

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

Evaluation des Effekts eines 3D-gedruckten Polylactidkäfigs modifiziert mit Kollagen  
und Bone Sialoprotein auf die Knochenneubildung in einem Defekt kritischer Größe  
im Femur der Ratte

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Christoph Matthias Dahmen  
aus Neuss

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06.06.2023

## **Inhaltsverzeichnis**

---

Einleitung.....	5
Literaturdiskussion .....	6
Der menschliche Knochen .....	6
Frakturenlehre .....	7
Tissue engineering.....	14
3D-Druck .....	15
Wachstumsfaktoren .....	16
Tiermodelle.....	17
Vorversuche .....	18
Material und Methodik .....	19
Versuchstierhaltung und Tierschutz .....	19
Tierschutzaspekte .....	20
RatFix®-System .....	20
Polylactid – Käfig.....	21
Füllung des Käfigs.....	22
Operationstechnik .....	23
Röntgenuntersuchung.....	26
Femurentnahme.....	26
Mikro - CT .....	27
Ergebnisse und Diskussion .....	29
In vitro .....	29
In vivo.....	29
Qualitative Auswertung.....	29
Quantitative Auswertung.....	52
Diskussion.....	57

Fehlerdiskussion.....	61
Zusammenfassung und Ausblick.....	64
Eingesetzte Materialien .....	65
Gerätschaften .....	65
Software .....	66
Instrumente.....	67
Reagenzien .....	68
Verbrauchsmaterialien .....	70
Abkürzungsverzeichnis .....	72
Abbildungsverzeichnis.....	73
Literaturverzeichnis .....	76
Danksagung .....	87
Lebenslauf.....	88

## Einleitung

---

Frakturen gehören mit zu den häufigsten Indikationen für eine Operation in Deutschland und sind daher im klinischen Alltag von hohem Interesse (1). Insbesondere Frakturen kritischer Größe, ob nun aufgrund von Trauma, Infektion oder pathologischer Ursache, stellen Orthopäden und Unfallchirurgen auch heute noch vor schwerwiegende Problemstellungen (2). Diese sogenannten Critical Size Defects (CSD), mit einer Größe von meist mehr als 2,5cm ohne Fragmentkontakt und keiner bis schlechter Spontanheilungstendenz, zeigen ein weites Feld an möglichen Komplikationen wie etwa die Ausbildung einer Pseudoarthrose, langanhaltende Schmerzsymptomaten, weiterführende Funktionsstörungen im Bewegungsapparat und als Folge all dieser auch psychische Belastungen (2, 3).

Die Therapie dieser Frakturen gestaltet sich bis jetzt meist in Form einer autologen Transplantation vaskularisierten Knochens, einer Distraktionsosteogenese oder der Anwendung der Masquelet-Technik (Induced Membrane Technique). Diese bringen zwar teilweise gute Ergebnisse, jedoch entstehen hier die Nachteile einer zweiten Operation, der Spendermorbidity und des Entnahmerisikos (4, 5). Aufgrund dessen liegt zurzeit das Augenmerk auf dem Feld des Bioengineering, welches hofft, durch Fortschritte in der Stammzellbiologie, 3D-Druck und neuer künstlicher Biomaterialien bessere Alternativen zu schaffen. Die grundlegende Idee ist es, mithilfe eines 3D-gedruckten Gerüsts („Scaffold“), welches beispielsweise mit mesenchymalen Stammzellen und Wachstumsfaktoren befüllt wird, den Bruch zu stabilisieren und Knochen- und Gefäßwachstum lokal anzuregen.

In dieser Arbeit wurde ein 3D-gedrucktes Gerüst aus Polylactid in Kombination mit Kollagen und BSP (Bone SialoProtein) auf seine Fähigkeit hin getestet, das Knochenwachstum im Femur der Ratte nach standardisiertem kritischem Defekt, welcher mit einer Plattenosteosynthese stabilisiert wurde, anzuregen. Als Positivkontrolle diente BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein), von dem bereits bekannt ist, dass es Knochenwachstum fördert. Um die Knochenregeneration zu quali- und quantifizieren, wurden die Knochenproben durch Röntgen (in vivo), im Mikro-CT und histologisch untersucht.

## Literaturdiskussion

---

### Der menschliche Knochen

Knochengewebe ist nach dem Zahnschmelz die härteste Substanz im menschlichen Organismus und mit ca. 210 Knochen gibt es dem Skelett seine Form. Seine Eigenschaften ermöglichen es ihm, mechanischen Einflüssen wie Druck, Dehnung und Biegung standzuhalten (6). Auch ist er ein Fett-, Calcium- und Phosphatspeicher und hat als solcher Einfluss auf den Haushalt dieser beiden Ionen. Zusätzlich beherbergt er das rote Knochenmark mit den Stammzellen verschiedener Blutzellreihen (6).

Auf zellulärer Ebene besteht Knochen aus extrazellulärer Matrix (EZM), welche von den Osteozyten, knochenspezifischen Zellen, mit hauptsächlich Hydroxylapatit mineralisiert wurde. Diese EZM besteht wiederum aus einem organischen Anteil, welcher hauptsächlich durch Kollagen Typ 1 gebildet wird, und einem anorganischen Teil, mit dem Mineral Hydroxylapatit als Hauptbestandteil. Im Verbund erlauben sie dem Knochen seine mechanische Beanspruchbarkeit (6, 7).

Im Knochengewebe finden sich als weitere Zellen die Osteoblasten, verantwortlich für neuen Knochenaufbau, und die Osteoklasten, die den Abbau des Knochens bewerkstelligen. Sie machen trotz ihrer Wichtigkeit für die Remodellierung des Knochens nur etwa 2% seiner Trockenmasse aus. Gemeinsam sorgen sie dafür, dass sich ein Knochen innerhalb von 2 – 8 Monaten komplett erneuert und sind somit die Hauptakteure im Rahmen des Knochenstoffwechsels (6).

## Frakturenlehre

Eine Fraktur ist definiert als die vollständige Unterbrechung des Knochens unter Bildung von mindestens zwei Fragmenten, die durch einen Bruchspalt voneinander getrennt sind (8). Dabei gibt es viele verschiedene Frakturformen, von Biegungs- und Torsionsfrakturen über Abriss- und Abscherfrakturen bis hin zu Kompressions-, Trümmer-, und Luxationsbrüchen. Die Ausheilung dieser Verletzungen ist dementsprechend unterschiedlich und von Faktoren wie etwa Alter, Einnahme bestimmter Medikamente (Eigenschaften des Patienten), Vaskularisation und Kontakt der Fragmente und deren Ruhigstellung (mechanische Stabilität) abhängig (6, 9).

Diese Voraussetzungen für eine erfolgreiche Knochenheilung werden unter dem sogenannten „Diamond Concept“ zusammengefasst, welches damit auch für die Therapie relevant ist (10–12).



Abbildung 1: *Diamond Concept* modifiziert nach Giannoudis et al. (12).

Man unterscheidet die Knochenheilung in die primäre Form, welche nur bei stabiler Fixation durch Osteosynthese auftritt, und die sekundäre Form, die dagegen unter instabilen Bedingungen und in vier Phasen abläuft (Siehe a) – d) in Abbildung 2). Bei der Mehrzahl von Verletzungen entsteht eine Verschiebung der Knochenfragmente, sodass sie den Kontakt zueinander verlieren und somit die sekundäre Knochenheilung wesentlich häufiger vorkommt (8).

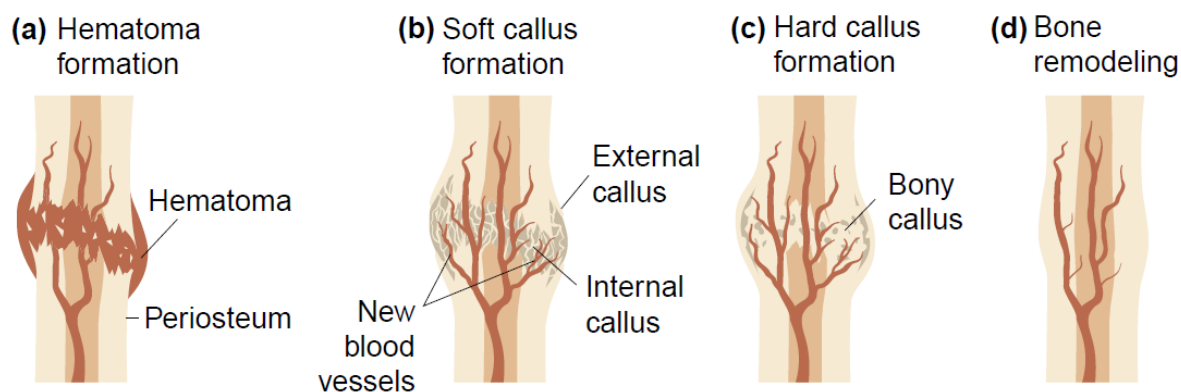


Abbildung 2: Stadien der sekundären Knochenheilung, a) Hämatombildung b) Bildung des weichen Kallus und neuer Blutgefäße c) Bildung des harten Kallus d) Knochenumformung zur neuen, ausgeheilten Form (13).

Ist die Verschiebung der Fragmente jedoch zu groß, etwa bei hochgradig offenen Frakturen, Infektionen, Hochenergetraumata oder großen Knochentumoren mit entsprechender Resektion, kann eine spontane Heilung des Knochens kaum mehr stattfinden: Es ist eine operative Therapie notwendig. Bleibt auch dann eine Heilung aus, so ist möglicherweise ein Defekt kritischer Größe entstanden (2).

### **Therapie von Frakturen**

Die Therapie der Frakturen richtet sich meist nach deren Ursache und ist demnach vielfältig. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen konservativer und operativer Therapie, wobei sich beispielsweise anhand der Lokalisation, dem Frakturtyp, dem Allgemeinzustand des Patienten und Zusatzverletzungen für eine der beiden Optionen entschieden wird (8). Sowohl konservative als auch operative Versorgung folgen dabei den drei Grundsätzen Reposition, Retention und Rehabilitation.

Die Reposition, operativ oder konservativ, sollte unter Analgesie und Muskelrelaxation erfolgen. Dabei werden die Knochenfragmente durch Zug und gegebenenfalls Seitendruck wieder in Kontakt gebracht. Anschließend folgt die Retention, die Ruhigstellung, der jetzt reponierten Knochenanteile, mit diversen Schienen oder Verbandarten. Zu guter Letzt erfolgt immer auch eine Rehabilitation des Patienten. Deren Art ist abhängig von Frakturform und gewählter Therapie und beinhaltet physiotherapeutische Mobilisation und Übungen (8).



Eine besondere Situation stellen jedoch Knochendefekte dar, die trotz chirurgischer Stabilisierung keine Ausheilung zeigen, die Critical Size Defects (CSD). Deren tatsächliche Größe ist weiterhin nicht klar definiert und variiert sowohl intra- als auch interspezifisch, je nach Lokalisation des Defekts und Schaden des umgebenden Weichteilgewebes (2), was nicht zuletzt auch zur Schwierigkeit der Therapie solcher Frakturen beiträgt.



Abbildung 3: Röntgenbild eines Defekts kritischer Größe (CSD) im Femur einer Ratte; hier bereits mit einer Osteosynthese versorgt.

An dieser Stelle ist es wichtig einen CSD von einer „Non-union“ eines Knochens zu unterscheiden: Letztere stellt die Situation einer ausbleibenden Heilung aufgrund biomechanischer Instabilität und/oder zellulärer bzw. molekularer Problematiken dar, welche bei einem CSD nicht gegeben sind (14–16). Ist, wie oben beschrieben, ein kritischer Defekt vorhanden, so sind besondere Therapiemaßnahmen von Nöten, um eine Ausheilung erreichen zu können:

Ein Beispiel ist die autologe Knochentransplantation, welche auch heute noch den Goldstandard in der Therapie darstellt (2). Hier wird dem Patienten ein Transplantat spongiösen Knochens, zumeist aus der Crista iliaca, entnommen und in den Defekt eingebracht (6). Die hierbei platzierten Osteozyten und -blasten, zusätzlich zu den Wachstumsfaktoren, dienen der Unterstützung der frühen Knochenbildung (17). Diese Therapieform erfordert eine gute Durchblutungssituation und mechanische Stabilisierung an der Defektstelle, weshalb eine zusätzliche Osteosynthese angebracht wird.

Die osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften gekoppelt mit dem Auffüllungseffekt erlaubten zwar bisher die Therapie kritischer Defekte, allerdings besteht wie bereits oben erwähnt ein gewisses Entnahmerisiko, mit Möglichkeit einer chronischen Schmerzsymptomatik oder Infektion (beide jeweils mit etwa 10% Wahrscheinlichkeit) (6, 18). Problematisch wird die Anwendung auch bei Kindern und älteren Patienten aufgrund des geringen Angebots autologen Knochenmaterials (19). Diese Technik eignet sich außerdem nur für Brüche mit einer maximalen Größe von 4-5cm (20). Obwohl diese Therapieoption derzeit den Goldstandard für die Therapie von CSDs darstellt, bestehen auch oft, aufgrund der genannten Problematiken, Limitationen in deren Anwendung.

Eine weitere Therapieoption stellt die Masquelet – Technik dar, auch Technik der induzierten Membran genannt. Diese bietet sich insbesondere bei Defekten größer 5cm<sup>3</sup>, aber auch bei infizierten Knochenverletzungen an (6, 21, 22). Hierbei handelt es sich um eine zweizeitige OP, es werden also zwei Eingriffe benötigt. Beim ersten wird ein PMMA (Polymethylmethacrylat) -Zementspacer, ein Platzhalter, der mit Antibiotika angereichert werden kann und die Form der später gewünschten Knochenstruktur hat, in den Defekt eingebracht. Dieser ermöglicht durch eine Fremdkörperreaktion die Bildung einer synovialen Membran um den Frakturbereich, welche Wachstumsfaktoren und Vorläuferzellen enthält und zusätzlich die Durchblutungssituation verbessert (21, 22). Die Defektstelle wird anschließend durch meist externe Verfahren stabilisiert, um die korrekte Ausbildung der Membran zu gewährleisten (23).

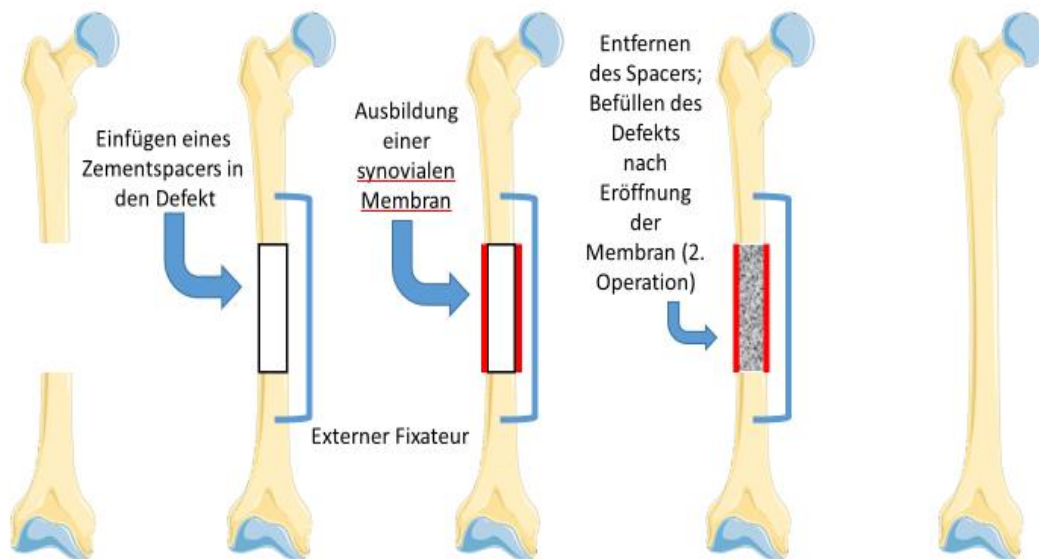


Abbildung 4: Schema der Masquelet-Technik (Modifiziert nach „Femur“ von Laboratoires Servier / CC BY Lizenz) (26)

Beim zweiten Eingriff nach etwa 6 bis 8 Wochen wird diese Membran eröffnet, der Zement entfernt und mit autogenem spongiösem Knochenmaterial aufgefüllt. Zusätzlich zum Knochentransplantat werden noch Tricalciumphosphat und Wachstumsfaktoren (BMP 2 oder BMP 7) inseriert, um eine bestmögliche Knochenregeneration zu ermöglichen (24, 25). Eine Vollbelastung ist mit dieser Methode nach ca. 6 Monaten möglich, wobei die Patienten regelmäßige Kontrolluntersuchungen wahrnehmen sollten, um eine häufige progressive Deformität des therapierten Knochensegments frühestmöglich zu erkennen (23).

Im Rahmen der Therapie eines CSD ist auch die Distraktionsosteogenese (nach ihrem Erfinder auch Ilizarov-Technik genannt) zu erwähnen. Diese Methode wird in 3 Phasen gegliedert: An erster Stelle steht die Latenzperiode, in der zunächst ein künstlicher Frakturspalt abseits (meist metaphysär gelegen) des eigentlichen Defekts gesetzt wird, sodass ein freies Knochenfragment entsteht. Die beiden Frakturpartner der neuen Frakturstelle werden anschließend minimal voneinander getrennt und über einen externen Ringfixateur (Distraktor) stabilisiert. Nach der Operation erfolgt dann eine Latenzzeit von etwa 1 Woche bis zur Bildung von Kallus im künstlichen Defekt. Nun beginnt die Distraktionsphase: Der eingebrachte Distraktor erlaubt über durch den Knochen gespannte Drähte die Aufdehnung des Frakturspalts von außen um ca. 1mm pro Tag (5). Eine Geschwindigkeit, die eine verfrühte Verfestigung des Kallus verhindert, gleichzeitig aber nicht die Wachstumsfähigkeit der umgebenden Weichteile überschreitet. Diese Phase dauert bis zur Kompression der beiden Fragmente der ursprünglichen Fraktur an. Als letztes schließt sich die Konsolidierungsphase an, welche bis zur Ausheilung des CSD andauert (5). Für diese Zeit wird der verwendete Fixateur im Patienten belassen.

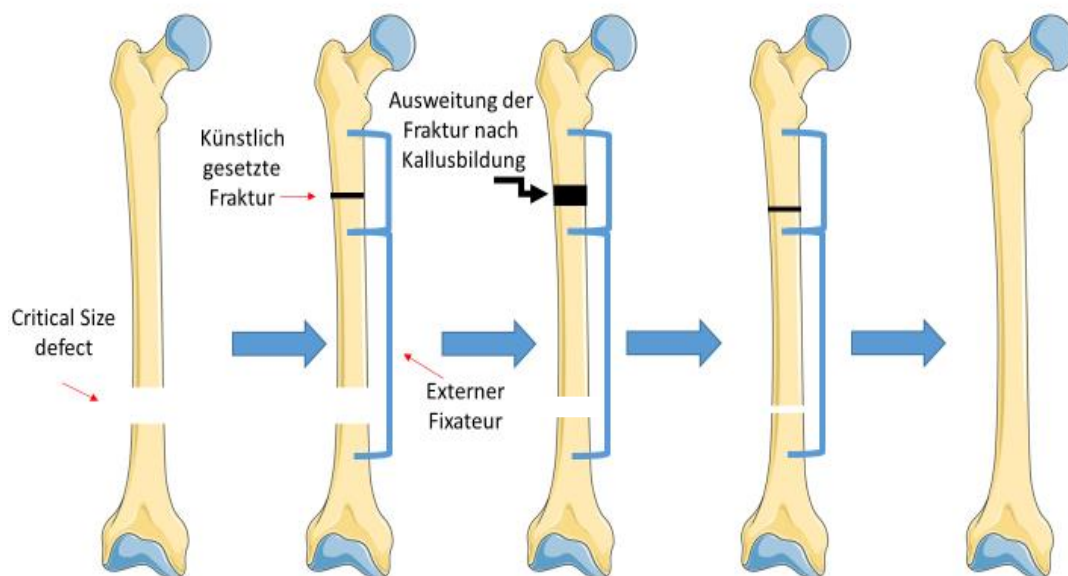


Abbildung 5: Schema der Distraktionsosteogenese. Die Ausweitung der künstlichen Fraktur erfolgt millimeterweise bis der CSD geschlossen ist. (Modifiziert nach „Femur“ von Laboratoires Servier / CC BY Lizenz) (26)

Die Distractionsosteogenese konnte gute Ergebnisse in der Therapie von CSD's in langen Röhrenknochen erzielen (27) und findet daher ebenfalls Anwendung, insbesondere in der Rekonstruktionschirurgie (28). Jedoch zeigt sie auch Nachteile. Hierbei ist die lange Therapiedauer zu nennen, die, abhängig von der Länge zu überbrückenden Fraktur, Monate bis Jahre dauern kann (5). Nicht zuletzt deshalb kommt es häufig zu Infektionen der Insertionsstellen des Fixateurs. Auch ist diese Therapieform nur ausgewählten Patienten vorbehalten, da die tägliche Distraction an diese delegiert wird und somit eine enorme Compliance verlangt (5).

Weitere Therapieoptionen für CSD stellen die endoprothetische Versorgung, Amputation und, im Falle von betroffenen Gelenken, die Arthrodesse dar. Diese werden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher beleuchtet.

## **Tissue engineering**

Aus den oben beschriebenen Sachverhalten ergibt sich das hohe Interesse an künstlich synthetisiertem Knochenersatzmaterial. Eine vielversprechende Möglichkeit bietet in diesem Zusammenhang das Tissue Engineering (engl. für „Gewebekonstruktion“ / Gewebezüchtung), welche im Grundsatz versucht funktionelle Substituenten zu finden, um geschädigtes Gewebe zu unterstützen oder zu ersetzen (29, 30). Zu diesem Zweck kommen Stammzellen, Bioreaktoren, Matrizen mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung (synthetische und natürliche), Scaffolds (Gerüste) und lösliche Moleküle, wie zum Beispiel Proteine und Nukleinsäuren, zum Einsatz (30). Das Tissue Engineering ist ein großes Gebiet in der regenerativen Medizin; hier soll es daher auf den Bereich des Bone Tissue Engineering eingeschränkt werden.

Dieses fokussiert die genannten Techniken auf den Problembereich des knöchernen Systems und so ergibt sich, auch angelehnt an das bereits kurz erwähnte Diamond Concept, für das Bone Tissue Engineering spezifisch mögliche Strategien, um Defekte kritischer Größe zu therapieren (10). So können etwa speziell für einen Defekt vor der Operation gefertigte Platzhalter-Gerüste die benötigte mechanische Stabilität ermöglichen (31). In diese Gerüste eingebrachte und kontinuierlich freigesetzte Wachstumsfaktoren dienen der Verbesserung der Vaskularisierung (etwa durch VEGF „Vascular endothelial growth factor“) und der Anregung der osteogenen Zellen zur Knochenbildung (12, 32). In dieser Arbeit wurde beispielsweise ein Mitglied der BMP (bone morphogenetic protein) Familie verwendet. Auch in der Natur benötigt die Knochenheilung eine Art Scaffold: Diese Funktion übernimmt dort das initiale Hämatom und später der Knorpelkallus (5).

Insbesondere ist auch das Einbringen von mesenchymalen Stammzellen (MSC = Multipotent Stem Cells) ein erfolgversprechender Ansatz in diesem Gebiet. Allerdings benötigen diese Zellen ebenfalls die Implantation eines Gerüsts, um ihnen physikalischen Schutz und eine Art Leitstruktur für die gewünschte Form zu geben (33, 34). Diese Gerüste lassen sich aufgrund ihrer materiellen Beschaffenheit meist den Klassen Metall, Polymer und/oder Biokeramik einteilen, wobei sie auch aus mehreren Stoffen zusammengesetzt und damit auch mehreren dieser Gruppen gleichzeitig angehören können. Auch von Bedeutung ist die Unterscheidung zwischen natürlichen und künstlichen Materialien und damit die Beachtung ihrer Biodegradierbarkeit, also ihrer Fähigkeit im Körper resorbiert zu werden (35). Bei der Herstellung eines scaffolds muss auf die

Balance zwischen Porosität und Stabilität des Materials geachtet werden, da große Poren zwar die Freisetzung von eventuell eingebrachten Substanzen erleichtert, gleichzeitig aber die mechanische Stabilität darunter leidet und umgekehrt (36, 37). Die Herstellung dieser Gerüste erfolgt zumeist über 3D-Drucker, um sie in ihrer Form dem gewünschten Zweck anzupassen.

### **3D-Druck**

Der 3D-Druck, auch additive Fertigung genannt, ist eine computergesteuerte Technologie zur schichtweisen Herstellung von dreidimensionalen Werkstücken (38), wobei dieser Begriff von Gegenständen bis hin zu ganzen Organen reicht (39). Die Vorteile dieser Form der Manufaktur der Gerüste liegen dabei in der möglichen hohen patientenspezifischen Flexibilität und Präzision, sodass sie den Defekten exakt angepasst werden können (35, 40). Für das Bone Tissue Engineering ist neben dem Einsatz von metallbasierten Fertigungen auch die polymerbasierte Variante von besonderer Bedeutung. Zum Einsatz kommen dabei eine Bandbreite an verschiedenen Biomaterialien, wie etwa Kollagen, Fibrin oder Elastin als Beispiele für natürliche Stoffe und Polyglykolsäure- (PGA), Polydioxanon- und Polylactatpolymere als Vertreter der synthetischen Stoffe (41), wobei letzteres in dieser Arbeit Anwendung fand.

