaubarkeit werden Polylactide insbesondere in Form von Schrauben, Stiften und Osteosyntheseplatten eingesetzt [53, S.67]. Zudem befassen sich zahlreiche Studien mit der Etablierung von Polylactid als biodegradierbares

Knochenersatzmaterial. Zwar hat das Polymer keine Ähnlichkeiten mit der menschlichen Knochenstruktur, degradiert aber schneller als das gut etablierte β-Tricalciumphosphat [72]. Ein großer Nachteil der Polymerdegradation sind die aciden Abbauprodukte in Form von Milchsäure [146]. Bei zu großen Mengen, die beim Abbau freiwerden, kann die Einheilung durch ein erhöhtes Entzündungs- und Abstoßungsrisiko gefährdet werden. Auf die Mechanismen der Degradation wird in Kapitel 2.3 genauer eingegangen.

Es werden zwei Strukturen der Milchsäure unterschieden: L-Milchsäure und D-Milchsäure (Abb. 7 oben) [114, S. 53]. Unter Abspaltung von Wasser bilden sich aus zwei Milchsäuren ringförmige Lactide (Abb. 7 unten). Je nach Strukturelement entsteht somit ein L,L-Lactid, D,L-Lactid oder D,D-Lactid. Durch Ringöffnungspolymerisationen können sich daraus Polylactide bilden (Abb. 8a) [10, S. 401]. Durch die verschiedene Zusammensetzung der Strukturelemente unterscheidet man auch bei den Polymeren zwischen Poly-(D-Lactid), Poly-(L-Lactid), oder Poly-(D,L-Lactid), [10, S. 11], [61, S. 8] (Abb. 8b-d). Die Monomere können in Poly-(D,L-Lactid) in unterschiedlichen Verhältnissen vorliegen. Die Verteilung der Monomere erfolgt statistisch. In der vorliegenden Arbeit lagen die Monomere in gleichen Anteilen vor.



Abb. 7: Strukturformeln von D- und L-Milchsäure (oben) und der durch Abspaltung von Wasser daraus bildbaren Lactide: L,L-Lactid, meso-Lactid und D,D-Lactid [114, S. 53]. (meso-Lactid \triangleq D,L-Lactid).



Abb. 8: Ringöffnungspolymerisation von Lactid [10, S. 14] (a). Es entsteht ein Polylactid. Je nach Anordnung der Strukturelemente bildet sich Poly-(D-Lactid) (b), Poly-(L-Lactid) (c), oder Poly-(D,L-Lactid) (d) [61, S. 8].

Die beiden Polylactid-Varianten, die am häufigsten verwendet werden, sind Poly(D,L-Lactid) (PDLLA) und Poly(L-Lactid) (PLLA). Sie unterscheiden sich in der Ausrichtung ihrer Liganden (Abb. 8b und c). Während PLLA nur aus L-Elementen besteht, die abwechselnd entgegengesetzt ausgerichtet sind (vgl. Abb. 8b), besteht PDLLA aus L- und D-Elementen (vgl. Abb. 8c). Die D- und L-Elemente sind chiral. Nach IUPAC sind zwei Strukturen chiral, wenn sie nicht deckungsgleich sind [167, Nr. 41, 42]. Dadurch ist PDLLA nicht in der Lage kristalline Bereiche auszubilden und verbleibt amorph [61, S. 8]. Durch die statistische Ausrichtung der D- und L-Einheiten entsteht eine hohe Unordnung [48, S. 57]. Durch die regelmäßige Anordnung in PLLA ergeben sich teilkristalline Bereiche [10, S. 3, 74].

Durch die amorphe Struktur weist PDLLA keinen definierten Schmelzpunkt auf, sondern einen Schmelzbereich [158, S. 113]. Dieser beginnt bei der Erweichungstemperatur T_G , die zwischen 50 und 60 °C liegt [158, S. 113]. Durch die teilkristallinen Eigenschaften hat PLLA eine stabilere Struktur [48], wodurch der Schmelzbereich heraufgesetzt und zudem definierter wird. Durch die stabilere Form verlängert sich die Degradationszeit [10, S. 74], [29, S. 13], [48, S. 58]. Die Eigenschaften einer Polylactid-Variante können durch das Verhältnis von D- zu L-Lactiden gezielt eingestellt werden [28]. Thermische Eigenschaften können durch die Kettenlänge des Abbauverhalten auswirkt. Das Abbauverhalten kann durch die Kettenlänge des Polymers beeinflusst werden, was auch Einfluss auf die Festigkeit hat (Tab. 2 und 3). Der Polymerabbau kann anhand der Molmasse oder der polymerkonzentrationsabhängigen inhärenten Viskosität gemessen werden. Durch die Vielzahl der Einstellungsparameter ist das Gesamtsystem komplex.

Kennwerte	PDLLA	PLLA	Molmasse des Polymers (bzw. inhärente Viskosität)
	55-60 °C [29]	60-65 °C [29]	k. A.
	51,6 °C [28]	57,4 °C [28] PLLA: 137.000 g/mc PDLLA: k. A. (0,68 dl/g)	
Glacüborgange	57 °C [164]	58 °C [164]	k. A.
temperatur	59-52 °C [133]	55-59 °C [133]	PDLLA: 47.500-114.000 g/mol, PLLA: 23.000-66.000 g/mol [133]
	-	62 °C [178]	keine Angabe (2,7-3,6 dl/g [178])
		175,1 °C [28]	S. O.
Schmolzpunkt		178 °C [178]	S. O.
Schneizpunkt	-	184 °C [164]	k. A.
		178-181 °C [133]	S. O.
	-	150 MPa [110]	PLLA: 431.000 g/mol [110]
		150 MPa [179]	M _w = 200.000 g/mol [179]
	42 MPa [104]	-	k. A.
Biegefestigkeit	-	122 u. 126 MPa [58]	M _w = 800.000 g/mol bzw. 500.000 g/mol [58]
	-	88 MPa [102]	M _W = 52.000 g/mol [102]
	-	259 MPa [155]	M _w = 400.000 g/mol [155]
	-	113-142 MPa [164]	k. A.
	84-88 MPa [133]	64-106 MPa [133]	S. 0.
Druckfestigkeit	79 MPa [104]	-	k. A.
Druckicstigkeit	-	118 MPa [178]	S. 0.
	-	75-83 MPa [97]	k. A. (PLLA L206 nach Hersteller 0,8-1,2 dl/g)
	49-53 MPa [133]	55-59 MPa [133]	S. 0.
Zugrestigkeit	-	46 MPa [102]	S 0.
	42-51 MPa [164]	75-83 MPa [164]	k. A.
	-	53 MPa [178]	S. O.
	-	6900-9800 MPa [10]	k. A.
- 1 (1 1 1 1 1	-	3300-4000 MPa [58]	S. 0.
Elastizitats- modul	-	4000 MPa [102]	S. O.
	-	3700 MPa [92]	k. A

3600-3650 MPa [33]

19,8 MPa [28]

S. O.

S. O.

-3500-3600 MPa

2,8 MPa [28]

[133]

Tab. 2: Mechanische Eigenschaften von PDLLA und PLLA (k. A. = keine Angabe)

Es zeigt sich, dass nicht nur der Kristallisationsgrad, sondern auch die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften hat (Tab. 3). Bei einer Erhöhung der Temperatur von Raum- auf Körpertemperatur fallen die 30 % mechanischen Festigkeiten um etwa ab (Tab. 3). Bei einer Umgebungstemperatur von 56 °C ($\approx T_G$) weisen PDLLA und PLLA_{9%} nahezu keine Restfestigkeiten auf, wohingegen das kristallinere PLLA_{52%} bei 56 °C noch etwa 30 % der Festigkeit bei Körpertemperatur aufweist. Im Hinblick auf den E-Modul zeigt sich ein ähnliches Bild.

Eigenschaft		PDLLA	PLLA	
Struktur		amorph	teilkristallin	
Kristallisationsgrad		0 %	9 %	52 %
	23 °C	86 MPa	100 MPa	113 MPa
Biegefestigkeit	36 °C	60 MPa	77 MPa	83 MPa
	56 °C	0,2 MPa	0,4 MPa	28 MPa
	23 °C	3550 MPa	3600 MPa	4150 MPa
Elastizitätsmodul	36 °C	2800 MPa	3400 MPa	3600 MPa
	56 °C	25 MPa	50 MPa	950 MPa

Tab. 3: Mechanische Eigenschaften von PDLLA und PLLA [10], [133].

Insbesondere im Hinblick auf die Anwendung als biodegradierbarer Knochenersatzwerkstoff sind die fehlenden osteokonduktiven Eigenschaften der Polylactide problematisch. So zeigten verschiedene Studien, dass sich um das Implantat aus reinem Polylactid unmittelbar nach der Implantation eine fibröse Grenzschicht bildet und folglich kein Kontakt zwischen Implantat und Knochen zustande kommt [34], [72]. Abhilfe bietet die Zugabe von osteokonduktiven Komponenten (z. B. Calciumphosphat), die die biologischen Eigenschaften verbessern.

Polylactid-basierte Verbundwerkstoffe

Da Biowerkstoffe, wie bereits erläutert, nicht nur positive Eigenschaften aufweisen, bietet die Synthese von Verbundwerkstoffen die Möglichkeit, durch Kombination verschiedener Werkstoffe positive Eigenschaften gezielt einzustellen und nachteilige Eigenschaften zu verbessern. So besitzen zum Beispiel Polylactide aute mechanische. aber unzureichende biologische Eigenschaften [34]. Calciumphosphate dagegen haben zwar hervorragende biologische, jedoch schlechte mechanische Eigenschaften [2], [113]. Daculsi et al. verliehen Polylactid durch Zugabe vob Calciumphosphaten knochenähnliche Eigenschaften [34]. Bei Verbundwerkstoffen für den Knochenersatz soll eine gute Kombination aus Festigkeit und biologischer Wirkung erzielt werden. Im Optimalfall ist das eingesetzte Implantat aktiv an der Einheilung beteiligt. Insbesondere im Fall von bioresorbierbaren Materialien sind Implantatabbau und Knochenaufbau so aufeinander abgestimmt,

dass diese gleichermaßen parallel ablaufen. Neben der Festigkeit und der biologischen Wirkung ist somit die Degradationskinetik eines Werkstoffes eine Stellschraube. Durch die Kombination von Materialien mit unterschiedlichen Abbauraten kann der Materialabbau eines Verbundwerkstoffes definiert eingestellt werden. Hydroxylapatit ist zum Beispiel nahezu unlöslich und kann durch Beimengen des leichter löslichen β-Tricalciumphosphats besser lösliche Anteile erhalten. Durch Poly-(D,L-Lactid)) die Zugabe resorbierbarer Polymere (z. B. kann die Implantatlöslichkeit weiter erhöht werden [72]. Verbundwerkstoffe können gezielt auf eine spezifische medizinische Anwendung hin entwickelt werden. Neben den Anforderungen an einen Werkstoff (z. B. Abbauverhalten, Festigkeit, biologische Aktivität) können auch patientenspezifische Einflüsse (z. B. Alter, Geschlecht) berücksichtigt werden. Da ein älterer Knochen nicht die gleiche Regenerationszeit aufweist wie ein junger Knochen, muss entsprechend auch die Implantatabbaurate eingestellt werden. Da sich die vorliegende Arbeit mit verschiedenen Polylactiden befasst, beschränken sich die folgenden Abschnitte des Kapitels auf Polylactidbasierte Werkstoffe. Zu Beginn dieses Kapitels wurden die Unterschiede verschiedener Polylactid-Varianten bereits angesprochen. Um die Eigenschaften der gezielt auf eine spezifische Anwendung Werkstoffe anzupassen. werden verschiedene Varianten kombiniert [28]. Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht zu den einstellbaren Parametern durch Kombination verschiedener Polylactid-Strukturen und deren Wechselwirkung:



Abb. 9: Wechselbeziehungen der Eigenschaften von Polylactiden.

Die mechanischen Eigenschaften und das Abbauverhalten von Polylactiden werden in erster Linie durch das Molekulargewicht und den Kristallinitätsgrad bestimmt [28], [173, S. 265]. Durch Wahl der Molekülkettenlängen der Polymere und dem Verhältnis von amorphen zu kristallinem Anteilen (z. B. PDLLA/PLLA) kann der Implantatwerkstoff gezielt an das Einsatzgebiet und die Defektgröße angepasst werden [28]. Aufgrund der höheren Kristallinität von PLLA im Vergleich zu PDLLA ist die Strukturstabilität höher und folglich auch die Festigkeit [28], [164]. Durch die höhere Stabilität der Struktur ist zum einen eine höhere Temperatur zum Aufschmelzen des Materials nötig, zum anderen verlängert sich die Abbauzeit [28], [48, S. 58].

Im Hinblick auf die mechanischen Eigenschaften ergeben sich teils sehr unterschiedliche Aussagen. Grund dafür ist die Abhängigkeit der Kennwerte von den Eigenschaften des Ausgangspolymers (z. B. Molmasse und Kristallinität) und dem Aufbereitungs- und Verarbeitungsprozess (z. B. Fällung, Aufschmelzung). Ignjatovic

et al. synthetisierten Hydroxylapatit-basierte Verbundwerkstoffes mit PLLA-Anteilen aus 10, 15, 20, 25 und 30 Gew.-% [78]. Dabei zeigte sich, dass die Dichte der Prüfkörper mit steigendem PLLA-Gehalt anstieg [78]. Parallel zur Prüfkörperdichte stiegen die Druckfestigkeit und der E-Modul. Eine konträre Abhängigkeit ergaben die Studien von Lin et al. [104]. Sie synthetisierten Verbundwerkstoffe aus PDLLA und β-TCP. Unter anderem stellten sie PDLLA/TCP-Verhältnisse von 60/40, 50/50 und 40/60 (Gew.-%) ein, die auch im Rahmen dieser Arbeit von Wichtigkeit sind. Die Biege- und die Druckfestigkeiten sowie der E-Modul stiegen mit steigendem Keramik-Anteil an [104]. Abgesehen von den Varianten der Polylactide bzw. der Calciumphosphate unterschieden sich die beiden Studien im Herstellungsverfahren der Verbundwerkstoffe. Ignjatovic et al. lösten zunächst das Polymer und versetzten es dann mit den Keramikpartikeln [78]. Lin et al. dagegen schmolzen das Polymer auf und brachten die Keramikpartikel in die Schmelze ein [104]. Der Vergleich von reinem PDLLA und einem Verbundwerkstoff aus 75,9 Mol-% Tricalciumphosphat und 24,1 Mol-% PDLLA zeigte Biegefestigkeiten von ca. 100 und 90 MPa [72]. Der Vergleich der Biegefestigkeiten von PLLA und einem Verbundwerkstoff aus 80 Gew.-% PLLA und 20 Gew.-% β-TCP zeigten vergleichbare Werte von 151 bzw. 153 MPa [179]. Anteile von 5, 9,5 und 14 Gew.-% β-TCP in PLLA resultierten in Biegefestigkeiten von 90 MPa (5 und 9,5 Gew.-%) und 80 MPa (14 Gew.-%) [92].

In Kapitel 2.3 wird genauer auf die Degradation Polylactid-basierter Knochenersatzwerkstoffe eingegangen. Insbesondere die Pufferwirkung verschiedener Füllstoffe und die autokatalytische Wirkung durch den aciden Abbau stehen im Vordergrund. In diesem Kapitel werden zudem auch verschiedene *In-Vivo*-Untersuchungen aufgezeigt.

2.2.3 Strontium im Einsatz bei Knochenersatzwerkstoffen

Strontium wird in Form von Strontiumranelat zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt (vgl. 2.1.3). Um die positive Wirkung von Strontium nicht nur bei der systemischen Knochenstärkung, sondern auch bei lokalen Knochendefekten zu nutzen, befassen sich verschiedene Studien mit der Integration von Strontium in Knochenersatzwerkstoffe. Strontium hemmt die Osteoklastogenese, indem es OPG hochreguliert und RANKL herunterreguliert [69]. Gleichzeitig kann es an den Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR) binden und so diesen Signalweg steuern [69], [111]. Die Inkubation von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) in einem Strontiumchlorid-haltigen Medium führte zur Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten [176]. Dies wurde anhand der ALP-Aktivität untersucht, wobei im SrCl₂-Medium 40 % ALP-positive Zellen und auf den Kontrollen nur 2 % ALP-positive Zellen nachgewiesen werden konnten [176]. In einem In-Vivo-Versuch an Ratten löste Strontium-Hydroxylapatit eine zwölffach stärkere Knochenneubildung aus als die Kontrolle [176]. Durch Menge und Freisetzungsdosis kann der Knochenaufbau gezielt gesteuert werden. Hao et al. untersuchten den Einfluss der Konzentration von Strontium-dotiertem Hydroxylapatit (Sr-HA) in einer 5 %igen Gelatine-Lösung [70]. Es zeigte sich, dass die Knochenneubildung bei einer Konzentration von 20 mg/ml größer war als bei 10 mg/ml, was sich auch in der ALP-Expression widerspiegelte [70].

Aufgrund der Strukturähnlichkeit zum natürlichen Knochen liegt der Schwerpunkt aktueller Forschungen auf Strontium-substituierten Calciumphosphaten. In Calciumphosphaten führt der Einbau von Strontium anstelle des Calciums aufgrund des Größenunterschiedes der Ionen zu einer Verzerrung der Kristallstruktur, die sich im Beugungsdiagramm durch eine Verschiebung der Maxima zu kleineren Winkeln zeigt [102]. Dieser Einfluss ist bei Hydroxylapatit deutlich größer als bei β -TCP. Dies zeigt sich darin, dass 18 Gew.-% (\triangleq 9,1 Mol-%) Strontium bereits einen Einfluss auf die Hydroxylapatit-Struktur haben (Abb. 10) [2], während sich bei β -TCP erst ab 50 Mol-% (\triangleq 68,8 Gew.-%) eine Veränderung in der Struktur zeigt [19]. In Hydroxylapatit führt die Verzerrung ab 18 Gew.-% Strontium zu einer Destabilisierung der Struktur, wodurch sich als zweite Phase β -TCP ausbildet [2], [103].



Abb. 10: Röntgenbeugungsdiagramme Strontium-substituierter Hydroxylapatit-Pulver mit verschiedenen Strontium-Anteilen (5, 10, 18, 26 und 34 Gew.-%) und Hydroxylapatit-Referenz (vgl. [2]). (Teile der vorgelegten Promotionsschrift wurden vorab in einer Originalarbeite [2] veröffentlicht.)

Die Aufbereitung Strontium-haltiger Calciumphosphate erfolgt über die Reaktion einer Mischung aus Calcium- und Strontiumcarbonat mit Phosphorsäure [2]. Das Verhältnis von Calcium zu Strontium kann durch das Verhältnis von Calciumcarbonat zu Strontiumcarbonat gezielt eingestellt werden. Die Reaktionsgleichungen für die Herstellung von Strontium-dotiertem Hydroxylapatit (Gl. 1) bzw. β -Tricalciumphosphat (Gl. 2) lauten wie folgt:

$$5 (CaCO_3 + SrCO_3) + 3 H_3PO_4 = Ca_5(PO_4)_3OH + 5 CO_2 + 4 H_2O$$
(GI. 1)

$$3 (CaCO_3 + SrCO_3) + 2 H_3PO_4 = Ca_3(PO_4)_2 + 3 CO_2 + 3 H_2O$$
(GI. 2)

2.3 Degradation und Resorption von Biowerkstoffen

Aufgrund zahlreicher, teils widersprüchlicher Definitionen werden die folgenden Begriffe nach der Festlegung durch die *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) aus dem Jahre 2012 eingeführt [167]:

- (Bio-)Degradation,
- Erosion,
- (Bio-)Resorption und
- Hydrolyse.

Im Allgemeinen versteht man nach IUPAC unter dem Begriff der "Degradation" die fortschreitende Abnahme der Eigenschaften und Merkmale eines Werkstoffs oder Implantats. Diese kann hydrolytisch, optisch durch Licht, oxidativ, thermisch oder chemisch erfolgen [167, Pkt. 50]. Bei Polymeren bezeichnet der Begriff der Degradation die Spaltung der Makromoleküle und die daraus resultierende Reduktion der molaren Masse [167, Pkt. 51]. Prinzipiell werden zwei Degradationsmechanismen unterschieden: Volumendegradation ("bulk degradation") und Oberflächendegradation ("Erosion") [167, Pkt 38, 70]. Bei letzterer beginnt der Abbau an der Oberfläche und ist zum Probenzentrum gerichtet [74, S. 47], [82, S. 295]. Die äußere Form des Prüfkörpers ändert sich stetig mit fortschreitender Degradation. Bei Makromolekülen können erosive Effekte verstärkt werden, indem z. B. Enzyme durch das Eindiffundieren von Flüssigkeiten in die Polymermatrix in das Material aufgenommen werden [167, Pkt. 70]. Dadurch kann bei Makromolekülen auch im Probeninneren Erosion stattfinden. Bei der Volumendegradation findet der Materialabbau im gesamten Volumen statt. Meist wird der Begriff der Volumendegradation jedoch verwendet, wenn die Degradation im Inneren schneller vonstattengeht als an der Oberfläche. So beginnt die Degradation im Probenzentrum und verläuft dann in Richtung der Oberfläche, bis diese aufbricht. Das bedeutet, dass die äußere Probenform lange erhalten bleibt, auch wenn die Degradation im Inneren schon weit fortgeschritten ist. Da die Degradationsprodukte somit vorerst in der Probe verbleiben, spielen autokatalytische Reaktionen eine entscheidende Rolle. Als Autokatalyse bezeichnet man eine chemische Reaktion, die durch Reaktions- oder Zwischenprodukte beschleunigt wird [167, Pkt 8]. Bei Polylactiden entsteht Milchsäure als Degradationsprodukt, die den Polymerabbau katalysiert [34], [104]. Im speziellen Fall der Degradation von Polylactiden definierte Ruffieux die folgenden Einflussfaktoren [144, S. 13f.]:

 Geometrie: Je größer ein Bauteil ist, desto stärker ist der Einfluss der Autokatalyse. Bei dünnen Bauteilen dagegen überwiegt der Einfluss der Erosion.

- Prüfkörperdichte: Je geringer die Prüfkörperdichte ist, desto größer ist das freie Volumen und die Degradation wird beschleunigt.
- Kristallisationsgrad: Dieser Einflussfaktor spielt in erster Linie in teilkristallinen Polylactiden eine Rolle. Da die amorphen Bereiche ein größeres freies Volumen haben als die kristallinen Bereiche, degradieren die amorphen Bereiche zuerst (durch Erosion), da das Eindiffundieren von Wasser in diese Bereiche erleichtert wird. Dadurch steigt während des Degradationsprozesses das Verhältnis von kristallinem zu amorphem Anteil.
- Temperatur: Die Degradation wird durch eine erhöhte Temperatur beschleunigt.

Die folgende Grafik gibt einen Überblick über die Möglichkeiten des Abbaus von Werkstoffen bzw. Prüfkörpern:



Abb. 11: Für den Materialabbau relevante Prozesse.

<u>Resorption</u> ist eine der am häufigsten unterschiedlich verwendeten Begriffe. Die Definition nach IUPAC bezeichnet mit diesem Begriff die Eliminierung einer Substanz aus ihrem Verbund aufgrund physikalischer und/oder chemischer Prozesse [167, Pkt. 93]. Das schließt jedoch die Lösung in einer Flüssigkeit aus. Bei der <u>Lösung</u> lösen sich kontinuierlich Bestandteile aus dem Materialverbund und werden in das umgebene Medium abgegeben [167, Pkt. 66]. Nicht zu vernachlässigen sind zudem hydrolytische Reaktionen. <u>Hydrolyse</u> kann dann erfolgen, wenn das Material in Kontakt mit wasserhaltigen Substanzen gelangt [167, Pkt. 76]. Unter Hydrolyse versteht man die chemische Spaltung einer Verbindung unter der Anlagerung eines Wassermoleküls [118, S. 309]. Bei einem Polymer kann es zudem bei der Lagerung in Flüssigkeit zu einer Matrixquellung kommen, wenn die Flüssigkeit in das Material aufgenommen wird [167, Pkt. 99].

Bei In-Vivo-Anwendungen (z. B. Implantate) spielen biologische Prozesse eine zusätzliche Rolle. Zum einen wird der Implantatabbau durch physiologische Bedingungen (z. B. Ort der Implantation, Körpertemperatur) und zum anderen durch zelluläre Prozesse beeinflusst. Der Begriff "Biodegradation" bezeichnet die Eigenschaft eines Stoffes durch biologische Aktivität abgebaut werden zu können [167, Pkt 19]. Die Biodegradation erfolgt durch Enzyme, Zellen oder andere Organismen [167, Pkt. 51]. In Bezug auf Polymere bzw. Makromolekülen ist die Biodegradation neben zellbedingtem Abbau zudem als die Verringerung der molekularen Masse definiert [167, Pkt 21, 23], die durch die Kettenspaltung der Makromoleküle verursacht wird [167, Pkt 48]. Unter Bioerosion versteht man die Degradation an der Oberfläche, die durch zelluläre Aktivität erfolgt [167, Pkt. 25]. Dabei ändert sich die molare Masse des Grundmaterials nicht [167, Pkt. 25]. Im Fall der <u>Bioresorption</u> spricht man von der Fähigkeit des Körpers (Tier oder Mensch) Material über natürliche Signalwege (z. B. Metabolismus und Ausscheidung) abzubauen [167, Pkt. 109+110]. Enzymatische Reaktionen werden diesbezüglich nicht als biologische Aktivität angesehen [167, Pkt. 19]. Unter einer enzymatischen Degradation versteht man stattdessen die Degradation aufgrund katalytischer Aktivität von Enzymen [167, Pkt. 68].

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit Prüfkörper und Implantate aus biodegradierbaren Polylactid-basierten Werkstoffen untersucht werden, wird in den folgenden Abschnitten genauer auf das Abbauverhalten von Polylactiden und Polylactid-basierten Verbundwerkstoffen eingegangen. Bei Polylactiden beginnt die Degradation im Inneren und schreitet zur Oberfläche hin fort (*bulk degradation*) [10, S. 363]. Durch das Eindiffundieren von Flüssigkeit erfolgt die Degradation im Inneren der Implantate überwiegend durch hydrolytische Prozesse [33]. Diese werden durch das degradationsbedingte saure Milieu im Inneren katalysiert. Unter physiologischen Bedingungen degradieren Polylactide daher überwiegend hydrolytisch (Abb. 12). Die Hydrolyse erfolgt überwiegend in den amorphen Bereichen, da dort das freie Volumen größer ist als in kristallinen Bereichen [97]. So kann in den amorphen Bereichen entsprechend mehr Flüssigkeit eingelagert werden [97].



Abb. 12: Hydrolytische Kettenspaltung von Polylactid. Die Esterbindung (-COO) wird unter Verbrauch eines Wassermoleküls aufgespalten [8], nach [137, S. 698].

Bei der Hydrolyse verringert sich nicht die Masse, sondern nur das Molekulargewicht [33]. Sind die Molekülketten klein genug, können sie aus der Polymermatrix herausdiffundieren [33]. In der Regel verliert die Randfläche an Stabilität und bricht auf, bevor die Degradationsprodukte gänzlich aus dem Werkstoff herausdiffundiert sind [100]. Durch das plötzliche Aufbrechen der Randschicht gelangen die gelartigen Degradationsprodukte in das Körpermilieu. Da Polylactide durch die Bildung von Milchsäure einen aciden Abbau aufweisen, können dadurch die Einheilung verzögert und Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen hervorgerufen werden. Sind die freiwerdenden Säuremengen gering, kann der Körper den pH-Wert selbstständig neutralisieren. Bei zu großen Mengen sind jedoch zusätzliche Pufferkomponenten nötig, um das Entzündungsrisiko zu mindern [3], [92]. Problematisch bei dem Abbau von Polylactid ist besonders der plötzliche pH-Wert-Abfall, der durch die Freisetzung der Degradationsprodukte nach dem Aufbrechen des Randbereiches verursacht wird. Dadurch hat der Körper keine Gelegenheit sich allmählich an die neue Umgebung anzupassen, sondern muss schnell reagieren.

Um die Säurebildung direkt zu neutralisieren, bevor die äußere Schale aufbricht und Degradationsprodukte in das Körpermilieu gelangen, die wurden bereits verschiedene Studien zur Einbringung einer Pufferkomponente in die Polylactid-Matrix durchgeführt [9], [11], [72], [73], [146], [155]. Dabei zeigte sich, dass Füllstoffe die Matrix so verändern, dass es keine klassische bulk degradation mehr gibt. Die Untersuchungen eines Verbundwerkstoffes aus PLLA und Hydroxylapatit zeigten, dass hergestellten Prüfkörper homogen degradierten die und es kein Degradationszentrum gab [155]. Auch in einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Füllstoffe die Polymerdegradation beeinflussen können [72]. Das reine Polymer degradierte, indem sich im Inneren ein gelartiger Degradationskern bildete (nach 24 Wochen), während die Verbundwerkstoffe PDLLA/β-TCP (24,1 Gew.-%/75,9 Gew.-%) und PDLLA/Calciumhydrogenphosphat (CHP) (95,4 Gew.-%/4,6 Gew.-%) im gesamten Volumen gelartig wurden (nach 72 Wochen) [72].

<u>24</u>

Ara et al. untersuchten die Pufferkapazitäten verschiedener Calcium-haltiger Füllstoffe in Polylactid-co-Glycolid (PLGA) (30 Gew.-% Füllstoff, 70 Gew.-% PLGA) [9]. Es zeigte sich, dass die Degradationsrate des Verbundwerkstoffes mit steigendem pH-Wert sank und die Degradationsrate bei Calciumcarbonat durch die stärkste Pufferung geringster war als bei Calciumphosphaten. Calciumcarbonat zeigte zwar die beste Pufferfähigkeit, jedoch ist die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen von Ratten auf Calciumcarbonat schlechter als auf Calciumphosphaten [71]. Bei der Untersuchung der osteogenen Marker konnte kein eindeutiger Einfluss nachgewiesen werden, da die Zellen OPN am stärksten auf Calciumcarbonat exprimierten, COL I und Runx2 aber am stärksten auf β-TCP [71]. Schiller et al. untersuchten die Pufferfähigkeit verschiedener carbonhaltiger amorpher Calciumphosphate in Milchsäure [146]. Dazu stellten sie verschiedene Verhältnisse von Calciumcarbonat zu Calciumphosphat ein (12, 29 und 35 Gew.-%), um den Mengeneinfluss zu untersuchen. 12 Gew.-% Carbonat zeigten keine Pufferwirkung, während 29 und 35 Gew.-% in einem ähnlichen Bereich um 5 mmol/g lagen (Abb. 13). Der direkte Vergleich von Hydroxylapatit (HA) und reinem Calciumcarbonat zeigte, dass HA nur sehr geringe Mengen Milchsäure puffern kann, wohingegen 1 g Calciumcarbonat bis zu 20 mmol Milchsäure neutralisieren kann (Abb. 13) [146]. Degradiert 1 g PDLLA vollständig, entstehen dabei 13,9 mmol Milchsäure [147]. Daraus ergibt sich, dass 0,695 g Calciumcarbonat nötig sind, um 1 g PDLLA zu puffern (Berechnungen basierend auf [147]). Übertragen auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete PDLLA müsste ein Verhältnis von 59 Gew.-% Polymer und 41 Gew.-% Calciumcarbonat eingestellt werden. Dabei sind allerdings nicht die Einflüsse durch das Körpermilieu (z. B. Pufferfähigkeit der Körperflüssigkeit, zelluläre Aktivität) berücksichtigt.



Abb. 13: Abhängigkeit des pH-Wertes verschiedener Calciumphosphate bzw. Calciumcarbonat in wässriger Milchsäure-Lösung vom Verhältnis Milchsäure zu keramischem Feststoffanteil (mmol Milchsäure pro g Feststoff). Alle Angaben beziehen sich auf Gewichtsprozent. ACP: amorphes Calciumphosphat. [146]

Schiller et al. fanden heraus, dass nicht die Menge des puffernden Füllers, sondern dessen chemische Zusammensetzung entscheidend ist [146]. Es wurden verschiedene Verbundwerkstoffe aus PDLLA und carbonathaltigem Calciumphosphat (CaP+CC) hergestellt, die sich zum einen in ihrem Verhältnis von Polymer zu Keramik unterschieden und zum anderen in dem Calciumcarbonat-Anteil im Calciumphosphat (12 bzw. 35 Gew.-%) [146]. Die Untersuchungen ergaben, dass bei einem Werkstoff aus 75 Gew.-% PDLLA, 16,25 Gew.-% Calciumphosphat und 8.75 Gew.-% Calciumcarbonat eine ausreichende Pufferung erzielt werden konnte. während bei einem Werkstoff aus 50 Gew.-% PDLLA, 44 Gew.-% Calciumphosphat und 6 Gew.-% Calciumcarbonat der pH-Wert schnell abfiel (Berechnungen basierend auf [146]). In beiden Werkstoffvarianten war das Verhältnis von Calciumcarbonat zu PDLLA 0,12 (Berechnungen basierend auf [146]), so dass eine ähnliche pH-Wertentwicklung zu erwarten gewesen wäre.

Ein kritischer Aspekt bei Polymer-basierten Werkstoffen ist die Matrixquellung bei Lagerung in Flüssigkeit, die durch Aufnahme der Flüssigkeit in die Matrix verursacht wird. Cuhlmann beobachtete eine volumetrische Vergrößerung von bis zu 26 Vol.-% durch die Lagerung in Zellkulturmedium [33]. Er verglich das reine Polymer aus PLA-PGA mit dem Polymer, in das 20 Gew.-% Calciumcarbonat integriert war [33]. Dabei zeigten beide Werkstoffe ein ähnliches Ausmaß der Matrixquellung. Insbesondere bei der Verwendung solcher Verbundwerkstoffe für die Herstellung maßgeschneiderter Implantate ist das Quellverhalten sehr kritisch. Zum einen verlieren die Strukturen auf diese Weise ihre ursprüngliche Geometrie, zum anderen kann umliegendes Gewebe durch eine Volumenvergrößerung geschädigt werden.

In Bezug auf Polylactide wurden bereits zahlreiche In-Vivo-Untersuchungen durchgeführt. Mainil-Varlet et al. untersuchten das Verhalten verschiedener Polylactid-Varianten (PLLA, P(L/D)LA 95/5 % und P(L/DL)LA 95/5 %), die in Form von Stiften subkutan in Schafe implantiert wurden [110]. Um das Implantat herum bildete sich eine fibröse Grenzschicht. Zudem konnten Fresszellen nachgewiesen werden, wobei die Zellreaktion in den ersten 6 Monaten aber am größten war [110]. Die Reaktion war bei PLDLA am stärksten, was dazu führte, dass auch die Degradation am weitesten fortgeschritten war. Ein Jahr nach der Implantation war keines der Polymere vollständig degradiert. Zu Beginn wiesen alle Polymere eine Biegefestigkeit von ca. 150 MPa auf. Nach 20 Wochen zeigte PLLA noch eine Biegefestigkeit von 100 MPa, wohingegen die anderen beiden Varianten nur noch Werte von 20 und 10 MPa aufwiesen. Nach 50 Wochen wies PLLA immerhin noch eine Festigkeit von 50 MPa auf, während PLDLLA noch 10 MPa aufwies und PLDLA mit 0 MPa keine mechanische Beanspruchbarkeit mehr besaß [110]. Die Integration von β -Tricalciumphosphat in eine PLLA-Matrix (80 Gew.-% PLLA, 20 Gew.-% β -TCP) induzierte nach 24 Wochen eine signifikant höhere Knochenbildung als in der Kontrolle, wobei die Knochenbildung bei reinem PLLA sogar gänzlich ausblieb [179]. Keines der Implantate war zu diesem Zeitpunkt vollständig abgebaut. Die Biegefestigkeiten des Verbundwerkstoffes und des reinen PLLAs waren zu Beginn

ähnlich (ca. 150 MPa). 24 Wochen nach der Implantation fielen die Werte ab auf 83 MPa (β-TCP/PLLA) und 56 MPa (PLLA) [179]. Die Implantation von Werkstoffen aus Poly(96L/4D-Lactid) und β-TCP in Kaninchen zeigt nach 76 Wochen weder Entzündungs- noch Abstoßungsreaktionen [34]. Beim reinen Polymer blieb der Kontakt zwischen Knochen und Implantat aus. Nur bei den Verbundwerkstoffen (10 und 24 Gew.-% β-TCP) konnte ein Knocheneinwachsen und eine Mineralisation nachgewiesen werden, die bei dem höheren Anteil an β-TCP am stärksten waren [34]. Der Vergleich der Abbauraten zeigte für das reine Polymer und das Polymer im Verbundwerkstoff ähnliche Werte, wobei die Degradation in vivo schneller verlief als in vitro [34]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Zhu et al., indem sie nachwiesen, dass sich 24 Wochen nach der Implantation von PLLA kein neuer Knochen unmittelbar um das Implantat gebildet hatte, während bei einem Füllstoffanteil von 20 Gew.-% β-TCP neugebildeter Knochen nachgewiesen werden konnte [179]. Die Untersuchungen von Renno et al. zeigten dagegen eine deutlich stärkere Knochenneubildung bei Verbundwerkstoffen aus Calciumphosphat (85 Gew.-% a-TCP, 10 Gew.-% Dicalciumphosphatanhydrat, 5 Gew.-% Hydroxylapatit) und Poly-(D,L-lactide-co-glycolid) (PLGA) im Vergleich zu reinem Calciumphosphat [140].

2.4 Generative Fertigung zur Implantatherstellung

Das Prinzip der generativen Fertigung beruht darauf, dass ein Bauteil schichtweise zu einer dreidimensionalen Struktur aufgebaut wird [57, S. 4]. Eine Möglichkeit ist, eine Schmelze oder Suspension tropfenweise aufeinander zu platzieren [93, S. 79]. Das Auflösungsvermögen ist dabei unter anderem abhängig von der Tropfengröße, die wiederum abhängig von den Fließeigenschaften und der Viskosität der Flüssigkeit ist. Eine andere Möglichkeit ist, das Bauteil aus einem Pulverbett heraus lagenweise aufzubauen [142, S. 97]. Nach Auftragen einer Pulverschicht wird die spätere Probengeometrie mit Hilfe eines Binders oder durch Aufschmelzen fixiert [57, S. 47, 74]. Die Verwendung eines Lasers zum Aufschmelzen des Pulvers bietet die Möglichkeit sehr feine Geometrien zu erstellen. Der Laserschmelzprozess (selective laser melting = SLM) benötigt eine schmelzfähige Komponente, z. B. Polylactid. Der SLM-Prozess kann durch Variation diverser Parameter (z. B. Leistung, Belichtungszeit) gezielt auf einzelne Materialien angepasst werden. Zudem können durch die eingestellte Leistung auch die Dicke der Schmelzschicht und die Überlagerung dieser Schmelzschichten definiert werden. Die Herstellung von Implantaten mittels SLM-Prozess bietet die Möglichkeit maßgeschneiderte, patientenspezifische Geometrien herzustellen [57, S. 7], [174, S. 143]. Da keine zerspanende Nachbearbeitung nötig ist, können 3D-Strukturen im Prinzip direkt eingesetzt werden. Die Implantate müssen lediglich von Pulverresten befreit werden. Die Einbringung einer interkonnektierenden Porenstruktur ist zum Beispiel durch Spritzguss oder abrasive Prozesse nur sehr begrenzt möglich und erlaubt keine definierte Porengröße im Mikrometer-Bereich [50, S. 12]. Neben der Geometriefreiheit und Maßhaltigkeit ist beim additiven Aufbau ein großer Vorteil, dass es keinen
Materialverschnitt gibt [50, S. 11]. Dies spielt in der Implantologie eine wichtige Rolle, da aufgrund von Werkstoffreinheit und Zulassungsprüfungen häufig teure Werkstoffe verwendet werden müssen.

Die Bauteilgeometrien werden mit Hilfe eines Computerprogramms erstellt und in CAD-Dateien konvertiert. CT-Datensätze der Patienten dienen in der Regel als Rohdaten. Die Geometrien werden mit Hilfe des Programms in definierte Schichten unterteilt. Die Schichtdicke kann in Abhängigkeit der Bauteilanforderungen variiert werden. Wichtig bei der Pulverbett-basierten generativen Fertigung ist eine offenporöse Struktur, damit beim 3D-Aufbau nicht gebundenes Restpulver wieder aus dem Bauteil entfernt werden kann. Basierend auf der erstellten Datei wird dann das Bauteil in einer entsprechenden Anlage gefertigt. Da im Rahmen dieser Arbeit auch Prüfkörper mittels SLM-Prozess erstellt wurden, wird im Folgenden kurz das Prinzip des SLM-Prozesses erläutert (Abb. 14). Über eine Walze wird das Pulver aus dem Pulverreservoir auf die Bearbeitungsfläche aufgetragen. Das Pulverreservoir wird mit Hilfe einer Hubautomatik verfahren. Nach Auftragen der Pulverschicht rastert der Laser das Pulverbett ab und schmilzt die Stellen auf, an denen die spätere Struktur entsteht. Nach Vollendung einer Schicht wird das Pulverbett automatisch abgesenkt und mit Hilfe der Walze eine neue Pulverschicht aus dem Pulverreservoir aufgetragen.



Abb. 14: Schema des Laserschmelz-Prozesses.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen beschrieben. Zunächst wird auf die Werkstoffaufbereitung und die Prüfkörperherstellung eingegangen. Daran anschließend erfolgen die Erläuterungen zu den Versuchen hinsichtlich Mechanik, Degradation und zellbiologischer Eigenschaften.

Im Rahmen der Arbeit wurde zunächst Poly-(D,L-Lactid) (Resomer R 208, Evonik Industries, Darmstadt) verwendet. Zusätzlich wurden Untersuchungen mit Poly-(L-Lactid) (Resomer L206S, Evonik Industries AG, Darmstadt) durchgeführt. Neben β-Tricalciumphosphat (Biovision GmbH, Ilmenau) wurden verschiedene Calciumcarbonat-Varianten (Schaefer Kalk GmbH & Co. KG, Diez) als Füllstoffe verwendet. Die verwendeten Varianten unterschieden sich in der Geometrie der Partikel:

- rhomboedrisch grob (rg), Charge 02061201-07 (d50 = 2,5 μm),
- rhomboedrisch fein (rf), Charge 02061201-01 (d50 = 1,0 μm),
- kugelförmig fein, Charge 02061201-08 (d50 = 1,4 μm),
- kugelförmig grob/sphärolithisch (sph), Charge 02061201-05 (d50 = 12,2 μm),
- nadelförmig (nad), Charge 02061201-04 (d50 = 0,4 μm) und
- basisch, Charge 02061201-03 (d50 = 0,8 μm).

Im Hinblick auf die biologischen Eigenschaften wurde zudem Strontiumcarbonat (Merck KDaA, Darmstadt) verwendet.

3.1 Werkstoffaufbereitung

3.1.1 Pulverherstellung

Die Verbundwerkstoffe wurden über einen Mahlprozess aufbereitet. Der Mahlprozess erfolgte mit Hilfe einer Rollenbank (Eigenbau), auf der das Mahlgut zusammen mit ZrO₂-Mahlkörpern (Tosoh, Japan) in einer Polyethylen-Flasche gelagert wurde. Es wurden verschiedene Verhältnisse aus Poly-(D,L-Lactid) (PDLLA), β-Tricalciumphosphat (β-TCP) und Calciumcarbonat (CC) eingestellt. Zudem wurden unterschiedliche Varianten von Calciumcarbonat verwendet. Durch Variation der Mahlparameter (Verhältnis Mahlgut/ Mahlkörper, Zusammensetzung der Mahlkörper, Trommelvolumen, Mahlgeschwindigkeit, Mahldauer) konnte die Partikelgröße verschiedener Verbundwerkstoffe gezielt eingestellt werden. Aufgrund der Vielzahl an Mahlparametern wurde die Pulverfeinheit jedoch ausschließlich durch Festlegung der Mahldauer eingestellt. Die übrigen Mahlparameter wurden konstant gehalten (Tab. 4). Um die Pulver mit einem Sieb mit einer Maschenweite von 100 µm abzusieben, mussten die Werkstoffe basierend auf 40-60 Gew.-% PDLLA 4 Wochen aufgemahlen werden. Bei einem Polymeranteil von 70-95 Gew.-% verlängerte sich die Mahldauer um eine Woche. Die folgenden Parameter konnten für den Aufbereitungsprozess definiert werden. Entsprechende Anpassung des Mahlgutes und der Kugelmassen erfolgte für ein Trommelvolumen von 1000, 500, 250 und 50 ml.

Tab. 4: Parameter des Mahlprozesses zur Aufbereitung der Werkstoffe mit vergleichbarer Partikelgröße.

Mahlgut-	Mahlkörperzusammensetzung			Trommel-	Zusammen-	Mahl-
masse	Kug	geldurchmes	ser	volumen	setzung	dauer
(a)	1 mm	10 mm	20 mm (ml)		PDLLA/TCP/CC	(Tago)
(9)			20 11111	(1111)	(Gew%)	(Tage)
					60/20/20	
					60/40/0	
	875	1000	500	2000	60/0/40	28
200					50/25/25	
					40/30/30	
					80/20	25
					70/30	

Da sich gezeigt hatte, dass ein Abrieb der Polyethylen-Flasche während des Mahlprozesses nicht verhindert werden konnte, wurden die Gefäße von innen mit einer Polyurethan-Gießmasse (GM 984-2, Ebalta Kunststoff, Rothenburg ob der Tauber) beschichtet.

3.1.1.1 Einfluss des Polymergehalts

Um den optimalen Gehalt an Polymer im Werkstoff festzulegen, wurde der Anteil von 40 bis 60 Gew.-% variiert (Tab. 5). Ziel war dabei, den Polymeranteil so gering wie möglich zu halten, um die knochenähnliche Struktur durch die höheren Keramikanteile nachzuahmen. Auf der anderen Seite musste der Polymeranteil so hoch sein, dass die Implantate eine ausreichend hohe Stabilität aufwiesen, da das Polymer als stabilisierendes Adhäsiv wirkte. Die Anteile an β -TCP und Calciumcarbonat (rhomboedrisch fein) wurden für diese Untersuchungen zunächst in einem Verhältnis 1:1 verwendet. Die Zielgrößen der weiterführenden Untersuchungen waren neben der Probenstabilität die mechanischen und biologischen Materialeigenschaften.

Werkstoffkennzeichnung	Werkstoffzusammensetzung			
40D/20T/20CC+f	40 Gew% PDLLA			
407/301/30001	30 Gew% β-TCP 30 Gew% CCrf			
	50 Gew% PDLLA			
50P/25T/25CCrf	25 Gew% β-TCP			
	25 Gew% CCrf			
	60 Gew% PDLLA			
60P/20T/20CCrf	20 Gew% β-TCP			
	20 Gew% CCrf			

Tab. 5: Übersicht über die Werkstoffe mit Variation des Polymer-Gehaltes.

3.1.1.2 Einfluss der Struktur der Calciumcarbonatpartikel

Eingangs wurde stets eine Calciumcarbonat-Variante mit einer rhomboedrisch feinen Partikelgeometrie (d90 = 0,5 μ m) verwendet. Um den Einfluss der Partikelgeometrie auf die Pufferfähigkeit zu untersuchen, wurden Werkstoffe mit verschiedenen CC-Varianten aufbereitet (Tab. 6). Für diese Untersuchung wurden die Werkstoffe nicht über den herkömmlichen Mahlprozess hergestellt, sondern 7 Tage ohne Mahlkörper zur Vermischung auf der Rollenbank gelagert. Es wurde jeweils ein Verhältnis aus 80 Gew.-% PDLLA und 20 Gew.-% CC eingestellt. Auf β -TCP wurde verzichtet, um ausschließlich durch das Calciumcarbonat eine Pufferwirkung zu erzielen. Das verwendete PDLLA wurde vor der Verwendung im Werkstoff vorbehandelt, indem 70 g zusammen mit 258 g 20 mm-Mahlkugeln, 496 g 10 mm-Mahlkugel und 439 g 1 mm-Mahlkugeln 7 Tage auf der Rollenbank gelagert wurden.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Calciumcarbonat-Varianten (Angaben und Bilder von Schaefer Kalk GmbH & Co. KG).

Calciumcarbonat- Variante	Partikeldurchmesser (d50)	Geometrie der Partikel (Aufnahmen von Schaefer Kalk)
rhomboedrisch fein	1,0 µm	
rhomboedrisch grob	2,5 µm	
nadelförmig	0,4 µm	

kugelförmig	1,4 µm	
sphärolithisch (große Kugeln)	12,2 µm	
basisch	0,8 µm	

Zudem wurden basierend auf einer Zusammensetzung von 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% CC Werkstoffe mit vier verschiedenen CC-Varianten über den herkömmlichen Mahlprozess aufbereitet (Tab. 7).

Tab. 7: Aufbereitete Verbundwerkstoffe mit unterschiedlichen Calciumcarbonat-Varianten bei gleicher Zusammensetzung.

Werkstoffkennzeichnung	Zusammensetzung	Calciumcarbonat-Variante
60/20/20rf		rhomboedrisch fein
60/20/20rg	60 Gew% PDLLA	rhomboedrisch grob
60/20/20nad	20 Gew% p-TCP 20 Gew% CC	nadelförmig
60/20/20sph		sphärolithisch

3.1.1.3 Einfluss der Anteile der keramischen Komponenten

Bei der Festlegung der Anteile der keramischen Komponenten musste ein Kompromiss zwischen Pufferfähigkeit (CaCO₃ \uparrow , β -TCP \downarrow) und knochenähnlicher Eigenschaften (β -TCP \uparrow , CaCO₃ \downarrow) eingegangen werden. So wurde die Anteile

jeweils von 0 bis 40 Gew.-% variiert (Tab. 8). Gleichzeitig wurde zudem der Einfluss des Keramik-Verhältnisses bei unterschiedlichen CC-Varianten untersucht (Tab. 8).

Werkstoffkennzeichnung		Anteil PDLLA (Gew%)	Anteil β-TCP (Gew%)	Anteil Calciumcarbonat (Gew%) (CC-Variante)	
60/40TCP	Г			40	-
60/35/5rf				35	5 (rhomb. fein)
60/35/5rg		eigt		35	5 (rhomb. grob)
60/27,5/12,5rf				27,5	12,5 (rhomb. fein)
60/27,5/12,5rg		eil st	60	27,5	12,5 (rhomb. grob)
60/25/15sp		Ante		25	15 (sphärolithisch)
60/20/20rf		С С		20	20 (rhomb. fein)
60/20/20rg				20	20 (rhomb. grob)
60/20/20nad				20	20 (rhomb. nadelig)
60/40CCrf	1	7		-	40 (rhomb. fein)

Tab.	8:	Variation	der	Anteile	der l	keramis	chen	Komponen	ten.

3.1.1.4 Materialoptimierung für die Anwendung im Laserschmelzprozess

Da sich gezeigt hatte, dass ein PDLLA-Anteil von 60 Gew.-% ein guter Kompromiss für die Anwendung im Laserschmelzprozess ist, wurde dieser Anteil für die weiteren Untersuchungen festgelegt. Da jedoch Calciumcarbonat im SLM-Prozess zu einer starken degradationsbedingten Verfärbung der Prüfkörper führte, wurde in weiteren Testreihen deren Ursache erforscht. Da diese Verfärbung bei den Werkstoffen aus PDLLA und β-TCP bei den untersuchten Laserleistungen bzw. Energiedichten gänzlich vermieden werden konnten, wurde zunächst ein Werkstoff aus PDLLA und (80/20 Gew.-%) mit dem herkömmlichen Mahlprozess hergestellt. β-TCP Anschließend wurde mit Hilfe eines Speedmixers (SpeedMixer DAC 150.1 FVZ, Hausschild, Hamm) Calciumcarbonat (rhomboedrisch fein) eingebracht. So konnte sichergestellt werden, dass sich die Partikelgeometrie des Calciumcarbonats nicht veränderte. Dazu wurde 10 g des Ausgangswerkstoffes (PDLLA/TCP) mit 2 g CC vermengt, wobei ein Verhältnis von 66 Gew.-% PDLLA, 17 Gew.-% β-TCP und 17 Gew.-% CC eingestellt wurde. Diese Mischung wurde dann zweimal jeweils 20 sec und anschließend zehnmal 10 sec bei 2500 U/min im Speedmixer homogenisiert. Die Zeiten mussten so kurz wie möglich gehalten werden, da das Pulver bei geringer Erwärmung bereits aufquoll und die Homogenisierung erschwerte. Auf diese Weise wurden zwei Werkstoffe hergestellt, die sich in der Calciumcarbonat-Variante (rhomboedrisch fein bzw. spärolithisch) unterschieden, um den Einfluss der Partikelgeometrie auf die Polymerdegradation zu ergründen.

3.1.1.5 Zugabe von Strontium-haltigen Komponenten

Aufgrund der nachweislich positiven Einflüsse von Strontium auf den Knochenaufbau wurden zudem Strontium-haltige Verbindungen in den Verbundwerkstoff integriert. wurden Strontiumcarbonat (SC) und Strontium-substituiertes Dazu β-Tricalciumphosphat (Sr13TCP) verwendet (Tab. 9). Die Synthese von Strontiumsubstituierten Calciumphosphaten wurde in der Arbeitsgruppe bereits etabliert [2]. Dazu wurde ein nasschemischer Herstellungsprozess entwickelt, der die exakte Einstellung des Calcium/Phosphat-Verhältnisses sowie des Calcium/Strontium-Verhältnisses ermöglicht [2]. In dem hier verwendeten Werkstoff waren 13 % der Calcium-Plätze durch Strontium ersetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Tabelle 10 die Anteile an Strontium (in Gew.-%) in den Werkstoffen angegeben. Die Anteile an Strontium in dem vier- und zweikomponentigen Werkstoff sind etwa gleich, während der Anteil in dem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat etwa doppelt so hoch war (Tab. 10).

Werkstoffkennzeichnung	Werkstoffzusammensetzung		
	60 Gew% PDLLA		
60P/20T/20SC	20 Gew% β-TCP		
	20 Gew% SC		
	60 Gew% PDLLA		
60D/20T/10CC/10SC	20 Gew% β-TCP		
00F/201/10CC/10SC	10 Gew% CC		
	10 Gew% SC		
60D/405-12TCD	60 Gew% PDLLA		
00F/405131CP	40 Gew% Sr13TCP		

Tab. 9: Übersicht über die Werkstoffe mit Strontium-haltigen Verbindungen.

Tab. 10: Vergleich der Strontiumgehalte der verschiedenen Werkstoffe.

Werkstoff	Masse SrCO₃ (mg)	Masse Sr ²⁺ (mg)	Anteil Sr ²⁺ (Gew%)			
	in einer 300 mg-Probe					
60P-20T-10CC-10SC	30	17,8	5,9			
60P-20T-20SC	60	35,7	11,9			
Werkstoff	Masse Sr13TCP (mg)	Masse Sr ²⁺ (mg)	Anteil Sr ²⁺ (Gew%)			
	in einer 300 mg-Probe					
60P-40SrTCP	120	16,8	5,6			

3.1.2 Charakterisierung der Werkstoffe

Werkstoff- und Phasenreinheit

Um das Mahlgut auf einen möglichen Polyethylen-Abrieb des Behälters hin zu untersuchen, wurde eine Messung mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) am Institut für Kunststoffverarbeitung (IKV) der RWTH Aachen durchgeführt. Dabei wurde das Pulver auf 200 °C aufgeheizt. Die Änderung im Energiefluss für Polyethylen war im Bereich zwischen 100 und 110 °C zu erwarten. Die Schmelzpunkte der Einzelkomponente resultieren in einem Sprung in der Temperaturkurve. Dieser Nachweis erlaubte jedoch nur einen qualitativen Nachweis. Zusätzlich wurde die Elementzusammensetzung mittels Röntgenfluoreszenz-Analyse (RFA) (PW2405, Philips, Almelo, Niederlande) am Institut für Gesteinshüttenkunde (GHI) der RWTH Aachen bestimmt, um Kationen von möglichen Fremdstoffen zu identifizieren. Zur Sicherstellung der enthaltenen Kristallstrukturen wurde am GHI auch eine Röntgenbeugungs-Analyse (RBA) (D8 Advance, Bragg Brentano, Bruker AXS, Karlsruhe) durchgeführt. Die Verteilung der Einzelkomponenten wurde in der Elektronenmikroskopischen Einrichtung (ELMI) der Uniklinik Aachen anhand rasterelektronenmikroskopischer Messungen (Enviromental Scanning Electron Microscope XL 30 ESEM, Fei, Hilsbro, USA) analysiert. Dabei wurden die Elemente aufgrund der Unterschiede in der Ordnungszahl und der sich daraus ergebenden Unterschiede in der Rückstrahlintensität zugeordnet: je größer die Protonenzahl des Atoms, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass ein Strahl auf ein Proton trifft und daran gestreut wird. Die angelegte Spannung betrug 10 kV. Parallel wurde eine Elementanalyse mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) (TEAM EDS System for SEM, EDAX, Mahwah, USA) durchgeführt.

Partikelgröße

Zu den wichtigsten Pulvereigenschaften im Hinblick auf die spätere Verwendung der Verbundwerkstoffe im Laserschmelzprozess (SLM) gehört die Partikelgröße der Werkstoffe. Die Zielkorngröße lag bei einem d(90)-Wert von 100 µm. Da eine spätere Porengröße in den Implantaten im Bereich von 500 µm angestrebt wurde, sind nur durch eine Partikelgröße der Pulver unter 100 µm ausreichend dünne Schichten für feine Porenstrukturen realisierbar. Um dies zu überprüfen, wurden die Pulver zunächst durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 100 µm abgesiebt. Anschließend wurde die Partikelgröße am *GHI* mittels Lasergranulometrie (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, Großbritannien) bestimmt. Die Lasergranulometrie basiert auf dem Prinzip der Lichtstreuung. Je größer ein Partikel ist, desto größer ist seine Oberfläche und somit die Fläche, auf die die Laserstrahlung auftrifft und gestreut wird. Bei den ersten Analysen wurden die Messungen sowohl mit als auch ohne Ultraschallbehandlung durchgeführt, um zu untersuchen, ob es eine Agglomerat-Bildung gab bzw. wie groß die Differenz zwischen den beiden Größen war. Die Messungen unterscheiden sich darin, dass bei

zusätzlicher Ultraschallbehandlung mögliche Agglomerate in einzelne Partikel aufgelöst werden können.

