

Aus dem Bereich  
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **"In-vivo-Degradation bioresorbierbarer Ca10-Scaffolds im Mausmodell"**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Tobias Fritz  
geb. am: 07.03.1987 in Ludwigsburg

---

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

---

Dekan: Prof. Dr. med. M. Menger  
1.Gutachter:  
2.Gutachter:  
Jahr der Promotion: 2016

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
1. Zusammenfassung .....	8
1.1 Summary .....	11
2. Einleitung .....	14
2.1 Knochen.....	14
2.1.1 Morphologie .....	14
2.1.2 Histologie.....	14
2.1.3 Physiologie .....	17
2.2 Frakturheilung .....	17
2.2.1 Primäre Frakturheilung.....	17
2.3 Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen .....	19
2.3.1 Hypertrophe Pseudarthrose.....	20
2.3.2 Atrophe Pseudarthrose.....	20
2.4 Defektmodelle .....	21
2.4.1 Maus .....	22
2.4.2 Ratte.....	23
2.4.3 Schaf .....	23
2.5 Knochenersatzmaterialien .....	23
2.5.1 Autologe Knochenersatzmaterialien.....	24
2.5.2 Allogene Knochenersatzmaterialien .....	24
2.5.3 Xenografts.....	25
2.5.4 Alloplastische Knochenersatzmaterialien.....	25
2.5.5 Bioresorbierbare Knochenersatzmaterialien.....	25
2.5.6 Polymere (Polymerzemente).....	26
2.5.7 Bioaktive Knochenersatzmaterialien .....	26
2.5.8 Bioionierte Knochenersatzmaterialien.....	27
2.6 Zielsetzung .....	27
2.7 Fragestellung .....	27
3 Material und Methoden .....	28
3.1 Intervention.....	28
3.1.1 Versuchsprotokoll.....	28
3.1.2 Tiermodell.....	29

3.1.3 Di- und metaphosphathaltige Calcium-Orthophosphat-Keramikscaffolds.....	29
3.1.4 Besiedlung der Scaffolds mit Osteoblasten und REM Analyse.....	31
3.1.5 Operation .....	32
3.1.6 Ektope Implantation in die Flanke der Maus.....	32
3.1.7 Orthotope Implantation in das Femur der Maus .....	36
3.1.8 Tötung der Tiere .....	49
3.1.9 Explantation der Scaffolds nach ektooper Implantation .....	49
3.1.10 Knochenpräparation.....	49
3.2 Zielkriterien und Auswertung.....	50
3.2.1 Radiologie.....	50
3.2.2 Computertomographie .....	51
3.2.3 Biomechanik .....	51
3.2.4 Histologie.....	51
3.3 Statistik .....	55
4 Ergebnisse .....	56
4.1 Postoperativer Verlauf.....	56
4.2 Makroskopie .....	56
4.3 Radiologie.....	57
4.4 Biomechanik.....	57
4.5 Histologie .....	58
4.5.1 Orthotope Implantation.....	58
4.5.2 Ektope Implantation der Keramik in die Flanke der Maus.....	62
4.6 Rasterelektronenmikroskopie .....	64
4.7 Computertomographie .....	66
5 Diskussion .....	69
5.1 Diskussion der Methoden .....	69
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	72
6. Fazit.....	77
7. Literaturverzeichnis.....	78
9. Publikationen / Danksagung.....	90
9.1 Publikationen.....	90
9.2 Danksagung .....	90
10. Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
Δ%	Delta-Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
B-TCP	Beta-Tricalciumphosphat
μA	Mikro-Ampère
μCT	Mikro-Computertomographie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
%	Prozent
2-D	zweidimensional
3-D	dreidimensional
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Al	Aluminium
ANOVA	analysis of variance
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
ASAP	Accelerated Surface Area and Porosimetry System
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
AZ	Aktenzeichen
BAM	Bundesanstalt für Materialwissenschaften
BMP	Bone morphogenic proteine
BV	Bone Volume
Ca	Calcium
CaO	Calciumoxid
CaO/P <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Calciumoxid/Phosphat
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie

Cu	Kupfer
d	Durchschnitt
et al.	et alteri
g	Gramm
GK	Gefechtsknochen
i.d.R.	in der Regel
h	Stunde
HCA	Hydroxyl Carbonapatit Kristallen
HMDS	Hexamethyldisilazan
HU	Houndsfield Units
K	Kalium
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
Lig.	Ligament
M	Mittelwert
M	Mol
M.	Musculus
mA	Milliampère
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmilimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmilimeter
mM	Milimol
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomographie
Na	Natrium
NaO <sub>2</sub>	Natriumoxid

Nmm	Newtonmillimeter
nm	Nanometer
PDS	Polydioxanon
PMMA	Polymethylmetacrylat
PO <sub>4</sub>	Phosphat
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROI	Region of interest
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SV	Scaffold Volume
SV <sub>v</sub>	Scaffold Volume vorher
SV <sub>n</sub>	Scaffold Volume nachher
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalciumphosphat
TRIS-HCl	Trishydroxymethyl-aminomethan-Hydrochlorid
U	Umdrehungen
USA	United States of America
UV	Ultraviolett

## **1. Zusammenfassung**

Die Behandlung von Pseudarthrosen und großen Knochendefekten ist auch heute im klinischen Alltag eine große Herausforderung. Der therapeutische Goldstandard ist weiterhin die autologe Transplantation, z.B. aus dem Beckenkamm. Je nach Größe des Defektes kann allerdings eine Auffüllung mit körpereigenem Material nicht gewährleistet werden. Deshalb wurden in der Vergangenheit verschiedene Therapiekonzepte entwickelt. So kommen heutzutage immer häufiger Knochenersatzmaterialien zum Einsatz. Diese unterscheiden sich in ihrem Ursprung und ihrem *in vivo* Verhalten. So kommen allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien zum Einsatz. Das optimale Knochenersatzmaterial sollte entsprechend biokompatibel, osteoinduktiv, osteokonduktiv und resorbierbar sein. Aufgrund ihrer reproduzierbaren Zusammensetzung und der damit verbundenen hohen Verfügbarkeit gewinnen alloplastische Knochenersatzmaterialien zunehmend an Bedeutung im klinischen Einsatz.

Die heute am häufigsten klinisch eingesetzten Knochenersatzmaterialien bestehen meist aus Calcium-Phosphat-Verbindungen. Sie zeigen eine dem Knochen ähnliche chemische Zusammensetzung, um eine gute Biokompatibilität und Osteokonduktion zu erreichen. Entsprechend ist es Ziel der aktuellen Forschung, ein Knochenersatzmaterial in hoher Verfügbarkeit herzustellen, welches sowohl biokompatibel, osteoinduktiv, osteokonduktiv und resorbierbar ist.

Vor diesem Hintergrund wurde die hier vorgestellte Studie zur Charakterisierung unterschiedlicher di- und metaphosphathaltiger Calcium-Orthophosphat-Keramiken (D40, D33, D22) hinsichtlich Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und Biodegradation konzipiert.

Im Rahmen dieser Studie erfolgte zunächst die *in vitro* Besiedelung der Scaffolds mit Osteoblasten und die Bestimmung ihrer Morphologie im REM.

Die anschließend durchgeführte tierexperimentelle Studie untersuchte die Biokompatibilität, Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und Biodegradation der Scaffolds, deren *in vivo* Eigenschaften bisher nicht bekannt waren.

Die Versuche wurden an ausgewachsenen Mäusen (CD-1) durchgeführt. Die in dieser Studie verwendeten Tiermodelle waren bereits vorher standardisiert und etabliert.

Die Osteoinduktivität wurde durch ektope Implantation der Scaffolds in die Flankenmuskulatur der Maus (n=48) untersucht. Nach vier- bzw. zwölfwöchiger Standzeit wurden die Scaffolds histologisch untersucht.

Die Osteokonduktivität und Biodegradation wurden in einem etablierten Knochendefektmodell untersucht. Hierbei wurden die unterschiedlichen Scaffolds in einen 2mm messenden Knochendefekt in der Diaphyse des Femurs implantiert und mittels MouseNail stabilisiert (n=144). Als Kontrollgruppe diente ein entsprechender Knochendefekt in der Diaphyse der Maus ohne Auffüllung mit einem Scaffold (n=24). Die Versuchstiere wurden nach fünf, zehn und fünfundzwanzig Wochen Standzeit ebenfalls durch eine Überdosis Phenobarbital getötet, um die Knochen radiologisch, biomechanisch und histologisch zu untersuchen.

Die radiologische Auswertung erfolgte mittels konventionellen Röntgenbildern, um die ossäre Integration des Scaffolds zu analysieren. Anhand eines modifizierten Goldberg-Scores wurden die Knochenenden proximal und distal des Scaffolds und ihre Reaktion nach den entsprechenden Standzeiten beurteilt.

Zur Untersuchung der Biodegradation wurde das Volumen der Scaffolds vor orthotoper Implantation mittels  $\mu$ CT bestimmt. Eine erneute Bestimmung des Volumens der Scaffolds mittels  $\mu$ CT erfolgte post mortem. Somit konnten Volumenänderungen im Sinne einer Degradation über die Dauer der Standzeit gemessen werden.

Die biomechanische Rotationstestung erfolgte, um die Stabilität des Knochendefektes mit im besten Fall komplett integriertem Scaffold zu überprüfen. Hierzu wurde das maximale Drehmoment bei Versagen des Femurs gegenüber den jeweiligen Werten der unfrakturierten Femora ermittelt.

Die histologische Untersuchung diente dem Nachweis des Einwanderungsverhalten von Zellen in den Rand- bzw. Zentrumsbereich der Scaffolds. Hierzu erfolgte bei den ektope Scaffolds die Untersuchung an axialen und bei den orthotop implantierten Scaffolds entlang der Longitudinalachse geschnittenen Proben. Dann wurden die Zellen in vier zentralen und acht randständigen Regions of interest (ROI) quantitativ bestimmt. Hierzu wurden zunächst alle Schnittpräparate mittels Bisbenzimid gefärbt und die eingewanderten Zellen unter UV-Licht quantitativ bestimmt. Anschließend erfolgte die Färbung der Proben mittels Methylenblau und die Anzahl der Zellen wurden in äquivalenter Methode bestimmt. Durch den direkten Vergleich von Bisbenzimid- und Methylenblaufärbung konnten Artefakte der Färbung ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- I. Im Rahmen der Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich eine deutlich unterschiedliche Oberflächenstruktur der Scaffolds. Dies führte zu einer unterschiedlichen Anzahl und Morphologie der Osteoblasten auf den Scaffolds. So zeigte die Oberfläche der Scaffolds D22 gegenüber den Scaffolds D33 und D40 eine zerklüftetere Struktur. Die glattere Oberfläche der Scaffolds D40 führte zu einer Fibroblasten ähnlichen Morphologie der Osteoblasten, um eine Anheftung an der Oberfläche zu gewährleisten. Die Osteoblasten auf den Scaffolds D33 und vor allem Scaffolds D22 zeigten eine typische kompakte Konfiguration.
- II. Bei allen eingeschlossenen Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich eine atrophe Pseudarthrose im Defektbereich der Diaphyse. Nach orthotoper Implantation der Scaffolds zeigten sich unterschiedliche Reaktionen im Defektbereich. So zeigten sich sowohl hypertrophe Überbauung als auch Atrophie der Knochenenden, bei fehlender Rotationsstabilität in der biomechanischen Untersuchung im Vergleich zur gesunden Gegenseite.
- III. Im konventionellen Röntgen konnten anhand eines modifizierten Goldberg scores keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden.
- IV. Histologisch zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an Zellen der orthotop implantierten Scaffolds D33 und D22 gegenüber D40 nach allen Standzeiten. Außerdem zeigte das Scaffold D22 gegenüber D33 eine signifikant höhere Anzahl an Zellen nach 25 Wochen Standzeit.
- V. Histologisch zeigten die ectop implantierten Scaffolds D33 und D22 eine signifikant höhere Anzahl an Zellen gegenüber D40 nach allen Standzeiten. Außerdem zeigte das Scaffold D22 eine signifikant höhere Anzahl an Zellen gegenüber D33 nach allen Standzeiten.
- VI. Die durchgeführten  $\mu$ CT-Untersuchungen zeigten lediglich in der Gruppe der D22 Scaffolds nach 25 Wochen Standzeit einen signifikanten Unterschied der Abnahme des Bone volumes. In den weiteren Gruppen und Standzeiten konnte zwar eine abnehmende Tendenz des Bone volumes nach der in vivo Testung beobachtet werden, allerdings waren die Unterschiede zu gering, um einen signifikanten Unterschied erkennen zu können.

In der hier vorgestellten Studie konnten in vitro und vivo die Biokompatibilität und Osteokonduktivität der getesteten Scaffolds nachgewiesen werden. Die Scaffolds zeigten vor allem Unterschiede in der Osteokonduktivität, wobei die D22 Scaffolds die höchste Rate an Osteokonduktivität aufweisen. Allerdings zeigten die untersuchten Proben keine Osteoinduktivität und keine relevante Biodegradation.

Zusammenfassend zeigen die hier untersuchten Scaffolds zwar Biokompatibilität und mäßige Osteokonduktivität, eignen sich aber aufgrund der mäßigen Osteokonduktivität und der nur geringen Biodegradationsrate nicht für einen klinischen Einsatz.

## **1.1 Summary**

*“In vivo biodegradation of Ca10-scaffolds in a murine critical size defect model“*

Despite the growing knowledge about bone healing treatment of large sized bone defects and bone non unions still remain a major clinical task. Autologous bone grafting is still the state of the art therapy. However in large sized defects this might not be possible due to its limited supply. Moreover harvesting bone from the iliac crest or the tibial head is additionally combined with the donor site morbidity. Therefore allogenic, xenogenic or synthetic bone substitutes are getting into focus. A perfect bone substitute should be biocompatible, osteoconductive and osteoinductive and its degradation should match the rate of new bone formation. In clinical use most bone substitutes are composed of calcium-phosphates because of their bone like chemical structure. Until now a bone substitute which meets all the aboved mentioned requirements of a perfect bone substitute has not been developed.

The aim of this study was the characterization of different di- and metaphosphates containing calcium-orthophosphat ceramics (D40, D33, D22) in terms of their osteoinductivity, osteoconductivity and biodegradation.

At first the scaffolds were colonized with osteoblasts. The interaction of the osteoblasts with the scaffold surface was analysed with scanning electron microscopy.

After in vitro testing the in vivo study was performed to assess osteoconductivity, osteoinductivity and biodegradation of the scaffolds, which was unknown for this material composition so far.

All experiments were performed on adult mice (CD-1) using established and standardized animal models.

To study osteoinductivity the scaffolds were implanted into a muscle flap (n=48) and harvested after 4 and twelve weeks. The mice were euthanized by phenobarbital and the scaffolds were analysed histologically and in  $\mu$ CT-scan.

Osteoconductivity and biodegradation were assessed using an established critical size bone defect model. After creating a 2mm femoral bone defect the scaffolds were implanted and stabilized with the Locking Mouse Nail® (n=144). In the control group no scaffolds were implanted into the critical size defect (n=24). After five, ten and twenty-five weeks radiological/ $\mu$ CT, biomechanical and histological analysis were accomplished.

Using a modified Goldberg score on conventional radiography the bone reaction proximal and distal adjacent to the scaffold was assessed at every time point.

The biomechanical rotation testing was performed to analyse the stability of the bone scaffold interface. The maximum torque of critical size bone defects was compared to the maximum torque of unfractured femora.

Cell immigration into the periphery and the center of the scaffolds with analysed with histological samples. The orthotopic implanted scaffolds were cut longitudinal and the ectopic implanted scaffolds were cut axial. In every scaffold four central and eight peripheral regions of interest (ROI) have been assessed. At first all histological specimens were stained by bisbenzimidazole and immigrated cells were analyzed and quantified using ultraviolet light. Afterwards all histological samples were stained by methylene blue and the analysis was repeated. This technique allowed a direct comparison of the samples and reduction of artefacts by staining.

The results of this study can be summarised as follows:

- I. SEM analysis showed different surface structures of the scaffolds. These different surfaces led to different osteoblastic morphologies. D22 scaffolds showed a rougher surface compared to D33 and D40. The osteoblasts on D40 showed a fibroblast-like morphology processing filopodiae to gain contact on the smooth surface structures. Osteoblasts on D33 and D22 showed a typical compact morphology.
- II. All included mice of the control group showed an atrophic bone non union at the femoral critical size defect. Orthotopic implanted scaffolds showed both hypertrophic and atrophic bone union which was also confirmed by a missing torsional stiffness compared to the healthy contralateral femur.

- III. Using a modified Goldberg score on conventional radiography showed no significant difference between the different groups.
- IV. Orthotopic implanted scaffolds showed significantly more cells in groups D33 and D22 compared to group D40 at every point. Also there were significantly more cells 25 weeks after implantation in D22 compared to D33.
- V. Ectopic implanted scaffolds showed significantly more cells in groups D33 and D22 compared to group D40 at every point. Also group D22 showed significantly more cells compared to group D33 at every point.
- VI.  $\mu$ CT analysis showed a significant reduction of the scaffold volume of orthotopic implanted scaffold D22 after 25 weeks. Although a decreasing scaffold volume could be observed in the other groups, there was no significant difference.

This study showed different in vitro and in vivo reactions regarding biocompatibility and osteoconductivity in the different scaffolds, nonetheless no scaffold showed any sign of osteoinductivity in this study. The highest osteoconductive potential could be observed in scaffold D22.

In summary the lack of osteoinductivity and low rate of biodegradation tend to argue against the clinical use of the different scaffolds in this study.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Knochen**

#### **2.1.1 Morphologie**

Knochen können anhand ihrer Morphologie in Röhrenknochen, platte Knochen und kurze Knochen unterschieden werden.

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit wurden an Röhrenknochen vorgenommen.

Der Röhrenknochen weist drei unterschiedliche Bereiche auf. Diese werden als Diaphyse, Epiphyse und Metaphyse bezeichnet. (Aumüller et al., 2014)

Die Epiphysen befinden sich jeweils am proximalen und distalen Enden des Knochens und die Diaphyse bildet den schaftartigen Bereich dazwischen. Die Metaphyse liegt zwischen Epiphyse und Diaphyse.

Für die hier vorliegende Doktorarbeit wurde die Diaphyse des Femurs verwendet. Das Femur ist der längste Röhrenknochen des Körpers, so dass hier ein ossärer Defekt am einfachsten umzusetzen und zu reproduzieren war.

#### **2.1.2 Histologie**

Der Knochen kann histologisch in Periost, Substantia compacta und Substantia spongiosa unterteilt werden.

##### Substantia compacta

Die Substantia compacta setzt sich aus mehreren funktionellen Einheiten zusammen. Diese bestehen aus verschiedenen Knochenlamellen, den Spezial- oder Haverslamellen. Sie befinden sich um den longitudinal verlaufenden Havers-Kanal (Zentralkanal) (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012). Die hierin enthaltenen Havers-Gefäße sind über seitlich verlaufende Volkmann-Kanäle verbunden und werden durch diese versorgt. Des Weiteren befinden sich Bindegewebe, vegetative Nerven und mesenchymale Vorläuferzellen innerhalb der Havers-Kanäle. Eine solche Einheit wird als Osteon oder Havers-System bezeichnet. Zwischen solchen Osteonen befinden sich Schaltlamellen, welche Reststücke alter, teilweiser abgebauter Havers-Systeme sind. Äußere dem Periost angrenzende Lamellen werden als „äußere Generallamellen“, die an die innenliegende Spongiosa angrenzenden Lamellen als „innere Generallamellen“ bezeichnet (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

Das Periost überzieht die gesamte Kortikalis mit Ausnahme der knorpeligen Gelenkflächen. Dieses unterteilt sich in zwei weitere funktionelle Schichten, das Stratum fibrosum und das Stratum osteogenicum.

Kollagenfasern (Sharpey Fasern) verbinden das Stratum fibrosum mit der Kortikalis des Knochens. Durch das Einstrahlen der Kollagenfasern im Bereich der Ansatzfläche der Sehnen und Bänder in das Stratum fibrosum verteilen sich die Zugkräfte durch die größere Ansatzfläche besser am Knochen (Schiebler & Korf, 2007; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

Kleine Gefäße und Kapillaren befinden sich im Stratum osteogenicum, über die Volkmann- und Haverskanäle wird die Blutversorgung der Kompakta und der Knochengrundsubstanz gesichert. Das Stratum osteogenicum enthält zusätzlich sensible Nervenfasern, diese spielen besonders in der Schmerzempfindung des Knochens, z.B. bei Frakturen eine wichtige Rolle. Eine weitere wichtige Funktion des Stratum osteogenicum ist die Differenzierung der Osteoblasten während des physiologischen Knochenwachstums, welche nach dessen Abschluss wieder deutlich abnimmt. Dies trägt zur Bildung neuer Knochensubstanz bei. Im Bedarfsfall, z.B. im Rahmen der Frakturheilung (periostale Knochenheilung), kann diese jedoch erneut einsetzen (Schiebler & Korf, 2007; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

### Substantia spongiosa

Die Substantia spongiosa besteht aus einem komplexen System von Knochenbälkchen und Knochenplatten. In deren Zwischenräumen befindet sich das Knochenmark (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012). Hierin findet im roten Mark aller Knochen die Hämatopoese bis zum erstehnten Lebensjahr statt. Im weiteren Lebensverlauf wird das rote Mark in langen Knochen schrittweise durch Fettmark ersetzt und die Hämatopoese findet dann nur noch in kurzen und platten Knochen statt (Junqueira et al., 2004).

### Knochengewebe

Das Knochengewebe kann prinzipiell in Geflecht- und Lamellenknochen unterteilt werden (Junqueira et al., 2004).

Im Rahmen der Osteoneogenese, entsteht zunächst Geflechtknochen. Dieser enthält eine hohe Anzahl Osteozyten und unregelmäßig verlaufende Kollagenfasern. Das Wachstum erfolgt entlang der im Knochen vorhandenen Kapillaren. Im weiteren Verlauf differenziert sich der Geflechtknochen dann zum Lamellenknochen; dieser zeigt eine höhere anorganische Zusammensetzung. Das weitere Wachstum erfolgt dann entlang der Kraftlinien, die durch

mechanisch wirkenden Kräfte beeinflusst werden (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

Die Knochenlamellen bestehen aus 3-7 µm dicken Schichten von Osteozyten und parallel verlaufenden, schraubenförmig angeordneten Kollagenfasern. Dadurch kann sich der Knochen Zug- und Druckbelastungen anpassen (Bucher & Wartenberg, 1997). Zwischen zwei Lamellen liegen die Osteozyten innerhalb der Lacunae ossae. Von diesen ziehen radiäre Knochenkanäle, die Canaliculi ossei, mit eingeschlossenen Osteozytenfortsätze zu den benachbarten Osteonen. Hierdurch wird eine Verbindung zwischen zwei benachbarten Havers-Systemen erreicht (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

Neben Osteozyten befinden sich Osteoblasten und –klasten sowie mesenchymale Vorläuferzellen im Knochen. Die Vorläuferzellen liegen auf der inneren und äußeren Knochenoberfläche und in den Havers-Kanälen und können sich durch hormonelle Stimulation zu Osteoblasten differenzieren (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

Neue Knochensubstanz wird durch Osteoblasten gebildet. Die Knochengrundsubstanz setzt sich aus ca. 65% anorganischen und zu ca. 35% aus organischen Komponenten zusammen. Der anorganische Anteil besteht nahezu vollständig aus Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten. Der organische Anteil bildet eine Matrix, welche sich zu ca. 90% aus Kollagen und ca. 10% Lipiden und Proteinen zusammensetzt. (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012)

Im Verlauf wird diese durch die alkalische Phosphatase mineralisiert. Dies dauert beim Menschen in der Substantia spongiosa ca. 25 Tage und in der Substantia compacta ca. 35 Tage. Osteoblasten wandeln sich in Osteozyten um, sobald diese komplett von Osteoid eingeschlossen sind (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

Osteoklasten dienen dem Abbau der Knochensubstanz. Sie liegen in Vertiefungen an der Knochenoberfläche (Howship Lacunen) und in der Kortikalis, wo sie neue Gefäßkanäle für Osteonen schaffen. Die Osteoklasten entstehen im Gegensatz zu den anderen Knochenzellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Ein Osteoklast baut dieselbe Menge Knochen ab, den 100-150 Osteoblasten im selben Zeitraum herstellen (Junqueira et al., 2004; Lüllmann-Rauch et al., 2012).

### **2.1.3 Physiologie**

Der Knochen übernimmt vier wichtige Hauptaufgaben: die Stützfunktion, die Strukturfunktion, die Calciumhomöostase und die Mobilitätsfunktion.

Um diese Funktionen aufrecht zu erhalten, befindet der Knochen sich in ständigem Wachstum, Modeling und Remodeling (Junqueira et al., 2004).

Das Längenwachstum findet in den Epiphysenfugen statt, wodurch Länge und Knochenmasse zunehmen (Junqueira et al., 2004).

Das Modeling dient der Fähigkeit des Knochens, auf mechanische Erfordernisse durch gezielte Formveränderungen zu reagieren. Dies ist vor allem während der Wachstumsphase ausgeprägt und nimmt im zunehmenden Alter stark ab (Fleisch et al., 1997).

Das Remodeling dagegen beschreibt die Fähigkeit des Knochens durch Umbauprozesse auf belastungsunabhängige Veränderungen zu reagieren. Da es sich um Umbauprozesse handelt, erfolgt keine Zunahme der Knochenmasse. Diese Vorgänge laufen ein Leben lang ab und dienen z.B. der Reparatur von Mikrofrakturen. Das ständige Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenneogenese wird als Coupling bezeichnet (Sims et al., 2014).

## **2.2 Frakturheilung**

### **2.2.1 Primäre Frakturheilung**

Der Begriff primäre Frakturheilung beschreibt die Vereinigung von Frakturfragmenten ohne Ausbildung von Kallusgewebe. Hierbei werden Spaltheilung und Kontaktheilung unterschieden. Diese sind von der absoluten Frakturspaltweite abhängig (beim Menschen kleiner bzw. größer 0,2mm) (Rueter et al., 2008).

Bei der Spaltheilung wird innerhalb von 3-4 Wochen der Frakturspalt zunächst durch Geflechtknochen aufgefüllt und anschließend zu Lamellenknochen umgebaut. Der Lamellenknochen ist parallel zur Schaftachse ausgerichtet (Rueter et al., 2008).

