

**Materialeigenschaften und Gewebeschaffenheit
an der Grenzfläche zwischen Knochenneubildungs-
zone und einem neuen Verbundstoff als Implantat-
material im osteoporotischen Mausfrakturmodell**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Bamberg, Coralie Elisabeth
aus Saarlouis

Gießen 2019

Aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie
der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christian Heiß,
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Katrin S. Lips

Gutachter: Prof. Dr. Markus Rickert

Tag der Disputation: 16.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Osteoporose.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Knochenaufbau und Knochenzellen.....	2
1.1.3	Osteoporotische Frakturen und Frakturheilung.....	3
1.1.4	Calciumphosphatphasen und Calcium / Phosphor-Verhältnis	4
1.1.5	Diagnostik der Osteoporose.....	7
1.1.6	Therapie der Osteoporose	7
1.2	M3R-Knock-Out-Mäuse.....	8
1.3	Knochenersatzmaterialien.....	10
1.4	Brain-derived neurotrophic factor	14
1.5	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie	16
1.6	Fragestellung.....	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Tiermodell	20
2.2	Knochenzement	21
2.3	Probenvorbereitung.....	22
2.4	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie	22
2.5	Rasterelektronenmikroskopie und Energiedispersive Röntgenspektroskopie	24
2.6	Histologische Färbungen und Lichtmikroskopie	25
2.6.1	Kombinierte Alcianblau-PAS (= Perjodsäure-Schiff-Reaktion) Färbung	25
2.6.2	Silberfärbung.....	26
2.6.3	Toluidinblau-Färbung	27
2.7	Osteocyten-Analyse	28
2.8	Statistik.....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Deskriptive Auswertung der ToF-SIMS-, REM / EDX- und PAS-gefärbten lichtmikroskopischen Aufnahmen.....	29
3.1.1	Wildtyp-Gruppe mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF	33
3.1.2	Wildtyp-Gruppe mit MBG-haltigem CPC mit BDNF.....	35
3.1.3	M3R-KO-Gruppe mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF	38
3.1.4	M3R-KO-Gruppe mit MBG-haltigem CPC mit BDNF	41

3.2 EDX-Quantifizierung.....	43
3.3 Osteocyten-Analyse	46
3.3.1 Osteocytenmorphologie	46
3.3.2 Osteocytenzahl	52
4 Diskussion	54
4.1 ToF-SIMS-Auswertungen.....	54
4.2 EDX-Quantifizierung und Ca / P-Verhältnis.....	59
4.3 Osteocyten-Analyse	63
4.4 CPC-MBG-BDNF-Komposit als Knochenersatzmaterial	67
4.5 Osteoporose.....	71
4.6 Ausblick.....	73
5 Zusammenfassung	75
6 Summary	76
7 Verzeichnisse	77
7.1 Abkürzungsverzeichnis	77
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	78
7.3 Tabellenverzeichnis.....	78
7.4 Literaturverzeichnis	79
7.5 Publikationsverzeichnis	93
8 Erklärung zur Dissertation	94
9 Danksagung	95

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

Die Osteoporose, auch Knochenschwund genannt, gehört zu den systemischen Knochenerkrankungen. Sie ist durch eine geringere Knochenmasse und Knochendichte im Vergleich zu gesundem Knochen als Folge einer gestörten Mikroarchitektur charakterisiert, ohne dass das Verhältnis von mineralisierter zu nichtmineralisierter Matrix nachweisbar verändert ist. Daraus resultiert eine verstärkte Knochenbrüchigkeit (Ensrud und Crandall 2017).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Osteoporose ist eine bedeutende Alterserkrankung, da etwa acht Millionen Deutsche betroffen sind. Jedes Jahr erleiden ca. 4-5% der Betroffenen eine Fraktur, sodass fast 500.000 Frakturen jährlich auf eine Osteoporose zurückgeführt werden können. Es entstehen schätzungsweise 5,4 Milliarden Euro Krankheitskosten, wodurch sie zu den kostenintensiveren Volkskrankheiten zählt (Josten 2012).

Die häufigste Form ist die primäre Osteoporose, die hauptsächlich Frauen nach der Menopause betrifft, da der hierdurch bedingte Östrogenmangel zur vermehrten Differenzierung und Aktivierung, sowie erhöhter Lebensdauer von Osteoklasten führt. Dadurch kommt es zum Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau zugunsten der Knochenresorption mit folglichem Knochenschwund (Pietschmann et al. 2009). Die senile Osteoporose wird einer kontinuierlichen Abnahme der Knochenmasse durch Alterungsprozesse wie Osteoblastendysfunktion und einer verschobenen osteogenen Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu Adipocyten zugeschrieben (Valenti et al. 2011). Viele Risikofaktoren, die zu einer sekundären Osteoporose führen können, sind bekannt: dazu gehören unter anderem Medikamenteneinnahmen, vor allem von Glucocorticoiden, Störungen des Hormonhaushalts wie Hyperthyreose oder Hyperparathyroidismus, aber auch mangelnde Belastung bei Immobilisation oder ein erniedrigter body-mass-index (Pisani et al. 2016). Die Folgen sind eine geringere Knochenmineraldichte und eine verschlechterte Knochenmikroarchitektur, die häufig zu Frakturen führt.

1.1.2 Knochenaufbau und Knochenzellen

Die homogene äußere Schicht des Knochens wird als Kompakta oder Corticalis bezeichnet, im Inneren des Knochens findet sich die Spongiosa, welche einem Trabekelgitter entspricht, in dessen Zwischenräumen sich das Knochenmark befindet. Vor allem Knochen mit hohem Spongiosa-Anteil sind durch die postmenopausale Osteoporose frakturgefährdet, da die Spongiosa schneller umgebaut wird als die Kompakta. Die jährliche Remodellierungsrate beträgt 25% für trabekulären Knochen und 3% für corticalen Knochen (Anil et al. 2010). Die Trabekel sind in Anzahl und Dicke im Vergleich zu gesundem Spongiosagewebe deutlich vermindert (Chen et al. 2014). Lange Röhrenknochen wie das Femur werden in Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse eingeteilt. Diaphyse oder Knochenchaft wird der lange mittlere Teil des Knochens genannt, als Epiphyse werden die Knochenenden mit Gelenkflächen bezeichnet, die Metaphyse stellt den Abschnitt dazwischen dar und entspricht in der Wachstumsphase der Wachstumszone. Vor allem metaphysär zeigt sich eine trabekuläre Struktur. Als Frakturmodelle in Tierversuchen eignen sich daher Knochendefekte in diesem Bereich, um Einflüsse von Biomaterialien auf den osteoporotischen Knochen zu testen (Alt et al. 2013). Die senile Osteoporose betrifft sowohl trabekulären als auch corticalen Knochen. Dabei kommt es im Alter zu einem kontinuierlichen Abbau der gesamten Knochenmasse (Duque und Troen 2008).

Das Knochengewebe setzt sich aus Kollagenfibrillen und daran angelagerten Calciumphosphat-Kristallen in Form von größtenteils Hydroxylapatit (HA), die zusammen die mineralisierte Extrazellulärmatrix bilden, und den verschiedenen Knochenzellen zusammen. Knochenzellen lassen sich in Osteoblasten, Osteoklasten und Osteocyten unterteilen. Zu den Aufgaben der Osteoblasten gehören hauptsächlich die Synthese der organischen Knochengrundsubstanz, die Steuerung der Calcifizierung dieser, und die Regulierung der Osteoklasten. Diese sind für die Knochenresorption zuständig, die durch Demineralisation durch Ansäuern der Mikroumgebung, und enzymatische Auflösung der kollagenen Knochenmatrix geschieht (Clarke 2008). Durch anschließende Phagozytose der gelösten Substanzen entstehen Resorptionszonen, die sogenannten Howship-Lakunen. Normalerweise herrscht ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -resorption, sodass die Knochenmasse konstant bleibt. Durch diesen ständigen Umbauprozess, der als Knochenremodeling bezeichnet wird, wird jedes Jahr ca. 10% der Knochenmasse ersetzt (Cohen Jr. 2006).

Osteoblasten lagern neugebildete unmineralisierte Kollagenfibrillenschichten, das Osteoid, auf vorhandener Knochenmatrix ab. Durch Auflagern weiterer Schichten und Mineralisation dieser, entstehen aus den kugeligen ca. 5-10 µm kleinen Osteoblasten mit

wenigen kurzen Ausläufern die eingemauerten Osteocyten (Florencio-Silva et al. 2015). Die Osteocyten liegen in linsenförmigen Lakunen von 20-60 µm, wovon zahlreiche Canaliculi abgehen, in denen die langen Zellausläufer, die auch als Dendriten bezeichnet werden, liegen und ein Netz in der mineralisierten Knochenmatrix bilden (Bonewald 2011). Je weniger die Zellen synthetisieren, desto flacher und dendritenreicher werden sie. Sie sind dann verantwortlich für die Mechanotransduktion und initiieren bei Mikrorissen und anderen Defekten der Knochenstruktur die Remodellierung (Capulli et al. 2014). Die Orientierung des Minerals im Knochen, steht mit der Orientierung der Osteocyt-lakunen in Verbindung und die Knochenarchitektur wiederum hängt mit der Knochenqualität, die zu seiner Gesamtstärke und Elastizität beiträgt, zusammen: ein besser organisierter Knochen weist kleinere Mineralpartikel auf, wohingegen weniger organisierter Knochen größere, unorganisiertere Partikel aufweist (Binkley und Grandfield 2017).

1.1.3 Osteoporotische Frakturen und Frakturheilung

In fortgeschrittenen Stadien der Osteoporose ist die Knochenbrüchigkeit und damit die Anfälligkeit für Frakturen deutlich erhöht, sodass diese sogar nach nur minimalem oder ohne vorheriges Trauma auftreten. In Westeuropa beträgt die Wahrscheinlichkeit, eine osteoporotisch bedingte Fraktur zu erleiden, für Frauen nach der Menopause über 40% (Kanis et al. 2013b). Die häufigsten Lokalisationen sind dabei die Wirbelkörper und die hüftgelenksnahen Oberschenkel (Warriner et al. 2011). Konsequenzen ergeben sich aus der beeinträchtigten Frakturheilung bei Osteoporose.

Im gesunden Knochen kann zwischen primärer und sekundärer Frakturheilung unterschieden werden. Die primäre oder direkte Frakturheilung ohne äußere Kallusbildung findet nur bei enger Adaptation der Bruchenden mit Ruhigstellung statt, was nur in einzelnen Fällen nach chirurgischer Versorgung mittels Osteosynthese vorkommt. Die sekundäre indirekte Frakturheilung stellt die regelhafte Knochenheilung dar. Diese vollzieht sich in mehreren Phasen: In der Verletzungsphase bildet sich ein Frakturhämatom, das multilineare mesenchymale Vorläuferzellen enthält (Oe et al. 2007). In der folgenden Entzündungs- und Granulationsphase findet die Angiogenese und Differenzierung von MSCs statt, die durch sezernierte Cytokine und Wachstumsfaktoren gesteuert wird (Mark et al. 2004). Es entsteht ein zellreiches fibrocartilaginäres Gewebe aus Bindegewebe und Faserknorpel, woraufhin dann die Osteogenese beginnt. Das Granulationsgewebe wird in einigen Wochen bis Monaten durch mineralisierten Geflechtknochen in der Phase der Kallushärtung ersetzt. Durch funktionelle Anpassung wird der Geflechtknochen in Lamellenknochen umgebaut und der überschüssige Kallus abgebaut. In dieser

Remodellierungsphase wird die ursprüngliche Knochenstruktur in 1-2 Jahren wiederhergestellt (Niethard et al. 2017; Grifka und Kuster 2011).

Viele Faktoren im Prozess der Frakturheilung durch desmale und chondrale Ossifikation einschließlich Signalisierung, Rekrutierung und Differenzierung von MSC während der frühen Phase, Kallushärtung, Angiogenese und Revaskularisation während der mittleren Phase, und Remodellierung in der späten Phase, sind in osteoporotischem Knochen beeinträchtigt und resultieren in einer verzögerten Frakturheilung und veränderten Gewebezusammensetzung (Cheung et al. 2016).

Re-Frakturen sowie übermäßige Morbidität und Mortalität sind daher gefürchtete Folgen osteoporotischer Frakturen (Leslie und Morin 2014). Bei proximalen Femurfrakturen liegt die Komplikationsrate nach Osteosynthesen im osteoporotischen Knochen deutlich höher als bei gesunden Patienten. Es kommt öfter zum Implantatversagen und Sekundärfrakturen oder Dislokationen treten hier signifikant häufiger auf (Goldhahn et al. 2008a). Untersuchungen zeigen, dass die Biegesteifigkeit an der Frakturheilungszone am distalen Femur signifikant geringer ist als in der gesunden Kontrollgruppe mit gleicher Fraktur. Es wurde zudem weniger mineralisiertes und mehr unmineralisiertes Gewebe im Kallusgebiet des osteoporotischen Knochens gefunden (Thormann et al. 2014). Hinzu kommt eine Verringerung der osteoinduktiven Kapazität aufgrund des Verlusts von bioaktiven Faktoren, knochenmorphogenetischen Proteinen und MSC, die Alterung und Osteoporose begleiten (Fini et al. 2004). Durch die verzögerte Frakturheilung ist die Genesung langsam (McCann et al. 2008; Nikolaou et al. 2009) und die Rehabilitation oft unvollständig, sodass viele Patienten dauerhaft in Pflegeheimen stationiert sind (Kanis et al. 2013b).

1.1.4 Calciumphosphatphasen und Calcium / Phosphor-Verhältnis

Der Hauptbestandteil des Knochens ist neben Kollagen, welches durch Aneinanderlagern von Proteinketten als Faserbündel vorliegt, das Knochenmineral, insbesondere ein calciumdefizienter nichtstöchiometrischer HA, der oft als „biologischer Apatit“ bezeichnet wird. Nach Gewicht besteht der Knochen aus ungefähr 50-60% Mineral, 30-40% Kollagen und 10% Wasser (Dorozhkin und Epple 2002). Bei biologischen Calcifikationen treten Calciumorthophosphate in verschiedenen Formen auf. Diese Verbindungen fallen jedoch nicht direkt aus, es sind immer Zwischenphasen beteiligt, sodass die Entstehung über mehrere Stufen mit verschiedenen Calciumphosphatphasen verläuft. Biologisch relevante Vorstufen von HA im Knochen sind amorphes Calciumphosphat (ACP) sowie

Octacalciumphosphat (OCP) (Campi et al. 2012). Ein Parameter, der zur Charakterisierung der Knochenmineralisierung herangezogen werden kann, ist das molare Calcium / Phosphor-Verhältnis (Ca / P-Verhältnis), das sich bei den verschiedenen Calciumphosphatphasen unterscheidet. Es zeigt das Stadium des Mineralisierungsprozesses an, wodurch die Beurteilung der Knochenqualität und deren Veränderung im systemisch erkrankten Knochen ermöglicht werden und Informationen über den Einfluss von Knochenersatzmaterialien auf die Frakturheilung gegeben werden könnten.

Der erste Feststoff, der während der Fällung von Calciumphosphaten in wässriger Lösung gebildet wird, ist ein instabiles nicht kristallines oder amorphes Calciumphosphat (ACP: $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$), das durch autokatalytische Mechanismen weiterreagiert (Termine und Posner 1966). Das Molverhältnis von Calcium zu Phosphor liegt für die angegebene stöchiometrische Formel bei 1,5, kann jedoch zwischen 1,2 und 2,2 je nach chemischer Zusammensetzung schwanken, die stark von den Fällungsbedingungen wie pH oder Ionenkonzentrationen abhängt (Brown und Chow 1976). Danach wandelt sich dieser Feststoff in Kontakt mit der Fällungslösung zuerst in eine OCP-artige kristalline Phase um, die anschließend zu Apatit hydrolysiert (Eanes und Meyer 1977). OCP ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) mit dem molaren Ca / P-Verhältnis von 1,33 ist strukturell ähnlich dem HA und ebenfalls eine metastabile Zwischenstufe der Knochenkristallbildung (Eidelman und Eanes 2001). Diese Primärkristalle sind in ihren allgemeinen Strukturmerkmalen zwar apatitähnlich, jedoch in Zusammensetzung und strukturellen Details deutlich von HA abweichend, was sich durch niedrigere Ca / P-Molverhältnisse bemerkbar macht. Sie sind außerdem instabiler und verändern sich bei gleichzeitiger Abnahme der Löslichkeit mit der Zeit zu biologischem HA, was einem Reifungsverhalten entspricht (Eanes und Meyer 1977).

Reines stöchiometrisches HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) mit einem Ca / P-Verhältnis von 1,67 ist unter biologischen Verhältnissen die stabilste Phase. Die Kristallstruktur des reifen Knochens entspricht der des HAs, trotzdem finden sich große Unterschiede des molaren Ca / P-Verhältnisses in verschiedenen Knochenpräparaten, die zwischen 1,3 und 2 schwanken, obwohl sich das Röntgenspektrum des Apatits zeigt. Erklärungen hierfür sind unterschiedliche Zusammensetzungen der Hydrationshülle, Defekte, und Substitutionen von Natrium (Na^+), Magnesium (Mg^{2+}), Carbonat (CO_3^{2-}), Fluorid (F^-) und Chlorid (Cl^-) im Austausch gegen Calcium (Ca^{2+}) und Phosphat (PO_4^{3-}) im Kristallgitter, sowie an dessen Oberfläche, was zu einem nichtstöchiometrischen Aufbau in biologischen Systemen führt (Weicker et al. 1967). Die Kristallstruktur des stöchiometrischen HAs bleibt dabei erhalten. Diese Veränderungen des reinen HAs liegen im unteren Prozentbereich,

sodass die biologischen Apatite des Knochens trotzdem noch als HA bezeichnet werden (Weicker et al. 1967; Epple 2003).

Das Vorhandensein von ACP und OCP konnten auch in vivo nachgewiesen werden (Crane et al. 2006; Mahamid et al. 2011). Beispielsweise wurde herausgefunden, dass die Menge an amorphem Material im Rattenfemur im Alter von acht Tagen 60,5% betrug und auf 36,0% im Alter von 38 Tagen zurückging (Termine und Posner 1966).

Im osteoporotischen Knochen finden sich divergierende Ergebnisse der Ca / P-Verhältnisse in der Literatur, teilweise werden diese als höher (Zoehrer et al. 2012), teilweise als niedriger (Kourkoumelis et al. 2012) oder unverändert (Baslé et al. 1990) beschrieben.

Calciumphosphatzemente (CPC) basierend auf α -Tricalciumphosphat (α -TCP, α -Ca₃(PO₄)₂ mit dem Ca / P-Verhältnis von 1,5), die als Knochenersatzmaterial verwendet werden, härten unter Bildung eines calciumdefizienten HA aus (Yubao et al. 1997).

Name	Abkürzung	Formel	Ca / P - Verhältnis	Stabilität
α -Tricalciumphosphat	α -TCP	α -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	metastabil
Hydroxylapatit	HA	Ca ₁₀ O(PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	stabil
Calciumdefizientes Hydroxylapatit	CDHA	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x}	1,5-1,67	stabil
Amorphes Calciumphosphat	ACP	Ca _{1x} (PO ₄) _y · nH ₂ O	1,2-2,2	metastabil
Octacalciumphosphat	OCP	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ · 5H ₂ O	1,33	metastabil

Tab. 1: Übersicht über verschiedene Calciumphosphate, modifiziert nach Sheikh et al. (2015)

1.1.5 Diagnostik der Osteoporose

Screening und Diagnostik von Osteoporose verwenden eine Messung der Knochenmineraldichte (bone mineral density, BMD). Dabei wird die mineralisierte Knochensubstanz im Verhältnis zu einem definierten Knochenvolumen bzw. als Mineralgehalt pro Flächeneinheit bestimmt. Die am weitesten verbreitete Technik dieser Messung ist die Dual-energy-X-ray-absorptiometry (DXA). Als Messergebnis wird ein T-Score angegeben, der als Standardabweichung von der mittleren BMD einer normalverteilten, gesunden erwachsenen Referenzpopulation definiert ist. 1 bis 2,5 Standardabweichungen unter dem Durchschnitt wird als Osteopenie bezeichnet, bei 2,5 oder mehr Standardabweichungen unter dem Durchschnitt wird von Osteoporose gesprochen (World Health Organization 1994, 2004). Neben subklinischen Verläufen treten im Falle einer fortgeschrittenen, manifesten Osteoporose zusätzlich eine oder mehrere Fragilitätsfrakturen auf. Diese werden nach der World Health Organization (WHO) als Frakturen aufgrund eines inadäquaten Traumas definiert, welches bei normaler Knochensubstanz nicht zu knöchernen Verletzungen führt (World Health Organization 1994, 2004).

