

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie der
Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Evaluation Bone Sialoprotein-beschichteter
Knochenersatzmaterialien am
Femurkondylendefektmodell der Ratte**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der

Medizin

der Universitätsmedizin

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Christiane Isabell Mack

aus Baden-Baden

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher

Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	5
2 Aktueller Stand der Literatur	7
2.1 Osteogenese und Ossifikation	7
2.1.1 Knochenaufbau und Struktur	7
2.1.2 Zelluläre Bestandteile und Knochenmetabolismus	8
2.1.3 Matrix.....	10
2.1.4 Knochenumbau.....	12
2.1.5 Chondrale Ossifikation.....	12
2.2 Frakturlehre.....	13
2.2.1 Primäre und sekundäre Knochenheilung.....	13
2.2.2 Knochenheilungsstörung und Pseudarthrosen	14
2.3 Kritische Knochendefekte.....	15
2.3.1 Definition.....	15
2.3.2 Bohrlochdefekt im Kleintiermodell.....	16
2.4 Therapieoptionen	17
2.4.1 Das Diamond Concept.....	17
2.4.2 Der Goldstandard	19
2.4.3 Alternativer Knochenersatz.....	20
2.5 Biomaterialien	21
2.5.1 Anforderungen	21
2.5.2 Keramik-basierte Knochenersatzmaterialien	22
2.5.3 Polymere	25

2.5.4	Verbundstoffe	25
2.6	Bone Tissue Engineering	26
2.6.1	Hintergrund.....	26
2.6.2	Scaffolds.....	27
2.6.3	Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle.....	29
2.6.4	Aktuelle Trends und Zukunftsaussicht.....	30
2.7	Bone Sialoprotein.....	31
2.7.1	Aufbau und Funktion.....	31
2.7.2	Anwendung.....	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Auswahl der Biomaterialien.....	35
3.1.1	Calciumphosphat-Zement.....	35
3.1.2	Bone Sialoprotein	36
3.1.3	BMP-7.....	36
3.2	In-vitro Vorversuche	36
3.2.1	Beschichtung	36
3.2.2	Verifizierung.....	36
3.3	Studiendesign	37
3.4	In-vivo Versuchsdurchführung.....	37
3.4.1	Versuchstiere.....	37
3.4.2	Versuchsaufbau.....	38
3.4.3	Anästhesie.....	39
3.4.4	Desinfektion und präoperative Maßnahmen	41
3.4.5	Postoperative Versorgung	43
3.5	Röntgenverlaufskontrollen.....	44
3.6	Euthanasie der Tiere	44
3.7	Entnahme des Femurs, Präparation und Fixation	44
3.8	µCT-Bilder.....	45

3.8.1	Vorbereitung	45
3.8.2	μCT-Aufnahmen	46
3.9	Histologische Untersuchung	47
3.9.1	Aufbereitung der Präparate	47
3.9.2	Paraffineinbettung.....	47
3.9.3	Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin	49
3.9.4	Masson-Goldner-Trichromfärbung.....	50
3.9.5	Immunhistochemofärbung	52
3.9.6	Auswertungsverfahren.....	57
3.10	μCT Auswertung mit Image J.....	58
3.11	Statistische Analyse	62
4	Ergebnisse.....	62
4.1	Bildgebung	62
4.1.1	Röntgenverlaufskontrolle	62
4.1.2	μCT-Aufnahmen	63
4.2	Bone Volume/ Total Volume-Auswertung.....	66
4.2.1	Untersuchung spezifischer Volumina.....	68
4.3	Allgemeinhistologische Auswertung.....	75
4.3.1	Evaluation des Ossifikationsverhaltens	75
	<i>8-wöchiger Heilungsprozess</i>	77
4.3.2	Evaluation der Morphologie	80
4.4	Immunhistochemische Auswertung.....	84
5	Diskussion	87
5.1	Diskussion des Studienaufbaus	88
5.1.1	Kontrollgruppen	88
5.1.1	Bone Sialoprotein	90
5.2	Diskussion des Defektmodells	91
5.2.1	Tiermodell.....	91

5.2.2	Femurkondylendefektmodell.....	92
5.2.1	OP-Vorgehen.....	94
5.3	Diskussion des Trägermaterials	95
5.3.1	Bioaktivität und Stabilität des Scaffolds	95
5.3.2	Freisetzung von Bone Sialoprotein	96
5.4	Diskussion der Ergebnisse.....	99
5.4.1	Röntgenaufnahmen	99
5.4.2	μCT-Aufnahmen	100
5.4.3	Quantitative Ergebnisse.....	101
5.4.4	Qualitative Ergebnisse.....	104
5.4.5	Schlussfolgerung	108
6	Zusammenfassung	110
7	Literaturverzeichnis.....	111
	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Tabellarischer Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

BCP <i>Bicalciumphosphat</i>	M.G <i>Masson-Goldner</i>
BMP <i>Bone morphogenetic protein</i>	MSC <i>engl. mesenchymal stem cells</i>
BMU <i>Basic multicellular unit</i>	
BSP <i>Bone Sialoprotein</i>	NK <i>Negativkontrolle</i>
BTE <i>Bone Tissue Engineering</i>	
BV <i>Bone Volume</i>	OPN <i>Osteopontin, Osteopontin</i>
	OPZ <i>Osteoprogenitorzellen</i>
CPC <i>calcium phosphate cement</i>	ORIF <i>open reduction and internal fixation</i>
CSD <i>critical size defect</i>	
	PBS <i>phosphate buffered saline</i>
DDS <i>Drug Delivery System</i>	PCL <i>Polycaprolacton</i>
	PDGF <i>platelet-derived-growth-factor</i>
EDTA <i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>	PEG <i>Polyethylenglykol</i>
EZM <i>Extrazellularmatrix</i>	PGA <i>Polyglykolsäure</i>
	PK <i>Positivkontrolle</i>
FGF <i>Fibroblast Growth Factor</i>	PLA <i>Polylaktatsäure</i>
	PLGA <i>Poly(lactid-co-glykolid)</i>
GV <i>Gesellschaft für Versuchstierkunde</i>	
	ROI <i>Region of Interest</i>
H.E. <i>Hämatoxylin-Eosin</i>	
HA <i>Hydroxylapatit, Hydroxylapatit</i>	SD <i>Standardabweichung</i>
HIV <i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>	SPARC <i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
HLA <i>Humanes Leukozytenantigen</i>	
	TCP <i>Tricalciumphosphat, Tricalciumphosphat</i>
ID <i>Identifikationsnummer</i>	TGF <i>transforming-growth-factor</i>
IGF <i>engl. Inulin-growth-factor</i>	TNF <i>Tumornekrosefaktor</i>
IgG <i>Immunglobulin G</i>	TRIS <i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
	TV <i>Total Volume</i>
KEM <i>Knochenersatzmaterial</i>	
KG <i>Körpergewicht</i>	VEGF <i>vascular-endothelial-growth-factor</i>
kgKG <i>Kilogramm Körpergewicht</i>	vWF <i>von-Willebrandt-Faktor</i>
LSAB <i>Labelled-Streptavidin-Biotin</i>	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kompakta mit angrenzender Spongiosa.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Spongiosabälkchens mit lamellärer Knochenstruktur und hellrotem, blutbildendem Knochenmark.	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Knochengewebes.	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Diamond Concepts.....	18
Abbildung 5: struktureller Aufbau eines BSP-Moleküls	32
Abbildung 6: 3D-gedruckter CPC-Scaffold.....	35
Abbildung 7: Haltung einer männlichen Wistar-Ratte im Alter von 6 Wochen	38
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Studienaufbaus;.....	39
Abbildung 10: 3 mm Bohrer.	41
Abbildung 10: Steriler OP-Tisch.	41
Abbildung 11: Versorgung der Augen mit Corneregel® (links) und Testen des Zwischenzehenreflexes (rechts).....	42
Abbildung 12: Operationsablauf.....	42
Abbildung 13: Implantation des Knochenersatzmaterials	43
<i>Abbildung 14: Präparation der des distalen Femurs für die μCT-Aufnahmen</i>	45
Abbildung 15: 3D-Rekonstruktion eines implantierten KEM (BMP-7-beschichtet)	46
Abbildung 16: LSAB-Methode schematisch dargestellt.....	53
<i>Abbildung 17: Feuchtkammer mit histologischen Schnitten</i>	54
Abbildung 18: Shandon-Kassetten mit eingelagerten Paraffinschnitten	55
Abbildung 19: Schematische Darstellung der systematischen Präparat-Auswahl für die immunhistochemische Färbung.....	57
Abbildung 20: μ CT-Aufnahme eines BSP-beschichteten KEM nach 4 Wochen	59
Abbildung 21: Subtraktion des dilatierten KEMs vom gesamten Binary.	60
Abbildung 22: Erstellung der Gesamt-ROI in Form eines Zylinders	60
Abbildung 23: schematische Darstellung der Aufteilung der Gesamt-ROI in Subzylinder (A,B,C) und Hohlzylinder (Zone 1-3).....	61
Abbildung 24: Aufteilung der Gesamt-ROI in drei Abschnitte (A,B,C) und drei Hohlzylinder (Zone 1-3).....	61
Abbildung 25: Verlaufskontrolle des rechten Femurs im Abstand von 2 Wochen.....	62
Abbildung 26: μ CT-Aufnahmen nach 4 (A) und 8 Wochen (B) jeder Versuchsgruppe.....	64
Abbildung 27: Coronare Sequenzen entlang der Longitudinalebene des BSP beschichteten Implantats	65
Abbildung 28: Axiale Bildsequenzen von medullär (links) nach kortikal (rechts) der Versuchsgruppe III (KEM+BSP).	65
Abbildung 29: Knochenanteil der gesamten ROI im Defektbereich nach 4 und 8 Wochen Heilungsprozess. ..	67
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Aufteilung der ROI in 3 Abschnitte (A,B,C)	68
<i>Abbildung 31A: Knochenanteil in verschiedenen Abschnitten nach 4 Wochen</i>	70
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Aufteilung der ROI	72
Abbildung 33A: Knochenanteil in verschiedenen Zonen (1-3) nach 4 Wochen (Angabe in %).	73

Abbildung 34: Gruppierete Übersichtsaufnahmen (x25) aller Versuchsgruppen nach 4 Wochen Heilungsprozess in H.E. sowie in M.G.- Färbung.	76
Abbildung 35: Übersichtsaufnahme (x25) der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) nach 4 Wochen Heilungsprozess (H.E.).....	77
Abbildung 36: Gruppierete Übersichtsaufnahmen (x25) aller Versuchsgruppen nach 8 Wochen in H.E. sowie in M.G.-Färbung.....	78
Abbildung 37: Übersichtsaufnahme (x25) der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) nach 8 Wochen Heilungsprozess (H.E.).....	79
Abbildung 38: Histologischer Schnitt einer Negativkontrolle in H.E. (links) und M.G.- (rechts) Färbungen nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung;	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 39: Histologische Schnitte der Versuchsgruppe II (KEM) in H.E. (links) und M.G. (rechts) nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung.	81
Abbildung 40: Histologische Schnitte der Versuchsgruppe III (KEM + BSP) in H.E. (links) und M.G. (rechts) nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung.	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 41: Histologische Schnitte der Versuchsgruppe IV (KEM + BMP-7) in H.E. (links) und M.G. (rechts) nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung.	82
Abbildung 42: Histologischer Schnitt einer BSP-Gruppe von Tier Nr.34 (a) und Tier Nr. 35 (b) in 100-facher Vergrößerung;.....	83
Abbildung 43: Übersichtsaufnahme (10-faches Objektiv) mit SPARC, OPN und vWF.....	84
Abbildung 44: Mit SPARC versetzte immunhistochemische Färbung	85
Abbildung 45: Mit Anti-OPN versetzte immunhistochemische Färbung der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) ...	85
Abbildung 46: Mit Anti-vWF versetzte immunhistochemische Färbung der Versuchsgruppe III (KEM+BSP)....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufteilung der Versuchsgruppen I-IV nach Materialeinsatz und Anzahl der Tiere pro Gruppe	37
Tabelle 2: Aufteilung der Versuchsgruppen I-IV in die Untergruppen A und B anhand der Untersuchungszeit	39
Tabelle 3: Narkoseprotokoll	40
Tabelle 4: Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe	49
Tabelle 5: H.E.-Färbeprotokoll	50
Tabelle 6: M.G.-Färbeprotokoll	51
Tabelle 7: Auflistung der Primärantikörper und ihrer Verdünnung	56
Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Ergebnisse (BV/TV) nach 4 und 8 Wochen im Vergleich.	68

1 Einleitung

Die Rekonstruktion des originalen Knochengewebes nach komplizierten Verletzungsmustern stellt in der Orthopädie und Unfallchirurgie weiterhin eine große Herausforderung dar. Ständige Umbauprozesse und kontrolliertes Regenerieren neuen Knochengewebes sind charakteristische Merkmale, die den Heilungsprozess nach Verletzungen auf autonome Weise ermöglichen. Knochendefekte und Frakturen können innerhalb von Wochen selbständig und durch alleinige Ruhigstellung ausheilen, ohne dass narbiges Ersatzgewebe verbleibt [3-5]. Osteosynthetische Verfahren dienen dabei als weitere Therapiemöglichkeit [6]. Trotz zahlreicher modernisierter Fixations- und Retentionssysteme kommt es weiterhin zu nicht ausheilenden, kritischen Knochendefekten und Ausbildung von Pseudarthrosen. 5-10 % aller Frakturen werden dabei als kompliziert eingestuft und weisen eine verzögerte oder ausbleibende Knochenheilung auf [7]. Betroffen sind meist segmentale Knochendefekte nach Hochrasanztraumata, Defektsanierung, Tumorresektionen oder ausgefallenen Infektionen, die zu kritischen Knochendefekten und häufigen Revisionsoperationen führen [8]. Als „kritisch“ werden Knochendefekte bezeichnet, wenn aufgrund zell- und molekularbiologischer Gegebenheiten keine Ausheilung möglich wäre [9]. In solchen Fällen muss durch den Einsatz von Knochenersatzmaterialien eine lokale Defektrekonstruktion erfolgen, um eine Knochenheilung zu induzieren. Hinsichtlich des heutigen Goldstandards bietet sich an dieser Stelle die autologe Knochentransplantation in Form einer Spongiosaplastik oder als Knochenspan an. Aufgrund seiner porösen Struktur, einer guten knöchernen Vitalität und dem Vorhandensein mesenchymaler Stammzellen bietet der autologe Knochenersatz die besten Voraussetzungen für einen optimalen und originalgetreuen Knochenersatz [10]. Im Rahmen des Diamond Concepts werden dabei die Bedingungen der Osteoinduktion und Osteokonduktion bei gleichzeitig vorhandenen osteogenen Potenzial für eine optimale Knochenheilung in einer mechanisch stabilen Umgebung erfüllt [1]. Leider kann die operative Entnahme am Beckenkamm Hämatome, langanhaltende Schmerzen oder Infektionen an der Entnahmestelle verursachen [11]. Zudem besteht für große Defekte eine Limitation aufgrund mangelnder Verfügbarkeit. Die Limitationen rein biologischer Knochenersatzmaterialien erfordern somit die Entwicklung neuartiger synthetischer Biomaterialien, welche die Bedingungen des Diamond Concepts erfüllen, frei verfügbar sind und den Patienten dabei nicht negativ beeinflussen. Dreidimensional -

gedruckte Keramiken aus Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat bilden dabei aufgrund ihrer biochemischen Ähnlichkeit zur Knochenmatrix eine vielversprechende Grundlage zur ossifizierenden Defektfüllung [12]. Molekularbiologische Oberflächenbeschichtung mit knocheneigenen Wachstumsfaktoren versprechen diverse Knochen-Implantat-Interaktionen. Wachstumsfaktoren wie Bone morphogenetic protein (BMP)-2 und -7 haben sich dabei als effektive Beschichtung zur Osteoinduktion in-vitro sowie in-vivo bewährt [13]. Bone Sialoprotein (BSP), ein nicht-kollagenes Protein der Extrazellulärmatrix, ist als Teil der SIBLING-Familie in den Knochenheilungsprozess eingebunden. Es spielt insbesondere zu Beginn der Knochenformation und im Mineralisationsprozess durch Bindung von Hydroxylapatit eine wichtige Rolle [15].

Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Ossifikation BSP-beschichteter Calciumphosphat-Zemente im Femurkondylendefektmodell der Ratte zu evaluieren. Als Trägermaterial für BSP wurde dabei ein 3D-gedruckter makroporöser Scaffold aus α -Tricalciumphosphat (TCP) und Hydroxylapatit (HA) verwendet. Bei 20 Wistar-Ratten wurden zylindrische Bohrlochdefekte mit einem Durchmesser von 3 mm in die lateralen Femurkondylen beider Beine erzeugt. Beladene sowie unbeladene Calciumphosphat-Scaffolds wurden in die Defekte implantiert, wobei in 10 Femora ein Leerdefekt belassen wurde. Die BSP-Gruppe stellt dabei das Hauptexperiment dar, während die Implantation BMP-7-beschichteter sowie unbeschichteter Scaffolds die Kontrollgruppen bilden. Nach Untersuchungszeiträumen von 4 und 8 Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Anschließend wurden μ CT-Scans sowie histologische Paraffinschnitte angefertigt. Neben der qualitativen Auswertung der Histologie und Immunhistochemie erfolgte eine quantitative Ermittlung des Knochenvolumens über das Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen (BV/TV) mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms Image J.

Ziel dieser Arbeit ist somit die Evaluation des BSP-induzierten Knochenwachstums hinsichtlich einer schnelleren Osseointegration des Calciumphosphat-Scaffolds und der Prämisse, ob dadurch eine größere Vielfalt an Knochenersatzmaterialien für den klinischen Gebrauch in der Orthopädie und Unfallchirurgie etabliert werden kann.

2 Aktueller Stand der Literatur

2.1 Osteogenese und Ossifikation

2.1.1 Knochenaufbau und Struktur

Knochengewebe stellt festes und flexibles Bindegewebe dar, das zum größten Teil aus mineralisierter, extrazellulärer Knochenmatrix gebildet wird. Diese besteht zu 30% aus organischem Material, d. h. aus Kollagen Typ I (90 %) und kleineren Proteinen und Proteoglykanen (10 %). Ein weitaus größerer Teil (70 %) besteht neben Wasser (20 %) aus anorganischem Calciumphosphatsalzen, dem Hydroxylapatit, welches die Kollagenfibrillen umschließt und dem Knochen seine Härte verleiht (siehe Abbildung 3) [16, 17]. Als Osteoid bezeichnet man unreife, weiche Knochenmasse aus organischen Material, das von Osteoblasten sezerniert wird und zu Beginn der Osteogenese gebildet wird [18]. Histologisch lässt sich anfangs gebildeter, unreifer Geflechtknochen durch die unstrukturierte Anordnung der Kollagenfasern ohne feste Struktur erkennen. Es bildet sich ein Netz aus Knochenbälkchen, welches ständigen Umbauprozessen unterliegt. Diese Knochen trabekel weisen eine geringere Knochendichte auf, sind elastischer und haben eine höhere Umbaurate, als kortikaler Knochen [19]. Durch voranschreitende Ossifikation differenziert sich Geflechtknochen zu strukturfesteren und belastungsfähigeren Lamellenknochen [3, 19, 20]. Die Kollagenfibrillen werden dabei parallel und geordnet abgelagert, sodass sich im äußeren Bereich des Knochens eine feste und dichte Knochenmatrix, die Kompakta ausbildet. Diese bildet den größten Teil der Knochenmasse (80 %) in langen Röhrenknochen [16]. Strukturell bilden sich kreisrunde Osteone aus, die durch gefäßreiche Havers-Kanäle durchsetzt sind und der Kompakta biomechanische Stabilität verleihen [3, 20]. Im Innern befindet sich weiterhin Geflechtknochen, der die Spongiosa in Form von Knochenbälkchen bildet. Die Hohlräume werden durch sekundäres, blutzellbildendes Knochenmark ausgefüllt und vom Endost umhüllt. Die Kompakta wird außen von dem blut- und lymphgefäßreichen Periost umgeben, welches viele Nervenfasern enthält und sehr schmerzempfindlich ist. Endost und Periost weisen osteogenes Potential auf und haben damit eine wichtige Funktion in der Knochenheilung (siehe Abbildung 1) [21]. Makroskopisch werden lange Röhrenknochen in Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse eingeteilt und enthalten große Anteile hämatopoetischen Knochenmarks [22]. Dadurch wird eine Blutversorgung intraossär vom Mark ausgehend in die Peripherie gewährleistet.

Zudem versorgen anatomisch zugeteilte Gefäße die Kortikalis periostal. Die femorale Metaphyse wird dabei über zahlreiche kleine Arterien, die von außen in das Periost eintreten, versorgt [23-26].

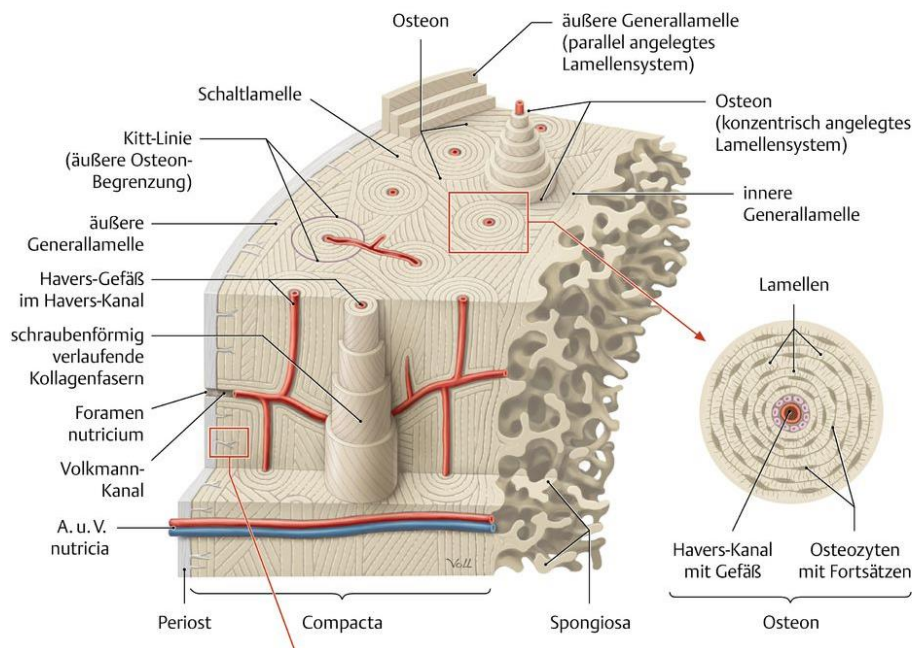


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kompakta mit angrenzender Spongiosa. Der Lamellenknochen wird durch kreisrunde Osteone gebildet und mit Havers-Kanälen durchsetzt (nach Schulte E. et al. [2])

2.1.2 Zelluläre Bestandteile und Knochenmetabolismus

Im Prozess der Osteogenese sind eine Reihe funktioneller Zellen beteiligt, die den Knochenauf- und -abbau regulieren. Dazu gehören mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten sowie Osteoklasten. Im Knochenmark reifen mesenchymale Stammzellen (MSCs) heran, die sich abhängig vom Stimulus zu Vorläuferzellen der Osteoblasten, den Osteoprogenitorzellen (OPZ), differenzieren [27]. Des Weiteren können Faktoren wie BMPs, Parathormon und Vitamin D die Proliferationsreihe steuern. Bei Knochendefekten werden diese Faktoren aktiviert und die OPZ entwickeln sich zu Osteoblasten weiter, um das appositionelle Dickenwachstum zu induzieren. Histologisch sind sie als schmale, hellkernige Zellen in der Kambiumschicht (Stratum osteogenicum) des Periosts und Endosts erkennbar [3, 18, 21].

Osteoblasten

Die Hauptfunktion von Osteoblasten während des Knochenstoffwechsels ist die Bildung von Knochenmatrix. Sie sitzen perlschnurartig vernetzt an der Oberfläche des wachsenden Knochens und sezernieren unter anderem Kollagen, Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin, Osteoprotegerin zur Ausbildung weicher, unreifer Knochenmatrix (Osteoid) [21]. In ihrer Membran befindet sich Alkalische Phosphate, ein wichtiges Enzym bei der Mineralisation der Matrix. Zudem besitzen Osteoblasten Rezeptoren für Parathormon und können die Knochenresorption einleiten, indem sie über Zytokinfreisetzung Osteoklasten stimulieren [18]. Bei Inaktivität entwickeln sich Osteoblasten zu Osteozyten und verbleiben als endostale Saumzellen im Ruhezustand oder gehen apoptotisch zugrunde [29]. Mit zunehmendem Alter nimmt der Anteil der Osteoblasten deutlich ab [3, 28, 30]. Die Anordnung der beteiligten Zellen im Prozess des Knochenumbaus im Bereich der Spongiosa ist in Abbildung 2 dargestellt.

Osteozyten

In der Knochenmatrix eingemauert befinden sich inaktive Osteozyten mit verzweigten Ausläufern. Sie dienen als Mechanosensoren und registrieren Belastung sowie Immobilisation, um den normalen Knochenhaushalt zu regulieren. Über den Einfluss in den Calcium- und Phosphathaushalt tragen sie zum Erhalt der Knochenmatrix bei [21].

Osteoklasten

Diese Zellen sind im Knochenstoffwechsel für die Knochenresorption zuständig. Diese differenzieren sich aus MSC, wobei sich zunächst Osteoklastenvorläuferzellen entwickeln, die zu mehrkernigen Riesenzellen verschmelzen. Osteoklasten sind an der Knochenoberfläche lokalisiert und bilden Howship-Lakunen aus, in denen die Matrixresorption stattfindet. Mittels Säure und lysosomalen Enzymen werden die Calciumsalze aufgelöst, um die Knochenmatrix mobilisieren und anschließend resorbieren zu können [21, 31-33].

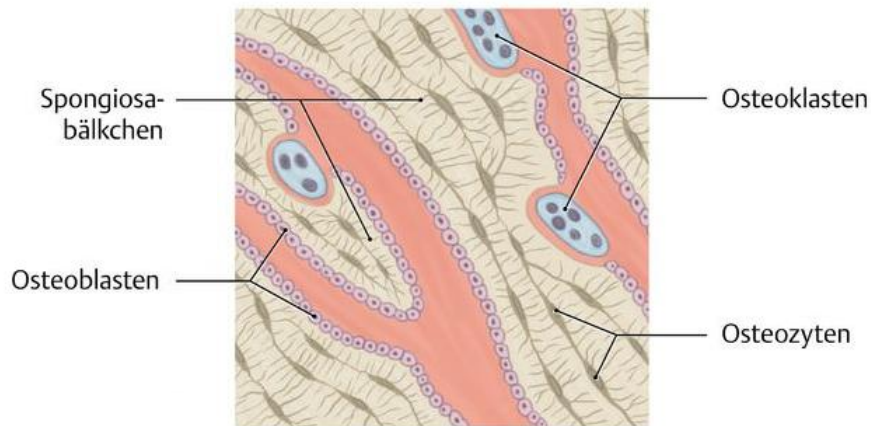


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Spongiosabälkchens mit lamellärer Knochenstruktur und hellrotem, blutbildendem Knochenmark.

Osteoblasten lagern sich saumartig entlang der Trabekel an. Die Osteoklasten bilden Howship-Lakunen aus und resorbieren Knochen an der Oberfläche. Osteozyten sind im in den Lamellenknochen eingelagert und weisen zahlreiche Ausläufer auf. Quelle: Schünke U, Schulte E, Schumacher U et al. [2]

2.1.3 Matrix

Die organischen Bestandteile der Knochenmatrix wird aus dem Hauptstrukturprotein Kollagen Typ I (90%) und nicht-kollagenen Proteinen (10%), die multiple Funktionen, wie die Regulation der Knochenmineralisierung und die Zellaktivität steuern, zusammengesetzt (siehe Abbildung 3) [3]. Diese Proteine werden teils exogen über die Blutbahn herangezogen oder in Osteoblasten produziert und durch Wachstumsfaktoren (z.B. BMPs), Somatomedine und zum Teil durch Vitamin D3 stimuliert [21, 34, 35]. Nicht-kollagene Proteine können in verschiedene Kategorien u. a. Glykoproteine, oder γ -carboxylierte Proteine unterteilt werden. Osteocalcin wird dabei eine Funktion als Promotor der Calciumablagerung zwischen den Enden der Kollagenfibrillen zu Beginn der Mineralisation zugeschrieben. Es reguliert aber gleichzeitig auch die Aktivität von Osteoklasten und deren inhibitorische Wirkung auf die Ossifikation. Osteopontin (OPN) inhibiert die Mineralisation und den Knochenumbau [28]. Alkalische Phosphatase wird an der Membranoberfläche gebunden oder liegt frei in der Knochenmatrix vor und stabilisiert diese [36]. Den größten Anteil der nicht-kollagenen Proteine bildet Osteonectin und macht 2% des gesamten Proteins in neugebildeten Knochen aus. Osteonectin besitzt eine Funktion

in der Proliferation von Osteoblasten und der Regulation des Durchmessers von Kollagenfibrillen [37]. Ein weiteres Protein, welches die Mineralisation der Matrix initiiert, ist das BSP. Es stellt ein Calcium- und Phosphat-bindendes nicht-kollagenes Proteine dar und koordiniert u. a. die Ablagerung der Matrix, indem es die Menge und die Größe der HA-Kristalle formt [37].

Die Mineralisierung der Matrix erfolgt durch anorganische Calciumphosphatkristalle ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), welche sich wahrscheinlich in Form von kleinen Vesikeln von Osteoblasten abschnüren und in die Matrix einlagern. Diese Vesikel enthalten die nötigen Proteine, Phospholipide, Calcium und Phosphate, um HA-Kristalle zu bilden. Nach Ausbildung von calciumphosphathaltigen Kristallen können diese an sich Kollagenfibrillen lagern und die Matrix erweitern [3]. Vitamin D und Parathormon regulieren die Calciumhomöostase und bestimmen damit die Festigkeit und Härte des Knochens [38]. Anorganische Knochenminerale bilden 50% der Knochenmasse und gewährleisten dadurch mechanische Festigkeit und Belastbarkeit, während organische Matrix dem Knochen Elastizität und Flexibilität verleiht [3, 16, 21]. Ein Großteil der Knochenstärke wird durch die Knochenmasse gewährleistet, während Geometrie und Komposition des Knochens eine kleinere Rolle spielen. Größere Knochen sind bei gleicher Matrixdichte stärker als kleine Knochen [3].

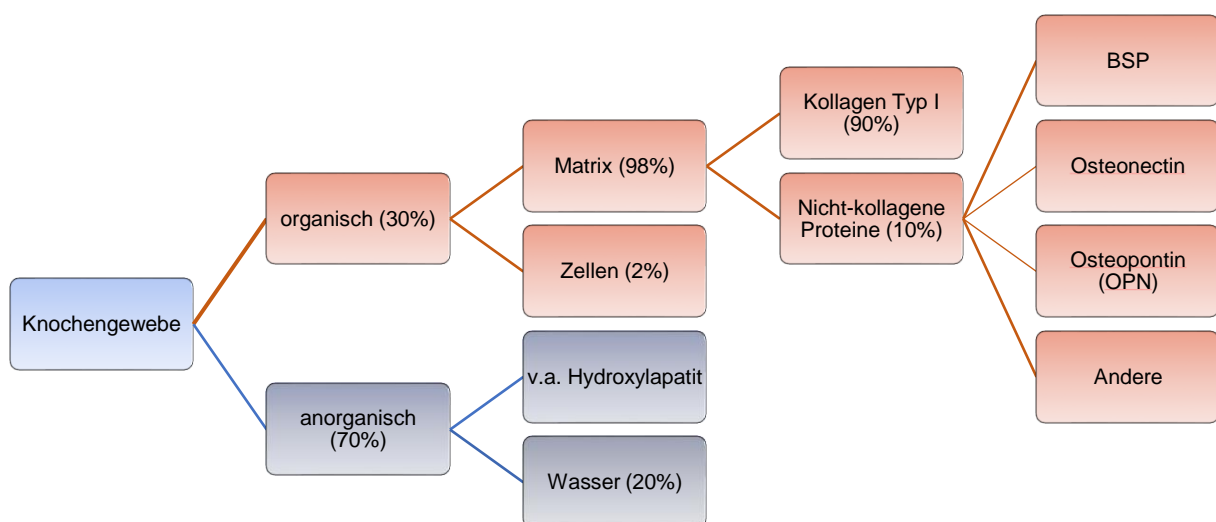


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Knochengewebes. Die Matrix wird aus Kollagen Typ I und nicht-kollagenen Proteinen gebildet.

2.1.4 Knochenumbau

Knochengewebe unterliegt einem ständigen Umbau durch Resorption des alten Knochens und Ersatz durch neu synthetisierte, mineralisierende Knochenmatrix. Dabei werden 2-5% des kortikalen Knochens und 18% des gesamten Skelettcalciums pro Jahr umgesetzt [19, 21]. Durch diesen Prozess wird die Strukturfestigkeit des Knochens und die Calciumhomöostase aufrecht erhalten [3, 39]. Außerdem werden Schäden des Skeletts, wie Mikrofrakturen, behoben und das Skelett so an biomechanische Belastungen angepasst [3, 19, 40, 41]. Eine organisierte Gruppe aus Osteoblasten und Osteoklasten bilden die „Bone multicellular unit“ (BMU) und arbeiten sich durch den kompakten Knochen in Form eines Bohrkanals oder oberflächlich an spongiösen Knochen entlang [19, 21, 44]. Der Ablauf kann in drei Phasen unterteilt werden: die Resorptionsphase unter Beteiligung der Osteoklasten, die Umkehrphase mit mononukleären Zellen und die Knochenbildungsphase unter der Beteiligung von Osteoblasten und Osteozyten [19, 44, 45]. Durch Rekrutierung von Osteoklastenvorläuferzellen kommt es zunächst zur Ausbildung aktivierter polyploider Zellen, welche die Matrix unter sauren pH-Wert auflösen. Diese Phase, bis der alte Knochen resorbiert wird, dauert ca. 2-4 Wochen. In der anschließenden vierwöchigen Umkehrphase lagern sich mononukleäre Zellen oberflächlich an den Knochen an und leiten die anschließende Knochenbildungsphase durch Stimulierung der Osteoblasten ein. In der Knochenbildungsphase lagern sich Osteoblasten an und sezernieren Osteoid, welches zunehmend über 4 Monate hinweg mineralisiert wird. Dies geschieht solange, bis alter Knochen vollständig resorbiert und durch neue Knochenmatrix ersetzt wurde. Schlussendlich setzt eine Ruhephase ein, solange bis ein neuer Zyklus beginnt [19].

2.1.5 Chondrale Ossifikation

Die Ossifikation von langen Röhrenknochen in der Organogenese erfolgt indirekt durch Ersatz des fetal angelegten knorpeligen Skeletts durch Knochengewebe bis zum Abschluss des Längenwachstums [46]. Embryonale MSCs differenzieren, anders als bei der desmalen Ossifikation, zunächst zu Chondroblasten und bilden ein knorpeliges Gerüst. Dieser Knorpel wird zunehmend abgebaut und durch Knochengewebe ersetzt [46-48]. Der Prozess der chondralen Ossifikation wird durch Interaktionen mit lokalen Wachstumsfaktoren, Hormonen und Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (EZM) reguliert [46, 49-51]. Dabei wird zwischen der

perichondralen Ossifikation, die in Form einer Knochenmanschette außen in die Länge wächst und der enchondralen Ossifikation, die in Knorpelhöhlen verschiedene Stadien durchläuft, unterschieden [52]. Ausdifferenzierte Chondrozyten hypertrophieren zu Blasenknorpel, der sich mittig im Bereich der Diaphyse ausbreitet und zunächst einen weichen, knorpeligen Kallus bildet [53]. OPZ sprießen in das primäre Ossifikationszentrum ein, entwickeln sich zu Osteoblasten und sezernieren Osteoid, sodass es zunehmend zur Bildung mineralisierter Knochenmatrix unter Abbau des primären Knorpelkerns kommt [46, 54-57]. Es bildet sich eine Knochen-Knorpel-Grenze aus, die in Richtung der Epiphysen wandert und die Zonen angrenzenden Säulenknorpels verkleinert. Im Bereich der Epiphysen befindet sich ein sekundärer Knorpelkern, der auf gleiche Weise ossifiziert und durch die knorpelige Epiphysenfuge vom primären Knochenzentrum getrennt ist [58, 59]. Die Epiphysenfuge ist reich an Knorpel und Gefäßen, sie ossifiziert nach Ende des Knochenwachstums, wenn sich die primären und sekundären Knochenkerne vereinen [46, 60].

2.2 Frakturlehre

2.2.1 Primäre und sekundäre Knochenheilung

Nach Frakturen müssen die ursprüngliche Anatomie und Funktionalität des Knochens wiederhergestellt werden. Dies wird durch ausreichende Durchblutung, die biologischen Prozesse des Knochenumbaus und den Einfluss mechanischer Komponenten beeinflusst [61]. Es wird zwischen primärer bzw. direkter Knochenheilung, bei der die Fraktarenden adaptiert sind und sekundärer Frakturheilung unterschieden. Liegen die Fraktarenden maximal 0,15 mm auseinander und weisen weniger als 2% intrafragmentärer Bewegung auf, können osteogene Zellen eine Brücke zum gegenüberliegenden Fragment bilden und einen Kallus aufbauen [53, 62]. Häufig liegt nach einem Trauma jedoch ein breiterer Frakturspalt vor, der durch Gewebeverletzung nach 3-5 Tagen von einem Hämatom ausgefüllt wird [63]. Im Rahmen der Entzündungsreaktion wandern Makrophagen, Monozyten, Leukozyten und Fibroblasten ein, die den bindegewebigen Kallus ausbilden. Durch freigesetzte Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukine und Wachstumsfaktoren wie Insulin-growth-factor (IGF), transforming-growth-factor (TGF)- β oder platelet-derived-growth-factor (PDGF) werden MSCs, knochenbildende Zellen sowie Entzündungszellen chemotaktisch angezogen und zur Proliferation angeregt [63]. Die Freisetzung von BMPs dient dabei der

Differenzierung von MSCs und Vorläuferzellen in reife Chondroblasten und Osteoblasten. Ihnen wird des Weiteren eine wichtige regulatorische Funktion in der Chondro-Osteogenese bezüglich Chemotaxis, Angiogenese und kontrollierter Synthese der EZM zugeschrieben [53, 64, 65]. BMP-2 wird dabei eine osteoinduktive Funktion in Bezug auf knochenbildende Zellen des Periosts und des Knochenmarks zugeschrieben [63]. Des Weiteren sezernieren ausdifferenzierte Osteoblasten, ausgehend vom Periost, knöchernen Matrix auf desmalen Weg [53, 64]. Dadurch wird ein provisorischer harter Kallus gebildet, der über 16-21 Tage mechanische Stabilität gewährleistet, jedoch noch nicht voll belastbar ist [63]. Gemäß der chondralen Ossifikation wird der knorpelige Kallus zunehmend durch den Einfluss von Osteoblasten mit Geflechtknochen ersetzt und durch Umbauprozesse in festen Lamellenknochen umgewandelt [20, 63]. Durch angiogenetische Faktoren wie vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) sprießen Gefäße in den neugebildeten Knochen ein und vitalisieren diesen [63, 65]. Die Dauer der knöchernen Konsolidierung ist individuell unterschiedlich und abhängig von Frakturtyp und Lokalisation, sie dauert jedoch mindestens 6 Wochen [66].

2.2.2 Knochenheilungsstörung und Pseudarthrosen

Insbesondere bei langen Röhrenknochen kann operativ durch Reposition und interne Fixierung eine Konsolidierung der Fraktur auf physiologischen Weg erreicht werden. Circa 10% aller Frakturen und 16% der Femurfrakturen weisen jedoch trotzdem eine verzögerte (nach 4-6 Monaten) oder gar eine ausbleibende Knochenheilung (>6-8 Monate) auf [63, 67, 68]. Bei einer ausbleibenden Frakturheilung nach 8 Monaten ist mit keiner spontanen Heilung zu rechnen und es bildet sich eine Pseudarthrose aus [69, 70]. Andere definieren eine Pseudarthrose bei ausbleibender Konsolidierung nach 9 Monaten und fehlender Anzeichen einer Knochenheilung innerhalb der ersten 3 Monate [62]. Knochenheilungsstörungen stellen eine verheerende Komplikation und Herausforderung für Patienten und Ärzte dar, da sie häufig mit Revisionsoperationen und langen Behandlungsintervallen assoziiert sind [71]. Der Heilungserfolg von Knochenbrüchen wird durch lokale Faktoren wie Weichteilverletzungen sowie von biologischen Faktoren wie dem Knochenstoffwechsel beeinflusst [63, 71]. Immobilisation und Stabilität beeinflussen die Knochenheilung positiv. Dies impliziert, dass eine erhöhte Beweglichkeit im Frakturspalt die Knorpel- und Knochenbildung verzögern und die Angiogenese behindern [63]. Die Bewegung führt zum wiederholten Brechen der knöchernen

Überbrückung und zur Hypertrophie von Kallus in der Peripherie des Frakturspaltes, ohne dass eine stabile knöcherne Durchbauung stattfindet [66]. Eine geringe interfragmentäre Beweglichkeit im Mikrometerbereich sowie eine axiale Belastung des Skeletts in frühen Stadien erweist sich dagegen durch Stimulation von Osteoblasten als förderlich [62, 72]. Atrophe Pseudarthrosen entstehen dagegen aufgrund eingeschränkter biologischer Funktionen durch unzureichende Durchblutung oder Infektionen im Defektbereich [69, 71, 73].

2.3 Kritische Knochendefekte

2.3.1 Definition

Unter kritischen Knochendefekten (engl. CSD, critical size defect) versteht man segmentale Knochenverluste bestimmter Größe, die spontan nicht knöchern ausheilen würden [74, 75]. Trotz chirurgischer Interventionen, wie Osteosynthesen oder Ersatz des Defektes durch autologes Knochenmaterial, heilen bestimmte Defekte nur unter Ausbildung eines bindegewebshaltigen Kallus aus und erfordern weitere Maßnahmen, um eine Knochenheilung zu erreichen [9]. Die genaue Definition eines Knochendefektes kritischer Größe wird in der Literatur nicht einheitlich festgelegt und ist abhängig von der Lokalisation und der vorherrschenden Weichteilverhältnisse [74]. Defekte des Femur heilen aufgrund der guten Weichteildeckung und Perfusion grundsätzlich besser aus als an der Tibia [75]. Ursachen solcher Knochendefekte mit Knochenverlust sind multifaktoriell und treten im Rahmen offener Frakturen, Hochrasanztraumata, Infektsanierung oder nach Tumorsektionen auf. Segmentale Defekte einer Größe >2 cm und einem Umfangsverlust von über 50% können nur mit geringer Wahrscheinlichkeit spontan ausheilen und erfordern eine weiterführende Intervention [75]. Im Tiermodell hat sich gezeigt, dass eine Defektgröße von mehr als 2 mm die spontane Knochenheilung verhindert und die Vaskularisation und die Zelldifferenzierung indirekt beeinflusst [76]. Man definiert hier einen kritischen Knochendefekt anhand der Tatsache, dass es während der Lebenszeit des Tieres nicht zu einer vollständigen Konsolidierung kommt bzw. die Regeneration des Knochengewebes weniger als 10% beträgt [9, 75]. Neben der anatomischen Lage und den Weichteilverhältnissen ist der Heilungsprozess von weiteren Faktoren wie der Verletzung des Periosts, dem Alter, Komorbiditäten, der Knochenstruktur, dem Metabolismus, mechanischer Belastung sowie davon, ob der Defekt aus einem partiellen oder segmentalen Verlust besteht, abhängig [75, 77]. Im Gegensatz zur Pseudarthrose ist in diesem Fall eine

adäquate biologische Funktion vorhanden, wobei die Problematik im Verlust des Knochens besteht und eine Auffüllung mit Knochenersatzmaterial (KEM) erfordert [9, 75, 78, 79].