Im Rahmen der Kontaktheilung wachsen die Osteone longitudinal in die Resorptionskanäle der gegenüberliegenden Kortikalis ein. Diese Resorptionskanäle entstehen durch Osteoklasten. Dies ermöglicht Osteoblasten einzuwandern und den Resorptionskanal mit neugebildetem Lamellenknochen aufzufüllen. Dadurch werden die Knochenfragmente direkt vereinigt (Rueter et al., 2008).

Damit eine primäre Frakturheilung stattfinden kann, benötigt der Knochen eine ausreichende mechanische Stabilität und Vaskularisierung. Dies kann durch eine anatomische Frakturposition und anschließende osteosynthetische Stabilisierung erreicht werden (Rueter et al., 2008).

### **2.2.2 Sekundäre Frakturheilung**

Häufig heilen Frakturen durch eine sekundäre Frakturheilung. Diese erfolgt immer dann, wenn eine anatomische Reposition der Knochenfragmente nicht erreicht wurde (Rueter et al., 2008).

Man kann die sekundäre Frakturheilung in die Frakturphase, die Entzündungsphase, die Granulationsphase, die Phase der Kallushärtung und die Phase des Modeling/Remodeling einteilen (Rueter et al., 2008).

Die Frakturphase beginnt mit der Gewalteinwirkung auf den Knochen und das angrenzende Weichteilgewebe bis zur Fraktur des Knochens. Hierbei werden das Periost, die Kortikalis, die Spongiosa und das Knochenmark verletzt. Dieser Vorgang bedingt ebenfalls die Ausbildung eines Hämatoms im Weichteilmantel (Rueter et al., 2008).

Auf die Frakturphase folgt die Entzündungsphase. Hierbei setzt eine Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung der vorhandenen Stammzellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen ein (Rueter et al., 2008).

Nach ca. 3 Tagen ist die Entzündungsphase beendet. Im Hämatom zeigt sich ein Netz aus Fibrin und Kollagenfibrillen, dieses wird rasch durch Granulationsgewebe ersetzt. Granulationsgewebe besteht aus Lymphozyten, Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und Kapillaren. Granulationsgewebebrücken zwischen den einzelnen Knochenfragmenten bezeichnet man als „weichen Kallus“, in diesem können bereits Mineraldepots nachgewiesen werden. Zeitgleich beginnt der Abbau nekrotischer Fragmente durch Osteoklasten und die Knochenneubildung durch Osteoblasten (Rueter et al., 2008).

Ein medullärer Kallus füllt den Frakturspalt durch Einwanderung eines Blastems aus dem Markraum. Beim Menschen sind nach etwa 3-4 Wochen die Knochenfragmente durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden (Rueter et al., 2008), während sich dieses Stadium bei der Maus schon nach 14 Tagen beobachten lässt (Manigrasso & O'Connor, 2004).

In der Phase der „Kallushärtung“ wird die entstandene Grundsubstanz zunehmend mineralisiert. Der entstehende Geflechtknochen verläuft deshalb entlang der neuen Kapillarsprossung, dies bezeichnet man als enchondrale Ossifikation. Außerhalb des Frakturspalt es beginnt eine periostale Osteoblastenproliferation. Dadurch lagert sich Geflechtknochen zwischen Diaphysenoberfläche und dem Periost ab (Rueter et al., 2008).

In den Bereichen der mechanischen Belastung erfolgt das Modeling zu lamellärem Knochen. Abschließend werden die Knochenkontur und der ursprüngliche Markraum wiederhergestellt (Remodeling) (Rueter et al., 2008).

Die Frakturheilung wird vor allem durch die biomechanischen Verhältnisse im Bereich der Fraktur beeinflusst. Diese bestimmen das Ausmaß der Kallusbildung und der Vaskularisierung im Bereich der Fraktur (Claes et al., 1997; Claes et al., 2002; Garcia et al., 2008). Eine zu große Instabilität führt zu einer verzögerten bzw. ausbleibenden Frakturheilung. Durch die Instabilität der Fragmente gelingt keine knöcherne Überbrückung des Frakturspalt es (Augat et al., 1996), es entsteht eine Pseudarthrose. Allerdings kann sich eine geringe interfragmentäre Bewegung auch positiv auf die Frakturheilung auswirken (Claes et al., 1997), da interfragmentäre Bewegungen die Kallusbildung bis zu einem gewissen Maß stimulieren können (Kenwright et al., 1989; McKibbin et al., 1978). In etwa sechs bis zehn Prozent aller Frakturen entsteht eine Pseudarthrose, wobei die Ursachen hierfür oft multifaktoriell sind (Babhulkar et al., 2005).

### **2.3 Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen**

Zeigt der Frakturspalt 4 Monate nach der Fraktur noch keine knöcherne Durchbauung, wird dies als verzögerte Heilung (delayed union) bezeichnet. Die verzögerte Frakturheilung zeigt jedoch eine weiterhin bestehende Heilungstendenz. Das Ausbleiben der knöchernen Überbrückung einer Fraktur über einen Zeitraum größer als 6 Monate ist als Pseudarthrose definiert (Scharf et al., 2011).

Pseudarthrosen werden grundsätzlich in zwei verschiedene Formen unterschieden, die hypertrophe und die atrophe Pseudarthrose.

Zur Entstehung einer Pseudarthrose tragen je nach ihrer Form verschiedene begünstigende Faktoren bei. Diese Faktoren können als mechanische, biologische, exogene und endogene Faktoren zusammengefasst werden. Diese können sowohl einzeln als auch in Kombination auftreten (Scharf et al., 2011).

### **2.3.1 Hypertrophe Pseudarthrose**

Der Auslöser einer hypertrophen Pseudarthrose liegt in einer unzureichenden mechanischen Stabilität. Die mechanische Instabilität führt im Rahmen der sekundären Frakturheilung zu immer wieder auftretenden Scherkräften im Bereich des neu gebildeten Kallus, welcher hierdurch ständig geschädigt und schließlich zerstört wird (Scharf et al., 2011).

Dies zeigt sich makroskopisch und radiologisch als überschießende „elefantenfußähnliche“ Bildung des Kallus, über die eine höhere mechanische Stabilität erreicht werden soll. Eine wirkliche knöcherne Durchbauung tritt nicht ein (Scharf et al., 2011).

### **2.3.2 Atrophe Pseudarthrose**

Atrophe Pseudarthrosen sind vor allem in Folge von Mikroangiopathien und der daraus resultierenden mangelnden Perfusion der Knochenfragmente zu finden. Aufgrund der verminderten Sauerstoffperfusion findet keine Kallusbildung zwischen den Fragmenten statt, was schließlich zu einer Atrophie dieser führt (Scharf et al., 2011).

Faktoren, welche die Vitalität des Gewebes herabsetzen oder die Frakturheilung verzögern, können die Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose begünstigen. Hierzu zählen z.B. das Alter des Patienten, endokrine oder auch medikamentöse Ursachen, die zum Substanzverlust führen können. Dies kann zu einer ungenügenden Mineralisierung des Knochens und somit zu einer Pseudarthrose führen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Denervierung und Durchblutungsstörungen der umliegenden Weichteile ebenso einen negativen Einfluss auf die Frakturheilung ausüben (Scharf et al., 2011).

Eine Pseudarthrose bedingt eine pathologische Beweglichkeit eines Skelettabschnitts. Dies bedingt Schmerzen, lokale Schwellung und eine geringere Belastbarkeit (Scharf et al., 2011). Die Klassifikation der Pseudarthrose erfolgt durch Röntgendiagnostik. Hierbei kann zwischen hypertropher und atropher Pseudarthrose unterschieden werden. Weiterführend kann durch eine computertomografische Bildgebung die knöcherne Durchbauung beurteilt werden, wohingegen die Vitalität des Knochens vor allem in einer MRT Untersuchung dargestellt werden kann (Scharf et al., 2011).

Die Therapie richtet sich nach der Entstehung der Pseudarthrose. Bei einer hypertrophen Pseudarthrose wird in der Regel eine Resektion der Pseudarthrosenmembran, eine Anfrischung des Knochens und anschließend eine stabile osteosynthetische Versorgung durchgeführt (Scharf et al., 2011).

Bei atropen Pseudarthrosen muss die Vitalität der Knochenenden wiederhergestellt werden. Dies erweist sich häufig als problematisch und benötigt nicht selten mehrere operative Eingriffe (Brownlow et al., 2000). Hierfür erfolgt in der Regel eine Resektion der atropen Knochenenden und eine Auffüllung des entstandenen Defektes. Der Goldstandard hierfür ist weiterhin die autologe Transplantation von Spongiosa oder Knochentransplantaten. Dies zielt auf eine Verbesserung der Vaskularisierung durch neue Wachstumsfaktoren und Zytokine (Scharf et al., 2011).

Das Ziel der Therapie ist die Wiederherstellung der kompletten Kontinuität, um die Stabilität des betroffenen Skelettabschnittes zu gewährleisten (Bennett et al., 2012).

## **2.4 Defektmodelle**

In der Vergangenheit konnten zahlreiche Erkenntnisse über die Physiologie der Knochenbruchheilung durch klinische Studien und in vitro Studien gewonnen werden. Dennoch sind auch heute Tiermodelle weiterhin ein essentieller Bestandteil der Fraktur-/Defektheilungsforschung. Hierfür wurden verschiedene Fraktur-/Defektmodelle an verschiedenen Säugetier- und Vogelarten entwickelt. Je nach Fragestellung der Studie wurden hierfür Spezies verschiedener Größe und Anatomie als Versuchstiere ausgewählt, das Spektrum reicht von Kleinnagetieren wie der Maus (Hiltunen et al., 1993) bis hin zu Großtiersäugern wie dem Schaf (Cheal et al., 1991; Kirker Head et al., 1995). Die unterschiedliche Anatomie der Spezies als auch die Physiologie der Knochenheilung muss in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Eine Übertragbarkeit der erlangten Ergebnisse auf den Menschen muss immer kritisch betrachtet werden (Rhineland et al., 1974), denn die Ergebnisse können in zwei unterschiedlichen Spezies stark variieren. Der Konsens über die Frakturheilung entwickelt sich aus den passenden Ergebnissen zwischen tierexperimentellen Studien und klinischen Studien (Nunamaker et al., 1998; Bigham-Sadegh et al., 2015).

Anatomisch haben kleine Nagetiere wie Mäuse und Ratten eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Das Remodeling findet bei den Kleinnagetieren in so genannten Resorptionshöhlen statt, welche sich in der Nähe der Fraktur bilden und sich später mit Osteoblasten wieder auffüllen.

Dieser Vorgang ist dem Remodeling mit Havers-System zwar sehr ähnlich, allerdings ist über die Unterschiede und deren Relevanz bisher wenig bekannt. Deshalb können kleine Nagetiere nicht für Studien verwendet werden, in denen die Funktion und Beschaffenheit des Havers-

Systems untersucht werden soll. Das Havers-System tritt zuerst bei Kaninchen auf, wobei auch hier gewisse Unterschiede zu dem des Menschen vorliegen (Nunamaker et al., 1998).

Des Weiteren übt das Alter der Versuchstiere einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung aus. Ein juveniler Knochen weist einen wesentlich schnelleren Heilungsverlauf auf als ein seniler Knochen (Lu et al., 2007; Rossant & Nagy, 1995). Als Hinweis auf ein abgeschlossenes Wachstum sollte ein Schluss der Epiphysenfuge radiologisch nachweisbar sein (Nunamaker et al., 1998).

#### **2.4.1 Maus**

Kleintiermodelle sind aktuell zur Untersuchung der Fraktur- und Knochendefektheilung etabliert. Die geringeren Kosten für Haltung und Zucht ermöglichen große Versuchsgruppen. Jedoch besitzt die Knochenstruktur der Maus kein Havers-System, dies muss bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen stets berücksichtigt werden. Darüber hinaus kann sich ein hohes Heilungspotential bei Mäusen entwickeln, sodass selbst unstabilisierte Frakturen ohne Verzögerung heilen können (Colnot et al., 2003; Garcia et al., 2013).

In den letzten Jahren wurden zunehmend neue Modelle zur Untersuchung der ausbleibenden Knochenheilung (Non-Union) mit einer standardisierten definierten Defektzone (critical-size Defekt) entwickelt (Garcia et al 2013). Die Frakturheilung ist bei der Maus in der Regel nach 4 Wochen abgeschlossen. Daher wird eine ausbleibende knöcherne Heilung über das 3-fache der Zeit (12 Wochen) als Pseudarthrose definiert (Garcia et al., 2013).

Zur Stabilisierung der Defektmodelle können verschiedene Implantate zum Einsatz kommen. Der Fixateur externe erreicht eine suffiziente Stabilität im Frakturspalt (Cheung et al., 2003, Choi et al., 2004), jedoch kann der physiologische Bewegungsablauf der Maus durch das über die Haut hinausragende Implantat gestört werden. Zudem können geringe Materialunterschiede große Auswirkungen auf die Frakturstabilität hervorrufen. Dies macht eine vorherige mechanische Materialtestung unabdingbar (Cheung et al., 2003, Choi et al., 2004, Claes et al., 2009; Strube et al., 2008; Dickson et al., 2008). Durch Oetgen et al. wurde 2008 mittels instabiler Fixation die Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose erreicht. Diese im klinischen Alltag verhältnismäßig einfach durch eine stabile osteosynthetische Versorgung therapiert werden (Garcia et al., 2013). Mit der Implantation eines intramedullären Pins mit extramedullärem Clip (Garcia et al., 2008) konnte das erste reproduzierbare Non-union Modell entwickelt werden (Garcia et al., 2013). Somit konnten definierte segmentale Defekte von 1,8mm standardisiert stabilisiert werden (Garcia et al., 2008). Durch die Entwicklung des

„Mouse Nail“, (RISystems, Davos Platz, Schweiz; Garcia et al., 2009) konnte eine hohe Standardisierung des Modells erreicht werden. Durch verriegelte Marknägeln mit standardisierter Länge und standardisiertem Durchmesser konnte mit einer Sägelehre eine definierte Defektzone von 2mm geschaffen werden (Garcia et al., 2009).

#### **2.4.2 Ratte**

Ratten werden bereits seit 1995 zur Untersuchung von Pseudarthrosen verwendet. Hierbei kommen Femur, Tibia, Fibula und Radius als Frakturlokalisationen zum Einsatz (Hietaniemi et al., 1995; Hausman et al., 2001; Utvag et al., 2001; Dickson et al., 2008; Claes et al., 2009). Die Körpergröße der Ratte erleichtert vor allem die operativen Schritte und biomechanischen Testungen. Grundsätzlich sind die Pseudarthrosemodelle der Ratte mit denen der Maus vergleichbar. So werden auch hier instabile Pin Osteosynthesen als auch stabile Techniken wie Verriegelungsmarknagel, Platte und Fixateur externe eingesetzt (Bonnarens & Einhorn, 1984; Wingerter et al., 2007; Kaspar et al., 2007; Drosse et al., 2008, Russel et al., 2007; Schoen et al., 2008; Zhang et al., 2012).

#### **2.4.3 Schaf**

Für die Entwicklung und Testung neuer Human-Implantate ist das Schaf aufgrund der Größe und Anatomie ein beliebtes Versuchstier (Cheal et al., 1991; Kirker-Head et al., 1995; Richardson & Nunamaker, 1991; Steen et al., 1988). Aufgrund früherer Studien ist sowohl die primäre Frakturheilung über das Havers-System (Schenk & Willenegger, 1977) als auch die sekundäre Frakturheilung (Schemitsch et al., 1995; Steen et al., 1989) sehr gut beschrieben. Allerdings führen die hohen Kosten für Zucht und Haltung zu einer erschwerten Durchführung großer Versuchsgruppen (Nunamaker, 1998).

### **2.5 Knochenersatzmaterialien**

Knochenersatzmaterialien gewinnen in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung im klinischen Einsatz, insbesondere zur Behandlung großer Knochendefekte in langen Röhrenknochen (Carson et al., 2007). Jedoch werden bereits seit über 100 Jahren Knochenersatzmaterialien eingesetzt (Carson et al., 2007). Hierbei kann man verschiedene Arten von Knochenersatzmaterialien nach Ursprung und Wirkung auf die knöchernen Regeneration und Frakturheilung unterteilen (Carson et al., 2007)

Man unterteilt in:

- autologe Knochenersatzmaterialien
- allogene Knochenersatzmaterialien
- xenogene Knochenersatzmaterialien
- alloplastische Knochenersatzmaterialien
  - Bioresorbierbare Knochenersatzmaterialien
  - Polymere (Polymer-Zemente)
  - Bioaktive Knochenersatzmaterialien
  - Bioinerte Knochenersatzmaterialien

Das optimale Knochenersatzmaterial sollte osteoinduktiv, osteokonduktiv, biokompatibel, biodegradierbar und nicht zuletzt mechanisch belastbar sein. Die Rate der Degradation sollte bestenfalls der Rate der Osteoneogenese entsprechen (Suchanek et al., 1998; Vallet-Regi et al., 2006; Bauer et al., 2000; Bernstein et al. 2007).

### **2.5.1 Autologe Knochenersatzmaterialien**

Der aktuelle Goldstandard im klinischen Einsatz ist die Verwendung autologer Knochentransplantate. Auf Grund seiner biologischen Struktur provoziert ein autologer Knochen keine Abstoßungsreaktion und wirkt durch bereits enthaltene endogene bioaktive Moleküle osteoinduktiv. Zusätzlich bringt er bereits die entsprechenden Zielzellen mit, auf welche diese Moleküle wirken können (Carson et al., 2007). Die Nachteile der autologen Transplantation liegen in der erhöhten Komorbidität der Entnahmestelle (Younger et al., 1989), der limitierten Menge und der interindividuellen Unterschiede der Knochenqualität. Aufgrund der limitierten Knochenmenge können größerer Defekte mit einer alleinigen autologen Transplantation nicht versorgt werden (Carson et al., 2007; Garcia et al., 2013).

### **2.5.2 Allogene Knochenersatzmaterialien**

Die allogene Knochentransplantation dient häufig als Alternative zur autologen Knochentransplantation. Hierzu werden Leichenknochenspenden oder Knochenspenden aus Femurköpfen nach Hüft-Total-Endoprothesen-Implantation eingesetzt. Der Nachteil dieser Methode ist das Risiko der Übertragung einer Infektion vom Spender auf den Empfänger, welche auch nach vorheriger Testung nicht komplett ausgeschlossen werden kann (Asselmeier et al., 1993). Des Weiteren besteht die seltene Gefahr einer Immunreaktion des Empfängers auf den Spenderknochen bis hin zur Abstoßungsreaktion (Bauer et al., 2007).

### **2.5.3 Xenografts**

Als weiteres Knochenersatzmaterial kommen Xenografts zum Einsatz. Diese sind tierischen, meist bovinen Ursprungs. Zur Eliminierung einer erhöhten immunologischen Reaktion werden im Herstellungsprozess der Xenografts alle organischen Anteile entfernt. Jedoch zeigen die Xenografts keine hohe Degradationsrate und sind noch Jahre nach Implantation radiologisch nachweisbar (Lorenzetti et al., 1998).

### **2.5.4 Alloplastische Knochenersatzmaterialien**

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik der autologen, allogenen und xenogenen Knochentransplantaten gewinnen synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien zunehmende Bedeutung in der Forschung und dem klinischen Einsatz.

Synthetische Knochenersatzmaterialien sind einfacher verfügbar und können den Ansprüchen entsprechend modifiziert werden (Hench et al., 1984; Rose et al., 2002; Beaman et al., 2006; Dorozhkin, 2011). Der Vorteil ist ein geringeres Risiko für Infektionen, immunologische Reaktionen und Komorbiditäten gegenüber autologen, allogenen und xenogenen Transplantaten. Deshalb erweisen sich diese besonders im Einsatz bei großen Defekten als sinnvolle Alternative zu Knochentransplantaten. (Trenholm et al., 2005; Welch et al., 2003; Horstmann et al., 2003; Kelly et al., 2001; Moed et al., 2003; Dorozhkin, 2011)

Aktuell werden einige synthetische Knochenersatzmaterialien klinisch eingesetzt (Rueger et al., 1995; Greenwald et al., 2001; Finkemeier et al., 2002; Giannoudis et al., 2005; Böhner et al., 2010; Dorozhkin, 2011). Die ersten klinisch eingesetzten synthetischen Keramiken waren Calcium-Phosphate (Mathijsen, 1852; Pflaster von Paris), zu diesen liegen die meisten Nachuntersuchungen vor (Carson et al., 2007). Weitere klinisch eingesetzte alloplastische Knochenersatzmaterialien sind bioaktives Glas, Glas-Keramiken und Calcium-Orthophosphate (Le Guéhennec et al., 2004; Dorozhkin, 2011).

### **2.5.5 Bioresorbierbare Knochenersatzmaterialien**

Zu den bioresorbierbaren Knochenersatzmaterialien zählen Calcium-Phosphat-Keramiken, z.B. Beta-Tri-Calcium-Phosphat ( $\beta$ -TCP), welches dem mineralen Bestandteil der Knochen und Zähne ähnlich ist (Chernousova et al., 2014). Dieser Anteil setzt sich aus Calcium-Phosphat (85-90%), Calcium-Carbonat (8-10%), Magnesium-Phosphat (1,5%) und Calcium-Fluorid (0,3%) zusammen. (Lichte et al., 2011)

Die Resorption des Scaffolds erfolgt durch die zelluläre Reaktion der Osteoklasten. Die Resorptionsrate hängt von der chemischen Zusammensetzung (Carson et al., 2007), der

Oberfläche und der Porosität des Materials ab (Lichte et al., 2011). Die menschliche Porengröße der Spongiosa entspricht ca. 100-500  $\mu\text{m}$  (Kühne et al., 1994), somit ist dies als ausreichende Porengröße, um eine Vaskularisation und Zellbesiedelung des Scaffollds gewährleisten zu können, notwendig (Gauthier et al., 1999; Hing et al., 1999; Carotenuto et al., 1999; Dorozhkin 2011).

Durch die chemische Zusammensetzung unterscheidet sich das biologische Verhalten der Keramiken in vivo. Calcium-Orthophosphatkeramiken ( $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_{10}[[\text{K}/\text{Na}](\text{PO}_4)_2$ ) zeigen ein besseres Einwachsverhalten und eine höhere Abbaugeschwindigkeit als Tri-Calcium-Phosphat (TCP), (Jorn et al., 2009; Knabe et al., 2008), welches aktuell klinisch am häufigsten als resorbierbares und bioaktives Knochenersatzmaterial eingesetzt wird (Dombrowski et al., 2013, C. Müller et al., 2012).

### **2.5.6 Polymere (Polymerzemente)**

Des Weiteren werden Polymere und Polymerzemente als Knochenersatzmaterialien verwendet, welche aus mehreren in Ketten angeordneten Monomeren bestehen. Polymere können auf Grund ihrer Viskoelastizität in entsprechend komplexe Strukturen geformt werden. Der Nachteil der Polymere liegt jedoch in ihrer geringen mechanischen Belastbarkeit. Das am häufigsten eingesetzte Polymer ist Polymethylmetacrylat (PMMA), welches im klinischen Alltag als Knochenzement eingesetzt wird. Dieses setzt allerdings während der Polymerisation toxische Monomere und Hitze frei, was zu lokalen Nekrosen und einer erhöhten inflammatorischen Körperreaktion führen kann (Dorozhkin, 2011; Temenoff et al., 2000). Außerdem zeigt PMMA weder eine Biodegradation noch eine Bioaktivität und erlaubt somit keinen knöchernen Ersatz des Materials (Dorozhkin, 2011; Temenoff et al., 2000).

### **2.5.7 Bioaktive Knochenersatzmaterialien**

Bioaktive Knochenersatzmaterialien zeigen eine Bindung zwischen dem Ersatzmaterial und dem Knochen. Zuerst ist dieser Effekt für spezifische Gläser beschrieben worden, die über einen dem Knochen entsprechenden Anteil an  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  und  $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$  besitzen. Die Verbindungen führen zum schnellen Entstehen von Hydroxyl-Carbonapatit-Kristallen (HCA). Diese bioaktiven Gläser können jedoch nicht resorbiert werden und erlauben somit ebenfalls keinen knöchernen Ersatz des Materials. Um die Bindungsfähigkeit zu erhöhen werden häufig Apatite oder Wollastonit-Kristalle beigefügt, was zu einer höheren mechanischen Stabilität führt. Da die Stabilität jedoch nicht der von Knochen entspricht, können Glashybridkeramiken zwar zum Auffüllen großer Defekte genutzt werden, dürfen aber nicht in gewichtsbelasteten Bereichen eingesetzt werden. (Carson et al., 2007)

### **2.5.8 Bioionierte Knochenersatzmaterialien**

Bioionierte Knochenersatzmaterialien reagieren nicht mit den angrenzenden Geweben. Dadurch zeigen sie die höchste mechanische Stabilität aller Knochenersatzmaterialien. Ihr Hauptbestandteil sind meist Metalloxide ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ;  $\text{ZrO}_2$ ;  $\text{TiO}_2$ ). Aufgrund der fehlenden Verbindung mit dem Knochen ist ihr Einsatz nur dort möglich, wo keine großen Scher- und Torsionskräfte entstehen (Carson et al., 2007).

### **2.6 Zielsetzung**

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung di- und metaphosphathaltiger Calcium-Orthophosphat-Keramiken hinsichtlich Biokompatibilität, Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und Biodegradation.

Hierzu wurde eine in vitro REM-Untersuchung und eine tierexperimentelle Untersuchung nach einem etablierten Tiermodell durchgeführt.

### **2.7 Fragestellung**

In den durchgeführten tierexperimentellen Studien sollte herausgefunden werden, ob neuartige Calcium-Orthophosphat-Keramiken mit unterschiedlichen Anteilen an Di- und Metaphosphaten (D40, D33 und D22) als Scaffold einen critical-size-Defekt im Gegensatz zu einem critical-size-Defekt ohne Interponat zur Ausheilung bringen können. Bislang ist nicht bekannt, wie sich die unterschiedlichen Scaffolds in vivo verhalten und ob die Heilung gehemmt, nicht beeinflusst oder gefördert wird.

