

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

Biofabrikation eines mit Wachstumsfaktoren funktionalisierten, 3D-gedruckten  
Scaffolds zur Knochenregeneration im Rahmen des  
Bone Tissue Engineerings

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

Vorgelegt von

Alina Lauer  
aus Wiesbaden

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.Juli 2021

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS.....	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	1
EINLEITUNG.....	4
ZIEL DER DISSERTATIONSSCHRIFT.....	5
LITERATURDISKUSSION.....	7
FRAKTURHEILUNG.....	7
DIREKTE (PRIMÄRE) FRAKTURHEILUNG.....	7
INDIREKTE (SEKUNDÄRE) FRAKTURHEILUNG.....	8
STÖRUNGEN DER FRAKTURHEILUNG.....	12
VERZÖGERTE FRAKTURHEILUNG.....	12
PSEUDARTHROSE.....	12
KLASSIFIKATION DER PSEUDARTHROSE.....	13
1. Vitale Pseudarthrose.....	13
2. Avitale Pseudarthrosen.....	14
THERAPIEN DER PSEUDARTHROSEN.....	15
KLEINTIERMODELL.....	17
CRITICAL-SIZE-DEFECT (CSD).....	17
BONE TISSUE ENGINEERING (BTE).....	18
SCAFFOLD.....	20
POLYLACTIDE (PLA).....	22
BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs).....	23
STROMAL DERIVED FACTOR-1 (SDF-1).....	26
MATERIAL UND METHODIK.....	29
VERSUCHSTIERE.....	29
<i>Tierversuchsantrag</i> .....	29
<i>Tierbezug</i> .....	29
<i>Tierhaltung</i> .....	29
ORGANISATION DER VERSUCHSGRUPPEN.....	30
HERSTELLUNGSPROZESSE DER VERWENDETEN MATERIALIEN.....	31
<i>Herstellung des PLA-Cages</i> .....	31

<i>Herstellung des Kollagengels</i> .....	32
<i>Herstellung der Narkose</i> .....	33
<i>Applikation der Narkose</i> .....	34
OPERATIVES VORGEHEN AM BEISPIEL EINER OPERATION .....	35
<i>Röntgenkontrolle</i> .....	40
<i>Euthanasie der Versuchstiere</i> .....	41
DOKUMENTATION DER VERSUCHSREIHE .....	42
μ-CT .....	43
ENTKALKUNG DER PRÄPARATE .....	44
HISTOLOGIE .....	44
EINBETTUNG IN PARAFFIN .....	44
SCHNITT DER PRÄPARATE.....	45
HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG .....	45
MASSON-GOLDNER-TRICHROM-FÄRBUNG.....	46
MASSON-GOLDNER-TRICHROM-FÄRBUNG.....	46
ELASTIKA VAN GIESON- FÄRBUNG .....	47
HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG .....	48
AUSWERTUNG CT-DATEN.....	49
STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATEN.....	50
ERGEBNISSE.....	51
KONTROLL-RÖNTGEN .....	51
CT-DARSTELLUNG .....	60
HISTOLOGIE .....	68
HE-FÄRBUNG .....	69
ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER HE-FÄRBUNG .....	69
MASON-GOLDNER-TRICHROM FÄRBUNG .....	72
ELASTIKA-VAN-GIESON .....	78
DISKUSSION .....	84
RATTEN ALS TIERVERSUCHSMODELLE.....	84
DEFEKTMODELL UND ÜBERTRAGBARKEIT AUF DEN MENSCHEN.....	85
ZELLFREIES BONE TISSUE ENGINEERING .....	87

EINSATZ VON POLYLACTIDE UND KOLLAGEN IM RAHMEN EINES „DRUG DELIVERY SYSTEMS“ .....	89
EINSATZ REKOMBINANTER WACHSTUMSFAKTOREN IM BONE TISSUE ENGINEERING.....	93
AUSBLICK .....	99
ZUSAMMENFASSUNG .....	100
LITERATURVERZEICHNIS .....	102
ANHANG.....	129

## **Tabellenverzeichnis**

TABELLE 1: GRUPPENORGANISATION .....	30
TABELLE 2: HERSTELLUNG KOLLAGENGEL .....	32
TABELLE 3: HERSTELLUNG NARKOSELÖSUNG .....	34
TABELLE 4: ANTAGONISTEN NARKOSE.....	34
TABELLE 5: GEWICHTSADAPTIERTE NARKOSEAPPLIKATION.....	34
TABELLE 6: VERSUCHSDOKUMENTATION.....	43
TABELLE 7: FÄRBESCHEMA HE-FÄRBUNG .....	46
TABELLE 8: FÄRBESCHEMA MASON-GOLDNER-TRICHROM-FÄRBUNG.....	47
TABELLE 9: FÄRBESCHEMA ELASTIKA VAN GIESON-FÄRBUNG .....	48
TABELLE 10: STATISTISCHE AUSWERTUNG AUF GRUNDLAGE DES 5MM ZYLINDERS. ....	65
TABELLE 11: STATISTISCHE AUSWERTUNG AUF GRUNDLAGE DES 3MM ZYLINDERS. ....	68

## **Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DES ZUGRUNDELIEGENDEN ARBEITSPANS. ....	6
ABBILDUNG 2: DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN PHASEN DER FRAKTURHEILUNG. ....	11
ABBILDUNG 3: KLASSIFIKATION DER PSEUDARTHROSEN.....	15
ABBILDUNG 4: STRUKTURFORMEL DES POLYLACTIDES AUS (115).....	23
ABBILDUNG 5: DARSTELLUNG DES SMAD-ABHÄNGIGEN BMP-SIGNALWEGES.....	25
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ÜBER CXCR4 AGIERENDEN SIGNALWEGS. .....	28
ABBILDUNG 7: MODELLE DES PLA-SCAFFOLDS.....	32
ABBILDUNG 8: PRÄPARIERTER OPERATIONSTISCH .....	35
ABBILDUNG 9: POSITIONIERTES TIER .....	36
ABBILDUNG 10: HAUTINZISION .....	36
ABBILDUNG 11: PRÄPARIERTES FEMUR .....	37
ABBILDUNG 12: FIXIERTE PEEK-PLATTE .....	38
ABBILDUNG 13: OSTEOTOMIE .....	38
ABBILDUNG 14: "PRESS FIT" EINGESETZTER PLA-CAGE.....	39
ABBILDUNG 15: KONTROLL-RÖNTGEN DER OSTEOTOMIE .....	40
ABBILDUNG 16: KONTROLL-RÖNTGENBILDER DER OSTEOTOMIEN AUS VERSUCHSGRUPPE „LEERE OSTEOTOMIE“ (VERSUCHSGRUPPE 1).....	52

ABBILDUNG 17: KONTROLL-RÖNTGENBILDER AUS VERSUCHSGRUPPE "PLA" (VERSUCHSGRUPPE 2).....	53
ABBILDUNG 18: KONTROLL-RÖNTGENBILDER AUF VERSUCHSGRUPPE "PLA + KOLLAGEN" (VERSUCHSGRUPPE 3).....	54
ABBILDUNG 19: KONTROLL-RÖNTGENBILDER AUS VERSUCHSGRUPPE "PLA + KOLLAGEN + SDF-1" (VERSUCHSGRUPPE 4).....	55
ABBILDUNG 20: KONTROLL-RÖNTGENBILDER AUS VERSUCHSGRUPPE "PLA + KOLLAGEN + SDF-1" NACH 20 WOCHEN POSTOPERATIV (VERSUCHSGRUPPE 4).....	56
ABBILDUNG 21: ABBILDUNG 21: KONTROLL-RÖNTGENBILDER AUS VERSUCHSGRUPPE "PLA + KOLLAGEN + BMP-7" (VERSUCHSGRUPPE 5).....	57
ABBILDUNG 22: KONTROLL-RÖNTGENBILDER AUS VERSUCHSGRUPPE "PLA + KOLLAGEN + BMP-7" NACH 20 POSTOPERATIVEN WOCHEN (VERSUCHSGRUPPE 5).....	59
ABBILDUNG 23: DARSTELLUNG $\mu$ CT-UNTERSUCHUNGEN DER VERSUCHSGRUPPEN. ....	61
ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG DER $\mu$ CT-UNTERSUCHUNGEN DER VERSUCHSGRUPPEN „SDF-1“ UND „BMP-7“ NACH 20 POSTOPERATIVEN WOCHEN. ....	62
ABBILDUNG 25: DARSTELLUNG DER BV/TV DES 5MM DURCHMESSERS MITTELS BOXPLOT. ....	63
ABBILDUNG 26: DARSTELLUNG DER BV/TV DES 3MM DURCHMESSERS MITTELS BOXPLOT. ....	66
ABBILDUNG 27: ÜBERSICHT HE-FÄRBUNGEN ALLER VERSUCHSGRUPPEN. ....	69
ABBILDUNG 28: HE-FÄRBUNG EINES PRÄPARATES AUS DER VERSUCHSGRUPPE „LEERE OSTEOTOMIE“ (PRÄPARAT 3637).....	70
ABBILDUNG 29: HE-FÄRBUNG EINES PRÄPARATES MIT SDF-1 ALS WACHSTUMSFAKTOR (PRÄPARAT 3725).....	71
ABBILDUNG 30: HE-FÄRBUNG EINES PRÄPARATES MIT BMP-7 ALS WACHSTUMSFAKTOR (PRÄPARAT 3740).....	71
ABBILDUNG 31: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINER LEEREN OSTEOTOMIE – GEFÄRBT MIT DER MASON-GOLDNER-TRICHROM- FÄRBUNG.....	73
ABBILDUNG 32: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTEM PLA-SCAFFOLD – GEFÄRBT MIT DER MASON-GOLDNER-TRICHROM FÄRBUNG. ....	73
ABBILDUNG 33: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER MASON-GOLDNER-TRICHROM FÄRBUNG.....	74

ABBILDUNG 34: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-SDF-1 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER MASON-GOLDNER-TRICHROM FÄRBUNG.....	75
ABBILDUNG 35: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-SDF-1 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER MASON-GOLDNER-TRICHROM FÄRBUNG.....	76
ABBILDUNG 36: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-BMP-7 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER MASON-GOLDNER-TRICHROM FÄRBUNG.....	76
ABBILDUNG 37: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-BMP-7 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER MASON-GOLDNER-TRICHROM FÄRBUNG.....	77
ABBILDUNG 38: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINER LEEREN OSTEOTOMIE – GEFÄRBT MIT DER ELASTIKA-VAN-GIESON FÄRBUNG.....	78
ABBILDUNG 39: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTEM PLA-SCAFFOLD – GEFÄRBT MIT DER ELASTIKA-VAN-GIESON FÄRBUNG.....	79
ABBILDUNG 40: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER ELASTIKA-VAN-GIESON FÄRBUNG.....	79
ABBILDUNG 41: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-SDF-1 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER ELASTIKA-VAN-GIESON FÄRBUNG.....	80
ABBILDUNG 42: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-SDF-1 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER ELASTIKA-VAN-GIESON FÄRBUNG.....	81
ABBILDUNG 43: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-BMP-7 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER ELASTIKA-VAN-GIESON FÄRBUNG.....	82
ABBILDUNG 44: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES PRÄPARATES NACH EINGESETZTER PLA-SCAFFOLD-KOLLAGEN-SDF-1 KOMBINATION – GEFÄRBT MIT DER ELASTIKA-VAN-GIESON FÄRBUNG.....	82

## **Einleitung**

Jährlich werden ungefähr 800.000 Frakturen unterschiedlichster Knochen im stationären Setting behandelt, wobei die Mehrzahl dieser zeitgerecht und ohne weitere Komplikationen konsolidiert (1). In der Literatur werden jedoch bei bis zu 5-10% der Frakturen Störungen der Frakturheilung beschrieben, zu welchen unter anderem die verzögerte und die ausbleibende Frakturheilung gezählt werden (2). In Deutschland machten 2017 laut Gesundheitsbericht des Bundes Pseudarthrosen mit fast 58% einen Großteil der registrierten Störungen der Knochenkontinuität und Frakturheilung, die variierende Verteilung außer Acht lassend, aus, sodass hieraus bereits die gesellschaftliche Relevanz des Krankheitsbildes ersichtlich wird (3, 4).

Neben den psychischen und physischen Belastungen, die eine solche Frakturheilungsstörung für den Patienten birgt, sind Pseudarthrosen mit enormen sozioökonomischen Kosten verbunden. Berechnungen bezüglich der zu erwartenden Therapiekosten einer manifesten Pseudarthrose nach dem „Best-Case“-Szenario beliefen sich in Großbritannien auf ca. 15.566 £ für den Humerus, 16.330 £ für die Tibia und 17.200 £ für den Femur (5). In den vergangenen Jahren etablierten sich sukzessive verschiedenste konservative Therapieverfahren, welche unter anderem die niedrig intensiviert gepulster Ultraschalltherapie (LIPUS), die hochenergetische fokussierte extrakorporale Stoßwellentherapie (fESWT) und die elektromagnetische Therapie (PEMF) umfassen (6). Aufgrund nicht prognostizierbarer Konsolidierungsraten, strengen Indikationsstellungen und einer nicht unerheblichen Therapieintensität besteht trotz dieser Therapieoptionen weiterhin ein außerordentlicher Bedarf an effektiven und effizienten invasiven Therapien. Die Effektivität einer Knochen-spantransplantation bei reduzierter Invasivität stellt den Maßstab für neue Therapieoptionen. Als Folge der nicht unerheblichen Invasivität und den Einsatzlimitationen der etablierten, operativen Versorgungsverfahren gewinnen Verfahren aus dem Kreis des Tissue Engineerings und besonders des Bone Tissue Engineerings verstärkt das Interesse verschiedenster Forschungsgruppen und fördern deren Bemühungen zur Etablierung biokompatibler, biodegradierbarer und im optimalen Fall sowohl kostengünstiger als auch universell einsetzbarer Knochenersatzmaterialien.

## **Ziel der Dissertationsschrift**

Das maßgebliche Ziel dieser Dissertationsschrift lag in der Erprobung einer möglichen Kombination verschiedenster in der Biofabrikation bereits erprobter und einzeln eingesetzter Knochenersatzmaterialien zur Optimierung der etablierten operativen Therapieverfahren der Pseudarthrose.

Ein mittels handelsüblichem 3D-Drucker hergestellter Hybrid-Scaffold, der die einzeln bereits eingesetzten Komponenten Polylactide, Kollagen I und rekombinantes SDF-1/rekombinantes BMP-7 kombiniert, sollte im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich seines Potenzials zur Osteoinduktion und Osteointegration überprüft werden, um anhand dieser Ergebnisse einen Einsatz als Knochenersatzmaterial im Rahmen des Bone Tissue Engineerings evaluieren zu können. Ein weiterer Aspekt, der im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollte, war die Frage der Überlegenheit eines Wachstumsfaktors hinsichtlich des zu erwartenden osteogenen Potenzials.

Diese Ziele sollten primär an einem Rattendefektmodell des Femurs erprobt werden, um in der Folge Erkenntnisse hinsichtlich einer Modelloptimierung und Translation auf dem Menschen näherstehende Versuchsmodelle zu generieren.

Der nachfolgend exemplarisch aufgeführte Arbeitsplan lag dieser Dissertationsschrift und der diese Arbeit bestimmenden Fragestellungen zugrunde.

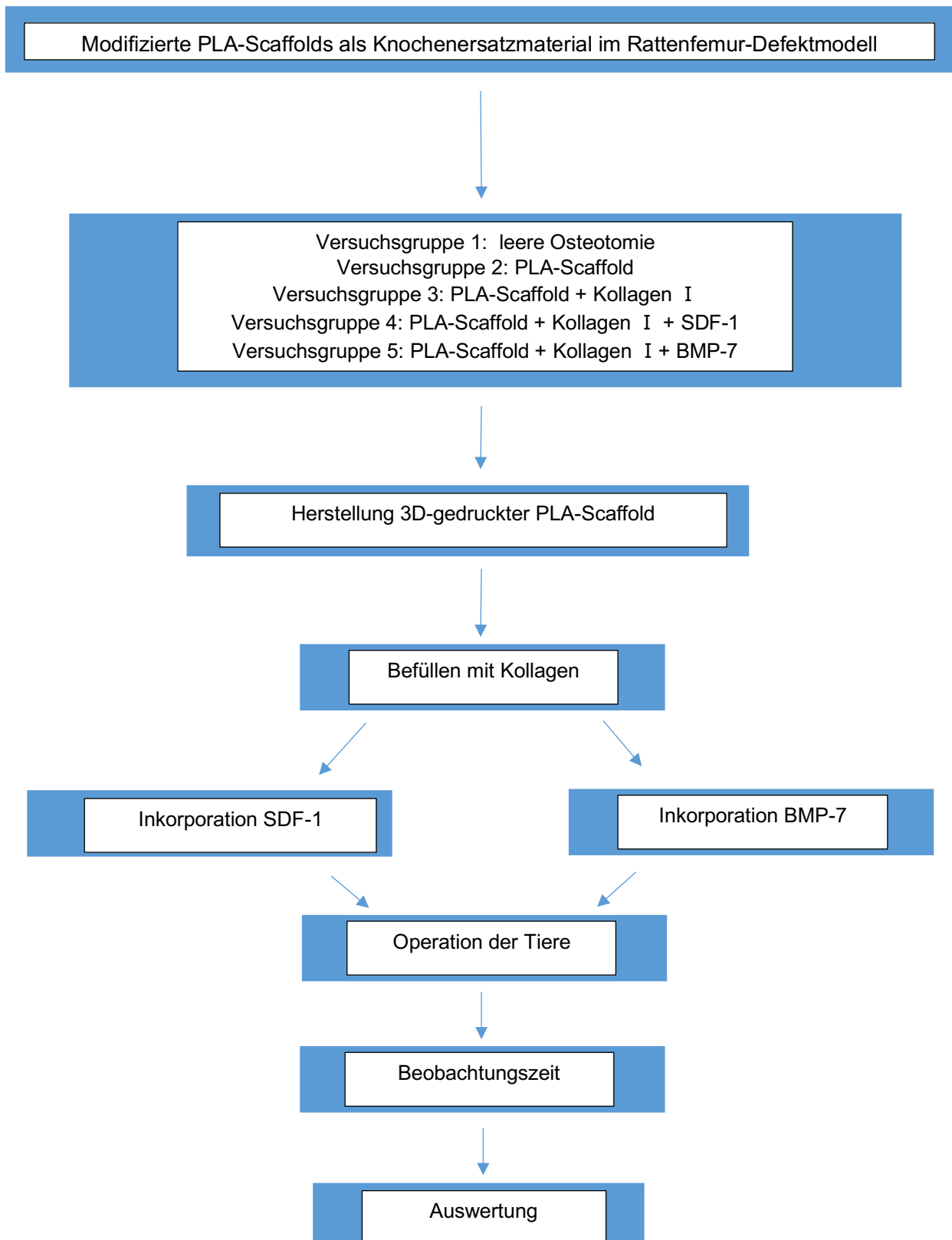


Abbildung 1: schematische Übersicht des zugrundeliegenden Arbeitsplans.

# **Literaturdiskussion**

## **Frakturheilung**

Im menschlichen Skelett dienen die Knochen sowohl der Bewegungsstabilität als auch der Schaffung optimaler Bedingungen für die in den Bewegungsablauf eingebundenen Muskeln und Sehnen (7, 8).

Eine jede eingeschlagene Therapie dient der Wiederherstellung der Integrität des Knochens und der ursprünglichen Funktion (9). Hierfür kann sich zu Nutzen gemacht werden, dass Knochen im Gegensatz zu vielen anderen Organen des menschlichen Körpers heilen, ohne eine fibröse Narbe zu bilden (7, 10).

Im Rahmen der Frakturheilung werden zwei Formen unterschieden (11-14):

- Direkte (primäre) Frakturheilung
- Indirekte (sekundäre) Frakturheilung

Ein allgemeines Charakteristikum der sich regenerierenden Gewebe ist das Vorhandensein einer proliferativen und undifferenzierten Zellpopulation, welche bei Bedarf um systemisch rekrutierte Zellen erweitert werden kann (8).

## **Direkte (primäre) Frakturheilung**

Die direkte Frakturheilung ist dadurch charakterisiert, dass die Knochenheilung ohne vorherige Bildung eines knorpeligen Gerüsts vonstatten geht (13). Diese Form der Frakturheilung ist selten anzutreffen, da sie besonderer Bedingungen bedarf. Die exakte anatomische Position und maximale Reduktion der interfragmentären Bewegungen und Belastungen sind essenziell (7, 12, 13). Marsell und Einhorn postulierten 2011 die Unterteilung der direkten Frakturheilung in Kontaktheilung und Spaltheilung. Beiden ist gemein, dass der zu überbrückende Frakturspalt nicht mehr als 1mm misst (12).

Sowohl der Frakturspalt als auch die avitalen Frakturende werden durch auf beiden Seiten der Fraktur vorhandene Havers's Kanäle überbrückt (14). Die im Rahmen des Frakturereignisses und durch Ausbildung eines Hämatoms ischämischen Frakturende werden in der Folge nicht resorbiert. Zytokine, unter anderem IL-1 IL-6, TNF- $\alpha$ ,

PEG2, werden bei der Ausbildung des Frakturhämatoms freigesetzt und entfalten ihre chemotaktische Wirkung auf Osteoprogenitorzellen (13). Sind auf beiden Seiten der Fraktur Osteoklasten vorhanden, bilden diese „cutting cones“, die eine Resorption der bestehenden Osteone über den Frakturspalt hinweg induzieren und hierdurch zu einer sukzessiven Konzentrationssteigerung von VEGF, TGF- $\beta$  und BMPs führen (7). Dies führt in der Folge zu einer Stimulation von Endothelzellen und perivaskulären Stammzellen, die das Einwachsen eines Gefäßes in das im Aufbau befindliche Osteon ermöglichen (13, 15). Die überbrückenden Osteone richten sich im ersten Schritt parallel zum Frakturspalt und im Verlauf der Konsolidierung entsprechend der Belastungsrichtung aus (14). Der anschließende Umbau der Lamellen in Abhängigkeit der Belastungsrichtung geschieht langsam, sodass die Konsolidierung erst nach Monaten oder Jahren als abgeschlossen bezeichnet werden kann (7, 14).

### **Indirekte (sekundäre) Frakturheilung**

Der menschliche Knochen enthält sowohl organische als auch anorganische Substanzen, welche sowohl die Stärke als auch die Elastizität des Knochens definieren (11). Obwohl die Knochenzusammensetzung und somit die Eigenschaften des Knochens mit dem Alter und Komorbiditäten variieren, stellt die indirekte Frakturheilung die häufigste anzutreffende Form der Ausheilung dar (11, 12, 15).

Die sekundäre Frakturheilung wird als eine Kombination aus intramembranöser und endochondraler Ossifikation angesehen (8, 12, 15).

Die endochondrale Ossifikation ähnelt in ihrer Gesamtheit der embryonalen Knochenentwicklung und führt über die Bildung eines temporären knorpeligen Grundgerüsts zur Knochenbildung und zur finalen Frakturheilung (10). Dahingegen bildet sich im Rahmen der intramembranösen Ossifikation Knochen ohne vorheriges knorpeliges Gerüst.

Die vier Hauptzonen der Frakturheilung sind: Das Knochenmark, der von den beiden Kortizes eingeschlossene Bereich, das subperiostale Stratum cambium und das den Knochen umgebende Weichteilgewebe (16). Es werden unterschiedliche Einteilungen der Frakturheilung postuliert, wobei die Einteilung anhand definierter Phasen eine der Häufigsten ist.

Eine zeitliche Einteilung des Heilungsprozesses unterscheidet vier Phasen (7, 16). Die vier Phasen werden im Folgenden separat voneinander beschrieben. In vivo treten sie jedoch überlappend auf, sodass jede Fraktur zeitlich individuell heilt und die Vereinfachung lediglich dem besseren Verständnis dient (10).

#### 1. Inflammation

Diese Phase dauert ungefähr eine Woche und ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines Frakturhämatoms (7, 11, 14). Dieses entsteht je nach Ausmaß der Fraktur durch eine Unterbrechung der intramedullären, periostalen und den Weichteilmantel versorgenden Gefäße. Daraus resultiert eine Ischämie der Fraktarenden (10). Die Zahl der die avitalen Fraktarenden phagozytierenden Makrophagen steigt im Frakturhämatom aufgrund vorhandener Zytokine an. Dies führt zu einer primären Vergrößerung des Frakturspalt (11). Im Rahmen der beginnenden Koagulation des Blutes werden unter anderem IL-1, IL-6, IL-11, IL-18, TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> von Makrophagen sezerniert. Diese Zytokine wirken chemotaktisch auf mesenchymale Stammzellen und induzieren deren Differenzierung (13, 17). Neben der Initiation der Kallusbildung fällt in diese Phase die Initiation der Angiogenese im Bereich des avaskulären Knochenabschnittes (12). Mit steigender Kapillardichte wird das Frakturhämatom in Granulationsgewebe umgewandelt. Dieses dient als Grundlage für den sich entwickelnden Kallus (10). Diese initiale Phase der Frakturheilung wird in Abbildung 1, in den Spalten 1 und 2, präsentiert.

#### 2. Weicher Kallus

Diese Form des Kallus stellt nach Abschluss seiner Bildung eine erste, den Frakturspalt überbrückende Struktur dar. Zu diesem Zeitpunkt ist die Angiogenese angestoßen, jedoch ist der Großteil des betroffenen Gewebes weiterhin einem hypoxischen Umfeld ausgesetzt. Dieses Milieu wird in Abbildung 1 durch Abschnitt 3 der Abbildung versinnbildlicht. Aufgrund der Kombination von Hypoxie und einem hohen Maß an interfragmentärer Bewegung wird die Knorpelbildung und folglich die indirekte Knochenbildung der direkten Ossifikation vorgezogen (7, 11, 13). Dies trifft nicht auf jeden Bereich der Fraktur zu, da die periostalen Frakturbereiche durch eine direkte Knochenbildung gekennzeichnet

sind (12). Die intramembranöse Ossifikation kann in diesen Bereichen stattfinden, da das Stratum cambium, ein Bestandteil des Periostes, bereits eine hohe Dichte an Osteoprogenitorzellen aufweist und somit nicht auf eine lokale oder systemische Rekrutierung dieser angewiesen ist (11, 16, 18).

In der zentralen Region der Fraktur wird die Rekrutierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen auf lokaler Ebene oder systemisch vorangetrieben (11). Stimuliert werden diese Prozesse unter anderem von Interleukinen, TNF- $\alpha$  und Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie, BMPs, PDGF, FGF, VEGF und IGF (8, 10, 12, 13). Der konsekutiv entstehende Faserknorpel weist eine hohe Zelldichte auf, die zur Bildung der extrazellulären Matrix beiträgt, welche wiederum reich an Kollagenmolekülen und Proteoglykanen ist (10, 12, 13). Zu diesem Zeitpunkt ist Kollagen II der dominante Kollagentyp, wird mit Zunahme des Reifungsprozesses jedoch durch Kollagentyp I ersetzt (11). Die extrazelluläre Matrix dient im weiteren Verlauf des Heilungsprozesses als Grundgerüst, das die benötigte Umgebungssituation für die Mineralisation des abgelagerten, unreifen Knochenmaterials schafft (8).

### 3. Harter Kallus

Dieses Stadium ist geprägt von der Hypertrophie der Chondrozyten, die die Ablage der Matrixprodukte, die zweite Phase der Frakturheilung darstellend, einstellen (12). Die hypertrophen Chondrozyten bereiten die Mineralisation der extrazellulären Matrix vor, indem calciumhaltige mitochondriale Vesikel, Proteasen und Phosphatasen sezerniert werden. Dies führt zum einem zur Mineralisation der Matrix und zum anderen zum Abbau von Proteoglykanen (12, 18). Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zu einem Wechsel der dominierenden Kollagenmoleküle hin zu Kollagen I (15). Die kalzifizierte Matrix ermöglicht im Verlauf das Einwachsen neuer Gefäße in den ehemaligen Frakturspalt. Die Gefäße werden von undifferenzierten multipotenten mesenchymalen Stammzellen begleitet, die sich in Osteoprogenitorzellen und im Anschluss in Osteoklasten oder Osteoblasten enddifferenzieren können (vergleiche Abbildung 1, Spalte 4) (15, 18).

Die hypertrophen Chondrozyten gehen apoptotisch zugrunde und Makrophagen beginnen mit der Abräumung kalzifizierter Areale (13). Bereits überlappend

mit der Resorption beginnt die koordinierte Ablage neuen Knochenmaterials durch Osteoblasten (13, 18). Die Fraktur wird durch Geflechtknochen überbrückt und stabilisiert, sodass eine vorläufige Kontinuität des Knochens wiederhergestellt ist (11).

#### 4. Remodeling

Unter diesem Begriff wird die Anpassung des Geflechtknochens an die mechanischen Anforderungen des ursprünglichen frakturierten Knochens verstanden. Dies wird durch die Bildung eines entsprechend der Belastungsrichtung organisierten Lamellenknochens ermöglicht (7). Die in Howship-Lakunen befindlichen Osteoklasten ermöglichen durch Abbau des vorbestehenden Osteoids die Ablagerung neuen Osteoids durch Osteoblasten (7, 19). Das Remodeling überlappt zeitlich mit der Bildung des harten Kallus, sodass die endgültige Wiederherstellung der Integrität des Knochens charakterisiert durch Funktionalität, Belastbarkeit und Vorhandenseins einer Knochenmarkshöhle mit suffizienter Blutversorgung des Knochens über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren variieren kann (10-13). Somit ist Spalte 5 der Abbildung 1 als schematische Vereinfachung des tatsächlichen Prozesses zu verstehen.

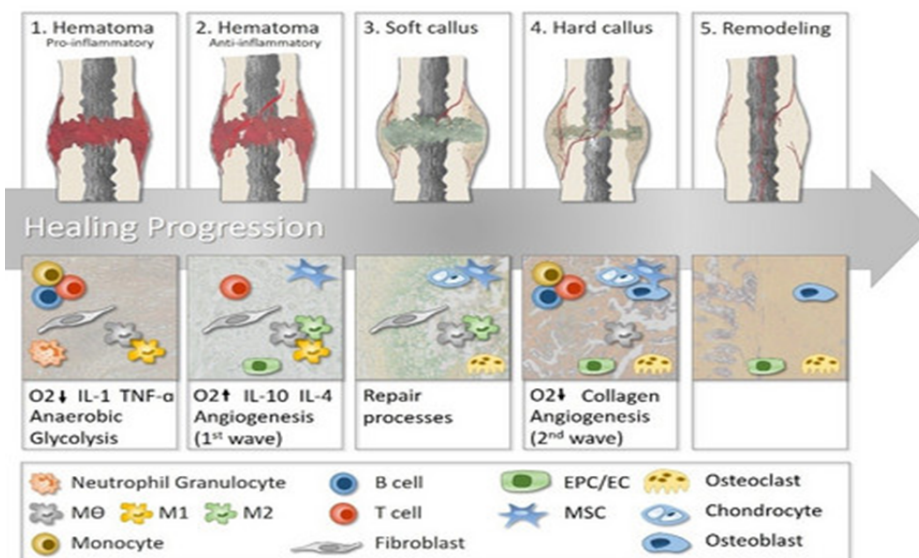


Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Phasen der Frakturheilung.

Reprinted aus: „Trends in Endocrinology & Metabolism, Volume 29, Issue 2, The Metabolic Microenvironment Steers Bone Tissue Regeneration, Julia Loeffler, Georg N. Duda, F. Andrea Sass, Anke Dienelt, Pages 99-110, Copyright (2017) mit der Erlaubnis von Elsevier (Lizenznummer 4822520940460) (20).

## **Störungen der Frakturheilung**

Die Komplikationen, die auf eine Fraktur folgen können, sind vielfältig. Neben Infektionen und Osteomyelitiden zählen die verzögerte und ausbleibende Frakturheilung dazu. Störungen der Frakturheilung treten in bis zu 5-10% der Fälle auf, jedoch kann die Inzidenz stark variieren (2). Das Risiko für eine Frakturheilungsstörung der unteren Extremität wird auf 5-30% beziffert und ist somit deutlich höher als das Risiko nach Frakturen im Bereich der oberen Extremitäten (1). Nach Frakturen im Bereich der Tibia wird eine Frakturheilungsstörung in 45% und nach Frakturen des Femurs in 16% der Fälle berichtet (21).

In der Literatur lassen sich verschiedene Risikofaktoren für das Auftreten von Frakturheilungsstörungen finden. Neben einer genetischen Komponente werden patientenunabhängigen Risikofaktoren (anatomische Lokalisation der Fraktur, das Frakturmuster, Weichteil- und Gefäßverletzungen) und patientenabhängigen Faktoren (Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, Alkoholkonsum, Einnahme NSAIDs) beschrieben, welche in ihrer Relevanz durch frakturmorphologische Eigenschaften wie der lokalen Durchblutungssituation, des Infektionsstatus und der posttherapeutischen Frakturstabilität ergänzt werden (22-27).

## **Verzögerte Frakturheilung**

Frakturen, die 3-6 Monate posttraumatisch keine vollständige Konsolidierung zeigen, gelten als verzögert („delayed union“) (28). Bei festgestellter Verzögerung im Heilungsprozess erfolgt eine Re-Evaluation der bisherigen Therapie und gegebenenfalls eine Therapieänderung, wobei formal weiterhin die Möglichkeit einer regelrechten Konsolidierung besteht.

## **Pseudarthrose**

Unter einer Pseudarthrose wird ein Ausbleiben der knöchernen Konsolidierung einer Fraktur verstanden (29). Die U.S Food and Drug Administration, kurz FDA, charakterisiert die Pseudarthrose („non union“) als eine Fraktur, die 9 Monate posttraumatisch nicht vollständig konsolidiert ist, wobei ein Heilungsprogress in den letzten 3 Monaten radiologisch nicht mehr nachweisbar war (1, 30-32). In der Bundesrepublik

Deutschland wird eine Fraktur jedoch als Pseudarthrose eingestuft, wenn eine Konsolidierung nach 6 Monaten nicht eingetreten ist (28). Ein Konsens bezüglich der Definition liegt somit nicht vor, weshalb der Übergang von einer verzögerten Frakturheilung zur ausbleibenden Heilung als fließend angesehen wird. Von Seiten der AO (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen) wird dem behandelnden Arzt aufgrund dieses Dissenses ein größerer Spielraum in Bezug auf die Diagnosestellung eingeräumt (1, 33).

Neben den allgemeinen Risikofaktoren, die eine suffiziente Frakturheilung behindern können, hat auch die Lokalisation der Fraktur einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung einer Pseudarthrose, mit Häufung im Bereich der unteren Extremitäten (4, 34).

Patienten mit einer manifesten Pseudarthrose werden vielfältig klinisch auffällig. Belastungsabhängige Schmerzen, Belastungsinsuffizienz, Schwellung, Infektionsparameter, Bewegung im Bereich der Frakturzone, Versteifung benachbarter Gelenke und radiologischer Nachweis eines persistierenden Frakturspaltens in mindestens 2 Ebenen werden beobachtet (35).

### **Klassifikation der Pseudarthrose**

Die Klassifikation einer Pseudarthrose hat großen Einfluss auf die Heilungschancen des Patienten, da sich hieraus verschiedene Therapieoptionen ergeben. Die am häufigsten verwendete Klassifikation wurde in den 70er Jahren von Weber und Cech veröffentlicht und unterteilt Pseudarthrosen radiologisch hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in vitale und avitale Pseudarthrosen (36). Diese beiden Hauptgruppen werden nochmals in Unterformen unterteilt:

#### **1. Vitale Pseudarthrose**

- Hypertrophe Pseudarthrose („Elefantenfuß“): hypertrophe Pseudarthrosen sind radiologisch durch überschießende Kallusbildung bei nicht konsolidiertem Frakturspalt charakterisiert, vgl. Abbildung 1.a. Die biologische Aktivität der Frakturenden ist ausreichend hoch, jedoch verhindert eine mechanische Instabilität die suffiziente Überbrückung des Frakturspaltens durch Kallus (33, 37).

- Hypertrophe Pseudarthrose („Pferdefuß“): Diese Form der hypertrophe Pseudarthrose ist durch deutlich weniger Kallusbildung charakterisiert, vgl. Abbildung 1.b. Als ursächlich für die Entstehung dieser Form der Pseudarthrose kann sowohl eine mechanische Instabilität als auch eine eingeschränkte biologische Aktivität gesehen werden (33).
- Oligotrophe Pseudarthrose: Diese Form der Pseudarthrose kann nicht eindeutig der Gruppe der vitalen oder avitalen Pseudarthrosen zugeordnet werden, vgl. Abbildung 1.c. Ein Hauptproblem der ausbleibenden Heilung besteht in einer mechanischen Instabilität, jedoch ist ebenfalls die biologische Aktivität beeinträchtigt. Dies zeigt sich radiologisch in abgerundeten Frakturenenden und einem sich durch Resorption progredient vergrößernden Frakturspalt (33).
- Defekt-Pseudarthrose: Diese Form der Pseudarthrose nimmt aufgrund ihres Ursprungs eine Sonderstellung ein. Die Frakturenenden besitzen eine ausreichende biologische Aktivität, jedoch ist diese nicht groß genug, den durch Verlust eines knöchernen Segmentes entstandenen Frakturspalt adäquat zu überbrücken (38), vgl. Abbildung 1.d + e.

## **2. Avitale Pseudarthrosen**

- Avitale Pseudarthrosen werden durch Avaskularität und fehlende biologische Aktivität charakterisiert. Der Frakturspalt vergrößert sich durch ausbleibende Kallusbildung und Resorption der Frakturenenden, vgl. Abbildung 1.f. Im Rahmen einer manifesten avitalen Pseudarthrose überbrückt am ehesten fibröses Gewebe den Frakturspalt (33, 38).
- Infekt-Pseudarthrosen: Diese Pseudarthrosen werden nicht explizit bei Weber und Cech beschrieben, jedoch steigt ihre Bedeutung aufgrund der Assoziation zum Hochrasanztrauma und endogenen Infektionen. Die Frakturenenden werden im Rahmen einer Infektion nekrotisch und resorbiert, wodurch sich der Frakturspalt vergrößert. Die Kallusbildung unterbleibt bei nicht vorhandener biologischer Aktivität und lokaler Entzündungsprozesse (21, 29).

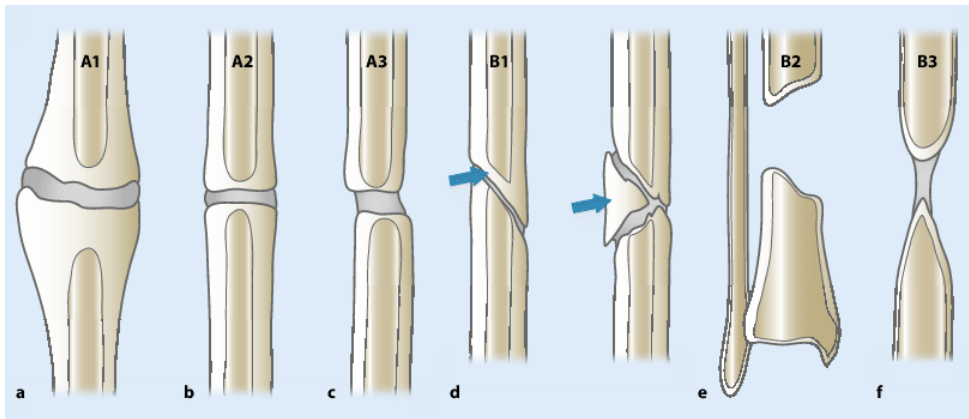


Abbildung 3: Klassifikation der Pseudarthrosen.

A: hypertrophe Pseudarthrose, b: oligotrophe Pseudarthrose, c: atrophe Pseudarthrose. Reprinted aus: „Trauma und Berufskrankheiten, Volume 19, Issue 3, Pseudarthrosen, M. J. Raschke, S. Roßlenbroich, J. Everding, Copyright (2017) mit der Erlaubnis von Springer Nature (Lizenznummer 4559320613094) (1).

Diese etablierte Klassifikation ist sehr verbreitet, jedoch lässt sie einige frakturindividuelle Faktoren, die das Outcome stark beeinflussen können, außer Acht. Aufgrund dessen werden verschiedene neue Scoring Systeme zur Optimierung der Klassifikation und Intervention entwickelt und im klinischen Alltag etabliert (1, 35, 39).

### **Therapien der Pseudarthrosen**

Eine diagnostizierte, klassifizierte und auf Infektion überprüfte Pseudarthrose stellt in den meisten Fällen eine Indikation zur operativen Versorgung dar (38).

Das „Diamond-Konzept“ von Giannoudis und Einhorn beschreibt die für eine optimale Frakturheilung nötigen Faktoren: Mechanische Stabilität, osteogenes Potenzial der Fraktarenden, osteokonduktives Gerüst im Bereich des Frakturspaltes und das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren (8). Pseudarthrosen mangelt es in Abhängigkeit ihrer Genese an einem oder mehrerer dieser Faktoren. Das Ziel einer jeden operativen Versorgung ist das Beseitigen des Ungleichgewichtes, welches im optimalen Fall zur Konsolidierung der Pseudarthrose führt (35).

Hypertrophe Pseudarthrosen entstehen durch eine verminderte Stabilität der Fraktur. Aufgrund dessen ist ihre operative Versorgung auf die Wiederherstellung einer optimalen Stabilität mit Reduktion der interfragmentären Bewegungen ausgelegt. Diese kann mittels Marknagel, Kaliberwechsels des Marknagels oder Plattenosteosynthese

erfolgen (30, 40, 41). Oligotrophe Pseudarthrosen unterscheiden sich in der Therapie nicht erheblich von hypertrophen Pseudarthrosen, können jedoch von einer Marknagelung mit kombinierter Aufbohrung des Markraums profitieren (40).