2.3.2 Bohrlochdefekt im Kleintiermodell

In-vivo Untersuchungen nutzen Tiermodelle, um physiologische und pathologische Reaktionen zu sammeln und die Ergebnisse für die Etablierung einer klinischen Intervention zu integrieren. Sie dienen somit als Verbindung zwischen vorangegangenen in-vitro-Studien und klinischen Versuchen, um sich den realen Gegebenheiten anzunähern. Im Bereich der Knochenregeneration sind Kleintiermodelle erste Wahl zur Untersuchung der Ossifikation kritischer Knochendefekte, da sie eine Vielzahl relevanter Aussagen über verschiedene Zellpopulationen geben [80, 81]. Sie liefern erste Erkenntnisse über die Interaktion eines Implantats mit dessen biologischer Umgebung und geben Auskunft über die physiologischen, biomechanischen und hormonellen Funktionen. Zudem steht ihr Skelett lebenslang unter einem ständigen Knochenumbau, wobei auch die Wachstumsfugen stets offen bleiben [82, 83]. Durch ihre verkürzte Lebenszeit, kann auch der Einfluss des Alterns auf den Knochenstoffwechsel und die Knochenheilung beurteilt werden. Man unterscheidet heterotopische und orthotopische Modelle, die abhängig von der Umgebung des autologen Knochens eingeteilt werden. Häufig wird zunächst ein heterotopischer Ansatz (d. h. subkutane oder intramuskuläre Injektionen) untersucht, um die einzelnen Schritte des Verknöcherungsprozesses nachvollziehen zu können [84, 85]. Im Rahmen von intraossären Defekten wird häufig ein orthotopischer Knochenersatz gewählt, bei dem ein direkter Kontakt zu autologen Knochen besteht. Dadurch können die Materialeigenschaften anhand diskontinuierlicher und gewichtsbelasteter Läsionen beurteilt werden [82]. Häufig wird in Bezug auf Knochenheilung von kraniofazialen Defekten das Modell des Schädelknochens der Maus oder der Ratte angewandt [86-90]. Hierbei gilt als kritischer Knochendefekt ein Defekt von 8 mm Durchmesser bei der Ratte und 5 mm bei der Maus [91]. Zur Untersuchung der biologischen Prozesse unter biomechanischer Belastung eignen sich dahingehend Defektlokalisationen am Femur, an Tibia oder Mandibula [92]. Diese Modelle sind besonders zur Untersuchung der Biokompatibilität, Oberflächenosteokonduktion, Toxizität und Abbaurate von Knochenersatzmaterialien unter mechanischer Belastung nützlich [82].

2.4 Therapieoptionen

2.4.1 Das Diamond Concept

Knochendefekte kritischer Größe und Pseudarthrosen bedürfen einer Therapie, die es ermöglicht, unter erschwerten Bedingungen die knöcherne Kontinuität und Stabilität wiederzuerlangen. Knochenersatzmaterialien dienen nach heutigem Standard der Auffüllung von Knochendefekten nach Traumata oder Knochenerkrankungen und ermöglichen die Wiederherstellung mechanischer Stabilität. Es gibt eine Reihe verschiedener Knochenimplantate, die abhängig von der Defektgröße und dem zu ersetzenden Volumen, den biomechanischen Eigenschaften, der chemischen Zusammensetzung, der gewünschten Resorptionsrate sowie der Verfügbarkeit gewählt werden. Außerdem werden unerwünschte Nebenwirkungen, Kosten und ethische Fragestellungen mit in die Auswahl des Ersatzmaterials einbezogen [101]. Um den Knochenheilungsprozess zu optimieren muss daher ein KEM gewählt werden, welches den genannten Anforderungen gerecht wird und dabei eine Zusammensetzung aufweist, die eine Ossifikation im Defektbereich auf biologischen Weg ermöglicht. Das Diamond Concept stellt dabei einen konzeptionellen Rahmen für bestimmte Parameter und Kofaktoren der optimalen Knochenheilung da. Voraussetzung für die Knochenheilung nach diesem Konzept sind Zellpopulationen mit osteogenen Potenzial, d. h. das Vorhandensein von MSCs, OPZ und Osteoblasten. Diese sind physiologisch in der Kortikalis, dem Periost, im Weichteilgewebe und im stammzellreichen Knochenmark zu finden [102]. Eine vitale Umgebung des Defektes ist dabei für das Überleben solcher Zellen von großer Bedeutung. Über osteoinduktive Stimuli können sich MSCs des Knochenmarks in die osteoblastische Zelllinie differenzieren und somit die Osteogenese induzieren. Zu diesen Stimuli zählen Wachstumsfaktoren wie IGF, fibroblast growth factor (FGF), PDGF, VEGF, BMPs, Metalloproteinasen und Signalmoleküle wie Interleukine und Zytokine. Diese werden von Endothelzellen, Makrophagen und Monozyten sezerniert. Sie befinden sich physiologisch in der EZM und werden im Rahmen der Entzündungsreaktion vermehrt im Frakturhämatom angesammelt. Im Bereich des Kortex stimuliert Osteocalcin periostal gelegene Osteoblasten zur Ausbildung eines harten Kallus durch Produktion von Kollagen Typ I [62]. Ein weiterer Faktor des Diamond Concepts ist eine osteokonduktive Matrix als Leitschiene des Knochenwachstums zur Überbrückung des Defektes. Diese sollte eine poröse Struktur mit spezieller Makro-

und Mikroarchitektur zur Adhäsion und Migration knochen- und gefäßbildender Zellen aufweisen [1]. Trabekulärer Knochen der Spongiosa oder kollagenreiche demineralisierte Matrix sind dabei die körpereigenen Gerüste, die eine Ossifikation ermöglichen. Der vierte Aspekt betrachtet die mechanische Stabilität der Fraktur und ordnet ihr einen hohen Stellenwert im spontanen Heilungsprozess zu. Die Stabilität kann durch Schienen, Gipsverbände, Marknägel, interne Fixierung (engl. open reduction internal fixation, ORIF) oder auch extern über spezielle Fixationssysteme gewährleistet werden [1]. Diese osteosynthetischen Verfahren bestimmen die Rigidität des Defektes, die relative und absolute Frakturstabilität sowie die interfragmentäre Beanspruchung [1, 102].

Weitere Voraussetzungen, die neben den Hauptfaktoren in die Knochenheilung eingehen sind u. a. die Vaskularisation und Weichteildeckung sowie das physiologische Profil des Patienten. Eine gute Durchblutung ist essenziell für den Transport metabolischer Produkte und die Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen, Signalmolekülen sowie von Vorläuferzellen. Die Genetik, Alter und Komorbiditäten des Patienten sind individuelle Gegebenheiten, die den Knochenheilungsprozess relevant beeinflussen [102].

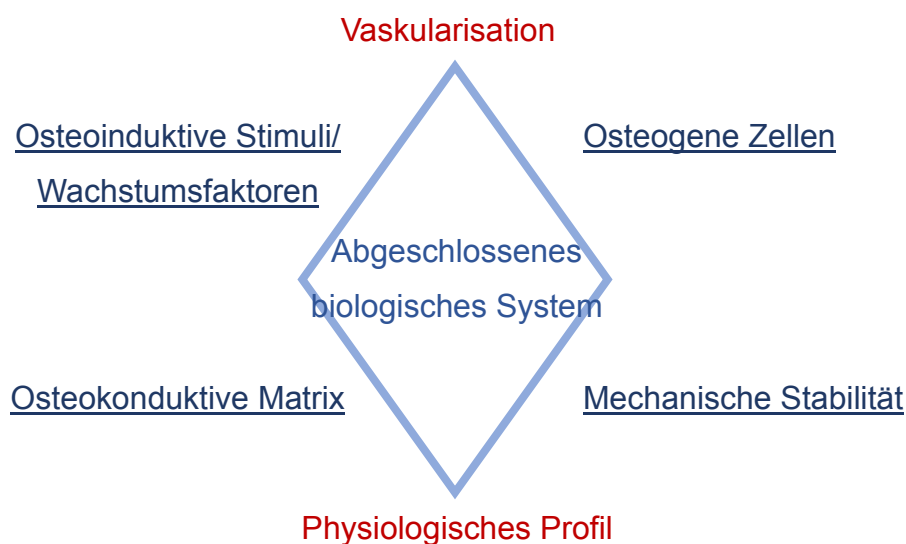


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Diamond Concepts
Angelehnt an Giannoudis et al.[1]

Des Weiteren sollte die Qualität und die Knochendichte des vorliegenden Knochengewebes sowie die biomechanischen Umstände d. h. das Belastungsmuster berücksichtigt werden [102]. Die Prinzipien des Diamond Concepts lassen die besten

Ergebnisse in einem eingedämmten biologischen Umfeld erwarten (Abbildung 4). Die biophysiological Prozesse im Rahmen der Knochenheilung sollten demnach möglichst lokal im Bereich des Knochendefektes eingegrenzt werden, um eine maximale Wirkung erzielen zu können. Dies kann durch Modifikation der Weichteildeckung, Biomembranen oder Dichtungsmassen erreicht werden [62].

2.4.2 Der Goldstandard

Der aktuelle Goldstandard der Knochenersatzverfahren ist nach wie vor die autologe Spongiosaplastik [103-105]. Bei dieser Methode wird körpereigenes Material für gewöhnlich aus dem Beckenkamm aber auch aus den Rippen, der Tibia, Fibula oder dem Kalkaneus entnommen und heterotop an Stellen des Defektes implantiert. Autogener Knochen wird dabei als ideales Transplantat angesehen, da es osteogene Zellpopulationen (u. a. MSCs), osteoinduktive Signalmoleküle (Wachstumsfaktoren, Zytokine) sowie eine osteokonduktive Matrix in Form poröser Spongiosa mit großer Oberfläche aufweist [106, 107]. Zudem kann körpereigenes Knochenmaterial während orthopädischer Operationen gewonnen und reimplantiert werden, ohne dass ein zusätzlicher Eingriff nötig ist [101, 103]. Die Entnahme beinhaltet reine Spongiosa oder eventuell einen vaskularisierten Knochenspan, der spongiosen als auch kortikalen Knochen enthält und ein geringeres Nekroserisiko aufweist [101]. Aspiriertes Knochenmark aus dem Femur oder verarbeitete osteogene Zellen zählen des Weiteren zu autologen Transplantaten [108]. Die trabekuläre Struktur der Spongiosa weist eine deutlich höhere metabolische Aktivität als kortikaler Knochen auf und induziert zudem eine Revaskularisation und schnelle Eingliederung in den umliegenden Knochen [104]. Vaskularisierte Transplantate können bei adäquaten vaskulären Anastomosen mehr als 90 % der Osteozyten erhalten und ermöglichen somit eine raschere und stabilere Osseointegration [104]. Die Nachteile des autologen Knochenersatz liegen in der Gewebeverletzung an der Entnahmestelle, wodurch es zu lokalen Hämatomen, chronischen Schmerzen über Monate hinweg, Sensibilitätsstörungen sowie Infektionen aufgrund langer Liegedauer kommen kann [11]. Zudem können größere Defekte aufgrund des limitierten Knochenvolumens nicht ausreichend ersetzt werden und es müssen auf weitere Ressourcen zurückgegriffen werden [10, 101, 103, 109-111]. Trotz guter Voraussetzungen des Knochenimplantats beträgt die allgemeine Misserfolgsrate 50% aufgrund fehlerhafter Entnahme, Implantation und Unterschiede

in der Knochenvitalität und Patientenverfassung. In langen Röhrenknochen konnte hingegen eine Heilungsrate von 60-100 % festgestellt werden [10].

2.4.3 Alternativer Knochenersatz

Eine gute Alternative zum autologen Knochenersatz bietet allogenes Knochenersatzmaterial eines Spenders. Allogener Knochenersatz wird dadurch definiert, dass das Material von einem Individuum entnommen und in einem anderem Individuum der gleichen Spezies implantiert wird [108]. Dadurch kann die lokale Entnahmestellenmorbidity inklusive der Schmerzen vermieden werden. Zudem ist ein größeres Volumen verfügbar und das Transplantat ist relativ leicht zu besorgen. Es wird entweder von Leichen oder Lebendspendern entnommen, wie z. B. der Hüftkopf, der bei einer Hüftgelenkersatz-OP entfernt wird [101]. Allogenes Knochenmaterial weist gute osteokonduktive und biomechanische Eigenschaften aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Matrix auf. Die Qualität des Transplantats ist jedoch spenderabhängig und zeigt dementsprechend unterschiedliche Ergebnisse in der Ossifikation. Die Osteoinduktivität ist abhängig von der Fülle an Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen und wird durch den Prozess der Aufbereitung, Sterilisation und Aufbewahrung wesentlich beeinflusst [10]. Durch Implantation von nicht-eigenem Knochenmaterial besteht das Risiko der immunogenen Abstoßungsreaktion und der Übertragung von Krankheiten. Die Spender werden daher auf mögliche Übertragungskrankheiten wie HIV oder Hepatitis A & B serologisch getestet. Außerdem werden bakteriologische Abstriche während der Explantation entnommen und es folgt eine 6-monatige Tiefkühlung [101]. Um die Immunreaktion gegen das Implantat zu vermeiden, werden vorher alle zellulären Komponenten des Knochens entfernt. Dadurch kann das Material auch ohne vorangegangene HLA-Gewebetypisierung oder ABO-Blutgruppenbestimmung transplantiert werden. Während die osteokonduktiven Eigenschaften der Knochenmatrix weiterhin vorhanden sind, geht das osteogene Potenzial des Transplantats dadurch verloren und ist dem autologen Transplantat daher unterlegen [101]. Allogenes Material kann in Form von Puder, Granulat, spongioser und kortikaler Chips, Streifen oder Blöcke, abhängig von der erzielten Funktion, implantiert werden [10].

Entmineralisierte Knochenmatrix allogenen Materials kann hierbei als Ergänzung zu autologen Spongiosaplastiken herangezogen werden, wenn diese nicht ausreichend verfügbar sind oder der Defekt zu groß ist [85, 113].

Des Weiteren bieten sich xenogene Präparate als Knochenersatzmaterial an. Dieses wird einer Spezies entnommen und in einem Individuum einer anderen Spezies implantiert. Grundsätzlich wird eine xenogene Transplantation nicht empfohlen, da es zu einer akuten immunogenen Reaktion kommen kann [115]. Durch Entfernung von Proteinen und Fett wird eine Immunreaktion weitestgehend reduziert, wobei gleichzeitig auch die Osteoinduktivität durch Zerstörung der Matrixproteine abnimmt. Zudem mangelt es an osteogenen Potenzial [115]. Rinderkollagen bietet sich wegen seiner Biokompatibilität und Flexibilität als eine geeignete Komponente für Knochentransplantaten an und kann als Gelpulver, Schwamm, Papier oder filzförmiges Gewebe verarbeitet werden [108].

2.5 Biomaterialien

Neuartige Ansätze beschäftigen sich mit der Entwicklung synthetisch hergestellter osteokonduktiver Knochenersatzmaterialien, welche die Verfügbarkeit von Knochentransplantaten deutlich erweitern. Die Kombination mit extrahierten oder synthetisch hergestellten Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen ermöglichen die Konstruktion von Knochenimplantaten nach dem Diamond Concept [101]. Sie unterscheiden sich in ihrer Osteokonduktivität- und Induktivität sowie in der Handhabung und Anwendungsweise von ihren biologischen Vorläufern. Sie sind als Chips, Granulat, Puder oder Paste verfügbar und können dadurch auch im Rahmen minimalinvasiver Anwendung injiziert werden [114]. Der große Vorteil synthetisch hergestellter Knochenersatzmaterialien gegenüber autologen Transplantaten besteht zum einen in der größeren Verfügbarkeit und zum anderen auch darin, dass chronische Schmerzen, operative Komplikationen und kosmetische Konsequenzen der Materialentnahme vermieden werden können [114].

2.5.1 Anforderungen

Ein ideales Knochenersatzmaterial sollte osteokonduktiv und osteogen sein sowie potenzielle osteoinduktive Eigenschaften besitzen, z. B. durch Bindung von Wachstumsfaktoren. Zudem sollten sie eine hohe Bioaktivität und Biokompatibilität aufweisen [114]. Die Biokompatibilität nimmt dabei einen hohen Stellenwert ein und ist ein wichtiges Kriterium in der Konzeption des Knochenersatzmaterials. Biokompatibel bedeutet, dass das eingesetzte Material mit Stellen des Körpers lokal interagiert und in einer angemessenen Antwort des Patienten resultiert [116]. Unter Bioaktivität versteht man, dass eine Interaktion zwischen dem eingesetzten

Knochenersatzmaterial und seiner Umgebung stattfindet [114]. In diesem Fall beeinflusst das Biomaterial die Ossifikation in unmittelbarer Nähe. Durch Veränderung der Oberflächeneigenschaften der eingesetzten Implantate kann die Osteointegration- und Bindung beeinflusst werden. Im Idealfall dient das Knochenersatzmaterial somit als eine Art Leitmatrix für die Knochenregeneration [117]. Auf zellulärer Ebene bedeutet dies, dass es auf der Oberfläche solcher Gerüste zur Befestigung und Differenzierung osteogener Zellen kommt, die die Knochenmatrix ablagern [114]. Damit es zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu knochenbildenden Zellen kommt, muss das Gerüst osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Dies kann durch molekularbiologische Verknüpfung mit Signalmolekülen des Knochenstoffwechsels erreicht werden.

2.5.2 Keramik-basierte Knochenersatzmaterialien

Die meist verwendeten Materialien sind Keramiken aus Hydroxylapatit (HA) und β -Tricalciumphosphat (TCP). Sie weisen eine hohe Biokompatibilität und Bioaktivität auf und sind teilweise bioresorbierbar. Man unterscheidet inerte (nicht resorbierbare), semi-inerte (bioaktive) und nicht-inerte (resorbierbare) Keramiken. Ihre Struktur ist porös und spröde, jedoch zeigen sie zugleich Stabilität sowie eine Druck- und Korrosionsbeständigkeit [118]. Zudem haben sie eine gute osteokonduktive Wirkung und regen knochenbildende Zellen zur Migration, Adhäsion und Proliferation an. Dies führt zur Bildung von Knochengewebe entlang der Oberfläche des Materials. Die Osteoinduktivität solcher Gerüste kann entweder durch Oberflächenmerkmale, die osteoinduktive Faktoren absorbieren oder durch Lösung von Calcium- und Phosphationen, die später die Differenzierung von Stammzellen zu Knochenzellen beeinflussen, erklärt werden [119]. Die Resorption der Keramiken erfolgt langsam, sodass ein Einwachsen des Knochens über entsprechende Zeit ermöglicht werden kann und die erforderliche Stabilität länger gewährleistet wird [113]. Der Abbauprozess wird durch angrenzende Osteoklasten und mehrkernige Riesenzellen durchgeführt. Hydroxylapatit hat hierbei eine sehr langsame Resorptionszeit gegenüber TCP und wird daher vorzugsweise bei langwierigen Knochenheilungsprozessen eingesetzt [118]. Die Abbaugeschwindigkeit der Gerüste ist abhängig von der Porengröße und entsprechender Porosität. Materialien mit hoher Porosität werden schneller abgebaut als Materialien mit geringerer Porosität.

Hydroxylapatit

Bei HA handelt es sich um eine hochkristalline Form des Calciumphosphates ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), das in einer Hochtemperaturreaktion aushärtet. Es kann in Massenform implantiert oder als Beschichtung verwendet werden [121]. Durch die chemische Ähnlichkeit zu mineralisierter Knochenmatrix bildet es ein hervorragendes osteokonduktives Gerüst mit hoher Biokompatibilität [113]. Im Vergleich zu TCP ist der neugebildete Knochen um das HA-Gerüst herum kompakter und voluminöser [115]. Zudem kann dieses Gerüst als Träger von Wachstumsfaktoren und osteogenen Zellpopulationen genutzt werden und erhält dadurch hohes osteoinduktives Potenzial. HA-beschichtetes Material zeigt eine schnellere Osseointegration durch verstärkte Adhäsionseigenschaften sowie eine stärkere Grenzflächenbefestigung am Knochen als unbeschichtetes Material [121]. Nachteile der langsamen Resorbierbarkeit können Langzeitfolgen wie die Ablösung der Beschichtung vom Material mit fibröser Umbauung in der Implantatumgebung oder periimplantäre Infektionen sein [121].

Tricalciumphosphat

TCP hat die Strukturformel $Ca_3(PO_4)_2$ und hat ein Calcium-Phosphat-Verhältnis von 1,5. Es kommt als α -TCP oder β -TCP vor und ähnelt wie HA der chemischen Zusammensetzung von mineralisierten Knochen [115]. Es wird häufig als Platzhalter in orthopädischen oder zahnmedizinischen Eingriffen verwendet [122]. In solchen Defekten zeigt es eine normale Knochenheilung ohne Entzündungsreaktion und erweist sich teilweise besser als autogenes Material [115]. TCP kann außerdem in Kombination mit autogenen Knochenersatz angewandt werden, um Lücken zu füllen, falls eine Resorption des Materials mit anschließender Knochenneubildung erwünscht ist [115]. Durch die kleine Partikelgröße und die mikroporöse Struktur wird es schneller resorbiert als HA und liefert deshalb eine geringere mechanische Stabilität [123, 124]. Der Vorteil der geringen Porengröße zeigt sich in den guten osteokonduktiven Eigenschaften und der zügigen Resorption im Einklang mit dem Knochenumbau [113]. Mittels der Kombination aus HA und TCP bildet sich ein makroporöses biphasisches Calciumphosphat, welches die Resorptionseigenschaften von reinen HA sowie reinen TCP mitbringt. Durch Variationen in den Anteilen von TCP und HA können verschiedene Ergebnisse erzielt werden. Die Vorteile der zügigen Resorption des TCP in Kombination mit der länger

anhaltenden osteokonduktiven Wirkung des HA (60 % HA/ 40 % TCP) bewährt sich in einer Kombination in segmentalen Knochendefekten [115]. Zudem wird dieses Präparat gerne in Verbindung mit autologen Spongiosaplastiken verwendet, um Defekte mit ausreichender Weichteilumgebung zu füllen [125].

Calciumphosphatzement

Die Kombination aus Calciumphosphat-haltigen Pulver und Flüssigkeit ergibt einen formbaren, bioaktiven Zement (engl. calcium phosphate cement, CPC), der sich an Form und Größe des Knochendefektes anpassen kann. Kommt dieser in Berührung mit Körperflüssigkeit, härtet er zu Hydroxylapatit aus. Das Präparat ist eine Mischung aus Dicalciumphosphat und Tetracalciumphosphat und wird durch Erhitzen pulverisiert [121, 126]. Die Vorteile des Zementes bestehen bei HA-ähnlicher biologischer Aktivität in der guten Formbarkeit und der schnellen Aufbereitung. Bereits nach 2 Wochen können Anzeichen vitalen Knochens und Osteozyten festgestellt werden [121]. Zudem handelt es sich dabei um ein alloplastisches Material, das in der Menge frei verfügbar und unbegrenzt ist und kein Infektionsrisiko birgt. Der große Nachteil des spröden CPCs ist die geringe Stabilität unter Zug- und Schlagkraft, weswegen es hauptsächlich in kraniofazialen Defekten verwendet wird [121]. Eine spezifische Eigenschaft des Zements ist es, dass sich nach der Implantation eine Apatitschicht an der Oberfläche ausbildet, deren Partikel sich untereinander nicht verknüpfen und leicht abgetragen werden. Nach initialer Auflösung wird CPC somit zügig von Osteoklasten abgetragen [121, 127]. Der Ersatz des Knochenersatzmaterials durch neugebildeten Knochen ist dabei abhängig von seiner Porosität, Partikelgröße, Kristallinität und dem Ca/P- und Puder/Flüssigkeits-Verhältnis sowie den physiologischen Profil des Patienten [121]. Im Allgemeinen neigen Materialien aus kristallinen Calciumphosphaten aufgrund ihrer spröden Struktur häufig dazu, unter starker Belastung zu versagen und sind daher in ihrer Anwendung limitiert. Zudem werden sie nur langsam oder garnicht resorbiert, wodurch die Knochenheilung blockiert oder verlangsamt wird [128]. Nicht-kristalline Calciumphosphate kommen der natürlichen Knochenzusammensetzung dagegen näher und werden leichter aufgelöst und resorbiert. Ionen können eher freigesetzt werden und durch Bildung einer bioaktiven Schicht die Mineralisierung von Knochen an der Oberfläche fördern [128].

2.5.3 Polymere

Neuartige Modelle beschäftigen sich daher mit der Entwicklung makromolekularer Verbindungen, welche neue Handhabungs- und Resorptionseigenschaften von Knochenersatzmaterialien aufzeigen. Die Eigenschaften synthetischer und natürlicher Polymere können durch Polymerkonzentration, Polymerisationsbedingungen, durch die chemische Zusammensetzung sowie durch das Hinzufügen von Proteinen und Zellen so beeinflusst werden, dass sie biokompatible und bioaktive Wirkungen zeigen [129, 130]. Häufig verwendete natürlichen Polymere sind Gelatine, Kollagen, Chitosan, Hyaluronsäure, Cellulose, Alginat und Peptide [131-133]. Kollagen in Form von Hydrogel wird dabei gerne aufgrund seines reichlichen Vorkommens in Bindegewebe, Knorpel und Knochen verwendet. Kollagenfasern haben eine Dreifachhelix-Konfiguration aus Polypeptidketten die Hydroxalapatitkristalle in der Knochenmineralisation anlagern und werden daher oft in Kombination mit HA implantiert [133]. Zu den synthetischen Polymeren zählen die Polyester wie Polylaktatsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA), Polyethylenglykol (PEG), Polycaprolakton (PCL) und deren Kopolymere (z.B. Poly(lactid-co-glykolid), (PLGA) [101, 119, 132, 134-136].

2.5.4 Verbundstoffe

Um mechanische Stabilität, Druck- und Zugfestigkeit nach physiologischen Eigenschaften zu simulieren, bieten sich Verbundstoffe aus bioaktiven Keramiken und Polymeren an [101, 145-147]. Dabei werden natürliche Polymere mit HA bzw. TCP kombiniert (z. B. Kollagen/HA, Chitosan/HA, TCP/PCL, Gelatine/PLGA) oder synthetische Polymere untereinander (z. B. PLA/PEG) verbunden [128, 133, 136, 148-151]. Durch Zugabe eines abbaubaren Polymers zu Calciumphosphaten kann die Makro- und Mikrostruktur und damit die Sprödigkeit der hergestellten Gerüste reguliert werden. Die hohe Druckfestigkeit und Elastizitätsmodule calciumphosphathaltiger Keramiken wird dabei mit den Vorteilen der biologischen Abbaubarkeit und der knochenkompatiblen Mechanik von Polymeren kombiniert [119, 152]. Durch eine Polymer-Keramik-Kombination kann also über Regulierung von Morphologie und chemischer Zusammensetzung der Polymermatrix die Eigenschaften solcher Gerüste an das umgebende Gewebe angepasst werden. Eine etablierte Methode ist die Mischung aus kristallinem Hydroxylapatit mit abbaubaren synthetischen Polymeren wie PCL oder die Ausfällung einer apatitähnlichen Schicht an Polymeroberflächen [128, 151, 153]. Durch die Beschichtung von Scaffolds mit

HA und PCL können die mechanischen Eigenschaften, die Druckfestigkeit sowie die Elastizität deutlich verbessert werden [151].

2.6 Bone Tissue Engineering

2.6.1 Hintergrund

Bone Tissue Engineering (BTE) beschäftigt sich mit der Entwicklung von Knochenersatzgerüsten, welche der chemischen und strukturellen Eigenschaft der EZM auf natürliche Weise ähneln und die Knochenheilung fördern, ohne dass toxische Substanzen anfallen. Die Aufgabe des Knochenersatzmaterials besteht darin, unmittelbar nach der Implantation eine vorübergehende mechanische Stabilität im Defektbereich zu gewährleisten, bis neuer Knochen gebildet wird und die biomechanische Funktion übernehmen kann. Ziel ist somit eine Resorption des Materials im Verlauf des Heilungsprozesses und Ersatz durch neugebildete Knochenmatrix. Diese Voraussetzungen können nur erfüllt werden, wenn die Eigenschaften des Biomaterials an die physischen Bedingungen der Umgebung angepasst sind [5, 119]. Da die Materialzusammensetzung auch die mechanischen Eigenschaften beeinflusst, sollte BTE den Anforderungen der Umgebung (z.B. Lokalisierung, Belastungsmuster) abgestimmt werden. Synthetische Knochenersatzmaterialien versuchen die poröse Struktur spongiösen Knochens nachzubilden, um eine größere Oberfläche zu generieren und um MSCs zur Migration anzuregen. Die Porosität ist dabei ausschlaggebend für die Osteokonduktivität und das Einwachsen knochen- und gefäßbildender Zellen. Während eine größere Porengröße das Knochenwachstum fördert, geht dabei mechanische Stabilität verloren. Ziel ist somit eine Balance zwischen knochenkompatibler Porosität und mechanischer Stabilität zu finden [119]. Eine kleine Porengröße von 15-50 μm stimuliert das Einwachsen fibrovaskulärer Strukturen, 50-150 μm induziert die Bildung von Osteoid in peripheren Bereichen und eine Porengröße von 150-500 μm scheint das optimale Maß für die Bildung mineralisierter Knochenmatrix zu sein [101]. Erst ab einer Porengröße von 300 μm kann aufgrund ausreichender Vaskularisation und anschließenden Sauerstoff- und Nährstofftransport Osteoblastenwachstum im gesamten Gerüst nachgewiesen werden [119, 164]. Die Biomaterialien können zudem mit Wachstumsfaktoren oder BMPs beladen werden, um eine osteoinduktive Wirkung zu verstärken. Bei der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien müssen viele Faktoren berücksichtigt werden, die insbesondere mit den Prinzipien des Diamond Concepts einhergehen.

Sobald ein struktureller oder chemischer Faktor verändert wird, hat dies Auswirkungen auf die physikalischen und biomechanischen Eigenschaften eines Gesamtsystems. Die isolierte Untersuchung eines einzelnen Faktors kann somit nicht zwangsläufig auf das Gesamtverhalten des implantierten Materials in-vivo projiziert werden [101]. Über mikro- und nanostrukturelle Veränderungen der Oberflächentopographie kann die Zelladhäsion und Migration gesteuert werden. Aktuelle und zukünftige Ansätze könnten extrazelluläre Matrixproteine oder adhäsive Liganden inkludieren, die frühzeitig eine Gewebeumwandlung durch Differenzierung von MSCs vermitteln [119]. In der orthopädischen Chirurgie ist auch die Handhabung des Knochenersatzmaterials vor und während der Implantation von Bedeutung. Präparation, Abgabesystem, Implantation, Aushärteverhalten und die lokale Eindämmung des Materials sind dabei für den Operateur und das anschließende Ergebnis entscheidend und sollte im Rahmen des BTE beachtet werden [101].

2.6.2 Scaffolds

Die Produktion dreidimensionaler Knochenersatzgerüste (engl. Scaffolds) mittels 3D-Druckern dient der strukturellen Unterstützung biomechanischer Stabilität im Defektbereich und regt dabei umliegendes Gewebe zur Knochenregeneration an. Scaffolds sind poröse, faserige, durchlässige Biomaterialien, die den Transport von Körperflüssigkeit sowie Zelladhäsion und Ablagerung von Knochenmatrix gewährleisten [164-168]. Sie sind bioresorbierbar und weisen nur minimal entzündliche oder toxische Wirkung auf [118, 152, 169, 170]. Die Mikro- und Makrostruktur hat dabei wesentliche Auswirkungen auf das Ergebnis, sodass einerseits die Größe und Geometrie, als auch die Porosität bei der Konstruktion bedacht werden [164, 169, 171, 172]. Mittels 3D-Druckern können solche Formen durch hoch entwickelten und präzisen Schichtaufbau entworfen werden [168]. Des Weiteren eignen sich Drucktechniken für die Integration von therapeutischen Wirkstoffen wie Proteinen oder Wachstumsfaktoren, um die natürliche Signalgebung nachzuahmen [118, 173]. HA, β -TCP und bioaktive Gläser sind dabei die meist genutzten Materialien für den 3D-Druck. HA-Scaffolds mit hochauflösenden Verbindungskanäle eines Durchmessers von 300 μm führen zu einer hohen Mikroporosität und ermöglichen dadurch ein Knochenwachstum bis ins Innere des Gerüsts [118, 167]. Die raue Granulatstruktur des HA vergrößert dabei die für das flüssige Medium oder für die Auflösung zugängliche Oberfläche [164]. Mit Nanotechnologien können spezielle Gerüststrukturen geschaffen werden, die auf den

jeweiligen Zell- oder Gewebetyp abgestimmt sind. Diese wirken dabei direkt osteoinduktiv auf die umgebende EZM und fördern die Zelladhäsion am Material [174]. Neuere Entwicklungen beschäftigen sich mit personalisierten und anatomisch angepassten Knochentransplantaten durch computergestützte Fertigung mit CT- Scans. Durch dieses „Rapid Prototyping“ können flexible 3D-Gerüste präzise an das natürliche Knochengewebe mittels Patientendaten konstruiert werden [5, 118, 164, 175].

Oberflächenfunktionalisierung

Für eine nahtlose Integration des Biomaterials in den umliegenden Knochen, ist die biologische Aktivität im Grenzflächenbereich entscheidend. Die räumliche Verteilung knochenbildender Zellen und die Biomaterial-Zell-Interaktion grenzflächenbildenden Gewebes sind wichtige Faktoren für eine lebensfähige Geweberegeneration [116, 119, 176]. Die Verankerung von osteoinduktiven Substanzen am Gerüst und die anschließende Freisetzung ist dabei förderlich für eine erfolgreiche Osseointegration [173]. Dies wird unter anderem durch Eigenschaften der Oberflächenchemie, Ladung, Hydrophilie und Rigidität des Scaffolds bestimmt [118]. Die Adsorption von Proteinen sowie die Adhäsion von Zellen an Oberflächenstrukturen im Nanometerbereich ist also stark von der Oberflächenbeschaffenheit abhängig [174, 177, 178]. Die Bindung von Proteinen an der Oberfläche erfolgt spontan nach Kontakt mit dem Biomaterial und resultiert in der Ausbildung einer Proteinschicht zwischen dem Biomaterial und Zelloberflächenrezeptoren nach der Zelladhäsion [174]. Bioaktive Keramiken sind mögliche Träger solcher Proteine, wobei die Freisetzung in situ nur schwer zu kontrollieren ist [179, 180].

Drug Delivery Systeme

Des Weiteren steht die Entwicklung von Drug Delivery Systemen (DDS), welche Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle im Defektbereich langsam und kontrolliert freisetzen können im Vordergrund der Forschung im Rahmen des BTE [137]. Die Zufuhr solcher Substanzen ist dabei an die Abbaugeschwindigkeit des Biomaterials gekoppelt und kann lokal begrenzt kontrolliert werden, ohne dass das System belastet wird. Ausschlaggebend ist die beladene Matrix, die Menge des hinzugefügten Stoffes sowie die Abbaurate des Materials [180]. DDS eignen sich zur Förderung der lokalen Wundheilung und Geweberegeneration, zur Verhinderung von

Infektionen oder als Lieferant von Chemotherapeutika [181]. Verbundstoffe aus Keramiken und biologisch abbaubaren Polymeren oder reine Polymere in Form von Gelen, Scheiben oder 3D-Gerüsten ermöglichen eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung im Vergleich zu reinen Keramiken [182-184]. DDS können die Bioverfügbarkeit einer Substanz verbessern, da sie so konzipiert sind, dass ein Medikamentenmolekül mit einer bestimmten Geschwindigkeit und über eine bestimmte Zeitspanne hinweg freigesetzt wird [179, 180, 185, 186].

2.6.3 Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle

Knochen kann sich nur regenerieren, wenn ein Zusammenspiel von Zellen und Wachstumsfaktoren bzw. Signalmolekülen möglich ist. Osteoinduktive Signalmoleküle regulieren die Zellexpression, Migration, Proliferation und Morphogenese neuen Gewebes und sind damit essenziell für die Knochenheilung [119]. Die Applikation von Wachstumsfaktoren kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Eine einfache Oberflächenbeschichtung führt über passive Diffusion zu einer Freisetzung im Defektbereich und ermöglicht Grenzflächeninteraktionen [119]. Eine andere Methode stellen DDS für eine verlangsamte und kontinuierliche Abgabe dar (siehe 2.6.2). Zellbasierte Ansätze im BTE beschäftigen sich daher mit der Frage, welcher Zelltyp am effektivsten für die Knochenregeneration ist. Dieser Faktor sollte möglichst früh in den Prozess der Osteogenese eingreifen und über Freisetzung von osteogenen und vaskulogenen Faktoren, Vorläuferzellen zur Differenzierung und Proliferation anregen, damit es frühzeitig zu der Ausbildung eines Knochenkonstrukts kommt. Über gezielte Strategien kann dadurch in verschiedene Stadien der Knochenregeneration eingegriffen werden. MSCs bieten dabei durch Differenzierung in unterschiedliche Zelllinien osteogenes sowie vaskularisierendes Potenzial [94, 187-189]. Sie werden häufig aus dem Knochenmark entnommen und anschließend in ihrer Anzahl erweitert. Des Weiteren bieten sich periostale Zellen sowie Osteoblasten für die Förderung der Knochenheilung im Rahmen des BTEs an [190-192]. Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs) sind Teil der TGF- β Superfamilie und kommen physiologisch in der Knochenmatrix und im Osteoid des Skeletts vor. Sie sind an der Regulierung des Knochenstoffwechsels, Frakturheilung und Knochenneubildung beteiligt [193]. Im Rahmen des Knochenumbaus werden sie aktiv durch Osteoklasten freigesetzt und regen benachbarte Zellen zur Osteosynthese und Gewebedifferenzierung an [5]. Zwischen 20 identifizierten BMPs

konnte nur bei BMP 2, 4 und 7 in-vitro nachgewiesen werden, dass sie die Differenzierung von Stammzellen in osteoblastische Vorläuferzellen stimulieren [194]. Der positive Effekt von BMP-beschichteten Knochenersatzmaterialien auf die Knochenheilung insbesondere bei Pseudarthrosen wurde in zahlreichen in-vivo Untersuchungen nachgewiesen [195-198]. In der klinischen Praxis findet BMP-7 in der Therapie von Pseudarthrosen langer Röhrenknochen Anwendung und zeigt durch eine Verbesserung der biologischen Umgebung im Defektbereichs eine effiziente Knochenheilung [199]. Insbesondere BMP-2 und BMP-7 haben nachgewiesen eine positive Wirkung auf die Knochenregeneration von segmentalen Knochendefekten langer Röhrenknochen, Pseudarthrosen oder Wirbelarthrosen und sind in der klinischen Anwendung zugelassen [194, 199-203].

Die Anwendungsgebiete von BMPs sind jedoch aufgrund der ausgeprägten induktiven Wirkung auf die Knochenheilung und dessen potenzieller Nebenwirkungen, wie ektope Ossifikationen, Osteolysen, Weichteilschwellungen oder neurologischer Defizite, begrenzt [14, 204-207].

2.6.4 Aktuelle Trends und Zukunftsaussicht

Neueste Technologien im Feld des BTE beziehen verschiedene Komponenten wie das Gerüst, beteiligte Zellen sowie die Applikation von Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle in Konzepte zur Rekonstruktion von kritischen Knochendefekten mit ein. Probleme können dabei auftreten, alle Komponenten in ein funktionsfähiges Gesamtsystem zu integrieren, das sich in-vivo bewährt [119]. Im Rahmen des Bioprinting werden Gerüste erstellt, die bioaktive Komponenten während des Druckens einarbeiten und dadurch biomimetische Wirkungen zeigen [212-214]. Da dies bei Biokeramiken aufgrund der Sinterung unter hohen Temperaturen nicht möglich ist, ist es das Ziel neuartige Materialien auf Calciumphosphat-Basis zu entwickeln, die unter physiologischen Bedingungen bzw. unter Raumtemperatur ohne Zusatz von toxischen Substanzen druckbar sind. Anforderungen an das Bioprinting sind Druckbarkeit, Materialkompatibilität und Zellebensfähigkeit [215]. Hybride Ansätze kombinieren mechanisch stabile, poröse Gerüste mit nanofunktionellen Peptid-Hydrogelen, sodass knochenbildende Zellen vermehrt einwachsen und gleichzeitig Stabilität gesichert wird [183, 216-219]. Solche Hydrogele können mit vaskularisierenden und osteogenen Faktoren zur Beschleunigung der Knochen- und Gefäßneubildung gebunden werden [118, 220-

223]. Durch Bioprinting kann eine inhomogene Zellverteilung durch oberflächliche Zellaussaat vermieden werden sowie die Architektur der Gerüste vorbestimmt werden [212]. Ein weiterer Ansatz besteht in genaktivierten Scaffolds, die Wirtszellen dazu anregen, bestimmte Transgene vermehrt zu exprimieren, um die verlängerte Expression osteogener Proteine zu fördern [203, 224-228]. Letztlich können auch biologisch abbaubare Metalle eine Position in der neuen Generation der Trägergerüste einnehmen. Diese bieten aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften ähnliche Vorteile wie die kompakte Struktur der Kortikalis [119]. BTE wird derzeit patientenspezifisch genutzt, jedoch mangelt es an unzureichenden Herstellungsmethoden. Im Allgemeinen ist Bioprinting mit hohen Herstellungskosten verbunden und stellt derzeit nicht den Goldstandard der klinischen Praxis dar.

2.7 Bone Sialoprotein

2.7.1 Aufbau und Funktion

BSP ist Bestandteil der Extrazellulärmatrix von Knochen und Dentin und macht 8-12 % der nicht-kollagenen Proteine des Knochens aus [229]. Es bildet zusammen mit Osteopontin (SPP-1), Dentin-Sialoprotein und dem Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) die SIBLING (small, integrin-binding ligand N-linked glycoprotein)-Familie [230, 231]. Das Bone Sialoprotein ist ein Glykoprotein aus 301 Aminosäuren mit zahlreichen phosphorylierten Glutamat-Anteilen am N-terminalen Ende und sulfatierten Tyrosinresten am C-terminalen Ende. Der hohe Anteil von Sialinsäuren begründet die Namensgebung. Am C-terminalen Ende befindet sich auch die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) mit der BSP an β_3 -oder $\alpha_v\beta_3$ -Integrine (Vitronectin-Rezeptor) bindet, um mit Zellen oder mineralisierter Knochenmatrix zu interagieren. Eine Kollagenbindestelle befindet sich am N-terminalen Ende [232]. Das Protein weist einen hohen Kohlenhydratanteil in Form von O- und N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydraten entlang der Aminosäuresequenz auf [233]. Die Struktur des BSP-Moleküls ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Expression von BSP erfolgt hauptsächlich im Rahmen des primären Knochenaufbaus durch Osteoblasten, Osteoklasten, hypertrophe Chondrozyten sowie durch Odontoblasten und Zementoblasten und wird durch mechanische Stimulation getriggert [15, 234]. Eigenschaften von BSP sind u. a. seine Gewebespezifität und die Affinität zu kollagener Knochenmatrix [233]. Eine BSP-Expression kann vor allem in aktiven, differenzierten Osteoblasten, die an neugebildeten Knochen lokalisiert sind, nachgewiesen werden. An der Metaphyse

und der Epiphyse im Bereich der Wachstumszone, wo kondylärer Knorpel in Knochen umgewandelt wird, zeigt sich ein hohes Aufkommen von BSP. Dahingegen kann in reifen Knochen kaum eine Expression von BSP nachgewiesen werden. Es besteht somit ein positiver Zusammenhang zwischen Knochenneubildungsaktivität und der Expression von BSP [210]. Des Weiteren kann BSP vermehrt in Osteosarkomen und Tumoren, die in den Knochen metastasieren können (z.B. Brustkrebs, Prostatakrebs) festgestellt werden [235-237].