Die Nullhypothese lautet:

**„Die Heilung eines critical-size-Defektes im Femur der Maus zeigt nach Augmentation mit einem di- und metaphosphathaltigen Calcium-Orthophosphat-Keramikscaffold (Verum) keinen Unterschied gegenüber der Heilung ohne Scaffold (Kontrolle).“**

Die Heilung des Defektes wurde 5, 10 und 25 Wochen nach Osteotomie mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden am postmortalen Femur untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Intervention

##### 3.1.1 Versuchsprotokoll

Der Tierversuch wurde am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die zuständige Behörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigte das Projekt unter dem AZ 30/2009.

Für die Versuchsdurchführung wurden 192 Mäuse verwendet. Davon wurden 144 Tieren ein di- und metaphosphathaltiges Calcium-Orthophosphat-Keramikscaffold in einen critical-size-Defekt des rechten Femurs orthotop implantiert. Je 48 Mäuse wurden mit dem Scaffold D40, D33 und D22 versorgt. Die restlichen 24 dienten als Kontrolltiere, der critical-size-Defekt wurde mit einem verriegelten Marknagel ohne zusätzliche Implantation eines Scaffolds stabilisiert.

Bei weiteren 24 Mäusen wurde ein Scaffold beidseits in die Flanke im Sinne einer ekto-Implantation eingebracht, wobei je 8 Mäuse das Scaffold D40, D33 und D22 erhielten.

Die Analyse der Femora wurde 5, 10 und 25 Wochen nach Osteotomie mit Hilfe radiologischer, biomechanischer und histologischer Methoden durchgeführt.

Die Auswertung der ekto-implantierten Scaffolds erfolgte 4 bzw. 12 Wochen postoperativ mit radiologischer und histologischer Untersuchung.

	<b>D40</b>	<b>D33</b>	<b>D22</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Standzeit Biomechanik</b>				
5 Wochen	n=8	n=8	n=8	n=8
10 Wochen	n=8	n=8	n=8	n=8
25 Wochen	n=8	n=8	n=8	n=8
<b>Standzeit Histologie/Radiologie</b>				
5 Wochen	n=8	n=8	n=8	n=8
10 Wochen	n=8	n=8	n=8	n=8
25 Wochen	n=8	n=8	n=8	n=8

*Tabelle 1: Versuchsprotokoll der orthotopen Implantation*

	<b>D40</b>	<b>D33</b>	<b>D22</b>
Standzeit Histologie/Radiologie			
4 Wochen	n=8	n=8	n=8
12 Wochen	n=8	n=8	n=8

Tabelle 2: Versuchsprotokoll der ektopen Implantation

### 3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere dienten CD-1 Mäuse mit einem Körpergewicht von 28-38 kg.

Die Tierhaltung erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg, unter klimatisierten Raum-Bedingungen (Lufttemperatur: 22 - 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) mit einem 12-stündigem Tag- / Nachtrhythmus in Käfigen bis zu 5 Mäusen. Es wurden Wasser sowie Standarddiätfutter der Firma Altromin (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) in Pelletform ad libitum bereitgestellt.

### 3.1.3 Di- und metaphosphathaltige Calcium-Orthophosphat-Keramikscaffolds

Alle untersuchten Scaffolds bestanden zum Hauptanteil aus  $\text{Ca}_{10}[\text{K/Na}](\text{PO}_4)_7$  (Orthophosphat,  $Q_0$ ) mit unterschiedlichen Anteilen Di- ( $Q_1$ ) und Metaphosphaten ( $Q_2$ ). Die jeweiligen Scaffolds bezeichneten wir mit D40, D33 und D22 entsprechend ihres Diphosphatanteiles (Tab. 3).

Scaffold	Orthophosphat ( $Q_0$ ) $X^*(\text{Ca}_{10}[\text{K/Na}](\text{PO}_4)_7)$	Diphosphat ( $Q_1$ ) $X^*(\text{M}'\text{P}_2\text{O}_7)_n$	Metaphosphat ( $Q_2$ ) $X^*(\text{M}'\text{PO}_3)_n$
D40	56%	40%	4%
D33	65%	33%	2%
D22	75%	22%	4%

Tabelle 3: Prozentuale Anteile von Ortho- ( $Q_0$ ), Di- ( $Q_1$ ) und Metaphosphaten ( $Q_2$ ) in den verwendeten Scaffolds

Die verwendeten Scaffolds wurden durch die Bundesanstalt für Materialforschung und Prüfung, Berlin, hergestellt. Die Grundsubstanzen Calcium Oxid ( $\text{CaO}$ ) und Phosphor-Pentoxid ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) wurden unter Zugabe von Natrium-Oxid ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), Kalium-Oxid ( $\text{K}_2\text{O}$ ) und Magnesium-Oxid ( $\text{MgO}$ ) bei Temperaturen bis zu 1600°C in einem Platin-Schmelz-Topf für 120 Minuten gesintert. Dies führt zur kristallinen Hauptphase  $\text{Ca}_{10}[\text{K/Na}](\text{PO}_4)_7$ . Je nach Variation der oben genannten Zusatzstoffe entstehen bis zu 40% Diphosphat- und bis zu 4% Metaphosphatanteile. Die Qualität und Quantität der entstandenen Keramiken wurde mittels  $^{31}\text{P}$ -Phosphor-Magnetresonanzspektroskopie ( $^{31}\text{P}$ -MAS-NMR-Spektroskopie) bestimmt (Dombrowski et al.,

2013). Die Sinterprodukte wurden zunächst per Hand zermörsert und anschließend in einer Vibrations-Mikromühle (Pulverisette, Fritsch, Deutschland) für maximal 30 Sekunden zerkleinert. Die kurzen Intervalle in der Vibrationsmikromühle mit geringer Energie führen zu einer Zerkleinerung mit einer großen Anzahl an irregulär geformten Partikeln mit einer Größe von 25-150  $\mu\text{m}$ , ohne dass eine zu große Feinfraktion unter 25  $\mu\text{m}$  anfällt. Anschließend wurde das Pulver gesiebt, sodass Partikel unterschiedlicher Größe getrennt wurden. Man unterteilt klein (25-45  $\mu\text{m}$ ), mittlere (45-63  $\mu\text{m}$ ) und große Partikel (63-90  $\mu\text{m}$ ). Die spezifische Oberfläche jeder Fraktion wurde durch Krypton-Adsorption in einem Accelerated Surface Area and Porosimetry System (ASAP) (Micromeritics, Norcross USA) bestimmt (Dombrowski et al., 2013). Für den 3D-printing Prozess (R1 Printer Pro Metal Company, USA) wurden jeweils 33,3ma% der Fraktionen gemischt und zylindrische Proben mit einem Durchmesser  $d=2,5$  mm, einer Höhe  $h=2$ mm und einer Innenbohrung  $d=0,8$ mm hergestellt (siehe Abbildung 1). Nachdem die entstandenen Scaffolds bei 125°C für 48h getrocknet wurden, erfolgte ein erneutes Sintern nach thermalen Analysen in einem Temperaturbereich von  $T=900^{\circ}\text{C}$  – 1300°C. Aufgrund der Auflösungsgrenzen des 3-D Druckers können Abweichungen der Höhe und des Außendurchmessers entstehen, diese betragen im Mittel 180  $\mu\text{m}$ . Zur Implantation in das Mäusefemur und Stabilisierung mit dem Locking Mouse Nail musste ein Innendurchmesser von 0,8mm gewährleistet werden. Aus diesem Grund wurden die Innenbohrungen mit einem Diamant-Bohrer ( $d=0,8$ mm) nachbearbeitet. (siehe Abbildung 1).

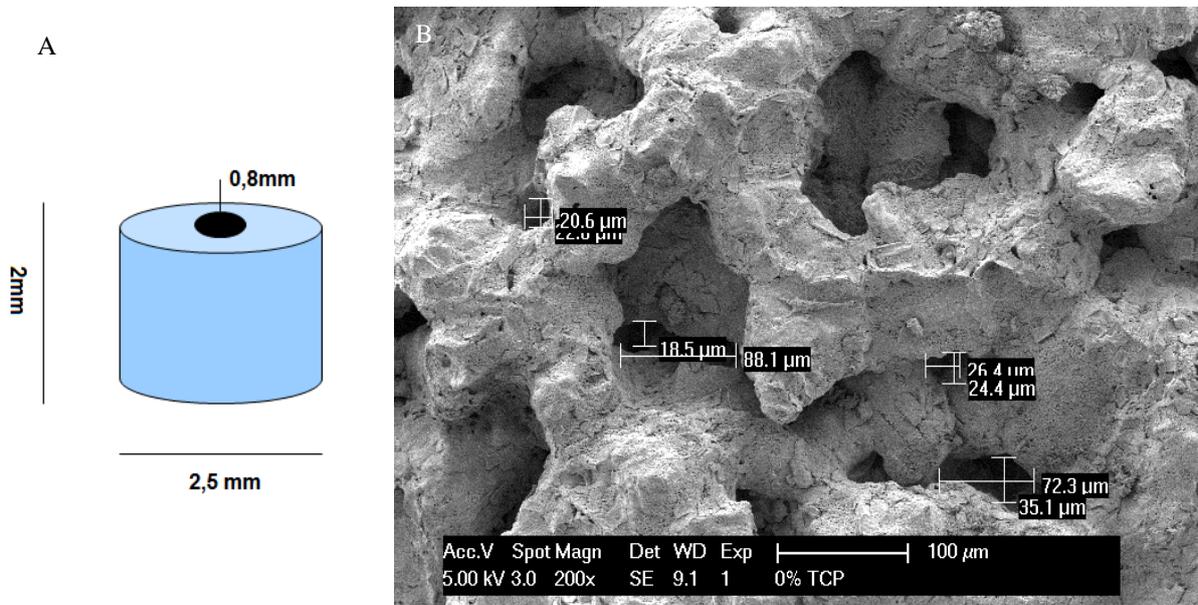


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Scaffolds mit Größenangaben (A), REM Aufnahme des Scaffolds zur Darstellung der Porosität in 200x facher Vergrößerung (B)

### **3.1.4 Besiedlung der Scaffolds mit Osteoblasten und REM Analyse**

Die In-Vitro Besiedelung der Scaffolds mit Osteoblasten erfolgte zur Untersuchung der Adhäsion der Osteoblasten an die Scaffolds verschiedener chemischer Kompositionen.

Die Keramiken wurden zunächst auf Glas-Deckgläsern (Durchmesser 15mm) mittels 20µl Agarose Typ IX (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103) fixiert.

Um eine bessere Anhaftung der Agarose Typ IX an die Deckgläser zu erreichen, wurden diese zunächst mittels Kollagen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) beschichtet. Das Kollagen wurde mit 0,1%iger Essigsäure auf  $c=100\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Hiervon wurden je 100µl auf ein Deckglas gegeben und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Deckgläser über Nacht auf einer Sterilbank getrocknet.

Im nächsten Schritt erfolgte die Sterilisation der Proben mittels Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) und Ethanol (70%) für 20 Minuten.

Die zur Besiedelung notwendigen Osteoblasten (NHost, Lonza Köln, Köln, Deutschland) wurden zunächst mittels Neubauer-Zählkammer abgelöst und ausgezählt. Dann erfolgte die Aussaat mit 200 Zellen/mm<sup>2</sup> auf die Grundfläche eines „wells“ einer 12 well-plate (Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). Anschließend wurden die vorbereiteten Keramiken hinzugefügt und in einem Medium (Osteoblast Growth Medium, Lonza Köln, Köln, Deutschland) zusammen mit 1% Gentamycin/Amphotericin für zwei Tage inkubiert.

Nach der Inkubation der Proben folgte die Osmierung. Hierzu wurden die Proben 3x für je 10 Minuten in Cacodylat-Puffer gewaschen. Nach Entfernung des Cacodylatpuffers wurde 1ml Osmiumtetroxidlösung auf die Proben gegeben und für zwei Stunden im Dunkeln inkubiert. Durch diesen Prozess konnten die Proben kontrastiert und die Membranen stabilisiert werden.

Nun wurden die Proben jeweils 4x20 Minuten mit Aqua Dest gewaschen. In der letzten Waschlösung wurden die Proben mit Vitamin C/Methanol auf eine zu starke Schwarzfärbung überprüft.

Als letzter Schritt der Präparation erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Proben wurden über Nacht in Hexamethyldisilazan (HMDS) gelagert.

Die Raster-Elektronen-Mikroskopie(SEM)-Aufnahmen erfolgten anschließend am institutseigenen Gerät (FEI XL 30 ESEM FEG, Hillsboro, USA).

### **3.1.5 Operation**

Die Operationen erfolgten im Tieroperationssaal des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg, und wurde in allen Fällen in gleicher standardisierter Weise durchgeführt.

Zur Narkose diente die intraperitoneale Gabe von 2% Xylazin (2mg/kg Körpergewicht, Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und Ketamin (75mg/kg Körpergewicht, Ursotamin, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland). Zur weiteren Schmerztherapie erfolgte am Operationstag sowie über die ersten 7 Tage postoperativ die subkutane Gabe von 0,05 ml Caprofren® (Rimadyl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland).

Nach Überprüfung des vollständig erloschenen Zwischenzehenreflexes wurde das OP-Feld mit asid®-med Enthaarungscreme (ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) vollständig von der Behaarung befreit und anschließend mit Softasept® Hautdesinfektion (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 3-fach desinfiziert.

Es wurden zwei verschiedene Operationsverfahren angewandt.

### **3.1.6 Ektope Implantation in die Flanke der Maus**

Die Operation erfolgte in Bauchlage der Maus. Nach oben genannter Vorbereitung wurde die Haut auf einer Länge von 5mm paravertebral rechts in der Glutealregion parallel zum Wirbelsäulenverlauf eröffnet. Die Faszie wurde in 90° versetzt zum Hautschnitt gespalten und die Muskulatur des oberflächlichen Glutealmuskels stumpf mit einer Mikropinzette gespreizt. In die so entstandene Muskeltasche wurde nun das Scaffold eingelegt. Daraufhin erfolgte der adaptierende Verschluss der Muskulatur mit Prolene 6-0 Nahtmaterial (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) in Einzelknopfnahntechnik. Abschließend wurde die Haut ebenfalls in Einzelknopfnahntechnik mit Prolene 6-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Nach der Hautnaht erfolgte das analoge Vorgehen an der Gegenseite.



*Abbildung 2: Operationsgebiet nach Enthaarung vor dem Hautschnitt*



*Abbildung 3: Hautschnitt paravertebral rechts*



*Abbildung 4: Stumpfe Präparation der Muskeltasche in den oberflächlichen Glutealmuskel*



*Abbildung 5: Scaffold vor der Implantation*



*Abbildung 6: Implantation der Keramik in die präparierte Muskeltasche des oberflächlichen Glutealmuskels*



*Abbildung 7: Scaffold nach Implantation in die Muskeltasche vor der Hautnaht*

### 3.1.7 Orthotope Implantation in das Femur der Maus

Nach oben genannter Vorbereitung des rechten Oberschenkels wurde die Maus in Rückenlage gelagert. Zur Stabilisierung des critical-size-Defektes wurde der Mouse Nail (RISystems, Davos Platz, Schweiz) verwendet.

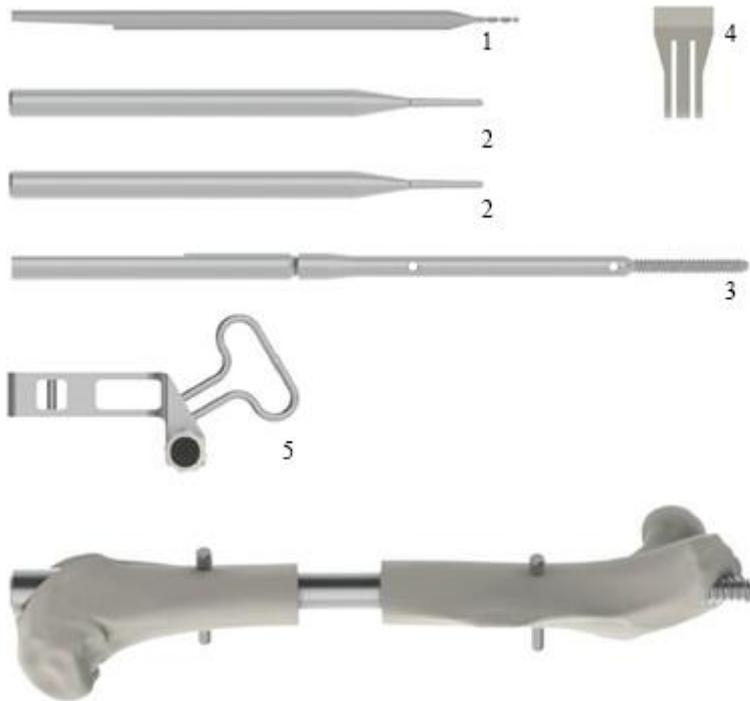


Abbildung 8: Mouse Nail (RISystems Davos Platz, Schweiz): (1) Pin-Bohrer (2) Verriegelungspin (3) Mouse Nail (4) Sägelehre (5) Zielbügel

Die erste Hautinzision erfolgte medial parapatellar über eine Länge von ca. 5mm. Die Kniegelenkscapsel wurde ebenfalls medial parapatellar über eine Länge von 5mm eröffnet, die Patella wurde nach lateral luxiert. Der Markraum wurde zentral in der Fossa intercondylaris im Verlauf der Femurschaftachse mit einem 0,5mm Mikrobohrer (GG12, Proxxon GmbH, Föhren, Deutschland) bei 20000 Umdrehungen/min eröffnet. Danach wurde das Bohrloch mit einem 0,8mm messenden Bohrer bei 20000 Umdrehungen/min erweitert. Im Anschluss wurde der Markraum des Femurs zunächst mit einer 24G BD Microlance™ 3 Kanüle (0,55 x 25mm, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) aufgebohrt, die proximale Kortikalis wurde ebenfalls mit Kanüle eröffnet. Dann wurde der Markraum mit einer 22G BD Microlance™ 3 Kanüle (0,70 x 30mm) Spritzkanüle zum komplikationslosen Einbringen nochmals erweitert, dabei durfte die proximale Kortikalis nicht durchdrungen werden.

Anschließend wurde der Mouse Nail (RISystems, Davos Platz, Schweiz) in das Femur eingebracht.

Daraufhin erfolgte die zweite Hautinzision nach Umlagern der Maus in die Seitenlage lateral über dem Femurverlauf auf ca. 1cm Länge. Anschließend wurde die Fascia lata über gleiche Länge gespalten. Nun erfolgte die stumpfe Präparation des Femurs durch Auseinanderdrängen der Muskulatur des Vastus lateralis des M. quadriceps femoris und des M. biceps femoris. Die Darstellung über die komplette Zirkumferenz wurde durch das Umfahren des Femurs mit einer gebogenen Klemme erreicht. Die geöffnete Klemme verblieb als Wundspreizer während der Operation in situ. Es folgte das Aufsetzen des Zielbügels auf den Mouse Nail sowie das Anbringen der Sägelehre. Mit einer 0,22mm Gigli-Drahtsäge (RISystem, Davos Platz, Schweiz) wurde eine 2mm Osteotomie anhand der Sägelehre unter regelmäßiger Spülung durchgeführt. Nach vollständiger Durchtrennung der Femurkortikalis wurde der Zielbügel entfernt und der Mouse Nail bis über den distalen Osteotomiespalt zurückgezogen. Der entstandene Sequester wurde entfernt. Das Scaffold wurde in den critical-size-Defekt eingelegt, der Mouse Nail wurde über die zentrale Bohrung des Scaffolds vorgeschoben und das Gewinde wurde in die proximale Kortikalis eingeschraubt. Das Vorschrauben des Nagels erfolgte bis zum vollständigen Kontakt des proximalen und distalen Knochenendes mit der Scaffoldoberfläche. Der Zielbügel wurde erneut zur Verriegelung des Nagels eingebracht. Zunächst wurde der proximale Knochenteil nach Aufbohren der Kortikalis mit einem Handbohrer mit dem entsprechenden Verriegelungspin verriegelt. Anschließend erfolgte das analoge Vorgehen am distalen Knochenteil. Der Zielbügel wurde entfernt und der überstehende Teil des Femurnagels auf Condylenebene gekürzt. Nach Ausschluss einer Fraktur und Spülung der Wundhöhle folgte eine adaptierende Naht der Muskulatur. Die Hautnaht erfolgte in Einzelknopfnahntechnik über dem lateralen Zugang mit Prolene 6-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Patella wurde reponiert und die Kniegelenkkapsel und die Haut mit Prolene 6-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) in Einzelknopfnahntechnik verschlossen. Knie- und Hüftgelenk wurden auf eine freie Beweglichkeit überprüft, die korrekte Implantatlage wurde in einer postoperativen Röntgenkontrolle festgehalten (Fraxitron MX-20, Fraxitron, Tucson, USA).



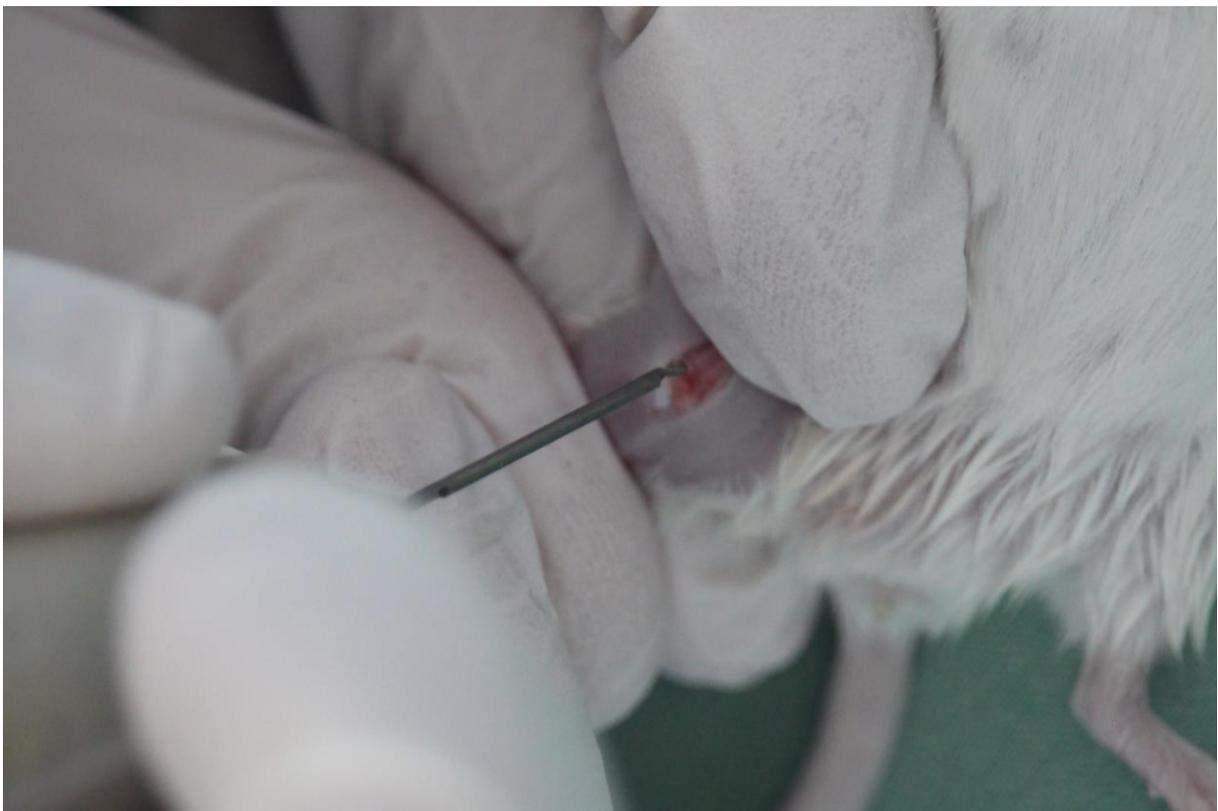
*Abbildung 9: Operationsgebiet nach Enthaarung vor dem Hautschnitt*



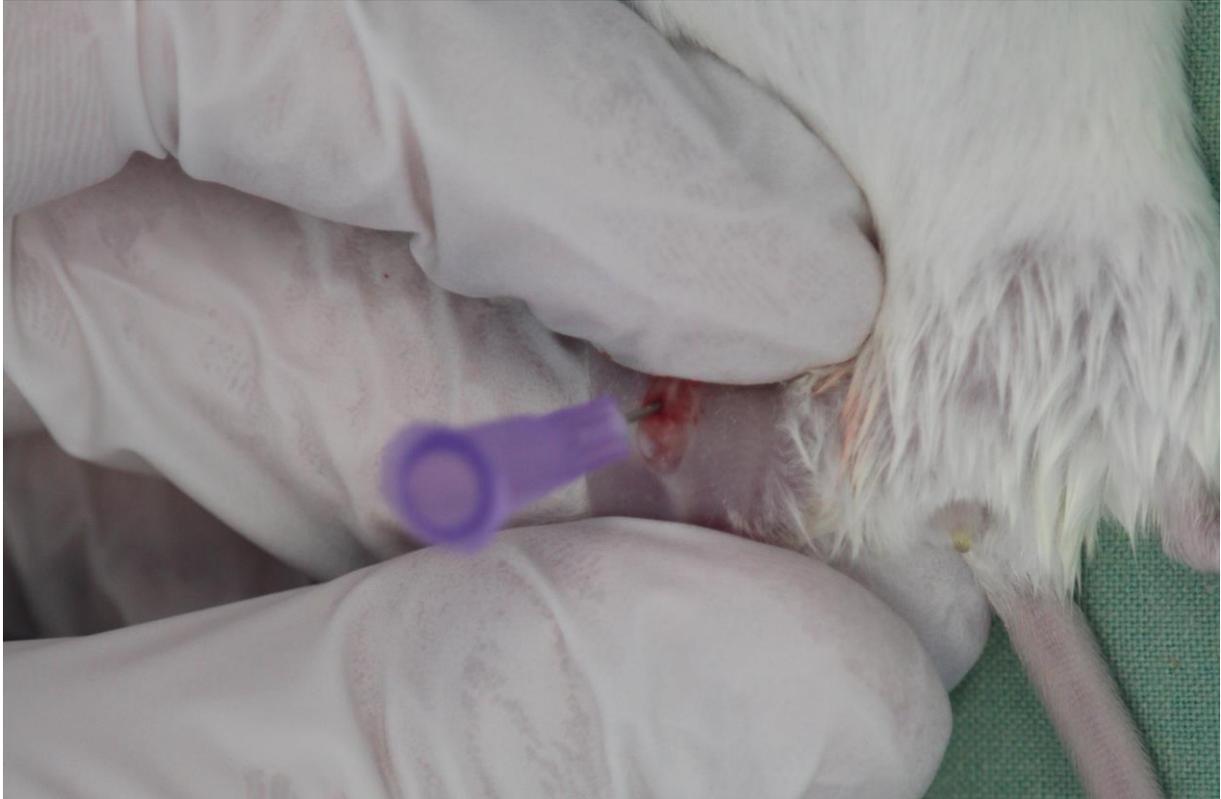
*Abbildung 10: Fixierung des Beines für den operativen Zugang*