Polylactid ist ein aus Zucker zu Milchsäure fermentiertes Polymer, welches sich im Bereich des Tissue Engineering aufgrund seiner überzeugenden mechanischen Eigenschaften und seiner leichten Verarbeitung im 3D Druck etabliert hat (42). Zudem eignet es sich als Träger für Wachstumsfaktoren (43). PLA ist eines der wenigen künstlichen Polymere, welches schon lange von der Food and Drug Administration der U.S.A. für den klinischen Einsatz zugelassen wurde (44). Nachteile von PLA sind die hydrophoben Eigenschaften, welche eine niedrige Zelladhäsion bedingen und die durch seine Abbauprodukte (Laktat) bedingte Inflammation in vivo (45)(46). Allerdings hat sich bis heute insgesamt weder PLA noch ein anderes einzelnes Material als optimale Gerüstgrundlage abheben können (47). Die in dieser Arbeit verwendeten PLA Käfige wurden durch die „Fused Deposition Modelling“ (FDM) Technik hergestellt, das heißt sie wurden Schicht für Schicht aus bei ca. 200° geschmolzenem PLA gefertigt.

## Wachstumsfaktoren

Als Wachstumsfaktoren bezeichnet man in der Medizin alle natürlichen Stoffe, die in der Lage sind, Zellproliferation, Zellreifung, Wundheilung, Zelldifferenzierung und -migration zu unterstützen (48, 49). In den verschiedenen Geweben des Körpers finden sich dementsprechend unterschiedliche Wachstumsfaktoren, weshalb diese in Familien eingeteilt werden. Dabei sind sie nicht notwendigerweise spezifisch für ein Gewebe; vielmehr bewirkt in vielen Fällen eine komplexe Interaktion dieser Stoffe mit Zellen deren Wirkung, wie etwa bei der Reparatur von Weichteilen (50). Für das Knochenwachstum und damit das Bone Tissue Engineering sind dabei die Familien mit Einfluss auf die Osteozyten, -blasten und -klasten, wie etwa die Insulin-Like-Growth Factors (IGFs), Fibroblast-Growth Factors (FGFs) und Transforming-Growth Factors (TGFs) von gesteigerter Bedeutung (51, 52). Zusätzlich zu den Genannten sind insbesondere Faktoren wichtig, die die Angiogenese fördern. Einige Arbeiten haben die Wichtigkeit eines suffizienten Gefäßnetzes herauskristallisiert, um ein optimales Knochenwachstum gewährleisten zu können. So sterben beispielsweise in das Gerüst eingebrachte Stammzellen ohne Anbindung an eine Gefäßversorgung an O<sub>2</sub>- und Nährstoffmangel (47, 53).

## Bone Sialoprotein (BSP)

Bone Sialoprotein (BSP) ist ein Vertreter der „Small Integrin-Binding N-Linked Glycoprotein“ – Protein-Familie und Teil der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix von Knochen und Dentin (54). Hauptsächlich wird es von Osteoblasten, Odontoblasten und zu kleinerem Teil von Osteoklasten und Chondrozyten exprimiert (55). Seine Aufgaben im Knochenstoffwechsel sind noch nicht endgültig geklärt, jedoch hat es, unter anderem durch seine starke Affinität zu Calcium, einen Einfluss auf die Mineralisierung der extrazellulären Matrix (56). Dabei wird vermutet, dass es eine Funktion als Kern für die Bildung der ersten Hydroxylapatitkristalle beim Wachstum neuen Knochens hat (57). Im Knock-out-Versuch für das BSP Gen in der Maus wurde eine erhöhte Masse an spongiösen Knochen bei gleichzeitig reduzierten Knochenumsatz detektiert; gleichzeitig zeigte sich auch ein insgesamt vermindertes Wachstum der Röhrenknochen (58). Durch seine Interaktion mit Integrinen (Transmembranproteine), welche von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden, fördert es weiterhin auch die Angiogenese (59, 60).



## Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Einige der wichtigsten das Knochenwachstum fördernden Stoffe sind die Bone Morphogenetic Proteins (BMP). Diese gehören in die Gruppe der Zytokine, die als Wachstumsfaktor fungieren. Die BMP gehören größtenteils der Familie der Transforming Growth Factor beta Familie (TGF beta) an. Ihre Funktion liegt in der Beeinflussung von Differenzierung und Proliferation von Geweben; damit haben sie eine Vielzahl von Aufgaben, wie etwa in der Herz-, Neuron-, Knorpel- und Knochenentwicklung, was anhand von Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte (61, 62). Den Teil ihres Namens „Bone Morphogenetic“ erhielten sie durch ihren Erstuntersucher Urist & Strates (1971); seitdem waren sie Objekt zahlreicher Studien, wodurch ihre weiteren Fähigkeiten erkannt wurden. Untersuchungen haben gezeigt, dass BMP bei großen Knochenfrakturen vollständig fehlte, in physiologischen Knochenwachstum jedoch vorhanden ist, was auf seine Bedeutung für die Knochenausheilung hindeutete (63). Heute zählen insgesamt 20 Proteine zu den BMPs; BMP-2 und BMP-7 werden klinisch bereits regelmäßig zur Therapie von Pseudoarthrosen in der proximalen Tibia eingesetzt (64, 65). Ein Nachteil der BMP Gruppe ist das Auftreten von heterotopen Ossifikationen und Inflammation, insbesondere bei hohen Konzentrationen dieser Proteine (66, 67).

## Tiermodelle

Um die Lösung für das Problem der CSDs zu finden, waren und sind Modelle am Tier notwendig, bevor ein Transfer in den klinischen Alltag mit Einsatz am Menschen stattfinden kann. Die richtige Applikation von Scaffolds, Wachstumsfaktoren und Stammzellen ist von kritischer Bedeutung, um ein zufriedenstellendes Ergebnis in der Therapie dieser Defekte erzielen zu können. In den meisten Studien dienen zu diesem Zweck oft Nagetiere (Mäuse und Ratten) als Modelle, aber auch Schafe, Ziegen und Schweine sind oft verwendete Versuchstiere. (58) Zwei Defektarten sind dabei häufig vertreten: Defekte der Schädelkalotte und segmentale Defekte in langen Röhrenknochen, der Tibia oder des Femurs. Letztere werden insbesondere genutzt, um die CSD zu simulieren (58, 68). Diese werden künstlich über ein Osteotomieverfahren mit Säge oder Bohrer und meist mit einer Größe von 2 - 2,5x Durchmesser des Knochenschaftes gesetzt (69).

Da bis heute das Ausmaß eines CSD nicht standardisiert ist, schwankt deren Größe in Untersuchungen zum Teil deutlich. In dieser Arbeit nutzten wir eine Defektgröße von 6 mm. Anschließend an die Setzung des Defekts erfolgt in den meisten Fällen eine interne Fixation des Defektgebiets mit Schrauben und Platten (70–72), wobei bis heute unklar ist, ob nicht eine externe Fixation von Vorteil wäre (58).

### **Vorversuche**

Als Vorversuch zu dieser Arbeit ist hier vornehmlich das Projekt von Tanja Habeck als Basis für ihre Masterthesis zu nennen. In diesem beschäftigte sie sich mit dem Einfluss von Bone-Sialo-Protein auf die Genexpression der osteoblastenspezifischen Differenzierungsmarkern (ALP, SP7 und RUNX2) in-vitro. Dazu wurden auf mit BSP beschichteten PLA-Scheiben SaOs-2 Zellen (Sarcoma Osteogenic-2) angezüchtet. Diese Osteosarkomzellen eignen sich insbesondere zur Examinierung der späten Differenzierungsstadien humaner Osteoblasten (73) weil sie in der Lage sind eine mineralisierungs-kompetente extrazelluläre Matrix zu bilden (74). Die RNA dieser Zellen wurde anschließend isoliert und die Genexpression durch eine real-time PCR untersucht. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollkultur gefunden werden. Anschließend wurde die Freisetzung von BSP aus einem mit Kollagen-Gel als Trägersubstanz befüllten 3D-PLA Käfig bewertet, welche sich als suffizient herausstellte. Dieses PLA-System fand danach Anwendung in dieser Arbeit.

## **Material und Methodik**

---

### **Versuchstierhaltung und Tierschutz**

Der Tierversuch mit dem Titel „Evaluation des Effekts von Bone Sialprotein (BSP) auf die Knochenneubildung und Angiogenese in einem diaphysären Femur-Defektmodell der Ratte“ wurde durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (G18-1-051).

Für diesen Versuch wurden 32 männliche Wistar Ratten im Alter von acht Wochen von dem Produzenten Janvier Labs verwendet. Vor Beginn des Versuchs besaßen die Ratten ein Durchschnittsgewicht von 385g (340 – 431g) und erhielten eine Eingewöhnungszeit von 5 bis 7 Tagen, wobei in einem Käfig jeweils 2 oder 3 Tiere zusammengehalten wurden.



Abbildung 6: Wistar Ratte (75)

Die Tiere erhielten Futter nach eigenem Belieben. Für eine möglichst keimarme Haltung stand ein Tierstall zur Verfügung. Der Kontakt mit den Tieren ist nur nach Anlage einer Garderobe, bestehend aus OP-Kittel und Haube, Einmal-Galoschen, Handschuhen und Mundschutz, erfolgt. Nach erfolgter Operation wurden die Versuchstiere zwei bis drei Tage in Einzelhaltung geführt, um die Wahrscheinlichkeit für ein Lösen der Nähte durch Anknabbern anderer Tiere und damit einer Infektion zu verringern.

## **Tierschutzaspekte**

Die Tierschutzkommission des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz hat das Tierversuchsvorhaben mit dem Titel „Evaluation des Effekts von Bone Sialprotein (BSP) auf die Knochenneubildung und Angiogenese in einem diaphysären Femur-Defektmodell der Ratte“ (G18-1-051) genehmigt. Um unnötigem Schmerz und Stress der Versuchstiere zu verringern, wurden folgende Vorkehrungen getroffen: Zum einen wurde die bereits oben genannte Eingewöhnungszeit von 5 bis 7 Tagen der Tiere in der neuen Umgebung eingehalten. Eine automatische Schaltung des Raumlichts erlaubte eine Simulation des natürlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von Ratten. Zum anderen wurden die Ratten hauptsächlich in sozialen Gruppen von zwei bis drei Tieren gehalten. Zur Analgesie wurde den Ratten nach den Eingriffen eine Woche lang Tramadol (1 mg/ml) im Trinkwasser verabreicht. Die Abbruchkriterien für diesen Versuch lauteten wie folgt: Ein Gewichtsverlust von mehr als 20%, andauernde Schmerzen, abnormales Verhalten (z.B. verminderte Flüssigkeit- oder Nahrungsaufnahme) und ein mehrmaliges Aufgehen der OP-Naht mit Infektion. Die Kontrolle dieser Kriterien erfolgte alle ein bis zwei Tage postoperativ. Eine Überdosierung des Narkosemittels Isofluran mit anschließender Enthauptung erlaubte eine nahezu schmerzfreie Tötung der Tiere.

## **RatFix®-System**

Das RatFix®-System (Hersteller: RISystem) besteht aus einer Polyetheretherketon (PEEK) Platte, sechs RatFix ShoulderScrews, einer Säge- und Bohrerleere und einem Bohreraufsatz. Es erlaubt einen standardisierten Defekt kritischer Größe am Femurschaft der Ratte zu setzen und diesen über die Platte zu stabilisieren (76). Polyetheretherketon hat den Vorteil einer hohen Widerstandskraft und Röntgendurchlässigkeit (77).

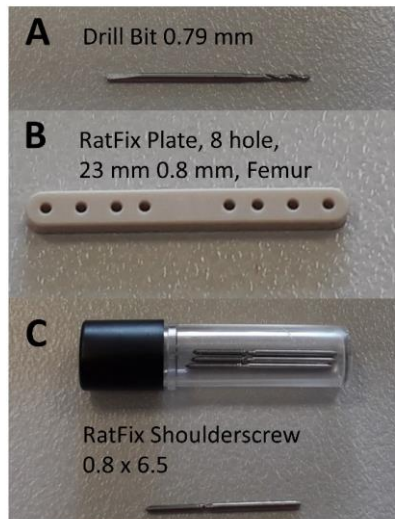


Abbildung 7: Instrumente und Materialien des RatFix-Systems. A Bohraufsatz 0,79mm B PEEK-Platte. C Fixierschrauben

### Polylactid – Käfig

Als Füllsubstanz für den Defekt wurde ein aus Polylaktid (PLA) gefertigter Käfig verwendet, der gleichzeitig auch als Träger für die knochenwachstumsfördernden Proteine fungierte. Seine Durchlässigkeit für Röntgenstrahlen war im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls von Bedeutung. Wir nutzten das kommerziell vertriebene PLA – Filament Ultimaker silver metallic PLA, iGo3D, Hannover, Germany) in der Stärke 2.85 \_ 0.10 mm.

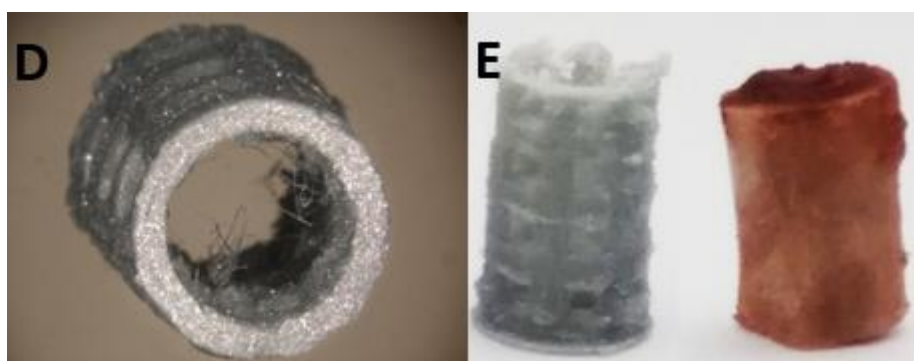


Abbildung 8: D Scanning electron microscope Aufnahme eines PLA-Käfigs E PLA-Käfig neben entnommenen Femurzylinder (78)

## Füllung des Käfigs

Der zylinderförmige Polylactidkäfig wurde mit Kollagengel und der zu untersuchenden Menge an BSP bzw. BMP-7 befüllt. Dabei wies das Gel die folgende Zusammensetzung auf:

### **Kollagengel mit 3,5mg/ml Kollagen:**

MEDIUM M199	10x 75µL
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5 %ig	35,8 µl
Natronlauge 1 M	26,5 µl
Aqua dest.	108 µl
Kollagen Typ I Lösung	578 µl

Die Käfige wurden zunächst bis zur Hälfte mit dem Kollagengel befüllt, die Proteinzusätze mittig eingebracht und dann wiederum das restliche Volumen mit Gel bestückt. Je nach Proteinzusatz ergaben sich folgende Gruppen:

<b>Gruppe</b>	<b>Benennung</b>		<b>Standzeiten</b>	<b>Anzahl der Tiere</b>	<b>gesamt</b>
1	-PLA	Leerkontrolle ohne Käfig	4/8 Wochen	1/1	2
2	+PLA	Leerkontrolle mit Käfig	4/8 Wochen	1/1	2
3	PLA+Kollagen	Kontrolle mit Käfig und Kollagen	4/8 Wochen	2/2	4
4	PLA+BMP-7	Käfig mit Kollagen + 2 µg BMP-7	4/8 Wochen	2/2	4
5	PLA+BSPlow	Käfig mit Kollagen + 1µg BSP	4/8 Wochen	5/5	10
6	PLA+BSPhigh	Käfig mit Kollagen + 5µg BSP	4/8 Wochen	5/5	10

Gruppeneinteilung der Versuchstiere

## Operationstechnik

### Narkose

Die Versuchstiere wurden durch Isofluran kurz prä- und anschließend durch eine intraperitoneale Injektion der Narkosemischung vollnarkotisiert. Zum Erhalt der Narkosetiefe dienende Injektionen wurden subkutan in die Nackenfalte appliziert. Die betäubte Ratte wurde auf einer sterilen OP-Unterlage in Bauchlage platziert, das rechte Bein großzügig rasiert, mit Braunol desinfiziert und die Augen der Ratte mit Corneregal-Augenschutzsalbe benetzt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Vor Beginn der OP wurde die Narkosetiefe anhand des Zwischenzehenreflexes überprüft.

### Analgesie

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration Stammlösung</b>	<b>Konzentration Narkose</b>
Midazolam	5 mg/ml	2 mg/kg Körpergewicht
Medetomidin	1 mg/ml	150 µg/kg Körpergewicht
Fentanyl	50 µg/ml	5 µg/kg Körpergewicht

### Antagonisierung

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration Stammlösung</b>	<b>Konzentration Antagonisierung</b>
Flumazenil	100 µg/ml	200 µg/kg Körpergewicht
Atipamezol	5 mg/ml	750 µg/kg Körpergewicht

Wirkstoffe und deren Dosierungen für die OP

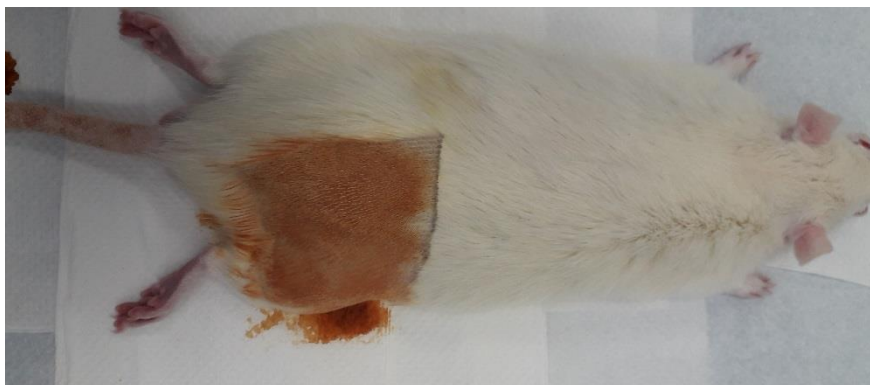


Abbildung 9: Zur OP vorbereitete Wistar Ratte

## OP-Methode

Nach sorgfältiger Vorbereitung begann die OP mit einer ca. 3 cm langen Inzision der Haut entlang des zuvor getasteten rechten Femurs. Danach wurde die Fascia lata am kranialen Rand des Musculus biceps femoris längs durchtrennt, um die Muskulatur freizulegen. Der M. biceps femoris wurde mit dem Raspatorium stumpf nach dorsal, der M. vastus lateralis nach ventral vom Femur gelöst. Die weitere Präparation des Femurs erfolgte ebenfalls stumpf, um eine weitere Schädigung der Muskulatur zu minimieren. Ein Wundspreizer, angelegt an die beiden oben genannten Muskelbäuche, erlaubte eine bessere Einsicht auf den freigelegten Femur.

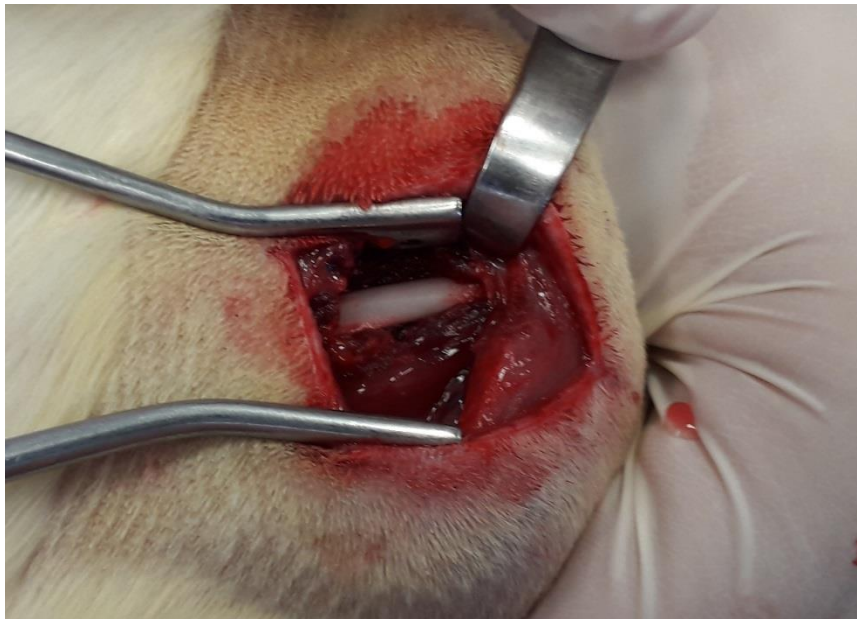


Abbildung 10: Frei präparierter Femurschaft



Für die nun durchzuführende Osteotomie kam das RatFix®-System (Firma RISystem, Schweiz) zum Einsatz. Der erste Schritt bestand in der Fixierung der PEEK-Platte in Parallelstellung am Femurschaft mithilfe von 5 bzw. 6 winkelstabilen Schrauben, wobei die inneren Löcher freigelassen wurden, um Raum für die Sägelehre zu lassen.

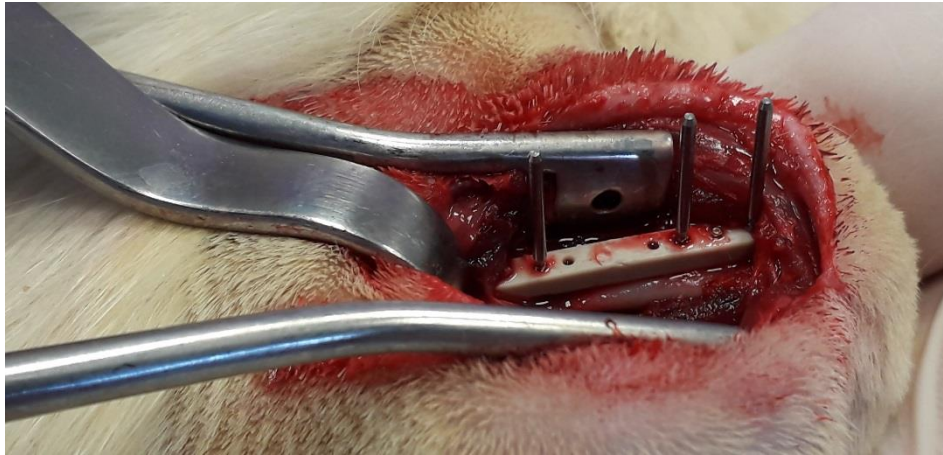


Abbildung 11: Durch Schrauben am Femur fixierte PEEK-Platte

Dieselbige wurde nach Arretierung der Schrauben auf deren Enden platziert. Dadurch normierten wir die Größe der Osteotomie auf 6mm. Anschließend fand der Sägedraht nacheinander in beiden Führungsschienen der Sägelehre Einsatz, um den Defekt zu setzen. Das Knochenfragment und die Sägelehre wurden entfernt und die Schrauben an ihren Sollbruchstellen abgebrochen. Nun wurde der PLA-Käfig press-fit in dem Defekt platziert.



Abbildung 12: Osteotomie mit press-fit eingesetztem PLA-Käfig

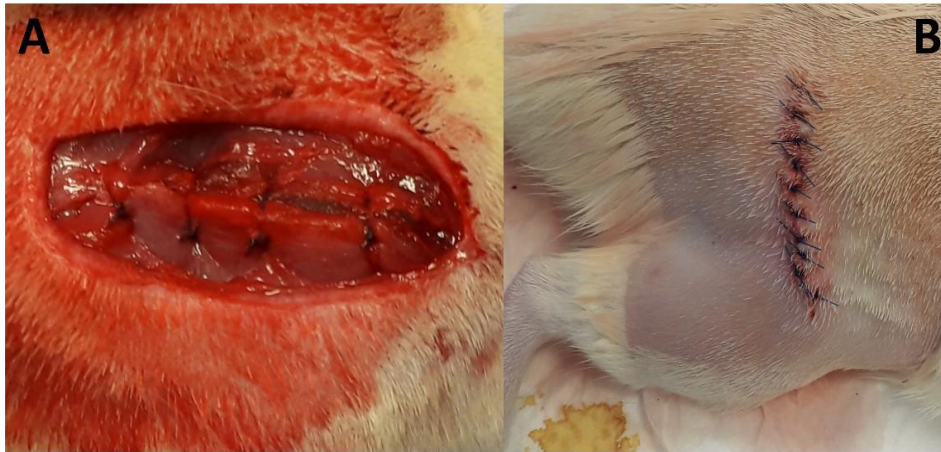


Abbildung 13: A Adaption der Muskulatur mit Vicryl-Faden B Adaption der Haut mit Ethilon-Faden

Die Muskulatur wurde mit einem resorbierbaren Vicryl-Faden und die Haut mit einem Ethilon-Faden vernäht. Abschließend desinfizierten wir die Wunde abermals mit Brau-nol und brachten einen Sprühverband an. Die Tiere wurden zwei bis drei Tage postoperativ in Einzelhaltung gelassen, um die Wahrscheinlichkeit einer Eröffnung der Wunde zu vermindern.