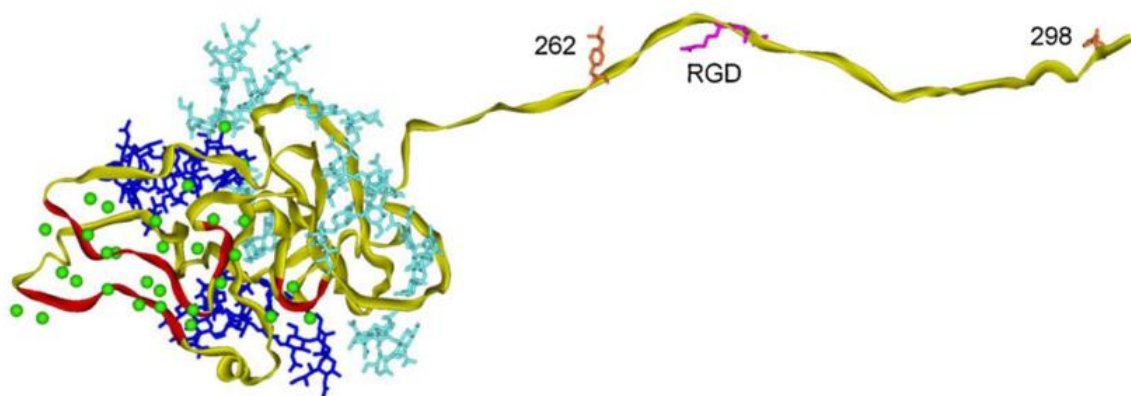


Abbildung 5: struktureller Aufbau eines BSP-Moleküls nach Vincent et al. [238]

Durch seine chemische Struktur hat BSP das Potenzial in den Knochenumbau einzugreifen und die Entwicklung und Regeneration neuen Knochens zu regulieren [230]. Die Funktionen des BSP sind teilweise noch unerforscht, jedoch können einige Zellinteraktionen und eine direkte Beteiligung an der Knochenmineralisation festgestellt werden [15, 239, 240]. In-vitro Untersuchungen deuten darauf hin, dass produziertes BSP teilweise vor der Mineralisation in die kollagene Gewebematrix eingearbeitet wird und dann die Formation der HA-Kristalle initiieren können [209, 210]. Spezifische Eigenschaften von BSP sind seine Gewebespezifität und eine hohe Affinität zu kollagener Knochenmatrix [233, 241, 242]. Durch die stereochemische Anordnung von Calcium- und Phosphat-bindenden Gruppen an der Oberfläche des Proteins können existierende HA-Kristalle gebunden werden oder in einem Prozess der De-novo Nukleation gebildet werden. Diese Eigenschaft ist jedoch abhängig von der chemischen Strukturordnung und der physikalischen Phase des Proteins, d.h. ob es immobilisiert oder flüssig vorliegt [229]. Die Wirkung von BSP auf die HA-Bildung wurde 1993 von Hunter und Goldberg in einem Steady-State-Agarosegel-System untersucht. Dabei konnte

gezeigt werden, dass BSP die Bildung von HA durch Niederschlag in unterschwelligen CaP-Konzentrationslösungen induzieren kann [209]. Da HA-Kristalle in der Knochenmatrix meist an Kollagen Typ I gebunden sind, geht man davon aus, dass auch Protein-Nukleatoren wie BSP stark und eventuell kovalent an Kollagen binden. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt, wobei die dreifach helikale Struktur des Kollagens dabei Bedeutung haben könnte [243]. Mit der RGD-Sequenz bindet BSP an den Vitronektin-Rezeptor an der Oberfläche von Zellen des Knochenmetabolismus. Durch eine Signaltransduktion an Osteoklasten wird die resorptive Aktivität dosisabhängig gesteigert [244]. In-vitro konnte durch die Bindung an Präosteoblasten die Differenzierung zu Osteoblasten und deren Expression von ALP aktiviert werden, sodass die Mineralisation gefördert wird [245]. Inwieweit BSP in vivo die Differenzierung von OPZ zu Osteoblasten fördert ist bisher noch unklar [246].

Da auch während der Angiogenese vermehrt $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren auf endothelialen Zellen exprimiert werden, liegt es nahe, dass BSP mit dem RGD-Peptid einen Einfluss in der Angiogenese von Knochengewebe und Tumorgewebe haben könnte. Der Vitronektin-Rezeptor ist einer der wichtigsten Rezeptoren der EZM, der im Prozess der Angiogenese beteiligt ist [248, 249]. In Zusammenhang mit der tumorassoziierten Angiogenese zeigt BSP im Gegensatz zu OPN eine höhere Exprimierung an primären und metastasierten Tumoren [250].

2.7.2 Anwendung

Im Rahmen der Gelenkersatzoperationen in der orthopädischen Chirurgie ist die Knochen-Implantat-Anhaftung von großer Bedeutung, um eine aseptische Prothesenlockerung nach der Implantation zu verhindern [251]. Die Beschichtung von Implantaten mit BSP stellt einen möglichen Ansatz dar, die Osteoinduktivität und das Einheilen des Implantats in den umliegenden Knochen verbessern. In-vitro Analysen BSP-beschichteter CPCs zeigten eine erhöhte Lebensfähigkeit der Osteoblasten sowie eine Differenzierung und Ausbreitung humaner Osteoblasten entlang des Scaffolds. Insgesamt konnte eine Zunahme des hOB-Ausbreitungsgebietes und eine interzelluläre Netzwerkbildung auf BSP-beschichteten CPC-Gerüsten beobachtet werden [252]. Auf Titanscheiben zeigte BSP nach Adsorption sowie nach kovalenter Bindung eine gesteigerte Zellmigration und Differenzierung sowie eine höhere Calciumablagerung als auf unbeschichteten

Titanscheiben. Dieser Effekt lässt sich vor allem bei der Anwendung höherer BSP-Konzentrationen beobachten [253]. Die in-vitro Studien zeigen, dass es sich bei BSP um einen potenziellen Oberflächenmodifikator handelt, der die Osseointegration von Implantaten in-vivo begünstigen kann. O'Toole zeigte 2004 erstmals eine osteoinduktive Wirkung von BSP in-vivo an beschichteten Titan-Implantaten im Rattenfemur. Eine Rekrutierung von Osteoblasten und Bildung von Osteoid sowie eine Neovaskularisation im Heilungsprozess konnte dabei festgestellt werden [254]. Anhand von in-vivo Untersuchungen konnte die Knochenheilung kritischer Knochendefekte mittels einer BSP-versetzten Kollagenmatrix im Kalvariendefektmodell der Ratte begünstigt werden [181, 241]. Bei einem kritischen Knochendefekt der Größe von 8 mm konnte nach Implantation einer BSP-Kollagenmatrix eine gesteigerte Differenzierung von Osteoblasten und eine verstärkte Knochenheilung im Vergleich zu reinem Kollagen festgestellt werden [241, 255]. Am Schädelknochen der Maus konnte anhand der Implantation eines BSP-beschichteten CPC-Gerüsts in einem 2,7 mm Bohrloch ein tendenziell größeres Knochenwachstum im Vergleich zu unbeschichtetem Material festgestellt werden [256]. Bisher gibt es noch keine in-vivo Studien in Knochendefekten langer Röhrenknochen.

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl der Biomaterialien

3.1.1 Calciumphosphat-Zement

Für die folgenden Versuche galt es ein Knochenersatzmaterial zu wählen, welches eine osteogene Zellproliferation in innere Strukturen sowie eine Oberflächenbeschichtung mit osteoinduktiven Faktoren gewährleisten kann. Bestimmte Kriterien waren dabei für die Umsetzung des Konzepts von Bedeutung: die Maximierung der Oberfläche, eine erleichterte Oberflächenbeschichtung zur Förderung der Zelladhäsion und eine gute Versorgung im Innern mit Medium. Für die Versuche wurde schließlich ein dreidimensionales CPC-Biogerüst ausgewählt. Die porösen Gerüste bestehen hauptsächlich aus nanokristallinem, hydroxylierten Calciumphosphatsalzen. Sie weisen eine Porengröße von 200 µm auf und das Verhältnis der Makroporosität beträgt 50 %. Die in Abbildung 6 dargestellten 3 x 3 mm große Zylinder wurden von INNOTERE (Radebeul, Deutschland) mittels 3D-Drucker aus einer Paste hergestellt. Differenziert besteht die CPC-Paste aus 60% α -Tricalciumphosphat ($\alpha - Ca_3(PO_4)_2$) 26 % Calciumhydrogenphosphat ($CaHPO_4$), 10% Calciumcarbonat ($CaCO_3$), 4 % ausgefallenen Hydroxylapatit und zwei Teilen einer Trägerflüssigkeit. Das CA/P-Verhältnis beträgt dabei 1,5 und die spezifische Größe 12 m²/g. Aufgrund ihrer Beschaffenheit haben sie hohe Ähnlichkeit zur menschlichen Knochensubstanz, eine hohe Biokompatibilität und Bioaktivität konnte nachgewiesen werden [257-259].



Abbildung 6: 3D-gedruckter CPC-Scaffold

3.1.2 Bone Sialoprotein

Bei dem hier verwendeten Protein handelt es sich um rekombinant hergestelltes humanes BSP aus der Ovarialzell-Linie chinesischer Hamster, bereitgestellt von Immundiagnostik AG (Bensheim, Germany).

3.1.3 BMP-7

Das in diesem Modell verwendete BMP-7 wurde bei Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach, Deutschland) erworben.

3.2 In-vitro Vorversuche

Im Rahmen der Vorbereitung wurden in-vitro Versuche mit hOB durchgeführt, um die optimale Konzentration von BSP für eine dauerhafte Bindung an das CPC-Gerüst und dessen osteoinduktive Wirkung zu belegen [252]. Alle Versuche wurden steril und unter laminärer Luftströmung durchgeführt. Verbrauchsmaterialien wurden steril verpackt vom Hersteller verwendet, Instrumente und Laborutensilien wurden zuvor autoklaviert, hitzesterilisiert oder mit einem 22 µm Filter steril gefiltert.

3.2.1 Beschichtung

Die Beschichtung der Scaffolds erfolgte mit den vorgesehenen Proteinen (BSP 200 µg/ml, BMP-7 10 µg/ml) via Physisorption anhand der vorangegangenen in-vitro Versuche [252]. Zu Beginn wurden die Scaffolds in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient F-12-Medium (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) für 24 h bei 37°C inkubiert, um einen Ionenaustausch und eine Bindung von Serumproteinen zu gewährleisten. Nach zwei Waschungen mit phosphatgepufferter Salzlösung PBS (engl. phosphate buffered saline) erfolgte anschließend die Inkubation mit BSP-Lösung (200 µg/mL) für 24 Stunden bei 8°C unter ständigem Schütteln. Nach zwei weiteren Waschschritten erfolgte die Trocknung unter laminärer Luftströmung und Lagerung bei 8°C bis zur Implantation [260].

3.2.2 Verifizierung

Die Adsorption des BSP an das CPC-Gerüst wurde qualitativ mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und quantitativ mittels ELISA untersucht. Aufgrund dieser Vorversuche konnte eine Konzentration von 200 µg/ml BSP als optimale Konzentration ermittelt werden [261, 262].

3.3 Studiendesign

Zwanzig KEM wurden unbeschichtet belassen (Gr. II), während 40 KEM anhand des Protokolls mit BSP (Gr. III) oder BMP-7 (Gr. IV) beschichtet wurden. Die Gruppe IV stellt dabei die Positivkontrolle (PK) dar. Für die Negativkontrolle (NK) wurde bei 20 Defekten kein Material implantiert und ein Leerdefekt belassen (Gr. I). Die Zuteilung der Tiere zu den Versuchsgruppen erfolgte randomisiert und ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Aufteilung der Versuchsgruppen I-IV nach Materialeinsatz und Anzahl der Tiere pro Gruppe

Versuchsgruppe	Material	Anzahl Tiere	Anzahl (n) Femora
I	Kein Material/ NK	10	20
II	KEM ohne Beschichtung	10	20
III	KEM + BSP	10	20
IV	KEM + BMP-7/ PK	10	20

3.4 In-vivo Versuchsdurchführung

3.4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 40 männliche Wistar-Ratten im Alter von 6 Wochen und einem Gewicht von durchschnittlich ca. 300 g, ähnlich wie in Abbildung 7 dargestellt, für die OP ausgewählt. Diese Tiere wurden vom Züchter Janvier Europe (Frankreich) speziell für Tierversuche bereitgestellt (§§ 19 bis 24 TierSchVersV). Das Versuchstiovorhaben wurde durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Referat 23, Koblenz) genehmigt (Ratten-Femur-Bohrlochdefektmodell, Aktenzeichen G 15-1-093, Ausstellungsdatum: 21.06.2016). Die nationalen Vorschriften für die Haltung und Verwendung von Versuchstieren wurde durchgehend respektiert und eingehalten. Die Tiere wurden in dafür vorgesehenen Räumen in Käfigen mit Einstreu und Trinkwasser sowie Futter ad libitum gehalten. Die einzeln gehaltenen Tiere hatten Sicht-, Geruchs -und Hörkontakt zu den anderen Tieren. Zudem galt es den Hell-Dunkel Rhythmus im 12h Takt mittels künstlichen Lichts aufrecht zu erhalten. In vergleichbaren Studien mit dem Femurkondylendefektmodell ist eine Gruppengröße von 6 Tieren erforderlich, um signifikante Unterschiede in der Knochenheilung feststellen zu können [263-265].



Abbildung 7: Haltung einer männlichen Wistar-Ratte im Alter von 6 Wochen

3.4.2 Versuchsaufbau

Der Effekt BSP-beschichteter Scaffolds auf die Knochenregeneration sollte anhand eines Bohrlochdefektmodells an Femurkondylen überprüft werden. Ein Bohrlochdefekt mit einem Durchmesser von 3 mm wurde jeweils in die Femurkondylen beider Beine gesetzt. In den Defekt wurden die Knochenersatzgerüste entsprechend ihrer Beschichtung in die Gruppen II-IV (siehe Tabelle 1) eingeteilt oder es wurde im Fall der Negativkontrolle ein Leerdefekt hinterlassen (Gruppe I). Jedes Femur erhielt dabei eine eindeutige Identifikationsnummer (ID), anhand welcher eine Zuordnung zur Versuchsgruppe und der anatomischen Position (links vs rechts) realisiert wurde. Insgesamt werden bei 20 Versuchstieren 40 femorale Defekte erzeugt. Zusätzlich wurden die Ratten anhand ihrer Standzeit in 2 Gruppen (A und B) eingeteilt. Gruppe A umfasst dabei die Versuchstiere, bei denen eine Regenerationszeit von 4 Wochen untersucht wurden, während Gruppe B die Versuchstiere mit 8 Wochen Standzeit einschließt. Die Einteilung erfolgte so, dass den Gruppen A und B jeweils 20 Tiere zugeordnet sind und die Implantation der beschichteten bzw. unbeschichteten KEM randomisiert erfolgte (Tabelle 2). Die Einteilung in die einzelnen Versuchsgruppen mit der

Unterteilung in die Untergruppen A und B ist schematisch in der Abbildung 8 dargestellt.

Tabelle 2: Aufteilung der Versuchsgruppen I-IV in die Untergruppen A und B anhand der Untersuchungszeit

Untergruppe	ID	Standzeit	Versuchsgruppe	Anzahl Femur
A	2621-2660	4 Wochen	I-IV	40
B	2673-2712	8 Wochen	I-IV	40

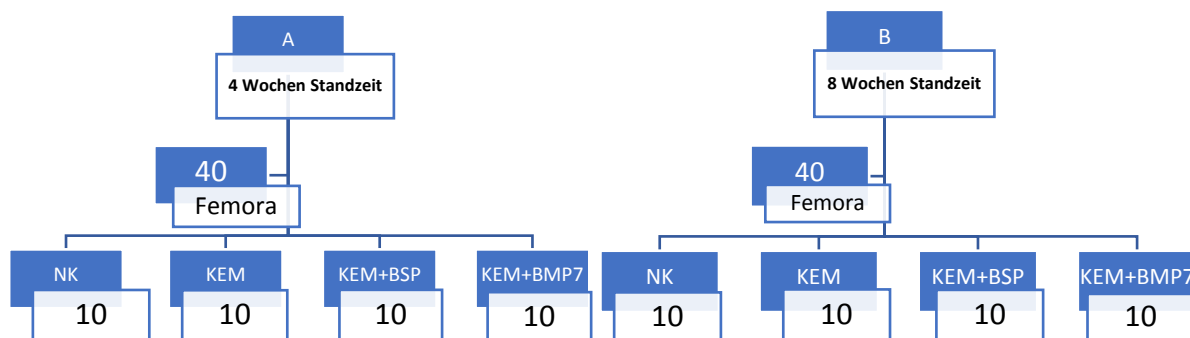


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Studienaufbaus; Standzeit 4 Wochen (A) und Standzeit 8 Wochen (B)

3.4.3 Anästhesie

Nach einer Akklimatisierungszeit von mindestens 5 Tagen wurde ein Tag präoperativ Tramadol (1 mg/ ml) ins Trinkwasser gemischt, um die Tiere schon vor dem Eingriff an den veränderten Geschmack des Trinkwassers zu gewöhnen. Die Auswahl der Narkotika erfolgte anhand der gesicherten spezifischen Wirkung bei der Ratte und unter Berücksichtigung der jeweiligen Nebenwirkungen und Komplikationen. Das Anästhetikum wurde so gewählt, dass es anhand der allgemeinen Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstiere (GV Solas) an die Operationsdauer und die Schmerzintensität angepasst wurde [266]. In Anbetracht einer erforderlichen Schlafdauer von ca. einer Stunde, sollte die Narkose die Kriterien der zentralen Schmerzhemmung sowie die Erregbarkeitsminderung des zentralen Nervensystems unter Erhalt der Spontanatmung und lebenswichtiger Funktionen erfüllen. Die Kombination aus Medetomidin (Dorbene® vet 1 mg/ ml, Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen, Deutschland), Midazolam (Midazolam-ratiopharm® 15 mg/ 3ml, ratiopharm

GmbH, Ulm, Deutschland) und Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,1 mg/ 2ml, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany) bietet eine geeignete Kombination aus Sedativa und Analgetikum, bei der die synergistische Wirkung von Medetomidin und Fentanyl die erforderliche Anästhesie ermöglicht. Es handelt sich dabei um eine vollständig antagonisierbare Anästhesie, d.h. die Schlafdauer könnte gegebenenfalls durch die Kombination aus Atipamezol (750 µg/ kgKG, Alzane[®] vet 5 mg/ml, Zoetis GmbH, Berlin, Germany) und Flumazenil (0,2 mg/ kgKG, Anexate[®], 0,1 mg/ml, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) unterbrochen oder variiert werden. Die Applikation der Narkosemischung erfolgte subkutan. Dauer und Stärke der Narkose ist dosisabhängig und ist abhängig vom Körpergewicht (KG) des Tieres. Die Tiere wurden präoperativ gewogen und bekamen entsprechend des Protokolls aus Tabelle 3 die aufgelistete Narkose.

Tabelle 3: Narkoseprotokoll

Wirkstoff	Stammlösung	Applikations-Konzentration	Narkosewirkung
Medetomidin	1 mg/ml	150 µg/kg KG	alpha 2-Agonist , sedativ, analgetisch, myorelaxierend
Midazolam	5 mg/ml	2 mg/kg KG	Benzodiazepin , sedativ, anxiolytisch, myorelaxierend
Fentanyl	50 µg/ml	5 µg/kg KG	Opioid , analgetisch, geringe bis keine sedierende Wirkung

Die häufigsten Komplikationen, die während einer Narkose auftreten können, sind Hypothermie, Atem- und Kreislaufdepression und Dehydratation. Die Tiere wurden daher nach erfolgreicher Applikation des Narkotikums auf eine Wärmeplatte verlagert, wo sie während der Operation sowie postoperativ verweilten, um den Verlust der Körperwärme aufgrund der fehlenden Muskelaktivität und der Medikamentennebenwirkung vorzubeugen. Während der gesamten Narkosedauer wurden die Atembewegungen des Brustkorbes der Ratten beobachtet, um einer zunehmenden Atemdepression frühzeitig entgegen zu wirken. Die Narkose sowie

das Tramadol im Trinkwasser zeigte bei allen Tieren ein gutes Ansprechen und Komplikationen konnten nicht beobachtet werden.

3.4.4 Desinfektion und präoperative Maßnahmen

Die Durchführung der Operation erfolgte steril und unter strikter Trennung der unreinen Versuchstiere von den autoklavierten Instrumenten. Die Operationsbank wurde desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgedeckt und die Wärmeplatte wurde auf 37°C eingestellt.



Abbildung 10: Steriler OP-Tisch.

Abbildung 10: 3 mm Bohrer

Zum Schutz der Kornea wird wegen der zunehmenden Dehydratation Augensalbe (Corneregel®, Bausch & Lomb, Rochester, USA) aufgebracht. Durch Auslösen eines Schmerzreizes zwischen den Zehen ohne gekoppelte Reaktion (Zwischenzehenreflex) und durch den Ausfall des Lidschlussreflexes bei Auftragen der Augensalbe kann von einer ausreichenden Narkosetiefe im chirurgischen Toleranzstadium ausgegangen werden.



Abbildung 11: Versorgung der Augen mit Corneregel® (links) und Testen des Zwischenzehenreflexes (rechts)

Operationsablauf

Das betreffende Areal am distalen Oberschenkel wurde rasiert und mehrmals mit Braunol® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) desinfiziert. Der Hautschnitt am distalen Femur erfolgte mit einem Skalpell (Feather®, Nr.15, Safety Razor Co., Osaka, Japan). Der ca. 1 cm lange Schnitt wies glatte Schnittränder auf. Um das Subkutangewebe zu verdrängen, wurde ein Wundspreizer (Aesculap AG Co. KG, Tuttlingen, Germany) verwendet und anschließend stumpf durch die Muskelfaszien präpariert.

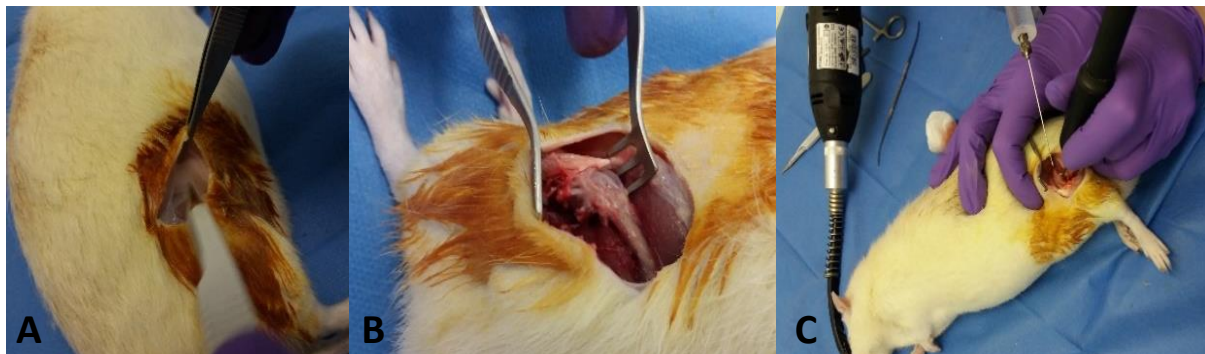


Abbildung 12: Operationsablauf ; A: Hautschnitt; B: Freilegen des Femurs mit Wundspreizer; C: Setzen des Bohrlochdefektes

Der Bohrlochdefekt wurde an der lateralen Femurcondyle mit einem Spiralbohrer (HSS Spiralbohrer-Set mit Zentrierspitze, PROXXON S.A., Wecker, Luxembourg) mit einem Durchmesser von 2,5 mm, unter ständiger Befeuchtung mit isotoner Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0,9 %, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gesetzt. Um einen Durchmesser von 3,0 mm für die vorgesehenen Scaffolds zu erreichen, musste mit einem 3 mm Spiralbohrer manuell nachgebohrt werden. Die angefallene Spongiosa wurde herausgenommen, um einen

Spontanverschluss zu vermeiden. Schließlich folgte der Einsatz der beschichteten Knochenersatzgerüste mittels Press-fit-Technik unter Befeuchtung mit NaCl-Lösung. An dieser Stelle war zu berücksichtigen, dass die Scaffolds möglichst passend in den Defekt versenkt werden, um eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Material und Knochen zu schaffen. Der Wundverschluss erfolgte mittels Subkutaner Naht mit Nadelhalter (125 mm/130 mm, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und polyfilem Faden (Vicryl™, 4.0, 70 cm,, V304, Ethicon®, Johnson + Johnson International, Diegen, Belgien). Die Haut wurde durch eine Einzelknopfnah mit monofilem Faden (Ethilon, 4.0, 45 cm, XN698, Ethicon®, Johnson + Johnson International, Diegen, Belgien) verschlossen und nochmals desinfiziert. Das Vorgehen wurde auf gleiche Weise am Femur der kontralateralen Seite durchgeführt, sodass beidseits ein Scaffold mit gleicher Beschichtung implantiert wurde oder jeweils ein Leerdefekt im Falle einer Negativkontrolle belassen wurde. In allen Fällen wurde der Defekt unter Schonung des Weichteilgewebes und der Kollateralbänder gleichermaßen in die laterale Femurkondyle gesetzt. Die Operationsdauer betrug pro Ratte zwischen 30 und 60 Minuten.



Abbildung 13: Implantation des Knochenersatzmaterials ; A: leerer Knochendefekt;
B: Knochenersatzmaterial wurde implantiert; C: Wundverschluss mit Subkutannaht

3.4.5 Postoperative Versorgung

Täglich wurden alle Tiere auf ihre Mobilität und Vitalität kontrolliert sowie die Wunde auf Infektionen oder Nahtinsuffizienz inspiziert. Postoperativ erhielten die Ratten für 5 Tage Tramadol (1 mg/ ml) zur Schmerztherapie ins Trinkwasser.

3.5 Röntgenverlaufskontrollen

Die Radiographie stellt die Basisdiagnostik bei der Beurteilung von Frakturheilung und Knochendefektheilung dar. Anhand postoperativer Nativröntgenbilder kann der Knochendefekt und die Qualität des eingesetzten Implantats beurteilt werden. Um den Heilungsverlauf über Wochen hinweg zu kontrollieren, wurden Nativröntgenaufnahmen des Femurs in zwei Ebenen in einem Röntgenschränk (Faxitron x-ray Company, Lincolnshire, USA) bei narkotisierten Ratten angefertigt. Die Röntgenverlaufskontrolle wurde direkt postoperativ und dann im Abstand von 2 Wochen bei jeweils zwei ausgewählten Tieren pro Versuchsgruppe gemacht. Zum Zeitpunkt der Woche 4 und 8 wurden direkt nach Opfierung der Tiere repräsentative Aufnahmen angefertigt. Für die Anästhesie der Tiere wurde Isofluran (Forene[®], 100 %, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland) zur Präanarkose verwendet. Anschließend erfolgte die subkutane Applikation einer Mischung aus Medetomidin und Midazolam (siehe Tabelle 3). Bei den Aufnahmen wurde stets darauf geachtet, dass der distale Teil des Femurs mit den operierten Kondylen sowie der Leerdefekt zentral abgebildet wurde.

3.6 Euthanasie der Tiere

Die 40 Tiere wurden in zwei Gruppen nach ihrer Standzeit von entweder 4 oder 8 Wochen unterteilt. Folglich wurden nach 4 Wochen die ersten 20 Tiere durch Inhalation von 100 % Vol. CO₂ in einer Kammer euthanasiert. Bei zunehmender Atemdepression starben die Tiere schmerzlos innerhalb kurzer Zeit. Der Tod konnte anhand des zu beobachteten Kreislaufstillstandes, die fehlende Atembewegung sowie durch Ausbleiben der Reflexe festgestellt werden.

3.7 Entnahme des Femurs, Präparation und Fixation

Die Eröffnung des Beines erfolgte mit einem Skalpell (Feather[®], Nr.15, Safety Razor Co., Osaka, Japan) und einer Präparierschere (145 mm, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), sodass die Haut vom Weichteilgewebe entfernt und das Femur mit einer Drehbewegung beidseits von der Beckenpfanne abgetrennt werden konnte. Mit der Präparierschere konnten die Füße an der distalen Tibia und große Muskelgruppen entfernt werden. Besondere Vorsicht galt dem Kniegelenk, da bei Präparation des Bandapparates der Bohrlochdefekt und das Material an den Kondylen nicht beschädigt werden durfte. Anschließend erfolgte die Fixation der Präparate in 4,5 %-iger Formaldehydlösung (Carl-Roth[®] GmbH, Karlsruhe,

Deutschland) für 5 Tage, um eine bessere Schneidbarkeit für die folgende Präparation zu gewährleisten.

3.8 μ CT-Bilder

Die Computermikrotomographie ist die Miniaturform der konventionellen Computertomographie, die mittels Röntgenstrahlung in der Diagnostik von Knochenläsionen zum Einsatz kommt. Dabei können auch dreidimensionale Rekonstruktionen des Defektbereichs zur Analyse der Knochenstruktur angefertigt werden.

3.8.1 Vorbereitung

Für die Anfertigung der μ CT- Bilder war es erforderlich die Präparate auf das Femur zu reduzieren, um die Lage im μ CT zu optimieren und eine höhere Auflösung zu erreichen (Abbildung 14). Mit einem Skalpell und einer Präparierschere wurde die restliche Muskulatur, Faszien und Sehnen sowie die Tibia am Kniegelenk entlang der Präparationslinie unter Schonung der Kondylen, entfernt. Das Femur wurde proximal um ca. die Hälfte der Diaphyse gekürzt.

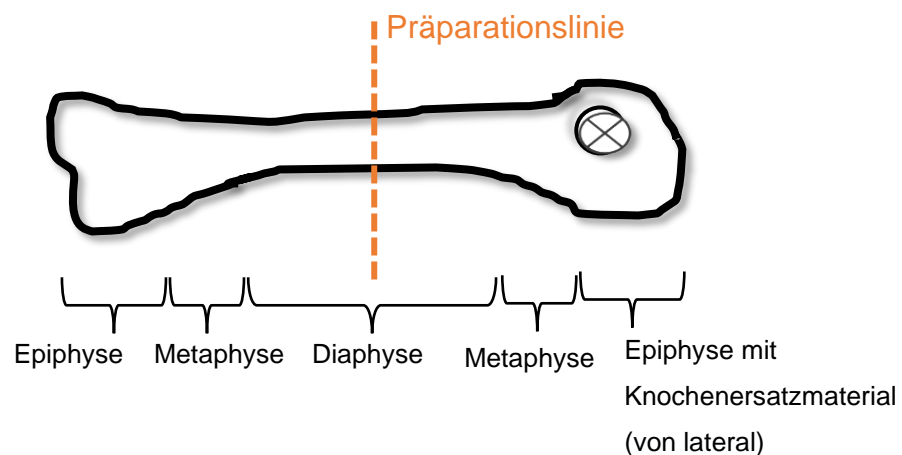


Abbildung 14: Präparation der des distalen Femurs für die μ CT-Aufnahmen

3.8.2 μ CT-Aufnahmen

Die computertomographische Aufnahme der Femurkondylen erfolgte mit einem μ CT 40 von SCANCO (Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) bei 70 kV, 114 Mikroampere (μ Amp) und einer Voxel-Größe von 20 μ m. Das implantierte Knochenersatzmaterial befand sich in den Kondylen der Epiphyse, jedoch gab es auch Defekte, die bis in den metaphysären Übergangsbereich ragten. Die Präparate wurden daher alle gleichermaßen so positioniert, dass Epiphyse und die Metaphyse bis zur proximalen Grenze der Diaphyse aufgenommen wurden. Da die Lage des Materials im Knochen immer leicht unterschiedlich ist, kann keine einheitliche Zentrierung der Schnittbilder eingestellt werden. Durch das Bearbeitungsprogramm Image J (Version 1.48 und 1.50, NIH National Institute of Health, Rockville, USA) [267-269] und mit Hilfe des Align Stacks Plugins können anschließend alle Bildsequenzen im Raum rotiert werden, sodass alle Sequenzen gleichermaßen ausgerichtet werden. Zur Veranschaulichung der Lage des Knochenersatzmaterials im Knochen, wurden 3D-Rekonstruktionen des Defektbereiches anhand der μ CT-Bilder angefertigt (Abbildung 15). Die Scaffolds liegen meist lateral in der Femurkondyle und teilweise in der Metaphyse (siehe 3.8). Dabei tangieren sie in einigen Fällen die Wachstumsfuge und durchbrechen die Kortikalis unipolar.

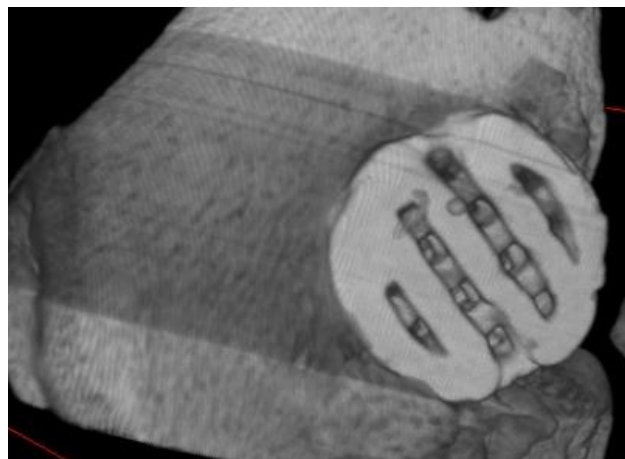


Abbildung 15: 3D-Rekonstruktion eines implantierten KEM (BMP-7-beschichtet)

3.9 Histologische Untersuchung

Von den insgesamt 80 Proben wurden jeweils 4 Proben pro Versuchsgruppe und Standzeit ausgewählt und für die histologische Untersuchung aufgearbeitet. Da es 4 Versuchsgruppen und zwei unterschiedliche Standzeiten gibt, wurden insgesamt 32 Proben an die Histologie übergeben. Alle restlichen Fixierungen dienten als Reserve oder wurden in Kunststoff eingebettet.

3.9.1 Aufbereitung der Präparate

Für die histologische Untersuchung müssen zunächst Paraffinschnitte aus den fixierten Proben hergestellt werden. Da Knochengewebe in der Regel zu hart ist, um es sauber mit dem Schlittenmikrotom schneiden zu können, mussten die Proben zunächst drei Wochen in 10 %-iger EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-Lösung (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany) entkalkt werden. EDTA wird dabei in destilliertem Wasser (Aqua. dest, pH 7,1-7,2) gelöst und mit Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Applichem GmbH, Darmstadt, Germany) gepuffert, sodass eine gewebeschonende Entkalkungslösung entsteht. EDTA ist eine schwache organische Säure, die als Chelatbildner die Calcium-Ionen in der Lösung bindet. Die Calcium-Ionen können somit nicht mehr vom Knochen resorbiert werden und der Knochen weicht auf. Durch kontrollierte Zugabe von Natronlauge (NaOH, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und kontinuierlicher Durchmischung auf einem Magnetrührer (Heidolph MR, Hei-Mix-S, Schwabach, Deutschland) wurde ein pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die Proben wurden in Einbettungskassetten (Tissue-Tek[®], Mega-Cassette[®] System, Sakura[®] Finetek Europe, Zoeterwoude, Netherlands) in das Entkalkungsmedium eingelegt, wodurch sie komplett von der Lösung umgeben wurden. Das Medium wurde täglich komplett ausgetauscht. Anschließend wurde der weiche Knochen mit destilliertem Wasser gespült, über Nacht darin aufbewahrt und somit komplett von EDTA-Rückständen befreit. Die erweichten Femora wurden ein letztes Mal mithilfe eines Skalpell's zugeschnitten, sodass nur das Defektgebiet mit den Kondylen in Paraffin eingebettet wurde.

3.9.2 Paraffineinbettung

Zur weiteren Aufbereitung wurden die fixierten Proben im Autotechnikon (Technovit[®] 7200 VLC Kulzer GmbH, Hanau, Germany) in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und von Lipiden befreit. Danach wurden sie in Xylol (AppliChem GmbH Darmstadt,

Germany) gebadet, um letzte Wasser- oder Alkoholreste zu entfernen und somit den Kontakt zwischen dem hydrophoben Paraffin (Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Germany) und dem Knochen zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gewebe mit flüssigem Paraffin infiltriert, sodass alle Zwischenräume in Berührung mit dem Medium kamen. Nach ordnungsgemäßer Infiltration mit Paraffin, wurden die Proben mit Hilfe eines Einbettautomaten in Paraffinblöcke eingebettet. In Metallgussformen wurde die Probe während des Ausgießens des Paraffins so positioniert, dass das Femur in Sagittalebene geschnitten werden konnte. Nach Auskühlen der Paraffinblöcke auf der Kühlplatte konnten die Formen entfernt werden.

Schneiden

Mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Mikrotom 2030, Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland) wurden Schnitte der Dicke von 5 µm angefertigt. Die Teilung erfolgte dabei senkrecht zur Längsachse im mittleren Abschnitt des Defekts. Diese dünnen Schnitte konnten nur durch vorangegangene ordnungsgemäße Entkalkung, Fixierung und Auswahl des richtigen Einbettungsmediums ermöglicht werden. Da sich die Schnitte nach dem Schneiden teilweise zusammenziehen, werden sie in einem heißen Wasserbad gestreckt und anschließend auf einen Objektträger gezogen und über Nacht im Wärmeschrank getrocknet.

Entparaffinieren

Bevor die Schnitte mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt werden können, muss das hydrophobe Paraffin herausgelöst werden. Die Schnitte werden für 30 min in einem Brutschrank bei 60°C gelagert, wodurch sich das Paraffin verflüssigt und abtropft. Das Entparaffinieren erfolgte durch Waschen mit Xylol, welches aufgrund seiner Löslichkeitseigenschaft das restliche Paraffin herauslöst. Im Anschluss erfolgte eine absteigende Alkoholreihe in Isopropanol (Hedinger, Stuttgart, Germany), welche der Tabelle 4 entnommen werden kann, um die Schnitte zu rehydrieren.

Tabelle 4: Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe und abschließendes Rehydratisieren in angegebener Zeit in Minuten (min)

Medium	t (min)
Xylol	3 x 10
Isopropanol 100%	2 x 5
Isopropanol 96%	2 x 5
Isopropanol 70%	1 x 5
Isopropanol 50%	1 x 5
Aqua dest.	ca. 0,5

3.9.3 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin

Jeder fünfte Schnitt der angefertigten Präparate wurde mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) -Färbung versetzt. Die Vorgehensweise erfolgte nach dem Färbeprotokoll der Tabelle 5 unter Verwendung von Hämatoxylin nach Gill (Polysciences Europe GmbH, Norderstedt, Germany) und Eosin G-Lösung (0,5% Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Germany). Bei dieser Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, die als Standardverfahren angewendet wird, um einen Überblick über alle Strukturen zu erhalten. Die Kombination von basischem Hämatoxylin mit dem sauren Eosin ermöglicht eine Kern- und Zytoplasmafärbung in unterschiedlicher Ausprägung. Das Hämatoxylin beinhaltet als Oxidationsprodukt das Hämatein, welches positiv (kationisch) geladen ist und an saure oder basophile Strukturen bindet. Da sich im Zellkern das negativ geladene Chromatin befindet, wird mit dieser Färbung vorwiegend der Kern blau gefärbt. Das Eosin ist negativ geladen (anionisch), ist azidophil und bindet somit u. a. an positiv geladene Proteine im Zytoplasma und in Mitochondrien. Dies erklärt die rosa bis hellrote Färbung vorwiegend im Zytoplasma. Kollagene Fasern sowie Knochen lassen sich stark rot bis pink darstellen. Hyaliner Knorpel erscheint dagegen blau und Erythrozyten orange bis rot.

Tabelle 5: H.E.-Färbeprotokoll mit Färbelösungen und aufsteigender Alkoholreihe in angegebener Zeit in Minuten (min)

Medium	Zeit (in min)
Hämatoxylin nach Gill	7 min
Fließend Leitungswasser (Bläuen)	10 min
Eosin G Lösung, (0,5 %)	3 min
Aqua dest.	kurz eintauchen
Aufsteigende Alkoholreihe mit Isopropanol 50-100 % (Hedinger, Stuttgart, Germany)	Jeweils kurz eintauchen, 2 x 2 min in 100%
Xylol	3 x 5 min
Cytoseal™ XYL (Richard-Allan Scientific, San Diego USA)	Eindecken

3.9.4 Masson-Goldner-Trichromfärbung

Bei der Masson-Goldner (M.G.)-Trichromfärbung handelt es sich um eine Standardmethode, um Bindegewebe differenziert von restlichen Gewebestandteilen darzustellen. Dabei werden grundsätzlich drei verschiedene Zytoplasmafarbstoffe, die Goldner-Lösungen I-III sowie der Kernfarbstoff Eisenhämatoxylin nach Weigert (Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Als Goldner-Lösung I wird Ponceau-Säurefuchsinlösung (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland) bezeichnet und dient der initialen Anfärbung des Zytoplasmas. Als Differenzierungslösung wird Phosphorwolframsäure (Goldner II, Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland) genutzt, wobei Orange G zur Anfärbung der Erythrozyten ergänzt wird. Die Goldner III-Lösung enthält Lichtgrün (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH, Köngen, Deutschland) und färbt abschließend das Bindegewebe grünlich. Für die Kernfärbung wurde an dieser Stelle Eisenhämatoxylin verwendet, welches als einziges basisches Medium die sauren Bestandteile des Zellkerns dunkelbraun bis schwarz färbt. Die Zytoplasma-Färbung erfolgte mit sauren Lösungen, die sich aufgrund ihrer Molekülgröße und Ladung in Zwischenräume unterschiedlicher Größe einlagern können und aufgrund ihres Absorptionsspektrums

unterschiedliche Farberscheinungen hervorrufen. Da das Organparenchym des Knochens vorwiegend Gewebekomponenten mit kationischer Ladung unterschiedlicher Struktur aufweist, kann Bindegewebe sowie reifer und unreifer Knochen gut voneinander differenziert werden. Kollagenes Bindegewebe wird dabei grün gefärbt. Nicht verkalktes Osteoid färbt sich orangerot und bereits mineralisierte Knochenmatrix türkis. Das Zytoplasma lässt sich rötlich-braun darstellen und Gefäße rot. Für die Färbung wurden pro Versuchsgruppe jeweils vier bis sechs Paraffinschnitte ausgewählt, die den Defekt und das eingesetzte Material gut darstellen. Vor der eigentlichen Färbung erfolgte auch hier das Entparaffinieren und Rehydratisieren in Xylol und absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua dest., wie es in Tabelle 6 dargestellt ist.

Tabelle 6: M.G.-Färbeprotokoll mit Kern- und Zytoplasmafarbstoffen (Goldner I-III) und den jeweiligen Zwischenschritten. Die Zeitangabe ist in Minuten (min) angegeben.