Polymerdegradation

Da die Materialaufbereitung zum einen bei Raumtemperatur erfolgte und diese zudem zu einer mechanischen Zerkleinerung der Polymerketten führen kann, wurde eine Messung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt. Durch diese Messung wurde die Molmasse des Polymers bestimmt, um den Polymerabbau zu dokumentieren. Die Analysen wurden anhand eines Verbundwerkstoffes aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% CCrf durchgeführt. Vor der Messung mussten zunächst die keramischen Bestandteile aus dem Verbundwerkstoff gelöst werden, da diese das Ergebnis verfälschen können. Dazu wurden die Werkstoffe in Chloroform gelöst und filtriert (0,2 µm-Filter). Zusätzlich wurden die Mischungen zentrifugiert, um die gesamt Keramik zu entfernen. Als Referenz wurde die Molmasse des reinen Polymers bestimmt. Für die Messung wurden der Werkstoff und das Polymer in Chloroform gemessen. Die Messkalibrierung erfolgte mittels PMMA. Als Detektor wurde ein Sedere Sedex 85 verwendet.

3.1.3 Herstellung der Prüfkörper

Um die Werkstoffe genauer charakterisieren zu können, wurde eine Methode zur Prüfkörperherstellung etabliert. Um den später zu verwendenden Laserschmelzprozess zu simulieren, wurden zunächst Prüfkörper hergestellt, indem das Pulver in zylinderförmigen Schalen (Ø = 12 mm) aus Aluminiumfolie gefüllt und 1 h bei 200 °C im Ofen aufgeschmolzen wurde. Um eine höhere Prüfkörperdichte zu erreichen, wurden die Verbundwerkstoffe in einer weiteren Versuchsreihe mit Hilfe einer Stahlmatrize (Stempeldurchmesser 12 mm) und einer Universalprüfmaschine (Z030, Zwick, Ulm) kaltverpresst (60 sec mit 3 kN) und anschließend wie zuvor im Ofen aufgeschmolzen. Da die ersten Prüfkörper durch die Erwärmung insbesondere in Richtung der Prüfkörperdicke aufquollen, wurden die Prüfkörper zwischen zwei Platten gelagert, um eine Ausdehnung in diese Richtung zu verhindern.

Um dichtere und formtreuere Prüfkörper zu erzeugen, wurde im Weiteren ein Prozess entwickelt, bei dem Press- und Schmelzprozess kombiniert wurden. Dazu wurde eine Stahlmatrize mit einem Stempeldurchmesser von 12 mm (Abb. 15) auf die gewünschte Temperatur erhitzt und anschließend mit dem Verbundwerkstoffpulver befüllt. Durch Aufbringen einer Presskraft von 3 kN mit der Universalprüfmaschine und einer Haltezeit von 180 sec wurde das Pulver verdichtet. Um die Polymerdegradation zu beschränken oder sogar zu verhindern, wurde die Presstemperatur möglichst gering gehalten. Dazu wurden Versuche bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (130, 140 und 150 °C). Die spätere Probendicke konnte durch die Materialmenge eingestellt werden. Für die Standardproben wurden 300 mg Pulver eingesetzt. Um sicherzustellen, dass die Prüfkörper gänzlich aufgeschmolzen waren, wurde deren innere Struktur anhand der Bruchflächen nach einem Kryobruch am Rasterelektronenmikroskop in der ELMI untersucht. Zudem wurde die Molmasse Polymers des mittels Gelpermeationschromatographie am Leibniz-Institut für Interaktive Materialien (DWI) RWTH Aachen bestimmt (vgl. Kap. 3.1.2), um den Einfluss des der Warmpressprozesses auf die Degradation zu untersuchen. Da sich gezeigt hatte, dass über den Warmpressprozess reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden die weiteren Experimente anhand dieser Prüfkörper durchgeführt. Für der PLLA-basierten die Untersuchungen Werkstoffe musste der Warmpressprozess angepasst werden. Da es sich um ein teilkristallines Polymer handelt, ist eine höhere Energie zum Aufschmelzen nötig. Dazu wurden Versuche bei Temperaturen von 150, 180 und 200 °C durchgeführt.



Abb. 15: Stahlmatrize zur Herstellung der warmgepressten Prüfkörper.

Zusätzlich wurden am Fraunhofer Institut für Lasertechnik (ILT Aachen) von Christoph Gayer aus den hergestellten Werkstoffen Prüfkörper mittels Laserschmelzprozess (CO₂-Laser) hergestellt. Dazu wurde am ILT ein Prozess entwickelt, der die Verarbeitung der Werkstoffe zuließ. Parameter im Prozess waren neben der Energiedichte der Laserstrahlung (39 W/mm²) und dem Spurabstand (20 μ m) auch die Scangeschwindigkeit (2000 mm/s) und die Schichtdicke (50 μ m). Es wurden vier verschiedene Werkstoffe analysiert, die jeweils auf 60 Gew.-% PDLLA basierten. Die β -TCP-Anteile waren 20, 30, 35 und 40 Gew.-%. Der restliche Anteil war Calciumcarbonat.

Ein Werkstoff aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% wurde mit den folgenden Laserparametern zu Prüfkörpern verarbeitet: eine Scangeschwindigkeit von 50 mm/s, ein Spurabstand von 20 µm und eine Schichtdicke von 50 µm. Die Energiedichte der Strahlung wurde von 3,4 W/mm² bis 6,4 W/mm² variiert.

In verschiedenen Untersuchungen wurden die Laserparameter teilweise variiert. Auf diese wird in den Kapiteln zu den entsprechenden Versuchen eingegangen.

3.2 Mechanische Charakterisierung

3.2.1 Bestimmung der elastischen Konstanten

Die elastischen Konstanten wurden benötigt, um die Biegefestigkeit mittels *Ball-on-three-balls*-Test bestimmen zu können [23], [24], [36]. Dazu wurde die Poissonzahl mit Hilfe des Elastizitätsmoduls (E) und des Schubmoduls (G) berechnet (GI. 3) [184].

$$\nu = \frac{E}{2G} - 1 \tag{Gl. 3}$$

Der E-Modul und der G-Modul wurden jeweils mit Hilfe von zwei verschiedenen Messmethoden bestimmt: der Resonanzfrequenz-Dämpfungsanalyse (RFDA) und der Grindosonic-Methode ("Kugelfall-Methode"). Da es sich bei beiden Methoden um zerstörungsfreie Analysen handelt, konnten die Prüfkörper für beide Messungen verwendet werden. Dies hatte zudem den Vorteil, dass die Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden konnten. Bei der RFDA, die am Institut für Gesteinshüttenkunde (GHI) durchgeführt wurde, wurde eine Probe mit den Abmessungen 5 x 5 x 52 mm³ (b x h x l) für den E-Modul und 6 x 19 x 52 mm³ für den G-Modul auf einem Drahtgerüst gelagert. Dabei unterschieden sich die Messungen in der Art der Lagerung. Die E-Modul-Probe wurde auf zwei parallelen Drähten gelagert, die G-Modul-Probe auf zwei kreuzförmig angeordneten Drähten (Abb. 16) [184]. Die Proben wurden durch einen mechanischen Impuls in Schwingung versetzt. Die Prüfkörper wurden jeweils auf den Knotenpunkten für die Grundfrequenz von Biege- und Torsionsschwingung angekoppelt. Für die Bestimmung des E-Moduls erfolgte die Anregung zentriert auf der Probe (Abb. 16a), für die Bestimmung des G-Moduls am Rand (Abb. 16b). Das entstandene akustische Signal wurde durch ein Mikrophon aufgezeichnet. Über eine Software wurde das Signal in E-Modul, G-Modul und Poissonzahl umgerechnet. Die Grindosonic-Methode erfolgte am Institut für Werkstoffanwendungen im Maschinenbau (IWM). Die Messung unterschied sich von der zuvor durchgeführten dadurch, dass der mechanische Reiz nicht durch händisches Anstoßen, sondern durch das Fallenlassen einer Kugel aufgelöst wurde. Nachdem der Prüfkörper auf zwei Stützen gelagert wurde (Abb. 16), wurde eine kleine Kugel aus definierter Höhe auf die Probe fallen gelassen. Die Auflager waren in diesem Fall keine Drähte, sondern steife Kunststoffhalter. Durch den mechanischen Reiz wurden auch hier Schwingungen ausgelöst, die über ein Mikrophon aufgenommen wurden. Die Auswertung erfolgt ebenfalls über eine Software zur Frequenzanalyse.



Abb. 16: Grindosonic: Impulsanregungsverfahren: Messaufbau und Anregungsorte beim Biegeschwingmodus für den E-Modul (a) und Torsionsschwingmodus für den G-Modul (b). Legende: (1) Mikrophon, (2) Keramikstab zum Piezo-Messwertaufnehmer, (3) Lage von Biegeschwingungsknoten, (4) Impulsgeber, (5) Lage von Torsionsschwingungsknoten [184].

Die Messung mittels Kugelfallmethode wurde wiederholt, nachdem die Prüfkörper zwei bzw. fünf Wochen in Wasser gelagert worden waren. Nach 15-monatiger Lagerung wurde die Messung mittels RFDA wiederholt.

3.2.2 Biegefestigkeit

Die Biegefestigkeit der hergestellten Prüfkörper (warmgepresst und SLM) wurde mit Hilfe des Ball-on-three-balls-Test analysiert [23], [24], [36]. Die Messmethode wurde von Danzer et al. entwickelt und ist für spröde Werkstoffe geeignet. Da die hergestellten Prüfkörper unter Biegung ein sprödes Bruchverhalten zeigten, konnte diese Messmethode verwendet werden. Der Vorteil der Messmethode liegt darin, dass geringe Abweichungen von der idealen Geometrie keinen Einfluss auf die So wird auch der Einfluss Biegefestigkeit haben. durch Kanteneffekte ausgeschlossen [35]. Ein weiterer Vorteil ist, dass zudem sehr kleine Prüfkörper getestet werden können [36]. Da die Prüfkörper durch den Warmpressprozess geringe Variationen in der Probendicke oder auch eine Durchbiegung aufwiesen, war dieser Test besonders geeignet. Zur Messung wurden die Proben von einer Seite mittig durch eine, auf der anderen Seite durch drei dichtgepackte Stahlkugeln 17a und b). Durch punktuelle Auflager und einen guasibelastet (Abb. konnten freischwebenden Aufbau Reibkräfte minimiert werden [36]. Der Probenradius wurde definiert mit R, der Abstand zwischen Kugelmittelpunkt der einzelnen Kugel (= Probenmittel-punkt) und Mittelpunkt einer der drei anderen Kugeln mit R_a, und der Kugelradius mit R_b (Abb. 17c). Der Aufbau wurde bis zum Bruch belastet und die bruchauslösende Kraft dokumentiert. Anhand dieser Kraft F, der Probengeometrie (Durchmesser ø und Dicke t) wurde die Bruchfestigkeit σ_{max} berechnet (Gl. 4 und Gl. 5).



Abb. 17: Messaufbau beim *Ball-on-three-balls*-Test: Aufsicht und Seitenansicht (a), Versuchsaufbau (b) und Definition der Variablen [24] (c).

Die Literatur gibt die Konstanten c_0 bis c_6 für definierte Poissonzahlen an [24]. Liegt die bestimmte Poissonzahl nicht in diesem Bereich, können die Konstanten interpoliert werden (Gl. 6) [23].

$$\sigma_{\max} = f * \frac{F}{t^2}$$
 (GI. 4)

$$f\left(\frac{t}{R}, \frac{R_a}{R}, \nu\right) = c_0 + \frac{(c_1 + c_2 * \frac{t}{R} + c_3 * (\frac{t}{R})^2 + c_4 * (\frac{t}{R})^3)}{1 + c_5 * \frac{t}{R}} * (1 + c_6 * \frac{R_a}{R})$$
(GI. 5)

$$f\left(\frac{t}{R}, \frac{R_{a}}{R}, \nu\right) = \frac{\nu_{2} - \nu_{1}}{\nu_{2} - \nu_{1}} * f\left(\frac{t}{R}, \frac{R_{a}}{R}, \nu_{1}\right) + \frac{\nu - \nu_{1}}{\nu_{2} - \nu_{1}} * f\left(\frac{t}{R}, \frac{R_{a}}{R}, \nu_{2}\right)$$
(GI. 6)

3.2.2.1 Biegefestigkeit warmgepresster Prüfkörper

Für die Messung der Biegefestigkeit der warmgepressten Prüfkörper wurden pro Werkstoff 30 Prüfkörper verwendet. Pro Prüfkörper wurden dazu jeweils 300 mg Material verwendet. Die Herstellung der Prüfkörper erfolgte über den Warmpressprozess wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Die folgenden Werkstoffe wurden untersucht:

- 40/30/30rf,
- 50/25/25rf,
- 60/20/20rf, 60/20/20rg und 60/20/20nad,
- 60/27.5/12.5rf und 60/27.5/12.5rg und
- 60/35/5rf und 60/3/5rg.

Zum Vergleich wurde auch reines PDLLA mittels *Ball-on-three-balls*-Test analysiert, obwohl dieser nur für spröde Werkstoffe geeignet war. Parallel wurden daher ein Vier-Punkt-Biegetest sowie ein Drei-Punkt-Biegetest durchgeführt. Der Vier-Punkt-Biegetest wurde mit der Universalprüfmaschine, einem Auflagerabstand von 20 mm und einer Belastungsgeschwindigkeit von 1 mm/min durchgeführt. Der 3-Punkt-Biegetest wurde ebenfalls mit der Universalprüfmaschine durchgeführt. Es wurden verschiedene Prüfkörperabmessungen getestet, wobei ein Teil der Prüfkörper nicht

der von der Norm geforderten Geometrie entsprach [185]. Bei den nicht der Norm entsprechenden Stäben wurde ein Auflagerabstand von 11 mm und 25 mm gewählt, sowie eine Belastungsgeschwindigkeit von 1 mm/min. Bei den normähnlichen Stäben wurden ein Auflagerabstand von 40 bzw. 32 mm sowie eine Belastungsgeschwindigkeit von 1 mm/min gewählt. Die bruchauslösende Kraft wurde dokumentiert.

3.2.2.2 Biegefestigkeit der SLM-Prüfkörper

Die SLM-Prüfkörper wurden am Institut für Lasertechnik (ILT) hergestellt. Die Parameter im Laserprozess (Laserleistung und die Scangeschwindigkeit) wurden dabei für die unterschiedlichen Verbundwerkstoffe so angepasst, dass alle Bauteile eine vergleichbare Dichte aufwiesen. So galt die Dichte der Prüfkörper bei der Bestimmung der Biegefestigkeiten als Konstante. Die Biegefestigkeit wurde mit der gleichen Methode wie bei den warmgepressten Prüfkörpern ermittelt. Die Seite, die im SLM-Prozess auf der Bauplattform gelegen hatte, wurde bei der Messung stets nach unten gelagert und lag somit auf der einzelnen Kugel auf (Drucklastspannungs-Seite). Pro Werkstoff wurden abweichend von der Norm nur jeweils fünf Prüfkörper untersucht, da der Probenaufwand sehr hoch war und aufgrund der hohen Kosten nur wenig Material zur Verfügung stand, die Standardabweichungen bei den Festigkeitswerten aber sehr gering waren. Neben der Werkstoffzusammensetzung wurde zudem der Einfluss der Energiedichte der Laserstrahlung auf die Festigkeit untersucht. Die folgenden Prüfkörper wurden untersucht:

PDLLA-Werkstoffe (jeweils 5 Prüfkörper pro Werkstoff und Energiedichte)

- $60/20/20rf: 39 \text{ W/mm}^2 \text{ und } 44 \text{ W/mm}^2, \emptyset = 10 \text{ mm}, t = 2 \text{ mm},$
- 60/30/10sp: 39 W/mm² und 44 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm,
- 60/35/5sp: 39 W/mm² und 44 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm und
- 60/40TCP: 39 W/mm² und 44 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm.

PLLA-Werkstoffe (jeweils 4 Prüfkörper pro Werkstoff und Energiedichte)

- 76PLLA/24CCsp-3,4 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm
- 76PLLA/24CCsp-3,9 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm
- 76PLLA/24CCsp-4,4 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm
- 76PLLA/24CCsp-4,9 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm
- 76PLLA/24CCsp-5,9 W/mm², Ø =10 mm, t = 2 mm

3.2.3 Druckfestigkeit

3.2.3.1 Druckfestigkeit warmgepresster Prüfkörper

Für die ersten Untersuchungen zur Druckfestigkeit der Werkstoffe wurden dichte Prüfkörper aus 60/20/20rf mittels Warmpressprozess hergestellt. Aufgrund einer größeren Pulvermenge wurden die Pressparameter angepasst (5000 N, 240 sec Haltezeit). Da die ersten Pressversuche mit 2 g Pulvermaterial nicht zu formtreuen Prüfkörpergeometrien führten, wurde das Material nach dem Pressen in der Form bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur in der Matrize belassen. Anschließend wurden die Prüfkörper vermessen und bis zum Bruch mit Hilfe der Universalprüfmaschine belastet. Parallel wurden in einen Teil der Prüfkörper jeweils ein Kanal ($\emptyset = 5$ mm) längs der Probe gebohrt, um den Einfluss einer Struktur zu untersuchen. Diese Prüfkörper wurden mit den gleichen Parametern wie die Prüfkörper ohne Kanal untersucht.

3.2.3.2 Druckfestigkeit der SLM-Prüfkörper

Zur ersten Abschätzung der leistungsabhängigen Druckfestigkeit von SLM-Prüfkörpern wurden vier verschiedene Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP bei unterschiedlichen Energiedichten der Laserstrahlung (2,5 W/mm², 2,9 W/mm², 3,4 W/mm² und 3,9 W/mm²) hergestellt. Die Abmessungen betrugen 6,5 x 6,5 x 6 mm³ (I x b x h). Die Prüfkörper wurden mit Hilfe einer Universalprüfmaschine belastet, bis die Messung abbrach. Die Kraft, die zum Bruch führte, wurde aufgenommen und daraus die Bruchspannung berechnet.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden SLM-Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% sphärolithischem Calciumcarbonat untersucht. Die Laserparameter waren eine Energiedichte der Laserstrahlung von 1.1 W/mm², eine Scangeschwindigkeit von 50 mm/s sowie ein Spurabstand von 20 µm (Entwicklung und Herstellung ILT Aachen). Entsprechend der Norm ISO 604 betrugen die Prüfkörperabmessungen 10 x 10 x 4 mm³ [186]. Die Prüfkörper wurden hochkant beansprucht.

3.2.4 Dynamische Beanspruchung

3.2.4.1 Druckfestigkeit warmgepresster Prüfkörper

Basierend auf der bestimmten Druckfestigkeit (vgl. Kap.3.2.3.1), wurden Prüfkörper mit einem zentralen Kanal auch unter dynamischer Belastung untersucht. Die zuvor bestimmte Bruchfestigkeit galt bei dieser Untersuchung der Festlegung der Maximalkraft. So wurden die Experimente oszillierend zwischen 10 % der Oberlast (580 N) und 70 % (5800 N) der bestimmten Druckfestigkeit (8300 N) durchgeführt. Die Mittelspannung lag bei 3190 N. Die Belastungsfrequenz lag bei 3 Hz, die angestrebte ertragbare Zyklenzahl bei 1 Mio.

3.2.4.2 Druckfestigkeit der SLM-Prüfkörper

Die in Kapitel 3.2.4.1 beschriebene Messung wurde auch an SLM-Prüfkörpern aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% sphärolithischem Calciumcarbonat durchgeführt. Die verwendeten Prüfkörper entsprachen derer, die für die einfachen Drucktests verwendet wurden (vgl. Kap. 3.2.3.2).

3.3 Degradation

3.3.1 Untersuchung des pH-Wertes bei beschleunigter Degradation

Da sich PDLLA erst nach mehreren Monaten abbaut, wurden zunächst Degradationsstudien bei erhöhter Temperatur durchgeführt, um den Polymerabbau zu beschleunigen und schneller belastbare Aussagen zum Pufferverhalten der entwickelten Werkstoffe zu treffen. Um die Materialeigenschaften nicht grundsätzlich zu ändern, wurde eine Lagertemperatur unterhalb der Glasübergangstemperatur $(T_G = 63 \degree C)$ gewählt. Da verschiedene Varianten von Calciumcarbonat zur Verfügung standen, die sich in der Geometrie der Partikel unterschieden (vgl. Tab. 6), wurde zunächst der Einfluss der Partikelstruktur auf die Pufferfähigkeit der Verbundwerkstoffe untersucht. Die Zusammensetzungen aller Werkstoffe betrugen 80 Gew.-% PDLLA und 20 Gew.-% Calciumcarbonat. Die Werkstoffe wurden aufbereitet, indem 1,6 g aufgemahlenes PDLLA mit 0,4 g der entsprechenden Calciumcarbonat-Variante 7 Tage lang in einer 50 ml-Polyethylen-Flasche auf einer Rollenbank miteinander vermischt wurden. Anschließend wurden über einen Warmpressprozess (150 °C) aus jeweils 500 mg Pulver zylinderförmige Prüfkörper hergestellt. Die Pressparameter entsprachen den Standardparametern (vgl. Kap. 3.1.3). Entsprechend der Norm ISO 15814 wurden die Prüfkörper in Sörensen-Puffer gelagert [188], da dieser einen pH-Wert von 7,4 aufweist und somit im physiologischen Bereich liegt. Der Sörensen-Puffer setzt sich zu 18,2 % der Lösung A und 81,8 % der Lösung B zusammen:

- A: 1/15 mol/l KH₂PO₄
- B: 1/15 mol/l Na₂HPO₄

Nachdem die Proben 15 min im Ultraschallbad gereinigt und von beiden Seiten für 15 s mit UV-Licht bestrahlt worden waren, wurden die Prüfkörper einzeln mit jeweils 20 ml Puffer in einer 50 ml-Polyethylen-Flaschen in einem Wärmeschrank gelagert. Dabei wurde die Temperatur abweichend von der Norm auf 53 °C eingestellt, um die Polymerdegradation zu beschleunigen. Der pH-Wert wurde während der 34-tägigen Lagerungszeit mehrfach kontrolliert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gefäße nur kurz geöffnet wurden, um den Einfluss durch die Wechselwirkung mit der Umgebungsluft gering zu halten.

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurde der Einfluss der Zusammensetzung auf die Pufferwirkung des Werkstoffs untersucht. Zusätzlich wurden zwei Calciumcarbonat-Varianten (rhomboedrisch grob und fein) verglichen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die untersuchten Zusammensetzungen:

Proho	Zusammensetzung (Gew%)						
FIODE	PDLLA	β-ΤϹΡ	CC (Variante)				
PDLLA	100	-	-				
80P/20TCP		20	-				
80P/20CCrf	80	-	20 (rhomb. fein)				
80P/20CCrg		-	20 (rhomb. grob)				
50P/50TCP		50	-				
50P/50CCrf	50		50 (rhomb. fein)				
50P/50CCrg			50 (rhomb. grob)				
60P/40TCP		40	-				
60P/30TCP/10CCrf		30	10 (rhomb. fein)				
60P/30TCP/10CCrg		30	10 (rhomb. grob)				
60P/20TCP/20CCrf	60	20	20 (rhomb. fein)				
60P/20TCP/20CCrg		20	20 (rhomb. grob)				
60P/10TCP/30CCrf		10	30 (rhomb. fein)				
60P/10TCP/30CCrg		10	30 (rhomb. grob)				
PBS-Referenz	-	-	-				

Tab. 11: Beschleunigte Degradation der Werkstoff bei 50°C in Abhängigkeit der Werkstoffzusammensetzung.

Bevor die Prüfkörper bei 50 °C in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelagert wurden, wurden sie mittels γ-Strahlung sterilisiert, um sicher zu gehen, dass alle Keime abgetötet wurden. So konnte ausgeschlossen werden, dass pH-Wert-Änderungen durch eine Kontamination verursacht wurden. Für jede Probenreihe wurden sechs Ansätze präpariert, wobei jeweils zwei Proben nach einer, zwei und drei Wochen analysiert wurden. Dadurch konnte wiederum sichergestellt werden, dass pH-Wert-Änderungen nicht durch Wechselwirkungen mit der Umgebungsluft verursacht wurden. Bereits analysierte Proben wurden dennoch im Experiment weiter geführt und zu späteren Zeitpunkten erneut analysiert (Tab. 12). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gefäße erst unmittelbar vor der Messung geöffnet wurden und unmittelbar nach der Messung wieder verschlossen wurden.

		Anzahl der Wochen							
Probe	1	2	3	4	5	6	12	20	24
W1									
W2									
W3									

Tab. 12: Messzeiten während der Experimente zur beschleunigten Degradation bei 50°C.

Zur Untersuchung der Degradation der Werkstoffe und der Pufferfähigkeit in Abhängigkeit der Zusammensetzung wurden verschiedene Prüfkörper über 8, 16 und 24 Wochen bei 37 °C in PBS gelagert. Dazu wurden vier Werkstoffe miteinander verglichen: reines PDLLA, 60/40TCP, 60/20/20rf und 60/40CCrf. Jeweils neun Prüfkörper wurden mit UV-Licht sterilisiert und anschließend einzeln in einem 13 ml-Gefäß gelagert. Um Wechselwirkungen mit der Umgebungsluft zu vermeiden, wurden die Gefäße bis zum Rand befüllt. Die Gefäße wurden erst für die pH-Wert-Messung zu den entsprechenden Zeiten geöffnet. Pro Werkstoff und pro Zeitpunkt wurden drei Proben untersucht.

3.3.3 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit

Um erste Aussagen über das Materialverhalten in flüssiger Umgebung treffen zu können, wurde die Biegefestigkeit von Prüfkörpern nach Lagerung in Flüssigkeit bestimmt.

Um belastbare Aussagen über die Biegefestigkeit treffen zu können, wurden Festigkeitsanalysen an einer von der Norm geforderten Anzahl von Prüfkörpern durchgeführt. Diese wurden in Wasser bzw. in einer zweiten Versuchsreihe in PBS ausgelagert. Die Untersuchungen wurden an einem Verbundwerkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) durchgeführt, da dieser die beste Kombination aus Verarbeitbarkeit, Festigkeit und theoretischer Pufferfähigkeit aufwies. Die erste Versuchsreihe wurde in demineralisiertem Wasser Einflüsse durch Fremdionen durchgeführt, um auszuschließen. Die Lagerungszeiten betrugen 2, 4, und 8 Wochen. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde neben der Bestimmung der Biegefestigkeit mittels Ball-on-three-balls-Test auch die geometrische Veränderung der Prüfkörper, der pH-Wert und die Zusammensetzung des Lagerungsmediums mittels ICP-Analyse (ICP-OES 715 mit radialem Plasma, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) untersucht. Die Morphologie der Oberflächen und deren Zusammensetzungen wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Pro Zeitraum wurden 30 Prüfkörper analysiert. Für die Abschätzung der Biegefestigkeit wurde der Werkstoff auch im Ausgangszustand untersucht. Für die übrigen Analysen diente reines PDLLA als Referenz. Die Prüfkörper wurden entsprechend Abbildung 19 verteilt. Um den Einfluss einer körperähnlichen Umgebung auf die Prüfkörper zu untersuchen, wurde die Versuchsreihe in einer Pufferlösung wiederholt. Dazu wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verwendet. Die untersuchten Zeitpunkte waren 2, 4 und 8 Wochen. Auch hier wurden pro Zeitraum 30 Prüfkörper untersucht. Um den Einfluss der Zusammensetzung auf die Biegefestigkeit zu untersuchen, wurde ein Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP analysiert. Zusätzlich wurde die geometrische Veränderung untersucht. Pro Zeitpunkt standen jedoch nur fünf Prüfkörper zur Verfügung. Zusätzlich wurden zwei 60/35/5-Werkstoffe in Abhängigkeit der Struktur der CC-Partikel (rhomboedrisch fein und grob) nach der



Lagerung in Wasser auf ihre Festigkeit hin analysiert. Dazu wurden jeweils drei Prüfkörper nach 6, 12 und 18 Wochen mittels *Ball-on-three-balls*-Test analysiert.

Abb. 18: Verteilung der Prüfkörper auf die Gefäße während der Degradationsuntersuchungen [8].

Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und des hohen Herstellungsaufwandes der SLM-Prüfkörper wurden die Versuche in flüssiger Umgebung an nur jeweils fünf statt der von der Norm geforderten 30 Prüfkörpern durchgeführt. Verwendet wurden die Werkstoffe aus 60/20/20rf, 60/30/10sph, 60/35/5sph und 60/40TCP. Die Prüfkörper wurden zur ersten Abschätzung nur sieben Tage in PBS gelagert. Anschließend wurde die Biegefestigkeit der Prüfkörper bestimmt.

Die SLM-Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% sphärolithischem Calciumcarbonat wurden 2, 4 und 8 Wochen bei 37 °C in PBS gelagert und auf ihre Festigkeit hin untersucht. Auch der Ausgangszustand vor der Lagerung wurde analysiert. Zusätzlich wurden Prüfkörper bei 50 °C zur Beschleunigung der Degradation gelagert und nach 1, 2 und 3 Wochen auf ihre Biegefestigkeit sowie auf den pH-Wert des Mediums hin untersucht.

3.3.4 Dynamische Beanspruchung in flüssiger Umgebung

Die Experimente zur dynamischen Beanspruchung wurden zusätzliche in flüssiger Umgebung durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.4), um eine körperähnliche Umgebung zu simulieren. Dazu wurden die Zylinder mit dem zentralen Kanal (vgl. Kap.3.2.4.1) in Wasser gelagert und gleichzeitig zyklisch beansprucht. Dabei wurden die gleichen Parameter wie bei den Versuchen in trockener Umgebung verwendet.

3.3.5 Lagerung verfärbter SLM-Proben in flüssiger Umgebung

Es hatte sich gezeigt hatte, dass sich die braun-verfärbten SLM-Prüfkörper in Flüssigkeit mit der Zeit entfärbten. Es wurde ein SLM-Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% CC (rhomb. fein) in 1 ml Zellnährmedium gelagert. Neben der

Farbveränderung des Medium wurde auch der pH-Wert kontrolliert. Als Referenz wurde das Zellmedium separat mitgeführt. Der pH-Wert wurde über sechs Tage gemessen. Ziel dieser Untersuchung war in erster Linie herauszufinden, ob der negative Einfluss auf die Zellvitalität durch die verfärbten Prüfkörper bzw. die Abgabe der Degradationsprodukte ins Medium oder aber durch einen veränderten pH-Wert verursacht war. In einer weiteren Versuchsreihe wurde zudem der Einfluss der Art und des Volumens des Lagerungsmediums untersucht. So wurden SLM-Prüfkörper aus 60/20/20rf in 13 ml Wasser und Zellnährmedium gelagert.

3.4 Biologische Verträglichkeit

3.4.1 Verwendete Zelltypen

L929-Mausfibroblasten sind weltweit etabliert und sind somit in ihrem Wachstumsverhalten und ihrer Morphologie bekannt. Sie entstammen dem Bindegewebe. Der Vorteil der Untersuchungen mit Mausfibroblasten liegt darin, dass die Zellen ein sehr konstantes und somit reproduzierbares Verhalten aufweisen. Daher können die Untersuchungen gut mit anderen Studien mit L929-Zellen verglichen werden. Mausfibroblasten werden meist für erste Versuche zur Abschätzung der Verträglichkeit und als Referenz für die Untersuchungen mit anderen, für den Einsatz als Implantatmaterial relevanteren Zellen (z. B. Osteoblasten, Osteoklasten oder Stammzellen) verwendet. Im Hinblick auf den Knochenaufbau wurden zudem Osteoblasten-ähnliche Zellen in Kontakt mit den entwickelten Verbundwerkstoffen untersucht. Dazu wurden MG-63-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um eine humane Osteosarkomzelllinie. Im Weiteren wurde auch der Knochenabbau untersucht. Dazu wurde der Zelltyp RAW 264.7 untersucht. Bei RAW-Zellen handelt es sich um eine murine Osteoklasten-ähnliche Krebszellinie (Leukämie). RAW-Zellen lassen sich durch Zugabe von Differenzierungsfaktoren (RANKL und MCS-F) zu Osteoklasten differenzieren.

Hinsichtlich der späteren Anwendung als Implantatmaterial sind die wichtigsten zu untersuchenden Zellen humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs). Die in dieser Arbeit verwendeten hMSCs wurden aus Hüftköpfen isoliert. Die Methode zur Stammzellisolierung ist in der Arbeitsgruppe gut etabliert. Als Referenz wurden hMSCs der Firma PromoCell analysiert.

3.4.2 Abschätzung der Zytotoxizität

Zur ersten Abschätzung der Zytokompatibilität und zur Untersuchung der Zellmorphologie wurden Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Werkstoffe mit Zellen besiedelt und über 24 h (L-929, M-G63, RAW) bzw. 72 h (hMSCS) kultiviert. Die untersuchten Werkstoffe und die ausgesäten Zellkonzentrationen zeigt Tabelle 13.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer ermittelt. Die Aussaat erfolgte in 24er-Wellplatten auf Prüfkörpern mit einem Durchmesser von 12 mm. Die Grund-

fläche der einzelnen Wells betrug 2 cm². Zur Zellkontrolle wurden zudem Zellen auf Glasronden ausgesät. Pro Werkstoff erfolgte eine Dreifachbestimmung. Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer (Tab. 13) wurden die Zellen mit einer fluoreszierenden Lösung kenntlich gemacht. Dazu wurde eine Mischung aus 600 µl Ringerlösung ("Hausabfüllung" über Apotheke), 10 µl Propidiumiodid (PI 95% HPLC, Sigma P4170-10116) und 10 µl Fluorsceindiacetat (FDA, Sigma F7378-10G) angesetzt. Die Ringerlösung enthielt neben demineralisiertem Wasser Kalium-Natrium- und Calciumchlorid. PI diente dabei der Kenntlichmachung der toten Zellen, da es nicht in der Lage ist, intakte Zellmembranen zu durchdringen, während die Membranen toter Zellen kein Hindernis darstellen. PI kann dann direkt in die DNA interkalieren, wodurch der Zellkern einer toten Zelle unter roter Fluoreszenz erscheint. FDA wurde zu Kenntlichmachung der lebenden Zellen verwendet. Gelangt es in lebende Zellen, wird es durch membranständige Esterasen zu Fluorescein verstoffwechselt, wodurch es seine fluoreszierende Eigenschaft (grün) erhält. Da es in toten Zellen keinen Stoffwechsel gibt, bleibt diese Umwandlung dort folglich aus.

Zelltyp	Werkstoffe	Zelldichte (Zellen pro cm²)	Kultivierungsdauer (h)
L-929	Variation Polymeranteil: 40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf Variation Keramik-Anteile: 60/20/20rg 60/20/20rg 60/20/20nad 60/27,5/12,5rf 60/27,5/12,5rg 60/35/5rf 60/35/5rg	20.000	24
MG-63	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20nad β-TCP Calciumcarbonat rf 60/35/5rf SLM-60/40TCP SLM-60/40CCrf	20.000	24
	Strontiumchlorid-haltige Medien (mg/ml): 0,036 0,073 0,18 0,36 3,6	20.000	24
RAW	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20nad	20.000	24
hMSCs	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20nad Vergleich mit Strontium- haltigen Werkstoffen: 50/25/25rf 62/20/20rf 60/40TCP 60/40TCP 60/40CCrf 60/20/10CC/10SC 60/20/20SC	5000	72
	Alu-PLLA77/CCsp23 Alu-PDLLA80/CCsp20	10000	24

Tab. 13: Übersicht über die durchgeführten Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen.

Jeweils 20 µl dieser Mischung wurden anschließend unmittelbar vor der Messung auf jede Probe pipettiert. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop (AXIO Imager M2m, Zeiss, Wetzlar) mit Hilfe des Programmes *AxioVision* visualisiert. Dazu wurde zunächst ein Bild bei fünffacher Vergrößerung aufgenommen und jeweils drei bei zehnfacher Vergrößerung. Bei letzterer wurde dazu jeweils eine Aufnahme von der Probenmitte, dem Probenrand und dazwischen vorgenommen (Abb. 19). Aufgrund der deutlich größeren Stammzellen wurden in den hMSC-Versuchsreihen die Aufnahmen bei fünffacher Vergrößerung ausgewertet. Über die Mehrkanalaufnahme konnten die lebenden und die toten Zellen parallel aufgenommen werden. Die Auszählung der Zellen erfolgte über das Computerprogramm *ImageJ*.



Abb. 19: Positionen der Aufnahmen bei der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung: Probenmitte (1), Probenrand (3) und dazwischen (2).

3.4.3 Viabilität

Die Viabilität der in Kap. 3.4.1 erläuterten Zelltypen wurde auf verschiedenen Werkstoffen untersucht, um deren Zellverträglichkeit abzuschätzen. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Kultivierungsparameter.

Zelltyp	Werkstoffe	Zelldichte (pro cm ²)	Kultivierungsdauer (Tage)
L929	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20nad	20.000	1, 2, 3, 4
MG63	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf β-TCP CaCO ₃ Strontiumchlorid-haltige Medien (mg/ml): 0,036 0,36 3,6 60/20/20CCrf 60/20/20CCrf 60/20/10CCrf/10SC 60/20/10CCrf/10SC 60/20/10CCrf/10SC 60/40TCP SLM-60/40TCP SLM-60/40TCP SLM-60/30/10sp SLM-60/35/5sp HP-60/27,5/12,5rf HP-60/35/5rf HP-60/35/5rf HP-60/35/5rf HP-60/40TCP SLM-79PLLA/21CCsp-2,9W/mm ² SLM-79PLLA/21CCsp-3,9W/mm ² SLM-79PLLA/21CCsp-4,9W/mm ² SLM-79PLLA/21CCsp-4,9W/mm ²	20.000	3, 5, 7
RAW	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg	2000	3, 5, 7
hMSCs	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20sc 60/20/10Ccrf/10SC 60/40TCP 60/35/5rf SLM-79PLLA/21CCsp-2,9W/mm ² SLM-79PLLA/21CCsp-3,9W/mm ² SLM-79PLLA/21CCsp-4,9W/mm ² SLM-60PDLLA/40TCP	5000	3, 5, 7, 10

Tab. 14: Übersicht über die durchgeführten Viabilitätsuntersuchungen.

In den einzelnen Untersuchungen wurden jeweils durchgehend die gleichen Prüfkörper für alle Messtage verwendet. Bei einem Teil der Untersuchungen wurde zusätzlich eine Versuchsreihe mit neuen Prüfkörpern für jeden Zeitpunkt durchgeführt, um den Einfluss des Farbstoffes auf die Zellaktivität zu untersuchen. Dadurch kamen die Zellen während der Untersuchung nur einmal mit dem Farbstoff in Kontakt, statt an jedem Messtag erneut.

Die Viabilität der vier Zelltypen (vgl. Kap.3.4.1) wurde anhand des Promega CellTiter-Blue-Assays durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in entsprechender Zelldichte auf den Prüfkörper mit einem Durchmesser von 5 mm in Sechsfachbestimmung in einer 96er-Wellplatte bzw. auf den Prüfkörper mit einem Durchmesser von 12 mm in Dreifachbestimmung in einer 24er-Wellplatte ausgesät. Das Mediumvolumen betrug 150 µl (96er-Well) bzw. 1000 µl (24er-Well). Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Wellplatten dem Inkubator entnommen und das Medium abgenommen. Die zu verwendenden Reagenzien wurden auf 37 °C aufgewärmt. Nachdem eine Mischung aus einem Teil CellTiterBlue (CTB) und fünf Teilen Zellmedium angesetzt wurde, wurden jeweils 150 µl in jedes 96er-Well (bzw. 500 µl in jedes 24er-Well) pipettiert. Anschließend wurde die Platte 1 h bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde jeweils eine Messreihe ohne Zellen als Hintergrundkontrolle angesetzt, so dass nur die Intensität der Farblösung gemessen wurde. Als Zellkontrolle wurden Zellen ohne Prüfkörper direkt auf dem Wellboden ausplattiert. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 100 µl des Mediums aus den Wellplatten in eine schwarze 96er-Wellplatte umpipettiert und mit Alufolie abgedeckt. Das restliche Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nachdem auch der Puffer abgesaugt wurde, wurden die Zellen mit frischem Nährmedium weiterkultiviert. An den übrigen Messtagen wurden diese Schritte wiederholt.

Die entnommenen Überstände in der schwarzen Wellplatte wurden dann am SpectraMax (SpectraMax M2, Molecular Device, Kalifornien, USA) analysiert. Die Intensität der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.4.4 Zytotoxizität

Parallel zu einigen der Viabilitätsuntersuchungen wurde am ersten und am letzten Messtag eine Zytotoxizitätsuntersuchung anhand des Promega *CytotoxOne*-Assay durchgeführt (Tab. 15).

Zelltyp	Werkstoffe	Zelldichte (pro cm ²)	Kultivierungsdauer (Tage)
L929	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20nad	20.000	1, 2, 3, 4
MG63	β-TCP CaCO ₃ 40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf	20.000	3, 5, 7
RAW	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20nad	2000	3, 5, 7
hMSCs	40/30/30rf 50/25/25rf 60/20/20rf 60/20/20rg 60/20/20nad 60/35/5rf	5000	3, 5, 7, 10

Tab. 15: Übersicht über die durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen.

Die Analyse wurde am Überstand durchgeführt, so dass bei jedem Mediumwechsel bei den Viabilitätsexperimenten das alte Medium nicht entsorgt, sondern in eine neue Wellplatte überführt wurde. Zusätzlich mussten zwölf Wells mit Zellen kultiviert werden, die als "Maximum-LDH-Release-Kontrolle" verwendet wurden. Diese wurden dann am ersten und letzten Messtag lysiert. Als Hintergrundkontrolle wurde reines Medium ohne Zellen analysiert. Die Belegung der Wellplatte ist im folgenden Schema gezeigt (Tab. 16).

Tab. 16: Belegung der Wellplatte während der CytotoxOne-Untersuchungen.

	1	2	3	4	5	6
А	Probe 1-1	Probe 1-2	Probe 1-3	Probe 1-4	Probe 1-5	Probe 1-6
В	Probe 2-1	Probe 2-2	Probe 2-3	Probe 2-4	Probe 2-5	Probe 2-6
С	Probe 3-1	Probe 3-2	Probe 3-3	Probe 3-4	Probe 3-5	Probe 3-6
D	Medium- Kontrolle 1	Medium- Kontrolle 2	Medium- Kontrolle 3	Medium- Kontrolle 4	Medium- Kontrolle 5	Medium- Kontrolle 6
Е	Max-LDH 1 1. Messtag	Max-LDH 2 1. Messtag	Max-LDH 3 1. Messtag	Max-LDH 4 1. Messtag	Max-LDH 5 1. Messtag	Max-LDH 6 1. Messtag
F	Max-LDH 1 Letzter Messtag	Max-LDH 2 Letzter Messtag	Max-LDH 3 Letzter Messtag	Max-LDH 4 Letzter Messtag	Max-LDH 5 Letzter Messtag	Max-LDH 6 Letzter Messtag

Die Reagenzien (Promega CytotoxOne "Substrate Mix", "Assay Buffer", "Lysis Solution" und "Stop solution" wurden zu Beginn auf 22 °C temperiert. Anschließend

54

wurden 11 ml "Assay Buffer" zu einer Ampulle "Substrate Mix" gegeben und vermischt. Diese Mischung musste vor Licht geschützt werden. Nachdem die Viabilitätsplatte dem Inkubator entnommen und jeweils 100 µl des Überstandes in eine neue 96er-Wellplatte umpipettiert worden war, wurde diese auf 22 °C temperiert. Die zusätzlich angesetzten "Maximum-LDH-Release-Kontrolle" wurden lysiert, indem jeweils 2 µl Promega "Lysis Solution" in die Wells pipettiert wurde. Auch von diesen Wells wurden dann jeweils 100 µl in die neue 96er-Wellplatte umpipettiert. Anschließend wurde in alle belegten Wells 100 µl "CytotoxOne Reagenz" zugegeben. Nachdem die Reagenzien in der Wellplatte für 30 sec auf dem Schüttler vermischt wurden, wurde die Platte 10 min bei 22 °C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Promega "Stop Solution" in jedes Well und zusätzliches Homogenisieren auf dem Schüttler (10 sec) wurde die Reaktion beendet. Für die spätere Fluoreszenzmessung wurden aus jedem Well 100 µl in eine schwarze 96er-Wellplatte umpipettiert. Diese Platte wurde mit Alufolie abgedeckt, um sie vor Licht zu schützen. Zunächst wurde jedoch das restliche Medium aus der Wellplatte mit den zellbesiedelten Prüfkörpern abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann bis zum nächsten Messzeitpunkt weiter kultiviert.

Die beiseite gestellte Wellplatte wurde abschließend im photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm analysiert (SpectraMax M2, Molecular Device, Kalifornien, USA). Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Fluoreszenzwerte des Mediums ohne Zellen ("Hintergrund") von allen gemessenen Intensitäten der Proben abgezogen. Die anschließend daraus gebildeten Mittelwerte wurden dann in die Gleichung zur Berechnung der Zytotoxizität eingesetzt (Gl. 7).

Zytotoxizität (%) = $100 * \frac{\text{gemessene Probenintensität} - \text{Mediumintensität}}{\text{Maximum LDH Release} - \text{Mediumintensität}}$ (Gl. 7)

3.4.5 Zelldifferenzierung

3.4.5.1 Visualisierung Osteoblasten-ähnlicher Zellen

Zur Beurteilung der Zellmorphologie von MG-63 auf den entwickelten Werkstoffen wurden die Zellen nach drei-tägiger Kultivierung mit einer Hämalaun-Färbung kenntlich gemacht. Die Zellen wurden auf 60/20/20rf und zur Kontrolle auf Glasronden ausgesät. Nach drei Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gereinigt. Nachdem auch die PBS abgesaugt wurde, wurde zur Zellfixierung auf jede Probe 500 µl Methanol gegeben. Die Platte wurde 15 min im Kühlschrank inkubiert. Das Methanol wurde anschließend abgenommen. Die Prüfkörper wurden mit demineralisiertem Wasser gewaschen, welches danach ebenfalls abgenommen wurde. Zur eigentlichen Färbung wurden 500 µl Hämalaun (Hämatoxylin-Lösung, Gill No.3, 50 ml, Sigma-Aldrich, 1:2 mit PBS zu verdünnt) in jedes Well gegeben und 5 min inkubiert. Die Prüfkörper wurden dreimal mit warmem Leitungswasser gewaschen. Für die Mikroskopaufnahmen wurde ein Tropfen Glyceringelatine auf

einen Objektträger gegeben und die Prüfkörper mit den Zellen nach unten auf den Objektträger gelegt.

Für die Beurteilung der Zellmorphologie wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden MG-63-Zellen bzw. hMSCs in einer Zelldichte von 3000 Zellen/cm³ über fünf Tage auf Prüfkörpern aus 60/20/20rf und 60/40TCP und als Referenz auf Glasronden kultiviert. Danach wurden Aktin und Integrin in den Zellen angefärbt. Nachdem das Medium von den Zellen abgesaugt worden war, wurden die Zellen dreimal mit kalter PBS (4 °C) jeweils 1 min gewaschen. Die Zellen wurden durch 15-minütige Inkubation in 500 µl kaltem Methanol (-20 °C) fixiert. Das Methanol wurde anschließend abgesaugt und die Proben 10-20 min an der Luft getrocknet. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit einem *Wasch- und Verdünnungspuffer* (0,5 g BSA + 100ml PBS) (3 x 2 min). Die Proben wurden zusammen mit jeweils 500 µl *Blocking-Solution* (0,2 g BSA + 20ml PBS + 20µl Triton) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden vor der Verwendung jeweils mit dem Wasch- und Verdünnungspuffer verdünnt (**Tab. 17**).

Antikörper	Verdünnung	Zusammensetzung
Primär-Antikörper Integrin (Merck Millipore, Darmstadt)	1:200	12 µI AK + 2388 µI Puffer
Primär-Antikörper Aktin (MP Biomedicals, Kalifornien, USA)	1:2000	3 µl AK + 2997 µl Puffer
Sekundär-Antikörper Integrin (Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit IgG, Invitrogen)	1:1000	2 µl AK + 3998 µl Puffer
Sekundär-Antikörper Aktin (Alexa Fluor 555, donkey anti- mouse IgG, Invitrogen)	1:2000	2 µl AK + 3998 µl Puffer

Tab. 17: Verdünnung der verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper (AK).

Zunächst wurde die Integrin-Färbung vorgenommen. Dazu wurden 400 µl des Primär-Antikörpers Integrin in jeweils zwei der drei Wells pro Werkstoff pipettiert. Das dritte Well wurde als Negativ-Kontrolle verwendet. Nach einer 45 minütigen Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurden die gefärbten Proben mit dem Wasch- und Verdünnungspuffer gewaschen (3 x 2 min). Dann wurden 400 µl des verdünnten Sekundär-Antikörpers Integrin auf alle Proben gegeben (vgl. Tab. 17). Die Zugabe erfolgte auch auf die dritte Probe der Werkstoffe ("Negativkontrolle"). Nach einer Inkubationszeit von 40 min - abgedeckt bei Raumtemperatur - erfolgte ein erneuter Waschschritt (3 x 20 min). Der zweite Antikörper wurde auf die gleiche Weise verwendet. 400 µl des verdünnten Primär-Antikörpers Aktin wurden in die Wells pipettiert. Die Negativkontrollen wurden ausgelassen. Die Platte wurde abgedeckt 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Spülung mit dem Wasch- und Verdünnungspuffer (3 x 2 min) wurden 400 µl des zweiten Sekundär-Antikörpers Aktin auf alle Proben gegeben (vgl. Tab. 17). Die Inkubation erfolgte zugedeckt für 40 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben mit dem Wasch- und Verdünnungspuffer (3 x 2 min) und zusätzlich mit PBS (1 x 2 min) gespült. Im letzten

Färbeschritt wurden die Zellkerne kenntlich gemacht. Dazu wurden 500 µl DAPI-Lösung (1:10.000 mit PBS verdünnt) in jedes Well pipettiert und 1 min inkubiert und abschließend mit PBS gewaschen (2 x 2 min). Die Zellen wurden am Fluoreszenz-Mikroskop (AXIO Imager M2m, Zeiss, Wetzlar) visualisiert. Dazu wurde eine Mehrkanalaufnahme gemacht, bei der DAPI (blau), FITC (grün) und TRITC (rot) parallel aufgenommen wurden.

3.4.5.2 Differenzierung von hMSCs zu Osteoblasten

Die Differenzierung von hMSCs zu Osteoblasten erfolgte mit Hilfe eines OIM-Mediums (osteogenic induction medium). Dieses setzte sich wie folgt zusammen:

- DMEM low glucose (Sigma, München),
- 10 Vol.-% FCS (10 ml/500 ml) (Sigma/Gibco),
- 1 Vol.-% LG-PS (5 ml/500 ml) (P11-0,13, PAA Laboratories, Cölbe),
- 100 nM Dexamethason (1:1000, Stock 100 μM, -20 °C),
- 10 mM ß-Glycerophosphat (1:100, Stock 1 M, -20° C) und
- 0,05 mM L-Ascorbinsäure-2-phosphat (1:100, Stock 5 mM, -20° C) (A8960, Sigma, München).

Für Differenzierungsuntersuchungen von hMSCs wurden 31.000 Zellen/cm² ausplattiert. Einen Tag nach der Aussaat wurde das Zellmedium durch das OIM-Medium ersetzt, um die osteogene Differenzierung zu induzieren. Üblicherweise wurden die Versuchsreihen zur Negativ-Kontrolle statt mit OIM-Medium mit dem Standardkulturmedium für hMSCs kultiviert. Aufgrund der geringen Anzahl zur Verfügung stehender Prüfkörper konnte bei einem Teil der durchgeführten Experimente (bei Messungen am Überstand) der erste Messtag als Negativkontrolle verwendet werden, da die Differenzierung frühestens nach 7 Tagen einsetzt. Differenzierungsexperimente laufen in der Regel über einen Zeitraum von 3 Wochen [101], [125]. Dabei erfolgen Medienwechsel dreimal pro Woche. Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung können anschließend Analysen am Überstand (z. B. Proteine im Überstand) oder anhand der Zellen (z. B. Alizarin-Rot-Färbung, qualitative Realtime-PCR) durchgeführt werden [12], [101], [175].

3.4.5.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung

Nachweis osteogener Differenzierung mittels Rasterelektronemikroskop

Da die Alizarin-Rot-Färbung als allgemein übliche Methode zum Nachweis osteogener Differenzierung aufgrund der Calcium-haltigen Werkstoffe nicht verwendet werden konnte, wurde eine Methode am Rasterelektronenmikroskop entwickelt. Um die Zellen auf den Prüfkörpern rasterelektronenmikroskopisch untersuchen zu können, mussten diese zunächst auf der Probenoberfläche fixiert werden. Das war auch nötig, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Dieser Schritt erfolgte sehr vorsichtig, um die Zellen nicht von den Proben zu lösen. Nachdem Glutaraldehyd und die zugehörige Puffer-Lösung vermischt worden waren, wurde die Lösung langsam in die Wells gegeben, bis die Prüfkörper bedeckt waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Flüssigkeit nicht direkt auf die Zellen gegeben wurde, um die Zellen nicht zu beschädigen. Nach einer vier-stündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Fixierungsmedium abgesaugt. Es folgte eine Trocknungsreihe, indem nacheinander 30, 50, 70 und 100 %-iges Ethanol jeweils für 10 min auf die Proben gegeben wurde. Die Prüfkörper wurden dann in der Wellplatte angekippt, um sie für die Analysen nach der Trocknung leichter aus der Wellplatte nehmen zu können. Die Prüfkörper wurden mindestens 24 h an Luft getrocknet, bevor sie im REM untersucht wurden. Die Analysen im REM erfolgten dann mit Hilfe einer EDX-Analyse, um Calciumablagerungen aufgrund Differenzierung osteogener bzw. aktiver Osteoblasten nachzuweisen.

Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität

Zur Analyse des Fortschritts der osteogenen Differenzierung wurden die entwickelten Werkstoffe zunächst auf die *Alkalische Phosphatase*-Aktivität (ALP) der hMSCs untersucht. Die folgenden Werkstoffe wurden mit hMSCs besiedelt (31.000 Zellen/cm², 21 Tage, dreifach Bestimmung):

- 40/30/30rf,
- 50/25/25rf,
- 60/20/20rf,
- 60/30/10rf,
- 60/40TCP,
- PDLLA,
- 60/20/20SrCO3,
- 60/20/10CCrf/10SrCO3,
- Well-Kontrolle und
- Glas-Kontrolle.

Die Messungen wurden am Überstand durchgeführt, so dass dieselben Prüfkörper für den gesamten Untersuchungszeitraum verwendet werden konnten. Der Überstand von Tag 1 (= einen Tag nach OIM-Zugabe) wurde als Referenz ("noch keine Differenzierung") verwendet. Die weiteren Untersuchungszeiträume waren 7 und 14 Tage. Die Zellen wurden nach 14 Tagen fixiert und am REM untersucht.

Die gesammelten Überstände wurden nach der Entnahme eingefroren (-20 °C) und später gesammelt auf die ALP-Aktivität hin analysiert. Zur Vorbereitung wurde der Assay-Buffer auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reagenzien wurden kurz anzentrifugiert ("Pulse") und während der Durchführung auf Eis gestellt. Für 50 Proben wurde eine pNPP-Tablette in 2,7 ml Assay Buffer (= 5 mM pNPP Work Solution) aufgelöst und gut vermischt. Die Lösung wurde abgedeckt und auf Eis gelagert. Zusätzlich wurde eine 1 mM pNPP Work Solution für eine zusätzlich mitzuführende Standardreihe angesetzt (48 µl 5 mM pNPP Work Solution + 192 µl Assay Buffer). Die ALP-Enzyme wurden herunterzentrifugiert und in 1 mL Assay Buffer aufgelöst. Im Weiteren wurden die Proben und die Kontrollen vorbereitet,

indem zunächst 30 µl des ALP-Puffers in die entsprechende Anzahl Wells einer 96er-Wellplatte pipettiert wurde. Anschließend wurden jeweils 18 µl der Proben bzw. der Kontrolle (= verwendetes Kulturmedium) in Doppelbestimmung dazugegeben. Der Standard wurde nach folgendem Schema vorbereitet:

Komponente	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6
ALP-Puffer	72 µl	68 µl	64 µl	60 µl	56 µl	52 µl
1 mM pNPP	0 µl	4 µl	8 µl	12 µl	16 µl	20 µl

	Tab.	18: Zusammensetzun	a der	Standards	für die	e Standardkurve.
--	------	--------------------	-------	-----------	---------	------------------

Der ALP-Puffer wurde vorgelegt, dann erfolgte die Zugabe von 1 mM pNPP in die 96er-Wellplatte. Auch der Standard wurde in Doppelbestimmung angesetzt. Die Mischung wurde kurz auf dem Schüttler homogenisiert. Der Test wurde gestartet, indem 30 µl der 5 mM *pNPP Work Solution* in jedes Well mit den Proben bzw. den Kontrollen pipettiert wurde. Bereits nach Zugabe in das erste Well wurde die Zeit gemessen. Jeweils 6 µl der ALP Enzyme Solution wurde in jedes Well mit dem Standard pipettiert. Die Platte wurde erneut kurz auf dem Schüttler homogenisiert. Nach 60 min Inkubationszeit bei 25 °C (vor Licht geschützt), wurde der Test durch Zugabe von 12 µl Stop Solution in jedes Well (Proben, Kontrolle und Standard) beendet. Nach Mischen auf dem Schüttler wurde die Platte bei 405 nm im *SpectraMax* (SpectraMax M2, Molecular Device, Kalifornien, USA) gemessen.

Eine Wiederholung der Untersuchung erfolgte mit den folgenden Werkstoffen:

- 60/20/20rf,
- 60/20/10CCrf/10SC,
- 60/20/20SC,
- 60/40TCP und
- 60/40Sr13TCP.

Da ALP als klassischer Marker für die Knochenneubildung gilt, können anhand der ALP-Aktivität Aussagen über die osteogene Differenzierung von hMSCs zu Osteoblasten getroffen werden.