### Röntgenuntersuchung

Für die Röntgenuntersuchungen wurde das Kleintier-röntgengerät Faxitron MX20 eingesetzt. Die Ratten wurden direkt postoperativ untersucht, um die korrekte Position der Osteosynthese zu prüfen. Für eine bessere Lage des Femurs im Strahlengang wurde das rechte Knie der Ratten dabei mit einem Tupfer unterpolstert. Weitere Kontrollen erfolgten nach zwei, vier, sechs und acht Wochen nach OP mit erneuter Narkose. Hier wurde nach abgeschlossener Prüfung eine Antagonisierung eingesetzt.

### Femurentnahme

Die Ratten wurden vier bzw. acht Wochen nach der OP durch Einsatz einer Überdosierung von Isofluran und anschließender Enthauptung getötet und der Femur gänzlich entnommen. Bis zur  $\mu$ CT-Untersuchung lagerten wir die Knochen in Formaldehydlösung. Die Entnahme geschah über einen Hautschnitt ähnlich dem während der OP.

## Mikro - CT

Zusätzlich wurden die Femur-Defektzonen radiologisch im Mikro-CT ( $\mu$ CT 40 SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) untersucht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „MicroCT-Analysis Software“. Beim Einsatz des Mikro-CTs wurden Schnittbilder (Slices) generiert, die später in der quantitativen Auswertung in der Software ImageJ Verwendung fanden.



Abbildung 14:  $\mu$ CT 40 der Firma Scanco Medical AG

## Mikroskopie

Nach Anfertigung der Schnitte durch die Firma LLS Rowiak per Lasermikrotom wurden die histologischen Bilder unter dem Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH) untersucht. Es wurden Übersichtsaufnahmen bei unterschiedlichen Vergrößerungen durchgeführt (siehe Ergebnisse - Histologie).

## 3D-Bildgebung

Zur Erstellung der 3D Bilder des Knochenwachstums nutzten wir die Software Aycan Osirix. Es wurden pro Femur jeweils 2 Aufnahmen gemacht: Eine, die lediglich den calcifizierten, dichten Knochen zeigt und eine die zusätzlich dazu noch den neuen, noch nicht stark calcifizierten Knochen zeigt.

## Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung der mit dem Mikro-CT entwickelten Schnittbilder (Slices) erfolgte mit der Software ImageJ und dem dafür verfügbaren Plug-In BoneJ. Weiterhin kamen die Statistiksoftware SPSS der Firma IBM zum Einsatz, um die Ergebnisse graphisch darzustellen.

## **Ergebnisse und Diskussion**

---

### **In vitro**

Dieser Arbeit vorangestellt befasste sich, wie genauer unter dem Punkt „Vorversuche“ beschrieben, ein Projekt mit dem Einfluss der Beschichtung von PLA – Scheiben, mit u.a. BSP, auf die Expression osteoblasten-spezifischer Differenzierungsmarker in SaOS-2 (Osteosarkom)-Zellen. Die Ergebnisse zu diesem Part sind der Masterarbeit von Tanja Habeck zu entnehmen.

### **In vivo**

Wie unter „Methodik“ beschrieben umging der in-vivo Teil dieser Arbeit Untersuchungen des Knochenwachstums mithilfe von Röntgen, Mikro-Ct und Histologie zur qualitativen Auswertung. Deren Ergebnisse werden hier nun wiedergegeben.

### **Qualitative Auswertung**

#### **Röntgenuntersuchung**

Die unterschiedlich modifizierten Implantate wurden in einen Femurdefekt der Ratte implantiert, wobei das Knochenwachstum in und um die PLA – Käfige im 2 Wochen Intervall röntgenologisch kontrolliert wurde. Die Tiere erhielten direkt im Anschluss an die OP (0) und 2, 4, 6 und 8 Wochen danach eine Röntgenuntersuchung des betroffenen Femurs. Im Folgenden werden die Aufnahmen von jeweils 1 bis 2 Tieren pro Gruppe dem Femur einer nicht operierten Ratte mit 8 Wochen Standzeit gegenübergestellt. Es sei hier zu erwähnen, dass der Cage zwar weder in den Röntgen- noch in den Mikro-Ct-Aufnahmen zu sehen ist, dieser aber noch, zumindest in Teilen, vorhanden ist.

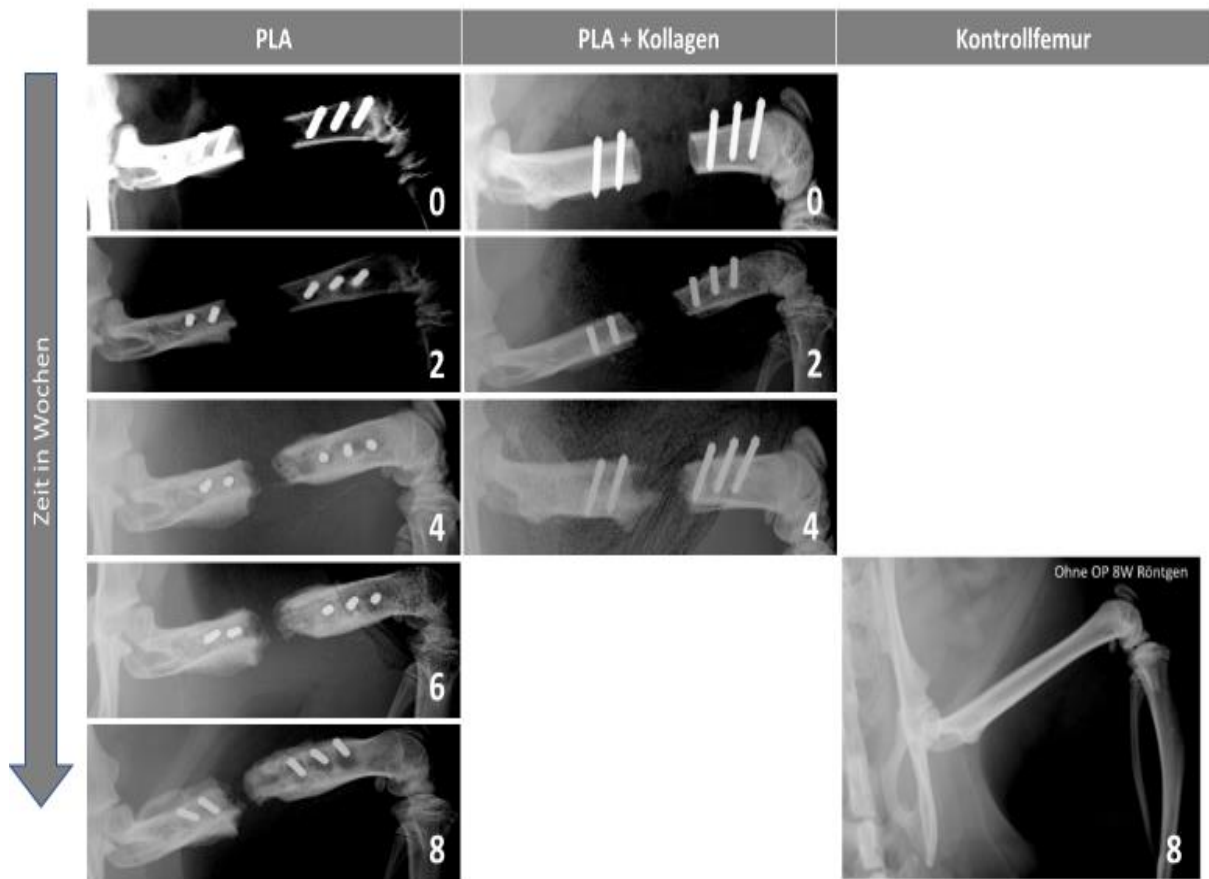


Abbildung 15: Röntgenaufnahmen von Rattenfemora der Gruppen PLA und PLA +Kollagen, sowie einer Ratte ohne OP. Die Zahlen in der rechten unteren Ecke geben die Zeitpunkte der Untersuchung nach OP in Wochen an.

In Abbildung 15 sind die Röntgenaufnahmen der Kontrolltiere (PLA und PLA + Kollagen), sowie das Bild eines nicht operierten Rattenfemurs als direkter Vergleich gezeigt. Aufgrund mangelhafter Stabilisierung der Osteotomie bei den 8 Wochen Tieren der PLA + Kollagen -Gruppe entstand eine Fehlstellung der Femora, die eine Bewertung bezüglich des Knochenwachstums äußerst schwierig, wenn nicht unmöglich machte. Trotz geringerer Vergleichbarkeit wird hier ein Femur aus der Gruppe der 4 Wochen PLA + Kollagen Tiere gezeigt.

In den ersten zwei Wochen ließ sich im Röntgenbild in beiden Gruppen kein bis minimales Knochenwachstum feststellen. Erst ab Woche 4 waren an den Rändern des Frakturspalts kleine Knochenvorschübe, in der PLA Gruppe vom distalem, in der PLA +Kollagen-Gruppe von proximalem Ende, auszumachen. In den darauffolgenden Wochen setzte sich das Wachstum bei den PLA Tieren fort, dennoch blieb ein nicht unerheblicher Frakturspalt, auch nach 8 Wochen Genesungszeit, erhalten.

Weiterhin fiel auf, dass das wenige Knochenwachstum sich auf den Bereich der eingebrachten Schrauben im Sinne einer Kallusbildung konzentrierte. Dies könnte möglicherweise auf ein Verrutschen der Platte bzw. der Schrauben zurückzuführen sein. Die Knochenenden erscheinen so, im Vergleich zum nicht operierten Knochen, verdickt.

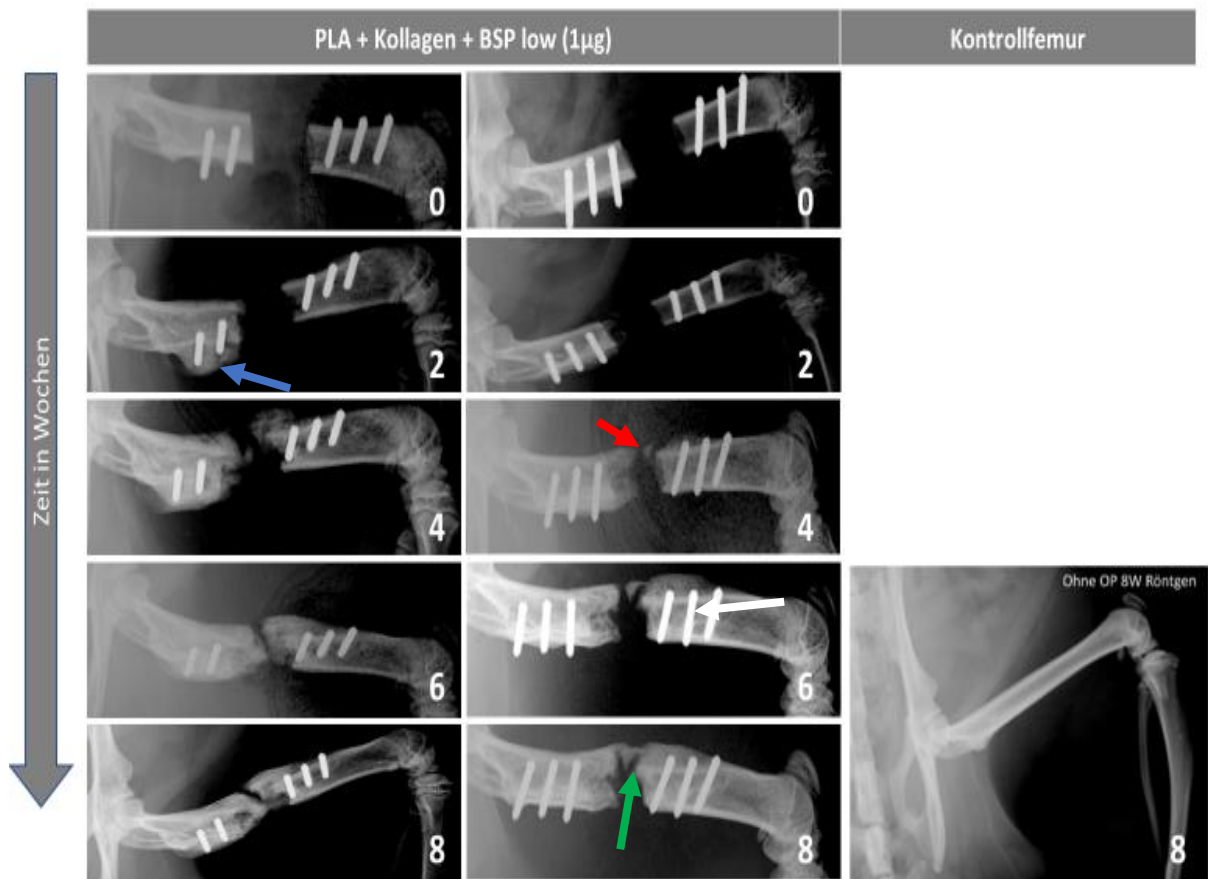


Abbildung 16: Röntgenaufnahmen von zwei Rattenfemora der Gruppe PLA +Kollagen + BSP low (1µg), sowie einer Ratte ohne OP.

Bei den Tieren aus der Gruppe PLA + Kollagen + BSP low (Abb. 16) zeigte sich ebenfalls erst nach 4 Wochen ein nennenswertes Knochenwachstum in den Frakturspalt, wobei jedoch das Tier auf der linken Seite bereits nach 2 Wochen beginnend eine deutliche Kallusbildung im Bereich der proximalen Schrauben aufwies (blauer Pfeil). Auch hier war vermutlich ein ungenaues Einbringen der Osteotomie-Platte der Grund. Der Knochen des Tiers in der mittleren Spalte besaß dieses Wachstum ebenfalls, allerdings fiel dieses erst ab der sechsten Woche, hier im Bereich der Schraubenköpfe des distalen Knochenendes, auf (weißer Pfeil). Ab der dritten Röntgenuntersuchung zeigte sich beim rechten Tier, zusätzlich zur Knochenbildung im Frakturspalt, das Auftreten eines Knochenstücks ohne Kontakt zu einem der Fraktarenden (roter Pfeil). Erst in der letzten Untersuchung nach 8 Wochen bildete dieses eine Verbindung zu den Knochenfragmenten aus (grüner Pfeil). Diese heterotope Knochenbildung lässt sich vermutlich auf einen im Frakturspalt primär schief eingebrachten oder verschobenen PLA -Cage zurückführen. Auch in dieser Gruppe stellte sich kein Verschluss des Knochendefekts ein.



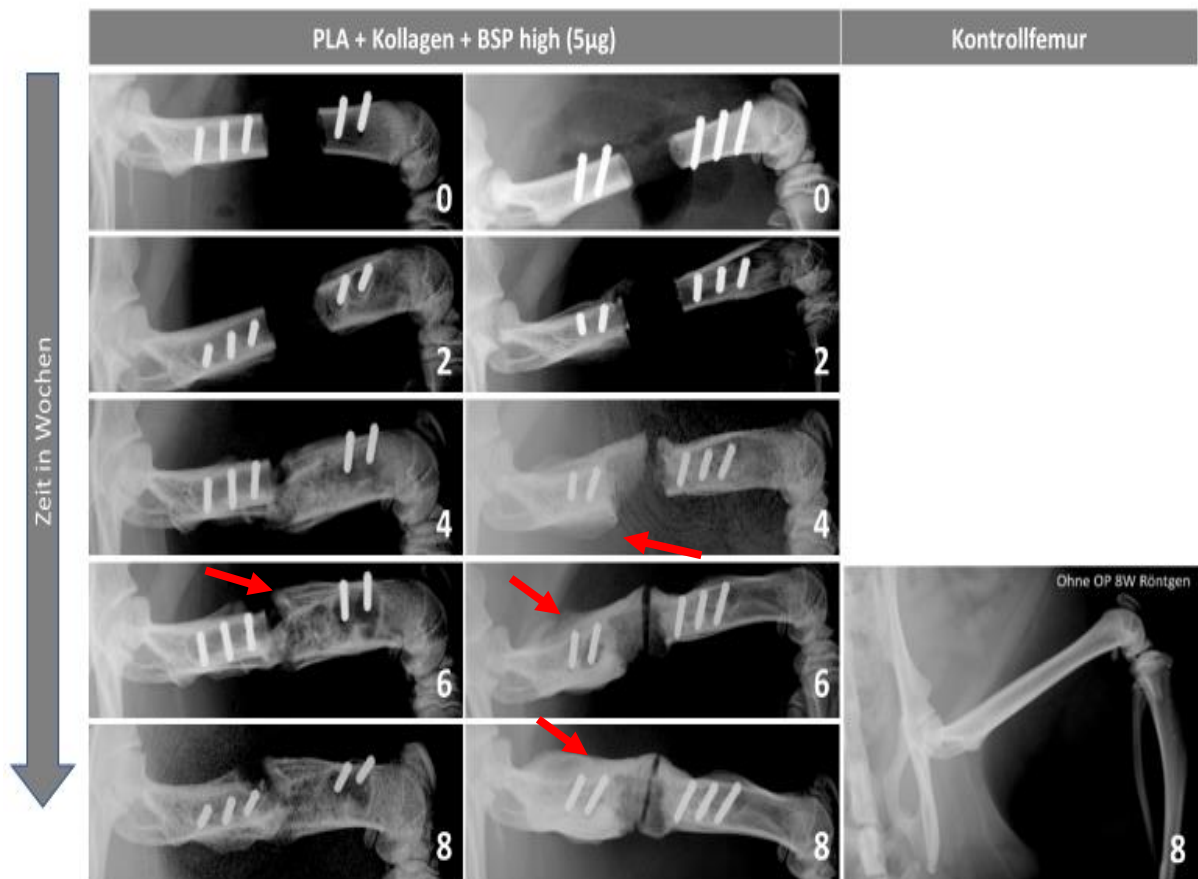


Abbildung 17: Röntgenaufnahmen von zwei Rattenfemora der Gruppe PLA +Kollagen + BSP high (5µg), sowie einer Ratte ohne OP.

Diese beiden Tiere der PLA + Kollagen + BSP high Gruppe (Abb. 17) präsentierten nach 4 Wochen einen Wachstumsschub an Knochengewebe, größtenteils in den Defektpalt hinein, während in den ersten 2 Wochen nach Operation kaum neues Gewebe entstanden war. Dabei ging die Ossifikation bei dem rechts abgebildeten Tier vornehmlich von dem proximalen, bei dem links abgebildeten dagegen vom distalen Fragment aus. Hervorstechend war auch die in den folgenden Wochen quer zur Längsachse ausgeprägte Kallusbildung des jeweiligen Fragments, teilweise weitab von der eigentlichen Defektstelle (rote Pfeile). Beide Exemplare zeigten eine deutliche Annäherung beider Knochenenden, ohne jedoch einen vollständigen Verschluss des Defekts zu erreichen.

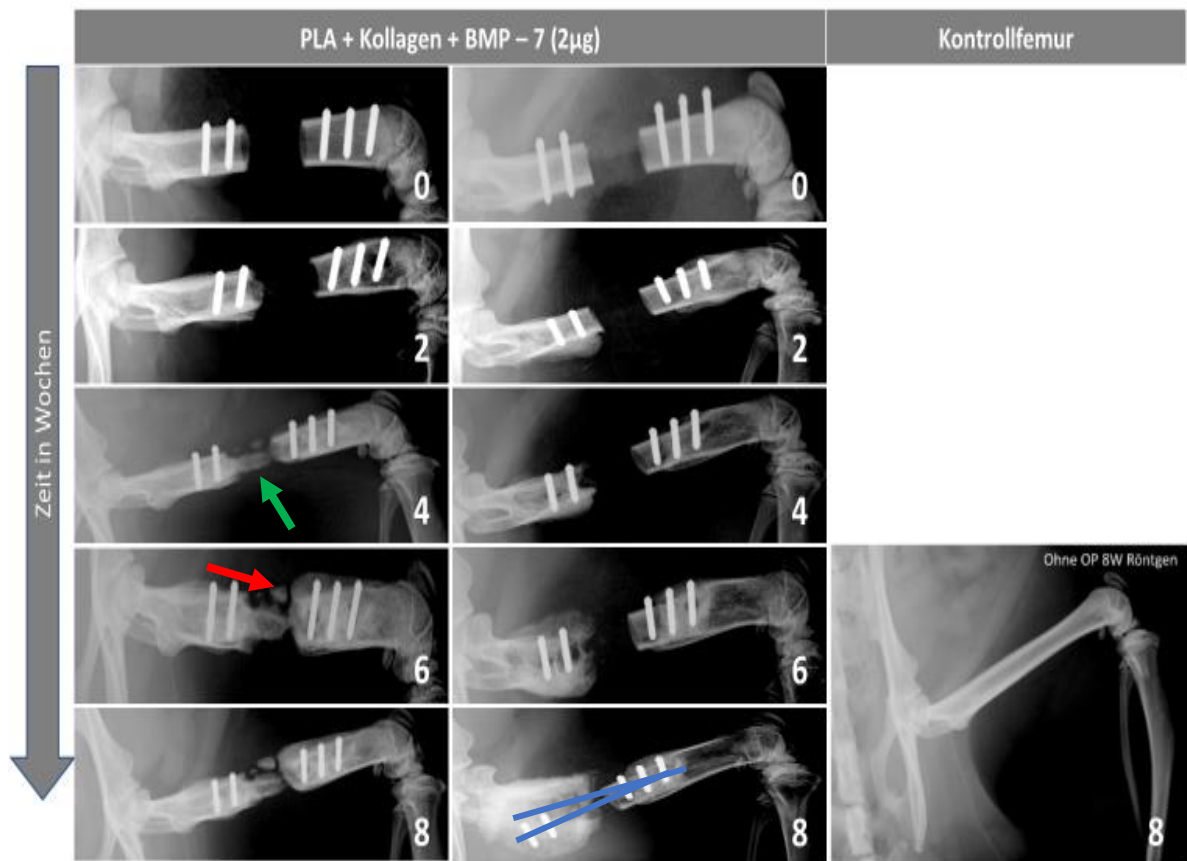


Abbildung 18: Röntgenaufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BMP – 7 (2µg), sowie einer Ratte ohne OP.

In der Abbildung 18 sind 2 Vertreter der Gruppe PLA + Kollagen +BMP-7 (2µg) zu sehen, wobei zwischen diesen beiden eine deutliche Diskrepanz im Knochenwachstum zu verzeichnen war: Während das links abgebildete Tier bis zur sechsten Woche eine zapfenartige Ausbildung von Knochen vermutlich in den Cage hinein zeigte (grüner Pfeil), so war zu diesem Zeitpunkt im rechten Tier nur Kallusbildung um das proximale Fragment auszumachen. Zudem schien es wahrscheinlich, dass sich hier im Verlaufe der Wochen die Osteosynthese gelockert hat, was an der schiefstehenden Achse der Schrauben zu erkennen ist (blaue Linien). Im linken Tier waren weiterhin ab der sechsten Woche ektote Ossifikationen zu finden (roter Pfeil).

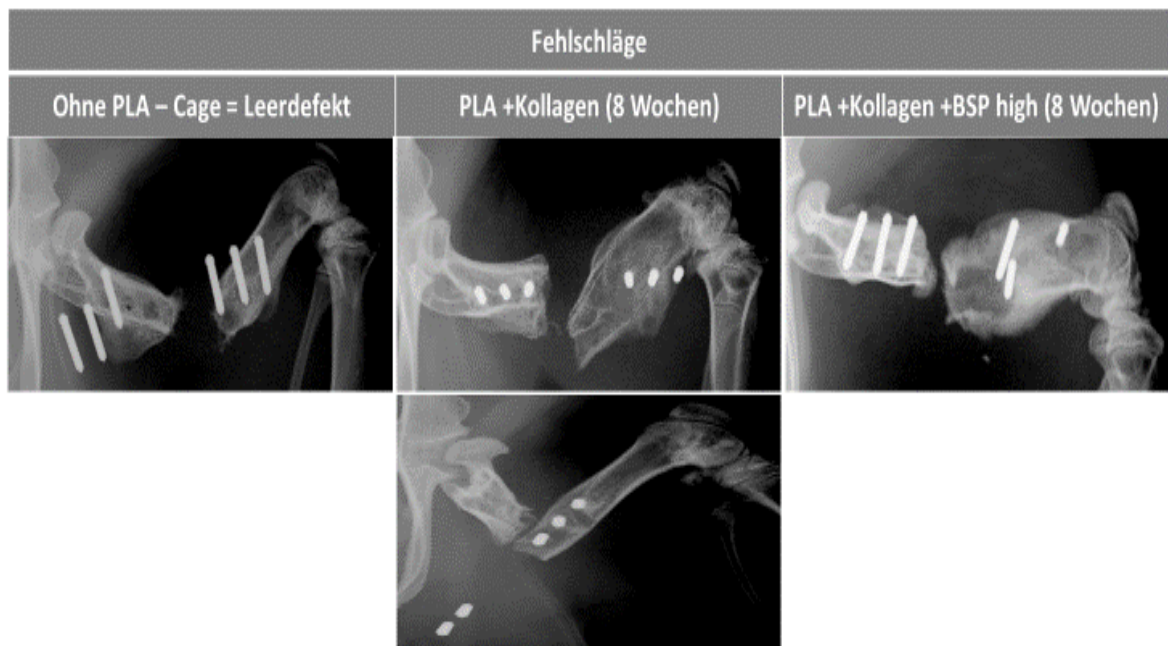


Abbildung 19: Beispiele für mangelhaftes Einbringen und Stabilisieren der Osteosynthese und dessen Folgen

Die Abbildung 19 zeigt vier der insgesamt fünf Fehlschläge der Operationen der 32 Ratten. Insbesondere zu Beginn der Versuchsreihe war die Fehlerwahrscheinlichkeit aufgrund fehlender Expertise noch recht hoch. Trotz der hier dramatisch erscheinenden Auswirkungen auf die Anatomie des Femurs, sei zu erwähnen, dass die betroffenen Tiere in den Wochen nach dem Eingriff nie die im Tierversuchantrag G18-1-051 festgelegten Abbruchkriterien erfüllten. Sie zeigten eine normale Beweglichkeit, insbesondere ein Stand auf den Hinterbeinen war ihnen möglich. Sie nahmen weiter an Gewicht zu und das allgemeine Verhalten, sowie der Zustand des Fells, waren unauffällig. Die größte Fehlerquelle bei dem Eingriff bestand in der Befestigung der Platte auf dem Femur. Bereits eine minimale Abhebung der Platte konnte bereits zu den obenstehenden Fehlstellungen führen. Eine weitere Problematik bestand in dem Einbringen des PLA-Cage. Trotz standardisierter Osteotomie-, und an diese angepasste Cage-Größe, musste aufgrund von leicht schrägen Schnittflächen (durch den Sägedraht bedingt, dessen genaue Lage während der OP trotz Sägelehre nur schwer zu bestimmen war) der Cage oft gekürzt werden. Einerseits war so der genaue Sitz des Cages innerhalb des Frakturspalts gefährdet, andererseits wurde auch die Konzentration der eingebrachten Substanzen in unbekannter Art verändert. Als Folge dessen war beispielweise die Lokalisation des Knochenwachstums nicht genau vorherzusagen.

