

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

Evaluation der Effekte von Bone Sialoprotein in funktionalisierten Kollagengelen in
einem Ratten Calvaria Defekt-Modell

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

Vorgelegt von

Christian Schlosser
aus Limburg a.d. Lahn

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 29. Oktober 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
2 Ziele dieser Arbeit.....	2
3 Literaturdiskussion.....	3
3.1 Physiologie des Knochens	3
3.2 Frakturen – Heilung und Prozesse.....	4
3.2.1 Pseudarthrosen.....	6
3.3 Angiogenese	6
3.3.1 Wundheilung	7
3.4 Defektmodelle im Tier	8
3.4.1 Calvarial Defekt Modell	9
3.5 BSP	9
3.6 BMP	10
3.6.1 BMP-2.....	10
3.6.2 BMP-7.....	11
3.7 Bone Tissue Engineering (BTE).....	11
3.7.1 Keramik.....	12
3.7.2 Polymere.....	12
3.7.3 Metalle	13
3.7.4 Kollagen Typ I.....	13
4 Material und Methoden	15
4.1 Herstellung der Kollagen-Gele	15
4.2 In vivo Untersuchung	16
4.2.1 Herstellen einer Narkoselösung	17
4.2.2 Herstellen der Antagonisierungslösung	17
4.2.3 Operationsbereich.....	18
4.2.4 Narkoseeinleitung	19
4.2.5 Desinfektion	19
4.2.6 Operation	20
4.3 Einteilung der Gruppen	23
4.3.1 Leerkontrolle	23
4.3.2 Kollagengel	23
4.3.3 BSP.....	23
4.3.4 Positivkontrolle/BMP-7	24
4.3.5 Komplikationen	24

4.4	Entnahme der Gewebeproben	24
4.4.1	Präparation	25
4.5	Radiologische Erfassung des neo-ossifizierten Gewebes.....	25
4.5.1	Röntgenkontrolle	25
4.5.2	µCT-Untersuchung.....	26
4.6	Histologie	26
4.6.1	Vorbereitungen	26
4.6.2	Hämatotoxylin- Eosin-Färbung.....	27
4.6.3	Elastica van Gieson (EvG).....	27
4.6.4	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MGT)	28
4.6.5	Immunhistologische Färbungen	29
4.7	Anwendung des Microfil	30
4.7.1	Vorbereitung	31
4.7.2	Intervention	31
4.8	Auswertung der µCT-Daten und Semiquantitative Analyse	34
4.9	Statistische Auswertung.....	35
5	Ergebnisse.....	36
5.1	Visuelle Auswertung der radiologischen Bildgebung	36
5.2	Analyse der Volume fraction	39
5.3	Histologische Beurteilung.....	40
5.4	Quantitative Analyse der Angiogenese	44
6	Diskussion	46
6.1	Rat calvarial defect modell	46
6.2	Kollagen als Trägermaterial	47
6.3	Bone Sialoprotein- Zukunft der BTE.....	48
6.4	Humanes BSP vs.Ratten-BSP	49
6.5	Darstellung der Vaskularisierung durch Microfil	50
7	Zusammenfassung	52
8	Materialien	53
9	References	59
10	Danksagung	70
11	Tabellarischer Lebenslauf.....	71

Abkürzungsverzeichnis

Kürzel	Bedeutung
Abb	Abbildung
Aqua dest	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
BTE	Bone Tissue Engineering
BV	Bone Volume
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CD	Cluster of differentiation
CSD	Critical Size Defect
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DPBS	Dilbecco's Phosphat Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EvG	Elastic van Gieson
FGF	Fibroblast Growth Factor
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hBSP	humanes Bone Sialoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
hOB	Human Osteoblast
HWZ	Halbwertszeit
IE	Internationale Einheiten
kDA	kilo Dalton
kg/KG	Kilogramm Körpergewicht
konz.	Konzentration
MGT	Masson-Goldner-Trichchrom
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
pH	pondus Hydrogenii

rBSP	Ratten BSP
ROI	Region of Interest
TV	Total Volume
VolFra	Volume Fraction
μ -CT	Mikrocomputertomographie
μ g	Mikrogramm

1 Einleitung

Schon seit jeher ist eine optimale Knochenheilung für den Menschen von Bedeutung, sei es zu Zeiten der noch nicht existenten modernen Medizin, bis hin zu den heutigen Zeiten mit ihren zahlreichen, fortschrittlichen Entwicklungen. Dennoch geht es nicht nur um eine schnelle Heilung, sondern auch um eine möglichst hochqualitative Regeneration des Knochens, um Komplikationen zu vermeiden. Um eine möglichst schnelle und komplikationslose Rekonvaleszenz zu erreichen, wird immer weiter nach Möglichkeiten geforscht, um dies zu beschleunigen. [1] Es geht hier nicht nur rein um die Regeneration im Allgemeinen, sondern auch um die Minimierung von Komplikationen, beispielsweise zur früheren Mobilisierung und damit einhergehend eines niedrigeren Thromboserisikos. Auch Kosten und Hospitalisierungsrate können somit gemindert und im besten Falle eine Senkung der Mortalität erreicht werden. [2]

Im Jahr 2019 wurden 688403 Frakturen registriert, wodurch die Inzidenz auf 1014/100000 stieg und damit in Relation um 14% im Vergleich zu 2018. Die häufigsten Frakturen waren in einer Analyse von 2019 Oberschenkelhalsfrakturen mit einer Inzidenz von 120/100000 Einwohner. Generell herrschen diverse Behandlungsstrategien, die von konservativen Vorgehensweisen wie Gipsverbänden über chirurgische Maßnahmen wie Plattenosteosynthese und Marknagelung reichen. In bis zu 10 % der Fälle ist eine Beeinträchtigung der Knochenheilung zu erkennen, die zu einer Ausbildung einer Pseudarthrose, mit weitreichenden Folgen für den physischen und psychischen Zustand der Patienten, führen kann. [3–5]

Proximale Femurfrakturen haben besonders mit zunehmendem Alter die höchste Prävalenz aller Frakturen. Der aktuelle operative Goldstandard ist die Versorgung mittels Gammanagel. [6] Aufgrund des demografischen Wandels wird die Gesellschaft vor eine besondere Herausforderung gestellt, da nicht nur das zunehmende Alter der Patienten ein Risikofaktor für Mineralisationsstörungen und ein erhöhtes Frakturrisiko darstellt, sondern auch durch Erkrankungen wie zum Beispiel Osteoporose und Diabetes mellitus. Der Knochenstoffwechsel verändert sich und damit erhöht sich auch das Risiko für Komplikationen wie Wundheilungsstörungen. [3, 7, 8]

Knochenheilungsstörungen, im Sinne von atrophen Pseudarthrosen, werden am besten mit der autologen Spongiosaplastik behandelt. [9] Autologes spongiöses Knochen-Transplantat bleibt das wirksamste Transplantationsmaterial, da es die drei für die Knochenregeneration erforderlichen Elemente bereitstellt: Osteokonduktion, Osteoinduktion und osteogene Zellen. Außerdem sorgt es für die strukturelle Integrität, die für die Rekonstruktion größerer Defekte wichtig ist. [10]

Obwohl die autogene Transplantation mit mehreren Nachteilen, darunter begrenzter Knochenmenge, Schmerzen sowie Hämatomen und einer Komplikationsrate von bis zu 30% verbunden ist, stellt sie weiterhin den Goldstandard dar. [11, 12]

Aufgrund der genannten Komplikationen und der daraus entstehenden Komorbiditäten forscht man ständig nach effizienteren und komplikationsärmeren Therapieoptionen. Das Gebiet des Bone Tissue Engineering ist besonders zu benennen. In den letzten Jahren wurde das Verständnis der Signalwege der Zellen verbessert, sodass neue Ansatzpunkte der Therapien aufgenommen werden können. [13]

Somit ergibt sich in den bisher durchgeführten Forschungen noch kein Durchbruch und es braucht weitere Untersuchungen zum Verständnis der physiologischen Abläufe und damit einhergehend bessere Möglichkeiten der osteosynthetischen Verfahren.

2 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Effekt des Bone Sialoproteins (BSP) auf die Knochenregeneration in einem kritischen Kalottendefekt am Rattenmodell zu untersuchen. Dabei wird das BSP in verschiedenen Konzentrationen immobilisiert in Kollagengelen verwendet. Das Modell erfolgt gänzlich ohne Verwendung eines weiteren Knochenersatzmaterials; der Träger der Wachstumsfaktoren ist Kollagen Typ I. Aufgrund der verschiedenen Gruppen und Konzentrationen soll insbesondere die qualitative und quantitative Knocheninduktion untersucht werden. Als Positivkontrolle agiert das bone-morphogenetic protein-7, um einen morphologischen Vergleich zu erzielen. Es findet sowohl eine qualitative (Histologie) als auch quantitative Auswertung (μ Ct-Bilder, Analyse bone volume/total volume) statt.

3 Literaturdiskussion

3.1 Physiologie des Knochens

Die Knochen des Menschen sind besonders zug- und druckfestes Material, welches dennoch metabolisch hochaktiv und auch in seiner eigenen Struktur dynamisch ist. In der makroskopischen Betrachtung des Knochens ist zwischen zwei Bauformen zu unterscheiden: Spongiosa und Kompakta. Die Spongiosa besteht aus dünnen Trabekeln. Diese haben eine trajektorielle Ausrichtung und in ihren Zwischenräumen befindet sich Knochenmark. Diese Art von Knochen befindet sich in den Wirbelkörpern, den Schädelknochen, in den proximalen und distalen Enden des Femurs und einigen Weiteren. Die Kompakta ist die Corticalis der großen Röhrenknochen und bis zu 10 mm dick.

Die Zusammensetzung des Knochens lässt sich in Extrazellulärmatrix (EZM) und in die knocheneigenen Zellen unterteilen. Die Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen, die überwiegend dem Kollagen Typ I zugehörig sind. Ein weiterer großer Teil ist Hydroxylapatit, das aufgrund seiner Anordnung als Kristall imponiert. Einen weiteren, kleineren Anteil bilden Proteine wie Osteocalzin, Sialoproteine, Proteoglykane und Osteonektin. [14]

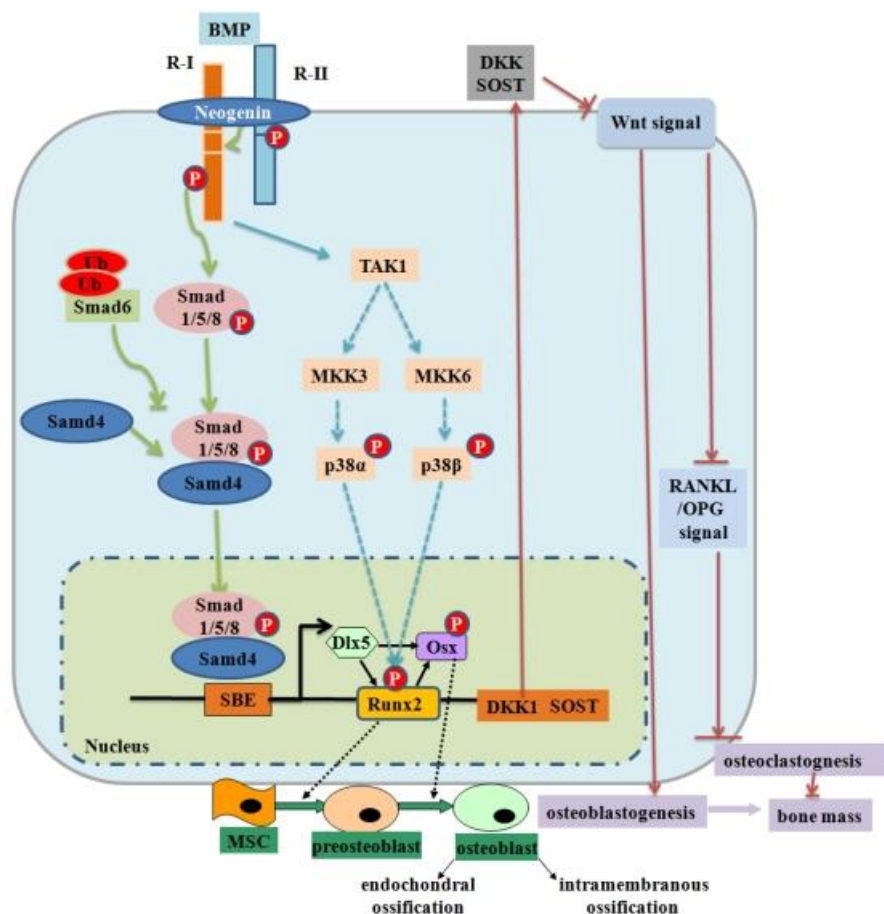


Abbildung 1: BMP-Signalisierungsweg. Aktivierte Smads bilden einen Komplex mit Smad4 und wandern dann in den Zellkern. Dort exprimieren sie die Transkriptionsfaktoren. Durch Hochregulierung der Runx2, Dlx5 und Osx- Gene erfolgt die Aktivierung der Differenzierung der Progenitorzellen zu Osteoblasten [15]

Die Zellen des Knochens sind Osteoblasten, welche im Verlauf zu Osteozyten differenzieren können, sowie Osteoklasten. Diese beiden Zellreihen sind im Zusammenspiel für den Auf- und Abbau der Knochenstruktur unerlässlich. Die Osteoblasten leiten sich aus Stammzellen ab. Durch Einwirkung lokaler Wachstumsfaktoren können diese nachgeliefert werden. Zu diesen lokalen Wachstumsfaktoren zählt unter anderem das Bone morphogenetic Protein, das über die Aktivierung des Smad-Weges die Runx2 Gene aktiviert. [15] Diese sorgen dafür, dass aus den mesenchymalen Stammzellen die Osteoblastendifferenzierung getriggert wird, wie man in der Abb. 1 erkennen kann. Ein weiterer lokaler Wachstumsfaktor ist der Tumorgrowth-Faktor β . Dieser ist im Zusammenspiel mit Parathormon ebenfalls für die Aktivierung des Runx2 Gens zuständig. Ausgebildete Osteoblasten synthetisieren zudem Kollagen für die EZM und steuern die Mineralisation. Der weitere Differenzierungsweg der Osteoblasten ist verschieden. Bis zu 20% werden zu Osteozyten, welche eine Vielzahl von Knochenzellen abbilden, die in den Knochen eingearbeitet werden. Ein weiterer Teil geht in den inaktiven Zustand zurück und der Großteil geht in die Apoptose über.

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, welche durch Fusion einkerniger Vorläuferzellen entstehen. Sie bilden zum Knochenabbau ein saures Milieu (pH ca. 4,5) durch H⁺ATPase und werden durch Endosomen aufgenommen. Ein aktiver Osteoklast hat eine Lebenszeit von ca. zwei Wochen und geht dann in die Apoptose über. Die Aktivierung und Erzeugung von Osteoklasten wird durch Osteoblasten gesteuert.

Der Knochenaufbau- und -abbau, ist durch viele Faktoren beeinflusst und somit ein Wechselspiel verschiedener Prozesse. Der physiologische Haushalt kann schnell von Umweltfaktoren, malignen Erkrankungen oder durch Hormone verändert werden und somit großen Einfluss auf den Abbau des Knochens nehmen. Da die meisten Veränderungen eine erhöhte Aktivierung der Osteoklasten nach sich ziehen, gehen diese mit einem Abbau des Knochens einher. [15–18]

Der Kalziumphosphathaushalt spielt hier zusätzlich eine wichtige Rolle. Der Knochen ist trotz seiner stabilen Funktion ein auf der Zellebene äußerst dynamisches Gewebe mit ständigen Auf- und Abbauprozessen. [19] So ist die normale Dynamik des Knochenaufbau- und -abbaus von immenser Bedeutung für die Frakturheilung. Diese Prozesse fungieren ebenfalls zusammen auf hormonell-komplexer Ebene. [20]

3.2 Frakturen – Heilung und Prozesse

Frakturen sind die häufigsten traumatischen Verletzungen des Knochens, welche eine ganze Kaskade von Prozessen in Gang setzen. Die Frakturheilung lässt sich in eine natürliche, auch als sekundär bezeichnete, und in eine primäre Frakturheilung unterteilen. Die primäre Frakturheilung ist gekennzeichnet durch die operative Osteosynthese, die beispielsweise mittels Anbringens von Platten und Schrauben an den Knochen durchgeführt wird. Es entsteht eine stabile Fixation, in der Lamellenknochen gebildet werden kann. Dennoch kommt es bei 5 bis 10% aller Frakturen zu einer fehlerhaften Knochenkonsolidierung, wodurch eine Pseudarthrose entsteht, welche im nachfolgenden Kapitel definiert wird. [3]

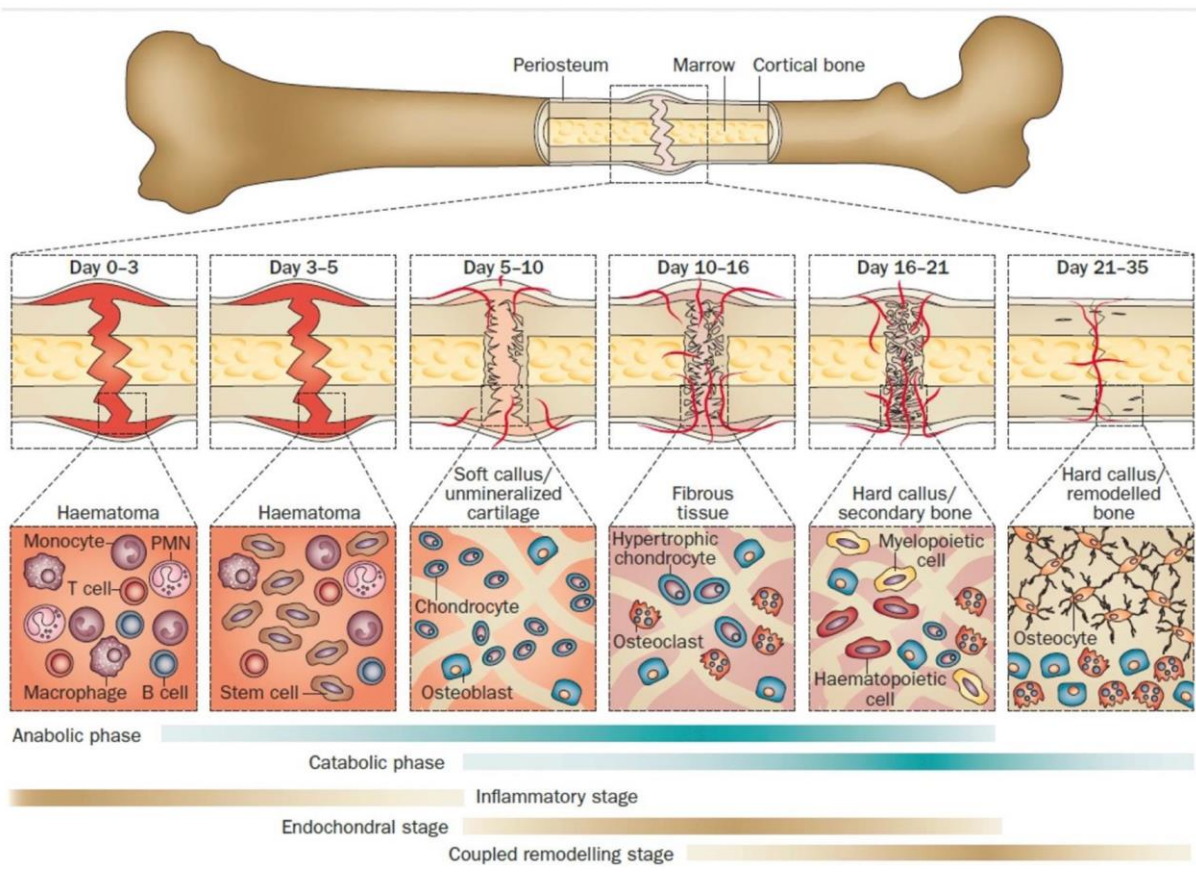


Abbildung 2: physiologischer Frakturheilungsprozess; blauer Balken: Stoffwechselphasen, brauner Balken: biologische Stadien [21]

Der Heilungsprozess kann generell in drei Phasen unterteilt werden: die Entzündungsphase, die Reparaturphase und die Umbauphase. [22] Dabei entsteht initial eine Zunahme des Zellvolumens aufgrund von einschwemmenden Stammzellen, die eine Knochen- und Gefäßbildung bewirken (siehe Abb. 2). [23, 24] In der Frühphase werden eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet, welche zu den immunmodulatorischen Mediatoren zählen. In Abb. 2 sieht man in der Frühphase das Einwandern der Zellen, die die Wachstumsfaktoren stimulieren. Sollte es zu einer dauerhaften Reizung des Gewebes kommen, oder auch zu einer Störung der Homöostase, wie es zum Beispiel bei Rauchern der Fall ist, kann es zu einer chronischen Entzündung kommen. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass es zu einer dauerhaften Ausschüttung von Mediatoren kommt, was wiederum zu einer fehlerhaften Wundheilung führt. [25, 26]

3.2.1 Pseudarthrosen

Die Pseudarthrose ist die maximale Form der Knochenheilungsstörung. Dieser voran geht die verzögerte Heilung, auch als „delayed-union“ bezeichnet, sowie die fehlende Heilung bzw. „non-union“. In der Regel spricht man von einer non-union, wenn nach neun Monaten keine Zeichen der Heilung zu finden sind, welche jedoch abhängig von der Lokalisation der Fraktur sind. In der Literatur wird eine Pseudarthrose als solche gewertet, wenn der Knochendefekt nicht innerhalb von sechs Monaten (siehe Abb. 3) verheilt und es zur Zwischenschaltung von inadäquatem Gewebe kommt. Daraus resultieren eine abnorme Beweglichkeit und Instabilität. Sie benötigt immer einen weiteren chirurgischen Handlungsbedarf. [27]

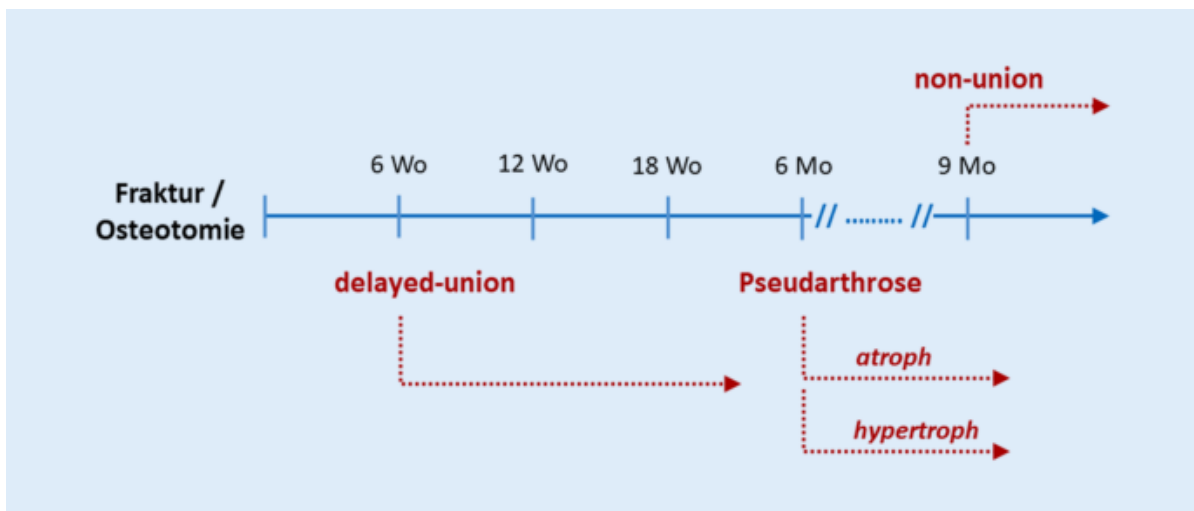


Abbildung 3: Chronologische Einordnung einer Knochenheilungsstörung. [28]

Die Pseudarthrose lässt sich unterteilen in eine hypertrophe und eine atrophe Form. Diese Unterformen stellen nicht nur hinsichtlich ihrer Genese, sondern auch ihrer Therapie massive Unterschiede dar. Die hypertrophe Störung geht mit einer Hypervaskularisation einher und es kommt aufgrund unzureichender Fixation beziehungsweise minimaler Bewegung zu einer Störung der Knochenkonsolidierung. Die Therapie ist die operative Fixation. Die atrophe Form zeichnet sich durch eine schlechte Revaskularisierung aus. Es können nekrotische Knochenfragmente und damit einhergehend Infektionen entstehen. [28] Die Therapie letzterer besteht aus der autologen Knochentransplantation. Der Vorteil ist die vollkommene Kompatibilität mit dem Patienten und die gute Heilungsrate. Aufgrund der Major-Komplikationsraten von bis zu 8,6%, welche unter anderem Infektionen und Reoperationen darstellen, ist die Entwicklung von Ersatzmaterialien ein wichtiger Ansatz. [11, 12]

3.3 Angiogenese

Die Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, der in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte in der Aufschlüsselung der Komponenten und deren Zusammenspiel

erfahren hat, da die Bildung neuer Gefäße ein entscheidender Bestandteil der Wundheilung ist. Wundheilungsstörungen zählen zu einem großen Feld der klinischen Medizin und verursachen neben hohen Kosten auch psychische Belastungen für Patienten aufgrund langer Krankheitsverläufe und unästhetischer Narbenbildung. [29, 30]

Die allgemeinen Phasen der Wundheilung wurden bereits in Kapitel 3.2 beschrieben.