*Abbildung 11: Sicht auf das Lig. patellae nach Hautschnitt*



*Abbildung 12: Eröffnung des Markraums im Bereich der Fossa intercondylaris nach Luxation der Patella nach lateral*



*Abbildung 13: Aufbohren des Markraumes mit einer 24G Spritzkanüle (0,55 x 20mm)*



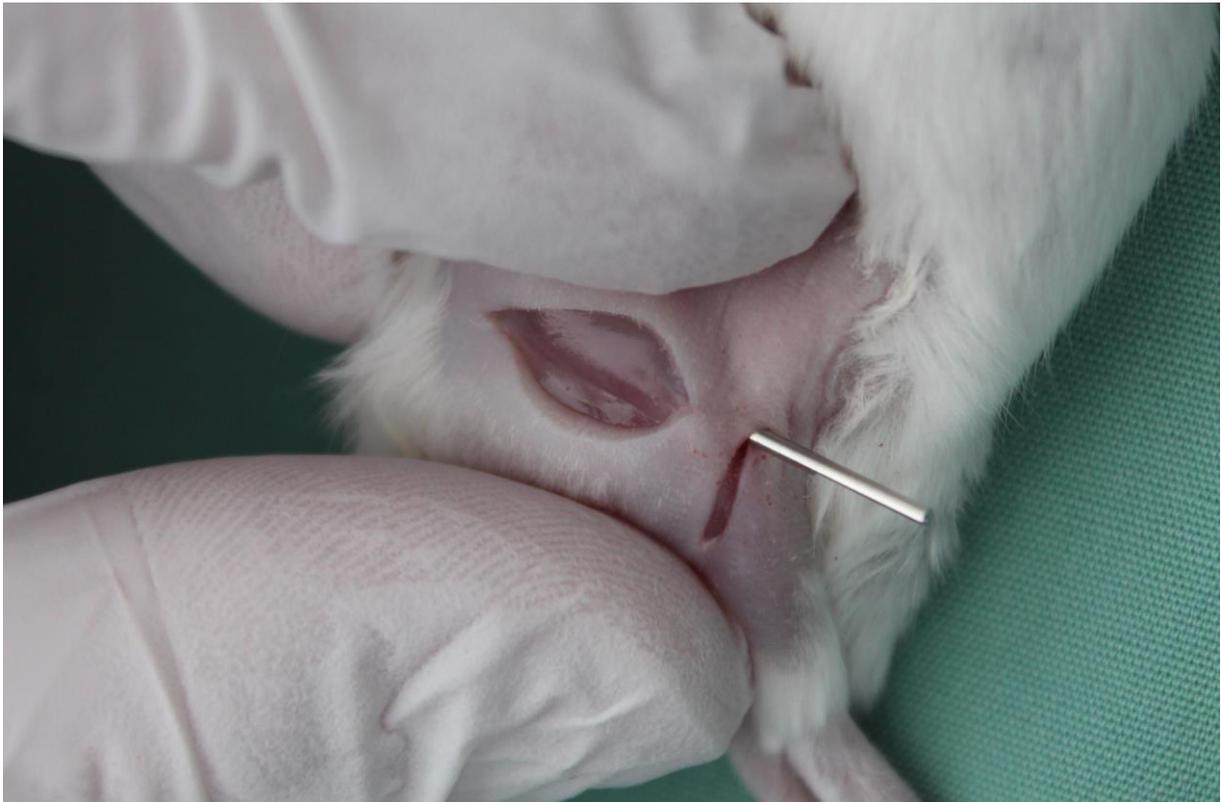
*Abbildung 14: Aufbohren des Markraumes mit einer 22G Spritzkanüle (0,70 x 30mm)*



*Abbildung 15: Einbringen des Mouse Nail*



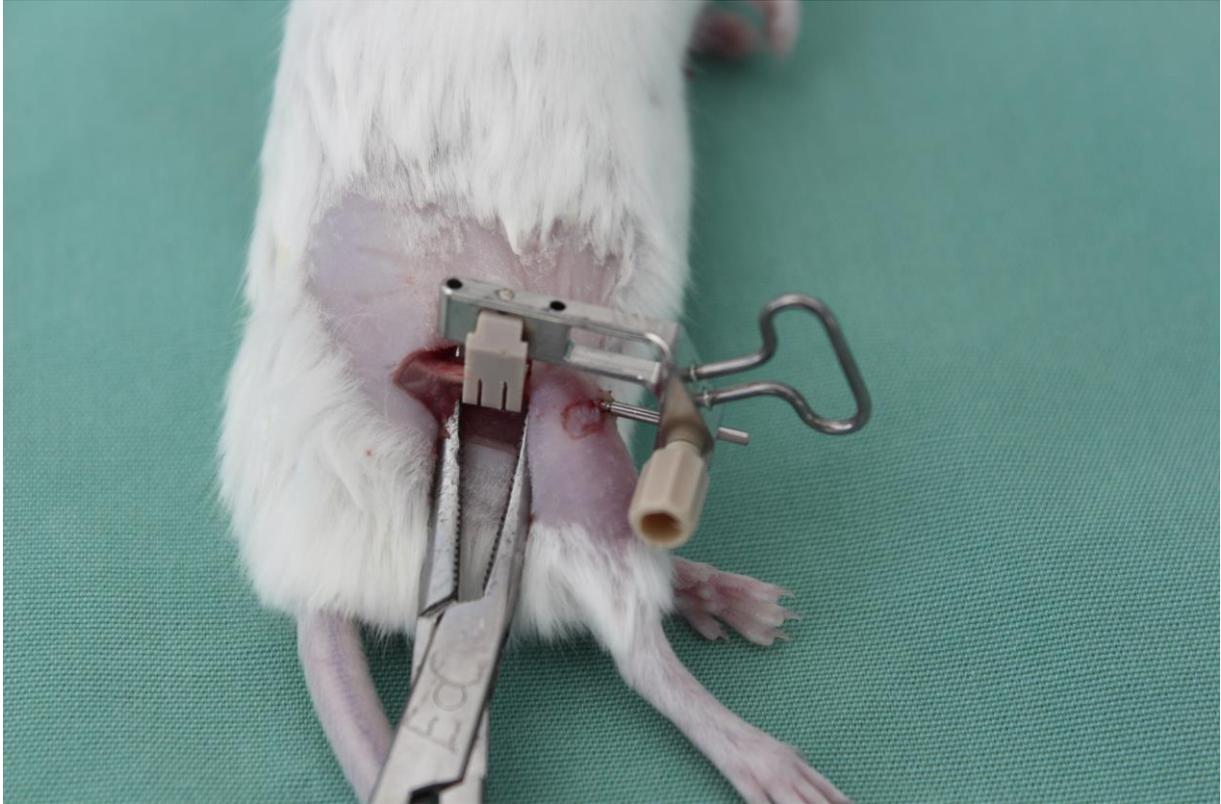
*Abbildung 16: Hautschnitt entlang des lateralen Oberschenkels*



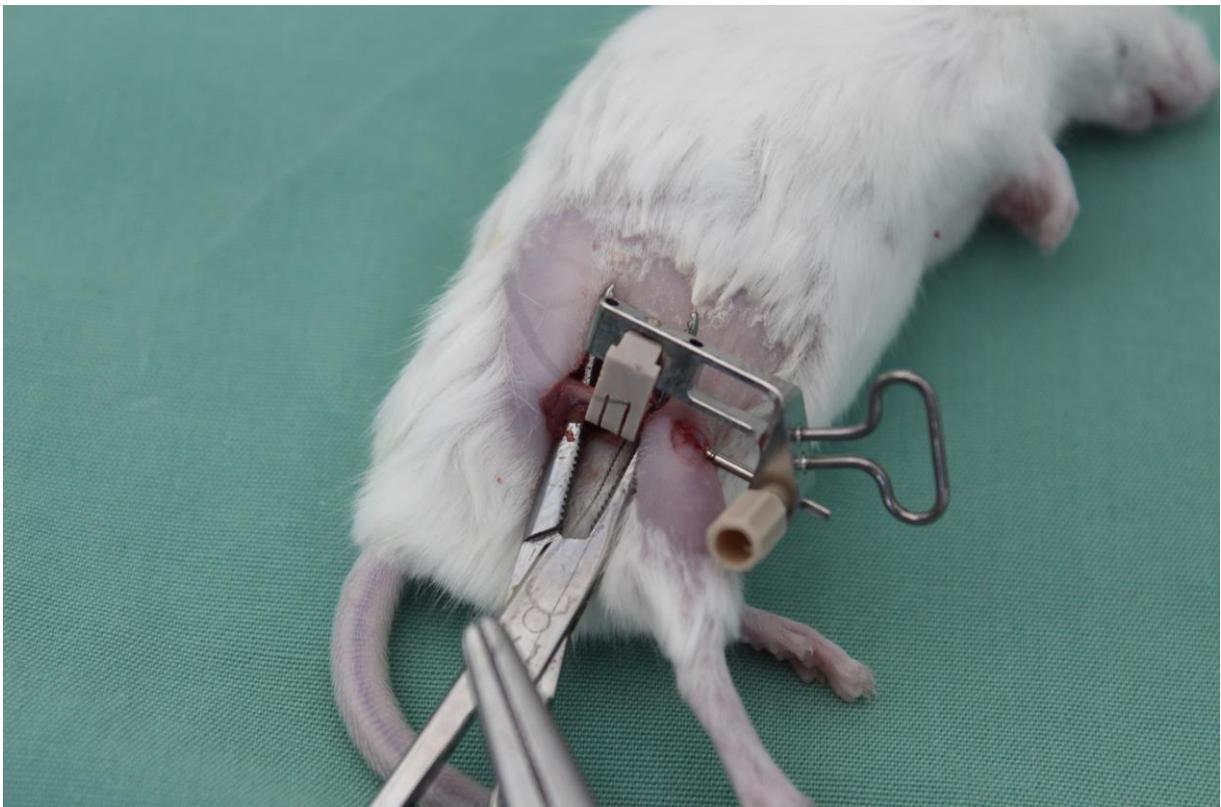
*Abbildung 17: Aufsicht auf die Oberschenkelmuskulatur nach Hautschnitt*



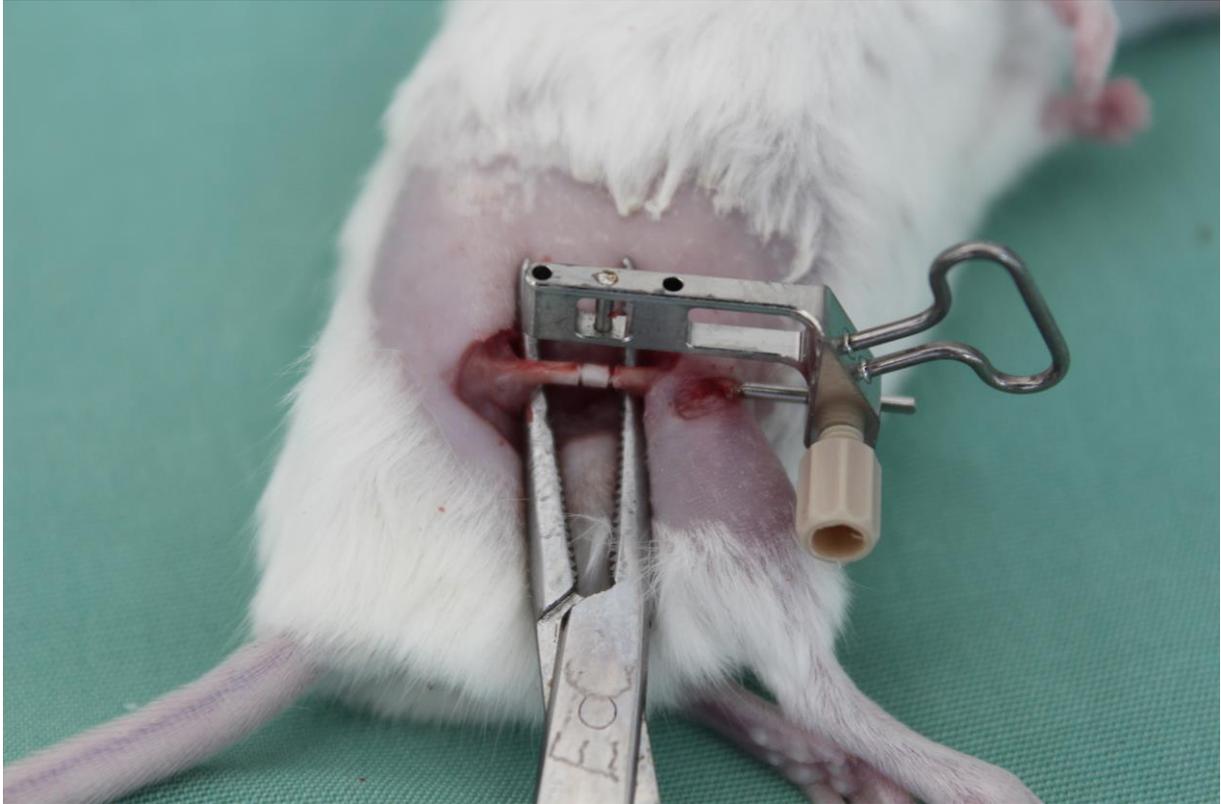
*Abbildung 18: Vollständige Präparation des Femurs mit einliegender Klemme als Wundspreizer*



*Abbildung 19: Aufbringen des Zielbügels mit Sägelehre*



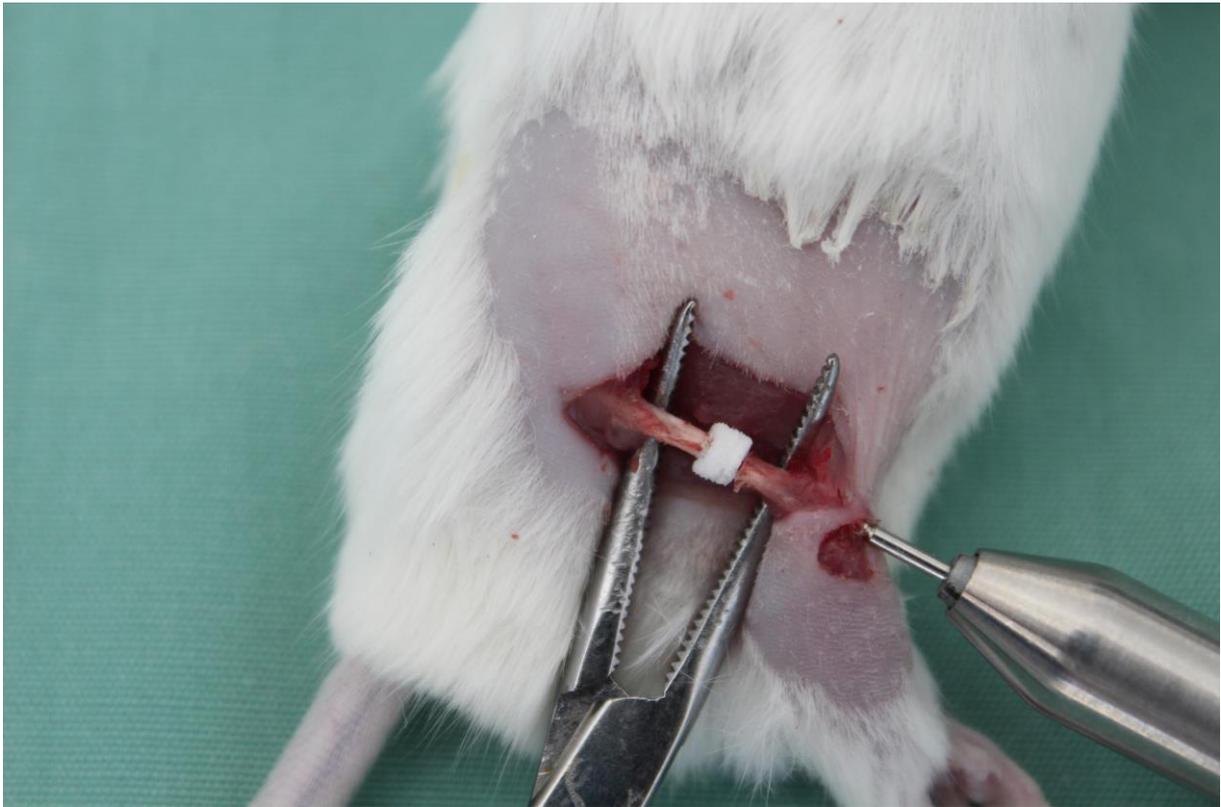
*Abbildung 20: Osteotomie des Femurs mittels Sägedraht*



*Abbildung 21: Blick auf das Operationsfeld nach Osteotomie des Femurs*



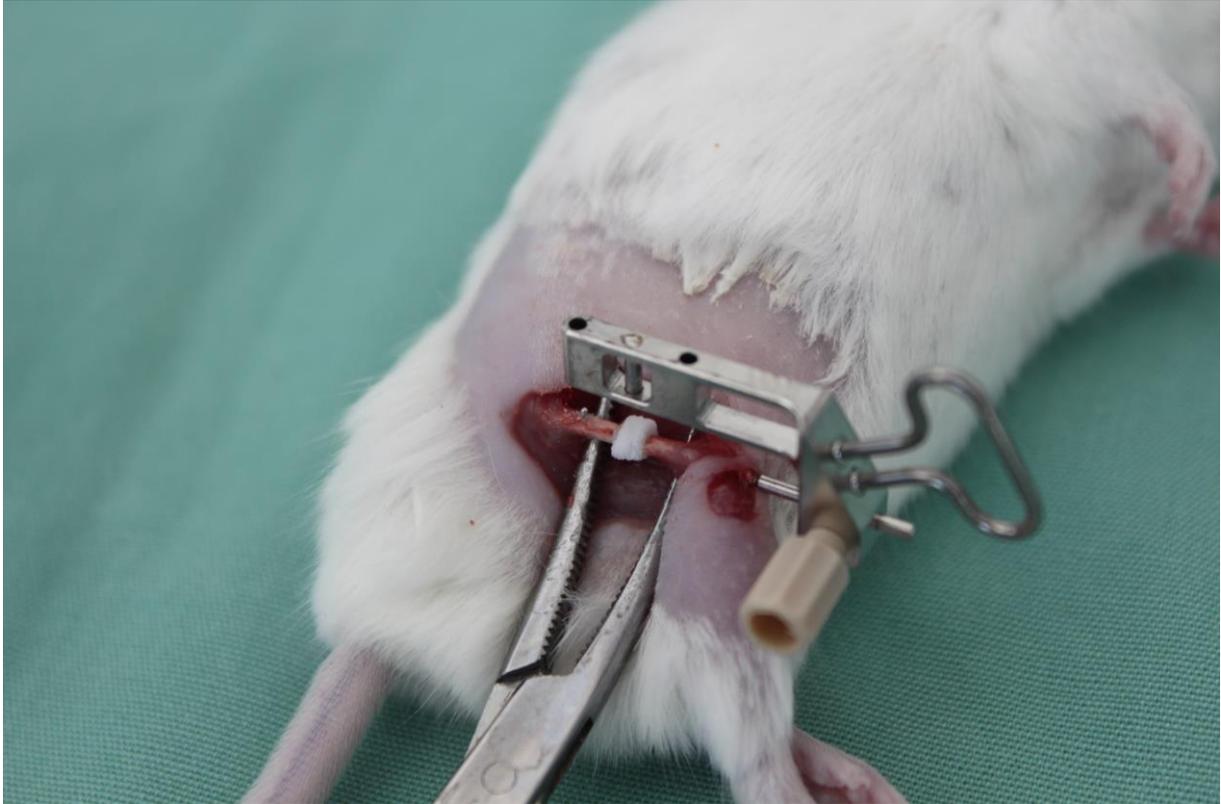
*Abbildung 22: Blick auf das Operationsfeld nach Osteotomie des Femurs vor Implantation des Scaffolds*



*Abbildung 23: Zustand nach Einbringung des Femurscaffolds*



*Abbildung 24: Vorbohren des Femurs zum Einbringen des proximalen Verriegelungspins*



*Abbildung 25: Einbringen des proximalen Verriegelungspins*



*Abbildung 26: Vorbohren des Femurs zum Einbringen des distalen Verriegelungspins*



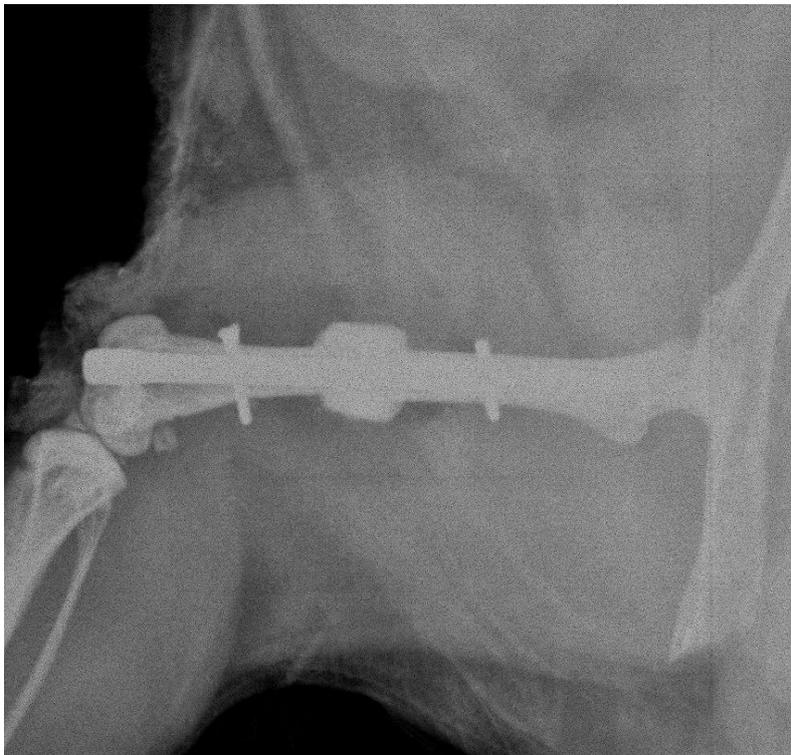
*Abbildung 27: Blick auf beide eingebrachten Verriegelungspins*



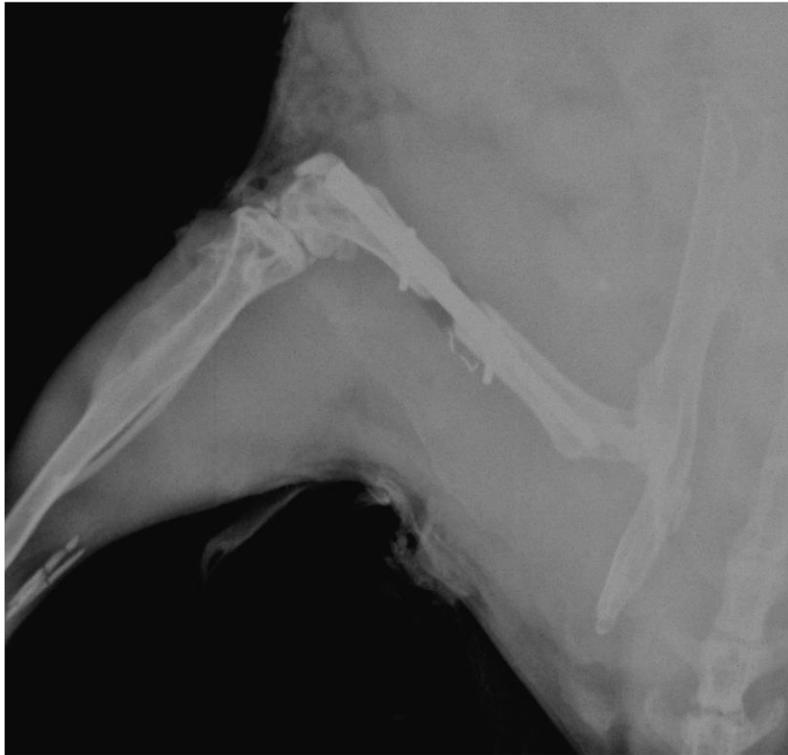
*Abbildung 28: Blick auf das Operationsfeld nach Abschneiden des Nagelendes*



*Abbildung 29: Hautnaht mittels 6-0 Monosynnahtmaterial*



*Abbildung 30: Postoperative Stellungskontrolle mit Scaffold*



*Abbildung 31: Postoperative Stellungskontrolle mit critical-size Defekt*

### **3.1.8 Tötung der Tiere**

Die Tiere wurden am Ende der jeweiligen Standzeit durch eine Überdosis Pentobarbital euthanasiert, um weitergehende Analysen der Scaffolds durchzuführen. Die Überdosis Pentobarbital wurde intraperitoneal verabreicht.

### **3.1.9 Explantation der Scaffolds nach ektopter Implantation**

Zur Explantation der ektopt implantierten Scaffolds wurde die Haut im ehemaligen Zugangsbereich eröffnet. Die Scaffolds wurden mit Skalpell und Schere präpariert und mit einem Sicherheitsabstand von ca. 2mm umgebendem Weichteilgewebe explantiert. Anschließend wurden die explantierten Scaffolds in Methanol 40% bei -20°C eingefroren.

### **3.1.10 Knochenpräparation**

Zur Analyse der orthotop implantierten Scaffolds wurden sowohl das operierte als auch das kontralaterale gesunde Femur zu weiteren Untersuchungen präpariert. Zunächst wurde die Haut über dem ehemaligen lateralen Zugang eröffnet, dieser wurde bis über das Kniegelenk geführt. Anschließend wurden die Band- und Weichteilstrukturen des Kniegelenkes mit dem Skalpell durchtrennt. Dann erfolgte die Präparation des Hüftgelenkes. Das Hüftgelenk wurde luxiert und alle umgebenden Weichteilstrukturen wurden ebenfalls durchtrennt. Anschließend

konnte das Femur in toto mit umgebendem Muskelgewebe entnommen werden. Es folgte eine teilweise Entfernung der Weichteile, so dass der Blick auf die Verriegelungspins frei wurde. Nach vorsichtigem Herauslösen der Pins unter Schonung des Frakturkallus mittels Gegendruck durch Pinzette und feinem Nadelhalter konnten die Femurcondylen osteotomiert werden. Dadurch war es möglich, den Femurnagel mit geringstem Schaden des Frakturkallus und des Femurscaffolds aus dem Knochen zu entfernen. Anschließend wurden die Femora in Methanol 40% bei -20°C tiefgefroren.