1.1.6 Therapie der Osteoporose

Zur Primär- und Sekundärprävention der Osteoporose werden vor allem die kombinierte Calcium- und Vitamin D-Supplementierung, Eigengewichtsbelastungen und muskelstärkende Übungen um Kraft, Beweglichkeit und Balance zu verbessern, eingesetzt, wodurch die Knochenstärke erhöht und das Sturzrisiko vermindert wird (Cosman et al. 2014).

Bei manifester Osteoporose mit Frakturen gelten Bisphosphonate als Erstlinientherapie. Sie reichern sich im Knochen an und hemmen dort die Osteoklastenaktivität und damit die Knochenresorption (Kling et al. 2014). Weitere Therapiemöglichkeiten sind die Hormonersatztherapie, selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren, Calcitonin oder Antikörper gegen verschiedene Proteine und Enzyme, die entscheidende Rollen beim Knochenumbau spielen (Maeda und Lazaretti-Castro 2014).

Trotz dieser Möglichkeiten treten im Alter häufig osteoporotisch bedingte Frakturen auf, da die Osteoporose durch ihren meist symptomlosen Verlauf oft unbemerkt und damit unbehandelt bleibt.

1.2 M3R-Knock-Out-Mäuse

Acetylcholin (ACh) spielt sowohl als Neurotransmitter im parasympathischen Nervensystem als auch im nicht-neuronalen cholinergen System eine wichtige Rolle durch Bindung an zwei verschiedene Rezeptorklassen: nikotinische (nAChR) und muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR). Es gibt fünf Subtypen der mAChR, die als M1R-M5R bezeichnet werden und in verschiedenen Organsystemen mit vielfältigen Wirkungen vorkommen (Caulfield 1993). Die Signalkaskade bei M1R, M3R und M5R verläuft über ein Gq-Protein (= Guanosin triphosphat-bindendes regulatorisches Protein, das an Phospholipase C gekoppelt ist), durch dessen Aktivierung die *second messenger* Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin gebildet werden und dadurch zur Aktivierung der phosphorylierenden Proteinkinase C und intrazellulären Calciumfreisetzung führen (Haga 2013).

M3R finden sich in Nervenzellen des zentralen Nervensystems, sowie in der Peripherie, wo sie zum Beispiel an glatten Muskelzellen der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts und des Urogenitaltrakts die Kontraktion vermitteln (Eglen 2006). In nicht-neuronalen Zellen agiert ACh als parakrines und autokrines Signalmolekül, das grundlegende Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und den Aufbau und Erhalt von Zell-Zell-Kontakten steuert (Wessler und Kirkpatrick 2008).

Charakteristika der Mäuse, bei denen dieser M3-Rezeptor gentechnisch ausgeschaltet wurde (M3R-Knock-Out, kurz M3R-KO) sind daher durch Verringerung des parasympathischen und dadurch erhöhten sympathischen Einfluss auf Organsysteme, in denen M3R eine führende Rolle spielen, erklärbar. Festgestellt werden konnten deutlich geringere Kalorienaufnahmen, ein um 25% geringeres Körpergewicht und ein gesteigerter Stoffwechsel (Gautam et al. 2006), sowie geringere Speichelproduktion, verminderte Pupillenkontraktionen und gedehnte Harnblasen (Matsui et al. 2000).

Wie andere physiologische Funktionssysteme des Körpers wird auch der Knochenumbau unter anderem neuronal reguliert. Das sympathische Nervensystem ist dafür bekannt, den Zuwachs an Knochenmasse zu hemmen. Auf der anderen Seite konnte durch verschiedene gentechnisch veränderte Mausstämmen, bei denen jeweils einer der Muskarinrezeptoren fehlte, gezeigt werden, dass das parasympathische Nervensystem durch den M3 Rezeptor einen positiven Regulator der Knochenmasse darstellt, also die Knochenbildung erhöht und die Knochenresorption verringert. Dieser Effekt ist auf eine indirekte Regulierung, die nicht direkt an Osteoblasten stattfindet, zurückzuführen, indem der negative Einfluss des Sympathikus auf die Knochenmasse gedämpft wird (Shi et al. 2010).

ACh und seine Rezeptoren spielen jedoch auch eine wichtige non-neuronale Rolle im Knochen: In nicht-neuronalen ACh-sezernierenden Zellen entsteht dadurch das nicht-neuronale cholinerge System (NNCS). So ist zum Beispiel die Signalkaskade über mAChR am Knochenumsatz beteiligt (Beckmann und Lips 2013). Eine Expression von M3R konnte in osteoblasten-ähnlichen Zellen *in vitro* (En-Nosse et al. 2009), sowie im Femur von Mäusen und Ratten und menschlichen Rippen (Liu et al. 2011) festgestellt werden. Desweiteren scheint das NNCS bei verschiedenen Erkrankungen wie Osteoporose dysreguliert zu sein, und umgekehrt zeigte sich in Knochen von Ratten mit induzierter Osteoporose eine Herunterregulierung der M3R Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) im Vergleich zu Kontrollratten (Kauschke et al. 2014). Durch Ausschaltung der Expression von Rezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der non-neuronalen Regulierung der Knochenremodellierung spielen, kann also der Knochenstatus bei Versuchstieren beeinflusst werden.

M3R-KO-Mäuse weisen einen Knochenverlust auf, der dem der Osteoporose ähnlich ist. Es wurde eine signifikante Abnahme des relativen Knochenvolumens, der Trabekeldicke und Trabekelzahl, sowie der Knochenoberflächendichte gemessen. Biomechanische Untersuchungen und Kollagen-Typ-1-Expressionsanalysen ergaben eine signifikant reduzierte Biegesteifigkeit ebenso wie eine Herunterregulierung der mRNA Expression von Kollagen Typ 1 bei M3R-KO im Vergleich zum Wildtyp (WT) (Kliemann et al. 2012). Auch bei 16 Wochen alten weiblichen M3R-KO-Mäusen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden: Diese Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion der Knochendichte, die zu einer reduzierten biomechanischen Belastbarkeit führt: Ein Z-score von -2,99, der per Definition eine Osteoporose bestätigt, wurde gemessen (Lips et al. 2015). Außerdem zeigten Knochenzellen ein verändertes Aussehen mit Zunahme an Cytoplasma und rauem endoplasmatischem Retikulum in Osteoblasten, verringertem perizellulärem Raum bei Osteocyten, und auch die enzymatische Knochenresorption der Osteoklasten war hochreguliert (Lips et al. 2015). Shi et al. (2010) konnten histologisch eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten und reduzierte Anzahl an Osteoblasten feststellen.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass das cholinerge System bei Osteoporose verändert ist, und umgekehrt durch eine genetische Veränderung dieses Systems, insbesondere durch Ausschalten der Expression von M3-Rezeptoren, ein osteoporotischer Phänotyp, ähnlich der menschlichen postmenopausalen Osteoporose, hervorgerufen werden kann, sodass sich M3R-KO-Mäuse als Osteoporosemodelle mit entsprechenden Knocheneigenschaften eignen.

In tierexperimentellen Studien werden zur Osteoporoseinduktion meist Ovariectomien durchgeführt mit anschließender Calcium-Phosphat-Vitamin-D-Mangeldiät oder Gabe von Glucocorticoiden. Die Knochendichte konnte dadurch nachweislich bis zum osteoporotischen Status gesenkt werden (Heiss et al. 2012). Im Gegensatz dazu haben genetisch veränderte osteoporotische Mausmodelle den Vorteil, dass keine zusätzlichen Operationen wie Ovariectomien und keine speziellen Mangeldiäten oder Medikamentengaben notwendig sind, durch die die Tiere zusätzlich belastet werden. Aufgrund der Möglichkeit, Gene, die an Osteoporose beteiligt sind, zu identifizieren, sowie der einfacheren Handhabung und niedrigeren Kosten, wurden in den letzten Jahren immer mehr genetisch veränderte Mäuse als Osteoporosemodelle eingesetzt (Klein 2008).

1.3 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien werden zur Restabilisierung nach Frakturen, Tumorentfernungen oder anderen Knochensubstanzverlusten zur Defektfüllung, oder zur Verankerung von Implantaten benötigt.

Durch die schlechtere Implantatstabilität bei verminderter Knochendichte und -regenerationsfähigkeit, und die gestörten Frakturheilungsmechanismen bei Osteoporose, ist es notwendig neue Knochenimplantate und Biomaterialien zu entwickeln (Goldhahn et al. 2008b). Eines der Hauptprobleme bei der Behandlung osteoporotischer Frakturen, besteht darin, eine stabile Fixierung zu erreichen und Substanzdefekte aufzufüllen. Denn trotz perfekter Reposition und optimaler Positionierung, sind die Versagensraten von Implantaten, insbesondere bei der Behandlung von instabilen osteoporotischen Trochanterfrakturen, höher als bei gesundem Knochen (Barrios et al. 1993).

Neben metallischen Implantaten aus Titan oder Stahl sind deshalb Materialien nötig, die die Primärstabilität entweder durch Auffüllen von Knochendefekten oder Verankern der Implantate durch Verbesserung der Implantat-Knochen-Grenzfläche sichern. Eine wichtige Eigenschaft dieser Materialien muss daher die mechanische Stabilität sein. Dazu gehört neben der Widerstandsfähigkeit gegen einwirkende Kräfte auch die knöcherne Integration des Ersatzmaterials. Diese wird durch eine hohe Biokompatibilität, die als Verträglichkeit im Körper eines Lebewesens definiert ist, positiv beeinflusst.

Viele verschiedene Knochenersatzmaterialien werden seit einiger Zeit verwendet, vor allem Calciumphosphatimplantate oder -zemente, Polymethylmethacrylate (PMMA) und

Knochen transplantate, sowie Modifizierungen dieser, zum Beispiel pharmazeutisch (Moroni et al. 2006). Autogene und allogene Knochen transplantate sind osteogene Materialien, das heißt sie enthalten alle zellulären Elemente, Wachstumsfaktoren und Gerüste, die zur Bildung von neuem Knochen erforderlich sind (Fillingham und Jacobs 2016). Aufgrund dieser biologischen Eigenschaften, wozu auch die komplette Gewebekompatibilität gehört, werden gerne autogene Transplantate genutzt. Das autologe Beckenkammtransplantat gilt bei knöchernen Defekten daher als Goldstandard (Long et al. 2007). Bei Osteoporose ist die autologe Knochen transplantation, vor allem die Spongiosaplastik wegen ihrer schlechten mechanischen Eigenschaften, begrenzten Verfügbarkeit und Morbidität der Patienten meist nicht geeignet (Giannoudis et al. 2005). Aus diesen Gründen wurden alternative Lösungen notwendig, die zur Entwicklung von Knochenersatzstoffen führten. PMMA und CPC sind pastös injizierbar und daher gut in irreguläre Frakturspalte zu applizieren. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass bioresorbierbare CPCs vor allem zur Vermeidung von Sinterungen bei instabilen Tibiakopffrakturen deutlich besser geeignet sind als autogene Transplantate (Russell und Leighton 2008). Bei den häufigsten durch Osteoporose induzierten Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper wird standardmäßig meist PMMA zum Aufrichten des eingebrochenen Knochens eingesetzt (Webb und Spencer 2007). Nachteile davon sind jedoch, dass dieses Material im Gegensatz zu CPC in vivo mit der Zeit nicht umgebaut und durch Knochen ersetzt wird, sowie die Cytotoxizität kontinuierlich freigesetzter Monomere und die exotherme Reaktion beim Aushärten in physiologischer Umgebung, weshalb hier ein Risiko für Nekrosen oder Beeinträchtigungen der Frakturheilung durch hohe Temperaturen besteht (Lindner et al. 2009; Dahl et al. 1994). Neben Defektfüllungen können PMMA und CPC außerdem zur stabilen Verankerung von Osteosynthesematerialien im gesunden und osteoporotischen Knochen genutzt werden, so konnte bei beiden eine Verbesserung der Implantatstabilität von Hüftschrauben bei instabilen intertrochantären Frakturen gezeigt werden, sodass eine frühe Mobilisierung und gute Heilung ermöglicht wird (Moore et al. 1997).

Auch andere Materialien wie natürliche und synthetische Hydrogele oder Kollagen-Verbindstoffe wurden und werden in den unterschiedlichsten Variationen untersucht, wobei alle Ersatzstoffe Vor- und Nachteile aufweisen (Serre et al. 1993; Short et al. 2015).

Ein Knochenersatzmaterial sollte neben seinen mechanischen und biokompatiblen Eigenschaften idealerweise osteokonduktiv und osteoinduktiv sein (Giannoudis et al. 2005). Die Osteokonduktivität kann durch CPCs erreicht werden, das heißt es bildet sich neuer Knochen entlang des Materials, welches als Gerüst dient, osteoinduktive Eigenschaften fehlen jedoch (Sterling und Guelcher 2014). Mit Osteoinduktivität ist der

Prozess gemeint, in MSC die Differenzierung zu knochenbildenden Zellen auszulösen, sodass die Knochenneubildung gefördert wird. Verschiedene biologische, chemische und medikamentöse Zusatzstoffe werden auf diese Eigenschaft hin untersucht, wobei unter anderem CPC als Abgabesysteme für solche Stoffe eine Rolle spielen, da sie einsetzbar sind, ohne sie zu denaturieren (Ginebra et al. 2012). Durch das Zusetzen von beispielsweise Wachstumsfaktoren zu dem Knochenersatzmaterial wird also versucht, diese wünschenswerte Eigenschaft der Osteoinduktivität zusätzlich zu erhalten, um neben der Knochenstabilisierung auch eine Verbesserung der Knochenarchitektur und eine schnellere Frakturheilung zu erzielen. Diese Methode kann außerdem helfen, Nachteile einer oralen oder intravenösen Verabreichung, wie systemische Nebenwirkungen oder begrenzte lokale Konzentrationen, zu überwinden. Jedoch kann die biologische Aktivität der Wirkstoffe beeinträchtigt werden.

Anti-resorptive bzw. anti-osteoporotische und stimulierende Wirkstoffe wie zum Beispiel Bisphosphonate, Strontium (Sr) oder Wachstumsfaktoren wurden mit oder ohne zusätzliche Trägerstoffe in CPC integriert. Bone morphogenic protein 2 (BMP-2) und BMP-7 verbesserten die Proliferation und osteogene Differenzierung von MSC bei Osteoporose (Pountos et al. 2010). Der Zusatz des Wachstumsfaktors transforming growth factor β 1 (TGF β 1) zu einem CPC mit Gelatine-Mikropartikeln führte zu einer signifikanten Verbesserung der Knochenumbauprozesse (Link et al. 2008), und eingebettet in CPC, stimuliert TGF β 1 die Differenzierung von Osteoblastenvorläufern in vitro (Blom et al. 2000). Mit Bisphosphonaten wie Alendronat oder Pamidronat funktionalisierten CPCs konnte die Osteoblastenproliferation und -differenzierung ebenfalls begünstigt werden, während die Osteoklastenfunktion und -genese in vitro gehemmt wurde (Panzavolta et al. 2009). Die Implantation von Bisphosphonat-beladenen Biomaterialien in proximale Oberschenkelknochen osteoporotischer Schafe führte zu einer signifikanten Zunahme des relativen Knochenanteils und einer Verbesserung der Mikroarchitektur (Verron et al. 2010). Eine Strontiummodifikation von CPC führte zu einer erhöhten Festigkeit des abgebundenen Zements. Durch Freisetzung relevanter Dosen von Sr²⁺-Ionen konnte die Proliferation und osteogene Differenzierung von Osteoprogenitorzellen verstärkt, die Knochenbildung stimuliert und gleichzeitig die osteoklastäre Knochenresorption begrenzt werden (Lode et al. 2017; Schumacher et al. 2013). Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Knochenbildung, vor allem an der Implantatgrenzfläche, verglichen mit purem CPC in der Defektzone bei osteoporotischen Ratten (Thormann et al. 2013).

Apatitzement, der dem biologischen HA des Knochens sehr ähnlich ist (Morgan et al. 1997), wird durch aktive Resorption aufgelöst und Schritt für Schritt durch neuen Knochen ersetzt, das heißt Zellen wie Makrophagen oder Osteoklasten resorbieren aktiv das

Knochenersatzmaterial, wodurch die Auflösung sehr langsam verläuft und der knöcherner Umbau lange dauert. Durch Porenbildung können umgebende physiologische Flüssigkeiten eindringen, sodass die Freisetzung zugesetzter Arzneimittel hauptsächlich durch Diffusion stattfindet (Ginebra et al. 2012). Trotz unzureichender Porosität der CPCs, um ein sofortiges Einwachsen des Knochens und damit eine schnelle Integration in das Knochengewebe zu ermöglichen, geschieht die Freisetzung der Wirkstoffe in den meisten Fällen schnell und erreicht innerhalb weniger Tage über 95%, da keine spezifische Bindung an die Zementmatrix vorliegt (Schumacher et al. 2017).

Die unter physiologischen Bedingungen sehr geringe Löslichkeit von HA und die daher schlechte Resorbierbarkeit von apatitbildenden Knochenzementen in vivo lassen sich durch bioaktives Glas verbessern (Mouriño und Boccaccini 2010). Bioaktive Gläser bestehen aus einem offenen Silikatnetzwerk, welches Wassermoleküle leicht eindringen lässt und zur Auflösung und Freisetzung von Ionen führt (Brauer 2015). Außer SiO_2 sind weitere Bestandteile des ersten Bioglasses, das 1969 entdeckt wurde, CaO , Na_2O und P_2O_5 (Jones 2015). Mittlerweile gibt es sehr viele verschiedene Möglichkeiten der Zusammensetzung und Herstellung von bioaktivem Glas, um Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften zu erhalten, die jeweils für bestimmte klinische Anwendungen geeignet sind (Bellucci et al. 2016). Silberionen wirken beispielsweise antibakteriell und können leicht in bioaktives Glas integriert werden (Bellantone et al. 2000). Glas wird als bioaktiv bezeichnet, wenn es biologische Aktivität induziert, was bedeutet, dass Kontakt mit Körperflüssigkeiten zu einer Oberflächenreaktion des Glases führt, wodurch sich eine HA-ähnliche Schicht bildet und eine chemische Bindung mit angrenzendem Knochengewebe eingegangen wird (Rahaman et al. 2011). Freigesetzte Ionen der Glasoberfläche sollen außerdem stimulierende Eigenschaften auf die Knochenneubildung haben (Hench und Jones 2015). Bioglas wird daher hauptsächlich bei Knochendefekten benutzt, hier vor allem in der Gesichtschirurgie und Zahnheilkunde. Dabei wird das bioaktive Glas, meist mit einer natürlichen Polymermatrix kombiniert, als Bioglas-beladene Kollagenschwämme oder -netze, als Partikel in bioresorbierbarem Kitt, oder als poröses Gerüst verwendet. Es findet aber auch andere Anwendungen, beispielsweise in Zahnpasta oder Kosmetika, borathaltige Biogläser werden außerdem zur Heilung chronischer Wunden eingesetzt (Jones et al. 2016).

Durch Beimengen von mesoporösem bioaktivem Glas (MBG) in Partikelform kann eine signifikante Zunahme der Porosität in wässriger Lösung und damit ein höherer Abbau des Komposits mit verbesserter knöcherner Integration erwartet werden. In-vivo-Studien deuten darauf hin, dass der Abbau der besser löslichen MBG-Phase dazu beiträgt, die Knochenbildung zu erhöhen und die Integration des Knochenzements in das

Knochengewebe zu fördern (Renno et al. 2013). Die mechanischen Eigenschaften des CPC-MBG-Komposits wurden durch die starke Grenzfläche zwischen Zementmatrix und MBG-Partikeln bis zu einer Zugabe von zehn Gewichtsprozent (wt%) MBG nicht beeinträchtigt (Schumacher et al. 2017).