3.3.1 Wundheilung

Die Ausbildung neuer Gefäße ist essenziell für die komplikationslose Heilung und damit auch ein wesentlicher Gegenstand von Untersuchungen mit weiteren proangiogenetischen Faktoren.

In der näheren Betrachtung der Angiogenese wird die Familie der VEGF immer wieder in den Mittelpunkt gestellt. Sie sorgen für eine erhöhte Permeabilität, weisen antiapoptotische Effekte auf die Endothelzellen auf und sind wichtig für die Ausbildung

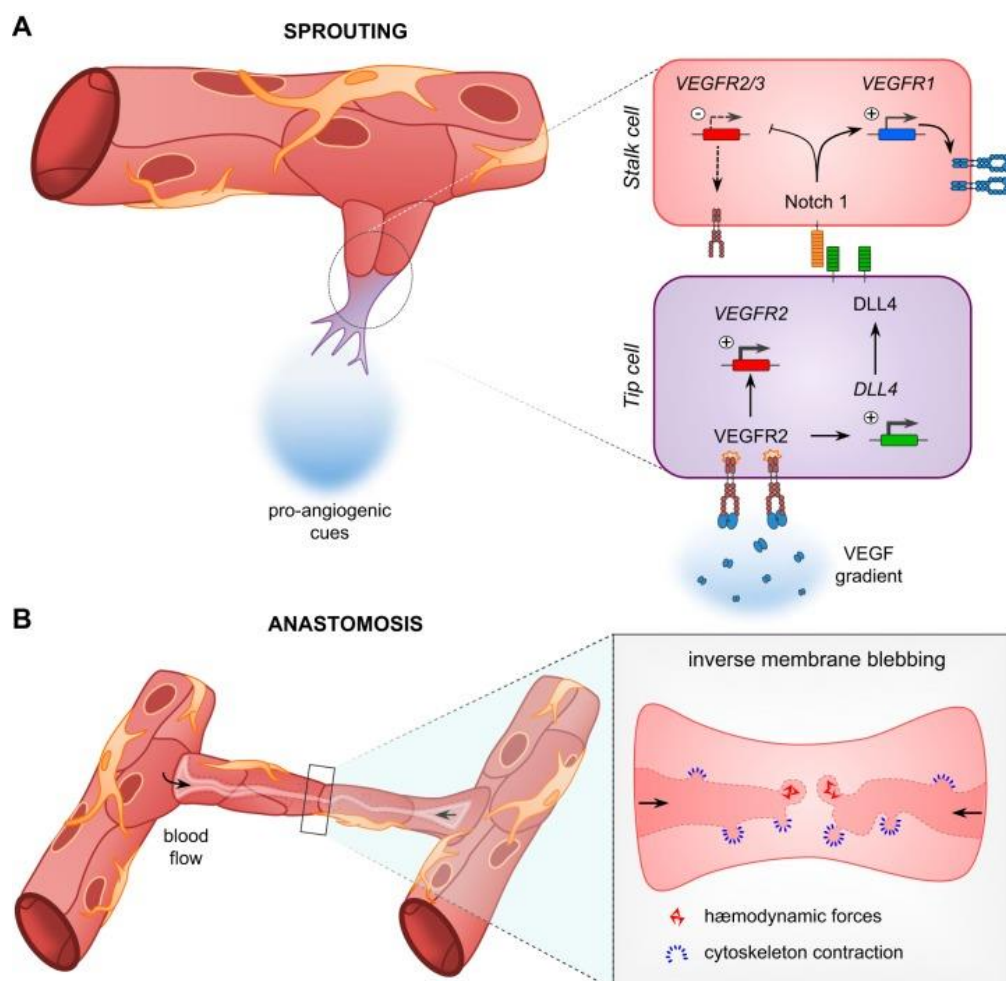


Abbildung 4. Nach Auflösung der Basalmembran erfolgt der lokale Umbau einhergehend mit Veränderung der EZM. Der bekannteste und wichtigste Faktor im Rahmen der Angiogenese ist der vascular endothelial growth Factor (VEGF) auch TGF- β , Angiogenin, Angiopoetin und humane Mastzelltryptase, oder der fibroblast growth factor-spielen eine wichtige Rolle [32]

neuer Gefäße. [31] So kommt es in der Heilung von Knochenbrüchen und in Wunden primär zur Ausschüttung von FGF-1 und 2 und aufgrund der auftretenden Gewebshypoxie wird VEGF freigesetzt, das an den VEGF-Rezeptor 2 bindet. Ein weiterer wichtiger Teil der Angiogenese sind Adhäsionsmoleküle. Dazu gehören die Integrinrezeptoren $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$. Diese interagieren mit der EZM über vorhandene RGD-Bindungsstellen der Rezeptoren. [32–34] Diese Rezeptoren werden in Wunden hochreguliert und sind kaum an bestehendem unverletztem Gewebe zu finden. [35] Damit kommt es zur Ausbildung neuer Kapillaren, bis sich ein neues Gefäß ausbilden kann.

So werden BSP, das auch die RGD-Sequenz besitzt, positive Effekte in der Neoangiogenese zugeschrieben. BSP interagiert mit Osteoblasten und Osteoklasten über alpha-beta-Integrinrezeptoren. Es wird angenommen, dass es über diesen auch von Endothelzellen exprimierten Rezeptoren zur Förderung der Angiogenese kommt. [36, 37]

Ein limitierendes Problem des Tissue Engineering ist die Vaskularisierung, die meist nicht ausreichend ist und zu einer Mangelversorgung an Sauerstoff und Nährstoffen führt. [38] Folge der entstehenden Mikrohypoxie kann eine Nekrose des Gewebes mit Entzündungsreaktion sein. Dadurch kann es zu einer Verzögerung oder gar kompletter Kompromittierung der Wundheilung kommen. So konnten Xiong et al. in ihrem Review von 2022 darlegen, welche Signalwege wichtig sind und wieso das sogenannte immune microenvironment eine Rolle spielen. Unter anderem wurde dort die Rolle des BMP-2 beschrieben, welches vor allem bei kritischen Knochendefekten produziert wird. [39] Untersuchungen haben gezeigt, dass bei kleineren Frakturen mit geringer Weichteilbeteiligung kaum eine Verzögerung der Wundheilung besteht. [40] Ist die Fraktur jedoch größer und der Weichteilschaden dementsprechend groß, ist es schwer eine steady state Oxygenierung des verletzten Gewebes zu erreichen. So ist gerade die Hypoxie des Gewebes ein wichtiger Faktor. Es konnte in einem Review gezeigt werden, dass stark hypoxische Bedingungen, hier definiert als unter 2% O₂, eine Hemmung der osteogenen Differenzierung zur Folge haben. [41] Dies zeigt, wie wichtig eine intakte Angiogenese ist.

3.4 Defektmodelle im Tier

Zur Testung von verschiedenen Materialien, die zur Knochenheilung beitragen können, gibt es diverse Tiermodelle. Die am häufigsten angewandten sind das „calvarial defect modell, long bone defect, partial cortical und cancellous defect modell“. [42] Die verursachten Knochendefekte sind so groß, dass sie als „critical size defect“ bezeichnet werden, d.h., dass diese Defekte ohne Behandlung nicht heilen werden. Die Modelle bieten individuelle Unterschiede, die in der Auswahl Beachtung finden müssen. McGovern et al. führte dies in ihrer Publikation aus und verglich die verschiedenen Bone Tissue Engineering (BTE)-Modelle. [43] Die klinische Übertragung jeglicher Ergebnisse im Tiermodell sollte mit Vorsicht erfolgen, da die physiologische Belastung und Knochenzusammensetzung, sowie endokrinologische Eigenschaften nur zum Teil übereinstimmen. Das Maus- und Rattenmodell sind die am häufigsten genutzten Tiermodelle im BTE. [44]

3.4.1 Calvarial Defekt Modell

Das Kalottendefektmodell ist eine standardisierte Methode, um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen. Es ist in der operativen Methodik einfach durchzuführen und hat bei richtiger Anwendung eine geringe Komplikationsrate. Das Modell ist radiographisch und histologisch gut auszuwerten. Zudem ist es kostengünstiger in der Haltung und Anschaffung im Vergleich zu Modellen mit größeren Tieren, z.B. Schweinen oder Hasen. Am häufigsten wird dieses Modell mit Ratten durchgeführt. [42, 45]

Die in dem Modell präparierten Knochen der Schädelkalotte selbst sind dem embryonalen Mesoderm entsprungen und sind ein aus desmaler Ossifikation bestehender Knochen. Damit hat dieser Knochen bei einem Defekt eine schlechtere Heilungstendenz. [46] Die standardisierten Defekte, bei denen keine Spontanheilung stattfindet, sind bei Ratten entweder 8 mm groß, als einzelner Defekt, oder 5 mm bei zwei Defekten. [47, 48]

Zudem trägt die flache, nicht tragende Form des Knochens zur Sicherheit der Methodik bei. So werden hier keine Schrauben oder Platten benötigt. [49] Dadurch ist dieses Verfahren geeignet, um aufgrund der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit neue BTE zu erforschen. [50, 51]

3.5 BSP

BSP gehört zu den kleinen Integrin-bindenden, Liganden-N-gebundenen Glykoproteinen und wird von verschiedenen Zellen, unter anderem Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert und ist ein wichtiger Teil der extrazellulären Matrix. Dazu gehören unter anderem Proteoglykane, Kollagen Typ I und nicht-kollagene Proteine wie Bone-Sialoprotein. Auch Osteonectin und Osteocalcin spielen eine Rolle in der extrazellulären Matrix. [52]

Neben dem RGD-Motiv (arginine-glycine-aspartic-acid) (siehe Abb. 5) enthält die BSP-Struktur Tyrosin-reiche Regionen, die die Zelladhäsion beeinflussen, sowie eine Kollagen-Bindungssequenz und Glutaminsäure-Regionen. [53, 54] BSP bindet an Typ-I-Kollagen mit hoher Affinität und an $\alpha\beta$ 3- und $\alpha\beta$ 5-Integrine, die die Zellsignalisierung vermitteln. [52] Eine Abwesenheit von BSP in Knockoutmäusen

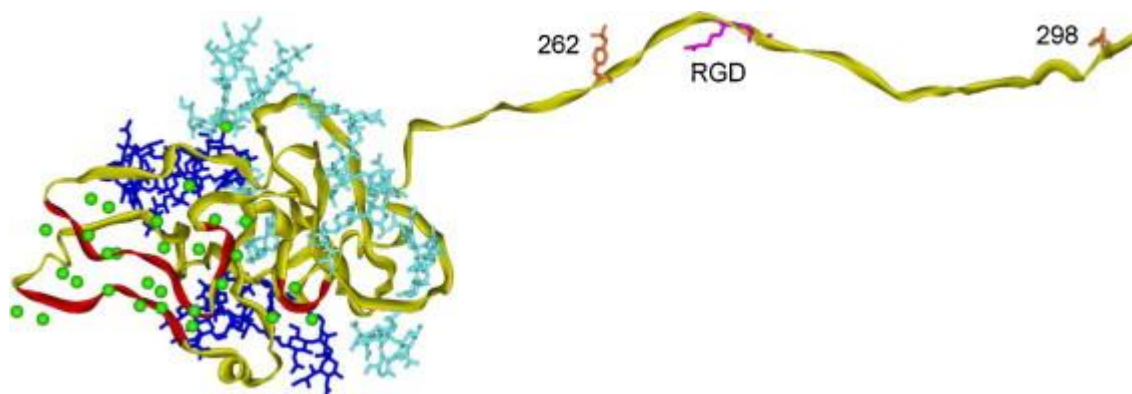


Abbildung 5: Bild eines BSP. Gelb: Proteinketten, Blau: Glycane grün: Calciumionen Magenta: RGD-Motiv [53]

konnte zeigen, dass es die Knochenmineralisation, sowie Neubildung und Resorption des Knochens beeinträchtigt. [55] In der embryonalen Entwicklung spielt BSP vor allem in der endochondralen Knochenwachstumsphase eine Rolle.

So ist BSP auch Gegenstand von Untersuchungen zur Verbesserung der Neoosteogenese und Neovaskularisation mit verschiedenen Implantatmaterialien. Darunter konnten Effekte auf das Knochenwachstum, die Angiogenese, aber auch Effekte auf Zellexpression und Differenzierung gezeigt werden. [37, 56–58]

BSP scheint zudem bei der Entstehung von Knochenmetastasen eine Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass BSP in einem Mausmodell negative Einflüsse auf die ossäre Metastasierung bei Lungenkarzinomen hat. Dies ist hilfreich, um sowohl die Signalwege von BSP weiter zu verstehen als auch therapeutische Ansätze zu finden. [59]

3.6 BMP

Die Familie der Bone morphogenetic Proteine wurde zuerst 1988 mit dem BMP-2 entdeckt, der als Wachstumsfaktor der Knochen- und Knorpelbildung identifiziert wurde. Daraufhin wurden weitere Teile der BMP-Familie untersucht. Die BMPs regulieren den Knochen- und Knorpelhaushalt und tragen zum Remodeling sowie zur Regulierung der Zellen bei. Sie sind außerdem wichtig für die Differenzierung und Apoptose der mesenchymalen Zellen. [60] Sie bilden die größte Untergruppe der β -Ligandenfamilie mit einer Vielzahl von Effekten, wie zum Beispiel die Differenzierung der Osteoblasten oder auf die chondrale Entwicklung. In den Knochen werden die Liganden BMP 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13 und 14 exprimiert. Es sind noch weitere bekannt, welche aber in der aktuellen Forschung wenig Relevanz haben. [61] Der Verlust von BMP 2 und 4 in der Phase der Entwicklung der Extremitäten von Mäusen hatte Veränderungen im Phänotyp der Hinterläufe zur Folge. Es konnte zu dem gezeigt werden, dass sich die Osteoprogenitorzellen nicht im vollen Umfang zu Osteoblasten ausbilden können, während BMP 7 kein essenzieller Faktor in der endochondralen Ossifikation darzustellen scheint. [62, 63]

3.6.1 BMP-2

Ein bekannter physiologischer und starker Wachstumsfaktor der BMP-Familie ist BMP-2. Dieses bindet an mesenchymale Stammzellen und fördert die Ausbildung von Osteoblasten und hat zudem einen Einfluss auf die Differenzierung von Adipozyten und Fibroblasten. [64] In einer Studie von 2002 zeigte sich unter dem Einsatz von BMP-2 eine beschleunigte Wund- und Frakturheilung bei Tibiafrakturen. [65, 66] Es unterstreicht damit die zumindest auf den Knochen positiven Effekte in Hinsicht auf die Knochenkonsolidierung. In der klinischen Anwendung sind die Erfahrungen weiter begrenzt. Die Anwendung von BMP-2 in Patienten mit Frakturen ist aufgrund der nicht spezifischen Wirkung zur Differenzierung zu Osteoblasten und möglichen Komplikationen in Form einer allergischen Reaktion bis hin zur Atemnot von der Food and Drug Association nicht mehr zugelassen. [67–69]

3.6.2 BMP-7

BMP-7 ist wichtig für die Differenzierung von Osteoblasten und erfüllt weitere Funktionen in der Embryogenese. In diesem Zusammenhang spielt es eine Rolle in der Regeneration von Knochenstrukturen. So war BMP-7 Gegenstand von Untersuchungen therapeutischer Optionen. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass BMP-7 einen deutlichen positiven Effekt auf die Knochenregeneration hat. [70, 71] Probleme ergaben sich jedoch das Protein stabil zu halten und kompatibel mit weiteren Materialien zur Implantation zu bekommen. [72] Es traten Nebenwirkungen und Komplikationen auf, wie zum Beispiel ein erhöhtes Risiko für Tumoren [69], so dass BMP-7 für den Patientengebrauch nicht mehr zugelassen ist.

3.7 Bone Tissue Engineering (BTE)

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl an Materialien, die in Studien als Träger oder endgültiges Material von Knochenersatz dienen. So bieten beispielsweise Metalle, Keramik oder polymerisiertes Material verschiedene Vor- und Nachteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen, die sich hauptsächlich aus der Kompatibilität der Beschaffenheit der Oberfläche ergeben. [73] Jedes Ersatzmaterial muss mit dem physiologischen Milieu kompatibel sein, um keine Fremdreaktion auszulösen und damit weitreichende pathologische Vorgänge zu aktivieren. [74, 75]

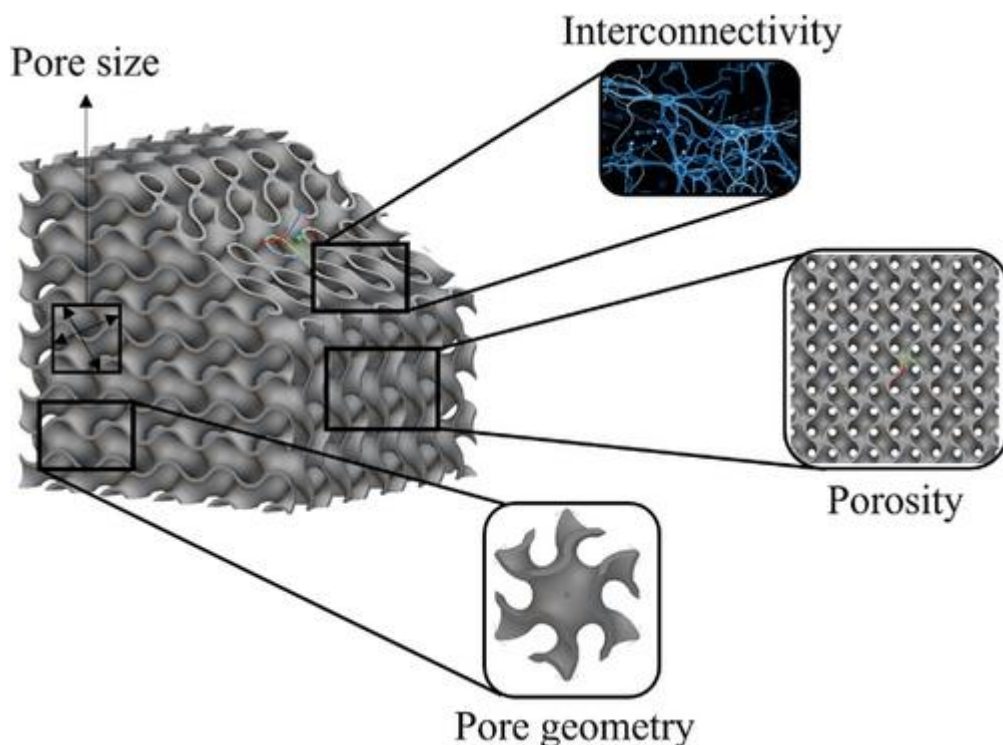


Abbildung 6 Schemenhaftes Bild zur Veranschaulichung der Eigenschaften eines BTE [75]

Es gibt Eigenschaften, die jedes BTE (Abb. 6) vorweisen muss. Dazu gehören

1. Poren unterschiedlicher Größe
2. Die Beschaffenheit des Materials
3. Die Anzahl der Poren im Verhältnis zur Oberfläche
4. Die Möglichkeit sich mit der Umgebung zu verbinden [76]

Die Wahl der Größe der Poren ist essenziell, um den Stammzellen im Knochen sowohl eine ausreichende Stabilität als auch den maximalen Kontakt mit der Umgebung zu geben. [77] Die richtige Größe der Poren muss an die Fragestellung angepasst sein, da verschiedene Größen einen unterschiedlichen Effekt im positiven oder negativen Sinne haben können. [78]

Die Oberfläche hat im besten Fall schon Eigenschaften, die selbst mit der Umgebung wie beispielsweise der EZM interagieren können oder haben die Eigenschaft sich modifizieren zu lassen, um positive Eigenschaften auf die Umgebung zu haben.

Die Porosität liegt je nach Anforderung zwischen 50% und 80%. Eine höhere Porosität sorgt für eine bessere Ausbreitung der Zellen, eine geringere sorgt für eine höhere Stabilität. [79, 80]

3.7.1 Keramik

In der Chirurgie hat Keramik aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften viele Anwendungen. Dazu gehören der Femurkopfersatz und Zahnkronen, die schon lange Bestandteil der Implantologie sind. Jedoch bieten Keramikimplantate in diesen Anwendungsgebieten keine Möglichkeit, mit dem Körper zu interagieren und die Osteoinduktion zu fördern. [81] Um mit den Zellen des Körpers zu interagieren, muss das Keramikmaterial verändert werden, z.B. indem man es mit Calciumphosphat mischt. [82, 83] Hier gilt es, die Herausforderung von mechanischer Stabilität und Porosität zu meistern, weshalb sie aktuell noch einen eingeschränkten Nutzen als BTE haben.

3.7.2 Polymere

Polymere können aus Kollagenen, Alginaten oder Chitosan bestehen und als BTE genutzt werden. Da die EZM des Knochens hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht, bietet es sich als Gerüst an. In Studien mit Kollagen konnte gezeigt werden, dass Kollagen einen positiven Effekt auf die Knochenheilung hat. [84, 85] Kollagen lässt sich zu dem einfach mit anderen Materialien kombinieren und ist damit ein idealer Träger für Proteine oder Zellen. [86] So konnten auch schon mit BMP-7 versetzte Adenoviren mit Polymeren verbunden werden. [87] Das Potenzial der Kombinationen ist noch nicht absehbar und bedarf weiterer Untersuchungen.

In Tiermodellen wurde im Zusammenhang mit Chitosan eine verbesserte Knochenregeneration nachgewiesen. Es hat auch zudem die Eigenschaft, Wachstumsfaktoren oder Proteine aufzunehmen. [88, 89]

3.7.3 Metalle

Aufgrund der Lebensdauer und Oberflächeneigenschaften werden metallische Implantate besonders am Patienten sehr häufig angewendet, wenn es zu einer Fixierung von Knochen kommen soll. Ein deutlicher Nachteil der Metalle ist die fehlende Anpassung an die mechanischen Eigenschaften des Knochens und kann so zu Lockerungen und Entzündungsreaktionen kommen. [73, 90] BTE findet in der Forschung der metallischen Legierungen immer häufigere Anwendungen. Insbesondere Zink, Eisen und Magnesium sind bioresorbierbar. Zudem haben sie antibakterielle und antimykotische und positive regenerative Eigenschaften. [91]

3.7.4 Kollagen Typ I

Es besitzt eine komplexe hierarchische Struktur bestehend aus zwei identischen alpha-1-Ketten und einer alpha-2-Kette (siehe Abb. 7), die hauptsächlich aus den Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin bestehen und sich zu einer Tripelhelix zusammenlagern. Diese alpha-Ketten besitzen ein RGD-Motiv und sind aufgrund ihrer funktionellen Gruppen gut modifizierbar. [52, 92]

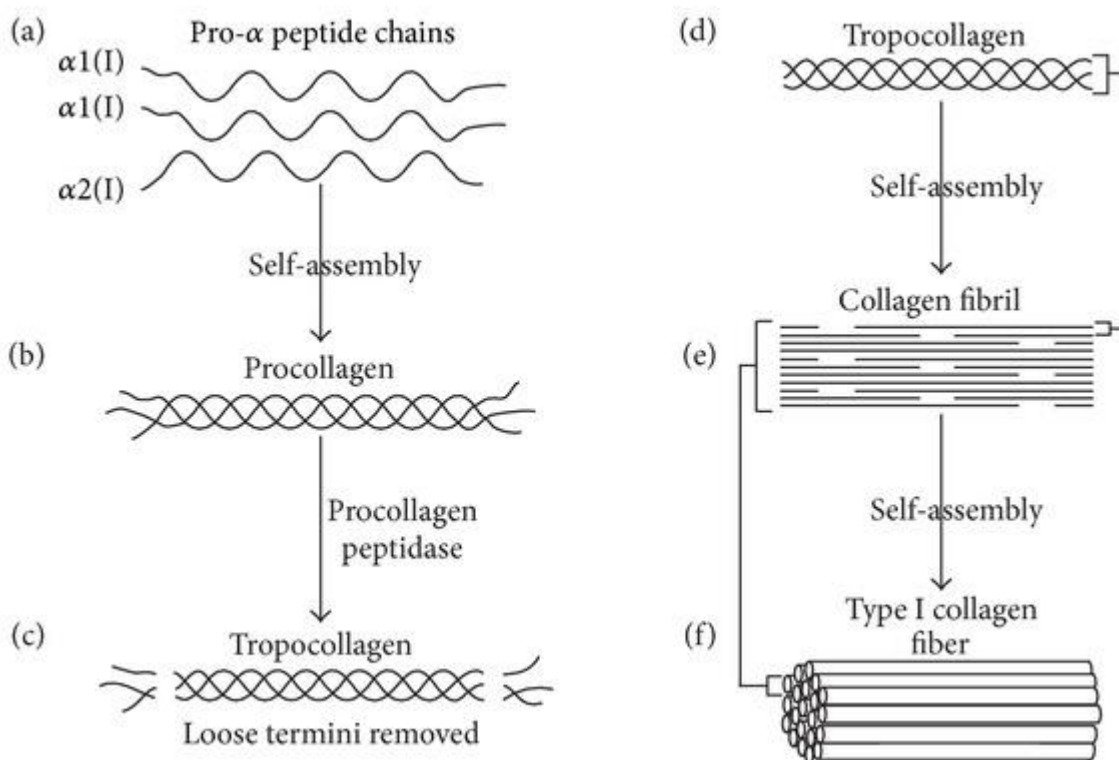


Abbildung 7: Aufbau von Kollagen Typ I. (a) drei alpha Ketten die sich zu zusammenlagern (b). (c-f) nach Modifikation erfolgt die zusammen Lagerung zu Kollagen Typ I. [52]

In der EZM des Menschen ist Kollagen Typ I am häufigsten vertreten. Dieser Typ kommt vor allem in Knochen vor und beeinflusst dort den Zellstoffwechsel. Kollagen Typ I hat den Vorteil, dass es biologisch abbaubar ist und selten zu Abstoßungsreaktionen führt. Zudem hat es eine hohe Porosität und bietet somit eine hervorragende Grundlage für eine gute Angiogenese. [93]

Aufgrund der genannten Eigenschaften und der guten Kompatibilität mit BSP entschieden wir uns für Kollagen Typ I als BTE.