### 3.2 Zielkriterien und Auswertung

#### 3.2.1 Radiologie

Es wurden jeweils zwei Röntgenbilder angefertigt. Eines direkt postoperativ und eines post mortem. Dies erfolgte im institutseigenen Röntgengerät. Hierbei wurde eine Belichtungszeit von 10s bei einer Stromstärke von mA und einer Spannung von 18kV eingesetzt. Die Röntgenaufnahmen wurden für die weitere Verwendung mittels Faxitron ® digitalisiert.

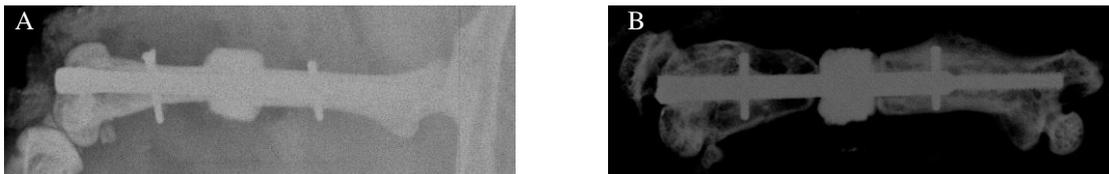


Abbildung 32: (A) Postoperatives Röntgenbild des Femur mit Scaffold und die korrekte Lage der Pins und des Femurnagels. (B) Femur nach Explantation. Die Frakturenden zeigen eine Atrophie bei überbauten Verriegelungspins.

Zur Auswertung dieser Röntgenbilder wurde folgender Score in Anlehnung an den Goldberg-Score (1985) erstellt und angewendet:

	Punkte (Distal/Proximal)
Atrophie des Knochenendes (Abb. 33A)	Je 0
Keine knöchernen Reaktion (Abb. 33B)	Je 1
Hypertrophie des Knochenendes (Abb. 33C)	Je 2

Tabelle 3: Score zur radiologischen Auswertung der knöchernen Reaktion



Abbildung 33: (A) Atrophie des Knochen, (B) Keine knöchernen Reaktion, (C) Hypertrophie des Knochens

### **3.2.2 Computertomographie**

Alle  $\mu$ CT Analysen wurden in ein  $\mu$ CT der Firma Skyscan (Skyscan 1172, Kontich Belgien) durchgeführt. Zunächst wurden alle Knochenersatzmaterialien vor der Implantation in das Mäusefemur bei einer Auflösung von 2,3  $\mu$ m bei einer Pixel-Matrix von 2672x4000 eingescannt. Die angelegte Röhrenspannung der Röntgenröhre betrug 40kV bei 250  $\mu$ A über 550ms. Dazu positionierten wir die Scaffolds auf einem Vasofix® 22G Mandrin (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Es erfolgte anschließend die 3D-Rekonstruktion der Rohdaten mittels SkyScan NRecon Reconstruction v.1.6.10. Dann erfolgte die 3D-Analyse mit der SkyScan CTAnalyzer v.1.16 nach Festlegung der Grauwertgrenzen von 60-255 HU. In diesem Grauwertbereich konnte jeweils das komplette Scaffoldvolumen abgebildet werden. Ein analoges Vorgehen erfolgte nach der jeweiligen In-Vivo Standzeit sowohl nach orthotoper als auch nach ektoper Implantation. Die jeweiligen Präparate wurden zur  $\mu$ CT-Analyse in einem 2 ml Eppendorf Gefäß in 40% Methanol-Lösung gelagert.

Als Zielparamester vor Implantation und nach Explantation diente:

- Scaffold Volume (SV) [ $\text{mm}^3$ ] entsprechend dem Scaffoldvolumen

### **3.2.3 Biomechanik**

Zur Untersuchung der biomechanischen Stabilität wurde die Torsionssteifigkeit der Femora getestet. Hierzu wurden das proximale und das distale Ende des Femurs in einer Aluminiumhülse in Polymethylmethacrylat eingebettet. Die Aluminiumhülsen wurden in einem Torsionsgerät eingespannt (Institute of Construction Design, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland). Unter kontinuierlicher Rotation von 0,42°/s wurde das distale Femurende gegenüber dem proximalen Femurende gedreht. Das entstehende torsionsabhängige Drehmoment wurde mittels digitalem Kraftmesser (FMT-400 SL, Alluris GmbH, Freiburg, Germany) in Nmm gemessen. Die Torsionssteifigkeit ( $\text{Nmm}/^\circ$ ) konnte anschließend aus dem linear elastischen Teil der Torsionsdrehmoment-/Torsionswinkel-Kurve berechnet werden. Die Rotation wurde bis zum Zerreißen des Scaffold-Knochenverbundes durchgeführt. Zur interindividuellen Kontrolle wurde ebenfalls die Torsionssteifigkeit des kontralateralen gesunden Femurs gemessen. Die Torsionssteifigkeit wurde als Prozentsatz der Torsionssteifigkeit des gesunden kontralateralen Femurs wiedergegeben.

### **3.2.4 Histologie**

Zur histologischen Untersuchung wurden die Proben in Technovit© 9100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) ohne Destabilisierung eingebettet. Hierfür wurden zunächst

die Proben in einem Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland), nach folgendem Schema bearbeitet:

- PBS: 24 Stunden
- 70% Ethanol: 2 Tage
- 80% Ethanol: 4 Tage
- 96% Ethanol: 1 Tag
- 96% Ethanol: 2 Tage
- 100% Ethanol: 3 Tage
- 100% Ethanol: 2 Tage

Anschließend erfolgte die weitere Behandlung im 5ml Becherglas (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland):

- Xylol: 2 Tage
- Xylol + Technovit 9100 zu gleichen Teilen: 3 Tage Raumtemperatur
- Präinfiltration:
  - Technovit 9100 + Härter 1: 3 Tage bei Raumtemperatur Vakuum anlegen (mit Exsikkator und Vakuumpumpe) 10 Minuten bei 500mbar
  - Einbettung:  
9 Teile Stammlösung A + 1 Teil Stammlösung B in einem Becherglas mischen, Proben in Teflonform (Fa. Kulzer, Wehrheim, Deutschland) überführen und Form auffüllen. Anschließend auf Eis Vakuum anlegen (mit Exsikkator und Vakuumpumpe) 10 Minuten bei 500 mbar Form luftdicht verschließen und bei -15°C aushärten lassen

Aufgrund der Härte und Brüchigkeit der Scaffolds war eine histologische Analyse in Dünnschnitttechnik nicht möglich, so dass die Proben in Longitudinalachse zum Femurschaft bis auf die Femurmitte mit einem Hartschnittmikrotom (RM2265, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) getrimmt wurden. Anschließend wurden die Proben zunächst mit Bisbenzimid eingefärbt und in 12 regions of interest (ROIs) (8 im Randbereich des Scaffolds und 4 im Zentrum des Scaffolds) bei 20-facher Vergrößerung in Auflichtmikroskopietechnik (BX-60, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mittels Kamera (DP73, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und dazugehöriger Imaging Software (cellSens Dimension 1.6, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgenommen und analysiert. Unter UV-Licht wurden die in die

Scaffold eingewanderten Zellen ausgezählt und in Zellen pro ROI wiedergegeben. Dann wurden die Proben mit Methylenblau gefärbt und in analoger Weise die Zellen pro ROI ausgezählt. Durch direkten Vergleich der Bisbenzimid- und Methylenblaufärbung konnten Artefakte der Färbung ausgeschlossen werden. Die histologische Analyse der Scaffolds nach orthotoper Implantation in das Mäusefemur erfolgte im longitudinalen Schnittpräparat in 12 ROIs wie in Abbildung 34 dargestellt.

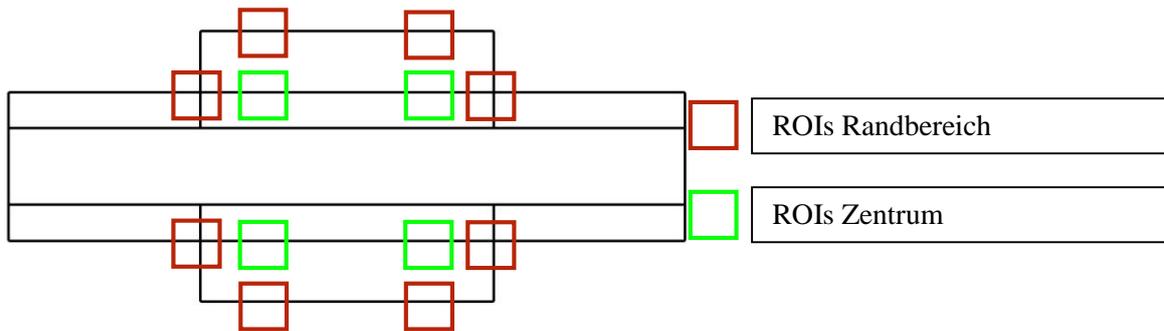


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Scaffolds nach orthotoper Implantation in das Femur im Längsschnitt mit Abbildung der ausgewerteten ROIs

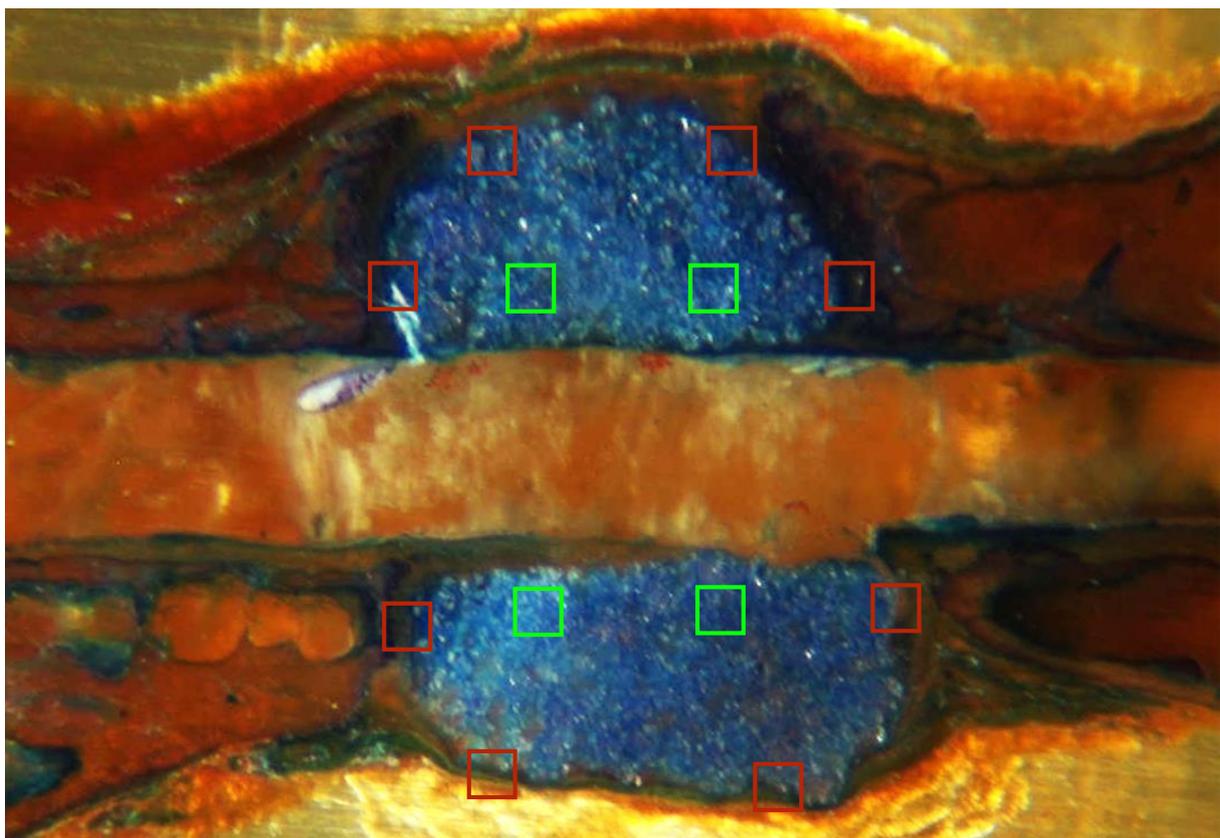


Abbildung 35: Längsschnitt des Scaffolds nach orthotoper Implantation in das Femur mit Abbildung der ausgewerteten ROIs (Methylenblaufärbung)

Die histologische Auswertung nach ektopter Implantation in die Flanke der Maus erfolgte ebenfalls in Auflichtmikroskopie. Hierzu wurden im axialen Schnittpräparat in 12 ROIs die eingewanderten Zellen ausgezählt, siehe Abbildung 36.

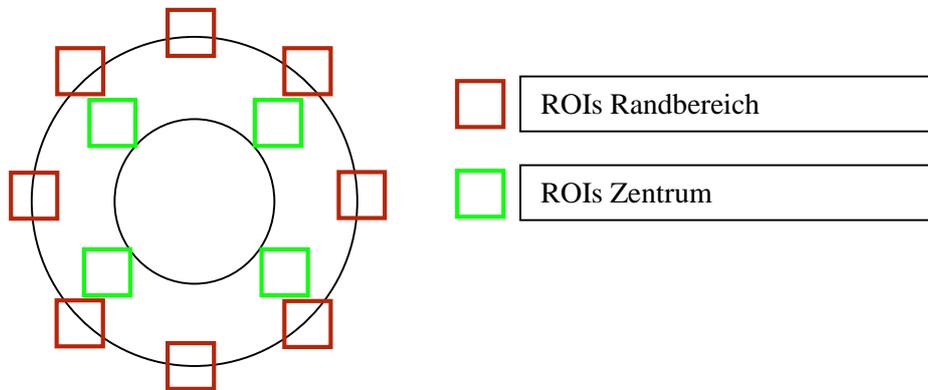


Abbildung 36: Schematische Darstellung des Scaffolds nach ektopter Implantation in die Flanke der Maus im axialen Schnitt mit Abbildung der ausgewerteten ROIs

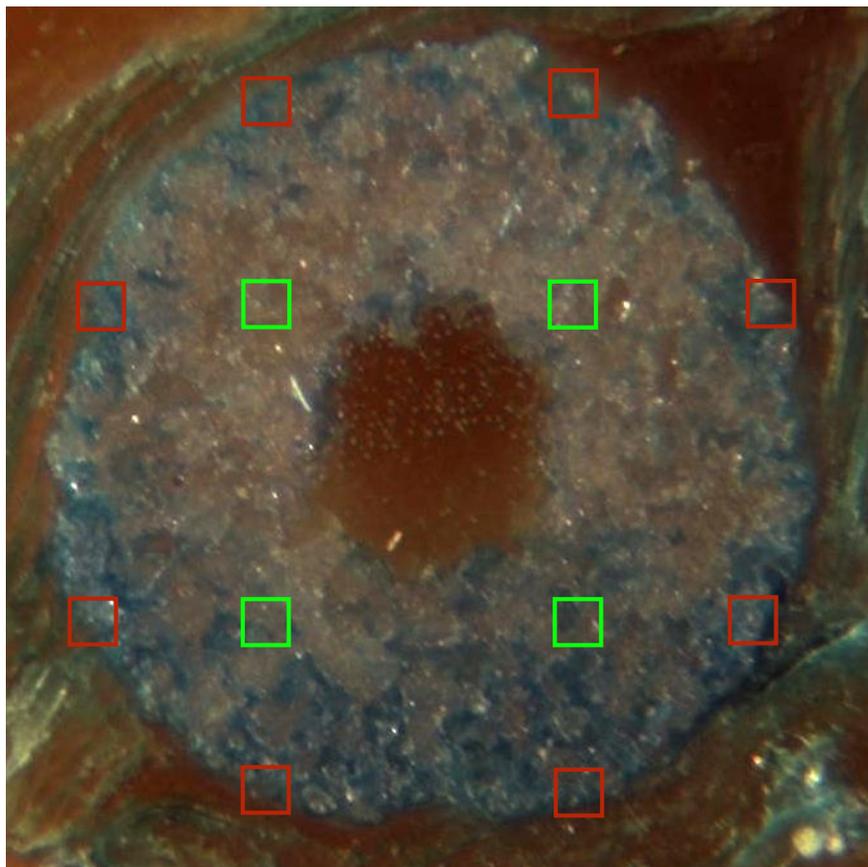


Abbildung 37: Axialer Schnitt des Scaffolds nach ektopter Implantation in die Flanke der Maus mit Abbildung der ausgewerteten ROIs (Methylenblaufärbung)

### **3.3 Statistik**

Alle statistischen Daten sind als Mittelwerte mit  $\pm$  Standardfehler angegeben worden. Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurde ein einseitiger ANOVA-Test angewendet, welcher den Alpha-Fehler für Mehrfachvergleiche ausgleicht. Die gesamte Statistik wurde mittels SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc. 2008) erstellt. Der p-Wert wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Postoperativer Verlauf

Alle operierten Tiere zeigten für die ersten beiden Tage ein diskretes Entlastungshinken des versorgten rechten Hinterlaufes. Anschließend gingen die Tiere rasch zur Vollbelastung ohne weiteres Hinken über. Während der gesamten Untersuchungszeit zeigten die Tiere keine relevanten Veränderungen des äußeren Erscheinungsbildes (Morton et al., 1985). Zur Feststellung einer Gewichtsabnahme der Mäuse wurde sowohl präoperativ als auch nach Beendigung der Untersuchungszeit das Gewicht der Mäuse bestimmt.

In keiner Gruppe zeigte sich eine signifikante Zu- oder Abnahme des Gewichtes der Mäuse in  $\Delta\%$  über die verschiedenen Standzeiten.

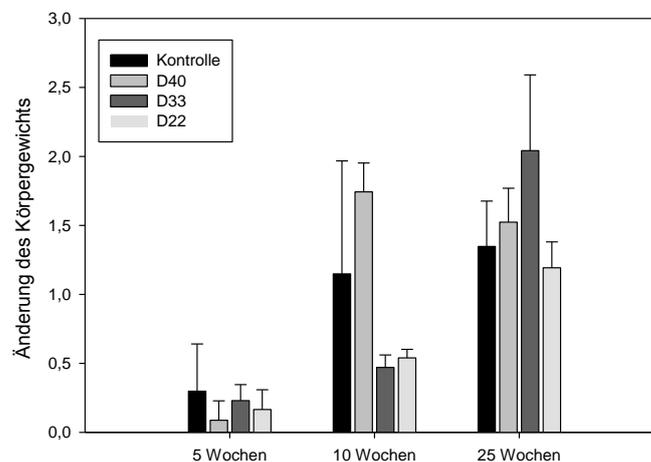


Abbildung 38: Zeigt die Änderung des Körpergewichts aller operierten Mäuse. Die Werte wurden als  $\Delta\%$  berechnet und sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Ausschlusskriterien der Studie waren jegliche Zerstörung des Scaffolds intra- oder postoperativ bzw. bei Ausbau der Scaffolds. Ebenso wurden Tiere ausgeschlossen, bei denen ein Bruch des Femurs im Rahmen der Operation oder während der Standzeit auftrat. Des Weiteren unterblieb der Einschluss der Tiere bei Dislokationen des Femurnagels als auch der Verriegelungs-Pins während des Beobachtungszeitraumes.

### 4.2 Makroskopie

Bei allen eingeschlossenen Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich eine atrophe Pseudarthrose im Defektbereich der Diaphyse. Nach orthotoper Implantation wurde sowohl eine hypertrophe Überbauung der Scaffolds aber auch eine Atrophie im Bereich der Knochenenden in

verschiedenen Tieren beobachtet. Es zeigte sich bei allen Tieren nach vorsichtiger Explantation des Femurnagels nur eine geringe Stabilität im critical-size-Defekt im Sinne einer bindegewebigen Überbauung. Auch nach 25-wöchiger Beobachtungszeit konnte keine stabile Überbauung des Defektes festgestellt werden.

### 4.3 Radiologie

Die radiologische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der untersuchten Gruppen. Innerhalb der 5 Wochen Gruppen zeigte sich zwischen D40 (0-4,  $M=1,125 \pm 0,479$ ,  $p>0,05$ ) gegenüber D33 (0-2,  $M=0,25 \pm 0,25$ ,  $p>0,05$ ) und D22 (0-3,  $M=1,375 \pm 0,375$ ,  $p>0,05$ ) kein signifikanter Unterschied. D40 (0-2,  $M=0,875 \pm 0,35$ ,  $p>0,05$ ), D33(0-4,  $M=1,5 \pm 0,423$ ,  $p>0,05$ ) und D22(0-4,  $M=1,75 \pm 0,453$ ,  $p>0,05$ ) unterschieden sich hinsichtlich der radiologischen Durchbauung auch nach 10 Wochen Standzeit nicht signifikant. Die Gruppen D40 (0-4,  $M=2,0 \pm 0,567$ ,  $p>0,05$ ), D33(0-2,  $M=1,375 \pm 0,263$ ,  $p>0,05$ ) und D22 (0-4,  $M=1,75 \pm 0,366$ ,  $p>0,05$ ) zeigten nach 25 Wochen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 39).

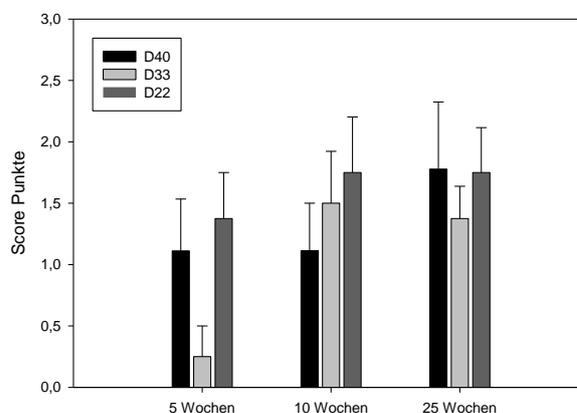


Abbildung 39: Punkte anhand des erstellten Scores 5,10 und 25 Wochen nach Implantation in das Femur der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 4.4 Biomechanik

In den biomechanischen Untersuchungen des Scaffold-Knochen-Verbundes zeigte sich keine Rotationsstabilität. Es wurde in allen Gruppen keine Rotationsstabilität im Vergleich zur gesunden Gegenseite gemessen ( $0,0\% \pm 0,0$ ). Die ermittelten Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied zu denen der Kontrollgruppe ohne Scaffoldimplantation ( $0,0\% \pm 0,0$ ).

## 4.5 Histologie

### 4.5.1 Orthotope Implantation

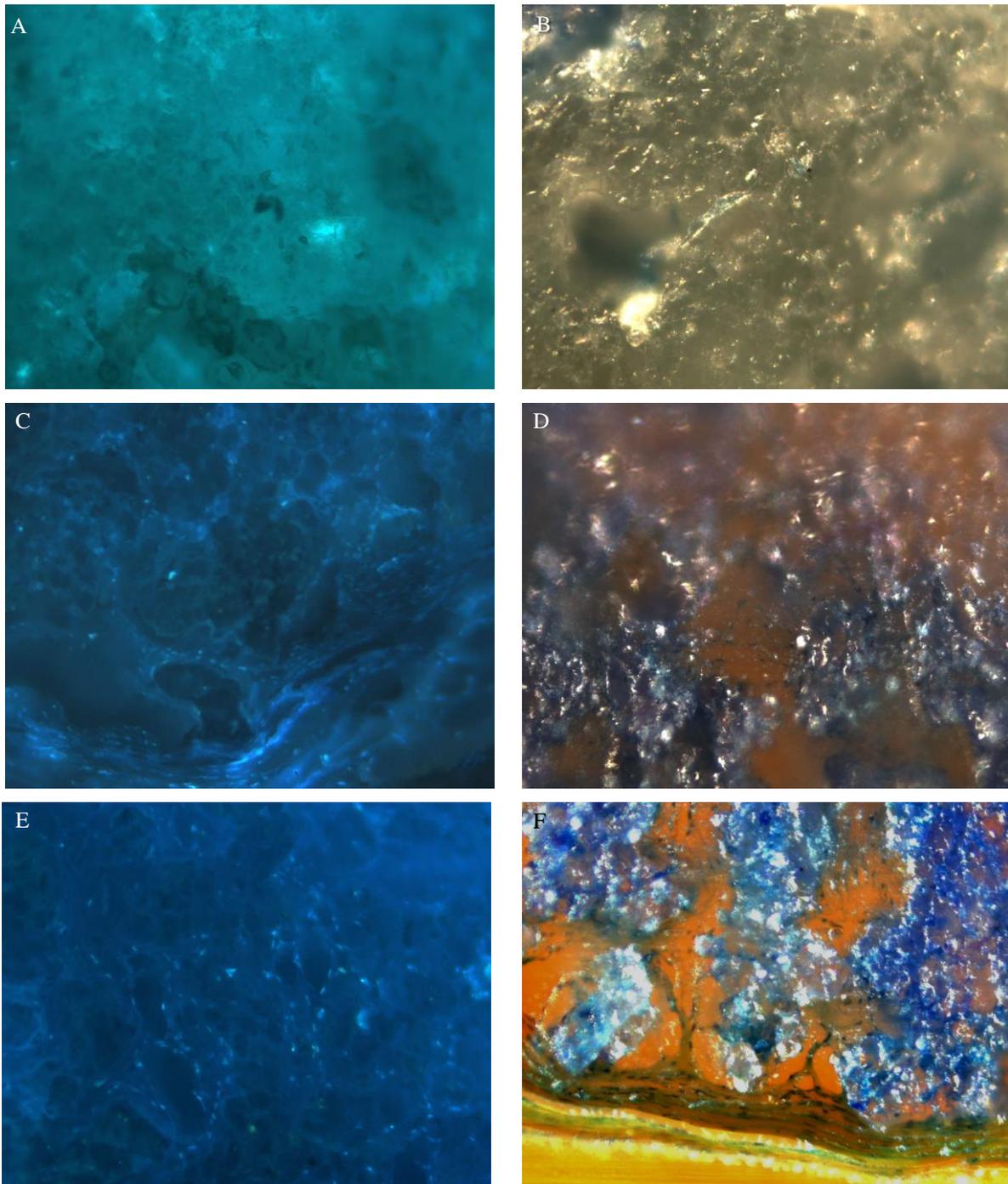


Abbildung 40: Histologie (A) D22 Bisbenzimidfärbung (B) D22 Methylenblaufärbung (C) D33 Bisbenzimidfärbung (D) Methylenblaufärbung (E) D40 Bisbenzimidfärbung (F) D40 Methylenblaufärbung

Die quantitative Analyse ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in den Scaffolds der Gruppen D33 und D22 gegenüber D40 5, 10 und 25 Wochen nach Implantation des Scaffolds in das Femur der Maus. Außerdem zeigte sich eine erhöhte Anzahl an Zellen in den Scaffolds D22 gegenüber D33 nach 25 Wochen (Abbildung 41).