Nachweis osteogener Differenzierung mittels Osteolmage

Der Nachweis von Calciumphosphat-Ablagerungen auf der Prüfkörperoberfläche infolge osteogener Differenzierung erfolgte über das *Osteolmage-Kit*. Im Gegensatz zu herkömmlichen Nachweismethoden, die auf der Detektion von Calcium-Ionen beruhen, weist *Osteolmage* spezifisch Hydroxylapatit nach. Nach der Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) auf warmgepressten Prüfkörpern unter Zugabe von Induktionsmedium (vgl. Kap. 3.4.5.2) über 7, 14 und 21 Tage in einer 24er-Wellplatte erfolgte neben einem quantitativen Nachweis auch ein qualitativer Nachweis. Zum quantitativen Nachweis wurden die Prüfkörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und anschließend photometrisch gemessen. Zum qualitativen Nachweis wurden die Prüfkörper unmittelbar nach der quantitativen Messung am Mikroskop visualisiert (AXIO Imager M2m, Zeiss, Wetzlar). Untersucht wurden die Werkstoffe aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat bzw. 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP.

Entsprechend der Kit-Anweisung wurde die Stocklösung des Waschpuffers 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Das Färbereagenz wurde 1:100 mit dem Färbereagenz-Puffer verdünnt. An den entsprechenden Messtagen wurden die Wellplatten mit den kultivierten Prüfkörpern aus dem Inkubator entnommen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nachdem das verbrauchte Medium aus den Wells abgesaugt und separat gelagert wurde, wurde jedes Well mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch eine 20-minütige Inkubation mit Ethanol fixiert. Nachdem das Ethanol entfernt worden war, wurden die Wells je einmal mit dem Waschpuffer gespült. Nachdem auch dieser wieder entfernt worden war, wurde in jedes Well 500 µl des verdünnten Färbereagenzes pipettiert. Die Inkubation erfolgte abgedeckt und geschützt vor Licht erfolgte für 30 min. Nachdem das Färbereagenz verworfen worden war, wurden die Wells jeweils dreimal mit 1000 µl Waschpuffer gespült. In jedem Waschschritt wurde der Puffer für 5 min im Well belassen. Nach dem letzten Waschschritt wurden für die Messungen 1000 µl frischer Waschpuffer in die Wells gegeben. Die quantitative Analyse erfolgte durch die Messung am SpectraMax (SpectraMax M2, Molecular Device, Kalifornien, USA). Die Anregung erfolgte bei 492 nm, die Emission bei 520 nm. Anschließend wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt (vgl. Kap. 3.4.5.1), um die Zellkerne zu visualisieren. Die Mikroskopaufnahmen wurden im blauen und im grünen Kanal vorgenommen.

Zusätzlich wurde am Überstand die *Alkalische Phosphatase*-Aktivität gemessen, um den Fortschritt der Differenzierung auf einem zweiten Weg zu begutachten und die beiden Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Dazu wurde das zu Beginn der Untersuchung abgenommene Medium der jeweiligen Messtage verwendet.

3.4.6 Resorptionsuntersuchungen

Um den Materialabbau auf zellulärer Ebene beurteilen zu können, wurden Experimente mit Makrophagen (RAW 264.7) bzw. zu Osteoklasten differenzierten Makrophagen (OK) durchgeführt. Dazu wurden Prüfkörpern aus verschiedenen Werkstoffzusammensetzungen in einer 24er-Wellplatte mit einer RAW-Zell-konzentration von 1500 Zellen/cm² kultiviert. Nachdem das RPMI-Medium mit den zugehörigen Reagenzien (10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) angesetzt worden war, wurden die Differenzierungsfaktoren MCS-F und RANKL (beide PeproTech, Hamburg) jeweils in der Konzentration 2 µg/ml in 0,1% BSA/PBS gelöst. In jedes Well wurden 500 µl RPMI-Medium gegeben, welches dann durch 5 µl der RANKL-Stammlösung und 2,5 µl der MCS-F-Stammlösung ergänzt wurde. Ein Teil der Prüfkörper wurde zur Kontrolle ohne

Differenzierungsfaktoren kultiviert. Um Aussagen über den zellulären Materialabbau treffen zu können, wurde das Medium an den Tagen des Mediumwechsel auf den pH-Wert hin untersucht. Die Hypothese war, dass der pH-Wert aufgrund des aciden Polymerabbaus abfallen sollte, je mehr aktive Osteoklasten vorhanden waren. Außerdem war zu klären, ob eine Zellschädigung basierend auf einem möglichen pH-Wert-Abfall stattfinden konnte.

Um das Verhalten der RAW 264.7-Makrophagen auf der Materialoberfläche gut beurteilen zu können, wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 1500 Zellen/cm² ausgesät. Nach einer 14-tägigen Kultivierung auf einem Werkstoff aus 60/20/20rf (Mediumwechsel zweimal pro Woche) wurden die Zellen am REM analysiert. Zusätzlich wurde auch in dieser Versuchsreihe der pH-Wert untersucht.

In einem weiteren Versuch wurden RAW-Zellen mit einer Dichte von 30.000 Zellen/cm² ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Differenzierungsfaktoren M-CSF und RANKL in den gleichen Konzentrationen wie zuvor zugegeben. Die Zellen wurden nach 14 Tagen mittels TRAP-Färbung visualisiert, um Osteoklasten von den RAW-Zellen unterscheiden zu können. Osteoklasten zeichnen sich dadurch aus, dass sie mehrere Zellkerne haben [49, S. 13], wohingegen RAW-Zellen nur einen einzigen Zellkern besitzen [148, S. 700]. Nachdem das alte Medium von den Zellen abgesaugt worden war, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen 30 sec mit einer Lösung aus 25 ml Zitratlösung, 65 ml Aceton und 8 ml 37 %-igem Formaldehyd (500 µl/Well) fixiert. Für die Färbung wurde eine Lösung aus 4500 µl vorgewärmten demineralisiertem Wasser (37 °C), 100 µl Fast Garnet GBC-Lösung (hergestellt aus 50 µl Fast Garnet Standardlösung und 50 µl Natriumnitritlösung), 200 µl Acetatlösung, 50 µl Naphtol-AS-Bi-Phosphorsäure und 100 µl Tartratlösung angesetzt. Nach Entnahme der Fixierlösung wurden die Zellen mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Dann wurden in jedes Well 500 µl der Färbelösung gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mehrmals mit Wasser gewaschen. Um die Zellkerne kenntlich zu machen, wurden 500 µl Hämatoxylin in jedes Well pipettiert und 2 min inkubiert. Nachdem die Zellen erneut mit Wasser gewaschen wurden, konnten die Proben mikroskopiert werden (AXIO Imager M2m, Zeiss, Wetzlar).

Um eine Alternative zur TRAP-Färbung zum Nachweis der Osteoklasten zu erforschen, wurde die zuvor beschriebene Untersuchung wiederholt. Die Visualisierung der Zellen bzw. der Aktinringe erfolgte durch eine Immunfluoreszenzfärbung des Aktins (vgl. Kap. 3.4.5.1).

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel wird zunächst auf die Ergebnisse im Rahmen der Herstellung der Verbundwerkstoffe und der Prüfkörper, sowie auf deren Charakterisierung eingegangen. Daran anschließend folgen die Ergebnisse der Degradationsstudien und der zellbiologischen Untersuchungen.

4.1 Aufbereitung und Charakterisierung der Werkstoffe

4.1.1 Analyse der Verbundwerkstoffe

Werkstoff- und Phasenreinheit

Durch die Polyurethan-Beschichtung konnte ein Abrieb der Mahltrommel verhindert werden (Anhang, Abb. 105). Die Elementanalyse des Pulvers zeigte zudem keine Verunreinigungen (Anhang, Tab. 39). Die Röntgenbeugungsanalysen zeigten sowohl reine Phasen der Ausgangsmaterialien (Anhang, Abb. 106a und b) als auch des Verbundwerkstoffes (Anhang, Abb. 106c).

Partikelgröße

Die wichtigste Zielgröße bei der Werkstoffaufbereitung war die Partikelgröße, die über die Mahldauer eingestellt wurde. Angestrebt wurde ein d90-Wert von maximal 100 µm. In Abhängigkeit der Zusammensetzung und der Mahldauer wurden jedoch unterschiedliche Partikelgrößen der Verbundwerkstoffe erzielt (Tab. 19).

Abhängigkeit der Partikelgröße vom Polymeranteil

Der Vergleich der Partikelgrößen in Abhängigkeit von dem Polymeranteil ergab, dass die Partikelgröße bei gleicher Mahldauer bei 50 Gew.-% Polymer (d90 = 72 µm) geringer war als bei 40 Gew.-% (d90 = 90 µm) (Tab. 19). Dagegen war die Partikelgröße bei 60 Gew.-% Polymer im Durchschnitt (\overline{d} 90 = 93 <u>+</u> 14 µm) größer als bei 50 Gew.-% Polymer. Sie lag im gleichen Bereich wie bei 40 Gew.-%.

Abhängigkeit von der Variante des Calciumcarbonats

Der direkte Vergleich dreier Werkstoffe, die mit identischen Aufbereitungsparametern hergestellt wurden, aber in der Variante des Calciumcarbonats variierten, ergab bei rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat eine deutlich größer Partikelgröße als bei rhomboedrisch grobem Calciumcarbonat (Tab. 20). Das nadelige Calciumcarbonat lag im Bereich des groben.

Abhängigkeit der Partikelgröße von den Anteilen der keramischen Komponenten

Der direkte Vergleich von Werkstoffen, die mit identischen Parametern aufbereitet wurden, jedoch in den Anteilen der beiden Keramiken variierten, ergaben eine steigende Partikelgröße mit steigendem Anteil an Calciumcarbonat (Tab. 21).

Probe	Mahldauer (Tage)	Partikelgröße d90 (in µm)	
40PDLLA-30TCP-30CCrf	40 % PDLLA 30 % β-TCP 30 % CC rhomb. fein	19	90
50PDLLA-25TCP-25CCrf	50 % PDLLA 25 % β-TCP 25 % CC rhomb. fein	28	72
60PDLLA-20TCP-20CCrf-1		28	121
60PDLLA-20TCP-20CCrf-2	20 % B-TCP	28	91
60PDLLA-20TCP-20CCrf-3	20 % CC rhomb, fein	28	88
60PDLLA-20TCP-20CCrf-4		28	73
60PDLLA-20TCP-20CCrg-1	60 % PDLLA	30	92
60PDLLA-20TCP-20CCrg-2	20 % β-TCP 20 % CC rhomb. grob	28	72
60PDLLA-20TCP-20CCnad-1	60 % PDLLA	26	90
60PDLLA-20TCP-20CCnad-2	20 % β-TCP 20 % CC nadelig	28	70
60PDLLA-27.5TCP-12.5CCrf	60 % PDLLA 27.5 % β-TCP 12.5 Gew% CC rhomb. fein	30	88
60PDLLA-27.5TCP-12.5CCrg	60 % PDLLA 27.5 % β-TCP 12.5 % CC rhomb. grob	30	92
60PDLLA-30TCP-10CCrf	60 % PDLLA 30 % β-TCP 10 % CC rhomb. fein	28	60
60PDLLA-30TCP-10CCsph	60 % PDLLA 30 % β-TCP 10 % CC sphärolithisch	28	95
60PDLLA-35TCP-5CCrf	60 % PDLLA 35 % β-TCP 5 % CC rhomb. fein	30	88
60PDLLA-35TCP-5CCrg	60 % PDLLA 35 % β-TCP 5 % CC rhomb. grob	30	-
60PDLLA-35TCP-5CCsph	60 % PDLLA 35 % β-TCP 5 % CC sphärolithisch	28	76
60PDLLA-40TCP-1		28	85
60PDLLA-40TCP-2	60 % PDLLA	27	81
60PDLLA-40TCP-3	40 % β-TCP	28	60
60PDLLA-40TCP-4		28	65
50PDLLA-50TCP-1	50 % PDLLA	21	104
50PDLLA-50TCP-2	50 % β-TCP	21	79
60PDLLA-40CCrf-1	60 % PDLLA	28	104
60PDLLA-40CCrf-2	40 % CC rhomb. fein	28	106

Tab. 19: Übersicht über die hergestellten Werkstoffe, deren Mahldauer und die eingestellte Partikelgröße.
Werkstoff	Partikelgröße d90 (in µm)
60PDLLA-20TCP-20CCrhomb. fein	88,2
60PDLLA-20TCP-20CCrhomb. grob	72,3
60PDLLA-20TCP-20CCnadelig	70,3

Tab. 20: Direkter Vergleich von Werkstoffen gleicher Zusammensetzung, jedoch unterschiendlichen Calciumcarbonat-Varianten. Die Herstellungsparameter waren identisch.

Tab. 21: Direkter Vergleich von Werkstoffen mit variierendem Verhältnis der keramischen Komponenten. Die Herstellungsparameter waren identisch.

Werkstoff	Partikelgröße d90 (in µm)
60PDLLA-40TCP	85
60PDLLA-20TCP-20CCrf	91
60PDLLA-40CCrf	104

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Das einfache Vermischen der Einzelkomponenten über zwei Tage auf der Rollenbank ergab keine homogene Verteilung der Komponenten im Verbundwerkstoff (Anhang, Abb. 108 links). Über den entwickelten Mahlprozess konnte dagegen die homogene Verteilung gewährleistet werden (Anhang, Abb. 108 rechts). Die REM-Aufnahmen der Verbundwerkstoffpulver bestätigten die homogene Verteilung der Einzelkomponenten im Werkstoff (Abb. 20a). Während die Polymerkomponente aufgrund schwächerer Rückstreuung leichterer Elemente dunkler erscheint, werden die keramischen Partikel heller dargestellt. Unter Berücksichtigung der Auflösung (Maßstabbalken \triangleq 50 µm) konnte sichergestellt werden, dass alle drei Komponente in jedem Partikel enthalten waren. Die zur Überprüfung der Ergebnisse durchgeführten Elementanalysen hinsichtlich Calcium und Phosphor bestätigten die homogene Verteilung der Komponenten (Abb. 20). Calcium, das sowohl Bestandteil von β-TCP als auch von Calciumcarbonat war, war in jedem Partikel des Verbundwerkstoffes nachweisbar (Abb. 20b). Phosphor, der nur in β-TCP enthalten war, konnte ebenfalls in jedem Partikel nachgewiesen werden (Abb. 20c). Die Ergebnisse der drei untersuchten Werkstoffe 40/30/30rf, 50/25/25rf und 60/20/20rf (Gew.-% PDLLA/β-TCP/CCrf) stimmten überein.



Abb. 20: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Verbundwerkstoffpulver (a) und die Visualisierung von Calcium (grün) (b) und Phosphor (violett) (c). (Maßstabbalken \triangleq 50 µm). (vgl. [1]).

(Teile der vorgelegten Promotionsschrift wurden vorab in einer Originalarbeit [1] veröffentlicht.)

Der Nachweis des Einflusses des Mahlprozesses auf die Geometrie der Calciumcarbonat-Partikel erwies sich als schwierig, da die Vergrößerung in die Größenordnung der Partikel ($\emptyset \approx 0.5 \,\mu$ m) zu einer starken Degradation des Polymers führte (Abb. 21, Pfeile). Dabei bildeten sich Löcher und Krater an der Oberfläche. Da sich die Proben während der Messungen veränderten, war eine scharfe Aufnahme zudem schwierig.



Abb. 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines warmgepressten Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) im Sekundärionen-Modus (Maßstabbalken \triangleq 10 µm). Bei dieser Vergrößerung degradiert das Polymer sehr stark und es bilden sich Krater (Pfeile). (vgl. [1]).

Die Aufnahmen der drei Verbundwerkstoffe gleicher Zusammensetzung, die sich in ihrer Calciumcarbonat-Variante unterschieden, zeigen bei 500-facher und 2500facher Vergrößerung keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22). Bei 5000-facher Vergrößerung erscheinen die Partikel des Verbundwerkstoffes mit rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat glatter als die beiden anderen Werkstoffe. In dem Verbundwerkstoff mit nadeligem Calciumcarbonat sind sehr feine Partikel erkennbar, die in der Größenordnung der Calciumcarbonat-Partikel liegen. Die Geometrie der Partikel ist jedoch nicht zu erkennen. So konnte bei diesem Werkstoff zwar die homogene Verteilung der Komponenten nachgewiesen werden, jedoch war die Beurteilung der Geometrie der Partikel nicht möglich. Die beiden Verbundwerkstoffe mit den rhomboedrischen Calciumcarbonat-Varianten waren noch schlechter im Hinblick auf die Calciumcarbonat-Verteilung und -Struktur zu beurteilen. Die Identifizierung der Partikel war nicht möglich.



Abb. 22: REM-Aufnahmen verschiedener Verbundwerkstoffpulver aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat mit verschiedenen Calciumcarbonat-Varianten (rhomboedrisch fein, rhomboedrisch grob und nadelförmig). Der Maßstabbalken entspricht bei 500-, 2500- und 5000-facher Vergrößerung 50, 10 bzw. 5 µm. (Aufnahmen von Schaefer Kalk).

Polymerdegradation

Der Mahlprozess führte zu einer Degradation des Polymers. Die Molmasse verringerte sich um 14 % (Tab. 22).

|--|

Prozessschritt	Molmasse (g/mol)
Ausgangspolymer PDLLA R208	2,2 * 10 ⁵ <u>+</u> 1,5
PDLLA nach dem Mahlprozess	1,9 * 10 ⁵ <u>+</u> 1,8

4.1.2 Materialoptimierung für die Anwendung im Laserschmelzprozess

Nach dem Laserschmelzprozess (durchgeführt von C. Gayer, Fraunhofer ILT, Aachen) wiesen die Schichten bei Verwendung Calciumcarbonat-haltiger Verbundwerkstoffe eine bräunliche Verfärbung auf, die mit ansteigender Laserleistung zunahm (Abb. 23b und c). Die Laserleistungen von 0,20 W bis 0,35 W entsprachen dabei Energiedichten der Laserstrahlung von 4,1 W/mm² bis 7,1 W/mm². Der Calciumcarbonat-freie Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew-% β -TCP wies diese Verfärbung nicht auf (Abb. 23a).



Abb. 23: Mittels Laserschmelzprozess erzeugte Schichten verschiedener Verbundwerkstoffe: 60 Gew.-% PDLLA/40 Gew.-% β -TCP, 60 Gew.-% PDLLA/40 Gew.-% Calciumcarbonat rhomb. fein und 60 Gew.-% PDLLA/20 Gew.-% β -TCP/20 Gew.-/ Calciumcarbonat rhomb. fein. Das Leistungsspektrum betrug 0,20 W bis 0,35 W, was Energiedichten der Laserstrahlung von 4,1 W/mm² bis 7,1 W/mm² entsprach. Übrige Parameter: Scangeschwindigkeit 50 mm/s, Spurabstand 20 µm, Strahldurchmesser 250 µm. (Fotos: C. Gayer, Fraunhofer ILT, Aachen).

Um die Calciumcarbonat-Partikel durch den Mahlprozess nicht zu verändern, wurde das Calciumcarbonat über einen Speedmixer nachträglich in den Werkstoff aus PDLLA und β -TCP eingebracht. Da sich das Pulver während des Speedmixer-Prozesses stark erwärmte und eine leichte Volumenvergrößerung zeigte, musste der Mischvorgang so kurz wie möglich gehalten. Durch mehrfache Wiederholung der Mischprozesse sowie kurze Abkühlphasen konnte die Aufheizung minimiert werden. Der Mahlprozess des PDLLA/ β -TCP-Grundpulvers verlängerte sich aufgrund des höheren Polymeranteils um sieben Tage. Die Partikelgröße des Verbundwerkstoffes mit 80 Gew.-% PDLLA war deutlich größer als mit 70 Gew.-% (Tab. 23). Obwohl der 80/20-Werkstoff mit einem Sieb mit einer Maschenweite von 125 µm abgesiebt wurde, war der d90-Wert größer.

Tab.	23:	Mittels	Speedmixer	hergestellte	Grundpulver	aus	PDLLA	und	β-ΤCΡ,	deren
Mahle	daue	r und Pa	artikelgröße.	-						

Werkstoff- bezeichnung	Zusammensetzung (Gew%)	Mahldauer (Tage)	Partikelgröße d90 (in µm)
80PDLLA-20TCP	80 % PDLLA 20 % β-TCP	35	132
70PDLLA-30TCP	70 % PDLLA 30 % β-TCP	35	85

Die REM-Aufnahmen (Aufnahmen vom ILT Aachen) des Verbundwerkstoffs aus 66 Gew.-% PDLLA, 17 Gew.-% β-TCP und 17 Gew.-% spärolithischem Calciumcarbonat zeigen, dass das Calciumcarbonat im gesamten Pulver verteilt ist und es keine lokalen Anhäufungen gibt (Abb. 24). Das Calciumcarbonat war anhand der Kugelform und der rauen Oberfläche eindeutig identifizierbar (vgl. Tab. 6). Da die Partikelgröße des sphärolithischen Calciumcarbonats größer war als die bisher untersuchten Varianten (0,5-3 µm), war es möglich, die Partikel am REM zu visualisieren, ohne dass das Polymer degradierte. Aufnahmen des Werkstoffs mit rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat gelangen auch im Rahmen dieser Untersuchung nicht. Basierend auf den Ergebnissen bezüglich des sphärolithischen Calciumcarbonats wurde davon ausgegangen, dass die Verteilung der Komponenten in diesem Werkstoff ebenfalls homogen im Werkstoff war.



Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines mittels Speedmixers hergestellten Verbundwerkstoffs aus 66 Gew.-% PDLLA, 17 Gew.-% β -TCP und 17 Gew.-% spärolithischem Calciumcarbonat. Maßstabbalken 20 µm (links) bzw. 2 µm (rechts). (Aufnahmen: C. Gayer, Fraunhofer ILT, Aachen).

Die Wiederholung des Schmelzprozesses an den mittels Speedmixers hergestellten Verbundwerkstoffen aus 66 Gew.-% PDLLA, 17 Gew.-% B-TCP und 17 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) zeigte bei den gleichen Leistungsparametern durchgehend weiße Schichten (Abb. 25 links, vgl. Abb. 23, Aufnahmen von C. Gayer, ILT Aachen). Der direkte Vergleich der Speedmixer-Werkstoffe mit sphärolithischem rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat und zeigte, dass das feinere Calciumcarbonat bei gleichen Leistungsparametern eine stärkere Verfärbung des Materials aufwies (Abb. 25 Mitte und rechts, Aufnahmen von C. Gayer, ILT Aachen). Während der Sphärolith-Werkstoff bei 0,40 W (≙ 8,1 W/mm²) noch weiß erschien, war beim Rhomboeder-Werkstoff bereits eine Verfärbung zu erkennen. Selbst bei einer Leistung von 0,70 W (≙ 14,3 W/mm²) zeigte der Sphärolith-Werkstoff nur eine geringe Verfärbung, während der Rhomboeder-Werkstoff eine starke Verkohlung aufwies.

	sphärol	rhomboed	lrisch fein		
0,20 W	0,25 W	0,40 W	0,50 W	0,40 W	0,50 W
114	1 And	and the second s	1200	TRA	MUSE .
The for	- 1	E	E		18%
		and the second s	ALCONT .		
E T			1	Est.	100
	E				
0.30 W	0.35 W	0.60 W	0.70 W	0.60 W	0.70 W

Abb. 25: Mittels SLM-Prozess erzeugte Schichten der Speedmixer- Verbundwerkstoff aus 66 Gew.-% PDLLA, 17 Gew.-% β -TCP und 17 Gew.-% sphärolithischem Calciumcarbonat (links und Mitte) bzw. rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat (rechts). Das Leistungsspektrum betrug 0,40 W, 0,50 W, 0,60 W und 0,70 W, was Energiedichten der Laserstrahlung von 8,1 W/mm², 10,2 W/mm², 12,2 W/mm² und 14,3 W/mm² entspricht. Übrige Parameter: Scangeschwindigkeit 50 mm/s, Spurabstand 20 µm, Strahldurchmesser 250 µm. (Fotos und Prozess: C. Gayer, Fraunhofer ILT Aachen).

4.1.3 Zugabe von Strontium-haltigen Komponenten

Die folgende Tabelle zeigt die synthetisierten strontiumhaltigen Verbundwerkstoffe, deren Mahldauer und die Partikelgröße:

Tab. 24: Strontiumhaltige Werkstoffe basierend auf 60 Gew.-% PDLLA, deren Mahldauer und Partikelgröße.

Probe	Zusammensetzung (Gew%)	Mahldauer (Tage)	Partikelgröße d90 (in µm)
60PDLLA-20TCP-10CCrf-10SC	60 % PDLLA 20 % β-TCP 10 % CCrf 10 % SrCO ₃	28	79
60PDLLA-20TCP-20SC	60 % PDLLA 20 % β-TCP 20 % SrCO ₃	30	47
60PDLLA-40Sr13TCP	60 % PDLLA 40 % Strontium-β-TCP	30	63

Der Werkstoff, der neben Strontiumcarbonat auch Calciumcarbonat enthielt wies eine deutlich größere Partikelgröße auf als der Werkstoff der nur Strontiumcarbonat enthielt. Die Partikelgröße war 68 % größer. Der Werkstoff aus PDLLA und Strontium-substituiertem β -TCP wies eine Partikelgröße zwischen den Werten der beiden anderen Werkstoffe auf (63 µm). Der Werkstoff mit Strontium- und Calciumcarbonat wurde 28 Tage aufgemahlen, die beiden übrigen 30 Tage.

4.1.4 PLLA-basierte Werkstoffe

Da das verwendete PLLA in Granulatform vorlag und für den entwickelten Mahlprozess zu hart war, wurden die Werkstoffe von der Firma Schaefer Kalk GmbH & Co. KG über eine Stahlmühle hergestellt. Durch Entfernen des Feinanteils aus dem Pulver variierten die Werkstoffe geringfügig in ihrer Zusammensetzung (Tab. 25). Die Partikelgrößen (d50) variierten zwischen 50 und 87 µm (Tab. 25).

Werkstoff- bezeichnung	Zusammensetzung (Gew%)	Partikelgröße d50 (in µm)
78PLLA-22CCsp-(-29)	78 % PDLLA 22 % CCsph	87
76PLLA-24CCsp-(-39)	76 % PDLLA 24 % CCsph	50
77PLLA-23CCsp-(-61)	77 % PDLLA 23 % CCsph	54

Tab. 25: Mittels Stahlmühle erzeugte Werkstoffe	e (Schaefer Kalk GmbH & Co. KG).
---	----------------------------------

4.1.5 Kurzzusammenfassung Ergebnisse Werkstoffaufbereitung

Es gelang einen Mahlprozess zu etablieren, mit dem verschiedene Zusammensetzungen eines Werkstoffes aus PDLLA, β -TCP und Calciumcarbonat hergestellt werden konnten. Es wurde eine homogene Verteilung der einzelnen Komponenten im Werkstoff nachgewiesen. Zudem wurden verschiedene Calciumcarbonat-Varianten in die Werkstoffe integriert. Die Zielpartikelgröße von maximal 100 µm wurde erreicht. Die d90-Werte lagen zwischen 70 und 100 µm, wobei die Partikelgröße bei einem höheren β -TCP-Gehalt abnahm. Neben Calciumcarbonat wurden Strontiumcarbonat und Strontium-substituiertes β -TCP in die Werkstoffe eingebracht. Im SLM-Prozess zeigten die Werkstoffe bei Anwesenheit von Calciumcarbonat eine bräunliche Verfärbung. Diese nahm sowohl mit steigendem Calciumcarbonat-Anteil sowie mit sinkender Partikelgröße der Calciumcarbonat-Variante zu.

Die PLLA-Werkstoffe konnten aufgrund der Härte der Polymergranulate nicht über den etablierten Mahlprozess hergestellt werden. Die Aufbereitung erfolgte über eine Stahlmühle bei der Fa. Schaefer Kalk.

4.2 Herstellung der Prüfkörper

4.2.1 Herstellung warmgepresster Prüfkörper

Folgende Methoden zur Herstellung von Prüfkörper wurden verwendet:

- Aufschmelzen in Aluminiumformen,
- Kaltpressprozess mit anschließendem Aufschmelzen,
- Warmpressprozess, und
- Laserschmelzprozess (separate Betrachtung in Kap. 4.2.3).

Die Prüfkörper, die hergestellt wurden, indem das Pulver in Aluminiumformen im Ofen aufgeschmolzen wurde, zeigten eine hohe Porosität (Abb. 26). Diese nahm zwar mit steigendem Polymeranteil ab, jedoch konnten Unebenheiten an der Oberfläche nicht vermieden werden. Zudem konnte die gewünschte zylindrische Form nicht erreicht werden, so dass keine reproduzierbaren Prüfkörper hergestellt werden konnten.



Abb. 26: In Aluminiumformen (a) bei 200 °C aufgeschmolzene Prüfkörper aus 40/30/30rf (b), 50/25/25rf (c) und 60/20/20rf (d) (PDLLA/ β -TCP/CCrf).

Weder das Aufschmelzen kaltgepresster Prüfkörper im Ofen, noch das zusätzliche Aufbringen einer Last durch eine Platte führten zu formtreuen Prüfkörpern (Anhang, Abb. 109). Erst über den Warmpressprozess konnten definierte und formtreue Prüfkörper hergestellt werden (Abb. 27). Die Prüfkörper unterschieden sich in Abhängigkeit der Zusammensetzung in der Farbe. Die Prüfkörper aus PDLLA und Calciumcarbonat waren leicht gelblich (Abb. 27 a und b), während die Prüfkörper aus PDLLA, B-TCP und Calciumcarbonat (Abb. 27c) sowie PDLLA und B-TCP weiß waren (Abb. 27d und e). Das reine PDLLA war nahezu farblos (Abb. 27f). Die optimale Matrizentemperatur war 150 °C, eine Presskraft von 3 kN und eine Haltezeit von 180 s. Sowohl bei geringeren Temperaturen als auch bei kürzeren Haltezeiten konnte das Polymer nicht gänzlich aufgeschmolzen werden. Die Kombination aus Kalt- und Warmpressprozess führte zwar zu einem geringeren Materialverlust während des Warmpressens, jedoch war der Arbeitsaufwand doppelt so hoch wie beim einfachen Warmpressprozess. Die hergestellten Prüfkörper beider Methoden zeigten keine signifikanten Unterschiede, so dass für die weiteren Untersuchungen der einfache Warmpressprozess verwendet wurde.



Abb. 27: Warmgepresste Prüfkörper aus 80/20CCrf (a), 50/50CCrf (b), 60/20/20rf (c), 80/20TCP (d), 50/50TCP (e), PDLLA (f) bei 150 °C.

Warmgepresste Prüfkörper aus dem PLLA-Werkstoff konnten nicht erfolgreich hergestellt werden. Da die Matrize bei Temperaturen über 180 °C nicht mehr auseinander geschraubt werden konnte, mussten die Prüfkörper bei 180 °C hergestellt werden. Dies hatte jedoch zur Folge, dass das Polymer nicht gänzlich aufschmolz. Ein Teil der Versuche wurde dennoch zu Vergleichszwecken mit den warmgepressten Prüfkörpern hergestellt.

4.2.2 Charakterisierung der warmgepressten Prüfkörper

Polymerdegradation

Der Warmpressprozess hatte keinen Einfluss auf die Molmasse des Polymers (Tab. 26). Die gemessenen Werte waren identisch.

	•
Prozessschritt	Molmasse (g/mol)
PDLLA nach dem Mahlprozess	1,9 * 10 ⁵ <u>+</u> 1,8
PDLLA nach dem Warmpressen	1,9 * 10 ⁵ <u>+</u> 1,8

Tab. 26: Molare Masse des Polymers vor und nach dem Warmpressen.

Dichte der Prüfkörper

Die Ermittlung der Dichte der warmgepressten Prüfkörper mittels einfachen Ausmessens und Abwiegen ergab eine Dichte von 82 % (Tab. 27). Die Standardabweichung beim Vergleich von fünf Prüfkörpern war vernachlässigbar gering. **Tab. 27:** Dichte der warmgepressten Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein). Die theoretische Dichte des Verbundwerkstoffes bei 0 % Porosität beträgt 1,92 mg/mm³.

Probe	Masse (mg)	Volumen (mm ³)	Dichte (mg/mm ³)	Dichte theoretische Dichte * 100%	Mittelwert Dichte (%)
1	293	185,18	1,58	82,41	
2	293	186,15	1,57	81,98	
3	293	186,60	1,57	81,78	81,71 <u>+</u> 0,62
4	292	188,40	1,55	80,73	
5	295	188,15	1,57	81,66	

Die Ermittlung der Dichte mittels Pyknometer erfolgte über die folgenden Gleichungen und die in Tabelle 29 angegebenen Definitionen [40, S. 49], [159, S. 217].

$$V(verdrängtes Wasser) = \frac{m(verdrängtes Wasser)}{\rho_{Wasser}} = V(Probe)$$
(Gl. 8)

$$\rho_{Probe} = \frac{m_{Probe} * \rho_{Wasser}}{m_{verdrängtes Wasser}}$$
(GI. 9)

$$m(verdrängtes Wasser) = m(P_{gefüllt}) - [m(P_{gefüllt} + Probe) - m(Probe)]$$
(Gl. 10)

$$\rho_{\text{spezifisch}} = \frac{m_{\text{Probe}}}{m_{\text{Verbundwerkstoff}}} * 100 \%$$
 (GI. 11)

Tab. 28: Definitionen zur Berechnung der Prüfkörperdichte mittels Pyknometer.

Variable	Definition
m(P _{leer})	Pyknometer leer (41,99 g)
m(P _{gefüllt})	Pyknometer mit Wasser gefüllt (90,90 g)
m(P _{gefüllt} +Probe)	Pyknometer mit Probe und mit Wasser gefüllt (41,99 g + m(Probe) - verdrängtes Wasser)
Pwasser	Dichte von Wasser (0,9982 mg/mm ³)
m(verdrängtes Wasser)	Masse des verdrängten Wassers
V(verdrängtes Wasser)	Volumen des verdrängten Wassers
V(Probe)	Volumen der Probe V(Probe) = V(verdrängtes Wasser)

Die drei sich in ihrer Masse unterscheidenden Prüfkörper ergaben Dichten von 72 bis 84 % (Tab. 29). Die Dichte nahm mit dem Prüfkörpervolumen zu.

des Verbundwerkstoffes bei 0 % Porosität beträgt 1,92 mg/mm³.						
Probe (60/20/20rf)	Masse (g)	verdrängtes Wasser (g)	Volumen (cm³)	Dichte (g/cm³)	$\frac{\text{Dichte}*100~\%}{\text{Dichte}_{theoretisch}}$	
1	0,158	0,113	0,113	1,39	72,4	
2	0,130	0,084	0,084	1,55	80,7	
		1				

0,430

1,62

84,4

Tab. 29: Mittels Pyknometer ermittelte Dichte der Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein). Die theoretische Dichte des Verbundwerkstoffes bei 0 % Porosität beträgt 1,92 mg/mm³.

Verteilung der Materialien in den warmgepressten Prüfkörpern

0,429

Da nicht sichergestellt werden konnte, dass die Herstellung von Querschliffen nicht zu einer Veränderung der Elementverteilung führte, wurden die weiteren Untersuchungen an mittels Kryobruch erzeugten Bruchflächen durchgeführt. Im Rückstreuelektronen-Modus war aufgrund der Polymerdegradation keine hochaufgelöste Aufnahme möglich (Anhang, Abb. 110). Die Zuordnung der Materialien aufgrund der Rückstreuintensitäten war nicht eindeutig möglich. Die Topographie der Prüfkörper war im Sekundärionen-Modus sehr gut zu erkennen (Abb. 28). Die Materialien wurden über die Partikelgrößen zugeordnet. Die glatten Flächen sind dem Polymer zuzuordnen. Zu erkennen ist auch, dass das Polymer im Warmpressprozess gänzlich aufgeschmolzen war. Das Polymer benetzt die ß-TCP-Partikel, die eine Größe von etwa 5 µm aufwiesen. Die kleinen, staubartigen Partikel sind überwiegend dem Calciumcarbonat zuzuweisen.



Abb. 28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der inneren Struktur eines Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) nach einem Kryobruch im Sekundärionen-Modus (Maßstabbalken \triangleq 10 µm). (vgl. [1]).

3

0,699

Prüfkörperoberfläche

Die ermittelten Kontaktwinkel lagen bei allen Werkstoffen im gleichen Bereich (Anhang, Abb. 111). Die Werte lagen unter 90 °, wiesen aber eine Tendenz zur Hydrophobie auf. Die Mittelwerte der Prüfkörperrauheit (maximaler Höhenunterschied) lagen zwischen 7 und 13 μ m (Anhang, Abb. 112). Die Standardabweichungen waren hoch in Bezug auf die ermittelten Rauheiten.

4.2.3 SLM-Prüfkörper

Die SLM-Prüfkörper wurden am *Fraunhofer-Institut für Lasertechnik Aachen (ILT Aachen)* mittels Laserschmelzprozess hergestellt. Die PDLLA-Prüfkörper wiesen mit steigendem Calciumcarbonat-Anteil eine bräunliche Verfärbung auf (Abb. 29a-c). Der Calciumcarbonat-freie Werkstoff war dagegen weiß (Abb. 29d).



Abb. 29: Mittels SLM-Prozess hergestellte PDLLA Prüfkörper: 60/20/20rf (a), 60/30/10sph (b), 60/35/5sph (c), 60/40TCP (d) (Gew.-% PDLLA/TCP/CC) (Foto von C. Gayer, ILT Aachen).

Die PLLA-Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% Calciumcarbonat (sph.) waren dagegen weiß (Abb. 30, Aufnahmen vom ILT Aachen). Erst bei höheren Laserleistungen bzw. höheren Energiedichten der Laserstrahlung kam es zu einer Verfärbung der Prüfkörper.



Abb. 30: Mittels SLM-Prozess hergestellte Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% Calciumcarbonat (sph) bei unterschiedlichen Laserleistungen. Die Laserleistungen entsprachen dabei Energiedichten der Laserstrahlung von 3,4 bis 6,4 W/mm². (Foto von C. Gayer, ILT Aachen).

4.2.4 Kurzzusammenfassung Ergebnisse Prüfkörperherstellung

Über den Warmpressprozess konnten reproduzierbare Prüfkörper aus den PDLLAbasierten Werkstoffen hergestellt werden. Die Prüfkörper wiesen eine homogene Verteilung der Einzelkomponenten des Werkstoffes auf. Der Warmpressprozess erfolgte ohne eine Degradation des Polymers. Es konnte eine Prüfkörperdichte von 80 % erreicht werden. Wie bereits im Rahmen der Werkstoffaufbereitung beobachtet wiesen die Calciumcarbonat-haltigen Werkstoffe im Laserschmelzprozess eine bräunliche Verfärbung auf. Die Verfärbung nahm mit steigendem Calciumcarbonat-Gehalt zu. Der PLLA-basierte Werkstoff konnte dagegen im SLM-Prozess verfärbungsfrei verarbeitet werden. Warmgepresste Prüfkörper waren aus dem PLLA-basierten Werkstoff nicht herstellbar.

4.3 Mechanische Charakterisierung

4.3.1 Bestimmung der elastischen Konstanten

Die Bestimmung der elastischen Konstanten mittels Resonanzfrequenzdämpfungsanalyse (RFDA) ergab Poissonzahlen zwischen 0,61 und 0,79 (Tab. 30). Da diese Zahlen außerhalb des Definitionsbereichs der Poissonzahl lagen, wurde die Messung mit der Grindosonic-Methode wiederholt (Tab. 31).

Tab. 30: Mittels Resonanzfrequenzdämpfungsanalyse bestimmte elastische Konstanten der Verbundwerkstoffe aus 40/30/30rf, 50/25/25rf und 60/20/20rf (PDLLA/ β -TCP/CCrf).

Probe	E-Modul (GPa)	G-Modul (GPa)	Poissonzahl (-)
40	10,6 <u>+</u> 0,4	3,0 <u>+</u> 0,1	0,79 <u>+</u> 0,24
50	8,0 <u>+</u> 0,1	2,5 <u>+</u> 0,1	0,61 <u>+</u> 0,07
60	6,9 <u>+</u> 0,4	2,0 <u>+</u> 0,1	0,73 <u>+</u> 0,17

Tab. 31: MittelsGrindosonic-MethodebestimmteelastischeKonstantendesVerbundwerkstoffesaus60/20/20rf(PDLLA/ β -TCP/CCrf).UntersuchtwurdenebendemAusgangszustandauchderZustandnach2und5WochennachLagerunginWasser.

Probe	E-Modul (GPa)		G-Modul (GPa)		Poissonzahl v
60/20/20rf	6,9 <u>+</u> 0,1	40.0/	2,6 <u>+</u> 0,0	44.0/	0,32 <u>+</u> 0,01
60/20/20rf- 2W-Wasser	6,0 <u>+</u> 0,1	-13 %	2,3 <u>+</u> 0,0	-14 %	0,33 <u>+</u> 0,01
60/20/20rf- 5W-Wasser	- (berechnet 5,90)	-2%	2,2 <u>+</u> 0,0	-2 %	- (berechnet 0,33)

Bei der Messung der Probe, die 5 Wochen in Wasser gelagert wurde, konnte der E-Modul nicht eindeutig bestimmt werden. Grund dafür war, dass die aufgenommenen Schwingungen durch ein starkes Rauschen überlagert wurden. Die Messung wurde mehrfach wiederholt, jedoch konnte keine der entstandenen Maxima eindeutig als Biegefrequenz identifiziert werden. Unter der Annahme, dass der E-Modul prozentual entsprechend dem G-Modul variiert, wurde dieser kalkuliert. Die anschließende Berechnung der Poissonzahl ergab einen Wert von 0,33, der somit dem Wert nach 2 Wochen Lagerung in Wasser entsprach.

Nach 15-monatiger Lagerung eines Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) in Wasser wurde eine Poissonzahl von 0,35 ermittelt (Tab. 32). Der als Referenz mitgeführte Prüfkörper

ohne Lagerung in Wasser ergab eine Poissonzahl von 0,30, die somit etwas unterhalb der zuvor ermittelten Werte lag. Der G-Modul lag im gleichen Bereich, der E-Modul war bei dieser Messung etwas geringer als bei der vorigen Messung (Tab. 32, vgl. Tab. 31).

Tab. 32: Mittels Resonanzfrequenz-Dämpfungsanalyse ermittelte elastische Konstanten einesWerkstoffs aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-%

Probe	E-Modul (GPa)	G-Modul (GPa)	Poissonzahl v
60/20/20 rf ohne Lagerung	6,7 <u>+</u> 0,0	2,6 <u>+</u> 0,0	0,30 <u>+</u> 0,00
60/20/20rf nach 15 monatiger Lagerung in Wasser	4,6 <u>+</u> 0,0	1,7 <u>+</u> 0,0	0,35 <u>+</u> 0,01

4.3.2 Biegefestigkeit

4.3.2.1 Biegefestigkeit warmgepresster Prüfkörper

Alle Prüfkörper aus den entwickelten Verbundwerkstoffen zeigten ein sprödes Bruchverhalten bei der Durchführung der Ball-on-three-balls-Tests. Ein klassisches Bruchbild zeigt Abbildung 32 (links). Reines PDLLA wurde als Referenz ebenfalls mittels Ball-on-three-balls-Test untersucht. Jedoch konnten die Messungen nicht eindeutig ausgewertet werden, da das PDLLA kein sprödes Bruchverhalten aufwies (Abb. 31 rechts). Es zeigte sich kein klassischer Bruch. Zudem drückten sich die Auflager in das Material ein. Aufgrund dessen wurde das reine PDLLA in einem Vier-Punkt-Biegetest und in einem Drei-Punkt-Biegetest analysiert. Dazu wurden stäbchenförmige Prüfkörper mittels Warmpressprozess hergestellt. Die Biegefestigkeit konnte jedoch mittels Vier-Punkt-Biegetest nicht bestimmt werden, da sich die Prüfkörper zu stark verformten und nicht brachen (Abb. 32). Über den Drei-Punkt-Biegetest erfolgte ein eindeutiger Bruch, jedoch nur bei der Analyse dickerer Proben (Abb. 33a). Bei einzelnen Proben erfolgte der Bruch nicht vollständig (Abb. 33b). Die dünneren Proben brachen nicht und verformten sich nur geringfügig (Abb. 33c).



Abb. 31: Klassisches Bruchbild der Prüfkörper aus den Verbundwerkstoffen nach dem *Ball-on-three-balls*-Test (links). Das reine PDLLA zeigte keinen Bruch, jedoch Druckstellen (rechts).



Abb. 32: Warmgepresstes Biegestäbchen aus reinem PDLLA nach dem Vier-Punkt-Biegeversuch.



Abb. 33: Warmgepresste Biegestäbchen aus reinem PDLLA nach dem Drei-Punkt-Biegeversuch.

Die mittels Drei-Punkt-Biegetest ermittelte Biegefestigkeit wurde mit der folgenden Gleichung berechnet [185].

$$\sigma_{max} = \frac{3FL}{2bh^2}$$
(Gl. 12)

Dabei ist F die maximal aufgebrachte Kraft, L die Auflagerdistanz, b die Prüfkörperbreite und h die Höhe des Prüfkörpers. Die Ergebnisse des Drei-Punkt-Biegetest zeigt die folgende Tabelle. Die Anzahl und die Geometrie der Prüfkörper, sowie der Abstand der Auflager variierte (Tab. 33). Insgesamt variierte die Biegefestigkeit zwischen 70 und 100 MPa (Tab. 33). Bei einem der Norm entsprechenden Breite-zu-Höhe-Verhältnis [185] betrug die Biegefestigkeit bei einem größeren Prüfkörper 83,3 MPa, bei fünf weiteren, jedoch kleineren Prüfkörpern 70,4 MPa (<u>+</u> 1,7 MPa). Die Prüfkörper, deren Abmessungen nicht der Norm entsprachen lagen zwischen 74 und 100 MPa.

Tab. 33: Mittels Der-Punkt-Biegetest untersuchte Prüfkörper, deren Abmessungen und die ermittelte Biegefestigkeit.

Anzahl der Prüfkörper	Breite (mm)	Höhe (mm)	Auflagerabstand (mm)	Biegefestigkeit (MPa)
3	4,6-5,9	3,7-4,5	25	74,3 <u>+</u> 3,1
2	4,5-4,6	4,0-4,1	11	99,7 <u>+</u> 3,7
1	10,1	5,7	40	83,3
5	5,5-5,9	2,0-2,6	32	70,4 <u>+</u> 1,7

Der direkte Vergleich der Biegefestigkeiten dreier Werkstoffe mit variierendem Polymergehalt (40, 50 bzw. 60 Gew.-% PDLLA, Verhältnis β -TCP/CaCO₃ 50/50) ergab signifikante Unterschiede (Abb. 34). Jedoch zeigte sich keine Abhängigkeit von dem Polymergehalt. Basierend auf einem Polymergehalt von 60 Gew.-% stieg die Biegefestigkeit mit zunehmendem Anteil an β -TCP signifikant an (Abb. 34).

Im Weiteren wurde der Einfluss der Calciumcarbonat-Variante auf die Biegefestigkeit analysiert (Abb. 35). Dabei zeigte sich, dass die Festigkeit auch bei rhomboedrisch grobem Calciumcarbonat mit steigendem Anteil β -TCP ansteigt. Zudem steigt die Festigkeit mit der Größe der Calciumcarbonat-Partikel (rhomb. fein < rhomb grob < nadelig).



Abb. 34: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit verschiedener Werkstoffe aus PDLLA, β -TCP und Calciumcarbonat in Abhängigkeit des Polymeranteils bzw. der keramischen Anteile (Gew.-% PDLLA- β -TCP-CC). (vgl. [1]).



Abb. 35: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit verschiedener Werkstoffe aus PDLLA, β-TCP und Calciumcarbonat in Abhängigkeit der Calciumcarbonat-Variante (Gew.-% PDLLA-β-TCP-CC).

4.3.2.2 Biegefestigkeit der SLM-Prüfkörper

PDLLA-Werkstoffe

Die SLM-Prüfkörper wurden zum Vergleich der Biegefestigkeiten mit zwei verschiedenen Energiedichten der Laserstrahlung hergestellt 39 W/mm² (\triangleq 4 W) und

44 W/mm² (≙ 4,5 W). Bei der Herstellung der Prüfkörper wurden konstante Laserparameter verwendet, um die Auswirkungen auf das Material vergleichend zu analysieren. Die Prüfkörper wiesen mit steigendem Calciumcarbonat-Anteil eine deutlich stärkere Verfärbung auf (Abb. 36). Die Bruchgeometrie und die Anzahl der Bruchstücke waren bei allen Prüfkörpern ähnlich (Abb. 36). Die analysierten Prüfkörper wiesen eine Dicke von 2 mm auf.



Abb. 36: SLM-Prüfkörper (hergestellt bei 39 W/mm² (links) und 44 W/mm² (rechts) nach dem *Ball-on-three-balls*-Test: 60/20/20rf (a), 60/30/10sph (b), 60/35/5sph (c), 60/40TCP (d).

Die Biegefestigkeit fiel bei beiden Leistungen mit dem Anteil an Calciumcarbonat ab (Abb. 37). So war die Biegefestigkeit bei dem Calciumcarbonat-freien Werkstoff am höchsten. Die Biegefestigkeiten der 4,5 W-Prüfkörper sind geringer als die der 4 W-Prüfköper. Die geringere Leistung führt zu etwa 25-30 % höheren Biegefestigkeiten. Zu beachten ist, dass der Werkstoff 60/20/20rf aus rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat war, die Werkstoffe aus 60/30/10sph und 60/35/5sph aus sphärolithischem Calciumcarbonat.



Abb. 37: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit von SLM-Prüfkörpers aus verschiedenen Werkstoffen variierend in dem Anteil der keramischen Komponenten (Gew.-% PDLLA/ β -TCP/CC). Die Prüfkörper wurden mit 4 W (\triangleq 39 W/mm²) (links) bzw. P=4,5 W (\triangleq 44 W/mm²) (rechts).

PLLA-Werkstoffe

Die PLLA-Werkstoffe wurden mit der Poissonzahl der PDLLA-Werkstoffe ausgewertet. In der ersten Versuchsreihe wurde die Biegefestigkeit eines Werkstoffes aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) in Abhängigkeit der im Laserprozess verwendeten Leistung analysiert. Verwendet wurden Laserleistungen von 0,35 W bis 0,65 W, welche Energiedichten der Laserstrahlung von 3,4 W/mm² bis 6,4 W/mm² entsprechen. Die Aufschmelzung des Polymers stieg mit zunehmender Laserleistung (Abb. 38). Jedoch zeigte sich ab 0,55 W eine bräunliche Verfärbung der Prüfkörper, die mit höherer Leistung stärker wurde (vgl. Kap. 4.2.3). Die mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit stieg zunächst mit steigender Leistung an, fiel aber mit Beginn der Verfärbung ab (Abb. 38). Mit zunehmender Verfärbung fiel die Festigkeit weiter ab.



Abb. 38: SLM-Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.- Calciumcarbonat (sphärolithisch), hergestellt bei unterschiedlichen Laserleistungen (Foto: C. Gayer, Fraunhofer ILT, Aachen) (a) und deren mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit (b).

4.3.3 Druckfestigkeit

4.3.3.1 Druckfestigkeit warmgepresster Prüfkörper

Bei den Drucktests der warmgepressten Prüfkörper brach die Messung nicht ab, da kein klassischer Bruch erfolgte. Die Messung wurde durch die maximal aufbringbare Kraft der Prüfmaschine von 10000 N beendet. Die zu Beginn zylindrischen Prüfkörper (Abb. 39a) wurden gestaucht und zeigten Risse im Randbereich (Abb. 39b). Durch die Einbringung eines Kanals in den Zylinder (Abb. 39d) wurde die Festigkeit herabgesetzt. Die Prüfkörper wiesen ein ähnliches Verhalten auf wie die Prüfkörper ohne Kanal (Abb. 39c). Der Abbruch der Messung erfolgte bei 8300 N. Dieser Wert wurde für die späteren dynamischen Drucktests als Grundlage verwendet.



Abb. 39: Prüfkörper vor und nach den Untersuchungen zur Druckfestigkeit eines Werkstoffes aus 60/20/20rf (Gew.-% PDLLA/β-TCP/CCrf).

4.3.3.2 Druckfestigkeit der SLM-Prüfkörper

PDLLA-Werkstoffe

Die Drucktests anhand der SLM-Prüfkörper wurden bis zu einer Beanspruchung von 10000 N durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Ausgangsprüfkörper mit einer Kantenlänge von 6 mm stark gestaucht wurde (Abb. 40a). Bei der geringsten Energiedichte der Laserstrahlung zeigte sich eine Stauchung ohne Rissbildung im Randbereich, während die Rissbildung mit steigender Energiedichte zunahm (Abb. 40b).



Abb. 40: SLM-Prüfkörper zur Bestimmung der Druckfestigkeit aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP vor (a) und nach (b) der Prüfung bei unterschiedlichen Energiedichten der Laserstrahlung.

PLLA-Werkstoffe

Die PLLA-Werkstoffe wurden zu Prüfkörpern verarbeitet, die von der Kunststoffnorm geforderten Abmessungen aufwiesen [186] (Abb. 41a). Da diese jedoch schwer von der Bauplattform ablösbar waren, zeigten sie einige Defektstellen (Abb. 41b). Das Ausmaß zeigte sich deutlich an den Resten auf der Plattform (Abb. 41c).



Abb. 41: SLM-Prüfkörper zur Bestimmung der Druckfestigkeit aus 77 Gew.-% PDLLA und 23 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) vor (a) und nach (b) der Prüfung, sowie die Rückstände nach dem Ablösen der Prüfkörper auf der Bauplattform (c) (Fotos: C. Gayer, ILT, Aachen).

Nach der Prüfung zeigten die Prüfkörper eine trapezförmige Stauchung (Abb. 42). In beiden Fällen wurde die Kraft von oben aufgebracht. Die Risse breiteten sich entlang der gelaserten Schichten aus. Der Kurvenverlauf der aufgebrachten Kraft in Abhängigkeit der Stauchung der Prüfkörper zeigt einen Anstieg der Kraft bis etwa 3000 N bei etwa 8 % Stauchung (Abb. 42). Danach ist ein Kraftabfall zu verzeichnen. Die ermittelte Bruchfestigkeit betrug bei 2 untersuchten Prüfkörpern 71,3 \pm 1,5 MPa.



Abb. 42: SLM-Prüfkörper nach Prüfung der Druckfestigkeit und der Verlauf der aufgebrachten Kraft in Abhängigkeit der Stauchung der Prüfkörper.

4.3.4 Dynamische Beanspruchung

Basierend auf den Ergebnissen der konstanten Druckbeanspruchung erfolgte die dynamische Beanspruchung der Prüfkörper.

4.3.4.1 Dynamische Beanspruchung warmgepresster Prüfkörper

Der zur Festlegung der Prüfkraft während der dynamischen Beanspruchung getestete Prüfzylinder ergab eine ertragbare Kraft von 8300 N (Kap. 4.3.3.1). Die dynamische Beanspruchung erfolgte mit 70 % der ertragbaren Last (5800 N). Die beiden geprüften Proben zeigten ein sehr unterschiedliches Verhalten (Abb. 43b und c). Probe 1 zeigte eine sehr ungleichmäßige Verformung, ertrug jedoch 1 Mio Lastzyklen. Probe 2 zeigte eine gleichmäßige Verformung und riss in den Randbereichen auf. Sie ertrug nur halb so viele Zyklen wie Probe 1 (480.000 Zyklen).



Abb. 43: Dynamische Beanspruchung (580 N bis 5800 N) warmgepresster Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein): Ausgangszustand (a) und zwei Prüfkörper nach der Messung (b und c).

4.3.4.2 Dynamische Beanspruchung der SLM-Prüfkörper

Da die Prüfkörper im einfachen Drucktest eine Stauchung verzeichneten, war dem Versagen der Prüfkörper keine eindeutige Bruchlast zuzuordnen. Daher wurden die Prüfkörper mit unterschiedlichen Lasten geprüft, um sich der ertragbaren Last anzunähern. Bei 5000 N Oberlast zerbrach die Probe bereits beim ersten Zyklus (Abb. 44). Bei 1000 N ertrug der Prüfkörper die von der Norm geforderten 1 Mio Zyklen, was auch in einer Wiederholung des Versuches bestätigt worden konnte. Sowohl bei 2000 N (803 Zyklen) als auch bei 1500 N (310.355 Zyklen) konnten die von der Norm geforderten Zyklen nicht erreicht werden.



Abb. 44: SLM-Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) nach der dynamischen Beanspruchung bei unterschiedlichen Druckkräften.

4.3.5 Kurzzusammenfassung Ergebnisse Mechanik

Die warmgepressten Prüfkörper wiesen Biegefestigkeit bis zu 90 MPa auf. Dabei stieg die Festigkeit mit steigendem β -TCP-Gehalt bzw. mit sinkendem Calciumcarbonat-Gehalt. Die Biegefestigkeit der SLM-Prüfkörper lag unterhalb der der warmgepressten Prüfkörper. Die SLM-Prüfkörper wiesen Festigkeiten bis 50 MPa auf. Während die warmgepressten Prüfkörper und die SLM-Prüfkörper unter Biegebeanspruchung ein sprödes Verhalten zeigten, verhielten sie sich unter Druckbeanpruchung duktil. Die bruchauslösenden Kräfte bzw. folglich die Druckfestigkeiten der warmgepressten Prüfkörper aus dem PDLLA-Werkstoff variierten sehr stark. Die SLM-Prüfkörper aus dem PLLA-Werkstoff wiesen eine Druckfestigkeit von 70 MPa auf. Sie rissen dabei entlang der gelaserten Schichten. Unter dynamischer Beanspruchung ertrugen die SLM-Prüfkörper bis 1000 N (\triangleq 25 MPa) die erforderlichen 1 Mio. Lastzyklen.