4 Material und Methoden

4.1 Herstellung der Kollagen-Gele

Die Basis aller Versuchsreihen waren Kollagengele aus Kollagen Typ I. Diese dienten als Trägermaterial für die jeweiligen Proteine. Erst der Zusatz des jeweiligen BSP oder BMP-7 definierte das Gel.

Die Kollagene wurden streng nach Protokoll hergestellt. Dafür wurden die gekühlten Substanzen auf Eis zusammengemischt, da diese bei höheren Temperaturen in eine feste Form übergehen.

Das beinhaltete die Herstellung von 3 mg/ml Kollagen Typ I, bestehend aus dem zehnfach konzentriertem Medium199, 6% NaHCO₃ (7,5%ig) und 2,5% NaOH (1M), 16,5%igem Aqua dest. Damit ergab sich eine Konzentration des Kollagens von 3 mg/ml. Durch das Aqua dest. wurde die gewünschte Viskosität erreicht.

BSP wurde mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml oder 5 µg/l direkt in die Gele gegeben. BMP-7 wurde mit einer Konzentration von 2µg/ml hinzugefügt. 1 ml der Suspension wurden daraufhin auf einer 96 Wells Platte ausgegossen (siehe Abb. 8), welche unter Raumtemperatur aushärtete. Das Füllvolumen je ausgegossenem Gel betrug damit 75 µl.

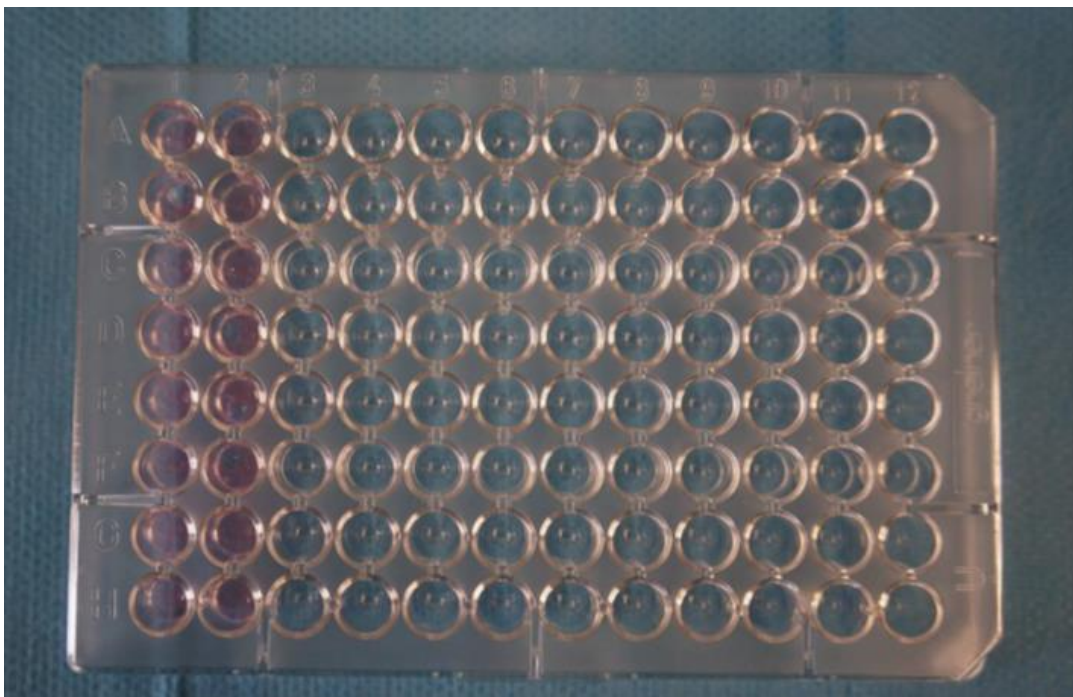


Abbildung 8: 96 Wells Platte, teilweise mit Kollagen-Gel befüllt

4.2 In vivo Untersuchung

Der Tierversuch wurde vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz mit der Tierversuchsantragsnummer G17-1-055 genehmigt.

Zur Untersuchungsreihe wurden 48 zehn Wochen alte Ratten der Wistarlinie (Janvier, France) verwendet und drei Tage vor der Operation akklimatisiert.

Die ausschließlich weiblichen Tiere wurden zu viert in Käfigen mit Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Die Futtergabe und Pflege erfolgten durch ausgebildetes Personal. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser. Für die postoperative Schmerzbehandlung wurden 1000 ml normales Leitungswasser mit 80 Hüben Tramadol versetzt. Um die Tiere an den Geschmack und Geruch des Wassers zu gewöhnen, wurde drei Tage vor OP begonnen sie damit zu versorgen.

Die Abbruchkriterien für den Versuch waren ein Gewichtsverlust von über 20%, abnormales Verhalten (z.B. stark verminderte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, struppiges Fell), sowie andauernde Schmerzen (Einschränkung der Bewegung, Verhalten) der Tiere. Um eine bessere Bewertung vornehmen zu können erfolgte die Erstellung eines Score Sheets mit folgenden Kriterien:

Score sheet für Abbruchkriterien:

Symptom	Kategorie
struppiges Fell	A
stark verminderte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme	B
Gewichtsverlust über 20 %	B/C
Einschränkung der Bewegung	B
andauernde Schmerzen	B/C

A: Versuchsleiter ist zu informieren. Qualitative und ausreichend frequente Beobachtung ist durchzuführen.

B: Das Tier muss dem Tierarzt vorgestellt werden.

C: Das Tier muss unverzüglich getötet werden.

Eine solche Auffälligkeit wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet.

4.2.1 Herstellen einer Narkoselösung

Die Narkose wurde zu je drei Teilen – Fentanyl, Midazolam, Medetomidin – in einem festen Mischungsverhältnis angesetzt und in Abhängigkeit zum Gewicht verabreicht. Die Verdünnung erfolgte mit 0,9% Natriumchlorid⁴. Dieses Verhältnis der Narkoselösung war ausreichend, um die Tiere bei einmaliger Injektion zu sedieren. Für eine 300g schwere Ratte ergab sich somit ein Injektionsvolumen von 500µl.

Wirkstoff	Konzentration der Stammlösung	Dosierung
Midazolam ¹	5mg/ml	5 mg/kg KG
Medetomidin ²	1mg/ml	500 µg/kg KG
Fentanyl ³	50µg/ml	50 µg/kg KG

1Midazolam, (Midazolam-ratiopharm 15mg/3ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Germany)

2Medetomidin, (Dorbene vet 1mg/ml, Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen, Germany)

3Fentanyl, (Fentanyl-Janssen 0,1mg/2ml, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany)

4Isotone Kochsalzlösung, (NaCl 0,9%, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)

4.2.2 Herstellen der Antagonisierungslösung

Damit die Tiere postoperativ schneller wach wurden, gaben wir den Tieren ein Antidot bestehend aus Flumazenil zur Antagonisierung des Benzodiazepins (Midazolam) und Atipamezol zur Antagonisierung des Sedativums (Medetomidin). Diese wurden in einem festen Mischungsverhältnis gewichtsadaptiert gegeben.

4.2.3 Operationsbereich

Der Operationsbereich wurde vor jeder Anwendung desinfiziert und mit sterilen Abdecktüchern vorbereitet. In der Mitte des Tisches befand sich die Wärmeplatte, die auf 37,0° eingestellt wurde und mit einem sterilen Abdecktuch versehen war. Sämtliche Instrumente und Materialien wurden auf dem Tisch platziert (siehe Abb 9). Die Tierkäfige wurden aus Platz- und Hygienegründen auf einem separaten Tisch platziert. Die kompletten Tabellen der benutzten Materialien befinden sich in Kapitel 8.



Abbildung 9: Materialansicht

4.2.4 Narkoseeinleitung

Die Narkose wurde den Ratten über eine Peritonealinjektion verabreicht. Nach erfolgter Narkoseeinleitung wurden die Ratten in ein separates Behältnis gesetzt, um die anderen Tiere nicht zu verunsichern. Nachdem die Tiere eingeschlafen waren, legten wir diese zeitnah auf die Wärmeplatte, um den Wärmehaushalt zu sichern (Abb. 10). Um sicher zu gehen, dass die Tiere operationsgeeignet sediert waren, wurde die stark sensibel innervierte Haut zwischen den Krallen der Hinterläufe als Reflexmarker genommen und regelmäßig mit einer Pinzette getestet, bis die Tiere keine Reaktion mehr zeigten, was nach ca. 5 Minuten der Fall war.



Abbildung 10: Narkotisierte Ratten mit rasiertem Schädel unmittelbar vor der Operation

Während der Narkose sind alle Schutzreflexe aufgehoben, so dass im Speziellen die Kornea vor Austrocknung und Schädigung geschützt werden musste. Des Weiteren wirkte das bei der Hautdesinfektion verwendete Braunol aggressiv auf die Hornhaut, weshalb Bepanthen Wund- und Heilsalbe auf die Augenoberfläche aufgetragen wurde, um diese zu schützen und vor Austrocknung zu bewahren.

4.2.5 Desinfektion

Zur besseren Desinfektion des zu operierenden Areals wurde den Tieren nach Gabe des Narkotikums das Fell mit einem Trockenrasierer entfernt, um eine bessere Hautdesinfektion zu gewährleisten. Danach wurde das OP-Gebiet mehrmals mit Braunol desinfiziert, um die Infektionsgefahr bestmöglich zu reduzieren.

4.2.6 Operation

Damit die Tiere möglichst wenig Stress ausgesetzt waren, wurde versucht die OP- Zeit möglichst gering zu halten. Dies wurde mit einer Arbeitsteilung der Operateure erreicht. Von dem ersten Schnitt bis zu Hautnaht dauerte es ca. 20 Min pro Tier.

Vor dem ersten Schnitt wurde nochmals die Narkosetiefe mittels Reflexe getestet. Die Schnittführung erfolgte möglichst in der Mediansagittallinie und so wenig invasiv

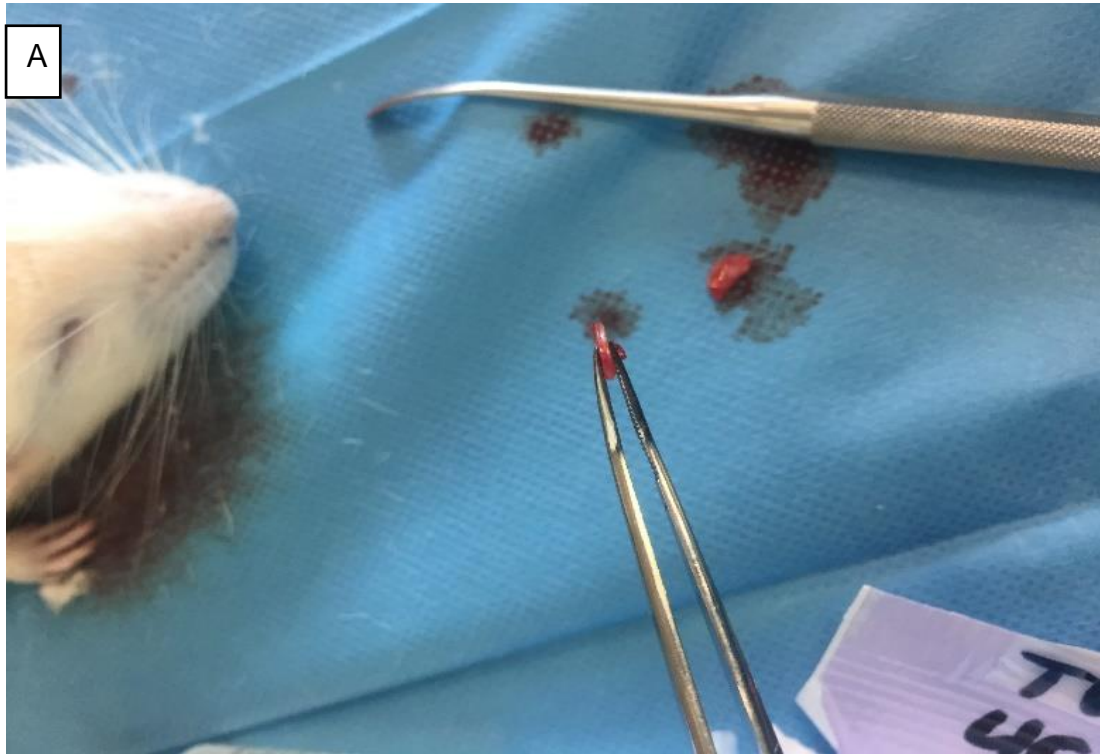


Abbildung 11: A: vollständiges Knochenfragment eines gesetzten Defektes; B: beide Defekte unter Schonung des Sinus sagitalis



Abbildung 12: Implantation der Ersatzstruktur

wie möglich. Nach dem Hautschnitt erfolgte der Schnitt durch die Kopfschwarte, um beide Os parietale freizulegen. Vor dem Bohrvorgang wurde das Periost mit Lidocain beträufelt und abermals der Reflex getestet, um die Narkosetiefe zu gewährleisten. Die Defekte wurden je links und rechts des Sinus sagittalis superior gesetzt, um eine größere Blutung zu vermeiden. Durchgeführt wurde der Vorgang mit einer Fräse, die ein Zirkuliermesser mit einem Außendurchmesser von 5 mm hatte.

Um das Risiko thermischer Schäden zu reduzieren, wurde während des Bohrvorgangs das Gebiet mit isotonischer Kochsalzlösung benetzt. Die Hohlfräse wurde unter leichtem Druck aufgesetzt. Um Verletzungen zu vermeiden, erfolgte eine intermittierende Prüfung der Defekte auf eine ausreichende Tiefe. Sobald der Knochen losgelöst war, wurde dieser mit Hilfe des Dissektors und einer feinen Pinzette entfernt (Abb. 11A). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Dura mater intakt blieb und kleinste Knochenstückchen entfernt wurden. Das zweite Bohrloch wurde aufgrund von Platzgründen und zur Schonung des Sinus sagittalis kontralateral und leicht diagonal versetzt platziert (Abb. 11B), mit der gleichen Vorgehensweise wie beim vorherigen Defekt.

Intakte Gefäßzeichnungen der Dura mater wurden als Indizien einer intakten Membran angesehen.

Trotz aller Risikominimierungen war das größte Problem die Gefahr der Verletzung der Dura mater und damit verbunden die Schäden des neuronalen Gewebes. Kam es zu solchen Verletzungen, wurde ausgiebig mit 0,9%-NaCl-Lösung gespült, um die Tiere zu stabilisieren, aber auch, um mögliche Störquellen gering zu halten.

Vor der Implantation der Gele selbst, wurde der Defekt nochmals genau begutachtet, um beurteilen zu können, ob am Rande des Defektes noch Knochen vorhanden war, der nachgefräst werden musste. Zusätzlich wurde die zugefügte Wunde mit 0,9%-NaCl-Lösung gespült, um auch geringste Knochenfragmente und somit unerwünschte Ossifikationsquellen zu entfernen. Anschließend wurde das Gel eingesetzt und auf zentralen Sitz geprüft, damit es in direktem Kontakt mit dem Knochen stand (Abb. 12).

Die Versorgung des Schnitts erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Kopfschwarte mit Einzelknopfnähten adaptiert, damit die Hautnähte spannungsfreier waren. Dafür wurde das Nahtmaterial Vicryl Plus ungefärbt geflochtene 4-0 resorbierbar verwendet. Die Hautnähte wurden mit monofilem, nicht-resorbierbarem 4-0 Nahtmaterial in Einzelknopftechnik versorgt (Abb.13A und B). Nachdem die Wunde zugenäht war, wurden die Tiere wieder zurück auf die Wärmeplatte gelegt, um weitere Auskühlungen zu vermeiden.

Die Tiere wurden anschließend mit Flumazenil und Atipamezolan subkutan antagonisiert, damit die Aufwachphase verkürzt wurde und damit eine erste neurologische Beurteilung nach möglichen Verletzungen vorgenommen werden konnte. Ferner konnte dadurch ein verbesserter Wärmehaushalt gewährleistet werden, da die Tiere wieder in ihren normalen Stoffwechsel zurückkehrten. Die Tiere wurden anschließend gemeinsam und aneinandergereiht in den Käfig gelegt und zugedeckt. Bis zum Aufwachen aller Tiere blieben diese unter Beobachtung.

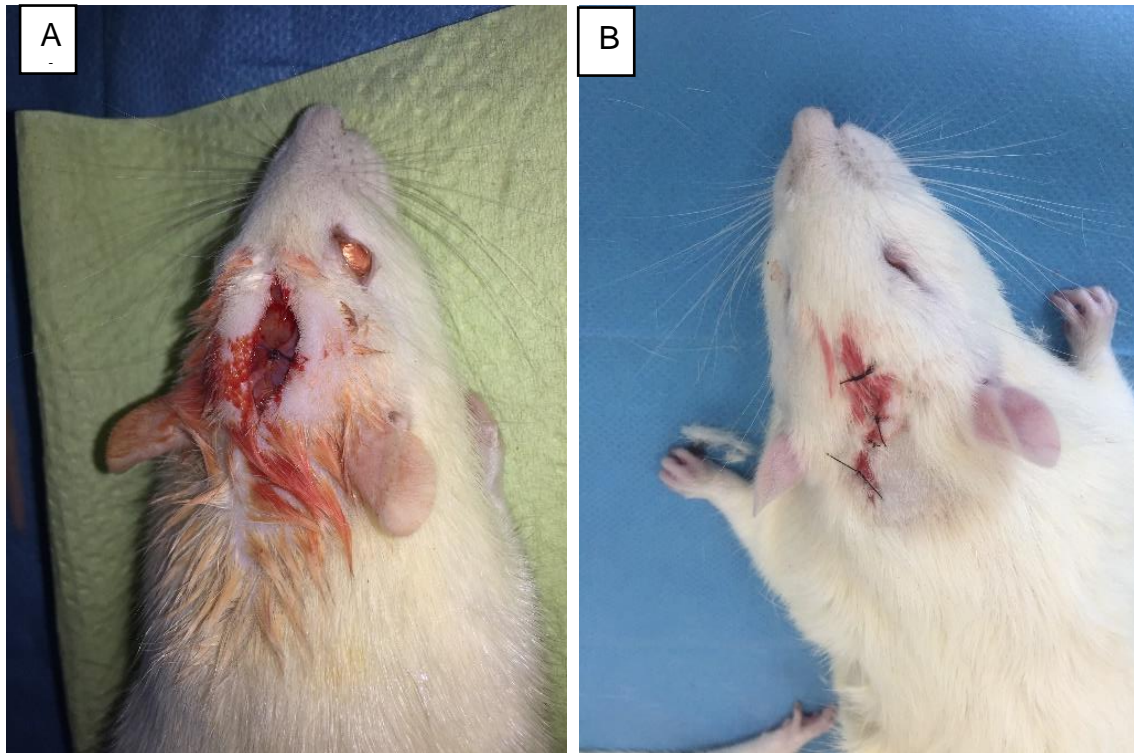


Abbildung 13 A: Fasziennaht; B: Hautnaht mit kompletter Adaption der Wundstellen

4.3 Einteilung der Gruppen

4.3.1 Leerkontrolle

Um eine Beurteilung des kritischen Defekts ohne jegliche Unterstützung durch das Kollagen Scaffold zu beurteilen, gab es eine Gruppe, der nur der kritische Defekt zugesetzt wurde, aber kein Gel eingesetzt wurde. Eine solche Versuchsgruppe zeigt die möglichen Auswirkungen des kritischen Defektes selbst, ohne jegliche Behandlung. Die Nachsorge der Tiere unterschied sich nicht zu der aller anderer Tiere.

4.3.2 Kollagengel

Die Gruppe der Kollagengele bestand aus unbehandelten Kollagengelen. Diese enthielten keine Wachstumsfaktoren, sodass die Auswirkungen der Kollagengele als solche interpretiert werden konnten und diese von der Wirkung der Zusätze unterschieden werden konnten.

4.3.3 BSP

Das Hinzufügen des BSP erfolgte in einer Konzentration für die 5µg/ml und mit 0,5 µg/ml. In der Folge wurden diese Ebenso wie die BMP-7 Gele erst kurz vor Zusammensetzung hinzugefügt, um Störquellen zu vermeiden.

4.3.4 Positivkontrolle/BMP-7

Das BMP-7 wurde mittels Aqua dest. aufgelöst, so dass eine Konzentration von 2µg/ml in den Gelen bestand. Diese wurden exakt nach Angaben des Herstellers verarbeitet. Damit Zeit und Wärme nur einen geringen Einfluss auf die BMP-7 versetzten Gele hatten, erfolgte die Zusammensetzung erst kurz vor Implantation. BMP-7 als potenter Wachstumsfaktor wurde in vielen Tiermodellen benutzt und hat sich als gute Referenz bewährt. Eine klare Konzentration in der Literatur ist nicht beschrieben, eher herrscht eine unterschiedliche Bandbreite von Konzentrationen in der Anwendung.

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Leerkontrolle	Kollagengel ohne Zusatz	Kollagengel + 0,5 µg BSP	Kollagengel + 5 µg BSP	Kollagengel + 2 µg BMP-7

Tabelle 1: Übersicht der Gruppen

4.3.5 Komplikationen

Aufgrund der zwei gesetzten Defekte jenseits des Sinus sagittalis kam es intraoperativ zu keinen größeren Blutungen und nur sehr selten zu Verletzungen der Dura. Während der ersten postoperativen Tage wurden die Tiere täglich begutachtet. Spätestens 24 Stunden nach der OP waren die Nebenwirkungen der Narkose aufgehoben. Die Schmerztherapie der Tiere war suffizient, so dass keines der Tiere postoperative Einschränkungen der Mobilität und Ernährung hatte. Es traten keine postoperativen Infektionen oder Nahtinsuffizienzen auf.

4.4 Entnahme der Gewebeproben

Die Tötung der Ratten erfolgte in zwei Gruppen, einmal nach drei Wochen und einmal nach acht Wochen. Die Tötung der Tiere erfolgte durch CO². Durch die Überdosierung des Gases kam es zu einer raschen Atemdepression und damit zur Asphyxie, womit der schmerzlose Tod gewährleistet war.

Danach wurde die Ratte auf einem Abdecktuch gelagert, mit einem Trockenrasierer wurde ihr der Kopf rasiert und in mehreren Durchgängen mit Enthaarungscreme eingeschmiert, so lange bis alle Haare entfernt waren. Im Anschluss daran wurde mit Skalpell und grober Präparierschere auf Höhe des ersten Halswirbels der Kopf entfernt. Zur einfacheren Lagerung des Schädels in 3,7%iger Formaldehydlösung wurden die Kaumuskeln, restliche Nackenmuskulatur, Ohren und der Unterkiefer entfernt. Die Dauer der Lagerung im Formaldehyd betrug mindestens drei Tage.

Ausgenommen von dieser Art des Todes sind die Tiere mit acht Wochen Standzeit, die für die Microfil-Präparation vorgesehen waren.

4.4.1 Präparation

Um den Schädel optimal im mikro-CT(μ -CT)-Gerät zu platzieren, wurde das Präparat weiter zugeschnitten. Dafür wurde der Schädel mit Skalpell und kleiner Säge kurz hinter den Augen am Os frontale und am Os occipitale bearbeitet. Um die Höhe des Schädels zu verringern, wurde der harte Gaumen entfernt, wodurch eine annähernd plane Fläche erreicht werden konnte, damit der Schädel im μ -CT eine ordentliche Lage hatte.

4.5 Radiologische Erfassung des neo-ossifizierten Gewebes

Als bildgebende Diagnostik dienten Röntgenbilder der Schädel im Verlauf des Versuchs und die computertomographische Darstellung zum Ende des Versuchs.

4.5.1 Röntgenkontrolle

Postoperativ wurden alle Tiere geröntgt. Von jeder Gruppe wurden zwei Tiere ausgewählt, die einmal pro Woche geröntgt wurden, um zu schauen, ob und welche röntgenologischen Veränderungen zu finden waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass mindestens ein Defekt deutlich zu sehen war und dieser auch im Verlauf immer wieder gut abgebildet wurde, um einen ersten Eindruck über die quantitative Ossifikation zu erhalten. Dafür wurden die jeweiligen Tiere einmal pro Woche in Narkose gelegt, um sie dann für die röntgenologische Untersuchung auszurichten.