Die Behandlung avitaler Pseudarthrosen stellt sich komplexer dar. Nicht die mechanische Instabilität, sondern das zum Erliegen gekommene biologische Potenzial wird als federführend betrachtet. Die hierauf ausgelegten und etablierten operativen Verfahren unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit der Größe des vorliegenden Frakturspaltes erheblich. Defekte bzw. Frakturspalte bis zu einer Größe von ungefähr zwei Zentimetern können mittels autologer Spongiosaplastik behandelt werden. Im Rahmen dieses Verfahrens wird dem Patienten Spongiosa aus dem vorderen oder hinteren Beckenkamm entnommen und in den zu beiden Seiten angefrischten und somit im besten Fall von vitalem Knochen begrenzten Frakturspalt eingebracht (28, 38, 40). Trotz der Limitationen durch begrenzte Entnahmemengen und eine hohe mit dem Verfahren vergesellschaftete Komorbidität, in Form von Schmerzen, Infekten und Hämatomen gilt dieses Verfahren als Goldstandard, der sowohl osteogene, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften besitzt (28, 42). Trotz der Anerkennung als Goldstandard werden für dieses Verfahren ausbleibende Heilungsraten von bis zu 60% beschrieben (43). Das RIA-Verfahren (Reaming-Irrigation-Aspiration) findet demzufolge immer größere Verwendung, da hierbei ein größeres Volumen autologer Spongiosa mobilisiert und entnommen werden kann bei gleichzeitiger Reduktion der Entnahmemorbidität (40).

Größere Knochendefekte können mithilfe dieser Verfahren nicht effektiv behandelt werden, sodass freie vaskularisierte Knochentransplantate, das Ilizarov-Verfahren oder die Masquelte-Technik Anwendung finden (1, 28). Diese Verfahren gehen bei guten Behandlungsergebnissen mit einer ausgeprägten Invasivität und Therapieintensität einher.

Bei septischen Pseudarthrosen steht die Sanierung des Infektionsherdes im Vordergrund. Die vorübergehende Stabilisierung der Fraktur erfolgt in der Regel mittels Fixateure externe. Nach Ausheilung des Infektionsgeschehens wird die Defektdeckung mit einem der bereits oben beschriebenen Verfahren angestrebt (28, 35). Die Therapie einer solchen Pseudarthrose erfolgt mehrzeitig und wiederholt invasiv.

## **Kleintiermodell**

Die Verwendung von Tiermodellen im Rahmen der Entwicklung neuer Implantate bzw. Knochenersatzmaterialien wird weiterhin als essenziell betrachtet. Die zurzeit möglichen in vitro-Versuche sind in der Lage, in einzelnen Zellkulturen die Zytotoxizität und Adhäsionsfähigkeiten von Materialien zu testen. Jedoch ist es bisher noch nicht möglich, die komplexen physiologischen Bedingungen der Knochenregeneration unter Belastung exakt zu reproduzieren (44). Genaue Aussagen über die Biokompatibilität, Biofunktionalität und biologische Relevanz des Implantates im Organismus sind folglich ohne Tiermodell schwer zu treffen (45). In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Tiermodelle zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen etabliert, welche sich zum Teil erheblich voneinander unterscheiden. Die Auswahl des bestmöglichen Modells hängt sowohl von der Versuchszintention als auch dem klinischen Setting, dem sich das Modell annähern soll, ab. Neben tierspezifischen Auswahlkriterien muss berücksichtigt werden, dass das ausgewählte Frakturmodell einen Rückschluss auf die Kausalität des möglicherweise positiven Heilungsverlaufes zulassen muss (46, 47). Trotz ihres vergleichsweise relativ niedrigen Standes im phylogenetischen Stammbaum, gewannen Nagetiere in den letzten Jahren neben im Großtierversuch eingesetzten Tieren wie z.B. Hunde, Schafe, Ziege, Schweine und Pferde verstärkt an Bedeutung (43).

Die stärkere Verwendung von Nagern, insbesondere Ratten, für Kleintier-Frakturmodelle gründet sich unter anderem auf ihrer Praktikabilität hinsichtlich Einsatz, Haltung, Standardisierung und Kosten ebenso wie auf der Etablierung neuer Stabilisationsverfahren, die eine bessere Reproduktion der Frakturgröße ermöglichen (48, 49).

Die Kleintiermodelle unterscheiden allgemein ektope und orthotope Modelle. Dies spiegelt das Bemühen um eine bestmögliche Translation der Ergebnisse von Nagetieren auf den Menschen unter Berücksichtigung der Einschränkungen der Modelle basierend auf Differenzen in Knochenstruktur, Größe und Wachstum (45, 47, 50).

## **Critical-Size-Defect (CSD)**

Das unter dem Begriff des Critical Size Defect (CSD) zusammengefasste Frakturmodell ist Ausdruck des Versuches einer größtmöglichen Standardisierung und Reproduzierbarkeit im Rahmen der experimentellen Etablierung von Pseudarthrosen. In den

vergangenen Jahren wurde der CSD als der kleinste Knochendefekt definiert, der in der zu erwartenden Lebenszeit des Tieres nicht spontan ausheilt (43, 46, 47, 51). Diese Definition wurde in den letzten Jahren dahingehend verändert, dass die ausbleibende Defektheilung nicht mehr auf die Lebenszeit des Tieres bezogen wurde, sondern auf einen experimentellen Zeitraum von 8 Wochen (52).

Die Defektgrößen, die als CSD angenommen werden, sind variabel und für jede Spezies anders definiert. Innerhalb einer Spezies gibt es jedoch ebenfalls Varianzen der nicht zur Ausheilung gelangender Defektgrößen. Als den Critical-Size-Defect beeinflussende Faktoren gelten Alter, Geschlecht, Ernährungszustand und die anatomische Position des gesetzten Defektes (53).

Unter dem Begriff des Critical-Size-Defects der Ratte werden zwei Modelle besonders häufig verwendet: Das Calvaria-Modell und das Segmentdefekt-Modell an Femur oder Tibia. Das Calvaria-Modell ermöglicht im Gegensatz zum Segmentdefekt-Modell keine Testung des Implantates unter physiologischer Belastung, sondern vielmehr die Testung der Materialeigenschaften per se (54). Im Rahmen mehrerer Untersuchungen wurde die Größe eines CSDs an einem Femur der Ratte auf 5mm festgelegt (47, 51, 52).

### **Bone Tissue Engineering (BTE)**

Bereits in der Vergangenheit bestanden menschliche Bestrebungen zur stetigen Verwendung neuerer Materialien bei größeren knöchernen Brüchen oder Defekten (55). In den letzten Jahren stieg der Bedarf an neuen Verfahren zur Versorgung knöcherner Defekte stetig an, da die etablierten Methoden sowohl hinsichtlich Gewinnung eines zu verwendenden Materials als auch der Lebensqualität des Patienten während der Therapie limitiert zu sein scheinen. Das Tissue Engineering und insbesondere das Bone Tissue Engineering scheint hierfür eine Alternative zu sein bzw. sich zu einer solchen zu entwickeln (56, 57).

Bereits Anfang der 1990er Jahre beschrieben Langer und Vacanti das Tissue Engineering als „ (...) *an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain or improve tissue function*“ (58). Das Interesse an Tissue Engineering und Bone Tissue

Engineering und deren Bedeutung stieg in den vergangenen Jahren unter anderem durch Entwicklungen und Gewinnung neuer Erkenntnisse im Bereich der Zellbiologie und zellulärer Signalkaskaden. Das BTE wird zurzeit als ein Verfahren, das Zellen, Wachstumsfaktoren und Biomaterialien (Scaffolds) kombiniert, verstanden (59-62).

Das Vorhandensein vitaler Zellen ist jedoch keine Voraussetzung für die Entwicklung und Verwendung eines Materials im Rahmen des Tissue Engineerings (63).

Die Anforderungen, die an ein Knochenersatzmaterial gestellt werden, sind vielfältig. Neben Osteogenität, Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und Osteointegration bedarf es einer ausreichenden biomechanischen Stabilität und einer guten Biokompatibilität, ohne Induktion einer immunologischen Antwort (57, 64-68). Aufgrund der Probleme, die durch eine Avaskularität der im BTE verwendeten Knochenersatzmaterialien entstehen können, wurde das Anforderungsprofil an Knochenersatzmaterialien dahingehend erweitert, dass eine Mikroumgebung für ein erfolgreiches Einwachsen neuer Gefäße geschaffen werden sollte, wenn die Angiogenese selbst nicht induziert wird (57, 66, 69, 70).

Die Kombination verschiedener Materialien mit ihren zum Teil sehr unterschiedlichen Eigenschaften ermöglicht ein größeres Abdecken des an neue Knochenersatzmaterialien gestellten Anforderungsprofils.

### **Biofabrikation**

Groll und Boland beschrieben die Biofabrikation 2016 als *“automated generation of biologically functional products with structural organization from living cells, bioactive molecules, biomaterials, cell aggregates [...] through Bioprinting or Bioassembly [...]”* (71). Die eingesetzten Biomaterialien werden sowohl in ihrer reinen Form als auch als Hybrid-Polymere verwendet und zeichnen sich durch Reproduktion natürlicher Matrices aus (72-75). Dies ist unter anderem ein Grund dafür, dass der Biofabrikation im Rahmen des Bone Tissue Engineerings das Potenzial zur Verbesserung der Patientenversorgung zugesprochen wird (76).

Das Additive Manufacturing (AM) bildet aufgrund der Möglichkeit zur exakten Herstellung von Scaffolds oder Implantaten basierend auf individuell am Computer generierten 3D-Modellen und der exakten Reproduktion mit der Möglichkeit der kontrollierten

Freisetzung inkorporierter Wachstumsfaktoren eine wichtige Säule in der Umsetzung der Idee der Biofabrikation (71, 77-81).

Grundsätzlich unterscheidet das AM zwischen der direkten und der indirekten Herstellung eines Scaffolds (82). Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich zum Teil erheblich voneinander, jedoch ist allen eine Schichtung von Materialien gemein, die dazu führt, dass personalisierte Implantate bzw. Scaffolds hergestellt werden können (77, 83-85).

Es werden bis zu 40 verschiedene Verfahrenstechniken unterschieden, wobei die am häufigsten verwendeten das Bioprinting und das Fused Deposition Modeling sind (86).

Im Rahmen des Bioprinting wird eine Pulverschicht mittels exakter Ablage von Bindeflüssigkeit zur Reaktion gebracht. Diese Schritte werden bis zur Entstehung des finalen Konstrukts wiederholt. Das ungebundene Biomaterial wird im Anschluss entfernt. Aufgrund niedriger Herstellungstemperaturen können vitale Zellen inkorporiert werden. Dieses Verfahren geht jedoch insgesamt mit einer geringen mechanischen Stabilität einher (82, 87-89).

Das Fused Deposition Modeling verwendet thermoplastische Materialien, die durch Erhitzen geschmolzen und schichtweise auf einer sich bewegenden Plattform abgelegt werden. Das Konstrukt wird ohne Hilfsstrukturen bzw. Stützen bei guter mechanischer Stabilität aufgebaut. Aufgrund der hohen Prozesstemperaturen ist es nicht möglich, vitale Zellen direkt zu inkorporieren, sodass eine spätere Inkorporation oder Beschichtung vorgenommen werden muss (82, 83, 87-89).

### **Scaffold**

Der Scaffold dient im BTE zum einen der mechanischen Stabilität als auch als Grundgerüst für Zelladhäsionen, Zellmigration, Zelldifferenzierung und Proliferation (55, 64, 69, 90). Das Design eines Scaffolds und dessen Eigenschaften, zum Beispiel das Ausmaß der Porosität und die Porengröße, können in Abhängigkeit vom zu regenerierenden Gewebe variieren (91). Die größte Bedeutung als Biomaterialien im Rahmen der Scaffold-Herstellung kommt den Keramiken, den biologischen und den synthetischen Polymeren zu. Diese sind durch deutliche Unterschiede in ihren Eigenschaften und Anwendungsbereichen gekennzeichnet (64, 66, 92).

## **Kollagen**

Kollagene gehören zu den biologischen Polymeren. Zurzeit sind 28 Kollagentypen bekannt, wobei nur die Kollagene I , II , III, V und XI Fasern mit Durchmessern von 50 – 500nm ausbilden. Die Kollagene I und V sind Bestandteile der Extrazellulär Matrix (EZM) von Knochen (93, 94). Kollagenfasern bilden in der EZM eine hochkomplexe 3 - dimensionale Struktur aus, die sowohl der strukturellen Integrität als auch der zellulären Funktionsfähigkeit dient (95). Somit bildet die Extrazellulär Matrix das Grundgerüst für eine erfolgreiche Regeneration von Geweben und Heilung von Gewebefekten (96).

Scaffolds aus Kollagen I wurden in den letzten Jahren verstärkt für das BTE verwendet, um sich die natürlichen Eigenschaften des Kollagens zu Nutzen zu machen (97). Prinzipiell wird zwischen zellulären und azellulären Kollagengelen unterschieden. Die Verwendung azellulärer Gele kann die bereits schwach ausgeprägte Antigenität des Kollagens weiter reduzieren (98). Eine besondere Bedeutung kommt der Biokompatibilität und Bioaktivität der Kollagene zu. Über nicht-integrine und integrine Zellrezeptoren können Zellen mit der EZM kommunizieren, sowohl die Adhäsion als auch die Ausdifferenzierung osteogener Zellen initiieren (99, 100). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Kollagengelen als Biomaterialien wird in der Tatsache gesehen, dass auf diese Weise schnellstmöglich eine Mikroumgebung geschaffen wird, die es Osteoblasten erlaubt, die Mineralisierung der Extrazellulär-Matrix zu beginnen (94, 98). Die an Kollagenfasern adhärenen Zellen sind neben der Sekretion von Calcium und Phosphat in der Lage, die poröse Matrixstruktur durch Sekretion von Kollagenasen aufzulösen. Die frei werdenden chemotaktisch wirksamen kollagenösen Abbauprodukte ermöglichen in der Folge eine gerichtete Migration von Zellen in das Innere des Kollagen-Scaffolds (93, 98, 100, 101). Die schnelle und vollständige Biodegradation von Kollagenen als natürliche Polymere geht mit einer starken Hydrophilie und einer daraus resultierenden, eingeschränkten mechanischen Stabilität einher. Mittels Vernetzung kann die Abbaurrate der Kollagene herabgesetzt werden, jedoch bedingt diese Art der Modifikation eine nicht unerhebliche Einschränkung der Bioaktivität (96, 98).

Trotz seiner Ubiquität muss Kollagen als ein komplexes Biomaterial angesehen werden, welches aufgrund seines hauptsächlich tierischen Ursprungs im Vorfeld des Einsatzes im BTE intensiver Aufbereitungsprozesse bedarf (93).

### **Poly lactide (PLA)**

In den vergangenen Jahren gewannen biodegradierbare Polymere und deren Ko-Polymere für die Verwendung im Rahmen der Biofabrikation und des TE mit der Etablierung neuerer und kostengünstigerer Herstellungsprozesse und dem schnell voranschreitenden Verständnis der in vivo Abbauprozesse zunehmend an Bedeutung (102). PLA und dessen Ko-Polymere gelten als außerordentlich biokompatibel und wurden unter anderem aufgrund dessen bereits von der Food and Drug Administration (FDA) zur medizinischen Anwendung zugelassen (103-105). Das Polymer PLA zeichnet sich neben seiner guten Biokompatibilität auch durch ein Potenzial zur Osteoinduktion und Osteokonduktion aus. Diese Eigenschaften ermöglichen eine gute Zelladhäsion an der Materialoberfläche. Trotz der nicht nur auf Zellen beschränkten guten Oberflächenadhäsionsmöglichkeiten an PLA überschreiten die Messwerte für anhaftende Bakterien und deren Endotoxine nicht die durch die FDA festgesetzten Höchstwerte (106, 107).

PLA ist ein aliphatischer Polyester auf Grundlage organisch vorkommender Milchsäure (108). Im menschlichen Organismus wird natürlich anfallende Milchsäure, zum Beispiel aus dem Abbau von Pyruvat oder Laktat, über den Corizyklus und den Citratzyklus im Energiekreislauf gehalten. In der Literatur werden positive zelluläre Effekte des Abbauprodukts im Sinne eines Antioxidans und als zellulärer Proliferationsstimulus beschrieben (103, 109). Zur Herstellung von PLA sind verschiedene Verfahren etabliert, jedoch handelt es sich bei der Polykondensation und der Ringöffnungskondensation um die am häufigsten eingesetzten (102, 108, 110, 111).

Milchsäure existiert in den Stereoisomeren D und L. Daraus folgt für das Polymer PLA, dass es als PLLA, PDLA und PDLLA mit unterschiedlichen prozentualen Anteilen der Stereoisomere synthetisiert werden kann (103, 110, 112). Der im fertiggestellten Konstrukt enthaltenen Anteil bestimmter Stereoisomere hat entscheidenden Einfluss auf die finalen Materialeigenschaften (105, 110). PLLA, das den größten Anteil des industriell produzierten PLAs bildet, besitzt eine hohe Festigkeit bei gleichzeitig langer

Degradationsphase, welche wiederum das Risiko einer materialassoziierten Inflammation erhöht. PDLA weist eine vergleichsweise verkürzte Degradationszeit, die zu einer verminderten Festigkeit und Stabilität des Materials führt, auf (112, 113). Die Kombination von PLLA und PDLA ermöglicht eine an die beabsichtigte Applikation angepasste Degradationszeit und Festigkeit, indem die prozentualen Anteile entsprechend verändert werden können (114).

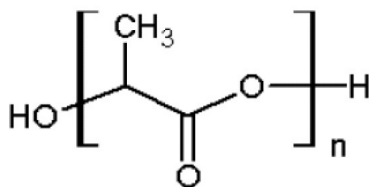


Abbildung 4: Strukturformel des Polylactides aus (115).

Die Degradation des Polylactides erfolgt nicht-enzymatisch über eine Hydrolyse in Oligo- oder Monomere, welche durch Diffusion eliminiert werden (109, 116). Im Rahmen dieses Vorganges werden sowohl Milchsäure als auch Glycolsäure frei. Diese frei werdenden Stoffe können unter anderem durch eine Senkung des lokalen pH-Wertes eine Inflammation, gesteigerte Abbaurate des PLAs, Zellschäden und einen sekundären Stabilitätsverlust des Implantates hervorrufen (104, 111, 116). Das Risiko für materialassoziierte Nebenwirkungen steigt mit der Größe des Implantates, der Länge des Degradationsprozesses und der Vaskularisation am Ort der Implantation, da ein gut ausgebildetes und funktionelles Gefäßsystem als essenziell für eine schnelle Elimination und der daraus resultierenden Verhinderung von potenziell schädlichen Stoffakkumulation angesehen wird (113, 114).

### **Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)**

Wachstumsfaktoren können als Signalmoleküle ihre Wirkung sowohl auf parakrine, autokrine als auch endokrine Weise vermitteln und dabei verschiedene Effekte auf unterschiedliche Zelltypen haben (117).

Die Bone Morphogenetic Proteins gehören zu den Wachstumsfaktoren und wurden in den 1960er Jahren erstmals von Urist im Rahmen der Beobachtung ektoper Ossifikationen beschrieben (118). BMPs werden von unterschiedlichen Zellen u.a. MSCs, Osteoblasten und Chondrozyten sezerniert oder finden sich eingelagert in die Knochenmatrix, aus welcher sie im Rahmen des Remodlings und nach Fraktur des Knochens freigesetzt werden (17, 119, 120).

Die BMPs werden aufgrund ihrer biochemischen Struktur der TGF- $\beta$ -Superfamilie zugerechnet. Diese besteht aus mehr als 30 strukturell verwandten Polypeptiden von denen ein Großteil den BMPs zugeordnet wird (120-122). Obwohl die humanen BMPs strukturell verwandt sind, werden den einzelnen Wachstumsfaktoren unterschiedliche Funktionen in der Embryogenese und der postnatalen Geweberegeneration u.a. als Differenzierungs- und Apoptose-Stimulus zugeschrieben (123-126). Aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz werden die humanen BMPs in 4 Untergruppen eingeteilt (124, 127):

- Gruppe 1: BMP 2 + 4
- Gruppe 2: BMP 5 + 6 + 7 + 8
- Gruppe 3: BMP 9 + 10
- Gruppe 4: BMP 12 + 13 + 14

Die Bone Morphogenetic Proteins 2, 3, 4, 5, 6, 9 besitzen ein sehr hohes osteoinduktives Potenzial, welches sich in ihrer Potenz zur Stimulation der Osteoblasten und Chondrozyten-Differenzierung niederschlägt (128, 129). Neben der Osteoblastogenese stimulieren BMPs auch die Osteoklastogenese, wobei den Subgruppen 1-3 ebenfalls ein kanzerogenes Potenzial attestiert wird (121, 126, 130, 131).

BMPs sind intrazellulär prozessierte Polypeptide, die zum Erlang ihrer Funktion extrazellulär als Dimere, sowohl Homo- als auch als Heterodimere, vorliegen (132). Sie entfalten ihre Wirkung über die Bindung an Oberflächenrezeptoren der Zielzellen. Der BMP-Rezeptorkomplex besteht aus zwei Rezeptoren, die allgemein als Typ 1- und Typ 2-Rezeptoren bezeichnet werden (133). Es sind mehrere Subtypen der beiden Rezeptorgruppen bekannt, welche sich zu unterschiedlichen Heteromeren formieren können. Die einzelnen BMPs besitzen präferierte Rezeptor-Kombinationen und damit einhergehend erhöhte Bindungsaffinitäten (123, 126, 134, 135).

Der extrazellulär vorliegende BMP-Ligand bindet an den permanent aktiven Typ-2-Rezeptor auf der zellulären Oberfläche und führt nachfolgend zur Komplexbildung und Aktivierung des Typ-1-Rezeptors durch Phosphorylierung (127, 134). An den aktivierten Rezeptor-Komplex bindet intrazellulär ein Proteinkomplex bestehend aus den R-Smads 1, 5 und 8. Dieser wird durch Phosphorylierung aktiviert und bindet im nächsten Schritt das Co-Smad Smad 4 (136). Dieser heterooligomere Komplex ist in der Lage, die nukleare Membran zu passieren und nuklear zu akkumulieren (132, 134, 135). Der Prozess der Membranpassage ist schematisch und vereinfacht in der nachfolgenden Abbildung 4 dargestellt. Beide Komplexpartner, sowohl R- als auch Co-Smads, besitzen eine definierte Domäne, genannt MH1, die die direkte Bindung an Promotorregionen der DNA ermöglicht (137). Diese direkte Bindung ist durch eine schwache Bindungsstärke gekennzeichnet, sodass die indirekte Bindung, vermittelt durch eine Komplexbildung mit für die Osteoblasten- und Chondrozyten-Differenzierung essenziellen Transkriptionsfaktoren wie Runx2 bevorzugt wird (128, 138-142). Zur Aufrechterhaltung der Balance des Knochenstoffwechsels greifen Antagonisten und Inhibitoren wie z. B. Noggin, Gremlin und I-Smads auf verschiedenen Ebenen des BMP-Signalweges in die Signaltransduktion ein (120, 123, 127, 130, 132, 136, 143).

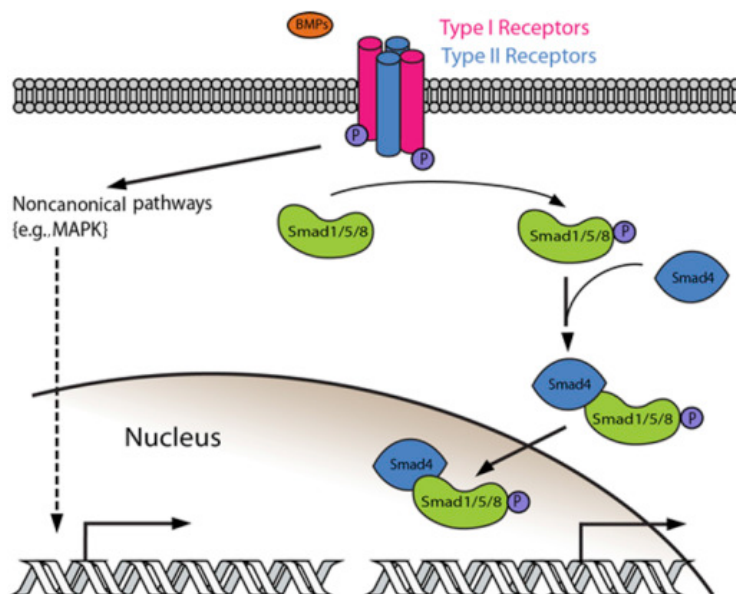


Abbildung 5: Darstellung des Smad-abhängigen BMP-Signalweges.

„Reprinted aus Journal of Orthopaedic Translation, Bone morphogenetic protein-7: Review of signaling and efficacy in fracture healing, Steven Cecchi, Simon J Bennet, Mani Arora, Pages 28-34, Copyright (2016)“ mit der Erlaubnis von Elsevier (Lizenznummer 4797700230723) (144)

Zurzeit sind durch die FDA nur zwei rekombinant hergestellte BMP-Produkte rhBMP-2 und rhBMP-7 zur klinischen Anwendung zugelassen, wobei die Produktion von rhBMP-7 eingestellt wurde (119, 124, 145, 146). Die Indikationen zum Einsatz dieser rekombinanten BMPs sind streng zu stellen (121, 125, 147). In der klinischen Anwendung zeigten sich einige unerwünschte Nebenwirkungen, darunter die heterotope und ektopische Ossifikation, Weichteilschwellung und Erytheme, Osteolysen mit Implantatversagen, Inflammation, Wundheilungsstörungen und eine immunologische Reaktion mit Antikörperbildung (122, 145, 148, 149).

### **Stromal Derived Factor-1 (SDF-1)**

Bei den Chemokinen handelt es sich um eine Gruppe kleiner Proteine mit vielfältigen Funktionen und Eigenschaften. Neben embryonaler Organogenese können sie ihre Wirkung im Rahmen von Inflammation, Chemoattraktion, Proliferationsregulation, Metastasierung und Zellhomings hämatopoetischer Stammzellen in das Knochenmark entfalten (150-152).

Chemokine werden aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz in 4 Gruppen unterteilt: CC, CXC, XC und CX3C. Die Gruppen CC und CXC bilden die größten und am besten untersuchten Subgruppen, wobei innerhalb dieser beiden Gruppen die sogenannte SDF-1-CXCR4 Achse am besten untersucht ist (150, 153-155). Nahezu alle Chemokine können verschiedene oberflächengebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, wobei die einzelnen Chemokine unterschiedliche Rezeptoren favorisieren (155). Das Chemokine SDF-1, auch CXCL12 genannt, bildet hiervon eine Ausnahme, da es neben dem Hauptrezeptor CXCR4 nur einen weiteren Rezeptor, CXCR7, bindet (156-158).

SDF-1 ist ein hoch konserviertes Protein, welches über verschiedene Spezies hinweg eine nahezu stabile Aminosäure-Sequenz aufweist und aufgrund alternativen Splicings im menschlichen Organismus in Form mehrerer Isoformen mit nahezu identischen Funktionen vorkommt (153, 159-163).

Der Stromal-Derived-Factor-1 wird kontinuierlich in verschiedenen humanen Geweben wie zum Beispiel dem Knochenmark, Gehirn, Leber, Niere, Herz, Milz, Lunge, En-

dothelien und fakultativ in Folge von Gewebeschädigung zum Beispiel bei Knochenfraktur oder Inflammation exprimiert (150, 154, 164, 165). Neben der physiologisch vorhandenen SDF-1 Sekretion im Rahmen von Neovaskularisation, Angiogenese, Hämatopoese, Osteogenese und Knochenremodeling finden sich pathologisch erhöhte SDF-1 Konzentrationen in Zusammenhang mit der Kanzerogenese unterschiedlichster Ursprungsgewebe und metabolischer Knochenerkrankungen (153, 157, 166-168). Das Chemokine SDF-1 ist als starker Chemoattraktant bekannt und beeinflusst neben der Rekrutierung verschiedener Stammzellen (HSCs, EPCs und MSCs) auch die Überlebens- und Proliferationsrate CXCR4 positiver Zellen (153, 169-171). Bei der Gewebehypoxie handelt es sich um einen der stärksten Trigger-Faktoren für die Sekretion von SDF-1, da diese durch die lokale HIF-1 $\alpha$  Erhöhung die SDF-1 Konzentrationserhöhung und nachfolgend die Sekretion weiterer proangiogener Faktoren wie VEGF fördert (161, 162, 165, 172, 173).

Zur Wirkungsentfaltung wird ein SDF-1 Gradient mit Konzentrationspeak im geschädigten Gewebe aufgebaut, der seine Wirkung erst durch die systemische Reduktion der SDF-1 Konzentration vollständig entfalten kann (164, 174). Neben der Rekrutierung verschiedenster Stamm- und Progenitorzellen wird aufgrund dieses Gradienten auch die Transmigration der CXCR4 positiven Zellen infolge einer Aktivierung oberflächenständiger Adhäsionsmoleküle und die Überwindung vaskulärer Basalmembranen durch sezernierte MMPs ermöglicht (150, 169, 175-178).

Die intrazellulär ablaufende Signaltransduktion als Folge einer SDF-1 Bindung an den CXCR4 Oberflächenrezeptor ist zurzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. In der Literatur werden verschiedene von SDF-1 abhängige Signalwege beschrieben. Zu diesen gehören unter anderem der PI3K/Akt- und der MAPK/Erk-Signalweg (156, 160, 165, 176, 179-181).

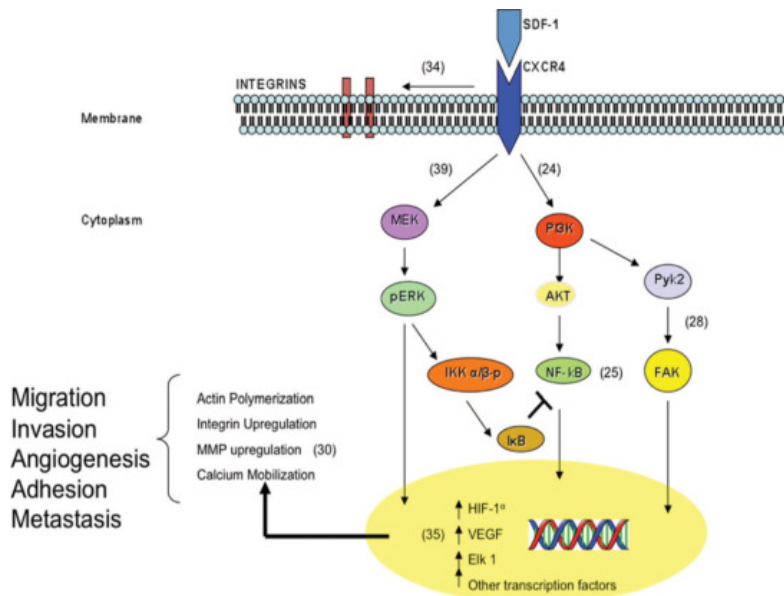


Abbildung 6: Schematische Darstellung des über CXCR4 agierenden Signalwegs.

Reprinted aus Journal of Thoracic Oncology, The CXCR4/SDF-1 Chemokine Receptor Axis: A New Target Therapeutic for Non-small Cell Lung Cancer, Shannon Otsuka, Gwyn Bebb, Copyright 2008, Pages 1379-1383, mit der Erlaubnis von Elsevir (Lizenznummer 4797701479758) (180).

Neben den bisher beschriebenen und in Abbildung 5 gezeigten Eigenschaften wie Migration, Adhäsion und Invasion fördert SDF-1 die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten, welche entscheidende Rollen in der Frakturheilung einnehmen (167, 175, 182, 183).

Aufgrund der Kopplung der Osteogenese an die Angiogenese und somit der Kopplung von Frakturheilung an eine ausreichende Blutversorgung wird SDF-1 vermehrt im Rahmen des Tissue Engineerings erprobt, da der Stromal-Derived-Factor-1 aufgrund seines mutmaßlich breiten Wirkspektrums auf EPCs, HSCs und MSCs alle für diese Kopplung erforderlichen Zelllinien adressiert (172, 184-189).

# **Material und Methodik**

## **Versuchstiere**

### **Tierversuchsantrag**

Das Versuchsvorhaben wurde im Rahmen eines Tierversuchsantrages durch das Landesuntersuchungsamt in Koblenz genehmigt (AZ 23177-07/g17-1-032).

### **Tierbezug**

Die Tiere wurden extra für Tierversuche gezüchtet und waren vorher keinen anderweitigen Versuchen ausgesetzt. Bezogen wurden die Tiere von:

Janvier Europe  
Route des Chênes Secs BP-5  
F-53940 Le Genest-Saint-Isle  
Frankreich

Für die Versuchsreihen wurden mindestens 8 Wochen alte männliche Wistar-Ratten verwendet. Eine Akklimatisierungszeit von mindestens 3 Tagen vor der Operation wurde gewährleistet. Die operierten Tiere wiesen zum Zeitpunkt der Operation ein durchschnittliches Gewicht von 382,25g, mit einem minimalen und maximalen Gewicht von 330g und 460g, auf.

### **Tierhaltung**

Die Räumlichkeiten für die Tierhaltung befanden sich in der Mund-Kiefer-Gesichts Klinik der Universitätsmedizin Mainz und waren vom Operationsraum räumlich getrennt. Das Betreten der Räumlichkeiten erfolgte erst nach dem Anziehen eines Kittels, einer OP-Haube, Mundschutz, Handschuhen und Einmalschuhüberziehern. Zum Schutz der Tiere wurden Abbruchkriterien definiert, welche einen optimalen Gesundheitszustand der Tiere gewährleisten. Dieser wurde regelmäßig, in Abständen von 1-2 Tagen, kontrolliert. Zu den definierten Abbruchkriterien gehörte unter anderem: Struppiges Fell, abnormes Verhalten mit Nahrungsverweigerung und anhaltende Schmerzen ohne Reaktion auf medikamentöse Analgesie-Versuche.

Vor dem Hintergrund des Tierwachstums wurden maximal 3 Tiere zusammen in einem Käfig gehalten. Ein „12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus“ wurde ermöglicht. Die Ratten erhielten täglich spezielles Diätfutter und Wasser ad libitum.

Zur Sicherstellung einer postoperativen Akzeptanz der per Trinkwasser zugeführten Analgesie erhielten die Tiere 1-2 Tage vor der geplanten Operation mit Tramadol versetztes Trinkwasser in der Konzentration von 1mg/ml. Eine per Trinkwasser durchgeführte Analgesie wurde den Tieren bis zum 7. postoperativen Tag angeboten.

### **Organisation der Versuchsgruppen**

Gruppe	PEEK- Platte	PLA- Cage	Kollagen- gel	SDF-1	BMP-7	Tiere pro Gruppe
1	+					4
2	+	+				9
3	+	+	+			9
4	+	+	+	+		10
5	+	+	+		+	9

Tabelle 1: Gruppenorganisation

Der Versuchsaufbau sieht 5 Gruppen vor. Im Rahmen einer jeden Gruppe wurde eine neue Komponente hinzugefügt und blieb im Versuchsaufbau der nachfolgenden Gruppen bestehen. In Gruppe 1 wurde die Osteotomie lediglich mittels PEEK-Platte stabilisiert und diente als Referenzgruppe bezüglich der Ausbildung einer Pseudarthrose. In Gruppe 2 wurde der Versuchsaufbau um einen in die Osteotomie eingesetzten Cage aus Polylactide (PLA) ergänzt. In Gruppe 3 sah der Versuchsaufbau eine PEEK-Platte, einen mit Kollagengel befüllten PLA-Cage vor. In den Gruppen 4 und 5 fand eine dahingehende Erweiterung des Versuchsaufbaus statt, dass in Gruppe 4 SDF-1 und in Gruppe 5 BMP-7 innerhalb des bereits in der vorherigen Versuchsgruppe etablierten Kollagengels inkorporiert wurde.

Die durchschnittliche postoperative Heilungszeit der Osteotomie wurde auf 8 Wochen festgelegt. Jeweils 2 Tieren aus den Gruppen 4 und 5 wurde eine postoperative Heilungs- und Beobachtungszeit von 20 Wochen zuteil, um die Degradierung der PLA-Cage und die langfristige Frakturheilung einschätzen zu können.

## **Herstellungsprozesse der verwendeten Materialien**

### **Herstellung des PLA-Cages**

Zur Herstellung des Polylactide Cages verwendeten wir einen handelsüblichen 3D-Drucker des Modells „Ultimaker 2+“. Der 3D-Drucker fand Verwendung, da das Prinzip des „Fused Deposition Modeling“ aufgrund der hohen Verwendungstemperaturen den Anspruch nach möglichst geringer Endotoxin-Belastung erfüllt.

Für diesen Herstellungsprozess wurde Polylactide in der Stärke 2.85 \_ 0.10 mm, welches sich als gut verformbar und biokompatibel erwies, verwendet.

Mit der 3D-Modeling-Software „Autodesk® Inventor Professional 2013“ (Autodesk, San Rafael, CA, USA) konnte das fertige Konstrukt designed werden, welches in Form und Größe den in der Osteotomie entnommenen Knochenfragmenten entspricht. Dies findet seine Darstellung in Abbildung 1.3. Die so hergestellten Cages hielten im Rahmen einer biomechanischen Testung einer axialen Belastung von 16kg stand. Das verwendete Modell weist eine Höhe von 7mm, einen Durchmesser von 4mm und einen Innendurchmesser von 3mm auf. Dies wird in Abbildung 1.1 im Rahmen der Abbildung eines Planungsmodelles ersichtlich.

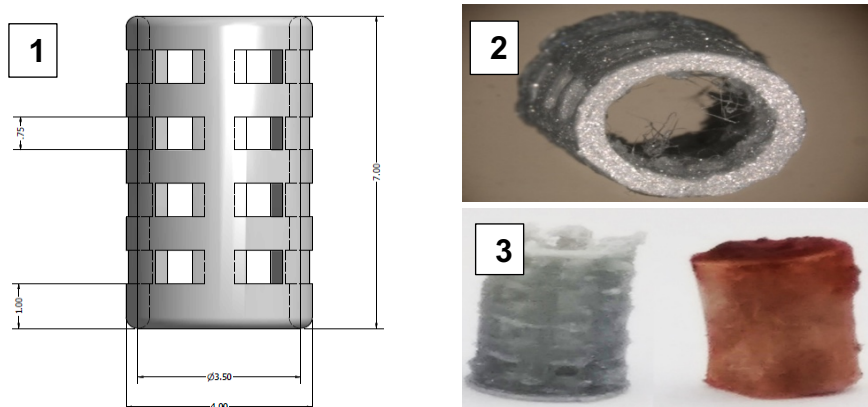


Abbildung 7: Modelle des PLA-Scaffolds.

1: Modell des 3D gedruckten Scaffolds 2: Transversalansicht des 3D gedruckten PLA-Scaffolds, 3: Nebeneinanderstellende Ansicht PLA-Scaffold und entnommenes knöchernes Fragment des Ratten Femurs

### **Herstellung des Kollagengels**

Das Kollagengel diente der Befüllung der PLA-Cages, welche in den Gruppen 3-5 des Versuchsaufbaus vorgesehen war. Im Vorfeld einer jeden neuen intraoperativen Verwendung wurde das Kollagengel neu hergestellt. Dies erfolgte unter sterilen Rahmenbedingungen, geschaffen durch eine Sicherheitswerkbank. Zur Sicherstellung einer einheitlichen Konzentration von 3mg/ml Gel wurden die Dosierungen der verwendeten Komponenten entsprechend der zu diesem Zeitpunkt im Labor vorhandenen Chargenkonzentrationen angepasst.

Für 1ml Gel wurden die einzelnen Komponenten in nachfolgenden Dosierungen angesetzt.

Substanz	Dosierung
10xM199 <sup>1</sup>	100 µl
NaHCO <sub>3</sub> <sup>2</sup>	60 µl
NaOH <sup>3</sup>	23 µl
Bovines Kollagen I* <sup>4</sup>	650 µl
H <sub>2</sub> O ad 1 ml* <sup>5</sup>	167 µl

Tabelle 2: Herstellung Kollagengel

\*An die zuletzt verwendete Charge angepasste Dosierung

<sup>1</sup> Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

<sup>2</sup> Merck Millipore, Darmstadt, Germany

<sup>3</sup> Merck Millipore, Darmstadt, Germany

<sup>4</sup> BD Biosciences, Heidelberg, Germany

<sup>5</sup> B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany

Die Ansetzung des Gels erfolgte auf Eis, um eine vorzeitige Polymerisierung zu verhindern.

Nach der initialen Herstellung des Gels wurden die vorbereiteten PLA-Cages mit 100µl des flüssigen Gels befüllt und zum Zwecke der Polymerisierung in einen Brutschrank gestellt.

Im Rahmen der Inkorporation von SDF-1 innerhalb des Kollagens wurde nach einer ersten, den Boden und die Seiten des Konstruktes bedeckenden Befüllung, das Kollagengel im Brutschrank zur Polymerisation gebracht. Nach Ablauf dieses ersten Schrittes konnte 1µl SDF-1 (Stock 100ng/µl) hinzugefügt und mit einer abschließenden Schicht des noch nicht polymerisierten Kollagengels bedeckt werden. Die abschließende Polymerisierung fand erneut im Brutschrank statt.

Die Herstellung des mit BMP-7 versetzten Kollagengels glich der oben beschriebenen Inkorporation von SDF-1, wobei hier 2µl BMP-7 (Stock 1µg/µl) zwischen den Schichten aus Kollagen I inkorporiert wurden.

### **Herstellung der Narkose**

Präoperativ wurde die zur Anwendung kommende Narkose für die Tiere anhand eines im Rahmen der Vorarbeit von Herrn Mehmet Rüzgar evaluierten Schemas angesetzt.

Zur leichteren Herstellung und Applikation der Narkose wurden die benötigten Mengen auf den erwarteten Bedarf von 8 Narkosen umgerechnet.

Substanzname	Dosierung	Herstellername
<b>Fentanyl</b>	240 µl	Fentanyl-Janssen 0,1mg/2ml
<b>Midazolam</b>	1926 µl	Midazolam-hameln 5 mg/ml Injektionslösung 15mg in 3ml <sup>2</sup>
<b>Metedomodin</b>	896 µl	Dorbene® vet. 1 mg/ml <sup>3</sup>

<b>Natrium-Chlorid-</b> 944 µl	NaCl 0,9% B. Braun, Ecolav®, 250 ml <sup>4</sup>
<b>Lösung</b>	

Tabelle 3: Herstellung Narkoselösung

- <sup>1</sup> Janssen-Cilag GmbH Neuss, Germany  
<sup>2</sup> hameln pharma plus gmbh, Hameln, Germany  
<sup>3</sup> Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany  
<sup>4</sup> B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany

Zur Antagonisierung der Narkose standen folgende Medikamente zur Verfügung.