Mesoporöse Systeme sind bei Anwendungen zur Wirkstoffabgabe von großem Interesse, da der Wirkstoff innerhalb des mesoporösen Netzwerks gelagert werden kann. Daher kann eine mesoporöse Form von bioaktivem Glas ebenfalls als Trägermaterial mit therapeutischen Wirkstoffen beladen werden (Vallet-Regí et al. 2012). Am Beispiel von biologisch aktiven Proteinen und Wachstumsfaktoren, die auf der Oberfläche des MBGs über Adsorption und chemische Bindungen fest anhaften, konnte eine hohe Beladungskapazität und eine langfristige kontrollierte Freisetzung gezeigt werden, was durch die große, mit vielen Porenkanälen durchsetzte Oberfläche des MBG erklärbar ist. Es wurde auch gezeigt, dass die biologische Aktivität der adsorbierten Wirkstoffe während der Bindung an und Freisetzung aus dem Komposit beibehalten wird (Zhang et al. 2013; Wu et al. 2013).

MBG verzögert die Freisetzung durch verstärkte Adsorption und beschleunigt die knöchernen Integrität durch erhöhte Porosität, weshalb der CPC-MBG-Verbundstoff ein potenzielles Träger- und Abgabesystem für Wachstumsfaktoren oder andere bioaktive Substanzen darstellt und vorteilhaft im Vergleich zur Beladung von purem Zement ist.

1.4 Brain-derived neurotrophic factor

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ist ein Protein bestehend aus 119 Aminosäuren und gehört zu den Neurotrophinen. Zu dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren zählen außerdem der Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF) und die Neurotrophine 3 bis 5 (NT 3-5). Alle haben als Signalstoffe regulatorische Einflüsse auf Neuronen. Sie kontrollieren deren Entwicklung, Plastizität, Funktion und Überleben im zentralen und peripheren Nervensystem (Skaper 2012). Neurotrophine können an zwei verschiedene Arten von Transmembranproteinen binden: selektiv an einen der drei Hochaffinitäts-Tyrosinkinase-Rezeptoren (*Tropomyosin-receptor-related-kinase*, kurz TrkA / TrkB / TrkC), während alle Neurotrophine mit einer geringeren Affinität an den p75-Neurotrophinrezeptor binden, der zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gehört und über den die Apoptose gefördert werden kann (Chao 2003).

Die Effekte von BDNF werden durch Bindung an TrkB und folgende Phosphorylierungen, die weitere verschiedene Signalkaskaden auslösen, erreicht. Eine wichtige Rolle spielt BDNF bei der adulten Neurogenese und synaptischen Plastizität: es stimuliert die Nervenentwicklung beim Erwachsenen mehr als andere Wachstumsfaktoren, und Synapsen werden durch Regulation der neuronalen Aktivität beeinflusst (Lu et al. 2014). Daher ist BDNF zum Beispiel ein wichtiger Faktor bei der Bildung und Aufrechterhaltung des Langzeitgedächtnisses (Bekinschtein et al. 2008). Weiterhin fördern Neurotrophine die neuronale Erholung nach Rückenmarksverletzungen (Arvanian 2013). Veränderte Expressionen von BDNF sind mit psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, bipolarer Störung oder Depression assoziiert (Reinhart et al. 2015).

Neben der Wirkung auf Nervenzellen zeigt BDNF ebenfalls Einflüsse auf andere Zelltypen. Mehrere Neurotrophine einschließlich BDNF werden auch in nicht-neuronalen Organsystemen wie den vaskulären glatten Muskelzellen, Immunzellen oder bei der Entwicklung von inneren Organen exprimiert. Auch Endothelzellen synthetisieren und sezernieren BDNF (Nakahashi et al. 2000). Es konnten proangiogene Wirkungen festgestellt werden, die durch lokale Aktivierung des TrkB-Rezeptors auf einer Subpopulation von Endothelzellen und zusätzlich durch Rekrutierung von Knochenmarkszellen zur Neoangiogenese beitragen (Kermani und Hempstead 2007). Die direkte proangiogene Wirkung auf Endothelzellen konnte auch in der frühen postnatalen Phase bestätigt werden, in der BDNF für die Aufrechterhaltung der Gefäßstabilität im Herzen sorgt (Donovan et al. 2000). BDNF stimuliert die Endothelzellmigration über seinen hochaffinen TrkB-Rezeptor, was die Gefäßbildung anregt und dadurch helfen kann, die Geweberegeneration zu verstärken (Matsuda et al. 2012). Auch über die Stimulation der Expression und Sekretion von *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) aus Osteoblasten, die hauptsächlich die Angiogenese während der Frakturheilung steuern, trägt BDNF hierzu bei (Zhang et al. 2017).

Bei osteoblastären Zelllinien konnte ebenfalls eine Expression von BDNF festgestellt werden (Nakanishi et al. 1994). In Maus- und Rattenfrakturmodellen war die Expression von BDNF-mRNA in knochenbildenden Zellen gesteigert (Asaumi et al. 2000; Aiga et al. 2006). Analog dazu sind BDNF und dessen Rezeptor TrkB während des Knochenbildungsprozesses in menschlichem Frakturspaltgewebe in Osteoblasten und Endothelzellen ebenfalls hochreguliert (Kilian et al. 2014). Osteoblasten, die mit Neurotrophin-synthetisierenden Schwann-Zellen co-kultiviert werden, zeigen einen signifikanten Anstieg der Proliferation und es bildet sich eine erhöhte Anzahl an Verkalkungszonen (Cai et al. 2010). Die Genexpression von Knochenstoffwechselmarkern in Zementoblasten, welche, ähnlich der Osteoblasten im Knochen, matrixbildende Zellen der Zähne sind,

wird in vitro durch Zugabe von BDNF gesteigert (Kajiya et al. 2008). Auch in einem mandibulären Osteotomie-Modell der Ratte konnte eine Stimulation der Knochenbildung und -reifung durch Injektion von BDNF in den Osteotomiespalt festgestellt werden (Ida-Yonemochi et al. 2017).

BDNF ist an der Angiogenese und osteogenen Prozessen beteiligt. Vor allem die Verbesserung der parodontalen Geweberegeneration konnte mehrfach festgestellt werden (Takeda et al. 2005).

In vitro konnte durch Funktionalisierung von CPC mit BDNF eine Steigerung der Proliferation von MSC erreicht werden (Kauschke et al. 2018a). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass BDNF in vivo zu gesteigerter Gefäßbildung, sowie verstärkter Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und damit vermehrter Bildung mineralisierten Gewebes während der Frakturheilung beiträgt. Diese Effekte sollen durch Funktionalisierung von CPC-MBG mit BDNF im osteoporotischen Mausfrakturmodell untersucht werden.

1.5 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie

Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (*Time-of-flight secondary ion mass spectrometry*, ToF-SIMS) ist eine Methode zur Oberflächenanalyse, die vor allem in den Materialwissenschaften zur Charakterisierung von anorganischen Festkörpern genutzt wird. In den letzten Jahren wurde aber auch zunehmend die Anwendung zur Untersuchung biologischer Proben getestet und etabliert (Fletcher und Vickerman 2010).

Das Funktionsprinzip ist, dass in einer sogenannten Primärionenquelle ein hochenergetischer Strahl aus geladenen Teilchen erzeugt wird, der auf die zu analysierende Probe geschossen wird. Die Energie der Primärionen, die typischerweise 25 keV beträgt, wird beim Auftreffen auf die Probenoberfläche auf diese übertragen, wodurch eine Stoßkaskade mit Molekülfragmentation ausgelöst wird. Als Resultat kommt es unter anderem zu einer Emission von Sekundärionen, die aus den obersten Atomschichten stammen und deren Menge proportional zur entsprechenden Oberflächenkonzentration ist. Diese Sekundärionen aus bis zu 10 nm Probentiefe werden im Hochvakuum durch ein elektrisches Feld beschleunigt und dann im Flugzeitanalysator nach ihrer jeweiligen Flugzeit gemäß Massen-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und im Detektor orts aufgelöst detektiert (Vickerman und Briggs 2013). Dadurch entstehen Massenspektren mit Signalen der

detektierten Sekundärionen und durch Abrastern von definierten Oberflächenarealen (*stage scans*) in verschiedenen Betriebsmodi wie *bunched* oder *burst alignment* bis zu 100 nm lateral aufgelöste Massenbilder, die die Verteilung der Sekundärionen zeigen (Sodhi 2004). Dazu wird jedem Messpunkt (Pixel) gemäß Anzahl an detektierten Sekundärionen ein Farbwert zugeordnet, sodass semiquantitative Aussagen gemacht werden können. Mithilfe der chemischen Information ist es daher möglich, die Probenzusammensetzung und -morphologie bildlich darzustellen, ähnlich der histologischen Bilder, ohne eine Färbung zu benötigen (Henss et al. 2013). Als Primärionen können Ionen oder Ionencluster von verschiedenen chemischen Elementen benutzt werden. Für biologische Gewebeproben, bei denen auch die Verteilung größerer organischer Moleküle von Interesse ist, zeigten sich Clusterionen wie zum Beispiel Bi_3^+ am geeignetsten, da dadurch die Fragmentation vermindert wird und so mehr größere Fragmente, das heißt Sekundärionen höherer Massen, entstehen können (Malmberg et al. 2007).

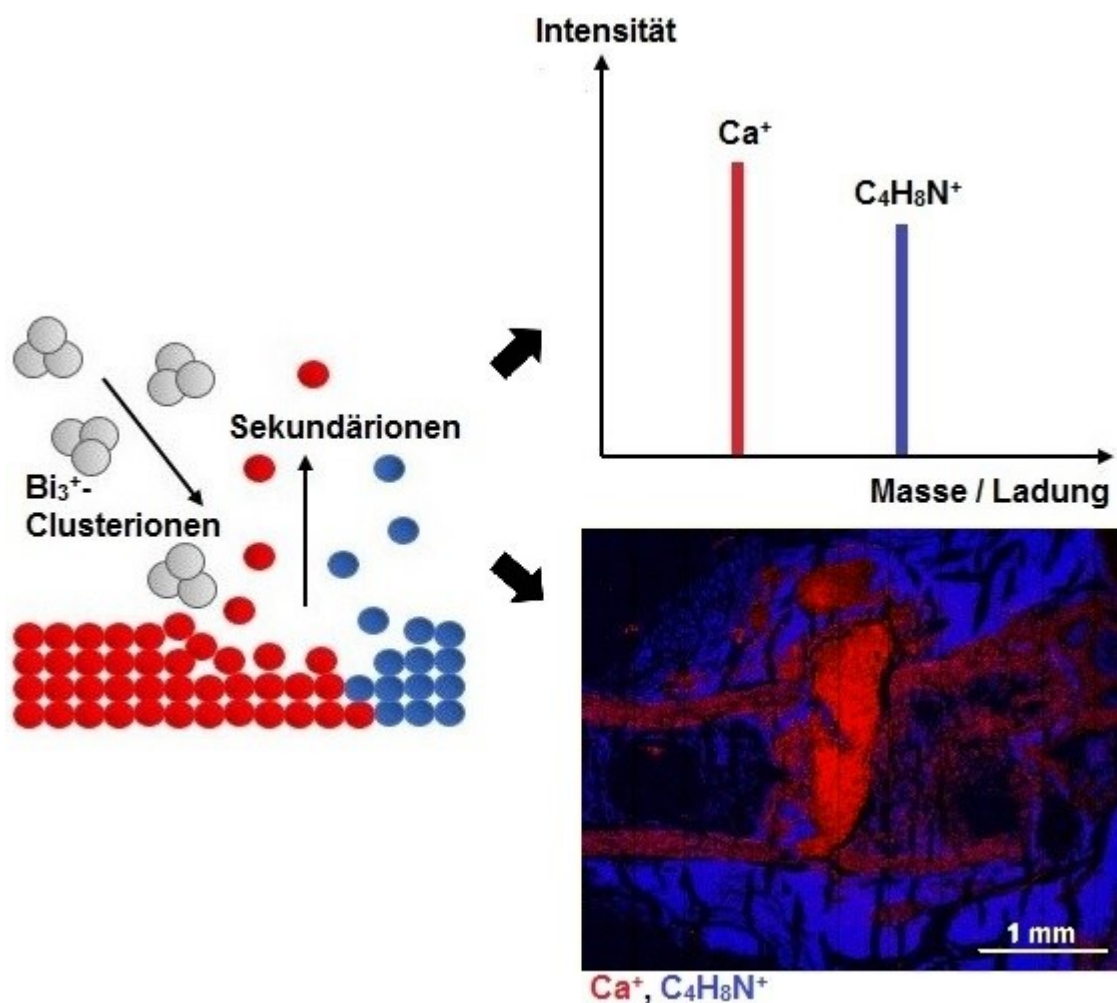


Abb. 1: Funktionsprinzip der ToF-SIMS-Analyse

Durch Beschuss mit beispielsweise Bi_3^+ -Clusterionen werden Sekundärionen der analysierten Oberfläche herausgelöst, welche dann hinsichtlich ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses analysiert, und als Intensitätsspektren oder bildgebend gemäß chemischer Verteilung des *stage scans*, wiedergegeben werden.

Bereits in anderen Studien wurde diese Methode benutzt, um Knochengewebe zu charakterisieren (Henss et al. 2013; Malmberg et al. 2007; Malmberg und Nygren 2008; Palmquist et al. 2012). Die Knochenmineralisation bei Frakturheilungen und Knochenimplantaten kann durch Ionenverteilungen von Ca^+ , CaO^+ , CaOH^+ oder auch größeren Fragmenten des HAs wie zum Beispiel $\text{Ca}_5\text{P}_3\text{O}_{12}^+$ analysiert werden (Malmberg und Nygren 2008). Auch zur Überprüfung der Knochenzusammensetzung im osteoporotischen Tiermodell wurde die ToF-SIMS-Analyse schon eingesetzt und konnte die degenerative Knochenveränderung detailliert darstellen (Henss et al. 2013). Neben der Knochenmineralisation kann auch das Bindegewebe anhand von Sekundärionen dargestellt werden. Die Fragmente CH_4N^+ , $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}^+$ und $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ sind Bruchstücke der Aminosäure Prolin, welche eine der Hauptkomponenten von Kollagen Typ 1 ist, das im Knochen und Faserknorpel größtenteils vorkommt (Sanni et al. 2002). Verschiedenste Ionen als spezifische Fragmente von anderen Gewebe- oder Zellbestandteilen sowie Medikamenten können mit einer hohen Sensitivität und räumlichen Auflösung detektiert werden und so zur Probencharakterisierung beitragen (Nygren und Malmberg 2007).

In Abgrenzung zu anderen häufig verwendeten Untersuchungsmethoden von Gewebeproben wie der histologischen Färbung mit lichtmikroskopischer Auswertung, bei der hauptsächlich Zell- und Gewebearten differenziert werden, können durch massenspektrometrische Bildgebung verschiedene Molekülverteilungen der zu analysierenden Oberfläche dargestellt, und diese dadurch genauer charakterisiert werden.

1.6 Fragestellung

Osteoporose als häufige Alterserkrankung hat Fragilitätsfrakturen zur Folge, die oft mit Knochenersatzmaterialien versorgt werden müssen, die an die schwierigeren Knochenheilungsverhältnisse angepasst sein sollten. Durch diese anspruchsvolle Behandlung der osteoporotischen Frakturen, ist die Entwicklung neuer, besserer Implantatmaterialien in der Zeit einer alternden Bevölkerung erforderlich.

Das Ziel des Projekts war, die Wirkung von mit BDNF modifiziertem MBG-haltigem CPC als Knochenersatzmaterial im metaphysären Frakturspalt an osteoporotischen M3R-KO-Mäusen zu untersuchen. Neben osteokonduktiven Eigenschaften wurden Osteoinduktivität durch Anregen der Proliferation und Differenzierung von MSC zu Osteoblasten und Stimulierung der Angiogenese erhofft, die die im osteoporotischen Knochen gestörte Frakturheilung verbessern könnten.

In dieser Arbeit sollen vor allem durch ToF-SIMS-Analysen deskriptive Aussagen zur Charakterisierung des CPC-MBG-Komposits (mit oder ohne BDNF), insbesondere der MBG-Partikel, und der Knochenneubildung an der Grenzfläche zum Implantatmaterial getroffen werden. Zur Beurteilung des Knochenersatzmaterials soll vor allem die Detektion der (mit BDNF beladenen) mesoporösen Glaspartikel und eine Beurteilung deren Auflösung (und damit indirekt von BDNF in den entsprechenden Gruppen) mit dieser Methode gelingen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Siliciumverteilung in räumlichem Bezug zum Restgewebe, aber auch die Resorption des gesamten Verbundstoffs und die knöcherne Integration soll beurteilt werden. Dabei ist die Calciumverteilung zum Nachweis von neugebildetem Knochengewebe an der Grenzfläche, und zur Unterscheidung zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe von Bedeutung. Zur vergleichenden Bewertung der Frakturheilung sollen histologische Färbungen und rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen dienen. Hier stellt sich die Frage nach der Gewebebeschaffenheit an der Knochen-Zement-Grenze. Mithilfe der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (Energy-dispersive X-ray, EDX) soll zusätzlich eine Quantifizierung von Calcium und Phosphor versucht, sowie das Ca / P-Verhältnis gemessen werden, um zu beantworten, ob unterschiedliche Zusammensetzungen der Calciumphosphate zwischen den Gruppen vorliegen. Auch die Osteocyten sollen lichtmikroskopisch nach Anzahl, Verteilung und Morphologie bewertet werden und mit hochauflösenden ToF-SIMS-Scans verglichen werden.

Allgemein sind Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen (WT und M3R-KO, mit oder ohne BDNF) von Interesse.

Durch Charakterisierung des Knochenersatzmaterials mit indirekter Lokalisierung der BDNF-Freisetzung in räumlichem Bezug zu biologischem Gewebe mit Identifizierung von mineralisierten und unmineralisierten Knochenneubildungszonen wird erwartet, dass einerseits positive Effekte des eingesetzten Komposits auf die Frakturheilung sichtbar gemacht werden können, und andererseits durch kritische Auseinandersetzung mit dem CPC-MBG-BDNF-Verbundstoff dieser weiter angepasst werden kann, um die Frakturheilung bei systemischen Knochenerkrankungen wie Osteoporose verbessern zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Ausgewachsene 16 Wochen alte weibliche WT- (Zuchtstamm: C57BL/6N_{Tac}) und osteoporotische M3R-KO- (Zuchtstamm: B6.129S6-CF1-Chrm3^{tm1Jwe}) Mäuse wurden als Versuchstiere genutzt (Tierversuch V 54 -19 c 20 15 h 01 GI 20/15 Nr. 75/2014).

Osteoporotisch, CPC-MBG ohne BDNF (M3R-KO)	Osteoporotisch, CPC-MBG mit BDNF (M3R-KO + BDNF)
Wildtyp, CPC-MBG ohne BDNF (WT)	Wildtyp, CPC-MBG mit BDNF (WT + BDNF)

Das Tiermodell wurde durch die Mitarbeiter/innen der Experimentellen Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen beantragt und durchgeführt. Die Proben von jeweils fünf Tieren pro Gruppe wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Durch ein Randomisierungsverfahren wurden die Tiere zufällig in die Gruppen mit oder ohne BDNF eingeteilt. Unter Inhalationsnarkose wurde nach Enthaarung und Desinfektion des Operationsgebiets die Haut und Fascia lata des distalen rechten Femurs durchtrennt. Dort wurde im metaphysären Bereich ein 1,2 mm breiter Spalt durch komplettes Durchsägen erzeugt. Der genutzte Knochenzement wurde mit 4% Natriumhydrogenphosphatpuffer zu einer Paste angerührt, mit einer Spritze in den Frakturspalt eingebracht und bündig verspachtelt. Zur stabilen Überbrückung des Frakturspalt es wurde ein Platten-Schraubensystem (metaphysealMouseFix, RISystem AG, Davos, Schweiz) verwendet und die Wunde sorgfältig verschlossen. 35 Tage nach der Operation wurden die Tiere mit CO₂-Inhalationsnarkose euthanasiert.