4.4 Degradation

4.4.1 Untersuchung des pH-Wertes bei beschleunigter Degradation

Die Untersuchung des pH-Wertes bei beschleunigter Degradation in Sörensen-Puffer bei 53 °C ergab, dass das rhomboedrisch grobe und das rhomboedrisch feine Calciumcarbonat am längsten pufferten (Abb. 45). Das basische sowie die beiden kugelförmigen Varianten verzeichneten zuerst einen pH-Wert-Abfall. Das nadelförmige Calciumcarbonat befand sich im Mittelfeld. Der reine Puffer blieb über den gesamten Zeitraum konstant. Die Prüfkörper verloren im Rahmen dieser Untersuchung ihre Stabilität und zerfielen. Jedoch war keiner der Prüfkörper am Ende der Versuchsreihe vollständig degradiert. Basierend auf dieser Untersuchung wurden für die weiteren Untersuchungen die beiden rhomboedrischen und die nadelförmige Variante verwendet.



Abb. 45: pH-Wert-Kontrolle bei beschleunigter Degradation verschiedener Werkstoffe aus 80 Gew.-% PDLLA und 20 Gew.-% Calciumcarbonat in Abhängigkeit der Calciumcarbonat-Struktur (bei 53 °C).

Die anschließende Versuchsreihe zur Untersuchung des pH-Wertes in Abhängigkeit der Werkstoffzusammensetzung über einen Zeitraum von 24 Wochen bei 50 °C zeigte, dass das reine PDLLA bereits nach zwei Wochen Lagerungszeit zu einem deutlichen pH-Wert-Abfall führte (Abb. 46). Der Werkstoff aus 80 Gew.-% PDLLA und 20 Gew.-% β-TCP zeigte ein ähnliches Verhalten ab drei Wochen Lagerungszeit. Die Calciumcarbonat-haltigen Varianten zeigten ein besseres Pufferverhalten. Jedoch lagen nur die beiden Werkstoffe aus 50 Gew.-% PDLLA und 50 Gew.-% Calciumcarbonat nach einem vorübergehenden pH-Wert-Abfall auch nach 24 Wochen noch im physiologischen Bereich lagen (Abb. 46). Die übrigen Wertstoffe lagen nach 24 Wochen bei einem pH-Wert von 4 oder darunter. Der Vergleich der beiden Calciumcarbonat-Varianten zeigte, dass das feinere Calciumcarbonat durchgehend einen etwas geringeren pH-Wert aufwies als das aröbere Calciumcarbonat. Um auszuschließen, dass der Austausch mit der Luft durch das Öffnen der Probengefäße an den jeweiligen Messtagen zu einer Verfälschung des pH-Wertes führte, wurde im Rahmen dieser Untersuchung für drei Messzeitpunkte eine neue Probe analysiert. Dabei zeigte sich, dass alle Proben nach 3 Wochen eine Reduktion des pH-Wertes aufwiesen (Abb. 47). Der pH-Wert-Abfall war bei reinem PDLLA am größten. Die anderen Werkstoffe wiesen alle ein untereinander ähnliches Verhalten auf. Die beiden Werkstoffe aus PDLLA und β -TCP lagen tendenziell etwas unterhalb der Werte der Calciumcarbonat-haltigen Werkstoffe, aber in einem ähnlichen Bereich (Abb. 47). In Bezug auf die Anteile der drei Komponenten im Werkstoff war keine eindeutige Abhängigkeit zu erkennen.



Abb. 46: pH-Wert-Kontrolle bei beschleunigter Degradation verschiedener Werkstoffe aus PDLLA , β -TCP und Calciumcarbonat in Abhängigkeit der Werkstoffzusammensetzung und der Calciumcarbonat-Variante (bei 50 °C).



Abb. 47: pH-Wert-Kontrolle bei beschleunigter Degradation verschiedener Werkstoffe (PDLLA/ β -TCP/Calciumcarbonat). Für jeden Zeitpunkt wurde eine neue Probe verwendet, um die Verfälschung des pH-Wertes durch den Austausch mit der Umgebungsluft zu reduzieren.

4.4.2 Untersuchung des pH-Wertes bei Raum- und Körpertemperatur

Die Untersuchung des pH-Wertes der Medien, in denen Prüfkörper über 8, 16 und 24 Wochen gelagert wurden, ergab, dass sowohl die PBS-Kontrolle als auch das reine PDLLA über den gesamten Zeitraum im physiologischen Bereich lagen (Abb. 48). Der Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP führte zwar zu einem Abfall des pH-Wertes, jedoch lag dieser weiterhin annähernd im physiologischen Bereich (Abb. 48). Die beiden Calciumcarbonat-haltigen Werkstoffe verhielten sich vergleichbar und zeigten einen deutlichen Abfall des pH-Wertes.



Abb. 48: pH-Werte der Medien, in denen verschiedene PDLLA-basierte Werkstoffe bei 37 °C gelagert wurden.

Außer der Prüfkörper aus reinem PDLLA brachen alle Prüfkörper spröde. Weder bei den Verbundwerkstoffen, noch bei dem reinen Polymer zeigte sich die Ausbildung eines gelartigen Kerns im Inneren (Abb. 49). Die Verbundwerkstoffe zeigten eine deutliche Quellung und Verformung bezüglich der Ausgangsgeometrie. Die Prüfkörper aus den Verbundwerkstoffen wiesen teilweise eine Rissbildung an der Oberfläche auf.



Abb. 49: Analyse der Bruchflächen der Prüfkörper nach dem *Ball-on-three-balls*-Test. Die Prüfkörper waren 24 Wochen in PBS gelagert worden. Die Bruchflächen der Prüfkörper aus 60/40TCP und 60/40CCrf waren mit den 60/20/20rf-Prüfkörpern vergleichbar.

Die Biegefestigkeit des Werkstoffes aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP lag auch nach 16 Wochen deutlich über den Biegefestigkeiten der Calciumcarbonathaltigen Werkstoffe (Abb. 50). Bei allen Werkstoffen war die Biegefestigkeit der zweiten 8-Wochen-Messreihe höher als bei der ersten Messreihe. Nach 24 Wochen lagen alle Festigkeiten unter 5 MPa (Abb. 50).



Abb. 50: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit verschiedener Werkstoffe nach Lagerung in PBS bei 37 °C.

4.4.3 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit

4.4.3.1 Warmgepresste Prüfkörper aus PDLLA-Werkstoffen

Zur Untersuchung des Einflusses flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit warmgepresster Prüfkörper zur Abschätzung des Degradationsfortschrittes wurden die Prüfkörper in Wasser und in einer zweiten Versuchsreihe in PBS gelagert. Die Flüssigkeitsaufnahme bei Lagerung in PBS war deutlich größer als in Wasser (Anhang, Abb. 113). So nahmen die Prüfkörper in PBS nach acht Wochen 22 % ihres Eigengewichtes an Flüssigkeit auf. In Wasser stieg die Flüssigkeitsaufnahme nach vier Wochen auf 16 Gew.-% des Eigengewichtes und fiel nach acht Wochen auf 13 Gew.-%. Reines PDLLA nahm bei der Lagerung in Wasser nach acht Wochen nahezu keine Flüssigkeit auf (Anhang, Abb. 114). Ebenso stärker ausgeprägt war das Quellverhalten der Prüfkörper während der Lagerung in PBS im Vergleich zur Lagerung in Wasser (Abb. 51). Nach acht Wochen quoll der Prüfkörper in PBS in seiner Dicke um 40 %, in Wasser um nur um etwa die Hälfte. Im Durchmesser zeigte sich ein geringeres Ausmaß an Quellung. Die Lagerung von reinem PDLLA in Wasser ergab eine deutlich geringere Quellung (Abb. 52). Die Änderung der Dicke blieb unter 10 %, während sich der Durchmesser nahezu gar nicht änderte.



Abb. 51: Geometrische Veränderung der warmgepressten Prüfkörper aus <u>60 Gew.-%</u> <u>PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein)</u> nach Lagerung in Wasser bzw. PBS bei 37 °C. (vgl. [1]).



Abb. 52: Geometrische Veränderung der warmgepressten Prüfkörper aus reinem PDLLA nach Lagerung in Wasser bei 37 °C. (vgl. [1]).

Der pH-Wert des Wassers in dem der Verbundwerkstoff gelagert wurde, blieb über 8 Wochen im physiologischen Bereich (7-7,4) (Abb. 53). Die Wasserreferenz zeigte dagegen deutlich geringere Werte. Zwar stieg der Wert über den Untersuchungszeitraum, überschritt aber einen pH-Wert von 6 nicht (Abb. 53). Der pH-Wert der PBS, in der der Verbundwerkstoff gelagert wurde, blieb über 4 Wochen konstant im physiologischen Bereich. Nach 8 Wochen fiel er jedoch auf etwa 6 ab. Das reine PDLLA blieb konstant bei einem pH-Wert von 6 (Abb. 54).

Die Analyse der beiden Lagerungsmedien ergab, dass sich in reinem Wasser deutlich mehr Calcium aus den Proben gelöst hatte als in PBS (Abb. 55). Nach 8 Wochen hatte sich in PBS etwas mehr als 1 % des Calciums in den Proben gelöst, während sich nach gleicher Zeit in reinem Wasser über 9 % gelöst hatten. Anhand der Elementanalysen der Prüfkörperoberflächen am Rasterelektronenmikroskop mittels energiedispersiver Röntgenstrahlung (EDX) ergab, dass sich das Calcium/Phosphat-Verhältnis an der Oberfläche nach der Lagerung in Wasser im Vergleich zum Ausgangszustand der Proben verändert hatte (Abb. 56). Bei



überwiegendem Herauslösen des Calciums in Form von β-TCP hätte das Verhältnis von Calcium zu Phosphat etwa gleich bleiben müssen.

Abb. 53: pH-Werte der Lagerungsmedien der warmgepressten Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) nach Lagerung in Wasser bzw. PBS bei 37 °C. (vgl. [1]).



Abb. 54: pH-Werte der Lagerungsmedien der warmgepressten Prüfkörper aus reinem PDLLA nach Lagerung in Wasser bei 37 °C.



Abb. 55: Aus den Prüfkörpern gelöstes Calcium im Lagerungsmedium (ICP-Messung). (vgl. [1]).



Abb. 56: Am Rasterelektronenmikroskop durchgeführte Elementanalyse (EDX) von Prüfkörpern vor der Lagerung und nach 2 wöchiger Lagerung in deminderalisertem Wasser.

Da davon ausgegangen werden konnte, dass sich überwiegend Calciumcarbonat gelöst hatte, wurde basierend auf dieser Erkenntnis die aus den Proben herausgelöste Menge Calciumcarbonat berechnet (Tab. 34 und Tab. 35). Nach achtwöchiger Lagerungszeit in Wasser hatten sich 10,7 mg Calciumcarbonat aus den Prüfkörpern gelöst, in PBS 1,3 mg. Aus der Gesamtmassenabnahme wurde schließlich die Menge an PDLLA berechnet, die sich ebenso gelöst haben musste. Nach acht Wochen in Wasser hatten sich 15,3 mg aus den Prüfkörpern gelöst, in PBS 8,1 mg (Tab. 34 und Tab. 35). Sowohl in Wasser als auch in PBS stiegen die aus der Probe gelösten Anteile mit der Lagerungszeit an.

Lagerungszeit in Wasser (Wochen)	Gelöste Ca ²⁺ -Ionen (mg)	Masseverlust CaCO₃ (mg)	Masseverlust insgesamt (mg)	Masseverlust PDLLA (mg)
2	1,1	2,7	6,0	3,3
4	1,8	4,6	12,4	7,8
8	4,3	10,7	26,0	15,3

Tab. 34: Berechnung der freigesetzten Calciumcarbonat-Masse pro Prüfkörper basierend auf dem gelösten Anteil Calcium und des freigesetzten PDLLAs <u>in Wasser</u>.

Tab. 35: Berechnung der freigesetzten Calciumcarbonat-Masse pro Prüfkörper basierend auf dem gelösten Anteil Calcium und des freigesetzten PDLLAs <u>in PBS</u>.

Lagerungszeit in PBS (Wochen)	Gelöste Ca ²⁺ -Ionen (mg)	Masseverlust CaCO₃ (mg)	Masseverlust insgesamt (mg)	Masseverlust PDLLA (mg)
2	0,1	0,2	0,2	0,0
4	0,2	0,2	4,1	3,9
8	1,3	1,3	9,4	8,1

Die Biegefestigkeit der Prüfkörper nach Lagerung in PBS bzw. Wasser fielen bereits nach zwei Wochen um etwa 70 % ab (Abb. 57). Bis hin zu acht Wochen fiel die Festigkeit für beide Lagerungsmedien weiter ab. Bis vier Wochen war dieser Abfall signifikant. Die Lagerung in Wasser führte zu einem stärkeren Abfall der Biegefestigkeit als in PBS, jedoch lagen die Werte in einem ähnlichen Bereich.



Abb. 57: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit der warmgepressten Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) nach Lagerung in Wasser bzw. PBS bei 37 °C. (vgl. [1]).

Die Untersuchung der Bruchflächen ergab, dass die Prüfkörper einen dunkleren Kern aufweisen (Abb. 58). Bei der Lagerung in Wasser ist dieser Kern nach vier Wochen nicht mehr zu sehen, während er bei der Lagerung in PBS erst nach acht Wochen nicht mehr zu sehen ist. Zudem zeigte sich eine Quellung und Verformung der Prüfkörper nach der Lagerung in Flüssigkeit. Auffällig ist auch, dass die zu Beginn leicht gelblichen Prüfkörper nach der Lagerung eine rein weiße Erscheinung haben. Die Farbe des Kerns ähnelt der Farbe des Ausgangszustandes.



Abb. 58: Bruchflächen der warmgepressten Prüfkörper nach Lagerung in Wasser (oben) und PBS (unten). (vgl. [1]).

Um die Abhängigkeit der Reduktion der Biegefestigkeit von der Materialzusammensetzung zu untersuchen, wurde ein Werkstoff mit einem reduzierten Anteil an Calciumcarbonat (60 Gew.-% PDLLA, 35 Gew.-% β-TCP und 5 Gew.-% Calciumcarbonat) untersucht. Beide Calciumcarbonat-Varianten (rhomboedrisch fein und rhomboedrisch grob) zeigten ein vergleichbares Verhalten. Die Biegefestigkeit bei reduziertem Anteil an Calciumcarbonat war deutlich höher als bei dem 60/20/20rf-Werkstoff (Abb. 59, vgl. Abb. 57). Sie fiel nach sechs Wochen Lagerung in Wasser um etwa 50 % ab (Abb. 59). Bei dem 60/20/20rf-Werkstoff war sie nach zwei Wochen bereits um 70 % abgefallen (vgl. Abb. 57). Auch nach 18 Wochen Lagerung in Wasser lag die Biegefestigkeit der Prüfkörper noch über 40 MPa.



Abb. 59: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit der warmgepressten Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 35 Gew.-% β -TCP und 5 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein bzw. rhomb. grob) nach Lagerung in Wasser bei 37 °C.

Der Calciumcarbonat-freie Werkstoff (60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP) hatte eine Ausgangbiegefestigkeit von 120 MPa (Abb. 60 links). Die Biegefestigkeit nahm nach vier Wochen Lagerung in PBS nur geringfügig ab (~100 MPa) und halbierte sich erst nach acht Wochen (~50 MPa). Die Prüfkörperdicke quoll bereits nach zwei Wochen um 28 % (Abb. 60 rechts). Die Quellung ging jedoch über die übrigen Lagerungszeiten deutlich zurück.



Abb. 60: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit der warmgepressten Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP (links) und deren Quellung (rechts) nach Lagerung in PBS bei 37 °C.

4.4.3.2 SLM-Prüfkörper aus PDLLA-Werkstoffen

Die Ausgangsprüfkörper wiesen eine deutliche Verfärbung auf (Abb. 61). Eine Ausnahme bildete der Calciumcarbonat-freie Werkstoff. Nach der Lagerung in PBS waren die Prüfkörper deutlich heller (Abb. 61). Die Bruchgeometrien nach dem *Ballon-three-balls*-Test waren vergleichbar mit den bisherigen Geometrien ohne Lagerung in Flüssigkeit (vgl. Abb. 36).



Abb. 61: SLM-Prüfkörper vor (oben) und nach (unten) siebentägiger Lagerung in PBS bei 37 °C. Die Prüfkörper wurden zudem auf ihre Biegefestigkeit untersucht. Werkstoffe: 60/20/20rf(a), 60/30/10sph (b), 60/35/5sph (c) und 60/40TCP (d).

Die SLM-Prüfkörper zeigten mit steigendem Anteil an Calciumcarbonat eine ausgeprägte Quellung (Abb. 62). Der Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat zeigte eine Zunahme des Durchmessers von fast 60 %. Der Calciumcarbonat-freie Werkstoff wies dagegen nur eine Quellung von etwa 8 % auf. Die Biegefestigkeit fiel stark ab im Vergleich zu den Ausgangsproben (Abb. 62). Die Reduktion der Biegefestigkeit stieg mit steigendem Anteil an Calciumcarbonat. So fiel die Festigkeit des 60/20/20rf-Werkstoffes auf ein Zehntel der Ausgangfestigkeit, während der 60/35/5sph-Werkstoff auf ein Drittel der Ausgangsfestigkeit und der 60/40TCP-Werkstoff nur auf 50 % der Ausgangsfestigkeit fiel (Abb. 62). Auch bei den SLM-Prüfkörpern zeigte sich generell eine höhere Festigkeit bei geringeren Anteilen an Calciumcarbonat.



Abb. 62: Quellung (oben) und mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit (unten) der Prüfkörper nach siebentägiger Lagerung in PBS.

4.4.3.3 SLM-Prüfkörper aus dem PLLA-Werkstoff

Unter physiologischen Bedingungen (37 °C)

Die SLM Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) zeigten ebenso eine Reduktion der Biegefestigkeit durch Lagerung in PBS bei 37 °C (Abb. 63). Nach zwei Wochen fiel die Biegefestigkeit von anfänglich 60 MPa um etwa 50 %. Nach acht Wochen lag die Biegefestigkeit bei etwa 18 MPa. Die Flüssigkeitsaufnahme lag konstant bei etwa 20 % der Ausgangsmasse der Prüfkörper, zeigte jedoch relativ hohe Standardabweichungen (Anhang, Abb. 115). Eine Quellung zeigte sich nur bei den Prüfkörpern nach 8 Wochen Lagerungszeit (Anhang, Abb. 115). Diese lag im Mittel bei 3 %, wies jedoch hohe Standardabweichungen auf. Die Werte lagen aber deutlich unter 7 %.



Abb. 63: Mittels *Ball-on-three-balls*-Test ermittelte Biegefestigkeit von SLM-Prüfkörpern aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% CCsph nach verschiedenen Lagerungszeiten in PBS (37 °C).

Beschleunigte Degradation bei 50 °C

Die Analyse der degradationsbedingten Festigkeitsabnahme in PBS bei 50 °C ergab geringfügig niedrigere Werte als bei Lagerung bei 37 °C (Abb. 64 links, vgl. Abb. 63). Während der Lagerungszeiten zeigten alle Prüfkörper ein ähnliches Verhalten, sodass die Quellung nahezu konstant war (Abb. 64 rechts). Die Standardabweichungen waren hoch, jedoch lagen alle Werte unter 5 %.





Die pH-Werte lagen an allen drei Messzeitpunkten sowohl für den Werkstoff als auch für die Kontrolle im physiologischen Bereich (7,2-7,4) (Abb. 65).


Abb. 65: pH-Wert des Lagerungsmediums der SLM-Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA77 und 23 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) in PBS bei 50 °C.

4.4.4 Dynamische Beanspruchung in flüssiger Umgebung

Der warmgepresste Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) zerbrach durch die zyklische Belastung zwischen 580 N und 5800 N während der Lagerung in Wasser bei 20 °C bereits nach 9100 Lastzyklen. Der Prüfkörper zerfiel in eine Vielzahl an Bruchstücken (Abb. 66).



Abb. 66: Dynamische Beanspruchung (oszillierend zwischen 580 N und 5800 N) eines Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) in flüssiger Umgebung (Wasser) bei Raumtemperatur.

4.4.5 Lagerung verfärbter SLM-Proben in flüssiger Umgebung

Für die späteren Zellkulturuntersuchungen war von Bedeutung, ob die Prüfkörper bei der Lagerung im Kulturmedium zu einer Veränderung der Zusammensetzung und/oder zu einem veränderten pH-Wert des Mediums führt. Bereits nach 30-minütiger Lagerung eines stark verfärbten SLM-Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) zeigte sich eine deutliche Verfärbung

des ursprünglich magentafarbenen Mediums (Abb. 67a und b). Das Referenzmedium blieb über den gesamten Zeitraum magentafarben. Der pH-Wert der Mediumkontrolle lag über sechs Tage zwischen 8 und 9 (Abb. 68). Die ersten drei Tage zeigten eine steigende Tendenz, danach fiel der pH-Wert ab. Das Medium, in dem die Probe gelagert wurde, zeigte die ersten 24 Stunden eine fallende Tendenz, danach blieb

der Wert relativ konstant. Die pH-Werte des Lagerungsmediums lagen zwischen 7 und 8 und lagen somit im neutralen Bereich, während das Kontroll-medium schon in den basischen Bereich kam.



Abb. 67: Ein SLM-Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) vor der Lagerung in Zellmedium (a) und während der Lagerung in Zellmedium (b, rechts). Als Referenz diente Zellmedium ohne Prüfkörperlagerung (b, links).



Abb. 68: pH-Wert-Kontrolle des Zellkulturmediums während der Lagerung des braunverfärbten SLM-Prüfkörpers (bei Raumtemperatur).

Die Lagerung verfärbter SLM-Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) (Abb. 69a) in einem größeren Volumen von Zellkulturmedium (13 ml) ergab bereits nach 45 min eine deutliche Entfärbung der Prüfkörper (Abb. 69b). Das Zellkulturmedium wechselte von einem

ursprünglich magentafarbenen (Abb. 69b, rechts) zu einem rötlicheren Ton (Abb. 69b, links u. Mitte). Nach sieben Tagen erschienen alle Prüfkörper gänzlich weiß (Abb. 69c). Parallel wurden zu Vergleichszwecken zwei Prüfkörper in demineralisiertem Wasser gelagert, die ebenfalls nach siebenTagen wieder weiß erschienen. Das Wasser zeigte keine sichtbare Veränderung.

Abb. 69: Lagerung eines verfärbten SLM-Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) in 13 ml Zelkulturmedium. Ausgangsprobe (a), nach 45 min Lagerung (b) und nach 7 Tagen Lagerung (c).

Die Analyse der Lagerungsmedien ergab, dass sich aus den Proben, die in Zellmedium gelagert wurden, nach sieben Tagen kein Calcium gelöst hatte (Abb. 70). Aus den Prüfkörpern, die Wasser gelagert wurden, hatte sich jeweils etwa 1 mg Calcium gelöst. Aus dem Prüfkörper, der in 1 ml Zellmedium gelagert wurde (vgl. Abb. 67), hatten sich fast 13 mg Calcium gelöst (Abb. 70). Jedoch bestand dieser Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein), wohingegen die zuerst analysierten Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) bestanden.



Abb. 70: Elementanalyse des Zellkulturmediums bzw. des Wassers nach der Lagerung des braun-verfärbten SLM-Prüfkörpers mittels ICP.

4.4.6 Kurzzusammenfassung Ergebnisse Degradation

Die Prüfkörper aus den PDLLA-basierten Werkstoffen zeigten während der Lagerung in Flüssigkeit (demineralisiertes Wasser und PBS) nach acht Wochen eine starke Volumenquellung bis zu 60 Vol.-% und eine damit verbundene Reduktion der Biegefestigkeit bis zu 70 %. Dieses Phänomen war umso stärker, je höher der Anteil an Calciumcarbonat war. Ebenso waren die Quellung und die Reduktion der Biegefestigkeit bei den SLM-Prüfkörpern stärker ausgeprägt als bei den warmgepressten Prüfkörpern. Bei den bräunlich-verfärbten SLM-Prüfkörpern zeigte sich durch die Lagerung in Flüssigkeit bereits nach kurzer Zeit eine Entfärbung. Die SLM-Prüfkörper aus dem PLLA-basierten Werkstoff zeigten eine deutlich geringere Quellung (< 7 Vol.-%) und folglich eine geringere Reduktion der Biegefestigkeit um 50 % nach acht Wochen.

4.5 Biologische Verträglichkeit

4.5.1 Abschätzung der Zytotoxizität

Warmgepresste Prüfkörper

Weder der Anteil an Polymer noch das Verhältnis der keramischen Komponenten und der Calciumcarbonat-Variante zeigten einen Einfluss auf die Vitalität der L929-Zellen. Die Zellen wiesen auf allen Werkstoffen eine Vitalität über 95 % auf (Anhang, Tab. 43). Auch Osteoblasten-ähnliche Zellen (MG-63) zeigten ein ähnliches Verhalten (Anhang, Tab. 44). Die Anzahl der entsprechenden Zellen lag auf allen Werkstoffen in einem ähnlichen Bereich. Einzig der Werkstoff aus 50 Gew.-% PDLLA, 25 Gew.-% β -TCP und 25 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) wies eine höhere Anzahl an MG-63-Zellen auf.

Die Zellzahl auf den Prüfkörpern zeigte keine Abhängigkeit von der Strontiumchlorid-Konzentration im Zellmedium (Tab. 36). Die Vitalität der Osteoblasten-ähnlichen Zellen lag bei allen Konzentrationen über 96 % (Tab. 36). Die höchste Konzentration führte zu dem geringsten Wert.

Tab. 36: Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG63) auf Zellkulturplastik in Zellmedien mit variierender Strontiumchlorid-Konzentration. Angegeben ist die Vitalität der Zellen bezogen auf die Probenfläche und die Vitalität bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen.

SrCl ₂ -Konzentation (mg/ml)	Zellzahl/mm ² lebend	Zellzahl/mm ² tot	Vitalität (%)
0	115 <u>+</u> 31	1 <u>+</u> 1	99
0,036	118 <u>+</u> 35	1 <u>+</u> 1	100
0,073	125 <u>+</u> 40	1 <u>+</u> 1	99
0,18	105 <u>+</u> 27	2 <u>+</u> 2	98
0,36	141 <u>+</u> 14	2 <u>+</u> 1	99
3,6	160 <u>+</u> 109	7 <u>+</u> 9	96

Die Osteoklasten-ähnlichen Zellen (RAW) zeigten keine Tendenz in Abhängigkeit von der Werkstoffzusammensetzung (Anhang, Tab. 45). Die Vitalität lag für alle Werkstoffe über 90 %.

Der für die Anwendung als Implantatmaterial wichtigste Zelltyp sind humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs). Die Anzahl der Zellen auf dem Material ist deutlich geringer als bei den zuvor untersuchten Zelltypen (Tab. 37), wobei hMSCs deutlich größer sind. Die Zellanzahl ist auf allen Werkstoffen vergleichbar. Die Vitalität beträgt in allen Fällen annähernd 100 % (Tab. 37). Die Wiederholung der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung von hMSCs ergab eine etwa 10fach höhere Anzahl der Zellen auf den Prüfkörpern (Tab. 37). Gleichzeitig wurden zwei strontiumhaltige Werkstoffe analysiert. Die Mittelwerte der Zellanzahl lagen über den Werten der strontiumfreien Werkstoffe. jedoch sind die Standardabweichungen extrem hoch. Die Vitalität der hMSCs lag jedoch auf alle Werkstoffen über 90 % (Tab. 37).

Tab. 37: Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) auf verschiedenen Werkstoffen mit variierendem Polymer-Gehalt: 40/30/30, 50/25/25 und 60/20/20 (PDLLA/TCP/CCrf) sowie variierenden keramischen Anteilen. Angegeben ist die Vitalität der Zellen bezogen auf die Probenfläche und die Vitalität bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen.

Werkstoff	Zellzahl/mm²lebend	Zellzahl/mm ² tot	Vitalität (%)	
Experiment Variation des Polymeranteils sowie der Calciumcarbonat-Variante				
40/30/30rf	14,7 <u>+</u> 7,4	0,3 <u>+</u> 0,4	98	
50/25/25rf	14,3 <u>+</u> 4,1	0,1 <u>+</u> 0,2	99	
60/20/20rf	13 <u>+</u> 6,2	0,1 <u>+</u> 0,1	99	
60/20/20rg	16,4 <u>+</u> 5,9	0,1 <u>+</u> 0,1	99	
60/20/20nad	16,3 <u>+</u> 5,4	0,2 <u>+</u> 0,1	99	
Glaskontrolle	14,2 <u>+</u> 4,6	0,1 <u>+</u> 0,1	99	
Experiment mit Strontium-haltigen Komponenten				
50/25/25rf	126 <u>+</u> 152	2 <u>+</u> 3	98	
60/20/20rf	93 <u>+</u> 91	2 <u>+</u> 3	98	
60/40TCP	85 <u>+</u> 155	3 <u>+</u> 5	96	
60/40CCrf	83 <u>+</u> 82	2 <u>+</u> 2	97	
60/20/10CC/10SC	111 <u>+</u> 198	5 <u>+</u> 6	94	
60/20/20SC	130 <u>+</u> 157	6 <u>+</u> 15	95	
Glaskontrolle	95 <u>+</u> 66	1 <u>+</u> 1	96	

SLM-Prüfkörper

Nach der Kultivierung der SLM-Prüfkörper mit Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG63) waren nahezu keine Zellen auf den Prüfkörpern nachweisbar (**Tab. 38**). Sowohl auf der Glas-Kontrolle als auch auf den warmgepressten Prüfkörpern waren jedoch Zellen nachweisbar. Die Vitalität auf den beiden Kontrollen lag bei 100 bzw. 97 %.

Auf den SLM-Prüfkörpern waren 40 % bzw. 95 % der wenigen Zellen, die vorhanden waren, nicht vital.

Tab. 38: Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG63) auf SLM-Prüfkörpern und warmgepressten Prüfkörperm aus verschiedenen Werkstoffen (Gew.-% PDLLA/TCP/CC). Angegeben ist die Vitalität der Zellen bezogen auf die Probenfläche (links) und die Vitalität bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen (rechts).

Werkstoff	Zellzahl/mm²lebend	Zellzahl/mm ² tot	Vitalität (%)
SLM-60/40TCP	4 <u>+</u> 6	2 <u>+</u> 4	59
SLM-60/40CCrf	1 <u>+</u> 1	17 <u>+</u> 10	4
HP-60/35/5rf	313 <u>+</u> 169	1 <u>+</u> 1	100
Glaskontrolle	227 <u>+</u> 55	6 <u>+</u> 5	97

4.5.2 Viabilität und Zytotoxizität

4.5.2.1 PDLLA-Werkstoffe

Einen Tag nach der Aussaat war die Viabilität der L929-Mausfibroblasten auf den Verbundwerkstoffen mit rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat vergleichbar mit der Kontrolle (Anhang, Abb. 116). Die Viabilität auf den beiden anderen Werkstoffen mit nadelförmiger bzw. rhomboedrisch grober Calciumcarbonat-Variante war deutlich geringer. Die Aktivität auf den beiden Werkstoffen mit 40 bzw. 50 Gew.-% PDLLA stieg über den Untersuchungszeitraum, wobei der geringere Anteil an Polymer eine höhere Aktivität verzeichnete. Die Werkstoffe basierend auf 60 Gew.-% Polymer zeigten nach 2, 3 und 4 Tagen eine relativ konstante Aktivität. Alle Werkstoffe zeigten nach 2, 3 und 4 Tagen eine deutlich geringere Aktivität der Zellen gegenüber der Kontrolle. Die Zytotoxizität lag am ersten Tag zwischen 10 und 20 % und lag somit für jeden Werkstoff unter der von der Norm geforderten Grenze von 30 % (Anhang, Abb. 116). Der Werkstoff mit dem geringsten Polymeranteil zeigte den geringsten Wert. Nach 4 Tagen zeigten sich deutlich geringere Werte für alle Werkstoffe (< 6 %) (Anhang, Abb. 116).

Die Viabilität von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) war nach drei Tagen auf den Verbundwerkstoffen deutlich geringer als auf der Kontrolle (Abb. 71 links). Am 5. Tag steigt die Aktivität jedoch, wobei der Werkstoff basierend auf 50 Gew.-% sogar den Wert der Kontrolle übersteigt. Nach 7 Tagen ist die Aktivität der Zellen auf den Werkstoffen deutlich gesunken, während sie auf der Kontrolle stark ansteigt. Die Werte der Zytotoxizität liegen für alle Werkstoffe im Bereich der Kontrolle oder darunter (Abb. 71 rechts).



Abb. 71: Viabilität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf verschiedenen Verbundwerkstoffen variierend in ihrem Polymeranteil (Gew.-% PDLLA/β-TCP/CCrf) (links) sowie die Zytotoxizität verschiedener Verbundwerkstoffe in Bezug auf Osteoblasten-ähnliche Zellen (MG-63).

Die Viabilität von MG63-Zellen auf Zellkulturplastik in Strontiumchlorid-haltigen Kulturmedien stieg über 7 Tage für alle Konzentrationen (Abb. 72). Die Strontiumchlorid-Konzentrationen von 0,036 und 0,36 mg/ml liegen im Bereich der Kontrolle (0 mg/ml). Die höchste Konzentration (3,6 mg/ml) induziert eine geringere Aktivität der Zellen.



Abb. 72: Viabilität von MG-63-Zellen in Strontiumchlorid-haltigen Zellkulturmedien auf TCPS.

Die Viabilität von MG63-Zellen auf Strontiumcarbonat-haltigen PDLLA-Werkstoffen stieg zwar über die Kultivierungszeit an, die Werte lagen aber dennoch unterhalb der Strontium-freien Werkstoffe und der Wellkontrolle (Abb. 73).



Abb. 73: Viabilität von MG-63-Zellen auf Strontiumcarbonat-haltigen PDLLA-Werkstoffen (Gew.-% PDLLA/TCP/CaCO₃, PDLLA/TCP/SrCO₃ bzw. PDLLA/TCP).

Während der Kultivierung von MG63-Zellen auf SLM-Prüfkörpern verschiedener Werkstoffe fiel eine Verfärbung des Mediums auf, in dem der Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) gelagert wurde (Abb. 74). Bei der Messung der Viabilität der Zellen ergab sich, dass diese auf den SLM-Prüfkörpern keine Aktivität zeigten (Abb. 74). Sowohl auf den warmgepressten Prüfkörpern als auch auf der Kontrolle zeigte sich eine hohe Aktivität.



Abb. 74: Viabilität von MG-63-Zellen auf SLM-Prüfkörpern aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP bzw. Calciumcarbonat (rhomb. fein). Als Kontrolle wurden warmgepresste Prüfkörper sowie Zellkulturplastik untersucht.

Die Untersuchung zur Auswaschung der Degradationsprodukte ergab, dass MG63-Zellen auf Werkstoffen aktiver waren als auf der Kontrolle (Abb. 75). Dabei zeigte sich keine Abhängigkeit vom Calciumcarbonat-Gehalt.



Abb. 75: Viabilität von MG-63-Zellen auf SLM-Prüfkörpern aus verschiedenen Werkstoffen (Gew.-% PDLLA/TCP/CCrf) nach 30 minütiger Lagerung in PBS.

Die Untersuchung, ob der Farbstoff einen Einfluss auf die Zellviabilität hatte, ergab höhere Werte für die Zellen, die nur einmal gefärbt wurden, als die Zellen, die für alle Messtage verwendet wurden (Abb. 76).



Abb. 76: Viabilität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf SLM-Prüfkörpern und warmgepressten Prüfkörpern aus verschiedenen Verbundwerkstoffen (Gew.-% PDLLA/β-TCP/CCrf). Es wurde durchgehend die gleiche Platte vermessen (a) bzw. jeweils eine neue Platte mit neuen Prüfkörpern (b).

Die Viabilität der Osteoklasten-ähnlichen Zellen steigt für alle Werkstoffe über 7 Tage an (Anhang, Abb. 117). Die Aktivität der Zellen auf den Werkstoffen lag unterhalb der Kontrolle. Die Werte der Zytotoxizität waren negativ (Anhang, Abb. 117).

Die Viabilität von Stammzellen wurde aus mehreren Spendern aufgrund der Spendervarianz gemittelt und auf die Fläche normiert (Abb. 77). Am ersten Messtag (Tag 3) war eine Aktivität der Stammzellen messbar, während die Aktivität an den weiteren Messtagen deutlich gesunken ist. Die Zellen zeigen auf dem Werkstoff mit 60 Gew.-% nahezu keine Aktivität mehr, während bei 40 und 50 Gew.-% überwiegend zumindest geringe Aktivitäten zu verzeichnen sind. Die Kontrolle zeigt die höchste Aktivität, jedoch ist auch diese in Bezug auf den ersten Messtag stark abgefallen. Die Ergebnisse sind für die Mittelung von fünf (Abb. 77a), zwei (Abb. 77b) und drei Spendern (Abb. 77c) vergleichbar.



Abb. 77: Viabilität humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs) auf verschiedenen Verbundwerkstoffen (Gew.-% PDLLA/ β -TCP/CCrf). Auswertung von 5 Spendern (a), 2 Spendern (b) und 3 Spendern (c).

Am ersten ("Tag 3") und am zweiten Messtag ("Tag 5") war auf den Strontiumcarbonat-haltigen Werkstoffen sowie auf den Strontium-freien Kontrollen eine Aktivität der Stammzellen messbar (Abb. 78). An den weiteren Messtag waren teilweise keine Aktivitäten mehr messbar. Die Kontrolle und der Werkstoff mit 10 Gew.-% Calciumcarbonat und 10 Gew.-% Strontiumcarbonat war durchgehend eine Aktivität der Zellen nachweisbar.



Abb. 78: Viabilität von hMSCs auf Strontium-haltigen Verbundwerkstoffe.

Da die hMSCs in den bisherigen Untersuchungen überwiegend geringe Aktivitäten auf den hergestellten Werkstoffen zeigten, wurde in einem neuen Experiment die Aktivität der Zellen auf den Prüfkörpern, die an allen Zeitpunkten verwendet wurden, mit Prüfkörpern verglichen, die nur für jeweils einen Messzeitpunkt verwendet wurden. Neue Prüfkörper für jeden Zeitpunkt bedeuteten zwar einen 4fachen Probenaufwand, jedoch konnte ausgeschlossen werden, dass das Färbereagenz einen Einfluss auf die Zellaktivität hat. Die Verwendung gleicher Prüfkörper über den gesamten Untersuchungszeitraum ergab eine relativ konstante Aktivität der Zellen (Abb. 79a). Die Verwendung neuer Prüfkörper dagegen zeigte einen deutlichen Anstieg der Stammzell-Aktivität (Abb. 79b). Zunächst zeigten 40 und 50 Gew.-% Polymer den stärksten Anstieg. Am 10. Tag stiegen aber auch 60/20/20rg und 60/35/5rf in den gleichen Bereich an. Die Aktivität der Zellen auf 60/20/20rf und 60/20/20nad war am letzten Messtag deutlich geringer.





Die Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung nach der Viabilitätsmessung zum Nachweis vorhandener Zellen auf den Prüfkörpern ergab, dass auf den durchgehend verwendeten Prüfkörpern nahezu keine Zelle nachweisbar war (Abb. 80). Auf den Prüfkörpern die nur für jeweils eine Messung verwendet wurden, konnte dagegen ein dichter Zellrasen nachgewiesen werden (Abb. 80). Dabei konnte keine Abhängigkeit der Zellzahl von dem verwendeten Verbundwerkstoff festgestellt werden. Die zudem durchgeführte Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen auf den Prüfkörpern hatte den Vorteil, dass die Zellen unmittelbar nach der Viabilitätsmessung fixiert werden konnten, während die Zellen für die Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung über einige Stunden weiterkultiviert werden mussten. Auf den durchgehend verwendeten

Prüfkörpern konnten vereinzelt Zellen nachgewiesen werden (Abb. 81). Auf den neuen Proben konnten sehr viel mehr Zellen nachgewiesen werden. Das Aktinskelett der einzelnen Zellen konnte visualisiert werden (Abb. 81).



Abb. 80: Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung nach der Viabilitätsmessung auf den durchgehend verwendeten und für jeden Zeitpunkt neuen Prüfkörpern. (Maßstabbalken 200 µm).



Abb. 81: Immunofluoreszenz-Färbung nach der Viabilitätsmessung auf den durchgehend verwendeten und für jeden Zeitpunkt neuen Prüfkörpern. Dargestellt sind Aktin (grün) und Integrin (rot) (Maßstabbalken 200 µm).

Die Parallel zu Viabilität gemessene Zytotoxizität zeigte für beide Methoden Werte unter 30 % (Anhang, Abb. 118).

4.5.2.2 PLLA-Werkstoffe

Die SLM-Prüfkörper, die aus einem Verbundwerkstoff aus 79 Gew.-% PLLA und 21 Gew.-% Calciumcarbonat (sph) aufgebaut wurden, wurden sowohl im Hinblick auf

die Aktivität von MG-63-Zellen als auch von hMSCs untersucht. Bei der Untersuchung der MG-63-Zellen wurde zusätzlich als Referenz ein Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP verwendet. Die Laserleistungen von 0,30 W, 0,40 W und 0,50 W entsprachen dabei Energiedichten der Laserstrahlung von 2,9 W/mm², 3,9 W/mm² und 4,9 W/mm². Die leistungsabhängige Verfärbung der Prüfkörper zeigt die folgende Abbildung. Zudem zeigte der PLLA-Werkstoff eine höhere Formgenauigkeit, während bei dem PDLLA-Werkstoff ein Teil des Pulverbettes mit den Prüfkörper verschmolzen ist (Abb. 82).



Abb. 82: SLM-Prüfkörper zur Untersuchung der Aktivität von MG-63-Zellen und hMSCs aus 79 Gew.-% PLLA und 21 Gew.-% sphärolithischem Calciumcarbonat (links) bzw. 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP (rechts). (Fotos von C. Gayer, ILT Aachen).

Die Aktivität der Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) stieg deutlich über den gesamten Untersuchungszeitraum an und lag im Bereich der Kontrolle (Abb. 83). Tendenziell zeigten die Zellen bei den beiden höheren Energiedichten etwas geringere Werte. Auch der PDLLA-Werkstoff liegt im Bereich der Kontrolle. Die Wiederholung der Untersuchung mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurde zusätzlich auch an für jeden Zeitpunkt neuen Prüfkörpern durchgeführt. Dabei zeigten die durchgehend verwendeten Prüfkörper (Abb. 84a) und die neuen Prüfkörper (Abb. 84b) vergleichbare Ergebnisse. Die Aktivität der Zellen stieg mit der Energiedichte der Laserstrahlung.



Abb. 83: Aktivität von MG-63-Zellen auf einem Verbundwerkstoff aus 79 Gew.-% PLLA und 21 Gew.-% Calciumcarbonat (sph.) und einem Verbundwerkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP.



Abb. 84: Aktivität von humanen mesenchymalen Stammzellen auf einem Verbundwerkstoff aus 79 Gew.-% PLLA und 21 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch). Verglichen werden Zellen, die durchgehend für alle Messungen verwendet wurden (a), mit für jeden Zeitpunkt neuen Zellen (b).

4.5.3 Zelldifferenzierung

4.5.3.1 Visualisierung Osteoblasten-ähnlicher Zellen und hMSCs

Die Hämalaun-Färbung der MG-63-Zellen zur Untersuchung der Morphologie führte zu einer starken Verfärbung der Prüfkörper (Abb. 85 links). Dadurch ist die Morphologie der Zellen schwer zu beurteilen. Auf der Glaskontrolle ist die Morphologie gut zu erkennen (Abb. 85 rechts). Die Zellen sind ausgespreizt.



Abb. 85: Hämalaun-Färbung Osteoblasten-ähnlicher MG-Zellen auf einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) (links) und auf einer Glaskontrolle (rechts). Maßstabbalken \triangleq 200 µm.

Durch eine Immunfluoreszenz-Färbung konnten MG-63-Zellen auf den Verbundwerkstoffen visualisiert werden (Abb. 86). Zwar waren die Zellen aufgrund der unebenen Oberfläche schwer scharf aunehmbar, jedoch ist das Zytoskelett der Zellen gut zu erkennen. Aktin erscheint grün, Integrin rot. der Zellkern ist blau. Auf den Glaskontrollen waren die Zellen deutlich schärfer visualisierbar. Bei der Wiederholung des Versuches mit hMSCs konnten zwar auf den Werkstoffen und der Kontrolle Zellen sichtbar gemacht werden, jedoch war der Nachweis deutlich schwieriger (Abb. 87). Die Aufnahmen sind aufgrund der sehr unebenen Oberfläche

nach der Kultivierung sehr unscharf. Die Zellen sind jedoch durchgängig ausgespreizt.



Abb. 86: Immunfluoreszenzfärbung (Aktin, Integrin) von osteoblastenähnlichen Zellen auf nach 5 Tagen Kultivierung. Maßstabbalken \triangleq 50 µm.



Abb. 87: Immunfluoreszenzfärbung (Aktin, Integrin) von hMSCs nach 5 Tagen Kultivierung. Maßstabbalken \triangleq 200 µm.

4.5.3.2 Nachweis der osteogenen Differenzierung

Um die von den Osteoblasten gebildeten Calciumphosphat-Ablagerungen indirekt als Nachweis der osteogenen Differenzierung zu visualisieren. wurden am Rasterelektronenmikroskop Elementanalysen durchgeführt (Abb. 88). Auf reinem PDLLA wurde vereinzelt Calcium und flächendeckend Phosphor nachgewiesen. Im Bereich der Calcium-reichen Stellen war die Intensität der Phosphor-Reflexe deutlich stärker als auf der restlichen Probe. Der Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP und der Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat zeigten vergleichbare Resultate. Sowohl Calcium als auch Phosphor war über die gesamte Oberfläche homogen verteilt. In der Verteilung zeigte sich kein Unterschied zwischen den Proben mit Zellen und ohne Zellen. Die Prüfkörper ohne Zellen wurden genau wie die besiedelten Proben behandelt.



Abb. 88: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von hMSC-besiedelten Prüfkörpern aus PDLLA und Verbundwerkstoffen im Rückstreuelektronenmodus und der Nachweis von Calcium und Phosphor mittels EDX. (Maßstabbalken \triangleq 100 µm).

Die genauere Betrachtung des reinen PDLLAs, indem die Bilder der Oberfläche und der Elementanalysen übereinander gelegt wurden, ergab, dass die heller erscheinenden Bereiche auf der Oberfläche (Abb. 89 links) höhere Konzentrationen an Calcium und Phosphat aufwiesen (Abb. 89 rechts).



Abb. 89: Überlagerung einer rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mit hMSCbesiedelten Prüfkörpers aus PDLLA mit den Elementanalysen bezüglich Calcium (grün) und Phosphor (blau).

Das verbrauchte Zellmedium wurde nach dem Mediumwechsel nicht verworfen, sondern auf Alkalische Phosphatasen (ALP) untersucht (Abb. 90). Parallel wurden zusätzliche, u. a. Strontium-haltige Werkstoffe analysiert. Abgesehen davon, dass die Wellkontrolle deutlich geringere Werte zeigt als die Werkstoffe und die Glaskontrolle, liegen die Werte innerhalb eines Messzeitpunktes in einem ähnlichen Bereich. Die Werte sind am ersten Messtag (1 Tag) am höchsten. Nach 7 Tagen fallen die Werte ab, steigen nach 14 Tagen jedoch wieder etwas an.



Abb. 90: Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität am Überstand nach 1, 7 und 14 Tagen Kultivierung von hMSCs in osteogenem Induktionsmedium auf verschiedenen Verbundwerkstoffen. Werkstoffbezeichnungen in Gew.-% PDLLA/β-TCP/Calciumcarbonat (bzw. Strontiumcarbonat) bzw. PDLLA/β-TCP.

Eine Wiederholung der ALP-Messung an neuen Prüfkörpern zeigte vergleichbare Ergebnisse (Abb. 91). In diesem Versuch wurde das Induktionsmedium erst zugeben, nachdem der Zellrasen eine Konfluenz von 100 % aufwies. Dieser Tag wurde als "Tag 0" definiert. Nach 7 Tagen war zwar die ALP-Aktivität auf dem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Strontium-substituiertem β -TCP höher als auf den anderen Werkstoffen, jedoch war auch die Standardabweichung hoch.



Abb. 91: Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität am Überstand am Tag der Induktion und nach 1, 7 und 14 Tagen Kultivierung von hMSCs nach Induktion auf verschiedenen Verbundwerkstoffen. Werkstoffbezeichnung in Gew.-% PDLLA/ β -TCP/Calciumcarbonat (bzw. Strontiumcarbonat) bzw. PDLLA/ β -TCP (bzw. Sr13TCP).

Die Versuchsreihe, in der der Nachweis sowohl qualitativ als auch quantitativ mittels Osteolmage erfolgte, beinhaltete zudem den ALP-Nachweis (**Abb. 92**). Die Aktivität stieg über 14 Tage für beide Werkstoffe und die Kontrolle an, fiel nach 21 Tagen jedoch ab. Beide Werkstoffe lagen auch hier über der Kontrolle.



Abb. 92: Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität am Überstand am Tag der Induktion und nach 1, 7 und 14 Tagen Kultivierung von hMSCs nach Induktion auf verschiedenen Verbundwerkstoffen. Werkstoffbezeichnung in Gew.-% PDLLA/β-TCP/Calciumcarbonat bzw. PDLLA/β-TCP.

Der qualitative Nachweis der Hydroxylapatit-Ablagerungen als Hinweis auf osteogene Differenzierung der hMSCs erfolgte mittels *Osteolmage* (Abb. 93). Sowohl mit Induktion als auch ohne Induktion gab es auch beiden Werkstoffen Reaktionen hinsichtlich des Hydroxylapatit-Nachweises. Auch die Zellen wurden anhand ihrer Zellkerne mit der DAPI-Färbung nachgewiesen. Aufgrund der grünen Farbintensität sind die Kerne jedoch schwieriger zu erkennen.

Auf der Kontrolle ohne Induktion wurde nur der Zellkern angefärbt. Hydroxylapatit konnte nicht nachgewiesen werden. Auf der Kontrolle mit Induktion waren nur vereinzelt Zellen zu finden. Hydroxylapatit konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.



Abb. 93: Qualitativer Nachweis von Hydroxylapatit-Ablagerung als Zeichen osteogener Differenzierung von hMSCS mittels *OsteoImage*. Maßstabbalken \triangleq 500 µm.

Der quantitative Nachweis der Hydroxylapatit-Bildung mittels fluorometrischer Messung ergab bei osteogener Induktion deutlich höhere Werte für den 60/20/20rf-Werkstoff im Vergleich zu dem 60/40TCP-Werkstoff (Abb. 94 links). Ohne osteogene Induktion waren die gemessenen Werte sehr gering. Als Kontrolle wurden zudem die Intensitäten von reinem Hydroxylapatit und β -TCP ohne Zellbesiedelung gemessen (Abb. 94 rechts). Als Kontrolle wurden die reinen Werkstoffe ohne Färbung gemessen. Zwar war die Intensität von Hydroxylapatit deutlich höher als β -TCP, jedoch führte auch letzteres zu einer Reaktion. Die Prüfkörper ohne Färbung zeigten nahezu keine Messintensität.



Abb. 94: Fluorometrischer Nachweis von Hydroxylapatit-Ablagerung auf verschiedenen Werkstoffen (Gew.-% PDLLA/ β -TCP/Calciumcarbonat bzw. PDLLA/ β -TCP) als Zeichen osteogener Differenzierung von hMSCS mittels OsteoImage (links). Vergleich der fluorometrischen Intensitäten von Hydroxylapatit und β -TCP ohne Zellbesiedelung mittels OsteoImage (rechts). Als Kontrolle wurden die reinen Prüfkörper ohne Färbung analysiert.

4.5.4 Resorptionsuntersuchungen

Die Kontrolle des pH-Wertes während der Kultivierung von RAW ergab, dass die Werte für alle Werkstoffe sowohl mit als auch ohen Differenzierungsfaktoren über die untersuchten 10 Tage abfallen (Abb. 95). Die Glaskontrolle ohne Differenzierungszusätze stieg zunächst etwas an, zeigte nach 10 Tagen aber einen unveränderten pH-Wert. Auch der pH-Wert des Mediums der Glasproben mit Differenzierungszusätzen fiel in gleichem Maße wie die Werkstoffe ab. Trotz des pH-Wert-Abfalls liegen die Werte im neutralen Bereich.



Abb. 95: pH-Kontrolle des Medium während der RAW-Kultivierung. Der initiale pH-Wert des Medium lag bei 8,0.

Die Visualisierung der ohne Differenzierungszusätze kultivierten RAW-Zellen mittels Rasterelektronenmikroskop zeigte, dass sich die Zellen sowohl auf der Kontrolle als auch auf dem Werkstoff dicht zusammenlagerten (Abb. 96).



Abb. 96: RAW-Zellen auf einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. grob) und einer Glaskontrolle im Sekundärelektronen-und Rückstreuelektronen-Modus. (Maßstabbalken \triangleq 20 µm).

Die Morphologie der Zellen und der Oberfläche war im Sekundärelektronen-Modus gut erkennbar. Auf der Kontrolle waren die Zellausläufer der ausgespreitzten Zellen gut zu erkennen. Auf dem Werkstoff war die Morphologie deutlich schwieriger zu beurteilen. Insgesamt sahen die Zellen deutlich kompakter und runder aus. Die materiellen Unterschiede konnten im Rückstreuelektronen-Modus analysiert werden. So zeigte sich das die bereits erwähne Zusammenlagerung der Zellen auf dem Werkstoff deutlich ausgeprägter war als auf der Kontrolle. Auf dem Werkstoff entstand ein dichter Zellrasen, während auf der Kontrolle Zwischenräume zu sehen sind. Resorptionslakunen waren nicht zu erkennen.

Die pH-Wert-Kontrolle bei der Kultivierung von RAW-Zellen ohne Differenzierungszusätze auf einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. grob) sowie einer Glas- und Wellkontrolle, verzeichnete für alle Proben einen Abfall des pH-Wertes über 14 Tage (Abb. 97). Dennoch lagen die Werte im physiologischen Bereich. Die Mediumkontrolle blieb konstant.



Abb. 97: pH-Wert-Entwicklung bei RAW-Kultivierung ohne Differnezierungszusätze auf einem Werkstoff aus 60 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. grob).

In einem weiteren Versuch wurden zunächst Osteoklasten mittels TRAP-Färbung auf den Glaskontrollen nachgewiesen (Abb. 98). Die Zellen waren teilsweise sehr dicht gewachsen, so dass die Ausfindung der differenzierten Zellen schwierig war. Osteoklasten konnten vereinzelt sowohl am Tag der Faktoren-Zugabe ("Tag 0") als auch nach 14 Tagen nachgewiesen werden (Abb. 98, Pfeile).

Durch die Immunfluoreszenzfärbung wurde das Skelett der Zellen visualisiert (Abb. 99). Deutlich zusehen ist der Aktinring der Zellen auf den Glasronden, mit Hilfe dessen die Zellen an der Oberfläche anhaften. Auf den Prüfkörpern sind die Zellen deutlich schlechter zu erkennen, da die Oberfläche sehr uneben ist. Zudem zeigte sich, dass auf den Prüfkörpern mit Differenzierungszusätzen deutlich weniger Zellen zu finden waren als auf denen ohne Zusätze.



Abb. 98: TRAP-Färbung von RAW-Zellen nach Kultivierung in Differenzierungsmedium.



60/30/10 ohne Faktoren

60/30/10 mit Faktoren

Abb. 99: Immunfluoreszenzfärbung von RAW-Zellen mit und ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren (Maßstabbalken \triangleq 200 µm).

4.5.5 Kurzusammenfassung Ergebnisse Zellverträglichkeit

aller Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen Die untersuchten Zelltypen auf den warmgepressten Prüfkörper wiesen für alle Werkstoffe auf eine qute Zellverträglichkeit hin. Die Untersuchungen mit hMSCs zeigten jedoch sehr geringe Zellaktivitäten. Dabei ergab sich eine Abhängigkeit der Anzahl der Kontakte mit dem Fluoreszenz-Farbstoff. Dies zeigten Immunfluoreszenz-Färbungen nach der Viabilitätsanalyse. Auf den SLM-Prüfkörper wurden nur sehr wenige Zellen, die zudem überwiegend tot waren, nachgewiesen. Die Viabilitätsuntersuchungen zeigten, dass es auf den SLM-Prüfkörpern nahezu keine Zellaktivität der untersuchten Zelltypen gab. Dabei ergab sich keine Abhängigkeit von der Werkstoffzusammensetzung. Auf den SLM-Prüfkörpern aus dem PLLA-Werkstoff zeigten MG-63-Zellen ansteigende Aktivitäten im Bereich der Kontrolle. Die Aktivität der Stammzellen auf dem PLLA-Werkstoff lag zwar unterhalb der Zellaktivität auf der Kontrolle, jedoch stieg sie kontinuierlich an.

Eine Differenzierung der hMSCs zu Osteoblasten konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auch Osteoklasten und eine resultierende Resorption des Werkstoffes konnte nicht eindeutig gezeigt werden.

Die Strontium-haltigen Verbundwerkstoffe zeigten eine geringere Zellviabilität als die Strontium-freien Werkstoffe.

5 Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse im Hinblick auf die Werkstoffaufbereitung, die Prüfkörperherstellung sowie deren Charakterisierung diskutiert. Daran anschließend folgt die Diskussion der Degradationsstudien und der biologischen Verträglichkeit. Eine Übersicht über die diskutierten Aspekte gibt das folgende Schema:

Untersuchungen an PDLLA- und PLLA-basierten Werkstoffen					
Werkstoff	Mechanik	Degradation	 <u>Biologie</u> Viabilität Differenzierung Resorption 		
• Synthese	• Biegung	• pH-Wert			
• Charakteri-	• Druck	• Festigkeit			
sierung	• zyklisch	• Quellung			

Abb. 100: Übersicht über die Reihenfolge der im Rahmen der Diskussion betrachteten Ergebnisse.

5.1 Charakterisierung der Werkstoffe und Prüfkörper

Das Ziel war es, einen maßgeschneiderten Verbundwerkstoff zu entwickeln, der neben einer ausreichend hohen Festigkeit der herzustellenden Implantate gute biologische Eigenschaften sowie eine ausreichende Pufferfähigkeit besitzt, um dem aciden Polymerabbau entgegenzuwirken. Zudem galt es, einen Kompromiss zwischen Polymer- und Keramikanteil zu finden. Da das Polymer als adhäsive Komponente ("Kleber") im Verbundwerkstoff diente, musste der Anteil ausreichend hoch sein, um eine Prüfkörperstabilität zu erzielen. Mit steigendem Calciumphosphat-Anteil ähnelt der Werkstoff jedoch mehr der mineralischen Struktur des natürlichen Knochens, wodurch gute biologische Eigenschaften zu erwarten waren. Mit steigendem Anteil an Calciumcarbonat erhöht sich die Pufferfähigkeit der neuartigen Verbundwerkstoffe.