Substanz	Dosierung (mg/kg KG)
Atipamezol	Revertor® 0,75 [mg/kg KG] <sup>1</sup>
Flumazenil	Anexate® 0,2 [mg/kg KG]

Tabelle 4: Antagonisten Narkose

- <sup>1</sup> Virbac AG, Glattbrugg, Switzerland  
<sup>2</sup> Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany

### **Applikation der Narkose**

Vor Applikation der Narkose wurde das zu operierende Tier in einer Plastikbox gewogen, sodass hieraus das zu applizierende Narkosenvolumen errechnet werden konnte. Die initiale, inhalative Narkose wurde in Form einer Kombination von Isofluran und fortlaufender Sauerstoffzufuhr verabreicht, sodass die intraperitoneale Injektion der Sedativa und Analgetika für die Tiere stressfreier und sicherer vonstattengehen konnte. Die intraperitoneale Injektion erfolgte in den rechten unteren Quadranten des Abdomens.

Die zu verabreichende Narkosemenge wurde anhand des vorher ermittelten Gewichtes und der nachfolgenden Tabelle bestimmt.

Narkosemenge in Abhängigkeit des Gewichts	
<b>430g</b>	0,55 ml Narkose
<b>400g</b>	0,51 ml Narkose
<b>370g</b>	0,47 ml Narkose
<b>350g</b>	0,45 ml Narkose

Tabelle 5: gewichtsadaptierte Narkoseapplikation

Die Narkoselösung wurde dem Tier mit einer Feindosierungsspritze (Omnifix®) und Kanüle (STERICAN) verabreicht.

Bei intraoperativen Anzeichen einer unzureichenden Analgesie und Sedierung wurde den Tieren 0,1- 0,2 ml Narkoselösung subkutan in die Nackenfalte appliziert.

Nach Injektion der Narkose wurde jedes Tier bis zum Eintritt der Analgosedierung in einen von den anderen Tieren getrennten Käfig gesetzt.

### **Operatives Vorgehen am Beispiel einer Operation**

Die operativen Handlungen an den Versuchstieren, welche die Grundlage dieser Dissertationsschrift bilden, wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Philipp Wolf durchgeführt.

Der Operationstisch wurde mit einem sterilen Operationstuch und den abgebildeten sterilen chirurgischen Instrumenten bestückt.



Abbildung 8: präparierter Operationstisch

Die Markierung der Tiere erfolgte mit Hilfe eines Stanzloches im Ohr. Die Position und die Anzahl der Stanzlöcher ergaben sich aus der Anzahl der in einem Käfig lebenden Tiere.

Das sedierte Tier wurde dem Käfig entnommen und auf dem vorbereiteten Tisch positioniert. Der Schutz der Cornea konnte mit Corneregel® gewährleistet werden.

Vor Beginn der Operation wurde die Tiefe der Narkose mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft, um ein ausreichendes Analgesie-Niveau sicherzustellen.

Das rechte Bein des Tieres wurde großzügig zwischen Knie und Hüfte rasiert, um eine möglichst saubere Operationsfläche zu generieren.

Mithilfe eines Skalpell (No.15, Feather Disposable Scalpel) vorgenommene Hautinzision zwischen Knie und Hüfte des rechten Beines wurde unter leichter Hautspannung ausgeführt.

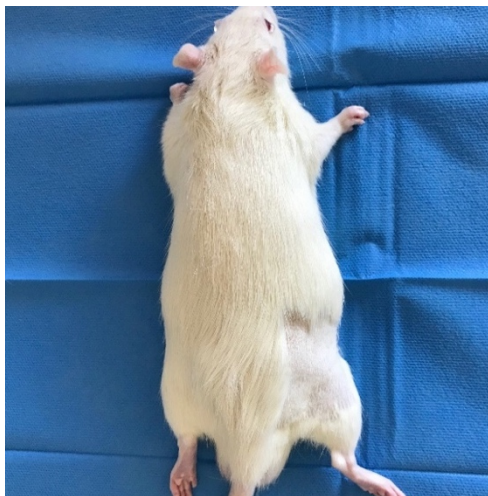


Abbildung 9: positioniertes Tier



Abbildung 10: Hautinzision

Unter Zuhilfenahme einer chirurgischen Pinzette und der Präparierschere nach Metzenbaum konnte die Inzision erweitert werden. Im weiteren Operationsverlauf diente die Fascia lata als Orientierungspunkt für eine schonende Freipräparation des Femurs. Eine bestmögliche Weichteilschonung bei diesem Vorgehen konnte durch die Verwendung eines Raspatoriums und eines Lidhackens erreicht werden.

Nach ventraler Präparation des Femurs wurde die Einsicht in das Operationsfeld mittels Wundspreizer erweitert. Dies erfolgte unter Identifikation und Schonung des Nervus ischiadicus. Daran anschließend konnte die Freipräparation der dorsalen Femuranteile unter Außenrotation des Beines fortgesetzt werden.



Abbildung 11: präpariertes Femur

Nach Überprüfung der Vollständigkeit der Präparation durch Anlage des Osteosynthesematerials (RatFix plate 8 hole, Femur, RISystemes, Davos Platz, Switzerland) wurde die finale Position auf der femoralen Diaphyse unter Außenrotation des Beins festgelegt. Die Integrität des Kniegelenks war dabei von besonderer Bedeutung, um dem Tier postoperativ eine uneingeschränkte Bewegungsfreiheit zu ermöglichen.

Die Fixierung der PEEK-Platte erfolgte mittels Titanschrauben (RatFix shoulder screw 0.80x6.50 mm, RISystems, Davos Platz, Switzerland). Für die Bohrungen konnte der mitgelieferte Bohraufsatz auf eine handelsübliche Kleinbohrmaschine mit Präzisionskugellager (Hobby Drill 2000, No. 0550) montiert werden. Nach senkrechter Bohrung wurden die einzelnen Schrauben unter Blutstillung und unter Zuhilfenahme eines Handbohrers (siehe Bild) in den vorgebohrten Positionen verankert.

Besonders wichtig erschien hierbei die gleiche Ausrichtung der überstehenden Schraubenstifte im Raum, um den RatFix Drill- & Saw guide (RISystems, Davos Platz, Switzerland) passgenau aufsetzen zu können.



Abbildung 12: fixierte PEEK-Platte

Die beiden innersten Löcher der PEEK-Platte blieben ohne Verschraubung, da die angestrebte Osteotomie im Bereich dieser Schrauben verlief.

Nach Aufsetzen des RatFix Drill- & Saw guides (RISystems, Davos Platz, Switzerland) auf die primäre Osteosynthese wurde ein Sägedraht (Gigli wire saw 0,44mm, RISystems, Davos Platz, Switzerland) in die Führungsschienen eingespannt. Unter konsequenter Weichteilschonung wurde eine 6mm messende Osteotomie des Femurs durchgeführt.

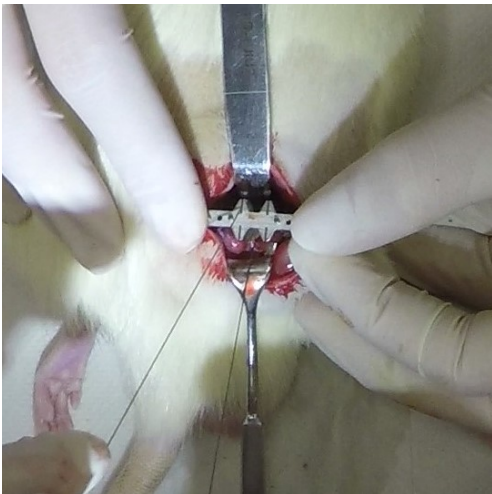


Abbildung 13: Osteotomie

Nach dem Setzen der Osteotomie wurde eine strikte Blutstillung und Spülung im Bereich der Wunde vorgenommen, um diese von Knochenspänen zu reinigen und das Infektionsrisiko zu minimieren.

Der im 3D-Drucker gedruckte PLA-Cage wurde durch Abschleifen an die genaue Form der Osteotomie angepasst, wobei hier stets der Gedanke nach einem „press fit“-Einsatzes des Scaffolds in die Osteotomie federführend war.



Abbildung 14: "press fit" eingesetzter PLA-Cage

Ein erneutes Spülen der Wundhöhle vor Verschluss der Wunde wurde vorgenommen. Einzelknopfnähte mit 4-0 Vicryl-Fäden (Polyglactin 910) dienten der Muskeladaptation. Die Hautinzision wurde mit 4-0 Ethilon-Fäden verschlossen.

Im Anschluss an den Wundverschluss erfolgte eine Reinigung der Hautnaht mittels NaCl-Lösung und Auftragen des Wundantiseptikums Braunol®. Zum Abschluss des Wundverschlusses wurde der Sprühpflasterverband Opsite Spray aufgetragen.

Zum Abschluss der Operation erfolgte eine radiologische Darstellung der Osteotomie unter leichter Außenrotation des rechten Beines. Dies konnte durch Unterlage eines Tupfers unter das rechte Knie des Tieres erreicht werden.

Zur Sicherstellung einer reizlosen primären Wundheilung wurden die Tiere 2 Tage postoperativ alleine in einem Käfig gehalten und anschließend mit den Tieren ihrer alten Gruppe zusammengeführt. Eine ausgiebige Wundkontrolle erfolgte am ersten

postoperativen Tage. Anschließend wurde die Wundkontrolle in Abständen von 1-2 Tagen fortgeführt.

Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere für 7 Tage Tramadol-ratiopharm® 100 mg/ml Tropfen mit einer Konzentration von 1mg/ml in frei zugänglichem Trinkwasser. Nach Ablauf der 7 Tage wurde auf die weitere Gabe von Analgetika im Trinkwasser verzichtet.

### **Röntgenkontrolle**

Alle Röntgenkontrollen wurden in einem Abstand von 4 Wochen durchgeführt. Daraus ergaben sich einmalige Kontrollen für die Tiere mit 8-wöchiger Standzeit und für die Tiere mit 20 Wochen Standzeit Kontrollzeitpunkte nach 4, 8, 12, und 16 Wochen.

Im Rahmen der Röntgenkontrolle wurden die Tiere einzeln ihrem Käfig entnommen und erhielten eine inhalative Kurznarkose bestehend aus Isofluran und kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr. Die Augen wurden mittels Corneregel vor Austrocknung geschützt.

Nach Eintritt der Narkose wurde das Tier seinem Käfig entnommen und mittig in dem Faxitron MX-20 Kleintier-Röntgengerät positioniert. Für die Röntgenbilder war eine Leistung von 10-35kV ausreichend. Zur Bildoptimierung wurde das rechte Knie mit einem Schlinggazetupfer ohne Röntgenmarkierung unterlegt.



Abbildung 15: Kontroll-Röntgen der Osteotomie

## **Euthanasie der Versuchstiere**

Die Euthanasie der Tiere erfolgte nach 8 oder nach 20 postoperativen Wochen. Entsprechend des Tierversuchsantrages wurde diese mittels CO<sub>2</sub> und anschließender Dekapitation durchgeführt. Zur Stressvermeidung während des Vorgangs wurde CO<sub>2</sub> dem System erst zugeführt, nachdem das Tier in ihm platziert war. Nach Eintritt des Todes wurde ein erstes Röntgenbild, nach Vorbild der 4-wöchigen Kontrollbilder, angefertigt.

Im Anschluss wurde das Femur zur histologischen Aufarbeitung entnommen. Dafür erfolgte nach Rasur des Beines eine Inzision entlang der Operationsnarbe. Anschließend wurde die Muskulatur unter Schonung des Kallus entfernt. Zuletzt wurden sowohl das Knie- als auch das Hüftgelenk durchtrennt.

Das entnommene Femur wurde nochmals einer radiologischen Bildgebung zugeführt.

Zum Zwecke der Fixierung wurde das Femur in ein Falcon™ Zentrifugenröhrchen (50ml) befüllt mit 40 ml 4,5% Formaldehydlösung (Roti®-Histofix 4,5%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), gelegt. Jedem entnommenen Femur wurde eine Nummer zu Dokumentationszwecken, aus den Unterlagen des Labors zugeordnet, sodass die Nachvollziehbarkeit der einzelnen Proben gewährleistet werden kann.

## Dokumentation der Versuchsreihe

Tier (Versuchs- nummer)	OP- Datum	Versuchs- gruppe	Datum Euthana- sie	Doku- mentati- onsnum- mer	CT-Nr.
11	14.11.17	1	Vorzeitig gestorben	3624	M1907
12	14.11.17	2	09.01.18	3623	M1911
13	02.12.17	1	27.01.18	3634	M1908
14	02.12.17	2	27.01.18	3635	Ausge- schlossen
15	02.12.17	2	27.01.18	3636	M1912
16	02.12.17	1	27.01.18	3637	M1909
17	16.12.17	2	10.02.18	3390	M1913
18	16.12.17	2	10.02.18	3391	M1914
19	16.12.17	2	10.02.18	3392	M1915
20	16.12.17	2	10.02.18	3393	M1916
21	27.12.17	1	21.02.18	3648	M1910
22	27.12.17	3	21.02.18	3649	M1900
23	27.12.17	3	Vorzeitig gestorben	/	
24	27.12.17	3	21.02.18	3650	M1901
25	05.01.18	2	02.03.18	3675	M1917
26	05.01.18	2	Vorzeitig gestorben	/	
27	15.01.18	3	12.03.18	3676	M1902
28	15.01.18	3	12.03.18	3677	M1903
29	17.01.18	3	14.03.18	3678	Ausge- schlossen
30	17.01.18	3	14.03.18	3679	M1904
31	17.01.18	3	14.03.18	3680	M1905
32	17.01.18	3	14.03.18	3681	M1906

33	07.02.18	4	04.04.18	3719	M1919
34	07.02.18	4	04.04.18	3720	M1920
35	07.02.18	4	04.04.18	3721	M1921
36	10.02.18	4	07.04.18	3722	M1922
37	10.02.18	4	07.04.18	3723	M1923
38*	10.02.18	4	30.06.18	3822	M1971
39*	10.02.18	4	30.06.18	3823	M1972
40	14.02.18	4	11.04.18	3724	M1924
41	14.02.18	4	11.04.18	3725	M1925
42	14.02.18	4	11.04.18	3726	M1926
43*	10.03.18	5	28.07.18	3840	M1967
44*	10.03.18	5	28.07.18	3841	M1968
45	10.03.18	5	05.05.18	3738	M1939
46	10.03.18	5	05.05.18	3739	M1940
47	14.03.18	5	09.05.18	3740	M1941
48	14.03.18	5	09.05.18	3741	M1942
49	14.03.18	5	09.05.18	3742	M1943
59	04.05.18	5	29.06.18	3819	M1970
60	04.05.18	5	Vorzeitig gestorben	/	

Tabelle 6: Versuchsdokumentation

\*Tiere mit 20 Wochen postoperativer Heilungszeit

Den nachfolgend beschriebenen Prozessen wurden alle entnommenen Femora mit Ausnahme des Femurs mit der „Histonummer“ 3624 zugeführt.

### $\mu$ -CT

Alle entnommenen Präparate wurden der weiteren radiologischen Aufarbeitung zugeführt. Die genaue radiologische Darstellung des Osteotomie-Bereiches erfolgte durch Herrn Hermann Götz (Plattform Biomaterialien, Universitätsmedizin Mainz). Hierfür wurden die entnommenen Femora in eine spezielle Halterung für  $\mu$ CTs gebettet. Die Anfertigung der CT-Darstellung erfolgte mittels eines  $\mu$ CT des Modelles CT40

(DCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland). Die sich anschließende Darstellung der Befunde wurde mit der Software „MicroCT-Analysis- Software“ durchgeführt und mit der Open Source Software „ImageJ“ ausgewertet.

## **Entkalkung der Präparate**

Es wurde die Herstellung einer 17,7% EDTA-Lösung angestrebt. Hierfür wurden 354g EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ) und 117g Tris ( $C_4H_{11}NO_3$ ) ad 2000ml  $H_2O$  gelöst. Die Lösung der Substanzen wurde durch einen Rührfisch gewährleistet und der sich einstellende pH-Wert kontinuierlich überwacht. Angestrebt wurde ein pH-Wert von 7,1-7,2. Zum Erreichen des Wertes konnte mit HCl titriert werden.

Im Anschluss an das  $\mu$ CT wurden die entnommenen Femora einzeln in Falcon™ Zentrifugenröhrchen (50ml) gelegt und der Entkalkungsprozess auf einer Rüttelplatte begonnen. Die Prozessdauer wurde auf 6 Wochen für die nach 8 Wochen entnommenen Femora und auf 8 Wochen für die nach 20 Wochen entnommenen Femora festgelegt.

Die Entkalkung folgte einem festgelegten Schema. In der ersten Woche wurde die Lösung täglich gewechselt, in der zweiten Woche jeden zweiten Tag und ab der dritten Woche zweimal wöchentlich.

Nach abgeschlossener Entkalkung der Femora wurden das gesamte Osteosynthesematerial entfernt. Dies erfolgte mittels im RatFix enthaltenem Instrumentarium (Square box wrench 0.70 mm). Im Anschluss konnte das regenerierte Gewebe mit ca. 2 mm Sicherheitsabstand aus dem Knochenverbund gelöst werden. Die so präparierten Femurfragmente wurden bis zur Einbettung in Paraffin mit Histofix bedeckt.

## **Histologie**

### **Einbettung in Paraffin**

Die vorbereiteten Präparate wurden vor der eigentlichen Einbettung in Paraffin in Aqua dest. gewässert, um Rückstände des Formalins zu entfernen. Die Entwässerung er-

folgte in aufsteigender Alkoholkonzentration (Isopropanol 20-40-60-80-90-100). Im Anschluss an diesen Schritt konnte das Präparat in heißes Paraffin eingebracht und zu Blöcken gegossen werden.

### **Schnitt der Präparate**

Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden vor dem Schnitt zur Optimierung der Schnittkanten gekühlt. Mittels Schlittenmikrotom konnten Schnitte von 5µm Dicke angefertigt werden. Das gesamte Präparat wurde geschnitten, wobei nur jeder fünfte Schnitt (bis zum 50. Schnitt) in die weitere Aufarbeitung aufgenommen wurde. Das dazwischenliegende Gewebe wurde für eine potenziell anschließende Verwendung zurückgestellt. Nach dem Schnitt wurde das Gewebe im warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger übertragen.

Bis auf Präparat 3624 wurden alle Präparate geschnitten und der histologischen Färbung zugeführt.

### **Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Im Rahmen der Herstellung von mikroskopisch auswertbaren Präparaten fand die Hämatoxylin-Eosin-Färbung Verwendung. Die paraffinierten Präparate wurden ca. 20 Minuten vor Beginn der Färbung in einem 60 Grad messenden Inkubator erwärmt.

Vor Verwendung der Hämatoxylin-Lösung wurde diese filtriert. Die Eosin G Lösung wurde vor Verwendung mit Eisessig (0,2ml auf 100ml) versetzt.

Die Entparaffinierung und Färbung der Präparate erfolgten anhand des nachfolgenden Protokolls.

<b><u>HE-Färbung</u></b>	
3 x 10 Minuten	Xylol
2 x 5 Minuten	Isopropanol 100%
2 x 5 Minuten	Isopropanol 96%
1 x 5 Minuten	Isopropanol 70%

1 x 5 Minuten	Isopropanol 50%
7 Minuten	Hämatoxylin-Lösung
15 Minuten	Bläuen unter fließendem Wasser
3 Minuten	Eosin G Lösung
1x kurz	Isopropanol 50%
1x kurz	Isopropanol 70 %
2 x kurz	Isopropanol 96%
2 x 5 Minuten	Isopropanol 100%
3 x 5 Minuten	Xylol

Tabelle 7: Färbeschema HE-Färbung

Die Eindeckung der gefärbten Schnitte erfolgte mit Cytoseal™

### **Masson-Goldner-Trichrom-Färbung**

Vor Beginn des Färbeprozesses wurden die Hämatoxylin Lösungen A und B nach Weigert im Verhältnis 1:1 gemischt und filtriert. Die 1%-ige Essigsäure wurde ebenso wie die 0,2%-ige Lichtgrünlösung, bestehend aus 0,2g gelösten Lichtgrüns in 100ml Aqua dest. versetzt mit 0,2ml Eisessig, vor der Färbung neu angesetzt.

Die Präparate wurden ca. 20 Minuten vor dem Beginn des Färbeprozesses bei 60 Grad inkubiert. Die Färbung erfolgte anhand des nachfolgend befindlichen Protokolls. Die Präparate wurden nach Abschluss der Färbung mit Cytoseal™ eingedeckt.

Die Kernfärbung erfolgte mit Eisen-Hämatoxylin Lösung, um die Entfärbung durch saure Farbstoffe zu vermeiden.

Die Färbung der Präparate erfolgte nach dem nachfolgenden Schema:

<b><u>Masson-Goldner-Trichrom-Färbung</u></b>	
3 x 10 Minuten	Xylol
2 x 5 Minuten	Isopropanol 100%
2 x 5 Minuten	Isopropanol 96%
1 x 5 Minuten	Isopropanol 70%
2 x 5 Minuten	Isopropanol 50%

Kurzes Eintauchen	Aqua dest.
5 Minuten	Hämatoxylin nach Weigert
15 Minuten	Fließendes Bläuen unter Wasser
Kurzes Eintauchen	Aqua dest.
30 Sekunden	Spülen mit 1%-iger Essigsäure
10 Minuten	Inkubation in Ponceau-S-Lösung
30 Sekunden	Spülen mit 1%-iger Essigsäure
10 Minuten	Inkubation in Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung
30 Sekunden	Spülen mit 1%-iger Essigsäure
10 Minuten	Inkubation in 0,2%-iger Lichtgrün-lösung
30 Sekunden	Spülen mit 1%-iger Essigsäure
Kurzes Eintauchen	Aqua dest.
Kurzes Eintauchen	aufsteigende Alkoholreihe (1x 50% Isopropanol, 1x 70% Isopropanol, 2x 96% Isopropanol, 2x2 Minuten 100% Isopropanol)
3 x 5 Minuten	Xylol

Tabelle 8: Färbeschema Mason-Goldner-Trichrom-Färbung

### **Elastika van Gieson- Färbung**

Ziel dieser Färbung war die Darstellung elastischer Fasern.

Vor Beginn des Färbeprozesses wurde die Hämatoxylin Lösung nach Weigert im Verhältnis 60ml Lösung A und 40ml Lösung B gemischt und filtriert.

Die Präparate wurden vor der Färbung für ca. 20 Minuten bei 60 Grad inkubiert. Die Färbung erfolgte anhand des nachfolgend befindlichen Protokolls. Nach Abschluss der Färbung wurden die Präparate mit Cytoseal™ eingedeckt.

<b><u>Elastika van Gieson-Färbung</u></b>	
3 x 10 Minuten	Xylol
2 x 5 Minuten	Isopropanol 100%
2 x 5 Minuten	Isopropanol 96%
1 x 5 Minuten	Isopropanol 70%
1 x 5 Minuten	Isopropanol 50%

Kurzes Eintauchen	Aqua dest.
10 Minuten	Hämatoxylin Lösung nach Weigert
10 Minuten	Fließendes Bläuen
Kurzes Eintauchen	Aqua dest.
15 Minuten	Resorcin-Fuchsin
Kurzes Eintauchen	Wasser
Kurzes Eintauchen	Aqua dest.
5 Minuten	Inkubation mit Van-Gieson-Gemisch (Pikrofuchsin)
Kurzes Eintauchen	Aqua dest.
1 x kurz	Ispopropanol 50%
1 x kurz	Isopropanol 70%
2 x kurz	Isopropanol 96%
2 x 5 Minuten	Isopropanol 100%
3 x 5 Minuten	Xylol

Tabelle 9: Färbeschema Elastika van Gieson-Färbung

### **Histologische Auswertung**

Zur histologischen Auswertung der mittels HE, Mason-Goldner Trichrom und Elastika van-Gieson eingefärbten Präparate wurden zwei Mikroskop-Modelle mit unterschiedlichen Auflösungen, ein Mikroskop des Modells Leica MZ16A und ein Zeiss Axioplan verwendet.

## Auswertung CT-Daten

Die Auswertung der DICOM CT-Daten, bereitgestellt von Herrn Hermann Götz, aus dem Institut BiomaTiCS der Univeritätsmedizin Mainz, erfolgte mit dem Programm Fiji ImageJ (64-bit) (190).

Angewendetes Procedere:

Der Import der DICOM Dateien erfolgte über die Befehlsfolge: „File → Import → Image sequence“. Das gewünschte Datenpaket wurde ausgewählt und „sort names numerically“ ausgewählt.

Die importierte Datei wurde im Anschluss in eine Binärdatei umgewandelt: „Image → Adjust → Threshold“. Für das Erstellen des Thresholds mussten die Felder „dark background“ und „stack histogram“ ausgewählt werden. In dem Kontrollfeld „Convert Stack to Binary“ wurden die Auswahlfelder „Default“ und „dark“ belassen, während alle anderen Angaben entfernt wurden. Das so generierte Threshold wurde für die weitere Verwendungen gespeichert.

Die Threshold-Dateien wurde im nächsten Schritt einer Reorientierung der Coronar- und Sagittalschnitte unterzogen: „Plugins → Align Stacks → Reorient3 TP“. Die anzuwendenden Winkel konnten mittels Winkelmesser bestimmt werden. Durch „Apply“ wurde der Vorgang bestätigt und die Datei erneut gespeichert.

Da im Rahmen der Auswertung nicht die gesamte Datei relevant war, musste ein Ausschnitt der CT-Datei generiert werden. Grundlage dessen war die Annahme, dass die Osteotomie eine Größe von 6mm aufweist. Da 20µm einem Voxel entsprechen, wurde die Größe des benötigten Ausschnitts auf 370 slices festgelegt. Das Generieren der Ausschnitts erfolgte über die Befehlsfolge: „Image → Stacks → Tools → Make Substack“ und das Angabe der ausgewählten Sequenz.

Die Selektion der als von Bedeutung angesehen Präparatregion schloss sich mit der Befehlsfolge „Edit → Selection → Specify“ an diesen Schritt an. Die Befehle „oval, constrain square/circle, centered und scales units(mm)“ wurden für alle Auswertungen ausgewählt. Die Auswertung erfolgte mit einem Durchmesser von 3mm, 4mm und 5mm. Die x- und y-Werte wurden so gewählt, dass sie die Osteotomie einschlossen.

Die Auswertung des Quotienten aus Bone volume und Tissue volume (BV/TV) erfolgte über die Befehlsfolge „Plugins → BoneJ → Volume Fraction“. Der „Voxel“ Algorithmus

und der ROI Manager mussten ausgewählt und bestätigt werden. In der darauf folgenden Kontrollbox für ein Threshold musste „Dark background“ und „Stack histogram“ ausgewählt und auf die gesamte datein angewendet werden.

Die so generierten Daten für Bone volume, Tissue volume und Quotienten bv/tv wurden für die weitere Verwendung gespeichert.

### **Statistische Auswertung der Daten**

Die im oben beschriebenen Schritt generierten Daten wurden mit Hilfe der IBM SPSS®-Softwareplattform 23 statistisch ausgewertet.

## Ergebnisse

### Kontroll-Röntgen

Im Rahmen der Versuchsplanung wurden die postoperativen Röntgenkontrollen zur Dokumentation des Heilungsverlaufes auf 4 und 8 Wochen festgelegt. Diese Kontrollen wurden bei allen Tieren aus den 5 Versuchsgruppen durchgeführt.

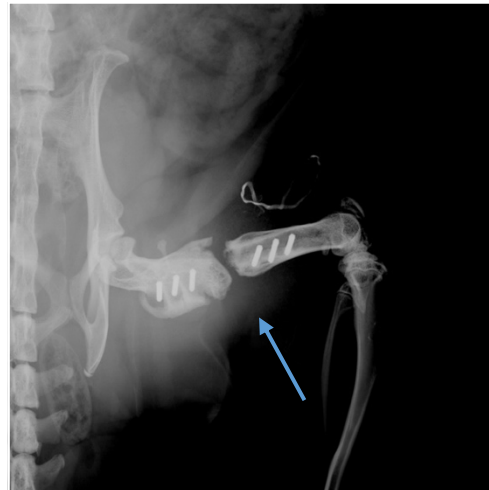
Nachfolgend finden sich Kontroll-Röntgenbilder von jeweils 2 Tieren pro Versuchsgruppe, die beispielhaft für den in der speziellen Versuchsgruppe beobachteten Heilungsverlauf sind.

Die Kontroll-Röntgenbilder der Tiere mit den Versuchsnummern 13 und 16 stehen beispielhaft für Versuchsgruppe 1, die durch eine leere Osteotomie definiert wird.

Leere Osteotomie (Nr. 13): 4 Wochen



Leere Osteotomie (Nr. 13): 8 Wochen



Leere Osteotomie (Nr. 16): 4 Wochen



Leere Osteotomie (Nr. 16): 8 Wochen

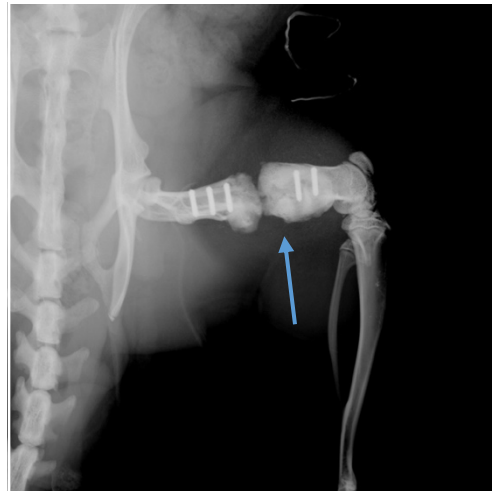


Abbildung 16: Kontroll-Röntgenbilder der Osteotomien aus Versuchsgruppe „leere Osteotomie“ (Versuchsgruppe 1).

Pfeil auf hypertropher Pseudarthrose.

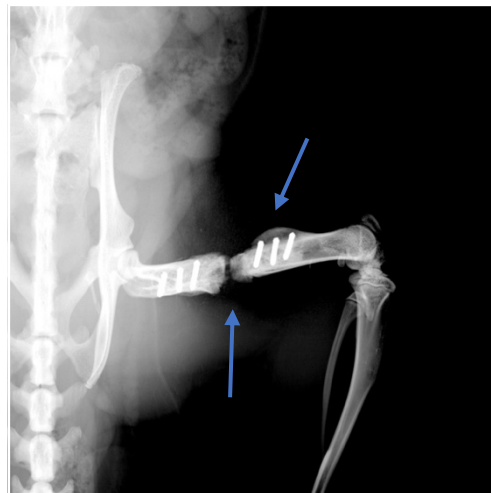
In Versuchsgruppe 1 zeigt sich eine hypertrophe Pseudarthrose in Folge des Critical-Size-Defects.

Die Kontroll-Röntgenbilder der Tiere mit den Versuchsnummern 15 und 20 stehen beispielhaft für Versuchsgruppe 2, in welcher die Osteotomie einen „press fit“ eingesetzten PLA-Cage enthält.

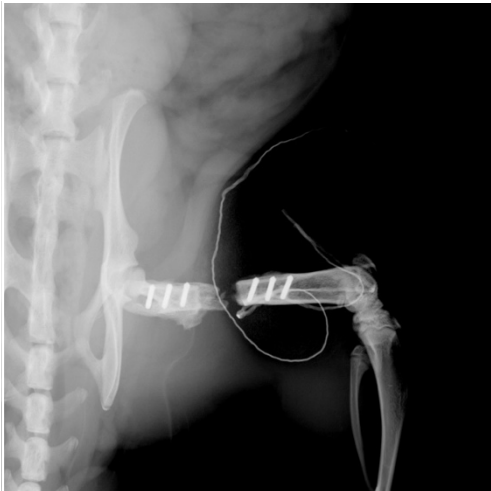
PLA (Nr. 15): 4 Wochen



PLA (Nr. 15): 8 Wochen



PLA (Nr. 20): 4 Wochen



PLA (Nr. 20): 8 Wochen

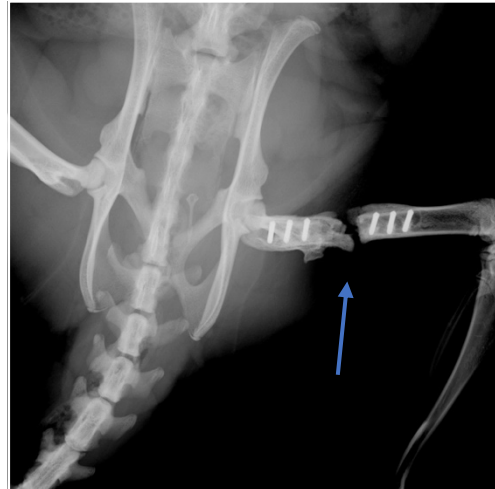


Abbildung 17: Kontroll-Röntgenbilder aus Versuchsgruppe "PLA" (Versuchsgruppe 2).

Pfeile auf Pseudarthrose, a.e. oligotroph.

Im Rahmen der zweiten Versuchsgruppe wurde der in die Osteotomie eingepasste PLA-Cage etabliert. Hierbei zeigt sich im Verlauf von 8 Wochen eine Abnahme der Kallus Hypertrophie, wobei die Pseudarthrose weiterhin Bestand hat.

Die Kontroll-Röntgenbilder der Tiere mit den Versuchsnummern 29 und 30 stehen beispielhaft für Versuchsgruppe 3, die durch einen mit Kollagen I befüllten PLA-Cage definiert wird.

PLA+Kollagen (Nr. 29): 4 Wochen



PLA+Kollagen (Nr. 29): 8 Wochen



PLA+Kollagen (Nr. 30): 4 Wochen



PLA+Kollagen (Nr. 30): 8 Wochen



Abbildung 18: Kontroll-Röntgenbilder auf Versuchsgruppe "PLA + Kollagen" (Versuchsgruppe 3).

Radiologisch lässt sich eine weitere Abnahme der Hypertrophie in Versuchsgruppe 3 beobachten. Das Wachstum des Kallusgewebes erscheint gerichteter und überbrückt größere Bereiche der Osteotomie. Der Defekt ist jedoch weiterhin gut sichtbar und nicht überbrückt.

Die Kontroll-Röntgenbilder der Tiere mit den Versuchsnummern 35 und 40 stehen beispielhaft für Versuchsgruppe 4, welche durch eine mit SDF-1 und Kollagen- I befüllten PLA-Cage definiert wird.

PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 35): 4 Wochen PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 35): 8 Wochen



PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 40): 4 Wochen PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 40): 8 Wochen

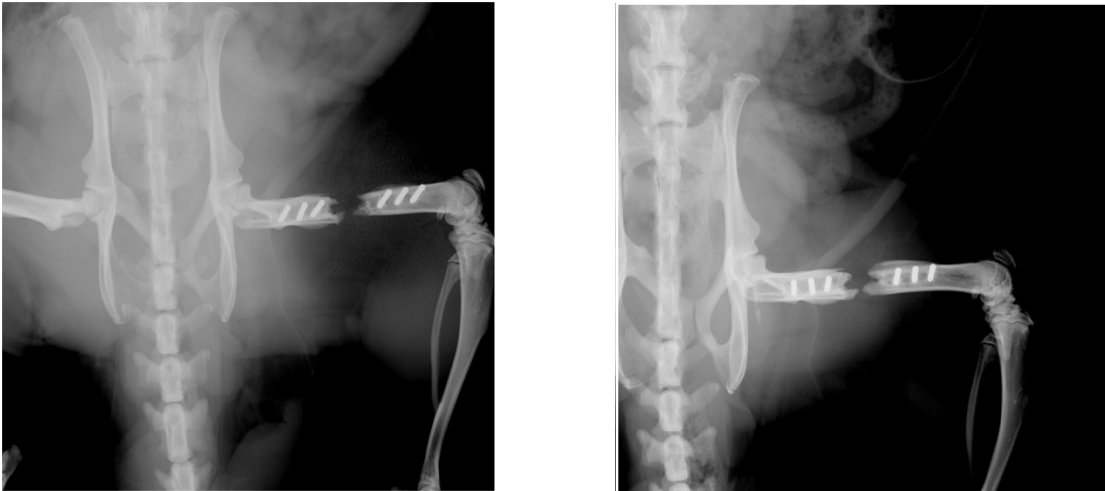
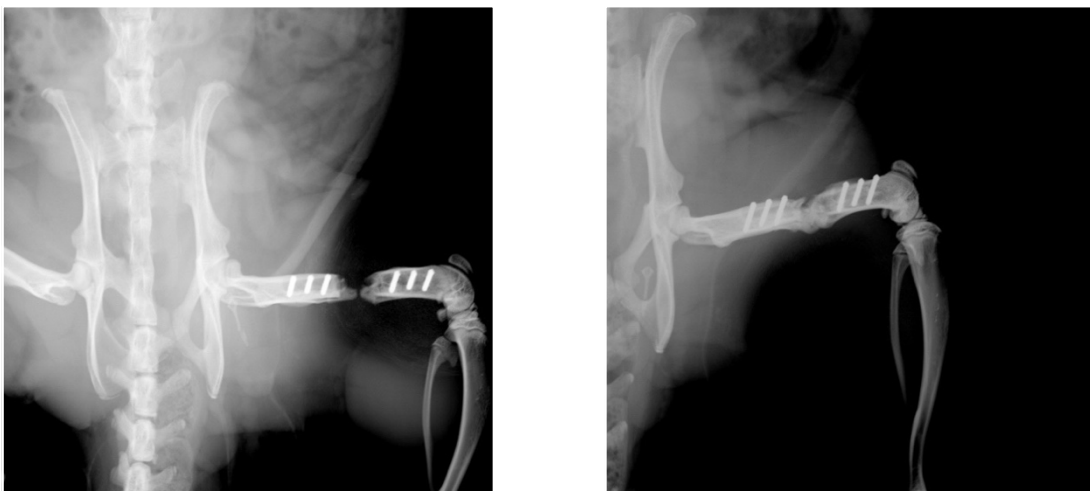


Abbildung 19: Kontroll-Röntgenbilder aus Versuchsgruppe "PLA + Kollagen + SDF-1" (Versuchsgruppe 4).

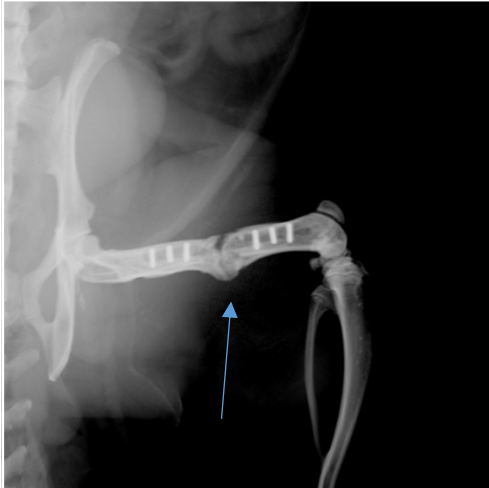
Das Knochenwachstum nach 8 Wochen in Versuchsgruppe 4 ist gerichtet und zeigt keine übermäßige Kallusbildung. Der sichtbare Defekt schrumpft in der Größe, wobei der Defekt weiterhin nicht vollständig überbrückt wird.

In dieser Versuchsgruppe wurden 2 Tiere über einen Zeitraum von 20 Wochen postoperativ beobachtet und der Heilungsprozess alle 4 Wochen radiologisch dokumentiert. Dies präsentiert nachfolgend das Tier mit Versuchsnummer 38.

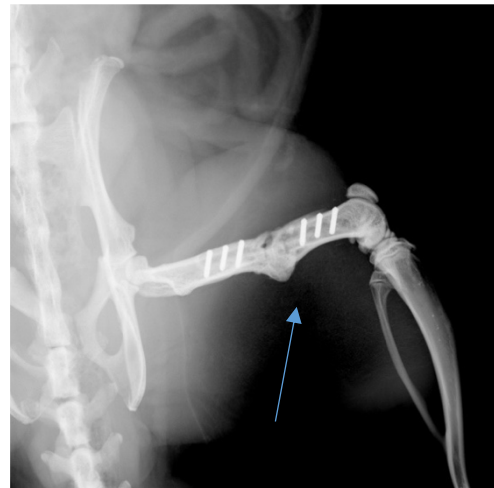
PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 38): 4 Wochen PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 38): 8 Wochen



PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 38): 12 Wo.



PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 38): 16 Wo.



PLA+Kollagen+SDF-1 (Nr. 38): 20 Wo.