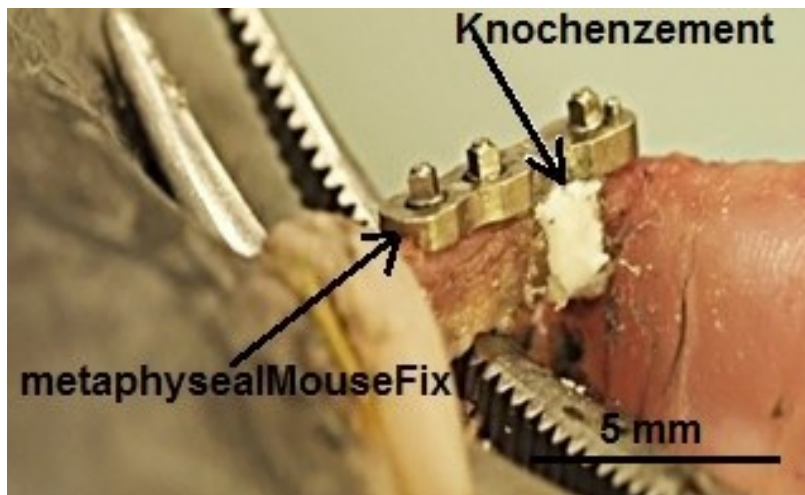


Abb. 2: Mausfrakturmodell intraoperativ, modifiziert nach Kauschke et al. (2018b)
 Rechtes Mausfemur mit pastösem CPC-MBG-(BDNF-)Knochenzement im distalen metaphysären Frakturspalt und metaphysealMouseFix zur stabilen Platten-Schrauben-Osteosynthese.

2.2 Knochenzement

Die Materialherstellung des Knochenzements geschah durch die Arbeitsgruppe um Dr. Matthias Schumacher der Technischen Universität Dresden.

Es wurde eine HA-formende Knochenzementpaste basierend auf α -TCP verwendet (InnoTERE GmbH, Radebeul, Deutschland), die von Driessens et al. (1997) genauer beschrieben wurde. Abgesehen davon besteht die Paste aus 14 wt% biokompatiblen Öl (Heinemann et al. 2013).

2 wt% mesoporöses bioaktives $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ Glas mit einem molaren Verhältnis von $\text{Si / Ca / P} = 80 / 15 / 5$ wurde direkt vor Applikation der Zementpaste beigemischt.

Die Herstellung des MBGs wurde wie von Zhu et al. (2008) beschrieben, durchgeführt. Es entstanden Glaspartikel zwischen 100 und 250 μm , die bei der Hälfte der WT- und KO-Mäuse vor Beimischung zur Zementpaste mit BDNF, durch Eintauchen in BDNF-Lösung und anschließendes Gefriertrocknen, funktionalisiert wurden (84,1 ng BDNF pro g MBG). Es wurde humanes BDNF, welches rekombinant hergestellt wurde (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), eingesetzt. Die Aminosäuresequenz von maturem murinem BDNF ist zu 100% identisch mit der humanen Aminosäuresequenz.

2.3 Probenvorbereitung

Bei den euthanasierten Tieren wurde das operierte Femur entfernt, freipräpariert und in 4% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben sechsmal mit 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7,2-7,4) gespült. Danach folgte die Technovit 9100 NEU Einbettung (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland). Die Technovit Blöcke wurden mithilfe von Kawamoto's Folie (Section-Lab Co. Ltd., Japan) zur Intakthaltung der Biomaterialien, mit einem Rotationsmikrotom in 5 µm dicke Scheibchen geschnitten und auf Objektträger aufgeklebt. Diese Arbeitsschritte wurden freundlicherweise von den Labormitarbeitern/innen der Experimentellen Unfallchirurgie Gießen durchgeführt.

Die auf Folie aufgeklebten Knochenschnitte mussten vor ToF-SIMS- und EDX-Messungen sowie histologischen Färbungen oberflächlich von der Einbettmasse befreit werden, da diese die Oberfläche des Gewebes bedeckt. Dieses Entplasten geschah durch zweimal 20-minütiges Eintauchen der Schnitte in 2-Methoxyethylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) und anschließend für jeweils 5 Minuten in eine absteigende Alkoholreihe mit 100%, 96%, 80%, 70% Ethanol (Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland) und Spülen mit destilliertem Wasser (Aqua dest.). Danach wurden die Folien mit Knochenschnitten glatt auf den Objektträgern aufliegend befestigt. Dieselben Schnitte, die im ToF-SIMS untersucht wurden, wurden anschließend gefärbt (PAS) und unter dem Lichtmikroskop analysiert. Für die REM / EDX-Messungen wurden jeweils Nachbarschnitte verwendet. Für Silber- und Toluidinblaufärbungen wurden ebenfalls Nachbarschnitte verwendet.

2.4 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie

Die Messungen wurden mit dem Gerät ToF-SIMS 5-100 (IONTOF, Münster, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Folien mit den entplasteten Knochenschnitten glatt auf Objektträger aufgeklebt und in die Vakuumkammer eingebracht. Als Primärionen wurden Bi_3^+ -Clusterionen benutzt, die mit einer Energie von 25 kV auf die Proben geschossen wurden. Der Ladungsausgleich wurde durch eine niederenergetische Elektronenkanone (*floodgun*) erreicht.

Die Übersichtsaufnahmen wurden durch Abrastern der Oberfläche des gesamten Knochenschnitts im *high-current bunched* Modus (*hc-bu*) aufgenommen. Diese *stage scans*

setzten sich aus einigen *patches* mit einer Größe von 0,4 x 0,4 mm zusammen, welche jeweils 10mal mit 2 Schüssen / Pixel gescannt wurden. Zur besseren Kontrastierung der Massenspektrometerbilder wurde die gesamte Knochenschnittfläche 12mal gescannt. Die Pixeldichte betrug 120 Pixel / mm, sodass eine laterale Auflösung von ca. 10 µm in diesem Modus erreicht werden konnte. Primärionenströme zwischen 0,28 und 0,42 pA wurden gemessen.

Die Detailaufnahmen an der Zementgrenzfläche wurden im *low-current bunched* Modus (*lc-bu*) mit einer Auflösung von ca. 2 µm aufgenommen. Die gemessenen Areale waren 0,8 x 0,8 mm groß und setzten sich aus 4 *patches* zusammen. Es wurde 100mal pro *patch* mit 2 Schüssen / Pixel gescannt. Auch hier wurden mehrere Scans durchgeführt. Die Pixeldichte betrug 1000 Pixel / mm. Der Primärionenstrom wurde mit 0,16 - 0,29 pA gemessen.

Die Osteocytenbilder wurden im *burst alignment* Modus (*bi-ba-i*) erstellt, in dem eine hohe Ortsauflösung von 300 nm möglich ist. Zum Vergleich mit den lichtmikroskopischen Osteocytenbildern wurden Nachbarschnitte der versilberten Schnitte benutzt, da die Proben bei der Silberfärbung entkalkt werden mussten und daher dieselben Schnitte zur Messung der Calciumverteilung mittels ToF-SIMS nicht brauchbar waren. Zur besseren Vergleichbarkeit und Auffindbarkeit der Osteocyten im ToF-SIMS wurden zusätzlich von einem Teil der Proben Knochenschnitte mit Toluidinblau gefärbt, welche danach massenspektrometrisch untersucht werden konnten. Es wurden Areale verschiedener Größen von 20 x 20 µm bis 150 x 150 µm mit dementsprechenden Messpunkten zwischen 256 x 256 bis 1024 x 1024 Pixeln mit 1 Schuss / Pixel gemessen. Der Primärionenstrom betrug 0,14 - 0,15 pA.

Es wurde für alle Messungen eine *cycle time* von 60 µs eingestellt, sodass Sekundärionen im Massenbereich bis 411 u detektiert werden konnten.

Die Datenauswertung erfolgte mit der Surface Lab 6 Software (IONTOF, Münster, Deutschland).

2.5 Rasterelektronenmikroskopie und Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Knochenschnitte wurden zur Vermeidung von Aufladungseffekten vor Einbringen in die Vakuumkammer des Elektronenmikroskops mit dem Gerät Edward Scancoat Six mit Kohlenstoff bedampft.

Für die Messungen wurde das hochauflösende Rasterelektronenmikroskop „Merlin“ (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer bestmöglichen Auflösung von 0,8 nm benutzt. Mit einem Schottky-Feldemitter wurde ein Elektronenstrahl erzeugt, die Elektronen wurden dann durch die angelegte Hochspannung beschleunigt und erzeugten beim Auftreffen auf die Probe Wechselwirkungen mit den Atomen der Gewebeoberfläche. Zur bildgebenden Erfassung der daraufhin ausgestrahlten Sekundärelektronen wurde der Everhart-Thornley-Detektor (SE2) verwendet. Die genutzte Software war SmartSEM (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Bei der EDX-Analyse werden durch den Elektronenstrahl Elektronen aus inneren Schalen der Atome der Probenoberfläche herausgeschlagen. Energiereichere Elektronen der äußeren Schalen gehen auf die entstandenen Lücken über, wobei charakteristische Röntgenstrahlung für das jeweilige Element und den Übergang entsteht. Diese wird durch den Detektor erfasst, sodass ein Spektrum mit elementspezifischen Peaks erzeugt wird, bei dem die Signalintensität in Abhängigkeit von der Energie der Röntgenstrahlung aufgetragen ist. Dadurch können die Elementzusammensetzungen der Knochenschnitte erfasst werden und Elementverteilungsbilder (= *Mappings*) erstellt werden.

Für die EDX-*Mappings* wurde der x-max-50mm²-Detektor (Oxford Instruments, Abingdon, UK) genutzt. Es wurden verschiedene Vergrößerungen mit einem Arbeitsabstand von ca. 5 mm gewählt und eine Spannung von 10 kV angelegt, der Probenstrom betrug 1000 pA. Als Software wurde INCA und AZtec (Oxford Instruments, Abingdon, UK) verwendet.

Zur Quantifizierung wurde an jeweils zwei Knochenschnitten pro Gruppe an mehreren Stellen innerhalb des Zements, der Corticalis und des neugebildeten mineralisierten Knochens die molare Probenzusammensetzung gemessen und aus diesen Werten Ca / P-Verhältnisse bestimmt. Aus diesen Ergebnissen wurden mittlere Ca / P-Verhältnisse mit Standardabweichung für alten Knochen, neuen Knochen und Zement der jeweiligen Mäusegruppen berechnet.

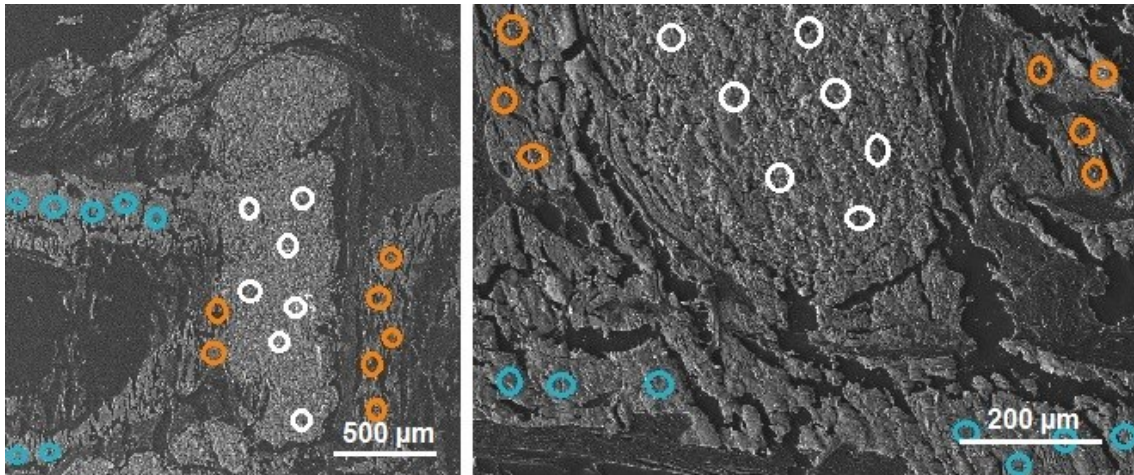


Abb. 3: Quantifizierung mittels EDX

Innerhalb der weißen Kreise wurde jeweils die Zusammensetzung des Knochenzements gemessen, innerhalb der blauen Kreise die des ursprünglichen corticalen Knochens, und innerhalb der orangenen Kreise die des neugebildeten Knochens.

2.6 Histologische Färbungen und Lichtmikroskopie

Die Bilder der histologisch gefärbten Knochenschnitte wurden in verschiedenen Vergrößerungen (10er, 20er und 40er Objektiv) mit einem Axioplan 2 Imaging System (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer Leica DM5500 Kamera (Leica, Bensheim, Deutschland) aufgenommen. Es wurde die Leica IM1000 Software benutzt.

2.6.1 Kombinierte Alcianblau-PAS (= Perjodsäure-Schiff-Reaktion) Färbung

Färbeprotokoll:

Nach Entplasten (siehe 2.3 Probenvorbereitung) wurden die auf Objektträgern aufgeklebten Knochenschnitte für 3 Minuten in 3%-ige Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) gestellt. Es folgte die Färbung mit Alcianblau (Chroma, Münster, Deutschland) für 30 Minuten, danach wurde mit Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in 1%-ige Perjodsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und dann dreimal 2 Minuten lang mit Aqua dest. gespült. Es folgte eine 10-minütige Dunkelinkubation in Schiffschem Reagenz (Merck, Darmstadt, Deutschland). Dann wurde für 15 Minuten mit Leitungswasser gespült, woraufhin Shandon Instant Hämatoxylin (Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland), welches im Verhältnis 1:1 mit Aqua bidest. gemischt wurde, aufgetropft und 3 Minuten einwirken gelassen wurde. Es schloss

sich ein 10-minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser an, danach wurde mit Aqua dest. gespült. Zum Eindecken wurde Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) benutzt und die Objektträger für 24 Stunden trocknen gelassen.

Färbeergebnis:

PAS-positive Substanzen sind Polysaccharide und neutrale Mukosubstanzen und wurden leuchtend rot gefärbt, zum Beispiel Glykogen, neutrale Muzine, Glykolipide, Basalmembranen, Hyalin, Cellulose und Kollagen (insbesondere retikulären Fasern). Dabei nahmen unterschiedliche Substanzen verschiedene Rot-Töne (magenta, pink, hellviolett) an. PAS-negative saure Mukosubstanzen und Zellkerne stellten sich blau dar, PAS-positive saure Mukosubstanzen in den entsprechenden Mischfarben (Mulisch und Welsch 2015).

2.6.2 Silberfärbung

Färbeprotokoll:

Nach Entplasten (siehe 2.3 Probenvorbereitung) wurden die Knochenschnitte zum Entkalken für 3 Tage in eine Lösung aus 3,4% Tris-Base (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 10% Titriplex III (Merck, Darmstadt, Deutschland) gestellt.

Eine Lösung A wurde hergestellt, indem zu 24,75 ml Aqua bidest. 0,5 g Gelatine Low Bloom (Sigma, Steinheim, Deutschland) gegeben und für 30 Minuten auf dem Rollmischgerät gelöst und danach 250 µl Ameisensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) beigemischt wurde. Diese Lösung wurde bis zum vollständigen Auflösen der Gelatine in einen Wärmeschrank bei 37 °C gegeben.

Eine Lösung B aus 20 ml Aqua bidest. und 10 g Silbernitrat (Sigma, Steinheim, Deutschland) wurde hergestellt.

Zur Herstellung von 5%-iger Natriumthiosulfatlösung wurden 0,5 g Natriumthiosulfatpulver (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 9 ml Aqua bidest. mit einem Magnetührer aufgelöst und auf 10 ml aufgefüllt.

Lösung A und B wurden im Verhältnis 1:2 gemischt, auf die Knochenschnitte getropft und 60 Minuten in einer Dunkelkammer einwirken gelassen, danach wurde für 5 Minuten mit Aqua bidest. gespült. Dann wurden die Schnitte mit der 5%-igen Natriumthiosulfatlösung betropft und für 10 Minuten einwirken gelassen, woraufhin sich ein 5-minütiges Spülen mit Aqua bidest. anschloss.

Vor dem Eindecken mit DePex (VWR, Darmstadt, Deutschland) wurden die Proben jeweils für 5 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe geben (70%, 96%, 100% Ethanol, Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland) und danach zweimal für 5 Minuten in Xylol

(Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht. Nach dem Eindecken wurden die Objektträger mit den Knochenschnitten für 24 Stunden trocknen gelassen.

Färbeergebnis:

Es resultierte eine Schwärzung aller mineralisierten (vor allem calciumphosphathaltigen) Gewebeanteile, indem Calcium in den Carbonaten und Phosphaten gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert wurde (Mulisch und Welsch 2015).

2.6.3 Toluidinblau-Färbung

Färbeprotokoll:

Lösung A wurde durch Mischen von 8 g Di-Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 8 g Toluidinblau O (Chroma, Münster, Deutschland) und 800 ml Aqua dest. und 15-minütigem Rühren auf dem Magnetrührer hergestellt.

Lösung B entstand aus 2 g Pyronin G (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 200 ml Aqua dest. und wurde ebenfalls für 15 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt.

Lösung A und B wurden gemischt und weitere 15 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt, danach wurde diese Toluidinblaulösung zweimal filtriert und im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnt.

Nach Entplasten der Knochenschnitte (siehe 2.3 Probenvorbereitung) wurde die Toluidinblau-Lösung auf die Knochenschnitte getropft und 90 Sekunden einwirken gelassen, danach wurde mit Aqua dest. abgespült.

Nach jeweils kurzem Eintauchen in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol, Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland) wurden die Proben zweimal für 5 Minuten in Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Anschließend wurde mit De-Pex (VWR, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt und die Objektträger mit den gefärbten Schnitten für 24 Stunden getrocknet.

Färbeergebnis:

Mineralisierte Hartgewebematrix blieb ungefärbt bis hellblau, Zellen und Weichgewebe wurden unterschiedlich blau angefärbt, Knorpelmatrix zeigte sich violett und verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau (Mulisch und Welsch 2015).

2.7 Osteocyten-Analyse

Die Osteocyten wurden in den versilberten Schnitten unter dem Lichtmikroskop mit dem 40er Objektiv im neugebildeten Knochen an der Grenzfläche zum Knochenzement quantitativ und qualitativ beurteilt. Dazu wurden jeweils im gesamten neugebildeten Knochen entlang des Knochenzements die Osteocyten manuell gezählt. Als Osteocyten wurden alle Zellen in diesem Bereich gewertet, die entsprechend der Versilberung gefärbt waren und zumindest ansatzweise erkennbar die für diese Zellen charakteristischen Zellausläufer besaßen. Zur qualitativen Beurteilung gehörte ein Vergleich der Osteocyten zwischen den Gruppen, um eine grobe Aussage zu den Unterschieden vor allem in Bezug auf Zellform, -größe und Anzahl und Länge der Zellausläufer zu machen.

Diese Auswertungen wurden verblindet vorgenommen, das heißt, ohne zu wissen aus welcher Versuchsgruppe die Probe stammt.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Osteocytenzahlen erfolgte mittels Anova (analysis of variance = Varianzanalyse), Kruskal-Wallis-Test und Zwei-Stichproben-t-Test. Die Normalverteilung als Voraussetzung für diese Tests wurde durch den Kolmogorow-Smirnow-Test überprüft und bestätigt. Anova testet, ob es einen signifikanten Unterschied der abhängigen Variable (Osteocytenzahl) zwischen mehr als zwei Gruppen gibt. Neben der Normalverteilung der Stichprobe ist hier außerdem eine Varianzhomogenität erforderlich, die jedoch nicht vorliegt. In diesem Fall kann der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test angewendet werden, der mehr als zwei unabhängige Stichproben auf signifikante Unterschiede basierend auf Rangplatzsummen der abhängigen Variablen vergleicht. Zusätzlich konnte mit dem t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen zwei unabhängigen normalverteilten Stichproben mit der Annahme unterschiedlicher Varianzen geprüft werden.

Ein Signifikanzniveau von 0,05 wurde festgelegt, sodass ein Wert von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet werden kann. Zur Berechnung wurde die Software Microsoft Excel 2016 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Auswertung der ToF-SIMS-, REM / EDX- und PAS-gefärbten lichtmikroskopischen Aufnahmen

Knochenschnitte von gesunden und osteoporotischen Mäusefemora, jeweils mit MBG-haltigem CPC mit oder ohne BDNF wurden durch ToF-SIMS-, REM / EDX- und PAS-gefärbte lichtmikroskopische Aufnahmen ausgewertet.