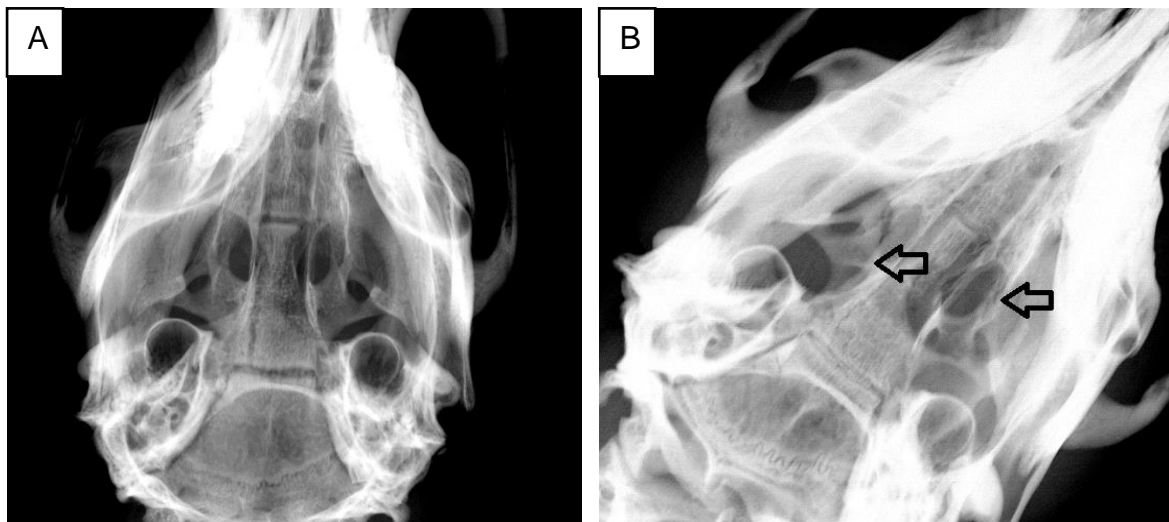


Abbildung 14: A: direkte postoperative Kontrolle eines Leerdefekts; B: Kontrolle nach 8 Wochen eines Leerdefekts; Pfeile zeigen direkt auf Defekt

4.5.2 μCT-Untersuchung

Die Entwicklung von Knochengewebe wurde anhand eines hochauflösenden Mikrocomputertomographie-Scanners (μCT) (Modell CT 40, SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) untersucht. Für die μCT-Analysen wurden Parameter von 70 kV und 114 μAmp verwendet, wobei die Voxelgröße auf 30 μm festgelegt wurde. Die erfassten Daten wurden mittels ImageJ analysiert, wobei das BoneJ-Plugin speziell zur Bestimmung der Knochenvolumen/Gesamtvolumen-Fraktion (BV/TV) eingesetzt wurde.

4.6 Histologie

Die histologische Untersuchung wurde an allen Tieren durchgeführt, es wurden allgemein- und immunhistochemische Färbungen angewandt.

4.6.1 Vorbereitungen

Um die Schnitte optimal herzustellen, wurden die Präparate über einen Zeitraum von 14-21 Tagen in einer 10%igen EDTA-Lösung entkalkt. Nach der Entkalkung wurden diese dann auf die endgültige Größe von ca. 2 x 2 cm für die Paraffinbettung zugeschnitten und in die aus Kunststoff bestehenden Kapseln eingeschlossen. Anschließend wurden diese zur Vorbereitung auf die kommende Dehydrierung mit Aqua dest. gewässert. Nach ca. 24 Stunden wurden die Kapseln samt Inhalt dem Einbettautomaten übergeben, um dort dann dehydriert und paraffiniert zu werden.

Es folgte das Kühlen des Paraffinblockes, um anschließend unter Einsatz des Schlittenmikrotoms histologische Schnitte von jeweils 5 μm Dicke zu erstellen. Jeder 11. Schnitt wurde behalten und auf einen Objektträger gebettet. Die Schnitte dazwischen wurden verworfen. Um die Färbungen vornehmen zu können, mussten die Schnitte wieder entparaffiniert werden, was mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe erfolgte.

Entparaffinierung	
3 x 10Min	Xylol
5Min	100% Alkohol
5Min	96% Alkohol (Mischung mit Aqua dest.)
5Min	70% Alkohol (Mischung mit Aqua dest.)
5Min	50% Alkohol (Mischung mit Aqua dest.)
	bis zur Färbung Aqua

Tabelle 2: Vorgehensweise der Entparaffinierung

4.6.2 Hämatotoxylin- Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist als Übersichtsfärbung geeignet und zählt zum histologischen Standard. Hierbei wird der natürliche basische Farbstoff Hämatoxylin eingesetzt, der saure und basophile Strukturen anfärbt und dazu führt, dass vor allem DNA und auch das raue Endoplasmatische Retikulum inklusive der Ribosomen eine blaue Färbung erhalten. Das künstlich hergestellte Eosin wird im Gegensatz dazu genutzt, um azidophile Strukturen anzufärben. Dieses färbt somit Mitochondrien, Cytoplasma und Kollagen. Ein dazu erstelltes Färbeprotokoll sorgte somit für eine einheitliche Färbung. (Siehe Tab. 3) [94]

HE-Färbung	
	Entparaffinierte Schnitte
5-7 min	Hämalaun
10 min	Fließendes Bläuen mit Leitungswasser
3 min	Eosin G 0,5%, wässrig + 1 TR. Eisessig auf 100 ml Lösung
Kurzes Abspülen	Aqua dest.
	Differenzieren mit aufsteigender Alkoholreihe; 70%, 2 x 96%, 2 x 100%
30 min	Zwischenschritt mit Xylol, mit zweifachem erneuern
	Eindecken mit Cytoseal

Tabelle 3: HE-Färbeprotokoll

4.6.3 Elastica van Gieson (EvG)

Diese Färbung erfolgte vor allem für Anfärbung der Gefäßwände und auch der kollagenen Fasern. Die histologischen Schnitte wurden für 5 min in Hämatoxylin gebadet und anschließend für 10 min in destilliertes Wasser gelegt. Anschließend erfolgt die Färbung mit Resorcin-Fuchsin, um danach erneut wieder für 10 min in destilliertem Wasser eingelegt zu werden. Dann erfolgt die letzte Färbung in Pikrinsäure-Säurefuchsin für 5 min, um anschließend in einer Alkoholreihe die Färbung zu beenden. Durch diese Färbung wurden die Kollagen- und Knochenstruktur grün und blau angefärbt. [95] In Tab. 4 ist das Färbeprotokoll zu sehen.

Elastica van Gieson Färbung	
	Entparaffinierte Schnitte
20-30 min	Resorcin- Fuchsin
10 min	Aqua dest.
Kurz	Ethanol 80%
2-3 min	Hämatoxylin
Kurzes Abspülen	Aqua dest.
5 min	Pikrinsäure-Säurefuchsin
	Differenzieren mit aufsteigender Alkoholreihe; 70%, 2 x 96%, 2 x 100%
30 min	Zwischenschritt mit Xylol, mit zweifachem erneuern
	Eindecken mit Cytoseal

Tabelle 4: EvG-Färbeprotokoll

4.6.4 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MGT)

Die MGT-Färbung wird vor allem zur Differenzierung von Gewebsbestandteilen eingesetzt. Insbesondere Knochen, Bindegewebe und Muskulatur als solche, lassen sich gut unterscheiden. Die hierzu eingesetzten Farbstoffe haben ein unterschiedliches Spektrum. Während das bei der HE-Färbung eingesetzte Hämatoxylin die Zellkerne anfärbt, sorgt die Ponceau-Säurefuchsin-Lösung im Zusammenspiel mit der Phosphorwolframsäure-Orange G Lösung und Lichtgrün für eine unterschiedliche Darstellung der Bindegewebebestandteile. [96] Das Protokoll der Färbung ist Tab. 5 zu entnehmen

Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	
	Entparaffinierte Schnitte
5 min	Hämatoxylin nach Weigert
Sekunden	Aqua dest.
10-15 min	Bläuen unter Leitungswasser
Sekunden	Aqua dest.
20-30 s	Spülen mit 1% Essigsäure
10 min	Inkubation in Ponceau-S-Lösung (Goldner I)
20-30 s	Spülen mit 1% Essigsäure
10 min	Inkubation in Phosphorwolframsäure-Orange G Lösung (Goldner II)
20-30 s	Spülen mit 1% Essigsäure
10 min	Inkubation in Lichtgrün-Lösung
20-30 s	Spülen mit 1% Essigsäure
Sekunden	Aqua dest.
	Differenzieren mit aufsteigender Alkoholreihe; 70%, 2 x 96%, 2 x 100%
15 min	Zwischenschritt mit Xylol, mit zweifachem erneuern
	Eindecken mit Cytoseal

Tabelle 5: MGT-Färbeprotokoll

4.6.5 Immunhistologische Färbungen

Die Immunhistochemische Untersuchung mit dem CD31, auch bekannt als PECAM-1 (Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1), erfolgt vor allem als Marker der Angiogenese. CD31 wird auf der Oberfläche von Endothelzellen und in geringerem Maße auf einer Reihe von hämatopoetischen Zellen wie Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen und T-Zell-Subtypen exprimiert. [97] Die Färbung fand in dem Verhältnis von 1:50 statt. Der Ablauf der Färbung ist in Tab. 6 zu entnehmen. Durch die Bearbeitung des Schnitts mit Proteinkinase K wurden Membranen und Proteine angedaut, was zu einer besseren Antigendemaskierung führte. Nach Behandlung durch den Primärantikörper CD31, wurde in dieser Zwei-Schritt-Methode ein Sekundärantikörper, der eine hohe Biotinylierung aufweist, hinzugefügt. In der Folge wurde der Schnitt mit Streptavidin behandelt, damit der Primärantikörper detektiert werden konnte. Dadurch kam es im Weiteren zu einer bräunlichen Ausfällung des

Chromogens. [98] Zum Schluss erfolgte eine Gegenfärbung mittels Hämatoxylin zur weiteren Differenzierung der Zellkerne.

Immunhistochemische Färbung	
	Entparaffinierte Schnitte
10 min	Proteinkinase K
5 min x 2	Dilbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS)
30 min	3 % H ₂ O ₂
5 min x 2	DPBS
	Transfer in den Sequenza
30 min	10 % Horse Serum
	Primärantikörper CD31 1:50 Inkubation über Nacht bei 4°C
5 min x 2	DPBS
10 min	Sekundärantikörper Biotinylated Link (Ziegen-Anti-Maus und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobuline)
5 min x 2	DPBS
10 min	Streptavidin-konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)
5 min x 2	DPBS
5 min	3-3'-Diaminobenzidin (DAB)- Chromogen
20 sec	Destilliertes Wasser
3 min	Hämatoxylin
10 min	Bläuen unter Leitungswasser

Tabelle 6: CD-31 Färbeprotokoll

4.7 Anwendung des Microfil

Ein Teil der Tiere mit acht Wochen Standzeit wurde zusätzlich mit Microfil präpariert. Zum Einsatz kamen hierfür ein Mehrkomponentengemisch von Microfil. Dieses bestand aus dem Diluent, Compound und Curing Agent. Es erfolgte die Zusammenmischung von 7,5 ml Diluent mit 6 ml Compound. Unmittelbar vor der

Perfusion erfolgte die Zugabe von 4 ml des Curing Agent. Nach der Zugabe des Curing Agent erfolgte die schnelle Verarbeitung, da das Gemisch nach ca. 20 min aushärtet.

4.7.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung wurden alle dafür vorgesehenen Komponenten auf dem Präpariertisch platziert. Da das Microfil sehr adhärent und toxisch war, musste der Tisch mit Abdecktüchern ausgestattet werden und es erfolgte das Anziehen eines zweiten Paar Handschuhe zum Schutz. Die zu benutzenden Utensilien sind der Abbildung 15 zu entnehmen.



Abbildung 15: Bereitgestellte Utensilien zur Präparation des Microfil

4.7.2 Intervention

Da dieses Verfahren für die Tiere tödlich ist und dennoch eine Schmerzlosigkeit gewährleistet werden muss, wurden die Tiere mit dem gleichen Narkotikumgemisch wie bei der Operation per Intrapertonealinjektion sediert, jedoch in mindestens doppelter Dosis, so dass dieses auch potenziell tödlich für die Tiere war. Nach der Gabe des Medikamentes, wurde gewartet, bis der Reflex an den Hinterläufen

erloschen war. Die Ratte wurde dann mit Hilfe von vier Kanülen, an jeder Pfote eine, auf dem Styropor fixiert. Es musste schnell gearbeitet werden, da für die Applikation des Microfil noch ein intakter Kreislauf benötigt wurde.

Um keine inneren Organe zu verletzen, wurde die Blase palpiert und über der Blase zur besseren Sicht auf das Gewebe das Fell entfernt. Danach wurde in der Mediansagittalebene ein 1,5 – 2 cm großer Hautschnitt gesetzt, wobei sehr genau darauf geachtet wurde, dass keine inneren Organe verletzt werden. Dazu wurde die Haut mit einer Pinzette auf Spannung gebracht. Nach erfolgreicher Eröffnung der Peritonealhöhle, wurde eine scharfe Schere eingesetzt, um das Fell bis zum Hals zu eröffnen. Dies wurde weiter nach lateral unterminiert, so dass es nicht im Behandlungsgebiet störte. Jetzt lag der Brustkorb frei und die Sicht aufs Zwerchfell war gegeben.

Anschließend wurde die Brusthöhle per Stichinzision ins Zwerchfell eröffnet, damit jetzt per Schere die Rippen in Höhe der vorderen Axillarlinie bis zur letzten noch zu fassenden Rippe durchtrennt werden konnten, um eine freie Sicht auf Herz und Lunge zu erhalten. Hier wurde peinlichst darauf geachtet, dass es zu keiner Verletzung der Thoraxorgane kam. Zur besseren Handhabung wurde der frei liegende Teil des Brustkorbs am kranialsten Teil abgeschnitten und beiseitegelegt.

Jetzt wurde am freiliegenden Herzen mit einem Butterfly die Herzspitze punktiert, um zum linken Ventrikel zu gelangen. Das rechte Herzohr wurde mittels Schere eröffnet, um den geschlossenen Kreislauf zu unterbrechen. Um die Perfusion auf den oberen Teil des Körpers zu beschränken, wurde zusätzlich die thorakale Aorta mittels Klemme unterbrochen.

Anschließend wurden mittels Perfusionspritze ca. 15 ml des NaCl-Heparin-Gemischs injiziert. 1000 IE Heparin wurden in 50 ml NaCl aufgelöst. Ab dem Zeitpunkt, an dem am rechten Herzohr klare Flüssigkeit austrat, stellten wir den Drei-Wegehahn um, so dass langsam das Microfil mit 2 ml pro Minute perfundieren konnte. Auch hier war der Vorgang beendet, sobald am rechten Herzohr die gelbe Flüssigkeit austrat, was zumeist nach 8 ml der Fall war. Anschließend wurden die Tiere in kleine Plastikbeutel gepackt und zum Aushärten des Microfil für 24h bei 4°C gelagert.

Nach der Zeit des Aushärtens wurden die Tiere weiterbehandelt wie die Tiere ohne Microfil. Die Auswertung erfolgte visuell mittels μ CT.

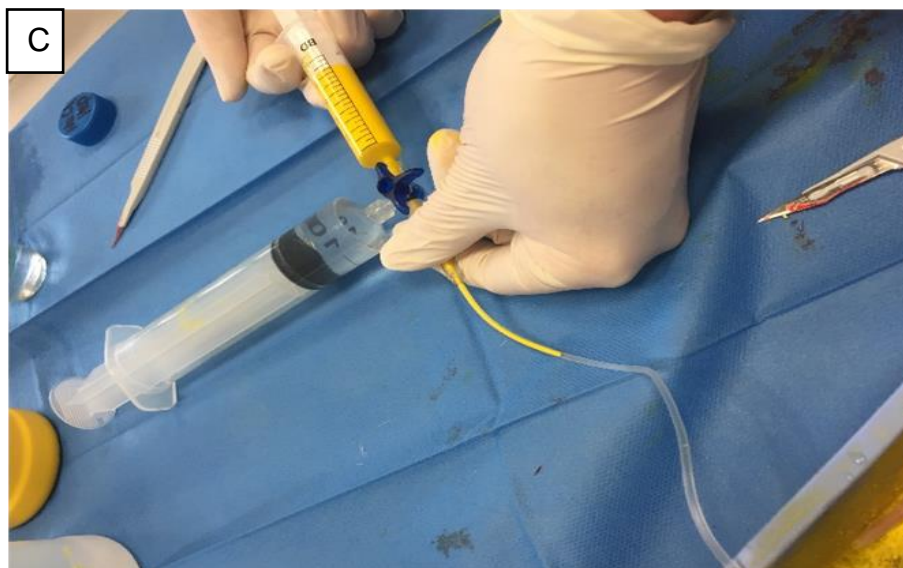


Abbildung 16 A: Narkotisierte Ratte mit teilrasiertem Abdomen
B: Freilegung des Herzens,
C: Applikation der Heparinlösung und des Microfil per 3-Wegehahn

4.8 Auswertung der μ CT-Daten und Semiquantitative Analyse

Um die DICOM generierten Bilddaten zu vermessen, bearbeiten und umzuwandeln, bedienen wir uns der Software Image J. [99] Damit die Ergebnisse vergleichbar waren, wurden die erstellten Slices zu einem Stack geformt. Danach erfolgte durch die Software die Erzeugung eines Binary, wodurch die Datenmenge merklich reduziert wurde. Zudem entstand ein schwarz-weißes Bild. Dadurch konnten Knochenstrukturen, da diese eine höhere Dichte besitzen, von anderen Strukturen wie elastischem Gewebe oder Gefäßen abgegrenzt werden.

Da die ursprünglichen Bilddateien nicht alle parallel zur horizontalen Ebene entstanden sind, musste vor einer optimalen Beurteilung der Region of Interest (ROI) eine Ausrichtung des generierten Stacks erfolgen. Nachdem diese angepasst wurden, erfolgte die Ausrichtung der ROI. Die ROI wurde über das Maximum des knöchernen Wachstums ausgelegt und die Höhe des auszuwertenden Stacks wurde auf 0,75 mm festgelegt, da diese der realen Knochendicke entsprach, mit einem Durchmesser von 5 mm. Der dadurch entstandene Zylinder bildete die ursprünglich verursachte Defektzone ab (Abb.16). Das Plugin Bone J, eine Erweiterung von Image J, wurde zur Auswertung des erschaffenen Binary benötigt. [100, 101] Es erfolgte mit diesem Plugin die Berechnung der Volume Fraction mit der Formel:

$$\text{Bone Volume/Total Volume} = \text{Volume Fraction}$$

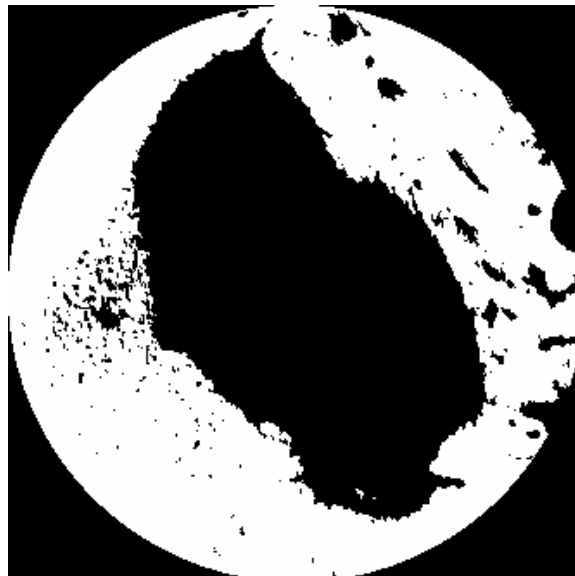


Abbildung 17 Darstellung eines Binary: weiß zeigt die Darstellung von Knochen, beispielhaft eine Positivkontrolle

4.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mithilfe der GraphPad Prism-Software durchgeführt. Die Messungen wurden dreifach durchgeführt. Die Ergebnisse wurden entweder als Mediane und Quartile oder als Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert.

Für normalverteilte Daten wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Paarweise Vergleiche wurden je nach Ergebnis des Levene-Tests auf Varianzgleichheit entweder mit einem Tukey-HSD- oder einem Games-Howell-Post-hoc-Test durchgeführt. Nicht normalverteilte Daten wurden hingegen mit dem Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Für paarweise Vergleiche wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen (*P $< 0,05$, **P $< 0,01$ und ***P $< 0,001$). Aufgrund der Durchführung mehrerer Tests wurden die p-Werte mithilfe der Bonferroni-Holm-Methode angepasst.

5 Ergebnisse

5.1 Visuelle Auswertung der radiologischen Bildgebung

Ziel der Untersuchung war es, in einem zuvor festgelegten Procedere die Knochenheilung drei und acht Wochen nach Operation zu untersuchen. Dafür erfolgte zum einen die wöchentliche Begutachtung der Röntgenbilder der Schädel, um einen Eindruck über die Knochenzunahme über die Zeit zu bekommen. Zum anderen wurden die fünf Gruppen post mortem CT-graphisch untersucht, um eine vollständige visuelle quantitative Beurteilung zu vollziehen.

Um direkt nach der Operation einen Eindruck zu gewinnen, erfolgte die postoperative Röntgenkontrolle der Tiere. Man erkennt durchweg auf allen Bildern die gesetzten Knochendefekte. Das Kollagengel ist nicht zu erkennen, weil es keine röntgendichte Masse besitzt. In Abb. 18 sind zur Veranschaulichung sowohl eine Leerkontrolle (A) als auch eine Positivkontrolle (B) nach acht Wochen gegenübergestellt. Während in der Leerkontrolle der Defekt auch nach acht Wochen zu sehen war, blieb in der Positivkontrolle lediglich eine kleine Defektzone. Die weiteren Gruppen mit einem Kollagengel erbrachten in der röntgenologischen Diagnostik ähnliche Ergebnisse wie das BMP-7.

Durch die Röntgenbilder entsteht somit ein zeitlicher Verlauf der Knochenheilung. Eine genaue Beurteilung ließ diese Untersuchungstechnik nicht zu. Dennoch konnte so schon während der laufenden Untersuchung ein Erfolg der Knochenzunahme dokumentiert werden. In Abb. 19 ist eine beispielhafte Verlaufsübersicht von vier Gruppen zu sehen. Die Kollagengruppe mit geringererer BSP-Konzentration ist hier nicht gezeigt. Der Unterschied zur Gruppe der höheren BSP-Konzentration ist auf den Röntgenbildern sehr gering und kaum erkennbar.