## μCT - Untersuchung

Im Anschluss an die Tötung der Tiere wurden μCT – Aufnahmen der Femora im μCT – 40 der Firma Scanco Medical AG durchgeführt. Im Folgenden sind jeweils ein bis zwei Tiere der verschiedenen Gruppen mit entweder 4 oder 8 Wochen Standzeit dargestellt. Die unter den Bildern stehenden 3D – Darstellungen sind Anfertigungen aus dem Schnittbildsatz mithilfe des Programms Osirix. Hierbei zeigt das linke 3D – Bild jeweils das Wachstum von nahezu vollständigen, das rechte den neuen, noch wenig mineralisierten Knochenzuwachs. Ganz rechts ist wiederum die Abbildung eines Kontrollfemurs einer nicht operierten Ratte zu sehen. Der Einheit halber sind die Bilder der Knochen teilweise gedreht worden, sodass das neue Knochengewebe immer auf der derselben Seite der Abbildung liegt; bei der Beschreibung wird darauf hingewiesen ob sich dieser am proximalen oder distalen Knochenende befand.

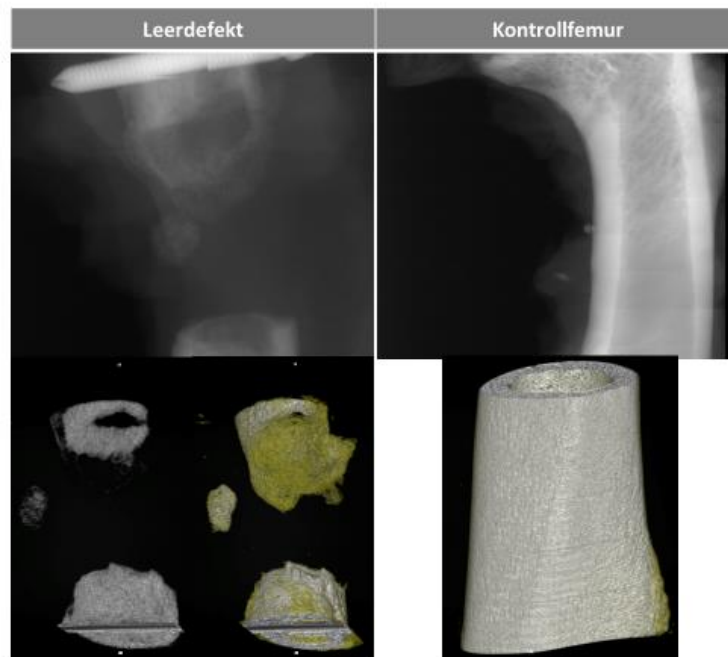


Abbildung 20: μCT- und 3D-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Leerdefekt und vier Wochen Standzeit

Bei dem Tier ohne Einbau des PLA – Cages zeigte sich generell wenig Knochenwachstum (Abb. 20) (Abb xy) Insbesondere mineralisierter Knochen ist nur äußerst geringfügig entstanden. Hier fällt links-mittig ein stark abseits gelegenes, heterotopes Knochenstück auf. Der Osteotomiespalt konnte hier nach vier Wochen nicht annähernd geschlossen werden.

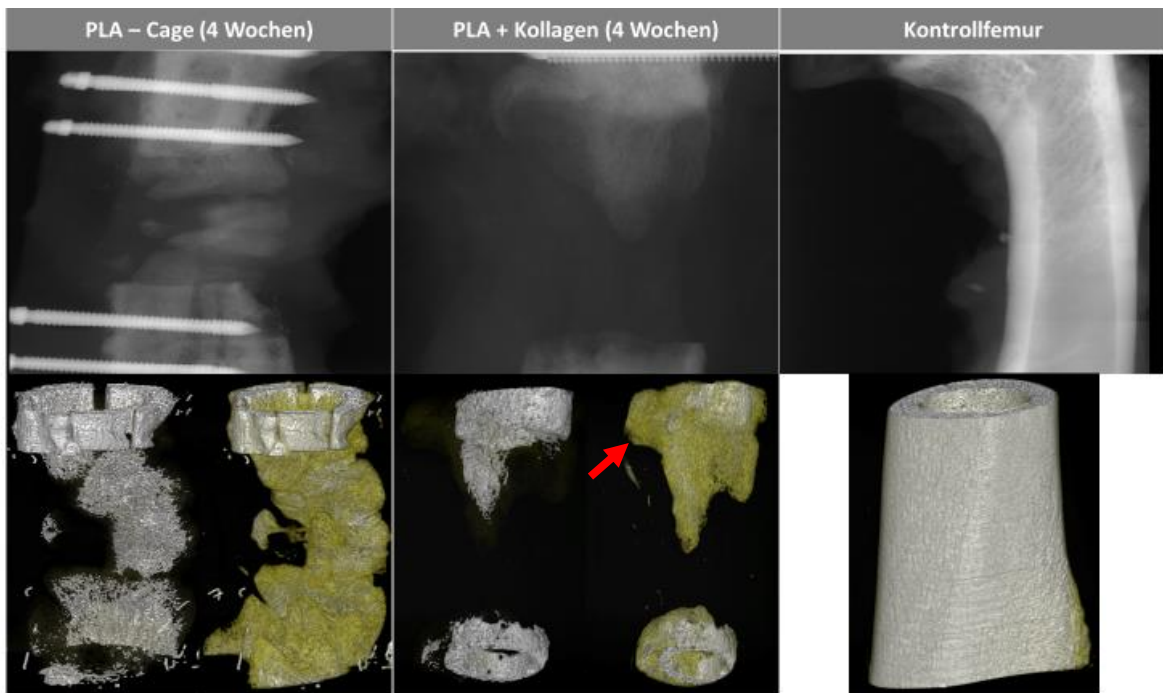


Abbildung 21:  $\mu$ CT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppen PLA -Cage und PLA + Kollagen mit vier Wochen Standzeit

Bei dem Tier mit Einsatz des PLA – Cage ohne Zusatz (Abb. 21, links) zeigte sich bereits ein deutlicheres Knochenwachstum, allerdings auch hier mit mehreren, ohne direkte Verbindung zu den Knochenenden entstandenen Ossifikationen. Das Wachstum war uneinheitlich; der im Bild hinten liegende Knochen verzeichnete stärkeren Zuwachs als der vordere. Betrachtete man die Aufnahme des weniger mineralisierten Knochens, so entsteht der Eindruck eines geringfügigen Verschlusses des Frakturspalts nach den vier Wochen Standzeit. Hier waren die heterotropen Ossifikationen deutlich zu sehen. Das Exemplar PLA + Kollagen zeigte ausgehend vom proximalen Knochenfragment eine zapfenartige Neubildung von Knochen, anders als beim linken Bild vermutlich in die Öffnung des Cages hinein, wobei hier ebenfalls der weniger feste Anteil dominiert. Dieser bildete sich proximal auch seitlich des ursprünglichen Knochens (roter Pfeil).

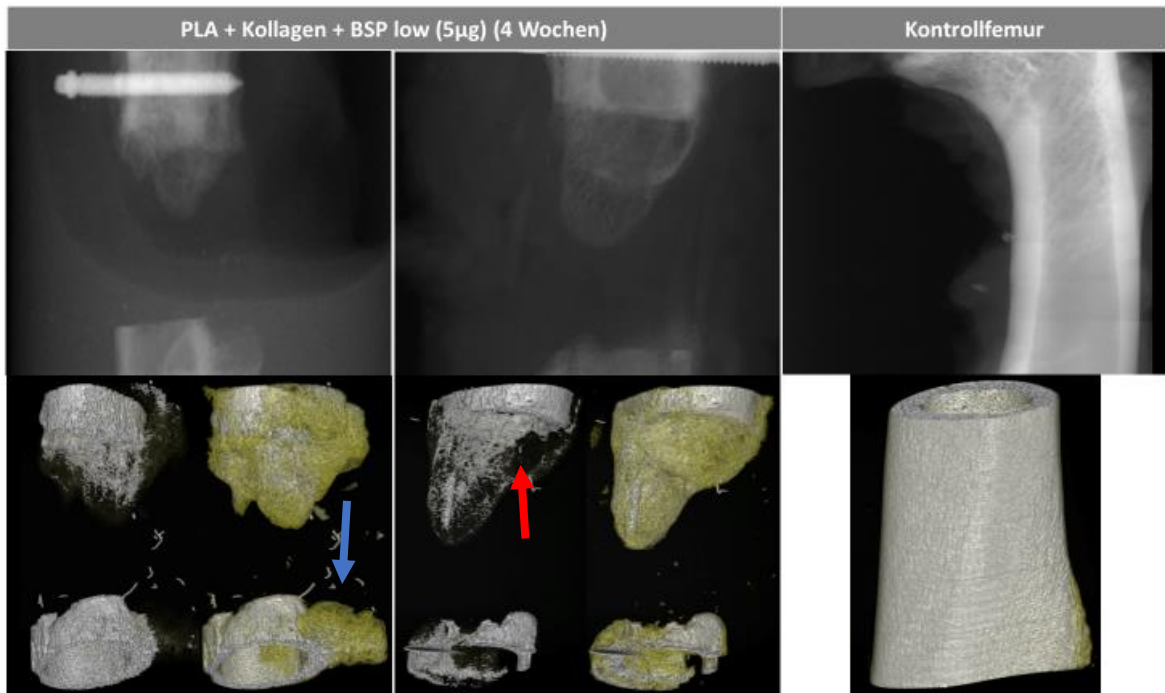


Abbildung 22:  $\mu$ CT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP low ( $1\mu\text{g}$ ) mit vier Wochen Standzeit

Das linke Exemplar aus dieser Gruppe (Abb. 22) wies distal einen nahezu ausschließlich horizontalen Knochenzuwachs auf (blauer Pfeil). Proximal fand sich wieder ein breitbasiger, zapfig-artiger Knochenanbau, der allerdings nicht derart stark ausgeprägt war, wie beim zweiten Vertreter dieser Gruppe (hier in der Mitte der Abbildung) Bei diesem war im distalen Bereich ebenfalls kaum neues Knochenwachstum festzustellen. Auffällig war hier das „Loch“ im mineralisierten Knochengewebe im proximalen Anteil (roter Pfeil). Der Frakturspalt konnte in dieser Gruppe nicht verschlossen werden.

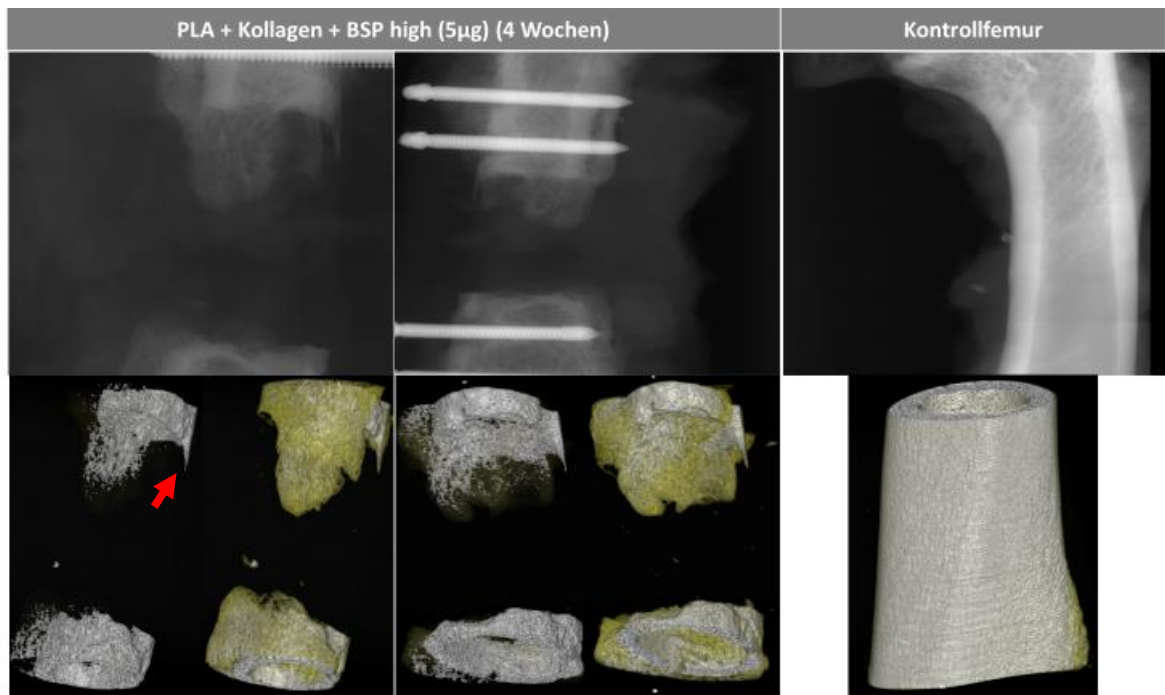


Abbildung 23: µCT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit vier Wochen Standzeit

Bei den Tieren aus der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (Abb. 23) war abermals im distalen Bereich nur wenig Knochenwachstum zu verzeichnen. Auch bildete sich beim linken Tier wieder eine Zapfenstruktur aus Knochengewebe. Zusätzlich prägte sich hier abseits vom Hauptzuwachs des Knochens eine schmale Knochenspange an der gegenüberliegenden Seite aus (Roter Pfeil), wobei ein Abschnitt des restlichen Knochens bei der Erstellung der 3D im Osirix Programm zu vermuten ist. Eine ähnliche Formation war auch beim rechten Tier zu sehen. Der Frakturspalt blieb unverschlossen.

In den folgenden Abbildungen 24 bis 26 sind die Aufnahmen der Rattenfemora mit acht Wochen Standzeit zu sehen. Eine Ausnahme ist dabei der Femur der Gruppe BMP 7 mit 4 Wochen Standzeit. Dieser findet sich zur besseren Vergleichbarkeit in dieser Sektion neben dem Tier mit 8 Wochen.

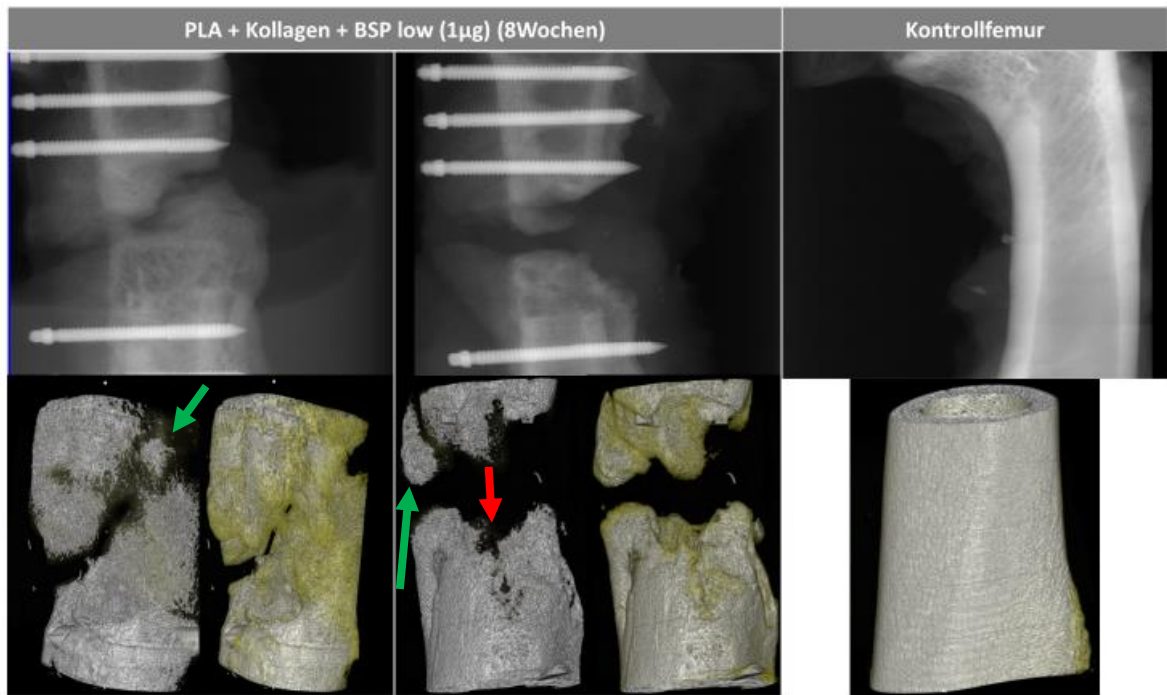


Abbildung 24:  $\mu$ CT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP low ( $1\mu\text{g}$ ) mit acht Wochen Standzeit

Die Tiere der BSP low Gruppe mit acht Wochen Standzeit (Abb. 24) zeigten ebenfalls keinen Verschluss des Osteotomiespalts, jedoch ein deutlich ausgeprägteres Knochenwachstum. Der Femur links in der Abbildung weist einen keilförmigen Knochenwuchs beider Knochenfragmente auf, die in der Aufnahme des schwächer mineralisierten Knochens fast Seit-zu-Seit verschmelzen. Die Ratte im mittleren Teil der Abbildung wies hauptsächlich Zuwachs an Knochen vom distalen Ende ausgehend auf, wobei hier eine deutliche Spaltbildung im endmineralisierten Knochen auffällt (roter Pfeil). Der Knochen in diesem Spalt wies dabei im Vergleich zu den seitlichen Keilen eine poröse Struktur auf. Beide Exemplare zeigten ebenfalls die Entwicklung heterotoper Knochenstücke auf (grüne Pfeile), welche jedoch durch weniger kalzifiziertes Gewebe mit den Hauptfragmenten verbunden sind.



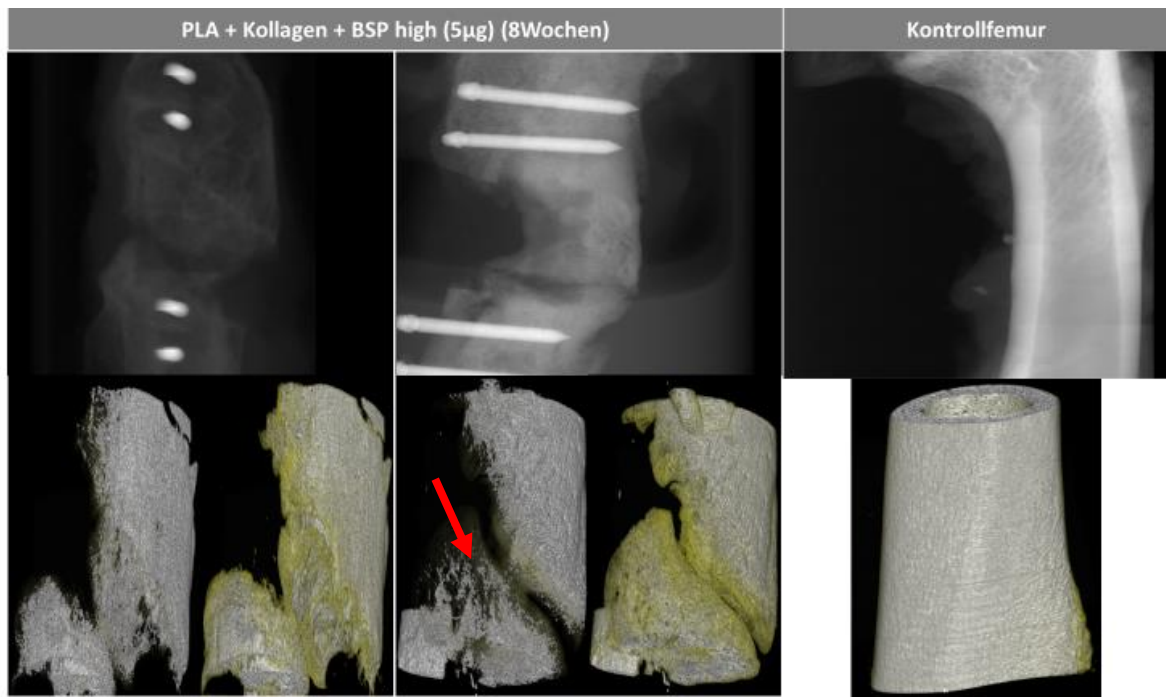


Abbildung 25:  $\mu$ CT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5 $\mu$ g) mit acht Wochen Standzeit. Aufgrund falscher Platzierung der Knochenprobe im Mikro-CT wurde das Bild oben links um 90 Grad gedreht aufgenommen, mit Blick auf die Schraube

Die Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (Abb. 25) zeigte, ähnlich wie die BSP low Gruppe, ein deutliches Knochenwachstum. Bei den beiden gezeigten Repräsentanten ging dieses hauptsächlich vom proximalen Knochenfragment aus; das distale Knochengewebe erschien hier weniger mineralisiert (roter Pfeil). Ebenfalls ähnlich dem Exemplar aus der Gruppe BSP low (Abbildung 24, links unten) nahmen die Ossifikationen hier keilförmige Strukturen an, die sich seitlich anzunähern schienen.

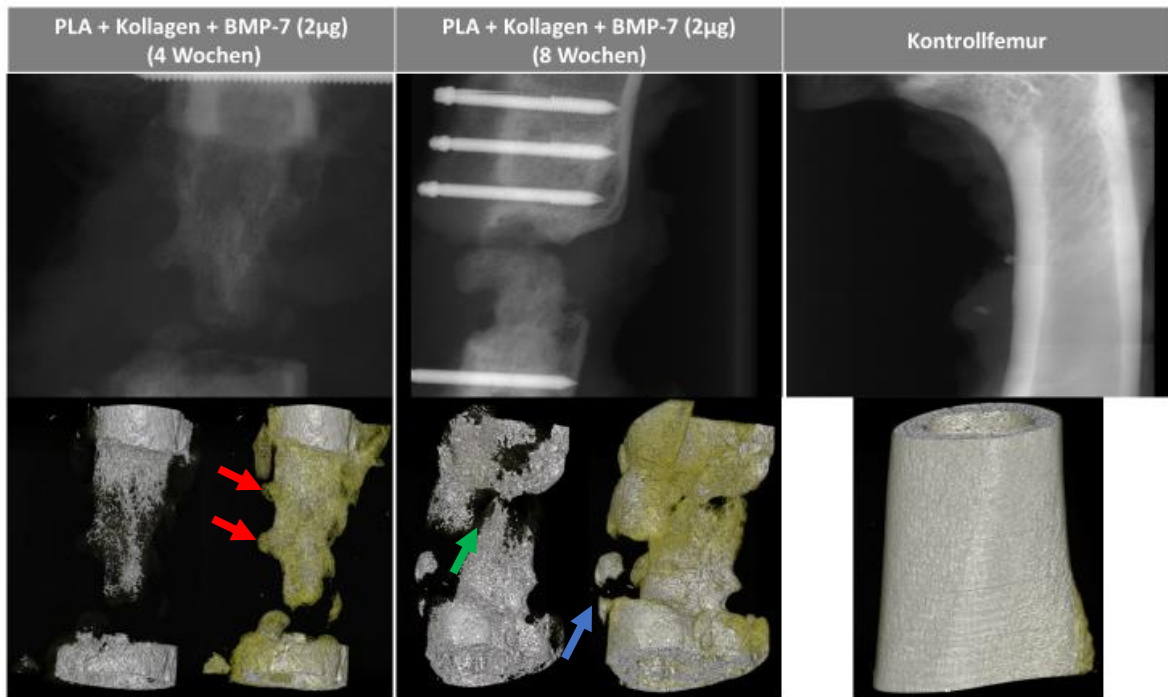


Abbildung 26:  $\mu$ CT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BMP -7 (2 $\mu$ g) mit vier und acht Wochen Standzeit

Die Ratte mit BMP-7 Implantat und 4 Wochen Standzeit (Abb. 26) wies ein nahezu ausschließlich vom proximalen Ende ausgehendes Knochenwachstum auf, welches vermutlich direkt in den Cage hineinführte. Besonders auffällig waren hier die seitlichen Auszieher des wenig mineralisierten Gewebes, die womöglich ihren Weg in die Fenster des Cages gefunden haben (rote Pfeile). Das Exemplar mit 8 Wochen Standzeit zeigte ein vergleichbar ausgeprägtes Wachstum, hier von beiden Knochenenden ausgehend. Allerdings schienen nur der distale Anteil ihren Weg in das Innere des Cage gefunden zu haben; der Proximale ging eher vom Randbereich aus, sodass beide sich zu verfehlen schienen (grüner Pfeil). Ein heterotopes Knochenstück war zu sehen (blauer Pfeil). Weder nach vier noch nach 8 Wochen war hier ein Verschluss des Defekts zu beobachten.