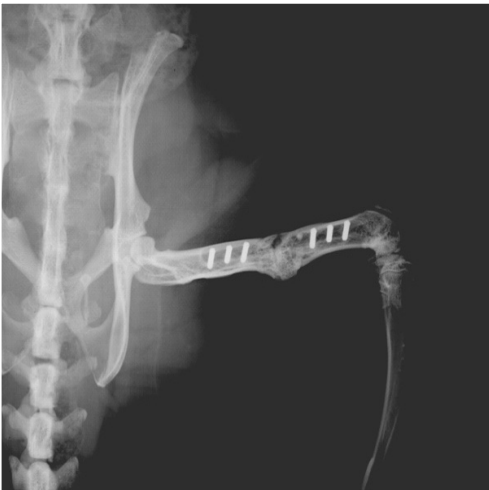
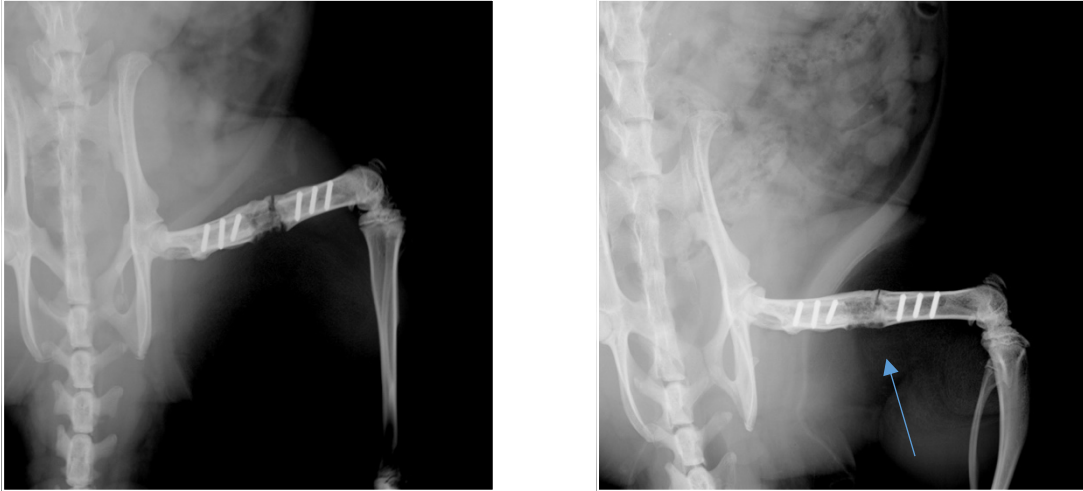


Abbildung 20: Kontroll-Röntgenbilder aus Versuchsgruppe "PLA + Kollagen + SDF-1" nach 20 Wochen postoperativ (Versuchsgruppe 4).

Die Röntgenbilder des Langzeit-Tieres dieser Gruppe zeigen eine vollständige Überbrückung des Defektes um die 16. Woche und eine Transparenzzunahme des neuen Knochens nach der 20. postoperativen Woche.

Die Kontroll-Röntgenbilder der Tiere mit den Versuchsnummern 46 und 49 stehen beispielhaft für Versuchsgruppe 5, welche durch einen mit BMP-7 und Kollagen I befüllten PLA-Cage definiert wird. In dieser Gruppe wurden ebenfalls 2 Tiere über 20 Wochen beobachtet und der Heilungsverlauf dokumentiert.

PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 46): 4 Wochen PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 46): 8 Wochen



PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 49): 4 Wochen PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 49): 8 Wochen



Abbildung 21:Abbildung 21: Kontroll-Röntgenbilder aus Versuchsgruppe "PLA + Kollagen + BMP-7" (Versuchsgruppe 5)

Pfeile auf knöchern überbrückte Osteotomie.

Radiologisch betrachtet schreitet die Frakturkonsolidierung in Versuchsgruppe 5 am schnellsten voran. Nach 4 Wochen sind die Defekte nahezu vollständig mit Kallus überbrückt, wobei die letzte Defektüberbrückung in dieser Versuchsgruppe mit Erreichen der 8. postoperativen Wochen abgeschlossen ist.

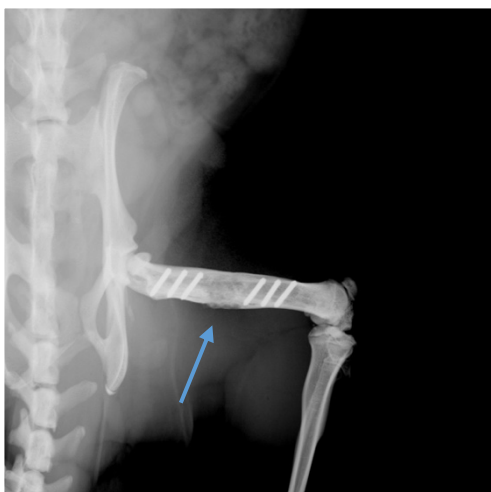
PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 44): 4 Wo.



PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 4): 8 Wo.



PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 44): 12 Wo.



PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 44) 16 Wo.



PLA+Kollagen+BMP-7 (Nr. 44): 20 Wo.



Abbildung 22: Kontroll-Röntgenbilder aus Versuchsgruppe "PLA + Kollagen + BMP-7" nach 20 postoperativen Wochen (Versuchsgruppe 5).

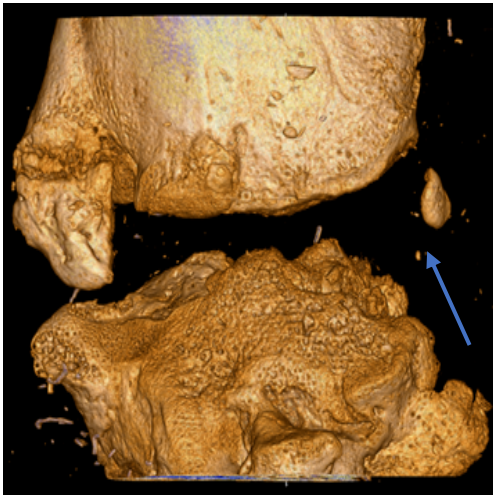
Im Gegensatz zu dem Langzeit-Tier aus Versuchsgruppe 4 finden sich bei dem Langzeit-Tier der Versuchsgruppe 5 radiologisch keine auffälligen Veränderungen der überbrückten Osteotomie nach der 12. postoperativen Woche.

Nach der radiologischen Einschätzung der Versuchsergebnisse stellte sich die Frage der Quantität der im Bereich der Osteotomien initiierten Frakturheilungen. Radiologisch ließ sich diese nicht ausreichend beantworten, sodass von jedem Femur eine  $\mu$ -CT Aufnahme angefertigt und hinsichtlich Quantität des neuen Knochens ausgewertet wurde.

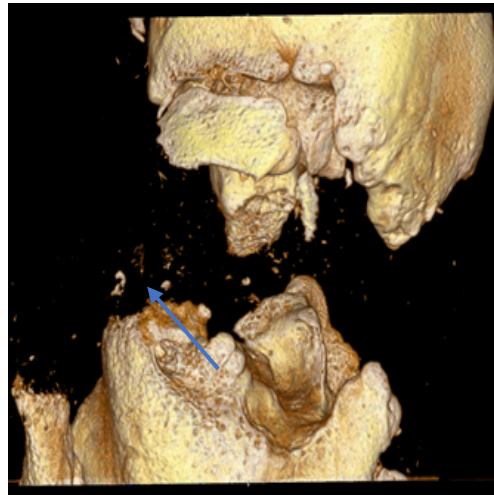
## CT-Darstellung

Nach der Euthanasie der Tiere und der anschließenden Entnahme der Präparate wurden durch Herrn Hermann Götz, aus dem Institut BiomaTiCS der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,  $\mu$ CT Aufnahmen angefertigt. Zur besseren Auswertung und Übersichtlichkeit der Datensätze wurde auf die Darstellung des gesamten Femurs verzichtet und nur die Defektzone betrachtet. Aufgrund dieser fokussierten radiologischen Bildgebung war eine detaillierte Visualisierung des nach 8 postoperativen Wochen stattgefundenen Heilungsverlaufes möglich. Nachfolgende CT-Bilder einzelner Versuchstiere stehen repräsentativ für ihre gesamte Versuchsgruppe.

Leere Osteotomie (Gr. 1): Nr. 16



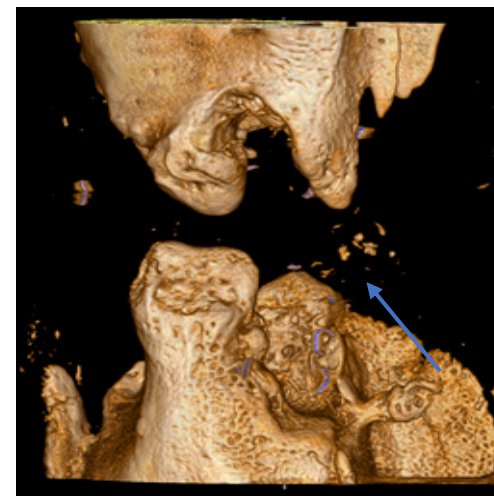
PLA-Cage (Gr.2): Nr. 19



PLA + Kollagen (Gr.3): Nr. 30



PLA + Kollagen + SDF-1 (Gr.4): Nr. 40



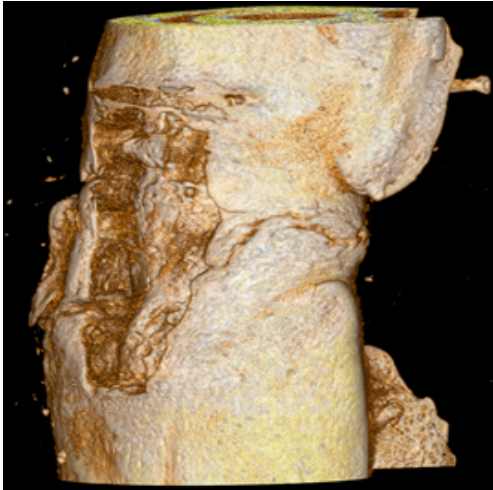


Abbildung 23: Darstellung  $\mu$ CT-Untersuchungen der Versuchsgruppen.

Darstellung der einzelnen Versuchsgruppe nach 8 postoperativen Wochen. Gruppe 1 = leere Osteotomie, Gruppe 2 = PLA-Cage, Gruppe 3 = PLA-Cage + Kollagen 1, Gruppe 4 = PLA-Cage + Kollagen 1 + SDF-1, Gruppe 5 = PLA-Cage + Kollagen 1 + BMP-7.

Die abgebildeten  $\mu$ CT-Bilder zeigen den beispielhaften Heilungsverlauf der einzelnen Versuchsgruppen 8 Wochen postoperativ. Bei den Tieren der ersten Versuchsgruppe zeigt sich radiologisch die Ausbildung einer Pseudarthrose. In der zweiten Versuchsgruppe, die durch einen leeren PLA-Cage in der Osteotomie definiert ist, zeigt sich grob orientierend bei der Betrachtung kein bedeutender Unterschied im Vergleich zu Versuchsgruppe 1. In der dritten Versuchsgruppe fällt eine Reduktion der Größe des weiterhin sichtbaren Frakturspaltes auf. In der repräsentativen Darstellung der vierten Versuchsgruppe findet sich ebenfalls ein weiterhin sichtbarer Frakturspalt, jedoch lässt sich CT-morphologisch ein zentraler, den PLA-Cage durchquerender Knochenzapfen mit Bestrebung zur Überbrückung des Defektes erkennen. Der durch die nativen Röntgenbilder geäußerte Verdacht der vollständigen Frakturkonsolidierung in Versuchsgruppe 5 kann durch die durchgeführte Computertomographie bestätigt werden. Den Versuchsgruppen 1 bis 4 ist gemein, dass sich im gesamten Bereich der Osteotomie versprengte Knocheninseln finden, welche mit voranschreitender Versuchsgruppe in ihrer Anzahl und zentraler Lokalisation zunehmen. Diese beschriebenen Knocheninseln sind in oben aufgeführten CT-Rekonstruktionen orientierend durch Pfeile markiert.

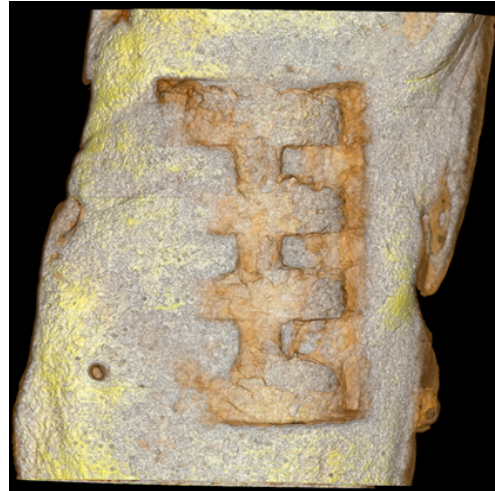
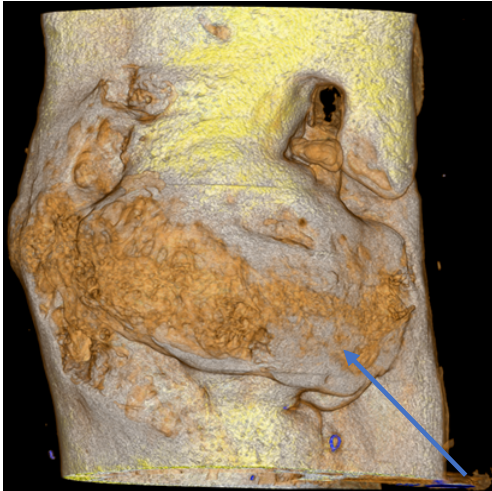


Abbildung 24: Darstellung der  $\mu$ CT-Untersuchungen der Versuchsgruppen „SDF-1“ und „BMP-7“ nach 20 postoperativen Wochen.

Bildmorphologisch zeigt sich in Versuchsgruppe 4 nach 20 postoperativen Wochen eine fast vollständige Konsolidierung der Osteotomie, wobei es zu einer verstärkten Knochenbildung im Zentrum der Osteotomie gekommen ist (mittels Pfeiles markiert). In Versuchsgruppe 5 zeigen die  $\mu$ CT-Aufnahmen nach 20 postoperativen Wochen keinen großen Unterschied zu den nach 8 Wochen angefertigten Aufnahmen. Im Gegensatz zu Versuchsgruppe 4 ist in der gezeigten Rekonstruktion aus Versuchsgruppe 5 die Grundarchitektur des „press fit“ eingesetzten PLA-Cages im Sinne einer strikt gelenkten Knochenheilung zu erkennen.

### **Quantitative Auswertung BV/TV**

#### **Auswertung eines Messzylinders mit 5mm Durchmesser:**

Die nachfolgende Auswertung erfolgte mittels SPSS und legte einen Messzylinder mit einem Innendurchmesser von 5mm und einem erfassten Gewebevolumen von 116,612 mm<sup>3</sup> zugrunde.

Die Auswertung basiert auf dem Quotienten BV/TV (Bonevolume/Tissuevolume). Das Minimum liegt bei 0,067 und das Maximum bei 0,435. Der Mittelwert beträgt 0,220 und die Standardabweichung 0,0965.

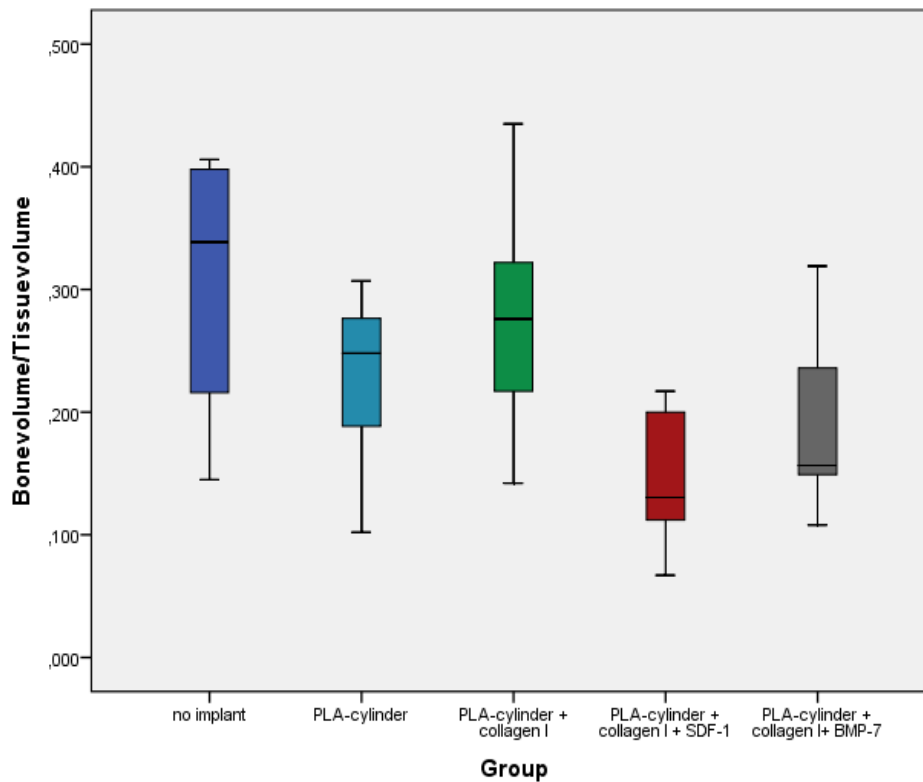


Abbildung 25: Darstellung der BV/TV des 5mm Durchmessers mittels Boxplot.

Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet. Die  $H_0$ , die eine Normalverteilung der Werte BV/TV annimmt, konnte durch den Shapiro-Wilk Test mit einem  $p=0,183$  nicht verworfen werden. Somit wird eine Normalverteilung der Werte angenommen. Die Testung auf Homogenität der Varianz ergibt  $p=0,540$ . Aufgrund dessen kann Varianzhomogenität angenommen werden und die Durchführung einer einfaktoriellen ANOVA ist möglich. Die Signifikanztestung ergab in der allgemeinen Testung aller Gruppen eine Signifikanz bei einem  $p$  von  $0,016$ . Das zugrunde liegende Signifikanzniveau ist  $5\%$  oder  $p=0,05$ . Die sich anschließende Post-hoc-Testung zur genaueren Aufgliederung des zuvor gesehenen signifikanten Unterschiedes wurde mit dem Tukey-Test durchgeführt.

Gruppen		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
no implant	PLA-cylinder	,080286	,052082	,546	-,07183	,23240
	PLA-cylinder + collagen I	,031143	,052082	,974	-,12097	,18326
	<b>PLA-cylinder + collagen I + SDF-1</b>	<b>,160875*</b>	<b>,050885</b>	<b>,029</b>	<b>,01226</b>	<b>,30949</b>
	PLA-cylinder + collagen I+ BMP-7	,119500	,053637	,200	-,03716	,27616
PLA-cylinder	no implant	-,080286	,052082	,546	-,23240	,07183
	PLA-cylinder + collagen I	-,049143	,044416	,802	-,17887	,08058
	PLA-cylinder + collagen I + SDF-1	,080589	,043005	,355	-,04502	,20619
	PLA-cylinder + collagen I+ BMP-7	,039214	,046229	,913	-,09581	,17424
<b>PLA-cylinder + collagen I</b>	no implant	-,031143	,052082	,974	-,18326	,12097
	PLA-cylinder	,049143	,044416	,802	-,08058	,17887
	<b>PLA-cylinder + collagen I + SDF-1</b>	<b>,129732*</b>	<b>,043005</b>	<b>,040</b>	<b>,00413</b>	<b>,25534</b>
	PLA-cylinder + collagen I+ BMP-7	,088357	,046229	,336	-,04666	,22338
<b>PLA-cylinder + collagen I + SDF-1</b>	<b>no implant</b>	<b>-,160875*</b>	<b>,050885</b>	<b>,029</b>	<b>-,30949</b>	<b>-,01226</b>
	PLA-cylinder	-,080589	,043005	,355	-,20619	,04502
	<b>PLA-cylinder + collagen I</b>	<b>-,129732*</b>	<b>,043005</b>	<b>,040</b>	<b>-,25534</b>	<b>-,00413</b>

	PLA-cylinder + collagen I+ BMP-7	-,041375	,044876	,886	-,17244	,08969
PLA-cylinder + collagen I+ BMP-7	no implant	-,119500	,053637	,200	-,27616	,03716
	PLA-cylinder	-,039214	,046229	,913	-,17424	,09581
	PLA-cylinder + collagen I	-,088357	,046229	,336	-,22338	,04666
	PLA-cylinder + collagen I + SDF-1	,041375	,044876	,886	-,08969	,17244

Tabelle 10: Statistische Auswertung auf Grundlage des 5mm Zylinders.  
Die einzelnen Versuchsgruppen wurden jeweils miteinander in Relation gesetzt.

Ein signifikanter Unterschied, beschrieben durch  $p=0,029$ , in der Quantität des neugebildeten mineralisierten Knochens findet sich zwischen Versuchsgruppe 1 (leere Osteotomie) und Versuchsgruppe 4 (PLA + Kollagen + SDF-1). Zwischen den Versuchsgruppen 3 (PLA + Kollagen) und 4 (PLA + Kollagen + SDF-1) findet sich ebenso ein signifikanter Unterschied beschrieben durch  $p=0,040$ .

#### Auswertung eines Messzylinders mit 3mm Durchmesser:

Die nachfolgende Auswertung erfolgte mittels SPSS und legte einen Messzylinder mit einem Innendurchmesser von 3mm und einem erfassten Gewebevolumen von 42,083 mm<sup>3</sup> zugrunde.

Die Auswertung basiert auf dem Quotienten BV/TV (Bonevolume/Tissuevolume). Das Minimum der erfassten Daten liegt bei 0,051 und das Maximum bei 0,410. Der Mittelwert beträgt 0,227 und die Standardabweichung 0,0835.

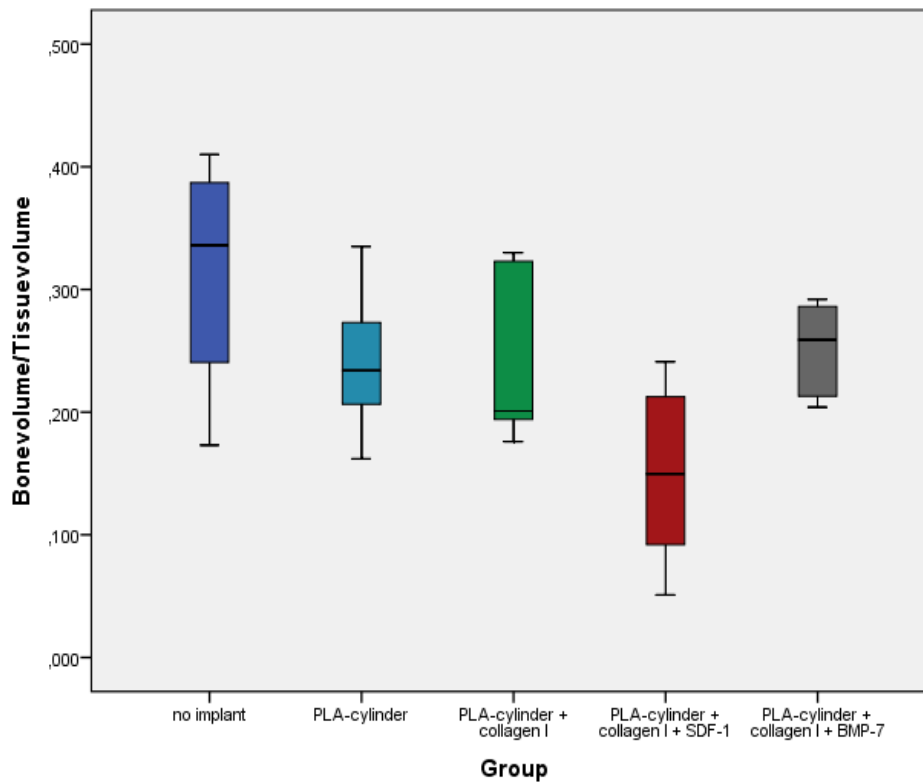


Abbildung 26: Darstellung der BV/TV des 3mm Durchmessers mittels Boxplot.

Die Testung auf Standardabweichung mithilfe des Shapiro-Wilk Testes ergibt  $p=0,861$ . Somit kann die  $H_0$  auf Normalverteilung nicht verworfen werden. Die anschließende Testung auf Varianzhomogenität mit dem Levene-Test ergibt  $p=0,467$ , sodass Varianzhomogenität angenommen und eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt werden kann. In der einfaktoriellen ANOVA findet sich mit  $p=0,009$  bereits ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des neugebildeten mineralisierten Knochens zwischen allen Gruppen. Die weitere Post-hoc-Testung wird mit dem Tukey-Test durchgeführt.

Gruppen		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
no implant	PLA-cylinder	,072321	,043385	,471	-,05510	,19974
	PLA-cylinder + collagen I	,076250	,044680	,448	-,05497	,20747
	<b>PLA-cylinder + collagen I + SDF-1</b>	<b>,163750*</b>	<b>,042388</b>	<b>,006</b>	<b>,03926</b>	<b>,28824</b>
	PLA-cylinder + collagen I + BMP-7	,062950	,046433	,660	-,07342	,19932
PLA-cylinder	no implant	-,072321	,043385	,471	-,19974	,05510
	PLA-cylinder + collagen I	,003929	,038510	1,000	-,10917	,11703
	PLA-cylinder + collagen I + SDF-1	,091429	,035824	,111	-,01378	,19664
	PLA-cylinder + collagen I + BMP-7	-,009371	,040530	,999	-,12840	,10966
PLA-cylinder + collagen I	no implant	-,076250	,044680	,448	-,20747	,05497
	PLA-cylinder	-,003929	,038510	1,000	-,11703	,10917
	PLA-cylinder + collagen I + SDF-1	,087500	,037382	,166	-,02229	,19729
	PLA-cylinder + collagen I + BMP-7	-,013300	,041914	,998	-,13640	,10980
	<b>no implant</b>	<b>-,163750*</b>	<b>,042388</b>	<b>,006</b>	<b>-,28824</b>	<b>-,03926</b>

PLA-cylinder + collagen I + SDF-1	PLA-cylinder	-,091429	,035824	,111	-,19664	,01378
	PLA-cylinder + collagen I	-,087500	,037382	,166	-,19729	,02229
	PLA-cylinder + collagen I + BMP-7	-,100800	,039461	,110	-,21669	,01509
PLA-cylinder + collagen I + BMP-7	no implant	-,062950	,046433	,660	-,19932	,07342
	PLA-cylinder	,009371	,040530	,999	-,10966	,12840
	PLA-cylinder + collagen I	,013300	,041914	,998	-,10980	,13640
	PLA-cylinder + collagen I + SDF-1	,100800	,039461	,110	-,01509	,21669

Tabelle 11: Statistische Auswertung auf Grundlage des 3mm Zylinders.  
Die einzelnen Versuchsgruppen wurden jeweils miteinander in Relation gesetzt.

In der Post-hoc-Testung findet sich ein signifikanter Unterschied der Ratio BV/TV zwischen den Gruppen 1 (leere Osteotomie) und 4 (PLA + Kollagen + SDF-1) beschrieben durch  $p = 0,006$ .

## **Histologie**

An die Auswertung der radiologischen Bilder schloss sich die histologische Aufarbeitung der Präparate an. Diese diente neben der Darstellung der Osteotomie auch der Klärung der einzelnen Komponenten, die die Defektzonen der einzelnen Versuchsgruppen dominieren und der Visualisierung eventuell vorhandener Unterschiede.

## HE-Färbung

### Übersichtsaufnahmen der HE-Färbung

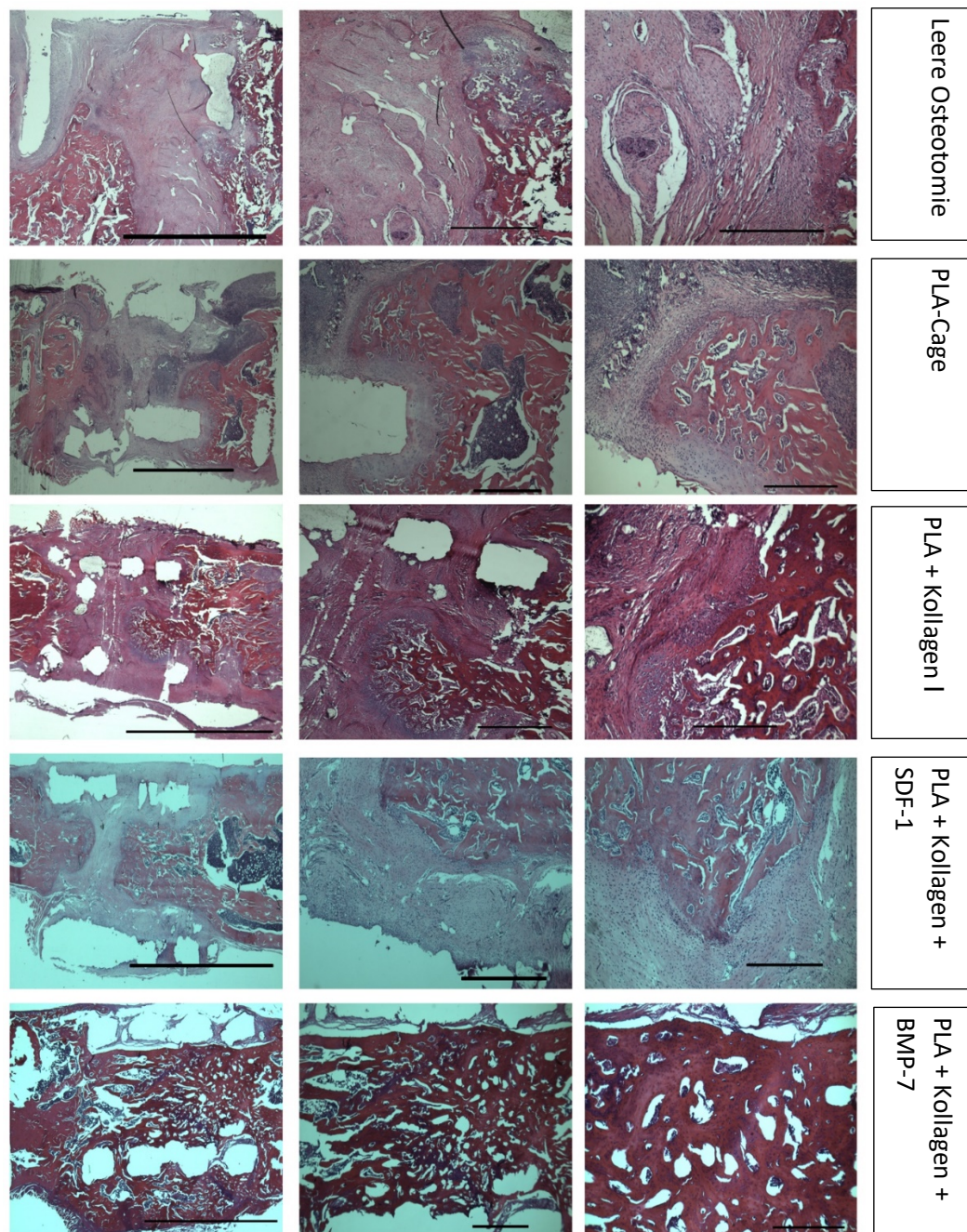


Abbildung 27: Übersicht HE-Färbungen aller Versuchsgruppen.

Die Übersichtsaufnahmen der HE gefärbten Präparate dienen einer ersten Orientierung und Einschätzung hinsichtlich sichtbaren Knochens und der stattgefundenen Defektheilung nach 8 postoperativen Wochen. Der intraoperativ eingesetzte

PLA-Cage ist in diesem Verfahren nicht darzustellen, jedoch ist die vermutliche Position über „Lücken“ im Präparat nachvollziehbar. Die einzelnen Präparate wurden sowohl bei 5-facher als auch bei 10-facher Vergrößerung betrachtet. Bei 5-facher Vergrößerung der Übersichtsaufnahmen fallen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen auf.

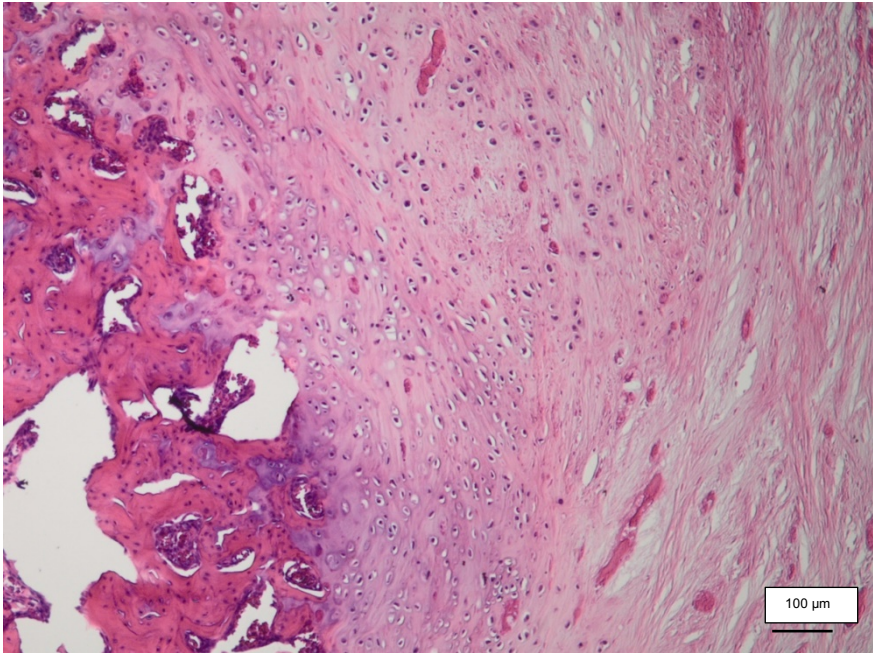


Abbildung 28: HE-Färbung eines Präparates aus der Versuchsgruppe „leere Osteotomie“ (Präparat 3637).

5-fache Vergrößerung. Hypertrophe Pseudarthrose mit dominanten fibrösen Anteilen.

In den Präparaten der Versuchsgruppe 1 dominieren fibröse Gewebeanteile, welche den Defekt bei fortbestehen als Pseudarthrose definieren. Es finden sich wenig hypertrophe Chondrozyten oder Gefäßneubildungen.

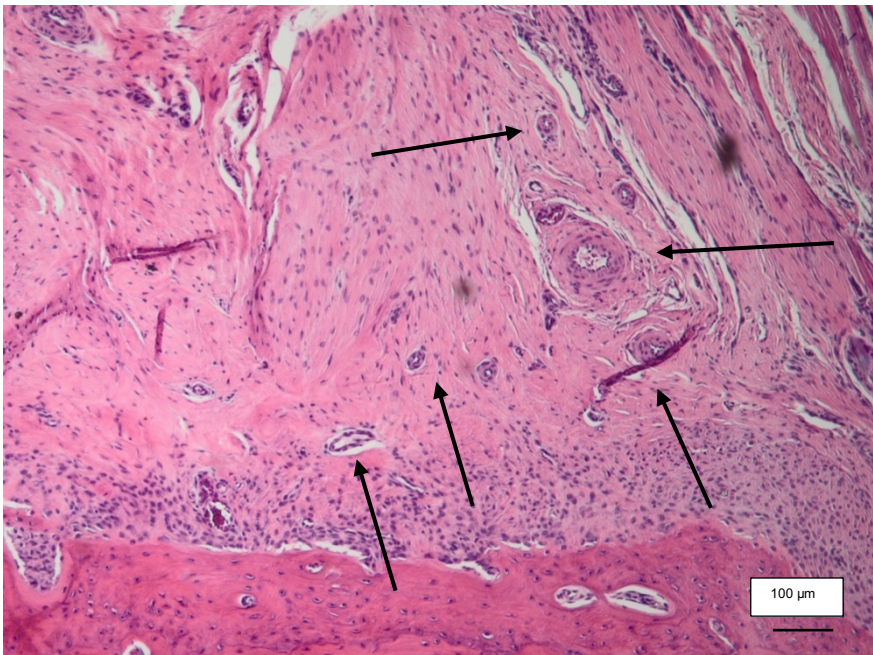


Abbildung 29: HE-Färbung eines Präparates mit SDF-1 als Wachstumsfaktor (Präparat 3725). 5-fache Vergrößerung. Die Pfeile kennzeichnen deutlich sichtbare Gefäße im Bereich der Osteotomie.

Die Präparate der Versuchsgruppe 4 zeigen im Bereich der Osteotomie wenige hypertrophe Chondrozyten und vereinzelt neues Knochengewebe in der Peripherie des Sichtfeldes. Auffällig sind die in bereits geringer Vergrößerung sichtbaren neuen Gefäße. Diese sind beispielhaft mit Pfeilen markiert.

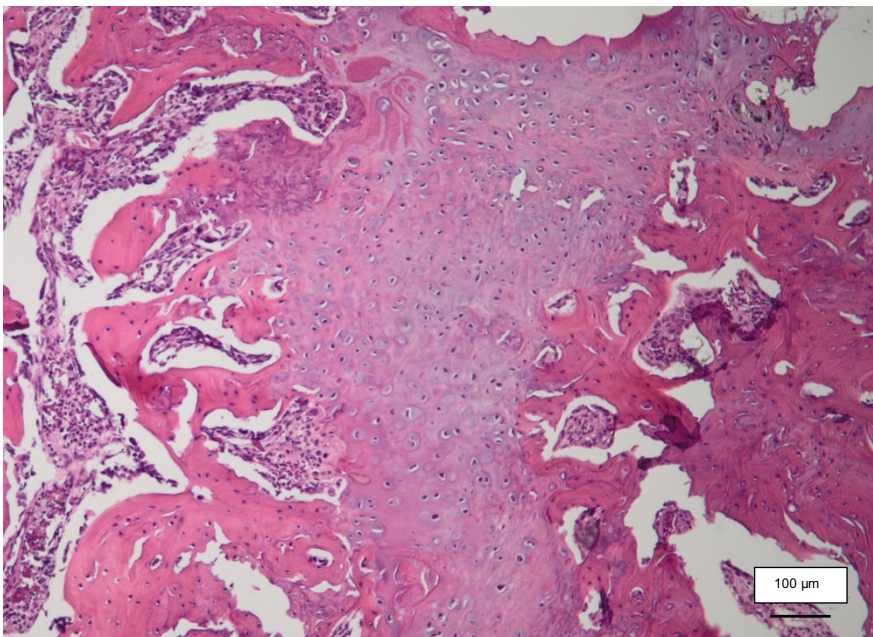


Abbildung 30: HE-Färbung eines Präparates mit BMP-7 als Wachstumsfaktor (Präparat 3740). 5-fache Vergrößerung.

In den Präparaten der Versuchsgruppe 5 sind die Defektgrenzen schwer zu erkennen, da die Defekte fast vollständig knöchern überbrückt sind. Die Defektgrenzen sind durch einzelne hypertrophe Chondrozyten charakterisiert. In diesen Präparaten zeigen sich bei geringer Vergrößerung keine Gefäßneubildungen.

### **Mason-Goldner-Trichrom Färbung**

Im Anschluss an die HE-Färbung wurde eine Mason-Goldner-Trichrom Färbung durchgeführt, um die in der Defektzone vorkommenden Komponenten genauer bestimmen zu können.

Im Rahmen dieser Färbung werden die einzelnen Präparat-Bestandteile wie folgt angefärbt:

Zellkerne	Dunkelbraun/schwarz
Erythrozyten	Leuchtend orange/rötlich
Zytoplasma/ Muskulatur	Rot-braun
Osteoid / Bindegewebe	Rot-orange/ orange-braun
Mineralisierter Knochen	Grün
Verkalkte Knochenmatrix	Hellgrün
Kollagene Fasern	Grün

Die nachfolgend abgebildeten Aufnahmen fokussieren sich auf den operativ gesetzten und in der Heilung verfolgten Defekt in 5-facher Vergrößerung.

Leere Osteotomie (Versuchsgruppe 1/ Präparat 3648):



Abbildung 31: histologische Darstellung einer leeren Osteotomie – gefärbt mit der Mason-Goldner-Trichrom- Färbung.

In Versuchsgruppe 1 zeigt das Präparat vor allem kollagene Fasern, welche im Verlauf zur Klassifikation als Pseudarthrose herangezogen werden. Im hellgrün dargestellten Bindegewebe zeigen sich einzelne versprengte und orange angefärbte Osteoidablagerungen.

PLA-Scaffold (Versuchsgruppe 2/ Präparat 3391):



Abbildung 32: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetztem PLA-Scaffold – gefärbt mit der Mason-Goldner-Trichrom Färbung.

Der Defektbereich des Präparates der zweiten Versuchsgruppe wird bei grob orientierender Betrachtung ebenfalls von kollagenen Fasern dominiert. Das neu abgelagerte Osteoid erscheint zahlreicher als im ersten Präparat und mit Bezug zu den in der Peripherie gelegenen Frakturgrenzen.

PLA-Scaffold + Kollagen I (Versuchsgruppe 3/ Präparat 3680):

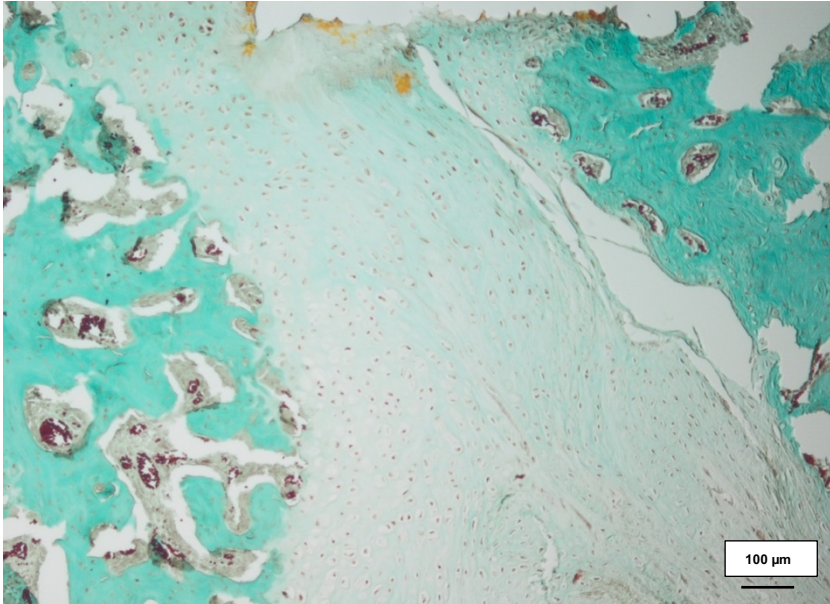


Abbildung 33: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen Kombination – gefärbt mit der Mason-Goldner-Trichrom Färbung.

In Versuchsgruppe 3 verkleinert sich der in der 5-fachen Vergrößerung sichtbare Defektspace. Diese Verkleinerung des Defektes geht mit einer Zunahme der peripher gelegenen mineralisierten Knochenmatrix bei weiterhin deutlichem Vorhandensein kollagenen Fasern einher.