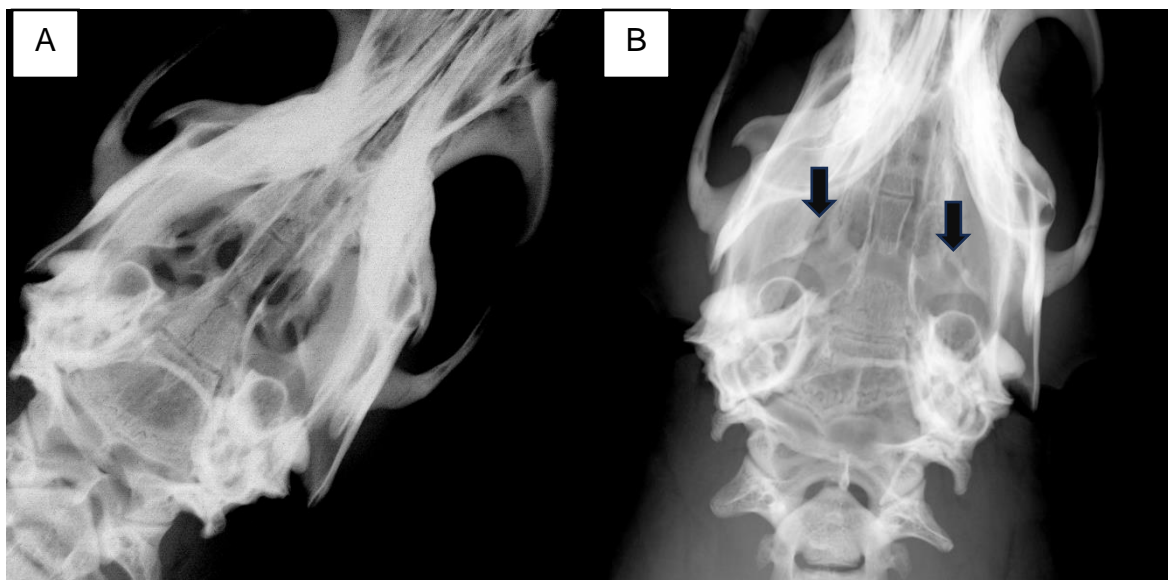


Abbildung 18: A Leerkontrolle nach acht Wochen; B CG+ BMP-7 nach acht Wochen, Pfeile markieren die Defektzone

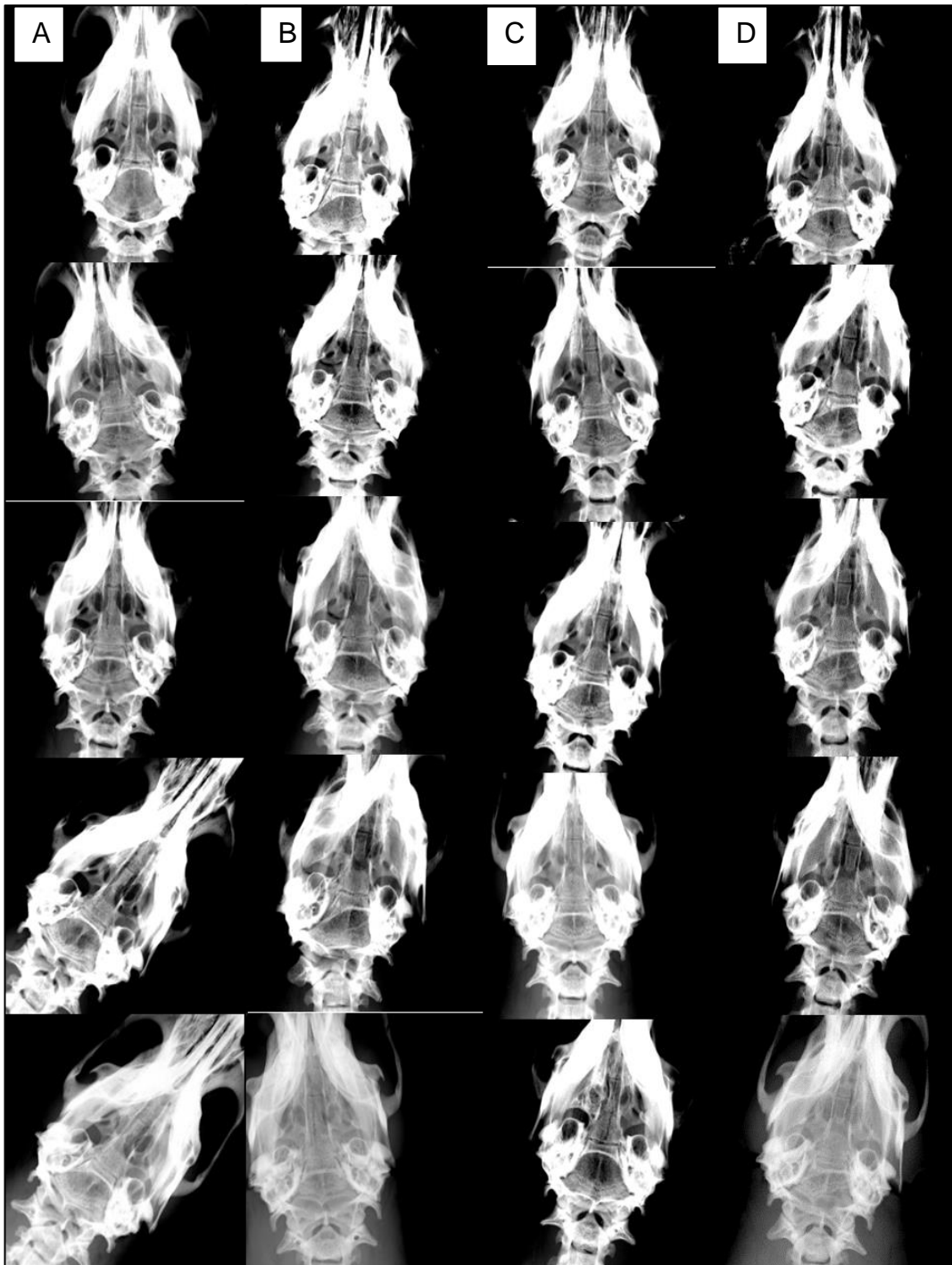


Abbildung 19: Verlaufsübersicht der Röntgenbilder. A: Leerkontrolle, B: Kollagen-Gel, C: CG + BSP high, D CG+ BMP-7

Ansicht von oben nach unten: 1 Reihe post OP; 2 Reihe 3 Wochen post OP; 3 Reihe 5 Wochen post OP; 4 Reihe 7 Wochen post OP; 5 Reihe 8 Wochen post OP;

Die 3D-Visualisierung der Defekte (siehe Abb. 20) erfolgte mittels μ -CT. In den Defekten gänzlich ohne Kollagengel ließen sich nach drei und acht Wochen keine bis maximal geringe spontane Heilungstendenzen erkennen. Damit war der Nachweis eines kritischen Knochendefekts gelungen und bestätigte somit, dass eine valide Negativkontrolle vorlag.

Die Positivkontrolle bot schon nach drei Wochen eine fast vollständige ossäre Deckung des Defekts mit höchstens punktuellen, nicht gedeckten Arealen. Nach acht Wochen war es hier jedoch zu einer kompletten Überbrückung des Bohrlochdefektes gekommen. Dies bestätigte die Wertigkeit von BMP-7 als Wachstumsfaktor für eine übermäßige Osteogenese. Dadurch wurde der Modellaufbau für eine Beurteilung der weiteren Gruppen ermöglicht.

In der näheren Betrachtung der weiteren Defekte mit und ohne BSP war nach drei Wochen bei allen Defekten eine Heilungstendenz zu erkennen. In den beispielhaften Bildern ergab sich der Eindruck, dass in den mit BSP versetzten Gruppen die Ossifikation über das physiologische Maß hinaus ging. In den Bildern nach acht Wochen kam es in der Gruppe der hohen BSP-Konzentrationen zudem zu einer fast vollständigen Osteogenese des gesetzten Defekts. So ergibt sich der visuelle Eindruck einer besseren Osteoinduktion in einer höheren Konzentration des BSP.

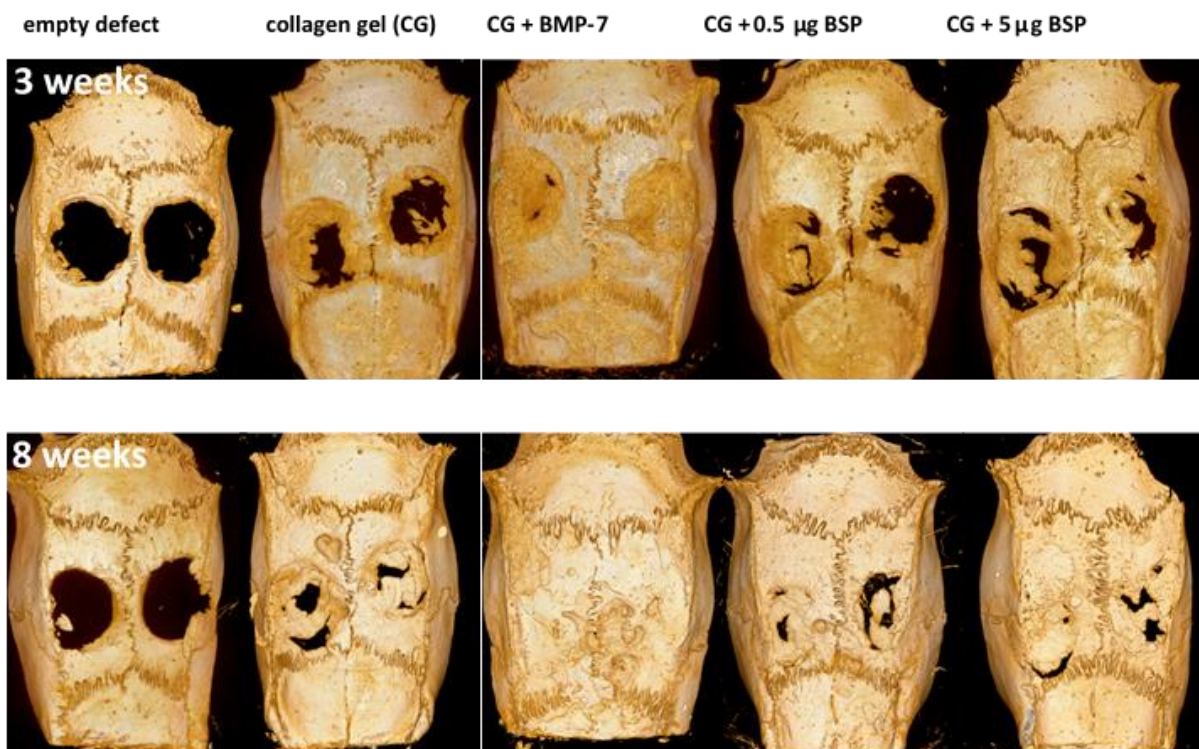


Abbildung 20: 3D μCT -Darstellung; oben: 3 Wochen post OP, unten: 8 Wochen post OP

5.2 Analyse der Volume fraction

Um die visuelle Bewertung zu quantifizieren, wurden die computertomographischen Bilder wie oben beschrieben in das Verhältnis von Bone Volume/Total Volume gesetzt und daraus wurde per Bone J die Größe des „Volume fraction“ geschaffen. Dadurch ergab sich das jeweilige osteogene Volumen eines jeden Defekts.

In den Kontrollgruppen konnte das Ergebnis der visuellen CT-grafischen Betrachtung bestätigt werden. Es zeigte sich dementsprechend kein Anhalt einer Spontanheilung in der Zeit des Versuchs. Deutlich zu erkennen ist, dass es im Vergleich der Drei-Wochen- zu den Acht-Wochen-Gruppen keine statistische Zunahme einer Knochenneubildung kam. Der kritische Knochendefekt ist damit als erwiesen anzusehen.

Es konnte zwischen Negativ- und Positivkontrolle, sowohl in der Drei- als auch in der Acht-Wochen-Reihe eine enorme Differenz gemäß Abb. 21 A und B aufgezeigt werden. Diese statistische Signifikanz zwischen diesen beiden Kontrollen hebt die praktische Relevanz dieses Modells hervor.

In Abb. 21A konnte ein signifikanter Unterschied der Kollagene, sowohl mit als auch ohne weitere Zusätze, gegenüber der Negativkontrolle erreicht werden, wenn auch nicht in dem Ausmaß der Positivkontrolle. Die Defekte, die mit BSP behandelt wurden, erreichen nach drei Wochen ein recht ähnliches Niveau.

In der Ansicht der Abb. 21B erfolgte die statistische Betrachtung der Knochenkonsolidierung nach acht Wochen. Im Vergleich zu der Auswertung der drei Wochen ist hier eine deutlich heterogenere Darstellung der stattgehabten Osteoinduktion zu sehen. In der Betrachtung der gesamten Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle erreichten alle die statistische Signifikanz. In der näheren Betrachtung ergaben sich einige Erkenntnisse. Die Kollagen-Gele mit der 5 µg BSP-Konzentration erreichten im Vergleich zu der Kollagen-Gruppe ohne Zusätze im Verhältnis zur Negativkontrolle ein besseres Signifikanzniveau. Das entsprach auch der Wahrnehmung der visuellen Beurteilung in Hinsicht der größeren osteogenen Tendenz des 5 µg BSP. Das niedriger konzentrierte, BSP versetzte Kollagengel erreichte eine große Schwankungsbreite der Ergebnisse und im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen ein schlechteres Signifikanzniveau zur Negativkontrolle.

Damit bleibt der tendenzielle Eindruck, in der Zusammenschau der Auswertung, dass 5 µg BSP eine verbesserte Osteoinduktion mit sich bringt im Vergleich zur reinen Kollagen Gruppe und zur Gruppe mit 0,5 µg BSP.

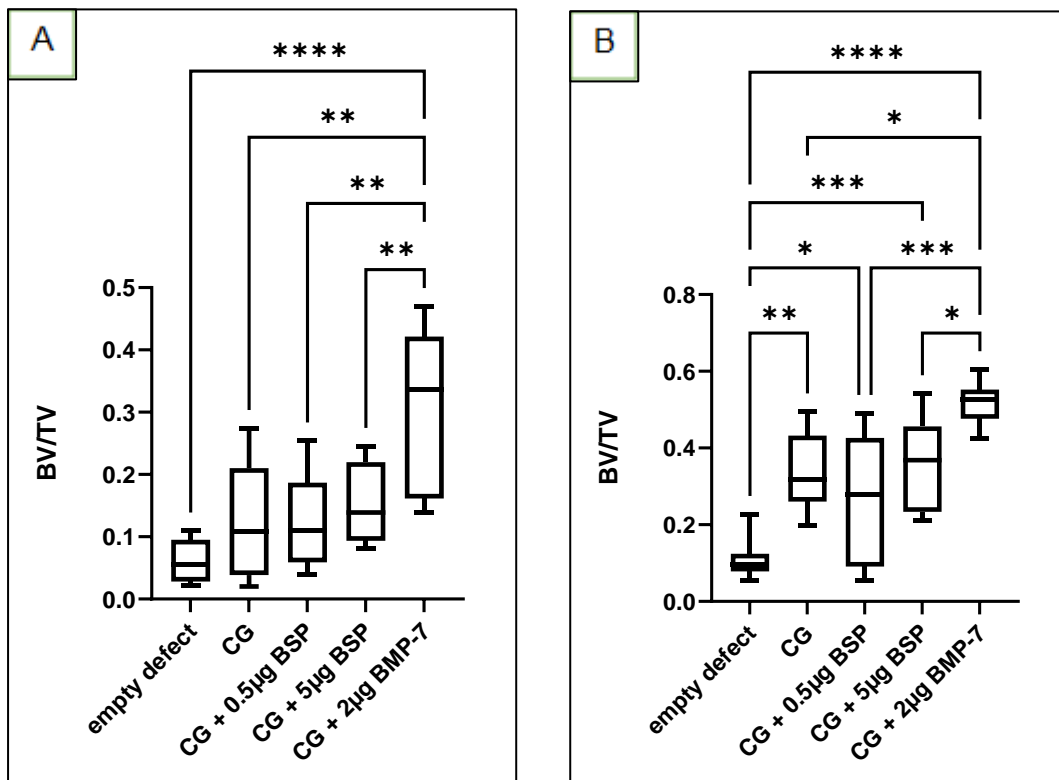


Abbildung 21: μ -CT Darstellung 3 Wochen (A) und 8 Wochen (B) nach OP; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$ ($n = 5$)

5.3 Histologische Beurteilung

Im Verlauf der histologischen Analyse wurden die zuvor radiologisch untersuchten Rattenschädel entkalkt, um sie als Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner Trichrom, Elastica van Gieson und Immunhistochemisch mit CD31 gefärbte Schnittpräparate unter dem Lichtmikroskop zu untersuchen. Die folgenden Auszüge der Aufnahmen zeigten die Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Auswertung erfolgte, um mögliche Unterschiede der Neo-Ossifizierung zu erkennen.

Die Aufnahmen der HE-Färbung (siehe Abb. 22 A) verdeutlichen eindrucksvoll den Anblick der Positivkontrolle, die die restlichen Gruppen in Bezug auf die Knochenbildung deutlich übertraf und somit auch in der qualitativen Beurteilung die statistische Auswertung bestätigen konnte. Der vollständig verschlossene, daher nicht mehr sichtbare Defekt wurde durch eine dicke Schädelkalotte ersetzt. Obwohl sich der Knochen nicht durchgehend kompakt zeigte, wies er dennoch große Anteile einer neu gebildeten Spongiosa auf. Dies bestätigte sich vor allem bei der Durchsicht der geschlossenen Defekte und deutete auf eine qualitativ adäquate Schließung des Defekts hin. Es ergab sich der Eindruck, dass die Knochenstruktur der Gruppe der CG mit BSP und BMP kompakter war im Vergleich zur Gruppe der CG ohne Zusätze. Es imponierte dort eine intensivere Färbung des Knochens.

In der Abb. 22B erkennt man die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung. In dieser sieht man, sowohl bei der Positivkontrolle als auch bei der Gruppe mit immobilisiertem BMP-7 und in der Gruppe des höher konzentrierten BSP, eine intensivere Orangefärbung,

welche in der Regel nur dann in dieser Färbung vorkommt, wenn Erythrozyten angefärbt werden. Dies wurde als Hinweis auf zahlreiche, neu gebildete Gefäße gewertet. Das ossifizierte Gewebe stellt sich in einem starken Türkis dar. Dies spricht für eine gute Mineralisation des geschlossenen Defektes und deckt sich somit mit der Beurteilung der HE-Färbung, welche den Eindruck einer besseren Knochenstruktur bietet.

In den EvG (siehe Abb. 23A) gefärbten histologischen Bildern sind insbesondere elastische Fasern nachzuweisen. Es zeigte sich bei näherer Betrachtung kein Nachweis einer solchen Anfärbung im Bereich der Gefäße. Dies spricht für die Ausbildung kleinerer Gefäße ohne weitere elastische Faseranteile. Da man die elastischen Fasern in großen Gefäßen, wie beispielsweise der Aorta, erwarten würde, bestätigt unser Ergebnis dies und weist auf die physiologische Ausbildung von Gefäßen hin. Hier wird deutlich, dass sich gerade in den großen Defektzonen das Bindegewebe in dieser Färbung gut darstellen lässt. Es zeigt sich zudem, dass es in der Negativkontrolle lediglich zur einer Defektdeckung durch umgebendes Bindegewebe mit elastischen Anteilen kam.

In den immunhistochemischen Schnitten lassen sich die Gefäße nur sehr schwer abgrenzen und konnten somit nur begrenzt bewertet werden.

Bei der Durchsicht der Bilder fiel auf, dass sich die positive Tendenz der statistischen Auswertung der 5 µg BSP-Gruppen weiter fortsetzte. Die Schnitte imponierten ähnlich zur Positivkontrolle mit einer besseren Spongiosa in der HE-Färbung, als auch einer besseren Mineralisierung in der MGT-Färbung.

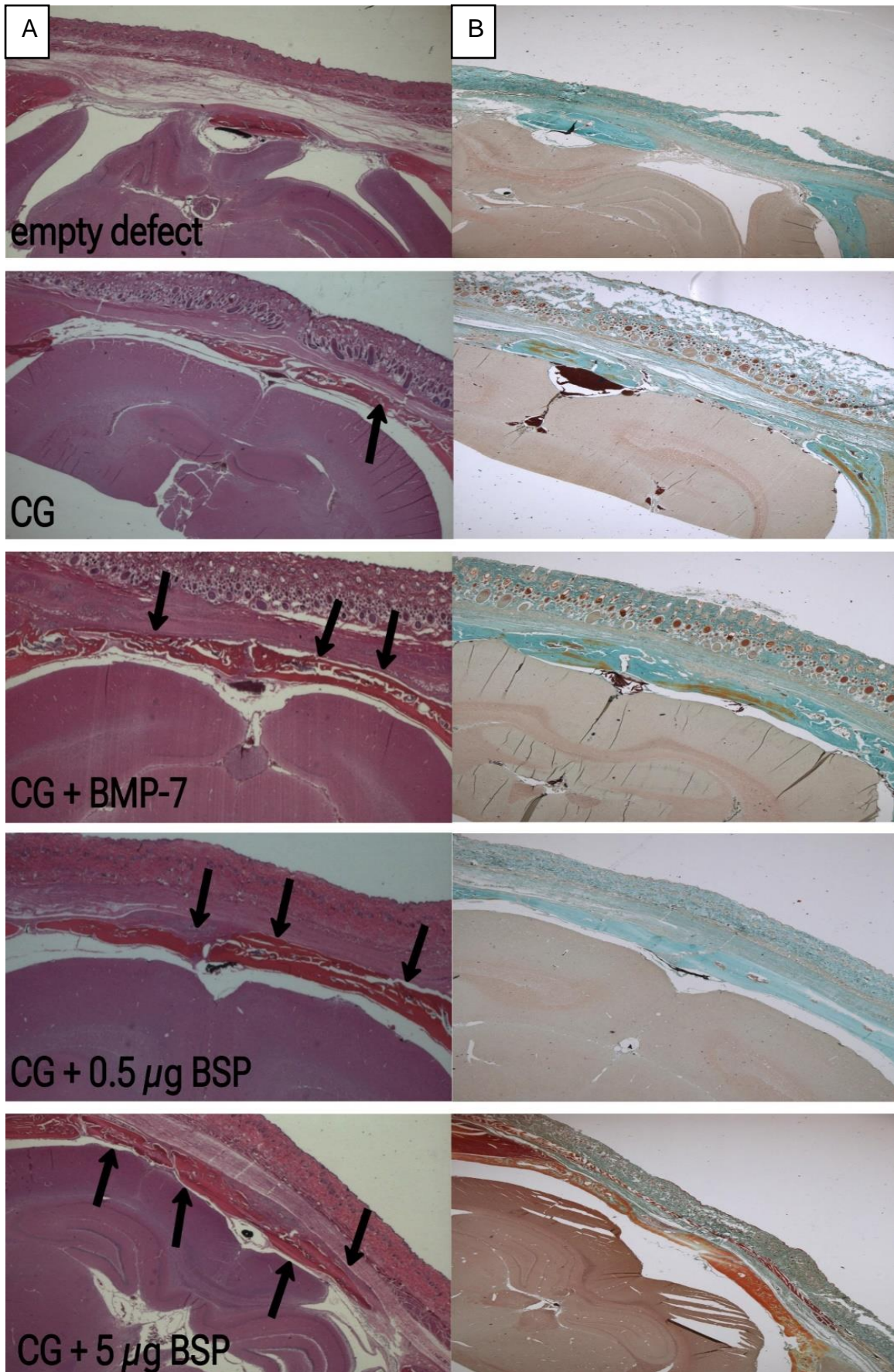


Abbildung 22: A: HE- Färbung, B: Masson Goldner Trichrom, jeweils nach 8 Wochen. Pfeile zeigen auf neugeformten Knochen

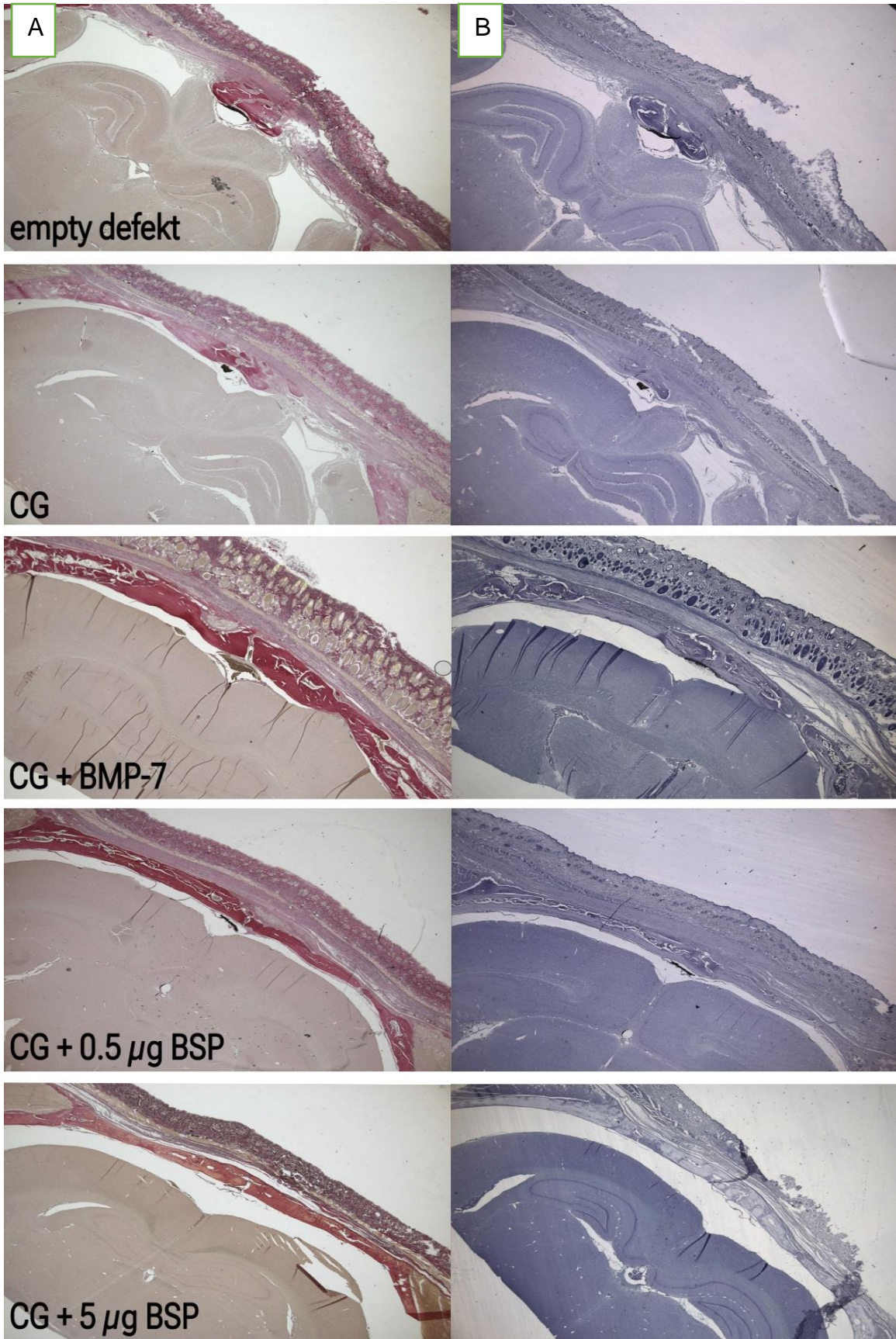


Abbildung 23: A: EvG- Färbung; B: CD 31-Färbung, jeweils nach 8 Wochen

5.4 Quantitative Analyse der Angiogenese

Für eine Beurteilung der Angiogenese wurden die mit Microfil bearbeiteten Tiere zunächst in nativem Zustand (siehe Abb. 24) im μ -CT dargestellt, womit eine ROI anhand des sichtbaren Defekts eingestellt werden konnte. Nach der standardmäßigen Dekalzifizierung blieb das röntgendichte Microfil übrig und es folgte die Beurteilung der Gefäßneubildung.

Bei der optischen Beurteilung der nativen Bilder erkannte man über der ROI die neu ausgebildeten Gefäße. Zum Vergleich wurde eine Leerkontrolle (siehe Abb. 24A) mit einer Positivkontrolle (siehe Abb. 24B) im gleichen Zustand gegenübergestellt. In dieser ließ sich erkennen, dass die Angiogenese in dem kleinen verbliebenen Defekt der Positivkontrolle vermehrt darzustellen war, während sich in der Negativkontrolle nur einzelne Gefäße über den gesamten Defekt nachweisen ließen.