## **Histologie**

Die histologische Untersuchung der Knochen geschah nach deren Aufbereitung durch die Firma LLS Rowiak, wobei jeweils eine Hämatoxylin-Eosin- (HE) und eine Masson-Goldner-Färbung (MG) angefertigt wurden. Es wurden Aufnahmen mit verschiedenen Vergrößerungen durchgeführt, eine bei 14,2x und eine bei 25x Vergrößerung als Übersicht. Weiterhin wurden Aufnahmen mit stärkerer Vergrößerung angefertigt, um eine zur Detailansicht zu ermöglichen (2,5x und 5x, elektronisches Mikroskop). Die MG Färbung eignet sich insbesondere zur Darstellung von Knochen- und Knorpelstrukturen, wobei sich mineralisierter Knochen grün/türkis darstellt; Osteoid bzw. anderes Bindegewebe erscheint gelb/gelb-orange. Die Anteile des PLA-Käfigs wurden bei der Herstellung der Schnitte herausgelöst und erscheinen hier als (weiße) Löcher. Die hier gezeigten Collagen der Schnitte zeigen eine Aufreihung mit von links nach rechts steigender Vergrößerung. In der oberen Reihe sind die HE -, in der unteren die MG – Bilder zu sehen.

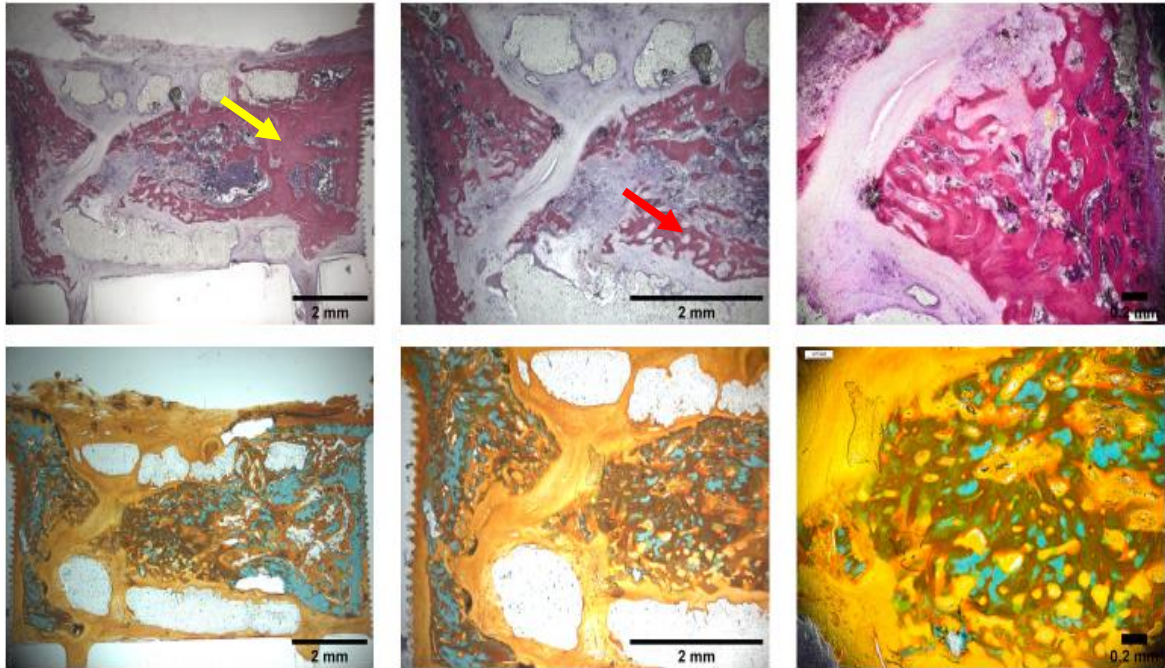


Abbildung 27: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BMP -7 (2 $\mu$ g) mit acht Wochen Standzeit

Wie in der Röntgenaufnahme bereits vermutet, fand das Knochenwachstum bei diesem Tier (Abb. 27) in den PLA-Cage hinein statt. Sehr gut war hier in der MG-Färbung die säulenartige Formation des Knochengewebes in Richtung distales Knochenfragment mit Übergang vom stärker zu schwächer mineralisierten Anteilen zu sehen. Der restliche Spalt zwischen beiden Frakturfragmenten war mit ca. 0,7 mm vergleichsweise klein und mit Kollagen gefüllt. Der Cage war im Verlauf der 8 Wochen stellenweise degeneriert, war insgesamt jedoch noch gut erhalten. Die Übersichtsaufnahmen zeigten die zum Defektinneren abnehmende Knochenqualität (gelber Pfeil, gute Qualität), erkennbar an dem zunehmend löchrigen Aufbau (roter Pfeil, schlechtere Qualität)).

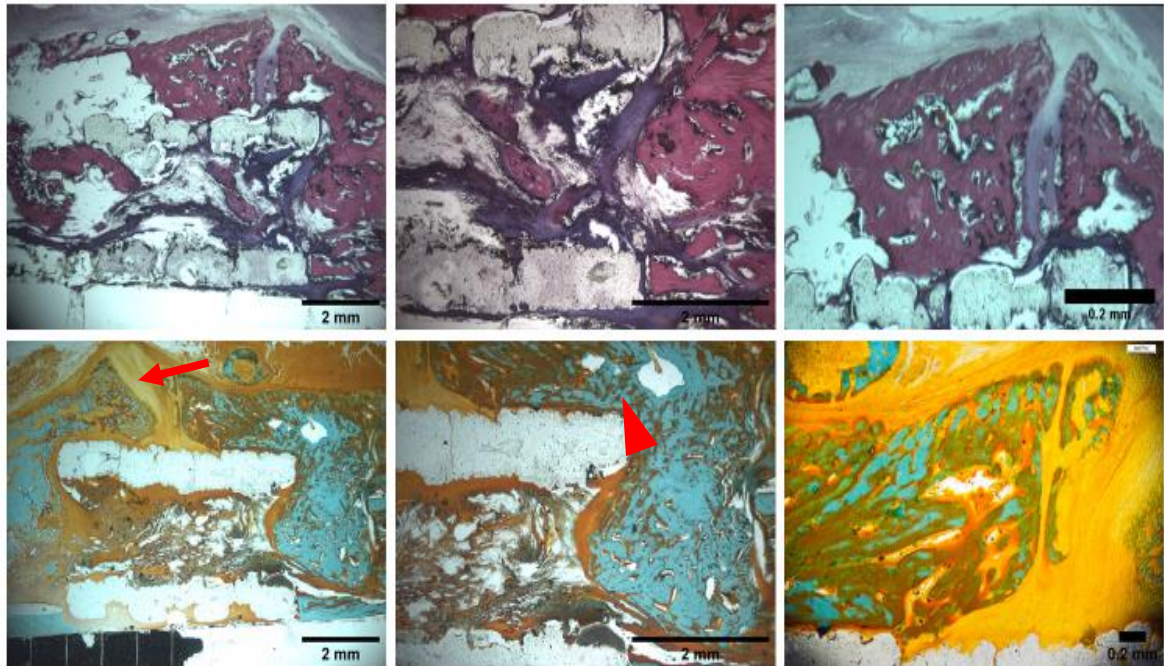


Abbildung 28: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5 $\mu$ g) mit acht Wochen Standzeit. Aufgrund von Datenverlust des 2,5x Bildes ist hier die 5x Vergrößerung (Bild oben rechts) zu sehen.

Bei diesem Exemplar (Abb. 28) fand das Hauptwachstum an neuem Knochengewebe an dem Cage vorbei statt, da dieser hier durch eine Verschiebung nicht mehr zentral im Defekt stand. Dennoch blieb auch hier nur ein relativ kleiner Restspalt offen (roter Pfeil). Das Innere des Cage war von Kollagen dominiert; mineralisierter Knochen war dort nur spärlich ausgeprägt. Auch hier zeigte sich wieder eine löchrige Natur des neu ausgebildeten Knochens mit versprengten Anteilen. (rote Pfeilspitze)

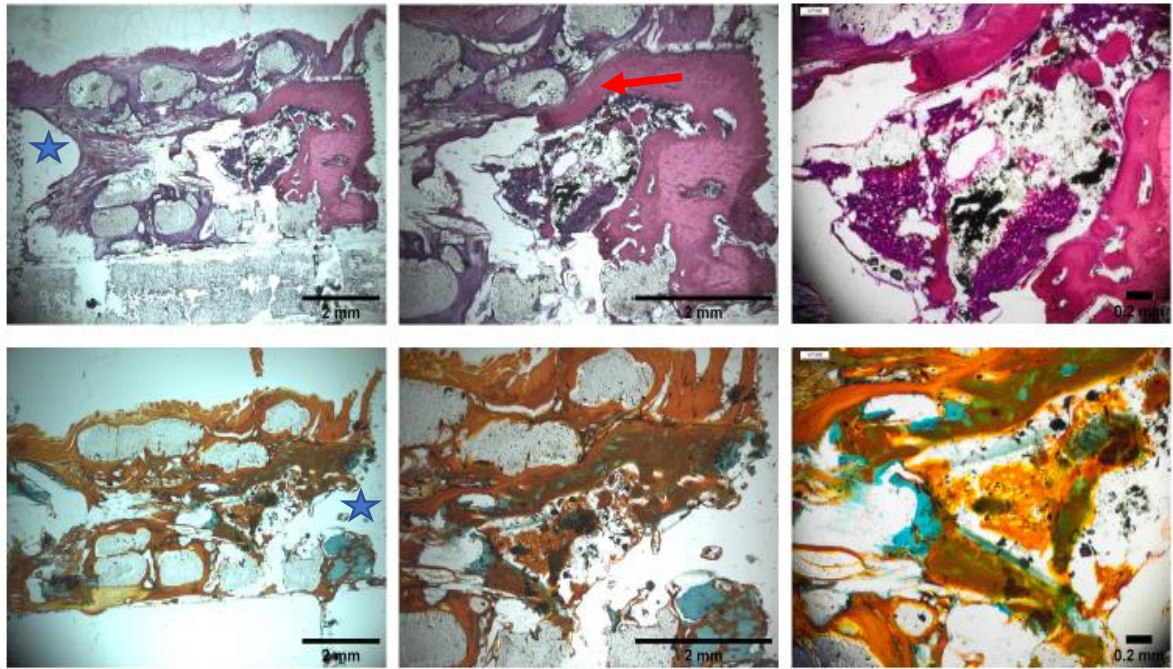


Abbildung 29: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5 $\mu$ g) mit acht Wochen Standzeit

Bei der Anfertigung der Schnitte (Abb. 29) für dieses Exemplar sind leider teilweise das proximale bzw. distale Frakturfragment herausgelöst worden (Sterne) und hier als große weiße Fläche zu sehen. In der HE Färbung waren qualitativ hochwertige (dichte) Knochenansätze (roter Pfeil) auszumachen, die sich jedoch nicht weit in den Cage fortsetzen konnten. Das Innere desselbigen gestaltete sich als ein diffuses Gemisch aus Kollagen und einzelnen kleineren Anteilen mineralisierten Knochens. Eine Tendenz zur Defektausheilung war nicht sichtbar.

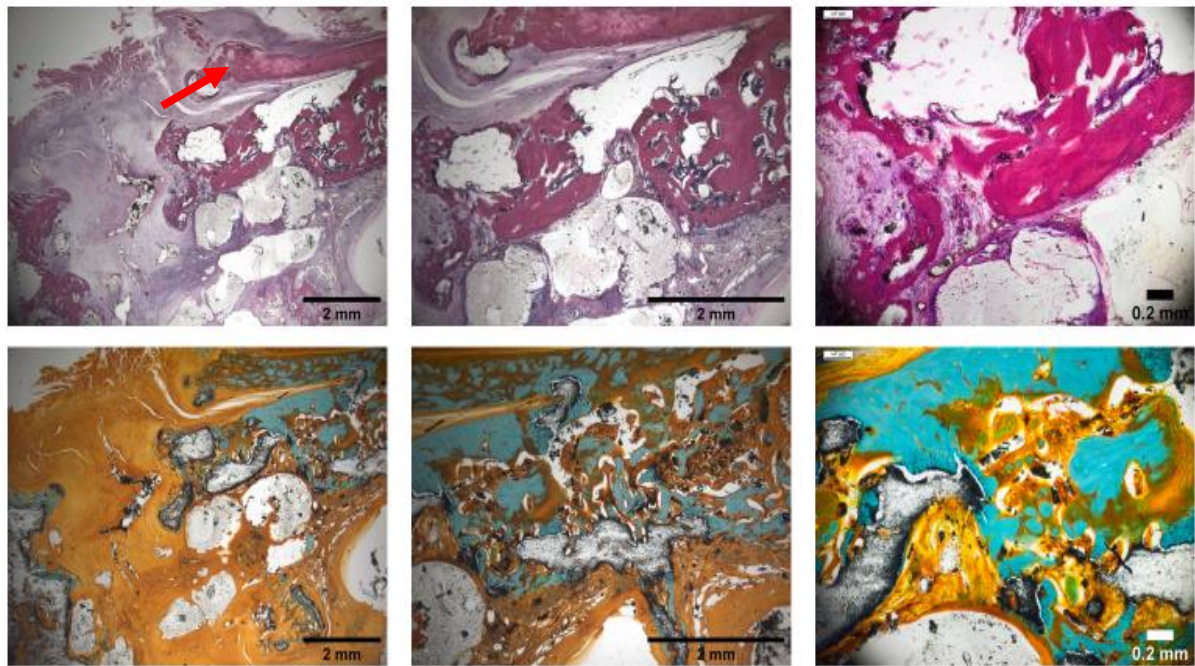


Abbildung 30: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5 $\mu$ g) mit acht Wochen Standzeit

Der Femur dieser Ratte aus der Gruppe BSP high (Abb. 30) zeigte ein diffuses Wachstumsmuster: Einerseits war im oberen Bereich der Aufnahme Zuwachs von Knochen abseits der Hauptmasse zu sehen (roter Pfeil), andererseits entstand auch ein Anteil zentral im Defekt. Zudem waren vielfach kleinere versprengte Stücke von Knochenmaterial zu vermerken. Aufgrund der deutlichen Degeneration des Cage war nicht klar zu sagen, ob dieser als Leitstruktur oder sogar als Hindernis, beispielsweise durch Verrutschen, für das Knochenwachstum fungierte.

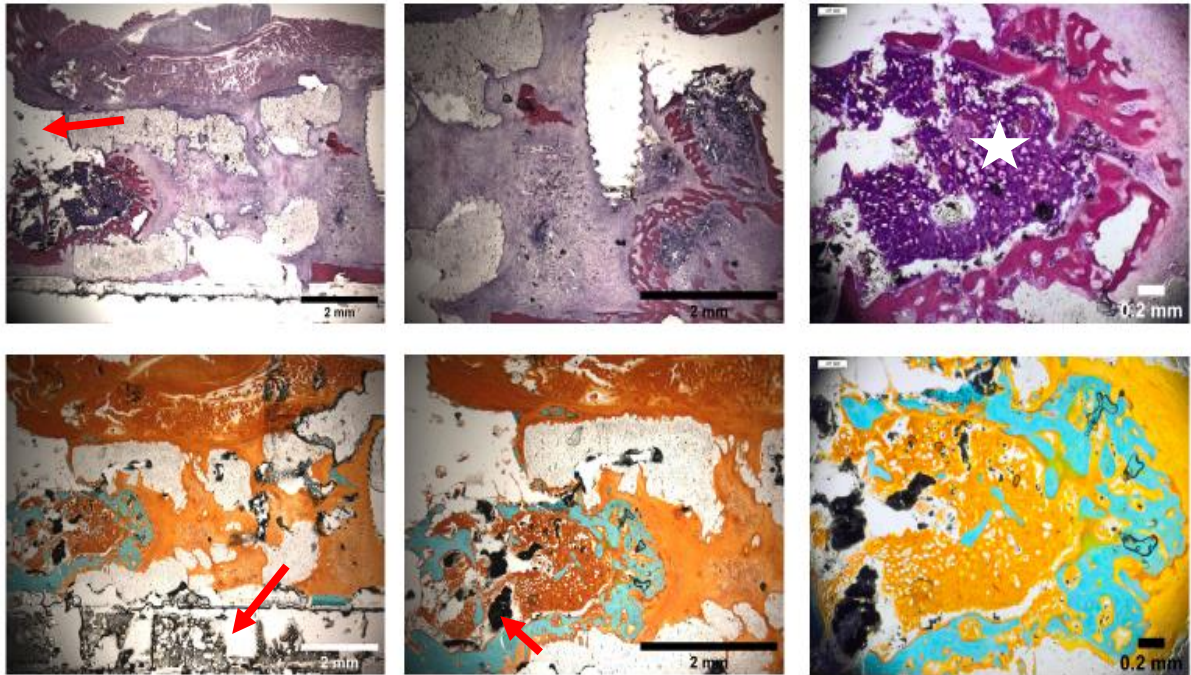


Abbildung 31: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP low (1µg) mit vier Wochen Standzeit

Der Schnitt durch diesen Femur (Abb. 31) war äußerst artefaktreich. (rote Pfeile) Es ließ sich ein vom proximalen Knochenfragment ausgehender Knochenvorschub in den Cage hinein ausmachen. Die Struktur dieses Einwachsens war in dieser Ebene von löchriger Gestalt. In ihrer Mitte befand sich eine Ansammlung von Osteoid/Knorpel (weißer Stern). Das distale Ende zeigte hier kein bis minimal neues Knochengewebe; somit war hier keine Tendenz zur Ausheilung des Defekts auszumachen.



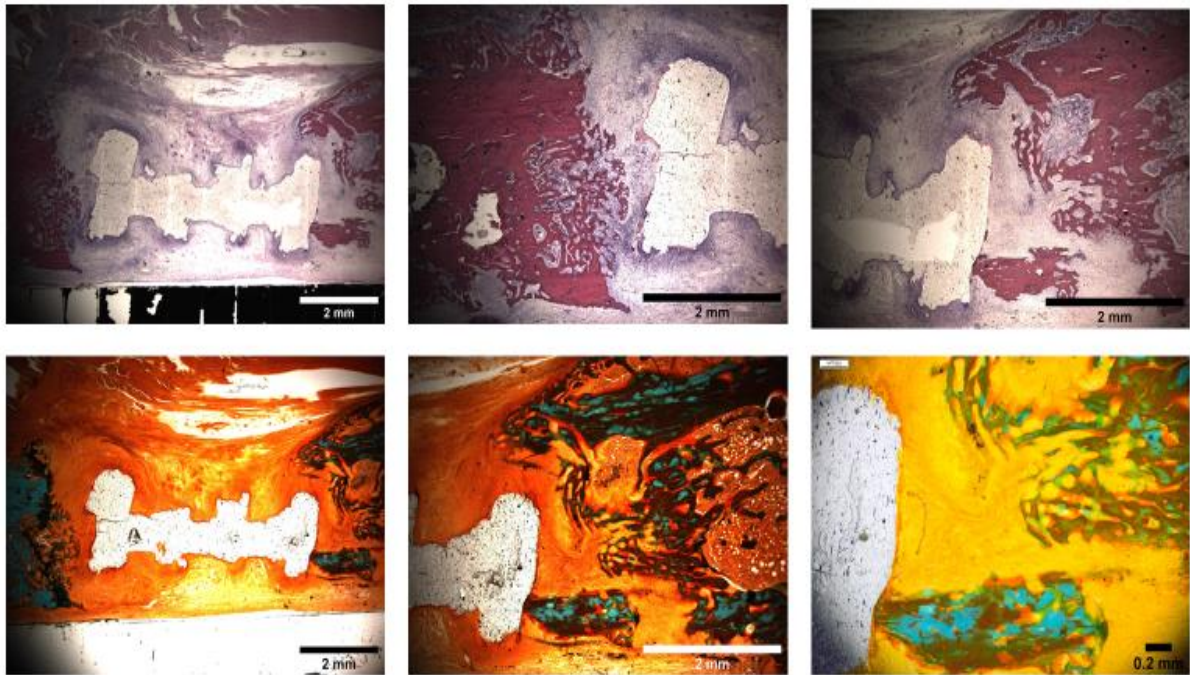


Abbildung 32: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen mit vier Wochen Standzeit

Es war auf dem Schnitt der Abbildung 32 insgesamt sehr wenig Knochenwachstum auszumachen, die Ränder der Knochenfragmente zeigten zarte Ausläufer von löchriger Natur. Nach Betrachtung des zugehörigen Röntgenbilds muss davon ausgegangen werden, dass der Defekt hier nicht zentral geschnitten wurde, da dort mehr Knochengewebe auszumachen war, als bei dieser Schnittebene in der Histologie der Fall war. Zusätzlich ist hier das „Loch“, das der PLA-Käfig hinterließ, ununterbrochen zu sehen.

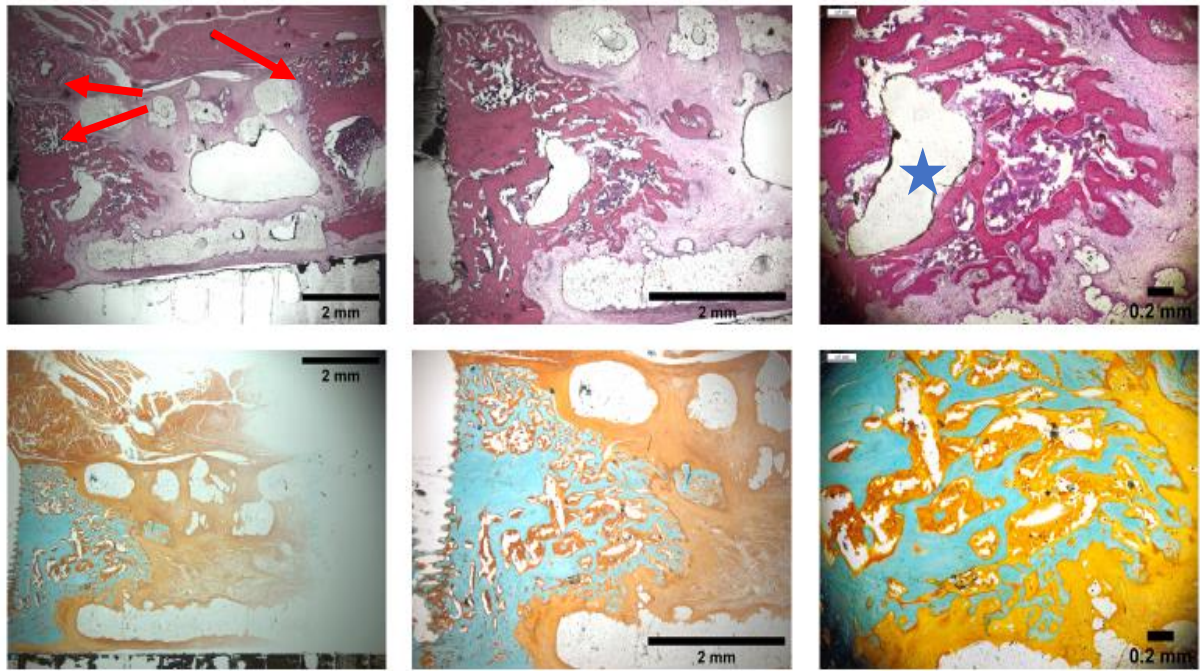


Abbildung 33: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit vier Wochen Standzeit

Dieses Tier der Gruppe mit höherer BSP Konzentration (Abb. 33) wies eine geringe Menge an neuem Knochenmaterial im Defektspace auf. Hier zeigte sich eine stumpfe, zapfenartige Struktur im proximalen Knochenfragment, jedoch wiederum Artefakte, die ein Loch erscheinen ließen (blauer Stern). In der HE Färbung fiel an beiden Knochenenden größere Ansammlungen von Kollagen in horizontaler Ausrichtung auf, was einen dazu passendes Knochenwachstum annehmen ließ (rote Pfeile), bzw. die Kallusbildung an den Schrauben verdeutlichte. In der Übersichtsaufnahme der MG-Färbung fehlte der distale Knochenanteil. Die HE Aufnahme ließ jedoch vermuten, dass in dieser Schnittebene, bis auf den erwähnten Kallus, kein wesentliches Wachstum stattfand.