Die Calciumverteilung des operierten distalen Femurs konnte durch die mithilfe des ToF-SIMS erzeugten Ca^+ -Sekundärionenbilder dargestellt werden. Durch diese bildliche Darstellung ließ sich genau erkennen, wo sich mineralisierter Knochen und der eingebrachte Knochenzement befindet, da diese Materialien sehr calciumhaltig sind, in Abgrenzung zu kollagenreichem unmineralisiertem Gewebe, das kein Calcium enthält. Die Corticalis war sowohl distal (auf den folgenden Abbildungen immer rechtsseitig) als auch proximal (linksseitig) des eingebrachten Knochenersatzmaterials gut darstellbar, distal konnte zudem auch die Trabekelstruktur des Knochens erkannt werden. Die Stellen, an denen das Osteosynthesematerial in der Corticalis befestigt war, konnten ebenfalls erkannt werden.

Je heller ein Pixel dargestellt ist, desto mehr Calcium konnte dort detektiert werden. Der eingebrachte CPC als rein anorganisches Material zeigte die meisten Ca^+ -Counts, das heißt die Anzahl der gemessenen Ca^+ -Sekundärionen pro Pixel ist dort am größten (gelb dargestellt), und ließ sich daher gut von dem umliegenden Knochen, der daneben zusätzlich organische Anteile besitzt, abgrenzen. Ursprünglicher corticaler und trabekulärer Knochen und neugebildeter Knochen zeigten weniger Ca^+ -Counts pro Pixel und ließen sich in den ToF-SIMS-Bildern anhand der Signalintensität untereinander nicht unterscheiden (jeweils rot dargestellt), sondern nur aufgrund der Lokalisation. Sowohl ursprünglicher als auch neugebildeter Knochen weisen in allen Gruppen eine homogene Calciumverteilung und ungefähr die gleiche Signalintensität von Calcium (*counts per pixel*) auf, sind also gleichmäßig mineralisiert.

In allen Gruppen ist ähnlich wie auf Abb. 4 erkennbar, dass beidseits an der Grenzfläche unmittelbar an den Zement anschließend Knochenneubildung stattfindet und an welchen Stellen die gebildete Knochenmatrix bereits mineralisiert war. Die Knochenneubildung zeigte sich hier kontinuierlich entlang des gesamten Zements.

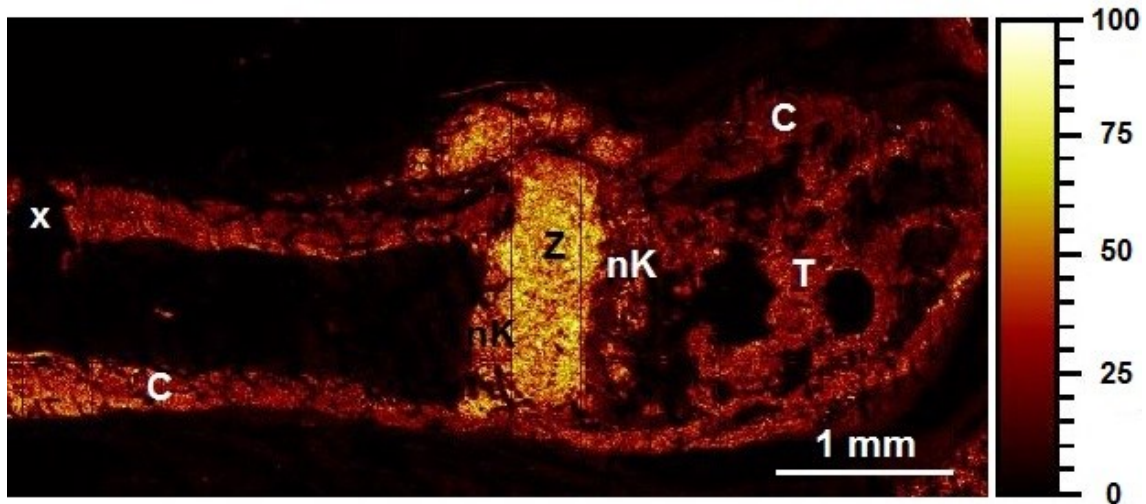


Abb. 4: Beispiel der Calciumverteilung eines Knochenschnitts mit MBG-haltigem CPC

Z: Zement, C: Corticalis, T: Trabekel, nK: neugebildeter mineralisierter Knochen, x: Stelle, an der die Platte verankert war

Je heller die Farbe, desto mehr Calcium ist vorhanden, was durch die Skala neben dem Bild verdeutlicht wird. Diese gibt die Anzahl der detektierten Sekundärionen pro Pixel an.

Anhand des Kollagenfragmentsignals $C_4H_8N^+$ konnten außerdem Knorpel und Granulationsgewebe als erste Schritte der Frakturheilung in räumlichem Bezug zum Zement und abgrenzend zu mineralisierter Knochensubstanz, bei denen jeweils zusätzlich ein Calciumsignal nachweisbar ist, dargestellt werden. Insgesamt zeigt sich bei allen untersuchten Proben eine Frakturheilung mit Knochenneubildung entlang des Zements mit stellenweise mineralisiertem Knochen. Teilweise konnte Osteoid oder Knorpelgewebe lichtmikroskopisch nachgewiesen werden.

Das in den Zement eingebrachte MBG konnte durch die ToF-SIMS- und EDX-Mappings anhand des Siliciumsignals wiedergefunden werden. Zudem konnte durch die Siliciumionenverteilung abgegrenzt werden, wie viele MBG-Partikel sich im Implantatmaterial eines Knochenschnitts befanden und an welchen Stellen die dem Zement beigemischten siliciumhaltigen Partikel lokalisiert sind bzw. ob diese sich aufgelöst haben, was unter dem Lichtmikroskop, wenn überhaupt, nur schwer erkennbar ist. Durch Beimischen von nur 2 wt% MBG konnten nur wenige oder sogar keine dieser Partikel in den Knochenschnitten angeschnitten werden. Es waren bis zu sechs MBG-Partikel (mit oder ohne BDNF) im Zement pro Schnittebene angeschnitten, meist jedoch nur ein bis zwei, in sechs Proben kein einziges. Randständige aufgelöste Partikel fanden sich in nur fünf der 20 Knochenschnitte (zwei in WT ohne BDNF, zwei in WT mit BDNF, eins in KO mit BDNF). Nur randständige MBG-Partikel konnten aufgelöst werden, sodass sich Poren im Zement gebildet haben. Die Implantat-Gewebe-Grenzfläche wurde dadurch vergrößert und solche Poren mit neugebildetem Gewebe gefüllt, wodurch der Zement besser

in den Knochen integriert werden konnte. Deutliche Zementpalte wurden in nur zwei Knochenschnitten gefunden (WT ohne BDNF und KO mit BDNF). Es zeigte sich dort sowohl bei der WT-Maus als auch bei der M3R-KO-Maus eine deutliche Gewebeneubildung mit hauptsächlich Kollagenfragmentsignalen ohne Ca^+ -Ablagerung, was daher dem Osteoid entsprechen könnte, und kleinere Partien mineralisierter Knochenmatrix im ToF-SIMS.

Es fand sich kein BDNF-spezifisches Fragmentensignal, das als Marker für die Verteilung des BDNFs genutzt werden könnte, da BDNF ein großes organisches Molekül aus 119 Aminosäuren ist und es somit kein spezifisches Fragment gibt.

Aus den Verteilungsbildern der Sekundärionen Ca^+ , $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ und Si^+ der ToF-SIMS-Übersichts- und Detailaufnahmen wurden Überlagerungsbilder (*Overlays*) erstellt, sodass die Beziehungen der verschiedenen Gewebe zueinander sichtbar wurden. Calciumreiche und damit Ca^+ -signalintensive Strukturen wie Knochen und Zement wurden auf den folgenden Abbildungen rot dargestellt. Je intensiver das Rot, desto mehr Calcium konnte detektiert werden, sodass eine Unterscheidung zwischen Zement, der intensiver rot, und Knochen, der schwächer rot dargestellt ist, weiterhin möglich ist. Kollagenreiches Gewebe wie Osteoid, Knorpel oder Granulationsgewebe zeigten eine hohe Signalintensität des Kollagenfragments $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ und erscheint in den *Overlays* blau. Silicium ist Hauptbestandteil des MBGs, weshalb Si^+ -Sekundärionenansammlungen, welche in grün abgebildet sind, als Marker dafür genutzt wurden.

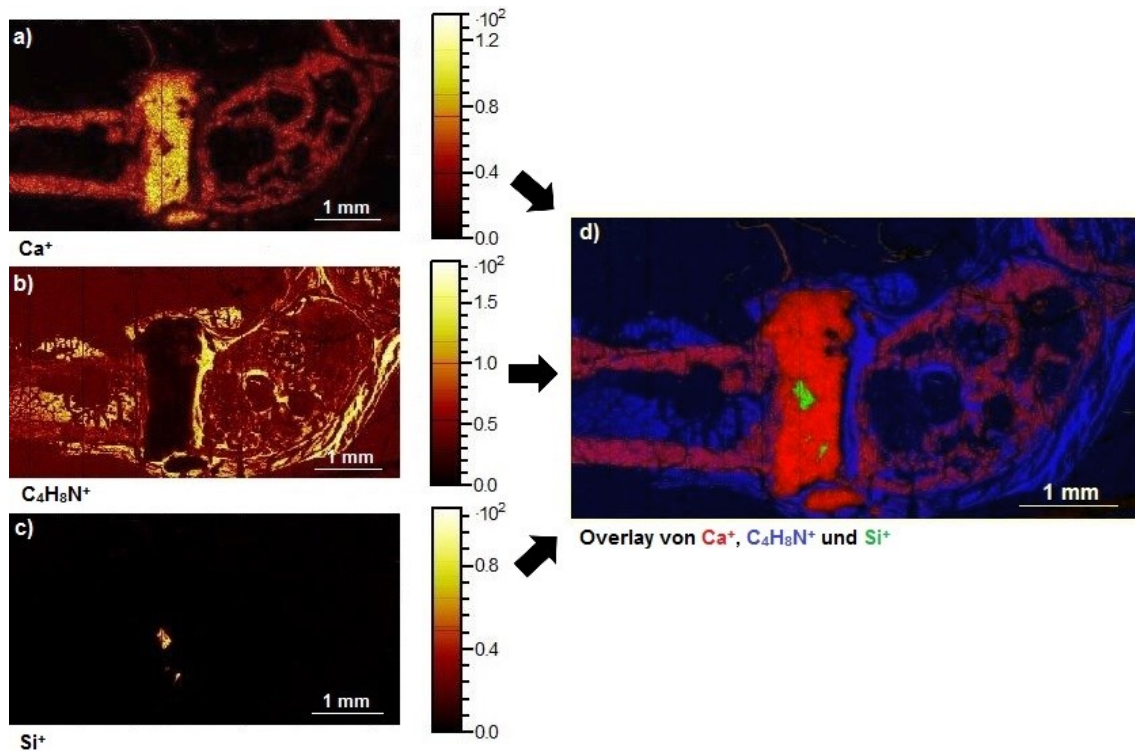


Abb. 5: ToF-SIMS-Aufnahmen eines Knochenschnitts einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF

a) Calciumverteilung, b) Verteilung des Kollagenfragmentsignals $C_4H_8N^+$, c) Siliciumverteilung
 Die Skala zeigt die *Counts* des jeweils gemessenen Sekundärions, das heißt je heller eine Stelle im Bild angezeigt wird, desto größer ist die Anzahl der detektierten Sekundärionen pro Pixel.
 d) *Overlay* aus a), b) und c): Ca^+ rot, $C_4H_8N^+$ blau und Si^+ grün dargestellt, je intensiver die Farbe, desto mehr *Counts* des entsprechenden Sekundärions konnten detektiert werden.

Ähnlich der Sekundärionenverteilungen des ToF-SIMS sind EDX-*Mappings* von Calcium und Silicium, die die Verteilungen dieser Elemente in rot und grün zeigen, dargestellt. Zum Vergleich und zu weiteren Gewebecharakterisierung sind elektronenmikroskopische und PAS-gefärbte lichtmikroskopische Aufnahmen abgebildet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der ToF-SIMS-, REM / EDX- und lichtmikroskopischen Auswertungen an ausgewählten Beispielen aus den Kontroll- und Versuchsgruppen (WT und M3R-KO, jeweils mit MBG-haltigem CPC mit oder ohne BDNF).

3.1.1 Wildtyp-Gruppe mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF

Auf Abbildung 6 stellte sich auf der ToF-SIMS-Übersichtsaufnahme an und um den mit Implantatmaterial ausgefüllten Frakturspalt vermehrt Granulationsgewebe als Zeichen der Kallusbildung dar. Die Knochenneubildung zeigte sich entlang des Zements, calciumreiche und damit mineralisierte Knochenmatrix ließ sich schollenartig in der unmineralisierten kollagenreichen Knochenmatrix abbilden. Silicium ist in der Übersichtsaufnahme nicht zu finden, hier wurde also kein MBG-Partikel angeschnitten.

In der Detailaufnahme ist der etwa 0,5 mm große Spalt im Zement vergrößert. An dieser Stelle hat sich ein randständiger Glaspartikel aufgelöst und wurde fast vollständig resorbiert. Im umliegenden Gewebe konnten nur noch punktuell Siliciumionen detektiert werden, welche als Überbleibsel des Glaspartikels zu identifizieren sind. Die Lücke wurde durch kollagenreiches Gewebe aufgefüllt, Mineralisierungszonen fanden sich weiter außerhalb.

Die lichtmikroskopische Aufnahme dieser Stelle bestätigte die unmineralisierte Knochenmatrix als teils bindegewebige Struktur im Zementspalt, die als Zeichen der Frakturheilung dem weichen Kallus und dem kollagenreichen Osteoid entspricht, und teils knorpelige Struktur weiter außen, die bei der Frakturheilung ebenfalls als Knochenvorstufe gebildet wurde. In diesem Bereich konnte außerdem ein bereits mineralisierter Teil der Knochenneubildungszone erkannt werden. Die knöcherne Integration des Zements wurde hier durch die Verzahnung des neugebildeten Knochens mit dem durch beginnende Resorption aufgerauten Zementrand deutlich.

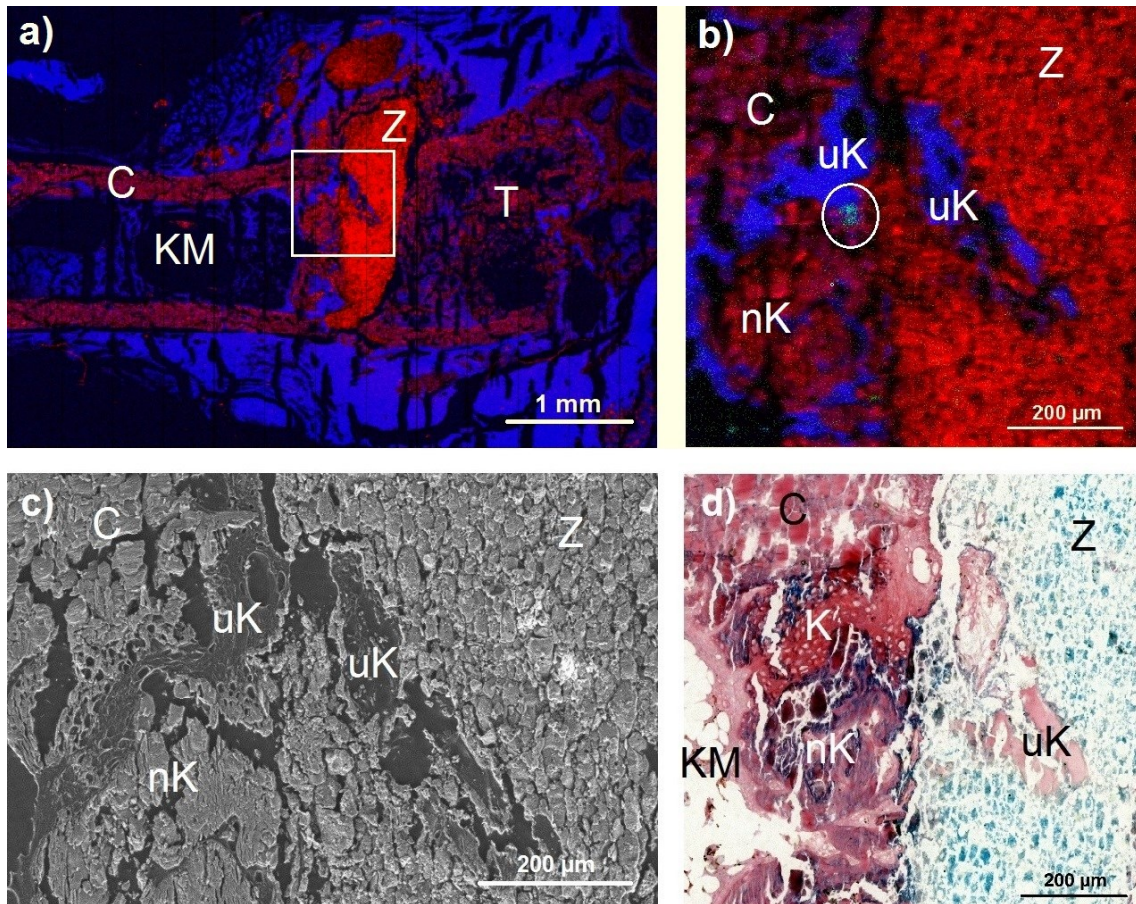


Abb. 6: Knochenschnitt einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, uK: unmineralisierte Knochenmatrix, K: Knorpel, KM: Knochenmark, C: Corticalis, T: Trabekel

a) ToF-SIMS-Übersicht, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot, Si^+ grün, b) ToF-SIMS-Detaillaufnahme aus a), Si^+ -Ansammlung eingekreist; c) REM-Bild der in a) markierten Stelle; d) PAS-gefärbtes lichtmikroskopisches Bild der in a) markierten Stelle.

3.1.2 Wildtyp-Gruppe mit MBG-haltigem CPC mit BDNF

In folgenden zwei Beispielen können die Partikel des MBGs im Zement gut erkannt werden. Bei den ToF-SIMS-*Overlays* wurden die Stellen, an denen Siliciumionen detektiert wurden, grün markiert. Diese siliciumhaltigen Partikel haben eine Größe von ca. 100-200 µm je nach Anschnitt. Das entspricht der Größe der MBG-Partikel, die der Zementpaste vor Einbringen in den Frakturspalt beigemischt wurden. Nur einer der hier jeweils angeschnittenen Glaspartikel lag so randständig im Zement, dass er Kontakt zum umliegenden Gewebe hatte und so aufgelöst werden konnte. Das EDX-*Mapping* bestätigt die Lage der Glaspartikel. Da für diese Auswertung ein benachbarter Schnitt benutzt wurde, stimmen die Anschnitte der Glaspartikel nicht komplett mit denen aus den ToF-SIMS-Auswertungen überein. Die beginnende Auflösung randständiger MBG-Partikel ist an dem geringeren Siliciumsignal im Vergleich zu den anderen Partikeln innerhalb des Zements erkennbar (Abb. 7). Auf den ToF-SIMS- und lichtmikroskopischen Detailaufnahmen wird zudem gut der Kontakt eines Partikels mit dem umliegenden Gewebe sichtbar und es ist erkennbar, dass sich ein Teil des Partikels bereits aufgelöst hat und dort eine Pore entstanden ist, in die etwas Granulationsgewebe eingewachsen ist. Poren, die sich am Rand des Zements gebildet haben, haben eine Größe von je ca. 100-200 µm (Abb. 8). Vor allem auf dem lichtmikroskopischen Bild ist nachweisbar, dass an dieser Stelle Granulationsgewebe anfängt in die entstandenen Poren einzuwachsen. In den Poren selbst ist erst sehr wenig Granulationsgewebe zu erkennen. Da aber eine Verbindung zu dem umliegenden Gewebe besteht, konnten sich dort zwei Glaspartikel auflösen. An diesen Stellen ist in der ToF-SIMS-Aufnahme kein Siliciumsignal mehr auffindbar, und auch im Gewebe dieses Knochenschnitts konnte kein Restsilicium mehr detektiert werden, was darauf hindeuten kann, dass das MBG mit BDNF hier vom Gewebe resorbiert und abgebaut wurde.