Werkstoffaufbereitung

Zu Beginn wurden Versuche durchgeführt, um werkstoffspezifische Mahlparameter einzustellen. Dies betraf neben der Mahlkugelmasse auch das Verhältnis der drei Mahlkörpergrößen sowie die Mahldauer, das Mahlvolumen der Trommel und die Masse des Mahlgutes. Aufgrund der zahlreichen Parameter und Einflussfaktoren wurde die Partikelgröße als Zielgröße definiert. Die Partikelgröße wurde ausschließlich über die Mahldauer eingestellt. Die übrigen Parameter wurden konstant gehalten, um für alle Werkstoffe die gleiche Ausgangsituation zu schaffen und sie besser miteinander vergleichen zu können. Aufgrund der hohen Mahlkräfte im Aufbereitungsprozess bestand neben dem Risiko des Abriebs von der Mahltrommel auch das Risiko des Abriebs von den Mahlkörpern. Durch die Beschichtung der Mahltrommel konnte ein Abrieb dieser verhindert werden (vgl. Abb. 105). Die Phasenanalyse zeigte keine Fremdphase von Zirkonoxid (vgl. Abb. 106). Die Elementanalyse ergab einen Anteil von 0,01 Gew.-% Zirkonium (vgl. Tab. 39). Dieser Anteil lag an der unteren Messgrenze der Anlage und war vernachlässigbar klein. Somit konnte bestätigt werden, dass der Aufbereitungsprozess nahezu abriebfrei durchgeführt werden konnte. Die Berechnung der Anteile von Calcium und Phosphor in einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat ergab Werte von 15,7 Gew.-% bzw. 4,0 Gew.-% (Anhang, Tab. 39). Der Vergleich der Werte aus der Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) (Ca 16,8 Gew.-% bzw. P 2,34 Gew.-%) ergab deutliche Unterschiede. Da die RFA eine Abweichung der Werte von 2-3 % besitzt und zudem die Ausgangsmaterialien sehr genau abgewogen wurden, ist davon auszugehen, dass der berechnete Wert näher am tatsächlichen Wert lag als der gemessene Wert. Die Bestimmung der Molmasse des Polymers vor und nach dem Mahlprozess ergab, dass der Mahlprozess die Molmasse um 14 % verringerte. Einerseits wurde der Mahlprozess über vier Wochen bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Polymer sollte im Kühlschrank gelagert werden, um eine Degradation zu verhindern. In Anbetracht der Abbauzeit des PDLLAs von einigen Monaten [32], [72], [135] sollte dieser Einfluss jedoch gering gewesen sein. Die Verringerung der Molmasse war hauptsächlich durch die mechanische Spaltung der Polymerketten und durch reibungsbedingte Temperaturerhöhung durch den Mahlprozess verursacht [149, S. 108].

Die wichtigste Zielgröße war die Partikelgröße der Verbundwerkstoffe. Da die Herstellung von mikrostrukturierten Implantaten mittels generativer Fertigungsverfahren eine Partikelgröße unterhalb der aufzubauenden Schichtdicken bedingt, wurde ein d90-Wert von 100 µm angestrebt. Der d90-Wert definiert die maximale Partikelgröße, die 90 % der Partikel haben [67, S. 69]. Da die Partikelgröße von Pulvern mittels Lasergranulometrie auf zwei Weisen erfolgen kann [14, S. 37f], wurden zu Beginn beide Messungen verglichen. Die erste Messung erfolgte ohne Ultraschallbehandlung, um mögliche Agglomerate im Werksstoff zu messen. Die zweite Messung erfolgte dann unter einer zusätzlichen Ultraschallbehandlung, wodurch mögliche Agglomerate aufgelöst wurden, so dass die einzelnen Partikel gemessen werden konnten. Da sich gezeigt hatte, dass beide Messungen zu einem vergleichbaren Ergebnis führten, wurde im Weiteren nur noch die Messung mit Ultraschallbehandlung durchgeführt. Die Messung benötigte nur einen Bruchteil der Pulvermenge, die für die andere Messung benötigt wurde. In Abhängigkeit der Werkstoffzusammensetzung variierten die Partikelgrößen der Pulver (vgl. Tab. 19). Der Vergleich der Werkstoffe mit einem Polymeranteil von 40, 50 und 60 Gew.-% ergab, dass die kleinste Korngröße bei 50 Gew.-% Polymer erreicht wurden. Die Partikelgröße bei 40 Gew.-% und der Mittelwert von 60 Gew.-% lagen in der gleichen Größenordnung. Eine mögliche Erklärung dafür war, dass ein höherer Polymeranteil

zu einer "Polsterung" führte. Durch die Einbettung der Mahlkugeln und der Keramiken wurden die Partikel vor Abrasion geschützt, was eine hemmende Mahlwirkung zur Folge hatte. Gleichzeitig führt ein deutlich geringerer Anteil von PDLLA (40 Gew.-%) zu einer größeren Partikelgröße, da die Zerkleinerung der harten β-TCP-Partikel länger dauert als der weichen Polymerflocken. Ein höherer β-TCP-Anteil führte zudem zu einer kleinere Korngröße. Ein Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP wies einen d90-Wert von 85 µm auf, während ein Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) bei identischen Mahlparametern einen d90-Wert von 104 µm aufwies (vgl. Tab. 21). Ein (60/20/20rf) enthielt lag mit 91 µm genau im Mittel. Zusätzlich zu den Mahlkörpern hatten auch die keramischen Anteile eine Mahlwirkung. Da das verwendete ß-TCP eine größere Ausgangspartikelgröße (588 µm) hatte als das rhomboedrisch feine Calciumcarbonat ($\approx 0.5 \,\mu$ m), war der Einfluss des β -TCP deutlich größer. Die Mahlwirkung des Calciumcarbonats war bei dieser feinen Partikelgröße eher zu vernachlässigen. Es zeigte sich jedoch, dass die Calciumcarbonat-Variante sehr wohl einen Einfluss auf die Partikelgröße hatte (vgl. Tab. 20). Bei Verwendung von sphärolithischem $(Ø = 3 \mu m)$ und bei rhomboedrisch arobem $(\emptyset = 12 \text{ µm})$ Calciumcarbonat ergab sich bei identischen Mahlparametern eine Partikelgröße von etwa 70 µm. Insgesamt zeigte sich, dass die Partikelgrößen der Werkstoffe, die aus 60 Gew.-% PDLLA bestanden und sowohl β-TCP als auch Calciumcarbonat enthielten, um 90 µm (d90) lagen. Die Standardabweichungen bei den Verbundwerkstoffen mit 60 Gew.-% Polymer, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) könnten durch Einflüsse aus der Umgebung verursacht worden sein. So führte eine höhere Luftfeuchtigkeit oder eine höhere Raumtemperatur möglicherweise zu einer leichten Quellung des Verbundwerkstoffes und folglich zu einer veränderten Partikelgröße [15, S. 62]. Fehler bei der Messung konnten zudem dadurch zustande gekommen sein, dass die Partikel nicht in alle drei Raumrichtungen symmetrisch waren (vgl. Tab. 6). Da die Lichtstreuung davon abhängig ist, welche Fläche des Partikels getroffen wird, können die Streuwinkel bei einem asymmetrischen Partikel voneinander abweichen. Zudem guoll das Polymerpulver in Kontakt mit Wasser auf, so dass eine Volumenvergrößerung zu einer abweichenden Partikelgröße führen konnte.

Anhand der REM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass das einfache Vermischen der drei Komponenten auf der Rollenbank nicht zu einer homogenen Verteilung im Werkstoff führte (vgl. Abb. 108 links). Erst der entwickelte Mahlprozess führte zu einem homogenen Werkstoff (vgl. Abb. 108 rechts). Der Mahlprozess war somit nicht nur für die Zerkleinerung der Partikel [149, S. 108], sondern auch für die Homogenisierung des Werkstoffes notwendig. Wichtig war vor allem, dass alle drei Komponenten in jedem Partikel des Werkstoffs enthalten waren, damit diese auch in jeder Schicht im späteren Laserprozess garantiert werden konnten. Im Hinblick auf Schichtdicke 100 µm konnte eine von anhand der **REM-Aufnahmen**

(Maßstabbalken $\triangleq 50 \,\mu$ m) nachgewiesen werden, dass die Partikel in jeder Schicht enthalten waren (vgl. Abb. 20). In jedem Polymerpartikel war sowohl Calcium als auch Phosphor enthalten, wodurch die homogene Verteilung von β -TCP nachgewiesen wurde. Das Calcium aus Calciumcarbonat und β -TCP konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund des enormen Größenunterschiedes der Ausgangspartikel wurden die groben Partikel dem β -TCP sowie die sehr feinen, staubartigen Partikel dem Calciumcarbonat zugeordnet wurden. Vereinzelt konnten Calcium-haltige, jedoch Phosphor-freie Partikel identifiziert werden, die eindeutig Calciumcarbonat zuzuordnen waren. Bei Verbundwerkstoffen mit rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat war die Vergrößerung in die Größenordnung der Calciumcarbonat-Partikel nicht möglich, da das Polymer zu schnell degradierte (vgl. Abb. 110). So konnte die Geometrie der Partikel nicht beurteilt werden und es blieb offen, ob der Mahlprozess einen Einfluss auf die Geometrie der Calciumcarbonat-Partikel hatte.

Im Laserschmelzprozess zeigte sich, dass sich der Werkstoff bei einem Anteil an Calciumcarbonat bräunlich verfärbte (vgl. Abb. 23). Die Verfärbung wurde mit steigendem Anteil an Calciumcarbonat stärker. Die Schmelzschichten des Calciumcarbonat-freien Werkstoffs waren gänzlich weiß. Diese Erkenntnis widersprach den Erkenntnissen einer Studie, die zeigte, dass Calciumcarbonat in einem PDLLA-Film zu einer Reduktion der thermischen Degradation gegenüber dem reinen Polymers führte [68, S. 132]. Die Verfärbung war umso stärker, je höher die Energiedichte der Laserstrahlung war. Die Verfärbung kam durch die Degradation des Polymers zustande [47, S. 17]. Das Calciumcarbonat im Werkstoff führte zu einer beschleunigten Degradation im Laserprozess. Die Herabsetzung der Energiedichte der Laserstrahlung verringerte zwar die Degradation, jedoch war kein vollständiges Aufschmelzen des Polymers möglich, so dass keine ausreichende Schichtstabilität gewährleistet werden konnte [106, S. 79]. Einflussfaktoren konnten neben der Partikelgröße auch die Partikelgeometrie des Calciumcarbonats sein [44, S. 92], [66, S. 110]. Da die Partikel aufgrund der geringen Größe bisher nicht am REM analysiert werden konnten, konnten jedoch keine Aussage über die Partikelgeometrie nach dem Mahlprozess getroffen werden. Um die mechanische Belastung zu verringern, wurden Verbundwerkstoffe mit Hilfe eines Speedmixers hergestellt. Es wurde zunächst ein Verbundwerkstoff aus PDLLA und ß-TCP über herkömmlichen Mahlprozess hergestellt. Anschließend wurde den das Calciumcarbonat über einen Speedmixer in den Werkstoff eingebracht. Da es sich beim Speedmixen nicht um einen Mahlprozess handelt, konnte sichergestellt werden, dass die Geometrie der Calciumcarbonat-Partikel nicht verändert wurde. Da Nekhamanurak et al. gezeigt hatten, dass die Degradationstemperatur (T_d) von PLA-CaCO₃-Werkstoffen bei Verwendung von Nano-CaCO₃ geringer war als bei Mikro-CaCO₃ [123], wurden zudem zwei verschiedene Partikelgrößen von Calciumcarbonat im Rahmen der Speedmixer-Untersuchungen verglichen. Die größeren Partikel (sphärolithisch, Ø≈12 µm) konnten am REM visualisiert werden, während die Auflösung in die Größenordnung der kleineren Partikel (rhomboedrisch fein, $\emptyset \approx 0,5 \mu m$) auch hier nicht möglich war. Der Werkstoff mit den sphärolithischen Partikeln zeigte eine homogene Verteilung sowie unveränderte Calciumcarbonat-Partikel (vgl. Tab. 6). Im Laserschmelzprozess konnten komplett weiße Schichten hergestellt werden, während die Verwendung von rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat bei gleichen Laserparametern zu eine deutlichen Verfärbung führte (vgl. Abb. 25). Die sphärolithische Variante zeigte erst bei höheren Energiedichten eine Verfärbung, bei denen die rhomboedrische Variante bereits stark verkohlt war (vgl. Abb. 25). Zu erwarten ist jedoch, dass weniger die Partikelgeometrie als die Partikelgröße für die Ausprägung der Degradation maßgeblich ist. Kim untersuchte den Einfluss von Makro-, Mikro- und Nano-Füllstoffteilchen in einer Polymermatrix [89]. Bei gleichem Volumenanteil des Füllstoffes sind die Abstände zwischen den Teilchen bei kleinen Partikeln kleiner als bei größeren Partikeln (ungefähr halb so groß). Dadurch sind die Polymerstege zwischen den Keramikpartikeln schmaler und der Einfluss der Grenzschicht wird größer [89].

Da die Verkleinerung der Partikel zu einer enormen Erhöhung der Partikelanzahl pro Volumen führt, ändern sich die Eigenschaften des Matrixpolymers signifikant [89]. Bei Nanopartikeln spricht man daher nicht mehr von einer gefüllten Polymermatrix, sondern von einer Polymergrenzschicht [89]. Hinzu kommt, dass die spezifische Oberfläche von Nanopartikeln größer ist als bei größeren Partikeln. Dadurch vergrößert sich die Kontaktfläche zwischen Polymermatrix und Füllstoff. Wenn also eine Reaktion zwischen Calciumcarbonat und Polymerschmelze abläuft, ist diese umso stärker bei kleineren Partikeln. Dies könnte erklären, warum die Degradation bei der sphärolithischen Variante so viel langsamer erfolgt war, als bei der rhomboedrisch feinen Variante. Bei einer großen spezifischen Oberfläche befinden sich viele Atome an der Oberfläche, wodurch der energetische Zustand erhöht wird [89]. Dadurch steigert sich neben der chemischen Reaktivität auch die katalytische Aktivität. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich die Calciumcarbonat-Partikel durch den Laserprozess so stark aufheizen, dass sich lokale Hitzezentren bilden, die das Polymer schädigen. Da bei einer feineren Calciumcarbonat-Variante die Partikelanzahl pro Volumen größer ist als bei einer gröberen Variante, ist folglich auch die Anzahl dieser Hitzezentren höher und die Polymerschädigung nimmt zu. Die Absorptionskoeffizienten von Calciumcarbonat und B-TCP liegen zwar in der aleichen Größenordnung, durch die deutlich größeren β-TCP-Partikel ist die Anzahl dieser lokalen Hitzezentren geringer. Demzufolge bedeutet eine höherer Anteil der kleinen Calciumcarbonat-Partikel eine stärkere Aufheizung und folglich eine stärkere Polymerschädigung. Im Hinblick auf die Degradation des Polymers wäre daher eine gröbere Calciumcarbonat-Variante sinnvoll. Hintergrund eine feine Variante zu wählen, war der, dass die Partikel viel feiner in der Matrix verteilt werden konnten und somit die Pufferung gleichmäßiger erfolgt. Bei einer feineren Variante wird eine höhere Anzahl an Partikeln pro Zeit freigesetzt, so dass dem aciden Abbau des Polymers konstant entgegengewirkt werden kann.

Strontium-haltige Werkstoffe

Da sich in einigen Untersuchungen [32], [58], [110] sowie in der vorliegenden Arbeit gezeigt hatte, dass die biologischen Eigenschaften optimiert werden mussten, wurden Strontium-haltige Materialien in den Verbundwerkstoff eingebracht. Neben Strontiumcarbonat wurde auch Strontium-substituiertes β -TCP (Sr13TCP) verwendet [2], [17]. Während von Strontiumcarbonat eine höhere Pufferfähigkeit zu erwarten war, wurden durch Sr13TCP die biologischen Eigenschaften optimiert. Ein Anteil von 10 Gew.-% Strontiumcarbonat bei einem Polymeranteil von 60 Gew.-% führte zu einer Partikelgröße von 79 µm (vgl. Tab. 24). Bei 20 Gew.-% Strontiumcarbonat (0 Gew.-% Calciumcarbonat) ergab sich eine um 40 % kleinere Partikelgröße von 47 µm. Somit zeigte sich, dass durch Strontiumcarbonat eine deutlich höhere Mahlwirkung erzielt wurde als durch Calciumcarbonat. Der Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Sr13TCP hatte eine Partikelgröße zwischen den beiden Werten. Daraus konnte geschlossen werden, dass Strontiumcarbonat eine höhere, Calciumcarbonat aber eine geringere Mahlwirkung als β -TCP hat.

Prüfkörperherstellung

Durch das einfache Aufschmelzen der Verbundwerkstoffpulver konnten keine dichten und formtreuen Prüfkörper hergestellt werden. Zwar könnte die Porosität, die zum einen durch fehlendes Verdichten und zum anderen durch degradationsbedingte Gasbildung verursacht wurde, vorteilhaft für das Zellverhalten und/oder das Gewebeeinwachsen sein [26], [122], jedoch ging es bei den anfänglichen Versuchen um die reine Materialcharakterisierung. Der Einfluss der Porenstruktur ist erst im Anschluss an die Materialcharakterisierung zu untersuchen. Nachteilig war, dass diese Porenstruktur undefiniert und zudem im Hinblick auf die äußere Implantatgeometrie beschränkt war. Die Aufschmelzung eines kaltgepressten Prüfkörpers, der zudem zwischen zwei Platten gelagert wurde, führte zwar zu etwas formtreueren Prüfkörpern, jedoch haben die Querschliffe gezeigt, dass das Probeninnere sehr inhomogen war (vgl. Anhang, Abb. 109). So waren die Randbereiche stärker degradiert, da der Prüfkörper nicht nur über die Umgebungsluft im Ofen, sondern auch durch direkt durch die warmen Auflager der Temperatur ausgesetzt war. Dadurch entstand im Inneren ein schwächer degradierter Kern (vgl. Abb. 101). Über den Warmpressprozess konnten reproduzierbare Prüfkörper hergestellt werden (vgl. Abb. 27). Da ein zusätzlicher Pressdruck aufgebracht wurde, konnte die Temperatur auf 150 °C reduziert werden. Zudem war die Presszeit ausreichend kurz, so dass eine Polymerdegradation verhindert werden konnte (vgl. Tab. 26). Trotz des Verpressens der Verbundwerkstoffe konnte statt einer erwarteten Dichte von annähernd 100 % nur eine Dichte von 84,7 % erreicht werden. Mögliche Ursachen können Lufteinschlüsse gewesen sein. Da das Polymer in Kontakt mit den Presstempeln schnell aufschmilzt, aber anschließend auch schnell aushärtet, kann eingeschlossene Luft nicht mehr aus dem Probeninneren entweichen. Außerdem wurde die Matrize durch das geschmolzene Polymer im Inneren gänzlich abgedichtet, so dass die Luft nicht aus der Matrize gelangen konnte [165, S. 367]. Eine

Gasbildung degradationsbedingte während des Warmpressens konnte ausgeschlossen werden, da bereits nachgewiesen wurde, dass sich die Molmasse des Polymers während des Warmpressprozesses nicht verändert hatte. Backhaus et al. gaben eine Dichte ihrer warmgepressten Prüfkörper von 100 % an [11]. Sie verwendeten zwar eine geringere Temperatur im Pressprozess (100 °C), wählten aber einen deutlich höheren Druck (60 kbar ≙ 6 GPa). Zudem lag die Haltezeit bei 15 min. Die Parameter in der vorliegenden Arbeit waren 150 °C, 3000 N (\triangleq 27 MPa). Da die Prüfkörper als Referenz zu den SLM-Prüfkörpern dienen sollten, wurde die Presskraft gering gehalten. Da die Verdichtung im Laserprozess über die Temperatur bzw. die Energiedichte der Laserstrahlung erfolgte und nicht über ein zusätzliches Verpressen, sollten beim Warmpressen vergleichbare Prozessschritte durchgeführt werden. Bei den SLM-Prüfkörpern konnte eine Dichte bis zu 98 % eingestellt werden (Angaben C. Gayer, ILT Aachen). Bei einer geringen Verfärbung lag der Wert bei etwa 80 % (vgl. Tab. 27). Die Dichte stieg zwar durch Aufbringen einer höheren Energie, jedoch zeigte der Werkstoff eine zunehmende Degradation. Eine Dichte von 100 % war erstrebenswert, da die gezielt einzubringende Makroporosität eindeutig definiert werden kann. Eine zusätzliche Mikroporosität kann jedoch zusätzliche positive Effekte auf das Knocheneinwachsen haben [113]. Die Dichte wurde ermittelt, die volumenbezogene Prüfkörpermasse in das Verhältnis indem zur volumenbezogenen Masse eines vollständig dichten Prüfkörpers (0 % Porosität) gesetzt wurde. Das hatte den Vorteil, dass eingeschlossene Poren (masselos) über das Prüfkörpervolumen trotzdem berücksichtigt wurden. Die mittels Pyknometer ermittelte Dichte berücksichtigte dagegen nur die offene Porosität. Die geschlossenen Poren wurden von dem umgebenen Wasser nicht erreicht, so dass diese als dichte Stelle im Material gewertet wurden. Zudem zeigte sich eine starke Varianz in der Dichte in Abhängigkeit der Prüfkörpergröße. Die Dichte variierte zwischen 72 und 84 %. Grund dafür war, dass das Prüfkörpervolumen bzw. die Menge des verdrängten Wassers gering waren im Vergleich zu dem Füllvolumen des Pyknometers. So ergab sich eine sehr geringe Massenänderung des Wassers im Pyknometer durch die Einlagerung der Probe. Die Massenänderung des Wassers bezogen auf die geringe Probenmasse war jedoch groß, so dass die Standardabweichungen groß waren (vgl. Tab. 29). Die Dichtebestimmung mittels Pyknometer war daher in Bezug auf die hergestellten Prüfkörper keine geeignete Methode.

Die aus den Prüfkörpern hergestellten Querschliffe zeigten zwar keine Porosität, jedoch konnte nicht garantiert werden, dass die Oberflächen während des Schleifprozesses unabsichtlich verdichtet wurde. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass die Verteilung der Komponenten durch ein "Verschmieren" des Polymers verändert wurde [149, S. 108], zum anderen konnten mögliche Poren durch die veränderte Verteilung gefüllt wurden. Durch einen Kryobruch konnte zwar der Einfluss des Schleifens auf die Verteilung im Werkstoff ausgeschlossen werden, jedoch konnte nicht unterschieden werden, ob Hohlräume durch die Porosität oder

herausgebrochenen Partikeln begründet sind. Die Aufnahmen im Sekundärelektronenmodus (SE) zeigten zum einen, dass das Polymer im Warmpressprozess gänzlich aufgeschmolzen wurde und die keramischen Partikel einbettete oder fixierte (vgl. Abb. 28). Zum anderen zeigte die Aufnahme eine homogene Verteilung der drei Komponenten. Genau wie bei der Beurteilung der Elementverteilung im Pulver war auch bei der Auswertung der Aufnahmen der Prüfkörper die starke Vergrößerung zu beachten. Der Maßstabbalken war mit 5 µm definiert. So konnte garantiert werden, dass in jeder Schicht des Prüfkörpers alle Komponenten vertreten waren. Zudem zeigten die Aufnahmen der Prüfkörperflächen, dass während der Prüfkörperherstellung keine Sedimentations- oder Separationseffekte auftraten. Die kleinen Calciumcarbonat-Partikel waren zwar erkennbar, aber auch hier war eine Identifikation ihrer Geometrie nicht möglich. Im Rückstreuelektronenmodus (BSE) war eine Aufnahme der Prüfkörper nicht möglich (vgl. Abb. 110). Da die aufzubringende Energie zu hoch war, degradierte das Polymer [46, S. 61]. Da sich die Oberfläche dadurch während der Aufnahme veränderte, konnte kein scharfes Bild aufgenommen werden. So konnten die Elemente nicht aufgrund ihrer elementspezifischen Rückstreuung zugeordnet werden (BSE-Modus), sondern nur aufgrund ihrer Morphologie und Größe (im SE-Modus).

Die zur Charakterisierung der Prüfkörperoberflächen durchgeführten Kontaktwinkelmessungen ergaben für alle Werkstoffe keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 111). Die Winkel lagen zwischen 50° und 65°. Die Werte lagen somit im hydrophilen Bereich (< 90°). Die Analyse der Rauheit ergab Mittenrauwerte zwischen Ra = 0,7 µm und 1,2 µm (vgl. Anhang Tab. 42, Abb. 112). Es zeigten sich keine Unterschiede in Abhängigkeit der Zusammensetzung. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Partikelgrößen der drei Komponenten war ein Höhenunterschied in dieser Größenordnung zu erwarten. Dementsprechend war die Beschaffenheit der Oberfläche gut geeignet für die weiteren Untersuchungen. Da die im Laserschmelzprozess hergestellten Prüfkörper nicht umfangreich nachbearbeitet werden sollten, wurden auch die warmgepressten Prüfkörper nicht nachbearbeitet. Dies hatte zudem den Vorteil, dass die Zusammensetzung und die Verteilung der Komponenten an der Oberfläche nicht verändert wurden. Eine Rauheit im Mikrometerbereich kann für das Zellverhalten sogar förderlich sein [79], [80].

Bei der Herstellung der SLM-Prüfkörper wurden die Scangeschwindigkeit, der Laserstrahldurchmesser und die Schichtdicke konstant gehalten. Einzig die Laserleistung, und somit die Energiedichte der Laserstrahlung, wurde variiert. Dadurch wurden alle Werkstoffe der gleichen Behandlung unterzogen, so dass die Auswirkungen auf das Material besser analysiert werden konnten. Insbesondere die Polymerdegradation spielte diesbezüglich eine Rolle, da diese einen entscheidenden Einfluss auf die Festigkeit der Prüfkörper hatte [151, S. 490]. Bei einer entsprechenden Anpassung der Laserparameter an den jeweiligen Werkstoff oder die Prüfkörpergeometrie könnte zwar ein konstanter Degradationsfortschritt eingestellt werden, jedoch waren eine Vielzahl von Laserparametern und somit von Einflussfaktoren zu betrachten. Ebenso ist die Anpassung der einzelnen Parameter im Laserschmelzprozess bei der Vielzahl an Werkstoffzusammensetzungen sehr aufwendig und nicht zielführend. Daher war es sinnvoll, die Anpassung der Parameter bei der finalen Werkstoffzusammensetzung vorzunehmen. In dieser Arbeit stand die Werkstoffentwicklung und -charakterisierung im Vordergrund. In Abhängigkeit der Energiedichte bzw. des Degradationsfortschrittes des Polymers variierte die Beschaffenheit der Oberfläche. Je stärker das Polymer degradierte, desto rauer wurde die Oberfläche (vgl. Abb. 29, Abb. 30). Dies war hauptsächlich mit der degradationsbedingten Gasbildung zu begründen [10, S. 304, 403]. Die Oberflächenbeschaffenheit hat speziell bei den biologischen Untersuchungen einen bedeutenden Einfluss auf das Zellverhalten [79], [80]. Jedoch ist im Rahmen der initialen Untersuchungen davon auszugehen, dass die Verfärbung bzw. die Degradationsprodukte einen stärkeren Einfluss auf das Zellverhalten hatten als die Oberflächenbeschaffenheit. Zu erwarten war, dass die Degradationsprodukte eine toxische Wirkung auf die Zellen haben.

Festigkeit

Die warmgepressten Prüfkörper aus den Verbundwerkstoffen konnten aufgrund ihrer Sprödigkeit mittels Ball-on-three-balls-Test im Hinblick auf die Biegefestigkeit analysiert werden. Für die Auswertung nach der Danzer-Methode wird die Poissonzahl benötigt. Da aber aufgrund der neuen Verbundwerkstoffzusammensetzung nicht auf Literaturwerte zurückgegriffen werden konnte, mussten die Werte ermittelt werden. Ein großer Vorteil der Grindosonic-Methode bzw. der Resonanzfrequenz-Dämpfungsanalyse (RFDA) ist, dass die Messungen zerstörungsfrei sind. Zum einen konnten die Messungen mehrfach wiederholt werden, zum anderen war es möglich, die Proben auch während einer längeren Auslagerungszeit zu messen und sie anschließend wieder einzulagern. Die ersten Messungen mittels RFDA führten zu Poissonzahlen zwischen 0,61 und 0,79. Da diese außerhalb des Definitionsbereiches (0 < v < 0.5) lagen, konnte geschlossen werden, dass die Prüfkörper für die Messung nicht geeignet waren. Die folgenden Poissonzahlen konnten der Literatur entnommen werden: PDLLA 0,30 [129], PLLA 0,44 [92], β-TCP 0,22 [92] und Calciumcarbonat 0,25 [154] und 0,32 [161]. Zwar konnte die Poissonzahl des Verbundwerkstoffes nicht über die Anteile der die Komponenten bestimmt werden, jedoch war zumindest eine Einordnung möglich. So war für die PDLLA-Werkstoffe ein Wert um 0,3 zu erwarten, für PLLA ein etwas höherer Wert. Fehler konnten bei der Messung dadurch zustande gekommen sein, dass die Prüfkörper nicht normgerecht waren. Die Prüfkörper unterschritten die Mindestdichte von 3 g/cm³. Problematisch war auch, dass die Prüfkörper nicht breit genug waren, so dass die Prüfkörperdiagonale nicht deutlich länger war als die Prüfkörperlänge. Dies hatte zur Folge, dass die Bestimmung des G-Moduls fehlerbehaftet war, da die Schwingung über die Diagonale aufgenommen wird. Bei der Wiederholung der RFDA war die Messung aufgrund einer neuen Messapparatur auch für die vorhandenen Prüfkörperabmessungen geeignet. Zudem konnten auch breitere Prüfkörper

hergestellt werden, so dass die G-Modul-Messung zuverlässigere Ergebnisse brachte. Die Messung war eigentlich für größere Prüfkörper vorgesehen. Größere Prüfkörper konnten mittels Warmpressprozess jedoch nicht hergestellt werden, da sie bei der Entnahme aus der Matrize eine starke Verbiegung aufwiesen. So musste ein Kompromiss zwischen geforderten Abmessungen und Abweichung von der idealen Geometrie eingegangen werden. Eine Möglichkeit wäre gewesen, die Prüfkörper erst nach dem Abkühlen aus der Matrize zu entfernen. Dadurch wären die Prüfkörper jedoch über eine deutlich längere Zeit der hohen Temperatur ausgesetzt gewesen. Zum einen konnte eine Degradation des Polymers nicht ausgeschlossen werden und zum anderen waren die Herstellungsprozesse der Prüfkörper für die Ball-on-three-balls-Test und der Prüfkörper für die Ermittlung der elastischen Konstanten nicht identisch und somit nur abschätzend vergleichbar. Die Grindosonic-Methode ("Kugelfall-Methode") forderte zwar auch größere Prüfkörper, jedoch konnten reproduzierbare Werte im erwarteten Bereich ermittelt werden. Da die Kugel bei der Messung aus einer definierten Höhe fallen gelassen wurde, konnten "händische" Messeinflüsse minimiert werden. Bei der RFDA wurde die Probe dagegen händisch mit einem kleinen Hammer in Schwingung versetzt, so dass Unterschiede in der Impulsgebung nicht vermieden werden konnten. Der Vergleich der Werte, die mit der optimierten RFDA bzw. der Kugelfall-Methode ermittelt wurden, ergab sowohl für den E-Modul als auch für den G-Modul etwas geringere Werte bei der RFDA (vgl. Tab. 31, Tab. 32). Somit war auch die berechnete Poissonzahl etwas geringer. Die Poissonzahl konnte nur schwer mit den Werten der Literatur vergleichen werden. Die Einordnung der Werte erfolgte daher über Literaturwerte bezüglich des E-Moduls. Der E-Modul des Verbundwerkstoffes aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) lag bei etwa 7 GPa (vgl. Tab. 31, Tab. 32). Lin et al. ermittelten einen E-Modul von 32 GPa für einen Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP [104]. Die Werkstoffe wurden in dieser Studie jedoch aufbereitet, indem das Calciumphosphat in das geschmolzene Polymer integriert gemengt wurde. Backhaus et al. entwickelten einen Werkstoff aus 80 Gew.-% PDLLA und 20 Gew.-% Calciumcarbonat mit einem E-Modul von 3,8 GPa [11]. Shikinami et al. ermittelten einen E-Modul von 9,1 GPa für einen Werkstoff aus 60 Gew.-% PLLA und 40 Gew.-% Hydroxylapatit [155]. Jedoch verwendeten sie zum einen PLLA statt PDLLA und zum anderen war die Molmasse etwa doppelt so groß wie die des in dieser Arbeit verwendeten PDLLA [155]. Kobayashi untersuchten geringere Anteile an Calciumphosphat in PLLA [92]. 5 bis 14 Gew.-% β-TCP führten zu einem E-Modul zwischen 4 und 4.5 GPa. Die Untersuchungen reinem PLLA an (MW = 500.000 g/mol) von Gerlach ergaben einen E-Modul von 4,0 GPa [58], die somit in einem ähnlichen Bereich lagen wie die von Törmälä mit 3,6-5,1 GPa [164].

Die Poissonzahl wurde zudem nach einer Lagerungszeit von zwei und fünf Wochen analysiert. Eine degradationsbedingte Änderung der Molmasse und folglich auch der elastischen Konstanten war nach den kurzen Zeiträumen nicht zu erwarten. Jedoch
bestand die Möglichkeit, dass die hohe Wasseraufnahme und die Ausspülung von Partikeln einen Einfluss auf die Molmasse hatten, was sich auch auf die Poissonzahl auswirken könnte [10, S. 304]. Für den Fünf-Wochen-Zeitpunkt musste zunächst eine Näherungsberechnung für den E-Modul durchgeführt werden, da die Messung zu keinem eindeutigen Wert führte. Da sich der G-Modul und der E-Modul nach zwei Wochen Lagerung in Wasser prozentual gleich reduzierten, wurde angenommen, dass die Reduktion auch nach fünf Wochen vergleichbar war. Die Poissonzahl lag somit sowohl nach zwei Wochen als auch nach fünf Wochen bei 0,33. Zu vermuten war, dass die anfängliche Wasseraufnahme in die Prüfkörpermatrix einen Einfluss auf das Material und somit auch auf die Poissonzahl hatte. Nach fünf Wochen stieg die Aufnahme aufgrund von Sättigung möglicherweise nicht weiter an, so dass ein Anstieg der Poissonzahl nicht resultierte. Da die weiterer gemessenen Poissonzahlen nur in der zweiten Nachkommastelle variierten, die auch durch eine Messungenauigkeit verursacht sein konnten, wurde davon ausgegangen, dass das Material durch die Lagerung in Wasser nach fünf Wochen nicht signifikant verändert worden war. Eine vergleichende Berechnung der beiden Poissonzahlen (0,32 und 0,33) ergab, dass der Einfluss auf die errechnete Biegefestigkeit sehr gering war und sich nur auf die Nachkommastellen auswirkte. Die Messung einer Probe nach 15monatiger Lagerung in Wasser ergab eine Reduktion der beiden Moduln, so dass die Poissonzahl auf 0,35 anstieg. Ursachen konnten neben der Wasserausnahme auch das Ausspülen von Partikeln aus der Matrix sowie die Degradation des Werkstoffes gewesen sein.

Die Ball-on-three-balls-Test analysierten mittels Prüfkörper den aus Verbundwerkstoffen zeigten einen klassischen Sprödbruch (vgl. Abb. 31). Das reine Polymer zeigte dagegen wie erwartet ein duktiles Verhalten (vgl. Abb. 31). Der Unterschied im Bruchverhalten war dadurch zu erklären, dass die Einbringung der sehr feinen Füllstoffe zu einer Versprödung des Polymers führte. Kim wies nach, dass die Einbringung von Siliziumdioxid-Nanopartikeln in eine PMMA-Matrix zu einer Versprödung des Materials führte [89]. Ein Anteil von 10 % Füllstoffe erhöhte die Härte gegenüber reinem PMMA um 10 %. Die Risszähigkeit stieg um 70 %. Ein höherer Anteil an Füllstoff verringerte die Risszähigkeit. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei den Prüfkörpers aus den Verbundwerkstoffen, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden. Die Füllstoffpartikel in der Polymermatrix wirken wie Poren, so dass die Prüfkörper spröde Eigenschaften aufwiesen. Aufgrund des spröden Bruchverhaltens konnten die Prüfkörper aus den Verbundwerkstoffen mittels Ball-onthree-balls-Test auf ihre Biegefestigkeit hin analysiert werden. Die Biegefestigkeit fiel zwar bei Erhöhung des Polymeranteils auf 50 Gew.-% signifikant ab (vgl. Abb. 34), lag jedoch im gleichen Bereich. Die Erhöhung auf 60 Gew.-% zeigte keinen signifikanten Unterschied. Erst die Variation der keramischen Anteile ergab, dass die Biegefestigkeit mit sinkendem Anteil an Calciumcarbonat anstieg (vgl. Abb. 35). Dies konnte bei allen drei untersuchten Calciumcarbonat-Varianten nachgewiesen werden. Die Festigkeiten zeigten bei den beiden groben Varianten höhere Werte.

Grund dafür ist der Einfluss der Partikelgröße auf die Matrixeigenschaften. Während die gröberen Partikel zu einer Verstärkung der Matrix führen, indem sie einen Riss umleiten und Druckspannungen stoppen oder erzeugen. In den Werkstoffwissenschaften ist die Festigkeitssteigerung durch Partikelverstärkung eine gängige Methode [143, S. 249]. Die Einbringung sehr feiner Partikel führt dagegen zu einer signifikanten Veränderung der Matrixeigenschaften [89]. Die ermittelte PDLLA mittels Drei-Punkt-Biegetest Biegefestigkeit des reinen ergab unterschiedliche Werte (vgl. Tab. 33). Die normgerechten Prüfkörper ergaben Werte von 70 bis 83 MPa. Sie unterschieden sich in ihren Abmessungen. So ergab der größere Prüfkörper eine höhere Festigkeit als die kleinen. Die Höhe und die Breite waren jeweils etwa doppelt so groß. Die nach Norm idealen Probenabmessungen sind 80 x 10 x 4 mm³ (Länge x Breite x Höhe). Der Auflagerabstand wurde in Abhängigkeit der Probendicke eingestellt. Da jedoch keine Prüfkörperlänge über 50 mm hergestellt werden konnte, musste der Auflagerabstand angepasst werden. Dadurch konnte die Messung fehlerbehaftet sein. Für die Prüfkörper mit einer Dicke von 5,7 mm wurde ein Abstand von 40 mm (statt 91 mm) eingestellt, so dass die Probe nur einen sehr geringen Überhang über die Auflager hatte. Die Prüfkörper mit einer Höhe von 2,0-2,6 mm konnten normgerecht bei einem Auflagerabstand von 32 mm geprüft werden. Daher sind diese Werte am verlässlichsten. Der Vergleich mit den Verbundwerkstoffen zeigt, dass die Biegefestigkeiten im gleichen Bereich lagen. Die Biegefestigkeit der Verbundwerkstoffe stieg gegenüber dem reinen PDLLA, wenn der β-TCP-Anteil erhöht bzw. der Calciumcarbonat-Anteil verringert wurde. Ausschlaggebend war dabei die Partikelgröße des Füllstoffs, die zum einen die Versprödung der Polymermatrix verursachte, zum anderen eine Partikelverstärkung bewirkte. Heidemann et al. untersuchten die Biegefestigkeit von reinem PDLLA sowie zwei Verbundwerkstoffe aus 24,1 Gew.-% PDLLA und 75,9 Gew.-% β-TCP bzw. 95,4 Gew.-% PDLLA und 4,6 Gew.-% Calciumhydrogenphosphat [72]. Die Biegefestigkeit des reinen Polymers lag bei etwa 100 MPa, während die beiden Verbundwerkstoffe bei etwa 90 MPa lagen. Kobayashi et al. berechneten eine Biegefestigkeit von etwa 90 MPa für Werkstoffe aus PLLA und einem β-TCP-Anteil von 5 Gew.-% bzw. 9,5 Gew.-% [92]. Ein Anteil von 14 Gew.-% β-TCP führte zu einer Biegefestigkeit von 80 MPa. Zwar wurden deutlich höhere Polymeranteile verwendet, jedoch lag die Festigkeit in einem ähnlichen Bereich wie die Werkstoffe, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Shikinami ermittelte eine deutlich höhere Biegefestigkeit von 270 MPa für einen Werkstoff aus 60 Gew.-% PLLA und 40 Gew.-% Hydroxylapatit [155]. Einerseits wurde für die Untersuchung ein Polymer mit einer Molmasse verwendet, die doppelt so hoch war wie das PDLLA in dieser Arbeit. Andererseits wurde aber auch PLLA statt PDLLA verwendet. Da PLLA eine höhere Kristallinität aufweist als PDLLA, besitzt es eine höhere Festigkeit und Härte aus [48, S. 58]. Ein Verbundwerkstoff aus 80 Gew.-% PLLA und 20 Gew.-% B-TCP zeigte eine vergleichbare Biegefestigkeit (152,7 MPa) wie das reine PLLA (150,5 MPa) [135] und lag damit über den Werten von Kobayashi et al. (80-90 MPa), ähnliche Zusammensetzung untersuchten [92]. die eine Reines PLLA (MW = 500.000 g/mol) wies nach Gerlach eine Biegefestigkeit von 126 MPa auf [58]. Reines PLDLA, PLDLLA und PLLA lagen im Bereich von 150 MPa [110]. Die Biegefestigkeit ist durch zahlreiche Parameter bestimmt. Zum einen haben bereits die Ausgangstoffe der Werkstoffe einen großen Einfluss (z. B. Molmasse des Polymers, Chemie und Partikelgröße des Füllstoffes). Im Weiteren ist die Aufbereitung der Werkstoffe und der Prüfkörper entscheidend (z. B. Zusammensetzung, Einfluss auf die Eigenschaften der Ausgangsstoffe, Degradation). Dadurch sind die unterschiedlichen Festigkeitswerte in den verschiedenen Studien zu erklären.

Auch die SLM-Prüfkörper aus den hergestellten Verbundwerkstoffen wiesen ein sprödes Bruchverhalten auf. Für diese Versuche wurde die Scangeschwindigkeit erhöht, um den Prozess zu beschleunigen. Wegen der kürzeren Belichtung musste die Laserleistung und folglich die Energiedichte der Laserstrahlung erhöht werden. Die Parameter wurden dabei so aufeinander abgestimmt, dass die Dichte der Prüfkörper mit der der Prüfkörper der herkömmlichen Parameter übereinstimmte. Die mittels Ball-on-three-balls-Test ermittelten Biegefestigkeiten der Prüfkörper bei 4 W (≙ einer Energiedichte der Laserstrahlung von 39,3 W/mm²) ergaben - wie bei den warmgepressten Prüfkörpern - höhere Werte bei höheren Anteilen an β-TCP gegenüber Calciumcarbonat (vgl. Abb. 37). Dieses Resultat wurde jedoch dadurch verstärkt, höhere Anteile an Calciumcarbonat zu einer dass stärkeren Polymerdegradation führten. Durch die degradationsbedingte Gasbildung wurde die Porosität der Prüfkörper erhöht, was in einer Abnahme der Prüfkörperstabilität bzw. resultierte. Zusammenhang Porosität der Festigkeit Den zwischen und Biegefestigkeit von Prüfkörpern aus PDLLA und Calciumcarbonat stellten auch Backhaus et al. fest [11]. Die Werte lagen zwischen 25 MPa (60/20/20rf) und 51 MPa (60/40TCP). Eine Erhöhung der Laserleistung auf 4,5 W (≙ einer Energiedichte der Laserstrahlung von 44,2 W/mm²) führte zu etwa 20 % geringeren Festigkeitswerten. Grund dafür war eine stärkere Polymerdegradation, die zum einen die Porosität erhöhte und zum anderen zu einer Veränderung des Matrixmaterials führte. Lindner et al. ermittelten in einem Vier-Punkt-Biegeversuch Biegefestigkeiten zwischen 13 und 23 MPa für SLM-Prüfkörper aus 50 Gew.-% PDLLA und 50 Gew.-% β-TCP [105]. Diese Werte lagen damit im unteren Bereich der Biegefestigkeiten, die in der vorliegenden Arbeit erreicht werden konnten. Jedoch waren die Festigkeiten auf zwei verschiedene Methoden ermittelt worden und waren daher nicht gänzlich vergleichbar.

Die Biegefestigkeit der SLM-Prüfkörper aus PLLA stieg bis 0,50 W (Energiedichte 4,9 W/mm²) stark an. Bei einer höheren Energiedichte zeigte das Polymer in Folge der Degradation eine leichte Verfärbung und eine Festigkeitsabnahme. Bei weiter ansteigender Energiedichte führte die fortschreitende Degradation zu einem Abfall der Festigkeit bis auf 40 MPa. Grund dafür war, dass die zunehmende Degradation eine zunehmende Porosität mit sich zog. Unter Berücksichtigung der Griffith-Gleichung [143, S. 132] bedeutet eine höhere Porosität eine größere Risslänge, sodass folglich die zulässige Spannung abfällt. Die geringen Festigkeiten bei

geringen Energiedichten der Laserstrahlung waren dadurch zu begründen, dass das Polymer noch nicht gänzlich aufgeschmolzen war und somit die Funktionen als adhäsive Komponente nicht erfüllte. Eine Energiedichte von 4,9 W/mm² führte zu einem gänzlich aufgeschmolzenen Polymer, das zudem keine sichtlichen Degradationserscheinungen zeigte. Folglich waren die Dichte der Prüfkörper und die Festigkeit bei diesem Parameter am größten. Eine mögliche Fehlerquelle bei der Berechnung der Biegefestigkeit der PLLA-Werkstoffe ist die Poissonzahl. Die Herstellung eines ausreichend großen Stäbchens mittels Warmpressprozess war nicht möglich, da die Matrize bei Temperaturen über 180 °C nicht verwendbar war. Die SLM-Stäbchen in der benötigten Größenordnung wiesen eine zu große Krümmung auf. Daher wurde zunächst auf Literaturwerte zurückgegriffen. Für reines PLLA sind in der Literatur Poissonzahlen von 0,36 bis 0,44 angegeben [92], [102]. Da die Auswertung des Ball-on-three-balls-Test nur für Poissonzahlen bis 0,35 möglich ist [23], [24] und zudem angenommen wurde, dass ein Füllstoffanteil von etwa 20 Gew.-% auch bei diesem Werkstoff zu einer Reduktion der Poissonzahl führte, wurde die Auswertung mit der ermittelten Poissonzahl der PDLLA-Werkstoffe durchgeführt. Parallel wurde die Auswertung nach Timoshenko durchgeführt, da diese Methode auch eine Poissonzahl von 0,44 zulässt [23]. Die Auswertung hat jedoch den Nachteil, dass sie aufgrund von verschiedenen Annahmen ungenauer ist und tendenziell etwas höher Biegefestigkeiten ergibt als die Auswertung nach Danzer. Da die Werte beider Methoden in der gleichen Größenordnung lagen, wurde aufgrund der besseren Vergleichbarkeit die Danzer-Methode für alle Untersuchungen verwendet. Im Ver-gleich mit den PDLLA-Werkstoffen waren bei dem PLLA-Werkstoff höhere Werte zu erwarten, da es durch die teilkristalline Struktur stabiler ist als das amorphe PDLLA.

Die Analysen hinsichtlich der Druckfestigkeit ergaben, dass die Prüfkörper unter Druckbeanspruchung eher ein duktiles Verhalten aufwiesen [10, S. 147], während sie unter Biegung spröde brachen. So war der Einfluss der polymeren Eigenschaften bei dieser Art der Beanspruchung größer als der der keramischen Eigenschaften. Dies war auch der Grund dafür, dass die Messung zur Ermittlung der Bruchkraft nicht abbrach. Da sich die Prüfkörper stetig verformten und nur langsam einrissen, gab es keinen plötzlichen Kraftabfall, so dass kein definierter Bruchzeitpunkt bzw. keine genaue Bruchkraft ermittelt werden konnten. Durch die Einbringung des Kanals in den Zylinder wurde die Festigkeit herabgesetzt und es zeigte sich ein Bruch bei 8300 N. Dies entsprach einer Druckfestigkeit von 51 MPa bezogen auf den Gesamtprüfkörper (inklusive Struktur). Da aber vor dem Abbruch bereits eine deutliche Verformung und vereinzelte Rissbildung zu erkennen war, kann man von einem früheren Versagen sprechen. Laut der Norm bezüglich des Knochenzements wird das Hüftgelenk beim Laufen mit dem dreifachen Körpergewicht belastet, beim Stolpern mit dem achtfachen Körpergewicht [183]. Die Implantate, die aus den Verbundwerkstoffen hergestellt werden sollen, sind zwar nicht für lasttragende Bereiche vorgesehen, jedoch kann über die Norm die Obergrenze der nötigen Festigkeit festgelegt werden. Da die Kanalstruktur händisch mit einem Bohrer eingebracht wurde, war die Messung fehlerbehaftet. Es konnte nicht sichergestellt werden, dass der Kanal exakt zentrisch in den Zylinder eingebracht wurde. Auch die Ausrichtung entlang der Längsachse wies geringe Abweichungen auf. Daher konnte die ermittelte Festigkeit nur zur Abschätzung verwendet werden und diente nur als Richtwert für die späteren dynamischen Tests. Bei der Herstellung der SLM-Prüfkörper konnten dagegen Fehler durch das Handling ausgeschlossen werden. Bei gleicher Belastung der Prüfkörper (bis 10 kN) verformten sich die Prüfkörper mit steigender Energiedichte der Laserstrahlung deutlich stärker, bis sie in den Randbereichen aufrissen (vgl. Abb. 40). Der Prüfkörper der mit einer Energiedichte von 2,5 W/mm² hergestellt wurde, zeigte die geringste Querschnittsfläche und wies nahezu keine Risse auf. Grund dafür ist, dass das Polymer noch nicht gänzlich aufgeschmolzen war und somit nicht als adhäsive Komponente agieren konnte. Daher verhielt sich der Werkstoff eher wie eine Keramik als wie ein Kunststoff, was unter anderem zu der geringeren Verformung führte. Lin et al. konnten bei einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% B-TCP eine Druckfestigkeit von 195 MPa erreichen [104]. Sie stellten den Verbundwerkstoff her, indem sie zunächst das Polymer aufschmolzen und die Keramik anschließend einrührten.

Die SLM-Prüfkörper aus dem PLLA-Werkstoff zeigten unter der Druckbelastung eine geringere Verformung (vgl. Abb. 42). Jedoch wurden bei dieser Untersuchung die von der Kunststoffnorm geforderte Prüfkörpergeometrie verwendet [186]. Es entstanden Risse entlang der Laserschichten, da dies die schwächsten Stellen im Prüfkörper waren. Der "Bruch" entstand bei einer Beanspruchung von 71 + 1,5 MPa (und einer Stauchung von 7-8 %. Die Stauchung in diesem Bereich bestätigt das duktile Werkstoffverhalten. Shikinami et al. entwickelten einen Verbundwerkstoff aus 60 Gew.-% PLLA und 40 Gew.-% Hydroxylapatit mit einer Druckfestigkeit von 107 MPa [155]. Ignjatovic et al. untersuchten Verbundwerkstoffe aus PLLA und Hydroxylapatit mit einem Polymeranteil von bis zu 25 Gew.-% [78]. Sie wiesen eine Druckfestigkeit von bis zu 25 MPa nach. Grund für die niedrige Festigkeit war der geringe Polymeranteil, der für einen adhäsiven Effekt nicht ausreichend war. Reines PLLA wies in den Untersuchungen von Zhang et al. eine Druckfestigkeit von 118 MPa auf [178]. Die Literaturwerte bezüglich der Druckfestigkeit Polylactidbasierter Werkstoffe variieren aufgrund einer Vielzahl an zu betrachtenden Parametern sehr stark. Einfluss haben neben der Variante und der Molmasse des Polylactids auch die Chemie und die Struktur des Füllstoffes sowie Aufbereitungsund Verarbeitungsprozess [10, S. 130], [89]. So hat z. B. die Prozesstemperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Polymeraufschmelzung und die -degradation [54, S. 294]. Im Weiteren entscheiden auch die Prüfkörperdichte und die adhäsive Fähigkeit des Polymers über die Festigkeit. Da die publizierten Studien sehr unterschiedliche Prozessschritte beinhalten, waren die Festigkeiten nur schwer untereinander vergleichen. Unabhängig von den unterschiedlichen zu Prozessparametern ist auch die Methode zur Messung der Festigkeit zu beachten, da die mit verschiedenen Methoden ermittelten Festigkeiten verschiedener Methoden voneinander abweichen können.

Die dynamische Beanspruchung der warmgepressten Zylinder aus 60 Gew.-% 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat brachte sehr PDLLA, unterschiedliche Ergebnisse. So zeigte ein Prüfkörper zwar eine leichte plastische Verformung, hielt aber 1 Mio Lastzyklen ohne Bruch aus. Ein weiterer Prüfkörper ertrug nur die Hälfte dieser Zyklen und zeigte eine deutlich stärkere Verformung mit Rissbildung (vgl. Abb. 43). Grund dafür war - wie bei dem einfachen statischen Drucktest - die händische Einbringung der Kanäle. Diese konnten nicht exakt zentrisch gebohrt werden und induzierten daher ein anisotropes Verhalten. Außerdem konnte aufgrund der großen Prüfkörperdicken davon ausgegangen werden, dass es durch eine ungleichmäßige Aufschmelzung des Polymers zu einer Inhomogenität im Werkstoff kam. Bei den scheibenförmigen Prüfkörpern konnte davon ausgehen, dass die Aufschmelzung aufgrund der geringen Prüfkörperdicken gleichmäßig erfolgte und die Materialbeschaffenheit homogen war. Um die Einflüsse bei der Herstellung auszuschließen, wurden die weiteren Versuche mit SLM-Prüfkörpern durchgeführt. Dies garantierte die Herstellung reproduzierbarer Prüfkörper. Die Beanspruchung mit 5 kN (≙ ca. 125 MPa) führte zu einem sofortigen Bruch des Prüfkörpers entlang der gelaserten Schichten (vgl. Abb. 44). Weder bei 2 kN (≙ ca. 50 MPa) noch bei 1,5 kN (≙ ca. 37,5 MPa) konnte die nötige Zyklenzahl von 1 Mio erreicht werden. Auch diese Prüfkörper rissen entlang der Schichten. Die bei 1 kN (≙ ca. 25 MPa) hielten dagegen die gesamten Lastzyklen aus, ohne dass sich ihre Geometrie veränderte. Die Prüfkörper wurden mit einer Energiedichte der Laserstrahlung von 4,4 W/mm² hergestellt. Die mit den gleichen Parametern hergestellten Prüfkörper für den Ball-on-three-balls-Test wiesen eine Biegefestigkeit von 59 MPa auf.

5.2 Degradation

Da die Degradation von PDLLA mehrere Monate, die Degradation von PLLA sogar mehrere Jahre dauern kann [48, S. 58], [135], [156], waren Degradationsexperimente bis zum vollständigen Abbau der Prüfkörper im Rahmen dieser Arbeit nur bedingt möglich. Zur Beschleunigung des Polymerabbaus wurden daher Untersuchungen bei erhöhter Temperatur durchgeführt. Dabei wurde eine Temperatur unterhalb der Erweichungstemperatur T_G eingestellt, um strukturelle Werkstoffänderungen auszuschließen. Die Relation zur Echtzeit konnte zunächst nicht abgeschätzt Pufferfähigkeiten werden. Im direkten Vergleich der unterschiedlicher Calciumcarbonate spielte jedoch die Zeit nur eine untergeordnete Rolle. Relevant war zunächst nur, ob die Calciumcarbonat-Variante überhaupt einen Einfluss hatte und ob 20 Gew.-% Calciumcarbonat ausreichend für eine Pufferung war. Die Messung ergab, dass der pH-Wert bei der rhomboedrisch groben, der rhomboedrisch feinen und der nadeligen Calciumcarbonat-Variante langsamer abfiel als bei den übrigen Varianten (vgl. Abb. 45). Über die Partikelgröße des Füllstoffs konnten keine Rückschlüsse auf die Pufferkapazität gezogen werden, da z. B. die Partikelgröße des feinen kugelförmigen Calciumcarbonats zwischen den Partikelgrößen der beiden rhomboedrischen Varianten lag. Der pH-Wert bei der feinen kugelförmigen Variante fiel jedoch sehr früh ab. Die in diesem Versuch verwendeten Werkstoffe aus 80 Gew.-% PDLLA und 20 Gew.-% Calciumcarbonat wiesen einen höheren Polymeranteil auf als die zu entwickelnden Werkstoffe (60 Gew.-%). Grund dafür war, dass der angestrebte Werkstoffanteil von Calciumcarbonat im Idealfall maximal 20 Gew.-% betragen sollte. Wenn also 20 Gew.-% Calciumcarbonat ausreichen, 80 Gew.-% PDLLA zu puffern, dann müsste die Pufferung in einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat gesichert sein. Zusätzlich weist auch β-TCP - zwar eine deutlich schwächere als Calciumcarbonat - eine Pufferfähigkeit auf. Während Calciumcarbonat bei einem pH-Wert von 7 puffert, puffert Calciumphosphat erst bei einem pH-Wert von 4 [146]. Basierend auf der Dissertation von Schiller konnte berechnet werden, dass 0.695 g Calciumcarbonat nötig sind, um 1 g PDLLA zu puffern [147]. Das entspricht einem Verhältnis von 59 Gew.-% PDLLA und 41 Gew.-% Calciumcarbonat. Demnach haben die in dieser Arbeit entwickelten Zusammensetzungen zu geringe Calciumcarbonat-Anteile. Jedoch ist zu beachten, dass in vivo auch eine Pufferfunktion des Körpers hinzukommt. Außerdem spielt die Freisetzungsrate der Milchsäure eine entscheidende Rolle. Bei geringeren Mengen an Milchsäure kann der Körper schnell reagieren. Wird zu viel Säure auf einmal frei, bleibt dem Körper zu wenig Zeit schnell zu reagieren.