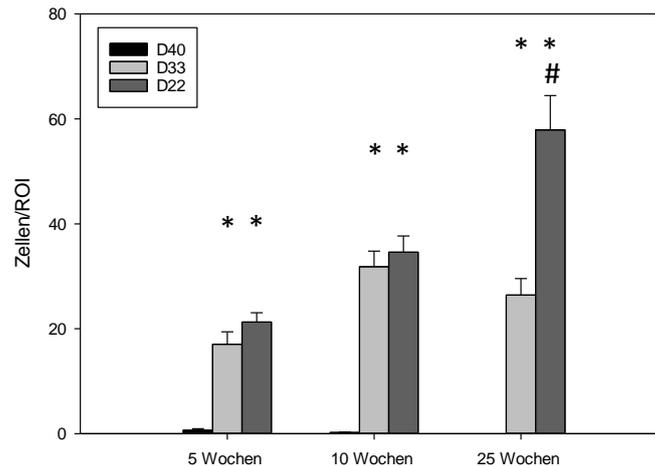


Abbildung 41: Anzahl an Zellen/ROI 5,10 und 25 Wochen nach Implantation in das Femur der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. (\* $p < 0,05$  D33, D22 versus D40 zu allen Zeitpunkten, # $p < 0,05$  D22 gegenüber D33 zum Zeitpunkt 25 Wochen)

5 Wochen nach orthotoper Implantation in das Femur der Maus zeigte sich eine signifikant erhöhte Gesamtzahl an Zellen in D33 (4 bis 33,75;  $M=17,042 \pm 2,37$  (SEM),  $p < 0,001$ ) und D22 (13,25 bis 34,00;  $M=21,25 \pm 1,786$ ,  $p < 0,001$ ) gegenüber D40 (0 bis 3,25;  $M=0,991 \pm 0,286$ ) (Abb. 41). Im Randbereich der Scaffolds konnten nicht signifikant mehr Zellen/ROI in den Gruppen D40 (0,0 bis 3,25;  $M=0,875 \pm 0,409$ ), D33 (4,0 bis 33,75;  $M=17,438 \pm 3,084$ ) und D22 (15,0 bis 34,00;  $M=22,00 \pm 2,216$ ) als im Zentrum von D40 (0 bis 0,50;  $M=0,188 \pm 0,12$ ,  $p > 0,05$ ), D33 (8,25 bis 23,75;  $M=16,25 \pm 4,132$ ;  $p > 0,05$ ) und D22 (13,25 bis 29,00;  $M=19,75 \pm 3,321$ ;  $p > 0,05$ ) nachgewiesen werden (Abb. 42).

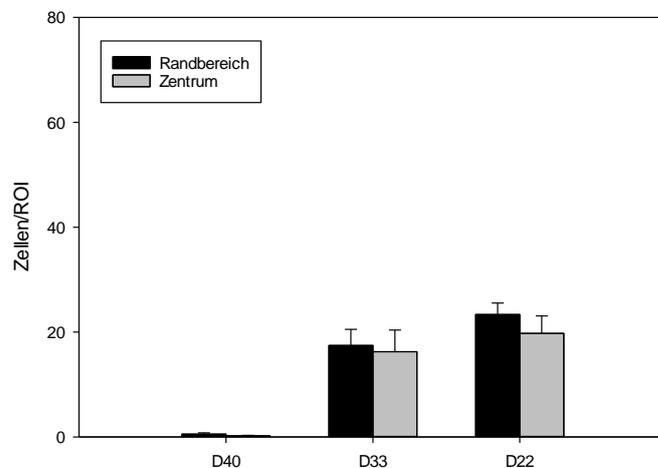


Abbildung 42: Anzahl an Zellen/ROI im Randbereich/Zentrum der Keramik 5 Wochen nach orthotoper Implantation in das Femur der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

10 Wochen nach orthotoper Implantation des Scaffolds in das Femur der Maus zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl Zellen in den Gruppen D33 (17,67 bis 55,33;  $M=31,806 \pm 2,968$ ,  $p < 0,001$ ) und D22 (19,25 bis 53,5;  $M=34,583 \pm 3,108$ ,  $p < 0,001$ ) gegenüber der Gruppe D40 (0 bis 0,75;  $M=0,208 \pm 0,0915$ ) (Abb. 41). Im Randbereich der Keramik zeigte sich nach 10 Wochen kein signifikanter Unterschied von Zellen/ROI in D40 (0,0 bis 0,75;  $M=0,313 \pm 0,123$ ), D33 (17,67 bis 46,67;  $M=31,46 \pm 3,156$ ) und D22 (19,25 bis 53,5;  $M=37,688 \pm 4,275$ ) gegenüber dem Zentrum in D40 (0,0 bis 0,0;  $M=0,0$ ,  $p > 0,05$ ), D33 (25,67 bis 32,0;  $M=28,0 \pm 1,381$ ;  $p > 0,05$ ) und D22 (25,25 bis 31,25;  $M=28,375 \pm 1,293$ ;  $p > 0,05$ ) (Abb. 43).

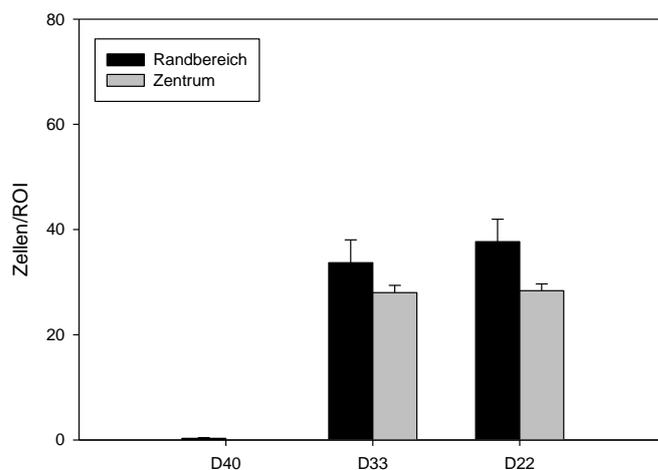


Abbildung 43: Anzahl an Zellen/ROI im Randbereich/Zentrum der Keramik 10 Wochen nach orthotoper Implantation in das Femur der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

25 Wochen nach Implantation des Scaffolds in das Femur der Maus zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl Zellen in D33 (10,33 bis 48,0;  $M=26,417 \pm 3,125$ ;  $p<0,001$ ) und D22 (24,0 bis 101,0;  $M=57,917 \pm 6,536$ ;  $p<0,001$ ) gegenüber D40 (0,0 bis 0,0;  $M=0 \pm 0,0$ ). Außerdem zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an Zellen in D22 (24,0 bis 101,0  $M=57,917 \pm 6,536$ ,  $p<0,001$ ) gegenüber D33 (6,1 bis 20,7;  $M=26,417 \pm 3,125$ ,  $p<0,001$ ). (Abb. 41)

Der Randbereich der Scaffolds zeigte nach 25 Wochen keinen signifikanten Unterschied an eingewanderten Zellen in D40 (0,0 bis 0,0;  $M=0,0 \pm 0$ ) und D22 (26,5 bis 77,0;  $M=59,25 \pm 5,445$ ) gegenüber dem Zentrum von D40 (0,0 bis 0,0;  $M=0,0 \pm 0$ ;  $p>0,05$ ) und D22 (24,0 bis 101,0;  $M=55,25 \pm 18,109$ ;  $p>0,05$ ). Bei den Scaffolds D33 zeigte sich zwischen den Zellen/ROI im Randbereich D33 (21,5 bis 48,0;  $M=31,125 \pm 3,466$ ) gegenüber dem Zentrum D33 (10,33 bis 22,75;  $M=17,0 \pm 2,651$ ;  $p<0,05$ ) ein signifikanter Unterschied. (Abb. 44).

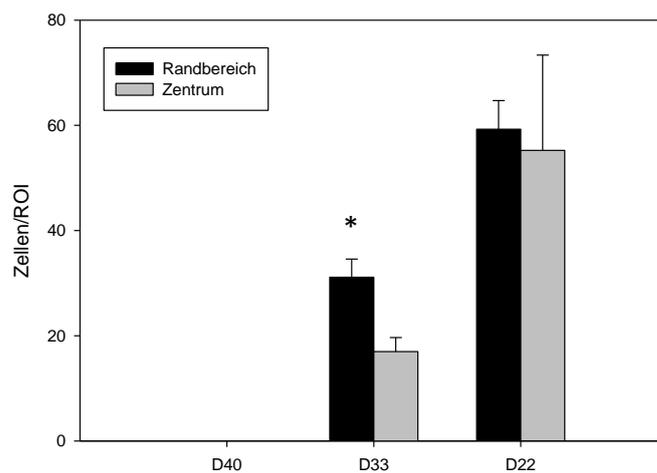


Abbildung 44: Anzahl an Zellen/ROI im Randbereich/Zentrum der Keramik 25 Wochen nach Implantation in das Femur der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. (\* $p<0,05$  D40, D33, D22 Randbereich versus Zentrum)

#### 4.5.2 Ektope Implantation der Keramik in die Flanke der Maus

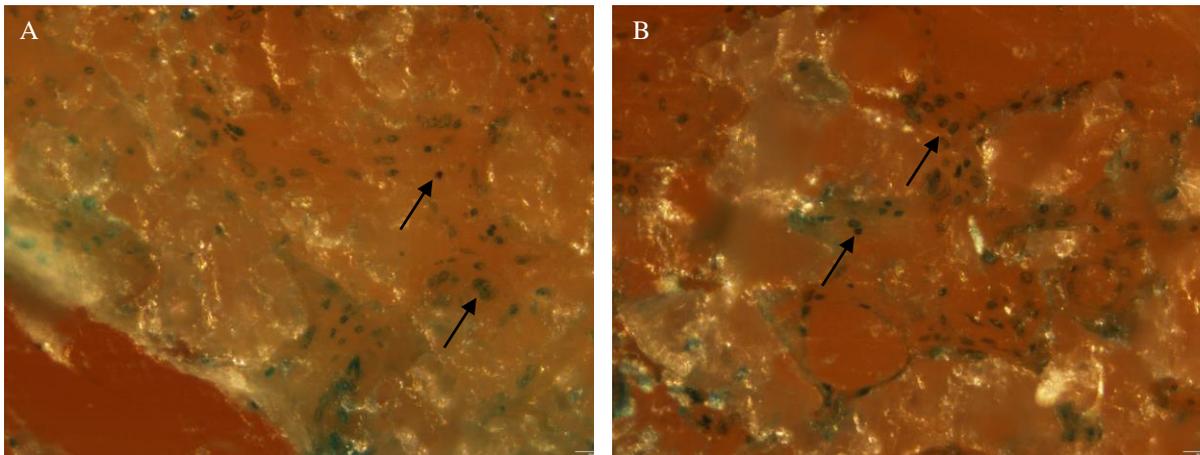


Abbildung 45: Histologie (A)ROI im Randbereich (B) ROI im Zentrum; Die Pfeile markieren gezählte Zellen.

Die quantitative Analyse der ektopen Implantation ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in D33 und D22 gegenüber D40 und ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in D22 gegenüber D33 nach 4 bzw. 12 Wochen (Abb. 46)

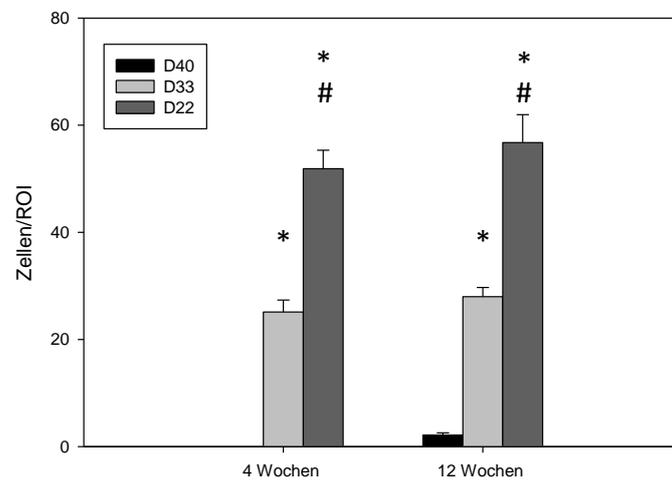


Abbildung 46: Anzahl an Zellen/ROI 4 und 12 Wochen nach Implantation in die Flanke der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. (\* $p < 0,05$  D33, D22 versus D40; # $p < 0,05$  D22 gegenüber D33)

4 Wochen nach ektopter Implantation des Scaffolds in die Flanke der Maus zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl Zellen in D33 (14,667 bis 38,0;  $M=22,188 \pm 1,99$ ) und D22 (31,5 bis 68,25;  $M=51,875 \pm 3,446$ ;  $p<0,001$ ) gegenüber D40 (0,0 bis 0,0;  $M=0,0 \pm 0,0$ ;  $p<0,001$ ). Außerdem zeigt sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in D22 (31,5 bis 68,25;  $M=51,875 \pm 3,446$ ;  $p<0,001$ ) gegenüber D33 (14,667 bis 38,0;  $M=22,188 \pm 1,99$ ,  $p<0,001$ ) (Abb. 46).

Allerdings zeigte sich nach 4 Wochen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Randbereich D40 (0,0 bis 0,0;  $M=0,0 \pm 0$ ) und D33 (15,0 bis 38,0;  $M=27,12 \pm 2,902$ ) gegenüber dem Zentrum der Keramik in den Gruppen D40 (0,0 bis 0,0;  $M=0,0 \pm 0$ ;  $p>0,05$ ) und D33 (14,67 bis 26,33,  $M=21,08 \pm 2,831$ ;  $p>0,05$ ). In den Scaffolds D22 zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Zellen/ROI zwischen dem Randbereich (44,0 bis 68,25;  $M=57,344 \pm 3,403$ ) und dem Zentrum D22 (31,5 bis 51,5;  $M=40,938 \pm 4,098$ ;  $p<0,05$ ) (Abb. 47).

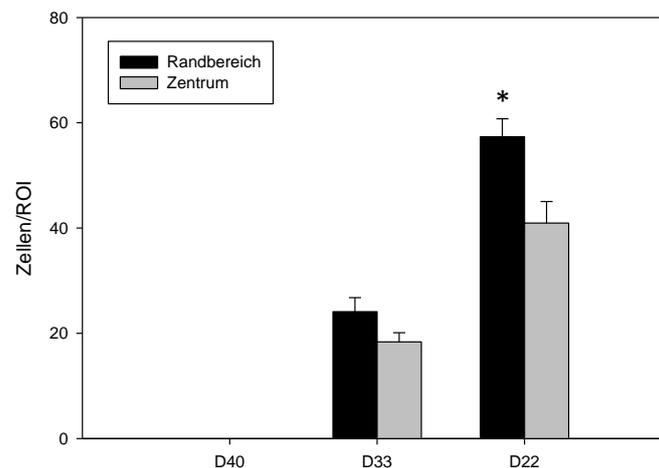


Abbildung 47: Anzahl an Zellen/ROI im Randbereich/Zentrum der Keramik 4 Wochen nach ektopter Implantation in die Flanke der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. (\* $p<0,05$  Randbereich versus Zentrum)

12 Wochen nach ektopter Implantation des Scaffolds in die Flanke der Maus zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl Zellen in D33 (19,6 bis 37,4;  $M=27,983 \pm 1,717$ ;  $p<0,001$ ) und D22 (26,75 bis 89,75;  $M=56,75 \pm 5,217$ ;  $p<0,001$ ) gegenüber D40 (0,0 bis 4,25;  $M=2,167 \pm 0,394$   $p<0,001$ ). Außerdem zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an Zellen in D22 (26,75 bis 89,75;  $SEM=5,217$ ;  $p<0,001$ ) gegenüber D33 (19,6 bis 37,4;  $SEM=1,717$ ;  $p<0,001$ ). (Abb. 46)

In der Untersuchung Randbereich vs. Zentrum zeigte sich im Randbereich der Gruppe D40 (1,25 bis 4,25;  $M=2,531 \pm 0,439$ ) gegenüber dem Zentrum kein signifikanter Unterschied D40 (0,0 bis 3,5;  $M=1,38$ ;  $p>0,05$ ). D33 (23,6 bis 37,4;  $M=30,825 \pm 1,778$ ) und D22 (54,25 bis 89,75;  $M=67,786 \pm 4,521$ ) zeigen gegenüber dem Zentrum D33 (19,6 bis 24,6;  $M=22,3 \pm 1,24$ ;

p<0,05) und D22 (26,75 bis 45,25; M=36,313 ±3,99; p<0,001) einen signifikanten Unterschied der Zellen/ROI (Abb. 48).

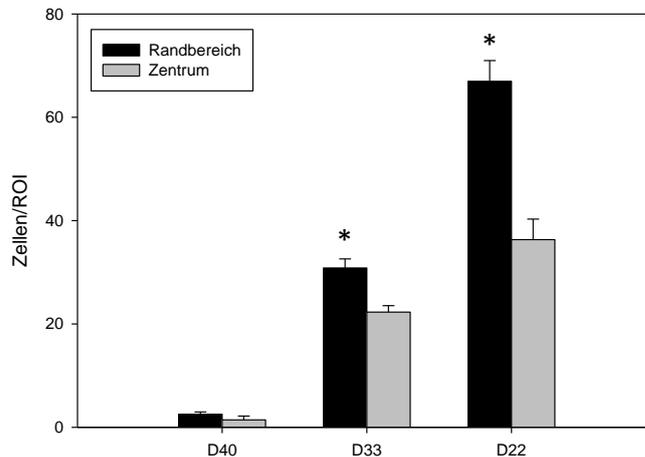


Abbildung 48: Anzahl an Zellen/ROI im Randbereich/Zentrum der Keramik 12 Wochen nach ektooper Implantation in die Flanke der Maus. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. (\*p<0,05 Randbereich vs Zentrum)

#### 4.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die Auswertung der Rasterelektronenmikroskopie (REM)- Aufnahmen zeigte, dass sich die Oberflächenstruktur sowie die Porosität der Scaffolds unterscheidet. So zeigte sich die Oberflächenstruktur von D40 glatter als die Oberflächen von D33 und D22 (Abb. 49). Auf den D40 Scaffolds konnte die geringste Anzahl an Osteoblasten beobachtet werden. Die Form der Osteoblasten unterscheidet sich hierbei zwischen den unterschiedlichen Scaffolds. So nehmen die Osteoblasten auf D40 mit langgezogenen Pseudopodien eine Fibroblasten- ähnliche Konfiguration an, um eine Anheftung zwischen den einzelnen Poren gewährleisten zu können (Abb. 49, A, B). In der Gruppe D33 zeigte sich eine zum Teil kugelförmige und baumartige Konfiguration der Osteoblasten zwischen den Poren (Abb. 49, C, D). In D22 zeigte sich eine rauere Oberfläche, hierauf reagierten die Osteoblasten mit einer flächigen Ausbreitung auf dem Scaffold und flächigem Überzug einzelner Poren (Abb. 49, E, F). Auch konnten hier die meisten Osteoblasten auf dem Scaffold beobachtet werden.

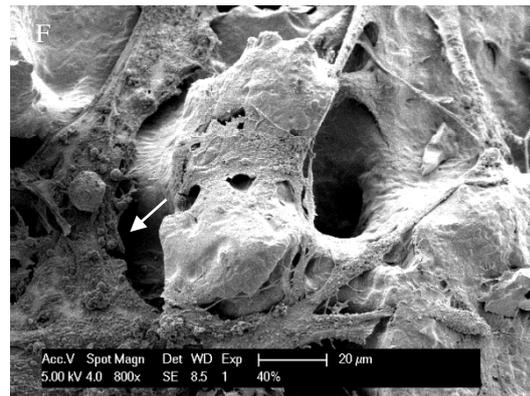
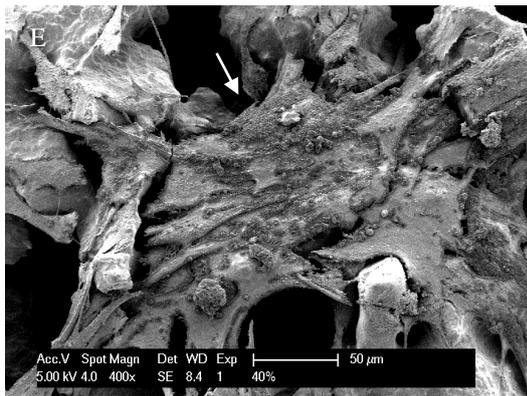
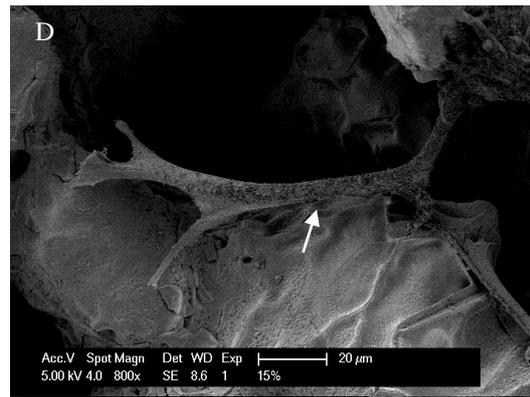
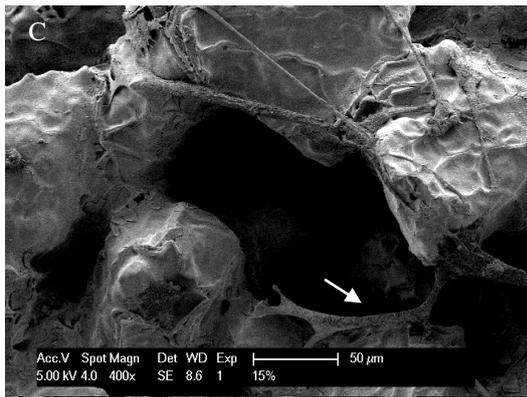
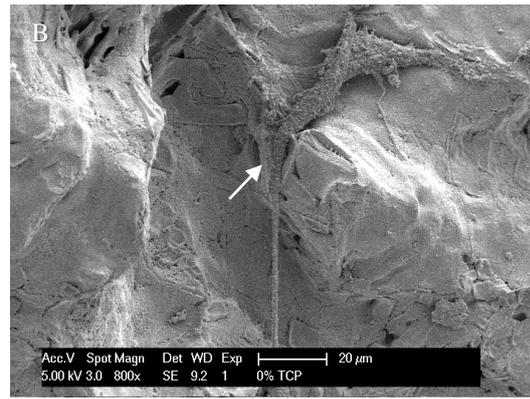
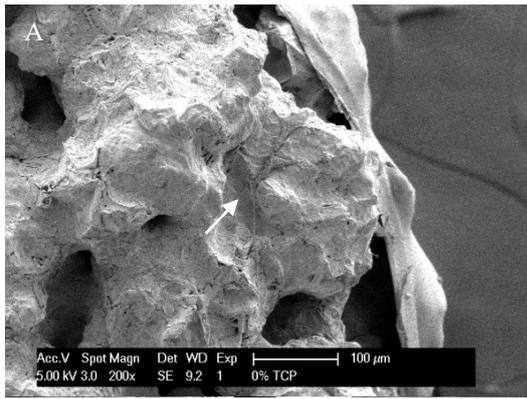


Abbildung 49: Scaffold D40 (A, B); Scaffold D33 (C, D); Scaffold D22 (E, F) Die Pfeile markieren die auf der Oberfläche befindlichen Osteoblasten.

## 4.7 Computertomographie

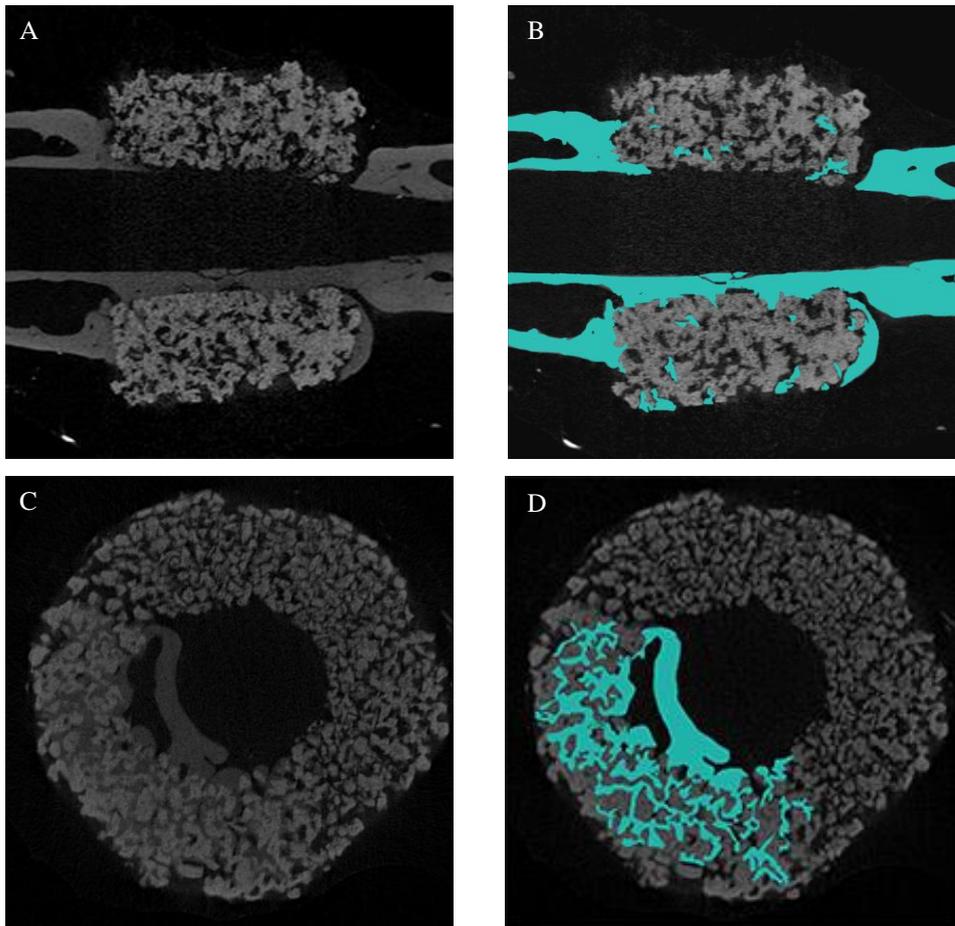


Abbildung 50: (A,B) Sagittalschnitte durch ein orthotop implantiertes Scaffold D22 nach 25 Wochen; (C,D) Axiale Schnitte durch ein orthotop implantiertes D22 Scaffold nach 25 Wochen. Die ossären Strukturen der Bilder B und D wurden zur besseren Darstellung mit Farbe nachträglich eingefärbt.