Hämatoxylin nach Weigert	5 min
Aqua dest.	kurz eintauchen
Differenzieren in HCl 30% (Merck KGaG, Darmstadt, Deutschland)	kurz eintauchen (einige Sekunden)
Fließend Leitungswasser (Bläuen)	10-15 min
Aqua dest.	kurz eintauchen, Spülen mit 1 %-iger Essigsäure
Ponceau-S-Lösung (Goldner I)	10 min + Spülen mit Essigsäure
Phosphorwolframsäure-Orange G- Lösung (Goldner II)	10 min + Spülen mit Essigsäure
Lichtgrün- Lösung (Goldner III)	10 min + Spülen mit Essigsäure
Aqua dest.	kurz eintauchen

Abschließend erfolgte das Dehydrieren ähnlich wie in Tabelle 5 mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 50%, 70%, 96%, 100%) und Xylol (3 x 5 min). Das Eindecken der gefärbten Schnitte erfolgte mit Cytoseal® und Deckgläsern (Microscope slides, RESULAB GmbH, Marburg, Deutschland).

3.9.5 Immunhistochemofärbung

Prinzip

Die Immunhistochemie (IHC) wird angewendet, um spezifische Proteine und Peptide im Gewebe des Defektbereichs zu identifizieren und lokalisieren. Das Prinzip der Immunhistologie beruht auf der Bindung eines unkonjugierten Primärantikörpers an ein zellspezifisches Epitop tragendes Antigen. Das Epitop des Antigens muss zuvor durch Vorbehandlung demaskiert werden, damit der Antikörper binden kann. Der Primärantikörper ist dabei meist an ein Detektionssystem gekoppelt, welches die Antigen-Antikörper-Reaktion indirekt über einen konjugierten Sekundärantikörper sichtbar macht. Beigefügtes Chromogensubstrat wird durch den konjugierten Komplex enzymatisch aktiviert und reagiert an der Antigenstelle mit einem Farbumschlag. So können gewebsspezifische Oberflächeneigenschaften detektiert werden [270].

Methode

Im vorliegenden Fall wurde eine LSAB (engl. labelled-streptavidin-biotin)-Methode angewandt (DAKO LSA B2, Syst HRP-K0675). Diese beinhaltet neben dem Primärantikörper, einen biotinylierten Sekundärantikörper (Biotinylated Link, Anti-mouse IgG made in Goat, Dako Carpinteria, California, USA) und eine mit Streptavidin konjugierte Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP, Carpinteria, California, USA). Bei Biotin handelt es sich um ein Coenzym, welches eine hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin aufweist und an den Sekundärantikörper bindet. Es bildet sich ein stabiler Streptavidin-Biotin-markierter Antikörper Komplex (LSAB), welcher es ermöglicht zahlreiche Enzymmoleküle zu binden und durch die Umsetzung des Chromogen, die Antigenstelle markiert. Die konjugierte Peroxidase ist das Enzym, welches die Reaktion des Chromogen Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Dako Liq. DAB K3469) mit Wasserstoffperoxid zu einem braunen Reaktionsprodukt katalysiert [271].

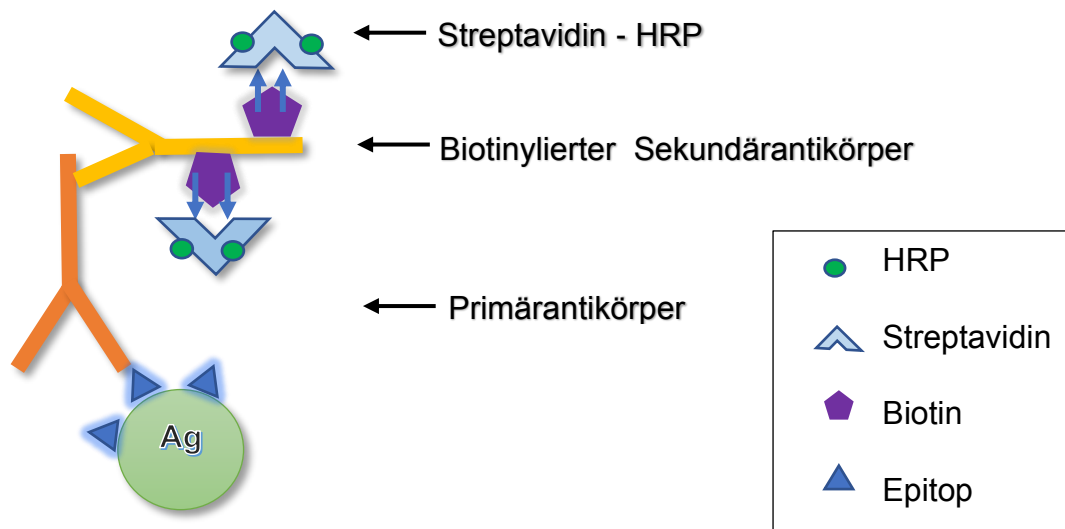


Abbildung 16: LSAB-Methode schematisch dargestellt

Primärantikörper

Bei den ausgewählten Primärantikörpern handelt es sich für die IHC geprüfte, unkonjugierte Anti-Ratten-Antikörper des Isotyp Immunglobulin G1 (IgG1) aus der Maus (außer Anti-vWF). Die Lagerung erfolgte als Aliquots bei einer Temperatur von 20°C.

CD31 (Thrombozyten/Endothelzellen-Adhäsionsmolekül, PECAM1)

Der monoklonale Antikörper (TLD-3A12, OriGene, Herford, Deutschland) bindet an die Oberflächenrezeptoren CD31 von Thrombozyten und Endothelzellen und dient damit hauptsächlich als Marker der Angiogenese [272].

SPARC (Osteonectin)

Der monoklonale Antikörper SPARC (5031, ThermoFisher, Waltham, USA) markiert das in der Extrazellulärmatrix vorkommende Protein Osteonectin. Da es hauptsächlich während Umbau- und Wachstumsvorgängen sezerniert wird, dient der SPARC Antikörper zur Markierung des Knochenstoffwechsels [273].

Osteopontin

Der monoklonale OPN-Antikörper (1B20, Novus, Cenntenial, USA) bindet an das in der Knochenmatrix befindliche Osteopontin. Da Osteopontin an der Regulation der Osteogenese beteiligt ist, dient der OPN-Antikörper als Marker des Knochenwachstums. Es bindet Hydroxylapatit und bildet damit die Grundsubstanz des Knochens [274].

Von-Willebrand-Faktor

Der polyklonale anti-vWF (aa1304-1452, LSBio, Seattle, USA) wurde in Kaninchen hergestellt und dient als Marker der Hämostase. Der von-Willebrand-Faktor dient der Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen, die auch im Knochengewebe an dünnwändigen Gefäßen zu finden sind [275].

Protokoll

Für die Immunhistologie wurden Paraffinschnitte verwendet, die zunächst in Xylol entparaffiniert wurden, um die Empfindlichkeit der Epitope für die Antikörper zu erhöhen. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (siehe Tabelle 4). Die Vorbehandlung der Schnitte zur proteolytischen Andauung erfolgte für 10 min in einer feuchten Kammer unter Einwirken von Proteinase K (DAKO – ready to use, Glostrup, Dänemark). Dieser Vorgang dient der Demaskierung der Epitope, die sonst durch Membranvernetzungen für die Antikörper unzugänglich sind.



Abbildung 17: Feuchtkammer mit histologischen Schnitten, Inkubation mit Proteinase K

Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim[®], Deutschland) wurden die Schnitte für 20 min in 3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Lösung (Merck KGA, Darmstadt, Germany), verdünnt mit PBS-Lösung, inkubiert. Dadurch sollte eine Hintergrundfärbung durch die katalytische Wirkung der endogenen Peroxidase unterdrückt werden. Es folgte erneut ein Waschvorgang mit PBS für 2 x 5 min und anschließenden Einspannen der Schnitte in die Shandon-Kassetten (Shandon Coverplate™, Richard-Allan-Scientific, Thermo Scientific Inc., Kalamazoo, USA).



Abbildung 18: Shandon-Kassetten mit eingelagerten Paraffinschnitten für Inkubations- und Waschschrirte im Prozess der immunhistochemischen Färbung

Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit Normalserum (Horse-Serum, Biochrom AG, Berlin, Germany) der Verdünnung 1:10 inkubiert, um eine unspezifische Hintergrundfärbung abzugrenzen. Anschließend wurden die Primärantikörper in einem bestimmten Verdünnungsverhältnis mit PBS (siehe Tabelle 7) auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Jede Shandon-Kassette wurde dabei jeweils mit 400 µl Reagenz in folgendem Verdünnungsverhältnis beladen.

Tabelle 7: Auflistung der Primärantikörper und ihrer Verdünnung

Primärantikörper	Verdünnungsverhältnis
CD31/PECAM1	1:100
SPARC (Osteonectin)	1:500
Osteopontin (OPN)	1:100
vWF	1:100

Für die Negativkontrolle wurden für jede Antikörpergruppe (CD31, SPARC, OPN, vWF) jeweils ein Schnitt verwendet, der gleichermaßen mit den gelisteten Reagenzien behandelt wurden, jedoch über Nacht nur mit Normalserum und ohne spezifischen Antikörper inkubiert wurde. Dieser wurde als negative Kontrollgruppe herangezogen, um eine grundsätzliche Funktionsfähigkeit der Färbemethode beurteilen zu können. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2 x mit PBS gewaschen und für 10 min mit jeweils 200 µl biotinyliertem Sekundärantikörper, verdünnt in PBS, inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die 10-minütige Inkubation mit der Streptavidin konjugierten Peroxidase zur Farbverstärkung. Für die Färbung wurde anschließend Diaminobenzidin als Chromogensubstrat (Dako Liq. DAB-K3469) in einer Feuchtkammer auf die Schnitte pipettiert [276]. In diesen Vorgang wurde das Chromogen durch die Peroxidase an der Antikörperbindungsstelle in einen bräunlichen Farbstoff umgesetzt, welcher sich zunehmend verstärkte. Die Inkubationszeit betrug dabei ca. 510 min und orientierte sich an der deutlichen Braunfärbung der Positivkontrollen. Die Schnitte wurden in Aqua dest. aufgenommen und die Reaktion mit dem DAB gestoppt. Zum Schluss erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Gill-III, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) und das luftfreie Eindecken mit Cytoseal™ (Richard-Allan Scientific, San Diego USA). Da die 4 Versuchsgruppen (NK, KEM, KEM+BSP, KEM+BMP7) der Standzeiten 4 und 8 Wochen jeweils mit vier Antikörpern (plus Negativkontrolle) inkubiert wurden, mussten insgesamt 40 Schnitte gefärbt werden. Die Abbildung 19 stellt die Zuordnungen der Präparate zu den jeweiligen Antikörpern schematisch dar.

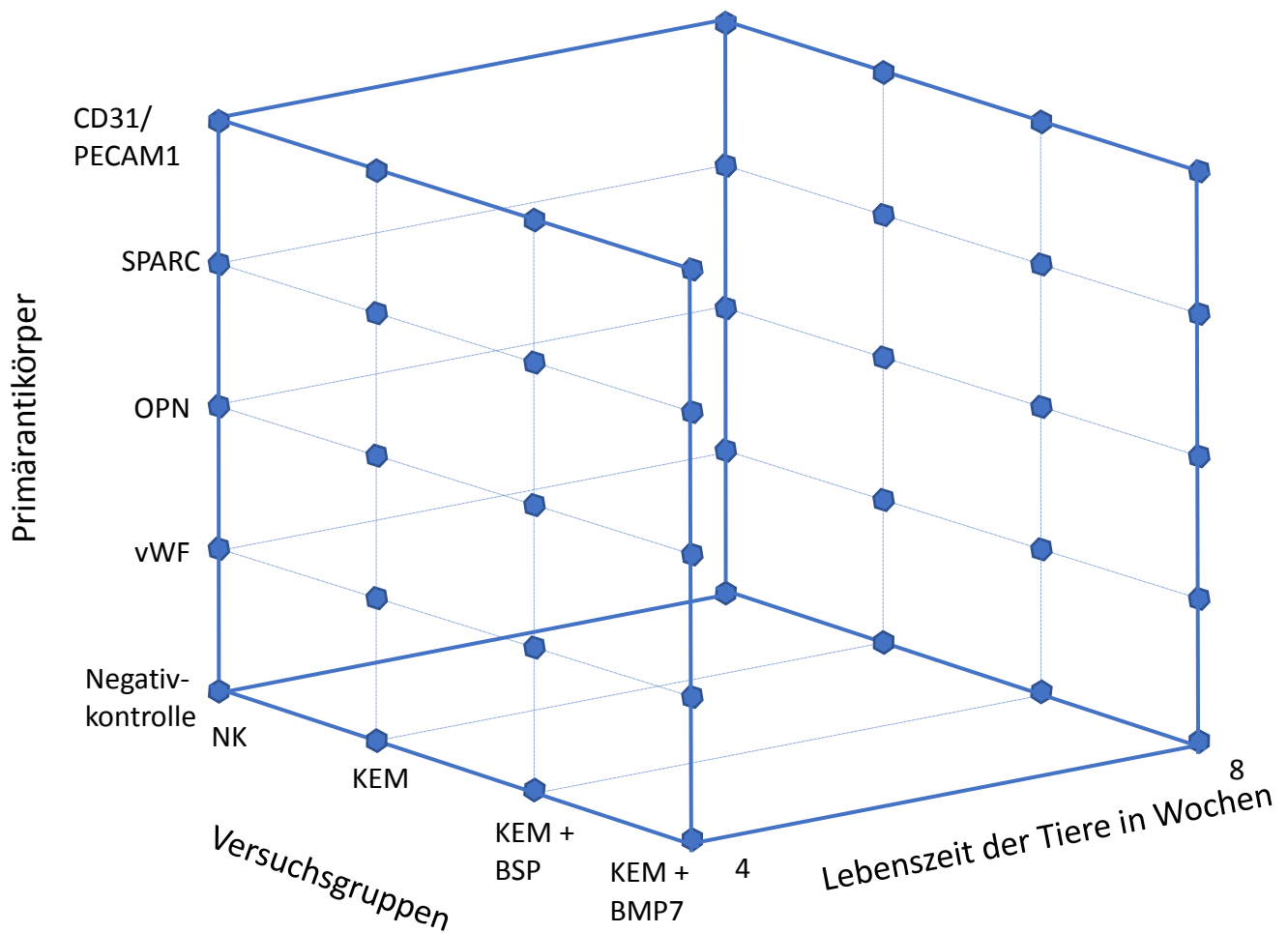


Abbildung 19: Schematische Darstellung der systematischen Präparat-Auswahl für die immunohistochemische Färbung.

Aus jeder Versuchsgruppe wurde jeweils ein Präparat mit Antikörper gegen CD31, Osteonectin (SPARC), Osteopontin (OPN) und vWF versetzt. Jeder Punkt im Gitter stellt dabei die Zuordnung eines Antikörpers zu der jeweiligen Versuchsgruppe dar. Insgesamt wurden folglich 40 Präparate gefärbt, wobei die Hälfte davon auf die beiden Standzeiten von 4 und 8 Wochen unterteilt wurden.

3.9.6 Auswertungsverfahren

Die Evaluation der Knochenregeneration erfolgte mit verschiedenen Lichtmikroskopen (Leica MZ16A, Zeiss Axioskop und Axioplan, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und zugeschalteter Kamera (Leica DC480, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Deutschland) und orientiert sich an qualitativmorphologischen Gesichtspunkten. Die deskriptive Histologie dient der

allgemeinen Beurteilung des Gewebes, der Zellmorphologie, der trabekulären und kortikalen Knochenoberflächen und Implantatoberflächen sowie der Anordnung von Knochen-Implantat-Kontakten im Defektbereich. Mittels AK-Bindung können zudem Gefäßstrukturen im Gewebe detektiert werden und Rückschlüsse auf die Knochenvitalität gezogen werden. Bei der Beurteilung der IHC ist zudem die kumulative Signalstärke der Reaktion das Kriterium qualitativer Auswertung.

3.10 μ CT Auswertung mit Image J

Für die Auswertung der μ CT-Bilder wurde das frei zugängliche Bildverarbeitungsprogramm Image J (1.50i; Java 1.6.0_24) verwendet [277-279]. Es wurde 1987 von Wayne Rasband an der NIH (National Institutes of Health, Rockville, USA) unter dem Namen NIH Image auf Mac OS X entwickelt und dient der Bearbeitung und Analyse von Bilddateien wissenschaftlicher Zwecke. Über die letzten Jahre wurde es durch Zusammenarbeit der Nutzer erweitert und ist nun auch für Windows und Linux verfügbar. Es entwickelten sich die neueren Programme Image J, Fiji (Image J 1.50e, NIH, Rockville, USA) und Image J 2, welche leichter zu entpacken sind und ein größeres Spektrum an Visualisierung und Modulation zulassen [267, 269]. Mithilfe von Macros und Plugins können verschiedene Bearbeitungsfunktionen beliebig kombiniert werden und Algorithmen (Macros) selbst erstellt und gespeichert werden, um die Bearbeitung zu erleichtern. Um das Knochenwachstum im Bereich des Defektes zu berechnen, wurde eine Methode angewandt, die das Knochenvolumen (engl. Bone Volume, BV) und das Gesamtvolumen (engl. Total Volume, TV) in Relation setzt. Es wird der Quotient BV/TV eines definierten Raumes (engl. Region of Interest, ROI) berechnet und daraus der jeweilige Knochenzuwachs in diesem Gebiet abgeleitet. Das prozentuale Knochenvolumen wurde somit durch Zählen der Pixel oberhalb der Knochendichteschwelle innerhalb des 3D-Volumens gemessen. Die Auswertung der vorliegenden Bilddateien erfolgte einfach verblindet. Als Erstes wurde das μ CT-Bild in ein Binärsystem (engl. Binary) umgewandelt, bei dem die Voxel entweder schwarz oder weiß sein können, Graustufen existieren darin nicht. Durch Setzen eines oberen und unteren Grenzwertes (engl. Treshold) konnte der implantierte CPC-Zylinder mit dem umliegenden Knochen (schwarz) vom Hintergrund (weiß) abgehoben werden. Dieses Vorgehen ist in der Abbildung 20 dargestellt. Der obere Grenzwert definiert dabei den maximalen Pixelwert und wird für jedes Bild gleichermaßen und durch den Untersucher festgelegt. In diesem Fall lag der Wert bei 19253. Alle Werte zwischen

dem oberen und unteren Grenzwert werden schwarz dargestellt, während alle Werte oberhalb oder unterhalb der Grenzwerte, weiß erscheinen. Der untere Wert wurde individuell durch den Kontrastumschlag von schwarz nach weiß ermittelt.

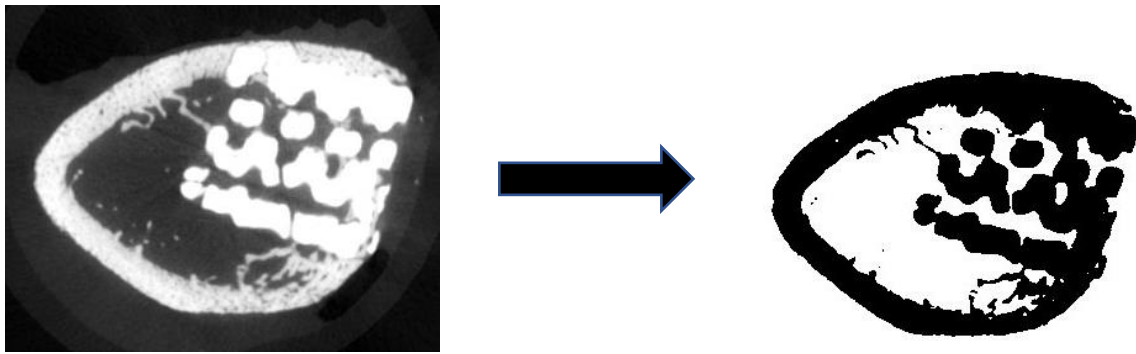


Abbildung 20: μ CT-Aufnahme eines BSP-beschichteten KEM nach 4 Wochen (ID 2632, Slice 102/312) wird durch Setzen des Grenzwertes in ein Binary umgewandelt

Nach diesem Prinzip wurde ein Binary erstellt, welcher den CPC-Zylinder und den umliegenden Knochen wie oben beschrieben darstellt (siehe Abbildung 20) sowie ein weiteres Binary, welches nur das Knochenersatzmaterial schwarz färbt (Abbildung 21). Aufgrund der unklaren Grenze zwischen Implantat und Knochen, wurde das Plugin „Dilate (3D)“ dreimal eingesetzt und der Treshold korrigiert. Mittels des Befehls „Image Calculator“ wurde anschließend das zweite Binary von dem ersten Binary subtrahiert, sodass ein Bild entstand, dass nur Knochen ohne Implantat enthielt. Dieses Vorgehen, wie es in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt wird, wurde als Basis der BV/TV Berechnung verwendet.

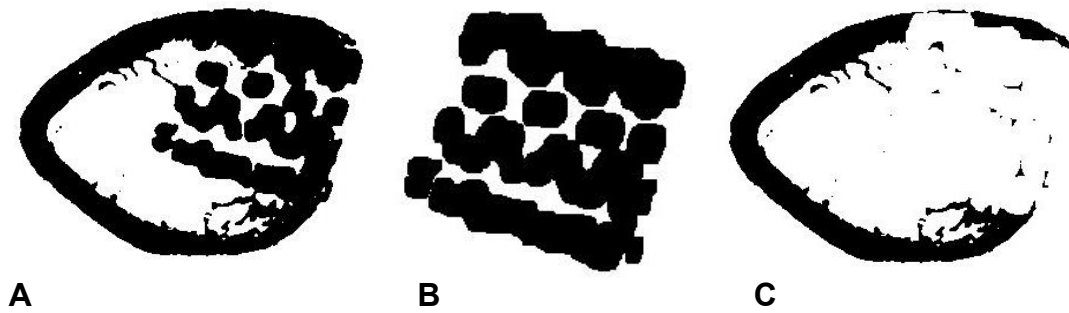


Abbildung 21: Subtraktion des dilatierten KEMs vom gesamten Binary.

A: Knochen+KEM; B: dilatiertes KEM; C: subtrahierter Knochen ohne KEM

Im nächsten Schritt wurden die μ CT-Bildsequenzen mithilfe des Plugins „Align Stacks“ und „Reorient Stack3 TP“ durch axiale und sagittale Rotation so ausgerichtet, dass das Knochenersatzmaterial genau in der Transversalebene (axial) lag. Dadurch wird der gesamte Durchmesser (3 mm) des Zylinders sichtbar. Dies war nötig, um später die ROI definieren zu können. Anschließend wurde die Bildsequenz von +/- 300 Bildern auf 155 Bilder verkürzt (1 Voxel = 20 μ m), welche nur den 3,1 mm hohen CPC-Zylinder mit seinem umgebenden Knochen einschloss. Die ROI wurde mit dem Befehl „Specify“ definiert und umfasste im Maximum den gesamten Durchmesser des Zylinders (\varnothing 3 mm). Durch diesen Schritt konnte letztendlich ein Zylinder definiert werden, welcher dem TV entspricht.

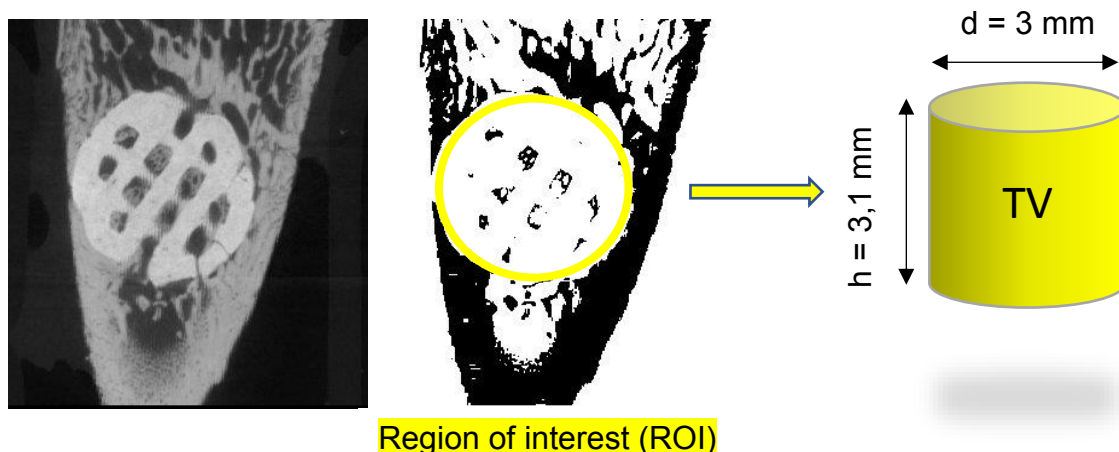


Abbildung 22: Erstellung der Gesamt-ROI in Form eines Zylinders anhand der bearbeiteten μ CT-Bilder. Hier ist ein BSP-beschichtetes KEM (ID 2632, Slice 118/155) nach 4 Wochen Heilungszeit abgebildet

Um eine Aussage über das Knochenwachstum im Innern des Knochens im Vergleich zum oberflächlichen Teil im Bereich der Kortikalis machen zu können, erfolgte die Unterteilung des Zylinders in drei Abschnitte vom medullären Teil des Knochens an die kortikale Oberfläche (A, B, C). Dies erfolgte mit Hilfe eines Macros, welches den Zylinder gleichermaßen in Subzylinder mit einer Höhe von jeweils 1 mm (51 oder 52 Slices) unterteilte. Zudem erfolgte eine Unterteilung von zentral nach peripher in Form von drei Hohlzylindern (Dicke jeweils 1 mm), um eine Aussage über die Ossifikation aus dem umgebenden Knochen in den Kern zu erhalten (von Kern zur Schale: Zone 1,2,3). Mit Hilfe eines weiteren selbst erstellten Macros konnte die Zielgröße BV/TV der einzelnen Kompartimente berechnet werden. Die Aufteilung der Gesamt-ROI in Abschnitte und Hohlzylinder ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

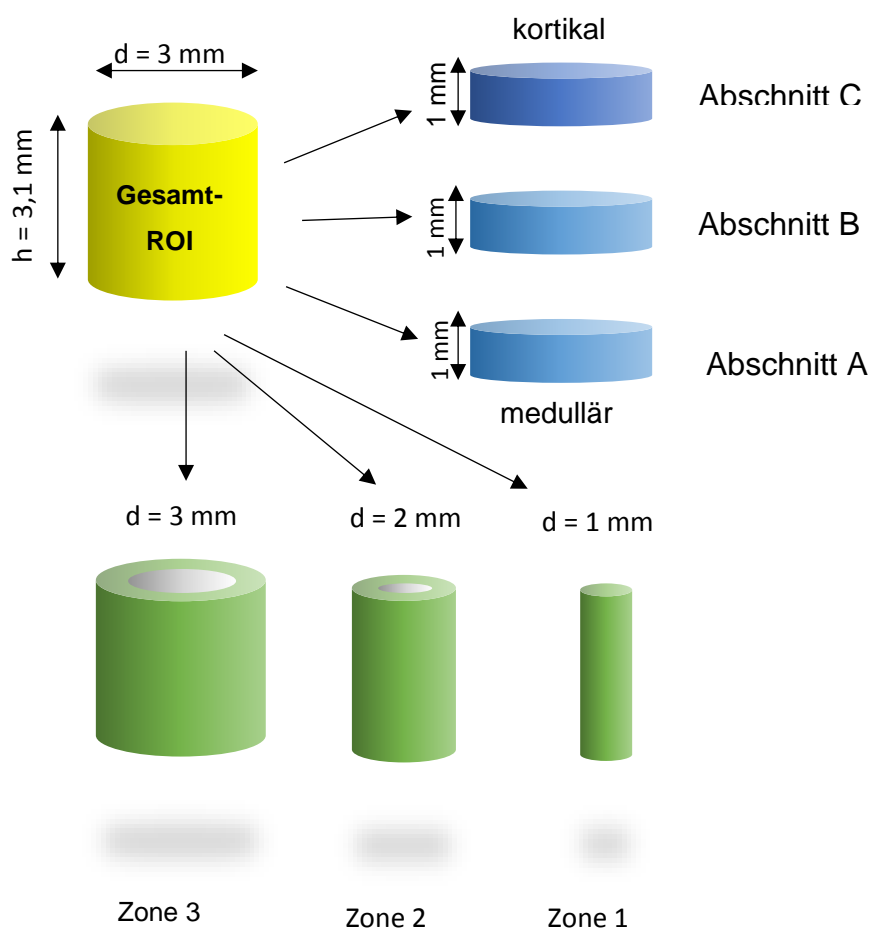


Abbildung 23: schematische Darstellung der Aufteilung der Gesamt-ROI in Subzylinder (A,B,C) und Hohlzylinder (Zone 1-3)

3.11 Statistische Analyse

Die Statistische Analyse wurde mit SPSS 23.0 (IBM, Chicago, USA) unter der Verwendung des Mann-Whitney U-Tests durchgeführt. Ein p-Wert < 0.05 wurde dabei als statistisch signifikant festgelegt. Im Falle multipler Testprozeduren, wurden die p-Werte an die Bonferroni-Korrektur angepasst. Die Darstellung der Daten erfolgte als Boxplot und beschreibt den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Bildgebung

4.1.1 Röntgenverlaufskontrolle

In der Röntgenverlaufskontrolle über 8 Wochen hinweg konnte eine heterotope Ossifikation in der Defektumgebung oder eine Dislokation des osteoinduktiven Materials in das umgebende Weichteilgewebe radiologisch ausgeschlossen werden. Unmittelbar postoperativ (W0) konnte die Lokalisation des Defekts und die Lage des Implantats überprüft werden. Der frische Knochendefekt ist durch einen transparenten Saum in der Peripherie des Scaffolds sichtbar. Im Verlauf des Heilungsprozesses kann nach 8 Wochen (W8) eine zunehmende Ossifikation durch eine vermehrte inhomogene Densität im Umkreis des Knochenersatzmaterials beobachtet werden, wobei eine Differenzierung von Knochen- und calciumphosphathaltigen KEM schwierig ist (Abbildung 25).

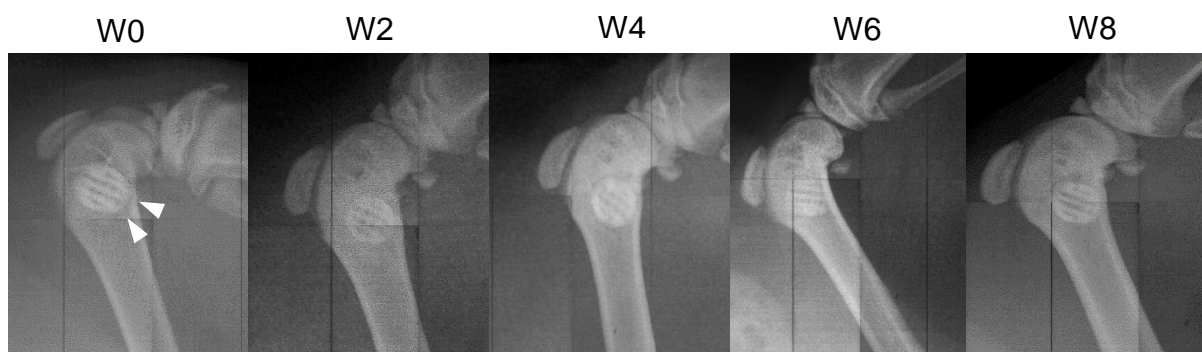


Abbildung 25: Verlaufskontrolle des rechten Femurs im Abstand von 2 Wochen von Tier Nr. 32 der Versuchsgruppe III (KEM+BSP), Untergruppe B (W0-W8). In der BSP-Gruppe wird das KEM in den Knochen integriert; Disklokationen des Implantats konnten in allen Präparaten ausgeschlossen werden.

4.1.2 μ CT-Aufnahmen

Die μ -CT-Bilder der Abbildung 26 zeigen detaillierter als die Röntgenuntersuchungen (Rx) der Femora die Veränderungen im Bereich des Knochendefektes. Sie wurden nach 4 Wochen (UG A) und nach 8 Wochen (UG B) post mortem angefertigt. In allen Aufnahmen, außer im Falle des Leerdefektes, bilden sich zahlreiche Knochen-Implantat-Kontakte, sodass das Knochenersatzmaterial sichtlich in den Knochen integriert wird. Die Ossifikation erfolgt vornehmlich entlang der Oberfläche des Scaffolds und bildet dabei strangförmige Querverbindungen innerhalb der Poren aus. In der Positivkontrolle (KEM+BMP-7) ist neu gebildetes Knochengewebe sichtlich im Randbereich des Defektes erkennbar und weniger im Zentrum. Hinsichtlich der BSP-beschichteten Knochenersatzmaterialien lässt sich das Knochenwachstum dagegen im gesamten Verlauf des Scaffolds bis in tiefere Bereiche verfolgen. In dieser Versuchsgruppe zeigt sich nach 4 Wochen tendenziell ein größeres Knochenvolumen im Bereich des Defektes im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die Negativkontrolle zeigt nach 4 Wochen radiologisch einen transparenzgeminderten Leerdefekt, welcher im μ CT durch die Unterbrechung der Kortikalis und die Ausdünnung der Spongiosa im Defektbereich zu erkennen ist. Ohne den Einsatz von Knochenimplantaten zeigt die Ossifikation in der radiologischen Bildgebung somit einen geringeren Fortschritt als in den Versuchsgruppen mit implantierten Knochenersatzmaterialien. Im zeitlichen Verlauf zeigt sich nach 8 Wochen eine Zunahme des Knochenvolumens in allen Versuchsgruppen unter Ausbildung eines stabilen Knochen-Implantat-Komplexes. Die Abbildung 27 zeigt hierbei die knöcherne Durchbauung in peripheren und zentralen Teilen in der BSP-Gruppe nach 8 Wochen. Die Abbildung 28 bildet die gleiche Gruppe in axialer Schnitfführung ab und zeigt eine deutliche Ossifikation im Außenbereich. Eine Densitätszunahme der neugebildeten Knochenmatrix in der Nativröntgenaufnahme über den Untersuchungszeitraum hinweg kann durch Ausbildung knöcherner Querbrücken in den μ CT-Aufnahmen bestätigt werden. Der Leerdefekt zeigt im μ CT nach 8 Wochen weiterhin einen Knochendefekt mit zunehmender Konsolidierung von basal.

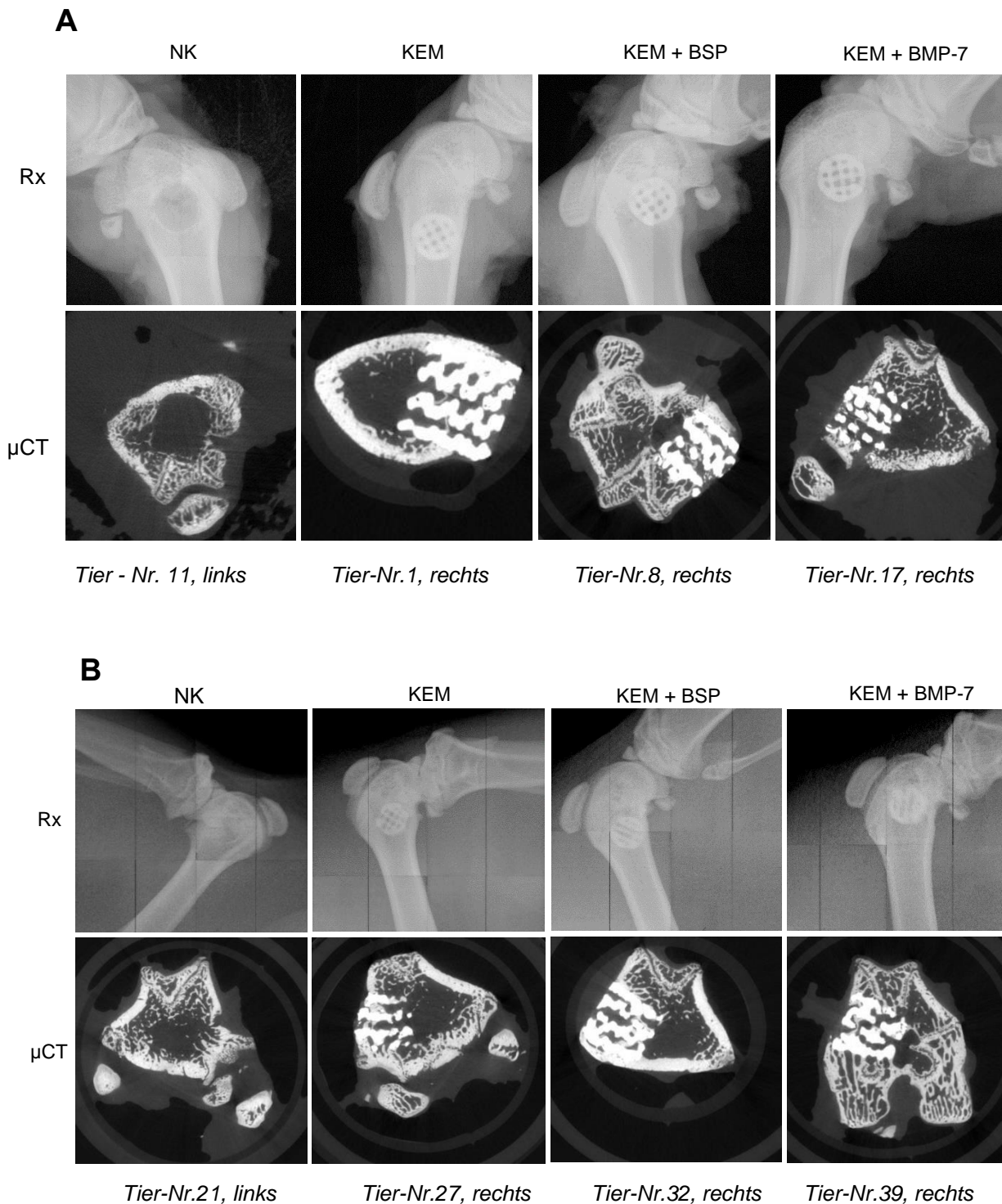


Abbildung 26: μ CT-Aufnahmen nach 4 (A) und 8 Wochen (B) jeder Versuchsgruppe in Anlehnung an Nativröntgenaufnahmen des zugehörigen Femurs. Das KEM wird zunehmend in den Knochen integriert und es bilden sich zahlreiche Knochen-Implantat-Kontakte aus. Der Leerdefekt ist nach 8 Wochen weiterhin erkennbar.

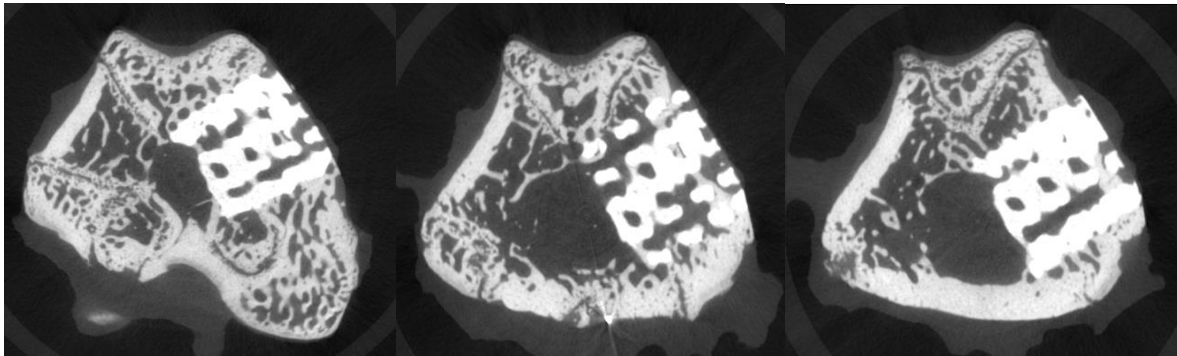


Abbildung 27: Coronare Sequenzen entlang der Longitudinalebene des BSP beschichteten Implantats nach 8 Wochen. Sichtbare knöcherne Durchbauung in äußeren (a und c) und mittleren Teilen (b).

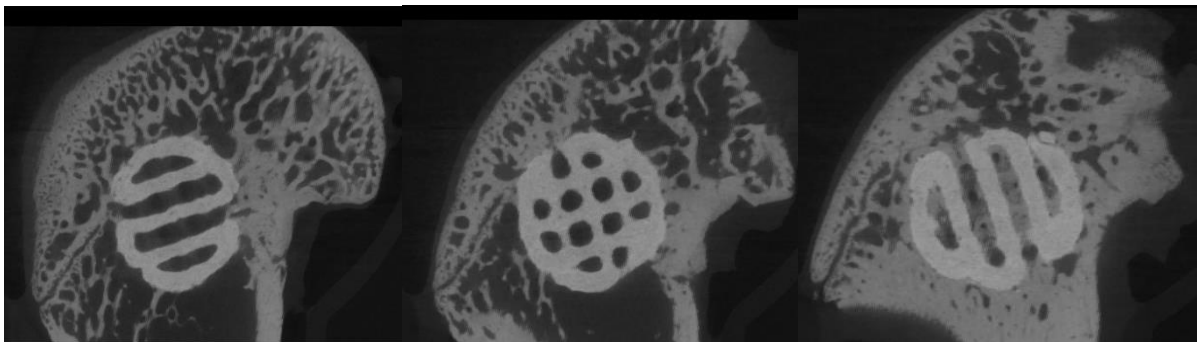


Abbildung 28: Axiale Bildsequenzen von medullär (links) nach kortikal (rechts) der Versuchsgruppe III (KEM+BSP).

Knochen-Implantat-Kontakte sind erkennbar und das Scaffold ist in allen Teilen gut in den Knochen integriert. Im Bereich der Kortikalis (rechts) hat sich ein dichtes Knochengeflecht gebildet.

4.2 Bone Volume/ Total Volume-Auswertung

Anhand der Auswertung der μ CT-Bilder mit Image J wurde der Quotient aus Knochenvolumen und Gesamtvolumen (BV/ TV) im Bereich des implantierten Knochenersatzmaterials erstellt. Die Datenermittlung erfolgte dabei verblindet, d.h. die Auswertung des Knochenvolumens wurde unabhängig von der jeweiligen Versuchsgruppe gleichermaßen durchgeführt. Der Anteil des neugebildeten Knochengewebes im Defektbereich wurde in Form einer deskriptiven Statistik ermittelt und als Boxplot dargestellt. Ausreißer (Datenabweichung $> 1,5$ Standardabweichungen (SD) vom Mittelwert) werden als Kreise dargestellt, extreme Ausreißer (>3 SD) werden als Sterne dargestellt. Der Knochenanteil wird dabei in Prozent angegeben und gegen die Variablen der X-Achse (Versuchsgruppen II-IV) aufgetragen. Der Median dient als Vergleichswert zwischen den einzelnen Gruppen und wird in den Tabellen detailliert aufgeführt (Tabelle 8). Der p-Wert bezieht sich jeweils auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) bei einer Gruppengröße von $n=10$ und definiert das Signifikanzniveau.