Weiterhin ist nachweisbar, dass sich in dieser Gruppe auch beidseits des Zements entlang der Grenzfläche Knochen neugebildet hat. Vor allem distal ist in beiden Beispielen jeweils unmineralisiertes Gewebe, das sich dem Zement anschließt, erkennbar. In dieser ca. 100 µm dicken Übergangszone befinden sich lichtmikroskopisch sichtbare Zellen, die unter anderen den Fibroblasten, Chondrocyten, Osteoblasten oder MSC entsprechen könnten, die die sekundäre Frakturheilung mit fibrocartilaginärem Gewebe, beginnender Angiogenese, und Osteogenese mit Osteoidbildung charakterisieren, woran sich dann eine Zone mit bereits mineralisiertem neugebildetem Knochen anschließt. Die ToF-SIMS-Detailaufnahme bestätigt eindeutig diese Gewebsverteilung: dem Zement schließt sich an der Grenzfläche eine Schicht an, die Kollagensignal zeigt, jedoch kein Calcium, also noch nicht mineralisiert ist. Daran anschließend findet sich die Schicht mit bereits

mineralisiertem neugebildetem Knochen, was sich anhand des Calciumsignals feststellen lässt. In beiden Beispielen zeigt sich eine ausgeprägte Knochenneubildung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT) ohne BDNF könnte diese auf die teilweise randständige aufgelösten MBG-Partikel und das dadurch freigesetzte BDNF zurückzuführen sein.

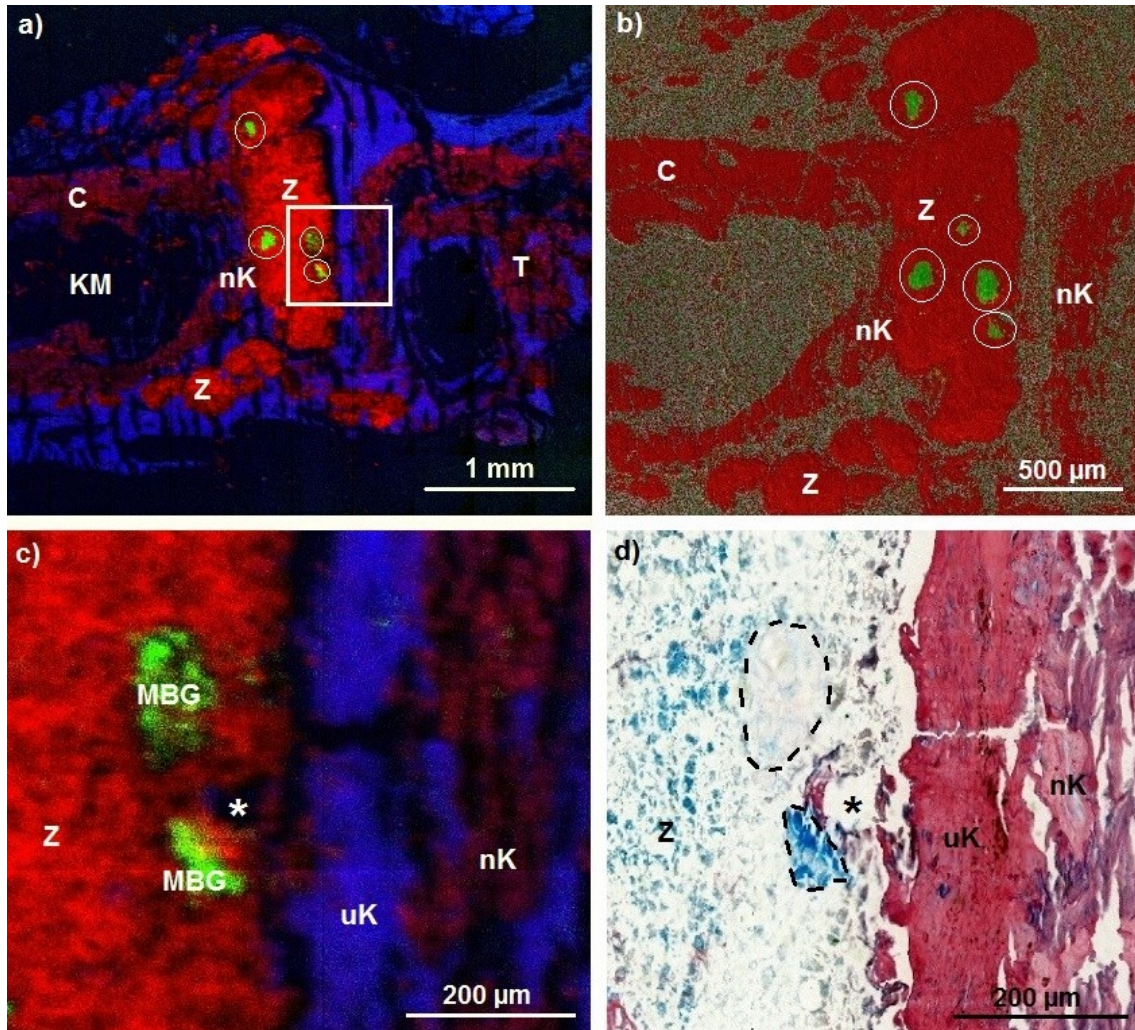


Abb. 7: Knochenschnitt einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, uK: unmineralisierte Knochenmatrix, KM: Knochenmark, C: Corticalis, T: Trabekel, MBG: mesoporöses bioaktives Glas, *: entstandene Pore durch Auflösung von MBG

a) ToF-SIMS-Übersicht, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot, Si^+ grün, Glaspartikel eingekreist; b) EDX-Mapping, Ca rot, Si grün, Glaspartikel eingekreist; c) ToF-SIMS-Detailaufnahme aus a); d) PAS-gefärbtes lichtmikroskopisches Bild der in a) markierten Stelle, Glaspartikel mit gestrichelter Linie umrandet.

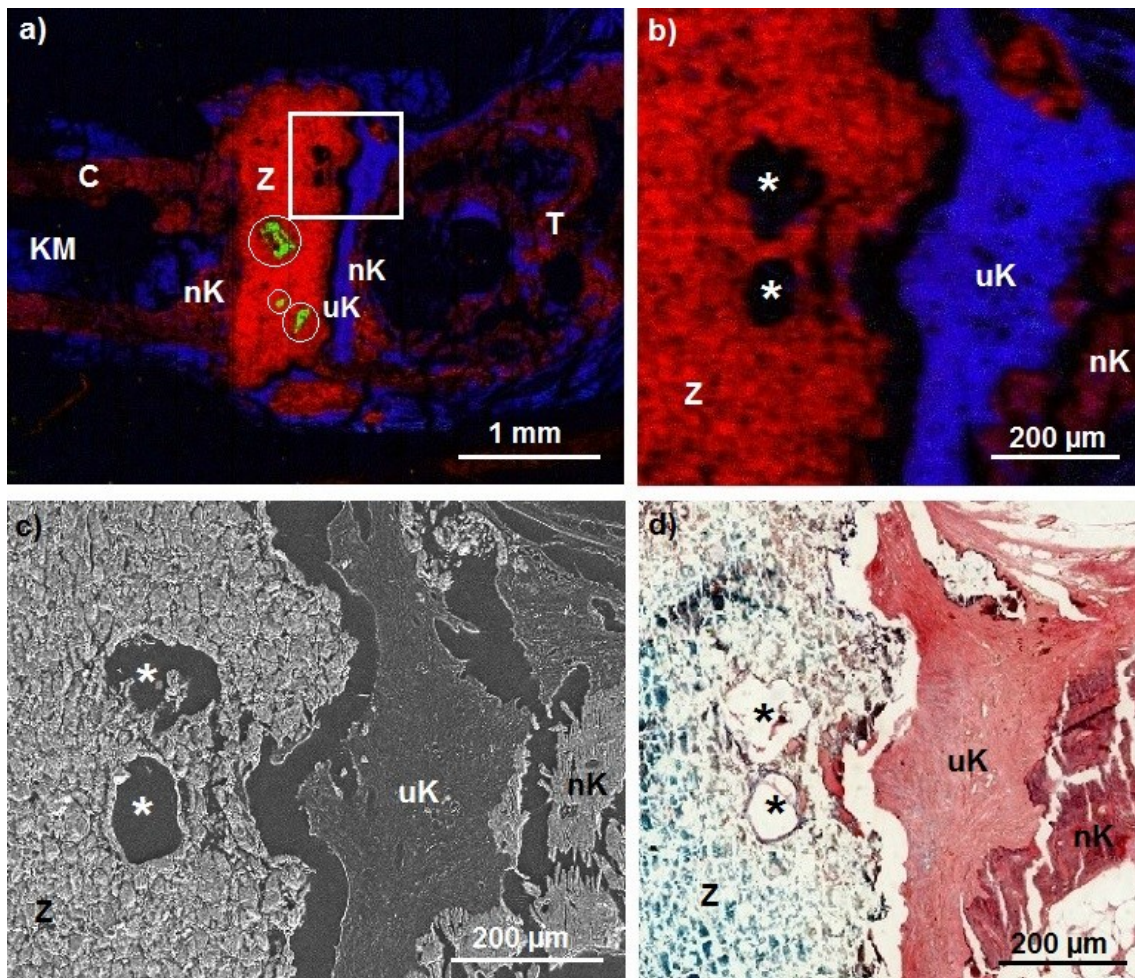


Abb. 8: Knochenschnitt einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, uK: unmineralisierte Knochenmatrix, KM: Knochenmark, C: Corticalis, T: Trabekel, *: entstandene Pore durch Auflösung von MBG
a) ToF-SIMS-Übersicht, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot, Si^+ grün, Glaspartikel eingekreist; b) ToF-SIMS-Detailaufnahme aus a); c) REM-Bild der in a) markierten Stelle; d) PAS-gefärbtes lichtmikroskopisches Bild der in a) markierten Stelle.

3.1.3 M3R-KO-Gruppe mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF

In der Gruppe der M3R-KO-Mäuse wurde in der ToF-SIMS Übersichtsaufnahme gut die ausgedünnte Trabekelstruktur des osteoporotischen Knochens sichtbar: Es fanden sich nur wenige und schmalere Trabekel innerhalb der Spongiosa der distalen Epiphyse.

Auch hier zeigte sich an der Zementgrenzfläche neugebildeter Knochen. Im ersten Beispiel (Abb. 9) findet sich zwar wenig Knochenneubildung bestehend aus mineralisierten und unmineralisierten Anteilen und kein Knorpel, dafür ist aber gut erkennbar, dass die Knochenneubildung direkt an der Oberfläche des eingebrachten Zements stattfindet: Auf der Detailaufnahme des ToF-SIMS geht die aufgeraute Oberfläche des Zements direkt in Knochen über, der aufgrund des geringeren Calciumsignals schwächer rot dargestellt wird. Auch auf dem lichtmikroskopischen Bild ist der lückenlose Übergang des hellen Zements zum violett gefärbten neuen, noch nicht vollständig mineralisierten Knochen sichtbar. ToF-SIMS und EDX-*Mapping* zeigen, dass das MBG hier keinen Kontakt zu Gewebe hat und daher noch unaufgelöst als Partikel im Zement vorliegt.

Am zweiten Beispiel (Abb. 10) ist eine deutlich ausgeprägtere Knochenneubildungszone erkennbar, proximal der Zementgrenzfläche konnten größere Areale mineralisierten Gewebes anhand des Calciumsignals festgestellt werden, auf der distalen Seite findet sich entlang des gesamten Implantatmaterials zellreiches fibrocartilaginäres Gewebe, von dem mehrere kleine Mineralisierungszonen ausgehen. Dieser neugebildete Knochen weist eine im REM sichtbare ungeordnete faserige Struktur auf, was nahelegt, dass es sich dabei noch um unreifen Geflechtknochen handelt, der im Rahmen der Frakturheilung zuerst entsteht. Im Vergleich dazu weist die Corticalis eine gerichtete Faserstruktur auf, die dem reifen Lamellenknochen entspricht.

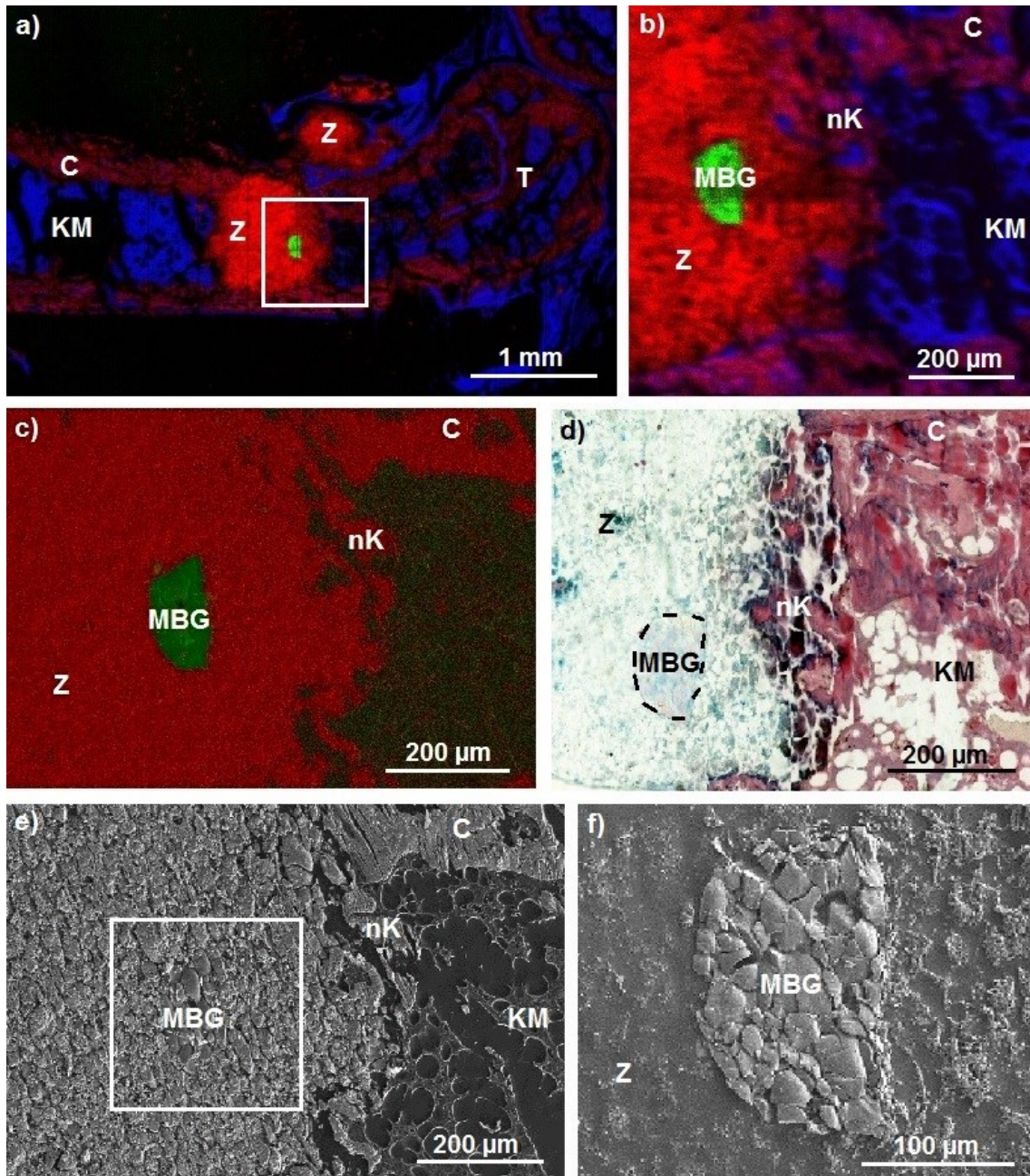


Abb. 9: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, KM: Knochenmark, C: Corticalis, T: Trabekel, MBG: mesoporöse bioaktive Glaspartikel

a) ToF-SIMS-Übersicht, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot, Si^+ grün; b) ToF-SIMS-Detailaufnahme aus a); c) EDX-Mapping der in a) markierten Stelle, Ca rot, Si grün; d) PAS-gefärbtes lichtmikroskopisches Bild der in a) markierten Stelle, Glaspartikel mit gestrichelter Linie umrandet; e) REM-Bild der in a) markierten Stelle; f) REM-Detailaufnahme eines mesoporösen bioaktiven Glaspartikels aus e).

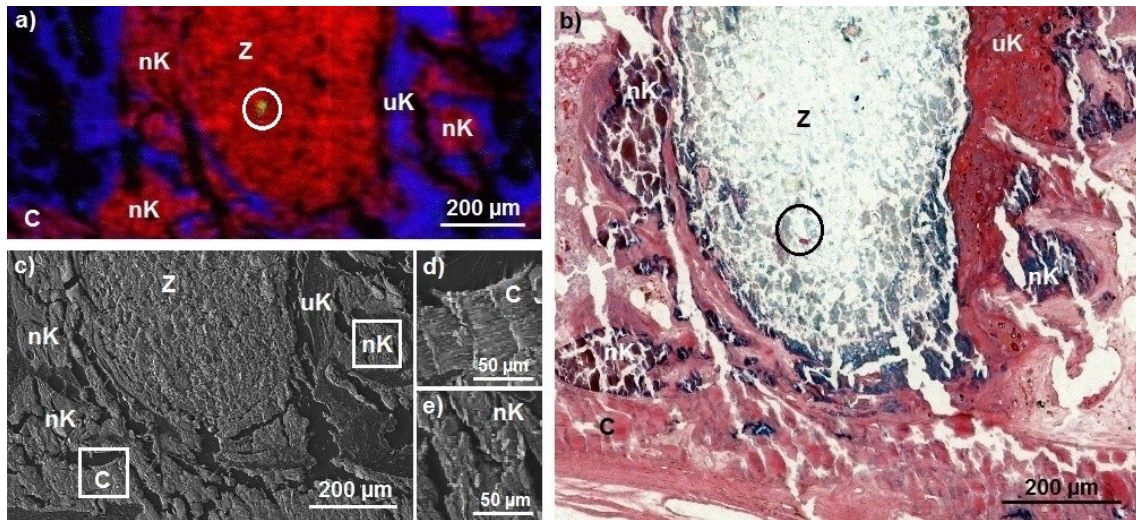


Abb. 10: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, uK: unmineralisierte Knochenmatrix, C: Corticalis

a) ToF-SIMS-Aufnahme, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot, Si^+ grün, Glaspartikel eingekreist; b) PAS-gefärbtes lichtmikroskopisches Bild der entsprechenden Stelle, Glaspartikel eingekreist; c) REM-Bild der entsprechenden Stelle mit REM-Detaillaufnahmen der Knochenstruktur des ursprünglichen Knochens der Corticalis in d) im Vergleich mit der des neugebildeten Knochens in e).

3.1.4 M3R-KO-Gruppe mit MBG-haltigem CPC mit BDNF

In folgendem Schnitt aus der Gruppe der M3R-KO-Mäuse mit BDNF-haltigem Implantat konnte die Knochenneubildung an einem entstandenen Zementspalt nachgewiesen werden. Mittig an der proximalen Zementgrenzfläche hat sich ein ca. 0,5 mm langer Spalt im Zement gebildet, der durch Auflösen eines Glaspartikels entstanden ist. An dieser Stelle kann also von einer Freisetzung und Wirkung von BDNF ausgegangen werden. Es ist erkennbar, dass sich weitere Partikel, die noch nicht aufgelöst sind, in der Nähe des Spaltes im Zement ohne Kontakt zum Gewebe befinden. Im Spalt selbst lässt sich innen nur ein Kollagensignal, weiter außen auch mineralisierter Knochen nachweisen (Abb. 11).

Vom Silicium sind sowohl auf dem ToF-SIMS- als auch auf dem EDX-Scan im Gewebe des Spalts keine Rückstände mehr auffindbar, das Glas mit BDNF wurde hier also bereits komplett abgebaut. Das kollagenreiche Gewebe im Inneren des Spalts entspricht lichtmikroskopisch vermutlich dem Osteoid, welches bindegewebsartig und zellarm erscheint und die Grundlage der Knochenneubildung darstellt. Daran angrenzend sind Bereiche mit Knorpel und neuem mineralisiertem Knochen zu sehen. Die Frakturheilung findet an dieser Stelle ausgeprägter statt als an der übrigen Grenzfläche des Zements, wo sich weniger neugebildeter Knochen findet (Abb. 11). Dies könnte ein Hinweis auf die osteoinduktive Wirkung von BDNF sein. Da es jedoch in der Vergleichsgruppe ohne BDNF kein Knochenschnitt mit randständigen Partikeln gab, ist kein direkter Vergleich möglich.