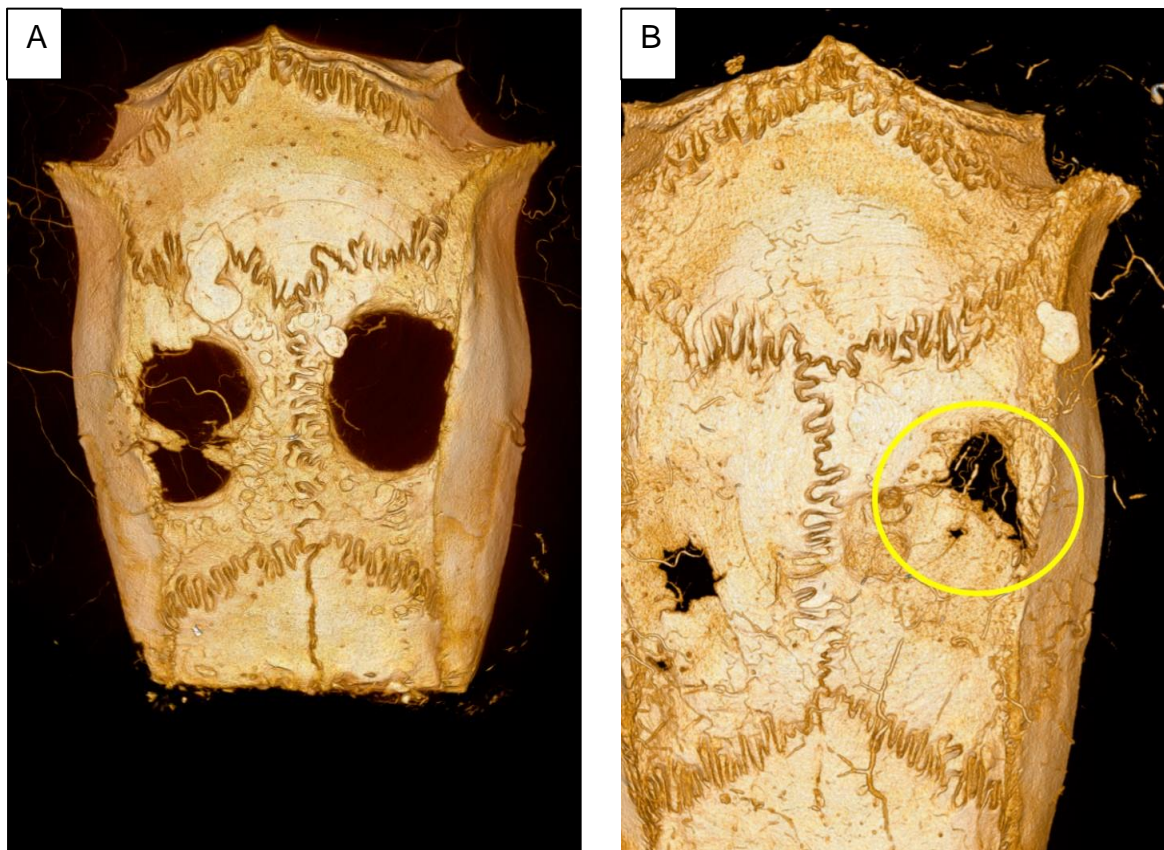


Abbildung 24: Microfil Darstellung im μ Ct nach 8 Wochen post OP; Defekt ohne Zusatz, B: Defekt mit CG+BMP-7

A:

In Abb. 25 erfolgt die μ -CT-Darstellung eines entkalkten Schädels der BMP-7 Gruppe. In Bild A sieht man neben der ROI das gesamte Gefäßnetz von transversal in einer Volumenrekonstruktion. Die Abb. 25B-D zeigt eine coronare Detailansicht in verschiedenen Sequenzen. In Bild B erfolgte die Lokalisation der ROI. Diese ist aufgrund der konkaven Knochenformation, die auf die ehemalige Defektzone hinweist, gut zu erkennen. In den Bildern C und D der Abb. 25 lassen sich in den entkalkten Bildern, die mit Microfil ausgefüllten Gefäße erkennen. In dem Konglomerat an Gefäßen fallen einige Gefäßabrisse auf. Es wäre im Hinblick auf die voll ausgebildete

Deckung des Defekts denkbar, dass hier ein Zusammenhang zwischen unzureichender Gefäßausbildung und nicht stattgehabter Konsolidierung des knöchernen Gewebes stattgefunden hat.

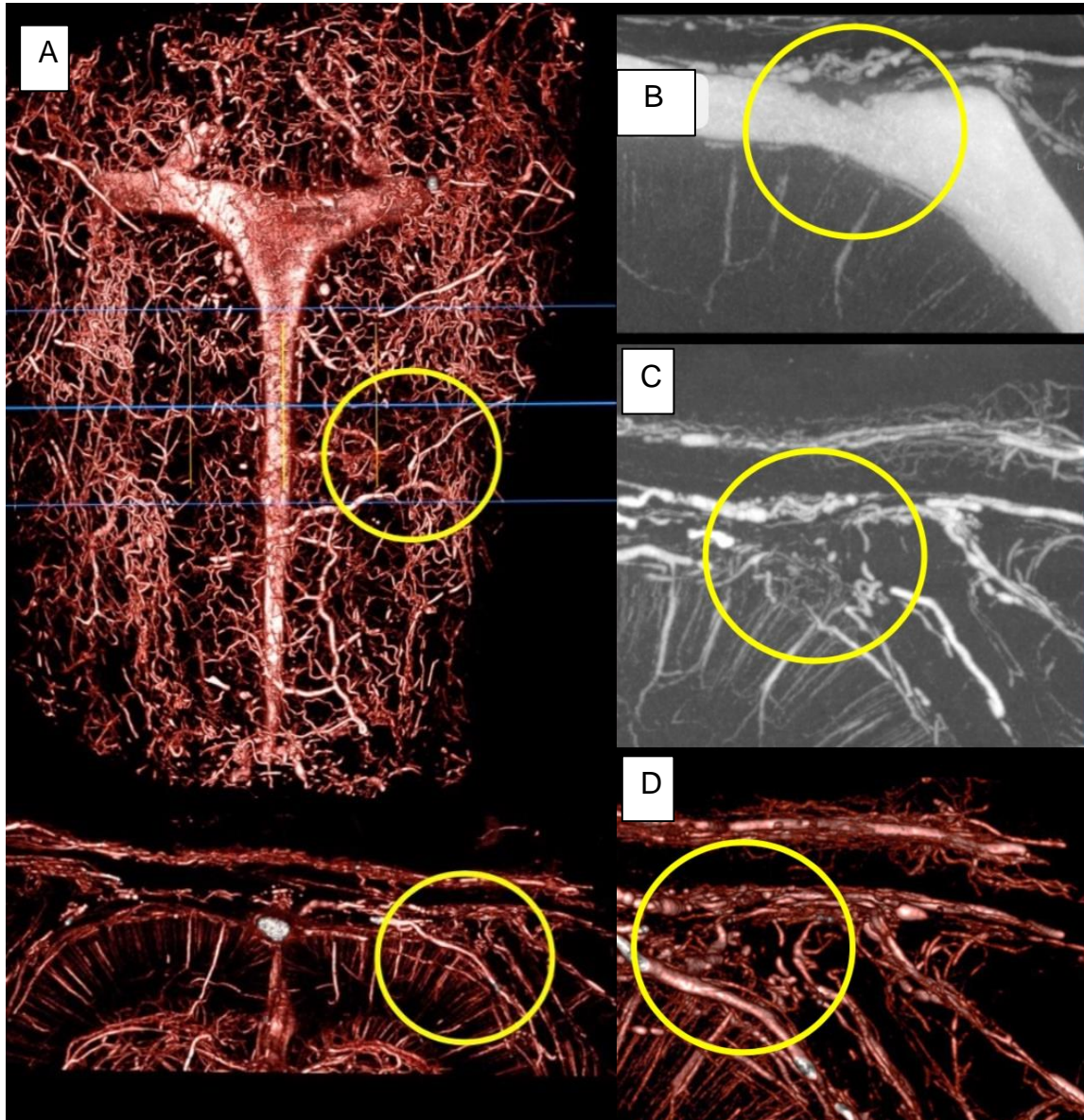


Abbildung 25: Darstellung der Angiogenese eines Defekts versorgt mit CG+BMP-7 nach 8 Wochen; gelb: ROI

A: Volumenrekonstruktion der Gefäße des Schädels aus Microfil im Transversal- und Coronarschnitt;

B: kalzifizierte Darstellung im Coronarschnitt;

C: dekalzifizierte Darstellung im Coronarschnitt;

D: Volumenrekonstruktion im Coronarschnitt

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt des Bone Sialoproteins in einem Rat calvarial model mit einem Defekt kritischer Größe zu untersuchen. Ein solches Experiment wurde in dieser Konstellation noch nie durchgeführt. Im Folgenden werden das genutzte Modell, BSP und weitere Aspekte dieser Arbeit diskutiert.

6.1 Rat calvarial defect modell

Der kritische Größendefekt und dessen unzureichende Möglichkeit der spontanen Heilung ist der Grundsatz dieses Defektes und ermöglicht erst die Beurteilung der Ergebnisse. Die Ratte als Modell in orthopädischen Untersuchungen ist zudem das meistgenutzte Tier und bietet damit eine große Erfahrung im Hinblick auf Haltung und Erfahrung. Dies liegt zum einen an der vergleichsweise kostengünstigen Anschaffung der Tiere, zum anderen lassen sich die weiblichen Tiere zudem kohortieren und zeigen eine hygienische Verhaltensweise. Damit ist das Infektions- und Komplikationsrisiko gering. Des Weiteren besitzen die Tiere ein hohes Regenerationspotenzial. [102]

In anderen Studien erfolgte der Versuch eines CSD bei Ratten von 8 mm. Dieser wurde platzbedingt mittig der Schädelknochen gesetzt. Es offenbarte das Potenzial von größeren Blutungen aufgrund der Verletzung des Sinus sagittalis. Dies hätte aufgrund des zusätzlichen Schadens nicht nur ein größeres Risiko für Komplikationen, wie beispielsweise Blutungen, gehabt, sondern hatte auch das Potenzial bei Verletzung die Ergebnisse zu verändern, da durch eine Blutung möglicherweise vermehrt Immunzellen einwandern könnten, die einen positiven Effekt auf die Induktion der Knochenheilung hätten. [103, 104] Dementsprechend fiel die Entscheidung für zwei Defekte á 5 mm Außendurchmesser, da diese den Vorteil hatten, dass gleich zwei Defekte verursacht werden konnten und das Risiko einer größeren Blutung minimiert wurde. In diversen Studien bietet sich eine Schwankungsbreite von eben jenen Defektgrößen. Beide Defektgrößen, 5 mm und 8 mm, wurden je nach Untersucher genutzt. [105–108] In der Literatur wurde der Defekt von 5 mm schon als CSD gewertet. [109]

Die Gruppe ohne CG zeigte wie erwartet über die gesamte Dauer des Versuches keine Heilungstendenz und unterstrich damit den Stellenwert der 5 mm großen Defekte als CSD.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der immer mehr Beachtung in der Forschung als auch der klinischen Medizin findet, ist die individualisierte Medizin. [110–112] In der näheren Betrachtung des Patientenkontextes Frakturen betreffend ist der Hauptteil der Patienten älter als 65 Jahre [113]. Es kommt bei Patienten höheren Alters vermehrt zu Diabetes mellitus Typ 2 oder auch zu Osteoporose. Diese Erkrankungen haben zum einen Einfluss auf die Wundheilung und das Infektionsrisiko sowie auf die allgemeine Knochenstruktur und deren Belastbarkeit. So ist die Prävalenz für Diabetes Typ 2 zwischen 70 und 80 Jahren bis zu 25%. [114] Die Inzidenz für Osteoporose ist ab dem 50. Lebensjahr deutlich zunehmend. Dies sind nur zwei Beispiele, die zur Veränderung der Knochenheilung der Menschen beitragen. In einer Studie wurde der Unterschied von jungen zu alten Ratten im Rat calvarial defect untersucht. Diese zeigte, dass die älteren Ratten eine deutlich geringere Knochenbildung aufwiesen. Die Übertragbarkeit

auf den Menschen bleibt jedoch umstritten. [115] In dieser Arbeit wurden junge Ratten benutzt, es sollten weitere Versuche mit älteren Tieren durchgeführt werden, um die Effekte von BSP auf die alternde Knochenstruktur zu untersuchen. Eine weitere Begutachtung des Alters sowie des Geschlechts wird in Zukunft weiter Einzug in die Medizin halten.

6.2 Kollagen als Trägermaterial

Kollagen Typ I hat sich in dieser Arbeit als hervorragendes Trägermaterial geeignet und zeigte in unseren Ergebnissen durchaus positive Effekte auf die Knochenheilung. Der Vorteil der Kollagengele besteht aus der spontanen Bildung der Dreifachhelix. Des Weiteren bietet es die Fähigkeit Medikamente zu binden und homogen abzugeben, dazu ist es in seiner Form abbaubar, biokompatibel, bioaktiv, osteokonduktiv und osteoinduktiv. Aufgrund dieser Eigenschaften bietet Kollagen ein breites Spektrum im heutigen BTE. [116, 117]

In dieser Arbeit erfolgte die Herstellung der Gele per Hand durch jeweiliges Pipettieren der Komponenten. Die Herstellung eines Trägermaterials mit Kollagen kann beispielsweise auch per 3D-Drucker erfolgen. Dadurch lassen sich in der Theorie die Eigenschaften, die ein BTE besitzen muss (siehe Kapitel 3.7), besser bestimmen, wie zum Beispiel die Porengröße. Jedoch muss in diesem Prozess eine gute Anpassung der Zusammensetzungsparameter erfolgen, da durch das Drucken eine fehlerbehaftete Herstellung erfolgen kann. Der Vorteil, den dieses Verfahren bieten könnte, ist die direkte Einarbeitung von beispielsweise Calcium. [118, 119]

So können Kollagen weiter als resorbierbare Kollagenschwämme kombiniert und eingesetzt werden, um so mit mesenchymalen Stammzellen verbunden zu werden. [120] In einer Veröffentlichung aus 2024 von Huang et al. wurde Kollagen mit Curdlan, ein mikrobielles Exopolysaccharid, kombiniert, um die Auswirkungen auf die Wundheilung in kutanen Wunden zu untersuchen. Dabei konnten positive Effekte in Hinblick auf Vaskularisation und schnellere Wundheilung nachgewiesen werden. [121]

Dieses Trägermaterial wurde auch in früheren Arbeiten in CSD mit verschiedenen beladenen Kollagen-Gelen genutzt. Xu et al. untersuchte zum Beispiel die Unterschiede von Kollagengel Typ I im Vergleich zu Gelatine als Träger von BSP. Die jeweiligen BTE wurden mit bis zu 20 µg BSP beladen und wurden 30 Tage lang beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass mit Kollagen Typ I beladene Gele eine bessere Mineralablagerung und Osteoblastenaktivität im Vergleich zu Gelatine als Träger des BSP aufwiesen. [122]

In den vielen Möglichkeiten Kollagene zu kombinieren ist es sogar möglich Elektrizität zum Einsatz zu bringen. Dadurch konnten beispielsweise durch Kationen eine oxidative Polymerisation mit Katecholaminen und Kollagen erfolgen, so dass eine solidere Verbindung entstand. Somit erlangte das Kollagen eine bessere mechanische Stabilität. [123]

Kollagene sind, wie auch diese Arbeit zeigte, osteoinduktiv und ein guter Träger für Medikamente. Weitere Forschungen sollten in Zukunft stattfinden, um Kollagene weiter zu modifizieren, um sie vielseitig einsetzen zu können. Es sollte in den Überlegungen neuer Kollagen-kombinierter Träger immer der Gedanke der möglich

praktischen Anwendung erfolgen. So ist eines der häufigeren Probleme, die gelöst werden müssen, Kollagene stabil zu halten, um eine möglichst frühe Mobilisation zu ermöglichen bei gleichzeitiger Erfüllung der Anforderung an das gebundene Medikament.

6.3 Bone Sialoprotein- Zukunft der BTE

Diese Arbeit, in deren Zentrum das Bone Sialoprotein steht, ist auf dem Boden von Versuchen, unter anderem unter der Mitarbeit unseres Labors, die darauf abzielten, die Wechselwirkungen mit Scaffolds mit verschiedenen Zusätzen zu erforschen und Bone Sialoprotein in diversen zellulären Versuchen und Knochendefektmodellen zu bewerten, begründet.

Knockoutmäuse zeigten auf, dass zu wenig BSP die Mineralisierung Differenzierung und Vaskularisierung negativ beeinträchtigt, während eine Überexpression von BSP den Effekt von vermehrter Osteoblastendifferenzierung und erhöhter Mineralisation des Knochens aufwies. Die erhöhte Mineralisation bedeutet, dass BSP einen Einfluss auf die vermehrte Osteoklasten und -blastenaktivität hat. Zu erwähnen ist jedoch, dass in den Knockoutmäusen ein funktionelles Skelett ausgebildet wurde, was auf einen Kompensationmechanismus hindeutete. Dennoch ist BSP in der Gänze der physiologischen Entwicklung von Knochen und Knorpelstrukturen von Bedeutung. [124, 125] Aufgrund des Einflusses, den BSP eben auf jene Differenzierung von Osteoblasten hat, ist es für die BTE ein interessanter Faktor, um positive Erfolge zu erzielen.

So erfolgte ab 2016 eine Reihe an Untersuchungen der Effekte von BSP in unserem Labor. Der Beginn erfolgte mit in vitro mit Titan beschichteten Oberflächen, welche mit BSP kombiniert wurden. Damals vermittelte BSP schon die Tendenz positive Effekte auf die Genexpression von Osteopontin und RUNX2 zu haben. [126] In einer weiteren Untersuchung erfolgte die Präparation von Calciumphosphat-haltigen Oberflächen mit BSP, welche auch die positiven Effekte von BSP auf humane Osteoblasten untersuchte und solche nachweisen konnte. Zudem konnte eine Bindung von BSP und Calciumphosphat erfolgen. [127] Durch diese Erkenntnisse schloss sich ein in vitro Versuch an, um die Effekte von Calciumphosphat-Zement mit BSP zu untersuchen. Calciumphosphat-haltige Biomaterialien haben aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaft schon osteoinduktives Potenzial. [66] Um diese Effekte zu untersuchen, wurde ein CSD in Mauskalotten etabliert. Abermals konnten positive Tendenzen im Hinblick auf die BSP versetzten Materialien in Hinsicht auf eine verbesserte Knochenkonsolidierung nachgewiesen werden. [128]

Auch in dieser Arbeit zeichnete sich der positive Effekt des BSP im Hinblick auf Vaskularisierung als auch Osteogenese vor allem in höheren Konzentrationen ab.

In einem Femur Defekt Model erzielte BSP in Kombination mit 3D gedrucktem Polyactid nach 4 wie auch 8 Wochen deutlich Knochenzunahme im Vergleich zu der Versuchsreihe ohne jegliche Zusätze. [129] Man sollte in der weiteren Betrachtung dieser Ergebnisse hinzuziehen das das Femur ein belasteter Knochen ist welcher damit deutliche Reize durch Druck und Zug erhält, was einen positiven Einfluss auf Heilung haben kann.

Ein weiterer Aspekt, der sich auch in anderen Arbeiten zeigt, ist die Konzentration von BSP. Choi et al. benutzten eine Konzentration von 20 µg/Implantat, diese wurde zwar nicht radiologisch ausgewertet, ließ aber in den histologischen Bildern eine deutliche Verkalkung zu erkennen. [130] Xu et al. nutzten in ihrer Arbeit auch eine Konzentration von 20 µg/ Implantat und zeigten eine deutliche Zunahme der neuen Mineralisation. [122]

Das deckt sich auch mit dem Ergebnis dieser Arbeit, dass höhere Konzentrationen eine bessere Osteoinduktion verursachen. In Hinsicht auf die Qualität des gebildeten Knochens muss es weitere Beurteilungen geben. Ein weiterer spannender Ansatz könnten in vivo Modelle sein, in denen eine trajektorielle Belastung stattfindet, um so weiter Aufschluss über das Potenzial von BSP in der funktionellen Knochenheilung zu geben.

6.4 Humanes BSP vs.Ratten-BSP

Um den möglichen Unterschied zwischen der tierspezifischen Variante des BSP und dem des humanen festzustellen, erfolgte eine Versuchsreihe mit Ratten-BSP. In den beispielhaften CT-Bildern, in Gegenüberstellung mit den Bildern der humanen BSP-Reihe, zeigte sich kein wirklicher Unterschied. Aufgrund des geringen Unterschieds erfolgte diesbezüglich keine eingehendere Untersuchung und Auswertung in dieser Arbeit.

BSP wurde 1986 aus einem Osteosarkom einer Ratte isoliert und das RGD-Pattern konnte damals erstmalig beschrieben werden. [131] Es erfolgte von Ogata die Aufschlüsselung der genomischen Sequenzen, welche zu einem hohen Maße ähnlich konserviert waren. [132] Ratten und Menschen-BSP haben eine ähnliche Masse von ca. 33 kDa und haben zudem beide das Arginin-Glycin-Asparaginsäure, welche das RGD-Pattern bildet. [53, 133] Damit können die Wachstumsfaktoren an die Zellen binden. Es findet sich damit in der ursprünglichen Bindung der Proteine an den Rezeptor keinen Unterschied. Dies bestätigt sich auch in unserer Durchsicht und Vergleich der jeweiligen BSP-Gruppen, da diese ein sehr ähnliches knochenregeneratives Profil aufweisen.

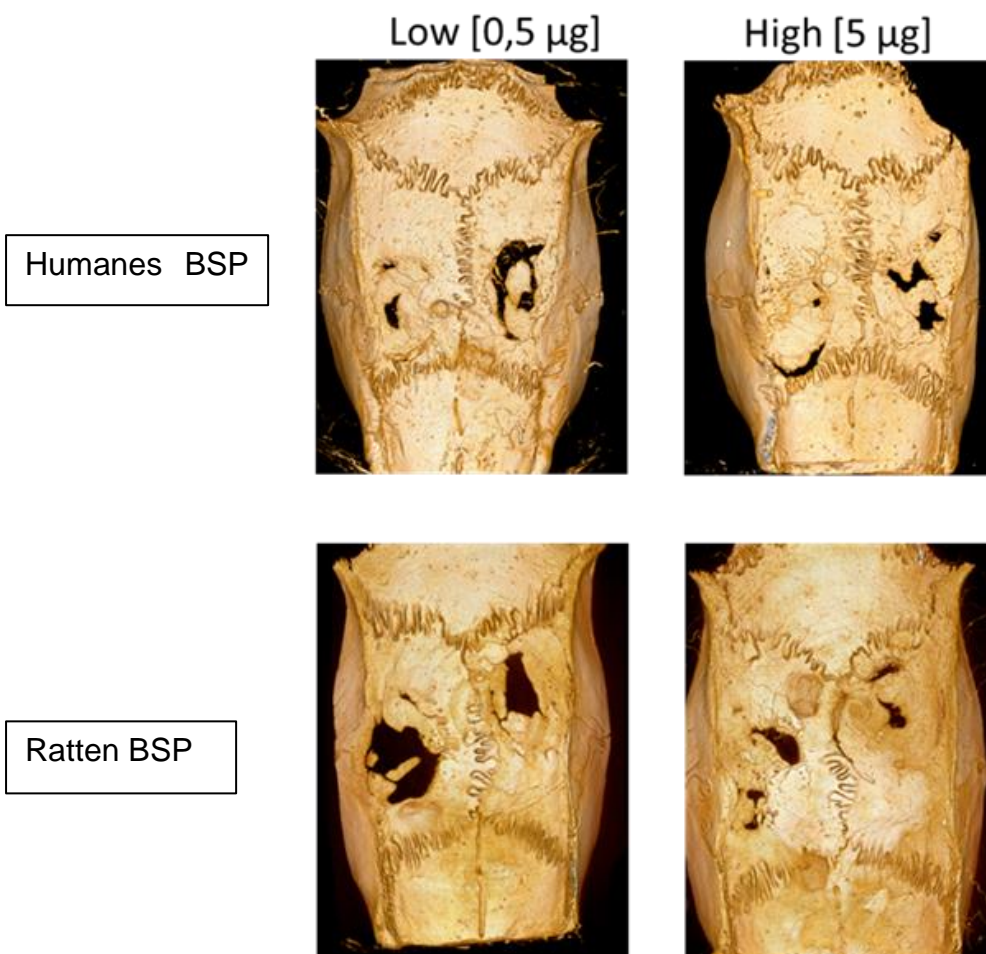


Abbildung 26: Vergleich von humanem BSP im Vergleich zu Ratten BSP nach 8 Wochen

6.5 Darstellung der Vaskularisierung durch Microfil

Ein wichtiger, vergesellschafteter Faktor für die Knochenregeneration ist die bestmögliche Durchblutung. [134] Bei unzureichender Vaskularisierung sind atrophe Pseudarthrosen die Folge. [28] Demnach ist es von Bedeutung, dass nicht nur die Scaffolds in den Studien eine gewisse Vaskularisierung zulassen, sondern auch dass BSP die Neoangiogenese induziert.