Die zu widerlegende Nullhypothese lautet dabei: Die Verteilung von BV/TV ist unabhängig von den Variablen der Versuchsgruppen

Zwischen den einzelnen Gruppen konnte weder nach 4 respektive nach 8 Wochen signifikante Unterschiede im Knochenvolumen festgestellt werden, sodass die Ergebnisse in Tendenzen wiedergegeben werden. Nach 4 Wochen ist der Anteil des neugebildeten Knochens in den mit BSP ($5 \% \pm 1,6 \%$)- und BMP-7 ($5,6\% \pm 2,2\%$)-beschichteten Knochenersatzmaterialien tendenziell höher als unbeschichtetes Material ($3,5 \% \pm 3,2 \%$). Somit ergibt die Evaluation des BV/ TV Quotienten die höchsten Werte für BMP-7 beschichtete Materialien, dicht gefolgt von BSP-beschichteten und letztlich für unbeschichtete Implantate. Man kann somit im Vergleich zur Kontrollgruppe II (KEM) tendenziell eine osteoinduktive Wirkung durch eine BSP-Beschichtung innerhalb der ersten 4 Wochen feststellen. Nach 8 Wochen zeigt sich der größte Knochenanteil bei unbeschichteten KEM ($6,4 \% \pm 2,1 \%$). Es kommt scheinbar zum Stagnieren des Knochenwachstums der Gruppen mit Beladung (KEM+BSP $4,0 \% \pm 3,8 \%$; KEM+BMP-7 $4,3 \% \pm 1,5 \%$), wobei insbesondere die BSP Gruppe hohe Standardabweichungen demonstriert (Abbildung 29).

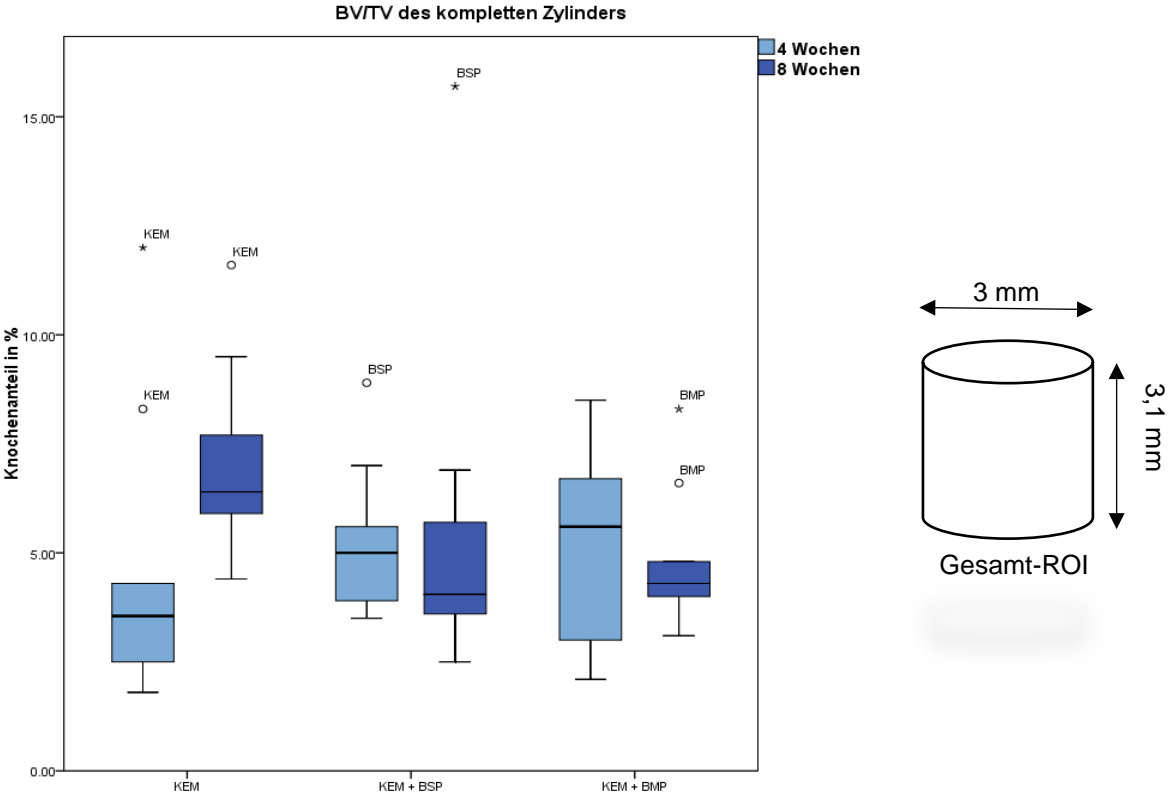


Abbildung 29: Knochenanteil der gesamten ROI im Defektbereich nach 4 und 8 Wochen Heilungsprozess. Die BSP-beschichteten KEM zeigen nach 4 Wochen ein höheres Knochenvolumen als unbeschichtetes Material, während nach 8 Wochen unbeschichtetes KEM das größte Knochenwachstum zeigt.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Ergebnisse (BV/TV) nach 4 und 8 Wochen im Vergleich. Erfasst wurde die Gesamt-ROI.

	KEM		KEM + BSP		KEM + BMP-7	
	4W	8W	4W	8W	4W	8W
Mittelwert	0,045	0,070	0,052	0,054	0,053	0,048
95% Konfidenzintervall						
Untergrenze	0,022	0,055	0,041	0,027	0,037	0,037
Obergrenze	0,068	0,086	0,064	0,082	0,069	0,059
Median	0,036	0,064	0,050	0,041	0,056	0,043
Standardabweichung	0,032	0,022	0,017	0,038	0,023	0,015
Minimum	0,018	0,040	0,035	0,030	0,021	0,030
Maximum	0,120	0,120	0,089	0,160	0,085	0,080

4.2.1 Untersuchung spezifischer Volumina

1) Vertikales Knochenwachstum

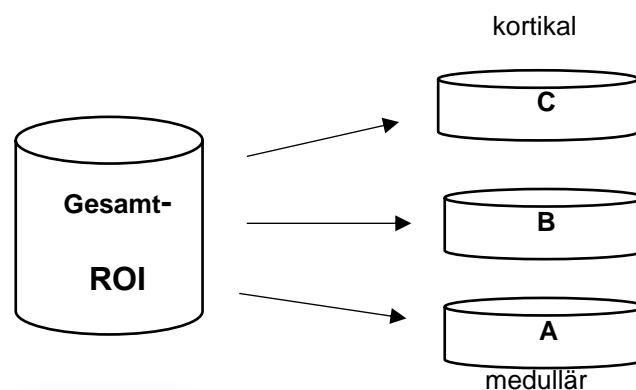


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Aufteilung der ROI in 3 Abschnitte (A,B,C) zur Evaluation des Knochenwachstums in vertikaler Richtung vom Knochenmark (medullär) zur Kortikalis (kortikal).

Die Einteilung des Zylinders in drei Abschnitte gibt Auskunft über das Knochenwachstum im basalen Spongiosabereich sowie im Bereich der Kortikalis (Abbildung 30). Nach 4 Wochen zeigt sich tendenziell ein höherer Knochenanteil im Abschnitt A der mit BSP- ($5,8 \% \pm 2,8 \%$) und BMP- ($6,3 \% \pm 3,8 \%$) beschichteten KEM, während unbeschichtetes KEM in diesem Bereich zunächst ein geringes Knochenvolumen aufweist ($2,8 \% \pm 3,1 \%$). In der Versuchsgruppe BSP-beschichteter Implantate erfolgt die Ossifikation zunächst eher

in den äußeren Abschnitten B ($\text{KEM+BSP } 3,9\% \pm 2,4\%$) und C ($\text{KEM+BSP } 3,6\% \pm 5,9\%$; siehe Abbildung 31A). Nach 8 Wochen zeigt sich einheitlich ein größeres Knochenwachstum im äußeren Abschnitt C als Zeichen einer verdichteten Kortikalis ($\text{KEM } 9,8\% \pm 4,9\%$; $\text{KEM+BSP } 6,1\% \pm 2,8\%$; $\text{KEM} \pm \text{BMP7 } 6,2\% \pm 1,9\%$; siehe Abbildung 31B). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen können bezüglich des vertikalen Wachstums nicht festgestellt werden.

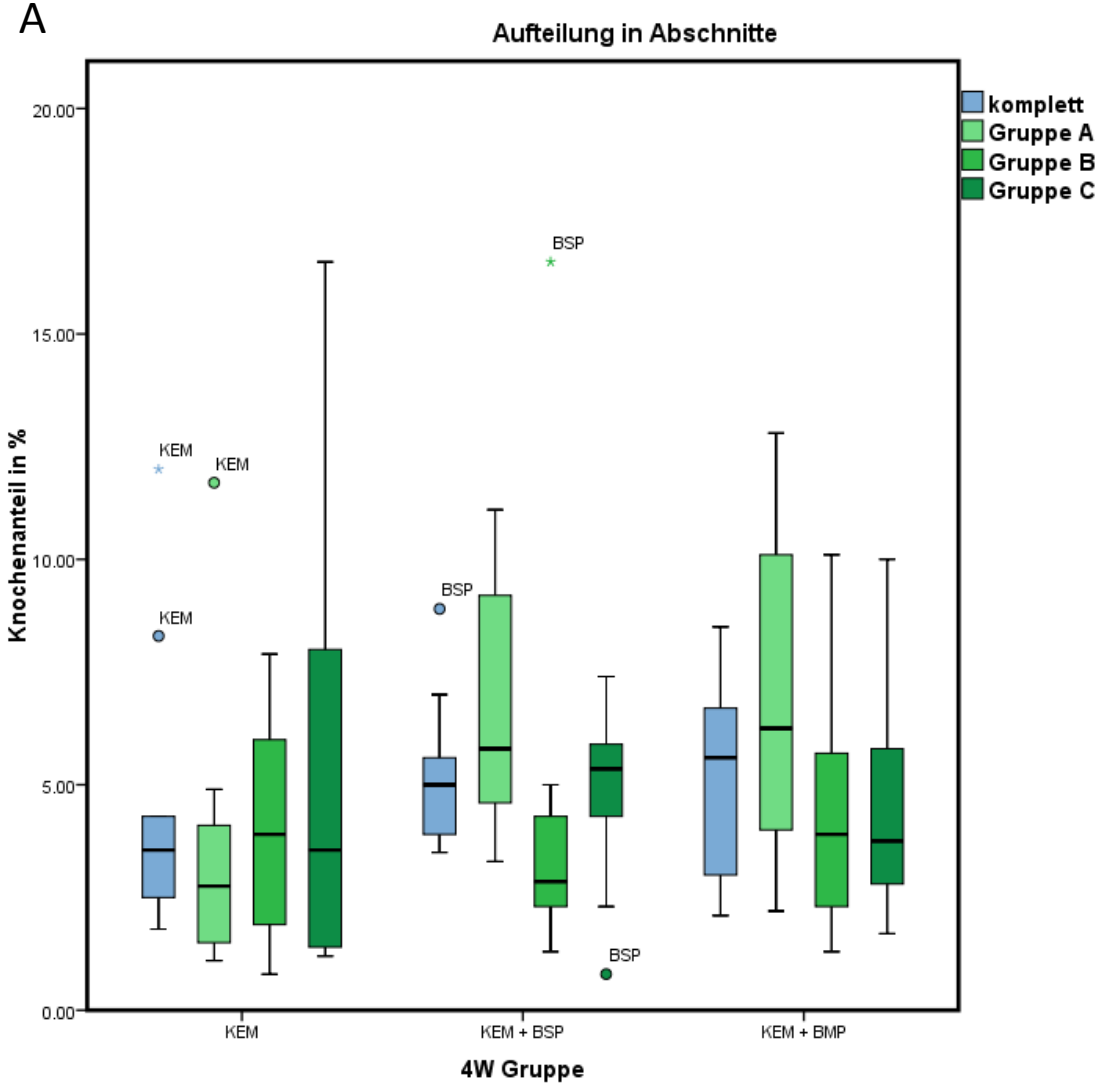


Abbildung 31A: Knochenanteil in verschiedenen Abschnitten nach 4 Wochen (Angabe in %). Die Daten werden als Boxplot mit Median und Quartilen angegeben. Nach 4 Wochen ossifiziert BSP-beschichtetes Material vorwiegend im Abschnitt A.

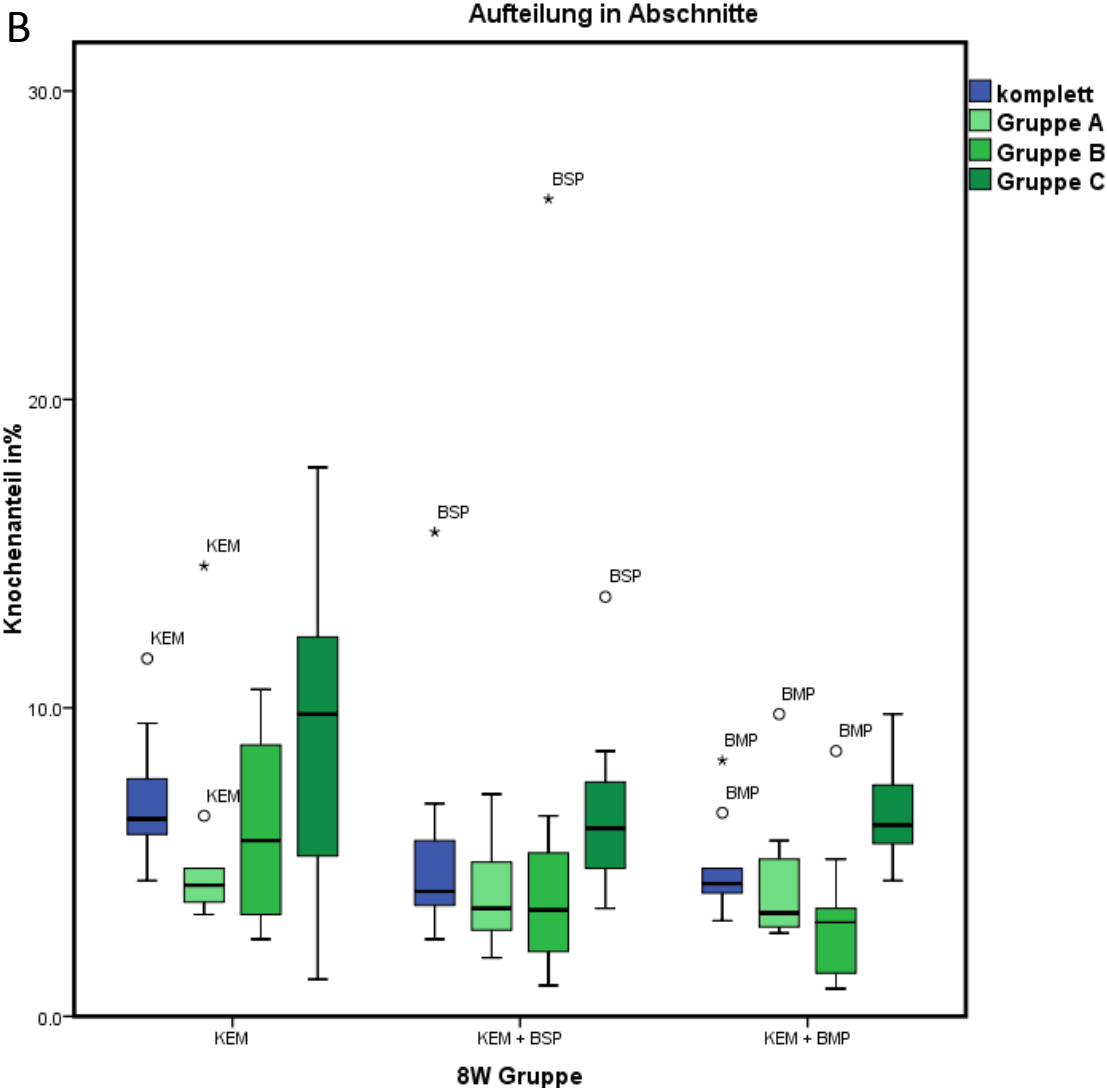


Abbildung 31B: Knochenanteil in verschiedenen Abschnitten nach 8 Wochen (Angabe in %). Die Daten werden als Boxplot mit Median und Quartilen angegeben. Nach 8 Wochen befindet sich in allen Versuchsgruppen größte Knochenanteil in Abschnitt C

2) Horizontales Knochenwachstum

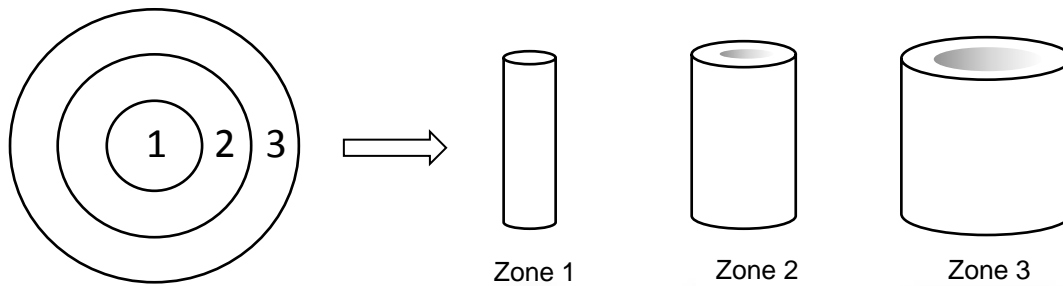


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Aufteilung der ROI in Zonen von zentral nach peripher zur Evaluation des Knochenwachstums in horizontaler Richtung

Die Einteilung des Defektbereiches in drei Hohlzylinder ermöglicht die Evaluation des Knochenwachstums in horizontaler Ebene. Die Zone 3 stellt dabei den peripheren Teil, die Zone 2 den mittleren und die Zone 1 den zentralen Kern des Zylinders dar (siehe Abbildung 32). Nach 4 Wochen Heilungsverlauf ist das größte Knochenvolumen in allen Versuchsgruppen in der äußeren Zone (3) zu beobachten. Insgesamt konnte eine Tendenz zu einem höheren Knochenwachstum der BSP-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (siehe Abbildung 33A), sodass dies auf ein peripheres Knochenwachstum zu Beginn zurückgeführt werden kann.

Nach 8 Wochen Heilungsprozess scheint ein Transfer vermehrten Knochenwachstums in die zentrale Zone des Zylinders stattzufinden. Der größte Knochenanteil kann nun in allen Versuchsgruppen in der Zone 1 festgestellt werden, wobei das unbeschichtete Material dabei tendenziell die höchsten Werte aufweist (KEM $7,6\% \pm 3,3\%$; KEM+BSP $5\% \pm 3,9\%$; KEM+BMP-7 $5\% \pm 1,5\%$; siehe Abbildung 33B). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Subzylindern können nicht festgestellt werden.

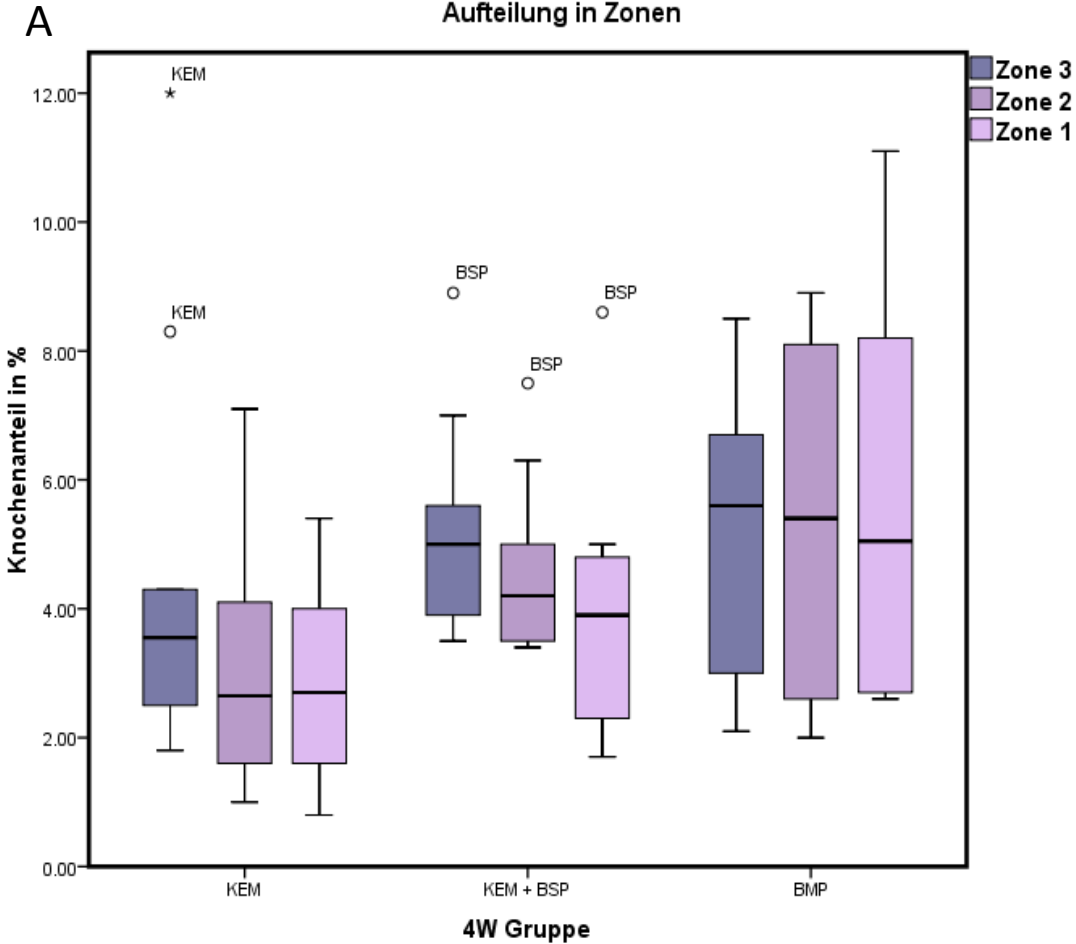


Abbildung 33A: Knochenanteil in verschiedenen Zonen (1-3) nach 4 Wochen (Angabe in %). Die Daten werden als Boxplot mit Median und Quartilen dargestellt. In der Zone 3 befindet sich zu diesem Zeitpunkt der höchste Knochenanteil.

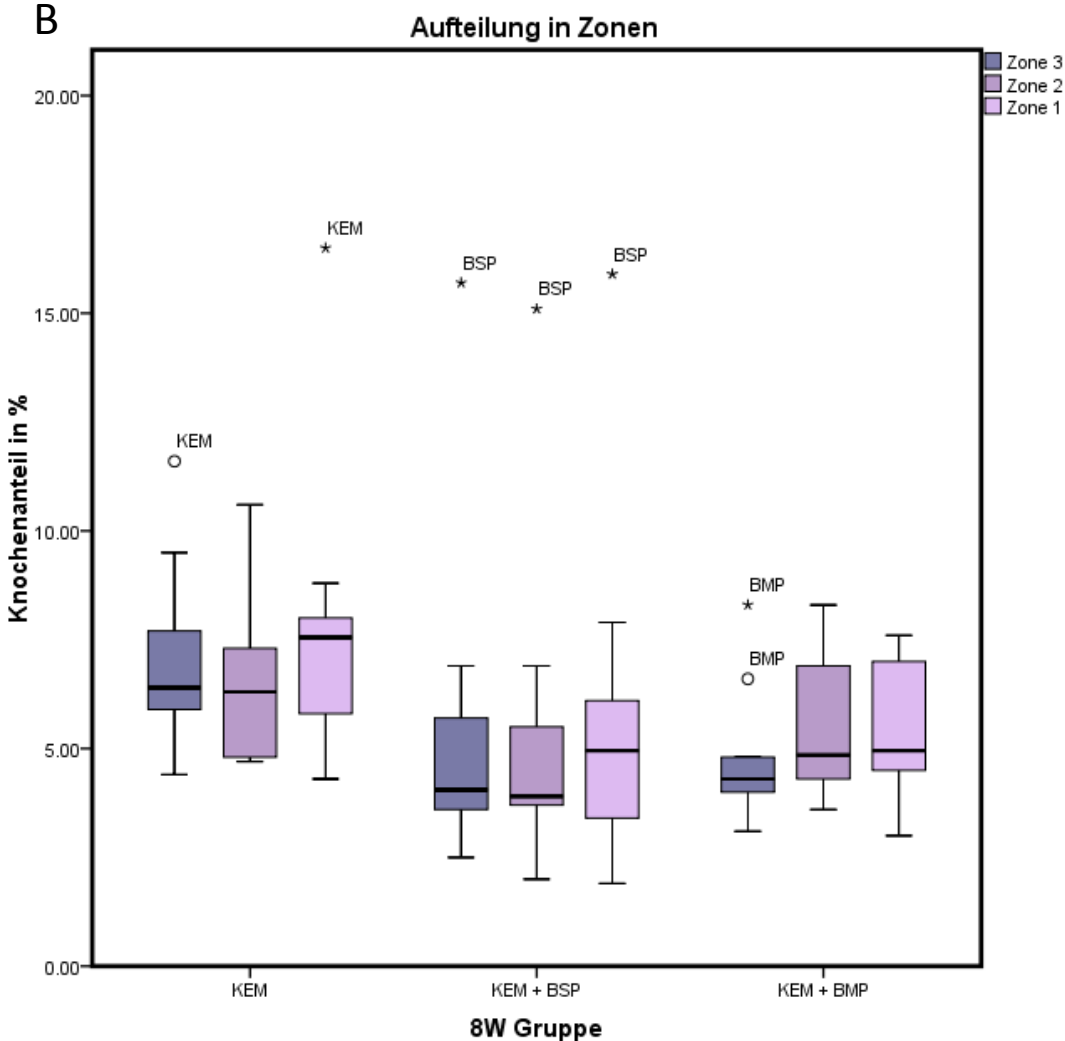


Abbildung 33B: Knochenanteil in verschiedenen Zonen (1-3) nach 8 Wochen (Angabe in %). Die Daten werden als Boxplot mit Median und Quartilen dargestellt. In der Zone 1 befindet sich zu diesem Zeitpunkt der höchste Knochenanteil.

4.3 Allgemeinhistologische Auswertung

Die Paraffinschnitte zeigen nach dem Färbeprozess mit Hämatoxylin-Eosin die Neubildung von Osteoid (hellrosa), Knochen (rot) und Bindegewebe (inhomogen rosa) im Defektbereich. Die Masson-Goldner-Färbung differenziert insbesondere die Morphologie des kollagenreichen Bindegewebes. Das verbliebene Knochengewebe außerhalb des Defektes ist qualitativ intakt, d.h. vital und mineralisiert. Durch das Entparaffinieren hat sich der Calciumphosphat-Zement herausgelöst und erscheint in den Paraffinschnitten als weißer Hintergrund mit vereinzelt blassen, amorphen Material versetzt.

4.3.1 Evaluation des Ossifikationsverhaltens

4-wöchiger Heilungsprozess

In der Übersichtsaufnahme der 4-Wochen-Präparate kann die strukturelle Anordnung der mineralisierten Knochenmatrix sichtlich entlang der Oberfläche des Knochenersatzmaterials in Form von schmalen strangförmigen Knochenbälkchen oder auch als Querverbindung zwischen den Poren beobachtet werden (Abbildung 34). Das osteoinduktive KEM wird von allen Seiten oberflächlich mit Knochenmatrix umschlossen, sodass auch der Randbereich mit der Defektperipherie abschließt und das Scaffold in den Knochen integriert wird. Die Knochenbälkchen des umliegenden intakten Knochenlagers bilden in der BSP-Gruppe breitere und stärkere mineralisierte Brücken zu der neu gebildeten Knochenmatrix aus (siehe Abbildung 35). Vitales, reifes Knochengewebe ist durch das Vorhandensein von eingeschlossenen Osteozyten, lamellärer Schichtung und glatter Begrenzung der neugebildeten Knochenmatrix zu erkennen. Es kann teilweise ein schmaler Osteoblastensaum, der dem Knochen oberflächlich eng anliegt, beobachtet werden. Dies ist ein Zeichen starker Proliferation und dient dem Umbau des provisorisch knöchernen Kallus in einen tragfähigen, definitiven Kallus. Das destruktive Bohrloch bedingt die quantitative Reduktion des Spongiosagerüsts, sodass sich der Markraum ausweitet und mit Fettgewebe ausgefüllt wird. Dies ist vor allem im Zentrum zu beobachten, während im Randbereich die kompakte Kortikalis überwiegt. Lockeres, zellreiches Bindegewebe befindet sich in unmittelbarer Angrenzung an den Knochen und enthält hauptsächlich Fibrozyten, Fibroblasten, Gefäße und kollagene Fasern. Darin ist eosinophiles, homogenes Material, das Osteoid integriert.

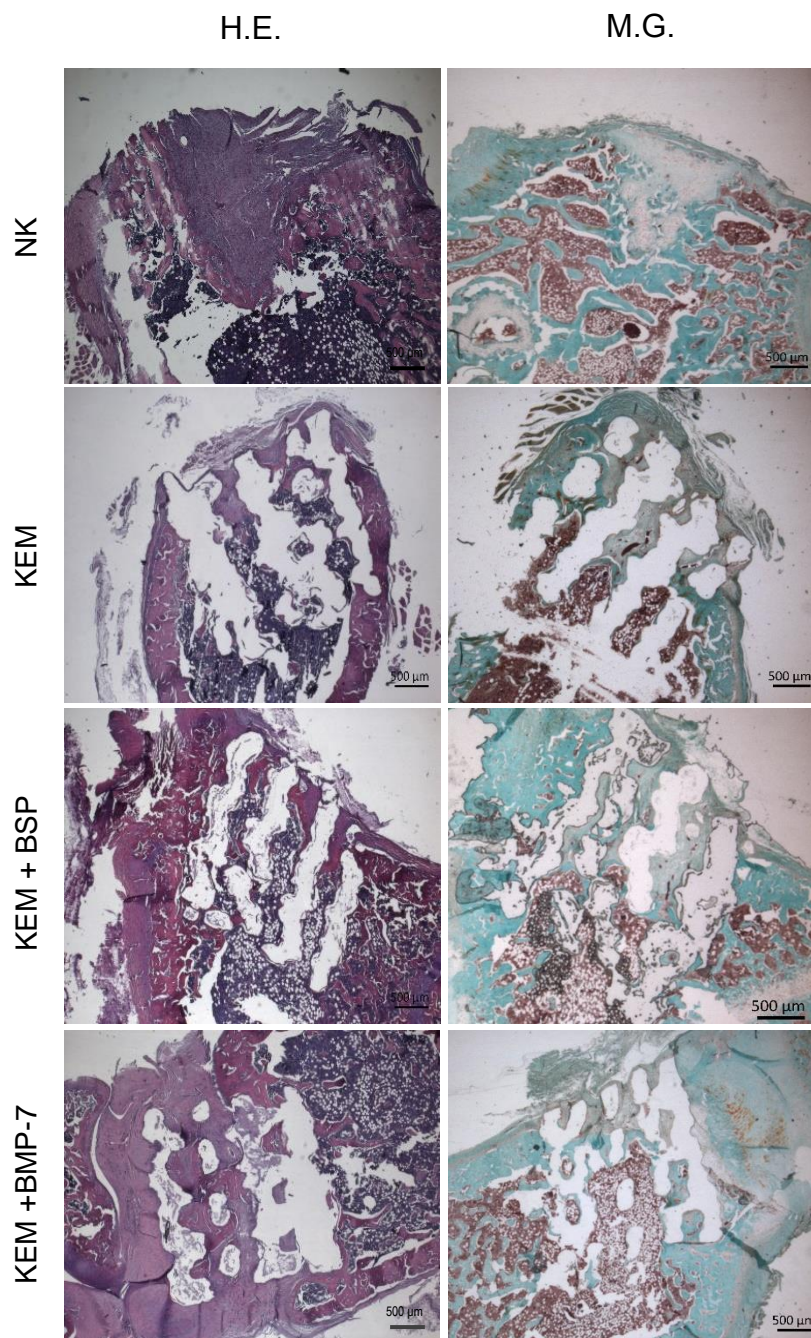


Abbildung 34: Gruppierte Übersichtsaufnahmen (x25) aller Versuchsgruppen nach 4 Wochen Heilungsprozess in H.E. sowie in M.G.-Färbung.

Pinkfarbener Knochen (H.E.) durchsetzt die Poren vor allem in den BSP- und BMP-7-beschichteten Implantatgruppen; Türkisgefärbte Knochentrabekel (M.G.) lagern sich oberflächlich an beschichtete KEM (+BSP/+BMP-7) an.

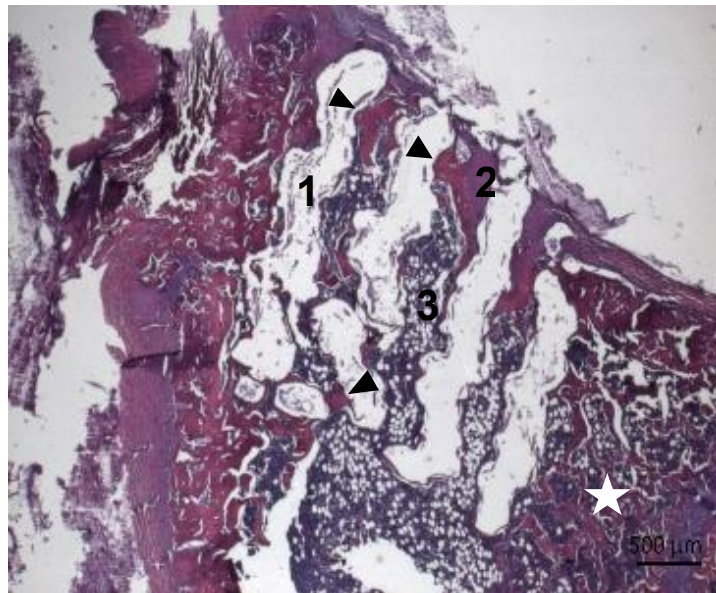


Abbildung 35: Übersichtsaufnahme (x25) der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) nach 4 Wochen Heilungsprozess (H.E.) in vergrößerter Ansicht.

Die Evaluation der Ossifikation orientiert sich an den morphologischen Veränderungen des Gewebes im Defektbereich. Herausgelöstes KEM und zurückgelassenes amorphes Material (1), Bindegewebe (2) liegt angrenzend an neugebildete Knochenmatrix (Pfeile); Fettgewebe durchsetztes Knochenmark (3) liegt angrenzend an trabekuläre Strukturen der Spongiosa (Stern).

8-wöchiger Heilungsprozess

Hinsichtlich des Ossifikationsverhaltens konnte in allen Versuchsgruppen der 8-Wochen-Präparate in den Übersichtsaufnahmen eine deutliche Zunahme des Knochenvolumens über die Zeit hinweg beobachtet werden. Nach einem Heilungsprozess von 8 Wochen konnte in den histologischen Schnitten bildmorphologisch eine vermehrte Mineralisation der Knochenmatrix im Vergleich zur Untergruppe A, die durch einen Heilungsprozess von 4 Wochen gekennzeichnet ist, festgestellt werden. Der Markraum des Femurs wurde wiederhergestellt und die Kortikalis zwischen dem proximalen und distalen Ende des Defektes wurde neu modelliert (siehe Abbildung 36). Hellrosanes Bindegewebe wird in der H.E.-Färbung sichtlich durch pinkfarbenen, mineralisierten Knochen ersetzt. In der M.G.-Färbung ist kollagenreiches, hellgrünes provisorisches Material mit zunehmender Mineralisation im Heilungsprozess in türkisfarbenen Knochen umgewandelt worden. Die Ossifikation findet hauptsächlich im Randbereich des Defektes statt.

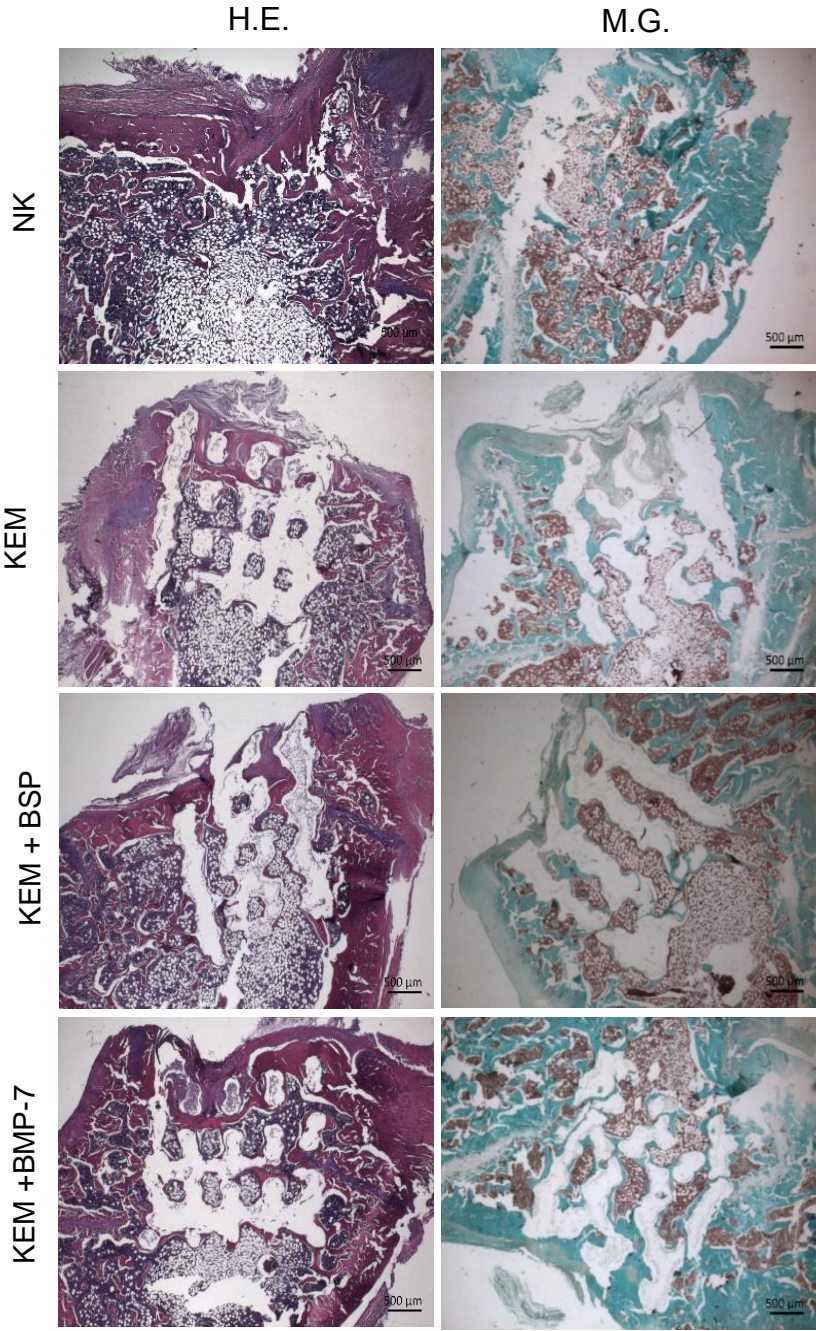


Abbildung 36: Gruppierte Übersichtsaufnahmen (x25) aller Versuchsgruppen nach 8 Wochen in H.E. sowie in M.G.-Färbung.

Das KEM ist sichtlich in den Knochen integriert und zeigt vermehrt mineralisierte Knochenmatrix.

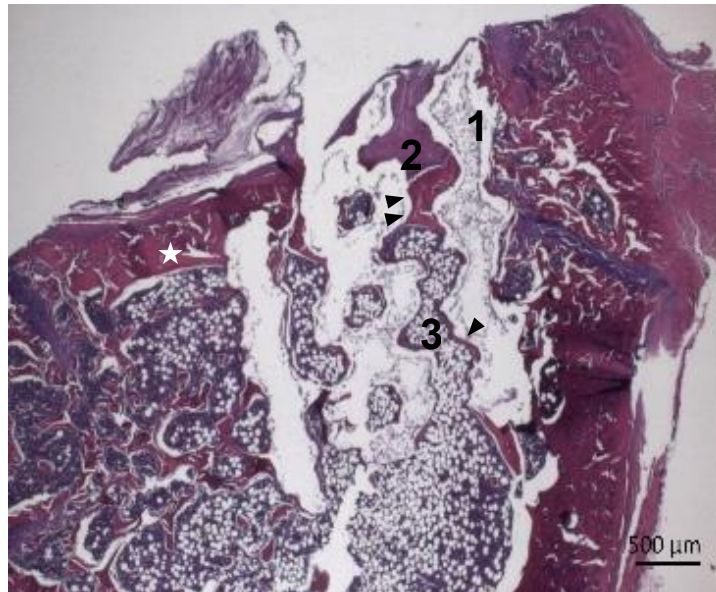


Abbildung 37: Übersichtsaufnahme (x25) der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) nach 8 Wochen Heilungsprozess (H.E.) in vergrößerter Ansicht.

Die Evaluation der Ossifikation orientiert sich an den morphologischen Veränderungen des Gewebes im Defektbereich. Herausgelöstes KEM wird durch amorphes Material ersetzt (1), Bindegewebe (2) liegt angrenzend an neugebildete Knochenmatrix (Pfeile), fettgewebsthroughsetztes Knochenmark (3), die Kortikalis (Stern) integriert das KEM an der Oberfläche.

Qualitativmorphologisch zeigen BSP-beschichtete Materialien tendenziell ein stärkeres Knochenwachstum im Heilungsprozess als unbeschichtete Knochenersatzmaterialien. Die Knochenmorphologie erscheint dichter und die lamellären Trabekel sind dicker (siehe Abbildung 37). Die M.G.-Färbung zeigt insbesondere für BSP-beschichtete Materialien eine deutliche Ansammlung von Gefäßen in der Mitte des eingesetzten KEM. In der Negativkontrolle verkleinert sich der Knochendefekt im Verlauf sichtlich und der zu Beginn vorhandene bindegewebige Kallus wird teilweise durch Knochen ersetzt (siehe Abbildung 36).

4.3.2 Evaluation der Morphologie *Gruppe I*

In der Negativkontrolle ist bei allen histologischen Schnitten nach 8 Wochen weiterhin ein kritischer Knochendefekt erkennbar, der zum großen Teil mit provisorischem, bindegewebigen Kallus gefüllt ist. Das dichte Bindegewebe lässt sich als wirbeliges, geflechtartig angeordnetes fibrohistiozytäres Gewebe beschreiben, das einem nicht ossifizierenden Kortikalisdefekt entspricht. Neugebildete vitale Knochenmatrix umgibt die Bruchstelle und weist eine lamellare Struktur auf. Der bindegewebige Kallus wird zunehmend durch die Aktivität der Osteoblasten in knöcherne Matrix umgewandelt. Im Heilungsprozess verbinden die unregelmäßig angeordneten Trabekel des Geflechtknochens die Frakturenenden und bilden somit einen knöchernen Kallus von basal ausgehend aus. Die Spongiosa weist eine diffuse Auflockerung mit größeren Lücken auf, welche mit fettreichen, blutbildenden Mark durchsetzt wird (Abbildung 38).

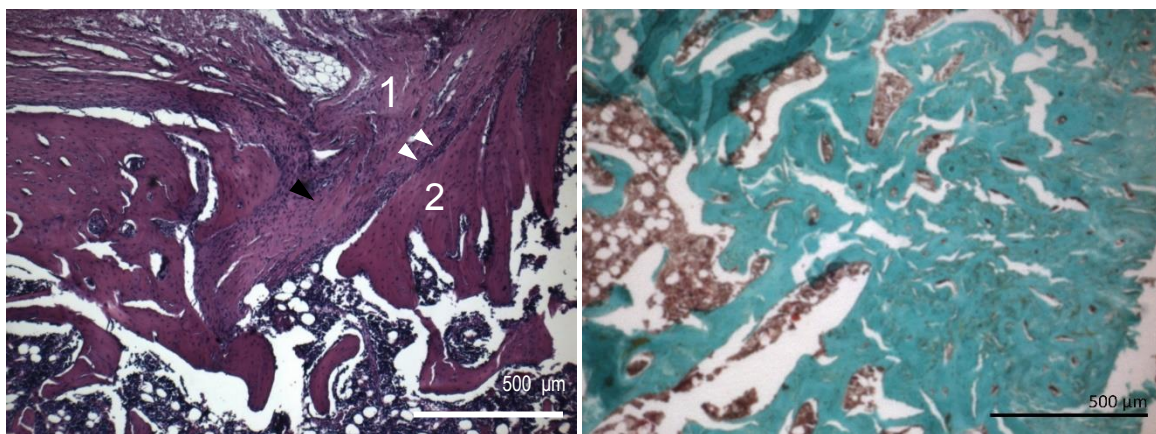


Abbildung 38: Histologischer Schnitt einer Negativkontrolle in H.E. (links) und M.G. (rechts) Färbungen nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung; Geflechtartig angeordnetes, zellreiches Bindegewebe (1) sind Osteoidtrabekel (schwarzer Pfeil) eingelagert; unmittelbar schließt kompakter Lamellenknochen basal an (2); das aufgelockertes Spongiosanetz wird durch fettreiches Mark ausgekleidet (3). Die weißen Pfeile markieren den Grenzbereich von mineralisierter und unmineralisierter Matrix.