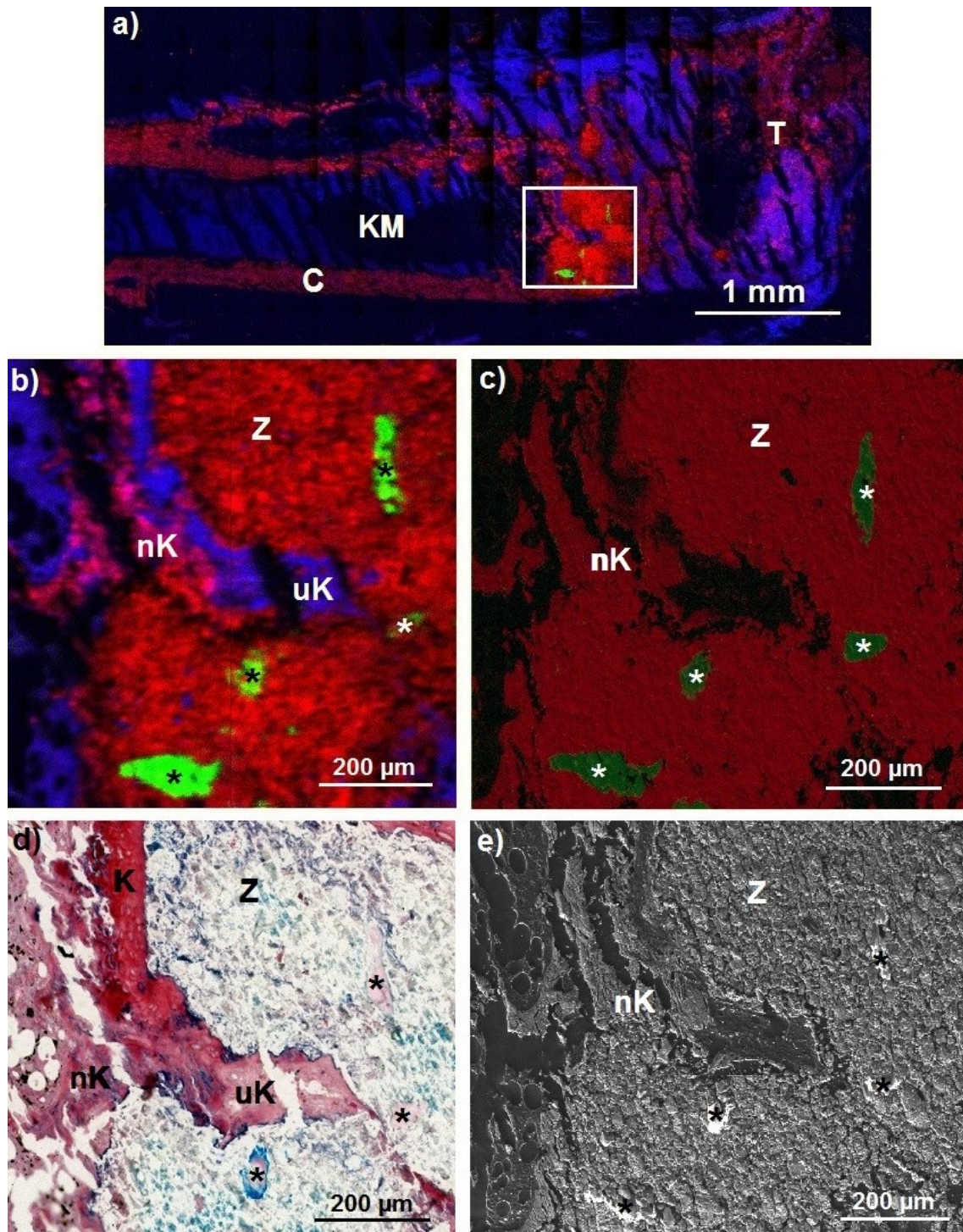


Abb. 11: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF, modifiziert nach (Kauschke et al. 2018b)

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, uK: unmineralisierte Knochenmatrix, KM: Knochenmark, C: Corticalis, T: Trabekel, *: mesoporöse bioaktive Glaspartikel

a) ToF-SIMS-Übersicht, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot, Si^+ grün; b) ToF-SIMS-Detailaufnahme aus a); c) EDX-Mapping der in a) markierten Stelle, Ca rot, Si grün; d) PAS-gefärbtes lichtmikroskopisches Bild der in a) markierten Stelle; e) REM-Bild der in a) markierten Stelle.

3.2 EDX-Quantifizierung

Da mittels Ca^+ -Counts im ToF-SIMS nur semiquantitative Aussagen gemacht werden können, wurde eine Quantifizierung durch EDX versucht. Pro Gruppe wurde an zwei Knochenschnitten im Zement, ursprünglichen und neugebildeten Knochen an jeweils mindestens sieben Stellen die molaren Calcium- und Phosphor-Anteile des Gewebes gemessen und daraus das Ca / P-Verhältnis bestimmt. Dieser Parameter unterscheidet sich bei den verschiedenen Calciumphosphatphasen und kann daher zur Charakterisierung der Knochenmineralisierung herangezogen werden.

Als Referenzwerte der molaren Ca / P-Verhältnisse der reinen stöchiometrischen Calciumphosphate finden sich in der Literatur folgende Angaben, die zum Vergleich dienen (Brown und Chow 1976):

ACP: 1,5

OCP: 1,333

HA: 1,667

Folgende Ca / P-Verhältnisse wurden in den verschiedenen Gruppen bestimmt:

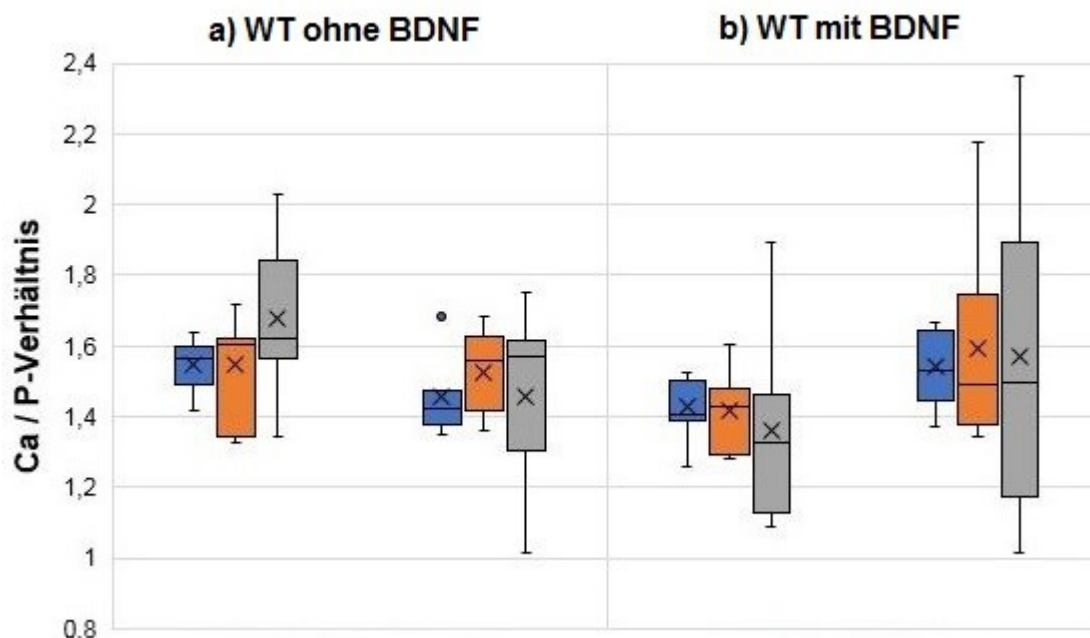


Abb. 12: Ca / P-Verhältnisse des Zements, ursprünglichen und neugebildeten Knochens der Wildtyp-Mäuse mit MBG-haltigem CPC mit oder ohne BDNF im Vergleich

Pro Gruppe wurden zwei Proben ausgewertet. Zement ist blau, ursprünglicher Knochen orange und neugebildeter Knochen bei jeder Probe grau dargestellt. Die Mittelwerte sind in den Kasten- grafiken jeweils mit Kreuz markiert.

- a) Gruppe der Wildtyp-Mäuse ohne BDNF: Mittelwert (\pm Standardabweichung)
 Probe 1: Zement: 1,546 (\pm 0,076); ursprünglicher Knochen: 1,545 (\pm 0,149); neugebildeter Knochen: 1,677 (\pm 0,215)
 Probe 2: Zement: 1,454 (\pm 0,109), Ausreißer: 1,681; ursprünglicher Knochen: 1,525 (\pm 0,118); neugebildeter Knochen: 1,458 (\pm 0,233)
- b) Gruppe der Wildtyp-Mäuse mit BDNF: Mittelwert (\pm Standardabweichung)
 Probe 1: Zement: 1,426 (\pm 0,092); ursprünglicher Knochen: 1,418 (\pm 0,112); neugebildeter Knochen: 1,362 (\pm 0,243)
 Probe 2: Zement: 1,540 (\pm 0,106); ursprünglicher Knochen: 1,594 (\pm 0,297); neugebildeter Knochen: 1,568 (\pm 0,438)

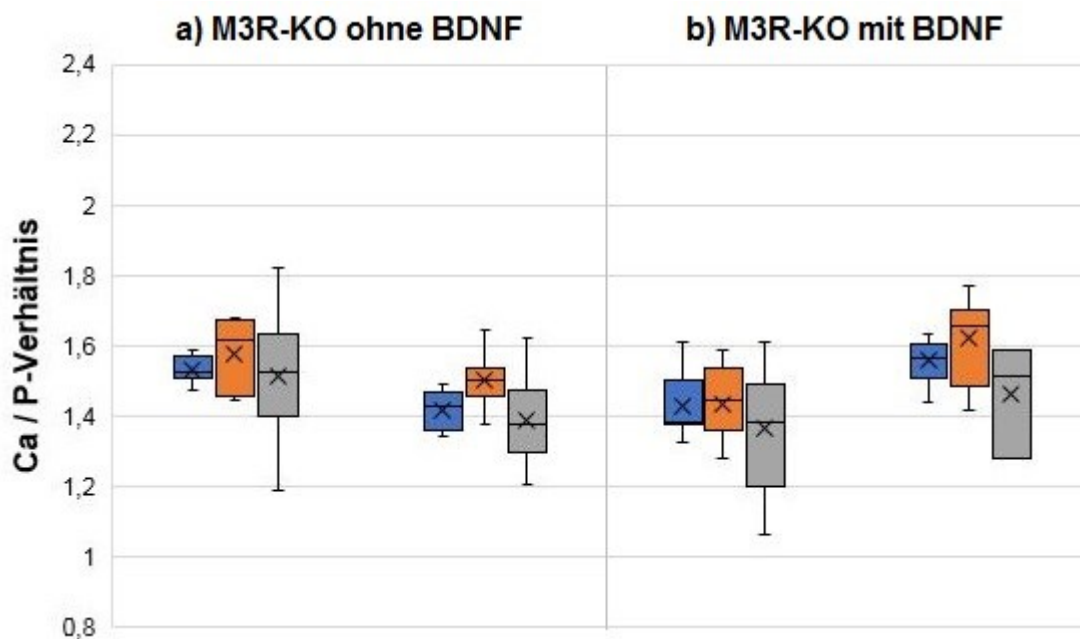


Abb. 13: Ca / P-Verhältnisse des Zements, ursprünglichen und neugebildeten Knochens der M3R-KO-Mäuse mit MBG-haltigem CPC mit oder ohne BDNF im Vergleich

Pro Gruppe wurden zwei Proben ausgewertet. Zement ist blau, ursprünglicher Knochen orange und neugebildeter Knochen grau dargestellt. Die Mittelwerte sind in den Kastengrafiken jeweils mit Kreuz markiert.

- a) Gruppe der M3R-KO-Mäuse ohne BDNF: Mittelwert (\pm Standardabweichung)
 Probe 1: Zement: 1,530 (\pm 0,039); ursprünglicher Knochen: 1,574 (\pm 0,103); neugebildeter Knochen: 1,512 (\pm 0,176)
 Probe 2: Zement: 1,417 (\pm 0,056); ursprünglicher Knochen: 1,503 (\pm 0,081); neugebildeter Knochen: 1,389 (\pm 0,122)
- b) Gruppe der M3R-KO-Mäuse mit BDNF: Mittelwert (\pm Standardabweichung)
 Probe 1: Zement: 1,428 (\pm 0,097); ursprünglicher Knochen: 1,434 (\pm 0,105); neugebildeter Knochen: 1,365 (\pm 0,180)
 Probe 2: Zement: 1,556 (\pm 0,064); ursprünglicher Knochen: 1,619 (\pm 0,125); neugebildeter Knochen: 1,463 (\pm 0,133)

	Zement	ursprünglicher Knochen	neugebildeter Knochen
WT ohne BDNF	1,5	1,535	1,567
WT mit BDNF	1,483	1,506	1,465
M3R-KO ohne BDNF	1,469	1,538	1,451
M3R-KO mit BDNF	1,492	1,527	1,414

Tab. 2: Gemittelte Ca / P-Verhältnisse beider Proben je Gruppe

Es zeigte sich eine große Streuung der Werte in jeder Gruppe. Zum einen variierten die einzelnen Ergebnisse innerhalb eines Gewebes stark, das heißt es wurden beispielsweise in der Corticalis des ursprünglichen Knochens an verschiedenen Messstellen innerhalb eines Knochenschnitts sich relativ stark unterscheidende Ca / P-Verhältnisse bestimmt. Hierbei fiel auf, dass bei dem neugebildeten Knochen in allen Gruppen die größte Streuung der Werte vorlag. Die Standardabweichung betrug hier in allen Gruppen über 0,1, wobei die Werte in den Gruppen der WT-Mäuse mit oder ohne BDNF größere Spannweiten aufwiesen als die M3R-KO-Mäuse. Diese variierenden Messwerte könnten auf das Vorliegen mehrerer verschiedener Calciumphosphatphasen bei der Knochenneubildung hindeuten, sodass an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Knochens variierende Verhältnisse von Calciumphosphatphasen vorliegen. Die Ergebnisse des Zements lagen pro Knochenschnitt am dichtesten beieinander, was zu einem einheitlicheren Verhältnis der Calciumphosphatphasen passen würde. Die Standardabweichung wurde hier in allen Gruppen mit Werten unter 0,1 berechnet.

Neugebildeter Knochen wies im Vergleich zu ursprünglichem Knochen fast in allen Proben egal welcher Gruppe niedrigere Mittelwerte der Ca / P-Verhältnisse auf, was für das Vorliegen eines größeren Anteils an Vorstufen von HA sprechen könnte.

Des Weiteren wurden deutliche Unterschiede der Durchschnittswerte innerhalb einer Gruppe zwischen den verschiedenen Proben sichtbar. Beispielsweise ließ sich in der Gruppe der M3R-KO-Mäuse mit BDNF im ursprünglichen Knochen bei einer Probe ein Durchschnittswert des Ca / P-Verhältnisses von 1,43 ermitteln, während dieser in einer anderen Probe 1,62 betrug. Die Zusammensetzung des Knochens unterscheidet sich also je nach Probe, es liegt kein reines stöchiometrisches ACP, OCP, HA oder spezifisches einheitliches Verhältnis dieser Calciumphosphate vor.

Die Ca / P-Verhältnisse des neugebildeten Knochens zeigten in der Gruppe mit BDNF im Vergleich zu der ohne BDNF jeweils bei den WT- als auch bei den M3R-KO-Mäusen

keine eindeutigen auffälligen Tendenzen in eine Richtung. Und auch zwischen osteoporotischem und gesundem corticalem Knochen fand sich kein deutlicher Unterschied der durchschnittlichen Ca / P-Verhältnisse.

Da jedoch insgesamt große Schwankungen der Ca / P-Verhältnisse vorlagen, waren die Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Ca / P-Verhältnissen innerhalb einer Gruppe genauso groß wie die zwischen den verschiedenen Gruppen, sodass weitere Auswertungen bzw. Aussagen zu Unterschieden zwischen den Gruppen hier nicht sinnvoll waren.

3.3 Osteocyten-Analyse

Die Osteocyten und deren Umgebung wurden in den versilberten Knochenschnitten unter dem Lichtmikroskop und durch ToF-SIMS-Detailaufnahmen im neugebildeten Knochen an der Grenzfläche zum Knochenzement quantitativ und qualitativ beurteilt.

3.3.1 Osteocytenmorphologie

Auf den lichtmikroskopischen Bildern der Versilberung, ist die typische längliche Form der Osteocyten mit zahlreichen langen Ausläufern in der Corticalis des ursprünglichen Knochens des Mäusefemurs am Beispiel einer M3R-KO-Maus mit Implantatmaterial ohne BDNF (Abb. 14) gut erkennbar. Im neugebildeten Knochen an der Grenzfläche zu dem Zement hingegen zeigten sich etwas kleinere kugeliger Zellen mit weniger und kürzeren Ausläufern. Im Gegensatz zur Corticalis des ursprünglichen Knochens, bei der die gesamte Fläche aneinanderhängend mineralisiert und daher komplett von Osteocyten durchsetzt ist, sind in der Frakturheilungszone an der Zementgrenzfläche nur stückchenweise mineralisierte Zonen vorhanden, in denen sich einzelne Osteocyten befinden. Das canaliculäre Netzwerk kommt dort daher deutlich weniger eindrucksvoll zum Vorschein als in der Corticalis des ursprünglichen Knochens.

Bei osteoporotischen Mäusen in der Versuchsgruppe mit BDNF konnten ebenfalls Osteocyten sowohl lichtmikroskopisch als auch durch die ToF-SIMS-Analyse im neugebildeten Knochen gefunden werden, die sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe jedoch in Anzahl und Erscheinung nicht deutlich unterschieden. Es scheint so als ob die Osteocyten auch hier eine eher kugelige Form mit wenig ausgeprägten Zellausläufern aufweisen.

In Abbildung 15 sind zusätzlich Osteocyten in einer mineralisierten Knochenneubildungszone in einem entstandenen Zementspalt nach Auflösung von BDNF-haltigem MBG sichtbar. Dort sind im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. An der Grenze zwischen mineralisiertem und unmineralisiertem Gewebe sind auf den toluidinblauen Bildern dunkelblau gefärbte Osteoblasten aneinandergereiht sichtbar. Dort findet die Knochensynthese statt.

Mithilfe von ToF-SIMS-Untersuchungen gelang es Osteocytenlakunen im neugebildeten Knochen wiederzufinden. Auch hier war erkennbar, dass diese mit ca. 10 µm eher klein sind. Im Vergleich der lichtmikroskopischen Bilder mit den Calciumverteilungen des ToF-SIMS ließen sich einigen Osteocytenlakunen, die kein Calciumsignal zeigten, identifizieren. In den Lakunen wurden teilweise Signale organischer Molekülfragmente gefunden. Dadurch, dass bei den ToF-SIMS-Messungen nur die oberste Schicht und nicht die komplette Schnittdicke wie unter dem Lichtmikroskop analysiert werden kann, waren einzelne Osteocyten nur andeutungsweise erkennbar oder die Osteocytenform, -größe und -lage nicht 100% identisch beim genauen Vergleich der Bilder. Canaliculi sind in den ToF-SIMS und Toluidinblau-gefärbten Aufnahmen im Gegensatz zu den versilberten Knochenschnitten nicht oder nur andeutungsweise zu erkennen. Die ToF-SIMS-Detailaufnahmen der Osteocyten zeigen jeweils eine gleichmäßige Verteilung des rot dargestellten Calciums in der Umgebung der Osteocyten, es lassen sich keine vermehrten oder verminderten HA-Ablagerungen nachweisen. Die Calciumverteilung um die Osteocytenlakunen kann daher in allen Gruppen als homogen beschrieben werden.