PLA-Scaffold + Kollagen I + SDF-1 (Versuchsgruppe 4/ Präparat 3725):

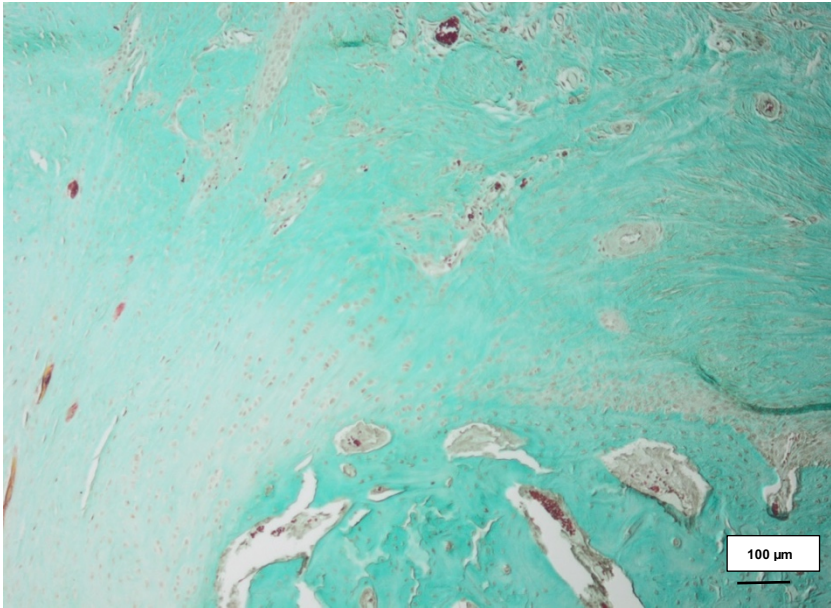


Abbildung 34: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-SDF-1 Kombination – gefärbt mit der Mason-Goldner-Trichrom Färbung. Präparat nach 8 Wochen postoperativer Heilungszeit.

Im oben gezeigten Präparat aus Versuchsgruppe 4, das einen 8-wöchigen postoperativen Heilungsverlauf widerspiegelt, steht besonders die Knochenmatrix, verkalkte neben mineralisierter Matrix, im Vordergrund. Kollagene Fasern finden sich im persistierenden Defekt deutlich seltener als in den vorherigen Versuchsgruppen. Vereinzelt sind neue Osteoidablagerungen zu sehen, diese fallen jedoch ebenfalls geringer aus als in den vorherigen Versuchsgruppen. Bei Betrachtung in 5-facher Vergrößerung liefert dieses Präparat Hinweise auf eine erfolgreiche Angiogenese im Bereich der Osteotomie.

PLA-Scaffold + Kollagen I + SDF-1 (Versuchsgruppe 4/ Präparat 3822):

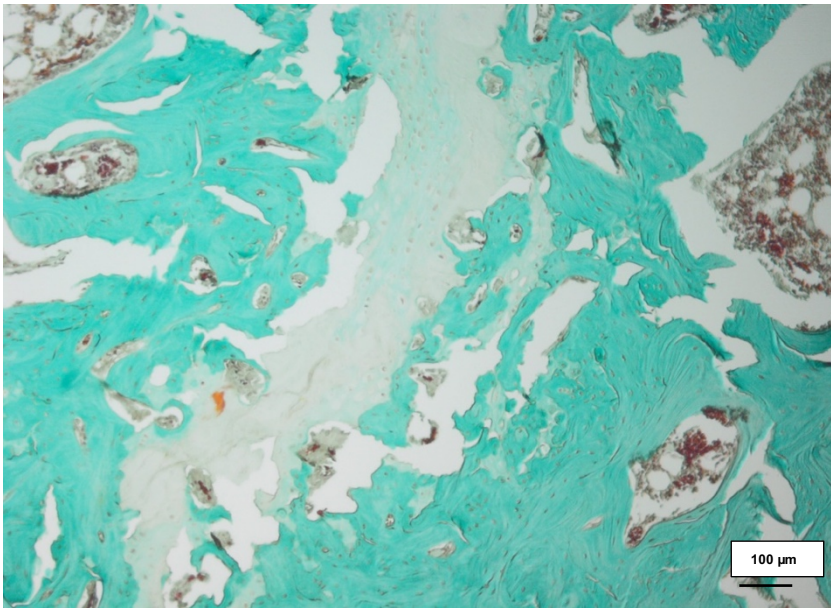


Abbildung 35: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-SDF-1 Kombination – gefärbt mit der Mason-Goldner-Trichrom Färbung. Präparat nach 20 Wochen postoperativer Heilungszeit.

Das Präparat, das einen postoperativen Heilungsverlauf von 20 Wochen dokumentiert, zeigt einen marginalen restlichen Defekt. Dieser besteht aus verkalkter Knochenmatrix, welche von mineralisiertem Knochen mit einzelnen eingelagerten Osteoidformationen umgeben ist.

PLA-Scaffold + Kollagen I + BMP-7 (Versuchsgruppe 5/ Präparat 3740):

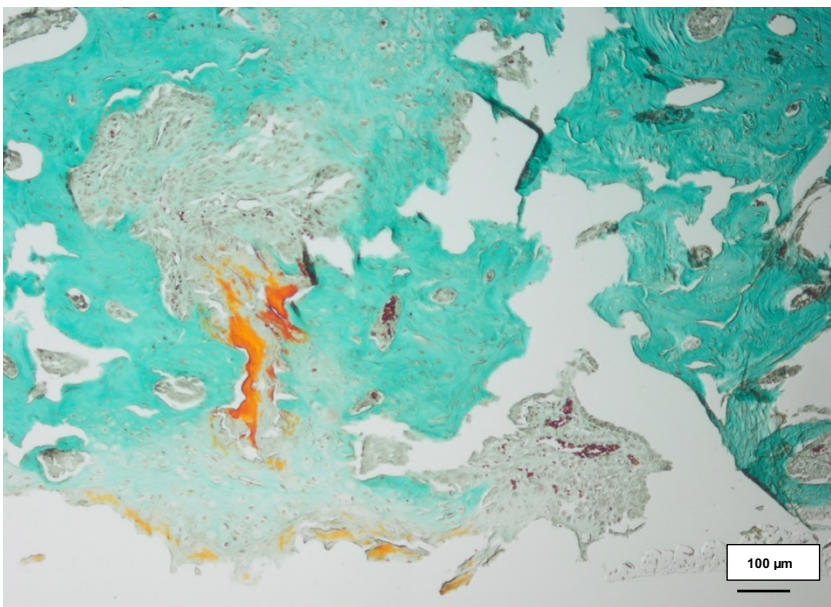


Abbildung 36: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-BMP-7 Kombination – gefärbt mit der Mason-Goldner-Trichrom Färbung.

Präparat nach 8 Wochen postoperativer Heilungszeit.

Die Präparate aus Versuchsgruppe 5 zeigen sowohl einen Heilungsverlauf nach 8 als auch nach 20 postoperativen Wochen. Nach 8 Wochen findet sich eine Kombination mineralisierten und verkalkten Knochens mit lokal stark ausgeprägter Osteoidablagerung im Bereich der inferioren Defektzone.

PLA-Scaffold + Kollagen I + BMP-7 (Versuchsgruppe 5/ Präparat 3841): 20 Wochen

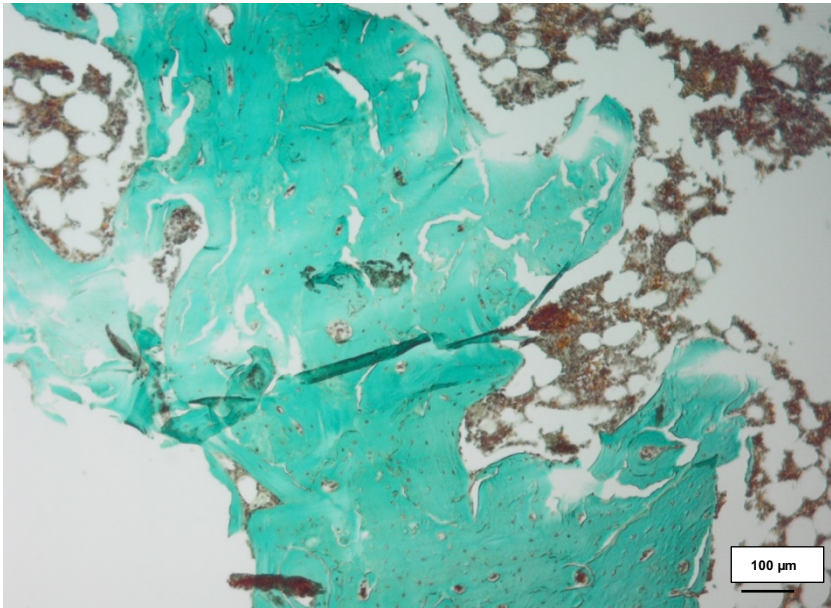


Abbildung 37: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-BMP-7 Kombination – gefärbt mit der Mason-Goldner-Trichrom Färbung. Präparat nach 20Wochen postoperativer Heilungszeit.

Im Präparat mit 20-wöchiger postoperativen Beobachtungszeit zeigt sich visuell eine Dominanz des mineralisierten Knochens im Bereich des vormaligen Defektes mit einzelnen Anzeichen für das Vorhandensein eines verkalkten Gewebes. In dieser Vergrößerung findet sich kein Anhalt für eine Persistenz des Defektes, sondern vielmehr eine neuausgebildete Knochenmarkshöhle als Korrelat einer abgeschlossenen Defektkonsolidierung.

### Elastika-van-Gieson

Die Elastika-van-Gieson Färbung wurde durchgeführt, um das in der HE-Färbung gefundene Gefäßvorkommen detailliert zu betrachten und eine eventuelle Häufung neuer Gefäße in den einzelnen Gruppen zu eruieren.

Die einzelnen Präparate-Bestandteile stellen sich im gefärbten Zustand wie folgt dar:

Zellkerne	Schwarzblau/ schwarzbraun
Elastische Fasern	Schwarzviolett
Kollagene Fasern	Rot
Muskulatur, Zytoplasma	Gelb

### Leere Osteotomie (Versuchsgruppe 1/ Präparat 3648):

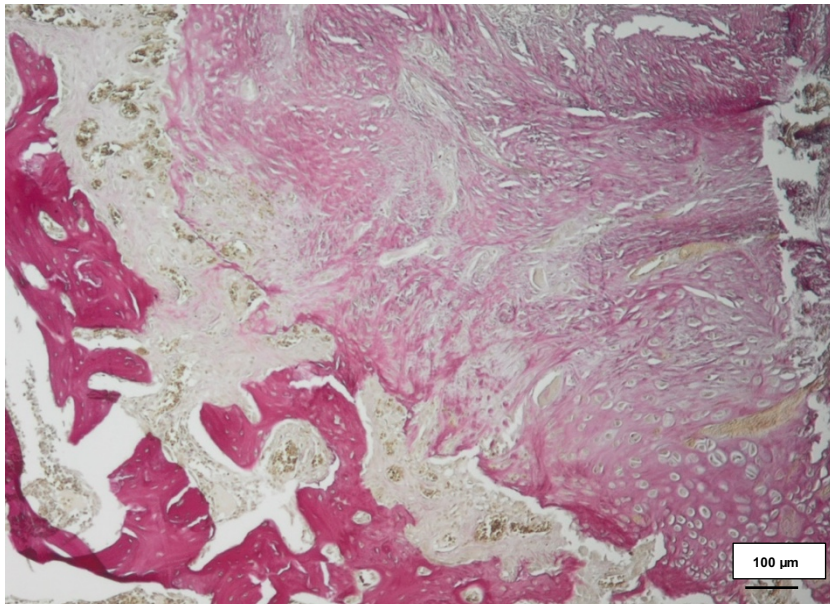


Abbildung 38: histologische Darstellung einer leeren Osteotomie – gefärbt mit der Elastika-van-Gieson Färbung.

In dem oben gezeigten und angefärbten Präparat der ersten Versuchsgruppe dominieren kollagene Fasern den Defektbereich. In der Peripherie des Defektes mit Bezug zu den Defektgrenzen finden sich kleinkalibrige Gefäße, welche einsprossenden Charakters sind.

PLA-Scaffold (Versuchsgruppe 2/ Präparat 3391):

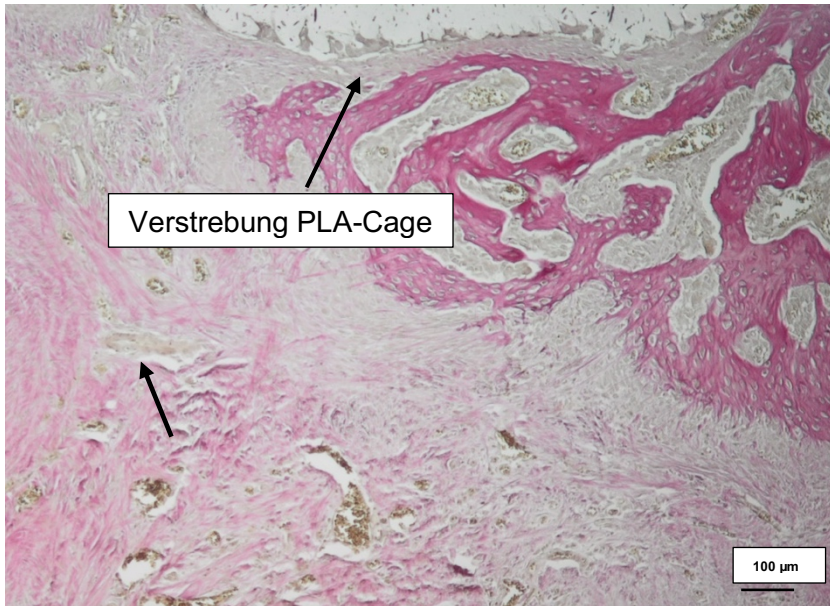


Abbildung 39: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetztem PLA-Scaffold – gefärbt mit der Elastica-van-Gieson Färbung.

Grauer Pfeil – Gefäßneubildung / Schwarzer Pfeil – Reste PLA-Scaffold.

In Versuchsgruppe 2 zeigt sich ebenfalls eine Dominanz kollagener Fasern, jedoch finden sich vermehrt Gefäßneubildungen in der Defektzone. Viele der bereits bei geringer Vergrößerung sichtbaren Gefäße bilden sich im Randbereich des PLA-Cages bzw. im Bereich der in den Cage integrierten Pore (markiert durch einen Pfeil).

PLA-Scaffold + Kollagen I (Versuchsgruppe 3/ Präparat 3680):

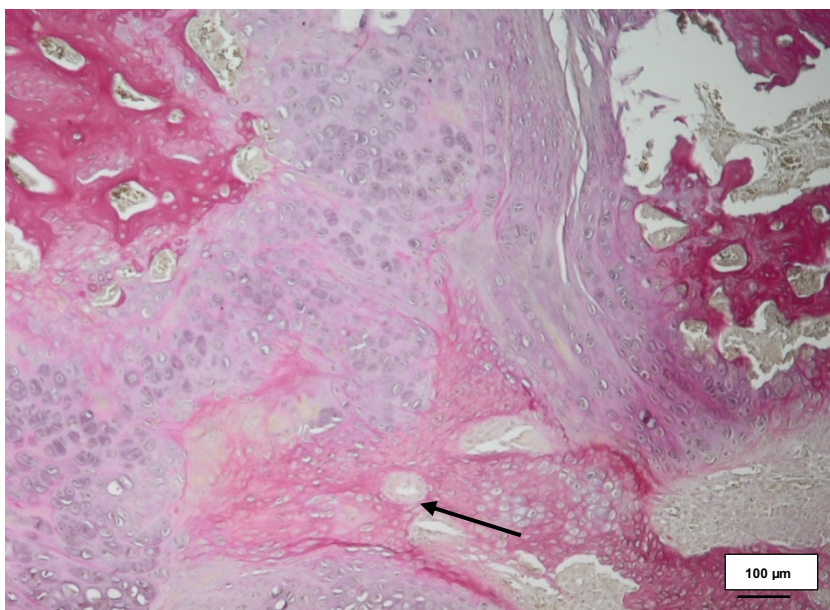


Abbildung 40: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen Kombination – gefärbt mit der Elastica-van-Gieson Färbung.

Schwarzer Pfeil – Gefäßneubildung.

In Versuchsgruppe 3 wird ein größerer Teil des noch vorhandenen Defektbereiches von Chondrozyten besetzt. Die neugebildeten Gefäße, durch einen Pfeil markiert, präsentieren sich großkalibriger und wandstärker als in den beiden vorherigen Versuchsgruppen.

PLA-Scaffold + Kollagen I + SDF-1 (Versuchsgruppe 4/ Präparat 3725):

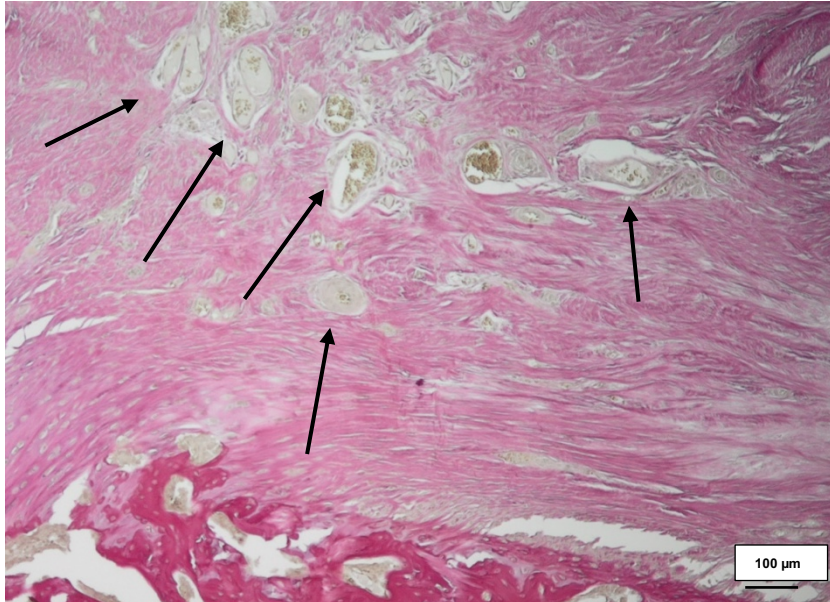


Abbildung 41: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-SDF-1 Kombination – gefärbt mit der Elastica-van-Gieson Färbung. Präparat nach 8 Wochen postoperativer Heilungszeit. Schwarze Pfeile – Gefäßneubildungen.

Das Präparat, das den Konsolidierungsprogress der vierten Versuchsgruppe nach 8 postoperativen Wochen zeigt, wird von zahlreichen Gefäßneubildungen im Bereich des Defektes dominiert (markiert durch multiple Pfeile). Die Gefäße sind variabel bezüglich des Lumens und der Wandstärke. Die neugebildeten Gefäße finden sich verstärkt an den knöchernen Grenzen des Defektes und im Bereich des PLA-Cages, hier am ehesten mit Assoziation zu den den PLA-Cage durchziehenden Poren.

PLA-Scaffold + Kollagen I + SDF-1 (Versuchsgruppe 4/ Präparat 3822):

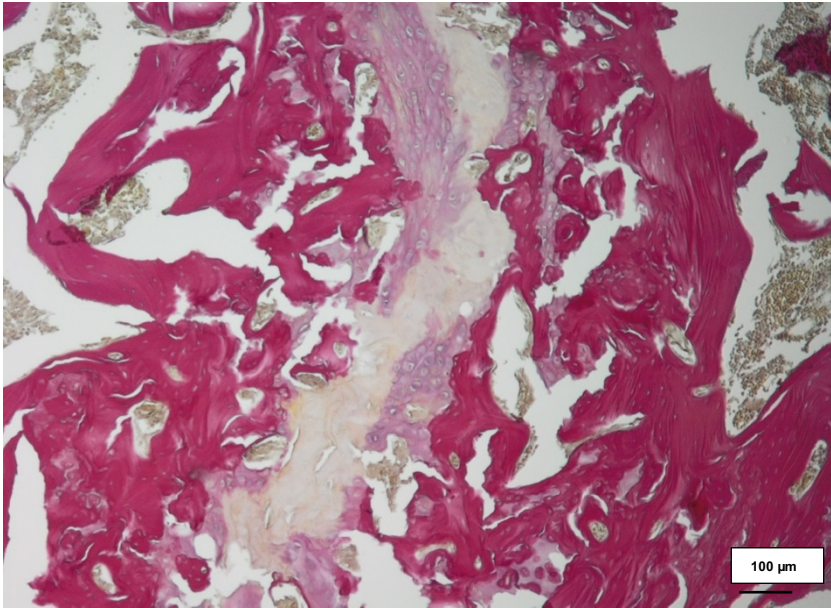


Abbildung 42: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-SDF-1 Kombination – gefärbt mit der Elastika-van-Gieson Färbung. Präparat nach 20 Wochen postoperativer Heilungszeit.

Das Präparat, das den 20-wöchigen Heilungsverlauf aus Versuchsgruppe 4 dokumentiert, besitzt einen eng umschriebenen persistierenden Defektbereich. In diesem finden sich vereinzelt Gruppen von Chondrozyten, aber keine bei geringer Vergrößerung sichtbaren Gefäßeinsprossungen in die Defektzone. Bei einer Etablierung der Knochenmarkshöhle mit Ausdehnung an die Defektgrenzen ist ein mit diesem kommunizierendes und im Heilungsverlauf neu entstandenes Gefäßsystem bei 5-facher Vergrößerung nicht zu beurteilen.

PLA-Scaffold + Kollagen I + BMP-7 (Versuchsgruppe 5/ Präparat 3740):

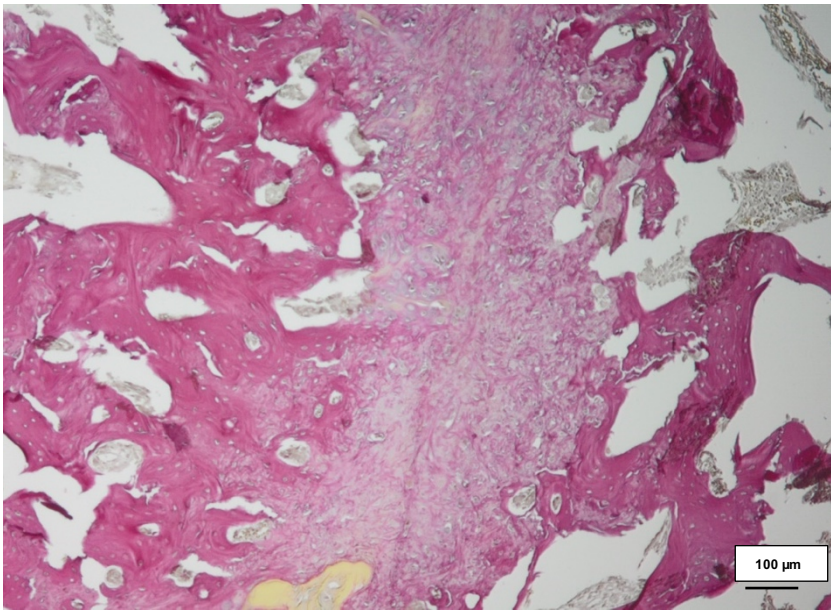


Abbildung 43: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-BMP-7 Kombination – gefärbt mit der Elastika-van-Gieson Färbung. Präparat nach 8 Wochen postoperativer Heilungszeit.

In Versuchsgruppe 5 zeigt sich im Vergleich zu den vorangegangenen vier Versuchsgruppen eine deutliche Verkleinerung der Defektzone. Nach 8-wöchiger postoperativer Beobachtungszeit definieren vereinzelte hypertrophe Chondrozyten und kollagene Fasern den persistierenden Defekt.

PLA-Scaffold + Kollagen I + BMP-7 (Versuchsgruppe 5/ Präparat 3841):

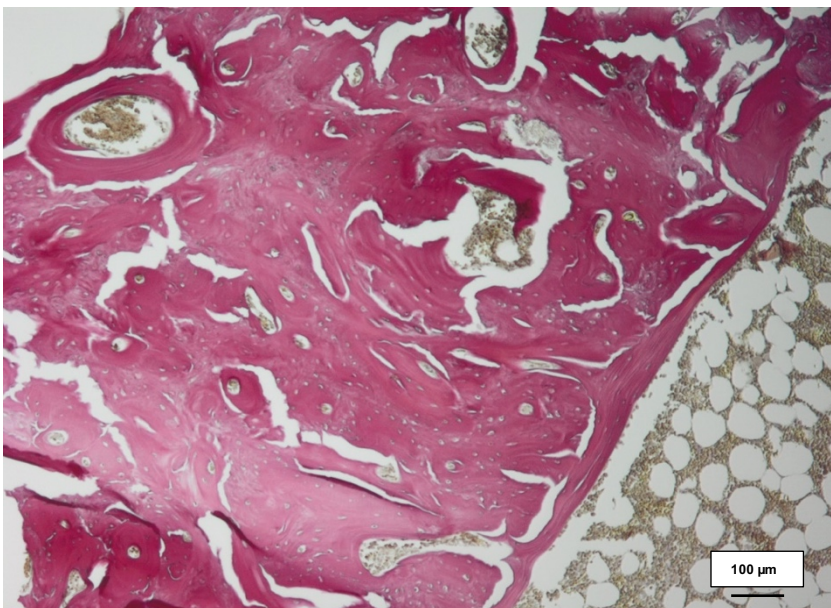


Abbildung 44: histologische Darstellung eines Präparates nach eingesetzter PLA-Scaffold-Kollagen-SDF-1 Kombination – gefärbt mit der Elastika-van-Gieson Färbung.

Präparat nach 20 Wochen postoperativer Heilungszeit.

Nach 20-wöchiger postoperativer Standzeit lässt sich im Präparat eine vollständige knöcherne Überbrückung des Defektes beobachten. Eine das gesamte Präparat durchspannende Knochenmarkshöhle lässt eine Beurteilung einzelner neugebildeter Gefäße im Bereich der vormaligen Osteotomie nicht zu.

## **Diskussion**

### **Ratten als Tierversuchsmodelle**

Im Rahmen des von uns durchgeführten Versuchsaufbaus verwendeten wir männliche Wistar-Ratten, die zum Zeitpunkt der Osteotomie mindestens 8 Wochen alt waren.

Der Einsatz von Nagern in der präklinischen Erprobung unterschiedlicher Bone Tissue Engineering Materialien wird aufgrund der vom Menschen stark abweichenden Knochenphysiologie und Defektheilungskapazität stark diskutiert. Gleichzeitig stellen Nager einen Großteil der Tiere, die in verschiedenen Studien dieses Feldes Verwendung finden (50, 191-193). Dem oben beschriebenen Nachteil der abweichenden Knochenphysiologie stehen die Vorteile eines Kleinterversuchsmodells, welche neben der sehr guten Praktikabilität, in den größeren Gruppen- und Tierzahlen, in der überschaubaren und verkürzten Zeit bis zum Erreichen des Endpunktes der Versuchsreihe und den zumeist geringeren ethischen Problemen innerhalb der Gesellschaft zu sehen sind, gegenüber (194-196). Unsere Wahl männlicher Wistar-Ratten zur Verwendung im Versuchsvorhaben basierte unter anderem auf den Erkenntnissen der Variabilität des Knochenwachstums und der Knochenregeneration weiblicher Tiere, welche sich aus dem nicht vollends zu standardisierenden Hormonzyklus ergibt (197-199). Dem gegenüber steht, dass jedoch auch bei der Verwendung männlicher Ratten kein vollständiger Ausschluss hormoneller Einflussfaktoren gewährleistet werden kann. In der Literatur werden in Abhängigkeit des Alters der Versuchstiere unterschiedliche Frakturheilungskapazitäten beschrieben (48). Dieser Tatsache wurden wir in unserem Versuchsaufbau nur zum Teil gerecht, da wir ein Mindestalter der Tiere zum Zeitpunkt der Osteotomie definierten, jedoch kein exakt gleiches Alter bei Durchführung der Osteotomie gewährleisten konnten. Jedoch fallen durch die Wahl nahezu gleichaltriger Tiere versuchsinterne Bias bezüglich der Ergebnisse nicht so stark ins Gewicht, wie es bei unterschiedlich alten Tieren innerhalb eines Versuches der Fall wäre, da junge Tiere über eine vergleichbar gute Knochenheilungskapazität verfügen. Durch die Wahl junger Tiere sind eine variierende Sensibilität auf Regenerationsstimuli und eine die Frakturheilung beeinflussende Divergenz der postoperativen Belastungsmuster bei unterschiedlich alten Versuchstieren nicht auszuschließen.

Trotz all dieser Aspekte erscheint der Einsatz von Nagetieren in der präklinischen Testung im Rahmen des BTE unerlässlich, da diese Tiere aufgrund ihrer begrenzten

Lebenszeit und hohen Reproduktionsrate geeignet sind, Beobachtungen in einer begrenzten Zeit zu ermöglichen und gegebenenfalls notwendige Anpassungen des Versuchsaufbaus innerhalb kurzer Zeit umzusetzen. Jedoch entbehrt dies nicht der Notwendigkeit der Testung an unterschiedlichen Geschlechtern und Tieren verschiedenen Alters, da dies eine detailliertere Vorhersage des Effektes in Abhängigkeit verschiedener Grundvoraussetzungen liefert.

### **Defektmodell und Übertragbarkeit auf den Menschen**

Das Ziel unseres Versuchsaufbaues war es, einen femoralen Defekt, der sich aufgrund seiner Beschaffenheit zur manifesten Pseudarthrose entwickeln kann, zu generieren. Hierfür etablierten wir einen 6mm messenden femoralen Defekt, der, im Rahmen einer Positivkontrollgruppe validiert, über die Dauer des Versuches hinweg nicht zur knöchernen Ausheilung gelangte.

Unter dem Begriff des „Critical Size Defect“ werden verschiedene Groß- und Kleintier-Defektmodelle mit unterschiedlichen, zum Teil nicht auf andere Modelle übertragbaren Voraussetzungen, unterschiedlichen Durchführungsmodi und Ergebnissen zusammengefasst. Folglich muss jedes Versuchsmodell auf seine Relevanz und Anwendbarkeit im Rahmen des angestrebten präklinischen Tests überprüft werden (46, 191, 200-203).

Durch die interne Stabilisation des großsegmentalen Defektes mittels des Systems RatFix konnten wir einen belastungsstabilen Defekt mit größtmöglicher Bewegungsfreiheit für die Versuchstiere generieren, der neben dem Wohlergehen der Tiere auch die Frakturheilung unter physiologischer Belastung zum Ziel hatte. Jedoch muss für jede Tierspezies das gewählte Defektmodell kritisch hinsichtlich alternativer Stabilisationsverfahren oder anderweitiger, die Pseudarthrosebildung und mögliche das Ergebnis beeinflussende Faktoren, überprüft werden (47, 53, 204). Hieraus folgt, dass nicht jedes im Kleintiermodell durchführbare Versuchsvorhaben in ein Großtiermodell überführt werden kann.

Das von uns verwendete CSD-Defektmodell führte zur Ausbildung einer femoralen Pseudarthrose der Ratte. Jedoch ist im Rahmen dessen zu beachten, dass wir mit unserem Modell eine hypertrophe Pseudarthrose generierten, welche im klinischen

Alltag einen geringeren Stellenwert im Vergleich zu atrophen, Infekt assoziierten und in Folge des Verlustes eines knöchernen Fragmentes entstandenen Pseudarthrosen einnimmt.

Der CSD spiegelt den experimentellen Versuch des standardisierten, großsegmentalen Defektes wider. Das von uns verwendete Defektmodell reiht sich in eine Reihe mit vielen anderen Tiermodelle ein, die als „Critical-Size-Defect“ bezeichnet werden (205). Bei einem solchen Defekt handelt es sich nach Schmitz et al. um einen Defekt, der in der Lebenszeit des Tieres nicht verheilt (206). Jedoch ist dieses Konstrukt eher als dynamisches Modell zu betrachten, da sowohl die Dauer der ausbleibenden und nicht mehr zu erwartenden Heilung in der Literatur variiert und im weiteren Verlauf durch verschiedene Arbeitsgruppen in der Definition verändert wurde (52, 207, 208). Die beschriebene Dynamik verbessert nicht die Übertragbarkeit potenzieller Ergebnisse auf den Menschen, da die Zeitspanne nach Ablauf derer von einer Pseudarthrose gesprochen wird, von der FDA auf 9 Monaten festgelegt, in kaum einem Defektmodell reproduziert werden kann. Dies beruht zum einem auf der begrenzten Lebenszeit der Tiere und zum anderem auf dem mit einem solch langem Versuch verbundenen Aufwand und Kosten. Dementsprechend stellen die Defektmodelle eine Annäherung an den beim Menschen möglichen Verlauf dar. Ein weiterer Aspekt dem in Bezug auf die Translation der Ergebnisse auf den Menschen Beachtung geschenkt werden muss ist, dass die Defektmodelle um den CSD bemüht sind, einen kausalen Zusammenhang zwischen einzelnen, genau definierten Faktoren, zu generieren. Diese einfache Kausalität findet sich bei kaum einem Patienten im klinischen Alltag, da die häufigen, die Frakturheilung störenden Faktoren wie exzessiver Analgetikagebrauch, Nikotinabusus und metabolische Varianzen in ihrer Komplexität nicht im Tiermodell nachgestellt werden können.

Somit besteht im Bereich des „Critical-Size-Defects“ eine große Heterogenität und es bedarf einer auf jede Fragestellung abgestimmten Evaluation der Anwendbarkeit des zur Verwendung geplanten Defektmodelles. Auf dieser Erkenntnis gründet, dass ein CSD nicht per se das richtige Defektmodell zur präklinischen Testung von Pseudarthrosen unterschiedlicher Genesen ist. Jedoch sind Tiermodelle und insbesondere Modelle an Nagern für die präklinische Forschung unerlässlich, da sie Hinweise auf mögliche, noch im Verlauf der Forschung auftretende Probleme und Lösungsansätze hinsichtlich Verträglichkeit und Praktikabilität, liefern können.

Resultierend daraus liegt der Vorteil von Ratten als Versuchstiere im Bereich des CSD-Defektmodelles nicht in ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen und dessen klinische Problematik, sondern vielmehr in der Schaffung eines Mediums, in dem es möglich wird, Problematiken zu erkennen und gegebenenfalls zu lösen. Die präklinische Testung zum Nachweis einer Kausalität zwischen den in unserem Fall eingesetzten Knochenersatzmaterialien und einer möglichen Heilung des knöchernen „Critical-Size-Defects“ ist essenziell, um die Testung auf Tiere, die dem Menschen in ihrer Skelettarchitektur näherstehen, übertragen zu können und somit eine aussagekräftigere Ergebnistranslation zu ermöglichen.

### **Zellfreies Bone Tissue Engineering**

Nach der Entscheidung zur Anwendung des Tissue Engineerings sieht sich der Verantwortliche zwangsläufig vor die Frage gestellt, welchen grundsätzlichen Weg er beschreiten möchte. Glowacki und Muizuno beschrieben die beiden möglichen Wege im Rahmen des Tissue Engineerings als „one involves cell-free materials and/or factors and one involves delivering cells to contribute to the regeneration process“ (63). So wenig spektakulär sich diese zu treffende Entscheidung anhört, so elementar beeinflusst sie den weiteren Verlauf der Entwicklung eines Scaffolds und in der Folge eines Knochenersatzmaterials.

Im Rahmen des dieser Dissertationsschrift zugrundeliegenden Arbeitsplans, setzten wir auf ein zellfreies Konstrukt, das die von Giannoudis et al. in ihrem „Diamond-Concept“ beschriebenen proliferativen Zellen durch biologisch aktive und zur Chemoattraktion mesenchymaler Stammzellen befähigte Wachstumsfaktoren ersetzt (8).

In den vergangenen Jahren beschäftigten sich verschiedene Forschungen mit den Stammzellen allgemein und den mesenchymalen Stammzellen im Besonderen. Mesenchymale Stammzellen zeichnen sich nicht nur durch ihr großes Differenzierungspotenzial und ihre essentielle Beteiligung an körpereigenen Regenerationsprozessen aus, sondern auch durch eine Beteiligung an der Kanzerogenese (209-211). Mit voranschreitenden Erkenntnissen und Fähigkeiten der Wissenschaft hinsichtlich Kollektion undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen und der Vordifferenzierung dieser in gewünschte Zelllinien, eröffnete sich die Möglichkeit zur

erfolgreichen Integration dieser in das Tissue Engineering wie zum Beispiel von Jones et al. oder Perez et al. beschrieben (212-214). Ein erfolgreicher Einsatz der Stammzellen basiert unter anderem auf der Gewinnung einer ausreichend großen Anzahl undifferenzierter Zellen und dem Erhalt der Vitalität dieser über die Scaffold-Konstruktion hinaus bis zum endgültigen Verbleib in situ. Problematisch erscheint hierbei die Invasivität, die der Gewinnung einer solch großen Menge vitaler Zellen zugrunde liegt und die notwendige ex vivo-Kultivierung bei zu geringer Zellkollektion. In der ex vivo-Kultivierung liegen jedoch Vorteil und Nachteil nah beieinander, da die Invasivität der Extraktionsmethoden durch die Kultivierung reduziert werden kann, dieser Prozess jedoch nicht die Möglichkeit der Restriktion des biologischen Potenzials der extrahierten Zellen auszuschließen vermag (215, 216).

Ein anderer Ansatz des Tissue Engineering legt die bekannten Eigenschaften der Stammzellen zugrunde, ohne diese gewinnen und weiterverarbeiten zu wollen. Mit den gewonnenen Erkenntnissen hinsichtlich Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und Voraussetzungen zur Differenzierung in die zur Knochenregeneration benötigten Zelllinien, ergibt sich die Möglichkeit der Inkorporation diese Prozesse fördernder Wachstumsfaktoren mit nachfolgend endogener Stammzellrekrutierung an den Ort der Gewebeschädigung. Ein Vorteil dieses Verfahrens, der unter anderem unserer Entscheidung zugunsten des zellfreien Verfahrens zugrunde liegt, ist in dem verhältnismäßig einfacheren Handling dessen zu sehen, da sowohl die präinterventionellen Vorbereitungen als auch die Gefahr einer Infektionstransduktion oder Vitalitätsbeeinträchtigung der implantierten Zellen reduziert und der Einsatz durch geringere klinische Anforderungen einem potenziell größerem Patientenspektrum zugänglich wird.

Unsere beobachteten Ergebnisse einer guten Effektivität des zellfreien Tissue Engineerings finden ihr Korrelat in den 2010 von Lyons et al. erhobenen Daten (217). Der Einsatz von Wachstumsfaktoren und somit der Verzicht auf Inkorporation vitaler Zellen in das Tissue Engineering ist folglich als ein vielversprechender Ansatz zu betrachten, da dieses Verfahren keiner Limitation der Konstruktskalierung durch für die in situ Zellvitalität notwendiger Versorgungsvorgänge unterliegt und durch variierende Wachstumsfaktoren die vielfältigen Genesen einer Pseudarthrose besser zu adressieren vermag (218).

Gleichwohl kann die von uns beobachtete Effektivität inkorporierter Wachstumsfaktoren zur Defektheilung eines CSDs nicht uneingeschränkt auf einen in seiner biologischen Aktivität eingeschränkten Knochendefekt übertragen werden, da hierbei die Frage nach einer ausreichenden endogenen Stammzellreserve, die mobilisiert und zur Regeneration befähigt ist, besteht.

### **Einsatz von Polylactide und Kollagen im Rahmen eines „Drug delivery Systems“**

Für unseren Versuchsaufbau schufen wir mit Hilfe eines handelsüblichen 3D-Druckers, dem „Ultimaker 2+“, ein PLA-basiertes „Drug delivery system“, welches in die im Tiermodell gesetzte Osteotomie implantiert wurde.

Unter einem „Drug delivery System“ versteht man ein System, welches in der Lage ist, Zellen oder Wachstumsfaktoren unter sicheren Bedingungen und mit größtmöglicher Effektivität in einen Organismus einzubringen (219-223).

Das Polymer Polylactide hat in den vergangenen Jahren in Zusammenhang mit steigendem Interesse an Biomaterialien und deren Biokompatibilität stetig an Beachtung gewonnen, sodass, wie von Dhawan et al. beschrieben, bereits Ansätze zur Integration des 3D-Druckers in die individuelle Patientenversorgung im tatsächlichen klinischen Alltag bestehen (224). Die verschiedenen Materialeigenschaften, welche eine Vielzahl der an ein Biomaterial gestellten Anforderungen erfüllt und deren potenzielle Modulation durch nachfolgendes Processing, vergrößern sukzessive den medizinischen Einsatzbereich des Polymers (225, 226).

Wir wählten PLA für unser Versuchsvorhaben, da es sich aufgrund seiner Materialeigenschaften gut zur direkten Fabrikation des von uns angestrebten Konstruktes mit der gewünschten Porengröße eignet. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass PLA hohen Temperaturen ausgesetzt werden muss, um in die gewünschte Form gebracht zu werden. Resultierend daraus ergibt sich, dass reines PLA oder vielmehr PLLA gut zur Fabrikation avitaler Konstrukte geeignet ist, jedoch nicht zur direkten Inkorporation vitaler und in der Folge proliferationsfähiger Zellen.

Da das von uns verwendete Gerät über keine simultan arbeitenden Düsen zur Verarbeitung verschiedener Stoffe verfügte, entschieden wir uns durch die Befüllung des PLA-Konstruktes mit Kollagen ein vereinfachtes „Drug delivery System“, erst durch die

Formstabilität des synthetischen Polymers möglich, zu schaffen. Ritz et al. zeigten in ihrem in vitro-Versuch, dass es sich bei PLA um ein Biomaterial mit guter Biokompatibilität handelt, da es die Adhärenz vitaler Zellen unterstützt, die Endotoxin-Anhaftung jedoch innerhalb der gesetzten Grenzen verbleibt (107). Trotz der guten in vitro und in vivo-Ergebnisse im Tiermodell werden verschiedenste zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen des klinischen Einsatzes von PLA beim Menschen beschrieben, sodass auf den Einsatz des Materials engmaschige Verlaufskontrollen folgen sollten (104, 227-231). Obwohl diese unerwünschten Nebenwirkungen unter anderem auf den Degradationsprozess des Implantats zurückzuführen sind, liegt hierin auch die Stärke des Implantats begründet. Ein durch Biodegradation abbaubares Implantat muss in keiner erneuten Operation entfernt werden und es findet sich keine Akkumulation synthetischer und potenziell toxischer Stoffe im Organismus. Des Weiteren ist ein Vorteil bei Einsatz des Materials im Rahmen der orthopädisch-unfallchirurgischen Versorgung explizit in der verzögert einsetzenden Degradation zu sehen, da die initiale Belastung auf dem Implantat liegt, diese jedoch schrittweise vom regenerierenden Gewebe übernommen wird und sich daraus ein allmählicher Belastungsaufbau mit Förderung des Knochenremodelings zugunsten eines physiologischen Knochens ergibt.