Aus der Vielzahl der Calciumcarbonat-Varianten wurden für die weiteren Untersuchungen nur noch die am besten puffernden Varianten - rhomboedrisch fein und rhomboedrisch grob - ausgewählt. Zusätzlich zu den drei Varianten wurden Werkstoffzusammensetzungen verschiedene untersucht. Bei beschleunigter Degradation (50 °C) lagen nach 24 Wochen neben der PBS-Kontrolle einzig die beiden Varianten aus 50 Gew.-% PDLLA und 50 Gew.-% Calciumcarbonat im physiologischen Bereich (vgl. Abb. 46). Wie erwartet fiel der pH-Wert der PDLLA-Proben am schnellsten ab und pendelte sich um einen Wert von 2,5 ein. Die Varianten aus PDLLA und β-TCP pufferten etwas besser, wobei der höhere Anteil an β-TCP etwa eine pH-Einheit höher lag. Die übrigen Werkstoffe (60/10/30, 60/20/20 und 60/30/10) verhielten sich ähnlich, wobei höhere Anteile an Calciumcarbonat einen höheren pH-Wert induzierten. Zudem lagen die Varianten mit dem rhomboedrisch groben Calciumcarbonat stets etwas oberhalb der feinen Variante. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass kleinere Partikel die Flüssigkeitsaufnahme gegenüber gröberen Partikeln erhöhen [89]. Die erhöhte Wasseraufnahme führt zum einen zu einer stärkeren Ausspülung der Degradationsprodukte und zum anderen zu einem tieferen Eindringen der Flüssigkeit in den Prüfkörper. So wird die Degradation durch die erhöhte Kontaktfläche zwischen Flüssigkeit und Prüfkörper beschleunigt. Diese Phänomene führen zu einem stärkeren Abfall des pH-Wertes. Nach 24 Wochen hatten sich die Prüfkörper komplett aufgelöst, so dass in allen Fällen von

einer vollständigen Degradation gesprochen werden kann. Die Untersuchung zeigte, dass der pH-Wert nur bei einem Verhältnis von 50 Gew.-% PDLLA und 50 Gew.-% Calciumcarbonat im physiologischen Bereich lag. Zu klären bleibt, ob die initiale Zellreaktion auf das Implantat (β -TCP \uparrow) oder die Pufferfähigkeit beim Implantatabbau (Calciumcarbonat \uparrow) den dominierenden Einfluss darstellt.

Bei reinem PDLLA wird aufgrund der Volumendegradation (*bulk degradation*) plötzlich eine größere Menge Milchsäure frei, da die Schale aufbricht und die Degradationsprodukte in den Organismus gelangen (Abb. 101a und b). Es bleibt zu klären, ob bei einem Verbundwerkstoff, in diesem Fall eine Keramik-gefüllte Polymermatrix, ebenfalls eine klassische *bulk degradation* auftritt (Abb. 101c und d). Entfernt man gedanklich die Keramikpartikel, so verbleibt eine durchlöcherte Polymermatrix (Abb. 101e). Zu erwarten ist, dass es nicht nur ein Degradationszentrum gibt wie bei dem dichten PDLLA (vgl. Abb. 101a und b), sondern, dass es mehrere Zentren gibt (Abb. 101f). In diesem Fall würde die Degradation aufgrund der vergrößerten Oberfläche und der Anzahl der Degradationszentren schneller ablaufen. Hinzu kommt, dass die Milchsäure kontinuierlich abgegeben werden würde, so dass der Körper besser auf die Säurebildung reagieren könnte. Bei einem sehr hohen Anteil an Füllstoff werden die Polymerstege zwischen den Keramikpartikeln schmaler, so dass davon auszugehen ist, dass es kaum Volumendegradation geben wird. Überwiegen würden erosive Effekte. Gong et al. untersuchten porenstrukturierte PLLA-Scaffolds und stellten fest, dass die Porenstruktur die Volumendegradation (bulk degradation) verhinderte [60].



Abb. 101: Schematische Darstellung der möglicher Degradationsprozesse von reinem PDLLA (a, b), einer Keramik-gefüllten PDLLA-Matrix (c, d), und einer Polymermatrix nach Entfernen der Keramik (e, f).

Heidemann *et al.* zeigten, dass sich bei reinem PDLLA nach 24 Wochen *in vivo* ein gelartiger Kern bildete [72]. Nach 72 Wochen zeigte sich bei einem Verbundwerkstoff

aus PDLLA und β-TCP ein ähnliches Verhalten, jedoch nicht nur im Kern, sondern im gesamten Volumen. Dies stützt die Theorie von mehreren Degradationszentren (vgl. Abb. 101f). Um zu ergründen, wie die Degradation der Verbundwerkstoffe abläuft, wurden die Prüfkörper über 24 Wochen bei 37 °C in PBS gelagert. Gleichzeitig konnte darüber die Relation zwischen der Degradation unter beschleunigten Bedingungen (50 °C) und Echtzeit (37 °C) analysiert werden. Anhand der Bruchflächen der Prüfkörper konnte weder bei dem reinen Polymer noch bei den Verbundwerkstoffen ein gelartiger Kern nachgewiesen werden (vgl. Abb. 49). Auch weitere Anzeichen für eine fortgeschrittene Degradation konnten nicht identifiziert werden. Als weiteres Indiz für eine Degradation wurde der pH-Wert der Lagerungsmedien überprüft (vgl. Abb. 48). Dabei zeigte sich jedoch, dass der pH-Wert des Mediums, in dem das reine PDLLA gelagert war, konstant bei 7,4 lag, wohingegen die pH-Werte der Medien der beiden Calciumcarbonat-haltigen Werkstoffe unter 6 abfielen. Der Werkstoff aus PDLLA und
ß-TCP zeigte einen pH-Wert zwischen dem reinen PDLLA und den übrigen Werkstoffen. Die Ergebnisse widersprachen den Erwartungen. Der Abfall der pH-Werte der Calciumcarbonathaltigen Werkstoffe war nicht zu erklären. Wenn Calciumcarbonat in das Medium freigesetzt worden wäre, hätte der pH-Wert ansteigen müssen. Eine Freisetzung des Calciumcarbonats kann dementsprechend nicht stattgefunden haben. Auch eine Wiederholung des 8-Wochen-Zeitpunktes führte zu dem gleichen Ergebnis. Da die Gefäße nur für die jeweilige Messung geöffnet und zudem für jeden Zeitpunkt neue Prüfkörper untersucht wurden, konnte eine Wechselwirkung mit der Umgebungsluft, die einen Einfluss auf den pH-Wert gehabt haben könnte, ausgeschlossen werden. Der Vergleich der Degradationsstudien bei 37 °C und 50 °C zeigte, dass die höhere Temperatur nach 24 Wochen zu einer vollständigen Degradation der Prüfkörper führte. Bei Körpertemperatur dagegen konnten nach der gleichen Lagerungszeit keine sichtbaren Degradationserscheinungen nachgewiesen werden. Li et al. verglichen die Lagerung von Polylactid in Sörensenpuffer bei 37 °C und 50 °C [102]. Nach 14 Tagen sank die Molmasse von initial 52000 g/mol bei 37 °C auf 45000 g/mol (-13 %), bei 50 °C auf 28000 g/mol (-46 %). Die Biegefestigkeit lag nach 28-tägiger Lagerung bei 37 °C bei etwa 120 MPa. Eine vergleichbare Festigkeit stellte sich bei Lagerung bei 50 °C nach etwa 10-14 Tagen ein [102]. Heidenmann zeigte, dass sich in reinem PDLLA nach 24 Wochen in vivo - also dem gleichen Zeitrahmen wie in der vorliegenden Studie - ein gelartiger Kern bildete [72]. Gründe für die unterschiedlich fortschreitende Degradation konnten zum einen die Polymereigenschaften (z. B. Molmasse oder Kristallisationsgrad) sein oder der Einfluss der In-Vivo-Umgebung. Die Studien von Prokop, Shikinami und Furukawa et al. zeigten, dass die Degradationszeiten von PDLLA und PLLA deutlich über einem halben Jahr lagen [55], [135], [156]. Proklop et al. wiesen nach 18 Monaten sowohl bei reinem PDLLA als auch bei einem Verbundwerkstoff aus 90 Gew.-% PDLLA und 10 Gew.-% B-TCP noch intakte Implantate nach, nur die Kanäle hatten sich vergrößert [135]. Furukawa et al. analysierten Verbundwerkstoffe aus PLLA und Hydroxylapatit [55]. Nach 52 Wochen in vivo waren noch vollständige Prüfkörper vorhanden, die auf ihre 144

Festigkeit untersuchbar waren. Shikinami et al. entstammten der gleichen Forschergruppe und untersuchten die gleichen Werkstoffe, die in Abhängigkeit der Implantationsstelle zwischen 4 und 6 Jahren vollständig resorbiert waren [156]. Heidemann et al. entwickelten Verbundwerkstoffe aus PDLLA und B-TCP sowie PDLLA und Calciumhydrogenphosphat [72]. Dabei zeigte sich, dass 72 Wochen nach der Implantation in den Muskel von Ratten weder bei den Verbundwerkstoffen noch bei dem reinen Polymer ein Abfall des pH-Wert zu verzeichnen war. Die Lagerung eines Polylactid-Polyglycolid-Copolymers (PLA-PGA) in Zellkulturmedium führte nach 14 Tagen zu einem pH-Wert-Abfall von 7,4 auf 6,1 [33]. Mit einem Anteil an 20 Gew.-% Calciumcarbonat sank der pH-Wert im gleichen Zeitraum lediglich von 7,4 auf 7,0. Die Untersuchungen von Schiller et al. hatten ergeben, dass ein Anteil von 35 Gew.-% Calciumcarbonat in einem amorphen Calciumphosphat unabhängig vom PDLLA-Anteil bis zu 125 Tage im physiologischen Bereich puffert [146]. Ein Anteil von 12 Gew.-% Calciumcarbonat führte dagegen zu einem Abfall des pH-Wertes bis auf 5,5. Interessant dabei war jedoch, dass bei einem Werkstoff aus 75 Gew.-% PDLLA, 16,25 Gew.-% Calciumphosphat und 8,75 Gew.-% Calciumcarbonat eine ausreichende Pufferung erzielt werden konnte, während bei einem Werkstoff Gew.-% PDLLA, 44 Gew.-% Calciumphosphat und 6 Gew.-% aus 50 Calciumcarbonat der pH-Wert schnell abfiel. In beiden Werkstoffvarianten ist das Verhältnis von Calciumcarbonat zu PDLLA 0,12, so dass eine ähnliche pH-Wertentwicklung zu erwarten wäre. So scheint nicht nur die Menge des puffernden Füllers ausschlaggebend zu sein, sondern auch die Chemie [146].

Aufgrund der langen Degradationszeiten der Werkstoffe wurde zur Abschätzung der abbaubedingten Materialveränderung der Einfluss flüssiger Umgebung auf die Festigkeit der Prüfkörper untersucht. Da die Prüfkörper der vorangegangenen Studie für die Kernuntersuchungen aufgebrochen werden mussten, wurde gleichzeitig die bruchauslösende Kraft aufgenommen (vgl. Abb. 50). Die ermittelte Biegefestigkeit war bei dem Calciumcarbonat-freien Werkstoff deutlich höher als bei den beiden anderen Werkstoffen. Nach 24 Wochen wiesen alle Werkstoffe aber kaum noch eine messbare Festigkeit auf. Zu berücksichtigen ist, dass pro Werkstoff nur jeweils drei Prüfkörper untersucht wurden. Für den Ball-on-three-balls-Test werden jedoch 30 Prüfkörper gefordert [23]. Da die Standardabweichungen mindestens verhältnismäßig gering waren, konnten die Werte zur Abschätzung aber genutzt werden. PDLLA konnte aufgrund des duktilen Verhaltens mittels Ball-on-three-balls-Test nicht analysiert werden.

Ein entscheidender Punkt bei der Verwendung der entwickelten Werkstoffe ist das Quellverhalten der Prüfkörper. Werden z. B. Schrauben oder Stifte aus den Verbundwerkstoffen implantiert, kann eine geringfügige Quellung im Hinblick auf die Fixierung möglicherweise von Vorteil sein. Durch die Volumenzunahme kann sich das Implantat an das Gewinde anpassen. Die Herstellung definierter mikro- oder porenstrukturierter Scaffolds ist jedoch bei einer starken Matrixquellung nicht zielführend, da die definierte Geometrie bereits nach kurzer Zeit verloren geht. Zudem kann eine Matrixquellung Einfluss auf das umliegende Gewebe nehmen und dieses verdrängen oder schädigen. Der Verbundwerkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% B-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat konnte als Kompromiss zwischen Verarbeitbarkeit, Puffereffekt und Festigkeit gewertet werden und wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet. Die Untersuchung dieses Verbundwerkstoffes ergab sowohl in Wasser als auch in PBS eine Massenzunahme in Folge der Flüssigkeitsaufnahme (vgl. Abb. 113). Dabei war die Massenzunahme in PBS größer als in Wasser. Grund dafür ist, dass der Einbau von Ionen aus der Flüssigkeit zusätzlich zu einer Zunahme führte. Zudem waren die Prüfkörper in demineralisierten zum Konzentrationsausgleich gezwungen, so dass sie Ionen in die Flüssigkeit abgeben und ihre Masse reduzieren. Bei reinem PDLLA in Wasser wurde nahezu keine Flüssigkeit in die Prüfkörper aufgenommen. Die keramischen Partikel an der Oberfläche der Verbundwerkstoffe wurden teilweise herausgelöst, so dass Poren zurückblieben. Dieses Phänomen wurde bereits von Furukawa et al. beschrieben [55]. In ihrer In-Vivo-Studie entstanden durch die Herauslösung von Hydroxylapatit-Partikeln aus einem Werkstoff aus 70 Gew.-% PLLA und 30 Gew.-% Hydroxylapatit an der Oberfläche Poren, so dass sich die effektive Oberfläche der Prüfkörper und somit die Kontaktfläche zwischen Umgebungsflüssigkeit und Implantat vergrößerte [55]. Zwar verlor der Werkstoff durch die Abgabe des Calciumphosphates die knochenähnlichen Eigenschaften, jedoch könnte sich die entstandene Porenstruktur positiv auf das spätere Gewebeeinwachsen auswirken [55].

Im Rahmen des Untersuchungszeitraums von acht Wochen war noch keine des Werkstoffes zu erwarten, Degradation die zu einer Abnahme der Prüfkörpermasse hätte führen können. Demnach war davon auszugehen, dass die Massenänderung ausschließlich durch die Flüssigkeitsaufnahme verursacht wurde, so dass die Differenz direkt in die aufgenommene Flüssigkeitsmasse umgerechnet werden konnte. Die Flüssigkeitsaufnahme resultierte in einer ausgeprägten Matrixquellung (vgl. Abb. 51). Getrieben durch die höhere Aufnahme an PBS veralichen mit Wasser war auch die Quellung in PBS stärker als in Wasser. Die Vergrößerung des Durchmessers war in beiden Lagerungsmedien ähnlich. Die Prüfkörperdicke stieg in PBS um bis zu 40 % an, in Wasser nur etwa halb so stark. Bezogen auf das Gesamtvolumen, quollen die Prüfkörper in Wasser um 32 Vol.-%, in PBS um 63 Vol.-%. Die Quellung von reinem PDLLA war nach der Analyse der Wasseraufnahme wie erwartet gering (< 10 %). Abou Neel et al. stellten ebenfalls eine höhere Flüssigkeitsaufnahme bei den gefüllten Polylactid-haltigen Werkstoffen (PPGLDMA) im Vergleich zum reinen Polymer fest [3]. Zhang et al. verzeichneten nach 4 Wochen Lagerungszeit eine Wasseraufnahme von 12 Gew.-% von Prüfkörpern aus reinem PDLLA [177]. In der vorliegenden Studie lag die Wasseraufnahme im gleichen Zeitraum von PDLLA bei 1 Gew.-%. Auch nach acht Wochen wurden 3 Gew.-% noch nicht überschritten. Die Molmasse des Polymers, das Zhang verwendete, war etwa zwanzig Mal kleiner (10000 g/mol vs.

200000 g/mol). Aufgrund der längeren Polymerketten bildete das in der vorliegenden Arbeit verwendete PDLLA ein dichteres Netzwerk, so dass weniger freies Volumen für eindringende Flüssigkeit zur Verfügung stand. Die Wasseraufnahme wurde dadurch beschränkt. Da die Wasseraufnahme bei dem Verbundwerkstoff so viel größer war, mussten die keramischen Füllstoffe die Wasseraufnahme begünstigen. Cuhlmann untersuchte einen Verbundwerkstoff aus 80 Gew.-% PLA-PGA und 20 Gew.-% Calciumcarbonat in Zellkulturmedium und stellte nach 14 Tagen eine Quellung von 24 % fest [33, S. 36, 60-61]. Die Quellung lag bei reinem Copolymer (PLA-PGA) bei 26 %.

Wie in der vorangegangenen Diskussion bereits erläutert, war nach acht-wöchiger Lagerung keine degradationsbedingte pH-Wert-Änderung zu erwarten. Das Wasser sowie der Puffer, in denen die Prüfkörper gelagert wurden, wiesen für alle Zeitpunkte einen pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 auf (vgl. Abb. 53). Eine Ausnahme bildeten die Prüfkörper nach acht Wochen in PBS. Der Wert sank auf 6,3. Eine logische Schlussfolgerung wäre, dass eine partielle Degradation des Werkstoffes zu dem reduzierten pH-Wert geführt hat. In Anbetracht des Zeitrahmens bisheriger Ergebnisse und veröffentlichter Studien konnte dies jedoch ausgeschlossen werden. Die PBS-Kontrolle lag konstant bei 7,4, während die Wasser-Kontrolle an allen Tagen zwischen 5 und 6 lag. Bei reinem PDLLA in Wasser lagen ebenfalls alle Werte zwischen 5 und 6. Grund dafür war, dass die pH-Wert-Messung von reinem Wasser generell sehr schwierig ist. Wird Wasser der Luft ausgesetzt, löst sich Kohlendioxid aus der Luft darin. Durch die Reaktion zu Kohlensäure und deren Lösung sinkt der pH-Wert [56]. Der pH-Wert kann dann bis auf 5 abfallen, wie es auch in dieser Untersuchung der Fall war. Die Messung des Wassers (mit und ohne Prüfkörper) müsste daher unter Schutzgas erfolgen, um diese Reaktion zu verhindern. Der pH-Wert des Wassers, in dem die Verbundwerkstoffe gelagert wurden, lag hingegen im neutralen Bereich. Dies war durch Diffusion zu erklären. Durch die treibende Kraft des Konzentrationsausgleiches wurden verstärkt keramische Bestandteile aus den Prüfkörpern in das Wasser abgegeben. Das Wasser, in dem das reine PDLLA gelagert wurde, wies den niedrigen pH-Wert auf, da keine Füllstoffe vorhanden waren, die die Pufferwirkung erzielen konnten. Huang et al. untersuchten einen Werkstoff aus 80 Gew.-% PLLA und 20 Gew.-% Nanohydroxylapatit [76]. Nach 11 Wochen fiel der pH-Wert des Lagerungsmediums (PBS), in dem der Werkstoff gelagert wurde, unter 7. Der pH-Wert des Puffers, in dem reines PLLA gelagert wurde, fiel bereits nach fünf Wochen unter 7. Zu beachten ist, dass der Abbau von PLLA - wie bereits diskutiert - sehr viel langsamer erfolgt als der Abbau von PDLLA. Daher ist es unwahrscheinlich, dass bereits nach fünf Wochen ein pH-Wert-Abfall zu beobachten war. Wenn die Prüfkörper und die Pufferlösung vor der Einlagerung nicht sterilisiert wurden, kann eine Bakterienkultur gewachsen sein. Eine bakterielle Kontamination äußert sich unter anderem in einer Reduktion des pH-Wertes. Bei dem Verbundwerkstoff ist eine pufferfähige Komponente enthalten, so dass der pH-Wert erst später sinken würde. Hydroxylapatit puffert zwar deutlich später als z. B.

Calciumcarbonat, jedoch wäre ein Einfluss in der Untersuchung von Huang *et al.* zu erwarten.

Um abzuklären, welche Menge der keramischen Füllstoffe in die Lagerungsmedien freigesetzt wurde, wurde der Calcium-Anteil mittels ICP bestimmt (vgl. Abb. 55). Indirekt konnte über eine Rückrechnung auch bestimmt werden, wie viel Polymer sich gelöst haben musste. Wie bereits erwartet, war die Calciumfreisetzung aufgrund der Diffusion in Wasser deutlich höher als in PBS (vgl. Abb. 55). Nach acht Wochen in PBS waren etwa 1 Gew.-% Calcium aus dem Werkstoff herausgelöst. In Wasser lag der Wert bei etwa 9 Gew.-%. Das Calcium in den Referenzmedien (ohne Prüfkörperlagerung) lag unterhalb der Detektionsgrenze. Da sowohl β-TCP als auch Calciumcarbonat Calcium enthalten, konnte das gemessene Calcium beiden Keramiken entstammen. Über Elementanalysen wurde festgestellt, dass sich das Calcium/Phosphor-Verhältnis nach der Lagerung in Wasser an der Prüfkörperoberfläche verändert hatte (vgl. Abb. 56). Daraus konnte geschlossen werden, dass sich überwiegend Calciumcarbonat aus der Oberfläche gelöst haben musste. Hätte sich überwiegend β-TCP gelöst, müsste das Calcium/Phosphor-Verhältnis annähernd konstant sein. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde die Masse des freigesetzten Calciumcarbonats pro Prüfkörper berechnet (vgl. Tab. 34, Tab. 35). Die Freisetzung stieg über die Zeit an, wobei sie in Wasser deutlich höher war als in PBS. Beim Vergleich mit dem Masseverlust der Prüfkörper stellte sich jedoch heraus, dass sich wider Erwarten auch ein Teil des PDLLAs gelöst haben musste. Die Masse des gelösten Polymers war in beiden Lagerungsmedien höher als die des Calciumcarbonats. Jedoch ist zu beachten, dass der Polymeranteil im Werkstoff bei 60 Gew.-% lag und der Calciumcarbonat-Anteil nur bei 20 Gew.-%. Eine tatsächliche Degradation des Polymers kann nahezu ausgeschlossen werden. Die Freisetzung des Polymers konnte z. B. durch Abplatzungen erfolgt sein. Eine weitere Möglichkeit war, dass herausgelöste Keramikpartikel partiell mit Polymer bedeckt waren. Die Untersuchungen von PLLA in PBS bei 37 °C von Gong et al. ergaben eine Reduktion der Prüfkörpermasse von 30 Gew.-% nach einer Lagerungszeit von 39 Wochen [60]. Die Molmasse verringerte sich in diesem Zeitraum um 62 %. Die Reduktion der Prüfkörpermasse war somit hauptsächlich durch die Polymerdegradation zu erklären. Diese Untersuchung unterstützt zudem die Theorie, dass sich bei einer gefüllten Polylactid-Matrix mehrere Degradationszentren bilden, wodurch der Abbau im gesamten Volumen und somit auch an der Oberfläche stattfindet. Shikinami et al. wiesen nach, dass sich auf Prüfkörpern aus PLLA und Hydroxylapatit bei Lagerung in Simulated Body Fluid (SBF) sogar Calcium auf der Oberfläche ablagert [155].

Als Indiz für die degradationsbedingte Veränderung der Werkstoffstruktur wurde die Biegefestigkeit der Prüfkörper nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in Wasser und PBS bestimmt. Der in dieser Untersuchung verwendete Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomboedrisch fein) wies eine Partikelgröße von 73 μm (d90) auf. Die Biegefestigkeit vor Lagerung in

Flüssigkeit lag bei 71 MPa (vgl. Abb. 65). Bereits nach zwei Wochen fiel die Festigkeit auf 20 MPa (-71 %) in PBS bzw. 15 MPa (-79 %) in Wasser ab. Grund dafür war die enorme Quellung der Prüfkörper durch die Flüssigkeitsaufnahme. Obwohl jedoch die Quellung in PBS deutlich ausgeprägter war als in Wasser, war die Biegefestigkeit der Prüfkörper in PBS etwa 35 % höher als in Wasser. Eine mögliche Ursache hierfür ist zum einen die Freisetzung von Partikeln aus dem Matrixverbund bei Lagerung in Wasser und zum anderen der Einbau von Ionen aus der Pufferlösung in die Prüfkörper. Dadurch verändert sich die Werkstoffzusammensetzung an der Oberfläche signifikant und beeinflusst die Festigkeit. Die Festigkeit fiel bis vier Wochen weiter signifikant ab. Nach acht Wochen zeigte sich in beiden Lagerungsmedien kein signifikanter Abfall mehr. Gerlach wies nach 4 Wochen in vivo (Ratten) eine Festigkeitsreduktion von Prüfkörpern aus PLLA von 50 % nach [58]. Nach acht Wochen fiel die Biegefestigkeit auf 25 % des Ausgangswertes ab [58]. Nach acht Wochen sanken die Festigkeiten für die beiden Lagerungsmedien auf 17 % (PBS) bzw. 11 % (Wasser) der Ausgangsfestigkeit. Grund für die stärkere Reduktion der Festigkeit waren hauptsächlich die unterschiedlichen Polylactid-Varianten. Während PLLA teilkristallin ist und dadurch zum einen grundsätzlich stabiler ist und zudem eine langsamere Degradationsrate aufweist, ist PDLLA amorph. Dies äußert sich in einer geringeren Festigkeit und einer schneller ablaufenden Degradation. Zudem bietet ein ungefülltes Polymer weniaer Angriffsfläche für die Wasseraufnahme. Cordewener et al. konnten nach 7 Wochen in vitro in einem Phosphatpuffer nahezu keine Festigkeit von Prüfkörpern aus P(96L/4D)LA mehr nachweisen [32]. Backhaus et al. untersuchten die Biegefestigkeit von Verbundwerkstoffen aus 75 Gew.-% PDLLA und 25 Gew.-% Calciumcarbonat nach Lagerung in Wasser [11]. Die Prüfkörper mit einer Porosität von 50 % zeigten nach sechs und acht Wochen einen Anstieg der Biegefestigkeit. Grund dafür war, dass die Wasseraufnahme in die Poren zu einer Verringerung der Kompression führte [11]. Das Ergebnis von Backhaus et al. deckte sich nicht mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen. Hier wurde eine entgegengesetzte Tendenz beobachtet. Die Festigkeit fiel mit steigender Wasseraufnahme. Heidemann et al. untersuchten neben reinem PDLLA auch Verbundwerkstoffe aus PDLLA und β-TCP (24,1/75,9 Gew.-%) sowie PDLLA und Calciumhydrogenphosphat (95,4/4,6 Gew.-%) [72]. Die Ausgangsfestigkeit lag bei etwa 100 MPa für das reine Polymer und bei etwa 90 MPa für die Verbundwerkstoffe. Nach 12 Wochen im Muskel von Ratten sank die Biegefestigkeit aller Implantate auf 60 % der Ausgangswerte. Die Reduktionsrate der Biegefestigkeit war somit deutlich geringer als in der vorliegenden Arbeit. Zudem zeigte die Studie von Heidemann et al., dass das reine Polymer schneller degradierte als die Verbundwerkstoffe [72]. Kobayashi et al. untersuchten die Biegefestigkeit verschiedener Verbundwerkstoffe aus PLLA und β-TCP (5-14 Gew.-%) nach Lagerung in PBS [92]. Dabei zeigte sich, dass die Biegefestigkeit umso mehr abnahm, je höher der Keramik-Anteil war. Die Rate der Festigkeitsreduktion war jedoch deutlich geringer als in unserer Studie. Eine mögliche Ursache war zum einen die Verwendung von PLLA statt PDLLA und zum

anderen der höhere Polymeranteil, der zu einer stabileren Struktur führte. Zhu et al. analysierten die Biegefestigkeit von Verbundwerkstoffen aus 80 Gew.-% PLLA und 20 Gew.-% B-TCP nach der Implantation in Hasen [179]. Die Festigkeit lag initial sowohl bei dem Verbundwerkstoff als auch bei dem reinen Polymer bei etwa 150 MPa. Nach vier Wochen war die Biegefestigkeit um 8 % beim Verbundwerkstoff gesunken. Das reine PLLA wies nach der gleichen Zeit eine verminderte Biegefestigkeit von 12 % auf. Nach 8 Wochen war die Festigkeit um 11 % (PLLA/TCP) bzw. 17 % (PLLA) reduziert. Nach 24 Wochen fiel die Biegefestigkeit des Verbundwerkstoffes auf 83 MPa, die des PLLAs auf 56 MPa ab [179]. Die Werte lagen auch nach diesem langen Zeitraum noch oberhalb der Werte der Prüfkörper der vorliegenden Arbeit nach acht Wochen. Die Prüfkörper wiesen bereits vor der Lagerung eine höhere Festigkeit auf als die Prüfkörper der vorliegenden Arbeit. Der Vergleich der Festigkeiten nach vier und acht Wochen zeigte einen deutlich größeren Abfall unserer Prüfkörper im Vergleich zu den Implantaten von Zhu et al. Neben dem Werkstoffzusammensetzung und Einfluss der der Polylactid-Variante hat möglicherweise auch die In-Vivo-Umgebung einen Einfluss auf die Festigkeit. Mainil-Verlet et al. untersuchten verschiedene Polylactid-Varianten (PLLA, PLDLLA und PLDLA) [110]. Nachdem alle Polymere zu Beginn eine Biegefestigkeit von 150 MPa aufwiesen, zeigte PLLA nach 50 Wochen in vivo noch eine Festigkeit von 50 MPa. PLDLLA wies nur noch eine Biegefestigkeit von 10 MPa auf, PLDLA sogar gar keine messbare Festigkeit mehr. Grund für die Unterschiede war die Kristallinität der Werkstoffe (PLLA>PLDLLA>PLDLA) [110].

Nach den Festigkeitsuntersuchungen wurden die Bruchflächen der Prüfkörper untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich in den Prüfkörpern während der Lagerung in Wasser bzw. PBS nach zwei Wochen ein im Vergleich zum Randbereich dunkleres Zentrum ("Kern") ausgebildet hatte (vgl. Abb. 58). Nach vier Wochen in PBS hatte sich dieser Kern vergrößert, während in Wasser kein Kern mehr sichtbar war. Der Kern wies die gleiche Farbe wie die ursprünglichen Prüfkörper auf. Der Randbereich um den Kern war heller und gänzlich weiß. Nach acht Wochen in PBS war schließlich auch kein Kern mehr sichtbar. Grund für die Entstehung des Kerns war das Eindringen der Flüssigkeit. Erst nach gänzlicher Durchnässung verschwand der Kern. Aufgrund der treibenden Kraft des Konzentrationsausgleiches erfolgte das Eindringen von demineralisiertem Wassers schneller als von PBS. Obwohl die Analyse des Molekulargewichtes keine Polymerdegradation nachwies, lässt die Verfärbung des weißen Verbundwerkstoffpulvers zu leicht gelblichen Prüfkörpern einen geringfügigen Polymerabbau vermuten. Die nach der Lagerung weiß erscheinenden Randbereiche lassen weiterhin vermuten, dass diese Degradationsprodukte ausgespült wurden.

Um der Ursache für die extreme Quellung und die damit verbundene Reduktion der Biegefestigkeit zu ergründen, wurde der Calciumcarbonat-Anteil auf 5 Gew.-% reduziert. Nach sechs Wochen in Wasser hatte sich die Biegefestigkeit nur um 50 % reduziert (vgl. Abb. 59). Dabei verhielten sich die Werkstoffe mit rhomboedrisch

feinem und rhomboedrisch grobem Calciumcarbonat vergleichbar. Nach 12 bzw. 18 Wochen lagen die Festigkeiten immer noch bei über 40 % der Ausgangswerte. Da nachgewiesen wurde, dass sich in der vorangegangenen Studie an dem Verbundwerkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat überwiegend Calciumcarbonat aus den Prüfkörpern gelöst hatte, erklärt sich die geringere Festigkeitsabnahme und die geringere Quellung der Prüfkörper. Da sich weniger Partikel aus der Oberfläche gelöst hatten, hatte sich die Oberfläche weniger vergrößert, so dass die Kontaktfläche zwischen Prüfkörper und Flüssigkeit geringer war. Dadurch reduzierte sich die Wasseraufnahme und folglich die Quellung der Prüfkörper und die Biegefestigkeit fiel nicht so stark ab. Der gänzliche Verzicht auf Calciumcarbonat in einem Verbundwerkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP ergab erst nach vier Wochen Lagerung in PBS einen signifikanten Abfall der Biegefestigkeit (vgl. Abb. 60). Die Abnahme der Biegefestigkeit lag jedoch unter 20 %. Nach acht Wochen sank die Festigkeit auf 40 % der Ausgangsfestigkeit. Die 60/20/20rf-Prüfkörper wiesen hingegen nach der gleichen Lagerungszeit in PBS nur noch 20 % der Ausgangsfestigkeit auf (vgl. Abb. 57). Die Quellung der Prüfkörper nahm mit der Zeit sogar ab. Die maximale Zunahme der Prüfkörperdicke lag bei 27 %. Die Quellung war zwar deutlich geringer als bei den Calciumcarbonat-haltigen Werkstoffen, jedoch für die Anwendung als Werkstoff für porenstrukturierte Implantate zu groß. Lin et al. zeigten, dass die Wasseraufnahme geringer war, je mehr β -TCP sie in die PDLLA-Matrix einbrachten [104]. Dies stützt die bisherige Theorie, dass die Einbringung eines Füllstoffes in eine Polymermatrix die Angriffsfläche für Flüssigkeit vergrößert und somit deren Aufnahme fördert.

Die SLM-Prüfkörper aus den PDLLA-basierten Werkstoffen zeigten auch nach der siebentägigen Lagerung in PBS bei 37 °C eine deutliche Abhängigkeit der Biegefestigkeit vom Calciumcarbonat-Anteil im Werkstoff (vgl. Abb. 62 unten). Zum einen war die Biegefestigkeit generell bei höheren Anteilen an Calciumcarbonat niedriger. Zum anderen stieg der prozentuale Abfall der Biegefestigkeit durch die Lagerung in PBS mit steigendem Anteil an Calciumcarbonat deutlich an. So fiel die Biegefestigkeit des Calciumcarbonat-freien Werkstoffs nach sieben Tagen um etwa 50 % ab. Bei den beiden höchsten Anteilen an Calciumcarbonat von 10 Gew.-% bzw. 20 Gew.-% fiel die Festigkeit nach der siebentägigen Lagerung in PBS um 90 % ab. Die Untersuchung der getesteten Prüfkörper nach Lagerung in PBS zeigte, dass die Quellung bei höheren Anteilen an Calciumcarbonat bzw. mit stärkerer Verfärbung der Prüfkörkörper zunahm (vgl. Abb. 61 unten). Bei dem höchsten Anteil von Calciumcarbonat (20 Gew.-%) zeigte sich nach einer Woche bereits eine Quellung von fast 60 % in Richtung der Prüfkörperdicke (vgl. Abb. 62 unten). Dies entspricht unter Berücksichtigung der Ausdehnung des Durchmessers einer Volumenquellung von 90 Vol.-%. Grund dafür war, dass die verstärkte Degradation durch höhere Anteile an Calciumcarbonat durch die Gasbildung zu einer höheren Porosität der Prüfkörper führte. Durch das größere freie Volumen im Prüfkörper war eine höhere

Flüssigkeitsaufnahme möglich, was in einer stärkeren Quellung und folglich einer Festigkeitsabnahme resultierte.

Nach den Untersuchungen zur degradationsbedingten Festigkeitsabnahme der Prüfkörper aus PDLLA, β-TCP und Calciumcarbonat zeigte sich, dass die Partikelgröße der Füllstoffe einen großen Einfluss auf die Ausgangsfestigkeit der Prüfkörper hatte. Während β-TCP nach dem Mahlprozess eine Partikelgröße von etwa 5 µm hatte, wies das rhomboedrisch feine Calciumcarbonat nur ein Zehntel der Partikelgröße auf. Höhere Anteile an β-TCP gegenüber Calciumcarbonat resultierten in höheren Biegefestigkeiten. Die Lagerung in Flüssigkeit zeigte sowohl für den Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% B-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat eine extrem hohe Quellung bis zu 60 Vol.-%. Auch eine Reduktion des Calciumcarbonat-Anteils, der zu einer verminderten Pufferfähigkeit des Verbundwerkstoffes führte, verminderte die Quellung der Prüfkörper nicht ausreichend. Da die entwickelten Werkstoffe somit nicht für die Entwicklung maßgeschneiderter feinstrukturierter Knochenersatzimplantate mittels Laserschmelzprozess geeignet waren, wurde PDLLA durch PLLA ersetzt. Da PLLA im Vergleich mit PDLLA aufgrund der teilkristallinen Eigenschaften eine höhere Festigkeit aufweist [48, S. 57], war zu erwarten, dass die Wasseraufnahme durch eine geringere Matrixquellung begrenzt ist. Zudem degradiert PLLA langsamer als PDLLA [48, S. 58], [135], [156], wodurch sich die Abbauzeit des angestrebten biodegradierbaren Knochenersatzmaterials deutlich verlängert. Shikinami et al. wiesen nach, dass Prüfkörper aus 60 Gew.-% PLLA und 40 Gew.-% Hydroxylapatit nach 25 Wochen in PBS immer noch 75 % der initialen Biegefestigkeit von 270 MPa hatten [155]. Nach 52 Wochen lag die Festigkeit sogar noch bei 150 MPa. Die Molmasse des Polymers war jedoch doppelt so groß wie die Molmasse des in der vorliegenden Arbeit verwendeten PDLLAs. Die PLLA-basierten SLM-Prüfkörper Verbundwerkstoff bestanden aus PLLA und 23 Gew.-% sphärolithischem Calciumcarbonat. 77 Gew.-% Das sphärolithische Calciumcarbonat wurde für die PLLA-Werkstoffe verwendet, da sich im Laserschmelzprozess gezeigt hatte, dass gröbere Partikel zu einer geringeren Degradation des Polymers führten. Da der Polymeranteil bei im Vergleich zu den aufbereiteten Werkstoffen höher war, bisher war zudem eine geringere Flüssigkeitsaufnahme zu erwarten, da das Matrixmaterial aufgrund des höheren Anteils eine höhere adhäsive Wirkung erzielen konnte. Die SLM-Prüfkörper wiesen eine Biegefestigkeit im Bereich der Verbundwerkstoffe aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP auf (vgl. Abb. 62, Abb. 63). Tendenziell lagen sie etwas über den Werten, wiesen jedoch höhere Standardabweichungen auf. Grund dafür war der höhere Polymeranteil des PLLA-Werkstoffs. Der Ball-on-three-balls-Test ist nur für spröde Werkstoffe geeignet [23], [24], [36]. Zwar verhielt sich der PLLA-Werkstoff aufgrund des Calciumcarbonats wie die untersuchten PDLLA-basierten Werkstoffe spröde, jedoch nehmen die duktilen Eigenschaften mit sinkendem Calciumcarbonat-Anteil zu. Die Abnahme der Biegefestigkeit erfolgte analog zu den PDLLA-Werkstoffen. Jedoch zeigte sich nach zwei Wochen ein Abfall der Biegefestigkeit von

etwa 50 %. Bis zu acht Wochen lag die Biegefestigkeit noch bei einem Drittel der Ausgangsfestigkeit. Ein direkter Vergleich der Biegefestigkeiten der PLLA-basierten mit den PDLLA-basierten SLM-Prüfkörpern war schwierig, da zu viele Parameter gleichzeitig variiert wurden. Dazu gehörten u. a. der Polymeranteil, der Füllstoff und der Untersuchungszeitraum. Die Flüssigkeitsaufnahme war über acht Wochen annähernd konstant um 10 Gew.-%. Außer nach vier Wochen zeigte sich jedoch bei Quellung. Nach vier Wochen war keinem Prüfkörper eine zudem die Standardabweichung sehr hoch. Für verlässliche Zusammenhänge sollte die Messung wiederholt werden. Da die Degradation von PLLA noch langsamer abläuft als von PDLLA, wurde die Studie zur Beschleunigung des Polymerabbaus bei erhöhter Temperatur (50 °C) wiederholt. Nach einer Woche wurde die Biegefestigkeit auf ein Drittel reduziert (vgl. Abb. 64). Nach drei Wochen sank sie auf ein Viertel. Die Quellung der Prüfkörper lag über drei Wochen konstant bei 1,8 %. Zwar waren auch hier die Standardabweichungen sehr hoch, jedoch lagen die ermittelten Festigkeitswerte insgesamt unter 5 %. Der pH-Wert der PBS-Kontrolle lag über drei Wochen konstant zwischen 7,3 und 7,4. Das Lagerungsmedium fiel dagegen kontinuierlich ab. Dennoch lag der pH-Wert nach acht Wochen noch bei 7,2. Da trotz beschleunigter Degradation noch kein makroskopisch sichtbarer Werkstoffabbau begonnen hatte, war davon auszugehen, dass die Degradation bei 37 °C um einiges länger dauern würde.

Die dynamische Beanspruchung von warmgepressten Prüfkörpern (mit Kanal) während der Lagerung in Wasser bei 20 °C führte sehr schnell zum mechanischen Versagen (vgl. Abb. 66). Mögliche Ursachen gab es diesbezüglich mehrere. Zum einen war die Druckfestigkeit in diesem Versuch mit 51 MPa verglichen mit Literaturwerten niedrig angesetzt. Wie bereits im Rahmen der einfachen Druckfestigkeit diskutiert, wiesen Lin et al. bei Prüfkörpern aus einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP eine Druckfestigkeit von 195 MPa nach [104]. Prüfkörpern aus einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PLLA und 40 Gew.-% Hydroxylapatit besaßen eine Druckfestigkeit von 107 MPa [155]. Diese Werte bezogen sich jedoch auf die Ausgangsfestigkeit der Prüfkörper ohne Lagerung in Flüssigkeit. Die Aufnahme der Flüssigkeit bzw. die Quellung der Prüfkörper führten zu einem starken Abfall der Festigkeit. Die dynamische Beanspruchung ergab jedoch eine höhere Beanspruchung der Probe, so dass eine Druckfestigkeit von 51 MPa als Oberlast zu hoch angesetzt ist. Die zweite Ursache konnte eine fehlerhafte Präparation der Prüfkörper sein. Zum einen wurde der Kanal händisch gebohrt, so dass Abweichungen von der idealen Geometrie unvermeidbar waren. Das hatte zur Folge, dass die Lastverteilung innerhalb des Prüfkörpers nicht homogen war. Zum anderen konnte nicht sichergestellt werden, dass die Prüfkörper in dieser Größe gänzlich aufgeschmolzen waren. Ein dritter Punkt konnte sein, dass durch die die dvnamische Beanspruchung bzw. die Prüfkörperverformung Flüssigkeitsaufnahme sogar beschleunigt wurde. Bei Lagerung in einem Puffer hält der Prüfkörper möglicherweise eine höhere Anzahl an Lastzyklen aus. Grund dafür

Kraft ist, dass nicht die treibende des Konzentrationsausgleiches in demineralisiertem Wasser wirkt und folglich keine Partikel aus der Oberfläche ausgeschwemmt werden. Da sich im Rahmen der gesamten Festigkeitsuntersuchungen gezeigt hatte, dass PDLLA für die vorhergesehene Prozesstechnik nicht geeignet war, wurde auf weitere Untersuchungen zur biomechanischen Festigkeitsuntersuchung verzichtet.

Insbesondere im Hinblick auf die zellbiologischen Untersuchungen musste die Verfärbung der Calciumcarbonat-haltigen SLM-Prüfkörper analysiert werden. Es wurde abgeklärt, ob ggfs. zellschädigende Degradationsprodukte aus den Prüfkörpern bei Lagerung in Flüssigkeit in die Umgebung abgegeben wurden. Zum einen würde sich dadurch die Zusammensetzung des Materials an der Prüfkörperoberfläche ändern, wodurch das Zellverhalten im Hinblick auf Adhäsion und Proliferation beeinflusst werden könnte. Zum anderen würde durch die Freisetzung der Abbauprodukte die Zusammensetzung des Mediums verändert werden, was die Zellen in ihrer Vitalität beeinflussen könnte. Die Lagerung eines SLM-Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomboedrisch fein) in Zellmedium offenbarte eine Farbänderung des Mediums (vgl. Abb. 67). Diese Zusammensetzung wurde gewählt, weil sie die stärkste Verfärbung nach dem Laserbehandlung zeigte. Es galt abzuklären, ob die Verfärbung des Mediums durch eine Änderung des pH-Wertes oder durch die Degradationsprodukte (ohne pH-Wert-Änderung) zustande kam. Eine pH-Wert-Änderung hätte einen starken Einfluss auf die Zellviabilität. Die Messung ergab, dass der pH-Wert des Probenmediums zwar unterhalb der Kontrolle, aber im idealen Wertebereich für die Zellkultivierung lag (7,0-7,5) (vgl. Abb. 68). Für die späteren zellbiologischen Untersuchungen war somit festzuhalten, dass im Falle einer schlechten Zellreaktion nicht der pH-Wert verantwortlich ist. Im Falle geringer Zellaktivität sollte daher eine veränderte Mediumzusammensetzung oder das degradierte Material eine größere Rolle spielen. Die Wiederholung der Untersuchungen mit SLM-Prüfkörpern aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% B-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomboedrisch fein) wurde in einem größeren Flüssigkeitsvolumen durchgeführt. Grund dafür war, dass im Körper ein größeres Flüssigkeitsvolumen zur Verfügung steht und der Einfluss der Freisetzung einzelner Bestandteile auf die Mediumzusammensetzung in einem größeren Volumen geringer ist als in einem kleinen Volumen. Dieser Werkstoff wurde verwendet, da die Zusammensetzung einen Kompromiss zwischen Verarbeitbarkeit, mechanischer Stabilität und biologischer Eigenschaften bildete. Bereits nach 45 min war eine deutliche Entfärbung der Prüfkörper zu verzeichnen (vgl. Abb. 69). Nach sieben Tagen in Zellmedium waren die Prüfkörper wieder komplett weiß. Das Zellmedium zeigte eine leichte Farbveränderung, die für einen geringen pH-Wert-Abfall sprach. Die parallel durchgeführte Lagerung in demineralisiertem Wasser ergab ein vergleichbares Ergebnis. Jedoch war keine farbliche Veränderung des Wassers zu beobachten. Der Calcium-Nachweis in den Lagerungsmedien der beiden

vorangegangenen Studien zeigte, dass sich in Wasser etwa 1 mg Calcium aus dem Prüfkörper gelöst hatte (vgl. Abb. 70, Tab. 34). Im Zellmedium dagegen war kein Calcium nachweisbar. Grund dafür war die treibende Kraft des Konzentrationsausgleiches in demineralisiertem Wasser. In dem Medium, in dem der Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% Calciumcarbonat gelagert wurde, hatten sich sogar 12 mg gelöst. Dieser Anteil war deutlich größer, was damit zu begründen war, dass die stärkere Degradation aufgrund des höheren Calciumcarbonats zu einer höheren Prüfkörperporosität führte. Dadurch konnte die mehr Flüssigkeit in den Prüfkörper eindringen und Degradationsprodukte ausgeschwemmt werden. Gleichzeitig war durch die stärkere Polymerdegradation die adhäsive Fähigkeit geschwächt, so dass sich die keramischen Partikel leichter aus dem Verbund lösen konnten.

5.3 Biologische Verträglichkeit

In den folgenden Unterkapiteln werden die biologischen Aspekte hinsichtlich der entwickelten Verbundwerkstoffe diskutiert. Im Vordergrund stand die Optimierung der Werkstoffzusammensetzung im Hinblick auf die gewünschte Zellreaktion (Viabilität, Differenzierung oder Resorption des Substrates).

5.3.1 Viabilität

Eine zytotoxische Wirkung der entwickelten Verbundwerkstoffe war nicht zu erwarten, da die verwendeten Materialien in abgewandelten Kombinationen in anderen Forschergruppen bereits in vitro und in vivo untersucht worden sind [34], [113], [135]. Es waren weder Entzündungs- noch Abstoßungsreaktionen aufgetreten. Zudem wurden in der vorgelegten Arbeit keine schädlichen Substanzen zur Materialaufbereitung oder während der Prozessführung verwendet, die das Zellverhalten hätten negativ beeinflussen können. Daher ging es in den Viabilitätsstudien primär darum, wie die Zelladhäsion und die Zellaktivität durch eine gezielte Einstellung der Werkstoffzusammensetzung optimiert werden konnte. Im Hinblick auf ein biologisch abbaubares Implantat wäre ein reines PDLLA-Implantat zwar erstrebenswert, jedoch fehlen osteokonduktive Eigenschaften, die das Knocheneinwachsen fördern. Dass Polylactid keine osteokonduktiven Eigenschaften besitzt, hatten mehrere Studien bereits gezeigt. Vier Wochen nach der Implantation von P(96L/4D-Lactid) hatte sich stattdessen um die Implantate eine Kollagenkapsel gebildet [32]. Um diese Kapsel herum hatte sich wiederum eine Bindegewebsschicht gebildet. Zwischen der Kollagen- und der Bindegewebsschicht befand sich eine etwa 15 µm dicke Zellschicht aus Makrophagen und Riesenzellen. Nach sieben Wochen war die Kollagenschicht vaskularisiert, jedoch waren auch weiter Makrophagen vorhanden, die zum Teil in die Kollagenschicht einwuchsen [32]. Nach 55 Wochen waren Kollagen- und Zellschicht deutlich gewachsen. Die äußere Form der Implantate war zu diesem Zeitpunkt noch erhalten. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen an reinem PLLA von Gerlach [58]. Nach 108 Wochen war die Fibroblastenschicht noch erhalten. Der Vergleich verschiedener Polylactid-Varianten (PLLA, PLPLA und PLDLLA) *in vivo* zeigte, dass sich um alle Implantate eine fibröse Grenzschicht sowie Fresszellen gebildet hatten [110]. Die Zellreaktion war innerhalb der ersten sechs Monate am stärksten und nahm danach ab. So entstand bei keiner der beschriebenen Studien ein Knochenkontakt.

Um die osteokonduktiven Eigenschafften zu verbessern und somit einen festen Kontakt zwischen Implantat und Knochen herzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit β-TCP in die Polymermatrix eingebracht. Dieser Anteil war jedoch durch die Einbringung der dritten - pufferfähigen - Komponente begrenzt. β-TCP hatte sich in verschiedenen Studien bereits im Hinblick auf Osteokonduktion bzw. Knocheneinwachsen bewährt [71], [113]. Grund dafür war, dass es der Struktur des natürlichen Knochens sehr ähnlich ist und dadurch eine positive Antwort stimuliert. In In-Vitro-Untersuchungen verschiedener Keramiken zeigten Rattenstammzellen eine höhere Proliferation auf *β*-TCP und Hydroxylapatit als auf Calciumcarbonat [71]. Übertragen auf die vorliegende Arbeit bedeutet das, dass Calciumcarbonat zwar besser puffert, B-TCP aber eine bessere Implantateinheilung vorhersagt. Bei der In-*Vivo*-Untersuchung von β -TCP waren zu Beginn Phagozyten nachweisbar [113]. Nach zwölf Wochen überwogen jedoch Osteoblasten und Osteozyten, so dass sich zudem eine Knochenschicht gebildet hatte. Nach 24 Wochen war ein Großteil der Keramik durch neugebildeten Knochen ersetzt. Durch die Einbringung von 10 bzw. 24 Gew.-% β-TCP in P(96L/4D-Lactid) konnten im Gegensatz zum reinen Polymer osteokonduktive Eigenschaften erworben werden [34].

Aufgrund der Vielzahl an Parametern bei den zellbiologischen Untersuchungen erfolgt die Diskussion entlang eines Schemas (Abb. 102). Die Diskussion der Ergebnisse bezüglich warmgepresster Prüfkörper beinhaltet neben den Einflüssen unterschiedlicher Werkstoffzusammensetzungen auch den Einfluss Strontiumhaltiger Komponenten auf das Zellverhalten. Anschließend werden die Erkenntnisse auf den Laserschmelzprozess übertragen. Die Werkstoff- und Prozessoptimierung durch den Wechsel von PDLLA auf PLLA erfolgt zum Schluss.



Abb. 102: Reihenfolge der Diskussion der zellbiologischen Ergebnisse

Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung

Die zur ersten Abschätzung der Zytokompatibilität durchgeführten Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen verschiedener Zelltypen auf warmgepressten Prüfkörpern wiesen auf allen PDLLA-basierten Verbundwerkstoffen auf eine gute Zellverträglichkeit hin. Die Vitalität aller Zelltypen lag auf allen Werkstoffen bei annähernd 100 % (vgl. Tab. 37 und Anhang Tab. 43-47). Sowohl die <u>L-929-Mausfibroblasten</u> als auch die <u>Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63)</u> zeigten auf den verschiedenen Werkstoffen keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Variation des Polymergehalts in dieser Größenordnung (40 bis 60 Gew.-%) sowie eine Variation der keramischen Komponenten keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum hatte. Der Vergleich der absoluten Zellzahlen lieferte für die vier Zelltypen eine hohe Standardabweichungen (vgl. Tab. 37 und Anhang Tab. 43-47). Grund dafür war, dass die Zellen nicht homogen auf den Prüfkörpern verteilt waren. Da die Fluoreszenzaufnahmen von drei verschiedenen Stellen (Mitte, Rand und dazwischen) der Prüfkörper gemacht wurden, variierten die Zellzahlen sehr stark. Die meisten Zellen befanden sich in der Probenmitte. Der Vergleich der absoluten Zellzahlen verschiedener Werkstoffe zeigte aufgrund der hohen Standardabweichungen kaum signifikante Unterschiede. Einzig der Werkstoff basierend auf 50 Gew.-% PDLLA zeigte eine signifikant höhere Anzahl an MG63-Zellen gegenüber den anderen Werkstoffen (vgl. Tab. 44). Auf reinem Calciumcarbonat (rhomboedrisch fein) zeigten MG63-Zellen eine geringere Vitalität (89 %) als auf den anderen Substraten. Die höhere Anzahl toter Zellen muss jedoch nicht zwangsweise durch das Material zustande gekommen sein. Da die Calciumcarbonat-Prüfkörper aufgrund der Reaktion zu Calciumoxid bei höheren Temperaturen nur bei 500 °C "gesintert" werden konnten, wiesen sie eine geringe Festigkeit auf [163, S. 54]. Sie zerbrachen bereits bei der Handhabung sehr schnell. Aufgrund der geringen Festigkeit konnten während der Zellkultivierung leicht Partikel aus der Oberfläche herausbrechen oder gelöst werden. Zudem war durch die Herauslösung von Partikeln die Porosität der Prüfkörper erhöht, was die Flüssigkeitsaufnahme erleichterte und erhöhte [18, S. 211], [130, S. 259]. Eine Veränderung der Oberflächen der Calciumcarbonat-Prüfkörper während der Kultivierung konnte dadurch nicht verhindert werden. Ein veränderter Untergrund konnte dazu geführt haben, dass sich die Zellen aktiv abgelöst haben. Zudem konnten die Zellen durch das Herauslösen von Partikeln passiv mit diesen Partikeln abgelöst worden sein. Zwar zeigte die Untersuchung, dass reines Calciumcarbonat in der hergestellten Prüfkörperform als Implantat ungeeignet war, jedoch schließt dies Calciumcarbonat als Werkstoff nicht aus. Calciumcarbonat gilt in der Literatur nicht als toxisches Material [71]. He et al. wiesen eine zu etablierten Implantatwerkstoffen vergleichbare Viabilität und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen von Ratten nach [71].

Die Anzahl der Osteoklasten-ähnlichen Zellen (RAW) variierte sehr stark auf den Prüfkörpern (vgl. Tab. 45). Tendenzen in der Zellzahl in Abhängigkeit der Werkstoffzusammensetzung waren nicht ersichtlich. Mit 90 % war die Vitalitätsrate auf dem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat deutlich unterhalb der bisher ermittelten Werte. Der Grund dafür war nicht ersichtlich. Ein Vergleich der Zellzahlen mit Literaturdaten war an dieser Stelle nicht sinnvoll, da es keine direkt vergleichbaren Studien gibt. Zudem wurden die untersuchten Werkstoffe in der Zusammensetzung aus den drei Komponenten noch nicht verwendet. Aufgrund der Vielzahl an Parametern (z. B. Werkstoffzusammensetzung, Zelltyp, Zellzahl, Kultivierungsdauer) wurden die Werkstoffe nur untereinander verglichen. Wie bereits diskutiert, war eine toxische Wirkung nicht zu erwarten, so dass der Schwerpunkt der Untersuchung auf einer optimalen Zellreaktion lag. Eine Zellverträglichkeit ähnlicher Zusammensetzungen hatten verschiedene Studien bereits gezeigt [72], [127], [179]. Näher erläutern Heidemann et al. untersuchten Verbundwerkstoffe aus PDLLA und β-TCP (24,1/75,9 Gew.-%) bzw. Calciumhydrogenphosphat (95,4/4,6 Gew.-%) [72], während Zhu et al. Verbundwerkstoffe aus PLLA und β-TCP (80/20 Gew.-%) untersuchten [179]. Nie et *al.* analysierten biphasische Calciumphosphate, die mit einem Verbundwerkstoff aus Hydroxylapatit und PLLA beschichtet waren [127].

Insgesamt lagen die Zellzahlen der drei Zelltypen durchgehend im Bereich der Kontrolle, so dass die Werkstoffe keinen negativen Einfluss auf das Zellverhalten hatten. Über die Zellzahlen auf den Prüfkörperoberflächen lassen sich zudem Rückschlüsse auf das Adhäsionsverhalten ziehen [115, S. 212]. Da die Zellzahlen von L-929-Zellen auf verschiedenen Werkstoffen vergleichbar waren, schien die Adhäsion der Zellen durch die Werkstoffzusammensetzung unbeeinflusst. Gleiches galt auch für MG63-Zellen. Da die drei Zelltypen in der gleichen Ausgangsdichte ausgesät wurden, konnten auch über diesen Aspekt Rückschlüsse auf das Adhäsionsverhalten gezogen werden. Da die Zellen nur über 24 Stunden kultiviert wurden, spielte die Proliferation der Zellen nur eine untergeordnete Rolle. Die Zellzahl der Mausfibroblasten war durchschnittlich etwa doppelt so groß wie die der MG63-Zellen. Die Anzahl der RAW-Zellen lagen zwischen den Werten der beiden anderen Zelltypen. Dass L929-Zellen die höchste Zellzahl auf den Prüfkörpern aufwiesen, war zu erwarten, da sie auf äußere Einflüsse am wenigsten stark reagieren [75, S. 73], [187].

