



Doctoral Thesis

Herstellung und Charakterisierung von hochporösen biodegradierbaren Polymerstrukturen aus DegraPol für Anwendungen in der medizinischen Geweberekonstruktion (Tissue Engineering)

Author(s):

Matter, Sandro

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001817738> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**Herstellung und Charakterisierung von hochporösen
biodegradierbaren Polymerstrukturen aus DegraPol®
für Anwendungen in der medizinischen
Geweberekonstruktion (Tissue Engineering)**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

Doktor der Technischen Naturwissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

ZÜRICH

vorgelegt von

Sandro Matter

Dipl. Chem. ETH

geboren am 22. August 1964

von Kölliken (AG)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. U.W. Suter, Referent

Prof. Dr. P. Smith, Korreferent

Prof. Dr. E. Wintermantel, Korreferent

Dr. P. Neuenschwander, Korreferent

Zürich 1997

II. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene biokompatible Block-Copolymere vom Typ DegraPol[®], deren Polymersynthesen innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt worden waren, in grösseren Mengen synthetisiert. Die hergestellten Polymere unterschieden sich in ihren hydrolytischen Degradationsgeschwindigkeiten. Weil die bei der Herstellung der Block-Copolymere verwendeten Weichsegmente mit einer unterschiedlichen Anzahl an Sollbruchstellen aus Glykolyglykolatesterbindungen modifiziert worden war.

Diese Polymere wurden mit einer in dieser Arbeit entwickelten Herstellungstechnik, deren Funktionsweise auf der thermoinduzierten Phasenseparierung (TIPS) von Polymerlösungen aus DegraPol[®] und 1,4-Dioxan basierte, zu hochporösen DegraPol[®]-Schäumen verarbeitet. Bei der Untersuchung des Phasenverhaltens konnte gezeigt werden, dass durch relativ rasche Abkühlung derartiger Polymerlösungen ein metastabiles Phasenverhalten induziert wurde, bei dem eine Region mit einer flüssig-flüssig-Phasentrennung existierte. Dieses Entmischungsphänomen ermöglichte es erst, dass ein hochporöser Polymerschäum entstand. Diese Schäume verfügten charakteristischerweise über eine relative Volumendichte von ca. 20% und einer Oberfläche von $25 \text{ mm}^2 \text{ pro mm}^3$. Um diese dreidimensionalen porösen Polymerstrukturen charakterisieren zu können, wurden zwei verschiedene bekannte Methoden an die vorliegenden Materialien angepasst. Zum einen wurde die am Institut für biomedizinische Technik zur dreidimensionalen Charakterisierung von trabekulärem Knochen entwickelte Mikrotomographie verwendet, um röntgenkontrastierte DegraPol[®]-Schäume morphometrisch analysieren zu können. Andererseits wurde in Zusammenarbeit mit dem anatomischen Institut der Universität Bern eine automatisierte Bildanalyse entwickelt, mit der Dünnschnitte von DegraPol[®]-Schäumen ausgewertet und mit klassischen stereologischen Verfahren dreidimensional charakterisiert werden konnten. Dieses Verfahren eignete sich besonders, um die Resorption von DegraPol[®]-

Schäumen *in vivo* quantitativ zu verfolgen.

Polymerschäume, aus verschiedenen DegraPol[®]-Sorten hergestellt, wurden danach in Pufferlösung bei 37° und 70°C (pH-Werte 3 und 7) abgebaut, wobei nebst der Veränderung des Molekulargewichtes zusätzlich die Abbauprodukte von DegraPol[®] (Glykolsäure, 3-(*R*)-Hydroxybuttersäure und 6-Hydroxycapronsäure) in der Pufferlösung mittels einer dafür eigens entwickelten HPLC-Methode bestimmt wurden. Damit war es möglich, die verschiedenen DegraPol[®]-Sorten auf ihr unterschiedliches Freisetzungsverhalten von Abbauprodukten zu untersuchen.