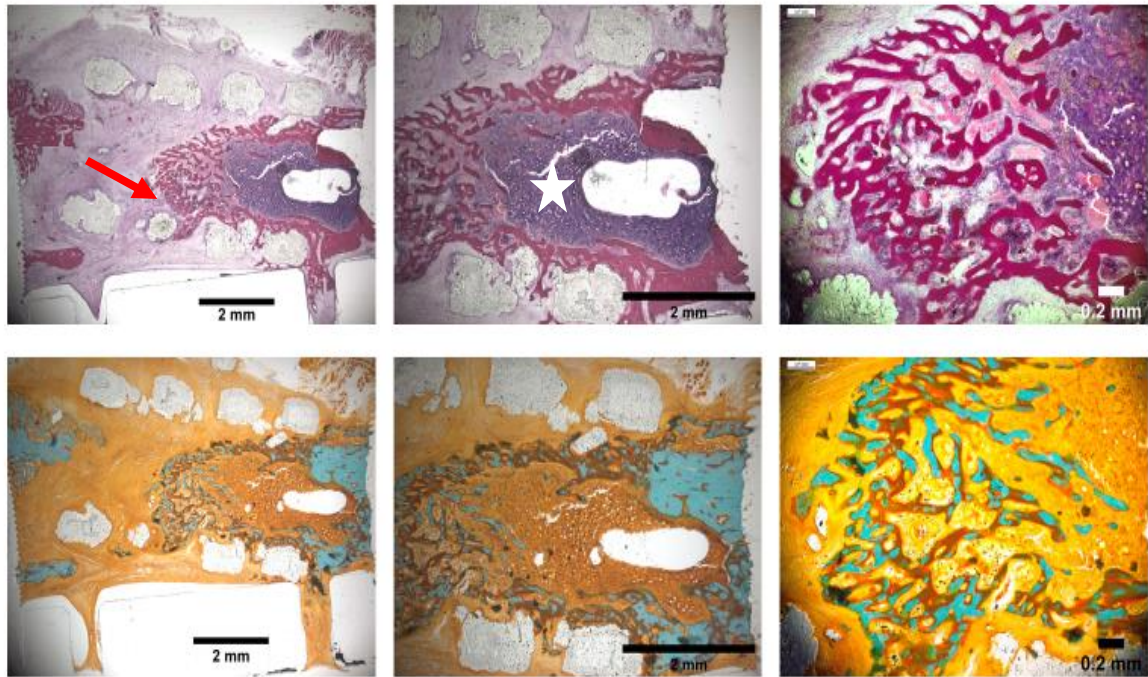


Abbildung 34: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BMP-7 (2 $\mu$ g) mit vier Wochen Standzeit

Dieses Exemplar (Abb. 34) zeigte bereits nach vier Wochen einen deutlichen Knochenvorschub in das Innere des Cages hinein, etwas über die Hälfte des Innenraumes wurde erreicht. Hier schien das weitere Wachstum seitlich „abzuknicken“, womöglich durch die Degradation des Cages in diesem Bereich bedingt (roter Pfeil). In diesem Knochenzapfen fiel eine große löchrige Struktur umgeben von Knorpel/Osteoid auf (weißer Stern). Das knöcherne Gewebe bildmässig erschien schwammartig mit wenig kompakten Anteilen. Diese waren hier eher auf der proximalen Seite des Knochens zu finden, welche dafür ein deutlich geringeres Wachstum zeigte.

### Quantitative Auswertung

Die quantitative Beurteilung des Knochenwachstums erfolgte mit dem Programm ImageJ. Es wurde ein zylinderförmiger Raum als Totalvolumen (Totalvolume, TV) definiert, das Knochenvolumen in diesem Zylinder (Bonevolume, BV) nach der jeweiligen Standzeit im Vergleich zum Kontrollknochen analysiert und dabei analog zu den Mikro-CT Aufnahmen zwischen dichten und undichten Knochen unterschieden. Zusätzlich wurde eine Aufteilung der Gruppen in „spezifisches“ und „unspezifisches“ Wachstum vorgenommen. „Spezifisch“ bedeutete Analyse des Wachstums in und nahe um den Cage (der oben genannte Zylinder), „unspezifisch“ bedeutete Analyse des gesamten Knochenwachstums in den generierten Schnittbildaufnahmen. Dies war notwendig, um eine Differenzierung zwischen dem Knochenwachstum insgesamt und dem Wachstum in der Nähe des Defektspalts zu ermöglichen, da es in einigen Fällen zu heterotopen Ossifikationen kam (siehe Abb. 35)

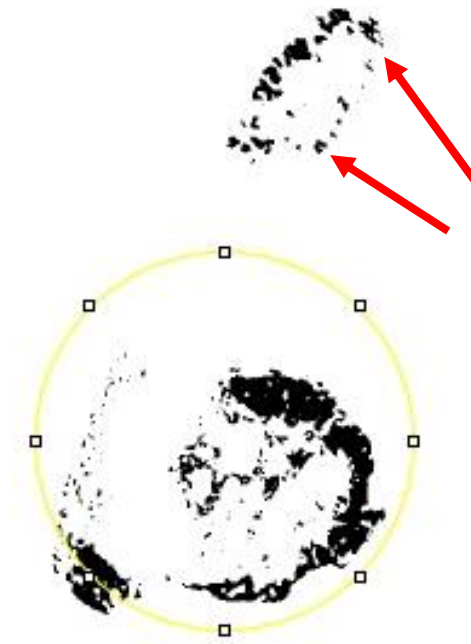
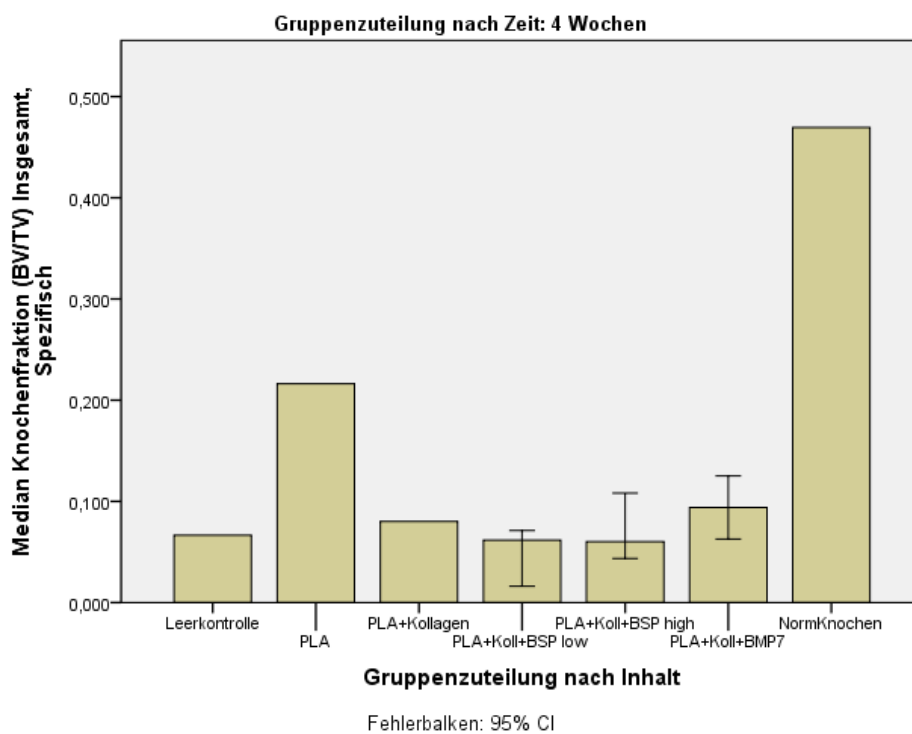


Abbildung 35: Beispiel für Selektion von Knochengewebe. Der gelbe Kreis gibt den Selektionszylinder um den Defektspalt an (Spezifische Analyse). Rote Pfeile zeigen auf heterotope Ossifikation (nur in der unspezifischen Analyse erfasst).

Aus den Messungen des BV und TV errechneten wir die Knochenfraktion BV/TV, um Aussagen über das Knochenvolumen bezogen auf das Totalvolumen machen zu können. Die in ImageJ generierten Datensätze wurden anschließend in SPSS integriert, um eine graphische Darstellung in Form von Balkendiagrammen zu erzeugen. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl der Gruppen PLA und PLA + Kollagen war für diese keine Angabe des Konfidenzintervalls möglich.



**Abbildung 36: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 4 Wochen Standzeit (Spezifische Analyse)**

Aus der Abbildung 36 ging hervor, dass sich bei den Tieren mit 4 Wochen Standzeit die PLA Gruppe mit der größten Knochenfraktion (BV/TV) in der spezifischen Auswertung auszeichnete, während die anderen Gruppen alle auf einem ähnlich niedrigen Niveau mit dem Leerwert blieben. Dieses Bild zeigte sich auch in der Untersuchung des unspezifischen Knochenwachstums, mit Ausnahme von BMP-7, wodurch sich bereits hier die heterotopen Ossifikationen deutlich machten.

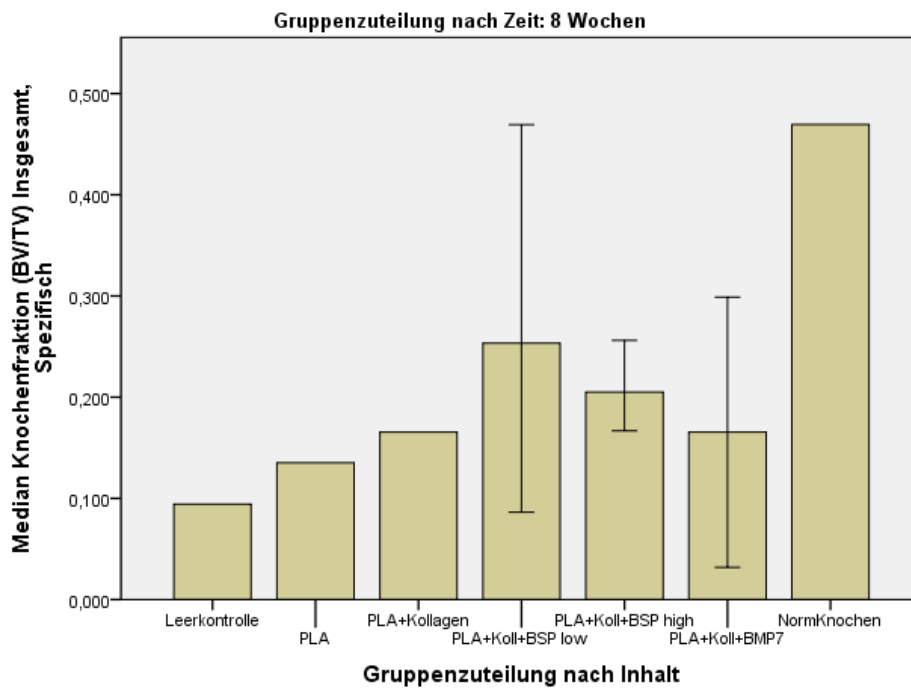


Abbildung 37: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 8 Wochen Standzeit (Spezifische Analyse)

Die Entwicklung nach 8 Wochen (Abbildung 37) zeigte: Während im spezifischen Zylinder um den Defekt die Gruppen „BSP low“ und „BSP high“ nun die höchste BV/TV besaßen, kristallisierte sich bei der unspezifischen ein treppenförmiger Anstieg der Knochenfraktion von der Leerkontrolle bis zur BMP-7 Gruppe heraus.

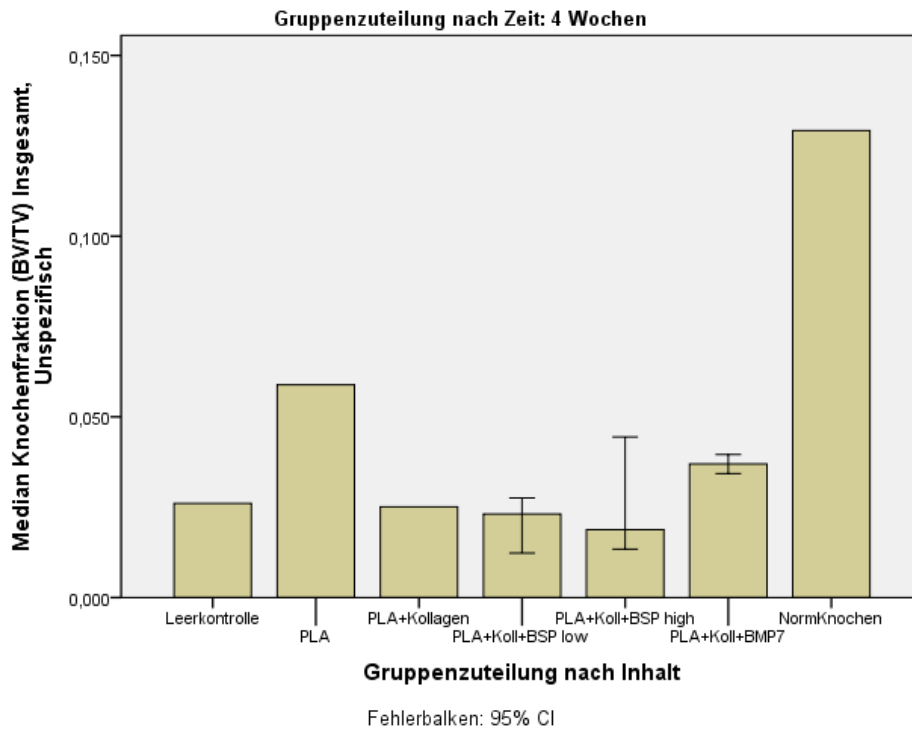


Abbildung 38: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 4 Wochen Standzeit (Unspezifische Analyse)

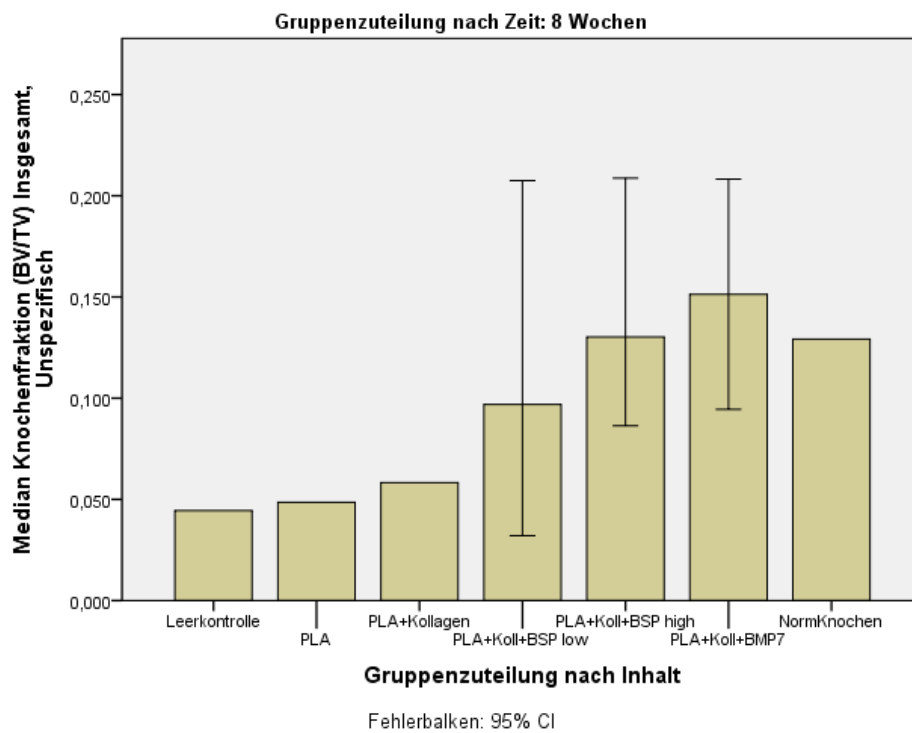


Abbildung 39: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 8 Wochen Standzeit (Unspezifische Analyse)

Nach 8 Wochen (Abb. 39) wiesen die Gruppen „BMP-7“ und „BSP high“ ein ähnliches Maß an Knochengewebe auf wie der Kontrollknochen. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass es sich hier größtenteils um undichte, kaum mineralisierte Ossifikationen handelte (siehe Abbildungen 40 und 41) und, wie im Vergleich mit Abbildung 35 zu sehen, diese sich nicht im gewünschten Raum des Defektpalts bildete.

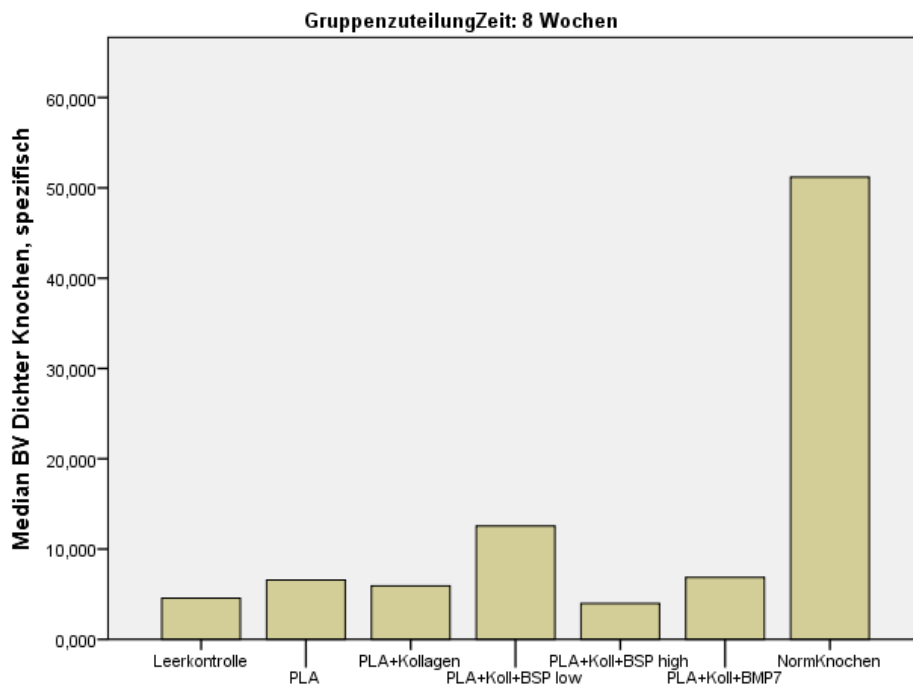


Abbildung 40

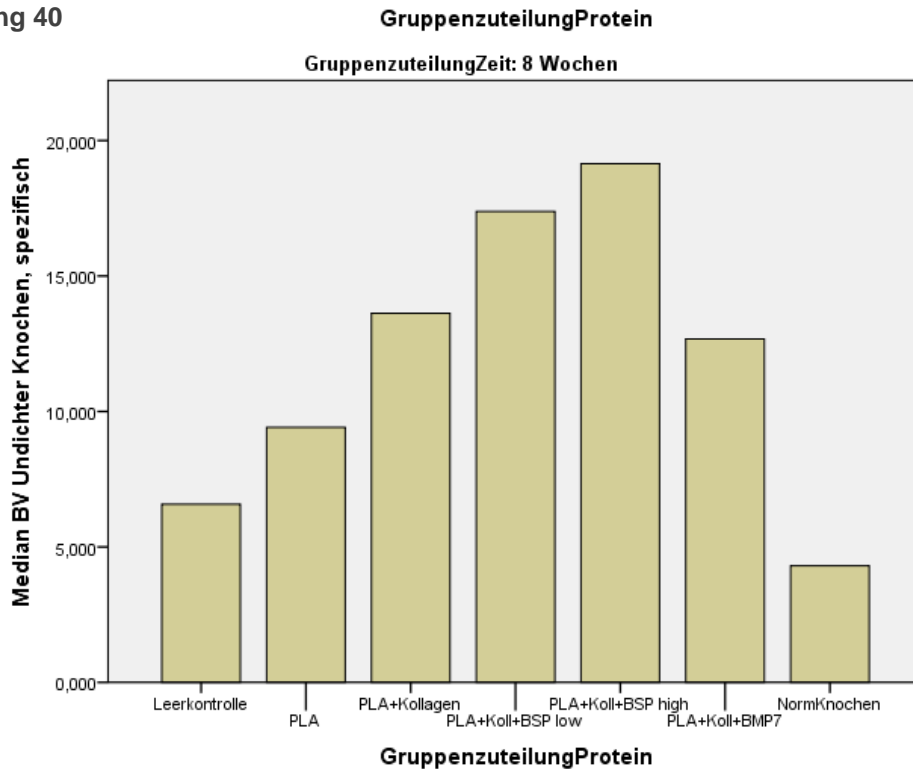


Abbildung 41 (und 40): Balkendiagramme des dichten und undichten Knochen volumens in der spezifischen Analyse. Im Vergleich wird deutlich, dass es sich beim neu gebildeten Knochen größtenteils um wenig dichtes Material handelte.



## Diskussion

Diese Arbeit befasste sich mit dem Einfluss eines mit Bone Sialoprotein besetzten 3D gedruckten PLA - Käfigs auf das Knochenwachstum in einem Defekt kritischer Größe in der Ratte. Dazu nutzen wir als Modell eine operativ gesetzte Fraktur des Femurs, ähnlich der anderer Forschungsgruppen, wie etwa Leiblein et al. (79) und Nau et al. (80). Das Femurdefektmodell ist weltweit mit 33% eines der häufigsten genutzten und ist damit ein akzeptiertes Standardmodell, um Untersuchungen zur Knochendefekt-reparatur durchzuführen (81). Zwar entspricht die Ratte dabei nicht den Dimensionen des menschlichen Skeletts, doch erlaubt sie aufgrund der kleinen Körpergröße eine kostengünstige Haltung und eine leichter zugängliche Operabilität. Diese verbesserte Wirtschaftlichkeit ermöglicht eine größere Anzahl an Versuchstieren und steigert damit die Aussagekraft einer mit Ratten durchgeführten Versuchsreihe (82). Wir nutzten für unseren Versuch die Wistar Ratte, da sie im Vergleich der Femora eine dem Menschen ähnelnere Knochenstruktur aufweist als z.B. Dawley Ratten (83, 84).

Im Rahmen von CSD-Modellen haben sich insbesondere Plattenosteosynthesen und Fixateure externe zur Stabilisation des Knochens bewährt, da hier die Überbrückung der Gesamtheit des Defekts untersucht wird und somit eine intramedulläre Stabilisierung nicht angewandt werden kann (82). Beide eignen sich um eine Osteotomie derartiger Größe zu fixieren (82), auch wenn es weiterhin Gegenstand heutiger Forschung ist welche der beiden Optionen für Knochenreparaturuntersuchungen zu bevorzugen ist (55). Als Implantat und Proteinträger nutzten wir einen aus Polylactid 3D-gedruckten Käfig. Polylactid, wie bereits unter 3D Druck (siehe Seite 14) beschrieben, zeichnet sich durch eine gute Biodegradierbarkeit und Biokompatibilität aus und zeigte in mehreren Untersuchungen gute Ergebnisse als Grundmaterial für den Bau von scaffolds im Bereich des bone tissue engineering (85, 86).

Als Trägersubstanz für BSP als Osteogenese-fördernde Substanz kam zusätzlich bei fast allen Gruppen unserer Versuchstiere eine Füllung mit Kollagengel zum Einsatz, da dieses sich als drug delivery system (DDS) bewährt hat (87–89). Kollagen ist zusätzlich ein wichtiger Interaktionspartner für einige andere Substanzen in der EZM und wichtig für dessen Modulation und Strukturierung. Auch hat es positive Auswirkungen auf Zelladhäsion, -migration und –proliferation (90). Des Weiteren ist eine Kombination

aus Kollagen und BSP günstig, insofern beide zusammen mit Osteocalcin und Osteopontin, ebenfalls beides Proteine die am Knochenaufbau bzw. –erhalt beteiligt sind, wichtige Bestandteile der Knochen-Implantat-Schnittstelle sind (91). Monfoulet et al. schlossen aus ihrer Arbeit den Hinweis, dass die Abwesenheit von BSP die Heilung von kortikalen Knochenschäden behinderte (92). Im Review von Boulefour et al. wird weiterhin ein negativer Effekt dieser Abwesenheit auf Mineralisierung, Vaskularisation und Knochenzellendifferenzierung beschrieben. Zusätzlich zeigten BSP Knock-out Mäuse eine Überproduktion von Osteopontin (54) und einen negativen Effekt auf das Längenwachstum von Femur und Tibia (93). In anderen Untersuchungen konnte für BSP beim Einsatz in einem Calvaria-Defektmodell eine Kalzifikation, jedoch kein Nachweis einer besseren Osteogenese gezeigt werden (94, 95). Mit unserer Arbeit ließ sich eine Tendenz zu vermehrtem Knochenwachstum durch BSP nach 8 Wochen im Vergleich zur Leerkontrolle zeigen.