In unserem Versuch beobachteten wir ein nach 8 Wochen unverändert erscheinendes PLA-Konstrukt, welches nach 20 Wochen nicht mehr nachzuweisen war. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben hinsichtlich der zu erwartenden Zeit bis zum vollständigen Abbau des Materials, wobei davon auszugehen ist, dass der Prozess gegen Ende des zweiten Monats beginnt und im Zeitraum von zwei bis fünf Jahren abgeschlossen ist (232, 233). In der Varianz der Degradationszeit liegt ein maßgebliches Problem begründet, welches weiterer Klärung bedarf, um Nebenwirkungen, Implantatversagen und verfrühten oder verspäteten Implantat-Abbau mit Störung der Geweberegeneration zu verstehen und diesen zu begegnen.

Ein Aspekt, der weiterer Klärung bedarf, ist, inwieweit sich die mechanische Stabilität des PLA-Konstruktes, welches in unserem Versuch eine belastungsstabile Defektversorgung ermöglichte, verändert, wenn dieses auf die notwendigen Maße eines Großtier- oder Menschenknochens übertragen wird. Resultierend daraus ergibt sich die Frage, ob das von uns angewendete Verfahren zur Knochenregeneration mittels handelsüblichem 3D-Drucker im Rahmen eines Großtierversuches praktikabel ist, da

sich vorhandene Migrationsstrecken und Diffusionsstrecken zur Zellversorgung maßgeblich vergrößern, wenn keine vitalen Zellen in das Polymer selbst oder in das Innere des Polymer-Konstruktes inkorporiert werden können.

Kollagen I gilt als ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommend und als Hauptbestandteil der EZM. Aufgrund der sich hieraus ergebenden sehr guten Biokompatibilität und der in verschiedenen Versuchen beschriebenen Plastizität des natürlichen Polymers, zählt dieses vor dem Hintergrund der angestrebten Imitation der nativen EZM zu den idealen Biomaterialien für den Einsatz in der regenerativen Medizin (234, 235). Die alleinige Verwendung des Kollagens als Scaffold im Bone Tissue Engineering erscheint möglich, jedoch wird die Integrität des so hergestellten Scaffolds durch die dem Kollagen innewohnende Plastizität und geringe Stabilität bei axialer Belastung gefährdet (96, 236, 237).

Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich im Vorfeld unseres Versuchsmodells die Überlegung der Verwendung eines Hybrid-Scaffolds, bestehend aus PLA und Kollagen, um auf diese Weise auf eine eventuell notwendige Modifikation des Kollagens zur Stabilitätssteigerung und damit einhergehend Restriktion des osteogenen Potenzials zu verzichten. Dewey et Johnson verwendeten in ihrer Versuchsreihe zur kranio-maxillofazialer Defektversorgung ebenfalls einen Hybrid-Scaffold aus PLA und Kollagen, wobei sich die in diesem und weiteren in der Literatur beschriebenen Modellen mit den von uns generierten Ergebnissen deckten, dass kein negativer Einfluss des PLAs auf die biologische Aktivität des Kollagens festzustellen, sondern viel mehr von einem Synergismus beider Polymere hin zu einer Förderung der Defektüberbrückung auszugehen ist (238-241). In der radiologischen, histologischen und statistischen Aufarbeitung der Proben konnten wir ebendiesen Synergismus von PLA und Kollagen nachvollziehen. Zu beachten ist jedoch im Rahmen dessen, dass unser Defektmodell eine hypertrophe Pseudarthrose mit per Definition ausreichend biologischem Potenzial als Referenzgruppe etablierte, sodass die Translation der Wirksamkeit der Kombination auf ein anderes Defektmodell eingeschränkt möglich ist.

Gleichzeitig wohnte der Entscheidung zur Verwendung eines Hybrid-Scaffolds die Überlegung inne, dass sich durch die Verwendung eines synthetischen Polymers die

Stabilität des Implantats in einer Weise erhöhen lässt, dass die Verwendung im Bereich der orthopädisch-unfallchirurgischen Defektversorgung möglich wird. Diese Stabilitätsverbesserung des Implantats im Sinne eines Exoskeletts wird in der Literatur beschrieben und zeigte sich im Rahmen der von uns durchgeführten Untersuchungen (242). Ein Nachteil, der sich für uns im Rahmen der postinterventionellen Aufarbeitung der Proben offenbarte, liegt zum einen in dem nicht linear verlaufenden Degradationsprozess des PLAs, der nicht mit dem histologisch sichtbaren Remodelings des Kollagens im Bereich der Osteotomie korreliert und zum anderen in der nicht vergleichbaren und qualifizierbaren Porosität des Polymers als Ausdruck der abgelaufenen Degradation (243). In der Verwendung verschiedener Polymerer in einem Konstrukt, ergibt sich folglich trotz der Etablierung einer benötigten Implantatstabilität eine gewisse Disbalance der Komponenten hinsichtlich der Degradation, welche dahingehend als problematisch anzusehen ist, dass eine für die physiologische Knochenheilung benötigte sukzessive Belastungssteigerung nicht vollständig nachvollzogen und somit teilweise der Kontrolle entzogen ist.

Die Möglichkeit der Inkorporation und die nachfolgende, kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren in einen durch 3D-gedruckten und mittels Kollagen befüllten PLA-Scaffold sprechen für die Anwendung eines 3D-Druckers im Bone Tissue Engineering, wobei der Einsatz eines solchen durch das verwendete Material und die Thermolabilität der Wachstumsfaktoren verkompliziert wird (244). Ein Makel unseres Versuchsmodells liegt in dem Mangel eines hochkomplexen 3D-Druckers, der eine geplante Inkorporation von Wachstumsfaktoren in das Kollagen selbst ermöglicht. Gleichwohl beobachteten wir in unserem Versuchsaufbau eine Steigerung des osteogenen Potenzials allein durch die Befüllung des PLA-Gerüsts, welches per se ein geringes osteoinduktives Potenzial besitzt, mit Kollagengel und somit in der Folge eine verbesserte Defektüberbrückung.

In Zusammenschau der Vor- und Nachteile zeigt sich, dass die Einzelkomponenten PLA und Kollagen per se für den Einsatz im Rahmen des Bone Tissue Engineering geeignet sind, jedoch die Verwendung eines Hybrid-Scaffolds aus PLA und Kollagen zu favorisieren ist. Dies ergibt sich unter anderem aus dem sich in unseren Ergebnissen und in der Literatur beschriebenen Synergismus der einzelnen Komponenten. Zur Herstellung eines Hybrid-Scaffold scheinen verschiedenen Materialien geeignet, wobei sich das ubiquitär vorkommende Kollagen als Hauptbestandteil der Extrazellulär-

Matrix zur Verwendung anbietet. Die Verwendung von PLA oder vielmehr von PLLA als Komponente im Hybrid-Scaffold wird durch die Biokompatibilität des synthetischen Polymers gestützt, welche perspektivisch die Geweberegeneration durch Nachahmung der integren Gewebestrukturen fördert (245-247).

### **Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren im Bone Tissue Engineering**

Der von uns gewählte Versuchsaufbau sah eine Gliederung der Versuchstiere in 5 Versuchsgruppen vor, wobei eine Versuchsgruppe durch Ausbildung einer Pseudarthrose bestach und in der Folge als Referenzgruppe angesehen wurde. Die vier verbliebenen Gruppen waren durch die Hinzunahme eines neuen Materials charakterisiert, da wir uns hieraus neue Erkenntnisse über die Effektivität der einzelnen Elemente versprochen. In unserem Defektmodell verwendeten wir rekombinantes SDF-1 und BMP-7 als in Kollagengel inkorporierte Wachstumsfaktoren. Zum Zeitpunkt der initialen Versuchsplanung und Durchführung war rekombinantes BMP-7 sowohl von der EMA als auch der FDA zum Einsatz bei Pseudarthrosen der unteren Extremität zugelassen. Jedoch nahm die einzige Firma, die rekombinantes BMP-7 zum humanen Einsatz fabrizierte, dieses zuletzt vom Markt, sodass die Übertragbarkeit der von uns generierten Ergebnisse vorerst eingeschränkt, jedoch aufgrund der zu generierenden Erkenntnisse, nicht zu vernachlässigen ist (146, 248).

Die Verwendung von rhBMP-7 im Rahmen unseres Defektmodells zielte auf die Nutzung der nachweislich sehr guten Osteoinduktivität ab, die vor allem auf lokaler Ebene der Knochenregeneration zum Tragen kommt. Durch Inkorporation von rhBMP-7 und SDF-1 in einen Scaffold bestehend aus PLA und Kollagengel und die schrittweise Freisetzung aus diesem, versuchten wir eine prolongierte Wachstumsfaktor-Präsenz im Defekt bei gleichzeitiger Vermeidung von Konzentrationspeaks zu ermöglichen. Problematisch stellt sich hierbei jedoch der in der Literatur beschriebene und deutlich supraphysiologische Bedarf an Wachstumsfaktoren zur Inkorporation in das Kollagengel dar, da aufgrund der Implantation in situ eine Kontrolle der Freisetzungskinetik nur begrenzt möglich und in verstärkter Weise von der Kollagendegradation oder allgemeiner von der Degradationskinetik des Scaffolds abhängig zu sein scheint (249-251).

Obwohl in unserem Defektmodell keine systemische Applikation des BMP-7 oder SDF-1 stattfand, konnten wir in unserem Versuchsaufbau deren systemische Relevanz unter anderem aufgrund der Verwendung hoher supraphysiologischer Konzentrationen nicht ausschließen. Gleichwohl beobachteten wir weder lokale noch systemische Nebenwirkungen infolge der applizierten Wachstumsfaktoren. Dies deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Toleranz verschiedenster Wachstumsfaktoren im Tiermodell der Ratte (249).

In der Literatur findet sich eine große Diskrepanz bezüglich der beschriebenen Effektivität von BMP im klinischen Einsatz beim Menschen. Sowohl Friedlaender et al. als auch Giannoudis et Tzioupis kamen in ihren Betrachtungen des klinischen Einsatzes rekombinanten BMP-7s zu dem Schluss, dass dieses mit einer Defektüberbrückung in über 80 % der Fälle als ein erfolgreich einzusetzender Wachstumsfaktor zu bewerten sei, wobei diese Einschätzung konträr zu einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2015 verläuft, die einen Einsatz rekombinanter BMPs vor allem bei akuten tibialen Frakturen favorisiert (252-254). Im Rahmen des von uns generierten Defektmodells zeigte sich sowohl radiologisch als auch histologisch eine Knochenheilung im Bereich der Osteotomie nach Applikation des rekombinanten BMP-7, sodass wir hierbei von einer Übereinstimmung mit den von Giannoudis et al. generierten Ergebnissen hinsichtlich der Effektivität ausgehen.

Bei der radiologischen Auswertung der generierten Daten zeigte sich eine zeitliche Überlegenheit des mittels rekombinanten BMP-7 funktionalisierten Hybrid-Scaffolds, da bereits nach 4 postoperativen Wochen eine nahezu vollständige Defektheilung bei allen Versuchstieren zu beobachten war. Dies spiegelt die sehr guten osteoinduktiven Eigenschaften des rekombinanten BMPs wider, jedoch generierten wir einen großsegmentalen Defekt, der in seiner Heilungskapazität nicht eingeschränkt war, sodass in unserem Versuch zu jedem Zeitpunkt ausreichend zur Ausdifferenzierung befähigte Zellen zur Verfügung standen, welche in der Folge durch die Wirkung der Wachstumsfaktoren in osteoblastäre Zelllinien übergehen konnten. Gleichwohl besticht das von uns erprobte Defektmodell durch eine radiologisch nachweisbar gerichtete Defektheilung entlang des implantierten Hybrid-Scaffolds, ohne ektopische Kallusbildung und Os-

sifikation in der Peripherie. Dies kann sowohl als Ausdruck der ausreichenden Osteosynthese als auch der Wachstumslenkung durch den implantierten Hybrid-Scaffold angesehen werden.

Obgleich wir im Rahmen der erhobenen Ergebnisse eine hohe Effektivität des rekombinanten BMP-7 im Bone Tissue Engineering beobachteten, ist zu berücksichtigen, dass in der Literatur die Effektivität hinsichtlich Lokalisation des zu therapierbaren Defektes und des eingesetzten rekombinanten Faktors unterschieden wird. Hierbei zeigt sich zusammenfassend eine gewisse Dominanz des rekombinanten BMP-2 gegenüber BMP-7, sodass bei der Wahl des in unserem Modell verwendeten rekombinanten BMPs eine gewisse Schwachstelle zu sehen ist (255). Neben lokalen Nebenwirkungen wie Infektionen, heterotoper Ossifikation und Schwellungen werden in der Literatur variierende Effekte auf die humane Knochenregeneration im Sinne einer ausgeprägten oder dezenter Osteogenese beschrieben (256-264). Dies mag zum einen an unterschiedlichen Einschlusskriterien der Patienten in die einzelnen Studien liegen als auch in dem weit verbreiteten „Off-label-Use“ des Moleküls im Bereich der orthopädisch-unfallchirurgischen Defektversorgung (265, 266).

Der Einfluss des SDF-1 auf die Knochenregeneration im Rahmen eines knöchernen Defektmodells stellt sich nicht so klar abgrenzbar dar wie es bei den unterschiedlichen BMP-Molekülen der Fall ist. Dies liegt unter anderem in der großen Wirkungsheterogenität des Chemokines, gekennzeichnet durch Angiogeneseförderung, endogene Stammzellrekrutierung und positiven Einflusses auf die ossäre Defektheilung, welche sich gegenseitig beeinflussen (173, 267-275).

Bei Betrachtung der SDF-1 zugeschriebenen Eigenschaften ergibt sich ein anderer Ansatzpunkt für den Einsatz im Tissue Engineering. So lag unserer Auswahl des Chemokines zur Inkorporation in den Hybrid-Scaffold die Überlegung, gestützt auf in vivo-Versuche u.a. von Eman et al. und Huang et al. zugrunde, dass eine erfolgreiche Defektheilung nur bei ausreichender mesenchymaler Stammzellkapazität und Gefäßversorgung der ischämischen Geweberegion möglich ist (273, 276-278).

Die mit Hilfe der Literatur definierten Ansatzpunkte der SDF-1 Wirkung zugunsten einer Angiogenese und Stammzellrekrutierung, decken sich mit unseren Ergebnissen der Versuchsgruppe mit inkorporiertem SDF-1, da diese nach 4 postoperativen Wochen radiologisch eine Tendenz zur Überbrückung des gesetzten Defektes erkennen

ließen, diese jedoch nicht an die generierten Ergebnisse der rhBMP-7 enthaltenen Versuchsgruppe heranreichten.

Diese erkennbare Tendenz in Richtung Überlegenheit des rhBMP-7 gegenüber rhSDF-1 verstärkte sich nach 8 Wochen, da im Gegensatz zu der SDF-1 enthaltenen Versuchsgruppe nach Ablauf dieses Zeitraums jeder großsegmentale Defekt der BMP-7 Versuchsgruppe zur Ausheilung gelangt war. Überraschenderweise stellten wir nach 20 postoperativen Wochen die knöcherne Überbrückung der Osteotomie der SDF-1 enthaltenen Versuchsgruppe fest. Daraufhin fassten wir den Entschluss zur Quantifizierung des neu gebildeten und bereits mineralisierten Knochenvolumens nach 8 postoperativen Wochen.

In der folgenden statistischen Auswertung zeigte sich kein signifikanter Unterschied der mineralisierten Knochenmatrix zwischen der BMP-7 enthaltenen und den übrigen Versuchsgruppen. Ein solch signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch zwischen der Kontrollgruppe und der mit SDF-1 funktionalisierten Versuchsgruppe. Dies mag auf den ersten Blick verwirrend erscheinen, jedoch gewinnen diese Ergebnisse an Plausibilität bei Berücksichtigung der Tatsache, dass ein physiologisch zur Ausheilung gelangter Knochendefekt nicht durch Homogenität der Knochenstruktur, sondern durch den Anschluss des neuen Knochengewebes an die vorbestehende Knochenmarkshöhle, bestehend aus nicht mineralisierten Strukturen, gekennzeichnet ist. Basierend auf diesen Ergebnissen führten wir eine histologische Untersuchung des Gewebes aus dem Bereich der Osteotomien nach Euthanasie der Tiere durch. Das Ziel dieses Vorganges war das Verständnis der unterschiedlichen Defektheilungsstadien nach 8 und nach 20 Wochen postoperativ. Die angefertigte HE-Färbung diente hierbei zur Schaffung einer ersten Übersicht. Im Rahmen der Durchführung der Mason-Goldner-Trichrom-Färbung zeigt sich die bereits in der Literatur beschriebene und ebenfalls von uns gesehene Dominanz des BMP-7 hinsichtlich Knochenregeneration basierend auf der direkten Induktion der Osteoblastendifferenzierung. Histologisch spiegelt sich diese Tatsache in dem vermehrten Auffinden mineralisierten Knochengewebes im Bereich der ehemaligen Osteotomie. Auf der anderen Seite bestach die SDF-1 enthaltene Versuchsgruppe durch die in der Elastika-van-Gieson und HE-Färbung gesehene deutliche Erhöhung der Angiogenese im Bereich des knöchernen Defektes. Hieraus ergibt sich zwar die Überlegenheit des BMP-7 hinsichtlich der reinen Knochenregeneration nach 8 Wochen, jedoch ist diese zeitliche Überlegenheit als rein

formal anzusehen und wird durch die primäre Induktion der Stammzellmigration und Angiogenese und in der Folge sekundär induzierten Knochenregeneration durch SDF-1 erklärt. Nach 20-wöchiger Heilungszeit gelangt der knöcherne Defekt der SDF-1 enthaltenen Versuchsgruppe ebenfalls zur Ausheilung. Daraus folgernd ergibt sich aus den von uns gewonnenen Ergebnissen die Erkenntnis, dass BMP-7 wie in der Literatur beschrieben, über ein stark osteoinduktives Potenzial bei vorhandenen osteoblastären Zellen verfügt, die von SDF-1 initiierte Knochenregeneration jedoch komplexer und vielschichtiger ist, da sie auf Grundlage einer endogenen Stammzellrekrutierung und Angiogenese stattfindet. Folglich liegen in dem Wirkspektrum des SDF-1 sowohl Nachteil als auch Vorteil eng beieinander, da bei Verwendung des Chemokines im Bone Tissue Engineering nicht von einer schnellen Knochenregeneration, vergleichbar mit der im Einsatz von rekombinanten BMP-7 auftretenden, ausgegangen werden kann. Durch Angiogeneseförderung und Stammzellrekrutierung kann jedoch ein neues Einsatzspektrum z.B. im Rahmen avitaler Pseudarthrosen generiert werden. Trotz der bereits genannten Komplexität der Knochenregeneration auf die Implantation eines Scaffolds mit SDF-1 folgend, präsentiert sich diese Kombination sowohl in der Literatur als auch in unseren Versuchsergebnissen als gut biokompatibel und ohne initiale, lokale Nebenwirkungen (279-281).

Ein Problem, das beide von uns verwendeten Wachstumsfaktoren betrifft, ist der ambivalente Einfluss auf die Kanzerogenese. So wird dem BMP-7 sowohl eine Beteiligung an der Proliferation von Osteosarkomen als auch an der Verhinderung des ossären Progresses metastasierter Mamma-Karzinome zugesprochen (282-286). Komplexer gestaltet sich der Einfluss des SDF-1 auf die Kanzerogenese, da hier sowohl die proliferationsunterstützende Wirkung, Angiogenese als auch die Metastasierungsförderung zum Tragen kommen (270, 287). Bei diesen vielfältigen Einflüssen der Wachstumsfaktoren auf die Kanzerogenese handelt es sich nicht primär um ein theoretisches Konstrukt, da der von uns gewählte und für CSD-Modelle empfohlene Beobachtungszeitraum zu kurz ist, um eine de novo Kanzerogenese und deren eventuelle Metastasierung zu beobachten. Jedoch ist hierbei herauszustellen, dass ein lokaler Einsatz dieser rekombinanten Wachstumsfaktoren nicht zwangsläufig zu einer Kanzerogenese führen muss. Dies gestaltet einen potenziell klinischen Einsatz der Wachstumsfaktoren schwierig, da obwohl keine direkte Förderung der Krebsentste-

hung beschrieben ist, die Patienten, bei denen der therapeutische Einsatz indiziert erscheint, intensiv auf bereits vorliegende Krebserkrankungen untersucht werden müssen bzw. deren Entstehung im Verlauf der Therapie aufgrund der zurzeit noch notwendigen supraphysiologischen Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden kann. Der potenzielle Ausschluss von Patienten, deren knöcherner Defekte auf einer Resektion in Folge einer muskuloskelettalen Krebserkrankung entstanden sind, lässt sich folglich nicht ausschließen und die Möglichkeit eines Rezidivs muss bei Verwendung der Molekülgruppen bedacht werden.

Gleichwohl konnten wir in unserem Versuch zeigen, dass SDF-1 sehr gut biokompatibel und in der Lage ist, die Ausheilung eines großsegmentalen Defektes, der perspektivisch in einer Pseudarthrose resultieren würde, anzuregen. Der initialen Feststellung einer Dominanz des rekombinanten BMP-7 hinsichtlich der Knochenregeneration kann abschließend keine Rechnung getragen werden, da inkorporiertes rekombinantes SDF-1 ebenfalls zu einer Knochenregeneration und Defektüberbrückung des CSDs führte.

Trotz der in unseren in vivo-Versuchen gesehenen guten Ergebnisse bei Einsatz des rekombinanten BMP-7, ist ein Einsatz im Rahmen des Bone Tissue Engineering als limitiert zu betrachten, da in weiteren in vivo-Studien eine ausgeprägte Dosisabhängigkeit des zu erwartenden Effektes und eine Abnahme der Qualität des regenerierten Knochens einhergehend mit Stabilitätsverlust bei Erhöhung der verwendeten Konzentrationen der Wachstumsfaktoren gesehen wird (288, 289).

Ein Nachteil rekombinanter Wachstumsfaktoren zur Verwendung im Bone Tissue Engineering ist in den hohen Kosten, die diese in der Synthese und Lagerung generieren, zu sehen, wobei eine Abwägung hinsichtlich multipler chirurgischer Interventionen im Rahmen einer konservativ chirurgischen Pseudarthrose-Therapie notwendig ist. Im Rahmen einer weitergehenden Evaluation der Inkorporation dieser Wachstumsfaktoren zur Schaffung eines Knochenersatzmaterials könnte der in anderen Versuchen gewonnene Erkenntnis des Synergismus des BMP-2 und SDF-1 Rechnung getragen werden, indem bei ähnlicher Wirkung eine Reduktion der notwendigen Einzelkonzentrationen und daraus folgend eine Reduktion der potenziell kanzerogenen Nebenwirkungen und Kosten angestrebt wird (290-294). Die in situ Kontrolle der Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren und eine eventuelle Modifikation

der Wachstumsfaktoren hin zu einer stabileren Form erscheint nach Abschluss des Versuchsmodells notwendig, um eine erfolgsversprechende Translation auf Großtiermodelle oder den Menschen bei geringeren Molekülkonzentrationen zu ermöglichen.

### **Ausblick**

Folglich kommen wir am Ende des in dieser Dissertationsschrift beschriebenen Tiermodells eines CSDs zu dem Schluss, dass bereits ein handelsüblicher 3D-Drucker trotz der ihm innewohnenden Limitationen hinsichtlich Auflösungsvermögens und Fabrikationsgröße, in der Lage ist, einen entscheidenden Beitrag zur Steigerung der Praktikabilität und der klinischen Translation des Bone Tissue Engineerings zu leisten. Gleichwohl gilt zu bedenken, dass das von uns vereinfachte, jedoch erfolgreich implantierte „Drug delivery system“ auf Basis eines den PLA-Scaffold auskleidenden Kollagengels und inkorporierter rhBMP-7 und rhSDF-1, die Bedürfnisse eines humanen Knochendefektes nur am Rande berühren. Daraus folgend ergibt sich für uns die Notwendigkeit der Weiterentwicklung des erprobten Hybrid-Scaffolds im Sinne der Übertragung auf einen „Critical Size Defect“ im Großtiermodell und der schrittweisen Effektivitätsprüfung des vergrößerten Implantates. Hierbei muss ein besonderes Augenmerk sowohl auf das osteogene Potenzial selbst, als auch die Fähigkeit zur Osteointegration gelegt werden, da bei einer Reduktion derer sowohl Modifikationen hinsichtlich Materialeigenschaften und Zelladhäsionsfähigkeit als auch der Dosis der verwendeten Wachstumsfaktoren getroffen werden müssen. Jedoch gelangen wir unter Berücksichtigung der von uns generierten Ergebnisse und der Literatur zu der Überzeugung, dass das zellfreie Bone Tissue Engineering perspektivisch einen vielversprechenden Beitrag zur Erweiterung des chirurgischen Repertoires der Therapie von Pseudarthrosen und Knochendefekten liefert, der aufgrund der Fähigkeit zur Integration verschiedenster Wachstumsfaktoren die interindividuellen Bedürfnisse von Patienten zu adressieren vermag.

## Zusammenfassung

Frakturen stellen ein häufiges, die Knochenkontinuität unterbrechendes Krankheitsbild des erwachsenen Menschen dar, welches in der Regel ohne großen Interventionsbedarf ausheilt. Konträr verhält es sich vor allem bei an den unteren Extremitäten auftretenden Frakturheilungsstörungen und Pseudarthrosen, wobei der Definition einer Pseudarthrose als eine Knochendiskontinuität, deren Integrität nach 6 bis 9 Monaten post Trauma nicht wiederhergestellt ist, Beachtung geschenkt werden muss (38, 295, 296). Hierin liegt ein Problem der modernen Medizin begründet, da chirurgische Interventionen, welche zur Zeit als Goldstandard der Therapie der Pseudarthrose gelten, sowohl mit einer hohen physischen und psychische Belastung des Patienten als auch hohen sozioökonomischen Kosten verbunden sind (38).

Das Bone Tissue Engineering stellt einen Versuch dar, diesem Problem dahingehend zu begegnen, dass biodegradierbare Knochenersatzmaterialien, durch integrierte Wachstumsfaktoren zu Osteoinduktion und Angiogenese befähigt, die etablierten chirurgischen Maßnahmen nicht zwangsläufig ablösen, sondern vielmehr durch ihr Potenzial ergänzen (297).

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Erprobung einzelner, bereits im Bone Tissue Engineering etablierter Komponenten und der Kombination derer vor dem Hintergrund der Schaffung eines biodegradierbaren und sowohl osteo- als auch angiointuktiven Knochenersatzmaterials. Als Erprobungsmodus wählten wir einen Critical-Size-Defect des Rattenfemurs, welcher per Definition innerhalb einer postoperativen Beobachtungszeit von 8 Wochen nicht spontan zur Ausheilung gelangt. Die Beobachtung der Wirkungen der einzelnen Komponenten und der globalen osteoinduktiven Wirkung erfolgte durch Einteilung der Versuchstiere in 5 Versuchsgruppen. Ein besonderes Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der vergleichenden Wirkung von den in einen Hybrid-Scaffold, bestehend aus PLA und Kollagen, inkorporierten rekombinanten Wachstumsfaktoren SDF-1 und BMP-7.

Im Rahmen der von uns durchgeführten radiologischen, histologischen und statistischen Auswertungen stellten wir eine zeitliche Überlegenheit des mittels rekombinanten BMP-7 funktionalisierten Knochenersatzmaterials hinsichtlich der reinen osteoinduktiven Wirkung fest. Da sich die Genese einer Pseudarthrose und insbesondere einer avitalen Pseudarthrose in den meisten Fällen jedoch mehrdimensional und nicht

nur durch eine Reduktion des osteogenen Potenzials erklären lässt, interessierte uns vor allem die Wirkung des SDF-1, dessen Potenzial zur Knochenheilung vor allem in der Befähigung zu Angiogenese und endogener Stammzellrekrutierung gesehen wird. Diese, dem SDF-1 bereits durch die Literatur zugeschriebene Eigenschaft, konnten wir in unserem Versuch verifizieren und müssen sie dahingehend ergänzen, dass eine erfolgsversprechende Knochenheilung nach Angiogenese stattfinden kann.

Gleichzeit müssen wir anerkennen, dass einer vermeintlichen Überlegenheit des rhBMP-7 im Rahmen des Bone Tissue Engineerings eine eindimensionale Betrachtung zugrunde liegt, da SDF-1 als inkorporierter Wachstumsfaktor eine verhältnismäßig verzögerte Defektheilung verantwortet, diese jedoch durch eine nachweislich erhöhte Angiogenese im Bereich der Osteotomie begründet ist.

Herauszustellend ist am Ende dieser Arbeit das Potenzial eines handelsüblichen 3D-Druckers zum Einsatz in der Fabrikation degradierbarer Knochenersatzmaterialien, da auf diese Weise hergestellte Knochenimplantate einem größeren Patienten- und Klinikspektrum zugänglich gemacht werden können. Folglich sehen wir in der Kombination von im 3D-Drucker verarbeiteten PLA, Kollagen I und SDF-1 ein für den Einsatz im Kleintiermodell erfolgsversprechendes biodegradierbares Knochenersatzmaterial, dessen Anwendung und Übertragung auf ein Großtiermodell und perspektivisch den tatsächlichen Knochendefekt des Menschen möglich erscheint.

## Literaturverzeichnis

1. Everding J, Roßlenbroich S, Raschke M. Pseudarthrosen der langen Röhrenknochen. *Der Chirurg*. 2018;89(1):73-88.
2. Dahabreh Z, Calori G, Kanakaris N, Nikolaou V, Giannoudis P. A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. *International orthopaedics*. 2009;33(5):1407.
3. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Internet). Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Fälle, Berechnungs- und Belegungstage, durchschnittliche Verweildauer). Gliederungsmerkmale: Jahre, Behandlungsort, Alter, Geschlecht, Verweildauer, ICD10-4-Steller. [updated 21.05.2020. 07.02.2019:[Available from: [http://www.gbe-bund.de/owa921-install/servlet/owa/aw92/WS0100/XWD\\_PROC?XWD\\_2/2/XWD\\_CUBE.DRILL/XWD\\_30/D.946/13220](http://www.gbe-bund.de/owa921-install/servlet/owa/aw92/WS0100/XWD_PROC?XWD_2/2/XWD_CUBE.DRILL/XWD_30/D.946/13220)].
4. Zura R, Xiong Z, Einhorn T, Watson JT, Ostrum RF, Prayson MJ, et al. Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA surgery*. 2016;151(11):e162775.
5. Kanakaris N, Giannoudis PV. The health economics of the treatment of long-bone non-unions. *Injury*. 2007;38:S77-S84.
6. Everding J, Stolberg-Stolberg J, Roßlenbroich S, Raschke MJ. Möglichkeiten der nicht operativen Behandlung von Pseudarthrosen. *OP-JOURNAL*. 2019;35(03):252-61.
7. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences : BES*. 2015;28(1):57-71.
8. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S3-6.
9. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L. Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2005;16 Suppl 2:S36-43.

10. Cameron JA, Milner DJ, Lee JS, Cheng J, Fang NX, Jasiuk IM. Employing the biology of successful fracture repair to heal critical size bone defects. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;367:113-32.
11. Bigham-Sadegh A, Oryan A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *International wound journal*. 2015;12(3):238-47.
12. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5.
13. Sathyendra V, Darowish M. Basic science of bone healing. *Hand clinics*. 2013;29(4):473-81.
14. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1978;60-b(2):150-62.
15. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*. 1998(355 Suppl):S7-21.
16. Phillips A. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005;36(3):S5-S7.
17. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(11):1805-15.
18. Einhorn TA. The science of fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma*. 2005;19(10 Suppl):S4-6.
19. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11(1):45-54.
20. Loeffler J, Duda GN, Sass FA, Dienelt A. The Metabolic Microenvironment Steers Bone Tissue Regeneration. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2018;29(2):99-110.
21. Schmidmaier G, Moghaddam A. Long bone nonunion. *Zeitschrift fur Orthopadie und Unfallchirurgie*. 2015;153(6):659-74; quiz 75-6.
22. Dimitriou R, Kanakaris N, Soucacos PN, Giannoudis PV. Genetic predisposition to non-union: evidence today. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S50-3.
23. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014;45:S3-S7.
24. Calori G, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury*. 2007;38:S11-S8.

25. Copuroglu C, Calori GM, Giannoudis PV. Fracture non-union: who is at risk? *Injury*. 2013;44(11):1379-82.
26. Meesters DM, Wijnands KAP, Brink PRG, Poeze M. Malnutrition and Fracture Healing: Are Specific Deficiencies in Amino Acids Important in Nonunion Development? *Nutrients*. 2018;10(11).
27. Pountos I, Georgouli T, Pneumaticos S, Giannoudis P. Fracture non-union: can biomarkers predict outcome? *Injury*. 2013;44(12):1725-32.
28. Steinhausen E, Glombitza M, Böhm H-J, Hax P-M, Rixen D. Pseudarthrosen. *Der Unfallchirurg*. 2013;116(7):633-49.
29. Meiners J, Gerlach U, Mägerlein S, Jürgens C, Faschingbauer M. Pseudarthrosen. *Der Chirurg*. 2009;80(10):979.
30. Lynch JR, Taitsman LA, Barei DP, Nork SE. Femoral nonunion: risk factors and treatment options. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2008;16(2):88-97.
31. Calori GM, Mazza EL, Mazzola S, Colombo A, Giardina F, Romano F, et al. Non-unions. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017;14(2):186-8.
32. Schlundt C, Bucher CH, Tsitsilonis S, Schell H, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Clinical and Research Approaches to Treat Non-union Fracture. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(2):155-68.
33. Frölke JPM, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury*. 2007;38:S19-S22.
34. Zura R, Mehta S, Della Rocca GJ, Steen RG. Biological Risk Factors for Nonunion of Bone Fracture. *JBJS reviews*. 2016;4(1).
35. Breer S, Auerswald M, Fuchs S, Jürgens C, Faschingbauer M, Dannenberg O. Versorgung von Pseudarthrosen der langen Röhrenknochen. *Trauma und Berufskrankheit*. 2015;17(4):233-43.
36. Weber B, Cech O. Pseudoarthrosis: pathology, biomechanics, therapy, results. Berne, Switzerland: Hans Huber Medical Publisher. 1976:181-4.
37. Hertweck J, Ritz U, Gotz H, Schottel PC, Rommens PM, Hofmann A. CD34(+) cells seeded in collagen scaffolds promote bone formation in a mouse calvarial defect model. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2018;106(4):1505-16.
38. Runkel M, Rommens P. Pseudarthrosen. *Der Unfallchirurg*. 2000;103(1):51-63.

39. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis P. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury*. 2008;39:S59-S63.
40. Raschke M, Gasch A. Verzögerte Frakturheilung. *Trauma und Berufskrankheit*. 2012;14(1):85-9.
41. Rupp M, Biehl C, Budak M, Thormann U, Heiss C, Alt V. Diaphyseal long bone nonunions—types, aetiology, economics, and treatment recommendations. *International orthopaedics*. 2018;42(2):247-58.
42. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011;42:S3-S15.
43. Garcia P, Histing T, Holstein J, Klein M, Laschke M, Matthys R, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *European cells & materials*. 2013;26(1):12.
44. Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European cells & materials*. 2007;13(1):1-10.
45. Wancket L. Animal models for evaluation of bone implants and devices: comparative bone structure and common model uses. *Veterinary pathology*. 2015;52(5):842-50.
46. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(1):123-45.
47. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 1999;367:S59-S67.
48. Histing T, Garcia P, Holstein J, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011;49(4):591-9.
49. Rucker C, Kirch H, Pullig O, Walles H. Strategies and First Advances in the Development of Prevascularized Bone Implants. *Current molecular biology reports*. 2016;2(3):149-57.
50. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone*. 2015;70:73-86.

51. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery*. 1990;1(1):60-8.
52. Watanabe Y, Harada N, Sato K, Abe S, Yamanaka K, Matushita T. Stem cell therapy: is there a future for reconstruction of large bone defects? *Injury*. 2016;47 Suppl 1:S47-51.
53. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegler ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. 2009;30(12):2149-63.
54. McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms*. 2018;11(4):dmm033084.
55. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone research*. 2013;1(3):216-48.
56. Parveen S, Krishnakumar K, Sahoo S. New era in health care: tissue engineering. *Journal of stem cells & regenerative medicine*. 2006;1(1):8-24.
57. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European cells & materials*. 2008;15:100-14.
58. Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science (New York, NY). 1993;260(5110):920-6.
59. Mishra R, Bishop T, Valerio IL, Fisher JP, Dean D. The potential impact of bone tissue engineering in the clinic. *Regenerative medicine*. 2016;11(6):571-87.
60. Lavik E, Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*. 2004;65(1):1-8.
61. Mravic M, Péault B, James AW. Current trends in bone tissue engineering. *BioMed research international*. 2014;2014.
62. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine*. 2011;9(1):66.
63. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*. 2008;89(5):338-44.
64. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*. 2011;42:S77-S81.

65. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2014;9(1):18.
66. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*. 2003;22(1):81-91.
67. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36(3):S20-S7.
68. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*. 2012;30(10):546-54.
69. Berner A, Reichert JC, Müller MB, Zellner J, Pfeifer C, Dienstknecht T, et al. Treatment of long bone defects and non-unions: from research to clinical practice. *Cell and tissue research*. 2012;347(3):501-19.
70. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept—open questions. *Injury*. 2008;39:S5-S8.
71. Groll J, Boland T, Blunk T, Burdick JA, Cho D-W, Dalton PD, et al. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. 2016;8(1):013001.
72. Lei B, Guo B, Rambhia KJ, Ma PX. Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration. *Frontiers of medicine*. 2019;13(2):189-201.
73. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(4):581-603.
74. Jessop ZM, Al-Sabah A, Gardiner MD, Combella E, Hawkins K, Whitaker IS. 3D bioprinting for reconstructive surgery: Principles, applications and challenges. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2017;70(9):1155-70.
75. Dzobo K, Motaung K, Adesida A. Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18).
76. Javaid M, Haleem A. Additive manufacturing applications in orthopaedics: a review. *Journal of clinical orthopaedics and trauma*. 2018;9(3):202-6.
77. Orciani M, Fini M, Di Primio R, Mattioli-Belmonte M. Biofabrication and Bone Tissue Regeneration: Cell Source, Approaches, and Challenges. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2017;5:17.

78. Horch RE, Weigand A, Wajant H, Groll J, Boccaccini AR, Arkudas A. [Biofabrication: new approaches for tissue regeneration]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe* 2018;50(2):93-100.
79. Moroni L, Boland T, Burdick JA, De Maria C, Derby B, Forgacs G, et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol.* 2018;36(4):384-402.
80. Koons GL, Mikos AG. Progress in three-dimensional printing with growth factors. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2019;295:50-9.
81. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A, West JL, Bashir RJArobe. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. 2014;16:247-76.
82. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications.* 2017;78:1246-62.
83. Mota C, Puppi D, Chiellini F, Chiellini E. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2015;9(3):174-90.
84. Serra T, Mateos-Timoneda MA, Planell JA, Navarro M. 3D printed PLA-based scaffolds: a versatile tool in regenerative medicine. *Organogenesis.* 2013;9(4):239-44.
85. Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW. [Scaffold-based Bone Tissue Engineering]. *Orthopade.* 2017;46(8):701-10.
86. An J, Teoh JEM, Suntornnond R, Chua CK. Design and 3D printing of scaffolds and tissues. *Engineering.* 2015;1(2):261-8.
87. Jariwala SH, Lewis GS, Bushman ZJ, Adair JH, Donahue HJ. 3D Printing of Personalized Artificial Bone Scaffolds. *3D printing and additive manufacturing.* 2015;2(2):56-64.
88. Tappa K, Jammalamadaka U. Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *Journal of functional biomaterials.* 2018;9(1).

89. Krujatz F, Lode A, Seidel J, Bley T, Gelinsky M, Steingroewer J. Additive Biotech-Chances, challenges, and recent applications of additive manufacturing technologies in biotechnology. *New biotechnology*. 2017;39(Pt B):222-31.
90. Zhang XY, Fang G, Zhou J. Additively Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering and the Prediction of their Mechanical Behavior: A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2017;10(1).
91. Smith BD, Grande DA. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11(4):213-22.
92. O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*. 2011;14(3):88-95.
93. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*. 2010;3(3):1863-87.
94. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia*. 2012;8(9):3191-200.
95. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatric research*. 2008;63(5):492.
96. Dong C, Lv Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*. 2016;8(2).
97. Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, et al. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3).
98. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 2000;38(2):211-8.
99. Kolacna L, Bakesova J, Varga F, Kostakova E, Planka L, Necas A, et al. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. *Physiological research*. 2007;56 Suppl 1:S51-60.
100. Curry AS, Pensa NW, Barlow AM, Bellis SL. Taking cues from the extracellular matrix to design bone-mimetic regenerative scaffolds. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2016;52-54:397-412.

101. Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers*. 2010;2(4):522-53.
102. Tokiwa Y, Calabia BP. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied microbiology and biotechnology*. 2006;72(2):244-51.
103. Singhvi M, Zinjarde S, Gokhale DJJoam. *Poly-Lactic acid (PLA): synthesis and biomedical applications*. 2019.
104. Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:153-62.
105. Balk M, Behl M, Wischke C, Zotzmann J, Lendlein A. Recent advances in degradable lactide-based shape-memory polymers. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:136-52.
106. Guduric V, Metz C, Siadous R, Bareille R, Levato R, Engel E, et al. Layer-by-layer bioassembly of cellularized polylactic acid porous membranes for bone tissue engineering. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2017;28(5):78.
107. Ritz U, Gerke R, Gotz H, Stein S, Rommens PM. A New Bone Substitute Developed from 3D-Prints of Polylactide (PLA) Loaded with Collagen I: An In Vitro Study. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12).
108. Poh PSP, Chhaya MP, Wunner FM, De-Juan-Pardo EM, Schilling AF, Schantz JT, et al. Polylactides in additive biomanufacturing. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:228-46.
109. da Silva D, Kaduri M, Poley M, Adir O, Krinsky N, Shainsky-Roitman J, et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. 2018;340:9-14.
110. Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:367-92.
111. Santoro M, Shah SR, Walker JL, Mikos AG. Poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:206-12.
112. Narayanan G, Vernekar VN, Kuyinu EL, Laurencin CT. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:247-76.

113. Dedukh N, Makarov V, Pavlov AJPJS. Polylactide-based biomaterial and its use as bone implants (analytical literature review). 2019;9(1):28-35.
114. Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, Jardini AL, Maciel Filho RJBa. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. 2012;30(1):321-8.
115. Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. J Nanobiotechnology. 2011;9:55.
116. Castro-Aguirre E, Iniguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly(lactic acid)-Mass production, processing, industrial applications, and end of life. Advanced drug delivery reviews. 2016;107:333-66.
117. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. La Chirurgia degli organi di movimento. 2008;92(3):161-8.
118. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science (New York, NY). 1965;150(3698):893-9.
119. Cui Q, Dighe AS, Irvine JN, Jr. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering. Current pharmaceutical design. 2013;19(19):3374-83.
120. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? Injury. 2007;38 Suppl 1:S11-25.
121. Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. Injury. 2009;40:S1-S3.
122. Argintar E, Edwards S, Delahay J. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. Injury. 2011;42(8):730-4.
123. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth factors (Chur, Switzerland). 2004;22(4):233-41.
124. Dumic-Cule I, Peric M, Kucko L, Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. International orthopaedics. 2018;42(11):2619-26.
125. Giannoudis PV, Dinopoulos HT. BMPs: Options, indications, and effectiveness. Journal of orthopaedic trauma. 2010;24 Suppl 1:S9-16.
126. Huntley R, Jensen E, Gopalakrishnan R, Mansky KC. Bone morphogenetic proteins: Their role in regulating osteoclast differentiation. Bone reports. 2019;10:100207.

127. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International orthopaedics*. 2011;35(9):1271-80.
128. Garg P, Mazur MM, Buck AC, Wandtke ME, Liu J, Ebraheim NA. Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts. *Orthopaedic surgery*. 2017;9(1):13-9.
129. Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of oral science*. 2003;45(2):57-73.
130. Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S4-7.
131. Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J. BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget*. 2016;7(47):78206-18.
132. ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Current medical research and opinion*. 2006;22 Suppl 1:S7-11.
133. Leboy PS. Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1068:14-8.
134. Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Mueller TD. Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20(5-6):367-77.
135. Yang J, Shi P, Tu M, Wang Y, Liu M, Fan F, et al. Bone morphogenetic proteins: Relationship between molecular structure and their osteogenic activity. *Food Science and Human Wellness*. 2014;3(3-4):127-35.
136. Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of cellular physiology*. 2002;191(1):1-16.
137. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes & development*. 2005;19(23):2783-810.
138. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(7).
139. Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochemistry and cell biology*. 2018;149(4):313-23.
140. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(9):1659-63.

141. Dirckx N, Van Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. Birth defects research Part C, Embryo today : reviews. 2013;99(3):170-91.
142. Jonason JH, Xiao G, Zhang M, Xing L, Chen D. Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage. J Dent Res. 2009;88(8):693-703.
143. Kloen P, Lauzier D, Hamdy RC. Co-expression of BMPs and BMP-inhibitors in human fractures and non-unions. Bone. 2012;51(1):59-68.
144. Cecchi S, Bennet SJ, Arora M. Bone morphogenetic protein-7: Review of signalling and efficacy in fracture healing. J Orthop Translat. 2016;4:28-34.
145. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. Advanced drug delivery reviews. 2015;94:3-12.
146. European Medicines Agency. Osigraft (Internet). European Medicines Agency. Letzte Aktualisierung: 27.07.2016. Zitiert am 01.04.2020. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/osigraft>.
147. Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. Injury. 2009;40 Suppl 3:S67-76.
148. Schmidmaier G, Schwabe P, Wildemann B, Haas N. Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. Injury. 2007;38:S35-S41.
149. Krishnakumar GS, Roffi A, Reale D, Kon E, Filardo G. Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. International orthopaedics. 2017;41(6):1073-83.
150. Yellowley C. CXCL12/CXCR4 signaling and other recruitment and homing pathways in fracture repair. BoneKEy reports. 2013;2(3).
151. Wong VW, Crawford JD. Vasculogenic cytokines in wound healing. BioMed research international. 2013;2013:190486.
152. Martins-Green M, Petreaca M, Wang L. Chemokines and their receptors are key players in the orchestra that regulates wound healing. Advances in wound care. 2013;2(7):327-47.
153. Gronthos S, Zannettino AC. The role of the chemokine CXCL12 in osteoclastogenesis. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2007;18(3):108-13.

154. Kawaguchi N, Zhang TT, Nakanishi T. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells*. 2019;8(2).
155. Hocking AM. The Role of Chemokines in Mesenchymal Stem Cell Homing to Wounds. *Advances in wound care*. 2015;4(11):623-30.
156. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007;50(3):274-80.
157. Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;292(3):C987-95.
158. Rankin SM. Chemokines and adult bone marrow stem cells. *Immunology letters*. 2012;145(1-2):47-54.
159. Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, et al. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*. 2006;38(4):497-508.
160. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(36):23169-75.
161. De Francesco EM, Sotgia F, Clarke RB, Lisanti MP, Maggiolini M. G Protein-Coupled Receptors at the Crossroad between Physiologic and Pathologic Angiogenesis: Old Paradigms and Emerging Concepts. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12):2713.
162. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(2):57-63.
163. Janssens R, Struyf S, Proost P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(4):299-311.
164. Lau TT, Wang D-A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert opinion on biological therapy*. 2011;11(2):189-97.
165. Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*. 2004;35(3):233-45.

166. Kawakami Y, Li M, Matsumoto T, Kuroda R, Kuroda T, Kwon SM, et al. SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2015;30(1):95-105.
167. Ho CY, Sanghani A, Hua J, Coathup M, Kalia P, Blunn G. Mesenchymal stem cells with increased stromal cell-derived factor 1 expression enhanced fracture healing. *Tissue engineering Part A*. 2015;21(3-4):594-602.
168. Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Frontiers in immunology*. 2015;6:301.
169. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World journal of stem cells*. 2016;8(3):73-87.
170. Liu X, Duan B, Cheng Z, Jia X, Mao L, Fu H, et al. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein & cell*. 2011;2(10):845-54.
171. Le Noble F, Le Noble J. Bone biology: Vessels of rejuvenation. *Nature*. 2014;507(7492):313-4.
172. Herrmann M, Verrier S, Alini M. Strategies to Stimulate Mobilization and Homing of Endogenous Stem and Progenitor Cells for Bone Tissue Repair. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2015;3:79.
173. Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Calzi SL, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(3):605-18.
174. Hosogane N, Huang Z, Rawlins BA, Liu X, Boachie-Adjei O, Boskey AL, et al. Stromal derived factor-1 regulates bone morphogenetic protein 2-induced osteogenic differentiation of primary mesenchymal stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(7):1132-41.
175. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2003;18(8):1404-18.
176. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *BioMed research international*. 2013;2013.

177. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine*. 2004;10(8):858-64.
178. Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2007;33(2):159-64.
179. Dutt P, Wang JF, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1 alpha and stem cell factor/kit ligand share signaling pathways in hemopoietic progenitors: a potential mechanism for cooperative induction of chemotaxis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;161(7):3652-8.
180. Otsuka S, Bebb G. The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2008;3(12):1379-83.
181. Walenkamp AME, Lapa C, Herrmann K, Wester HJ. CXCR4 Ligands: The Next Big Hit? *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2017;58(Suppl 2):77s-82s.
182. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem cells*. 2008;26(1):223-34.
183. Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone*. 2005;36(5):840-53.
184. Maes C. Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcified tissue international*. 2013;92(4):307-23.
185. Jin Q, Giannobile WV. SDF-1 enhances wound healing of critical-sized calvarial defects beyond self-repair capacity. *PloS one*. 2014;9(5):e97035.
186. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;561:109-17.
187. Stanovici J, Le Nail LR, Brennan MA, Vidal L, Trichet V, Rosset P, et al. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Current research in translational medicine*. 2016;64(2):83-90.
188. Xu X, Zhu F, Zhang M, Zeng D, Luo D, Liu G, et al. Stromal cell-derived factor-1 enhances wound healing through recruiting bone marrow-derived mesenchymal

- stem cells to the wound area and promoting neovascularization. *Cells, tissues, organs*. 2013;197(2):103-13.
189. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323.
190. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676.
191. Li Y, Chen S-K, Li L, Qin L, Wang X-L, Lai Y-X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of orthopaedic translation*. 2015;3(3):95-104.
192. Nunamaker D. Experimental models of fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 1998;355:S56-S65.
193. O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *JBJS*. 2008;90(Supplement\_1):79-84.
194. Kim J-H, Kim H-W. Rat defect models for bone grafts and tissue engineered bone constructs. *Tissue engineering and regenerative medicine*. 2013;10(6):310-6.
195. Turner AS. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *European cells & materials*. 2001;1(66-81):13.
196. Tsukamoto T, Pape HC. Animal models for trauma research: what are the options? *Shock*. 2009;31(1):3-10.
197. Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiological reviews*. 2001;81(1):419-47.
198. Hietala EL. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. *Bone Miner*. 1993;20(1):57-65.
199. Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;328(3):688-96.
200. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, et al. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2008;14(1):79-88.

201. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*. 2007;28(29):4240-50.
202. da Silva Morais A, Oliveira JM, Reis RL. Small Animal Models. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1059:423-39.
203. Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(2):263-71.
204. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury*. 2008;39(10):1119-26.
205. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clinical oral implants research*. 2014;25(8):879-93.
206. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*. 1986(205):299-308.
207. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*. 2012;7(10):1918.
208. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- $\beta$  isoforms. *Plastic and reconstructive surgery*. 2000;106(2):360-71.
209. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*. 1991;9(5):641-50.
210. Belk L, Tellisi N, Macdonald H, Erdem A, Ashammakhi N, Pountos I. Safety Considerations in 3D Bioprinting Using Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020;8:924.
211. Zhang B, Zhang PB, Wang ZL, Lyu ZW, Wu H. Tissue-engineered composite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite nanoparticles seeded with autologous mesenchymal stem cells for bone regeneration. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18(11):963-76.

212. Jones EA, Giannoudis PV, Kouroupis D. Bone repair with skeletal stem cells: rationale, progress to date and clinical application. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016;8(3):57-71.
213. Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Frontiers in bioengineering and biotechnology.* 2018;6:105.
214. Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):795-803.
215. Bunpetch V, Zhang ZY, Zhang X, Han S, Zongyou P, Wu H, et al. Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration. *Biomaterials.* 2019;196:67-79.
216. Kangari P, Talaei-Khozani T, Razeghian-Jahromi I, Razmkhah M. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):492.
217. Lyons FG, Al-Munajjed AA, Kieran SM, Toner ME, Murphy CM, Duffy GP, et al. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials.* 2010;31(35):9232-43.
218. Zheng C, Chen J, Liu S, Jin Y. Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation. *Int J Oral Sci.* 2019;11(3):23.
219. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Advanced drug delivery reviews.* 2012;64(12):1292-309.
220. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews.* 2007;59(4-5):339-59.
221. Huang CL, Lee WL, Loo JS. Drug-eluting scaffolds for bone and cartilage regeneration. *Drug Discov Today.* 2014;19(6):714-24.
222. Vasita R, Katti DS. Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Rev Med Devices.* 2006;3(1):29-47.
223. Chen FM, Zhang M, Wu ZF. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(24):6279-308.

224. Dhawan A, Kennedy PM, Rizk EB, Ozbolat IT. Three-dimensional Bioprinting for Bone and Cartilage Restoration in Orthopaedic Surgery. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2019;27(5):e215-e26.
225. Vacaras S, Baciut M, Lucaciu O, Dinu C, Baciut G, Crisan L, et al. Understanding the basis of medical use of poly-lactide-based resorbable polymers and composites - a review of the clinical and metabolic impact. *Drug metabolism reviews*. 2019;51(4):570-88.
226. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:163-75.
227. Böstman O, Pihlajamäki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*. 2000;21(24):2615-21.
228. Chen D, Su Z, Weng L, Cao L, Chen C, Zeng S, et al. Effect of inflammation on endothelial cells induced by poly-L-lactic acid degradation in vitro and in vivo. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2018;29(15):1909-19.
229. Mastrokalos DS, Paessler HH. Allergic reaction to biodegradable interference poly-L-lactic acid screws after anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone graft. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2008;24(6):732-3.
230. Polimeni G, Koo KT, Pringle GA, Agelan A, Safadi FF, Wikesjö UM. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. *Clinical implant dentistry and related research*. 2008;10(2):99-105.
231. Mau LP, Cheng CW, Hsieh PY, Jones AA. Biological complication in guided bone regeneration with a polylactic acid membrane: a case report. *Implant dentistry*. 2012;21(3):171-4.
232. Saini P, Arora M, Kumar M. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;107:47-59.
233. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*. 2006;3(10):589-601.
234. Pawelec KM, Best SM, Cameron RE. Collagen: a network for regenerative medicine. *J Mater Chem B*. 2016;4(40):6484-96.

235. Bierbaum S, Hintze V, Scharnweber D. Functionalization of biomaterial surfaces using artificial extracellular matrices. *Biomatter*. 2012;2(3):132-41.
236. Castro AP, Laity P, Shariatzadeh M, Wittkowske C, Holland C, Lacroix D. Combined numerical and experimental biomechanical characterization of soft collagen hydrogel substrate. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2016;27(4):79.
237. Busby GA, Grant MH, Mackay SP, Riches PE. Confined compression of collagen hydrogels. *Journal of biomechanics*. 2013;46(4):837-40.
238. Dewey MJ, Johnson EM, Weisgerber DW, Wheeler MB, Harley BAC. Shape-fitting collagen-PLA composite promotes osteogenic differentiation of porcine adipose stem cells. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019;95:21-33.
239. Teixeira BN, Aprile P, Mendonça RH, Kelly DJ, Thiré R. Evaluation of bone marrow stem cell response to PLA scaffolds manufactured by 3D printing and coated with polydopamine and type I collagen. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2019;107(1):37-49.
240. Bardakova KN, Grebenik EA, Istranova EV, Istranov LP, Gerasimov YV, Grosheva AG, et al. Reinforced Hybrid Collagen Sponges for Tissue Engineering. *Bull Exp Biol Med*. 2018;165(1):142-7.
241. Setayeshmehr M, Esfandiari E, Rafieinia M, Hashemibeni B, Taheri-Kafrani A, Samadikuchaksaraei A, et al. Hybrid and Composite Scaffolds Based on Extracellular Matrices for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2019;25(3):202-24.
242. Babilotte J, Guduric V, Le Nihouannen D, Naveau A, Fricain JC, Catros S. 3D printed polymer-mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2019;107(8):2579-95.
243. Wuisman PI, Smit TH. Bioresorbable polymers: heading for a new generation of spinal cages. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2006;15(2):133-48.
244. Haaparanta AM, Järvinen E, Cengiz IF, Ellä V, Kokkonen HT, Kiviranta I, et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2014;25(4):1129-36.

245. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(2):184-98.
246. Stratton S, Shelke NB, Hoshino K, Rudraiah S, Kumbar SG. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive materials*. 2016;1(2):93-108.
247. Uzun N, Martins TD, Teixeira GM, Cunha NL, Oliveira RB, Nassar EJ, et al. Poly(L-lactic acid) membranes: absence of genotoxic hazard and potential for drug delivery. *Toxicology letters*. 2015;232(2):513-8.
248. Teixeira SP, Domingues RM, Shevchuk M, Gomes ME, Peppas NA, Reis RL. Biomaterials for Sequestration of Growth Factors and Modulation of Cell Behavior. *Advanced Functional Materials*. 2020:1909011.
249. Vaibhav B, Nilesh P, Vikram S, Anshul C. Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: a current concept update. *Injury*. 2007;38(11):1227-35.
250. Kowalczewski CJ, Saul JM. Biomaterials for the Delivery of Growth Factors and Other Therapeutic Agents in Tissue Engineering Approaches to Bone Regeneration. *Front Pharmacol*. 2018;9:513.
251. Zhao W, Jin K, Li J, Qiu X, Li S. Delivery of stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  for in situ tissue regeneration. *Journal of biological engineering*. 2017;11:22.
252. Giannoudis PV, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S47-50.
253. Dai J, Li L, Jiang C, Wang C, Chen H, Chai Y. Bone Morphogenetic Protein for the Healing of Tibial Fracture: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PloS one*. 2015;10(10):e0141670.
254. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.
255. Haubruck P, Tanner MC, Vlachopoulos W, Hagelskamp S, Miska M, Ober J, et al. Comparison of the clinical effectiveness of Bone Morphogenetic Protein (BMP) -2 and -7 in the adjunct treatment of lower limb nonunions. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2018;104(8):1241-8.
256. Hackl S, Hierholzer C, Friederichs J, Woltmann A, Bühren V, von Räden C. Long-term outcome following additional rhBMP-7 application in revision surgery of aseptic humeral, femoral, and tibial shaft nonunion. *BMC musculoskeletal disorders*. 2017;18(1):342.

257. Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, Burssens P, De Biase P, Capanna R, et al. Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience. *Injury*. 2008;39:S83-S90.
258. Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, Verdonk R, Blokhuis TJ, Cherubino P, et al. Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S54-61.
259. Nauth A, Ristevski B, Li R, Schemitsch EH. Growth factors and bone regeneration: how much bone can we expect? *Injury*. 2011;42(6):574-9.
260. von Ruden C, Morgenstern M, Hierholzer C, Hackl S, Gradinger FL, Woltmann A, et al. The missing effect of human recombinant Bone Morphogenetic Proteins BMP-2 and BMP-7 in surgical treatment of aseptic forearm nonunion. *Injury*. 2016;47(4):919-24.
261. Calori GM, Colombo M, Bucci M, Mazza EL, Fadigati P, Mazzola S. Clinical effectiveness of Osigraft in long-bones non-unions. *Injury*. 2015;46 Suppl 8:S55-64.
262. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;2010(6):Cd006950.
263. Moghaddam A, Elleser C, Biglari B, Wentzensen A, Zimmermann G. Clinical application of BMP 7 in long bone non-unions. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2010;130(1):71-6.
264. von Ruden C, Morgenstern M, Friederichs J, Augat P, Hackl S, Woltmann A, et al. Comparative study suggests that human bone morphogenetic proteins have no influence on the outcome of operative treatment of aseptic clavicle non-unions. *International orthopaedics*. 2016;40(11):2339-45.
265. Courvoisier A, Sailhan F, Laffenêtre O, Obert L. Bone morphogenetic protein and orthopaedic surgery: can we legitimate its off-label use? *International orthopaedics*. 2014;38(12):2601-5.
266. Ronga M, Fagetti A, Canton G, Paiusco E, Surace MF, Cherubino P. Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S34-9.
267. Chen P, Tao J, Zhu S, Cai Y, Mao Q, Yu D, et al. Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. *Biomaterials*. 2015;39:114-23.

268. Wang Y, Sun X, Lv J, Zeng L, Wei X, Wei L. Stromal Cell-Derived Factor-1 Accelerates Cartilage Defect Repairing by Recruiting Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Promoting Chondrogenic Differentiation. *Tissue engineering Part A*. 2017;23(19-20):1160-8.
269. Takayama T, Dai J, Tachi K, Shohara R, Kasai H, Imamura K, et al. The potential of stromal cell-derived factor-1 delivery using a collagen membrane for bone regeneration. *Journal of biomaterials applications*. 2017;31(7):1049-61.
270. Kucia M, Reza R, Miekus K, Wazbeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1–CXCR4 axis. *Stem cells*. 2005;23(7):879-94.
271. Puchert M, Engele J. The peculiarities of the SDF-1/CXCL12 system: in some cells, CXCR4 and CXCR7 sing solos, in others, they sing duets. *Cell Tissue Res*. 2014;355(2):239-53.
272. Okada K, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Kurashimo S, Okumoto K, et al. Stromal cell-derived factor-1 mediates changes of bone marrow stem cells during the bone repair process. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2016;310(1):E15-23.
273. Yang F, Xue F, Guan J, Zhang Z, Yin J, Kang Q. Stromal-Cell-Derived Factor (SDF) 1-Alpha Overexpression Promotes Bone Regeneration by Osteogenesis and Angiogenesis in Osteonecrosis of the Femoral Head. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;46(6):2561-75.
274. Chen G, Lv Y. Matrix elasticity-modified scaffold loaded with SDF-1 $\alpha$  improves the in situ regeneration of segmental bone defect in rabbit radius. *Sci Rep*. 2017;7(1):1672.
275. Gilbert W, Bragg R, Elmansi AM, McGee-Lawrence ME, Isaacs CM, Hamrick MW, et al. Stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) and its role in bone and muscle biology. *Cytokine*. 2019;123:154783.
276. Ritz U, Kögler P, Höfer I, Frank P, Klees S, Gebhard S, et al. Photocrosslinkable polysaccharide hydrogel composites based on dextran or pullulan-amylose blends with cytokines for a human co-culture model of human osteoblasts and endothelial cells. *J Mater Chem B*. 2016;4(40):6552-64.

277. Eman RM, Oner FC, Kruyt MC, Dhert WJ, Alblas J. Stromal cell-derived factor-1 stimulates cell recruitment, vascularization and osteogenic differentiation. *Tissue engineering Part A*. 2014;20(3-4):466-73.
278. Huang J, Chi H, Chi H, Qiu L, Wang Y, Qiu Z, et al. Stromal Cell-Derived Factor 1 Promotes Cell Migration to Enhance Bone Regeneration After Hypoxic Preconditioning. *Tissue engineering Part A*. 2019;25(17-18):1300-9.
279. Chang YL, Hsieh CY, Yeh CY, Lin FH. The Development of Gelatin/Hyaluronate Copolymer Mixed with Calcium Sulfate, Hydroxyapatite, and Stromal-Cell-Derived Factor-1 for Bone Regeneration Enhancement. *Polymers*. 2019;11(9).
280. Cipitria A, Boettcher K, Schoenhals S, Garske DS, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A, et al. In-situ tissue regeneration through SDF-1 $\alpha$  driven cell recruitment and stiffness-mediated bone regeneration in a critical-sized segmental femoral defect. *Acta biomaterialia*. 2017;60:50-63.
281. Liu H, Li M, Du L, Yang P, Ge S. Local administration of stromal cell-derived factor-1 promotes stem cell recruitment and bone regeneration in a rat periodontal bone defect model. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2015;53:83-94.
282. Bach DH, Park HJ, Lee SK. The Dual Role of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer. *Molecular therapy oncolytics*. 2018;8:1-13.
283. Bami M, Mavrogenis AF, Angelini A, Milonaki M, Mitsiokapa E, Stamoulis D, et al. Bone morphogenetic protein signaling in musculoskeletal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(10):2061-72.
284. Jiramongkolchai P, Owens P, Hong CC. Emerging roles of the bone morphogenetic protein pathway in cancer: potential therapeutic target for kinase inhibition. *Biochemical Society transactions*. 2016;44(4):1117-34.
285. Pickup MW, Owens P, Moses HL. TGF- $\beta$ , Bone Morphogenetic Protein, and Activin Signaling and the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(5).
286. Nguyen A, Scott MA, Dry SM, James AW. Roles of bone morphogenetic protein signaling in osteosarcoma. *International orthopaedics*. 2014;38(11):2313-22.
287. Meng W, Xue S, Chen Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene*. 2018;641:105-10.

288. Williams JC, Maitra S, Anderson MJ, Christiansen BA, Reddi AH, Lee MA. BMP-7 and Bone Regeneration: Evaluation of Dose-Response in a Rodent Segmental Defect Model. *Journal of orthopaedic trauma*. 2015;29(9):e336-41.
289. Högel F, Hoffmann S, Hungerer S, Fleischacker E, Ullmann T, Betz OB, et al. Bone healing of critical size defects of the rat femur after the application of bone marrow aspirate and two different rh-BMP7 concentrations. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2015;41(5):557-63.
290. Zwingenberger S, Yao Z, Jacobi A, Vater C, Valladares RD, Li C, et al. Enhancement of BMP-2 induced bone regeneration by SDF-1 $\alpha$  mediated stem cell recruitment. *Tissue engineering Part A*. 2014;20(3-4):810-8.
291. Wegman F, Poldervaart MT, van der Helm YJ, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J. Combination of bone morphogenetic protein-2 plasmid DNA with chemokine CXCL12 creates an additive effect on bone formation onset and volume. *European cells & materials*. 2015;30:1-10; discussion -1.
292. Higashino K, Viggewarapu M, Bargouti M, Liu H, Titus L, Boden SD. Stromal cell-derived factor-1 potentiates bone morphogenetic protein-2 induced bone formation. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(3-4):523-30.
293. Zhu W, Boachie-Adjei O, Rawlins BA, Frenkel B, Boskey AL, Ivashkiv LB, et al. A novel regulatory role for stromal-derived factor-1 signaling in bone morphogenetic protein-2 osteogenic differentiation of mesenchymal C2C12 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(26):18676-85.
294. Dahabreh Z, Dimitriou R, Giannoudis PV. Health economics: a cost analysis of treatment of persistent fracture non-unions using bone morphogenetic protein-7. *Injury*. 2007;38(3):371-7.
295. Jäger M, Wassenaar D, Busch A, Haversath M. [Pseudarthroses]. *Orthopade*. 2020;49(6):547-60.
296. Grechenig S, Pfeifer C, Krutsch W, Hilber F, Nerlich M, Berner A. [Complication management for failed bone fracture healing: pseudarthrosis]. *Chirurg*. 2015;86(10):919-24.
297. Farokhi M, Mottaghitalab F, Shokrgozar MA, Ou KL, Mao C, Hosseinkhani H. Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;225:152-69.

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen wissenschaftlicher Veröffentlichungen vorveröffentlicht.

### Publikation

**A Lauer**, P Wolf, D Mehler, H Götz, M Rüzgar, A Baranowski, D Henrich, PM Rommens, U Ritz, *Biofabrication of SDF-1 Functionalized 3D-Printed Cell-Free Scaffolds for Bone Tissue Regeneration*, 2020, International Journal of Molecular Sciences

### Vorträge

1. U Ritz, **A Lauer**, P Wolf, M Rüzgar, R Gerke, H Götz, S Stein, PM Rommens. Evaluierung neuer Knochenersatzmaterialien aus 3D-gedrucktem Polylactide modifiziert mit Kollagen I und SDF-1 VIII. Münchener Symposium für experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und muskuloskelettale Forschung, 2. -3. März 2018, München
2. U Ritz, **A Lauer**, P Wolf, M Rüzgar, H Götz, A Klein, PM Rommens. A 3D printed biodegradable polylactide cage loaded with collagen I and growth factors (SDF-1, BMP-7 and tissue factor) for bone regeneration, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, 8. – 10. November 2018, Braunschweig
3. U Ritz, **A Lauer**, P Wolf, M Rüzgar, H Götz, A Klein, PM Rommens. A 3D printed biodegradable polylactide cage loaded with collagen I and growth factors (SDF-1 and BMP-7) for bone regeneration, Bone Innovation Summit, 13./14. Februar 2019, Lübeck
4. U Ritz, **A Lauer**, P Wolf, M Rüzgar, H Götz, A Klein, PM Rommens. A 3D printed biodegradable polylactide cage loaded with collagen I and growth factors (SDF-1 and BMP-7) for bone regeneration, VSOU, 2. – 4. Mai 2019, Baden-Baden

### Poster

1. P Wolf, **A Lauer**, M Rüzgar, R Gerke, H Götz, S Stein, PM Rommens, U Ritz, A New Bone Substitute Developed from 3D-Prints of Polylactide (PLA) Loaded with Collagen I, 3. Internationaler 3D-Print Kongress in der Medizin, 4.-5. Mai 2018, Mainz

2. **A Lauer**, P Wolf, M Rüzgar, A Ackermann, H Götz, PM Rommens, U Ritz, **A**  
*New Bone Substitute Developed from 3D-Prints of Polylactide (PLA) Loaded  
with Collagen I and SDF-1*, 22. Chirurgische Forschungstage Erlangen, 06.-08.  
September 2018, Erlangen



Article

## Biofabrication of SDF-1 Functionalized 3D-Printed Cell-Free Scaffolds for Bone Tissue Regeneration

Alina Lauer <sup>1</sup>, Philipp Wolf <sup>1</sup>, Dorothea Mehler <sup>1</sup>, Hermann Götz <sup>2</sup>, Mehmet Rüzgar <sup>1</sup>,  
Andreas Baranowski <sup>1</sup>, Dirk Henrich <sup>3</sup> , Pol Maria Rommens <sup>1</sup> and Ulrike Ritz <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Orthopaedics and Traumatology, BiomaTiCS, University Medical Center, Johannes Gutenberg University, 55131 Mainz, Germany; laueralina@rocketmail.com (A.L.); phwolf70@gmail.com (P.W.); dorothea.mehler@unimedizin-mainz.de (D.M.); ruezgar1969@gmail.com (M.R.); andreas.baranowski@unimedizin-mainz.de (A.B.); pol.rommens@unimedizin-mainz.de (P.M.R.)

<sup>2</sup> CBU—Cell Biology Unit, PKZI, University Medical Center, BiomaTiCS, Johannes Gutenberg University, 55131 Mainz, Germany; hgoetz@uni-mainz.de

<sup>3</sup> Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Goethe University Frankfurt, 60590 Frankfurt am Main, Germany; d.henrich@trauma.uni-frankfurt.de

\* Correspondence: ritz@uni-mainz.de; Tel: +49-613-117-2359

Received: 25 February 2020; Accepted: 20 March 2020; Published: 21 March 2020



**Abstract:** Large segmental bone defects occurring after trauma, bone tumors, infections or revision surgeries are a challenge for surgeons. The aim of our study was to develop a new biomaterial utilizing simple and cheap 3D-printing techniques. A porous polylactide (PLA) cylinder was printed and functionalized with stromal-derived factor 1 (SDF-1) or bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) immobilized in collagen type I. Biomechanical testing proved biomechanical stability and the scaffolds were implanted into a 6 mm critical size defect in rat femur. Bone growth was observed via x-ray and after 8 weeks, bone regeneration was analyzed with  $\mu$ CT and histological staining methods. Development of non-unions was detected in the control group with no implant. Implantation of PLA cylinder alone resulted in a slight but not significant osteoconductive effect, which was more pronounced in the group where the PLA cylinder was loaded with collagen type I. Addition of SDF-1 resulted in an osteoinductive effect, with stronger new bone formation. BMP-7 treatment showed the most distinct effect on bone regeneration. However, histological analyses revealed that newly formed bone in the BMP-7 group displayed a holey structure. Our results confirm the osteoinductive character of this 3D-biofabricated cell-free new biomaterial and raise new options for its application in bone tissue regeneration.

**Keywords:** bone tissue regeneration; 3D printed cell-free scaffold; polylactide; collagen type I; stromal-derived factor 1; in vivo model of critical size defects

### 1. Introduction

The overall risk of fractures resulting in non-unions lies between 2% and 30% depending on age, gender, type and site of fracture, soft tissue damage and secondary illnesses (e.g., diabetes). In particular, large segmental bone defects occurring after trauma, resection of bone tumors, debridement of infections and/or revision surgeries can result in non-unions [1,2]. The resulting pain and limitations in terms of activities of daily life that these patients are immense, and there is also economic harm. Costs for tibia non-unions are doubled when compared to those without a non-union [3]. Although much knowledge was acquired during the last years for reconstruction of bone defects, e.g., employing new methods such as reaming irrigation aspiration (RIA) or concerning management of infected non-unions [4,5], the gold standard in therapy is still autologous bone grafting. This therapy requires additional interventions and, consequently, is combined with the risk of surgical complications and

morbidity at the donor site. Moreover, the bone stock is limited [6]. Consequently, there is a high demand for new therapies capable of treating large segmental bone defects, which has led to great interest in bone tissue engineering. Different biodegradable and biocompatible materials employing various fabrication techniques have been developed and tested [7]. However, the optimal material fulfilling all clinical and mechanical requirements for a bone substitute in large diaphyseal defects still has to be found [8].

The 3D-printing techniques evolved in the last 20 years, leading to new optional materials for bone restoration. Currently, 3D printing, or 3D bioprinting, incorporating cells, extracellular matrix or bioactive molecules allows the fabrication of scaffolds with high structural complexity including pores of various sizes [9]. This relative new technique has already been applied in many fields of medicine including bone or cartilage restoration in dentistry or orthopedic surgery. The fabricated materials can be used as scaffolds for tissue regeneration, as prosthetic implants and/or as drug carriers [10].

Implan Table 3D-printed materials used as bone substitutes have to fulfill specific requirements: they need to be biocompatible, induce cell adhesion, proliferation and differentiation, be osteoconductive and, if possible, osteoinductive, demonstrate mechanical stability and be degradable with non-cytotoxic degradation products. Moreover, they should imitate extracellular matrix and it should be possible to either integrate cells or immobilize cytokines or growth factors. Many printable materials are available that can be used as bone substitute material, but the balancing act between stability, biocompatibility and degradation as well as mimicking the natural stiffness of bone is especially difficult. One solution could be composite materials combining stable structures with high stiffness and biomechanical stability with softer materials where bioactive molecules or cells can be included. Polymer filaments such as polylactide acid (PLA), polylactide (PDLLA), polycaprolactone (PCL), polypropylene fumarate (PPF), and polyether ether ketone (PEEK) can be used as hard biocompatible materials. They can be printed with fused deposition modeling (FDM) printers, which are cheap and can be handled as desktop printers. The materials melt at a temperature of approximately 200 °C, are pressed through a print head and can then be printed individually. These hard materials can be combined with soft materials such as hydrogels made from natural polymers such as collagen, polysaccharides, cellulose, gelatin, and alginate hyaluronic acid. Most of these materials are bioactive and can be modified with growth factors and/or loaded with cells of various sources [10].

One of the most utilized polymers for 3D printing is PLA. It is biocompatible, biodegradable, non-toxic and due to its melting temperature, at approximately 175 °C, it can be easily applied for FDM printing [11]. PLA allows cell adhesion but is not bioactive itself [12,13]. One major concern in applying PLA is long-term biocompatibility, as during degradation, acidic products might occur and decrease the physiological pH. However, surface modifications change the degradation product pattern [14]. Therefore, PLA is often combined with other materials [13]. One advantage of PLA is its good mechanical stability, although its compressive strength is lower when compared to bone tissue. PLA can easily be combined with soft and bioactive materials. Many options exist, but collagen as an extracellular matrix protein is one of the most widely used soft materials in tissue engineering [15,16]. It is inexpensive, biocompatible and degraded in the body by collagenases releasing non-toxic and non-immunogenic peptides [17]. Collagen can easily be loaded with bioactive molecules [18]. Moreover, it has been used in composite materials, combining hard materials such as strontium containing glass particles and soft materials [19]. Cells can be incorporated as demonstrated by Lee et al., who used collagen as bioink supplemented with pre-osteoblasts [20]. Among others, we printed PLA and collagen to induce tissue regeneration in bone defects [21]. Martin et al. printed PLA and functionalized the scaffolds with collagen, minocycline and citrate hydroxyapatite nanoparticles [22]. They could show that these scaffolds stimulated adhesion, proliferation and osteogenesis-related gene expression of hMSCs. Dewey et al. fabricated a multi-scale mineralized collagen PLA composite, which promoted osteogenic differentiation of porcine adipose stem cells [23]. Teixeira et al. evaluated the BMSC response to PLA scaffolds modified with polydopamine and type I collagen [24]. All these studies demonstrate the potential of PLA and collagen in combination as bone substitute material.

Bone morphogenetic proteins (BMP) are a group of growth factors belonging to the transforming growth factor-beta superfamily. They demonstrate osteogenic properties and induce bone regeneration and fracture healing [25]. It has been demonstrated that BMP-7 is completely absent in non-unions [26], whereas it is present in physiological bone, suggesting its application as therapy for fracture healing or after appearance of non-unions. BMP-7 was tested in many studies, with different results, and partly approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) [27,28]. Some severe side effects such as heterotopic ossification, osteolysis and inflammation were described, and a reevaluation of its clinical use is currently taking place. One important aspect is the concentration administered, as extreme high doses were used in some studies without testing different concentrations [25,29]. BMP-7 has been used in 3D printing with PCL and beta-tricalcium-phosphate. These scaffolds were tested in a pig condyle defect model and showed good tissue ingrowth and bone regeneration [30].

Another promising factor to be incorporated in scaffolds to induce bone regeneration is the stromal-derived factor 1 (SDF-1). It demonstrates various biological functions such as regulating cell migration and cell growth. By recruiting endothelial progenitor cells from the bone marrow, SDF-1 demonstrates a crucial role in angiogenesis [31]. Concerning bone regeneration, it stimulates homing of bone marrow mesenchymal stem cells [32]. It can be incorporated in hydrogels and keep its functionality [33].

In our former *in vitro* study [21], we printed solid discs as well as three-dimensional porous cages such as structures of polylactide with an inexpensive desktop printer and coated or filled them with type I collagen. We showed that various different cells adhere and proliferate on the solid discs. We immobilized SDF-1 in the three-dimensional PLA-collagen composite and demonstrated an even release for 48 h. After 48 h, 50% of the immobilized amount remained in the scaffold. We also demonstrated the functionality of the released growth factor. The study also confirmed the biocompatibility of our composite as well as endotoxin contamination clearly below the FDA limit.

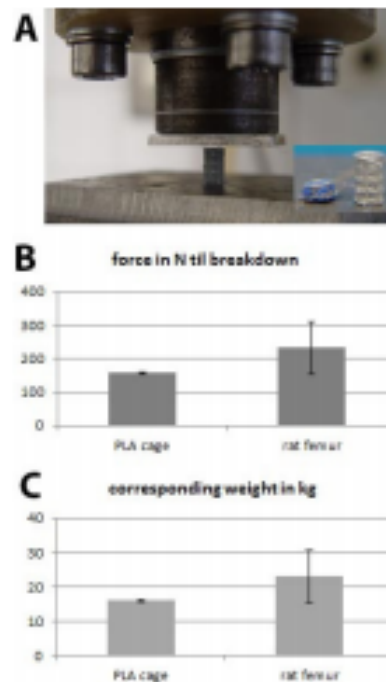
In this study, we performed the proof of concept by employing a femur defect model in the rat. Rat is a standard model to analyze bone regeneration. As recommended by Garcia et al., we created a non-union using a large segmental defect model without periosteal or endosteal injuries [34]. We used a femur defect with a critical size defect of 6 mm in rats 10 weeks of age. This represents a segmental defect which was stabilized with a fixation device (PEEK plate; Research Implant System, AO Foundation, Davos, Switzerland) and filled with our created bone substitute material. Together with mice, rats are the standard model to evaluate new materials for bone regeneration and to study bone physiology [35,36]. Their skeletons and bone biology including cells are similar to humans [37]. A defect size of 6 mm in rat femora represents a critical size defect as already described by others [38–40].

We printed a PLA cylinder corresponding in size and diameter to the defect set in the rat femur. We filled the cylinder with type I collagen, immobilized SDF-1 or BMP-7 into the collagen, implanted the composite material into the rat femur defect and analyzed bone regeneration after 8 weeks with  $\mu$ CT and histological analyzes.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Biomechanical Testing

Before the cylinders were implanted into rat femur osteotomy, they were tested for their mechanical stability using a pneumatic universal testing machine. Forces from 10 N to 500 N were applied with a frequency of 0.02 Hz until breakdown of the PLA cylinder (Figure 1A). The force applied until breakdown was 246 N  $\pm$  77 N for rat femora and 156 N  $\pm$  2 N for PLA cylinders. These values correspond to a bearing weight of 16 kg in the case of PLA cylinder and 24 kg concerning rat femur (Figure 1B,C).

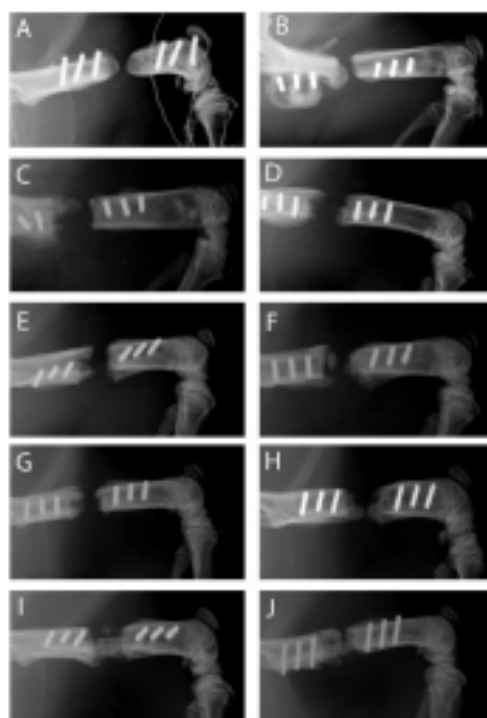


**Figure 1.** Biomechanical testing; (A) experimental setting; (B) applied force until breakdown of the polylactide acid (PLA) cage and rat femur and the (C) corresponding weight in kg.

The results show that the rat femur is more stable than 3D-printed polylactide. This was not surprising as it is known that PLA tends to brittle and demonstrates lower compressive strength compared to natural bone [10,41]. We decided that the mechanical stability of the PLA cylinder when combined with collagen would be sufficient to be used as bone substitute in the rat femur osteotomy especially as in our model the defect is stabilized with a PEEK plate and six screws.