### Orthotope Implantation

5 Wochen nach Implantation des Scaffolds in das Femur der Maus zeigte sich in den Mikro-CT Untersuchungen in Bezug auf das Scaffold Volume vorher ( $SV_v$ ) kein signifikanter Unterschied zu Scaffold volume nachher ( $SV_n$ ) in den einzelnen Gruppen. So lagen die Messwerte von  $SV_v$  D40 zwischen 6,25 und 7,47 ( $M=6,926 \pm 0,237$ ) gegenüber  $SV_n$  D40 zwischen 4,12 bis 6,67 ( $M=5,93 \pm 0,471$ ;  $p>0,05$ ).  $SV_v$  D33 (4,26 bis 9,77;  $M=6,135 \pm 1,238$ ) zu  $SV_n$  D33 (2,9 bis 6,23;  $M=5,204 \pm 0,783$ ;  $p>0,05$ ) und  $SV_v$  D22 (3,33 bis 6,97;  $M=5,849 \pm 0,845$ ) zu  $SV_n$  D22 (2,93 bis 6,97;  $M=4,409 \pm 0,898$ ;  $p>0,05$ ) ergaben ebenfalls keine signifikanten Veränderungen des Materiales (Abb. 51).

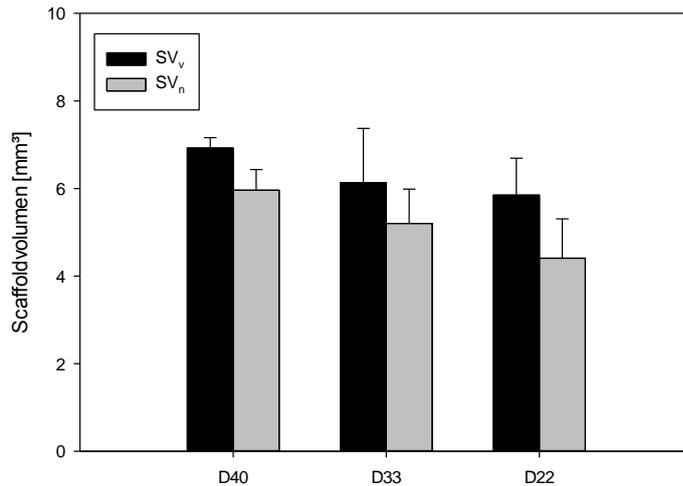


Abbildung 51: SV<sub>v</sub> und SV<sub>n</sub> 5 Wochen nach orthotoper Implantation. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

10 Wochen nach Implantation des Scaffolds in das Femur der Maus zeigte sich in den Mikro-CT Untersuchungen in Bezug auf das Scaffold Volume vorher (SV<sub>v</sub>) kein signifikanter Unterschied zu Scaffold volume nachher (SV<sub>n</sub>) in den einzelnen Gruppen. So zeigte sich das SV<sub>v</sub> D40 (6,19 bis 7,09; M=6,676  $\pm$ 0,196) zu SV<sub>n</sub> D40 (4,55 bis 7,03; M=5,801  $\pm$ 0,578;  $p > 0,05$ ), SV<sub>v</sub> D33 (3,24 bis 5,77; M=3,888  $\pm$ 0,627) zu SV<sub>n</sub> D33 (1,98 bis 4,86; M=3,438  $\pm$ 0,663;  $p > 0,05$ ) und SV<sub>v</sub> D22 (2,18 bis 4,91; M=3,820  $\pm$ 0,580) zu SV<sub>n</sub> D22 (1,18 bis 5,14; M=2,651  $\pm$ 0,862;  $p > 0,05$ ) jeweils nicht signifikant verändert (Abb. 52).

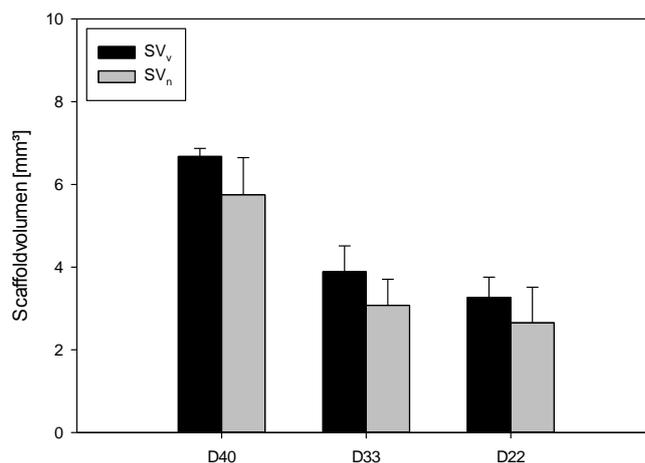


Abbildung 52: SV<sub>v</sub> und SV<sub>n</sub> 10 Wochen nach orthotoper Implantation. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Nach 25 Wochen zeigte sich in Bezug auf das Scaffold Volume (SV) signifikante Unterschiede zwischen den D22 Scaffolds. So zeigte sich das  $SV_v$  D40 (3,67 bis 9,12;  $M=6,026 \pm 1,616$ ) zu  $SV_n$  D40 (1,75 bis 6,04;  $M=4,478 \pm 1,369$ ;  $p>0,05$ ),  $SV_v$  D33 (2,55 bis 5,77;  $M=5,394 \pm 0,157$ ) zu  $SV_n$  D33 (4,47 bis 6,78;  $M=5,239 \pm 0,528$ ;  $p>0,05$ ) keine signifikanten Veränderungen.  $SV_v$  D22 (6,53 bis 7,53;  $M=6,9 \pm 0,228$ ) zeigte eine signifikante Abnahme zu  $SV_n$  D22 (2,93 bis 6,97;  $M=4,409 \pm 0,898$ ;  $p<0,05$ ) (Abb. 53).

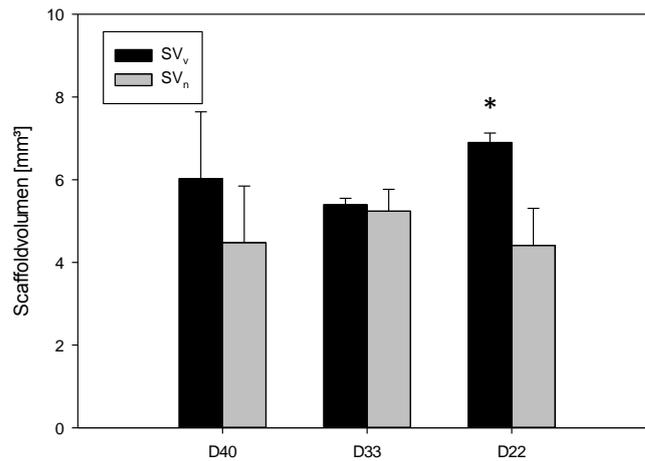


Abbildung 53:  $SV_v$  und  $SV_n$  25 Wochen nach orthotoper Implantation. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. (\* $p<0,05$   $SV_v$  versus  $SV_n$ )

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Methoden**

Im Gegensatz zu anderen Säugetieren und dem Menschen besitzt die Knochenstruktur der Maus kein Havers-System. Der Prozess der Frakturheilung läuft in der Maus in so genannten Resorptionshöhlen ab, welcher ähnlich dem Remodeling im Bereich des Havers-Systems bei größeren Säugetieren ist. (Nunamaker et al., 1998) Dies muss bei der Übertragung von Ergebnissen bei Kleintier- bzw. Mausmodellen auf den Menschen berücksichtigt werden. Trotzdem stellt die Maus das ideale Versuchstier für traumatologische Untersuchungen dar. So sind geringere Haltung- und Zuchtkosten für größere Versuchsgruppen der Maus gegenüber anderen Versuchstieren von Vorteil. Die Tiergröße stellt eine Herausforderung für die stabile Frakturstabilisierung dar. Das hier angewendete Tiermodell mit Verriegelungsmarknagel soll die Übertragbarkeit vom Tier auf den Menschen erhöhen und ist bereits etabliert. (Garcia et al., 2008) Die Alternative zur Verriegelungsmarknagelung ist die Versorgung mittels Pin-Clip-Osteosynthese, Plattenosteosynthese oder Fixateur externe (Garcia et al., 2013; Harris et al., 2014). Der Nachteil der Pin-Osteosynthese ist die fehlende Rotations- und Längenstabilität, was zu erhöhtem Risiko eines Bruchs des Scaffolds führen könnte (Garcia et al., 2013). Die Anlage eines Fixateurs externe hat den Nachteil eines hohen Implantatgewichts und doch deutlicher Behinderung des Bewegungsablaufs der Maus (Garcia et al., 2013). Bei Plattenosteosynthese wäre das von uns verwendete Scaffold nicht sicher zu befestigen gewesen, weshalb wir das von Garcia et al., 2008 entwickelte Modell verwendeten. Mit diesem Pseudarthrosenmodell mit Verriegelungsmarknagel konnte eine standardisierte offene Osteotomie mit rotationsstabilem Osteosyntheseverfahren und biomechanisch standardisierter Situation für die Knochenheilung geschaffen werden. Dies erbrachte den Vorteil der gezielten Implantation eines Scaffolds in einen standardisiert definierten Defekt von 2mm (Garcia et al., 2008; Garcia et al., 2013; Harris et al., 2013). Der standardisierte Defekt von 1,8 mm konnte von Garcia et al., 2008 als ausreichende Defektzone beschrieben werden, so dass sich hier bei Stabilisierung des Knochens mittels Mouse Nail keine Heilungstendenzen zeigten. Harris et al. beschrieben 2013 dass eine Defektzone von 4mm für Untersuchungen von Critical-size Defekten von Vorteil wäre, allerdings konnten wir nach Auswertung unserer Kontrollgruppen ohne Scaffold nach 5,10 und 25 Wochen keinerlei Heilungstendenz feststellen, sodass eine Defektzone von 2 mm als ausreichend gewertet werden kann. Als Analysezeitraum wurden in anderen Pseudarthrosenmodellstudien 4,9,10 und 15 bzw. 16 Wochen angewendet (Choi et al., 2004; Oetgen et al., 2008; Garcia et al., 2008; Garcia et al., 2010; Kumar et al., 2010). Die Frakturheilung bei Mäusen beträgt in der Regel bis zu 60 Tage, wobei Frakturen nach 14 – 27

Tagen überbaut sind und anschließend das Remodeling stattfindet (Garcia et al., 2012). Als ersten Untersuchungszeitpunkt legten wir 5 Wochen fest, da Frakturen nach diesem Zeitraum in der Regel verheilt sein sollten. Nach 10 Wochen sollte wie oben beschrieben das Remodeling erfolgt sein. Ein zusätzlicher Zeitpunkt wurde zur Langzeitanalyse nach 25 Wochen festgelegt. Für die Studie war eine offene Osteotomie nötig. Der Nachteil der offenen Osteotomie ist die erhöhte Weichteilschädigung und das Infektionsrisiko. Die Ausfallquote lag bei dieser Studie bei 8,8 %. Ausschlusskriterien waren die Lösung eines Verriegelungspins, Bruch des Schaftes bei Implantation, Bruch des Scaffolds in Vivo und Infektionen. Die Komplikationen waren vor allem zu Beginn der Studie erhöht und reduzierten sich im Rahmen der Lernkurve des Operateurs entscheidend. Im Vergleich zu anderen Studien und nach den von Auer et al. aufgestellten Richtlinien der Frakturstudien im Tiermodell ist diese Rate auf einem vertretbaren niedrigen Niveau (Auer et al., 2007).

Die ektope Implantation von Scaffolds in die Flanke der Maus ist bereits eine etablierte Methode (Casabona et al., 1998). Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass auch ektop implantiertes Knochenersatzmaterial von Gewebe und Knochen durchbaut werden kann (Casabona et al., 1998). Aufgrund der einfachen Anwendbarkeit der Methode ist die Untersuchung des Einwachsverhaltens in ektopen Gewebe ohne technisch aufwändige Verfahren möglich. Als erster Zeitpunkt der Auswertung wurden 4 Wochen äquivalent zu anderen Studien, welche die Knochenbildung in ektopen Gewebe untersuchten, gewählt (Liang et al., 2005; Zhao et al., 2014). In den meisten Studien war als zweiter Auswertungszeitpunkt 8 Wochen festgelegt worden (Liang et al., 2005; Asatrian et al., 2014). Da eine Untersuchung der Resorption in dieser Studie erfolgte, legten wir den zweiten Auswertungszeitpunkt nach 12 Wochen fest, um eine eventuell höhere Resorptions- und Zellbesiedelungsrate besser beobachten zu können.

Die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen (Osteotomie, Scaffold Gruppen). Da eine ähnliche Gewichtszunahme in allen Gruppen über den Beobachtungszeitraum vorlag, kann von einer guten Verträglichkeit der Implantation des Mouse Nail und dem Scaffold ausgegangen werden. Auch die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nach ektope Implantation zeigte sich regelrecht ohne signifikante Unterschiede, so dass auch hier von einer guten Verträglichkeit des Implantates und des OP-Verfahrens ausgegangen werden kann.

Zur radiologischen, biomechanischen und histologischen Untersuchung nach bereits etablierten Methoden war eine Tötung der Tiere notwendig.

Die radiologische Untersuchung wurde mittels etablierten Standardverfahren mit konventionellen 2D-Röntgenaufnahmen und 3D- $\mu$ CT Rekonstruktionen durchgeführt. Zur Auswertung der konventionellen Röntgenaufnahmen wurde, wie oben beschrieben, ein Score in Anlehnung an den Goldberg-Score erstellt. Anhand dessen wurde die knöcherne Reaktion im Bereich des Knochen-Scaffoldüberganges bewertet. Weder nach Vergleich der unterschiedlich langen Einheilungszeiten innerhalb einer Scaffoldzusammensetzung noch nach Vergleich der unterschiedlichen Scaffolds konnte eine knöcherne Überbauung festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied konnte nach Auswertung des Scores ebenfalls nicht festgestellt werden. Der Goldberg-Score wird zur Beurteilung des Einwachsens eines Allografts verwendet. Hier wird sowohl die Resorption des Allografts als auch das knöcherne Einwachsen am proximalen und distalen Übergang zum Empfängergewebe beurteilt. Der Goldberg-Score wird in Studien zur Beurteilung von Knochentransplantaten sowie zur Beurteilung der Frakturheilung eingesetzt (Goldberg et al., 1985; Lee et al., 2015; Harris et al., 2013; Gardner et al., 2011; Garcia et al., 2010; Bonfiglio et al., 1986). Trotz der  $\mu$ CT-Analyse der Knochen bleibt die radiologische Auswertung ein wertvolles Instrument zur einfachen Beurteilung der Integration der Scaffolds, insbesondere zur in vivo Analyse. Eine genauere Beurteilung der knöchernen Reaktion im Scaffold-Knochen-Übergang erfolgte nach Euthanasie der Tiere mit einer  $\mu$ CT-Analyse.

Die  $\mu$ CT-Analyse ist ein etabliertes Verfahren zur dreidimensionalen Beurteilung des Kallusgewebes bzw. zur Beurteilung der Osteointegration von Knochenersatzmaterialien im Empfängergewebe. Zusätzlich lässt sich mit dem  $\mu$ Mikro-CT die Feinmorphologie der Ersatzmaterialien wie z.B. Porengröße und Interkonnektivität der Poren beurteilen (Bouxsein et al., 2010).

Zur biomechanischen Testung wurde von uns die Rotationstestung (Burstein & Frankel, 1971) angewendet. Der Vorteil der Rotationstestung gegenüber der 3-Punkt bzw. 4-Punkt-Biegung ist die bereits durch Lind et al. (2001) beschriebene gleichmäßige Verteilung des gesamten Drehmoments auf den Knochen, sodass die Veränderungen der Knochengeometrie keine wesentlichen Auswirkungen haben. Eine geringfügige Lageveränderung des Knochens im Rahmen der 3-Punkt oder 4-Punkt-Biegung kann die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Testung stark reduzieren (Lind et al. 2001).

Generell ist eine histologische/histomorphometrische Analyse der Proben nach Maßgabe der ASBMR eine Standardanalysemethode im Rahmen von Nonunion-Modellen an Nagetieren (Parfitt et al., 1987). Die histologische Untersuchung gestaltete sich aufgrund der hohen

Porosität und damit vergesellschafteten Fragilität der Scaffolds schwierig. Eine Standarddünnschnitttechnik konnte aus zuvor genannten Gründen deswegen nicht angewendet werden. Daher wurden die Proben in Auflichtmikroskopietechnik untersucht. Dennoch wurden middiaphysäre Schnitte in Longitudinalachse mit einem Hartschnittmikrotom entsprechend der Vorgaben der ASBMR angefertigt (Gerstenfeld et al., 2005). Die auflichtmikroskopische Untersuchung birgt den Nachteil einer höheren Ungenauigkeit der Zellauszählung aufgrund der geringen Tiefenschärfe, insbesondere bei höheren Vergrößerungen. Die Methylenblaufärbung nach Mann wurde zur Darstellung des Kernchromatins und somit zur Auszählung der immigrierten Zellen verwendet. Eine unspezifische Färbung wurde durch Fluoreszenzmikroskopie nach Bisbenzimid-Färbung ausgeschlossen. Eine histomorphometrische Untersuchung war aufgrund fehlender Kallusbildung nicht adäquat umsetzbar. Daher erfolgte eine quantitative Auswertung der integrierten Zellen.

Die Rasterelektronenmikroskopie ist ein Standardverfahren zur hochauflösenden Darstellung von Oberflächen mit hoher Tiefenschärfe. Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Rasterelektronenmikroskopie häufig zur Charakterisierung von Biomaterialien angewendet. Insbesondere die Oberflächenbeschaffenheit spielt für die Zellbesiedelung des Materiales eine entscheidende Rolle. Durch die hohe Tiefenschärfe lässt sich die Oberflächentopographie selbst auf Nanoebene darstellen (Vielreicher et al., 2013).

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

Das Auffüllen größerer Knochensubstanzdefekte in der Behandlung von Pseudarthrosen oder Tumoren stellt auch heute noch eine große Herausforderung in der Medizin dar. Das optimale Knochenersatzmaterial sollte osteoinduktiv, osteokonduktiv und bioresorbierbar sein. Man unterscheidet wie oben beschrieben natürliche von synthetischen Knochenersatzmaterialien. Der aktuelle Goldstandard stellt weiterhin die autologe Knochen transplantation dar. Vorteile sind die problemlose Immunverträglichkeit und die gute Osteogenität durch die im Transplantat enthaltenen Osteoblasten und Osteoklasten. Des Weiteren weisen autologe Transplantate eine hohe Osteoinduktivität durch die vorhandenen Wachstumsfaktoren wie z.B. Bone morphogenetic proteins (BMPs) und eine hohe Osteokonduktivität durch die vorhandene Mikrostruktur des spongiösen Knochens auf (Habibovic et al., 2007). Den positiven Eigenschaften der autologen Knochen transplantation stehen das Komplikationsrisiko von Seiten der Entnahmestelle wie Infektionen, Frakturen und chronische Schmerzsyndrome (Habibovic et al., 2007). Außerdem sind an der Entnahmestelle nur begrenzte Mengen an spongiösem Knochen verfügbar (Habibovic et al., 2007). Deshalb wurden in den letzten

Jahrzehnten viele verschiedene Konzepte entwickelt, um knöcherne Defekte aufzufüllen. So unterscheidet man biologische von synthetischen Knochenersatzmaterialien. Die Transplantation allogener Knochenersatzmaterialien aus Spenderknochen besitzt der autologen Knochentransplantation ähnliche Eigenschaften. Die allogenen Transplantate werden meist aus Femurköpfen gewonnen, die im Rahmen eines endoprothetischen Hüftgelenkersatzes entnommen werden. Allerdings bergen diese stets das Risiko einer Infektionsübertragung, auch eine Transplantatabstoßungsreaktion kann nicht ausgeschlossen werden. Aus den zuvor genannten Gründen werden diese allogenen Knochenersatzmaterialien aufwändig aufbereitet, wodurch sich die osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften des Materials verringern (Lane and Sanhu, 1987).

Als weitere biologisch gewonnene Knochenersatzmaterialien werden Xenografts aus aufbereitetem bovinen Material eingesetzt. Diese besitzen allerdings ebenfalls das Risiko einer Abstoßungs- oder allergischen Reaktion (Lorenzetti et al., 1998).

Aufgrund der Risiken biologischer Knochenersatzmaterialien werden zunehmend synthetische Ersatzmaterialien entwickelt, die sich bereits teilweise im klinischen Einsatz befinden. Man unterscheidet bioresorbierbare, bioaktive und bionierte Knochenersatzmaterialien und Polymere. Der Vorteil synthetisch hergestellter Knochenersatzmaterialien ist die nahezu uneingeschränkte Verfügbarkeit und sie lösen in der Regel keine Abstoßungs- oder allergische Reaktionen aus (Habibovic et al., 2007). Der Hauptbestandteil dieser Knochenersatzmaterialien sind meist Calciumphosphate, wie sie natürlicherweise im mineralisierten Knochengewebe zu finden sind (Carson et al., 2007). Durch die chemische Zusammensetzung und die Sinterungsprozesse können sich die Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien z.T. stark unterscheiden. So kann die selbe chemische Zusammensetzung eines Materiales durch verschiedene Sinterungstemperaturen eine unterschiedliche Oberflächenstruktur, Porosität und Interkonnektivität hervorrufen (Bernstein et al., 2008). Diese strukturellen Eigenschaften können neben der chemischen Zusammensetzung die Osteokonduktivität der Knochenersatzmaterialien nachhaltig beeinflussen.

Die chemische Zusammensetzung kann zu einer unterschiedlichen Löslichkeit bzw. in vivo-Degradationsverhalten der Materialien führen, die gelösten Ionen können ihrerseits toxische Eigenschaften in Abhängigkeit ihrer Konzentration führen. Die Löslichkeit wird hierzu nach DIN-Norm (ISO EN DIN 10993-14:2001) in vitro in einer TRIS-HCl-Pufferlösung überprüft. Dadurch können potentiell zytotoxische Zusammensetzungen bereits in vitro erkannt werden. Die hier eingesetzten Proben zeigten in den Löslichkeitsversuchen (Bernstein et al., 2008) eine fallende Tendenz von Phosphationen bei geringerem Diphosphatanteil. Meleti et al. zeigten,

dass hohe Phosphationenkonzentrationen die Apoptose von Osteoblasten in vitro induzieren können. Somit könnte eine höhere Löslichkeit von Phosphationen zu einer geringeren Besiedlung der Scaffolds mit Osteoblasten führen. Die Analyse der Scaffolds unter Rasterelektronenmikroskopie als auch die histologische Analyse der Anzahl der immigrierten Zellen zeigten eine geringere Anzahl von Osteoblasten mit steigendem Diphosphatanteil und somit auch steigender Löslichkeit von Phosphationen. Daher könnte die steigende Phosphationenkonzentration sowohl in vitro als auch in vivo für die geringere Osteoblastenbesiedlung mitverantwortlich sein.

Neben der chemischen Zusammensetzung ist die Oberflächenstruktur ein wichtiger Faktor für die Bildung von neuem Knochen an den Scaffolds. So sind die durch Le Nihouannen (2005) beschriebenen „protektiven“ Areale wie Poren, Konkavität, Kanälen oder Interkonnektivität wichtige Faktoren für die Osteokonduktivität und Osteoinduktivität. Gerade diese Beschaffenheit der Oberflächenstruktur und -geometrie der Knochenersatzmaterialien hat entscheidenden Einfluss auf die Zellbesiedlung der Materialien. So wurde die Osteoinduktivität mit Knochenneubildung an untersuchten Materialien immer in Poren und nur in wenigen Fällen im Inneren des Materials oder vom Knochenersatzmaterial entfernt beschrieben (Barradas et al., 2011; Yuan et al., 2010).

Ripamonti et al. zeigten, dass die Knochenbildung immer in konkaven und nie in konvexen Räumen beginnt (Ripamonti et al., 1999). Diese konkaven Räume entstehen auch im Rahmen des Remodelings des Knochens durch die Resorptionszonen, welche durch die Osteoklasten gebildet werden. Sie sind maßgebliche Regulatoren der Knochenneubildung, da in diesen Bereichen eine höhere Konzentration von BMP und Stimulatoren der Angiogeneese vorhanden sein können (Ripamonti et al., 1999, 2009; Barradas et al., 2011). Im Rahmen unserer REM Untersuchung zeigten sich mit steigendem Orthophosphatanteil mehr Konkavitäten auf der Oberfläche der Scaffolds. Durch die konkave Oberfläche konnten in diesen auch die mehr anhaftenden Osteoblasten bei steigendem Orthophosphatanteil beobachtet werden. Die konkaven Räume auf der Oberfläche der Scaffolds dienen somit als geschützte Areale, in denen sich die Osteoblasten ansiedeln und die Knochenneubildung initiieren können. Neben der makroskopischen ist die mikroskopische Oberflächenstruktur für die Morphologie und der damit verbundenen Anheftungstendenz der Osteoblasten ein ausschlaggebender Faktor. Hayes et al. zeigten, dass Osteoblasten ihre Morphologie an die Oberfläche adaptieren. Die Osteoblasten nehmen auf glatten Oberflächen eine fibroblastenähnliche flache Form an und bilden Pseudopodien aus, um eine bessere Anhaftung

an die Oberfläche zu erreichen. Auf rauen Oberflächen können sich die Osteoblasten einfacher anheften und können somit die osteoblastentypische Form beibehalten (Hayes et al., 2010). In der REM Untersuchung der Scaffolds zeigte die Oberfläche eine stärkere Aufrauung der D22 Scaffolds mit höherem Orthophosphatanteil gegenüber den D33 und D40 Scaffolds. Dies führte dazu, dass die Osteoblasten auf den D40 Scaffolds eine gestreckte fibroblastenähnliche Morphologie mit vielen Pseudopodien ausbildeten, um eine Anheftung an das Scaffold überhaupt gewährleisten zu können. Die Osteoblasten auf den D33 und vor allem D22 Scaffolds zeigen eine typische kompakte Konfiguration, ähnlich der Konfiguration am Knochen.