Microfil eignet sich, um die Neovaskularisation in den Versuchen dreidimensional darstellen zu können. Es bietet aufgrund seiner röntgendichten Masse eine ideale Möglichkeit, da es auch nach der Dekalzifizierung im CT darstellbar ist. Dies gab weitere Aufschlüsse über die Quantität der Vaskularisierung über den gesamten Defekt in drei Ebenen. Die qualitative Beurteilung bleibt die Domäne der histologischen Untersuchung, welche jedoch zweidimensional und damit in der Beurteilung der Defektschließung bzw. Aussage über eine Gefäßnetzbildung unzureichend ist. [135]

In unserer Anwendung erfolgte vor Gabe des Microfil-Gemischs die Vorbehandlung mit einem Heparin-Gemisch. Dies minimierte das Risiko von Thrombenbildung und sorgte dafür, dass die röntgendichte Masse ungehindert in die Gefäße perfundieren konnte. Ein weiterer Benefit der Vorbehandlung war, dass durch die Auswaschung des

Blutes eine Beurteilung zur Beendigung des Verfahrens gegeben war. Eine weitere Möglichkeit, um eine bessere Perfusion zu erreichen, wäre der Einsatz eines vasodilatatorischen Medikaments gewesen. [136] Diese Vorbehandlungen verbessern die Perfusion der kleinen Gefäße, die gerade in unserer Untersuchung im Fokus standen. Des Weiteren hätte es aufgrund einer zu hohen Viskosität des Gemischs, welche nach Zusammenmischung der Komponenten nur eine Verarbeitungszeit von 20 Minuten hat, zu einer schlechteren Perfusion der Gefäße kommen können. Je nach Fragestellung muss hier eine Anpassung der Komponenten vorgenommen werden, um auch die Kapillaren zu erreichen. Ein weiterer Faktor einer adäquaten Anwendung ist der konstante Druck von ca. 100 mmHg, der aufgebracht werden sollte, um eine adäquate Perfusion zu erreichen. [137] Die Anwendung eines Perfusors bietet die gleichmäßigste, intravasale Verabreichung des Microfil und damit eine Minimierung einer Fehlerquelle, da hierdurch ein gleichmäßiger Druckgradient aufrechterhalten werden kann.

In den beispielhaften Abb. 22 und 23 sieht man das gut ausgebildete Gefäßnetz des gesamten Schädels, insbesondere die Gefäßentwicklung in der iatrogenen Defektzone der Positivkontrolle. Im Vergleich zur histologischen Untersuchung bietet es den Vorteil einer genauen Darstellung der Gefäße über die Gesamtstrecke. Hier war es die Schwierigkeit der Auswertung zu erkennen, ob die Gefäße, wie im Beispiel der Abb. 23 C und D, eine Unterbrechung ihrer Struktur haben, weil eine inadäquate Ausbildung des Gefäßes stattgefunden hat, oder ob es ein Problem der Anwendung des Microfil war. Dazu bedarf es weiterer Vergleichsuntersuchungen der kleinen Gefäße in nicht präparierten Tieren.

Aufgrund des erheblichen Aufwands und der zuvor erwähnten unklaren Gefäßstrukturen im neu gebildeten Knochen, erfolgte keine weitere Quantifizierung der Untersuchung. Damit bietet die Anwendung der Microfil-Untersuchung in Anbetracht der Verbesserungen das Potenzial einer weiteren Ausführung und somit einer genaueren Quantifizierung der Vaskularisierung.

In der Histologie zeichnete sich in den Gruppen mit BSP, ähnlich zu der beschriebenen CT-grafischen Neoangiogenese, eine vermehrte Angiogenese ab. Dies bestätigt sich auch in anderen Arbeiten. [36, 37, 138] Dies würde zudem dafür sprechen das eine verbesserte Knochenheilung stattgefunden hat, da die Ausbildung von Gefäßen essenziell für eine adäquate Knocheninduktion ist. Daher sind weitere Versuche im Hinblick auf höhere Konzentrationen des BSP auch mit der Frage einer besseren Angiogenese zu verfolgen und nicht nur im Sinne der Osteoinduktion.

7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte von Bone Sialoprotein in funktionalisiertem Kollagen auf den kritischen Knochendefekt der Ratte.

Das primäre Ziel war es, die osteoinduktiven und -konduktiven Fähigkeiten des BSP zu messen. Es konnte hinsichtlich dieser genannten Eigenschaften eine positive Tendenz abgeleitet werden, die BSP aufbringt. In der weiteren Differenzierung dieser Beobachtungen ist BSP vor allem in höherer Konzentration dazu in der Lage osteoinduktiver zu sein als Kollagene ohne BSP als Wachstumsfaktor. Dies entspricht den Beobachtungen anderer Arbeiten mit BSP. [119, 122]

Ferner zeigte sich durch Microfil erstmals die dreidimensionale Darstellung der neoangiogenetischen Effekte von BSP. Für eine quantitative Auswertung benötigt es in Zukunft die Bewältigung der angesprochenen Hürden. Es bleibt daher zumindest eine weitere Option der Auswertung von Gefäßen jeglicher Art. In der qualitativen Untersuchung konnte eine tendenziell bessere Vaskularisation festgestellt werden.

Zudem konnte erneut der „critical size defect“ als etabliertes Modell zur Testung von osteoinduktiven Materialien bestätigt werden. In dieser Arbeit zeigte der Defekt von 5 mm ohne BTE keine spontane Heilung. Damit bestätigt sich dieser Defekt als Negativkontrolle. Entgegen der Negativkontrolle steht die Positivkontrolle mit BMP-7 die auch mit Kollagen eine überschießende Knochenheilung verursachte.

Kollagen Typ I bestätigte sich aufgrund seiner eigenen osteoinduktiven Fähigkeiten und bildet in Kombination mit BSP einen Synergismus, welcher bessere Tendenzen zur Knochenheilung zeigt als Kollagen ohne Wachstumsfaktor.

In Zukunft sollten weitere Untersuchungen stattfinden, in deren Zentrum BSP in höheren Konzentrationen an Kollagene gekoppelt werden, um die Knochenheilung und Neoangiogenese zu untersuchen. BSP könnte damit in Zukunft Einzug in die klinische Relevanz finden.

8 Materialien

Gerätschaft	Produktname Hersteller Anschrift
Einbettautomat	Sakura VIP E150 Tissue Processor Sakura Finetek Germany GmbH Staufen, Germany
Flexible Welle	Dremel® 225, Biegsame Welle Dremel Europe Breda, the Netherlands
Flüssigkeitsabsauger	BVC 21 NZ Vario Vacuubrand GmbH Wertheim, Germany
Gefriertruhe, -80°C	Gefriertruhe, -80°C Heraeus Holding Hanau, Germany
MACS Multi Stand	MACS MULTI STAND Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany
MicroCT Analysesoftware	MicroCT Analysis Software SCANCO Medical AG Brüttisellen, Switzerland
Mikroskop, Übersichtsaufnahmen	Leica MZ16A Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie Wetzlar, Germany
Oberfräse Dremel 300 series	Dremel® Series 300 Dremel Europe Breda, the Netherlands
pH-Meter	QpH 70 Merck Millipore Darmstadt, Germany
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung Biocut 2030 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie Wetzlar, Germany
Sicherheitswerkbank	Sicherheitswerkbank Klasse II NUAIRE Biological Safety Cabinets Plymouth, USA
Statistiksoftware	Graph Pad Prism GraphPad Software Boston, USA
Wärmeplatte, 37°C	bw03 Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Germany
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R Eppendorf Wesseling-Berzdorf, Germany
µCT, Mikrocomputertomograph	µCT 40 SCANCO Medical AG

Instrument	Produktname Hersteller Anschrift
anatomische Pinzette, stumpf	anatomische Pinzette mittelbreit Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
Dissektor	Ochsner Double-Ended Dissector Abmessungen 3mm und 4mm, 18,1cm Scanlan International, Inc. Saint Paul, USA
feine anatomische Pinzette, spitz	feine anatomische Pinzette Abmessungen 150mm, 6 Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
feine anatomische Pinzette, stumpf	feine anatomische Pinzette Abmessungen 120mm, 4 $\frac{3}{4}$ Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
feine Schere, spitz	feine Schere, gerade, spitz/spitz Abmessungen 105mm, 4 $\frac{1}{8}$ Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
feine Schere, stumpf	Feine Präparierschere, gebogen, stumpf/stumpf Abmessungen 145mm, 5 $\frac{3}{4}$ Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
Luer-Zange	Hohlmeißelzange, Luer-Friedmann Abmessungen 150mm, 6 Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
Nadelhalter, klein	Nadelhalter, feines Modell Abmessungen 150mm, 6 Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
Skalpell Einmalskalpell	Einmalskalpell #15, steril Aesculap AG Tuttlingen, Germany
Spülkanüle	Acufirm Spülkanüle, mit Spitzenolive, gebogen Ernst Kratz GmbH Dreieich, Germany
Wundspreizer, klein, scharf	Wundspreizer Abmessungen 70mm, 2 $\frac{3}{4}$ Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany

Zirkuliermesser Ø 5mm (außen)	Schleimhautstanze 225HP021 Ø 5 mm (außen) Hager & Meisinger GmbH Neuss, Germany
-------------------------------	--

Reagenzien	Produktname Hersteller Anschritt
Accutase	Accutase PAA Laboratories Pasching, Austria
Alkohol zur Entwässerung	2-Propanol Rotipuran® Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Germany
biotinylierter Sekundärantikörper	Dako LSAB2 System-HRP K0675 Dako Deutschland GmbH Hamburg, Germany
BMP-7 Bone Morphogenetic Protein-7	Human BMP-7 research grade Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany
BSA, Bovine Serum Albumin	BSA, Bovine Serum Albumin PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria
CD 31 monoklonaler Antikörper	Monoclonal Antibody to CD31/PECAM1 OriGene Technologies Inc. Rockville, United States
Cytoseal zum Eindecken	Cytoseal™ XYL Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
DAB-Chromogen	Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System K3467 Dako Deutschland GmbH Hamburg, Germany
destilliertes Wasser Aqua destillata Aqua dest.	Aqua B. Braun, Spüllösung B. Braun Melsungen Melsungen, Germany
Dimethylsulfoxid	DMSO, Dimethyl-Sulphoxid HYBRI-MAX SIGMA-Aldrich company Ayrshire, United Kingdom
DMEM	GIBCO® DMEM/F-12; 1:1, 1x, +GlutaMAX-I; Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM/F-12 (Ham) (1:1) 1x Invitrogen Ltd. Paisley, United Kingdom
DPBS	GIBCO® Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösungen (D-PBS) (1x) Invitrogen Ltd.

	Paisley, United Kingdom
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat für die Molekularbiologie AppliChem GmbH Darmstadt, Germany
Eisessig	Essigsäure (Eisessig) 100% Merck Millipore Darmstadt, Germany
Eosin G	Eosin G Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Germany
FcR Blocking Reagenz	FcR Blocking Reagent human Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany
FCS, hitzeinaktiviertes Kälberserum	fetales FCS, BSF Bovine Serum Fetal LINARIS Wertheim-Bettingen, Germany
Fentanyl	Fentanyl-Janssen 0,1mg/2ml Janssen-Cilag GmbH Neuss, Germany
Fibronektin Stammlösung	FC 010 Human Plasma Fibronectin 1mg/ml Merck Millipore Darmstadt, Germany
Ficoll'sche Lösung	LSM 1077, Lymphocyte Separation Medium PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria
Formaldehydlösung 4,5%	Roti®-Histofix, Formaldehydlösung 4,5% Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Germany
H2O2, Wasserstoffperoxid	Hydrogen Peroxide Merck Millipore Darmstadt, Germany
Hämalaun (nach Gill)	Gill's Hematoxylin #3 for Histology Polysciences Europe GmbH Eppelheim, Germany
Hämalaun (nach Mayer)	Mayer's Hämalaun - Lösung für die Mikroskopie AppliChem GmbH Darmstadt, Germany
HEPES-Puffer	HEPES-Puffer, pH 7,4 PAA Laboratories Pasching, Austria
Isopropanol zum Einfrieren	Isopropylalkohol GMP (2-Propanol) Hedinger Stuttgart, Germany
Isotone Kochsalzlösung, 0,9% 500ml	NaCl 0,9% B. Braun, 500 ml B. Braun Melsungen AG

		Melsungen, Germany
Kollagen Stammlösung		Collagen Typ I 4,08mg/ml BD Biosciences Heidelberg, Germany
Kollagenase		Crude Collagenase Type IV Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Germany
Medetomidin		Dorbene vet 1mg/ml Fort Dodge Veterinär GmbH Würselen, Germany
Medium 199 (zehnfach konzentriert)		M199 (10x) Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Germany
MICROFIL		MICROFIL Silicon Rubber Injection Compound, Yellow Flow Tech Inc. Carver, USA
Midazolam		Midazolam-ratiopharm 15mg/3ml ratiopharm GmbH Ulm, Germany
Natriumhydrogencarbonat (7,5%ig)	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat Merck Millipore Darmstadt, Germany
Natronlauge NaOH (1M)		Natronlauge Merck Millipore Darmstadt, Germany
Normalserum (Horse)		Pferdeserum (donor horse serum) Merck Millipore Darmstadt, Germany
Penicillin/Streptomycin-Sulfat		GIBCO® 100µg/ml Streptomycin-Sulfat // 100U/ml Penicillin Invitrogen Ltd. Paisley, United Kingdom
Proteinase K		Dako Proteinase K Ready-to-use S3020 Dako Deutschland GmbH Hamburg, Germany
Streptavidin HSP		Dako LSAB2 System-HRP Dako Deutschland GmbH Hamburg, Germany
Substratpuffer		Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System K3467 Dako Deutschland GmbH Hamburg, Germany
Tramadol		Tramadol-ratiopharm® 100mg/ml ratiopharm GmbH Ulm, Germany
Tris		Tris für die Molekularbiologie AppliChem GmbH Darmstadt, Germany
Wasser für den Autoklaven		Ampuwa® Spüllösung

	Fresenius Kabi AG Bad Homburg, Germany
Xylol	Xylol - Isomerengemisch für die Histologie AppliChem GmbH Darmstadt, Germany
Injektionskanüle, grau	BD Eclipse™, 27G x 1/2", grau BD Heidelberg, Germany
MS-Säule	MS-Column Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany
Nahtmaterial	Ethilon® 5-0 (1Ph. Eur), Polyamid 6 Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Germany
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Germany
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	TipOne® Pipette Tips 10µl, 100µl, 1000µl StarLab GmbH Ahrensburg, Germany
Pipettenspitzen 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Cellstar® serological pipette, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, sterile Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Germany
Röhrchen 15ml, 50ml	Cellstar® polypropylen tubes, 15ml, 50ml, sterile Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Germany
Spritze, 1ml	Injekt®-F B. Braun Melsungen Melsungen, Germany
Spritze, 5ml	BD Discardit™ II Spritze, 5ml BD Heidelberg, Germany
sterile Latexhandschuhe	Vasco® OP Sensitive B. Braun Melsungen Melsungen, Germany
Tupfer, steril	Schlinggazetupfer 15x15, 10Stück, steril Fuhrmann GmbH Much, Germany
Waschlotion	Lifosan® soft B. Braun Melsungen Melsungen, Germany

9 References

1. Nauth, A., Schemitsch, E., Norris, B., Nollin, Z., Watson, J.T.: Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *Journal of orthopaedic trauma* **32**(March 2018), S7 (2018). doi: 10.1097/BOT.0000000000001115
2. Amelie Altenbuchner, Sonja Haug, Karsten Weber: Die ersten Schritte nach einer hüftnahen Fraktur: Sensorbasierte Bewegungsexploration bei geriatrischen Traumapatient/-innen. *Zeitschrift Fur Gerontologie Und Geriatrie* **54**(6), 555 (2021). doi: 10.1007/s00391-021-01861-3
3. Rupp, M., Walter, N., Pfeifer, C., Lang, S., Kerschbaum, M., Krutsch, W., Baumann, F., Alt, V.: The Incidence of Fractures Among the Adult Population of Germany—an Analysis From 2009 through 2019. *Deutsches Arzteblatt international* **118**(40), 665–669 (2021). doi: 10.3238/arztebl.m2021.0238
4. Robert Zura, Ze Xiong, Thomas Einhorn, J. Tracy Watson, Robert F. Ostrum, Michael J. Prayson, Gregory J. Della Rocca, Samir Mehta, Todd McKinley, Zhe Wang, R. Grant Steen: Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA Surg* **151**(11), e162775-e162775 (2016). doi: 10.1001/jamasurg.2016.2775
5. Louise Johnson, Emily Igoe, George Kleftouris, Ioannis V. Papachristos, Costas Papakostidis, Peter V. Giannoudis: Physical Health and Psychological Outcomes in Adult Patients with Long-Bone Fracture Non-Unions: Evidence Today. *Journal of Clinical Medicine* **8**(11) (2019). doi: 10.3390/jcm8111998
6. M. Müller, A. Seitz, L. Besch, R.E. Hilgert, A. Seekamp: Versorgung pertrochantärer Femurfrakturen. *Der Unfallchirurg* **2**(111), 71–78 (2008). doi: 10.1007/s00113-008-1393-0
7. Murray, C.E., Coleman, C.M.: Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *International journal of molecular sciences* **20**(19) (2019). doi: 10.3390/ijms20194873
8. Zhang, Q., Nettleship, I., Schmelzer, E., Gerlach, J., Zhang, X., Wang, J., Liu, C.: Tissue Engineering and Regenerative Medicine Therapies for Cell Senescence in Bone and Cartilage. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **26**(1), 64–78 (2020). doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0215
9. Steckel, H., Oldenburg, M., Müller, R.T.: Die Therapie des Enchondroms im langen Röhrenknochen (Therapy of enchondroma in long bones). *Der Unfallchirurg* **108**(6), 445–450 (2005). doi: 10.1007/s00113-005-0953-9
10. Gazdag, A.R., Lane, J.M., Glaser, D., Forster, R.A.: Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **3**(1), 1–8 (1995). doi: 10.5435/00124635-199501000-00001
11. Schmidt, A.H.: Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury* **52 Suppl 2**, S18-S22 (2021). doi: 10.1016/j.injury.2021.01.043
12. Younger, E.M., Chapman, M.W.: Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma* **3**(3), 192–195 (1989). doi: 10.1097/00005131-198909000-00002
13. Manzini, B.M., Machado, L.M.R., Noritomi, P.Y., DA Silva, J.V.L.: Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. *Journal of biosciences* **46** (2021)

14. Buck, D.W., Dumanian, G.A.: Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plastic and reconstructive surgery* **129**(6), 1314–1320 (2012). doi: 10.1097/PRS.0b013e31824eca94
15. Chen, G., Deng, C., Li, Y.-P.: TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences* **8**(2), 272–288 (2012). doi: 10.7150/ijbs.2929
16. Lüllmann-Rauch, R., Asan, E.: Taschenlehrbuch Histologie, 7th edn. Thieme, Stuttgart (2024)
17. Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., Recker, R.: Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures* **45**, 371–386 (1996)
18. Bhattacharjee, P., Kundu, B., Naskar, D., Kim, H.-W., Maiti, T.K., Bhattacharya, D., Kundu, S.C.: Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. *Acta biomaterialia* **63**, 1–17 (2017). doi: 10.1016/j.actbio.2017.09.027
19. Robling, A.G., Castillo, A.B., Turner, C.H.: Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual review of biomedical engineering* **8**, 455–498 (2006). doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721
20. Dallas, S.L., Prideaux, M., Bonewald, L.F.: The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine reviews* **34**(5), 658–690 (2013). doi: 10.1210/er.2012-1026
21. Gillman, C.E., Jayasuriya, A.C.: FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C* **130**, 112466 (2021). doi: 10.1016/j.msec.2021.112466
22. Claes, L., Recknagel, S., Ignatius, A.: Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature reviews. Rheumatology* **8**(3), 133–143 (2012). doi: 10.1038/nrrheum.2012.1
23. Bucholz, R.W., Heckman, J.D., Court-Brown, C.M., Tornetta, P., McQueen, M.M., Ricci, W.M.: Rockwood and Green's fractures in adults. In: Bucholz, R.W., Heckman, J.D., Court-Brown, C.M., Tornetta, P., McQueen, M.M., Ricci, W.M. (eds.) *Rockwood and Green's fractures in adults*, p. 1275 (2010)
24. Maruyama, M., Rhee, C., Utsunomiya, T., Zhang, N., Ueno, M., Yao, Z., Goodman, S.B.: Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Frontiers in endocrinology* **11**, 386 (2020). doi: 10.3389/fendo.2020.00386
25. Hernigou, J., Schuind, F.: Smoking as a predictor of negative outcome in diaphyseal fracture healing. *International orthopaedics* **37**(5), 883–887 (2013). doi: 10.1007/s00264-013-1809-5
26. Fullerton, J.N., Gilroy, D.W.: Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews. Drug discovery* **15**(8), 551–567 (2016). doi: 10.1038/nrd.2016.39
27. Frölke, J.P.M., Patka, P.: Definition and classification of fracture non-unions. *Injury* **38 Suppl 2**, S19-22 (2007). doi: 10.1016/s0020-1383(07)80005-2
28. Jäger, M., Wassenaar, D., Busch, A., Haversath, M.: Pseudarthrosen (Pseudarthroses). *Orthopäde* **49**(6), 547–560 (2020). doi: 10.1007/s00132-020-03920-w
29. Kujath, P., Michelsen, A.: Wounds - from physiology to wound dressing. *Deutsches Arzteblatt international* **105**(13), 239–248 (2008). doi: 10.3238/arztebl.2008.0239

30. Tonnesen, M.G., Feng, X., Clark, R.A.: Angiogenesis in wound healing. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* **5**(1), 40–46 (2000). doi: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x
31. Melincovici, C.S., Boşca, A.B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I.M., Roman, A.L., Mişu, C.M.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* **59**(2), 455–467 (2018)
32. Eelen, G., Zeeuw, P. de, Treps, L., Harjes, U., Wong, B.W., Carmeliet, P.: Endothelial Cell Metabolism. *Physiological reviews* **98**(1), 3–58 (2018). doi: 10.1152/physrev.00001.2017
33. Brooks, P.C.: Role of integrins in angiogenesis. *European Journal of Cancer* **32A**(14), 2423–2429 (1996). doi: 10.1016/S0959-8049(96)00381-4
34. Ruoslahti, E.: RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology* **12**, 697–715 (1996). doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
35. Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheresch, D.A.: Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* **264**(5158), 569–571 (1994). doi: 10.1126/science.7512751
36. Kriegel, A., Langendorf, E., Kottmann, V., Kämmerer, P.W., Armbruster, F.P., Wiesmann-Imilowski, N., Baranowski, A., Gercek, E., Drees, P., Rommens, P.M., Ritz, U.: Bone Sialoprotein Immobilized in Collagen Type I Enhances Angiogenesis In Vitro and In Ovo. *Polymers* **15**(4) (2023). doi: 10.3390/polym15041007
37. Bellahcène, A., Bonjean, K., Fohr, B., Fedarko, N.S., Robey, F.A., Young, M.F., Fisher, L.W., Castronovo, V.: Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circulation research* **86**(8), 885–891 (2000). doi: 10.1161/01.res.86.8.885
38. Jakob, F., Ebert, R., Ignatius, A., Matsushita, T., Watanabe, Y., Groll, J., Walles, H.: Bone tissue engineering in osteoporosis. *Maturitas* **75**(2), 118–124 (2013). doi: 10.1016/j.maturitas.2013.03.004
39. PubMed: The role of the immune microenvironment in bone, cartilage, and soft tissue regeneration: from mechanism to therapeutic opportunity - PubMed (2023)
40. PubMed: Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury - PubMed (2023)
41. Camacho-Cardenosa, M., Camacho-Cardenosa, A., Timón, R., Olcina, G., Tomas-Carus, P., Brazo-Sayavera, J.: Can Hypoxic Conditioning Improve Bone Metabolism? A Systematic Review. *International journal of environmental research and public health* **16**(10) (2019). doi: 10.3390/ijerph16101799
42. 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. *Connective tissue research* **56**(3), 175–194 (2015). doi: 10.3109/03008207.2015.1027341
43. McGovern, J.A., Griffin, M., Hutmacher, D.W.: Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms* **11**(4) (2018). doi: 10.1242/dmm.033084

44. Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., Dequeker, J.: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* **139**(2), 663–670 (1998). doi: 10.1210/endo.139.2.5751
45. Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R.: Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative medicine* **51**(4), 292–299 (2001)
46. Quarto, N., Wan, D.C., Kwan, M.D., Panetta, N.J., Li, S., Longaker, M.T.: Origin Matters: Differences in Embryonic Tissue Origin and Wnt Signaling Determine the Osteogenic Potential and Healing Capacity of Frontal and Parietal Calvarial Bones. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**(7), 1680–1694 (2009). doi: 10.1359/jbmr.091116
47. Bosch, C., Melsen, B., Vargervik, K.: Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *The Journal of craniofacial surgery* **9**(4), 310–316 (1998). doi: 10.1097/00001665-199807000-00004
48. Gomes, P.S., Fernandes, M.H.: Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory animals* **45**(1), 14–24 (2011). doi: 10.1258/la.2010.010085
49. Kotagudda Ranganath, S., Schlund, M., Delattre, J., Ferri, J., Chai, F.: Bilateral double site (calvarial and mandibular) critical-size bone defect model in rabbits for evaluation of a craniofacial tissue engineering constructs. *Materials Today Bio* **14** (2022). doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100267
50. Hollinger, J.O., Kleinschmidt, J.C.: The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery* **1**(1), 60–68 (1990). doi: 10.1097/00001665-199001000-00011
51. da Silva Morais, A., Oliveira, J.M., Reis, R.L.: Small Animal Models. *Advances in experimental medicine and biology* **1059**, 423–439 (2018). doi: 10.1007/978-3-319-76735-2_19
52. Kruger, T.E., Miller, A.H., Wang, J.: Collagen Scaffolds in Bone Sialoprotein-Mediated Bone Regeneration. *The Scientific World Journal* **2013**, 1–6 (2013). doi: 10.1155/2013/812718
53. Vincent, K., Durrant, M.C.: A structural and functional model for human bone sialoprotein. *Journal of molecular graphics & modelling* **39**, 108–117 (2013). doi: 10.1016/j.jmglm.2012.10.007
54. Harris, N.L., Rattray, K.R., Tye, C.E., Underhill, T.M., Somerman, M.J., D'Errico, J.A., Chambers, A.F., Hunter, G.K., Goldberg, H.A.: Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone* **27**(6), 795–802 (2000). doi: 10.1016/s8756-3282(00)00392-6
55. Boulefour, W., Juignet, L., Verdière, L., Machuca-Gayet, I., Thomas, M., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Farlay, D., Thomas, C., Gineyts, E., Concordet, J.P., Renaud, J.B., Aubert, D., Teixeira, M., Peyruchaud, O., Vico, L., Lafage-Proust, M.H., Follet, H., Malaval, L.: Deletion of OPN in BSP knockout mice does not correct bone hypomineralization but results in high bone turnover. *Bone* **120**, 411–422 (2019). doi: 10.1016/j.bone.2018.12.001
56. Baranowski, A., Klein, A., Ritz, U., Ackermann, A., Anthonissen, J., Kaufmann, K.B., Brendel, C., Götz, H., Rommens, P.M., Hofmann, A.: Surface Functionalization of Orthopedic Titanium Implants with Bone Sialoprotein. *PLoS one* **11**(4), e0153978 (2016). doi: 10.1371/journal.pone.0153978

57. Hilbig, H., Kirsten, M., Rupietta, R., Graf, H.-L., Thalhammer, S., Strasser, S., Armbruster, F.P.: Implant surface coatings with bone sialoprotein, collagen, and fibronectin and their effects on cells derived from human maxillar bone. *European journal of medical research* **12**(1), 6–12 (2007)
58. Davies, J.E.: In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat. Rec.* **245**(2), 426–445 (1996). doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<426:AID-AR21>3.0.CO;2-Q
59. Chen, W.-C., Chang, A.-C., Tsai, H.-C., Liu, P.-I., Huang, C.-L., Guo, J.-H., Liu, C.-L., Liu, J.-F., Le Huynh Hoai Thuong, Tang, C.-H.: Bone sialoprotein promotes lung cancer osteolytic bone metastasis via MMP14-dependent mechanisms. *Biochemical pharmacology* **211**, 115540 (2023). doi: 10.1016/j.bcp.2023.115540
60. Salazar, V.S., Gamer, L.W., Rosen, V.: BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature reviews. Endocrinology* **12**(4), 203–221 (2016). doi: 10.1038/nrendo.2016.12
61. Bessa, P.C., Casal, M., Reis, R.L.: Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2**(1), 1–13 (2008). doi: 10.1002/term.63
62. Lowery, J.W., Rosen, V.: The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiological reviews* **98**(4), 2431–2452 (2018). doi: 10.1152/physrev.00028.2017
63. Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V., Tabin, C.J.: Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS genetics* **2**(12), e216 (2006). doi: 10.1371/journal.pgen.0020216
64. Wang, E.A., Israel, D.I., Kelly, S., Luxenberg, D.P.: Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **9**(1), 57–71 (1993). doi: 10.3109/08977199308991582
65. Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Börner, M.G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R.L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P.M., Rondia, J., Rossouw, W.C., Daneel, P.J., Ruff, S., Rüter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T.A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R.B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A., Wisniewski, T.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **84**(12), 2123–2134 (2002). doi: 10.2106/00004623-200212000-00001
66. Yuan, H., Yang, Z., Li, Y., Zhang, X., Bruijn, J.D. de, Groot, K. de: Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Journal of materials science. Materials in medicine* **9**(12), 723–726 (1998). doi: 10.1023/a:1008950902047
67. Donoso, O., Pino, A.M., Seitz, G., Osses, N., Rodríguez, J.P.: Osteoporosis-associated alteration in the signalling status of BMP-2 in human MSCs under adipogenic conditions. *Journal of cellular biochemistry* **116**(7), 1267–1277 (2015). doi: 10.1002/jcb.25082

68. Cho, J.H., Lee, J.H., Lee, K.M., Lee, C.-K., Shin, D.-M.: BMP-2 Induced Signaling Pathways and Phenotypes: Comparisons Between Senescent and Non-senescent Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Calcified Tissue International* **110**(4), 489–503 (2022). doi: 10.1007/s00223-021-00923-3
69. Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R.D., Sogayar, M.C., Granjeiro, J.M.: Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *Journal of dental research* **93**(4), 335–345 (2014). doi: 10.1177/0022034513518561
70. Cook, S.D., Baffes, G.C., Wolfe, M.W., Sampath, T.K., Rueger, D.C.: Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clinical orthopaedics and related research*(301), 302–312 (1994)
71. Cook, S.D., Baffes, G.C., Wolfe, M.W., Sampath, T.K., Rueger, D.C., Whitecloud, T.S.: The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **76**(6), 827–838 (1994). doi: 10.2106/00004623-199406000-00006
72. El Bialy, I., Jiskoot, W., Reza Nejadnik, M.: Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharmaceutical Research* **34**(6), 1152–1170 (2017). doi: 10.1007/s11095-017-2147-x
73. Samavedi, S., Whittington, A.R., Goldstein, A.S.: Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta biomaterialia* **9**(9), 8037–8045 (2013). doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.014
74. Rahmati, M., Silva, E.A., Reseland, J.E., A Heyward, C., Haugen, H.J.: Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chemical Society reviews* **49**(15), 5178–5224 (2020). doi: 10.1039/d0cs00103a
75. Koushik, T.M., Miller, C.M., Antunes, E.: Bone Tissue Engineering Scaffolds: Function of Multi-Material Hierarchically Structured Scaffolds. *Advanced healthcare materials* **12**(9), e2202766 (2023). doi: 10.1002/adhm.202202766
76. Shrivats, A.R., McDermott, M.C., Hollinger, J.O.: Bone tissue engineering: state of the union. *Drug discovery today* **19**(6), 781–786 (2014). doi: 10.1016/j.drudis.2014.04.010
77. Ravanbakhsh, H., Karamzadeh, V., Bao, G., Mongeau, L., Juncker, D., Zhang, Y.S.: Emerging Technologies in Multi-Material Bioprinting. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **33**(49), e2104730 (2021). doi: 10.1002/adma.202104730
78. Jung, J.-Y., Naleway, S.E., Maker, Y.N., Kang, K.Y., Lee, J., Ha, J., Hur, S.S., Chien, S., McKittrick, J.: 3D Printed Templating of Extrinsic Freeze-Casting for Macro-Microporous Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **5**(5), 2122–2133 (2019). doi: 10.1021/acsbomaterials.8b01308
79. Murphy, C.M., Haugh, M.G., O'Brien, F.J.: The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **31**(3), 461–466 (2010). doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.063
80. Kanwar, S., Al-Ketan, O., Vijayavenkataraman, S.: A novel method to design biomimetic, 3D printable stochastic scaffolds with controlled porosity for bone tissue engineering. *Materials & Design* **220**, 110857 (2022). doi: 10.1016/j.matdes.2022.110857

81. Merola, M., Affatato, S.: Materials for Hip Prostheses: A Review of Wear and Loading Considerations. *Materials* **12**(3) (2019). doi: 10.3390/ma12030495
82. Erasmus, E.P., Sule, R., Johnson, O.T., Massera, J., Sigalas, I.: In vitro Evaluation of Porous borosilicate, borophosphate and phosphate Bioactive Glasses Scaffolds fabricated using Foaming Agent for Bone Regeneration. *Scientific reports* **8**(1), 3699 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-22032-2
83. Ribas, R.G., Schatkoski, V.M., Montanheiro, Thaís Larissa do Amaral, Menezes, B.R.C. de, Stegemann, C., Leite, D.M.G., Thim, G.P.: Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceramics International* **45**(17), 21051–21061 (2019). doi: 10.1016/j.ceramint.2019.07.096
84. Guo, L., Liang, Z., Yang, L., Du, W., Yu, T., Tang, H., Li, C., Qiu, H.: The role of natural polymers in bone tissue engineering. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **338**, 571–582 (2021). doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.055
85. Jäger, M., Herten, M., Fochtmann, U., Fischer, J., Hernigou, P., Zilkens, C., Hendrich, C., Krauspe, R.: Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **29**(2), 173–180 (2011). doi: 10.1002/jor.21230
86. Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V., Ciardelli, G.: Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia* **8**(9), 3191–3200 (2012). doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.014
87. Zhang, Y., Shi, B., Li, C., Wang, Y., Chen, Y., Zhang, W., Luo, T., Cheng, X.: The synergistic bone-forming effects of combinations of growth factors expressed by adenovirus vectors on chitosan/collagen scaffolds. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **136**(3), 172–178 (2009). doi: 10.1016/j.jconrel.2009.02.016
88. Abarategi, A., Moreno-Vicente, C., Ramos, V., Aranaz, I., Sanz Casado, J.V., López-Lacomba, J.L.: Improvement of porous beta-TCP scaffolds with rhBMP-2 chitosan carrier film for bone tissue application. *Tissue Engineering Part A* **14**(8), 1305–1319 (2008). doi: 10.1089/ten.tea.2007.0229
89. Lee, Y.M., Park, Y.J., Lee, S.J., Ku, Y., Han, S.B., Klokkevold, P.R., Chung, C.P.: The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *Journal of Periodontology* **71**(3), 418–424 (2000). doi: 10.1902/jop.2000.71.3.418
90. Langdahl, B., Ferrari, S., Dempster, D.W.: Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* **8**(6), 225–235 (2016). doi: 10.1177/1759720X16670154
91. Su, Y., Cockerill, I., Wang, Y., Qin, Y.-X., Chang, L., Zheng, Y., Zhu, D.: Zinc-Based Biomaterials for Regeneration and Therapy. *Trends in biotechnology* **37**(4), 428–441 (2019). doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.009
92. Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T.: Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**(12), 1531–1546 (2003). doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002
93. Glowacki, J., Mizuno, S.: Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* **89**(5), 338–344 (2008). doi: 10.1002/bip.20871

94. Sampias, C., Rolls, G.: Übersicht H&E-Färbung: Ein Leitfaden zur guten Praxis. Leica Biosystems. <https://www.leicabiosystems.com/de-de/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices/>. Accessed 9 April 2024
95. Meghan A. Piccinin, Janice Schwartz: Histology, Verhoeff Stain. In: Piccinin, M.A., Schwartz, J. (eds.) StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing (2023)
96. Doan, C.: Spezialfärbungen – Welche, warum und wie? Teil 2: Bindegewebe. Leica Biosystems. <https://www.leicabiosystems.com/de-de/knowledge-pathway/special-stains-which-one-how-and-why-part-ii-connective-tissue/>. Accessed 9 April 2024
97. dianova: Anti-Maus CD31 Antikörper für FFPE Gewebe: Klon SZ31 ist der Goldstandard. - dianova (2022)
98. Guesdon, J.L., Ternynck, T., Avrameas, S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **27**(8), 1131–1139 (1979). doi: 10.1177/27.8.90074
99. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W.: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**(7), 671–675 (2012). doi: 10.1038/nmeth.2089
100. Domander, R., Felder, A.A., Doube, M.: BoneJ2 - refactoring established research software. *Wellcome open research* **6**, 37 (2021). doi: 10.12688/wellcomeopenres.16619.2
101. Doube, M., Kłosowski, M.M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F.P., Dougherty, R.P., Jackson, J.S., Schmid, B., Hutchinson, J.R., Shefelbine, S.J.: BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* **47**(6), 1076–1079 (2010). doi: 10.1016/j.bone.2010.08.023
102. O'Loughlin, P.F., Morr, S., Bogunovic, L., Kim, A.D., Park, B., Lane, J.M.: Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **90 Suppl 1**, 79–84 (2008). doi: 10.2106/JBJS.G.01585
103. Al-Hamed, F.S., Rodan, R., Ramirez-Garcialuna, J.L., Elkashty, O., Al-Shahrani, N., Tran, S.D., Lordkipanidzé, M., Kaartinen, M., Badran, Z., Tamimi, F.: The effect of aging on the bone healing properties of blood plasma. *Injury* **52**(7), 1697–1708 (2021). doi: 10.1016/j.injury.2021.05.001
104. Spicer, P.P., Kretlow, J.D., Young, S., Jansen, J.A., Kasper, F.K., Mikos, A.G.: Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols* **7**(10), 1918–1929 (2012). doi: 10.1038/nprot.2012.113
105. Dubus, M., Scomazzon, L., Ledouble, C., Braux, J., Beljebbar, A., van Gulick, L., Baldit, A., Gorin, C., Alem, H., Bouland, N., Britton, M., Schiavi, J., Vaughan, T.J., Mauprivez, C., Kerdjoudj, H.: Hybrid Mineral/Organic Material Induces Bone Bridging and Bone Volume Augmentation in Rat Calvarial Critical Size Defects. *Cells* **11**(18) (2022). doi: 10.3390/cells11182865
106. Liu, B., Li, J., Lei, X., Miao, S., Zhang, S., Cheng, P., Song, Y., Wu, H., Gao, Y., Bi, L., Pei, G.: Cell-loaded injectable gelatin/alginate/LAPONITE® nanocomposite hydrogel promotes bone healing in a critical-size rat calvarial defect model. *RSC advances* **10**(43), 25652–25661 (2020). doi: 10.1039/d0ra03040f
107. Wähnert, D., Koettnitz, J., Merten, M., Kronenberg, D., Stange, R., Greiner, J.F.W., Kaltschmidt, C., Vordemvenne, T., Kaltschmidt, B.: Spongostan™ Leads to Increased Regeneration of a Rat Calvarial Critical Size Defect Compared to NanoBone® and Actifuse. *Materials* **14**(8) (2021). doi: 10.3390/ma14081961

108. Hatakeyama, W., Taira, M., Sawada, T., Hoshi, M., Hachinohe, Y., Sato, H., Takafuji, K., Kihara, H., Takemoto, S., Kondo, H.: Bone Regeneration of Critical-Size Calvarial Defects in Rats Using Highly Pressed Nano-Apatite/Collagen Composites. *Materials* **15**(9) (2022). doi: 10.3390/ma15093376
109. Vajgel, A., Mardas, N., Farias, B.C., Petrie, A., Cimões, R., Donos, N.: A Systematic Review on the Critical Size Defect Model. *Clinical oral implants research* **25**(8) (2014). doi: 10.1111/clr.12194
110. Tomlinson, D.J., Erskine, R.M., Morse, C.I., Winwood, K., Onambélé-Pearson, G.: The impact of obesity on skeletal muscle strength and structure through adolescence to old age. *Biogerontology* **17**(3), 467–483 (2016). doi: 10.1007/s10522-015-9626-4
111. Zheng, Z., Zhan, Q., Chen, A., Yu, Z., Chen, G.: Islet β -cells physiological difference study of old and young mice based on single-cell transcriptomics. *Journal of diabetes investigation* **12**(10), 1775–1783 (2021). doi: 10.1111/jdi.13579
112. Barceló, P., Nicolau, C., Gamundí, A., Fiol, M.A., Tresguerres, J.A.F., Akaâr, M., Rial, R.V.: Comparing the Behavioural Effects of Exogenous Growth Hormone and Melatonin in Young and Old Wistar Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**, 5863402 (2016). doi: 10.1155/2016/5863402
113. Meisinger, C., Wildner, M., Stieber, J., Heier, M., Sangha, O., Döring, A.: Epidemiologie der Extremitätenfrakturen (Epidemiology of limb fractures). *Der Orthopade* **31**(1), 92–99 (2002). doi: 10.1007/s132-002-8281-x
114. BMG: Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 | BMG (2024)
115. Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Häussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F., Linder, R.: The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Deutsches Arzteblatt international* **110**(4), 52–57 (2013). doi: 10.3238/arztebl.2013.0052
116. Olsen, D., Yang, C., Bodo, M., Chang, R., Leigh, S., Baez, J., Carmichael, D., Perälä, M., Hämäläinen, E.-R., Jarvinen, M., Polarek, J.: Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**(12), 1547–1567 (2003). doi: 10.1016/j.addr.2003.08.008
117. Vijayalekha, A., Anandasadagopan, S.K., Pandurangan, A.K.: An Overview of Collagen-Based Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Appl Biochem Biotechnol* **195**(7), 4617–4636 (2023). doi: 10.1007/s12010-023-04318-y
118. Ardelean, I.L., Gudovan, D., Ficai, D., Ficai, A., Andronescu, E., Albu-Kaya, M.G., Neacsu, P., Ion, R.N., Cimpean, A., Mitran, V.: Collagen/hydroxyapatite bone grafts manufactured by homogeneous/heterogeneous 3D printing. *Materials Letters* **231**, 179–182 (2018). doi: 10.1016/j.matlet.2018.08.042
119. Koo, Y., Choi, E.-J., Lee, J., Kim, H.-J., Kim, G., Do, S.H.: 3D printed cell-laden collagen and hybrid scaffolds for in vivo articular cartilage tissue regeneration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **66**, 343–355 (2018). doi: 10.1016/j.jiec.2018.05.049
120. Al-Ahmady, H.H., Abd Elazeem, A.F., Bellah Ahmed, N.E., Shawkat, W.M., Elmasry, M., Abdelrahman, M.A., Abderazik, M.A.: Combining autologous bone marrow mononuclear cells seeded on collagen sponge with Nano Hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin: Reporting a novel strategy for alveolar cleft bone regeneration. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the*

- European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery **46**(9), 1593–1600 (2018). doi: 10.1016/j.jcms.2018.05.049
121. Huang, Z., Chen, H., Wang, Y., Xiao, T., Guo, T., Ren, Z., Wu, C., Wang, Y.: Collagen/Curdlan composite sponge for rapid hemostasis and skin wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* **273**(Pt 1), 133032 (2024). doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133032
 122. Xu, L., Anderson, A.L., Lu, Q., Wang, J.: Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation. *Biomaterials* **28**(4), 750–761 (2007). doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.022
 123. Dhand, C., Ong, S.T., Dwivedi, N., Diaz, S.M., Venugopal, J.R., Navaneethan, B., Fazil, M.H.U.T., Liu, S., Seitz, V., Wintermantel, E., Beuerman, R.W., Ramakrishna, S., Verma, N.K., Lakshminarayanan, R.: Bio-inspired in situ crosslinking and mineralization of electrospun collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **104**, 323–338 (2016). doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.007
 124. Boulefour, W., Juignet, L., Bouet, G., Granito, R.N., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Aubin, J.E., Lafage-Proust, M.-H., Vico, L., Malaval, L.: The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **52-54**, 60–77 (2016). doi: 10.1016/j.matbio.2015.12.011
 125. Monfoulet, L., Malaval, L., Aubin, J.E., Rittling, S.R., Gadeau, A.P., Fricain, J.-C., Chassande, O.: Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone* **46**(2), 447–452 (2010). doi: 10.1016/j.bone.2009.09.007
 126. Baranowski, A., Klein, A., Ritz, U., Ackermann, A., Anthonissen, J., Kaufmann, K.B., Brendel, C., Götz, H., Rommens, P.M., Hofmann, A.: Surface Functionalization of Orthopedic Titanium Implants with Bone Sialoprotein. *PLoS one* **11**(4), e0153978 (2016). doi: 10.1371/journal.pone.0153978
 127. Klein, A., Baranowski, A., Ritz, U., Götz, H., Heinemann, S., Mattyasovszky, S., Rommens, P.M., Hofmann, A.: Effect of bone sialoprotein coated three-dimensional printed calcium phosphate scaffolds on primary human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **106**(7), 2565–2575 (2018). doi: 10.1002/jbm.b.34073
 128. Baranowski, A., Klein, A., Ritz, U., Götz, H., Mattyasovszky, S., Rommens, P., Hofmann, A.: Evaluation of Bone Sialoprotein Coating of Three-Dimensional Printed Calcium Phosphate Scaffolds in a Calvarial Defect Model in Mice. *Materials* **11**(11), 2336 (2018). doi: 10.3390/ma11112336
 129. Anja Kriegel, Christian Schlosser, Tanja Habeck, Christoph Dahmen, Hermann Götz, Franziska Clauder, Franz Paul Armbruster, Andreas Baranowski, Philipp Drees, Pol Maria Rommens, Ulrike Ritz: Bone Sialoprotein Immobilized in Collagen Type I Enhances Bone Regeneration In vitro and In vivo. *International Journal of Bioprinting* **8**(3) (2022). doi: 10.18063/ijb.v8i3.591
 130. Choi, Y.J., Lee, J.Y., Chung, C.-P., Park, Y.J.: Enhanced osteogenesis by collagen-binding peptide from bone sialoprotein *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **101A**(2), 547–554 (2012). doi: 10.1002/jbm.a.34356

131. Oldberg, A., Franzén, A., Heinegård, D.: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**(23), 8819–8823 (1986). doi: 10.1073/pnas.83.23.8819
132. Ogata, Y.: Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *Journal of periodontal research* **43**(2), 127–135 (2008). doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01014.x
133. Oldberg, A., Franzén, A., Heinegård, D.: The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **263**(36), 19430–19432 (1988). doi: 10.1016/S0021-9258(19)77651-0
134. Das, A., Botchwey, E.: Evaluation of angiogenesis and osteogenesis. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **17**(6), 403–414 (2011). doi: 10.1089/ten.TEB.2011.0190
135. Förster, Y., Rentsch, C., Schneiders, W., Bernhardt, R., Simon, J.C., Worch, H., Rammelt, S.: Surface modification of implants in long bone. *Biomater* **2**(3), 149–157 (2012). doi: 10.4161/biom.21563
136. Ghanavati, S., Yu, L.X., Lerch, J.P., Sled, J.G.: A perfusion procedure for imaging of the mouse cerebral vasculature by X-ray micro-CT. *Journal of Neuroscience Methods* **221**, 70–77 (2014). doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.09.002
137. Liu, X., Terry, T., Pan, S., Yang, Z., Willerson, J.T., Dixon, R.A.F., Liu, Q.: Osmotic drug delivery to ischemic hindlimbs and perfusion of vasculature with microfil for micro-computed tomography imaging. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(76) (2013). doi: 10.3791/50364
138. Imber, J.-C., Rocuzzo, A., Stähli, A., Saulacic, N., Deschner, J., Sculean, A., Bosshardt, D.D.: Immunohistochemical Evaluation of Periodontal Regeneration Using a Porous Collagen Scaffold. *International journal of molecular sciences* **22**(20) (2021). doi: 10.3390/ijms222010915

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei denjenigen bedanken die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. Es war ein langer Weg mit viel Hilfe, ohne die ich diese Promotion niemals geschafft hätte.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter für das Überlassen und das Betreuen dieses interessanten und aktuellen Themas. Die Zeit und Geduld, die sie aufgebracht hat, mich in der Fertigstellung dieser Arbeit zu unterstützen und zu motivieren ist in keinerlei Worte zu fassen. Du hast mir jedes Mal, wenn ich aufgeben wollte das Gefühl gegeben, dass dies keine Option ist und mich motiviert weiterzumachen.

Weiterer Dank geht an, die mich während der Zeit dieser Arbeit betreut hat. Die Einführung in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens wurde durch ihre Hilfe sehr einfach. Ohne deine Hilfe wäre die experimentelle Durchführung niemals möglich gewesen.

Ich danke auch, ohne deren Hilfe eine histologische und radiologische Auswertung nicht hätte stattfinden können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meine Verlobte war stets an meiner Seite, hat mich unterstützt, wenn ich nicht mehr denken konnte und hat mir die richtigen Impulse gegeben, um weiterzukommen. Du hast viel Verständnis gezeigt. Obwohl du fachfremd in diesem Thema warst, haben wir es geschafft fachlich zu diskutieren.

Ich möchte mich bei meiner Schwester bedanken, die mich in der Bildbearbeitung unterstützt hat.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Arbeitskollegen Majd. Jeder von euch hat auf unterschiedliche Weise einen Einfluss gehabt, sei es die Möglichkeit kurzfristig freie Tage zu nehmen, oder zum Gegenlesen der Promotion.

11 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname: **Christian**

Nachname: **Schlosser**

Schulischer Werdegang

09/97 - 06/01 **Pestalozzischule Grundschule, Diez**

09/01 - 06/07 **Theodor-Heuss-Schule, Realschule Limburg an der Lahn**

Ausbildung

10/07 – 11/10 **Masseur und medizinischer Bademeister, Koblenz**

11/10 - 04/12 **Ausbildung zum Physiotherapeuten, Koblenz**

Studium

10/14 - 11/21 **Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz**

Beruflicher Werdegang

01/22 – heute **Assistenzarzt in der Inneren Medizin für Nephrologie und
Infektiologie**

Fortbildungen

03/2022 **DEGUM zertifizierter Grundkurs Sonographie**

11/2023 **DEGUM zertifizierter Grundkurs Echokardiografie**

03/2024 **Antibiotic Stewardship Modul I**