Zu beachten war, dass die untersuchten Zelllinien - insbesondere L-929-Mausfibroblasten - sehr unempfindlich sind und daher durch geringe Schwankungen von den idealen Kultivierungsbedingungen (z. B. pH-Wert, CO₂-Atmosphäre, Temperatur) kaum beeinflusst werden [75, S. 73], [90, S. 59]. Sehr empfindlich sind dagegen <u>humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)</u>. Im Hinblick auf die Verwendung eines Implantatmaterials ist dies der wichtigste zu untersuchende Zelltyp. Bereits die beiden Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen der Stammzellen zeigte eine starke Spendervarianz (vgl. Tab. 37). Die Zellzahl auf den Prüfkörper beim ersten Spender betrug nur etwa ein Zehntel der Zellzahl beim zweiten Spender. Obwohl hMSCs mit Schwankungen der Kulturbedingungen oftmals sensitiv reagieren [30, S. 21] darunter fällt auch die Umkultivierung aus der Kulturflasche auf Prüfkörper - zeigten sie auf allen Prüfkörpern eine Vitalität von annähernd 100 %. Auch die Prüfkörper, die neben bzw. anstelle von Calciumcarbonat Strontiumcarbonat enthielten, zeigten keine Anzeichen für eine zytotoxische Wirkung auf Zellen.

Auf den <u>SLM-Prüfkörpern</u> waren nahezu keine Zellen nachweisbar, während im direkten Vergleich auf den warmgepressten Prüfkörpern eine Zellzahl oberhalb der Kontrolle nachgewiesen werden konnte. Zwar sollte in diesem Versuch die degradationsbedingte Verfärbung der Prüfkörper auf das Zellverhalten untersucht werden, jedoch zeigte sich, dass auch der weiße SLM-Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β -TCP nahezu zellfrei war (vgl. Tab. 38). Ein möglicher Einfluss durch die Verfärbung konnte auf der Grundlage der Ergebnisse nicht geschlossen werden. Es schienen aber andere Einflüsse zu überliegen. Es besteht die Vermutung, dass die Oberflächenbeschaffenheit eine große Rolle spielte. Zellen fühlen sich in der Regel wohler, wenn sie Ecken und Kanten zum "Festhalten" haben [59, S. 108]. Mainil-Varlet *et al.* zeigten z. B., dass die zelluläre Aktivität beim

Implantatabbau an den Implantatkanten und -ecken stärker war als auf den Flächen [110]. Durch den Laserschmelzprozess war eine sehr glatte Oberfläche entstanden, so dass die Adhäsion der Zellen möglicherweise erschwert oder sogar verhindert wurde. Die Calciumcarbonat-haltigen Prüfkörper wiesen - wie bereits diskutiert aufgrund der degradationsbedingten Gasbildung und der Verkohlung eine sehr unebene Oberfläche auf. Die Bedingungen wären optimal, sofern nicht die Degradationsprodukte einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hatten.

Kritische Betrachtung zur Analyse mittels Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung

Generell sind bei der Auswertung der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung wichtige Aspekte zu beachten [187]:

- 1. Beim Nachweis überwiegend toter Zellen ist das getestete Material aufgrund toxischer Wirkung auf Zellen als Implantatmaterial ungeeignet.
- 2. Beim Nachweis überwiegend lebender Zellen ist das getestete Material nicht zwangsweise auch als Implantatmaterial geeignet.

Beim Nachweis überwiegend lebender Zellen können unterschiedliche Schlüsse gezogen werden. Die naheliegende Interpretation ist, dass alle Zellen vital sind und das Material zellverträglich ist (Abb. 103a, 100 % vitale Zellen). Diese Schlussfolgerung kann jedoch unter Umständen falsch sein. Sterben Zellen ab, sind sie auf der Oberfläche nachweisbar, solange sie adhärent sind (Abb. 103b, 50 % vitale Zellen). Sind die Zellen nicht mehr adhärent, lösen sie sich ab und schwimmen im Zellmedium (Abb. 103c). Da nur die Zellen auf der Oberfläche berücksichtigt werden, werden die toten Zellen im Medium nicht miterfasst. Somit ergibt sich fälschlicherweise eine Vitalität der Zellen von 100 %, obwohl diese tatsächlich nur bei 50 % liegt.



Abb. 103: Kritische Aspekte bei der Auswertung der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung.

Zusammenfassend lässt sich zu den Untersuchungen mittels Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung sagen, dass kein Verbundwerkstoff einen Hinweis auf eine toxische Wirkung lieferte. Auch das Adhäsionsverhalten der Zellen scheint durch Variation der Werkstoffzusammensetzungen nicht beeinflusst worden zu sein. Diese Erkenntnis bezüglich der Zelladhäsion erleichtert die Werkstoffanpassung im Hinblick auf Festigkeit und Pufferfähigkeit, da ein Abhängigkeitsfaktor entfällt.

Zellviabilität und Zytotoxizität

In der vorliegenden Arbeit sollte eine optimale Kombination aus PDLLA, β-TCP und Calciumcarbonat gefunden werden. Da insbesondere die initiale sowie die langfristige Zellreaktion eine entscheidende Rolle bei der Implantateinheilung und dem Implantatabbau spielen, gehörten die zellbiologischen Untersuchungen zu den wichtigsten Aspekten. Um sowohl die Zellen auf der Probe als auch im Medium zu berücksichtigen, wurde die Aktivität der Zellen im gesamten Well mit Hilfe des *CellTiterBlue*-Assays bzw. die toten Zellen im Überstand anhand der LDH-Menge quantifiziert. Mit dem *CellTiterBlue*-Assay wird nicht die Vitalität oder die Proliferation der Zellen, sondern deren Aktivität gemessen. Eine Zelle kann vital sein, muss aber nicht zwangsweise aktiv sein [16]. Demnach kann die Vitalität der Zellen durchaus größer sein als die Aktivität vermuten lässt. Bei der Auswertung des Assays liefert auch eine konstante Aktivität ein gutes Ergebnis. In der Regel nimmt bei Zellwachstum die Aktivität zu, da bei proliferierenden Zellen die Häufigkeit aktiver Zellen steigt. Bei einer sinkenden Aktivität ist dagegen ein negativer Einfluss des Substratmaterials wahrscheinlich.

Die <u>Mausfibroblasten</u> zeigten zwar über den Untersuchungszeitraum eine wachsende Aktivität, was für ein Zellwachstum spricht, jedoch lagen die Aktivtäten deutlich unterhalb der Well-Kontrolle. Die Wellkontrolle gilt als optimaler Untergrund für eine Zelle [112, S. 34], [150, S. 49]. Auf dem gleichen Untergrund wurden die Zellen auch vor der Aussaat auf Prüfkörper kultiviert, sodass die Umgewöhnung für die Zellen gering ausfiel. Die Zytotoxizität lag am ersten Tag zwischen 10 und 20 %, was speziell für die unempfindlichen Mausfibroblasten hoch ist (vgl. Abb. 116). Da die Well-Kontrolle aber im gleichen Bereich (~17 %) und die Werte zudem alle unter der von der Norm geforderten Grenze von 30 % lagen [187], konnte eine toxische Wirkung ausgeschlossen werden.

Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) zeigten ein ähnliches Verhalten (vgl. Abb. 71 links). Da jedoch beobachtet wurde, dass das Wachstum jedoch insgesamt langsamer war als bei Mausfibroblasten, wurde das Zellverhalten nicht über vier, sondern über sieben Tage untersucht. Nach fünf Tagen stieg die Aktivität für alle Substrate an. Zwar lagen auch hier die Prüfkörper unterhalb der Kontrolle, aber nur geringfügig. Der Werkstoff, basierend auf 50 Gew.-% PDLLA, lag dagegen oberhalb der Kontrolle, was sich mit den Ergebnissen der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung deckte (vgl. Tab. 44). Speziell im Hinblick auf den Knochenaufbau scheint dieser Werkstoff eine positive Wirkung auf knochenaufbauende Zellen zu haben. Kim et al. konnten die Viabilität von MG-63-Zellen durch die Integration von 25 Gew.-% Hydroxylapatit etwas erhöhen im Vergleich zu reinem PDLLA [88]. Nach sieben Tagen sank die Zellaktivität auf den Werkstoffen der vorliegenden Arbeit. Im Well stieg sie dagegen weiter an. Gründe für eine verminderte Aktivität kann neben einem Zellabsterben auch eine Überwachsung oder eine erhöhten beginnende Differenzierung sein [52, S. 190]. Eine verminderte Zellaktivität muss nicht zwangsweise durch ein Zellabsterben verursacht worden sein. Auch vitale Zellen können

sich vorübergehend in einem inaktiven Zustand befinden [16]. Da Kontrollen gezeigt hatten, dass auf den Prüfkörpern nicht mehr Zellen als auf den Kontrollen waren (vgl. Tab. 36-40), war eine Überwachsung der Kultur unwahrscheinlich. Zwar war den Zellen kein Induktionsmedium zufügt worden, jedoch könnte auch durch das Material an sich eine Differenzierung induziert worden sein. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass einige Werkstoffe eine Differenzierung von hMSCs zu Osteoblasten stimulieren können, z. B. Bioglas [107], [166]. Um das Differenzierungspotential der entwickelten Werkstoffe zu analysieren, sind weitere Untersuchungen nötig. Die berechnete Zytotoxizität war auch in diesem Versuch verhältnismäßig hoch, lag aber für alle Verbundwerkstoffe unterhalb der Kontrolle (vgl. Abb. 71 rechts).

Die Viabilität der Osteoklasten-ähnlichen Zellen (RAW) stieg für alle Werkstoffe über sieben Tage an, lag aber durchgehend unterhalb der Kontrolle (vgl. Abb. 117 links). Die Aktivität der RAW-Zellen auf der Kontrolle stieg nur bis zum fünften Tag und viel danach ab. Ein möglicher Grund konnte aufgrund des hohen Wertes eine Überwachsung der Kultur gewesen sein. Die Zytotoxizität war nicht eindeutig bewertbar (vgl. Abb. 117 rechts). Die berechneten Werte reichten bis zu einer Zytotoxizität von -50 %. Bei der Bestimmung der Zytotoxizität ergaben sich mehrere kritische Aspekte, die zu den fehlerhaften Werten geführt hatten. Wenn ein Werkstoff nahezu keine zytotoxische Wirkung hat, ergibt sich im Idealfall eine Zytotoxizität von 0 %. Bei der Messung befindet man sich dann in einem Rauschbereich, da sich das Signal der Probe mit dem des Hintergrundes überlagert. Daher sind geringe negative Werte nicht unüblich bei dieser Methode. Ein Wert von -50 % konnte jedoch nicht mehr Rauschen gewertet werden (vgl. Abb. 117 rechts). Ein negativer Wert ergibt sich dann, wenn der Hintergrund eine höhere Intensität liefert als die Probe. Ein kritischer Punkt ist zudem, dass das Medium bei der Kultivierung von den Zellen verbraucht wird und sich dadurch verändert. Die Hintergrundkontrolle wird jedoch aus frischem Medium angesetzt, so dass die Medien der Zellen und der zellfreien Kontrolle leicht unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen können. Eines der größten Probleme bei den Untersuchungen in der vorliegende Arbeit war, dass der LDHmax-Wert, anhand von einer Wellkontrolle bestimmt wurde und nicht für jeden einzelnen Werkstoff. Da es sich dabei um den Bezugswert handelte, anhand dessen die Zytotoxizität abgeschätzt wurde, übertrug sich der Fehler auf jede Probe. Dieser Kompromiss wurde eingegangen, da der Probenaufwand für die werkstoffspezifische Bestimmung zu hoch war. Die Annahme für den Kompromiss war, dass die Anzahl und das Wachstum der Zellen auf den Prüfkörpern und der Wellkontrolle vergleichbar waren. Dass die Zellzahl zu Beginn vergleichbar war, konnte anhand der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen beobachtet werden. Die Zellaktivität auf den Prüfkörpern lag jedoch meist unterhalb der Kontrollen, so dass auf eine geringere Wachstumsrate zu schließen war. Demnach variierte auch die Zellzahl mit der Zeit.

Auch im Rahmen dieser Studien konnten die Ergebnisse - wie bei der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung - nicht direkt mit anderen Studien aus der Literatur verglichen werden. Daher wurde auf *In-Vivo*-Untersuchungen mit ähnlichen

Werkstoffen zurückgegriffen. Daculsi et al. konnten durch die Integration von 10 bzw. 24 Gew.-% B-TCP in P(96L/4D-Lactid) ein Knocheinwachsen in das Implantat und eine Mineralisierung bewirken [34]. Der Knochenkontakt blieb bei dem reinen Polymer gänzlich aus. Die Integration von 10 Gew.-% β-TCP in P(70L/30D-Lactid) zeigte dagegen keinen Unterschied zum reinen Polymer [135]. Unterschiede in den beiden Studien bestanden in den Tiermodellen. Während Prokop et al. in Schafe implantierten, untersuchten Daculsi et al. Kaninchen [34], [135]. Die verwendeten Polylactide unterschieden sich in ihrer Chiralität. Während P(96L/4D-Lactid) in der Ausrichtung der D- und L-Elemente PLLA ähnlicher ist, ähnelt P(70L/30D-Lactid) mehr PDLLA. So könnten z. B. Unterschiede im Quellverhalten oder Implantatabbau zu den unterschiedlichen Gewebereaktionen geführt haben. Da bereits geringe Unterschiede in den Ausgangsmaterialien (z. B. Chiralität, D/L-Verhältnis) einen Einfluss auf das Zellverhalten haben konnten, war die vollständige Charakterisierung der Werkstoffe umso wichtiger. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete PDLLA bestand in gleichen Teilen aus L- und D-Anteilen. Zhu et al. verglichen reines PLLA in vivo mit einem Verbundwerkstoff aus 80 Gew.-% PLLA und 20 Gew.-% B-TCP [179]. Bereits nach vier Wochen hatte sich in dem Defekt mit dem Verbundwerkstoff ein unregelmäßiger Knochenaufbau entwickelt. Die Knochendichte war allerdings sehr gering. Um das PLLA-Implantat hatte sich auch nach 24 Wochen kein neues Knochengewebe gebildet. Zu dieser Zeit war bei dem Verbundwerkstoff eine sehr gute Integration und Verbindung zwischen Gewebe und Implantation nachweisbar. Entzündungen gab es in keinem der Implantationsgebiete. Im direkten Vergleich von β-TCP und Calciumcarbonat wiesen Rattenstammzellen auf Calciumphosphat eine höhere Proliferation auf als auf Calciumcarbonat [71]. Dieses Ergebnis bestätigt, dass ein höherer B-TCP-Anteil vorteilhaft im Verbundwerkstoff im Vergleich zu Calciumcarbonat ist.

Da die angesprochenen Studien keinen Hinweis auf toxische Reaktionen gaben, konnte davon ausgegangen werden, dass auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Werkstoffe keine toxische Wirkung besitzen. Das folgende Diagramm verdeutlicht die Auswirkungen einer LDHmax-Bezugsquelle mit einer höheren Zellzahl als auf den zu vergleichenden Prüfkörpern (Abb. 104). Dies war in der vorliegenden Arbeit der Fall. Wenn alle Zellen auf einer Probe abgetötet werden, können sich die absolut gemessenen Werte bei unterschiedlichen Zellzahlen stark unterscheiden (Abb. 104 oben). Werden die Zellen auf den Prüfkörpern in Bezug zu einer "100 % toxisch"-Kontrolle gesetzt, die wesentlich mehr Zellen aufwies, wird der Zytotoxizitätswert fälschlicherweise kleiner abgeschätzt als er tatsächlich ist (Abb. 104 unten).



Abb. 104: Kritischer Aspekt bei der Bestimmung der Zytotoxizität in der vorliegenden Arbeit. Die Zellzahl nimmt direkten Einfluss auf das Messignal (oben). Der LDHmax-Bezugswert entstammt einer Wellkontrolle mit einer höheren Zellzahl gegenüber den Prüfkörpern. Fälschlicherweise entsteht dadurch ein zu geringerer Wert der Zytotoxizität als der tatsächliche Wert (unten).

Zudem stellte sich die Frage, ob die Messung mittels *CytotoxOne*-Assay überhaupt für Polylactid-basierte Substrate geeignet ist. Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das im Zytoplasma aller Zellen nahezu aller Lebewesen vorkommt [172, S. 77]. Es wird freigesetzt, wenn die Zellmembran zerstört wird. Da es jedoch auch in gesunden Zellen vorhanden ist, sollte in Untersuchungen die intra- und extrazelluläre Konzentration miteinander verglichen werden [172, S. 77]. Durch LDH wird die Reaktion von Lactat zu Pyruvat katalysiert [94, S. 100]. Die Reaktion ist reversibel. Im Allgemeinen gilt, dass das Lactatlevel in positiver Korrelation mit der LDH-Aktivität steht [37]. Ungeklärt bleibt, welchen Einfluss ein Polylactid-Substrat dabei hat. Wenn eine ausreichend hohe Menge LDH extrazellulär nachzuweisen ist, beschleunigt dies möglicherweise den Polymerabbau autokatalytisch. Sollte diesbezüglich eine verstärkte Reaktion ablaufen, so könnte die LDHmax-Kontrolle, in der alle Zellen abgetötet worden waren, verfälschte Fluoreszenzwerte geliefert haben. Dies könnte zu den ermittelten, unklaren Zytotoxizitätswerten geführt haben. Die Abklärung dieser Vermutungen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Wie bereits im Rahmen der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung diskutiert, gehören <u>humane mesenchymale Stammzellen</u> zu den wichtigsten zu untersuchenden Zellen. Da sie sich in Abhängigkeit vom Spender sehr unterschiedlich verhalten können, sollten Zellkulturen von mehreren Spendern untersucht und die entsprechenden resultate gemittelt werden. Die Auswertung der Experimente mit Zellen mehrerer Spender auf Verbundwerkstoffen aus PDLLA, β-TCP und Calciumcarbonat ergab

jedoch insgesamt nur sehr geringe Aktivitäten (vgl. Abb. 77). Nach drei Tagen waren auf allen Substraten noch Zellaktivitäten nachweisbar; zu den späteren Zeitpunkten fielen diese jedoch stark ab oder waren gar nicht mehr messbar. Sogar die Wellkontrolle verzeichnete einen deutlichen Abfall der Zellaktivität. Bei einem gut verträglichen, zytokompatiblen Werkstoff, sollte die Zellaktivität aufgrund von Zellwachstum ansteigen oder zumindest konstant bleiben.

Da verschiedene Studien an ähnlichen Werkstoffzusammensetzungen bisher keine negativen Auswirkungen *in vitro* auf die Zellen bzw. *in vivo* auf das umliegende Gewebe hatten, war nicht davon auszugehen, dass eine toxische Wirkung der entwickelten Werkstoffe zu der schlechten Zellaktivität geführt hatte [34], [113], [135], [179]. Mögliche Ursachen bestanden in den folgenden Aspekten:

- Stress der Zellen durch Umkultivierung von Zellkulturplastik auf Verbundwerkstoffe,
- veränderter Untergrund durch Prüfkörperquellung,
- veränderte Zusammensetzung des Zellmediums durch Partikelfreisetzung aus dem Prüfkörper,
- Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes, und
- beginnende Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten (materialinduziert).

Da die Zellen für die Aussaat auf den Prüfkörpern aus der Kulturflasche mittels Trypsin gelöst wurden, bedeutete das einen hohen Stress für die empfindlichen hMSCs [4, S. 85], [5, S. 184]. Die anschließende Gewöhnung an den neuen Untergrund bedeutete einen zusätzlichen Stress. Da die Umgewöhnung bei der Wellkontrolle entfiel, erklärte das die höhere Zellaktivität gegenüber den Verbundwerkstoff-Prüfkörpern. Da die Prüfkörper in Flüssigkeit zudem ein Quellverhalten aufwiesen, wurden die Zellen dadurch einer zweiten Umgewöhnung ausgesetzt. Durch die Quellung dehnte sich die Oberfläche aus, so dass die adhärenten Zellen mutmaßlich gestreckt wurden. Mögliche Folgen wären, dass sich absterben. die Zellen entweder lösen oder Da im Rahmen der Degradationsuntersuchungen festgestellt wurde, dass die Prüfkörper in Flüssigkeit Calciumcarbonat freisetzten, wurde die Zusammensetzung des Zellmediums während der Kultivierung leicht verändert. Da hMSCs bereits auf geringe Schwankungen empfindlich reagieren, konnte dies zur schlechten Zellreaktion in Verbindung mit den Verbundwerkstoffen geführt haben [4, S. 85], [5, S. 184]. Eine erhöhte Salzkonzentration im Medium konnte zudem durch die treibende Kraft des Konzentrationsausgleiches in die Zellen aufgenommen worden sein, so dass die Zellen abstarben [171, S. 73]. 52 Wochen nach der Implantation eines Verbundwerkstoffes aus 70 Gew.-% PLLA und 30 Gew.-% Hydroxylapatit in Kaninchen (subkutan) waren die ursprünglichen Implantatabmessungen noch erhalten, jedoch wurde ein Großteil des Hydroxylapatits aus der Oberfläche gelöst [55]. Ein Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes bei der Viabilitätsmessung konnte nach den bisherigen Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass der Farbstoff an sich schon eine zellschädigende Wirkung hatte

[21, S. 55]. Zum anderen konnten die Prüfkörper durch die Quellung auch Farbstoff aufgenommen haben, der bei der Reinigung mit PBS nicht gänzlich ausgespült und bei der weiteren Kultivierung freigesetzt werden konnte. Die fünfte Möglichkeit der <u>beginnenden Differenzierung</u> ist eher unwahrscheinlich, da zum einen der Zeitrahmen von fünf Tagen sehr kurz war und zum anderen die Zellaktivität zwar sinken, aber nicht komplett verloren gehen sollte. Unter Berücksichtigung dieser vier Aspekte war davon auszugehen, dass die geringe Zellaktivität negative Ursachen hatte, so dass die Werkstoff- und Prüfkörpereigenschaften für eine gute Zellreaktion optimiert werden mussten.

Um den Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes zu analysieren, wurden für jeden Zeitpunkt neue Prüfkörper verwendet, so dass die Zellen bei jeder Messung nur einmal angefärbt worden waren (vgl. Abb. 79). Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Zellen auf allen Prüfkörpern und der Kontrolle anstieg oder wenigstens konstant blieb (vgl. Abb. 79b). Als Kontrolle wurden die Prüfkörper vom ersten Messtag weiterverwendet, wobei sich jedoch zeigte, dass die Aktivität deutlich sank (vgl. Abb. 79a). Nur die Wellkontrolle stieg langfristig an. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Farbstoff einen gravierenden Einfluss auf die Zellen hatte. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher für jeden Messtag neue Prüfkörper und nicht wie zu vor durchgehend die gleichen. Die zur Beurteilung der Zellmorphologie und -vitalität durchgeführte Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung und die Immunfluoreszenz-Färbung nach den Viabilitätsmessungen bestätigten, dass auf den durchgehend verwendeten Prüfkörpern kaum Zellen nachgewiesen werden konnten. Da die Zellen für die Immunfluoreszenz-Färbung unmittelbar nach der Viabilitätsmessung fixiert und anschließend gefärbt wurden, waren auf den Prüfkörpern vereinzelt Zellen zu finden (vgl. Abb. 81). Da die Zellen für die Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung erst unmittelbar vor den Mikroskopaufnahmen angefärbt und nicht fixiert wurden, lagen sie länger und starben gänzlich ab. Auslöser dafür war mit ziemlicher Sicherheit der in dem Medium verbliebende Farbstoff, der die Zellen kontinuierlich weiter schädigte. Die am Überstand der durchgeführten Viabilitätsmessung durchgeführte Messung der Zytotoxizität lieferten für die durchgehenden Prüfkörper Werte um 0 % (vgl. Abb. 118 links). Bei den neuen Proben lagen die Werte am zehnten Tag um 10 % (vgl. Abb. 118 rechts). Da jedoch auf den durchgehend verwendeten Proben zuvor nur eine sehr geringe Zellaktivität nachgewiesen werden konnten, war ein deutlich höherer Zytotoxizitätswert zu erwarten (vgl. Abb. 79). Zudem war über die Färbungen nachgewiesen worden, dass sich die Zellen überwiegend von den Prüfkörpern gelöst hatten. Da die bisherigen Untersuchungen zur Zytotoxizität keine verlässlichen Ergebnisse geliefert hatten, werden die Ergebnisse bezüglich durchgehend verwendeter und neuer Proben im Hinblick auf die Zytotoxizität nicht weiter diskutiert.

Einfluss von Strontium auf die Zellviabilität

Die positive Wirkung von Strontium auf den Knochenaufbau wurde bereits nachgewiesen [20], [70], [86], [138], [176] (vgl. Kap. 2.1.3 und 2.2.3). Durch Stimulierung der Osteoblasten und Hemmung der Osteoklasten wird die

Knochenbildung gefördert [22], [98], [132], [176]. Die tiefergehende Diskussion des Einflusses von Strontium auf die Knochenbildung erfolgt im Rahmen der Differenzierungsuntersuchungen. Da während der Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht klar war, welche Rolle die Bindungsstärke des Strontiums bei seiner Wirkung spielte, wurden zunächst Osteoblasten-ähnliche MG63-Zellen in Strontiumchlorid-haltigem Medium kultiviert (vgl. Abb. 72). Der Einfluss des Strontiums auf die Zellaktivität sollte Aufschluss über eine mögliche toxische Wirkung in Abhängigkeit der Dosis geben bzw. einen potentiellen positiven Effekt auf die Zellen zeigen. SrCl₂-Konzentrationen von 0 mg/ml, 0,036 mg/ml (\triangleq 0,23 mM) und 0,36 mg/ml (riangle 2,3 mM) zeigten zwar einen starken Anstieg der Aktivität von MG63-Zellen über den Untersuchungszeitraum, jedoch keine signifikanten Unterschiede. Bei einer Konzentration von 3,6 mg/ml (≙ 23 mM) stieg die Zellaktivität an, jedoch signifikant geringer als die übrigen Konzentrationen. Yang et al. wiesen nach, dass Kultivierung hMSCs in einem 2 mM-Strontiumchlorid-Medium eine von (≙ 0,32 mg/ml) zu einer Differenzierung zu Osteoblasten führte [176]. In Strontiummedium waren 40 % der Zellen ALP-positiv, während der Wert in der Kontrolle bei nur 2 % lag. Im Allgemeinen ist zu erwarten, dass die Zellproliferation zurückgeht oder sogar gestoppt wird, wenn eine Differenzierung einsetzt [52, S. 190]. Dementsprechend waren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der von Yang et al. nicht komplett identisch. Da die Aktivität der Zellen über den gesamten Zeitraum anstieg (vgl. Abb. 72), war eine Differenzierung nicht zu vermuten. Diese hatten Yang et al. eindeutig nachgewiesen. Für eine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren Differenzierungsuntersuchungen an entwickelten Werkstoffen unabdingbar. Unterschiede in den den beiden Untersuchungen war neben den Zelltypen auch der Untersuchungszeitraum. Da es sich bei MG63-Zellen um eine Zelllinie handelt, sind die Zellen unempfindlicher gegenüber äußeren Reizen, so dass auch ein Differenzierungsreiz einen geringeren Einfluss hatte als bei Primärzellen (z. B. hMSCs) [4, S. 85], [5, S. 184], [75, S. 73], [90, S. 59].

Die Integration von Strontiumcarbonat in die Verbundwerkstoffe führte zu einer verringerten Aktivität der Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) gegenüber der Aktivität der Strontium-freien Werkstoffe und der Kontrolle (vgl. Abb. 73). Einerseits könnte das für eine schlechtere Zellverträglichkeit aufgrund des Strontiums sprechen. Andererseits kann dies jedoch auch für eine Differenzierung der Zellen sprechen, zumal der Untersuchungszeitraum auf neun Tage verlängert wurde. In diesem Zeitraum wäre eine Differenzierung der Zellen möglich [27]. Im Gegensatz zur vorangegangenen Untersuchung lag die Aktivität der MG63-Zellen bei der Wiederholung der Messung auf den Werkstoffen (ohne SrCO₃) im Bereich der Kontrolle (vgl. Abb. 73). Die Viabilität von hMSCs ging nach drei Tagen auf allen Prüfkörpern deutlich zurück (vgl. Abb. 78). Nach sieben und zehn Tagen waren nur noch sehr geringe Werte messbar. Eine Abhängigkeit vom Strontiumgehalt zeigte sich dabei nicht. Einzig die Wellkontrolle wies über den Zeitraum eine relativ

konstante Aktivität der hMSCs auf. Wie bei den Untersuchungen an den Strontiumfreien Werkstoffen sollten auch hier für weitere Untersuchungen für jeden Messzeitpunkt neue Prüfkörper verwendet werden. Raucci *et al.* synthetisierten Gele aus Strontium-substituiertem Hydroxylapatit (0-20 Mol.-% statt Calcium) und wiesen auf allen Werkstoffen eine vergleichbare Proliferation von hMSCs über einen Zeitraum von 28 Tagen nach [138]. Das Zellwachstum stieg kontinuierlich an. Zudem wiesen die Werkstoffe keine toxische Wirkung auf. Die Zellen zeigte eine ausgespreizte Form und die Zelladhäsion schien auf den Strontium-haltigen Materialien sogar besser zu sein [138].

Zellviabilität auf PDLLA-basierten SLM-Prüfkörpern

Wie nach den Untersuchungen von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) auf SLM-Prüfkörperm mittels Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung zu vermuten war, war in der Viabilitätsuntersuchung keine Zellaktivität nachweisbar (vgl. Tab. 38, Abb. 74). Die Kontrollen im Well sowie auf warmgepressten Prüfkörpern zeigten dagegen einen kontinuierlichen Anstieg der Zellaktivität. Die beiden Kontrollen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Ein großer Einflussfaktor war die starke degradationsbedingte Verfärbung der Calciumcarbonat-haltigen Prüfkörper. Diese schien eine toxische Wirkung auf die Zellen zu erzielen. Da jedoch auch der weiße Calciumcarbonat-freie Werkstoff keine Zellaktivität aufwies, konnte nicht eindeutig geschlossen werden, dass die Verfärbung der Grund für die schlechten Ergebnisse waren.

Wie bereits im Rahmen der Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung diskutiert, zeigten die SLM-Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% B-TCP durch die Polymeraufschmelzung eine sehr glatte Oberfläche. Dies könnte für die Zelladhäsion hinderlich sein, da keine Ecken oder Kanten zum "Festhalten" für die Zellen vorhanden sind [59, S. 108]. Nie et al. konnten durch die Beschichtung biphasiger Calciumphosphate mit einem Verbundwerkstoff aus Hydroxylapatit und PLLA die Proliferation von humanen Knochenstammzellen signifikant verbessern [127]. Die Prüfkörperoberfläche war durch den Polymeranteil deutlich glatter und es konnte eine stärkere Mineralablagerung auf der Oberfläche nachgewiesen werden [127]. Dies scheint den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zunächst zu widersprechen, jedoch wurde die Oberfläche durch die Mineralablagerungen aufgeraut. Um auch die initiale Zellreaktion zu beeinflussen, wäre eine Aufrauung der Prüfkörper von Vorteil (z. B. durch Sandstrahlen). Durch die Aufrauhung entsteht dann eine Mikrostrukturierung der Oberfläche. In diversen Studien wurde bereits erkannt, dass eine definierte Mikrostrukturierung an der Oberfläche die Zellen gezielt beeinflussen und somit im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung gesteuert werden kann [79], [80], [125].

Die Studien im Rahmen der Degradation hatten gezeigt, dass sich die Calciumcarbonat-haltigen Prüfkörper während der Lagerung in Flüssigkeit bereits nach einigen Minuten entfärbten (vgl. Abb. 67, Abb. 69). Basierend auf diesen Beobachtungen wurden in einer weiteren Untersuchung die SLM-Prüfkörper vor der

Zellaussaat 30 min in demineralisiertem Wasser die gelagert, um Degradationsprodukte auszuspülen. Das bot zudem den Vorteil, dass die Prüfkörper schon "vorquellen" konnten, so dass der Stress für die Zellen nach der Aussaat deutlich geringer war. Den dadurch bedingten positiven Effekt auf das Zellverhalten zeigte die Auswertung der Viabilitätsmessung (vgl. Abb. 75). Über sieben Tage stieg die Aktivität der Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG63) auf allen Substraten an. Am letzten Messtag lagen alle Zellaktivitäten sogar oberhalb der Kontrolle. Zu klären wäre jedoch noch, welches Ausmaß das Ausspülen der Degradationsprodukte auf die Werkstoffzusammensetzung hatte. Im Hinblick auf die spätere Zulassung als SLM-Implantat ist das Vorgehen jedoch als sehr kritisch anzusehen, da die Entfernung schädlicher Substanzen aus dem Scaffold bei der Implantation nicht garantiert werden kann.

Im Hinblick auf eine bessere Zellaktivität bzw. eine Reduktion der negativen Einflüsse wurde auch für die SLM-Prüfkörper eine Studie durchgeführt, in der für jeden Zeitpunkt neue bzw. durchgehend die gleichen Prüfkörper verwendet wurden (vgl. Abb. 76). Da auf den SLM-Prüfkörpern bereits die eher unempfindlichen MG63-Zellen keine hohe Aktivität zeigten, wurde die Studie mit diesem Zelltyp durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zellen auf den warmgepressten Prüfkörpern für alle Werkstoffe eine ansteigende Aktivität aufwiesen. Am siebten Tag stiegen die Aktivitäten sogar über die Aktivität der Zellen auf der Wellkontrolle. Die SLM-Prüfkörper zeigten dagegen durchgehend eine sehr geringe Zellaktivität. Einzig die SLM-Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% B-TCP zeigten eine ansteigende Aktivität, die jedoch unterhalb der Kontrolle sowie den warmgepressten Prüfkörpern lag. Bei Verwendung neuer Prüfkörper wiesen die gemessenen Zellaktivitäten auf den warmgepressten Prüfkörpern sowie der Kontrolle deutlich höhere Werte auf, so dass davon auszugehen war, dass der Farbstoff einen großen Einfluss auf das Zellverhalten hatte. Dabei zeigte sich keine Tendenz in Abhängigkeit der Werkstoffzusammensetzung. Die SLM-Prüfkörper zeigten eine eindeutige Abhängigkeit von der Werkstoffzusammensetzung. Die beiden Werkstoffe aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) sowie 60 Gew.-% PDLLA, 30 Gew.-% β-TCP und 10 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) wiesen nahezu keine Zellaktivität auf. Auf dem Calciumcarbonatfreien Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP zeigten die MG63-Zellen eine deutlich ansteigende Zellaktivität, die sich nach fünf Tagen in dem Bereich der warmgepressten Prüfkörper annäherte. Nach sieben Tagen fiel die Aktivität zwar ab, wies aber eine hohe Standardabweichung auf. Ein geringer Anteil von 5 Gew.-% Calciumcarbonat (sphärolithisch) führte bei Verwendung neuer Prüfkörper nun auch zu einer ansteigenden Zellaktivität. Diese lag jedoch unterhalb der Calciumcarbonat-freien Variante der SLM-Prüfkörper. Der Hauptgrund für diese Tendenz in der Zellaktivität in Abhängigkeit der Werkstoffzusammensetzung war die Quellung der Prüfkörper, die durch den wachsenden Degradationsgrad mit steigendem Calciumcarbonat-Gehalt stimuliert wurde. Da die Porosität durch die

degradationsbedingte Gasbildung zunahm, wurde das freie Volumen in den Prüfkörpern erhöht. Dadurch konnte eine größere Menge an Flüssigkeit in den Prüfkörper aufgenommen werden.

Zellviabilität auf PLLA-basierten SLM-Prüfkörpern

Da die PDLLA-Werkstoffe in den vorangegangenen Studien keine vielversprechenden Ergebnisse geliefert hatten und speziell im Laserschmelzprozess gravierende Probleme bereiteten, wurde PDLLA gegen PLLA ausgetauscht. Im Rahmen der Viabilitätsuntersuchungen wurden verschiedene Energiedichten der Laserstrahlung verglichen, um den Einfluss der degradationsbedingten Verfärbung der Prüfkörper auf das Zellverhalten zu analysieren. Dabei zeigten Osteoblasten-ähnliche M-G63-Zellen bei allen Energiedichten eine Zellaktivität im Bereich der Kontrolle (vgl. Abb. 83). Zwar fiel die Zellaktivität mit dem Verfärbungsgrad ab, doch zeigten sogar die stark verfärbten Prüfkörper eine deutlich höhere Zellaktivität als die zuvor untersuchten Calciumcarbonat-haltigen PDLLA-Werkstoffe. Der in der Untersuchung des PLLA-Werkstoffes als Kontrolle mitgeführte Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Zellaktivität gegenüber der Wellkontrolle bzw. des PLLA-Werkstoffes. Zu beachten war jedoch, dass der PLLA-Werkstoff einen Polymergehalt von 79 Gew.-% aufwies, wohingegen die PDLLA-Werkstoffe einen Anteil von 60 Gew.-% aufwiesen. Das reine PDLLA hatte im Vergleich zu dem gefüllten Polymer eine geringere Quellung in Wasser gezeigt, so dass die Prüfkörper eine höhere Stabilität aufwiesen. Grund dafür war, dass sich bei dem gefüllten Polymer die Oberfläche durch Herauslösen einzelner Partikel vergrößert und die Flüssigkeitsaufnahme erleichtert wird. Dieses Phänomen war auch bei PLLA zu erwarten. Da in den Untersuchungen der Füllstoff-Anteil im Werkstoff geringer war als bei den PDLLA-Werkstoffen, war eine deutlich geringere Quellung zu erwarten. Zudem hatte sich in den Degradationsstudien gezeigt, dass PLLA generell eine geringere Quellung als PDLLA und somit auch eine höhere Festigkeit aufwies. Durch die sehr geringe Quellung wurde die Zelladhäsion kaum beeinflusst, so dass den Zellen ein zusätzlicher Stress erspart wurde. Der Vergleich der PLLA- und PDLLA-basierten SLM-Prüfkörper zeigte, dass PDLLA bereits durch den Laserschmelzprozess eine leichte Volumenvergrößerung aufwies (vgl. Abb. 82). Zudem sinterte das angrenzende Pulver an die Prüfkörper an. Bei den PLLA-Prüfkörpern gab es diese Probleme nicht, so dass die Formtreue erhalten blieb.

Interessanterweise stieg die Aktivität von Stammzellen mit steigender Energiedichte und somit mit der Zunahme der degradationsbedingten Verfärbung - an (vgl. Abb. 84). Tendenziell stiegen alle Aktivitäten mit der Zeit an oder blieben konstant. Die Werte lagen jedoch alle unterhalb der Wellkontrolle. Bei Verwendung neuer Prüfkörper für jeden Zeitpunkt stiegen die Aktivitäten bis zum fünften Tag stärker an, jedoch fielen sie am siebten Tag stark ab. Da es sich jedoch um Versuche mit Zellen von nur einem Spender handelte, konnten die Ergebnisse nicht eindeutig interpretiert werden. Es müssten zusätzlich Versuche mit Zellen von mindestens zwei weiteren Spendern analysiert werden. Es lässt sich jedoch sagen, dass auch bei den PLLA- Werkstoffen ein Einfluss durch den Fluoreszenzfarbstoff zu vermerken war. Daher sollten für jeden Zeitpunkt neue Prüfkörper verwendet werden.

5.3.2 Differenzierung zu Osteoblasten

Bereits bei der Hämalaun-Färbung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) auf dem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat zeigte sich, dass die Prüfkörper einerseits stark aufquollen, so dass eine scharfe Aufnahme der Oberfläche sowie der Zellen schwierig war (vgl. Abb. 85). Andererseits nahmen sie einen Teil des Farbstoffes auf, so dass neben den Zellen auch die Prüfkörper angefärbt waren. Die Zellmorphologie war dadurch nur schwer zu beurteilen, da die Konturen nicht eindeutig zuzuweisen waren. Auf den Glasronden dagegen waren die Zellen eindeutig identifizierbar. Durch die Immunfluoreszenz-Färbung konnten die Zellen dagegen deutlicher visualisiert werden, da der Farbstoff keine Fluoreszenz des Substrates bewirkte und daher nur die Zelle fluoreszierte (vgl. Abb. 86). Die Zellen wiesen eine ausgespreizte Morphologie auf, was für ein sehr gutes Zellbefinden sprach [116, S. 38]. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Werkstoffen aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat bzw. 60 Gew.-% PDLLA und 40 Gew.-% β-TCP. Auch die Färbung der sehr empfindlichen humanen Stammzellen auf den gleichen Werkstoffen zeigte ein vergleichbares Ergebnis (vgl. Abb. 87). Obwohl die Prüfkörper mit der Zeit guollen, führte der veränderte Untergrund während dieser Kultivierung nicht zu einem Absterben der Zellen.

Da die etablierten Methoden zur Visualisierung der Calciumphosphat-Ablagerungen infolge osteogener Differenzierung auf dem Nachweis von Calcium basieren [141, S. 229], waren sie für die Untersuchungen auf Calcium-haltigen Substraten ungeeignet. Daher mussten alternative Analysemethoden etabliert werden.

Die bisherigen Untersuchungen (mit Ausnahme einer Immunfluoreszenz-Färbung) wurden anhand Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) durchgeführt. Da es sich um eine bereits quasi ausgereifte Zelllinie handelt, war eine weitere Differenzierung unwahrscheinlich [77, S. 33]. Bei humanen mesenchymalen Stammzellen handelt es sich um Primärzellen, die daher leichter differenzierbar sind [4, S. 85], [5, S. 184]. Da sie jedoch für die Testung der Werkstoffe als geeignete Implantatmaterialien relevanter waren, wurden die weiteren Versuche ausschließlich mit hMSCs durchgeführt. Der Differenzierung der Zellen wurde am Rasterelektronenmikroskop untersucht. Durch die Elementanalysen der Prüfkörperoberflächen konnte zwar auf reinem PDLLA Calcium und Phosphor nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf differenzierungsbedingte Calciumphosphat-Ablagerungen sein kann [141, S. 229] (vgl. Abb. 88). Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese nicht durch Ablagerung aus dem Zellmedium verursacht worden waren. Der direkte Vergleich der Prüfkörper aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat mit bzw. ohne Zellen zeigte weder einen Unterschied in der Farbintensität noch in der Verteilung, so dass anhand dieser Aufnahmen nicht auf
Differenzierung geschlossen werden konnte. Da die Methoden eine zur Visualisierung der Calciumphosphat-Ablagerungen erschöpft waren, wurde auf quantitative Methoden zurückgegriffen. Kritisch war dabei, dass die Messergebnisse visuell nicht überprüft werden konnten. In den durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität (ALP) konnte keine Differenzierung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 90-93). Verglichen mit "Tag 0", der als Ausgangswert galt, zeigte sich bei keinem der untersuchten Werkstoffe eine gesteigerte Aktivität. In der dritten Messung war eine geringe Tendenz zu gesteigerten zu erkennen (vgl. Abb. 92). Bei einer tatsächlich stattgefundenen Differenzierung sollten die Werte aber sprunghafter ansteigen. Die Aktivität auf der Kontrolle lag in den drei Untersuchungen deutlich unterhalb der Werkstoff-Werte. Da jedoch davon auszugehen war, dass an "Tag 0" noch keine Differenzierung stattgefunden haben kann, galt dieser als Minimum der ALP-Aktivität. Daher waren Werte unterhalb der Ausgangswerte als Messungenauigkeit zu werten. Auch die Strontium-haltigen Verbundwerkstoffe zeigten keinen Einfluss auf die ALP-Aktivität. Die Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich Strontium erfolgt übersichtshalber erst am Ende des Kapitels. Lee et al. verglichen die ALP-Expression von murinen Präosteoblasten auf reinem PLLA sowie auf einem PLLA/β-TCP-Verbundwerkstoff [96]. Die Expression konnte durch die Einbringung der keramischen Komponente deutlich erhöht werden. Ebenso stieg die Expression von Osteocalcin. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Kim et al. [88]. Die ALP-Expression von MG-63-Zellen auf einem Werkstoff aus 75 Gew.-% PDLLA und 25 Gew.-% Hydroxylapatit war im Vergleich zu dem reinen Polymer etwa viermal höher.

Unter Verwendung des Osteolmage-Kits wurde eine Methode gefunden, die die Differenzierung spezifisch durch die Detektion von Hydroxylapatit gualitativ und quantitativ nachweist. Kersten-Thiele hat anhand dieser Methode die Differenzierung von USSC (Nabelschnurblutstammzellen) bei verschiedenen Differenzierungszusätzen nachgewiesen [87]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Zellen auf den Substraten ohne Differenzierungszusätze keine Anzeichen für eine stattgefundene Differenzierung (vgl. Abb. 94). Mit Induktionsmedium stiegen die Werte auf den Werkstoffen stark an, auf der Kontrolle war dagegen keine Intensität messbar. Auf dem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) war die Intensität etwa doppelt so hoch wie auf dem Calciumcarbonat-freien Werkstoff, was dafür spricht, dass das Calciumcarbonat die Differenzierung zu stimulieren scheint. Im Vergleich mit den Fluoreszenzaufnahmen zum gualitativen Nachweis war kein eindeutiger Zusammenhang ersichtlich (vgl. Abb. 93). Während die beiden Werkstoff, auf denen die Zellen ohne Induktionszusätze kultiviert worden waren, fluoreszierende Bereiche aufwiesen, zeigte der dreikomponentige Werkstoff, der in der quantitativen Analyse den höchsten Wert lieferte, nur sporadisch fluoreszierende Partikel. Der Calciumcarbonat-freie Werkstoff mit Induktion zeigte ähnliche Ergebnisse wie ohne Induktion. Auf der Glaskontrolle ohne Induktion waren - wie erwartet - nur Zellkerne zu sehen, da das Glas weder

Calciumphosphat enthält, noch ein Differenzierungsstimulus induziert worden war. Auf der Glaskontrolle mit Induktion waren weder Zellen noch Hydroxylapatit-Ablagerungen nachweisbar. Die Messungen bzw. Aufnahmen wurden anhand von jeweils drei Proben durchgeführt, die keine signifikanten Unterschiede lieferten. Nach diesen Untersuchungen bestand der Verdacht, dass nicht nur Hydroxylapatit, sondern auch β-TCP durch das Kit beeinflusst wurde. Daher wurden Hydroxylapatitund β-TCP-Prüfkörper ohne Zellbesiedelung der gleichen Färbung unterzogen (vgl. Abb. 93). Dabei zeigte sich, dass Hydroxylapatit zwar eine vierfach höhere Messintensität verursachte, β-TCP jedoch nicht zu vernachlässigen war. Die direkte Messung der Prüfkörper in reinem Waschpuffer ohne zusätzliche Färbung ergab keine Messintensitäten. Nach den ersten Erkenntnissen scheint also auch β-TCP auf den Farbstoff zu reagieren. Zwar war der Effekt deutlich geringer als bei Hydroxylapatit, aber im Rahmen der Versuche der vorliegenden Arbeit konnte dies zu verfälschten Ergebnissen geführt haben. Zu beachten war, dass die Untersuchungen anhand von Zellen nur eines Spenders durchgeführt wurden. Um die Spendervarianz zu berücksichtigen, sollten die Versuche mindestens mit Zellen von zwei weiteren Spendern durchgeführt werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Ein Untersuchungszeitraum über 21 Tage sollte beibehalten werden, da verschiedene Studien gezeigt hatten, dass bereits nach fünf bis sieben Tagen ein Anstieg osteogener Marker nachzuweisen war. Zwischen dem 14. und 21. Tag war die Differenzierung jedoch am stärksten [83], [168]. Erstrebenswert bei der Wahl der Werkstoffzusammensetzung ist zudem ein möglichst hoher Keramikanteil im Polymer. Lee et al. wiesen durch die Einbringung von Calciumphosphat in eine PLLA-Matrix eine stärkere Expression osteogener Marker auf als bei dem reinen Polymer [96]. Insbesondere Calciumphosphat scheint gegenüber Calciumcarbonat förderlich für die Zelldifferenzierung zu sein. Beim Vergleich verschiedener Keramiken als Substratmaterial zeigten Rattenstammzellen in vitro eine höhere COL1- und Runx2-Aktivität auf β-TCP und Hydroxylapatit als auf Calciumcarbonat [71]. Aus diesem Grund ist ein möglichst hoher Calciumphosphat-Anteil im Verbundwerkstoff erstrebenswert.

Um einen zusätzlichen Differenzierungsstimulus zu erzeugen, wurden Strontiumhaltige Komponenten in den Werkstoff eingebracht. Im Rahmen der Untersuchungen konnte kein positiver Effekt durch Strontium auf die Zelleigenschaften nachgewiesen werden. Im Vergleich mit anderen Studien wäre jedoch eine Wirkung im Hinblick auf die Knochenzellen zu erwarten gewesen. Kaygili *et al.* wiesen nach, dass Strontiumsubstituierter Hydroxylapatit mit Strontium-Anteilen von 0,45 bis 2,25 Atom-% zu einer erhöhten Osteogenese gegenüber den Kontrollen führte [86]. Zwischen den Konzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch war der Anteil an Strontium insgesamt sehr gering. Bei höheren Konzentrationen würde sich vermutlich eine stärkere Wirkung zeigen. Zu diesem Ergebnis kamen Boanini *et al.* [20]. Sie untersuchten Hydroxylapatit mit 5 und 10 At.-% Strontium und wiesen mit steigendem Strontiumanteil eine sinkende Osteoklastenaktivität nach. Die Osteoblasten-spezifischen Marker *ALP* und *COL1* stiegen dagegen an. Raucci *et al.* wiesen bei Anteilen bis zu 20 Mol-% Strontium anstelle von Calcium in Hydroxylapatit eine gesteigerte ALP-Aktivität gegenüber der Kontrolle nach [138]. Eine *In-Vivo*-Untersuchung an Ratten ergab bereits bei einem reinen Hydroxylapatit-Implantat eine dreifach stärkere Knochenneubildung im Vergleich zur Kontrolle [176]. Die Verwendung von Strontium-Hydroxylapatit, bei dem das Calcium gänzlich durch Strontium substituiert wurde, führte in dieser Studie zu einer zwölffach stärkeren Knochenneubildung in Bezug auf die Kontrolle. Es ist zu erwarten, dass die in der vorliegenden Arbeit ausgebliebene Wirkung von Strontium durch stärkere Effekte (z. B. Matrixquellung, Partikelfreisetzung) überlagert wurde.

Da Strontium eine vielversprechende Möglichkeit ist, die Knochenneubildung zu fördern und somit die Defektheilung zu beschleunigen, sollten im Nachgang weitere Versuche zu Strontium-haltigen Polylactid-basierten Werkstoffen durchgeführt werden.

5.3.3 Resorptionsuntersuchungen

Da Polylactid unter der Bildung von Milchsäure abgebaut wird, fällt der pH-Wert lokal ab. Daher wurde der pH-Wert während der Kultivierung von RAW-Makrophagen bzw. der Differenzierung zu Osteoklasten zur Kontrolle des Degradationsfortschrittes gemessen (vgl. Abb. 95). Dies war jedoch nicht zielführend. Da die Zellen nicht luftdicht verschlossen kultiviert werden konnten, konnte ein Austausch mit der Umgebungsluft nicht verhindert werden. Zudem waren die Zellen einer CO₂-Atmosphäre von 5 % ausgesetzt. Daher wurde der pH-Wert durch verschiedene Aspekte beeinflusst, so dass die Kontrolle des pH-Wertes während der Kultivierung sehr schwierig war und keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Werkstoffabbau geschlossen werden konnten. Die pH-Werte aller Proben fielen über die untersuchten zehn Tage ab (vgl. Abb. 95). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Zugabe von Differenzierungsfaktoren und der Kultivierung ohne zusätzlichen Stimulus. Einzig die Kontrolle auf den Glasronden ohne Differenzierungszusätze wies keinen pH-Wert-Abfall auf. Die naheliegende Schlussfolgerung wäre, dass die Differenzierungsfaktoren eine Differenzierung der der RAW-Zellen zu Osteoklasten induziert hatten. Durch den aktiven Abbau des Werkstoffes durch die Osteoklasten sank dann der pH-Wert. Zudem schien auch, der Werkstoff an sich (ohne Zusätze) einen Einfluss zu auf die Differenzierung zu haben. Um sicherzustellen, dass diese Schlussfolgerung nicht falsch ist, mussten weitere Aspekte betrachtet werden. Neben dem Polymerabbau konnte der pH-Wert-Abfall auch durch eine Kontamination oder eine Überwachsung der Kultur sowie verstärkten Zelltod verursacht worden sein. Heidemann et al. untersuchten den pH-Wert in der Umgebung eines reinen PDLLA-Implantates in vivo an Ratten [73]. Innerhalb der ersten acht Wochen zeigte sich kein deutlicher Abfall des Wertes. Zum einen wirkten zusätzlich die Einflüsse des tierischen Organismus, zum anderen ist der Zeitraum für einen Implantatabbau sehr kurz. In der vorliegenden Arbeit wurden

aktiv Makrophagen auf den Prüfkörpern ausgesät, so dass der Implantatabbau gegenüber einer *In-Vivo*-Anwendung vermutlich deutlich beschleunigt war.

Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurden in einer weiteren Untersuchung RAW-Makrophagen ohne Zusätze auf einem Werkstoff kultiviert (vgl. Abb. 96, Abb. 97). Zusätzlich zur Messung des pH-Werte wurden Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskop gemacht, um den Zustand der Zellen zu beurteilen. Auf der Glaskontrolle waren die Zellen zwar untereinander vernetzt, aber über eine größere Fläche verteilt als die Zellen auf dem Werkstoff. Auf dem Werkstoff waren die Zellen sehr dicht aneinander gelagert. Aufgrund der Werkstoffzusammensetzung und der Morphologie war nicht zu beurteilen, ob die Makrophagen einen Teil des Materials resorbiert und Resorptionslakunen gebildet hatten. Die untersuchten Glasronden waren nicht resorbierbar, so dass auf diesem Substrat keine Lakunen zu erwarten waren. Der pH-Wert des Kontrollmediums war über 14 Tage konstant. Dagegen fielen die pH-Werte der Kulturmedien der Zellen auf dem Wellboden, der Glasronde und dem Werkstoff von eingangs 8,5 auf 7,2 ab (vgl. Abb. 97). Die Werte lagen nach wie vor im neutralen Bereich. Ein Zusammenhang zwischen Polymerabbau und Reduktion des pH-Wertes konnte nach dieser Untersuchung ausgeschlossen werden, da die pH-Wert-Entwicklung auf allen Substarten vergleichbar war. Demnach konnte nicht der Polymerabbau für den reduzierten pH-Wert verantwortlich gewesen sein. Da die Resorption der Verbundwerkstoffe nicht anhand der pH-Wert-Entwicklung beurteilt werden konnte, wurde der Werkstoffabbau über die gebildeten Osteoklasten nachgewiesen. Anhand der TRAP-Färbung konnten auf den Glasronden vereinzelte Osteoklasten nachgewiesen werden (vgl.Abb. 98). Dabei war jedoch kein Unterschied zwischen dem Tag der Faktorenzugabe (Tag 0) und dem 14. Tag nach der Faktorenzugabe zu erkennen. Vorversuche hatten gezeigt, dass die TRAP-Färbung auf den PDLLA-Werkstoffen aufgrund der Prüfkörperquellung und der -anfärbung schwierig war. Jones et al. untersuchten Osteoklasten und Osteoklasten/Osteoblasten-K5okulturen auf PLLA [85]. Sie verwendeten dafür murine Osteoblasten-ähnliche Zellen sowie murine Monozyten. Sie kamen zu der Erkenntnis, dass PLLA im Hinblick auf Adhäsion und Differenzierung zu Osteoklasten nicht das beste Material zu sein scheint [85]. Die TRAP-Aktivität als Nachweis von Osteoklasten war auf dem PLLA-Substrat im Gegensatz zu den Kontrollwerkstoffen sehr gering. Zudem zeigten sie, dass das Material mitangefärbt wurde, wie es sich auch in den Untersuchungen im Rahmen der Zelldifferenzierung gezeigt hatte. Jones et al. verwendeten PLLA-Filme, während im Rahmen der vorliegenden Arbeit PDLLA benutzt wurde. Da aus den durchgeführten Versuchen hervorging, dass das Quellverhalten von PDLLA gegenüber PLLA deutlich ausgeprägter war, kann davon ausgegangen werden, dass die Adhäsion und auch die Differenzierung auf PDLLA zusätzlich erschwert wurde. Dass in vivo dennoch Resorptionsaktivitäten ablaufen, zeigten Heidemann et al. [72]. Sie untersuchten reines PDLLA sowie zwei Verbundwerkstoffe aus 24,1 Gew.-% PDLLA und 75,9 Gew.-% β-TCP bzw. 95,4 Gew.-% PDLLA und 4,6 Gew.-%

Calciumhydrogenphosphat *in vivo* in Ratten. Dabei zeigte sich, dass sich nach sechs Wochen sowohl um die Implantate aus reinem PDLLA als auch um die Implantate aus den beiden Verbundwerkstoffen fibröses Gewebe gebildet hatte. Um alle Implantate war innerhalb von bis zu 32 Wochen eine erhöhte Anzahl an Makrophagen nachzuweisen. Um die Verbundwerkstoffe war zudem eine hohe Anzahl an Riesenzellen vorhanden [72]. Aufgrund der zellulären Aktivität wird die Degradation *in vivo* gegenüber der *In-Vitro*-Degradation - wie sie z. B. in den Degradationsuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden - beschleunigt. Dies zeigten auch Daculsi *et al.* bei der Untersuchung von P(L96/4D-Lactid), sowie von zwei Verbundwerkstoffen aus P(L96/4D-Lactid) mit β-TCP-Anteilen von 10 bzw. 24 Gew.-%. β-TCP [34].