Durch die eingewanderten Osteoblasten konnte Ripamonti et al. bei in die Muskulatur von Pavianen implantierten Scaffolds Knochenformationen im ektopen Gewebe und somit Osteoinduktivität nachweisen. In unseren Untersuchungen der ektopen Implantation des Scaffolds in der Muskulatur der Maus zeigte sich bei zunehmenden Orthophosphat Anteil ein signifikanter Unterschied der Anzahl von Zellen. Auch im  $\mu$ CT konnte kein Knochen in den ektop implantierten Scaffolds nachgewiesen werden. Wie oben bereits beschrieben zeigte sich bei bisher beschriebenen osteoinduktiven Materialien die Knochenbildung immer in den Porenbereichen und nicht im Randbereich (Barradas et al., 2011). Aufgrund der hohen Anzahl von Zellen im Randbereich und der geringeren Anzahl im zentralen Bereich kann dem untersuchten Material keine Osteoinduktivität zugeschrieben werden.

Die Osteokonduktivität wird durch die Materialarchitektur beeinflusst. Hierbei sind „Makroporen“ ( $>50\mu\text{m}$ ) für das Einwachsverhalten von Blutgefäßen und Knochen und „Mikroporen“ ( $0,1-10\mu\text{m}$ ) für das Resorptionsverhalten des Scaffolds enorm wichtig. (Bohner et al., 2010). In den Vorversuchen wurde die Gesamtporosität der Scaffolds mittels  $\mu$ CT ermittelt. So zeigten sich aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Scaffolds auch verschiedene Porositäten (D40:  $51,57 \pm 1\%$ , D33:  $54,50 \pm 0,8\%$ , D22:  $58,84 \pm 0,9\%$ ). Nach orthotoper Implantation zeigte die Gruppe der D40 Scaffolds zu allen Untersuchungszeitpunkten keine relevante Zellzahl, weder im Rand- noch im Zentrumsbereich. Die Porosität in dieser Gruppe zeigte die geringste Rate im Vergleich zu den anderen Gruppen, was möglicherweise das Einwandern der Zellen in das Scaffold verhindert. In den Scaffolds D22 und D33 konnten signifikant mehr Zellen im Bereich der Scaffolds gegenüber den D40 Scaffolds beobachtet werden. Nach 25 Wochen zeigte sich außerdem eine signifikant höhere Gesamtzahl Zellen in der Gruppe D22 gegenüber D33. Dies erklärt sich durch die höhere Porosität des D22 Scaffolds gegenüber dem D33 Scaffold. Betrachtet man das Zentrum gegenüber dem Randbereich der Scaffolds kann die entsprechende Interkonnektivität und

ausreichende Porengröße beobachtet werden. Hier zeigten sich in der D22 Gruppe keinerlei signifikante Unterschiede. In der D33 Gruppe zeigten sich nach 25 Wochen signifikant weniger Zellen im Zentrum. Ein Grund hierfür kann die mangelnde Versorgung der zentral gelegenen Zellen sein, da die im Vergleich zu D22 geringere Porosität zwar ein Einwandern von Zellen zulässt, aber die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff möglicherweise nicht gewährleistet ist. In der durchgeführten  $\mu$ CT Untersuchung konnte in einigen Scaffolds ein ossäres Einwachsen in das Scaffold beobachtet werden, sodass von einer Osteokonduktivität in den Gruppen D33 und D22 ausgegangen werden kann.

Das implantierte Scaffold sollte im optimalen Fall im Rahmen des Remodelings vollständig resorbiert werden. Makroskopisch und histologisch zeigte sich keine Resorptionsfähigkeit des Scaffolds. Um die Resorption quantifizieren zu können wurde das Volumen des Scaffolds vor Implantation und nach Explantation mittels  $\mu$ CT bestimmt. Hierbei zeigte sich lediglich in der D22 Gruppe ein signifikant verringertes Volumen nach 25 Wochen, in allen weiteren Gruppen zeigte sich keine signifikante Abnahme des Volumens. Somit kann im D22 Scaffold von einer geringen Degradationsfähigkeit ausgegangen werden. Die *in vivo* Degradation von Knochen und Knochenersatzmaterialien erfolgt vor allem durch Osteoklasten (Schilling et al., 2004). Die Regulierung von Osteoklasten erfolgt durch zelluläre Interaktion, Aktivierung über verschiedene Regulatoren und extrazelluläre Ionenkonzentrationen (Koner mann et al., 2014).

Datta et al. zeigten bereits 1989 dass eine erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration zu einer geringeren Zellgröße der Osteoklasten führt. Diese verminderte Zellgröße führt weiter zu einer verminderten Ausschüttung von Enzymen und dadurch zu einer verminderten Knochenresorption. In Vorversuchen wurden die Ionenkonzentrationen der verschiedenen Scaffolds nach ISO EN DIN 10993-14:2001 bestimmt. Hier zeigte sich eine abnehmende Konzentration der Kalziumionen zwischen den verschiedenen Scaffolds von D40 nach D22. Diese geringere Kalziumlöslichkeit erklärt möglicherweise die signifikant höhere *in vivo* Degradationsrate der D22 Scaffolds, da die Funktion der Osteoklasten weniger eingeschränkt wird.

Ein weiterer Grund der nur in den D22 Scaffolds nachgewiesenen signifikanten Degradation erklärt sich durch die Oberflächenstruktur. So zeigten Winkler et al. dass Ca<sub>2</sub> und Ca<sub>10</sub> Scaffolds in der Löslichkeitsuntersuchung nach ISO EN DIN 10993-14 eine vergleichbare Resorbierbarkeit zeigten. Allerdings konnte dies im *in vivo* Versuch nicht bestätigt werden. Hier erfolgte die Resorption wie bereits durch Schilling et al. gezeigt hauptsächlich über Osteoklasten. Ca<sub>2</sub> Scaffolds besitzen im Vergleich zu Ca<sub>10</sub> Scaffolds eine wesentlich rauere

Oberflächenstruktur. Dies führt zu einer besseren Anheftung und höheren Differenzierung der Osteoklasten (Winkler et al., 2010). Die in dieser Studie verwendeten Scaffolds zeigten wie oben beschrieben einen starken Unterschied der Oberflächenstruktur durch unterschiedliche Rauigkeit in der REM Untersuchung sowie unterschiedliche Porosität in Vorversuchen. Die Scaffolds D22 zeigten sich deutlich rauer und poröser als die Scaffolds D40 und D33. Diese Unterschiede der Oberflächenstruktur können die bessere in vivo Degradation der D22 Scaffolds nach 25 Wochen erklären.

## **6. Fazit**

Das in dieser Arbeit untersuchte Material konnte leider die daran gestellten hohen Erwartungen aus den durchgeführten Vorversuchen der Löslichkeitsprüfung im in vivo Modell nicht erfüllen. So zeigte das Material Biokompatibilität, allerdings konnte nur eine mäßige Osteokonduktivität und nur in einer Subgruppe vorhandene Biodegradation nachgewiesen werden. Eine Osteoinduktivität konnte im Rahmen der Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Somit ergibt das untersuchte Material keinen Vorteil gegenüber den aktuell verfügbaren Materialien.

## 7. Literaturverzeichnis

Asatrian G, Chang Le, James AW. Muscle puch implantation: an ectopic review bone formation model. *Animal Models for Stem Cell Therapy. Methods in Molecular Biology*, Volume 1213; pp 185-191. 2014

Asselmeier MA, Caspari RB, Bottenfield S. A review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus. *Am J Sports Med.* 21: 170-175. 1993

Aumüller G, Engele J, Kirsch J, Mense S. *Duale Reihe Anatomie*, 3. Auflage. 2014

Augat P, Merk J, Ignatius A, Margevicius K, Bauer G, Rosenbaum D, Claes L. Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* Jul;(328):194-202. 1996

Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, von Rechenberg B, Hoftmann-Antenbrinck M, Schneider E, Müller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimizing both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord.* Aug 1; 8:72. 2007

Babhulkar, S., K. Pande, and S. Babhulkar. Nonunion of the diaphysis of long bones. *Clin Orthop Relat Res*, (431): p. 50-6. 2005

Baron R, Tsouderos Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol* 450(1):11-7. 2002

Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater.* May 15;21:407-29. 2011

Bauer TW, Muschler G. Bone grafts materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*; 371:10-27. 2000

Bauer TW. An overview of the histology of skeletal substitute materials. *Arch Pathol Lab Med.* Feb; 131 (2): 217-24. 2007

Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin North Am*; 44:451-61. 2006

Bennett MH, Stanford RE, Turner R. Hyperbaric oxygen therapy for promoting fracture healing and treating fracture non-union (Review). The Cochrane Library, Issue 11. 2012

Bernstein A, Nöbel D, Mayr HO, Berger G, Gildenhaar R, Brandt J. Histological and histomorphometric investigations on bone integration of rapidly resorbable calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mat Res Part B: Appl Biomater.* 84B:452-462. 2007

Bigham-Sadegh A, Oryan A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connective tissue research*, Jun;56(3):175-94. 2015

Boecker W, Denk H & Heitz PU. *Pathologie.* Urban & Fischer, Elsevier. 2004

Bohner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *Eur Cell Mater.* Jul 1; 20:1-12. 2010

Bonfiglio M. Repair of bone defects with autogenous grafts after treatment of bone tumors by local resection. *Iowa Orthop J.* 6:21-30. 1986

Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 2(1):97-101. 1984

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* Jul; 25(7):1468-86. 2010

Brownlow, H.C. and A.H. Simpson. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res*, 18(3): p. 438-42. 2000

Bucher O, Wartenberg H. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* Verlag Hans Huber; 12. Auflage. 1997

Burstein AH, Frankel VH. A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech.* Mar;4(2):155-8. 1971

Carotenuto G, Spagnuolo G, Ambrosio L, Nicolais L. Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications. *J Mater Sci Mater Med;* 10:671-6. 1999

Carson JS, Bostrom MPG. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury, Int. J. Care Injured* 38S1, 33-37. 2007

Casabona F, Martin I, Muraglia A, Berrino P, Santi P, Cacedda R, Quarto R. Prefabricated engineered bone flaps: an experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Palst Reconstr Surg*. Mar;101(3):577-81. 1998

Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3<sup>rd</sup>, Hayes WC, Perren SM. Role of interfragmentary strain in fracture healing: bovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res*. Jan;9(1):131-42. 1991

Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KS. An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res*; Jul;21(4):685-90. 2003

Chernousova S, Epple M. Bioactive bone substitution materials. *Advanced Biomaterials and Devices in Medicine* 1(74-87). 2014

Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res*; Sep;22(5):1100-7. 2004

Claes L, Augat P, Suger P, Wilke HJ. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing, *J Orthop Research*, 15(4):577-84. 1997

Claes, L, Eckert-Hubner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res*. 20(5): p. 1099-1105. 2002

Claes L, Blakytyn R, Gockelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res* 24: 1178-1185. 2009

Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*; Sep;130(17):4123-33. 2003

Datta HK, MacIntyre I, Zaidi M. The effect of extracellular calcium elevation on morphology and function of isolated rat osteoclasts. *Biosci Rep*. Dec;9(6):747-51. 1989

Dickson GR, Geddis C, Fazzalari N, Marsh D, Parkinson I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *J Orthop Res* 26: 729-736. 2008

Dombrowski F, Garcia Caso P, Laschke MW, Klein M, Günster J, Berger G. 3-D printed bioactive bone replacement scaffolds of alkaline substituted ortho-phosphates containing meta- and di-phosphates; *Engineering Materials Vols.* 529-530 pp 138-142. 2013

Dorozhkin SV, Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates; Biomater 1:1, pp 3-56: July/August/September, Landes Bioscience. 2011

Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. Tissue Eng Part C Methods. Mar;14(1):79-88. 2008

Dutta SR, Passi D, Singh P, Bhuibhar A. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. Irish Journal Medical Science Mar, 184(1):101-6. 2015

Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am. Mar;84-A(3):454-64. 2002

Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in rabbit spine. Clin Orthop, 179:246-252. 1983

Fleisch HA. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. Ann Med. 29(1): 55-62. 1997

Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T & Menger MD. Development of a reliable non-union model in mice. J Surg Res 147: 84-91. 2008

Garcia, P, et al., A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. J Biomech. 41(8): p. 1689-96. 2008

Garcia P, Schwenger S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Pohlemann T, Menger MD. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation – role of a local renin-angiotensin system. Br J Pharmacol. April; 159(8): 1672-1680. 2010

Garcia P, Pieruschka A, Klein M, Tami A, Histing, T, Holstein JH, Scheuer C, Pohlemann T, Menger MD. Temporal and Spatial Vascularization Patterns of Unions and Nonunions: Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Proteins, J Bone Joint Surg Am Jan 4;94(1): 49-58. 2012

Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, Ignatius A, Wildemann B, Lienau J, Peters A, Willie B, Duda G, Claes L, Pohlemann T, Menger MD; Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *European Cells and Materials* Vol. 26 pages 1-14. 2013

Garcia P, Franz D, Raschke M. Knochenersatzmaterialien – Grundlagen und klinischer Nutzen. *Z Orthop Unfall*; 152: 152-160. 2014

Gardner MJ, Putnam S, Wong Ambrose, Streubel PN, Kotiya A, Silva MJ. Differential fracture healing resulting from fixation stiffness variability: A mouse model. *J Orthop Sci. Author manuscript.*; May 16(3): 298-303. 2011

Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res*; 47:28.1999

Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res.* Oct;20(10):1715-22. 2005

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* Nov;36 Suppl 3: S20-7. 2005

Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histomorphatibility in transplantation. *J Orthop Res.* 3(4): 389-404. 1985

Greenwald AS, Garino JP, American Academy of Orthopaedic Surgeons. Alternative bearing surfaces: the good, the bad, and the ugly. *J Bone Joint Surg Am.* 83-A Suppl 2 Pt 2:68-72. 2001

Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials – properties and relevance in bone repair. *J Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 1:1(25-32). 2007

Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis, *Bone* 29: 560-564. 2001

Harris JS, Bemenderfer TB, Wesser AR, Kacena MA. A review of mouse critical size defect models in weight bearing bones. *Bone.* Jul;55(1):241-7. 2013

Hayes JS, Richard RG. Surfaces to control tissue adhesion for osteosynthesis with metal implants: in vitro an in vivo studies to bring solutions to the patient. *Expert Reviews Med. Devices*; 7(1), 131-142. 2010

- Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science*; 226:630-6. 1984
- Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. An experimental model for non-union in rats. *Injury*; Dec; 26(10):681-6. 1995
- Hin KA, Best SM, Bonfield W. Characterization of porous hydroxapatite. *J Mater Sci Mater Med*; 10:135-45. 1999
- Hing KA, Best SM, Bonfield W. Characterization of porous hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. Mar;10(3):135-45. 1999
- Hiltunen A, Aro HT & Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res* 23-27. 1993
- Histing T, Klein M, Stieger A, Stenger D, Steck R, Matthys R, Holstein JH, Garcia P, Pohlemann T, Menger MD. A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *Journal of Surgical Research* 178: 715-721. 2012
- Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T. Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40: 215-219. 2007
- Horstmann WG, Verheyen CC, Leemans R. An injectable calcium phosphate cement as a bone graft substitute in the treatment of displaced lateral tibial plateau fractures. *Injury* 34: 141-144. 2003
- Jorn D, R. Gildenhaar R, Berger G, Stiller M, Knabe C. *KEM*, Vols. 396-398. pp 213-21. 2009
- Junqueira LC, Carneiro J & Gratzl M. *Histologie*, Springer, Berlin, 6. Auflage. 2004
- Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL & White AA. Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res* 3: 325-330. 1985
- Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G & Bail HJ. An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl)* 52: 383-390. 2007
- Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Hartjen C, Watson JT, Kim PT. The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop Relat Res*. Jan; (382): 42-50. 2001

Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Henning GE, Wang E, Holtrop ME. Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res.* Sep;(318):222-30. 1995

Kenwright, J. and A.E. Goodship. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res*, (241): p. 36-47. 1989

Knabe C, Houshmand A, Berger G, Ducheyne P, Gildenhaar R, I. Kranz I, Stiller M; Effect of rapidly resorbable bone substitute materials on the temporal expression of the osteoblastic phenotype in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 84A(4), pp 856-868. 2008

Konermann A, Staubwasser M, Dirk C, Keiling L, Bourauel C, Götz W, Jäger A, Reichert C. Bone substitute material composition and morphology modulate calcium and phosphate release through osteoclast-like cells. *Int. J of Oral & Maxillofacial Surgery* 43:514-521. 2014

Kühne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand.* Jun;65(3):246-52. 1994

Kumar S, Wan C, Ramaswamy G, Clemens TL, Ponnazhagan S. Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Mol Ther.* May;18(5):1026-34. 2010

Lane JM, Sanhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* Apr;18(2):213-25. 1987

Lee H, Chung CY, Lee KM, Kwon SS, Moon SY, Jung KJ, Chung MK, Park MS. Incidence and risk factors of allograft bone failure after calcaneal lengthening. *Clin Orthop Relat Res.* May; 473(5): 1765-1774. 2015

le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater*; 8:1-11. 2004

Le Nihouannen D, Guehenec LL, Rouillon T, Pilet P, Bilban M, Layrolle P, Daculsi G. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomaterials.* May;27(13):2716-22. 2006

- Li J, Xing X, Xue C. Hydroxyapatite particulate artificial bone for repairing sunken deformation of frontal bone following removal of dermoid cyst. *Zhongguo Xiu Fu Chon Jian Wai Ke Za Zhi*. Jan;21(1):6-8. 2007
- Liang G, Yang Y, Oh S, Ong JL, Zheng C, Ran J, Yin G, Zhou D. Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous Beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials* 26, 4265-4271. 2005
- Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*. Jun;42(6):569-73. 2011
- Lind PM, Lind L, Larsson S, Orberg J. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone*. Sep;29(3):265-70. 2001
- Lorenzetti M, Mozzati M, Campanino PP, Valente G. Bone augmentation of the inferior floor of the maxillary sinus with autogenous bone or composite bone grafts: A histologic-histomorphometric preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 13:69-76. 1998
- Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 25: 51-61. 2007
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme Verlag 4. Auflage. 2012
- Manigrasso MB, O'Connor JP. Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18: 687-695. 2004
- Mathijssen A. New method for application of plaster-of-Paris bandage. 1852. *Clin Orthop Relat Res*. May;458:59-62. 2007
- McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*. May;60-B(2):150-62. 1978
- Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS. Inorganic Phosphate induces apoptosis of Osteoblast-like cells in culture. *Bone* Vol. 27 No 3: 359-366. 2000
- Moed BR, Wilson Carr SE, Craig JG, Watson JT. Calcium sulfate used as bone graft substitute in acetabular fracture fixation. *Clin Orthop*. 410:303-309. 2003
- Moonga BS, Dempster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 10(3):453-7. 1995

Morton DB, Griffiths PHM. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. *Veterinary Record* 116, 431-436. 1985

Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9: 651-659. 1994

Nunamaker DM. A new external skeletal fixation device that allows immediate full weightbearing: Application in the horse. *Vet Surg* 345-355. 1986

Nunamaker DM & Perren SM. A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res* 167-174. 1979

Nunamaker DM, Richardson DW & Butterweck DM. Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma* 5: 138-145. 1991

Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* S56-65. 1998

Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury*, Oct;39(10):1119-26. 2008

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. Dec;2(6):595-610. 1987

Reed AA, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AH. Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br*. 85(4): p. 604-10. 2003

Rhineland FW, Nelson CL. Experimental implantation of porous materials into bone. Proplast for low modulus fixation of prostheses. *Acta Orthop Belg*. 40(5-6):771-98. 1974

Richardson DW, Nunamaker DM. Evaluation of plate luting, using an in vivo ovine osteotomy model. *Am J Vet Res*. Sep;52(9):1468-73. 1991

Ripamonti U, Tasker JR. Advances in biotechnology for tissue engineering of bone. *Curr Pharm Biotechnol*. 1(1):47-55. 2000

Ripamonti U. Biomimetism, biomimetic matrices and the introduction of bone formation. *J Cell Mol Med*; 13(9B):2953-72. 2009

Rossant J, Nagy A. Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med*, Jun;1(6):592-4. 1995

Rose FRAJ, Oreffo ROC. Breakthroughs and views bone tissue engineering: hope vs. hype, *Biochem Biophys Re*; 292:1-7; DOI: 10.1006/bbrc.2002.6519. 2002

Rueger JM, Linhart W, Sommerfeldt D. Biologic reactions to calcium phosphate ceramic implantations. Results of animal experiments. *Orthopäde*. Feb;27(2):89-95. 1995

Rueter A, Trentz O, Wagner M. *Unfallchirurgie*. Urban & Fischer, Elsevier Verlag, 2. Auflage. 2008

Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall JJ, Ragab A, Benghuzzi H. Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg* 20: 249-255. 2007

Scharf HP, Rüter A, Pohlemann T, Marzi I, Kohn D, Günther KP. *Orthopädie und Unfallchirurgie Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung*, 2. Auflage. 2011

Schenk RK, Willenegger HR. Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect. *Unfallheilkunde*. May;80(5):155-60. 1977

Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM. Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res*. May;13(3):382-9. 1995

Schiebler TH & Korf HW; *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*; 10. Auflage. 2007

Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. Resorbability of bon substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 25; 3963-3972. 2004

Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, Gradl G. Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res* 26: 184-189. 2008

Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of singals within the basic multicellular unit. *BoneKEy Reports* 3, Article number 481. 2014

- Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R, Trivella G. Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus, distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J Orthop.* 6(5):730-5. 1988
- Strube P, Mehta M, Putzier M, Matziolis G, Perka C, Duda GN. A new device to control mechanical environment in bone defect healing in rats. *J Biomech*; Aug 28;41(12):2696-702. 2008
- Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res*; 13:94-117. 1998
- Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials.* Dec;21(23):2405-12. 2000
- Trenholm A, Landry S, McLaughlin K, et al. Comparative fixation of tibial plateau fractures using BSM, a calcium phosphate cement, versus cancellous bone graft. *J Orthop Trauma* 19(10):698-702. 2005
- Utvag SE, Korsnes L, Rindal DB, Reikeras O. Influence of flexible nailing in the later phase of fracture healing: strength and mineralization in rat femora. *J Orthop Sci* 6: 576-584. 2001
- Vallet-Regi M, Arcos D. Nanostructured hybrid materials for bone tissue regeneration. *Curr Nanosci*; 2:179-89. 2006
- Vielreicher M, Schürmann S, Detsch R, Schmidt MA, Buttgerit A, Boccaccini A, Friedrich O. Taking a deep look: modern microscopy technologies to optimize the design and functionality of biocompatible scaffolds for tissue engineering in regenerative medicine. *J R Soc Interface* 10: 20130263. 2013
- Welch RD, Zhang H, Bronson DG. Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft. *J Bone Joint Surg Am.* 85:222-231. 2003
- Wilson T, Katz JM, Gray DH. Inhibition of active bone resorption by copper. *Calcif Tissue Int* 33(1):35-9. 1981
- Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H. Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg.* May-Jun;20(3):149-55. 2007

Winkler T, Hoenig E, Gildenhaar R, Berger G, Fritsch D, Janssen R, Morlock MM, Schilling AF. Volumetric analysis of osteoclastic bioresorption of calcium phosphate ceramics with different solubilities. *Acta Biomater.* Oct;6(10):4127-35. 2010

Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 3:192-195. 1989

Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, de Boer J, Barradas AM, de Ruiter A, Walsh WR, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 3;107(31):13614-9. 2010

Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Lee ES, Tan LG, Mattar CN, Fisk NM, Choolani M, Chan J. Neovascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical size femoral defects. *Biomaterials* 31: 606-620. 2012

Zhao J, Fang Z, Huang R, Xiao K, Li J, Xie M, Kan W. Ectopic osteogenesis in vivo using bone morphogenetic protein-2 derived peptide loaded biodegradable hydrogel. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 31(4):811-5. 2014

## **9. Publikationen / Danksagung**

### **9.1 Publikationen**

Die vorliegende Arbeit ist aktuell in der Vorbereitung zur Einreichung bei verschiedenen Fachzeitschriften.

### **9.2 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit widme ich meinem kürzlich verstorbenen Opa, der mir immer zur Seite stand und mich in all meinen Vorhaben unterstützte.

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Labor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt:

*Prof. Dr. med. Tim Pohlemann.* Für die Überlassung des Themas, sowie die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten und die Unterstützung seit meiner studentischen Tätigkeit und in meinen wissenschaftlichen Tätigkeiten.

*Dr. med. Moritz Klein.* Für seine Freundschaft, unsere zeitlich und fachlich intensiven Diskussionen bis in die Nacht und der unschätzbaren Betreuung. Ohne seine Hilfe wäre die Durchführung und der Abschluss der Arbeit nicht möglich gewesen.

*Prof. Dr. med. Michael Menger.* Für die Hilfe, produktiven und kritischen Anmerkung bei der Durchführung der Arbeit und für das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften.

*Frau J. Becker.* Für die tatkräftige, kreative und lösungsorientierte Unterstützung in der Durchführung der herausfordernden histologischen Analysen.

*Tobias Bierbaum.* Für seine Freundschaft und die unschätzbaren Hilfeleistungen während der operativen Eingriffe. Ohne Ihn wäre die Durchführung nur schwer möglich gewesen.

*Dr. med. vet. Monika Frings.* Für die Unterstützung und ihr Einverständnis zur Durchführung des Tierversuchs.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg/Saar für ein sehr angenehmes Arbeitsklima und die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung bei meinen Projekten.

Meiner Freundin Anna und ihren Eltern für Ihre ständige Unterstützung und Geduld.