Polymerschäume mit und ohne Glykolat in der Polymerkette wurden *in vivo* bis zu 65 Tagen subkutan in Ratten implantiert und der Polymerabbau wurde sowohl mittels GPC als auch mittels Bildanalyse an Dünnschnitten verfolgt. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein DegraPol[®]-Schaum ohne Glykolatgehalt des Weichsegmentes hydrolytisch in Pufferlösung unter physiologischen Bedingungen keinen Abbau zeigte. Während einer subkutanen Implantation unterlag der DegraPol[®]-Schaum jedoch einem markanten Abbau, wobei innerhalb von 65 Tagen 35% des Polymers *in vivo* resorbiert wurde. Die auf ihre Biokompatibilität mittels Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten getesteten hochporösen Polymersubstrate zeigten im Vergleich zu der Kontrolle (herkömmliche Gewebekulturschalen aus TCPS) sehr gute Resultate. Es konnte keine Aktivierung von Makrophagen festgestellt werden. Besonders Osteoblasten und Chondrozyten zeigten nach einer Anpassungszeit (bedingt durch die hohe Oberfläche der Schäume) von ca. 8 Tagen hohe Proliferationsraten und Produktion von extrazellulärer Matrix (Osteocalcin und Kollagen Typ I). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese hochporösen DegraPol[®]-Schäume ein gutes Zellsubstrat darstellen und eine Verwendung derartiger Strukturen als dreidimensionale, degradierbare Stützstrukturen zur Herstellung von künstlichem Gewebe ("Tissue Engineering") denkbar ist.

III. Abstract

Various biocompatible block-copolymers of the type DegraPol[®] were synthesized in larger amounts using polymerisation methods which were developed earlier in the group. These polyesteretherurethanes were different in their hydrolytical degradation behaviour. The soft segments used in the polymerisation to synthesize DegraPol[®] were modified with different amounts of weak links of glycolyl glycolate esterbonds, which can be easily hydrolysed.

The polymers were processed to DegraPol[®]-foams by a manufacturing technique based on a thermoinduced phase separation process (TIPS) of polymersolutions of DegraPol[®] and 1,4 dioxan. It was shown, by observations under a microscope equipped with a cold stage, that a metastable phase diagram was induced by fast cooling of the binary polymer solution. In this kinetically dependent phase diagram, a region with liquid-liquid demixing was evoked where the system demixed in two characteristic phases. This was the process responsible for the characteristic foam morphology of DegraPol[®]-scaffolds. In this work, a general process based on this principle was developed where after freeze drying of demixed polymer systems, polymeric scaffolds with a characteristic relative volume density of about 20% polymer and with a surface of 25 mm² per mm³ were produced.

Two different methods were used and adapted to characterize that kind of polymeric scaffolds properly in three dimensions. The first method was developed originally at the Institute for Biomedical Engineering of the ETH/UNI Zürich to morphometrically characterize trabecular bone by noninvasive microtomography. It was possible to tune this technique to characterize also X-ray-contrasted DegraPol[®]-scaffolds. The other method was developed together with the Institute of Anatomy of the University of Bern where an automated image analysis system was programmed in such a way that it was possible to measure thin sections of the stained porous polymer. The image data could then be used in classical stereological methods to calculate the

three-dimensional properties of the scaffolds. That method was especially useful to follow up the resorption of implanted DegraPol[®]-scaffolds incorporated in the tissue.

Polymeric foams made out of different types of DegraPol[®] were degraded in buffer solutions at 37° and 70°C (pH 3 and 7). Besides following up the loss in molecular weight, the degradation end products of DegraPol[®] (glycolic acid, 3-hydroxybutyric acid, 6-hydroxycaproic acid) were also detected in the surrounding buffer solution by a specially developed HPLC method. It was possible to investigate the different scaffolds for their hydrolytical release profile of degradation endproducts during break of the polymer-chains.

The scaffolds were also subcutaneously implanted in rats for up to 65 days and the degradation was followed by GPC analysis and image analysis of thin sections. It was shown that a DegraPol[®] scaffolds without any glycolate content, which showed almost no degradation in buffer solution under physiologic conditions, has lost 35% of its polymeric mass within 65 days of implantation.

The biocompatibility regarding macrophages, fibroblasts, osteoblasts, and chondrocyte cells showed, in comparison with the control (tissue culture plates TCPS), high cell proliferation and production of extracellular matrix proteins (osteocalcin, collagen type I) after an accommodation time of 8 days. No activation of macrophages was found and especially osteoblasts spread into the pores of the scaffolds. These results demonstrate, that the highly porous DegraPol[®] scaffolds make a nice cell substrate and may lead to an application as three-dimensional degradable polymeric scaffolds in the tissue engineering of bone and cartilage.