Gruppen II-IV

In allen histologischen Schnitten der Versuchsgruppen II-IV enthalten implantiertes Knochenersatzmaterial und zeigten unabhängig von der Beschichtung eine Ossifikation des provisorisch eingelagerten Bindegewebes zu intakten Knochen beobachten. Vitale Knochenmatrix lagert sich an unbeschichtetes und beschichtetes osteoinduktives KEM entlang der Oberfläche an (schwarze Pfeile Abbildung 39, Abbildung 40, Abbildung 41, Abbildung 42). Die Gruppe III (KEM+BSP) sowie die Positivkontrolle (KEM+BMP-7) weisen auffällig breite und starke Knochen trabekel um die Poren herum auf und bilden damit nach 8 Wochen einen tragfähigen knöchernen Kallus aus. Eine zusätzliche BSP-Beschichtung zeigt tendenziell mehr neugebildetes Knochengewebe als das unbeschichtete Material.

Gruppe II (KEM)

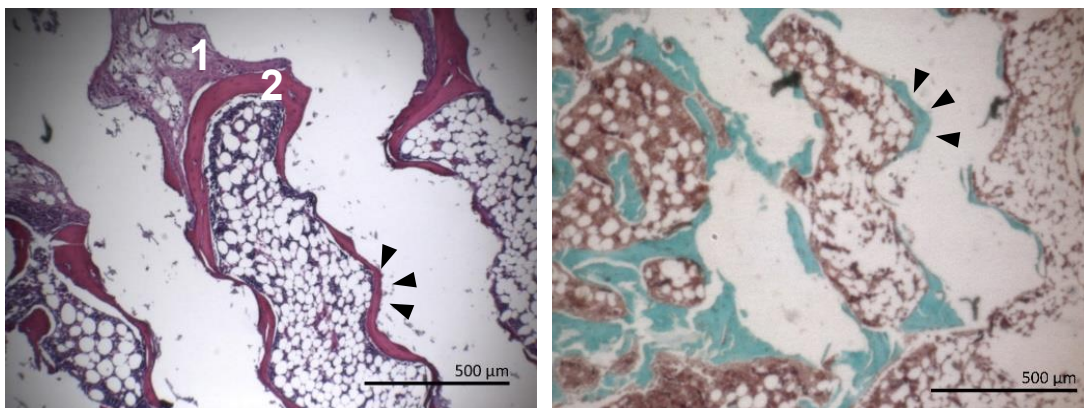


Abbildung 39: Histologische Schnitte der Versuchsgruppe II (KEM) in H.E. (links) und M.G. (rechts) nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung.

Lockerer, zell- und faserreiches Bindegewebe (1); mineralisierte Knochenmatrix (2); Die schwarzen Pfeile markieren neugebildete Knochenmatrix entlang der Scaffoldoberfläche.

Gruppe III (KEM + BSP)

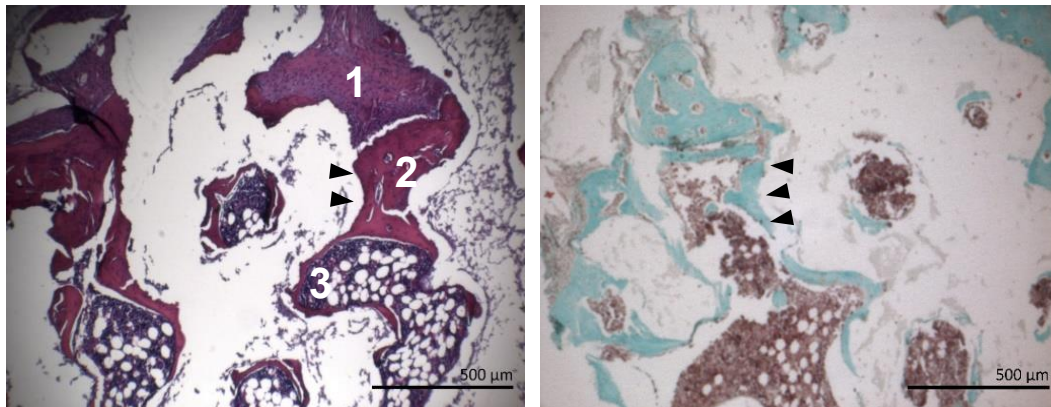


Abbildung 40: Histologische Schnitte der Versuchsgruppe III (KEM + BSP) in H.E. (links) und M.G. (rechts) nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung. Lockeres, zell- und faserreiches Bindegewebe (1); mineralisierte Knochenmatrix (2); oberflächliche Anlagerung an das Knochenzement (schwarze Pfeile); gefäßreicher Markraum mit Fettgewebe (3); Die schwarzen Pfeile markieren neugebildete Knochenmatrix.

Gruppe IV (KEM + BMP-7)

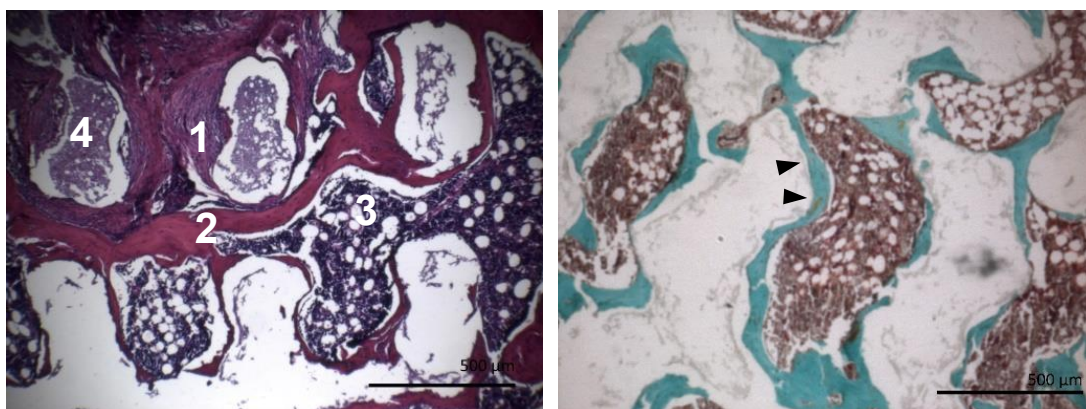


Abbildung 41: Histologische Schnitte der Versuchsgruppe IV (KEM + BMP-7) in H.E. (links) und M.G. (rechts) nach 8-wöchigen Heilungsprozess in 75-facher Vergrößerung.

Lockeres, zell- und faserreiches Bindegewebe (1); mineralisierte Knochenmatrix (2); oberflächliche Anlagerung an das Knochenzement (schwarze Pfeile); gefäßreicher Markraum mit Fettgewebe (3); Herausgelöstes Knochenersatzmaterial wird teilweise mit eosinophilen, amorphen Material ausgefüllt (4); Die schwarzen Pfeile markieren neugebildete Knochenmatrix.

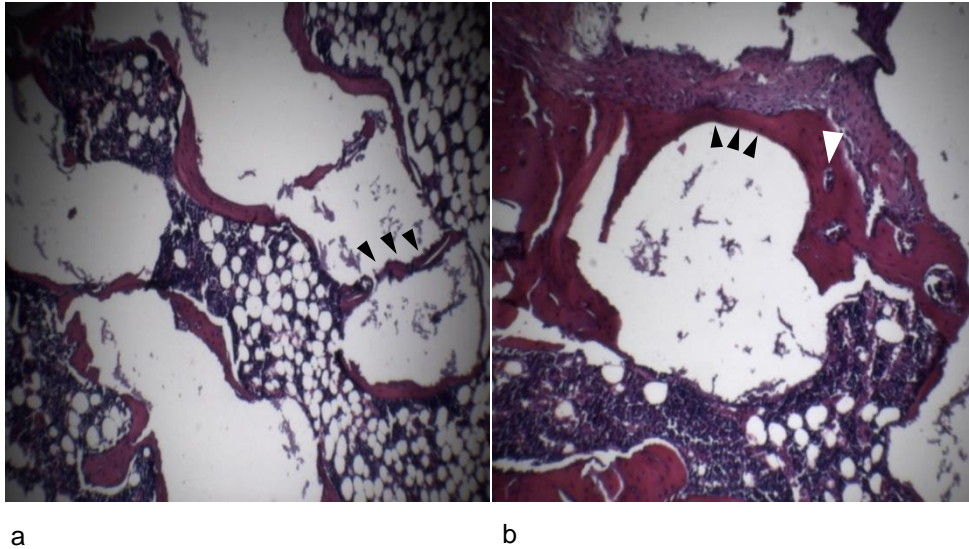


Abbildung 42: Histologischer Schnitt einer BSP-Gruppe von Tier Nr.34 (a) und Tier Nr. 35 (b) in 100-facher Vergrößerung; 8 Wochen Heilungsprozess (H.E.); pinkfarbene Knochen trabekel bilden Querbrücken innerhalb der Poren (a), neugebildete Knochenmatrix mineralisiert entlang der Oberfläche des KEM und wird von Bindegewebe umgeben (b); Die schwarzen Pfeile markieren neugebildeten Knochen; Osteozyten (weißer Pfeil) sind Zeichen vitalen Knochengewebes.

In einem der histologischen Schnitte der Versuchsgruppe BSP-beschichteter Knochenersatzmaterialien konnte exemplarisch die strangförmige Quervernetzung der Knochen trabekel innerhalb der Poren dargestellt werden (Abbildung 42 a). Es handelt sich um mineralisierte Knochenmatrix, die entlang des Materials die Poren durchqueren und Kontakt zu den gegenüberliegenden Knochenbälkchen aufnehmen. Das blutbildende Mark wird von großen Fettgewebsanteilen durchsetzt. Die Struktur des neugebildeten Lamellenknochens (Abbildung 42 b) kann in 100-facher Vergrößerung verdeutlicht werden. Der Knochen lagert sich unmittelbar oberflächlich an das beschichtete Knochenersatzmaterial an und wächst appositionell. Außen lagert sich Bindegewebe mit eingelagerten, eosinophilen Osteoid an, welches im zeitlichen Verlauf mineralisiert. Die Osteoblastensäume an den Knochenbälkchen sind flach und nur schwer zu erkennen. Es gibt keine Anzeichen für Osteoklastenaktivität.

4.4 Immunhistochemische Auswertung

In den IHC-gefärbten Schnitten der Gruppe II-IV konnte eine positive Immunreaktion hinsichtlich der Antikörper SPARC, OPN und vWF festgestellt werden (siehe Abbildung 43). Die Färbung mit CD31/PECAM-1 wurde aufgrund einer unzureichenden Färbung aus der Auswertung herausgenommen.

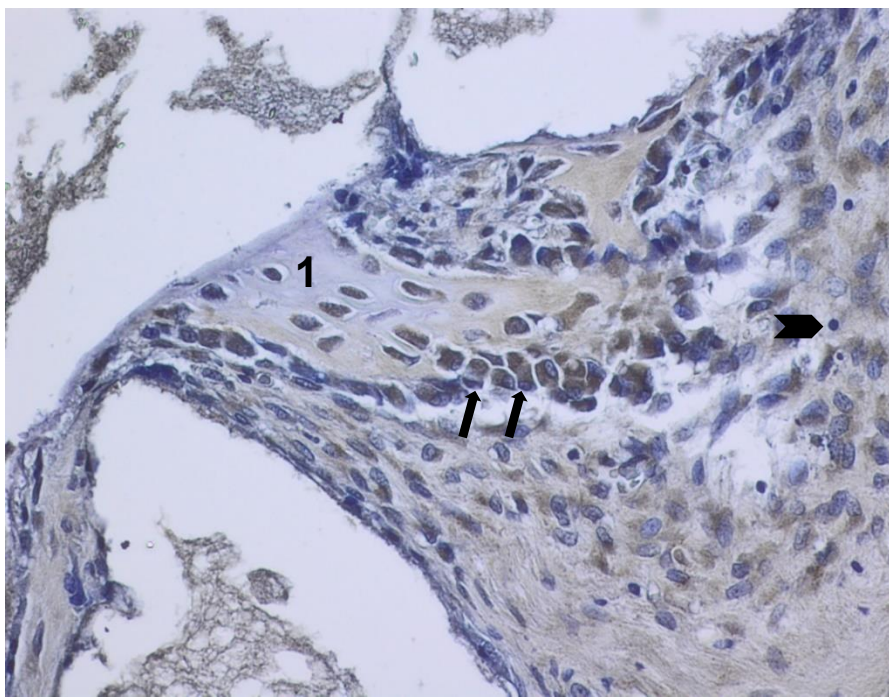
Abbildung 43: Übersichtsaufnahme (10-faches Objektiv) mit SPARC, OPN und vWF immunhistochemisch gefärbter Schnitte aller Versuchsgruppen nach 4 Wochen Heilungsprozess. Eine Braunfärbung detektiert eine positive Reaktion und ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet; Auffällig ist die intensive Reaktion an Grenzbereichen. Die Bindung der Antikörper (SPARC, OPN, vWF) an das spezifische Antigen kann kumulativ durch eine Braunfärbung in der Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Der Leerdefekt zeigt immunhistochemisch eine sehr schwache Reaktion und weist insgesamt einen deutlich geringeren Anteil extrazellulärer Proteine im Defektbereich im Vergleich zu den anderen Gruppen auf. Die Präparate BSP-beschichteter Materialien zeigen eine stärkere und globalere Reaktion im Defektbereich im Vergleich zu Präparaten mit unbeschichteten Implantaten (

Abbildung 43).

SPARC

Der Antikörper SPARC (Osteonectin) detektiert Umbau- und Wachstumsprozesse in der EZM und markiert in der Versuchsgruppe BSP-beschichteter Knochenersatzmaterialien die Aktivität des Knochenstoffwechsels (Abbildung 44). Er kumuliert hauptsächlich im Randbereich organischer Knochenmatrix und in



Grenzbereichen.

Abbildung 44: Mit SPARC versetzte immunhistochemische Färbung der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) in Vergrößerung (mit 20-fachen Objektiv). Der Heilungsprozess betrug 4 Wochen. Neugebildeter Knochen (1) wird im Grenzbereich von cuboidalen Osteoblasten besetzt (schwarze Pfeile). Osteonectin wird während der Osteogenese vermehrt sezerniert und wird durch die immunologische Reaktion in der unverkalkten Knochenmatrix sichtbar (2). Auch in der bindegewebigen, kollagenreichen EZM wird SPARC exprimiert. Weiterhin sind Osteozyten im Lamellenknochen erkennbar (weißer Stern); Lymphozyten und Makrophagen siedeln sich im Bindegewebe an (schwarze Markierung).

Osteopontin

Der Antikörper gegen Osteopontin bindet an das extrazellulär gelegene Antigen und weist eine positive Reaktion im Defektbereich der Versuchsgruppe mit integrierten BSP-beschichteten Knochenersatzmaterial auf (siehe Abbildung 45). In Gruppe III (KEM+BSP) lässt sich in allen Schnitten eine verstärkte Antigen-Antikörper-Reaktion durch intensive Braunfärbung beobachten.

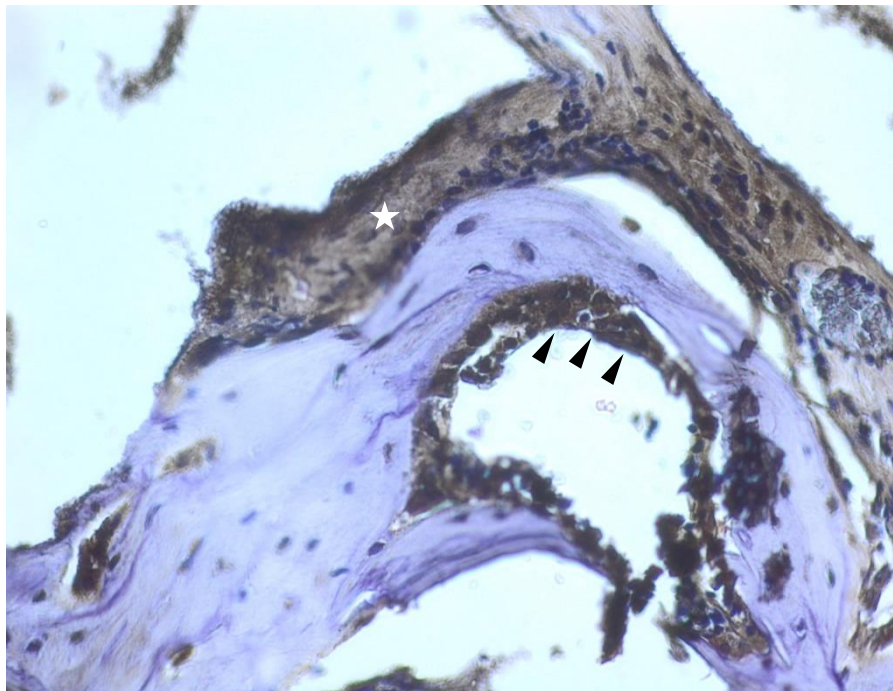


Abbildung 45: Mit Anti-OPN versetzte immunhistochemische Färbung der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) in Vergrößerung (mit 20-fachen Objektiv). Der Heilungsprozess betrug 4 Wochen. Die Immunreaktion ist verstärkt in Bereichen organischer EZM zu finden (Stern), beziehungsweise in

Bereichen hoher Knochenneubildungsaktivität, und legt sich in Form einer Beschichtung (erkennbar an der Braunfärbung) an die Oberfläche des Knochens an. Die Knochenmineralisation erfolgt entlang der Oberfläche des neugebildeten Lamellenknochens, wo sich flache Osteoblasten sammeln (Pfeile).

vWF

In allen Versuchsgruppen konnte eine positive Reaktion auf den vWF-Antikörper als Bestätigung einer vorhandenen Vaskularisation festgestellt werden. Die BSP-Gruppe zeigt eine gute Vaskularisation im Defektbereich als Zeichen vitalen Gewebes (siehe Abbildung 46).

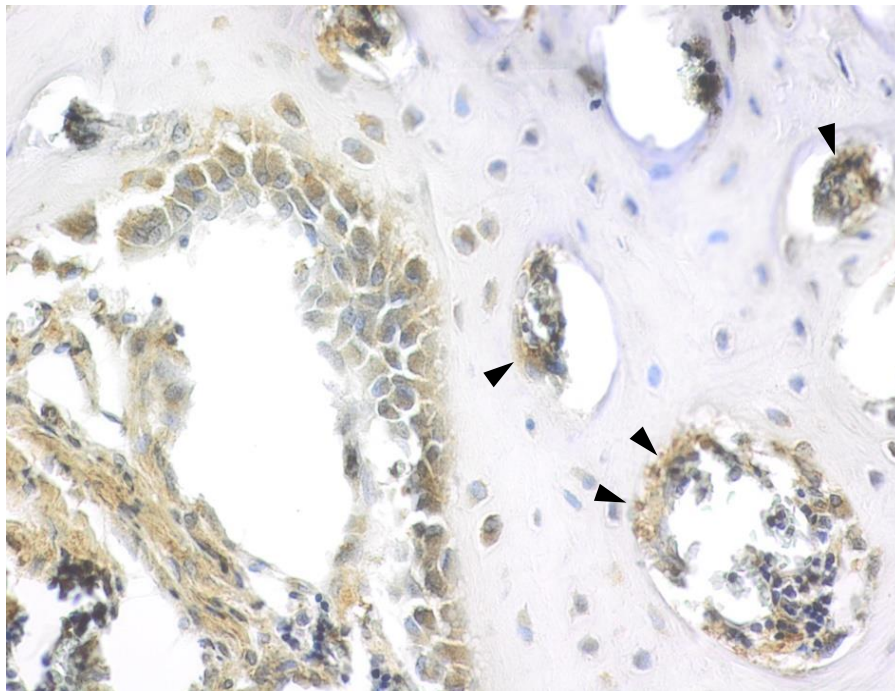


Abbildung 46: Mit Anti-vWF versetzte immunhistochemische Färbung der Versuchsgruppe III (KEM+BSP) in Vergrößerung (mit 20-fachen Objektiv). Der Heilungsprozess beträgt 4 Wochen. In BSP-beschichteten Schnitten konnte eine Ansammlung zahlreicher Gefäße und dünnwandiger Sinusoide innerhalb des Knochens anhand der Braunfärbung detektiert werden (Pfeile). Neugebildeter Knochen der Gruppe III weist tendenziell eine ausgeprägtere Vaskularisation als Knochen der Gruppe II (KEM) auf.

Zusammenfassend lässt sich anhand der lichtmikroskopischen Evaluation der immunhistochemischen Schnitte erkennen, dass in allen Versuchsgruppen eine positive Reaktion auf die nicht-kollagenen Proteinen OPN, SPARC sowie den endothelialen Faktor vWF stattgefunden hat, wobei die Leerdefekte eine deutlich geringere Reaktion aufweisen. BSP-beschichtete KEM zeigen qualitativ keine signifikanten Unterschiede zu der Positivkontrolle (KEM+BMP-7). Im Vergleich zu unbeschichteten KEM kann eine verstärkte Reaktion von SPARC und OPN in den 4-Wochen Präparaten beobachtet werden. Die IHC-Untersuchungen wurden auch nach 8 Wochen durchgeführt, wobei dabei kein Unterschied zu den 4-Wochen Präparaten beobachtet werden konnten.

5 Diskussion

Fünf Prozent aller Frakturen und 20 % der Frakturen mit hoher Schlagkraft weisen eine verzögerte Knochenheilung oder eine Pseudarthrose auf. Degenerative Erkrankungen der Wirbelsäule begünstigen die Entstehung von Pseudarthrosen, sodass die Rate hier bei 5-35 % liegt [101, 280]. Hochrasanztraumata, tumorbedingte Osteolysen, Infektsanierungen sowie Revisionsoperationen stellen typische Indikationen für den Einsatz von Knochenersatzmaterialien dar. Zudem stellt die limitierte biologische Regenerationskapazität osteoporotischer Knochen in einer zunehmend alternden Gesellschaft eine gewaltige Herausforderung dar [281]. Bei 4 Millionen Operationen mit Beteiligung von Knochenersatzmaterialien und Transplantaten ist die Entwicklung innovativer Knochenersatzmaterialien im Bereich der orthopädischen Chirurgie von großer Bedeutung [101]. Der bisherige Goldstandard in der Therapie solcher Knochendefekte stellt der autologe Knochenersatz bzw. die Spongiosaplastik dar, die jedoch aufgrund der Entnahmemorbidität und des Ertrags limitiert ist. Um diese Problematik zu umgehen, werden synthetische Biomaterialien entwickelt, die in hohem Maß produziert und in den Defekt implantiert werden können, ohne dass eine immunreaktive Abstoßung zu erwarten ist. Biokeramiken stellen dabei stabile, formfeste Gerüste aus Calciumphosphaten dar und gewährleisten vorübergehende mechanische Stabilität solange, bis der neue Knochen die Stützfunktion übernehmen kann (vgl. 2.5.2). Dies ist besonders im Bereich des Femurs von Bedeutung, bei dem eine frühzeitige mechanische Belastung angestrebt wird. Das optimale Knochenersatzmaterial sollte osteokonduktiv, osteoinduktiv, osteogen und biokompatibel sein sowie neben

mechanischer Stabilität die Eigenschaft besitzen biodegradierbar und resorbierbar zu sein, um die physiologische Knochenheilung zu fördern (vgl. 2.5.1). Die Wirkung solcher Biomaterialien wird derzeit durch Beladung mit Wachstumsfaktoren wie BMP-2 und BMP-7 oder endothelialer Signalmoleküle hinsichtlich der osteoinduktiven Eigenschaften verbessert (vgl. 2.6.3). Neuartige Konzepte nutzen osteogene nichtkollagene Proteine der Extrazellulärmatrix, um das Einwachsen knochenbildender Zellen zu fördern und den Mineralisationsprozess zu beschleunigen. BSP spielt hierbei eine wichtige Rolle zu Beginn der Knochenformation und wird derzeit in verschiedenen in-vitro und in-vivo Studien hinsichtlich einer Verbesserung des Knochenwachstums in Knochendefekten untersucht (vgl. 2.7). Die genaue Wirkung von BSP-beladenen Biomaterialien auf die Knochenheilung, insbesondere in tragenden Regionen langer Röhrenknochen und dessen Übertragbarkeit auf den Menschen ist derzeit nicht vollständig geklärt.

Diese Studie knüpft an den aktuellen Forschungsstand an und beschäftigt sich mit der Wirkung BSP-beladener Calciumphosphat-Scaffolds auf die Ossifikation eines Bohrlochdefekts im Femur der Ratte. Bei dem KEM handelt es sich um ein 3D-gedrucktes strukturfestes Gerüst aus amorphen Tricalciumphosphat (60%) und Hydroxylapatit mit einer Gesamtporosität von 50 % [282]. In diesem Modell wurde ein 3 mm-Bohrlochdefekt an beiden Femora von 20 Ratten gesetzt und anschließend beladene und unbeladene CPC-Gerüste implantiert. Die BSP-Beladung stellt dabei das zentrale Untersuchungsobjekt dar, wobei der Leerdefekt und BMP-7-beladene Scaffolds die Kontrollgruppen bilden. Nach verschiedenen Untersuchungszeiträumen im Verlauf des Heilungsprozesses konnte die Ossifikation im Osteotomiebereich qualitativ sowie quantitativ evaluiert werden.

5.1 Diskussion des Studienaufbaus

5.1.1 Kontrollgruppen

Die Methodik der Studie beruhte auf der Erstellung von vier Versuchsgruppen, die u. a. eine Positiv- und Negativkontrolle beinhaltet. Bei der Negativkontrolle wurde kein KEM in den Defekt eingesetzt, sodass der Knochenheilungsprozess auf rein physiologischen Weg und ohne Hilfsmittel erfolgte. Anhand radiologischer Analysen und qualitativmorphologischer Auswertung der Histologie konnten die Phasen der Kallusbildung und Ossifikationszeichen gemäß der sekundären Knochenheilung, unter unvollständiger Konsolidierung im Untersuchungszeitraum, beobachtet werden.

Die Negativkontrolle dient hierbei als Begleitexperiment, dass ein Ausbleiben der Knochenheilung im Untersuchungszeitraum ohne Implantation eines Knochenersatzes darstellt und in dieser Studie positiv ausfällt. Die positive Negativkontrolle stellt hierbei sicher, dass eine gesteigerte Knochenheilung in den anderen Versuchsgruppen auf die Implantation von Knochenersatzmaterial zurückzuführen ist. Eine weitere Kontrollgruppe dieser Studie bildet die Versuchsgruppe mit rekombinanten BMP-7 beschichteter KEM, die aufgrund ihrer nachgewiesenen osteoinduktiven Eigenschaften die Positivkontrolle darstellt. Unter 20 identifizierten BMPs hat sich vor allem BMP-7 bereits in-vitro [196] und in-vivo [195, 197, 201] anhand zahlreicher Studien sowie in der klinischen Anwendung von Defektpseudarthrosen langer Röhrenknochen bewährt [199]. Die Positivkontrolle zeigt in der hier vorliegenden Studie radiologisch und histologisch der Literatur entsprechend adäquate Resultate durch ein ausgeprägtes Knochenwachstum und dient damit als Voraussetzung für die Beurteilung der anderen Gruppen. Im Vergleich mit der Negativkontrolle kann qualitativ in der Versuchsgruppe IV ein Knochenwachstum über das physiologische Maß hinaus beobachtet werden. Dieser eindruckliche Unterschied der Knochenheilung zwischen diesen beiden Gruppen erklärt den Hintergrund von Kontrollgruppen in dieser Studie und stellt die prinzipielle Funktionsfähigkeit der angewandten Methode dar. Die Applikationskonzentration von BMP-7 ist speziesspezifisch und geht über das physiologische Maß hinaus, um eine adäquate Osteoinduktion und Bioverfügbarkeit über den Heilungszeitraum zu erzielen [193]. Die hohen BMP-Konzentrationen führen jedoch eher zu Nebenwirkungen, die in der Wirbelsäulen Chirurgie einige nachteilige Effekte wie ektope Ossifikationen, neurologische Defizite, Infektionen, Wundkomplikationen, Weichteilschwellungen, Absenkungen oder Osteolysen abbilden [205, 207]. Dementsprechend fiel das Augenmerk auf mögliche nachteilige Effekte in dieser Versuchsgruppe, wobei an keinem der Tiere unerwünschte Nebenwirkungen durch eine BMP-7-Beladung festgestellt werden konnte. Die Versuchsgruppe II ist durch die Implantation eines unbeschichteten KEM gekennzeichnet und dient als Vergleichsgruppe zur Versuchsgruppe III, bei der eine Beschichtung mit BSP vorliegt. Durch den Vergleich kann die bioaktive Eigenschaft des CPC-Gerüsts isoliert betrachtet werden sowie mögliche Vor- und Nachteile der BSP-Beschichtung evaluiert werden.

5.1.1 Bone Sialoprotein

Die Versuchsgruppe III stellt das eigentliche Hauptexperiment dieser Studie dar und ist durch die Implantation BSP-beschichteter KEM gekennzeichnet. Ziel war es herauszufinden, inwieweit BSP-beladene CPC-Scaffolds die Ossifikation in einem Femurkondylendefekt der Ratte beeinflusst. In der klinischen Anwendung von osteogenen Molekülen im Rahmen des BTE werden Moleküle verwendet, die gut zu isolieren und expandieren sind sowie die Eigenschaft besitzen, osteogene Marker zu exprimieren, diese zu stabilisieren und damit die Knochenbildung zu fördern. Hinsichtlich der Langzeitsicherheit sollten nachteilige Effekte wie Immunreaktionen, Entzündungsreaktionen oder Tumorigenität zuvor ausgeschlossen sein [119]. In dieser Studie erfolgte vor der Implantation eine effektive Isolierung des rekombinanten BSPs, eine verifizierte Benetzung des Scaffolds und eine vorsichtige Handhabung des Scaffolds durch Klein et al. [252]. Während der ersten 48 h nach der Beschichtung betrug die kumulative Freisetzung 0,8-28 µg. Das Applikationsschema wurde zuvor an CPC-Scaffolds und Titanimplantaten in-vitro sowie in-vivo Versuchen an Kalavariadefektmodellen von Baranowski und Klein et al. untersucht und hat sich dabei durchgehend bewährt [252, 256, 262]. Eine höhere BSP-Konzentration (200 µg/ml) zeigte dabei eine höhere Freisetzung sowie eine größere Wirksamkeit auf hOB im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen (150 µg/ml) [253]. BSP beeinflusst als nicht-kollagenes Protein der Knochenmatrix die Umbauprozesse des Knochens und wird vor und während Mineralisierungsphasen durch aktive Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten exprimiert [210, 245]. Es spielt außerdem als initialer Promoter der HA-Formation eine wichtige Rolle zu Beginn der De-novo Knochenbildung im Rahmen des Knochenumbaus sowie während der embryonalen Entwicklung [210, 229, 283]. Im Jahr 1998 entdeckten Cooper et al. in-vitro den positiven Einfluss von BSP auf die Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung innerhalb der ersten 14 Tage [284]. Während der Osteogenese der embryonalen Mandibula von Ratten wird BSP bereits nach 14 Tagen von Osteoblasten exprimiert und nach 16 Tagen kann bereits kalzifizierende Knochenmatrix festgestellt werden. In späteren Phasen der Osteogenese bilden sich Osteozyten und es lagern sich flache Osteoblasten an, die vermehrt Osteopontin und weniger BSP sezernieren [285]. In den ersten Wochen der Knochenheilung ist die Knochenneubildungsaktivität und damit die Expression von BSP durch aktive Osteoblasten besonders hoch [210]. In Zusammenschau der

Literatur besteht somit eine bedeutete Relevanz von BSP im Prozess der Osteogenese, die vorwiegend zu Beginn der Knochenheilung beschrieben wird. In der vorliegenden Studie wird 50 % des neugebildeten Knochens innerhalb der ersten 4 Wochen gebildet, sodass eine differenzierte Analyse der beteiligten Mechanismen hinsichtlich der initialen Knochenformation in diesem Modell angebracht ist.

Des Weiteren wird angenommen, dass hypertrophe Chondrozyten und reife Osteoblasten angiogenetische Wachstumsfaktoren im Rahmen der frühen Osteogenese sezernieren, um eine Gefäßinvasion zu induzieren. Da BSP im Rahmen der Knochenheilung von diesen Zellen exprimiert wird, kann nach Bellachène et al. einen Zusammenhang zwischen einer BSP-assoziierten Angiogenese und dem Knochenwachstum in der frühen Phase vermutet werden [250]. In der Evaluation immunhistochemischer Präparate konnte eine Expression des vWF in allen Präparaten mit KEM, insbesondere nach 4 Wochen beobachtet werden, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden konnten.

5.2 Diskussion des Defektmodells

5.2.1 Tiermodell

Hinsichtlich einem geeigneten Tiermodell sollte eine Pathologie bestehen, die auch im Menschen in ähnlicher Weise zu sehen ist, wobei das Leiden des Tieres so klein wie möglich gehalten werden sollte. Das Defektmodell im Tier sollte dabei unter ähnlichen Bedingungen, wie denen der klinischen Praxis untersucht werden [286]. In dieser Studie wurde darauf geachtet, dass die Ratten direkt postoperativ das Bein belastet haben und es in keinem Fall zu einer Immobilisation kam, um die Tragfähigkeit des Modells evaluieren zu können. Das Knochenwachstum ist bei Ratten länger und die Knochenheilungskapazität ist aufgrund der offenen Wachstumsfugen im Bereich der Epiphysen erhöht [80]. Die kurze Lebenszeit und kürzeren Entwicklungszyklen der Ratte resultieren in einer schnelleren Morphogenese, Knochenheilung und Alterung [287]. Dies bildet eine gute Grundlage in kurzer Heilungszeit von 4 Wochen bereits einen ausgeprägten Knochenumbau beobachten zu können. Während beim erwachsenen Menschen die Kortikalis langer Röhrenknochen in Form sekundären Knochens gebildet wird, dominiert in der Kortikalis von Ratten primärer Knochen, wobei dieser im Bereich der Wachstumsfugen durch Sekundärstrukturen ersetzt wird [80].

In dieser Studie wurde ein Bohrlochdefekt in der lateralen Kondyle des Femurs gesetzt, um an dieser Stelle die endochondrale Ossifikation zu evaluieren. Die langen Röhrenknochen von Nagetieren bestehen zu großen Teilen aus kortikalen Knochen und besitzen nur geringfügig Spongiosa, wobei diese vor allem an der Epiphyse zu finden sind. Der Rattenknochen hat nur begrenzte Fähigkeiten kortikalen Knochen in Form von Osteonen und Haverskanälen neu zu bilden, jedoch wird die Spongiosa in distalen femoralen und proximalen Defekten der Tibia reaktiv modelliert [80]. Dies erklärt die dominierende trabekuläre Knochenstruktur in den ossifizierten Defektbereichen dieser Studie, sodass das gemessene Knochenvolumen auf spongiösen Lamellenknochen zurückgeführt werden kann. Insgesamt unterscheidet sich die makroskopische und mikroskopische Anatomie der Ratten von der des Menschen, während Schafe, Ziegen oder Schweine eine ähnliche Knochenstruktur aufweisen [286]. Grundsätzlich ist das in-vivo Modell der Ratte eine ausgezeichnete Option die Freisetzung von BSP und dessen biologische Wechselwirkung mit seiner Umgebung sowie über die Biokompatibilität und Abbaueigenschaften des Implantats zu untersuchen. Das zylinderförmige Implantat ist an die Größe des Rattenfemurs angepasst und ist daher um einiges kleiner als es am Menschen angewandt werden könnte. Durch Veränderung der Größe des Scaffolds ändert sich die Bioaktivität und Biokompatibilität des Materials [101], sodass eine Translation auf den Menschen nicht zwangsläufig gegeben ist.

5.2.2 Femurkondylendefektmodell

Bei ansonsten gesunden Menschen wird ein Knochendefekt als kritisch definiert, wenn dieser innerhalb von 6 Monaten nicht ausheilt [288]. In Tiermodellen wird der „der kleinste intraossäre Defekt, der innerhalb der Lebenszeit des Tieres nicht ausheilt“ oder weniger als 10% der Knochenheilung aufweist als kritischer Knochendefekt definiert [9]. Hierbei werden vor allem Ratten, Kaninchen oder kleine Wiederkäuer herangezogen, wobei insbesondere Wiederkäuer wie Schafe oder Ziegen eine zum Menschen vergleichbarere Heilungsrate aufweisen: Während ein großer Knochendefekt der Tibia bei Ratten 12 Wochen zur Ausheilung benötigt, dauert der Heilungsprozess bei Schafen 32-52 Wochen [286].

Das Femurkondylendefektmodell ermöglicht die Etablierung eines standardisierten, reproduzierbaren orthotopischen Defekts, der zum einen die Beurteilung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien gewährleistet und zum anderen auch

die biologischen Prozesse unter mechanischer Belastung langer Röhrenknochen verdeutlicht. Es ist nachgewiesen, dass eine axiale Belastung des Skeletts die Knochenbildung und Heilung nach Frakturen fördert [72], sodass eine postoperative Belastung unserer Versuchstiere unabdingbar war. Zudem heilen laut Keating et al. Knochendefekte des Femurs aufgrund der ausgeprägten Weichteildeckung besser als an der Tibia, da eine Nährstoff- und Sauerstoffversorgung gewährleistet wird [75]. Die offenen Wachstumsfugen an den Epiphysen gewährleisten eine ausgeprägte Knochenneubildungsaktivität im Übergang zur Metaphyse und erlaubt zudem eine Beurteilung der endochondralen Ossifikation [80]. Die Größe eines kritischen Knochendefekts am Rattenfemur variiert in der Literatur zwischen 2 und 10 mm und wird nicht einheitlich festgelegt, da Parameter wie Rasse, Alter, Geschlecht oder Gewicht die Knochenheilung beeinflussen [93-100]. Bei der Etablierung unseren rattenspezifischen Femurkondylendefektmodells wurde ein zylindrischer Bohrlochdefekt erzeugt, der eine stabile mechanische Umgebung bietet und keine internale Fixierung erfordert. Die Bohrlochgröße wurde dabei so gewählt, dass gemäß dem Prinzip des kritischen Knochendefektes keine spontane Ausheilung während der Lebenszeit bzw. während des Untersuchungszeitraums stattfindet und zudem ausreichend Stabilität für eine Vollbelastung des Femurs gewährleistet wird. Dies konnte in der qualitativen Auswertung bestätigt werden (vgl. 5.4.4). In einer Studie von Gaston et al. hat sich im Tiermodell gezeigt, dass eine Defektgröße von mehr als 2 mm die spontane Knochenheilung verhindert und die Vaskularisation sowie die Zelldifferenzierung indirekt beeinflusst wird [76]. Mit einer Defektgröße von 3 mm wurde somit die theoretische Situation eines kritischen Knochendefektes, bezogen auf einen Untersuchungszeitraum von 4 bzw. 8 Wochen, geschaffen. Zur Untersuchung des Einflusses von BSP auf die Vaskularisierung sollten laut Horner et al. poröse Scaffolds in einer Defektgröße von 1-5 cm eingesetzt werden, um das Einwachsen von Gefäßen in einer größeren Defektumgebung evaluieren zu können. Größere Defekte weisen einen größeren Hypoxiegradienten auf, der das Einwachsen von Blutgefäßen stimuliert und dadurch Massentransport induziert [286]. Kleinere Defektgrößen von 3 mm wie in dieser Studie weisen daher kürzerer Diffusionsstrecken und insgesamt weniger Störvariablen wie eine mangelhafte Nährstoff- und Sauerstoffversorgung auf.

Bei der Auswertung der Negativkontrolle konnte eine geringfügige trabekuläre Ossifikation am Rand des Leerdefekts in allen untersuchten Präparaten beobachtet

werden. Dies kann auf die ausgeprägte Regenerationsleistung junger Wistar Ratten zurückgeführt werden. Um eine Verzerrung durch ein übersteigertes Knochenwachstum im Leerdefekt über den Untersuchungszeitraum hinweg zu minimieren, könnten alternativ erwachsene Ratten nach Abschluss des Knochenwachstums herangezogen werden. Da die Lokalisation an der Metaphyse einen gelenktragenden Bereich darstellt, sollte die Bohrlochgröße an dieser Stelle nicht maßgeblich vergrößert werden, um die Stabilität zu wahren und Frakturen vorzubeugen. Größere Bohrlochdefekte würden jedoch die Ossifikation im Leerdefekt über den Untersuchungszeitraum hinweg verringern und damit die Situation eines kritischen Knochendefektes im Modell verschärfen. Grundsätzlich bietet sich das Bohrlochdefektmodell am Rattenfemur für weitere Untersuchungen im Rahmen des Bone Tissue Engineering an, wobei größere, z. B. diaphysäre Defekte, eine erweiterte Option darstellen.

5.2.1 OP-Vorgehen

Der Bohrlochdefekt wurde zunächst mit einem maschinellen Bohrer (\varnothing 2,7 mm) gesetzt und anschließend manuell mit einem 3 mm-Handbohrer erweitert, um mögliche Abtragungen des Periosts im Randbereich und Störungen der kortikalen Vaskularisation zu minimieren. Das Periost besitzt osteogenes Potenzial aufgrund zahlreicher Gefäße und Osteoprogenitorzellen, sodass eine Schonung positive Auswirkungen auf die Knochenheilung von Frakturen und Knochendefekten hat [21, 24, 286]. Die kleinen Femora der Ratte erschwerten eine präzise Bohrung, sodass teilweise der Metaphysär-diaphysäre Übergangsbereich angebohrt wurde. Besonderes Augenmerk lag darauf, nicht die Epiphyse anzubohren, da dies eventuell zu einer ungleichen Wachstumsstimulation führen könnte. Das kleine Bohrloch begünstigte eine Anhäufung von Spongiosa im Defektbereich. Diese wurde explizit während der OP entfernt, um einen förderlichen Effekt auf die Ossifikation durch autologes Material auszuschließen. Zudem war eine achsgerechte Implantation des KEM mühsam und kleinere Abweichungen waren in den histologischen Schnitten und den μ CT-Aufnahmen ersichtlich. Eine Verankerung des Scaffolds z.B. durch Fibrinkleber oder Deckelung des Defektes mit Weichteil könnte erwogen, um eine Dislokation des Scaffolds vorzubeugen und somit einen bioreaktiven Raum mit fixierten Knochen-Implantat-Kontakten sicherzustellen.