BMP-7 lieferte in unserer Untersuchung die besten Ergebnisse, auch wenn wir weder nach 4 noch nach 8 Wochen eine vollständige Ausheilung des Defektes beobachten konnten. Dies war z.B. bei Hertweck J. bei Einsatz eines mit Kollagengel und BMP besetzten Implantats in ein Calvaria-Defekt-Modell nach 6 Wochen der Fall (96). Eine heterotope Ossifikation, wie sie bei anderen Untersuchungen auffiel (66, 67), konnten wir auch bei unserer Versuchsreihe ausmachen. Da BMP-7 bereits klinisch eingesetzt wird, war das gute Ergebnis von BMP-7 im Vergleich zu erwarten gewesen und wir nutzten es daher als Positivkontrolle. Dabei ist zu erwähnen, dass z.B. Lauer et. al. in ihrer Arbeit feststellten, dass zwar bei den BMP Versuchstieren tendenziell mehr Knochenzuwachs stattfand, dieser neue Knochen jedoch eine löchrige Struktur aufwies. Um Aussagen über die biomechanische Signifikanz dieser Art des Knochens zu formulieren, könnten Stabilitätsversuche hilfreich sein. (78)

In der Vergangenheit gab es eine Zahl an in-vivo Arbeiten, die ein ähnliches Versuchsmodell besaßen wie das unsere. Oft wurde ein anderer Grundstoff für das scaffold, ein anderes Defektmodell, ein anderes Versuchstier oder eine Kombination daraus verwendet (97–99). Dabei ist insbesondere die Zusammensetzung des Gerüsts von Bedeutung, da dessen Grundsubstanz mit der bioaktiven Füllsubstanz interagiert. So konnten Dadsetan et al. zeigen, dass bei einer Implantation von ungefüllten Scaffolds aus  $\beta$ -TCP (beta Tricalciumphosphat) und BCP (Biphasisches Calciumphosphat)

Letzteres bessere BV/TV Werte verzeichnete, bei BMP-2 Befüllung sich dieser Zusammenhang jedoch umkehrte (100). Ähnlich dem BMP in dieser Arbeit könnte auch BSP einen bestimmte Trägersubstanz benötigen, um eine optimale Wachstumsförderung zu bewirken.

Zur Erfassung des Knochenwachstums nutzten wir als bildgebende Verfahren Röntgen, Mikro CT und histologische Schnitte. Die Auswirkungen von BSP auf die Genexpression waren Teil der vorangehenden Arbeit von Tanja Habeck. Zusammen bildeten wir so einen Großteil der Dimensionen eines potenziellen Knochenwachstums ab, was nicht nur Aussagen über das Volumen, sondern auch über die Beschaffenheit desselbigen ermöglichte

Aus der quantitativen Auswertung ging hervor, dass nach 4 Wochen in der spezifischen Analyse nur die Gruppe PLA und in der unspezifischen die Gruppen PLA und BMP-7 nennenswerten Knochenzuwachs zu verzeichnen hatten, jedoch nach 8 Wochen die anderen Fraktionen diese weit überholten. Hier stellte sich die Frage nach dem Grund für diesen frühen Vorsprung von „PLA“, jedoch muss auch darauf hingewiesen werden, dass diese Gruppe nur zwei Tiere beinhaltete und somit dieses Ergebnis dem Zufall zuzuschreiben sein könnte. Eine Möglichkeit ist, wie in der Fehlerdiskussion beschrieben, dass bei der Auswertung in ImageJ ursprüngliches Knochengewebe oder Artefakte fälschlicherweise in die Messung mit eingeflossen sind.

Neben einem Fehler ist auch anzunehmen, dass der Faktor Zeit auch bei Einsatz von bioaktiven Knochenwachstums eine große Rolle spielt, da die Gruppen BSP low/high und BMP-7 nach 8 Wochen deutlich weiter voranschritten. Umso interessanter ist ebenfalls die Frage nach der kontinuierlichen Freisetzung von den eingesetzten Proteinen aus dem Kollagengel. Dieser ging Tanja Habeck in ihrer Masterarbeit nach und fand, dass BSP konstant aus den Käfigen freigesetzt wurde, jedoch nur ein kleiner Prozentsatz der ursprünglich verwendeten Menge der Proteine. Dies kann sowohl zum Vorteil als auch zum Nachteil gereichen: Der erste Knochenwuchs profitiert wahrscheinlich nur gering vom BSP, während später in den Käfig eingewachsene Zellen noch eine relativ große Menge BSP vorfinden. In diesem Rahmen ist zusätzlich das Alter der Ratten zu bedenken, dass in unserer Arbeit 8 Wochen betrug. Das Wachstum von männlichen Wistar-Ratten beginnt erst ab einem Alter von ca. 90 Tagen Ratten zu

stagnieren (101), sodass bei älteren Tieren im Vergleich zu unseren ein geringerer Zuwachs an Knochen zu erwarten ist.

Dass die Gruppe die „PLA + BSP low“ nach 8 Wochen in der spezifischen Analyse tendenziell mehr Knochenzuwachs vorlegte als die Gruppe „PLA + BSP high“ spricht für eine konzentrationsabhängige Induktion des Knochenwachstums. Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese sind zusätzliche Versuche mit mehreren Gruppen aufsteigender BSP-Konzentrationen nötig.

In unserer Arbeit entstand ein großer Anteil des neu entstandenen Knochens nicht in dem von uns vorher festgelegten zylinderförmigen Raum um den Defekt. Daher besteht Anlass zur Spekulation wie die Richtung des Knochenwachstums besser dirigiert bzw. heterotope Ossifikationen (HO) vermieden werden können. Im Menschen entstehen diese ebenfalls oft nach orthopädischen Operationen, insbesondere nach Hüftendoprothetik (bis zu 40% der Fälle) und nach Frakturen (bis zu 30% der Fälle) (102). Dabei ist bekannt, dass das Risiko für HO durch die Art des Eingriffs und die Sorgfalt des Operateurs beeinflusst wird und in Relation zur Schädigung des umgebenden Weichteilgewebes steht (103). Auch stellt die Implantation von Fremdgewebe, wie etwa den PLA-Käfig, einen Risikofaktor dar (104). In den digital erstellten 3D Bildern waren die HO insbesondere in den Bereichen des proximalen und distalen Knochenenden auszumachen. Dies mag die natürliche Konsequenz der Defektsetzung an diesen Stellen gewesen sein, jedoch stellt sich auch die Frage, ob durch den Einsatz des Gigli-Sägedrahts eine Verletzung des Weichteilgewebes oder eine Versprengung von osteoaktiven Zellen begünstigt wurde. Eine Möglichkeit ist auch eine asymmetrische Distribution des BMP/BMP, sodass diese eher an den proximalen bzw. distalen Enden der Käfige freigesetzt wurden, welche die größeren Öffnungen besaßen.

## Fehlerdiskussion

Die qualitative Auswertung umfasste mehrere Schritte unterschiedlicher Bildgebungen und war damit auch verschiedenen Fehlerquellen ausgesetzt. Wie bereits unter dem Punkt „Fehlschläge“ erwähnt, gelang es bei einigen der Versuchstiere nicht, den PLA Cage passgenau in den Femurdefekt einzubringen, was beispielsweise zu einem Verrutschen desselbigen führen konnte. Diese Tatsache machte sich insbesondere in der histologischen Auswertung bemerkbar, da hier der Cage sichtbar wurde und teilweise sogar das Knochenwachstum behindert haben könnte.

Eine weitere Fehlerursache ergab sich bei der Erstellung der Mikro-CT Bilder: Der Probenbehälter des CT-Geräts besaß einen größeren Durchmesser als die Rattenfemora; es war somit notwendig die Proben manuell senkrecht im Probenbehälter zu fixieren. Ein Verrutschen der Knochen führte vereinzelt zu schräg gestellten Aufnahmen, was zwar für die CT-Übersichtsaufnahmen durch Software-Nachbearbeitung kein Problem darstellte, jedoch die quantitative Auswertung verkomplizierte (siehe dortige Fehlerdiskussion). Des Weiteren wurden für einige der Exemplare ein anderer Scanbereich im Mikro CT festgelegt, sodass ein kleinerer Datensatz und somit ein kleineres Bild entstand. Auch dies erschwerte die statistische Auswertung, da die Vergleichbarkeit der Volumina nicht mehr vollständig gegeben war.

Die Herstellung der histologischen Knochenschnitte erfolgte durch die Firma LLS Rowiak. Dadurch war kein Einfluss auf die Qualität der Präparate möglich. Einzelne Schnitte waren nicht zentral im Defekt platziert, sodass eventuell entstandener Knochen nicht abgebildet wurde. Allerdings war dieses Problem kaum zu vermeiden, da das Knochenwachstum in den meisten Fällen asymmetrisch auftrat. Auf einigen Schnitten sind deutliche Artefakte zu erkennen, wie etwa nicht ausgewaschene Farbe und herausgelöste Knochenanteile. Daher war zum Teil keine klare Aussage über den Knochenzuwachs an proximalen oder distalen Knochenende möglich. Die Bildaufnahmen der Schnitte dagegen wurden eigenhändig angefertigt. Dabei kamen zwei verschiedene Mikroskope (Licht- und Elektromikroskop) zum Einsatz. Dabei entstanden Bilder unterschiedlicher Qualität: So musste beim Lichtmikroskop nachträglich ein Weißabgleich stattfinden, der sich von dem des Elektrischen unterschied, was teilweise zu dunkleren Bildern führte.

## Fehlerdiskussion – Quantitative Analyse

Die quantitative Auswertung der Proben gestaltete sich als problematisch. Grundlegend war die Stichprobenzahl niedrig, sodass eine statistische Aussage zu den Ergebnissen nur sehr eingeschränkt möglich war. Dieser Umstand verschärfte sich insbesondere in den Gruppen PLA und PLA + Kollagen durch den Verlust jeweils eines Knochens, sodass nur noch ein Vertreter für diese beiden zur Verfügung stand.

Ein Problem bei der Erfassung des neu gebildeten Knochens war die willkürliche Anlage des virtuellen Zylinders um den Defekt. Zwar war dieser mit 375 Schnittbildern in seiner Höhe und mit 5mm in seinem Durchmesser festgelegt, doch musste er individuell für jeden Knochen am Defektspalt ausgerichtet werden, teilweise mit digitaler Kippung des Schnittbildstapels. Diese war notwendig, da nicht alle Knochen exakt senkrecht im Probenbehälter für das Mikro-CT standen. Leider resultierten daraus auch Schwankungen bei der Erfassung des randständigen, bereits vorbestehenden Knochens der Knochenfragmente, sodass beispielsweise vermutlich dadurch das Exemplar aus der Gruppe PLA nach 4 Wochen das Maximum an dichten Knochen anzeigte. Da in dieser Gruppe generell wenig dichter Knochen gewachsen ist, fallen hier schon leichte Fehlplatzierungen der Zylinderposition besonders ins Gewicht.

Eine weitere Fehlerquelle war die ebenfalls willkürliche Einteilung von Knochengewebe in dicht und undicht: Um im Programm Image J das Knochenvolumen berechnen zu können, müssen die verschiedenen Grautöne der Mikro-CT Bilder digital in eine Schwarz-Weiß-Maske umgewandelt werden, sodass nun schwarze Pixel „Knochen“ und Weiße „Kein Knochen“ bedeuten. Dabei legten wir uns auf zwei verschiedene sogenannte „Thresholds“ fest, anhand derer das Programm darauf die Pixel definierte (einen Threshold für undichten und einen Threshold für dichten Knochen). Leider birgt dies je nach Lage dieser Thresholds die Gefahr, die gemessene Knochenmenge fälschlicherweise zu erhöhen bzw. zu erniedrigen. Dies war insbesondere problematisch, da bei einigen Aufnahmen eine der Osteosyntheseschrauben in den Schnittbildstapel hineinragte und diese bzw. deren umgebendes Gewebe (Artefakt bedingt, siehe Abb. ()) als Knochengewebe gezählt wurde.

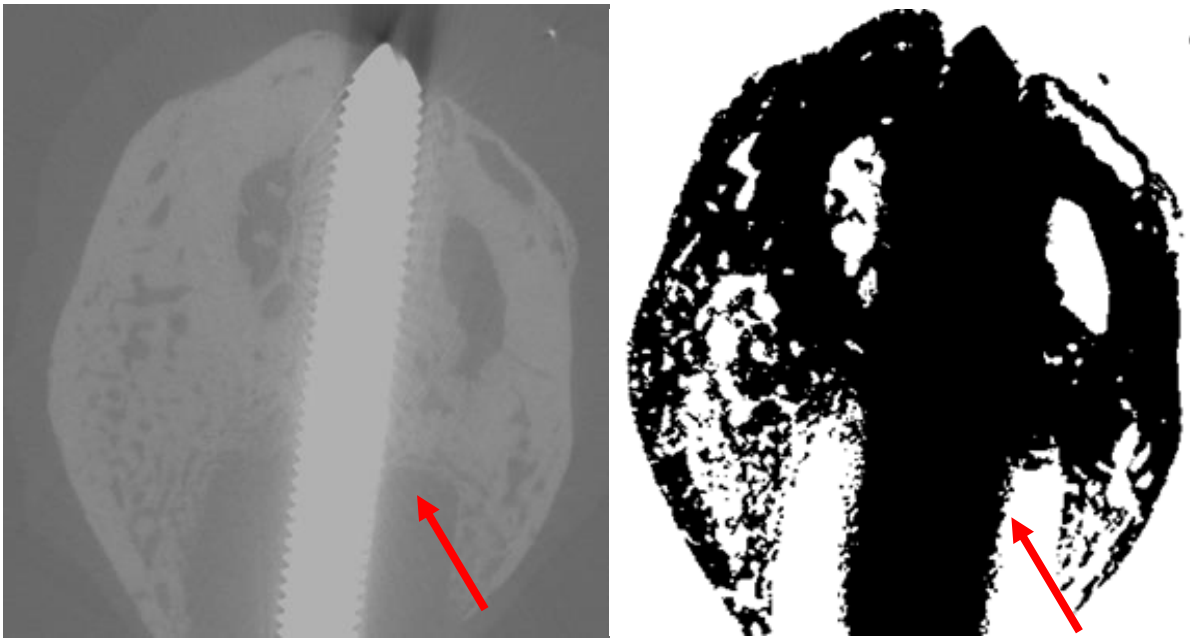


Abbildung 40: Schrauben erscheinen aufgrund ihrer hohen Dichte nach Produktion einer Schwarz/Weiß- (Knochen/Kein Knochen) Maske als Knochen. Die roten Pfeile markieren die Artefaktbildung um die Schrauben herum. Dieses extreme Beispiel fand keine Anwendung in der Auswertung

Es ist wichtig nochmals darauf hinzuweisen, dass einige Bilder im Mikro-CT unterschiedlich groß ausfielen, weshalb leider aufgrund unterschiedlicher Totalvolumina und somit abweichender Knochenfraktion die Vergleichbarkeit der Daten vermindert wurde. Allerdings ist es trotz dieser Unzulänglichkeiten möglich Aussagen zur positiven Tendenz des Einflusses von BSP zu machen. Natürlich sollte der Versuchsaufbau bei weiteren Versuchen korrigiert werden.

## **Zusammenfassung und Ausblick**

---

Knochendefekte kritischer Größe, etwa bei Infektionen, bei großen Knochentumoren oder nach schweren Traumata, sind auch heute noch ein Problemschwerpunkt in der Orthopädie. Das Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe von Techniken des bone tissue engineering den Einfluss eines 3D gedruckten und mit BSP befüllten PLA Cages auf das Knochenwachstum in einem Defekt kritischer Größe zu untersuchen.

Als Frakturmodell nutzen wir das CSD Modell des Femurs in der Ratte. In diesen Defekt wurde ein 3D gedruckter PLA Cage mit Kollagen BSP Füllung eingebracht. Als Positivkontrolle nutzen wir eine Gruppe mit BMP-7 befüllten Cages, welches bekanntermaßen das Knochenwachstum fördert. Um den Effekt des platzierten Käfigs zu quali- und quantifizieren nutzten wir Röntgen-, Mikro CT- und histologische Aufnahmen und SPSS.

In den Röntgen- und Mikro-CT Aufnahmen nach 8 Wochen zeigte sich bei Gruppen mit Cage Implantation in der Regel mehr Knochenwachstum als bei den Tieren mit 4 Wochen Standzeit und es war dort bei einigen Exemplaren eine Tendenz zur Defektausheilung auszumachen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein positiver Effekt von BSP auf das Knochenwachstum in der Ratte festgestellt werden. Ein Ergebnis, welches aufgrund geringer Stichprobenzahl und einiger Fehlerquellen jedoch in weiteren Untersuchungen abgesichert werden muss.

Die Funktionen von BSP bei der Osteosynthese sind noch nicht abschließend geklärt, sodass hier noch Grundlagenforschung betrieben werden muss. Zwar zeigte sich ein positiver Effekt der BSP-Cage Implantation auf das Knochenwachstum, doch müssen weitere Untersuchungen angestellt werden, um eine sichere Aussage bezüglich des Einflusses treffen zu können.

BMP findet bereits Einsatz im klinischen Alltag, doch könnte BSP nach zusätzlichen Untersuchungen, aufgrund der Gefahr einer Inflammation bzw. einer heterotopen Ossifikation beim Einsatz der BMP eine Alternative darstellen.



## Eingesetzte Materialien

---

### Gerätschaften

<b>Geräte</b>	<b>Handelsname, Hersteller, Adresse</b>
Einbettautomat	Sakura VIP E150 Tissue Processor, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Germany
Tiefkühlbox	Cryo 1 C Freezing Container Nalge Nunc International, Rochester, USA
Feinbohrmaschine	Feinbohrmaschine Typ 1 Donau Elektronik, Metten, Deutschland
Kleintierröntengerät	Faxitron MX-20 Faxitron Bioptics, Tucson, Arizona, USA
Mikro-CT	µCT 40 SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland
Mikroskop	Zeiss Axioskop Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung Biocut 2030 Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Germany
3 D-Drucker	Ultimaker 2+ Ultimaker BV, Geldermalsen, Niederlande

## Software

<b>Software</b>	<b>Handelsname, Hersteller, Adresse</b>
MicroCT Analysesoftware	SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland
Aycaan OsiriX Pro	Aycaan Osirix  aycaan Digitalsysteme GmbH Innere Aumühlstraße 5 97076 Würzburg . Germany
ImageJ / BoneJ	ImageJ  Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Mary- land, USA, <a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a> , 1997-2018.  BoneJ  Doube M, Kłosowski MM, Arganda- Carreras I, Cordelières F, Dougherty RP, Jackson J, Schmid B, Hutchinson JR, Shefelbine SJ. (2010) BoneJ: free and extensible bone image analysis in ImageJ. <i>Bone</i> 47:1076-9.
Microsoft Office 365 ProPlus Excel, Word, Powerpoint	Microsoft Cooperation, Redmond, USA

## Instrumente

<b>Instrument</b>	<b>Handelsname, Hersteller, Adresse</b>
Anatomische Pinzette	Anatomische Pinzette mittelbreit Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
Dissektor	Ochsner Double-Ended Dissector Scanlan International, Inc. Saint Paul, USA
Feine Schere, spitz	Feine Schere, gerade, spitz/spitz Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
Gigli-Sägedraht	Gigli wire saw RISystem AG, Landquart, Schweiz
Hand-Drill	Handdrill, RISystem AG, Landquart, Schweiz
Drill-Bit	0,79mm, RISystem AG, Landquart, Schweiz
Nadelhalter, klein	Nadelhalter, feines Modell Abmessungen 150mm, 6 Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
PEEK-Platte	RatFix Plate 8 hole@23mm 0,8mm, Femur RISystem AG, Landquart, Schweiz
Sägelehre	RatFix Drill- & Saw guide 6 mm@23 mm RISystem AG, Landquart, Schweiz
Schraube	RatFix Shoulderscrew 0,8x6,5 RISystem AG, Landquart, Schweiz
Skalpelli	Einmalskalpell #11, #15 . Feather® Safty Razor Co., Osaka, Japan

Wundspreizer, klein, scharf	Wundspreizer Abmessungen 70mm, 2 ¾ Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
-----------------------------	--

### Reagenzien

<b>Reagenz</b>	<b>Handelsname</b> <b>Hersteller, Adresse</b>
Atipamezol	Revertor® Virbac AG, Glattbrugg, Schweiz
Augenschutzsalbe	Corneregel® Bausch + Lomb GmbH, Berlin, Deutschland
Alkohol zur Entwässerung	2-Propanol Rotipuran® Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Aqua dest	Aqua B. Braun, Spüllösung B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany
Braunol®, Hautdesinfektion	Braunol®, 7,5% Povidon-Jod, 250ml B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany
Cytoseal zum Eindecken	Cytoseal™ XYL Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat für dieMolekularbiologie AppliChemGmbH,Darmstadt,Germany
Eisessig	Essigsäure (Eisessig) 100%

	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
Eosin G	Eosin G Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Germany
Fentanyl	Fentanyl-Janssen 0,1mg/2ml Janssen-Cilag GmbH Neuss, Germany
Flumazenil	Anexate® 0,1 mg/ml Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Formaldehydlösung 4,5%	Roti®-Histofix, Formaldehydlösung 4,5% Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Germany
Hämalaun (nach Gill)	Gill's Hematoxylin #3 for Histology Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany
Isofluran	Forene®, 100% (v/v) AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Germany
Kollagen-Stammlösung	Collagen Typ I 4,08mg/ml BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Medetomidin	Dorbene® vet 1mg/ml Fort Dodge Veterinär GmbH Würselen, Germany
Midazolam	Midazolam-ratiopharm® 15mg/3ml, Ratiopharm GmbH Ulm, Germany
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub> (7,5%ig) Merck Millipore, Darmstadt, Germany
Natronlauge NaOH (1M)	Natronlauge Merck Millipore, Darmstadt, Germany

PLA-Filament	Ultimaker silver metallic PLA 2.85 _ 0.10 mm iGo3D, Hannover, Germany
Tramadol	Tramadol-ratiopharm® 100mg/ml Ratiopharm GmbH Ulm, Germany
Tris	Tris für die Molekularbiologie AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Xylol	Xylol - Isomerengemisch für die Histologie AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Sprühverband	Opsite (100ml), Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Germany

#### Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Handelsname</b> <b>Hersteller, Adresse</b>
OP-Abdecktuch	OPS® Essential Medline International GmbH, Kleve, Germany
Injektionskanüle	BD Eclipse®, 27G x 1/2", grau BD, Heidelberg, Germany
Nahtmaterial	Ethilon, 4.0, 45 cm, XN699 Ethilon II, 5.0, 45 cm, XN698 Vicryl™, 4.0, 70 cm, V304 Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Germany

Spritze 1ml	Injekt®-F B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany
sterile Latexhandschuhe	Vasco® OP Sensitive B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany
Tupfer, steril	Schlinggazetupfer 15x15, 10 Stk., steril Fuhrmann GmbH Much, Germany

## Abkürzungsverzeichnis

---

BSP	Bone Sialoprotein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
PLA	Polylaktid
SIBLING	Small Integrin-binding Ligand N-linked Glycoproteins
PEEK	Polyetheretherketon
CSD	Critical size defect
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
MG	Masson-Goldner Färbung
RUNX2	Runt-related transcription factor
ALP	Alkalische Phosphatase
Osx/SP7	Osterix
CT	Computertomograph(ie)
FGF	Fibroblast-growth-factor
IGF	Insulin-like-growth-factor
BV	Bone volume
TV	Total volume
BV/TV	Knochenfraktion (Bone volume/Total volume)
HO	Heterotope Ossifikation



## **Abbildungsverzeichnis**

---

Abbildung 1: <i>Diamond Concept</i> modifiziert nach Giannoudis et al. (12).....	7
Abbildung 2: Stadien der sekundären Knochenheilung, a) Hämatombildung b) Bildung des weichen Kallus und neuer Blutgefäße c) Bildung des harten Kallus d) Knochenumformung zur neuen, ausgeheilten Form (13).....	8
Abbildung 3: Röntgenbild eines Defekts kritischer GröÙer (CSD) im Femur einer Ratte; hier bereits mit einer Osteosynthese versorgt.....	9
Abbildung 4: Schema der Masquelet-Technik (Modifiziert nach „Femur“ von Laboratoires Servier / CC BY Lizenz) (26).....	11
Abbildung 5: Schema der Distractionsosteogenese. Die Ausweitung der künstlichen Fraktur erfolgt millimeterweise bis der CSD geschlossen ist. (Modifiziert nach „Femur“ von Laboratoires Servier / CC BY Lizenz) (26).....	12
Abbildung 6: Wistar Ratte (75).....	19
Abbildung 7: Instrumente und Materialien des RatFix-Systems. A Bohraufsatz 0,79mm B PEEK-Platte. C Fixierschrauben.....	21
Abbildung 8: D Scanning electron microscope Aufnahme eines PLA-Käfigs E PLA-Käfig neben entnommenen Femurzylinder (78).....	21
Abbildung 9: Zur OP vorbereitete Wistar Ratte.....	23
Abbildung 10: Frei präparierter Femurschaft.....	24
Abbildung 11: Durch Schrauben am Femur fixierte PEEK-Platte.....	25
Abbildung 12: Osteotomie mit press-fit eingesetztem PLA-Käfig.....	25
Abbildung 13: A Adaption der Muskulatur mit Vicryl-Faden B Adaption der Haut mit Ethilon-Faden.....	26
Abbildung 14: µCT 40 der Firma Scanco Medical AG.....	27
Abbildung 15: Röntgenaufnahmen von Rattenfemora der Gruppen PLA und PLA +Kollagen, sowie einer Ratte ohne OP. Die Zahlen in der rechten unteren Ecke geben die Zeitpunkte der Untersuchung nach OP in Wochen an.....	30
Abbildung 16: Röntgenaufnahmen von zwei Rattenfemora der Gruppe PLA +Kollagen + BSP low (1µg), sowie einer Ratte ohne OP.....	32