Immunfluoreszenz-Färbung zur Kenntlichmachung Die der Aktinringe der Osteoklasten zeigte keine unterschiedlichen Zellen, die neben RAW-Zellen auf Osteoklasten hinwiesen (vgl. Abb. 99). Daher war davon auszugehen, dass die Differenzierung der RAW-Zellen zu Osteoklasten nicht erfolgreich war und eine Anpassung und Optimierung des Protokolls nötig ist. In anderen Studien war die Differenzierung erfolgreich [31, S. 162], [45]. Bei einer ausgiebigen Literaturrecherche hatte sich gezeigt, dass zur RAW-Differenzierung sehr unterschiedliche teils widersprüchliche - Protokolle etabliert wurden [41], [45], [152], [31, S. 162]. Sie unterscheiden sich z. B. in der ausgesäten Zelldichte, der Faktorenkonzentration und der Kultivierungsdauer. Ein Grund für die ausbleibende Differenzierung konnte die Passage der Zellen sein [31, S. 162], [152]. Da RAW-Zellen bereits weit differenzierte Zellen sind, ist es im Allgemeinen schwierig, sie noch weiter zu differenzieren [75, S. 73], [90, S. 59]. Demnach wäre die Verwendung von Primärzellen eine sinnvolle Alternative. Möglich wäre die Gewinnung von Monozyten aus humanem BuffyCoat oder aus murinem Femur [7], [39]. Eine sinnvolle Untersuchungsmethode wäre letztlich eine Analyse der Genexpression mittels qualitativer Realtime-PCR.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger Verbundwerkstoff aus Polylactid (PDLLA bzw. PLLA), β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und verschiedenen Calciumcarbonat-Varianten im Hinblick auf den Knochenersatz erforscht Wichtige zu untersuchende Eigenschaften der Verbundwerkstoffe waren die Festigkeit, die Zellverträglichkeit und die Degradationskinetik.

Aufbereitet wurden die Verbundwerkstoffe über einen Mahlprozess. Die Zielgröße der Pulverpartikel lag bei einem d90-Wert von maximal 100 μ m. Dies wurde über die Mahldauer eingestellt. Neben den Korngrößenanalysen wurden die hergestellten Werkstoffe auf Reinheit, prozessbedingten Polymerabbau und Elementverteilung hin untersucht. Für die weitere Charakterisierung wurden warmgepresste Prüfkörper hergestellt, die ebenso hinsichtlich Polymerabbau und Elementverteilung untersucht wurden. Für die mechanischen Untersuchungen spielten zudem die Mikrostruktur und die Porosität eine entscheidende Rolle. Die Aufbereitung erfolgte mit einer Stahlmühle, da PLLA-basierte Verbundwerkstoffe nicht über den Mahlprozess aufbereitet werden konnten. Aufgrund von Stahlabrieb der Mühle durch die β -TCP-Komponente konnten nur Werkstoffe aus PLLA und Calciumcarbonat über diese alternative Prozessschiene aufbereitet werden.

Die warmgepressten PDLLA-basierten Prüfkörper wiesen eine Biegefestigkeit von bis zu 90 MPa auf. Dabei stieg die Festigkeit mit steigendem β-TCP-Anteil. Grund dafür war die Partikelgröße der beiden Füllstoffe. Während β-TCP nach dem Mahlprozess eine Partikelgröße von etwa 5 µm hatte, wies das Calciumcarbonat eine deutlich geringere Partikelgröße auf. Im Fall der rhomboedrisch feinen Variante betrug die Partikelgröße nur etwa ein Zehntel der
ß-TCP-Partikel. Durch seine Feinheit veränderte Calciumcarbonat die Grundeigenschaften der Polymermatrix und führte zu einer Versprödung. Da das Calciumcarbonat zur Pufferung des aciden Abbaus des Polylactids eingesetzt wurde, wurde die Wirkung unterschiedlicher Geometrien Calciumcarbonat-Partikel auf die Pufferfähigkeit hin der untersucht. Degradationsuntersuchungen in PBS bei erhöhter Temperatur zur Beschleunigung des Polymerabbaus zeigten, dass die beiden rhomboedrischen und die nadelförmige Varianten des Calciumcarbonats am längsten im physiologischen Bereich pufferten. Aufgrund der langen Degradationszeiten (> 1 Jahr) waren Untersuchungen bezüglich pH-Wert und molarer Masse nicht zielführend. Daher wurde die degradationsbedingte Abnahme der Biegefestigkeit nach Lagerung in Wasser und Phosphat-Puffer (PBS) bei 37 °C analysiert, um dadurch eine Aussage über strukturelle Veränderungen der Prüfkörper zu treffen. Dabei zeigte sich, dass die Prüfkörper durch Flüssigkeitsaufnahme eine extrem starke Matrixquellung aufwiesen. Die Lagerung in PBS führte zu einer Prüfkörperquellung von bis zu 60 Vol.-%. Durch eine Reduktion des Calciumcarbonat-Anteils konnte die Quellung zwar verringert, aber nicht komplett verhindert werden. Auch die Prüfkörper, die mit dem Laserschmelzprozess (SLM) hergestellt worden waren, zeigten ein ausgeprägtes

Quellverhalten. Zudem offenbarte sich, dass die Polymerdegradation bei Anwesenheit von Calciumcarbonat im SLM-Prozess stark beschleunigt wurde, so dass die Prüfkörper mit steigendem Calciumcarbonat-Anteil eine zunehmende Verkohlung aufwiesen. Die wiederum führte aufgrund der degradationsbedingten Gasbildung zu einer hohen Porosität der Prüfkörper, die ebenso wie die Matrixquellung eine Reduktion der Biegefestigkeit verursachten. Aus dem Verbundwerkstoff aus PLLA und Calciumcarbonat konnten dagegen verkohlungsfreie SLM-Prüfkörper hergestellt werden. Zudem trat während einer achtwöchigen Lagerungszeit in PBS nahezu keine Quellung auf.

Die zellbiologischen Untersuchungen mit L-929-Mausfibroblasten, Osteoblastenähnlichen (MG63) und Osteoklasten-ähnlichen (RAW 264.7) Zellen an den PDLLAbasierten Werkstoffen zeigten zunächst vielversprechende Resultate im Hinblick auf eine gute Zellverträglichkeit. Die Vitalität aller Zelltypen lag auf den untersuchen Werkstoffen deutlich über 90 %. Die Viabilitätsuntersuchungen zeigten Zellaktivitäten im Bereich der Positivkontrolle (Zellkulturplastik). Die für eine spätere In-Vivo-Anwendung besonders relevanten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) zeigten jedoch auf den warmgepressten Prüfkörpern eine sehr geringe, auf den SLM-Prüfkörpern keine Zellaktivität. Auf dem Verbundwerkstoff aus PLLA und Calciumcarbonat zeigten sich im Gegensatz zu den PDLLA-basierten Werkstoffen auch mit hMSCs vielversprechende Resultate. Um die Eignung des PLLA-Calciumcarbonat-Verbundwerkstoffes als Knochenersatzwerkstoff nachzuweisen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Dazu gehören neben Viabilitätsanalysen mit hMSCs verschiedener Spender auch Differenzierungs- und Resorptionsuntersuchungen. Insbesondere aufgrund der langen Degradationszeiten von mehreren Jahren sind längerfristige Untersuchungen notwendig.

Im Hinblick auf eine optimale Zellreaktion in vivo sowie eine Verbesserung der Einheilung sind verschiedene Prozessanpassungen möglich. Durch Anpassung der Werkstoffzusammensetzung könnte neben der Degradationsrate auch eine gezielte Zellreaktion hervorgerufen werden. Insbesondere im Hinblick auf osteokonduktive Eigenschaften könnte die Einbringungen von Calciumphosphat in den PLLA-Calciumcarbonat-Verbundwerkstoff eine stimulierende Funktion erfüllen. Im Weiteren bietet eine gezielte Einstellung der Porengeometrie der Implantate eine zusätzliche Möglichkeit, die Zellreaktion zu optimieren. Um die Verwendbarkeit der Werkstoffe sind Knochenersatzmaterial abzusichern, schließlich tierexperimentelle als Untersuchungen notwendig. Bei einer nachgewiesenen Eignung als Implantatwerkstoff bietet die generative Fertigung von Knochenersatzstrukturen mittels SLM-Prozess die Möglichkeit, patientenspezifische Implantate herzustellen, die gezielt an Knochendefekte angepasst werden können und die aufgrund des verwendeten Verbundwerkstoffes Potential für eine verbesserte Einheilung und Regenerierung besitzen.

7 Literaturverzeichnis

Textquellen

- [1] Abert J, Amella A, Weigelt S, Fischer H (2016) Degradation and swelling issues of poly-(D,L-ladide)/β-tricalcium phosphate/calcium carbonate composites for bone replacement. J Mech Behav Biomed Mater 54:82-92.
- [2] Abert J, Bergmann C, Fischer H (2014). Wet chemical synthesis of strontiumsubstituted hydroxyapatite and its influence on the mechanical and biological properties. Cer Int 40:9195-9203.
- [3] Abou Neel E, Salin V (2012). Viscoelastic and biological performance of low-modulus, reactive calcium phosphate-filled, degradable, polymeric bone adhesives. Acta Biomater 8:313-320.
- [4] Aicher W, Fritz J, Kötter I (2013). Bioartifizieller Gewebeersatz Tissue Engineering. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.). Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [5] Alberts B, Bray D, Lewis J (et al.) (1995). Molekularbiologie der Zelle. 3. Aufl.; Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
- [6] Alberts B, Johnson A, Lewis J (et al.) (2011). Molekularbiologie der Zelle. Bd. 5, Weinheim: John Wiley & Sons.
- [7] Amano S, Sekine K, Bonewald L (2009). A novel osteoclast precursor cell line, 4B12, recapitulates the features of primary osteoclast differentiation and function: enhanced transfection efficiency before and after differentiation. J Cell Physiol 221:40-53.
- [8] Amella A (2014). Analyse der degradationsbedingten Festigkeitsabnahme eines Verbundwerkstoffes aus Poly(D,L-Lactid), β-Tricalciumphosphat und Calciumcarbonat in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerungszeiten in Wasser. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen: Bachelorarbeit.
- [9] Ara M, Watanabe M, Imai Y (2002). Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation pf poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid). Biomaterials 23:2479-2483.
- [10] Auras R, Lim L-T, Selke S (et al.) (2010). Poly(lactic acid) Synthesis, structures, properties, processing, and application. Weinheim: John Wiley & Sons.
- [11] Backhaus S, Annen T, Epple M (2013). A porous pH-stabilized composite material consisting of poly(D,L-lactide), calcium carbonate and gentamicin for bone substitution. Materwiss Werksttech 44:107-111.
- [12] Barradas A, Fernandes H, Groen N (2012). A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Biomaterials 33:3205-3215.
- [13] Bartl R (2010). Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. 4. Aufl., Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [14] Beiss P (2013). Pulvermetallurgische Fertigungstechnik. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- [15] Beneke H (2000). Lexikon der Korrosion und des Korrosionsschutzes. 2. Aufl., Essen: Vulkan-Verlag.
- [16] Berg van den F (2011). Angewandte Physiologie Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen. Zell am Moos, Österreich: Band 1, 3. Auflage, Thieme-Verlag.
- [17] Bergmann C (2014). Modifikationen calciumphosphatbasierter Knochenersatzwerkstoffe hinsichtlich biologischer Aspekte sowie prozessbedingter Anforderungen verschiedener generativer Fertigungsverfahren. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

[18]	Bernoulli C (1834). Elementarisches Handbuch der industriellen Physik, Mechanik und Hydraulik. Bd. 1, Stuttgart-Tübingen: J. G. Cottasche Buchhandlung.
[19]	Bigi O F E (1997). Isomorphous Substitutions in β -Tricalcium Phosphate : The Different Effects of Zinc and Strontium. Journal of Inorganic Biochemistry 66:259-265.
[20]	Boanini E, Torricelli P, Gazzano M (2014). Combined effect of strontium and zoledronate on hydroxyapatite structure and bone cell responses. Biomaterials 35:5619-5626.
[21]	Böcker W (2008). Pathologie. 4. Aufl., München-Jena: Urban & Fischer Verlag.
[22]	Bonnelye E C A (2008). Dual effect of strontium ranelat: Stimulation of osteoblasts differentiation an inhibition of osteoclasts formation and resorption in vitro. Bone 42:129-138.
[23]	Börger A S P (2002). The ball on three balls test for strength testing of brittle discs: stress distribution in the disc. J Eur Cer Soc 22:1425-1436.
[24]	Börger A S P (2003). The ball on three balls test for strength testing of brittle discs: Part II: analysis of possible errors in the strength determination. J Eur Cer Soc 24:2917-2928.
[25]	Brinkmann P, Frobin W, Leivseth G (2000). Orthopädische Biomechanik. Stuttgart: Thieme Verlag Stuttgart.
[26]	Byrne D, Lacroix D, Planell J (2007). Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: Application of mechanobiological models in tissue engineering. Biomaterials 28:5544-5554.
[27]	Capuccini C, Torricelli P, Boanini E (2009). Interactions of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells. J Biomed Mater Res A 89:594-600.
[28]	Chen C-C, Chueh J-Y, Tseng H (2003). Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. Biomaterials 24:1167-1173.
[29]	Chu P, Liu X (2008). Biomaterials Fabrication and Processing Handbook. Boca Raton-Florida: CRC Press.
[30]	Clark D, Pazdernik N (2009). Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
[31]	Collin-Osdoby P, Osdoby P (2003). RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. In: Helfrich M, Ralston S (Hrsg.). Bone research protocols. 2. Aufl., New York: Humana Press.
[32]	Cordewener F, Rozema F, Bos R (1995). Materials properties and tissue reactions during degradation of poly(96/4D-lactide) - a study in vitro and in rats. J Mater Sci: Mater Med 6:211-217.
[33]	Cuhlmann C (2009). Gesintertes Polylactid-Polyglycolid-Copolymer als individuell dreidimensionale konfigurierbares und bioresorbierbares Knochenersatzmaterial. Westfälische Wilhelms-Universität Münster: Dissertation.
[34]	Daculsi G, Goyenvalle E, Cognet R (et al.) (2011). Osteoconductive properties of poly(96L/4D-lactide)/beta-tricalcium phosphate in long term animal model. Biomaterials 32:3166-3177.
[35]	Danzer R, Harrer W, Supancic P (2007). The ball on three balls test - Strength and failure analysis of different materials. J Eur Cer Soc 27:1481-1485.
[36]	Danzer R, Börger A, Suoancic P (2003). Ein einfacher Festigkeitsversuch für Scheiben aus spröden Werkstoffen. Materialwissenschaften und Werkstofftechnik 34:490-498.
[37]	Dave K, Punekar N (2015). Expression of Lactate Dehydrogenase in Aspergillus niger for L-Lactic Acid Production. Plos One 10.
[38]	Davies D, Bassingthwaighte J, Kelly P (1976). Transcapillary exchange of strontium and sucrose in canine tibia. J Appl Physiol 40:17-22.
[39]	Davison N, ten Harkel B, Schoenmarker T (2014). Osteoclast resorption of beta- tricalcium phosphate controlled by surface architecture. Biomaterials 35:7441-7451.

- [40] de Quervain F (1967). Technische Gesteinskunde. 2. Aufl., Basel: Springer.
- [41] Detsch R, Schaefer S, Deisinger U (2011). In vitro-osteoclastic activity studies on surface of 3D printed calcium phosphate scaffolds. J Biomater Appl 26:359-380.
- [42] Döbele M, Schmidt S (2014). Demenzbegleiter für Betroffene und Angehörige: Informationen und Hilfen für den Alltag. Berlin-Heidelber-New York: Springer Verlag.
- [43] Dorozhkin SV und Epple M (2002). Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. Angewandte Chemie 114:3260-3277.
- [44] Duan B, Wang M (2013). Selective laser sintering and its biomedical application. In: Schmidt V, Belegratis M (Hrsg.). Laser technology in biomimetics: basics and applications. Berlin: Springer Science & Business Media.
- [45] Duarte Campos D, Vogt M, Lindner M (2014). Two-photon laser scanning microscopy as a useful tool for imaging and evaluating macrophage-, IL-4 activated macrophageand osteoclast-based in vitro degradation of beta-tricalcium phosphate bone substitute material. Microsc Res Tech 77:143-152.
- [46] Elsner P, Eyerer P, Hirth T (2013). Domininghaus Kunststoffe: Eigenschaften und Anwendungen. Bd. 8. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- [47] Emanuel N, Buchachenko A (1987). Chemical physics of polymer degradation and stabilization. Utrecht: VSP.
- [48] Epple M (2003). Biomaterialien und Biomineralisation. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [49] Faller A, Schünke M (2008). Der Körper des Menschen Einführung in Bau und Funktion. 15. Aufl.; Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- [50] Fastermann P (2014). 3D-Drucken: Wie die generative Fertigungstechnik funktioniert. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [51] Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2012). Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. Berlin-Heidelberg-Luxemburg: Springer Science & Business Media.
- [52] Freshney R (1990). Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch. Berlin: de Gruyter Verlag.
- [53] Fuchs M (2006). Untersuchungen zu biodegradablen Osteosynthese-Implantaten. Bd. 2, Habilitationsschrift. Aufl.; Göttingen: Cuvillier Verlag.
- [54] Fukushima K, Camino G (2015). Abiotic-hydrolytic degradation of poly(lactic acid). In: Jimenez A, Peltzer M, Ruseckaite R (Hrsg.). Poly(lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications. Cambridge: The royal society of chemistry.
- [55] Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T (2000). Biodegradation behavior of ultra-highstrength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. Biomaterials 21:889-898.
- [56] Galster H (1990). PH-Messung. Grundlagen, Methoden, Anwendungen, Geräte. Weinheim: Wiley-VCH.
- [57] Gebhardt A, Hötter J-S, Fateri M (2013). Generative Fertigungsverfahren Additive Manufacturing and 3D Drucken für Prototyping - Tooling - Produktion. Bd. 4. Aufl., München: Hanser Verlag.
- [58] Gerlach K (1993). In-vivo and clinical evaluation of poly(L-lactide) plates and screws for use in maxillofacial traumatology. Clin Mater 13:21-28.
- [59] Gilles S (2010). Nanoimprint-Lithographie als Methode zur chemischen Oberflächenstrukturierung für Anwendungen in der Bioelektronik. Forschungszentrum Jülich.
- [60] Gong Y, Zhou Q, Gao C (2007). In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(L-lactide acid) scaffolds fabricated by a gelatin particle reaching method. Acta Biomaterialia 3:531-540.

- [61] Gottschalk C (2005). Dendritische Copolymere auf der Basis von Milchsäure -Synthese, Charakterisierung und Anwendungsperspektiven. Johannes Gutenberg-Universität Mainz: Dissertation.
- [62] Götze S (2010). Epigenetische Regulation im Wnt/β-Catenin-Signalweg. Bochum, Dissertation.
- [63] Gravius S (2012). Grundlagen. In: Ruchholtz S, Wirtz D (Hrsg.). Orthopädie und Unfallchirurgie: Intensivkurs zur Weiterbildung. 2. Aufl., Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [64] Graw J, Alberts B, Bray D (et al.) (2012). Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. 4. Aufl., Weinheim: Wiley-VCH.
- [65] Groot d K (2006). Effect of Porosity and Physicochemical Properties on the Stability, Resorption, and Strength of Calcium Phosphate Ceramics. Annals of the New York Acadamy of Science 523:227-233.
- [66] Gu D (2015). Laser additive manufacturing of high-performance materials. Berlin-Heidelberg: Springer.
- [67] Gysau D (2006). Füllstoffe. Bd. 2. Aufl., Hannover: Vincentz Network.
- [68] Hakkarainen M (2001). Aliphatic polyesters: abiotic and biotic degradation and degradation products. In: Albertsson A-C (Hrsg.). Degradable aliphatic polyesters. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Science & Business Media.
- [69] Hamdy N (2009). Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. Rheumatology 48:iv9-iv13.
- [70] Hao J, Acharya A, Chen K (2015). Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. Clin Oral Impl Res 26:1-7.
- [71] He F, Zhang F, Yang F (2015). In vitro degradation and cell response of calcium carbonate composite ceramic in comparison with other synthetic bone substitute materials. Mater Sci Eng C 50:257-265.
- [72] Heidemann W, Jeschkeit S, Ruffieux K (et al.) (2001). Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo. Biomaterials 22:2371-2381.
- [73] Heidemann W, Jeschkeit-Schubbert S, Ruffieux K (2002). pH-stabilization of predegraded PDLLA by an admixture of water-soluble sodiumhydrogenphosphate results of an in vitro- and in vivo-study. Biomaterials 23:3567-3574.
- [74] Hentrich A (2005). Herstellung von polymeren Stents als Drug Delivery Systeme durch Tauchen aus der Polymerlösung. Berlin: Univerlagtuberlin.
- [75] Hermey G (2010). Zelluläre Neurobiologie. In: Hermey G, Mahlke C, Schwake M (Hrsg.). Der Experimentator: Neurowissenschaften. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [76] Huang J, Xiong J, Liu J (et al.) (2013). Investigation of the In Vitro Degradation of a Novel Polylactide/Nanohydroxyapatite Composite for Artificial Bone. J Nanomater 2013:515741.
- [77] Hughes F, Aubin J (1998). Culture of cells of the osteoblast lineage. In: Arnett T, Henderson B (Hrsg.). Methods in bone biology. London: Chapman & Hall.
- [78] Ignjatovic N, Tomic S, Dakic M (1999). Synthesis and properties of hydroxyapatite/PLLA composite biomaterials. Biomaterials 20:809-806.
- [79] Itälä A, Valimaki V, Kiviranta R (2003). Molecular biologic comparison of new bone formation and resorption on microrough and smooth bioactive glass microspheres. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 65:163-170.
- [80] Itälä A, Koort J, Ylanen H (2003). Biologic significance of surface microroughening in bone incorporation of porous bioactive glass implants. J Biomed Mater Res A 67:496-503.

- [81] Ittel T, Sieberth H-G, Matthiaß H (2013). Aktuelle Aspekte der Ostologie: Endokrinologie, Renale Osteopathie, Frakturheilung. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [82] Jaeger W (2013). Kunststoffimplantate in der Ophthalmologie. Heidelberh: Springer Verlag.
- [83] Jaiswal N, Haynesworth S, Caplan A (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 64:295-312.
- [84] Jerosch J, Bader A, Uhr G (2002). Knochen: Curasan Taschenatlas spezial. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [85] Jones G, Motta A, Marshall M (2009). Osteoblast: Osteoclast co-cultures on silk fibroin, chitosan and PLLA films. Biomaterials 30:5376-5384.
- [86] Kaygili O, Keser S, Kom M (2015). Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 55:538-546.
- [87] Kersten-Thiele P (2011). Osteogene Differenzierung von humanen Nabelschnurblutstammzellen (USSC) in der adhärenten Zellkultur sowie boviner, kollagener Knochenmatrix. Justus-Liebig-Universität Gießen: Dissertation.
- [88] Kim H-W, Lee H-H, Knowles J (2006). Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. J Biomed Mater Res A 79:643-649.
- [89] Kim G-M (2007). Verstärkungsmechanismen auf Makro-, Mikro- und Nano-Längenskala in heterogenen Polymerwerkstoffen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Habilitationsschrift.
- [90] Knasmüller S (2014). Krebs und Ernährung: Risiken und Prävention wissenschaftliche Grundlagen und Ernährungsempfehlungen. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [91] Knoche H (2013). Lehrbuch der Histologie: Cytologie Histologie Mikroskopische Anatomie. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- [92] Kobayashi S, Sakamoto K (2009). Effect of hydrolysis on mechanical properties of tricalcium phosphate/poly-L-lactide composites. J Mater Sci: Mater Med 20:379-386.
- [93] Komorowsky R (2014). Generative Fertigungsverfahren. Hamburg: Diplomica Verlag.
- [94] Koolmann J, Röhm K-H (2003). Taschenatlas der Biochemie. 3. Aufl., Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [95] Lang F (1990). Pathophysiologie Pathobiochemie. Stuttgart: 4. Aufl., Ferdinand Enke Verlag.
- [96] Lee H-H, Shin U, Lee J-H (2011). Biomedical nanocomposites of poly(lactic acid) and calcium phosphate hybridized with modified carbon nanotubes for hard tissue implants. J Biomed Mater Res B: Appl Biomater 98:246-254.
- [97] Leenslag J, Pennings A, Bos R (1987). Resorbable materials of poly(L-lactide) VII. In vivo and in vitro degradation. Biomaterials 8:311-314.
- [98] Lehnerdt F (1913). Der Einfluss des Strontiums auf die Entwicklung des Knochens wachsender Tiere bei verschiedenem Kalkgehalt der Nahrung. Halle: Springer-Verlag.
- [99] Leisten E (2013). Osteoporose: Handeln bevor der Knochen bricht. B.O.D.
- [100] Li S, Mc Carthy S (1999). Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(D,L-lactide). Biomaterials 20:35-44.
- [101] Li W-J, Tuli R, Huang X (2005). Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. Biomaterials 26:5158-5166.
- [102] Li X, Chu C, Liu L (2015). Biodegradable poly-lactic acid based composite reinforced unidirectionally with high-strength magnesium alloy wires. Biomaterials 48:135-144.
- [103] Li ZY L W (2007). Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. Biomaterials 28:1452-1460.

- [104] Lin F-H, Chen T-H, Lin C-P (1999). The merit of sintered PDLLA/TCP composites in management of bone fracture internal fixation. Artif Organs 23:186-194.
- [105] Lindner M, Hoeges S, Meiners W (et al.) (2011). Manufacturing of individual biodegradable bone substitute implants using selective laser melting technique. J Biomed Mater Res A 97:466-471.
- [106] Liu J, Zhang B, Yan C (2015). The effect of processing parameters on characteristics of selective laser sintering dental glass-ceramic powder. In: Gems E (Hrsg.). A focus on SLM and SLS methods in 3D printing. Bingley: Emerald Group Publishing Limited.
- [107] Lu W, Ji K, Kirham J (2014). Bone tissue engineering by using a combination of polymer/bioglass composites with human adipose-derived stem cells. Cell Tissue Res 356:97-107.
- [108] Lüllmann-Rauch R, Paulsen F (2012). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [109] Franke M (2007). Geweberegeneration und Biokompatibilität nach Implantation von Hydroxylapatit-Polyethylen (Hapex) in Weichgeweben und Ulnadefekt beim Kanninchen. Justus-Liebig-Universität Gießen: Dissertation.
- [110] Mainil-Varlet P, Gogolewski S, Nie P (1996). Long-term soft tissue reaction to various polylactides and their in vivo degradation. J Mater Sci: Mater Med 7:713-721.
- [111] Marie P (2010). Strontium ranelate in osteoporosis and beyond: identifying molecular targets in bone cell biology. Mol Interv 10:305-312.
- [112] Mather J, Roberts P (2007). Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. New York: Springer Science & Business Media.
- [113] Mayr H, Suedkamp N, Hammer T (2015). β-tricalcium phosphate for bone replacement: stability and integration in sheep. J Biomech 48:1023-1031.
- [114] Menges G, Haberstroh E, Michaeli W (et al.) (2011). Menges Werkstoffkunde Kunststoffe. 6. Aufl.; München: Carl Hanser Verlag.
- [115] Minuth W, Strehl R, Schumacher K (2012). Zukunftstechnologie Tissue Engineering: Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Weinheim: John Wiley & Sons.
- [116] Modrow S, Falke D, Truyen U (2010). Molekulare Virologie. 3. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [117] Moll K-J, Moll M (2000). Anatomie. 16. Aufl.; München: Urban & Fischer Verlag.
- [118] Mortimer C, Müller E (2007). Chemie: das Basiswissen der Chemie. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [119] Müller-Mai C (2003). Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. Planegg: Neuer Merkur Verlag.
- [120] Müller-Nothmann S-D (2007). Handbuch der Vitalstoffe. Coesfeld: Pausmedien.
- [121] Munk K (2008). Taschenlehrbuch Biologie Biochemie Zellbiologie. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [122] Murphy C, Haugh M, O'Brien F (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 31:461-466.
- [123] Nekhamanurak B, Patanathabutr P, Hongsriphan N (2014). The influence of micro-/nano-CaCO3 on thermal stability and melt rheology behaviour of poly(lactic)acid. Energy Procedia 56:118-128.
- [124] Netzger R (2012). Teil C: Zellzyklus und molekulare Genetik. In: Biochemie. 3. Aufl.; Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [125] Neuss S, Panfil C, Duarte Campos D (2015). Adhesion of human mesenchymal stem cells can be controlled by electron beam-microstructured titanium alloy surfaces during osteogenic differentiation. Biomed Eng - Biomed Tech 60:215-223.
- [126] Newesely H (1961). Changes in crystal types of low solubility calcium phosphates in the presence of accomanying ions. Arch Oral Biol 6:174-180.

- [127] Nie L, Chen D, Yang Q (et al.) (2013). Hydroxyapatite/poly-L-lactide nanocomposites coating improves the adherence and proliferation of human bone mesenchymal stem cells on porous biphasic calcium phosphate scaffolds. Mater Lett 92:25-28.
- [128] Niethard F, Pfeil J (1997). Orthopädie. 3. Aufl.; Stuttgart: Hippokrates Verlag Stuttgart.
- [129] Oilvares A, Marsal E, Planell J (2009). Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. Biomaterials 30:6142-6149.
- [130] Ondracek G (1994). Werkstoffkunde: Leitfaden für Studium und Praxis. 4. Aufl., Renningen: expert Verlag.
- [131] Osborn J (1979). Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten. Schw Mschr Zahnheilkd 87:1138-1139.
- [132] Peng S, Zhou G, Luk K (et al.) (2009). Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway. Cell Physiol Biochem 23:165-174.
- [133] Perego G, Cella D, Bastioli C (1996). Effect of Molecular Weight and Crystallinity on Poly (lactic acid) Mechanical Properties. J Appl Polym Sci 59:37-43.
- [134] Probst A (1983). Bewegungsorgane A: Knochen. In: Eder M, Gedigk P (Hrsg.). Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. 31. Aufl.; Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
- [135] Prokop A, Jubel A, Hahn U (2005). A comparative radiological assessment of polylactide pins over 3 years in vivo. Biomaterials 26:4129-4138.
- [136] Pschyrembel (2012). Klinisches Wörterbuch. Bd. 263. Aufl., Berlin-Bosten: de Gruyter.
- [137] Ratner B (2013). Biomaterials science. An introduction to materials in medicine.. Waltham: Academic Press.
- [138] Raucci M, Giugliano D, Alvarez-Perez M (2015). Effects on growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by the strontium-added sol-gel hydroxyapatite gel materials. J Mater Sci: Mater Med 26:90.
- [139] Staudinger C, Sarikas A (2010). Anatomie und Physiologie: kompakte Darstellung des Fachgebiets unter Berücksichtigung der Ausbildungs- und Prüfungsverordnung für die Berufe in der Krankenpflege. In: Weisse Reihe. 8. Aufl.; München: Elsevier, Urban und Fischer- Verlag.
- [140] Renno A, van de Watering F, Nejadnik M (2013). Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement: an evaluation. Acta Biomater 9:5728-5739.
- [141] Riedelsheimer B, Büchl-Zimmermann S (2015). Färbungen. In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg.). Romeis - Mikroskopische Technik. 19. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [142] Risse A (2012). Fertigungsverfahren der Mechatronik, Feinwerk und Präzisionsgeräte. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [143] Rösler J, Harders H, Bäker M (2008). Mechanisches Verhalten der Werkstoffe. 3. Aufl., Wiesbaden: Vieweg + Teubner.
- [144] Ruffieux K (1965). Degradables Osteosynthesesystem aus Polylactid für die maxillofaciale Chirurgie. Technische Hochschule Zürich: Dissertation.
- [145] Sax HM (2004). Entwicklung von Apatitkeramiken mit oxidkeramischen Zusätzen zum Einsatz als Knochenerssatzwerkstoffe in der Orthopädie. 1. Auflage, Sharker-Verlag.
- [146] Schiller C, Epple M (2003). Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. Biomaterials 24:2037-2043.
- [147] Schiller C (2003). Polyester und Calciumphosphate als resorbierbare Biomaterialien. Ruhruniversität Bochum: Dissertation.
- [148] Schlüfter S, Detsch R, Deisinger U (2009). In vitro-Abbauuntersuchungen an makroporösen 3D-Scaffolds auf Calciumphosphatbasis. In: Krenkel W (Hrsg.). Verbundwerkstoffe. Weinheim: Wiley-VCH.

- [149] Schmidt M (2015). Selektives Lasersintern (SLS) mit Kunststoffen: Technologie, Prozesse und Werkstoffe. München: Carl Hanser Verlag.
- [150] Schmitz S (2011). Der Experimentator: Zellkultur. 3. Aufl., Heidelberg: Springer Verlag.
- [151] Scholz H-C (1997). Kunststoff Biowerkstoff in der Medizin. In: Kramme R (Hrsg.). Medizintechnik — Verfahren, Systeme und Informationsverarbeitung: Ein anwenderorientierter Querschnitt für Ausbildung und Praxis. Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- [152] Schröter B (2009). Auflärung der Funktion von CYR61/CCN1 in Osteoblasten und Osteoklasten. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- [153] Schünke M (2000). Funktionelle Anatomie Topographie und Funktion des Bewegungssystems. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
- [154] Scott C, Ishida H (1992). Rubber-Filler Interaction Effects on the Solid State Dynamic Mechanical Properties of Polyethylene. Polym Compos 13:237-243.
- [155] Shikinami Y, Okuno M (1999). Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. Biomaterials 20:859-877.
- [156] Shikinami Y, Matsusue Y, Najamura T (2005). The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly-L-lactide (F-u-HA/PLLA). Biomaterials 26:5542-5551.
- [157] Silverthron D U (2009). Physiologie. 4. Aufl.; München: Pearson Studium Verlag.
- [158] Sin L, Rahmat A, Rahman W (2012). Polylactic acid: PLA biopolymer technology. New York: William Andrew.
- [159] Sommer H, Mendrzyk H (1940). Mechanisch-technologische Pr
 üfung von Gespinstfasern und Textilien. In: D'Ans J (Hrsg.). Untersuchungsmethoden der organisch-chemischen Technologie: Dritter Teil. Berlin: Springer.
- [160] Spanel-Borowski K, Mayerhofer A (2014). Zytologie und Histologie Grundlagen. In: Anatomie. 3. Aufl.; Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [161] Steenkamer D, Sullivan J (1999). The Performance of Calcium Carbonate Filled , Random Fiber Composites. Polym Compos 20:392-405.
- [162] Streicher J, Pretterklieber M L (2012). Bewegungsapparat. In: Anderhuber F, Pera F, Streicher J (Hrsg.). Waldeyer - Anatomie des Menschen. Berlin, Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.
- [163] Tegethoff W (2013). Calciumcarbonat: Von der Kreidezeit ins 21. Jahrhundert. Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- [164] Törmälä P, Pohjonen T, Rokkanen P (1998). Bioresorbable polymers: materials technology and surgical applications. Proceeding of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine 212:201-2011.
- [165] Tränkler H-R, Reindl L (2015). Sensortechnik: Handbuch für Praxis und Wissenschaft. Bd. 2. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- [166] Tsigkou O, Hench L, Boccaccini A (2007). Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing bioglass composite films in the absence of osteogenic supplements. J Biomed Mater Res A 15:837-851.
- [167] Vert M, Doi Y, Hellwich K-H (et al.) (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). Pure Appl Chem 84:377-410.
- [168] Westhrin M, Xie M, Olderoy M (2013). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in mineralized alginate matrices. Plos One 10:1-16.
- [169] Williams D F (1999). The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool: Liverpool University Press. S. 40.
- [170] Willman G (2009). Biokeramik für Anwendungen in der Orthopädie. In: Wintermantel E, Ha S-W (Hrsg.). Medizintechnik - Life Science Engineering. 5. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.

- [171] Winter R, Noll F (2013). Methoden der biophysikalischen Chemie. Wiesbaden: Springer Verlag.
- [172] Wintermantel E, Shah-Derler B, Bruinink A (2008). Biokompatibilität. In: Wintermantel E, Ha S-W (Hrsg.). Medizintechnik - Life Science Engineering. 4. Aufl., Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- [173] Wintermantel E, Ha S-W (2009). Medizintechnik Life Science Engineering. In: Wintermantel E, Ha S-W (Hrsg.). Gewebe. 5. Aufl.; Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- [174] Witt G, Wegner A, Sehrt J (2015). Neue Entwicklungen in der Additiven Fertigung. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- [175] Xin X, Hussain M, Mao J (2007). Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. Biomaterials 28:316-325.
- [176] Yang F Y D (2011). Strontium Enhances Osteogenic Differentiation of Mesechymal Stem Cells and In Vivo Bone Formation by Activating Wnt/Catenin Signaling. Stem Cells 29:981-991.
- [177] Zhang X, Wyss U, Pichora D (1994). An investigation of poly(lactic acid) degradation. J Bioact Compat Polym 9:80-100.
- [178] Zhang Q, Mochalin V, Neitzel I (2012). Mechanical properties and biomineralization of multifunctional nanodiamond-PLLA composites for bone tissue engineering. Biomaterials 33:5067-5075.
- [179] Zhu Z-J, Shen H, Wang Y-P (2013). Effect of beta-tricalcium phosphate/poly-l-lactide composites on radial bone defects of rabbit. Asian Pac J Trop Med 6:753-756.
- [180] Ziegler R, Nawroth P (2006). Physiologische Grundlagen. In: Siegenthaler W, Blum H (Hrsg.). Klinische Pathophysiologie. 9. Aufl., Stuttgart-NewYork: Georg Thieme Verlag.

Internetquellen

- [181] Department of Materials Science and Metallurgy, University of Cambridge. (DoITPoMS) D o. Ort: Internet, aufgerufen am: 2015-01-03 (http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/structure.php).
- [182] Visible Body. Smith C. Ort: Internet, aufgerufen am: 2015-09-21 (http://info.visiblebody.com/bid/263608/3D-Skeletal-System-Compact-Bone-Spongy-Bone-and-Osteons).

Normen

- [183] ISO 5833:2002:2002-05. Implants for surgery acrylic resin cements.
- [184] DIN EN 843-2:2007-03. Hochleistungskeramik Mechanische Eigenschaften monolithischer Keramik bei Raumtemperatur - Teil 2: Bestimmung des Elastizitätsmoduls, Schubmodul und der Poissonzahl.
- [185] DIN EN ISO 178:2011-04. Kunststoffe Bestimmung der Biegeeigenschaften.
- [186] DIN EN ISO 604:2003-12. Kunststoffe Bestimmung der Druckeigenschaften.
- [187] ISO 10993-5:2009:2009-10. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Prüfung auf In-vitro-Zytotoxizität.
- [188] ISO 15814:1999-11. ISO 15814:1999-11 Implants for surgery Copolymers and blends based on polylactide in vitro degradation testing.

8 Anhang

8.1 Analyse der Verbundwerkstoffe

Abrieb der Mahltrommel

Aufgrund der langen Mahldauer und der hohen Mahlkräfte im Aufbereitungsprozess wurde das Pulver auf Abrieb der Polyethylen-Flasche untersucht. Die DSC-Analyse ergab einen für Polyethylen charakteristischen Reflex in der temperaturabhängigen Wärmeflusskurve (Abb. 105). Analysiert wurde die zweite Aufheizung, da diese nur materialspezifische Effekte widerspiegelt. Die erste Aufheizung beinhaltet zusätzlich Effekte durch Verarbeitungsfehler. Die zweite Aufheizung wies eine schmelzfähige Komponente bei 109 °C nach, die im Bereich des Schmelzpunktes von Polyethylen liegt ($T_{m(PE)}$ = 105-110 °C [173]) (Abb. 105a). Bei der Analyse eines Werkstoffes, der in einer PU-beschichteten Flasche aufbereitet wurde, wurde dieser charakteristische Reflex in der zweiten Aufheizung nicht mehr nachgewiesen (Abb. 105b). Daher wurden die weiteren Werkstoffe ausschließlich in beschichteten Flaschen hergestellt.



Abb. 105: DSC-Analysen von Verbundwerkstoffen, die in einer unbeschichteten Polyethylen-Flasche (a) und in einer Polyurethan-beschichteten (b) Flasche aufbereitet wurden. Die Messung wurde jeweils unter zweifacher Aufheizung durchgeführt. (Messungen durchgeführt vom IKV der RWTH Aachen (a) bzw. von EOS GmbH Krailling (b)).

Phasen- und Elementanalysen

Die Röntgenbeugungsanalysen des verwendeten β -TCPs (Abb. 106a) und Calciumcarbonats (rhomboedrisch fein) (Abb. 106b) sowie des entwickelten Verbundwerkstoffes aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) (Abb. 106c) ergaben neben den erwarteten Phasen keine Fremdphasen. Auch die Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) zeigte nur sehr geringe Fremdanteile. Die im Mahlprozess verwendeten Zirkonoxid-Mahlkugeln zeigten somit keinen Abrieb (Tab. 39).



Abb. 106: Röntgenbeugungsdiagramme des verwendeten β -TCPs (a), rhomboedrisch feinen Calciumcarbonats (b) und des entwickelten Verbundwerkstoffes aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat (c). (Messungen durchgeführt vom Institut für Gesteinshüttenkunde der RWTH Aachen).

Tab. 39: Elementanalyse des Verbundwerkstoffes aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein). Die unterstrichenen Werte lagen unterhalb der Messgrenze und wurden daher auf 0,01 aufgerundet. (Messungen durchgeführt vom Institut für Gesteinshüttenkunde der RWTH Aachen).

Element	Gew% an der Gesamtmasse
Silizium	0,01
Aluminium	0,01
Titan	0,01
Eisen	<u>0,01</u>
Calcium	16,80
Kalium	<u>0,01</u>
Magnesium	0,06
Mangan	0,01
Natrium	<u>0,01</u>
Chrom	<u>0,01</u>
Phosphor	2,34
Strontium	0,01
Zirkonium	0,01

Partikelgröße

Die Korngrößenverteilung aller Werkstoffe war vergleichbar. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft ein Diagramm eines Werkstoffes aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat.



Abb. 107: Partikelgrößenverteilung in einem Verbundwerkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat (d90 = 88 µm). (Messungen durchgeführt vom Institut für Gesteinshüttenkunde der RWTH Aachen).

Verteilung im Verbundwerkstoff

Dass das einfache Vermischen der drei Komponenten über 2 Tage auf der Rollenbank ausreichend ohne Mahlprozess nicht war, zeigte die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschliffes eines warmgepressten Prüfkörpers (Abb. 108 links). Der Werkstoff bestand aus 50 Gew.-% PDLLA, 25 Gew.-% β-TCP und 25 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein). Die

Fläche wies starke Inhomogenitäten in der Verteilung der Einzelkomponenten auf. Eine warmgepresste Probe aus einem Werkstoff der gleichen Zusammensetzung, der jedoch über den entwickelten Mahlprozess aufbereitet wurde, zeigt dagegen eine sehr homogene Verteilung (Abb. 108 rechts). Bei der hellen Stelle in der Probe handelt es sich um einen Präparationsfehler. Im Weiteren wurde ausschließlich mit Verbundwerkstoffen gearbeitet, die über den Mahlprozess aufbereitet wurden.



Abb. 108: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen warmgepresster Prüfkörper aus 50 Gew.-% PDLLA, 25 Gew.-% β -TCP und 25 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) nach 2 tägigem Vermischen ohne Mahlprozess (links) und mit dem entwickelten Mahlprozess (rechts). (Maßstab \triangleq 1 mm).

Strontium-haltige Verbundwerkstoffe

Die beiden folgenden Tabellen zeigen die Berechnung der Strontiumanteile (Gew.-%) in den Strontium-haltigen Verbundwerkstoffen.

Tab. 40: Berechnung der Sr²⁺-Masse in verschiedenen Werkstoffen (bezogen auf einen 300 mg-Prüfkörper.

Werkstoff	Masse SrCO₃ (mg)	Masse Sr ²⁺ (mg)
60P-20T-10CC-10SC	30	$m_{Sr} = rac{m_{SrCO_3} * M_{Sr}}{M_{SrCO_3}} = 17,8$
60P-20T-20SC	60	$m_{Sr} = rac{m_{SrCO_3} * M_{Sr}}{M_{SrCO_3}} = 35,7$
Werkstoff	Masse Sr13TCP	Masse Sr ²⁺ (mg)
60P-40 <i>Sr13TCP</i>	120	0,87 Ca ₃ (PO ₄) ₂ 0,13 Sr ₃ (PO ₄) ₂
		$n_{Sr} = 0,13 * 3 * Sr - \beta - TCP$ $\frac{m_{Sr}}{M_{Sr}} = 0,13 * 3 * \frac{m_{SrTCP}}{M_{SrTCP}}$ $m_{Sr} = 0,104 * m_{SrTCP}$ $= 0,104 * (1,38 * m_{Sr13TCP})$ $= 0,14 * m_{Sr13TCP}$ $m_{Sr} = 0,14 * 120mg = 16,8 mg$
Zellmedium	Masse SrCl ₂	Masse Sr ²⁺ (mg)
DMEM-0,036	0,036	0,02
DMEM-0,073	0,073	0,04
DMEM-0,18	0,18	0,10
DMEM-0, 36	0,36	0,20
DMEM-3,6	3,6	2,0

Tab. 41: Berechnung der Anteile von Calcium und Phosphat in einem Werkstoff aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat. Ausgangen wird von einer Verbundwerkstoffmasse von 100 g.

Molmassen (g/mol)	Phosphor in β-TCP	Calcium in β-TCP	Calcium in CaCO3
M(Ca) = 40	n(P) = 2 * n(TCP)	n(Ca) = 3 * n(TCP)	$n(Ca) = n(CaCO_3)$
M(P) = 31	m(P) m(TCP)	m(Ca) m(TCP)	m(Ca) m(TCP)
M(0) = 16	$\overline{M(P)} = 2 * \overline{M(TCP)}$	$\overline{M(Ca)} = 3 * \overline{M(TCP)}$	$\overline{M(Ca)} = \overline{M(TCP)}$
M(C) = 12	m(P) = 4,0 g	m(Ca) = 7,7 g	m(Ca) = 8,0 g
M(TCP) = 310 $M(CaCO_3) = 100$	≙ 4,0 Gew%	≙ 15,7	Gew%

8.2 Prüfkörperherstellung

8.2.1 Aufschmelzen Kaltgepresster Prüfkörper

Um dichtere Prüfkörper zu erzielen, wurden aus den Kompositpulvern Prüfkörper kalt gepresst und anschließend im Ofen aufgeschmolzen. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Prüfkörper durch Quellung und Schmelzbildung ihre Form nicht beibehalten konnten. Indem eine Platte zusätzlich auf den Prüfkörpern gelagert wurde, konnte zumindest die Prüfkörperdicke konstant gehalten werden. REM-Aufnahmen der Querschliffe zeigten jedoch, dass es innerhalb der Prüfkörper zu Inhomogenität und einer Schichtbildung kommt (Abb. 109a). Die Inhomogenitäten sind auch innerhalb der Referenzproben, die ohne Gegengewicht im Ofen aufgeschmolzen wurden deutlich zu erkennen, allerdings keine Schichtbildung (Abb. 109b). Die Porenbildung konnte durch das Gegengewicht deutlich reduziert werden. Auch deutlich zu erkennen ist die konstante Prüfkörperdicke der Probe mit Gegengewicht (Abb. 109a) bzw. die abweichende Geometrie der Probe ohne Gegengewicht (Abb. 109b).



Abb. 109: REM-Aufnahmen zweier bei 130 °C Prüfkörper aus 50 Gew.-% PDLLA, 25 Gew.-% β -TCP und 25 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) mit 130 °C, mit Gewicht (a) und ohne Gewicht (b). (Legende: 1 Einbettmaterial, 2 Prüfkörper).

8.2.2 Verteilung der Materialien in den warmgepressten Prüfkörpern

Im Rückstreuelektronen-Modus war aufgrund der Polymerdegradation keine hochaufgelöste Aufnahme eines warmgepressten Prüfkörpers möglich (Abb. 110). Aufgenommen wurde die Oberfläche nach einem Kryobruch. Die Zuordnung der Materialien aufgrund der Rückstreuintensitäten war nicht eindeutig möglich.



Abb. 110: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der inneren Struktur eines Prüfkörpers aus 60 Gew.-% PDLLA, 20 Gew.-% β -TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein) nach einem Kryobruch. Die Aufnahme erfolgte im Rückstreuelektronen-Modus (Maßstabbalken \triangleq 10 µm).

8.2.3 Prüfkörperoberfläche

Die Kontaktwinkel der Wassertropfen auf den Prüfkörperoberflächen lagen bei allen Werkstoffen im gleichen Bereich (Abb. 111).



Abb. 111: Kontaktwinkel der Prüfkörper verschiedener Verbundwerkstoffe.

Die Mittenrauwerte der Prüfkörper lagen zwischen 0,7 und 1,5 µm (Abb. 112, Tab. 42). Die Standardabweichungen waren hoch in Bezug auf die ermittelten Rauheiten.



Abb. 112: Mittenrauwerte der warmgepressten Prüfkörper aus verschiedenen Werkstoffen.

Tab. 42: Mittenrauwerte der warmgepressten Prüfkörper aus verschiedenen Werkstoffen.

Werkstoff	MW Ra (µm)	STABW Ra (µm)
40/30/30 rf	0,96	0,57
50/25/25 rf	0,67	0,04
60/20/20 rf	1,22	0,11
60/27.5/12.5 rf	0,77	0,24
60/35/5 rf	0,71	0,25
60/20/20 rg	0,79	0,11

8.3 Degradation

8.3.1 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit warmgepresster Prüfkörper

PDLLA-Werkstoffe

Die Flüssigkeitsaufnahme bei Lagerung in PBS war deutlich größer als in Wasser (Anhang, Abb. 113). So nahmen die Prüfkörper in PBS nach 8 Wochen 22 % ihres Eigengewichtes an Flüssigkeit auf. In Wasser stieg die Flüssigkeitsaufnahme nach 4 Wochen auf 16 % des Eigengewichtes und fiel nach 8 Wochen auf 13 %. Reines PDLLA nahm bei der Lagerung in Wasser nach 8 Wochen nahezu keine Flüssigkeit auf (Anhang, Abb. 114).



Abb. 113: Flüssigkeitsaufnahme der warmgepressten Prüfkörper aus 60 <u>Gew.-% PDLLA,</u> <u>20 Gew.-% β-TCP und 20 Gew.-% Calciumcarbonat (rhomb. fein)</u> nach Lagerung in Wasser bzw. PBS bei 37 °C.



Abb. 114: Flüssigkeitsaufnahme der warmgepressten Prüfkörper aus <u>reinem PDLLA</u> nach Lagerung in Wasser bei 37 °C.

8.3.2 Einfluss flüssiger Umgebung auf die Biegefestigkeit von SLM-Prüfkörpern

Die Flüssigkeitsaufnahme der SLM-Prüfkörper aus dem PLLA-Verbundwerkstoff war zu allen Messzeitpunkten relativ konstant (Abb. 115). Im Mittel lagen die Werte bei 10 Gew.-% der Prüfkörpermasse.



Abb. 115: Flüssigkeitsaufnahme (links) und geometrische Veränderung (rechts) der SLM-Prüfkörper aus 77 Gew.-% PLLA und 23 Gew.-% CCsph nach verschiedenen Lagerungszeiten in PBS (37 °C).

8.4 Biologische Verträglichkeit

8.4.1 Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung

Die Vitalfluoreszenz-Doppelfärbungen von L929-Mausfibroblasten auf Werkstoffen mit Variation des Polymeranteils sowie der keramischen Anteile ergaben für alle Prüfkörper eine Vitalität zwischen 97 und 99 % (Tab. 43).

Tab. 43: Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung von Mausfibroblasten (L-929) auf verschiedenen Werkstoffen mit variierendem Polymer-Gehalt: 40/30/30, 50/25/25 und 60/20/20 (PDLLA/TCP/CCrf) sowie variierenden keramischen Anteilen. Angegeben ist die Vitalität der Zellen bezogen auf die Probenfläche und die Vitalität bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen.

Werkstoff	Zellzahl/mm²lebend	Zellzahl/mm ² tot	Vitalität (%)	
Experiment Variation Polymeranteil				
40/30/30rf	204 <u>+</u> 103	6 <u>+</u> 7	97	
50/25/25rf	185 <u>+</u> 58	2 <u>+</u> 2	99	
60/20/20rf	183 <u>+</u> 104	2 <u>+</u> 2	99	
Glaskontrolle	178 <u>+</u> 155	1 <u>+</u> 1	100	
Experiment Variation der keramischen Anteile				
60/20/20rf	269 <u>+</u> 51	1 <u>+</u> 5	100	
60/20/20rg	298 <u>+</u> 119	3 <u>+</u> 2	99	
60/20/20nad	377 <u>+</u> 230	4 <u>+</u> 4	99	
60/27,5/12,5rf	236 <u>+</u> 94	6 <u>+</u> 2	98	
60/27,5/12,5rg	259 <u>+</u> 116	2 <u>+</u> 2	99	
60/35/5rf	409 <u>+</u> 178	3 <u>+</u> 2	99	
60/35/5rg	237 <u>+</u> 77	3 <u>+</u> 3	99	
Glaskontrolle	277 <u>+</u> 150	2 <u>+</u> 2	99	

Die Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) ergab auf allen Prüfkörpern eine Vitalität zwischen 98 und 99 % (Tab. 44). Eine Ausnahme bildete Calciumcarbonat. Der Wert lag bei 89 %.

Tab. 44: Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) auf verschiedenen Werkstoffen mit variierendem Polymer-Gehalt: sowie verschiedenen Calciumcarbonat-Varianten. Angegeben ist die Vitalität der Zellen bezogen auf die Probenfläche und die Vitalität bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen.

Werkstoff	Zellzahl/mm ² lebend	Zellzahl/mm ² tot	Vitalität (%)
40/30/30rf	121 <u>+</u> 36	2 <u>+</u> 1	99
50/25/25rf	223 <u>+</u> 31	3 <u>+</u> 1	99
60/20/20rf	131 <u>+</u> 29	2 <u>+</u> 1	99
60/20/20rg	141 <u>+</u> 36	3 <u>+</u> 2	98
60/20/20nad	127 <u>+</u> 45	2 <u>+</u> 2	98
Calciumcarbonat rf	107 <u>+</u> 20	13 <u>+</u> 6	89
β-ΤϹΡ	99 <u>+</u> 27	2 <u>+</u> 1	98
Glaskontrolle	122 <u>+</u> 40	2 <u>+</u> 2	98

Die Osteoklasten-ähnlichen Zellen (RAW) wiesen eine Vitalität zwischen 90 und 100 % auf (Tab. 45).

Tab. 45: Vitalfluoreszenz-Doppelfärbung von Osteoklasten-ähnlichen Zellen (RAW) auf verschiedenen Werkstoffen mit variierendem Polymer-Gehalt: sowie verschiedenen Calciumcarbonat-Varianten. Angegeben ist die Vitalität der Zellen bezogen auf die Probenfläche und die Vitalität bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen.

Werkstoff	Zellzahl/mm²lebend	Zellzahl/mm ² tot	Vitalität (%)
40/30/30rf	148 <u>+</u> 44	10 <u>+</u> 5	94
50/25/25rf	255 <u>+</u> 67	4 <u>+</u> 2	99
60/20/20rf	187 <u>+</u> 68	21 <u>+</u> 11	90
60/20/20rg	280 <u>+</u> 52	7 <u>+</u> 8	98
60/20/20nad	262 <u>+</u> 66	3 <u>+</u> 2	99
Glaskontrolle	164 <u>+</u> 55	1 <u>+</u> 1	100

8.4.2 Viabilität und Zytotoxizität

Einen Tag nach der Aussaat war die Viabilität der L929-Mausfibroblasten auf den Verbundwerkstoffen mit rhomboedrisch feinem Calciumcarbonat vergleichbar mit der Kontrolle (Abb. 116). Die Viabilität auf den beiden anderen Werkstoffen mit nadelförmiger bzw. rhomboedrisch grober Calciumcarbonat-Variante war deutlich geringer. Die Aktivität auf den beiden Werkstoffen mit 40 bzw. 50 Gew.-% PDLLA stieg über den Untersuchungszeitraum, wobei der geringere Anteil an Polymer eine höhere Aktivität verzeichnete. Die Werkstoffe basierend auf 60 Gew.-% Polymer zeigten nach 2, 3 und 4 Tagen eine relativ konstante Aktivität. Alle Werkstoffe zeigten

nach 2, 3 und 4 Tagen eine deutlich geringere Aktivität der Zellen gegenüber der Kontrolle. Die Zytotoxizität lag am ersten Tag zwischen 10 und 20 % und lag somit für jeden Werkstoff unter der von der Norm geforderten Grenze von 30 % (Abb. 116). Der Werkstoff mit dem geringsten Polymeranteil zeigte den geringsten Wert. Nach 4 Tagen zeigten sich deutlich geringere Werte für alle Werkstoffe (< 6 %).



Abb. 116: Viabilität von L929-Mausfibroblasten auf verschiedenen Verbundwerkstoffen (links) und Zytotoxizität (rechts). (Gew.-% PDLLA-β-TCP-CC).

Die Viabilität der Osteoklasten-ähnlichen Zellen steigt für alle Werkstoffe über 7 Tage an (Abb. 117). Die Aktivität der Zellen auf den Werkstoffen lag unterhalb der Kontrolle. Die Werte der Zytotoxizität waren negativ (Abb. 117).



Abb. 117: Viabilität Osteoklasten-ähnlicher Zellen (RAW 264.7) auf warmgepressten Prüfkörpern aus verschiedenen Verbundwerkstoffen (Gew.-% PDLLA/β-TCP/CCrf) und die Zytotoxizität dieser Werkstoffe auf RAW-Zellen.

Vergleich alte und neue Prüfkörper pro Zeitpunkt (hMSCs)

Die Parallel zu Viabilität gemessene Zytotoxizität zeigte für beide Methoden Werte unter 30 % (Abb. 118).



Abb. 118: Zytotoxizität verschiedener Verbundwerkstoffe auf hMSCs. Zum einen wurde durchgehend für alle Zeitpunkte die gleiche Platte mit den gleichen Prüfkörpern vermessen (links), zum anderen jeweils eine neue Platte mit neuen Prüfkörpern (rechts).