5.3 Diskussion des Trägermaterials

5.3.1 Bioaktivität und Stabilität des Scaffolds

Als Trägermaterial für BSP verwendeten wir ein strukturfestes Calciumphosphatzement-Gerüst aus 60 % α -TCP, 4 % HA und 10 % Calciumcarbonat und 26 % Calciumhydrogenphosphat. Dabei handelt es sich um ein poröses, durchlässiges 3D-Gerüst von INNOTERE (Radebeul, Deutschland), das neben einer stabilisierenden Funktion als Leitmatrix für neugebildeten Knochen dienen sollte [282]. In einigen in-vitro und in-vivo Studien erweisen sich CPC-Scaffolds als osteokonduktiv, biokompatibel und bioaktiv [118, 121]. Da es sich dabei um eine alloplastische Ressource handelt, steht es unbegrenzt zur Verfügung und trägt keine Übertragungsrisiko von Infektionskrankheiten mit sich [121].

Bei einer Gesamtporosität von 50 % und einer Porengröße von 200 μ m werden die Bedingungen erfüllt, die für das Einwachsen von Gefäßen und knochenbildenden Zellen nötig sind. Folglich konnte in unseren Untersuchungen Knochen bis ins Innere einwachsen und das Gerüst wurde in den Knochen integriert. Das Resorptionsverhalten der CPC-Scaffolds ist weitgehend unklar und variiert mit der chemischen Zusammensetzung des Konstrukts und dem physiologischen Profil der Tiere [121]. Die Herstellung beruht auf einer speziellen Abbindereaktion, welche die Paste ohne Sinterungsschritte aushärten lässt. Das Gerüst ist gegenüber chemischen Abbauprozessen inert, sodass auf der Oberfläche Proteine adsorbiert werden können [282]. Das KEM war radiologisch sowie histologisch in allen Präparaten nach 8 Wochen weiterhin nahezu vollständig sichtbar. Es konnte im Laufe des Heilungsprozesses nicht durch neugebildeten Knochen ersetzt werden. Auch in der Versuchsgruppe mit unbeschichteten CPC-Scaffolds konnte in allen Präparaten eine Ossifikation entlang der Oberfläche und Osseointegration beobachtet werden, sodass von einer gewissen osteoinduktiven Wirkung des reinen KEMs auszugehen ist. Dieses Phänomen wird in der Literatur durch Lösung oberflächlicher Calcium- und Phosphat-Ionen und Ausfällung zu biologischen Apatit, welcher eine chemotaktische Wirkung auf MSCs und Osteoprogenitorzellen hat, erklärt werden [119, 289]. Grundsätzlich ist eine initiale Stabilisierung des Defektbereichs förderlich, wobei zugleich eine zügige Resorption und Ersatz des Materials durch Knochen erwünscht ist, um den Knocheneinwuchs nicht zu behindern. Die geringe Flexibilität des rigiden und spröden Gerüsts kann sich bei Implantation nicht angemessen an die Defektkontur anpassen, sodass Knochen-

Implantat-Kontakte zunächst an einigen Stellen ausbleiben. Trotzdem konnte postoperativ eine zeitnahe Belastung der Extremitäten bei ausreichender Stabilität beobachtet werden. Ein weiterer Nachteil dieser Struktur ist die geringe Beständigkeit bei hoher Druck- oder Zugbelastung [121]. Ein Materialschaden hinsichtlich dieser Problematik konnte in der Auswertung dieser Studie über den Untersuchungszeitraum bei keinem Präparat festgestellt werden. Zudem werden mögliche Langzeitfolgen wie eine fibröse Umbauung oder periimplantäre Infektionen durch die langanhaltende Beständigkeit beschrieben [121]. Dies konnte in der hier vorliegenden Studie während des Untersuchungszeitraums nicht bestätigt werden. Insgesamt konnte in unserer Studie das reine CPC-Scaffold durch seine positiven Eigenschaften wie der biomechanischen Stabilität, der Funktion als osteokonduktive Matrix sowie durch Osteoinduktion und Massentransport überzeugen.

5.3.2 Freisetzung von Bone Sialoprotein

Die Limitationen, die das CPC-Scaffold als Trägermaterial für BSP darstellt, ist die unkontrollierte Abgabe des Proteins über die Zeit und den Heilungsprozess hinweg. Humanes BSP ist durch Physisorption an der Oberfläche des Scaffolds gebunden und eine Freisetzung des Signalmoleküls erfolgt nach Interaktion mit der umliegenden EZM. Der resultierende Effekt von BSP ist dabei jedoch nicht an die Geschwindigkeit und den Ablauf des Knochenumbaus angepasst. Zudem sollte die BSP-Freisetzung über kontrollierte Gewebepenetration erfolgen, d.h. es muss sichergestellt sein, dass BSP in situ an den angestrebten Zellpopulationen in ausreichender Dosierung ankommt [290]. Die fehlenden Knochen-Implantat-Kontakte unmittelbar nach der Implantation könnten eine vorzeitige mechanische oder biophysiological Abtragung des BSP bedingen, bevor eine Interaktion mit der EZM entfaltet werden konnte. Ein Nachweis von BSP und dessen Verteilung im Knochengewebe könnte durch eine immunhistochemische Antigen-Antikörper-Bindung erfolgen oder durch radioisotopische Markierung [291, 292]. Grundsätzlich sollten laut Olthof et al. anspruchsvolle in-vitro und in-vivo-Systeme eingesetzt werden, um die Freisetzung der Signalmoleküle von einem komplexen Trägermaterial vorhersagen zu können. Die Freisetzungsrates von BMP-2 auf Polymergerüsten wurde dabei zuvor in vitro ermittelt und anschließend mittels radioisotopischer Auswertung von BMP-2 verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten nur eine geringe in-vitro und in-vivo Korrelation, sodass im Allgemeinen eine Vorhersehbarkeit des Freisetzungsverhaltens in-vivo durch in-vitro Versuche

begrenzt zu sein scheint. Zudem hat die Zusammensetzung der Trägermaterialien sowie die biologische Umgebung starken Einfluss auf die Freisetzung von Signalmolekülen [293]. In einer vorangegangenen in-vitro Studie von Klein et al. wurde die Freisetzungsrates des absorbierten BSP an CPC-Scheiben in-vitro untersucht. Dabei konnte eine kumulative Freisetzung von 0,8-28 µg in den ersten 48 h festgestellt werden, wobei höhere BSP-Konzentration in einer stärkeren BSP-Freisetzung resultierten. Die Kinetik folgte über 48 h hinweg insgesamt kontinuierlich, wobei in der initialen Phase (< 6 h) eine explosionsartige Freisetzung (engl. „burst“) zu beobachten war [252]. Um eine bessere Übertragbarkeit auf in-vivo Untersuchungen gewährleisten zu können, und um dabei die Bioverfügbarkeit durch passive Freisetzung nachvollziehen zu können, ist es sinnvoll eine derartige Studie auf einen längeren Zeitraum zu projizieren.

In den in-vivo Untersuchungen dieser Studie konnten über einen längeren Untersuchungszeitraum ein variierendes Ossifikationsverhalten in der Versuchsgruppe mit BSP-beschichteten KEM festgestellt werden. In den ersten 4 Wochen war quantitativ ein verstärktes Knochenwachstum gegenüber den Kontrollgruppen messbar, jedoch kam es anschließend zu einem Verlangsamten dieses Wachstumsverhaltens in den 4 darauffolgenden Wochen. Nach 8 Wochen war diese Versuchsgruppe den Kontrollgruppen mit implantierten KEM unterlegen. Dies könnte möglicherweise auf einen „burst“-Effekt der in-vivo Freisetzungsdynamik innerhalb der ersten 4 Wochen hindeuten. Laut Olthof et al. kann dieses Phänomen mit einer initialen Volumenerosion des CPC-Scaffolds, die eine Diffusion des gekoppelten Signalmoleküls begünstigt, zusammenhängen. Eine hohe „burst“-Freisetzung in-vivo verringert dabei die Korrelation zu dem ermittelten Freisetzungsprofil in-vitro, d.h. dass durch das veränderte biologische Umfeld eventuell nicht mehr von einer kontinuierlichen Freisetzung auszugehen ist [293]. Dadurch ist zunächst eine initiale Wirkung von BSP in der frühen Phase der Knochenheilung nach Kontakt mit umliegender Matrix zu erwarten, wobei ein Abfall des BSP-Effekts im Umbauprozess und eine Reduktion der Bioverfügbarkeit des BSP anzunehmen ist. Die gebildete Apatitschicht an der Oberfläche kann nach beginnender Auflösung des HA-Verbunds zügig durch Osteoklasten sezernierte Proteasen und Phagozytose abgebaut werden [127]. Yuan et al. fanden freie Zementpartikel im knöchernen Bereich des Implantats, die von Osteoklasten resorbiert werden konnten [294]. Laut Kimmel et al. findet eine

Osteoklastendifferenzierung in Röhrenkochen von Ratten bereits nach 24 h statt [295]. Dies widerspricht den Ergebnissen von Ritz et al., wobei festgestellt wurde, dass das gebundene BSP nach mehreren Waschschritten nicht denaturiert und bioaktiv an der Oberfläche des Calciumphosphatzements bestehen bleibt und sich damit von Calcium abgebenden Hydroxylapatit unterscheidet [262]. In der Studie von Baranowski et al. wurde die Beschichtung von humanen BSP an hydraulisch abgebundenen Knochenzement im Kalvariendefektmodell der Maus evaluiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass auch nach 8 Wochen der Einfluss des physisorbierten BSP vorhanden war und somit eine tendenzielle Verbesserung der Knochenheilung stattfand [256]. Dahingehend sind spezifische Untersuchungen des BSP-Freisetzungspfilms an unseren verwendeten CPC-Scaffolds in-vivo nötig, um die Dosierung des BSP in diesem Modell optimieren und die Ergebnisse dementsprechend interpretieren zu können.

Hinsichtlich der Kontrollgruppe BMP-7 beschichteter KEM müsste folglich die gleiche Problematik hinsichtlich des Trägermaterials vorherrschen, diese Gruppe zeigt nach 4 und 8 Wochen eine gleichmäßige Zunahme des Knochenwachstums und eine Überlegenheit der anderen Gruppen nach 8 Wochen. An dieser Stelle kann somit von einer effizienten Bindung des BMPs an das CPC ausgegangen werden. Zu Bedenken ist hierbei, dass vergleichsweise supraphysiologische Konzentrationen angewandt wurden, sodass eine Bioverfügbarkeit im Falle eines initialen „burst“-Effektes über längere Zeit vorhanden ist.

Lösungen, um einen „burst“-Effekt in-vivo auszugleichen und dadurch eine langanhaltende Bioverfügbarkeit zu gewährleisten, könnten somit möglicherweise höhere, supraphysiologische Dosierungen des BSP darstellen. Nach unseren in-vitro Erkenntnissen führen höhere Konzentrationen zu einer verstärkten BSP Freisetzung und in der Literatur wird eine positive Korrelation nicht-kollagener Matrixproteine mit dem Knochenwachstum in-vivo beschrieben [296]. Dem steht jedoch entgegen, dass eine BSP-Überexpression laut Valverde et al. zu einer gesteigerten Knochenresorption führen könnte. Dieser Effekt konnte anhand einer transgenen Mäuselinie, die BSP im Knochenstoffwechsel überexprimieren, gezeigt werden [297]. Zudem vergrößern höhere Konzentrationen das Risiko für die Entwicklung unerwünschter Nebenwirkungen wie es z.B. bei BMPs der Fall ist (vgl. 2.6.3). In Zusammenschau der aufgeführten „burst“-Problematik in-vivo und hinsichtlich des Dosierungs-Dilemmas eignet sich das CPC-Scaffold folglich nur begrenzt als

Trägermaterial für eine BSP-Beschichtung. Eine Verbesserung der Kinetik könnte eventuell durch Integration des BSP in das CPC-Gerüst während der Aushärtung darstellen [252, 298]. Wernike et. al. untersuchten die Freisetzung von Tritium-markierten Rinderserumalbumin durch Einarbeitung in eine Bicalciumphosphat (BCP)-Keramik im Vergleich zur konventionellen Oberflächenbeschichtung und konnten damit in-vitro einen „burst“-Effekt umgehen. Einhergehend mit vorangegangenen Studien ermittelten sie, dass durchschnittlich 62 % des markierten BSA innerhalb der ersten 4 Tage bei reiner Oberflächenabsorption freigesetzt wird, wohingegen durch eine Einarbeitung in das Scaffold in den ersten 19 Tagen nur 20 % des BSA passiv freigesetzt werden [298]. Eine Einarbeitung in das CPC-Scaffold könnte somit die Bioverfügbarkeit des BSP durch nachhaltige Freisetzung im Einklang mit der Resorptionsaktivität erhöhen sowie eine Applikation in supraphysiologischen Konzentrationen umgehen. Zudem sollte das bioaktive Trägermaterial in diesem Modell verformbar sein und zugleich weiterhin mechanische Stabilität im Defektbereich gewährleisten, um die erörterten Limitationen des CPC-Scaffolds zu kompensieren. Im Rahmen des Bioprintings können Signalmoleküle in 3D-Scaffolds, meist aus Hydrogelen, eingearbeitet werden, sodass die Wirkung einer EZM imitiert werden kann. Biokeramiken werden unter hohen Temperaturen gesintert, wodurch eine Eingliederung von Proteinen während des Prozesses unpraktikabel ist. Heo et al. regen an, dass durch Entwicklung einer Biokeramik, die erst unter physiologischen Bedingungen aushärtet, Biomoleküle effektiv eingesetzt werden könnten [168]. Häufig wird Hydroxylapatit mit Polymeren kombiniert, um eine adaptierte Freisetzung von Signalmolekülen durch Degradierung des Scaffolds und zugleich mechanische Stabilität zu gewährleisten [183, 200, 217]. Hinsichtlich des BSPs zeigten sich Scaffolds aus Kollagen in-vitro sowie in-vivo an Kalvariendefekten der Ratte förderlich auf die Knochenheilung [242].

5.4 Diskussion der Ergebnisse

5.4.1 Röntgenaufnahmen

Im Allgemeinen stellt das Röntgenverfahren eine nicht-invasive Methode dar, um eine Übersicht über den frühen Heilungsverlauf von Frakturen und Knochendefekten sensitiv zu erhalten [299]. Die Nativröntgenaufnahmen des Femurs wurden in dieser Studie in zwei Ebenen im Röntgenschränk (Faxitron x-ray Company, Lincolnshire, USA) bei narkotisierten Ratten durchgeführt. Die Verlaufskontrollen in Abständen von

2 Wochen dienen der qualitativen Evaluation der Knochenheilung im Defektbereich und der Detektion einer frühen Kallusbildung. Der Leerdefekt stellt dabei ein gutes Vergleichsobjekt dar, um eine frühe Kallusbildung durch Zunahme der Densität zu erkennen. Eine Zunahme der Densität im Osteotomiebereich konnte in den Versuchsgruppen erst in den 8 Wochen-Aufnahmen annähernd beobachtet werden, wobei einige Präparate keinen Unterschied zu den postoperativen Aufnahmen zeigten. Neben der mangelnden Auflösungsqualität des Faxitron, geben Radasch et al. den Hinweis, dass eine Röntgendichte im Defektbereich erst ab einer Knochenmineralisation von 30 % gegeben ist. Eine qualitative und quantitative Einschätzung der Röntgenbilder hinsichtlich des Knochenheilungsprozesses scheint aufgrund des insgesamt kleinen Defektbereichs und der Ausfüllung mit röntgendichten KEM schwierig zu sein. Grundsätzlich wird auch von Davis et al. postuliert, dass eine Frakturheilung bei konservativ behandelten Frakturen auf Röntgenbildern schwierig ist und zeigte in seiner Studie, dass Röntgenaufnahmen eine endgültige Knochenheilung internal fixierter Frakturen nur unzureichend definierten [300]. Eine Beurteilung hinsichtlich der Defektlokalisierung, Frakturlinien, ektooper Ossifikationen sowie die Einschätzung der Knochenheilung im Leerdefekt war dennoch möglich. Dies geht mit den Ergebnissen einer Studie von Blokhuis et al. einher, der an dieser Stelle die Verlässlichkeit einer konventionellen Röntgenaufnahme von der Einschätzung des Beobachters abhängig macht [301].

In der Negativkontrolle konnte in dieser Studie eine tendenziell ausbleibende Knochenheilung durch eine konstante Transparenz im Leerdefekt bis zur 8. Woche beobachtet werden. Anhand dieser Beobachtung kann von einem Knochendefekt kritischer Größe ausgegangen werden, da dieser in der Lebenszeit des Tieres nicht vollständig ausgeheilt ist. An dieser Stelle sollte jedoch auch die qualitative und quantitative Evaluation einer Knochenheilung mittels μ CT-Aufnahmen erfolgen, um eine vollständigere und detailliertere Visualisierung zu erhalten [299].

5.4.2 μ CT-Aufnahmen

Mittels μ CT-Bildern ist es möglich mehrere Ebenen des Defektbereichs präzise aufzunehmen und dadurch einen umfassenden Überblick über die Knochenformation im Innern des Knochens zu erfassen. Zudem kann durch Anfertigung von 3D-Bildern die räumliche Struktur in verschiedener Ausrichtung beurteilt werden. Die quantitative Auswertung zeigt dabei eine signifikante Korrelation zu qualitativen Veränderungen des Knochens [299]. Im Zuge der Quantifizierung stellt die BV/TV-Auswertung

mittels dem Bildverarbeitungsprogramm Image J eine gute Möglichkeit dar, das neugebildete Knochenvolumen im Defektbereich zu erfassen. Die Schwierigkeit lag dabei in der bildlichen Auswertung der einzelnen Ebenen hinsichtlich der Abgrenzung von Scaffold und Knochengewebe. Die Analyse bezieht sich dabei auf eine qualitative Strategie, bei der die Graustufenwerte der einzelnen Bilder manuell festgelegt werden. Kortikaler Knochen und mineralisierte Knochenmatrix wurden dabei markiert, während das Scaffoldmaterial und Weichteilgewebe von der Messung ausgeschlossen wurde. Die Anwendung des μ CT zur quantitativen Erfassung der Knochenformation in Defekten des distalen Femurs wurde in mehreren Studien validiert [302]. Die μ CT-Aufnahme der Femurkondylen erfolgte in dieser Studie mit einem μ CT 40 von SCANCO (Brüttisellen, Schweiz). Diese Methode dient als herkömmliches bildgebendes Verfahren bei der Untersuchung von Knochendefekten bei Ratten [302]. Nach der Erfassung der ROI des Defektbereichs erfolgte die Ermittlung des Bone Volume (BV) und des Total Volume (TV), welches sich auf die gesamte ROI oder auch auf die Subzylinder A, B, C bezog. Durch die Ermittlung des Quotientens (BV/ TV), konnte das neugebildete Knochenvolumen im Defektbereich prozentual erfasst werden. Des Weiteren wurde in dieser Studie eine differenzierte Erfassung der Knochenformation in vertikaler und horizontaler Richtung durch Abschnittseinteilung der ROI vorgenommen, um eine detaillierte Aussage über das Knochenwachstum machen zu können.

5.4.3 Quantitative Ergebnisse

Die Ergebnisse der BV/ TV-Auswertung können einer deskriptiven Statistik und den darauffolgenden Boxplots entnommen werden. Ein Grund für die fehlenden Signifikanzen könnte eine zu geringe Anzahl an Versuchstiere sein. Dennoch können bei dieser geringen Fallzahl die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen II-IV als deutliche Tendenzen festgelegt werden.

Gesamt-ROI

In den zylindrischen Borlochdefekten ist nach 4 Wochen tendenziell ein größeres Knochenvolumen in der Versuchsgruppe BSP-beschichteter KEM im Vergleich zu der Versuchsgruppe mit unbeschichteten Materialien festzustellen. Allgemein wird 50 % des neugebildeten Knochens in unserem Modell innerhalb der ersten 4 Wochen gebildet. Nach 8 Wochen lässt sich ein deutlicher Knochenzuwachs der unbeschichteten KEM beobachten, während das BV/ TV-Verhältnis in

BSP-beschichteten und in BMP-7-beschichteten Materialien kaum zunimmt und sich nahezu im steady-state befindet. Im Allgemeinen gibt es nur wenige in-vitro und noch weniger in-vivo Studien, die eine Wirkung von BSP auf die Osteogenese untersuchen [242, 246]. Bisher gibt es noch keine in-vivo Modelle am Bohrlochdefekt langer Röhrenknochen. Ein osteoinduktiver Effekt von BSP wird in der Literatur größtenteils dem frühen Stadium der Knochenheilung zugeschrieben (vgl. 2.7.2), sodass in dieser Studie eine relevante Wirkung von BSP innerhalb der ersten Tage nach der Implantation eventuell maskiert bleibt. Möglicherweise könnten sogar signifikante Unterschiede bei der Evaluation der Ossifikation BSP-beschichteter CPC-Scaffolds in den ersten 20 Tagen mit einer Analyse in kürzeren Intervallen erschlossen werden, da in diesem Zeitraum der Effekt von BSP auf die Osteogenese besonders hoch ist.

In diesem in-vivo Modell könnte eine frühzeitige „burst“-Freisetzung des BSP und eine anschließende mangelnde Bioverfügbarkeit mit zunehmenden Abbauprozessen eine fehlende Signifikanz über den Untersuchungszeitraum hinweg erklären (vgl. 5.3.2). Dieses Phänomen konnte auch in einer Studie von Lan Levengood et al. beobachtet werden, bei der BMP-2 an BCP-Scaffolds gebunden wurde und eine signifikante Steigerung der Zelldichte in mikroporösen Strukturen durch eine initiale explosionsartige Freisetzung des BMP-2 beobachtet wurde. Dies wird hierbei auf eine anfängliche „burst“-Freisetzung der ungebundenen BMP-2 Moleküle und Infiltration der Mikroporen zurückgeführt. In makroporösen Strukturen des BCP Scaffolds konnte dahingehend keine Zunahme des Knochenwachstums durch BMP-2 nach 3 Wochen festgestellt werden. Für die Kontrollgruppe werden dabei BMP-2 vernetzte Mikropartikel aus Gelatine in das BCP-Scaffold injiziert. Bei irreversibler Bindung des BMP-2 an die Gelatine erfolgt der Abbau enzymatisch im Verlauf des Umbauprozesses, wodurch nach 12 Wochen ein signifikant höheres Knochenvolumen festgestellt werden kann [289]. Die Auswirkung der Materialzusammensetzung des Knochenersatzmaterials auf die Freisetzung von gekoppelten Molekülen konnte auch in einer in-vivo Studie von Dadsetan et al. gezeigt werden, in welcher der BV/TV-Quotient abhängig von CaP-basierten Oberflächenbeschichtung variierte [303]. Weitere Studien zeigen eine effektive BSP-Bindung an Kollagen-Peptide sowie eine erfolgreiche Osteoinduktion durch Bindung an Kollagen-Scaffolds [181, 241, 242]. Dies unterstützt die Überlegung, dass die BSP-Freisetzung abhängig von der Beschaffenheit des

Trägermaterials ist und dementsprechend zu unterschiedlichen BV/ TV-Resultaten führt.

Vertikales Wachstum

Hinsichtlich der Verteilung des Knochenwachstums entlang der vertikalen Achse konnte nach 4 Wochen ein tendenziell größeres Knochenvolumen (BV/ TV) im medullären Abschnitt A der Versuchsgruppe BSP-beschichteter KEM festgestellt werden. Dahingegen kann bei unbeschichteten Materialien eine gleichmäßige Verteilung beobachtet werden. Da BSP größtenteils in Bereichen hoher Umbauraten exprimiert wird, kann eine zusätzliche BSP-Freisetzung effizient am Knochenumbau der Spongiosa wirken. Der innerste Teil des Zylinders ist dabei durch seine Lokalisation in der Spongiosa am stärksten den Umbauprozessen trabekulärer Strukturen ausgesetzt und wird zudem aufgrund der zylinderförmigen Geometrie auch basal von umliegender EZM umgeben. In BSP Knock-out-Mäusen zeigt sich ein sehr niedriger trabekulärer Knochenumsatz im Gegensatz zum Wildtyp [304]. Der in den ersten Wochen dominierende Effekt von BSP auf die Knochenheilung scheint somit auf einen schnelleren trabekulären Knochenumbau induziert zu werden. Nach 8 Wochen kommt es wie im gesamten Zylinder zum Stagnieren des Effekts.

Horizontales Wachstum

Die radiale Geometrie des zylinderförmigen Bohrlochdefekts ermöglicht dabei die Modellierung von biologischen Gradienten von der Peripherie ins Zentrum. Muschler et al. postuliert, dass bei kleineren Defekten von 3 mm die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung durch Diffusion aus der Peripherie erfolgt, wobei der Sauerstoffgradient dabei geringer ist als in großen Defekten. Folglich ist der Gradient bioaktiver Substanzen wie BSP auch relativ kurz, sodass die lokale Dosierung an die physiologischen Gegebenheiten angenähert werden kann [287]. Dementsprechend entschieden wir uns für eine Evaluation der graduellen Ossifikation von der Peripherie ins Innere des Scaffolds in Form von drei Zonen (siehe Abbildung 30). Dabei konnten wir während des Untersuchungszeitraums keine signifikanten Unterschiede im Knochenwachstum (BV/ TV) von der Peripherie ins Zentrum des Scaffolds feststellen, wobei die Knochenneubildung nach 4 Wochen im äußeren Bereich des Defekts in allen Versuchsgruppen tendenziell am größten war. Dies kann auf die Nähe zum umgebenden vitalen Knochen und dessen Nährstoff- und Sauerstoffversorgung zurückgeführt werden. Da auch bei unbeschichteten

Materialien und im Leerdefekt im Randbereich (Zone 3) Ossifikationen zu beobachten waren, kann davon ausgegangen werden, dass genügend knochenbildende Zellen in diesem Defektmodell rekrutiert wurden. Ein tendenziell größeres Knochenvolumen in dieser Zone wurde in der Gruppe BSP-beschichteter Implantate im Vergleich zu reinem KEM ermittelt. Der insgesamt höhere Anteil des Knochenvolumens in der BSP-Gruppe nach 4 Wochen ist somit auf das periphere Einwachsen neugebildeter Knochenmatrix durch Kontakt mit der EZM zurückzuführen.

Nach 8 Wochen konnte eine Verlagerung des Knochenwachstums ins Innere in allen Versuchsgruppen festgestellt werden, sodass tendenziell die Zone 1 in der BV/ TV Auswertung dominiert. In der Ausführung von Punkt 5.3.2. wird erörtert, dass die Bioverfügbarkeit des applizierten BSPs nach 8 Wochen, aufgrund einer initialen Entladung, nur noch geringfügig vorhanden ist. Laut der Studie von Malaval et al. wurden in BSP Knock-out-Mäusen eine signifikant (25-40%) höhere Knochenmasse trabekulären Knochengewebes festgestellt. Dies kann auf eine hohe Anzahl von Knochenstrahlen mit geringerer Separation zurückgeführt werden, wobei die Dicke der Trabekel kleiner erscheint [230]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden BV/ TV-Auswertung kann nicht auf den Durchmesser der Trabekel zurückgeführt werden, jedoch könnte dieses Phänomen den Shift des ermittelten Knochenvolumens (BV/ TV) von peripher nach zentral nach 8 Wochen erklären.

Voraussichtlich könnte in größeren Defekten mit größeren Scaffolds einen weitreichenderen bioaktiven Gradienten erzeugt werden, sodass eine zeitorientierte Studie über das horizontale Knochenwachstum signifikant wird. Diese Zoneneinteilung nach dem „outside in“- Muster konnte durch Takigami et al. anhand von 10 mm und 15 mm Bohrlochdefekten im Kaninchenfemur untersucht werden. Dabei wurde das Knochenvolumen (BV in %) eines Zylinders der Höhe von 3 mm aus dem mittleren Teil dieses Defektes in μ CT-Bildern untersucht. Signifikante Unterschiede konnten im äußeren Teil im Vergleich zum Inneren Teilen festgestellt werden [305]. In diesem Modell kann die Relevanz der biologischen Gradienten abhängig von der Defektgröße verdeutlicht werden.

5.4.4 Qualitative Ergebnisse

Die qualitative Evaluation beschäftigt sich mit der Morphologie und den charakteristischen Eigenschaften des Gewebes im Osteotomiebereich. Hierbei wurde eine deskriptive Auswertungsmethode gewählt, bei der durch histomorphologische

Beschreibung Rückschlüsse auf funktionelle Vorgänge während der Knochenheilung getroffen werden können. Die histologische Färbung mit H.E. gibt einen guten Überblick über die Ossifikationsvorgänge im Defektbereich und lassen eine morphologische Differenzierung von Bindegewebe, nicht-mineralisierter und mineralisierter Knochenmatrix zu. Mittels der M.G.-Färbung konnten zudem Bindegewebsstrukturen mit hohem Kollagengehalt von Knochengewebe abgehoben werden [21]. Zudem kann im Allgemeinen die Art der Ossifikation, die Gewebezusammensetzung sowie das KEM und dessen Degradation beurteilt werden. Die histologische und immunhistochemische Färbung stellen etablierte Methoden dar, um die Ergebnisse der μ CT-Auswertung dieser Studie zu veranschaulichen und qualitativ abzugleichen. In ähnlichen in-vivo Studien hat sich die histologische Auswertung von Knochendefekten des Femurs in Ergänzung zum μ CT gleichermaßen bewährt [289, 305, 306].

Nach 8 Wochen Heilungsprozess wurden die Poren der CPC-Scaffolds von vertikaler und horizontaler Seite mit knöchernem Gewebe durchsetzt, sodass in allen Versuchsgruppen eine Integration in den Knochen erfolgte. Dabei ist das Gerüst nahezu vollständig erkennbar, sodass von einer nur geringfügigen Resorption des CPCs auszugehen ist. Durch den hohen TCP-Gehalt (60 %) erfolgt eine zügigere Resorption als bei reinem HA und es kann im weiteren Verlauf mit einer Degradation gerechnet werden. Diese Prämisse kann bezogen auf einen Zeitraum von 8 Wochen in diesem Modell nicht bestätigt werden. Die weiterführende Ossifikation des Defektbereiches wird durch das Knochenersatzmaterial behindert, wodurch nach Füllung der Poren eine Zunahme des Knochenwachstums im weiteren Heilungsverlauf gebremst wird.

Auch der Leerdefekt weist nach 8 Wochen eine sichtliche Ossifikation im Randbereich und von basal aufsteigend auf, sodass sich der anfängliche Bindegewebskallus zunehmend verkleinert. Eine vollständige spontane Konsolidierung des Defektbereichs findet bis zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht statt. Diese Beobachtung geht mit der anfänglichen Beurteilung der Nativröntgenbilder und der μ CT-Bilder einher und unterstützt damit die Ansicht, dass es sich bei dem 3 mm-Bohrlochdefekt um einen kritischen Knochendefekt handelt, der im Laufe des Beobachtungszeitraums des Tieres nicht vollständig ausheilt.

Qualitativmorphologisch lässt sich nach 4 Wochen tendenziell ein größerer Anteil mineralisierten Knochens in der BSP-Gruppe im Vergleich zu unbeschichteten

Materialien beobachten. In letzterer Gruppe ist vergleichsweise ein hoher Anteil osteoiden Gewebes auffällig. BSP-Knock-out-Mäuse weisen neben kürzeren und weicheren Femora eine signifikant verzögerte Mineralisation und niedrigere Knochenbildungsrate im Vergleich zum Wildtyp auf [230]. Die Erkenntnis, dass BSP im initialen Mineralisationsprozess beteiligt ist und zudem ein einflussreicher Faktor in der Nukleation von HA-Kristallen, wurde bereits in der Literatur mehrfach dargelegt [209, 210, 229]. Auch in-vivo wurde nachweislich die Mineralisation im Rahmen der Osteogenese durch BSP gefördert [181, 255, 256]. Die hohen BV/TV-Werte der BSP-Gruppe kann nach Abgleich mit der histologischen Evaluation in dieser Studie auf eine schnellere Mineralisation neugebildeter Knochenmatrix zurückgeführt werden.

Insgesamt kann histologisch von einer primären Ossifikation ausgegangen werden, da es nicht zur Ausbildung von Knorpelgewebe kommt. Eine endochondrale Ossifikation lasse sich laut Malaval et al. nur im Bereich des Periosts beobachten, während Knochendefekte des Femur der Ratte eine membranöse Knochenheilung aufweist [304]. Durch Schonung des Periosts während der Operation, wurde eine chondrozytäre Proliferation vermieden.

Die IHC wurde durchgeführt, um die Expression nicht-kollagener Matrixproteine und endothelialer Strukturen in der frühen Heilungsphase von 4 und 8 Wochen darzustellen. Die Anwendung einer IHC ermöglicht die Identifizierung und Verteilung exprimierter nicht-kollagener Proteine im Knochengewebe. Diese zusätzliche Methode liefert einen weiteren Evidenzgrad in Bezug auf die frühe Knochenheilung unter dem Einfluss von BSP. Untersucht wurden dabei die Expression von Osteonectin sowie das SIBLING-Protein Osteopontin. Diese nicht-kollagenen Proteine sind wichtiger Bestandteil der EZM und im Prozess der Knochenmineralisation und Proliferation beteiligt. OPN bindet wie BSP an Hydroxylapatit, wobei ihm dabei eine negative Wirkung auf den Knochenheilungsprozess zugeschrieben wird, indem es die Mineralisation und den Knochenumbau der Knochenmatrix inhibiert [3]. Eine Expression wird größtenteils während der Proliferationsphase und etwas später während der Differenzierung beobachtet [252]. Es besteht ein komplexes Zusammenspiel zwischen BSP und OPN während der Osteogenese, aufgrund der Sekretion durch gleichartige Zellen. Dieses Phänomen wurde in einigen Studien differenziert untersucht [243, 307, 308]. In der Literatur variiert die Dichte der OPN-Expression in immunhistologischen

Untersuchungen von Knochengewebe, wobei eine Zunahme der OPN-Expression in reifen Lamellenknochen der Metaphyse und eine Abnahme der BSP-Expression in diesem Stadium beschrieben wird [296]. Osteozyten und flache Osteoblasten an reifen Knochen exprimieren nachweislich mehr OPN als cuboidale Osteoblasten [285]. Eine vermehrte Expression von OPN konnte an reifen Knochen in der Woche 8 im Vergleich zu Woche 4 in den vorliegenden Präparaten nicht beobachtet werden. Auffällig war jedoch die oberflächliche Beschichtung einer positiven Braunfärbung an organischer Matrix, als mögliches Zeichen von Resorptionsprozessen.

Osteonectin beeinflusst wahrscheinlich das Wachstum von Osteoblasten und die Knochenmineralisation und wird dabei konstant exprimiert. In einer Studie von Klein et al. konnte in-vitro eine signifikante Hochregulation der Expression von SPARC durch hOB unter Einfluss von BSP beobachtet werden. OPN wird dabei nur moderat hochreguliert [252]. In den vorliegenden IHC-Präparaten konnte nach 4 Wochen eine tendenziell stärkere Expression von SPARC als nach 8 Wochen festgestellt werden.

Insgesamt lässt sich eine Kumulation von OPN und SPARC verstärkt an Grenzflächen in Regionen hohen Knochenumsatzes beobachten. Einhergehend mit der Literatur, ist eine Expression nicht-kollagener Proteine nicht zwangsläufig mit der Knochenbildungsrate synchronisiert, da lokale Umstände den Knochenheilungsprozess modifizieren [296]. Letztendlich zeigt die immunhistochemische Färbung die variierende Expression nicht-kollagener Matrixproteine im Verlauf des Knochenheilungsprozess zu den Zeitpunkten nach 4 und 8 Wochen. Dies korreliert teilweise mit dem Stadium des Knochenheilungsprozess und gibt Aufschluss über die Konzentrationen und Verteilungen dieser Proteine in der Matrix.

Mittels der Immunreaktion gegen vWF konnten vaskuläre Sinusoide und dünnwändige Gefäße im Defektbereich kartiert werden, um einen Überblick über die Vaskularisation des Gewebes zu erhalten. In der BSP-Gruppe konnte eine ausgeprägte Vaskularisierung im Knochengewebe festgestellt werden, sodass von einer ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung und insgesamt vitaler Knochenmatrix auszugehen ist.

5.4.5 Schlussfolgerung

Nach Evaluation der angewandten Methodik und der resultierenden Ergebnisse kann eine Schlussfolgerung hinsichtlich der strategischen Durchführung des Versuchmodells getroffen werden. Diese gleicht die Vorgehensweise mit den finalen Resultaten ab und stellt neue Überlegungen durch logische Rückschlüsse heraus.

Durch bildgebende Verfahren kann die Knochenheilung im Defektbereich qualitativ beurteilt und der Heilungsverlauf kontrolliert werden. Das μ CT bietet dabei im Vergleich zum Röntgen weitergehende Möglichkeiten das Ossifikationsmuster und das neugebildete Knochenvolumen zu evaluieren und quantifizieren. Die histologischen Schnitte bieten interessante Einblicke in die Morphologie des Osteotomiegebiets und geben damit Aufschluss über das unterschiedliche Wachstumsverhalten zwischen den Versuchsgruppen. Durch immunhistochemische Färbemethoden kann die Expression nicht-kollagener Matrixproteine im Zuge der Knochenheilung detektiert werden und somit ein Zusammenhang mit der Applikation von BSP evaluiert werden. Neben der histologischen Untersuchung bietet die IHC weitere Informationen über relevante Vorgänge im Knochenheilungsprozess.

Diese Studie ist dahingehend begrenzt, dass der Bohrlochdefekt geringe Anteile neugebildeten Knochens zeigt und damit teilweise konsolidiert. Signifikante Unterschiede zu anderen Versuchsgruppen, die definitive Ossifikationstendenzen zeigen, werden dadurch eingeschränkt. Ein größerer Knochendefekt z.B. an älteren Tieren oder einer anderen Lokalisation könnte durch ausbleibende Knochenheilung eventuell signifikante Ergebnisse bringen. Im Allgemeinen kann der Femurkondylendefekt operativ gut durchgeführt werden und ist gut geeignet, um den Einfluss der mechanischen Belastung auf die Knochenheilung evaluieren zu können. Zudem wird der Knochendefekt an den Femurkondylen von den Tieren postoperativ gut toleriert. Des Weiteren ist in dieser Studie relevante Information zur osteoinduktiven Wirkung des BSP in der Anfangsphase verborgen geblieben. Untersuchungen innerhalb der ersten 4 Wochen in kürzeren Intervallen könnten Aufschluss über die initiale Wirkung von BSP auf das umliegende Gewebe und die Knochenheilung geben. Zudem ist weiterhin das Freisetzungsprofil von BSP in-vivo sowie der Abbauprozess der beladenen CPC-Scaffolds unklar und sollte weiteren Untersuchungen unterliegen.

In der Schlussfolgerung der angewandten Materialien und Methoden hinsichtlich der Ergebnisse scheint ein CPC-Gerüst nicht das optimale Trägermaterial für eine

effiziente BSP-Freisetzung zu sein. Grundsätzlich weist das reine CPC-Scaffold in unseren Versuchen osteoinduktive Eigenschaften auf, sodass eine Beschichtung mit BSP keine signifikante Verbesserung bringt. Die Wirksamkeit der beladenen CPC-Scaffolds kann eventuell durch Adsorption größerer Mengen BSP oder durch die Zugabe anderer Wachstumsfaktoren optimiert werden. Durch Applikation von BSP an Trägermaterialien ohne osteoinduktive Eigenschaften könnten gegebenenfalls Fortschritte erzielt werden. Außerdem stellt die Untersuchung eines degradierbaren Biomaterials, welches BSP kontrolliert abgibt und zudem ausreichend mechanische Stabilität gewährleistet, eine vielversprechende Herausforderung im Rahmen des BTE dar. Ein weiterer Ansatz, die Wirkung von BSP auf die Knochenheilung zu evaluieren, wäre eine detaillierte Untersuchung der Vaskularisierung zu Beginn der Ossifikation und dessen Zusammenhang mit einer BSP-Expression im Knochenumbauprozess.

6 Zusammenfassung

Kritische Knochendefekte und Pseudarthrosen sind nicht ausheilbare Verletzungen des Knochens, die einer dringenden Intervention bedürfen, um die vollständige Stabilität des Skeletts wiederzuerlangen. Die Therapie solcher Verletzungen stellt weiterhin eine weitverbreitete Herausforderung in der orthopädischen Chirurgie dar und ist im Zuge des demographischen Wandels von wachsender Bedeutung.

Das Implantieren BSP-beschichteter CPC-Scaffolds in den Femurkondylenbohrlochdefekt der Ratte stellt ein vielversprechendes experimentelles Modell dar, die in-vivo Reaktion potenzieller Biomaterialien auf die Knochenheilung zu untersuchen. In dieser Studie wurde dementsprechend ein 3 mm Bohrlochdefekt an den Femurkondylen beider Beine von 20 Wistar-Ratten gesetzt und beladenes und unbeladene Calciumphosphatzement-Scaffolds implantiert. Ziel war die Evaluation der Ossifikation im Defektbereich in Anbetracht des implantierten Materials und dessen Beschichtung mit BSP oder BMP-7 nach 4 und 8 Wochen. Dies erfolgte mittels Ermittlung des Knochenvolumens (BV/TV) und der Evaluation histologischer Schnitte.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine Verbesserung der Knochenheilung im Defektbereich durch Implantation von 3D-gedruckten CPC-Scaffolds gegenüber dem Leerdefekt. Ein förderlicher Effekt durch eine Oberflächenbeschichtung mit BSP konnte in unserem in-vivo Modell nicht signifikant bestätigt werden. Über den beobachteten Heilungsverlauf hinweg konnte insgesamt eine Tendenz zur Verbesserung des Knochenwachstums bei BSP-beschichteten Scaffolds in den ersten 4 Wochen nach der Implantation beobachtet werden. Dieser Effekt wurde in den darauffolgenden Wochen von den Kontrollgruppen übertroffen, sodass in der achten Woche ein tendenziell geringeres Knochenwachstum in der BSP-Gruppe im Vergleich zu reinem KEM festzustellen war.

Diese Studie deutet darauf hin, dass BSP in frühen Stadien der Knochenheilung an der Bildung neuer Knochenmatrix durch frühzeitige Mineralisationsprozesse beteiligt ist. In Anbetracht der vorangegangenen in-vitro und in-vivo Studien und in Zusammenschau der hier vorliegenden Ergebnisse kann die Annahme, dass die Eingliederung von BSP die osteoinduktiven Eigenschaften von Biomaterialien verbessern kann, gerechtfertigt werden. Die Herausforderung besteht zukünftig in der Erforschung der optimalen Dosis des geladenen BSP, dessen Freisetzungsprofil sowie die Auswirkung auf den zellulären Knochenheilungsprozess in-vivo.