## 2.2. Course of Bone Regeneration

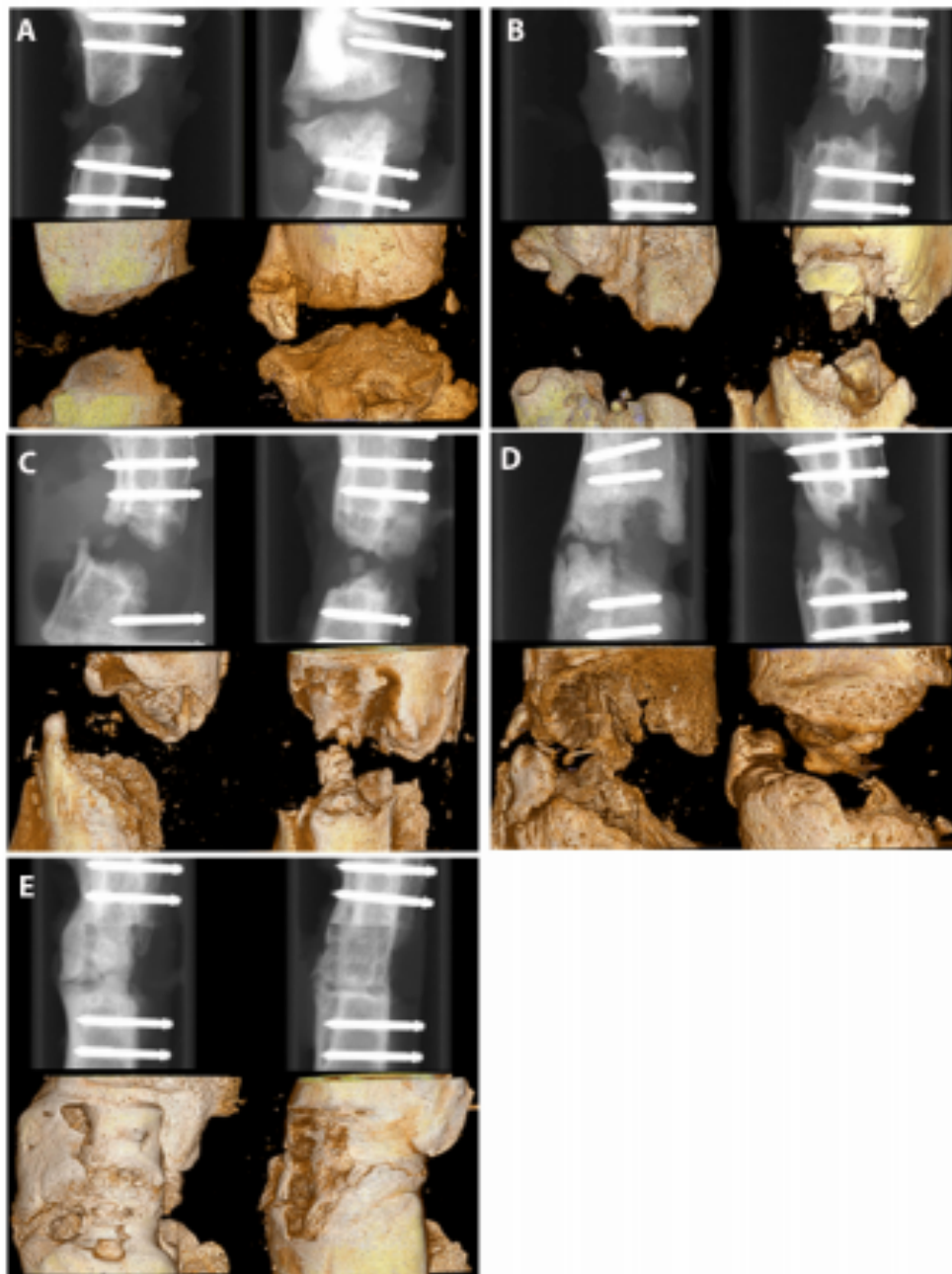
Rats were divided into five experimental groups (1: no implant; 2: PLA cylinder alone; 3: PLA cylinder + type I collagen; 4: PLA cylinder + type I collagen + SDF-1; 5: PLA cylinder + type I collagen + BMP-7) and operated as described in Methods. X-rays performed four weeks after surgery revealed heterogeneous results between the different groups. Observing the radiographs, one has to consider that neither the cylinder itself nor the stabilizing PEEK plate is visible. As shown in Figure 2, hardly any bone growth could be detected in groups 1 (no implant; Figure 2A,B), 2 (PLA cylinder alone; Figure 2C,D) and 3 (PLA cylinder + collagen type I; Figure 2E,F). In group 4 (PLA cylinder + collagen type I + SDF-1; Figure 2G,H), marginal bone growth at the edges of the defect can be detected. In group 5 (PLA cylinder + collagen type I + BMP-7; Figure 2I,J), bone growth through the cylinder was visible.



**Figure 2.** X-ray images of the different groups 4 weeks after surgery. Group 1—no implant—(A,B); 2—PLA cylinder alone—(C,D); 3—PLA cylinder + collagen type I—(E,F); 4—PLA cylinder + collagen type I + SDF-1—(G,H); 5—PLA cylinder + collagen type I + BMP-7—(I,J).

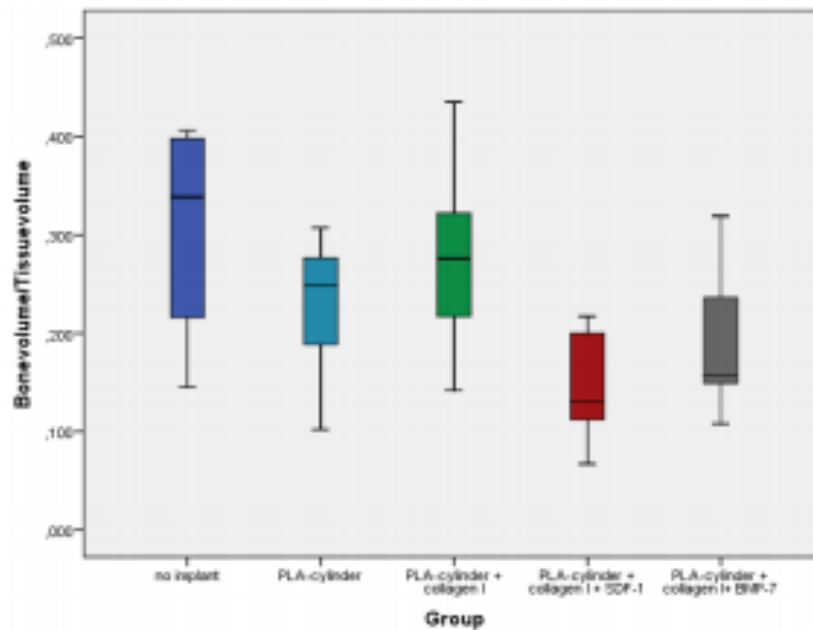
It is known that BMP-7 can induce bone regeneration already at a relative early time point [42]. Shi et al. observed an effect of SDF-1 already after 4 weeks [43], whereas only marginal bone regeneration could be observed after 4 weeks in our study. This different effect could be due to the material used. In contrast to our study, Shi et al. used demineralized bone matrix scaffolds as carrier systems, whereas we immobilized SDF-1 in collagen type I inside a PLA cylinder. These different materials and immobilization methods could be responsible for differences concerning the release and functionality of this chemokine.

Eight weeks after surgery, the animals were killed and x-rayed and the femora were excised for analyses employing  $\mu$ CT. As shown in Figure 3, more differences between the groups can be observed. In the group with no implant, development of non-unions is observed with the typical non-union formation described by Weber and Czech. No bridging of the fracture gap was seen (Figure 3A). In the group with PLA cylinder alone, a low osteoconductive effect can be observed (Figure 3B), which is more pronounced in the group where the cylinder is loaded with collagen type I (Figure 3C). In the group PLA+collagen+SDF-1, the fracture gap is almost closed, indicating a good osteoinductive effect of SDF-1 (Figure 3D). As already seen in the x-rays after 4 weeks, BMP-7 shows the most distinct effect on bone regeneration (Figure 3E).



**Figure 3.** X-ray images of the different groups 8 weeks after surgery. Group 1—no implant—(A); 2—PLA cylinder alone—(B); 3—PLA cylinder + collagen type 1—(C); 4—PLA cylinder + collagen type 1 + SDF-1—(D); 5—PLA cylinder + collagen type 1 + BMP-7—(E).

Quantitative analyses of bone volume to total volume ratio revealed partly opposite results (Figure 4). The best ratios were observed in the groups without implant and in the PLA group without growth factors.

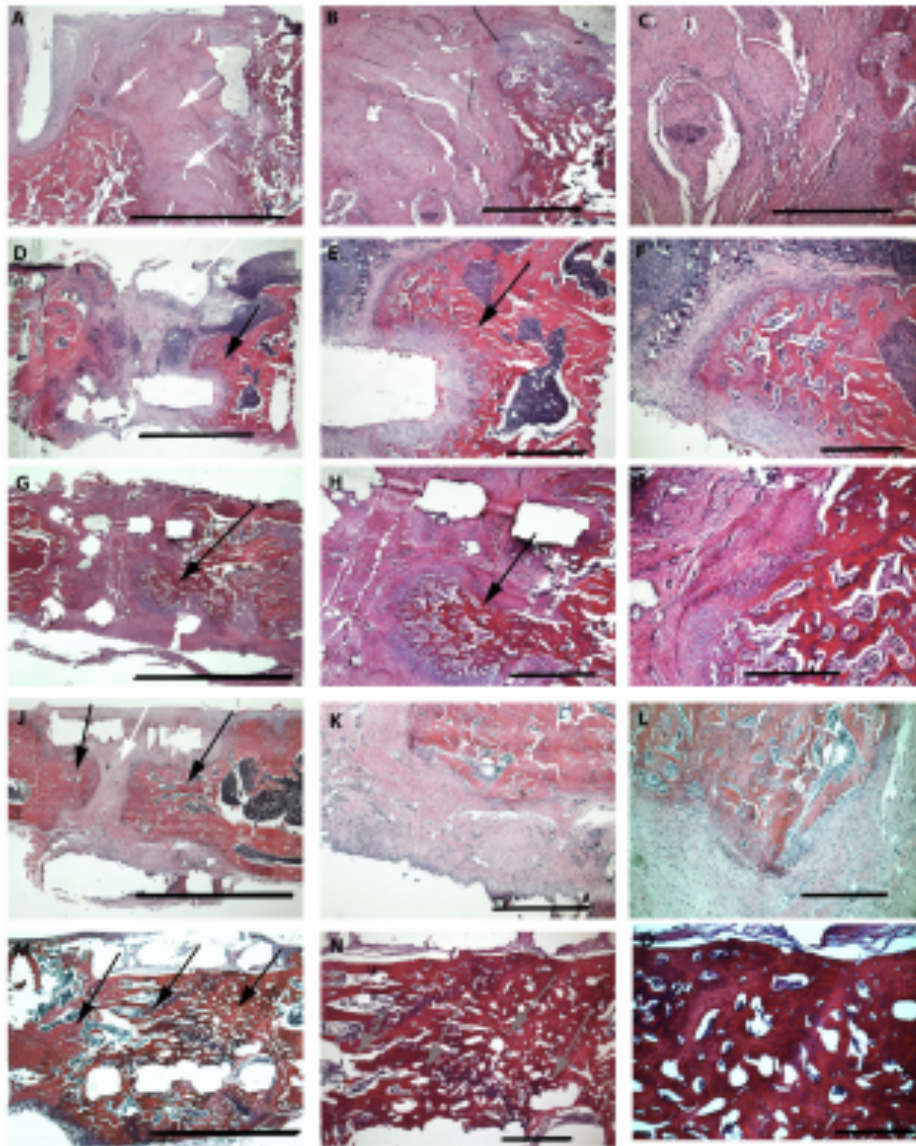


**Figure 4.** Quantitative analyses of bone volume/tissue volume ratios in the different groups 8 weeks after surgery.

Although these results seem to be surprising at first glance, they can be easily explained. First, we quantified overall bone formation. In particular, in groups with no growth factors, we observe non-physiological and non-directed bone formation, which we measure with the ratio of bone volume to total volume (BV/TV). Therefore, altogether, bone formation seems to be higher than in the groups with growth factors, where we observe directed bone formation aimed to close the fracture gap. The bone forms a callus, widening to the sides instead of growing straight through the fracture gap to close it, which is typical for complete or incomplete non-unions [44]. Second, the bone formed in the group without implant is a rather avital bone, probably consisting mostly of calcium-phosphate and much denser than the vital bone measured in the growth factor groups. These results illustrate that in this case, the quantitative analyses should be interpreted with caution and only in combination with imaging techniques such as  $\mu$ CT, X-ray and histology.

### 2.3. Histological Analyses

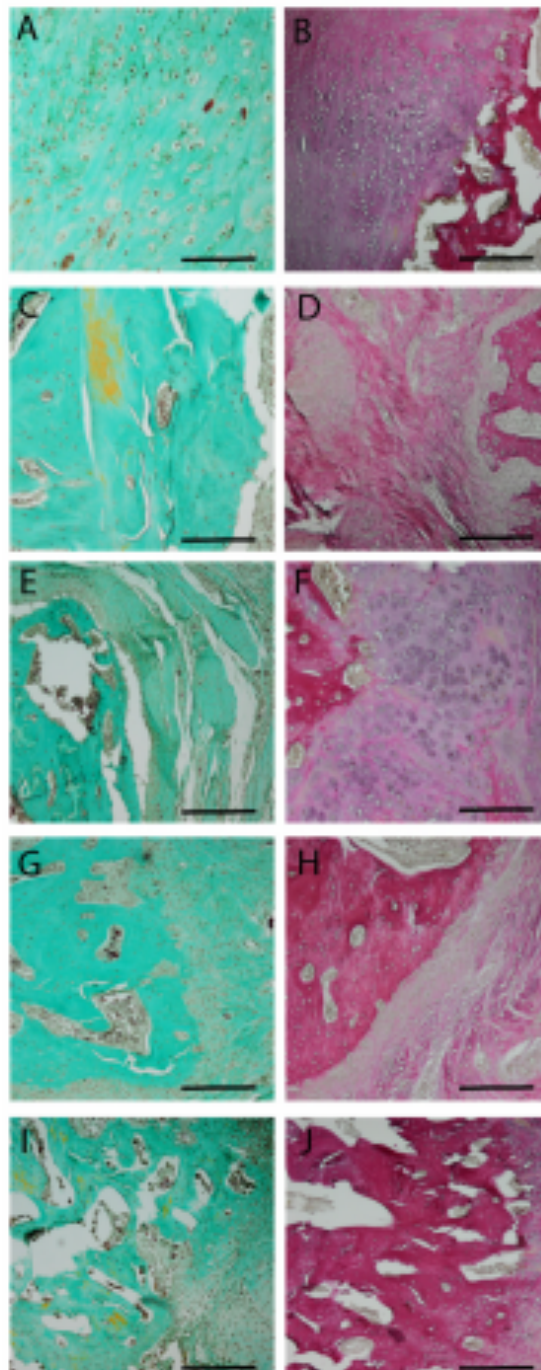
Histological analyses confirmed the qualitative  $\mu$ CT and X-ray results. In the groups with no implant or PLA cylinder alone, connective tissue dominates (Figure 5A, white arrows) and only marginal newly formed bone is observed. In the PLA group, slightly more bone tissue can be seen compared to the group without implant, especially in the areas between old bone and cylinder (Figure 5D,E, black arrows). In the group PLA + collagen type I, bone growth can be observed into the cylinder (Figure 5G,H, black arrows). In the group PLA + collagen type I + SDF-1, bone growth can be detected almost completely through the cylinder (Figure 5J, black arrows) and only the central part consists of pure connective tissue (Figure 5J, white arrows). In the group modified with BMP-7, bone growth can be observed completely through the cylinder (Figure 5M, black arrows). However, regarding the bone structure, there are tremendous differences between the bone formed after SDF-1 and BMP-7 supplementation. Whereas the new built bone in the SDF-1 group looks like the physiological bone, the bony structure in the BMP-7 group is holey (Figure 5N, grey arrows).



**Figure 5.** HE staining of various groups (8 weeks after surgery) under three different magnifications. First column overview—scale bar 5 mm; second column—30 times magnification—scale bar 1 mm; third column—75 times magnification—scale bar 500  $\mu$ m. Group 1—no implant—(A–C); 2—PLA cylinder alone—(D–F); 3—PLA cylinder + collagen type I—(G–I); 4—PLA cylinder + collagen type I + SDF-1—(J–L); 5—PLA cylinder + collagen type I + BMP-7—(M–O). White arrows indicate regions with connective tissue, black arrows indicate bone growth, and grey arrows show holey structures of the bone tissue.

This impression is confirmed by Masson–Goldner trichrome staining (Figure 6). Whereas only light green colors, identifying connective tissue, can be observed in the groups with no implant (A) and PLA cylinder alone (C), a mixture of green-turquoise staining, representing bone, and connective tissue can be observed in the group with collagen (E). The amount of green-turquoise increases in the SDF-1 group (G) and is most present in the BMP-7 group (I). Again, the structure of the BMP-7 bone is holey and very porous. In order to observe differences in the formation of elastic fibers, muscle and

small vessels an Elastica van Gieson staining was performed. No differences concerning elastic fibers or small vessel formation could be observed between the groups.



**Figure 6.** Masson-Goldner (first column) and Elastica van Gieson (second column) staining 8 weeks after surgery. Central parts of the fracture are shown. Group 1—no implant—(A,B); 2—PLA cylinder alone—(C,D); 3—PLA cylinder + collagen type I—(E,F); 4—PLA cylinder + collagen type I + SDF-1—(G,H); 5—PLA cylinder + collagen type I + BMP-7—(I,J). Scale bars: 1000  $\mu$ m.

It has been demonstrated by us and others that administration of BMP-7 results in excessive bone formation [45], heterotopic ossification [46] and bone with an abnormal structure and diminished biomechanical properties [47]. This is confirmed by some other studies employing BMP-2. For example, Zara et al. demonstrated that high doses of BMP-2 induced formation of structurally abnormal bone and inflammation *in vivo* [48].

Therefore, we conclude that, although bone growth after administration of SDF-1 results in a slower progress of bone regeneration, the bone seems to be more physiological than after BMP-7 utilization. This might be due to the fact that SDF-1 promotes bone regeneration via recruitment of endogenous bone marrow-derived stem cells [43,49,50] and cell migration [51]. By loading PLA and collagen with SDF-1, the required cells for bone regeneration are homed. The usage of collagen as a carrier system for SDF-1 has also been shown for bone regeneration in dentistry as well as in *in vivo* applications. Further, other materials have been demonstrated to carry SDF-1 [52,53], which speaks for the good functionality of SDF-1 after release from carrier systems. These facts show its potential as a component to induce bone regeneration and for its use in TE with cell-free bone substitutes. One option might be to combine SDF-1 and BMP-7, resulting in a combination of faster bone growth in a physiological manner. Tan et al. and others demonstrated a good effect on bone regeneration when combining SDF-1 and BMP-2 *in vitro* and *in vivo* [33,54]. The combination of SDF-1 and BMP-7 still has to be explored and is part of further studies.

As described above, combinations of collagen type I or other polymers with SDF-1 show promising results concerning new biomaterials for tissue engineering. However, these materials often demonstrate too low a stability to be used as bone substitute. Therefore, our approach to include these materials in a mechanically stable cylinder of 3D-printed polylactide combines many advantages. Polylactide is a biocompatible material and it can be modulated with simple 3D printers individually and as requested. Polylactide can be loaded with collagen type I with immobilized SDF-1, which is released in a semi-controlled manner and the released SDF-1 is functional. To our knowledge, in addition to our approach, only two research teams worked with a combination of polylactide and SDF-1. He et al. [55] combined SDF-1 with hydrogels containing different ratios of polylactide and Damanik et al. [56] combined electrospun PLA scaffolds with SDF-1 and demonstrated a significantly higher infiltration of MSC.

In order to identify differences in the presence of elastic fibers and blood vessels in the different groups, we performed Elastica van Gieson (EVG) staining. No differences concerning elastic fibers can be observed between the groups. This is probably due to the late time point of our histological studies at 8 weeks. Differences would be observed after shorter time periods (3–4 weeks) as described by others [57–59].

In our setting, parts of the implanted polylactide are still present 8 weeks after implantation. Histological staining did not reveal inflammatory or cytotoxic reactions at this time. Although some studies report long-term cytotoxic effects (see introduction), many other studies confirm the biocompatibility of PLA [60–62] as a bone substitute or for fixation of bone fractures. We believe that the degradation of polylactide is very slow and that the body is able to degrade the resulting degradation products. The degradation characteristic of the PLA–collagen implant material will be tested in a long-term setting, with standing times up to six months after implantation. In this follow-up study, biomechanical testing will be performed after explantation to analyze the differences in the stability of the built bone in the various groups.

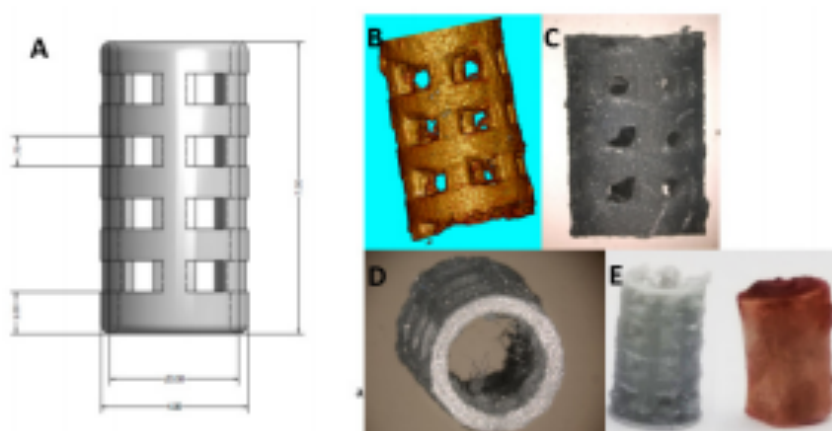
#### 2.4. Limitation of the Study

One limitation of the study is that we did not perform quantitative analyses of our histological data as, in our opinion, the qualitative images sufficiently demonstrate the differences between the groups.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Scaffold Preparation

A cylinder of PLA filament (Ultimaker silver metallic PLA, iGo3D, Hannover, Germany) with a diameter of 4 mm and a height of 7 mm was printed with the Ultimaker 2+. Mechanical, thermal and other properties are listed in the technical data sheet from Ultimaker. The cylinder was designed with a 3D modelling software (Autodesk Inventor Professional 2013, Autodesk, San Rafael, CA, USA) comparable to the size of the excised piece of femur during surgery (Figure 7E). Pores with a diameter of approximately 1 mm were included into the wall of the scaffold to facilitate bone ingrowth (Figure 7A–D). A collagen solution (10× M199, 6% NaHCO<sub>3</sub>, 2.5%, 65% collagen solution (Viscofan; 5 mg/mL 16.5% water) was prepared. In total, 100 µl of this solution was supplemented with 100 ng SDF-1 or BMP-7 (both Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), respectively, and pipetted into the cylinder and polymerized at room temperature.



**Figure 7.** The 3D-printed PLA cylinder. SEM images (A–D) and printed PLA cage corresponding to an excised piece of rat femur (E).

#### 3.2. Biomechanical Testing

Before implantation, mechanical testing was performed using a pneumatic universal testing machine (SincoTec<sup>®</sup>, Clausthal-Zellerfeld, Germany). The settings for the testing machine were selected with the help of the control software PneuSys<sup>®</sup>. Vertical movements, defined as the difference between the starting versus the ending point of the force transmitting bar, were measured directly at the actuator of the testing machine being connected to the bar. The data were recorded by means of a data-logging card at a scanning rate of 200 Hz. The data were processed with a program written in DasyLab<sup>®</sup> (DASYLab<sup>®</sup> National Instruments Ireland Resources Limited, Provider: measX GmbH & Co.KG, Mönchengladbach, Germany). In order to reduce the data volume for post-processing, the arithmetic mean was calculated during the test for each twenty measurement values. This reduced data set was then read out in the Excel<sup>®</sup> program for further post-processing. Independent measurements were performed for three PLA cylinders and three rat femora. The axial compression test was performed with a preload of 10N and a linear load increase to failure (or set force) at a frequency of 0.02 and 0.03 Hz.

#### 3.3. In Vivo Model

Our study was approved by the local regional welfare committee (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz AZ 23177-07/g17-1-032). All animal experiments complied with the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines and were carried out in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. Animals were housed 2 per cage in the

translational animal research center (TARC, University Medical Center, Mainz, Germany) with a 12 h dark–light rhythm.

In total, 36 ten-week-old Wistar rats (Janvier, France) were acclimatized for 3 days before they were subdivided into five groups according to Table 1:

**Table 1.** Classification of groups.

Group		n
1	No implant	4
2	PLA cylinder	8
3	PLA cylinder+ collagen I	8
4	PLA cylinder + collagen I + SDF-1	8
5	PLA cylinder + collagen I + BMP-7	8

To create the desired osteotomy of 6 mm, we used the rat fix system (RISystem, Davos, Switzerland). Anesthesia was initiated with isoflurane-oxygen per inhalation. Rats were anesthetized with an intra-peritoneal injection of midazolam (0.15 mg/kg), medetomidin (2 mg/kg) and fentanyl (0.005 mg/kg). As a pain prophylaxis, drinking water was supplied with tramadol (1 mg/mL) from 2 days before until 7 days after surgery. Skin incision was made along the femur, from the hip to the knee, and the underlying muscles were lifted. A gigly wire saw was placed around the bone and a PEEK plate was fixed with 6 screws bicortically. After positioning the drill and saw guide, a 6 mm femur osteotomy was created by using the gigly saw. The PLA cylinder was, if necessary, adapted in size and set in the resulted defect without further fixation. A previous pilot study for establishing the surgery method had demonstrated that this was the best option. The wound was then closed with resorbable vicryl sutures 4-0 (Ethilon, Ethicon, Norderstedt, Germany)).

X-rays were performed after 4 and 8 weeks. The rats were sacrificed 8 weeks after surgery by exposure to CO<sub>2</sub>. Femora were placed in 4.5% paraformaldehyde solution for  $\mu$ CT and histological analyses.

#### 3.4. $\mu$ CT Analyses/Bone Volume/Total Volume

Bone formation was evaluated using a high-resolution micro computed tomography (CT) scanner (CT 40, SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland). Radiographs of the femur were performed with the following specifications: the specimen tube of the CT scanner containing the femur was run with an X-ray tube of 70 kV and 113  $\mu$ A and the operational resolution was 30  $\mu$ m. Per rotation, 1000 pictures were taken with 1200  $\times$  1200 pixel resolution. Reconstruction resulted in 520 pictures/sample with a voxel size of 30  $\mu$ m corresponding to a layer thickness of 30  $\mu$ m and height of 6 mm. Thereby, the complete femur could be reconstructed.

The generated graphical material was exported as common DICOM images. It was edited and analyzed with the open source software “ImageJ” including the plugins “BoneJ” and “Stack Alignment.” The volume fraction (BV/TV) was then computed by measuring the bone volume (BV) inside a defined cylindrical total volume (TV). The base of the cylinder had a diameter of 5 mm and the cylinder had a height of 6 mm. This cylinder was orthogonally projected onto the bone defect and the calculation was performed using a voxel-based algorithm by the application “volume fraction” integrated in the BoneJ plugin.

#### 3.5. Histology

After radiologic analysis, the femora were decalcified using a 10% EDTA solution for at least 6 weeks, with the solution exchanged every second day during the first two weeks and then weekly. The femora were dehydrated by the Sakura VIP E150 Tissue Processor (Sakura Finetek GmbH,

Rüsselsheim, Germany) and then embedded in paraffin wax. The resulting blocks were cut in 5 µm slices, deparaffinized and then stained with hematoxylin and eosin.

The histologic slides were evaluated by descriptive histology by two independent and blinded investigators. The periphery and center of the critical size defects were compared among the five groups. Specimens were described and evaluated for cellular presence, extent of ossification defect and thickness of regenerated bone.

### 3.6. Masson–Goldner Trichrome Staining

Nuclei were stained for 5 min with hematoxylin according to Weigert, washed with 1% acetic acid followed by Ponceau-S staining (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) for 10 min. After another washing step with acetic acid (1%), samples were placed in acid orange G solution (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 10 min. After rinsing in 1% acetic acid, samples were stained with light green (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Germany) for 10 min then rinsed again in 1% acetic acid for 30 s.

### 3.7. Elastica Van Gieson Staining

Nuclei were stained for 5 min with hematoxylin according to Weigert then rinsed with distilled water for 10 min. After staining with resorcinol-fuchsin solution (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Germany), samples were again rinsed with distilled water for 10 min. Then samples were incubated with van Gieson solution (picric acid fuchsin; Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Germany) for 5 min, dehydrated in alcohols, cleared and mounted.

### 3.8. Statistical Analyses

For statistical analyses SPSS version 23.0 was used. Normal distribution was confirmed with Shapiro–Wilk test. Significant levels were analyzed with ANOVA and Tukey tests.

## 4. Conclusions

The 3D-biofabricated cell-free biomaterial consisting of polylactide in combination with collagen type I and especially when modified with SDF-1 is capable of inducing bone regeneration in a critical size defect in rats. In contrast to other biomaterials, this biomaterial can be easily produced with a simple 3D desktop printer. However, further experiments combining SDF-1 with bone morphogenetic proteins as well as large animal studies have to be performed to further characterize this material in terms of its capabilities in various applications.

**Author Contributions:** Conceptualization, U.R.; data curation, A.L., H.G., M.R., D.M. and U.R.; funding acquisition, U.R.; methodology, A.L., P.W., H.G. and M.R.; project administration, U.R.; resources, P.M.R.; writing—original draft, U.R.; writing—review and editing, A.L., A.B., D.H. and P.M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the research group BiomaTICS Mainz, Germany.

**Acknowledgments:** We thank Angelika Ackermann for her excellent technical assistance. This work is part of the doctoral theses of Alina Lauer and Philipp Wolf.

**Conflicts of Interest:** There are no conflicts of interest to declare.

## References

1. Ru, J.Y.; Chen, L.X.; Hu, F.Y.; Shi, D.; Xu, R.; Du, J.W.; Niu, Y.F. Factors associated with development of re-nonunion after primary revision in femoral shaft nonunion subsequent to failed intramedullary nailing. *J. Orthop. Surg. Res.* **2018**, *13*, 180. [[CrossRef](#)]
2. Mills, L.A.; Aitken, S.A.; Simpson, A.H.R.W. The risk of non-union per fracture: Current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthop.* **2017**, *88*, 434–439. [[CrossRef](#)]
3. Antonova, E.; Le, T.K.; Burge, R.; Mershon, J. Tibia shaft fractures: Costly burden of nonunions. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2013**, *14*, 42. [[CrossRef](#)]

4. Kuehlfluck, P.; Moghaddam, A.; Helbig, L.; Child, C.; Wildemann, B.; Schmidmaier, G.; Group, H.T.-H.T.R. RIA fractions contain mesenchymal stroma cells with high osteogenic potency. *Injury* **2015**, *46* (Suppl. S8), S23–S32. [[CrossRef](#)]
5. McNally, M.; Ferguson, J.; Kugan, R.; Stubbs, D. Ilizarov Treatment Protocols in the Management of Infected Nonunion of the Tibia. *J. Orthop. Trauma* **2017**, *31* (Suppl. S5), S47–S54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Giannoudis, P.V.; Atkins, R. Management of long-bone non-unions. *Injury* **2007**, *38* (Suppl. S2), S3–S9. [[CrossRef](#)]
7. Wubneh, A.; Tsekoura, E.K.; Ayranci, C.; Uludag, H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2018**, *80*, 1–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Giannoudis, P.V.; Stengel, D. Clinical research in trauma and orthopaedic surgery—Call for action. *Injury* **2008**, *39*, 627–630. [[CrossRef](#)]
9. Dhawan, A.; Kennedy, P.M.; Rizk, E.B.; Ozbolat, I.T. Three-dimensional Bioprinting for Bone and Cartilage Restoration in Orthopaedic Surgery. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2019**, *27*, e215–e226. [[CrossRef](#)]
10. Guvendiren, M.; Molde, J.; Soares, R.M.; Kohn, J. Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 1679–1693. [[CrossRef](#)]
11. Carlotta, D. A literature review of poly(lactic acid). *J. Polym. Environ.* **2001**, *9*, 63–84. [[CrossRef](#)]
12. Serra, T.; Mateos-Timoneda, M.A.; Planell, J.A.; Navarro, M. 3D printed PLA-based scaffolds: A versatile tool in regenerative medicine. *Organogenesis* **2013**, *9*, 239–244. [[CrossRef](#)]
13. Serra, T.; Planell, J.A.; Navarro, M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5521–5530. [[CrossRef](#)]
14. Hoglund, A.; Hakkarainen, M.; Edlund, U.; Albertsson, A.C. Surface modification changes the degradation process and degradation product pattern of polylactide. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2010**, *26*, 378–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bierbaum, S.; Hintze, V.; Scharnweber, D. Functionalization of biomaterial surfaces using artificial extracellular matrices. *Biomater* **2012**, *2*, 132–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sarker, B.; Hum, J.; Nazhat, S.N.; Boccacini, A.R. Combining collagen and bioactive glasses for bone tissue engineering: A review. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 176–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wallace, D.G.; Rosenblatt, J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1631–1649. [[CrossRef](#)]
18. Motamedian, S.R.; Hosseinpour, S.; Ahsaie, M.G.; Khojasteh, A. Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. *World J. Stem Cells* **2015**, *7*, 657–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Montalbano, G.; Fiorilli, S.; Caneschi, A.; Vitale-Brovarone, C. Type I Collagen and Strontium-Containing Mesoporous Glass Particles as Hybrid Material for 3D Printing of Bone-Like Materials. *Materials (Basel)* **2018**, *11*, 700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lee, H.J.; Kim, Y.B.; Ahn, S.H.; Lee, J.S.; Jang, C.H.; Yoon, H.; Chun, W.; Kim, G.H. A New Approach for Fabricating Collagen/ECM-Based Bioinks Using Preosteoblasts and Human Adipose Stem Cells. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1359–1368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ritz, U.; Gerke, R.; Gotz, H.; Stein, S.; Rommens, P.M. A New Bone Substitute Developed from 3D-Prints of Polylactide (PLA) Loaded with Collagen I: An In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Martin, V.; Ribeiro, I.A.; Alves, M.M.; Goncalves, L.; Claudio, R.A.; Grenho, L.; Fernandes, M.H.; Gomes, P.; Santos, C.F.; Bettencourt, A.F. Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocycline-nanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2019**, *101*, 15–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dewey, M.J.; Johnson, E.M.; Weisgerber, D.W.; Wheeler, M.B.; Harley, B.A.C. Shape-fitting collagen-PLA composite promotes osteogenic differentiation of porcine adipose stem cells. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *95*, 21–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Teixeira, B.N.; Aprile, P.; Mendonca, R.H.; Kelly, D.J.; Thire, R. Evaluation of bone marrow stem cell response to PLA scaffolds manufactured by 3D printing and coated with polydopamine and type I collagen. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2019**, *107*, 37–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dumic-Cule, I.; Peric, M.; Kucko, L.; Grgurevic, L.; Pecina, M.; Vukicevic, S. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. *Int. Orthop.* **2018**, *42*, 2619–2626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Li, X.; Wang, Y.; Wang, Z.; Qi, Y.; Li, L.; Zhang, P.; Chen, X.; Huang, Y. Composite PLA/PEG/nHA/Dexamethasone Scaffold Prepared by 3D Printing for Bone Regeneration. *Macromol. Biosci.* **2018**, *18*, e1800068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yoon, Y.K.; Park, H.S.; Lee, J.M.; Lee, J.S.; Lee, Y.J.; Sultan, M.T.; Seo, Y.B.; Lee, O.J.; Kim, S.H.; Park, C.H. New concept of 3D printed bone clip (polylactic acid/hydroxyapatite/silk composite) for internal fixation of bone fractures. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2018**, *29*, 894–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anteil der registrierten Pseudarthrosen (M84.1) an den Veränderungen der Knochenkontinuität (M84) aus: Gesundheitsberichterstattung des Bundes (3).

ICD10	Jahr (aufsteigend)									
	2000	2005	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
M84 Veränderungen der Knochenkontinuität	10.492	20.223	22.140	23.380	22.969	22.754	22.892	22.722	23.732	23.476
M84.0 Frakturheilung in Fehlstellung	1.116	2.692	2.497	2.660	2.481	2.512	2.332	2.359	2.403	2.439
M84.1 Nichtvereinigung der Frakturrenden [Pseudarthrose]	6.633	11.966	14.167	14.863	14.520	14.083	14.076	13.456	13.802	13.562
M84.2 Verzögerte Frakturheilung	550	1.072	1.267	1.429	1.474	1.573	1.425	1.565	1.496	1.462
M84.3 Stressfraktur, anderenorts nicht klassifiziert	80	169	303	365	432	460	553	589	579	583
M84.4 Pathologische Fraktur, anderenorts nicht klassifiziert	1.759	4.080	3.664	3.814	3.854	3.941	4.313	4.500	5.215	5.165
M84.8 Sonstige Veränderungen der Knochenkontinuität	180	212	206	198	175	156	166	181	162	213
M84.9 Veränderung der Knochenkontinuität, nicht näher bezeichnet	174	32	36	51	33	29	27	72	75	52
M96.0 Pseudarthrose nach Fusion oder Arthrodeese	1.109	1.014	1.392	1.691	1.937	2.051	2.074	2.184	2.202	2.232

### Verwendetes Material

<b>Autodesk® Inventor Professional 2013</b>	Autodesk, San Rafael, CA, USA
<b>Chirurgische/ anatomische Pinzette</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>Feinbohrmaschine</b>	Hobby Drill 2000, No. 0550
<b>Gerade Schere nach Tönnis</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>Halstedt-Mosquito-Klemmchen</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>Kleintier-Röntgengerät Faxitron</b>	Tucson, Arizona, USA
<b>Lidhaken</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>Nadelhalter nach Hegar</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>Präparierschere nach Metzenbaum</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>Raspatorium</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>RatFix System</b>	RISystemes, Davos Platz, Switzerland
<b>Ultimaker 2+</b>	Ultimaker, Geldermalsen, The Netherlands
<b>Ultimaker silver metallic</b>	iGo3D, Hannover, Germany

<b>PLA 2.85 _ 0.10 mm</b>	
<b>Wundspreizer nach Plester</b>	Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany
<b>µCT 40</b>	SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland
<b>µCT Analysesoftware</b>	SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland
<b>Fiji ImageJ (64-bit)</b>	
<b>IBM SPSS®-Softwareplattform 23</b>	

### Verbrauchsmaterialien

<b>Corneregel®</b>	Dr. Gerhard Mann chem.-pharm. Fabrik GmbH, Berlin, Germany
<b>Cytoseal™</b>	
<b>Ecolav® NaCl 0,9%, 250 ml</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
<b>Falcon™ Zentrifugenröhrchen</b>	
<b>Forene®</b>	Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, United Kingdom
<b>Nahtmaterial (Ethicon)</b>	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Germany
<b>Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost® Plus)</b>	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Germany
<b>Omnifix® 1 ml</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
<b>OPS® Essential (Abdecktuch)</b>	Medline International GmbH, Kleve, Germany
<b>Opsite Spray</b>	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Germany
<b>Schlinggazetupfer ohne Röntgenmarkierung</b>	Fuhrmann GmbH, Much, Germany
<b>Skalpell No.15</b>	Feather Disposable Scalpel, Aesculap AG, Tuttlingen, Germany

<b>STERICAN Ins. Einmal Kanüle</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
<b>Vasco® OP Sensitiv (sterile Latexhandschuhe)</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
<b>Wundantiseptikum Braunol®</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany

<b>Reagenzien</b>	
<b>10xM199</b>	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<b>Aqua dest.</b>	B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany
<b>Atipamezol 0,75 [mg/kg KG]</b>	Revertor® Virbac AG, Glattbrugg, Switzerland
<b>BMP-7 (Stock 1µg/µl)</b>	
<b>Bovines Kollagen (Collagen Typ I 4,08mg/ml)</b>	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
<b>Dako Liq. DAB-K3469</b>	Dako North America, Inc., Carpinteria, United States of America
<b>Dako LSA B2, Syst HRP-K0675</b>	Dako North America, Inc., Carpinteria, United States of America
<b>Dorbene® vet. 1 mg/ml<sup>3</sup></b>	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany
<b>EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2H<sub>2</sub>O)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
<b>Eosin G Lösung (0,5%)</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Germany
<b>Fentanyl 0,1mg/2ml</b>	Fentanyl-Janssen, Janssen-Cilag GmbH Neuss, Germany

<b>Flumazenil 0,2 [mg/kg KG]</b>	Anexate® Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany
<b>Hämatoxylinlösung nach Gill</b>	Polysciences Inc., Warrington, USA
<b>Isopropanol (2-Propanol)</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Germany
<b>Midazolam</b>	hameln pharma plus gmbh, Hameln, Germany
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
<b>NaOH (Natronlauge)</b>	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
<b>Roti®-Histofix 4,5%</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
<b>SDF-1 (Stock 100ng/µl)</b>	<u>Milentyi Biotec</u>
<b>Tramadol-ratiopharm® 100 mg/ml Tropfen</b>	ratiopharm GmbH, Ulm, Germany
<b>Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
<b>Xylene (Isomergemisch)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
<b>Weigerts Hämatoxylinlösung A + B</b>	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Germany
<b>Ponceau-Säurefuchsin-Lösung</b>	
<b>Phosphorwolframsäure-Orange G Lösung</b>	
<b>Lichtgrün</b>	
<b>Essigsäure 100%</b>	
<b>Pikrogemisch (van-Gieson Gemisch)</b>	
<b>Resorcin-Fuchsin</b>	

Intraoperativ verwendetes Instrumentarium

Chirurgische/ anatomische Pinzette

**Präparierschere nach Metzenbaum**

**Gerade Schere nach Tönnis**

**Halstedt-Mosquito-Klemmchen**

**Lidhaken**

**Wundspreizer nach Plester**

**Nadelhalter nach Hegar**

**Raspatorium**

**Sterile Tupfer**

**Steriles Einwegskalpell No. 15**

**RatFix System**

## **Danksagung**

## Lebenslauf