Abbildung 17: Röntgenaufnahmen von zwei Rattenfemora der Gruppe PLA +Kollagen + BSP high (5µg), sowie einer Ratte ohne OP. ....	33
Abbildung 18: Röntgenaufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BMP – 7 (2µg), sowie einer Ratte ohne OP.....	34
Abbildung 19: Beispiele für mangelhaftes Einbringen und Stabilisieren der Osteosynthese und dessen Folgen .....	35
Abbildung 20: µCT- und 3D-Aufnahmen eines Rattenfemurs mit Leerdefekt und vier Wochen Standzeit.....	36
Abbildung 21: µCT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppen PLA -Cage und PLA + Kollagen mit vier Wochen Standzeit.....	37
Abbildung 22: µCT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP low (1µg) mit vier Wochen Standzeit.....	38
Abbildung 23: µCT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit vier Wochen Standzeit .....	39
Abbildung 24: µCT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP low (1µg) mit acht Wochen Standzeit.....	40
Abbildung 25: µCT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit acht Wochen Standzeit. Aufgrund falscher Platzierung der Knochenprobe im Mikro-CT wurde das Bild oben links um 90 Grad gedreht aufgenommen, mit Blick auf die Schraube .....	41
Abbildung 26: µCT- und 3D-Aufnahmen von Rattenfemora der Gruppe PLA + Kollagen + BMP -7 (2µg) mit vier und acht Wochen Standzeit.....	42
Abbildung 27: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BMP -7 (2µg) mit acht Wochen Standzeit .....	44
Abbildung 28: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit acht Wochen Standzeit. Aufgrund von Datenverlust des 2,5x Bildes ist hier die 5x Vergrößerung (Bild oben rechts) zu sehen. ....	45
Abbildung 29: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit acht Wochen Standzeit .....	46
Abbildung 30: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit acht Wochen Standzeit .....	47

Abbildung 31: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP low (1µg) mit vier Wochen Standzeit.....	48
Abbildung 32: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen mit vier Wochen Standzeit.....	49
Abbildung 33: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BSP high (5µg) mit vier Wochen Standzeit .....	50
Abbildung 34: Aufnahmen der Histologie eines Rattenfemurs der Gruppe PLA + Kollagen + BMP-7 (2µg) mit vier Wochen Standzeit .....	51
Abbildung 35: Beispiel für Selektion von Knochengewebe. Der gelbe Kreis gibt den Selektionszylinder um den Defektspace an (Spezifische Analyse). Rote Pfeile zeigen auf heterotope Ossifikation (nur in der unspezifischen Analyse erfasst).....	52
Abbildung 36: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 4 Wochen Standzeit (Spezifische Analyse).....	53
Abbildung 37: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 8 Wochen Standzeit (Spezifische Analyse).....	54
Abbildung 38: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 4 Wochen Standzeit (Unspezifische Analyse).....	55
Abbildung 39: Median der Knochenfraktion (BV/TV) nach Gruppenzuteilung nach 8 Wochen Standzeit (Unspezifische Analyse).....	55
Abbildung 40: (und 41) Balkendiagramme des dichten und undichten Knochen volumens in der spezifischen Analyse. Im Vergleich wird deutlich, dass es sich beim neu gebildeten Knochen größtenteils um wenig dichtes Material handelte.....	56
Abbildung 41.....	56
Abbildung 42: Schrauben erscheinen aufgrund ihrer hohen Dichte nach Produktion einer Schwarz/Weiß- (Knochen/Kein Knochen) Maske als Knochen. Die roten Pfeile markieren die Artefaktbildung um die Schrauben herum. Dieses extreme Beispiel fand keine Anwendung in der Auswertung.....	63

## Literaturverzeichnis

---

1. Statistisches Bundesamt [Destatis] - Zentraler Auskunftsdienst. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik), Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern; 2019. Verfügbar unter: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbe-tol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=3&p\\_aid=30217248&nummer=666&p\\_sprache=D&p\\_in dsp=1200&p\\_aid=64675353#SOURCES](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbe-tol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=30217248&nummer=666&p_sprache=D&p_in dsp=1200&p_aid=64675353#SOURCES).
2. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma* 2017; 31 Suppl 5:S20-S22. doi: 10.1097/BOT.0000000000000978.
3. Steinhausen E, Glombitza M, Böhm H-J, Hax P-M, Rixen D. Pseudarthrosen : Von der Diagnose bis zur Ausheilung | Non-unions : From diagnosis to healing. *Der Unfallchirurg : Organ der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie* 2013; 116(7):633–49. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/s00113-013-2413-2>.
4. Aurégan J-C, Bégué T. Induced membrane for treatment of critical sized bone defect: a review of experimental and clinical experiences. *Int Orthop* 2014; 38(9):1971–8. doi: 10.1007/s00264-014-2422-y.
5. Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2018; 28(3):351–62. doi: 10.1007/s00590-017-2063-0.
6. Biberthaler P, van Griensven M. Knochendefekte und Pseudarthrosen; 2017. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-44991-8>.
7. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep* 2013; 2:447. doi: 10.1038/bonekey.2013.181.
8. Henne-Bruns D, Barth E, Hrsg. *Chirurgie: 292 Tabellen*. 4., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. (Duale Reihe).

9. Santolini E, West R, Giannoudis PV. Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. *Injury* 2015; 46:S8-S19. doi: 10.1016/S0020-1383(15)30049-8.
10. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007; 38 Suppl 4:S3-6. doi: 10.1016/s0020-1383(08)70003-2.
11. Giannoudis PV, Gudipati S, Harwood P, Kanakaris NK. Long bone non-unions treated with the diamond concept: a case series of 64 patients. *Injury* 2015; 46 Suppl 8:S48-54. doi: 10.1016/S0020-1383(15)30055-3.
12. Andrzejowski P, Giannoudis PV. The 'diamond concept' for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol* 2019; 20. doi: 10.1186/s10195-019-0528-0.
13. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 2003; 8(21):980–9. doi: 10.1016/S1359-6446(03)02866-6.
14. Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J Orthop Trauma* 2018; 32 Suppl 1:S7-S11. doi: 10.1097/BOT.0000000000001115.
15. Nauth A, McKee MD, Einhorn TA, Watson JT, Li R, Schemitsch EH. Managing bone defects. *J Orthop Trauma* 2011; 25(8):462–6. doi: 10.1097/BOT.0b013e318224caf0.
16. Sanders DW, Bhandari M, Guyatt G, Heels-Ansdell D, Schemitsch EH, Swiontkowski M et al. Critical-sized defect in the tibia: is it critical? Results from the SPRINT trial. *J Orthop Trauma* 2014; 28(11):632–5. doi: 10.1097/BOT.0000000000000194.
17. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84(3):454–64. doi: 10.2106/00004623-200203000-00020.
18. Conway JD. Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *Orthop Clin North Am* 2010; 41(1):75-84; table of contents. doi: 10.1016/j.jocl.2009.07.006.
19. Niedhart2010\_Chapter\_Vor-UndNachteileDerAutologenSp.

20. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am* 2010; 41(1):27-37; table of contents. doi: 10.1016/j.ocl.2009.07.011.
21. Henrich D, Basam S, Wenger F, Seebach C, Nau C, Barker J et al. Zelluläre und strukturelle Eigenschaften von Membranen induziert nach der Masquelet-Technik im Rattenmodell [meeting abstract]. Frankfurt am Main: Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg; 2012.
22. Moghaddam A, Zietzschmann S, Bruckner T, Schmidmaier G. Treatment of atrophic tibia non-unions according to 'diamond concept': Results of one- and two-step treatment. *Injury* 2015; 46 Suppl 4:S39-50. doi: 10.1016/S0020-1383(15)30017-6.
23. Masquelet A, Kanakaris NK, Obert L, Stafford P, Giannoudis PV. Bone Repair Using the Masquelet Technique. *J Bone Joint Surg Am* 2019; 101(11):1024–36. doi: 10.2106/JBJS.18.00842.
24. Raven TF, Moghaddam A, Ermisch C, Westhauser F, Heller R, Bruckner T et al. Use of Masquelet technique in treatment of septic and atrophic fracture nonunion. *Injury* 2019; 50 Suppl 3:40–54. doi: 10.1016/j.injury.2019.06.018.
25. Schmidmaier G, Moghaddam A. Pseudarthrosen langer Röhrenknochen. *Z Orthop Unfall* 2015; 153(6):659-74; quiz 675-6. doi: 10.1055/s-0035-1558259.
26. Laboratoires Servier / Servier Medical Art. Femur; 2019. Verfügbar unter: [https://smart.servier.com/smart\\_image/femur/](https://smart.servier.com/smart_image/femur/).
27. Papakostidis C, Bhandari M, Giannoudis PV. Distraction osteogenesis in the treatment of long bone defects of the lower limbs: effectiveness, complications and clinical results; a systematic review and meta-analysis. *The Bone & Joint Journal* 2013; 95-B(12):1673–80. doi: 10.1302/0301-620X.95B12.32385.
28. Baumgart R, Schuster B, Baumgart T. Kallusdistraction und Segmenttransport zur Behandlung von Knochendefekten. *Orthopäde* 2017; 46(8):673–80. doi: 10.1007/s00132-017-3441-3.
29. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011; 2:403–30. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.

30. Kaul H, Ventikos Y. On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2015; 21(2):203–17. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0285.
31. Ducheyne P, Healy K, Hutmacher DE, Grainger DW, Kirkpatrick CJ. *Comprehensive Biomaterials II*. Saint Louis: Elsevier Science; 2017. Verfügbar unter: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=4873524>.
32. Walters G, Pountos I, Giannoudis PV. The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: Current evidence. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12(3):e1662-e1677. doi: 10.1002/term.2593.
33. Lanza RP, Langer RS, Vacanti J, Hrsg. *Principles of tissue engineering*. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Acad. Press; 2014.
34. Oryan A, Hassanajili S, Sahvieh S, Azarpira N. Effectiveness of mesenchymal stem cell-seeded onto the 3D polylactic acid/polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold on the radius bone defect in rat. *Life sciences* 2020; 257. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32622947/>.
35. Anthony Atala RL, Mikos T, Hrsg. *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*. [Place of publication not identified]: Academic Press; 2019.
36. Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW. Gerüstträgerbasiertes Knochen-Tissue-Engineering. *Orthopäde* 2017; 46(8):701–10. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00132-017-3444-0>.
37. Kozusko SD, Riccio C, Goulart M, Bumgardner J, Jing XL, Konofaos P. Chitosan as a Bone Scaffold Biomaterial. *J Craniofac Surg* 2018; 29(7):1788–93. doi: 10.1097/SCS.0000000000004909.
38. Zäh M, Hrsg. *Wirtschaftliche Fertigung mit Rapid-Technologien: Anwender-Leitfaden zur Auswahl geeigneter Verfahren*. München: Hanser; 2006. (Kostengünstig Produzieren).
39. Noor N, Shapira A, Edri R, Gal I, Wertheim L, Dvir T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Adv Sci (Weinh)* 2019; 6(11):1900344. doi: 10.1002/advs.201900344.

40. Tzavellas A-N, Kenanidis E, Potoupnis M, Tsiridis E. 3D printing in orthopedic surgery. In: Tsoulfas G, Bangeas PI, Suri JS, Hrsg. 3D printing: Applications in medicine and surgery. Amsterdam: Elsevier; 2020. S. 133–41.
41. Nardo T, Carmagnola I, Ruini F, Caddeo S, Calzone S, Chiono V et al. Synthetic Biomaterial for Regenerative Medicine Applications. In: Orlando G, Remuzzi G, Williams DF, Hrsg. Kidney transplantation, bioengineering, and regeneration: Kidney transplantation in the regenerative medicine era. London: Elsevier, Academic Press, an imprint of Elsevier; 2017. S. 901–21.
42. Baur E, Brinkmann S, Osswald TA, Rudolph N, Schmachtenberg E, Saechtling H. Saechtling Kunststoff Taschenbuch. 31. Ausgabe, [komplett überarb., aktualisiert und zum ersten Mal in Farbe]. München: Hanser; 2013.
43. Santoro M, Shah SR, Walker JL, Mikos AG. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 107:206–12. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.019.
44. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphate-Containing Biocomposites and Hybrid Biomaterials for Biomedical Applications. *J Funct Biomater* 2015; 6(3):708–832. doi: 10.3390/jfb6030708.
45. Zhou H, Touny AH, Bhaduri SB. Fabrication of novel PLA/CDHA bionanocomposite fibers for tissue engineering applications via electrospinning. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22(5):1183–93. doi: 10.1007/s10856-011-4295-6.
46. DENHOLLANDER W, PATKA P, KLEIN C, HEIDENDAL G. Macroporous calcium phosphate ceramics for bone substitution: a tracer study on biodegradation with <sup>45</sup>Ca tracer. *Biomaterials* 1991; 12(6):569–73. doi: 10.1016/0142-9612(91)90053-D.
47. Yin S, Zhang W, Zhang Z, Jiang X. Recent Advances in Scaffold Design and Material for Vascularized Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater* 2019; 8(10):e1801433. doi: 10.1002/adhm.201801433.
48. Dorland, ut. *Dorland's illustrated medical dictionary*. 32nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2012.
49. Hasnain MS, Nayak AK, Hrsg. *Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications*. London: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2019.



50. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16(5):585–601. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19128254/>.
51. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)* 2016; 31(3):233–45. doi: 10.1152/physiol.00061.2014.
52. Shim KS. Pubertal growth and epiphyseal fusion. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 20(1):8–12. doi: 10.6065/apem.2015.20.1.8.
53. Freeman I, Cohen S. The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. *Biomaterials* 2009; 30(11):2122–31. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.057.
54. Boulefour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N et al. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol* 2016; 52-54:60–77. doi: 10.1016/j.matbio.2015.12.011.
55. Glorieux FH, Pettifor JM, Jüppner H. *Pediatric bone: Biology & diseases*. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Acad. Press; 2012. Verfügbar unter: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1606/2012360123-d.html>.
56. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of bone biology*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/AP; 2008. Verfügbar unter: <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10371781>.
57. Gorski JP, Franz NT, Pernoud D, Keightley A, Eyre DR, Oxford JT. A repeated triple lysine motif anchors complexes containing bone sialoprotein and the type XI collagen A1 chain involved in bone mineralization. *J Biol Chem* 2021:100436. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100436.
58. McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mech* 2018; 11(4). doi: 10.1242/dmm.033084.
59. Kruger TE, Miller AH, Godwin AK, Wang J. Bone Sialoprotein and Osteopontin in Bone Metastasis of Osteotropic Cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 89(2):330–41. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.013.

60. Bellahcène A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res* 2000; 86(8):885–91. doi: 10.1161/01.res.86.8.885.
61. Di Chen, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22(4):233–41. doi: 10.1080/08977190412331279890.
62. Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(11):696–711. doi: 10.1038/s41580-020-00279-w.
63. Kloen P, Lauzier D, Hamdy RC. Co-expression of BMPs and BMP-inhibitors in human fractures and non-unions. *Bone* 2012; 51(1):59–68. doi: 10.1016/j.bone.2012.03.032.
64. Hausmann M, Ehnert S, Hofmann V, Döbele S, Freude T, Stöckle U et al. Einsatz der Bone morphogenetic Proteins (BMPs) zur Behandlung von Pseudarthrosen - Effizienz und Therapieversagen. *Z Orthop Unfall* 2014; 152(2):144–51. doi: 10.1055/s-0034-1368208.
65. Even J, Eskander M, Kang J. Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses. *J Am Acad Orthop Surg* 2012; 20(9):547–52. doi: 10.5435/JAAOS-20-09-547.
66. Domic-Cule I, Peric M, Kucko L, Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. *Int Orthop* 2018; 42(11):2619–26. doi: 10.1007/s00264-018-4153-y.
67. Domic-Cule I, Brkljacic J, Rogic D, Bordukalo Niksic T, Tikvica Luetic A, Draca N et al. Systemically available bone morphogenetic protein two and seven affect bone metabolism. *Int Orthop* 2014; 38(9):1979–85. doi: 10.1007/s00264-014-2425-8.
68. Bigham-Sadegh A, Oryan A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Res* 2015; 56(3):175–94. doi: 10.3109/03008207.2015.1027341.
69. Lammens J, Maréchal M, Geris L, van der Aa J, van Hauwermeiren H, Luyten FP et al. Warning About the Use of Critical-Size Defects for the Translational Study

- of Bone Repair: Analysis of a Sheep Tibial Model. *Tissue Eng Part C Methods* 2017; 23(11):694–9. doi: 10.1089/ten.TEC.2017.0147.
70. Histing T, Menger MD, Pohlemann T, Matthys R, Fritz T, Garcia P et al. An Intramedullary Locking Nail for Standardized Fixation of Femur Osteotomies to Analyze Normal and Defective Bone Healing in Mice. *J Vis Exp* 2016; (117). doi: 10.3791/54472.
71. Pobloth A-M, Schell H, Petersen A, Beierlein K, Kleber C, Schmidt-Bleek K et al. Tubular open-porous  $\beta$ -tricalcium phosphate polycaprolactone scaffolds as guiding structure for segmental bone defect regeneration in a novel sheep model. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12(4):897–911. doi: 10.1002/term.2446.
72. Fernandes MBC, Guimarães JAM, Casado PL, Cavalcanti AdS, Gonçalves NN, Ambrósio CE et al. The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. *BMC Vet Res* 2014; 10:36. doi: 10.1186/1746-6148-10-36.
73. Gundle R, Beresford JN. The Isolation and Culture of Cells from Explants of Human Trabecular Bone. *Calcif Tissue Int* 1995; 56(S1):S8-S10. doi: 10.1007/BF03354640.
74. MCQUILLAN D. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *EMC - Cardiologie-Angiologie* 1995:415–26. doi: 10.1016/8756-3282(95)90186-8.
75. Janvier Labs. wistar\_rat. Verfügbar unter: [https://www.janvier-labs.com/en/fiche\\_produit/wistar\\_rat/](https://www.janvier-labs.com/en/fiche_produit/wistar_rat/).
76. Surgical Guide by RISystem, Schmidt-Bleek K., Ellinghaus A.
77. Schwitalla A, Spintig T, Kallage I et al (2014) Polyetheretherketon (PEEK) – ein vielversprechender Werkstoff für die Zukunft. *Umwelt-Medizin-Gesellschaft* 27: 255–261.
78. Lauer A, Wolf P, Mehler D, Götz H, Rüzgar M, Baranowski A et al. Biofabrication of SDF-1 Functionalized 3D-Printed Cell-Free Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *IJMS* 2020; 21(6):2175. doi: 10.3390/ijms21062175.

79. Leiblein M, Koch E, Winkenbach A, Schaible A, Nau C, Büchner H et al. Size matters: Effect of granule size of the bone graft substitute (Herafill®) on bone healing using Masquelet's induced membrane in a critical size defect model in the rat's femur. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2020; 108(4):1469–82. doi: 10.1002/jbm.b.34495.
80. Nau C, Simon S, Schaible A, Seebach C, Schröder K, Marzi I et al. Influence of the induced membrane filled with syngeneic bone and regenerative cells on bone healing in a critical size defect model of the rat's femur. *Injury* 2018; 49(10):1721–31. doi: 10.1016/j.injury.2018.06.041.
81. Zhang J, Shang Z, Jiang Y, Zhang K, Li X, Ma M et al. Biodegradable metals for bone fracture repair in animal models: a systematic review. *Regen Biomater* 2021; 8(1):rbaa047. doi: 10.1093/rb/rbaa047.
82. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011; 49(4):591–9. doi: 10.1016/j.bone.2011.07.007.
83. Ball AN, Donahue SW, Wojda SJ, McIlwraith CW, Kawcak CE, Ehrhart N et al. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis. *J Orthop Res* 2018; 36(6):1559–72. doi: 10.1002/jor.23845.
84. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed Tech (Berl)* 2005; 50(4):107–10. doi: 10.1515/BMT.2005.015.
85. Gregor A, Filová E, Novák M, Kronek J, Chlup H, Buzgo M et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J Biol Eng* 2017; 11:31. doi: 10.1186/s13036-017-0074-3.
86. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 107:163–75. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.018.
87. An B, Lin Y-S, Brodsky B. Collagen interactions: Drug design and delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 97:69–84. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.013.

88. Chowdhury SR, Mh Busra MF, Lokanathan Y, Ng MH, Law JX, Cletus UC et al. Collagen Type I: A Versatile Biomaterial. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1077:389–414. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2\_21.
89. Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R et al. Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65(4):429–56. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.010.
90. Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 2007; 26(3):146–55. doi: 10.1016/j.matbio.2006.10.007.
91. Shah FA, Thomsen P, Palmquist A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomater* 2019; 84:1–15. doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.018.
92. Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain J-C et al. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone* 2010; 46(2):447–52. doi: 10.1016/j.bone.2009.09.007.
93. Bouleftour W, Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Bouët G, Cardelli M, Laroche N et al. Skeletal development of mice lacking bone sialoprotein (BSP)--impairment of long bone growth and progressive establishment of high trabecular bone mass. *PLoS ONE* 2014; 9(5):e95144. doi: 10.1371/journal.pone.0095144.
94. Klein A. Functionalisation of Biomaterials with Bone Sialoprotein for Joint and Bone Replacement [Dissertation]. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität; 2017.
95. Wang J, Zhou H-Y, Salih E, Xu L, Wunderlich L, Gu X et al. Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein. *Calcif Tissue Int* 2006; 79(3):179–89. doi: 10.1007/s00223-006-0018-2.
96. Hertweck JM. In-vivo-Untersuchung prävascularisierter Knochenersatzkonstrukte [Dissertation]. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2016.
97. Klein A, Baranowski A, Ritz U, Mack C, Götz H, Langendorf E et al. Effect of bone sialoprotein coating on progression of bone formation in a femoral defect model in rats. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2020; 46(2):277–86. doi: 10.1007/s00068-019-01159-5.

98. Jonathan C. Bernhard, James Ferguson, B. Rieder, P. Heimel, T. Nau, S. Tangl et al. Tissue-engineered hypertrophic chondrocyte grafts enhanced long bone repair. undefined 2017. Verfügbar unter: <https://www.semanticscholar.org/paper/Tissue-engineered-hypertrophic-chondrocyte-grafts-Bernhard-Ferguson/48d9eddb64f792e25acf1c0691f2e7a886f4f945>.
99. Choi YJ, Lee JY, Chung C-P, Park YJ. Enhanced osteogenesis by collagen-binding peptide from bone sialoprotein in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101(2):547–54. doi: 10.1002/jbm.a.34356.
100. Dadsetan M, Guda T, Runge MB, Mijares D, LeGeros RZ, LeGeros JP et al. Effect of calcium phosphate coating and rhBMP-2 on bone regeneration in rabbit calvaria using poly(propylene fumarate) scaffolds. *Acta Biomater* 2015; 18:9–20. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706114005972>.
101. Janvier Labs: Growth Curve. Verfügbar unter: [https://www.janvier-labs.com/en/fiche\\_produit/wistar\\_rat](https://www.janvier-labs.com/en/fiche_produit/wistar_rat).
102. Meyers C, Lisiecki J, Miller S, Levin A, Fayad L, Ding C et al. Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review. *JBMR Plus* 2019; 3(4):e10172. doi: 10.1002/jbm4.10172.
103. Guo JJ, Tang N, Yang HL, Qin L, Leung KS. Impact of surgical approach on postoperative heterotopic ossification and avascular necrosis in femoral head fractures: a systematic review. *International Orthopaedics (SICOT)* 2010; 34(3):319–22. doi: 10.1007/s00264-009-0849-3.
104. Qureshi AT, Crump EK, Pavey GJ, Hope DN, Forsberg JA, Davis TA. Early Characterization of Blast-related Heterotopic Ossification in a Rat Model. *Clin Orthop Relat Res* 2015; 473(9):2831–9. doi: 10.1007/s11999-015-4240-y.

## Danksagung

---

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe am Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Mein Dank gilt allen, die an dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein größter Dank geht an Dr. U. R., für die herausragende Betreuung und sorgfältige Bewertung dieser Arbeit. Durch ihre flexible und souveräne Unterstützung war dieses Projekt erst möglich.

Dank geht selbstverständlich auch an T. H., mit der ich die Operationen der Ratten gemeinsam durchgeführt habe. Es wäre schwer sich einen besseren Operationspartner vorzustellen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und Freunden, die mich im Laufe dieser Doktorarbeit ebenfalls unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich auch T. L. meinen Dank aussprechen, dessen musikalische Unterstützung mich an manchem Abend motiviert hat.

## **Lebenslauf**

---

In der elektronischen Version nicht enthalten.