7 Literaturverzeichnis

1. Giannoudis, P.V., T.A. Einhorn, and D. Marsh, *Fracture healing: the diamond concept*. Injury, 2007. **38 Suppl 4**: p. S3-6.
2. Schünke M, S.E., Schumacher U et al., *4. Knochen und Knochenverbindungen. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage.*, ed. P.L.-A.A.u. Bewegungssystem. 2014, Stuttgart: Thieme.
3. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 3**: p. S131-9.
4. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. **42(6)**: p. 551-5.
5. Drosse, I., et al., *Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach*. Injury, 2008. **39 Suppl 2**: p. S9-20.
6. Hodgson, S., *AO Principles of Fracture Management*, in *Ann R Coll Surg Engl*. 2009, Copyright © 2009 by the Annals of The Royal College of Surgeons of England. p. 448-9.
7. Giannoudis, P.V. and R. Atkins, *Management of long-bone non-unions*. Injury, 2007. **38 Suppl 2**: p. S1-2.
8. DeCoster, T.A., et al., *Management of posttraumatic segmental bone defects*. J Am Acad Orthop Surg, 2004. **12(1)**: p. 28-38.
9. Hollinger, J.O. and J.C. Kleinschmidt, *The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials*. J Craniofac Surg, 1990. **1(1)**: p. 60-8.
10. Calori, G.M., et al., *The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs?* Injury, 2011. **42 Suppl 2**: p. S56-63.
11. Dimitriou, R., et al., *Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review*. Injury, 2011. **42 Suppl 2**: p. S3-15.
12. Boccaccini, A.R. and J.J. Blaker, *Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds*. Expert Rev Med Devices, 2005. **2(3)**: p. 303-17.
13. Carreira, A.C., et al., *Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives*. J Dent Res, 2014. **93(4)**: p. 335-45.
14. Fu, R., et al., *Effectiveness and Harms of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Spine Fusion: A Systematic Review and Meta-analysis*. Annals of Internal Medicine, 2013. **158(12)**: p. 890-902.
15. Bouleftour, W., et al., *The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics*. Matrix Biol, 2016. **52-54**: p. 60-77.
16. Peter Biberthaler, M.v.G., *Knochendefekte und Pseudarthrosen*, ed. S.-V. GmbH. Vol. Kapitel 1 Das Organ Knochen - Histologie und Zellmechanismen. 2017, Deutschland.
17. Fratzl, P., et al., *Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone*. J. Mater. Chem., 2004. **14(14)**: p. 2115-2123.
18. Marie, P.J., *Osteoblasts and Bone Formation*. 1998. **5**: p. 445-473.
19. Hadjidakis, D.J. and Androulakis, II, *Bone remodeling*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 385-96.
20. Weiner, S., W. Traub, and H.D. Wagner, *Lamellar bone: structure-function relations*. J Struct Biol, 1999. **126(3)**: p. 241-55.
21. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*, ed. M. Elsevier GmbH. 2014: Urban & Fischer Verlag. 669.
22. Michael Schünke, E.S., Udo Schumacher, Markus Voll, Karl Wesker, *Prometheus Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, ed. G.T.V. Stuttgart. 2005, 2011, Deutschland.
23. Johnson, E.O., K. Soultanis, and P.N. Soucacos, *Vascular anatomy and microcirculation of skeletal zones vulnerable to osteonecrosis: vascularization of the femoral head*. Orthop Clin North Am, 2004. **35(3)**: p. 285-91, viii.

24. Rogers, W.M. and H. Gladstone, *Vascular foramina and arterial supply of the distal end of the femur*. J Bone Joint Surg Am, 1950. **32 a**(4): p. 867-74.
25. Ganey, T.M., et al., *Basement membrane composition of cartilage canals during development and ossification of the epiphysis*. Anat Rec, 1995. **241**(3): p. 425-37.
26. Blumer, M.J., S. Longato, and H. Fritsch, *Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone*. Ann Anat, 2008. **190**(4): p. 305-15.
27. Majidinia, M., A. Sadeghpour, and B. Yousefi, *The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration*. J Cell Physiol, 2018. **233**(4): p. 2937-2948.
28. Caetano-Lopes, J., H. Canhao, and J.E. Fonseca, *Osteoblasts and bone formation*. Acta Reumatol Port, 2007. **32**(2): p. 103-10.
29. Jilka, R.L., et al., *Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(5): p. 793-802.
30. Ducy, P., T. Schinke, and G. Karsenty, *The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1501-4.
31. Vaananen, H.K., et al., *The cell biology of osteoclast function*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 3)**: p. 377-81.
32. Teitelbaum, S.L. and F.P. Ross, *Genetic regulation of osteoclast development and function*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(8): p. 638-49.
33. Jones, S.J. and A. Boyde, *Histomorphometry of Howship's lacunae formed in vivo and in vitro: depths and volumes measured by scanning electron and confocal microscopy*. Bone, 1993. **14**(3): p. 455-60.
34. Lieberman, J.R., A. Daluiski, and T.A. Einhorn, *The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84**(6): p. 1032-44.
35. Vladimirov, B.S. and S.A. Dimitrov, *Growth factors--importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures*. Folia Med (Plovdiv), 2004. **46**(2): p. 11-7.
36. Rucci, N., *Molecular biology of bone remodelling*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2008. **5**(1): p. 49-56.
37. Landis, W.J., *The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix*. Bone, 1995. **16**(5): p. 533-44.
38. Meunier, P.J., *Calcium and vitamin D are effective in preventing fractures in elderly people by reversing senile secondary hyperparathyroidism*. Osteoporos Int, 1998. **8 Suppl 2**: p. S1-2.
39. Motyl, K.J., et al., *Energy Metabolism of Bone*. Toxicol Pathol, 2017. **45**(7): p. 887-893.
40. Kenny, A.M. and L.G. Raisz, *Mechanisms of bone remodeling: implications for clinical practice*. J Reprod Med, 2002. **47**(1 Suppl): p. 63-70.
41. Allori, A.C., et al., *Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part III: biomechanical forces*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(3): p. 285-93.
42. Karp, S.J., et al., *Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways*. Development, 2000. **127**(3): p. 543-8.
43. Amling, M., et al., *Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development*. J Cell Biol, 1997. **136**(1): p. 205-13.
44. Kylmaoja, E., M. Nakamura, and J. Tuukkanen, *Osteoclasts and Remodeling Based Bone Formation*. Curr Stem Cell Res Ther, 2016. **11**(8): p. 626-633.
45. Bellido, T., *Osteocyte-driven bone remodeling*. Calcif Tissue Int, 2014. **94**(1): p. 25-34.
46. Mackie, E.J., L. Tatarczuch, and M. Mirams, *The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification*. J Endocrinol, 2011. **211**(2): p. 109-21.
47. Mackie, E.J., et al., *Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(1): p. 46-62.

48. Roach, H.I., T. Aigner, and J.B. Kouri, *Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes?* Apoptosis, 2004. **9**(3): p. 265-77.
49. Avrunin, A.S. and A.A. Doktorov, [CHARACTERISTICS OF OSTEOCYTE CELL LINES FROM BONES FORMED AS A RESULT OF MEMBRANOUS (SKULL BONES) AND CHONDRAL (LONG BONES) OSSIFICATION]. Morfologiya, 2016. **149**(1): p. 7-14.
50. Thompson, E.M., et al., *Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration.* J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(8): p. 889-902.
51. Oliveira, S.M., et al., *Engineering endochondral bone: in vivo studies.* Tissue Eng Part A, 2009. **15**(3): p. 635-43.
52. Pazzaglia, U.E., et al., *Long bone human anlage longitudinal and circumferential growth in the fetal period and comparison with the growth plate cartilage of the postnatal age.* Microsc Res Tech, 2019. **82**(3): p. 190-198.
53. Dimitriou, R., E. Tsiridis, and P.V. Giannoudis, *Current concepts of molecular aspects of bone healing.* Injury, 2005. **36**(12): p. 1392-404.
54. Shapiro, I.M., et al., *Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate.* Birth Defects Res C Embryo Today, 2005. **75**(4): p. 330-9.
55. Ahmed, Y.A., et al., *Physiological death of hypertrophic chondrocytes.* Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(5): p. 575-86.
56. Yang, L., et al., *Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(33): p. 12097-102.
57. Park, J., et al., *Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage.* Biol Open, 2015. **4**(5): p. 608-21.
58. Delgado-Martos, M.J., et al., *Does the epiphyseal cartilage of the long bones have one or two ossification fronts?* Med Hypotheses, 2013. **81**(4): p. 695-700.
59. Blumer, M.J., et al., *Identification and location of bone-forming cells within cartilage canals on their course into the secondary ossification centre.* J Anat, 2006. **208**(6): p. 695-707.
60. Ytrehus, B., et al., *Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs--development with age, growth rate, weight and joint shape.* Bone, 2004. **34**(3): p. 454-65.
61. Cottrell, J.A., et al., *The Biology of Bone and Ligament Healing.* Foot Ankle Clin, 2016. **21**(4): p. 739-761.
62. Andrzejowski, P. and P.V. Giannoudis, *The 'diamond concept' for long bone non-union management.* J Orthop Traumatol, 2019. **20**(1): p. 21.
63. Einhorn, T.A. and L.C. Gerstenfeld, *Fracture healing: mechanisms and interventions.* Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(1): p. 45-54.
64. Phillips, A.M., *Overview of the fracture healing cascade.* Injury, 2005. **36 Suppl 3**: p. S5-7.
65. Tsiridis, E., N. Upadhyay, and P. Giannoudis, *Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?* Injury, 2007. **38 Suppl 1**: p. S11-25.
66. Peter Biberthaler, M.v.G., *Knochendefekte und Pseudarthrosen*, ed. S.-V. GmbH. Vol. Kapitel 6 Verzögerte Knochenheilung. 2017, Deutschland.
67. Gajdobranski, D. and D. Zivkovic, [Disorders in fracture healing]. Med Pregl, 2003. **56**(3-4): p. 146-51.
68. Schmidmaier, G. and A. Moghaddam, [Long Bone Nonunion]. Z Orthop Unfall, 2015. **153**(6): p. 659-74; quiz 675-6.
69. Megas, P., *Classification of non-union.* Injury, 2005. **36 Suppl 4**: p. S30-7.
70. Runkel, M. and P.M. Rommens, [Pseudoarthrosis]. Unfallchirurg, 2000. **103**(1): p. 51-63; quiz 63.
71. Schlickewei, C.W., et al., *Current and Future Concepts for the Treatment of Impaired Fracture Healing.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
72. Rosa, N., et al., *From mechanical stimulus to bone formation: A review.* Med Eng Phys, 2015. **37**(8): p. 719-28.

73. Struijs, P.A., R.W. Poolman, and M. Bhandari, *Infected nonunion of the long bones*. J Orthop Trauma, 2007. **21**(7): p. 507-11.
74. Schemitsch, E.H., *Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!* J Orthop Trauma, 2017. **31 Suppl 5**: p. S20-s22.
75. Keating, J.F., A.H. Simpson, and C.M. Robinson, *The management of fractures with bone loss*. J Bone Joint Surg Br, 2005. **87**(2): p. 142-50.
76. Gaston, M.S. and A.H. Simpson, *Inhibition of fracture healing*. J Bone Joint Surg Br, 2007. **89**(12): p. 1553-60.
77. Glatt, V. and R. Matthys, *Adjustable stiffness, external fixator for the rat femur osteotomy and segmental bone defect models*. J Vis Exp, 2014(92): p. e51558.
78. Nauth, A., et al., *Managing bone defects*. J Orthop Trauma, 2011. **25**(8): p. 462-6.
79. Nauth, A., et al., *Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment?* J Orthop Trauma, 2018. **32 Suppl 1**: p. S7-s11.
80. Wancket, L.M., *Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses*. Vet Pathol, 2015. **52**(5): p. 842-50.
81. O'Loughlin, P.F., et al., *Selection and development of preclinical models in fracture-healing research*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90 Suppl 1**: p. 79-84.
82. Gomes, P.S. and M.H. Fernandes, *Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies*. Lab Anim, 2011. **45**(1): p. 14-24.
83. Erben, R.G., *Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling?* Anat Rec, 1996. **246**(1): p. 39-46.
84. O'Connor, J.P., *Animal models of heterotopic ossification*. Clin Orthop Relat Res, 1998(346): p. 71-80.
85. Edwards, J.T., M.H. Diegmann, and N.L. Scarborough, *Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model*. Clin Orthop Relat Res, 1998(357): p. 219-28.
86. Cooper, G.M., et al., *Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect*. Plast Reconstr Surg, 2010. **125**(6): p. 1685-92.
87. Schmitz, J.P., et al., *Characterization of rat calvarial nonunion defects*. Acta Anat (Basel), 1990. **138**(3): p. 185-92.
88. Spicer, P.P., et al., *Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect*. Nat Protoc, 2012. **7**(10): p. 1918-29.
89. Salgado, A.J., O.P. Coutinho, and R.L. Reis, *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*. Macromol Biosci, 2004. **4**(8): p. 743-65.
90. Bosch, C., B. Melsen, and K. Vargervik, *Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials*. J Craniofac Surg, 1998. **9**(4): p. 310-6.
91. Vajgel, A., et al., *A systematic review on the critical size defect model*. Clin Oral Implants Res, 2014. **25**(8): p. 879-93.
92. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 299-308.
93. Drosse, I., et al., *Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective*. Tissue Eng Part C Methods, 2008. **14**(1): p. 79-88.
94. Peterson, B., et al., *Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue*. Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 120-9.
95. Hsu, W.K., et al., *Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats*. Bone, 2007. **40**(4): p. 931-8.
96. Tsuchida, H., et al., *Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats*. J Orthop Res, 2003. **21**(1): p. 44-53.
97. Shen, H.C., et al., *Structural and functional healing of critical-size segmental bone defects by transduced muscle-derived cells expressing BMP4*. J Gene Med, 2004. **6**(9): p. 984-91.

98. Chen, X., et al., *Recombinant human osteogenic protein-1 induces bone formation in a chronically infected, internally stabilized segmental defect in the rat femur*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(7): p. 1510-23.
99. Oakes, D.A., C.C. Lee, and J.R. Lieberman, *An evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model*. Clin Orthop Relat Res, 2003(413): p. 281-90.
100. Rose, T., et al., *[Ex-vivo gene therapy with BMP-4 for critically sized defects and enhancement of fracture healing in an osteoporotic animal model]*. Unfallchirurg, 2005. **108**(1): p. 25-34.
101. Brydone, A.S., D. Meek, and S. Maclaine, *Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering*. Proc Inst Mech Eng H, 2010. **224**(12): p. 1329-43.
102. Calori, G.M. and P.V. Giannoudis, *Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber*. Injury, 2011. **42**(11): p. 1191-3.
103. Sen, M.K. and T. Miclau, *Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?* Injury, 2007. **38 Suppl 1**: p. S75-80.
104. Pape, H.C., A. Evans, and P. Kobbe, *Autologous bone graft: properties and techniques*. J Orthop Trauma, 2010. **24 Suppl 1**: p. S36-40.
105. Khan, S.N., E. Tomin, and J.M. Lane, *Clinical applications of bone graft substitutes*. Orthop Clin North Am, 2000. **31**(3): p. 389-98.
106. Quarto, R., et al., *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med, 2001. **344**(5): p. 385-6.
107. Kon, E., et al., *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(3): p. 328-37.
108. Bauer, T.W. and G.F. Muschler, *Bone graft materials. An overview of the basic science*. Clin Orthop Relat Res, 2000(371): p. 10-27.
109. De Long, W.G., Jr., et al., *Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(3): p. 649-58.
110. Finkemeier, C.G., *Bone-grafting and bone-graft substitutes*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84**(3): p. 454-64.
111. Perry, C.R., *Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes*. Clin Orthop Relat Res, 1999(360): p. 71-86.
112. Zhang, H., et al., *Demineralized Bone Matrix Carriers and their Clinical Applications: An Overview*. Orthop Surg, 2019. **11**(5): p. 725-737.
113. Zimmermann, G. and A. Moghaddam, *Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes*. Injury, 2011. **42 Suppl 2**: p. S16-21.
114. Blokhuis, T.J. and J.J. Arts, *Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths*. Injury, 2011. **42 Suppl 2**: p. S26-9.
115. Damien, C.J. and J.R. Parsons, *Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications*. J Appl Biomater, 1991. **2**(3): p. 187-208.
116. Williams, D.F., *Specifications for Innovative, Enabling Biomaterials Based on the Principles of Biocompatibility Mechanisms*. Front Bioeng Biotechnol, 2019. **7**: p. 255.
117. Chaikof, E.L., et al., *Biomaterials and scaffolds in reparative medicine*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **961**: p. 96-105.
118. Nikolova, M.P. and M.S. Chavali, *Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review*. Bioact Mater, 2019. **4**: p. 271-292.
119. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, *Bone tissue engineering: recent advances and challenges*. Crit Rev Biomed Eng, 2012. **40**(5): p. 363-408.
120. Vaccaro, A.R., *The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft*. Orthopedics, 2002. **25**(5 Suppl): p. s571-8.
121. Ambard, A.J. and L. Mueninghoff, *Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties*. J Prosthodont, 2006. **15**(5): p. 321-8.
122. Hak, D.J., *The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma*. J Am Acad Orthop Surg, 2007. **15**(9): p. 525-36.

123. Ghosh, S.K., et al., *In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. **86**(1): p. 217-27.
124. Hing, K.A., L.F. Wilson, and T. Buckland, *Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes*. Spine J, 2007. **7**(4): p. 475-90.
125. LeGeros, R.Z., et al., *Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications*. J Mater Sci Mater Med, 2003. **14**(3): p. 201-9.
126. Xu, H.H., et al., *Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties*. Bone Res, 2017. **5**: p. 17056.
127. Xia, Z. and J.T. Triffitt, *A review on macrophage responses to biomaterials*. Biomed Mater, 2006. **1**(1): p. R1-9.
128. Khan, Y.M., D.S. Katti, and C.T. Laurencin, *Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation*. J Biomed Mater Res A, 2004. **69**(4): p. 728-37.
129. Metzger, S., et al., *Modular poly(ethylene glycol) matrices for the controlled 3D-localized osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Adv Healthc Mater, 2015. **4**(4): p. 550-8.
130. Saik, J.E., et al., *Covalently immobilized platelet-derived growth factor-BB promotes angiogenesis in biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogels*. Acta Biomater, 2011. **7**(1): p. 133-43.
131. Echave, M.C., et al., *Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(24): p. 3567-3584.
132. Bombaldi de Souza, R.F., et al., *Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019. **94**: p. 364-375.
133. Aoki, K. and N. Saito, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems for Bone Regeneration*. Pharmaceutics, 2020. **12**(2).
134. Polo-Corrales, L., M. Latorre-Esteves, and J.E. Ramirez-Vick, *Scaffold design for bone regeneration*. J Nanosci Nanotechnol, 2014. **14**(1): p. 15-56.
135. Drotleff, S., et al., *Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **58**(2): p. 385-407.
136. Berger, J., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **57**(1): p. 19-34.
137. Rezwan, K., et al., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(18): p. 3413-31.
138. Hedberg, E.L., et al., *In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactico-glycolic acid) composite scaffolds*. Biomaterials, 2005. **26**(16): p. 3215-25.
139. Bergsma, E.J., et al., *Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures*. J Oral Maxillofac Surg, 1993. **51**(6): p. 666-70.
140. Martin, C., H. Winet, and J.Y. Bao, *Acidity near eroding polylactide-polyglycolide in vitro and in vivo in rabbit tibial bone chambers*. Biomaterials, 1996. **17**(24): p. 2373-80.
141. Ku, K.L., et al., *Incorporation of surface-modified hydroxyapatite into poly(methyl methacrylate) to improve biological activity and bone ingrowth*. R Soc Open Sci, 2019. **6**(5): p. 182060.
142. Lewis, G., *Properties of acrylic bone cement: state of the art review*. J Biomed Mater Res, 1997. **38**(2): p. 155-82.
143. Wilke, H.J., et al., *Biomechanical evaluation of vertebroplasty and kyphoplasty with polymethyl methacrylate or calcium phosphate cement under cyclic loading*. Spine (Phila Pa 1976), 2006. **31**(25): p. 2934-41.
144. Vaishya, R., M. Chauhan, and A. Vaish, *Bone cement*. J Clin Orthop Trauma, 2013. **4**(4): p. 157-63.
145. Zhang, K., et al., *Processing and properties of porous poly(L-lactide)/bioactive glass composites*. Biomaterials, 2004. **25**(13): p. 2489-500.

146. Jiang, G., et al., *Preparation of poly(epsilon-caprolactone)/continuous bioglass fibre composite using monomer transfer moulding for bone implant*. *Biomaterials*, 2005. **26**(15): p. 2281-8.
147. Thomson, R.C., et al., *Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration*. *Biomaterials*, 1998. **19**(21): p. 1935-43.
148. Tamai, N., et al., *A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(5): p. 405-17.
149. Hutmacher, D.W., et al., *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(4): p. 245-60.
150. Tancred, D.C., A.J. Carr, and B.A. McCormack, *The sintering and mechanical behavior of hydroxyapatite with bioglass additions*. *J Mater Sci Mater Med*, 2001. **12**(1): p. 81-93.
151. Kim, H.W., J.C. Knowles, and H.E. Kim, *Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery*. *Biomaterials*, 2004. **25**(7-8): p. 1279-87.
152. Turnbull, G., et al., *3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Bioact Mater*, 2018. **3**(3): p. 278-314.
153. Senkoğlu, A., et al., *Poly(D, L-lactide/epsilon-caprolactone)/hydroxyapatite composites as bone filler: an in vivo study in rats*. *Int J Artif Organs*, 2002. **25**(12): p. 1174-9.
154. Lu, H.H., et al., *Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites*. *Biomaterials*, 2005. **26**(32): p. 6323-34.
155. Xynos, I.D., et al., *Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **276**(2): p. 461-5.
156. Hench, L.L., *The future of bioactive ceramics*. *J Mater Sci Mater Med*, 2015. **26**(2): p. 86.
157. Kaur, G., et al., *Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019. **104**: p. 109895.
158. Fiume, E., et al., *Comparison Between Bioactive Sol-Gel and Melt-Derived Glasses/Glass-Ceramics Based on the Multicomponent SiO₂-P₂O₅-CaO-MgO-Na₂O-K₂O System*. *Materials (Basel)*, 2020. **13**(3).
159. Day, R.M., et al., *Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds*. *Biomaterials*, 2004. **25**(27): p. 5857-66.
160. Pereira, M.M., A.E. Clark, and L.L. Hench, *Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro*. *J Biomed Mater Res*, 1994. **28**(6): p. 693-8.
161. Adamopoulos, O. and T. Papadopoulos, *Nanostructured bioceramics for maxillofacial applications*. *J Mater Sci Mater Med*, 2007. **18**(8): p. 1587-97.
162. Marzban, K., et al., *Nanostructured akermanite glass-ceramic coating on Ti6Al4V for orthopedic applications*. *J Appl Biomater Funct Mater*, 2019. **17**(2): p. 2280800018793819.
163. Chen, Q.Z. and A.R. Boccaccini, *Poly(D,L-lactic acid) coated 45S5 Bioglass-based scaffolds: processing and characterization*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **77**(3): p. 445-57.
164. Leukers, B., et al., *Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing*. *J Mater Sci Mater Med*, 2005. **16**(12): p. 1121-4.
165. Gu, B.K., et al., *3D Bioprinting Technologies for Tissue Engineering Applications*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1078**: p. 15-28.
166. Huang, Y., et al., *3D bioprinting and the current applications in tissue engineering*. *Biotechnol J*, 2017. **12**(8).
167. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. *Biomaterials*, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
168. Lin, K., et al., *3D Printing of Bioceramic Scaffolds-Barriers to the Clinical Translation: From Promise to Reality, and Future Perspectives*. *Materials (Basel)*, 2019. **12**(17).

169. Seitz, H., et al., *Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **74**(2): p. 782-8.
170. Wen, Y., et al., *3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering: a review*. Biomater Sci, 2017. **5**(9): p. 1690-1698.
171. Chu, T.M., et al., *Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures*. Biomaterials, 2002. **23**(5): p. 1283-93.
172. Roseti, L., et al., *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **78**: p. 1246-1262.
173. Przekora, A., *Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
174. Le, X., et al., *Engineering a biocompatible scaffold with either micrometre or nanometre scale surface topography for promoting protein adsorption and cellular response*. Int J Biomater, 2013. **2013**: p. 782549.
175. Wilson, C.E., et al., *Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research*. J Biomed Mater Res A, 2004. **68**(1): p. 123-32.
176. Sailaja, G.S., et al., *Biomimetic approaches with smart interfaces for bone regeneration*. J Biomed Sci, 2016. **23**(1): p. 77.
177. Spicer, C.D., E.T. Pashuck, and M.M. Stevens, *Achieving Controlled Biomolecule-Biomaterial Conjugation*. Chem Rev, 2018. **118**(16): p. 7702-7743.
178. Fiedler, J., et al., *The effect of substrate surface nanotopography on the behavior of multipotent mesenchymal stromal cells and osteoblasts*. Biomaterials, 2013. **34**(35): p. 8851-9.
179. Mourino, V. and A.R. Boccaccini, *Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds*. J R Soc Interface, 2010. **7**(43): p. 209-27.
180. Lee, S.H. and H. Shin, *Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(4-5): p. 339-59.
181. Kruger, T.E., A.H. Miller, and J. Wang, *Collagen scaffolds in bone sialoprotein-mediated bone regeneration*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 812718.
182. Quinlan, E., et al., *Long-term controlled delivery of rhBMP-2 from collagen-hydroxyapatite scaffolds for superior bone tissue regeneration*. J Control Release, 2015. **207**: p. 112-9.
183. Quinlan, E., et al., *Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering*. J Control Release, 2015. **198**: p. 71-9.
184. Ahrens, L.A., et al., *Gelatin device for the delivery of growth factors involved in endochondral ossification*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0175095.
185. Kolambkar, Y.M., et al., *Spatiotemporal delivery of bone morphogenetic protein enhances functional repair of segmental bone defects*. Bone, 2011. **49**(3): p. 485-92.
186. Simmons, C.A., et al., *Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells*. Bone, 2004. **35**(2): p. 562-9.
187. Kanczler, J.M. and R.O. Oreffo, *Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone*. Eur Cell Mater, 2008. **15**: p. 100-14.
188. Olivier, V., N. Fauchoux, and P. Hardouin, *Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery*. Drug Discov Today, 2004. **9**(18): p. 803-11.
189. Marcacci, M., et al., *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng, 2007. **13**(5): p. 947-55.
190. Robey, P.G., *Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising)*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(6): p. 423-30.
191. Colnot, C., *Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(6): p. 449-57.

192. Vacanti, C.A., et al., *The efficacy of periosteal cells compared to chondrocytes in the tissue engineered repair of bone defects*. *Tissue Eng*, 1995. **1**(3): p. 301-8.
193. Garrison, K.R., et al., *Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review*. *Health Technol Assess*, 2007. **11**(30): p. 1-150, iii-iv.
194. De Biase, P. and R. Capanna, *Clinical applications of BMPs*. *Injury*, 2005. **36 Suppl 3**: p. S43-6.
195. Regauer, M., et al., *[New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep]*. *Zentralbl Chir*, 2005. **130**(4): p. 338-45.
196. Bessa, P.C., M. Casal, and R.L. Reis, *Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008. **2**(2-3): p. 81-96.
197. Schmidmaier, G., et al., *Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives*. *Injury*, 2007. **38 Suppl 4**: p. S35-41.
198. Mahendra, A. and A.D. Maclean, *Available biological treatments for complex non-unions*. *Injury*, 2007. **38 Suppl 4**: p. S7-12.
199. Kanakaris, N.K., et al., *Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience*. *Injury*, 2009. **40 Suppl 3**: p. S54-61.
200. Fu, Y.C., et al., *Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2*. *Biotechnol Bioeng*, 2008. **99**(4): p. 996-1006.
201. Dimitriou, R., et al., *Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions*. *Injury*, 2005. **36 Suppl 4**: p. S51-9.
202. Giannoudis, P.V., et al., *Biological enhancement of bone healing with Bone Morphogenetic Protein-7 at the clinical setting of pelvic girdle non-unions*. *Injury*, 2007. **38 Suppl 4**: p. S43-8.
203. Zhou, N., et al., *BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells*. *Cell Tissue Res*, 2016. **366**(1): p. 101-11.
204. Faundez, A., et al., *Bone morphogenetic protein use in spine surgery—complications and outcomes: a systematic review*. *International Orthopaedics*, 2016. **40**(6): p. 1309-1319.
205. Carragee, E.J., E.L. Hurwitz, and B.K. Weiner, *A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned*. *Spine J*, 2011. **11**(6): p. 471-91.
206. James, A.W., et al., *A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2016. **22**(4): p. 284-97.
207. Tannoury, C.A. and H.S. An, *Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery*. *Spine J*, 2014. **14**(3): p. 552-9.
208. Quinlan, E., et al., *Controlled release of vascular endothelial growth factor from spray-dried alginate microparticles in collagen-hydroxyapatite scaffolds for promoting vascularization and bone repair*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017. **11**(4): p. 1097-1109.
209. Hunter, G.K. and H.A. Goldberg, *Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein*. *Biochem J*, 1994. **302 (Pt 1)**: p. 175-9.
210. Chen, J.K., et al., *Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization*. *Matrix*, 1991. **11**(2): p. 133-43.
211. Oldberg, A., et al., *Regulation of bone sialoprotein mRNA by steroid hormones*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3183-6.
212. Ashammakhi, N., et al., *Advancing Frontiers in Bone Bioprinting*. *Adv Healthc Mater*, 2019. **8**(7): p. e1801048.
213. Dhawan, A., et al., *Three-dimensional Bioprinting for Bone and Cartilage Restoration in Orthopaedic Surgery*. *J Am Acad Orthop Surg*, 2019. **27**(5): p. e215-e226.
214. Daly, A.C., et al., *3D Bioprinting of Developmentally Inspired Templates for Whole Bone Organ Engineering*. *Adv Healthc Mater*, 2016. **5**(18): p. 2353-62.
215. Lee, J.M. and W.Y. Yeong, *Design and Printing Strategies in 3D Bioprinting of Cell-Hydrogels: A Review*. *Adv Healthc Mater*, 2016. **5**(22): p. 2856-2865.

216. Yeong, W.Y., et al., *Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 643-52.
217. Heo, S.J., et al., *Fabrication and characterization of novel nano- and micro-HA/PCL composite scaffolds using a modified rapid prototyping process*. J Biomed Mater Res A, 2009. **89**(1): p. 108-16.
218. Tao, S.L. and T.A. Desai, *Aligned arrays of biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanowires and nanofibers by template synthesis*. Nano Lett, 2007. **7**(6): p. 1463-8.
219. Igwe, J.C., P.E. Mikael, and S.P. Nukavarapu, *Design, fabrication and in vitro evaluation of a novel polymer-hydrogel hybrid scaffold for bone tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 2014. **8**(2): p. 131-42.
220. Shahabipour, F., et al., *Key components of engineering vascularized 3-dimensional bioprinted bone constructs*. Transl Res, 2020. **216**: p. 57-76.
221. Vikram Singh, A., et al., *Three-dimensional patterning in biomedicine: Importance and applications in neuropharmacology*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. **106**(3): p. 1369-1382.
222. Oest, M.E., et al., *Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects*. J Orthop Res, 2007. **25**(7): p. 941-50.
223. Jha, A.K., et al., *Enhanced survival and engraftment of transplanted stem cells using growth factor sequestering hydrogels*. Biomaterials, 2015. **47**: p. 1-12.
224. Sheehy, E.J., D.J. Kelly, and F.J. O'Brien, *Biomaterial-based endochondral bone regeneration: a shift from traditional tissue engineering paradigms to developmentally inspired strategies*. Mater Today Bio, 2019. **3**: p. 100009.
225. Lin, C.Y., et al., *The use of ASCs engineered to express BMP2 or TGF-beta3 within scaffold constructs to promote calvarial bone repair*. Biomaterials, 2013. **34**(37): p. 9401-12.
226. Gonzalez-Fernandez, T., et al., *Gene Delivery of TGF-beta3 and BMP2 in an MSC-Laden Alginate Hydrogel for Articular Cartilage and Endochondral Bone Tissue Engineering*. Tissue Eng Part A, 2016. **22**(9-10): p. 776-87.
227. Raftery, R.M., et al., *Translating the role of osteogenic-angiogenic coupling in bone formation: Highly efficient chitosan-pDNA activated scaffolds can accelerate bone regeneration in critical-sized bone defects*. Biomaterials, 2017. **149**: p. 116-127.
228. Curtin, C.M., et al., *Combinatorial gene therapy accelerates bone regeneration: non-viral dual delivery of VEGF and BMP2 in a collagen-nanohydroxyapatite scaffold*. Adv Healthc Mater, 2015. **4**(2): p. 223-7.
229. Ganss, B., R.H. Kim, and J. Sodek, *Bone sialoprotein*. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. **10**(1): p. 79-98.
230. Malaval, L., et al., *Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1145-53.
231. Fisher, L.W. and N.S. Fedarko, *Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins*. Connect Tissue Res, 2003. **44 Suppl 1**: p. 33-40.
232. Tye, C.E., G.K. Hunter, and H.A. Goldberg, *Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13487-92.
233. Midura, R.J., et al., *A rat osteogenic cell line (UMR 106-01) synthesizes a highly sulfated form of bone sialoprotein*. J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 5285-91.
234. Carvalho, R.S., et al., *Predominant integrin ligands expressed by osteoblasts show preferential regulation in response to both cell adhesion and mechanical perturbation*. J Cell Biochem, 2002. **84**(3): p. 497-508.
235. Bellahcene, A., M.P. Merville, and V. Castronovo, *Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer*. Cancer Res, 1994. **54**(11): p. 2823-6.
236. Waltregny, D., et al., *Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(13): p. 1000-8.
237. Bellahcene, A., et al., *Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer*. Thyroid, 1998. **8**(8): p. 637-41.

238. Vincent, K. and M.C. Durrant, *A structural and functional model for human bone sialoprotein*. J Mol Graph Model, 2013. **39**: p. 108-17.
239. Mosher, D.F. and J.C. Adams, *Adhesion-modulating/matricellular ECM protein families: a structural, functional and evolutionary appraisal*. Matrix Biol, 2012. **31**(3): p. 155-61.
240. Murphy-Ullrich, J.E. and E.H. Sage, *Revisiting the matricellular concept*. Matrix Biol, 2014. **37**: p. 1-14.
241. Xu, L., et al., *Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation*. Biomaterials, 2007. **28**(4): p. 750-61.
242. Choi, Y.J., et al., *Enhanced osteogenesis by collagen-binding peptide from bone sialoprotein in vitro and in vivo*. J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(2): p. 547-54.
243. Kasugai, S., T. Nagata, and J. Sodek, *Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro*. J Cell Physiol, 1992. **152**(3): p. 467-77.
244. Raynal, C., P.D. Delmas, and C. Chenu, *Bone sialoprotein stimulates in vitro bone resorption*. Endocrinology, 1996. **137**(6): p. 2347-54.
245. Zhou, H.Y., et al., *Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells*. Calcif Tissue Int, 1995. **56**(5): p. 403-7.
246. Schaeren, S., et al., *Effect of bone sialoprotein coating of ceramic and synthetic polymer materials on in vitro osteogenic cell differentiation and in vivo bone formation*. J Biomed Mater Res A, 2010. **92**(4): p. 1461-7.
247. Holm, E., et al., *Loss of bone sialoprotein leads to impaired endochondral bone development and mineralization*. Bone, 2015. **71**: p. 145-54.
248. Lamour, V., et al., *[SIBLING proteins: molecular tools for tumor progression and angiogenesis]*. Med Sci (Paris), 2013. **29**(11): p. 1018-25.
249. Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh, *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis*. Science, 1994. **264**(5158): p. 569-71.
250. Bellahcene, A., et al., *Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis*. Circ Res, 2000. **86**(8): p. 885-91.
251. Klug, A., et al., *Trends in Total Hip Arthroplasty in Germany from 2007 to 2016: What Has Changed and Where Are We Now?* Z Orthop Unfall, 2019.
252. Klein, A., et al., *Effect of bone sialoprotein coated three-dimensional printed calcium phosphate scaffolds on primary human osteoblasts*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. **106**(7): p. 2565-2575.
253. Baranowski, A., et al., *Surface Functionalization of Orthopedic Titanium Implants with Bone Sialoprotein*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0153978.
254. O'Toole, G.C., et al., *Bone sialoprotein-coated femoral implants are osteoinductive but mechanically compromised*. J Orthop Res, 2004. **22**(3): p. 641-6.
255. Wang, J., et al., *Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein*. Calcif Tissue Int, 2006. **79**(3): p. 179-89.
256. Baranowski, A., et al., *Evaluation of Bone Sialoprotein Coating of Three-Dimensional Printed Calcium Phosphate Scaffolds in a Calvarial Defect Model in Mice*. Materials (Basel), 2018. **11**(11).
257. Lode, A., et al., *Fabrication of porous scaffolds by three-dimensional plotting of a pasty calcium phosphate bone cement under mild conditions*. J Tissue Eng Regen Med, 2014. **8**(9): p. 682-93.
258. Reitmaier, S., et al., *Strontium(II) and mechanical loading additively augment bone formation in calcium phosphate scaffolds*. J Orthop Res, 2018. **36**(1): p. 106-117.
259. Akkineni, A.R., et al., *A versatile method for combining different biopolymers in a core/shell fashion by 3D plotting to achieve mechanically robust constructs*. Biofabrication, 2016. **8**(4): p. 045001.
260. Klein, A., et al., *Effect of bone sialoprotein coating on progression of bone formation in a femoral defect model in rats*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2019.

261. Klein, A., *Functionalisation of Biomaterials with Bone Sialoprotein for Joint and Bone Replacement*. 2017.
262. Univ.-Prof. Dr. med. Alexander Hofmann, D.r.p.U.R., Dr. med. Andreas Baranowski, Dr. Anja Klein, *Evaluation Bone Sialoprotein (BSP)-funktionalisierter Oberflächen und Biomaterialien in der rekonstruktiven Chirurgie des Bewegungsapparates und in der Dentalmedizin*. 2017, Wissenschaftliches Labor des Zentrums für Orthopädie und Unfallchirurgie Universitätsmedizin Mainz.
263. Nau, C., et al., *Treatment of Large Bone Defects with a Vascularized Periosteal Flap in Combination with Biodegradable Scaffold Seeded with Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells: An Experimental Study in Rats*. *Tissue Eng Part A*, 2016. **22**(1-2): p. 133-41.
264. Seebach, C., et al., *Cell-based therapy by implanted human bone marrow-derived mononuclear cells improved bone healing of large bone defects in rats*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(9-10): p. 1565-78.
265. Seebach, C., et al., *Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats*. *Tissue Eng Part A*, 2010. **16**(6): p. 1961-70.
266. Julia Henke, B., et al. *Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT Schmerztherapie bei Versuchstieren*. 2015. 1-72.
267. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-5.
268. Schindelin, J., et al., *The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis*. *Mol Reprod Dev*, 2015. **82**(7-8): p. 518-29.
269. Doube, M., et al., *BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ*. *Bone*, 2010. **47**(6): p. 1076-9.
270. Lang, G., *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* Immunhistochemie, ed. Springer. 2013: Online-Ausg.: Berlin ~[u.a.]œ: Springer, 2012.
271. Scientific, T.F., *Datasheet DAKO LSAB*. p. 1-23.
272. Technologies, O., *Datasheet CD31/PECAM1*. p. 1-3.
273. Scientific, T.F., *Datasheet Antibody SPARC (5031) ; Dako*. p. 1.
274. USA, N.B., *Datasheet Antibody OPN (1B20)*. p. 1-3.
275. LSBio, *Datasheet VWF _ Von Willebrand Factor Antibody (aa1304-1452) for IHC, WB_ Western*. p. 1-3.
276. Scientific, T.F., *Datasheet Liquid DAB+ Substrate; Dako Chromogen System Code K3468*. p. 2.
277. Unknown. *Image J facts*. 13.11.2018]; Available from: <https://imagej.net/ImageJ>.
278. Unknown. *Download Image J*. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.
279. Unknown. *Image J facts*. Available from: <https://imagej.net/ImageJ>.
280. Dickson, G., et al., *Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration*. *Technol Health Care*, 2007. **15**(1): p. 57-67.
281. Hollinger, J.O., S. Winn, and J. Bonadio, *Options for tissue engineering to address challenges of the aging skeleton*. *Tissue Eng*, 2000. **6**(4): p. 341-50.
282. GmbH, I. <https://www.innotere.de/3d-scaffolds>. Innotere 3D Scaffolds o. J. [cited 2020.
283. Midura, R.J., et al., *Bone acidic glycoprotein-75 delineates the extracellular sites of future bone sialoprotein accumulation and apatite nucleation in osteoblastic cultures*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25464-73.
284. Cooper, L.F., et al., *Spatiotemporal assessment of fetal bovine osteoblast culture differentiation indicates a role for BSP in promoting differentiation*. *J Bone Miner Res*, 1998. **13**(4): p. 620-32.
285. Zhu, J.X., et al., *Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats*. *Histochem J*, 2001. **33**(1): p. 25-35.

286. Horner, E.A., et al., *Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(2): p. 263-71.
287. Muschler, G.F., et al., *The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(1): p. 123-45.
288. Boutrand, J.P., *12 - Methods and interpretation of performance studies for bone implants*, in *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*, J.-P. Boutrand, Editor. 2012, Woodhead Publishing. p. 271-312e.
289. Lan Levensgood, S.K., et al., *The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity*. Acta Biomater, 2010. **6**(8): p. 3283-91.
290. Heitz, F., M.C. Morris, and G. Divita, *Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 195-206.
291. Ohnishi, T., et al., *Purification, characterization, and studies on biosynthesis of a 59-kDa bone sialic acid-containing protein (BSP) from rat mandible using a monoclonal antibody. Evidence that 59-kDa BSP may be the rat counterpart of human alpha 2-HS glycoprotein and is synthesized by both hepatocytes and osteoblasts*. J Biol Chem, 1991. **266**(22): p. 14636-45.
292. Zhao, C., et al., *Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation*. Arch Oral Biol, 2007. **52**(10): p. 945-53.
293. Olthof, M.G.L., et al., *In Vitro and In Vivo Correlation of Bone Morphogenetic Protein-2 Release Profiles from Complex Delivery Vehicles*. Tissue Eng Part C Methods, 2018. **24**(7): p. 379-390.
294. Yuan, H., et al., *Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs*. Biomaterials, 2000. **21**(12): p. 1283-90.
295. Kimmel, D.B. and W.S. Jee, *Bone cell kinetics during longitudinal bone growth in the rat*. Calcif Tissue Int, 1980. **32**(2): p. 123-33.
296. Nanci, A., *Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density*. J Struct Biol, 1999. **126**(3): p. 256-69.
297. Valverde, P., et al., *Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(11): p. 1775-88.
298. Wernike, E., et al., *Long-term cell-mediated protein release from calcium phosphate ceramics*. J Biomed Mater Res A, 2010. **92**(2): p. 463-74.
299. Grigoryan, M., et al., *Quantitative and qualitative assessment of closed fracture healing using computed tomography and conventional radiography*. Acad Radiol, 2003. **10**(11): p. 1267-73.
300. Davis, B.J., et al., *Reliability of radiographs in defining union of internally fixed fractures*. Injury, 2004. **35**(6): p. 557-61.
301. Blokhuis, T.J., et al., *The reliability of plain radiography in experimental fracture healing*. Skeletal Radiol, 2001. **30**(3): p. 151-6.
302. Claes, L.E. and J.L. Cunningham, *Monitoring the mechanical properties of healing bone*. Clin Orthop Relat Res, 2009. **467**(8): p. 1964-71.
303. Dadsetan, M., et al., *Effect of calcium phosphate coating and rhBMP-2 on bone regeneration in rabbit calvaria using poly(propylene fumarate) scaffolds*. Acta Biomater, 2015. **18**: p. 9-20.
304. Malaval, L., et al., *Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone*. Bone, 2009. **45**(5): p. 853-61.
305. Takigami, H., et al., *Bone formation following OP-1 implantation is improved by addition of autogenous bone marrow cells in a canine femur defect model*. J Orthop Res, 2007. **25**(10): p. 1333-42.
306. Walsh, W.R., et al., *Critical Size Bone Defect Healing Using Collagen-Calcium Phosphate Bone Graft Materials*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0168883.
307. Boulefour, W., et al., *Deletion of OPN in BSP knockout mice does not correct bone hypomineralization but results in high bone turnover*. Bone, 2019. **120**: p. 411-422.

308. Monfoulet, L., et al., *Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing*. *Bone*, 2010. **46**(2): p. 447-52.