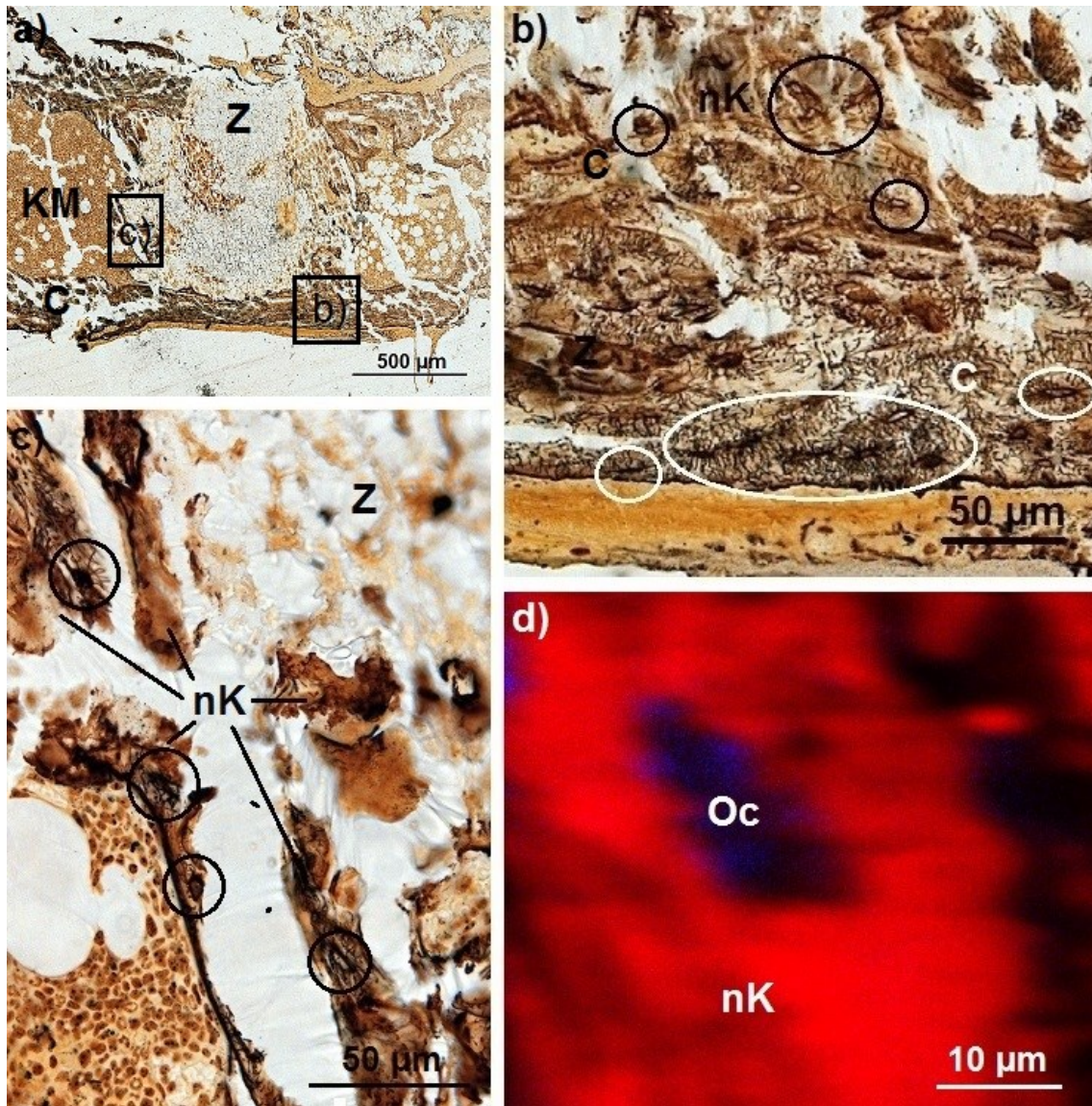


Abb. 14: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, KM: Knochenmark, C: Corticalis, Oc: Osteocyt

a) silbergefärbte lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme; b) silbergefärbte lichtmikroskopische Detailaufnahme aus a), Osteocyten der ursprünglichen Corticalis weiß und des neugebildeten Knochens schwarz eingekreist; c) silbergefärbte lichtmikroskopische Detailaufnahme aus a), Osteocyten des neugebildeten Knochens eingekreist; d) ToF-SIMS-Detailaufnahme einer Osteocyt-lakune des neugebildeten Knochens, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot.

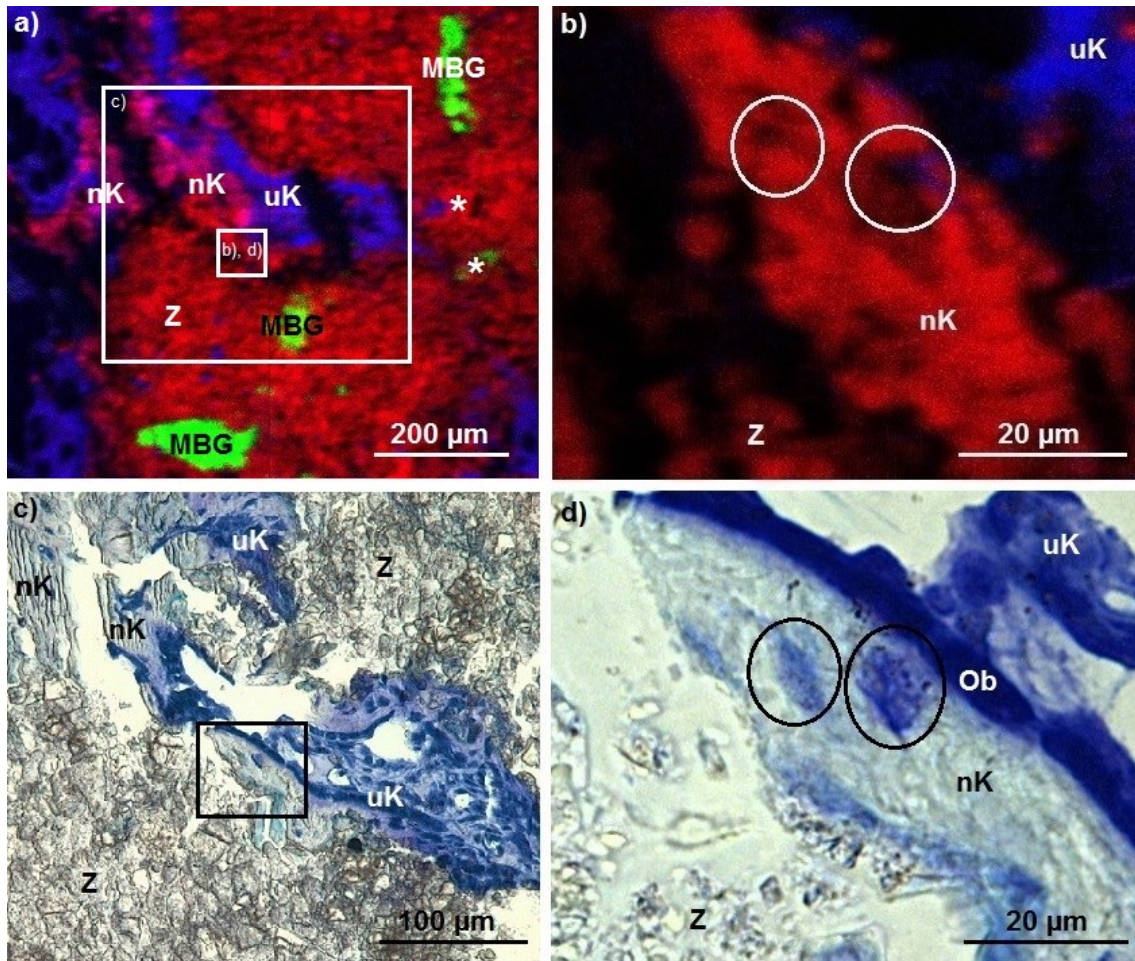


Abb. 15: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, uK: unmineralisierte Knochenmatrix, MBG: mesoporöse bioaktive Glaspartikel, Ob: Osteoblast; die Aufnahmen b), c) und d) stammen aus einem benachbarten Knochenschnitt zu dem der Übersichtsaufnahme aus a), daher keine 100%-ige Übereinstimmung der Ausschnitte.

a) ToF-SIMS-Aufnahme eines Zementspalts, der durch Auflösen von MBG entstanden ist, $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot, Si^+ grün, * markiert einen Glaspartikelrest und zwei kleine Poren ohne MBG-Reste am Zementspalt; b) ToF-SIMS-Detailaufnahme der in a) markierten Stelle, Osteocyten des neugebildeten Knochens eingekreist; c) toluidinblau-gefärbte lichtmikroskopische Aufnahme des Zementspalts entsprechend dem in a) markierten Ausschnitt; d) toluidinblau-gefärbte lichtmikroskopische Detailaufnahme aus c), Osteocyten eingekreist, eine Osteoblastenreihe zwischen mineralisiertem und unmineralisiertem Gewebe ist sichtbar.

Auch in der WT-Gruppe zeigten sich durch funktionalisiertes MBG mit BDNF keine Veränderungen der Osteocyten im Vergleich zu der entsprechenden Gruppe ohne BDNF. Die Canaliculi stellen sich auch hier in der Corticalis des ursprünglichen Knochens deutlich ausgeprägter dar als im neugebildeten Knochen.

Zwischen den verschiedenen Gruppen konnten anhand der lichtmikroskopisch betrachteten versilberten Knochenschnitte keine Unterschiede der Osteocytenmorphologie des

jeweils neugebildeten Knochens erkannt werden. In Bezug auf Zellgröße, -form und Zellausläufer erschienen die Osteocyten des neugebildeten Knochens in Experimental- und Kontrollgruppe sowohl bei gesunden als auch bei osteoporotischen Mäusen sehr ähnlich. Auch ToF-SIMS-Aufnahmen der Osteocytenlakunen zeigten keine Unterschiede der Mineral- und Kollagenverteilung zwischen Gruppen, die BDNF-haltiges Knochenersatzmaterial erhielten und Gruppen ohne BDNF, sowohl in gesundem als auch osteoporotischem Knochen.

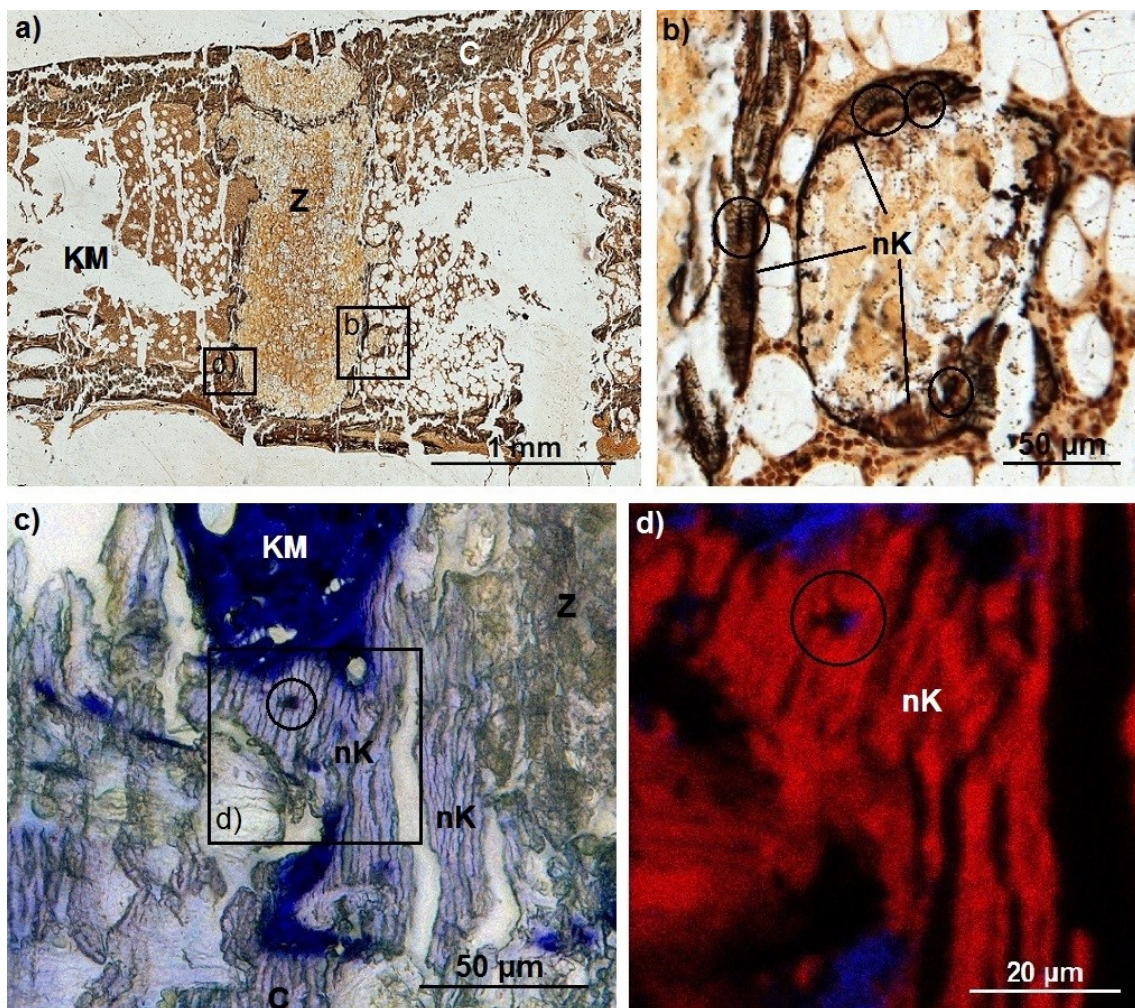


Abb. 16: Knochenschnitt einer WT-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, KM: Knochenmark, C: Corticalis
a) silbergefärbte lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme; b) silbergefärbte lichtmikroskopische Detailaufnahme aus a), Osteocyten des neugebildeten Knochens eingekreist; c) toluidinblau-gefärbte lichtmikroskopische Detailaufnahme aus a), Osteocyt des neugebildeten Knochens eingekreist; d) ToF-SIMS-Detailaufnahme einer Osteocytenlakune entsprechend der markierten Stelle aus c), $C_4H_8N^+$ blau, Ca^+ rot.

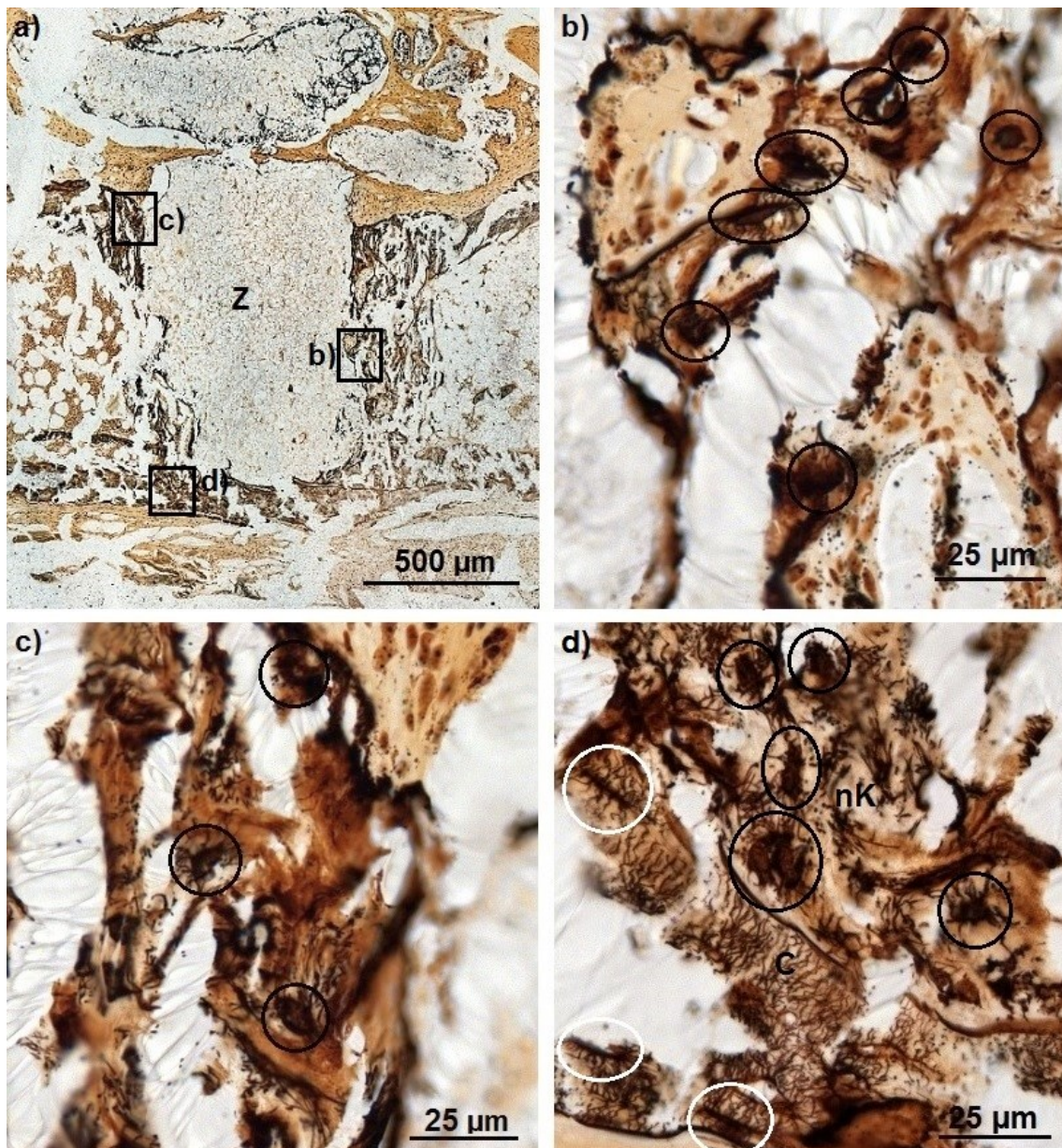


Abb. 17: Knochenschnitt einer WT-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF

Z: Zement, nK: mineralisierter neugebildeter Knochen, C: Corticalis

a) silbergefärbte lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme; b), c) silbergefärbte lichtmikroskopische Detailaufnahmen entsprechend den Markierungen in a), Osteocyten des neugebildeten Knochens eingekreist; d) silbergefärbte lichtmikroskopische Detailaufnahme aus a), Osteocyten der Corticalis weiß und des neugebildeten Knochens schwarz eingekreist, im Kreis in der Mitte des Bildes sind zwei Osteocyten zu sehen.

3.3.2 Osteocytenzahl

In jeder Gruppe wurden bei vier Knochenschnitten die Osteocyten des gesamten neugebildeten Knochens an der Grenzfläche zum Zement manuell unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Insgesamt konnten sowohl mithilfe der Anova als auch des Kruskal-Wallis-Tests, bei dem die hier nicht vorliegende Varianzhomogenität keine Voraussetzung ist, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

In den Gruppen, die mit Implantatmaterial ohne BDNF versorgt wurden, unterschieden sich gesunde WT-Mäuse, bei denen durchschnittlich 44 Osteocyten zu finden waren, und osteoporotische M3R-KO-Mäuse mit durchschnittlich 46 Osteocyten, in der Osteocytenzahl im neugebildeten Knochen nicht deutlich.

WT-Mäuse, die mit BDNF-haltigem Knochenzement versorgt wurden, wiesen eine etwas höhere Osteocytenzahl auf als die der Kontrollgruppe ohne BDNF. Dieser Unterschied war jedoch im Zwei-Stichproben-t-Test unter Annahme unterschiedlicher Varianzen nicht statistisch signifikant ($p = 0,108$). Der Mittelwert der Osteocytenzahl lag mit BDNF bei 54 im Vergleich zu durchschnittlich 44 ohne BDNF. Dies könnte der leichten Knochenmehrbi­dung in der BDNF-Gruppe entsprechen.

In der M3R-KO-Gruppen mit BDNF sind durchschnittlich etwa genauso viele Osteocyten zu finden wie in der entsprechenden Kontrollgruppe ohne BDNF. Im neugebildeten Knochen eines Knochenschnitts in der KO-Gruppe ohne BDNF wurden 102 Osteocyten gezählt, diese Anzahl wurde jedoch bei einem Knochenschnitt mit disloziertem Zement und daher keiner vergleichbaren ordnungsgemäßen Frakturheilung gefunden, sodass dieser Wert nicht berücksichtigt werden sollte. Abgesehen von diesem Ausreißer liegen die Mittelwerte hier in beiden Gruppen bei 46.

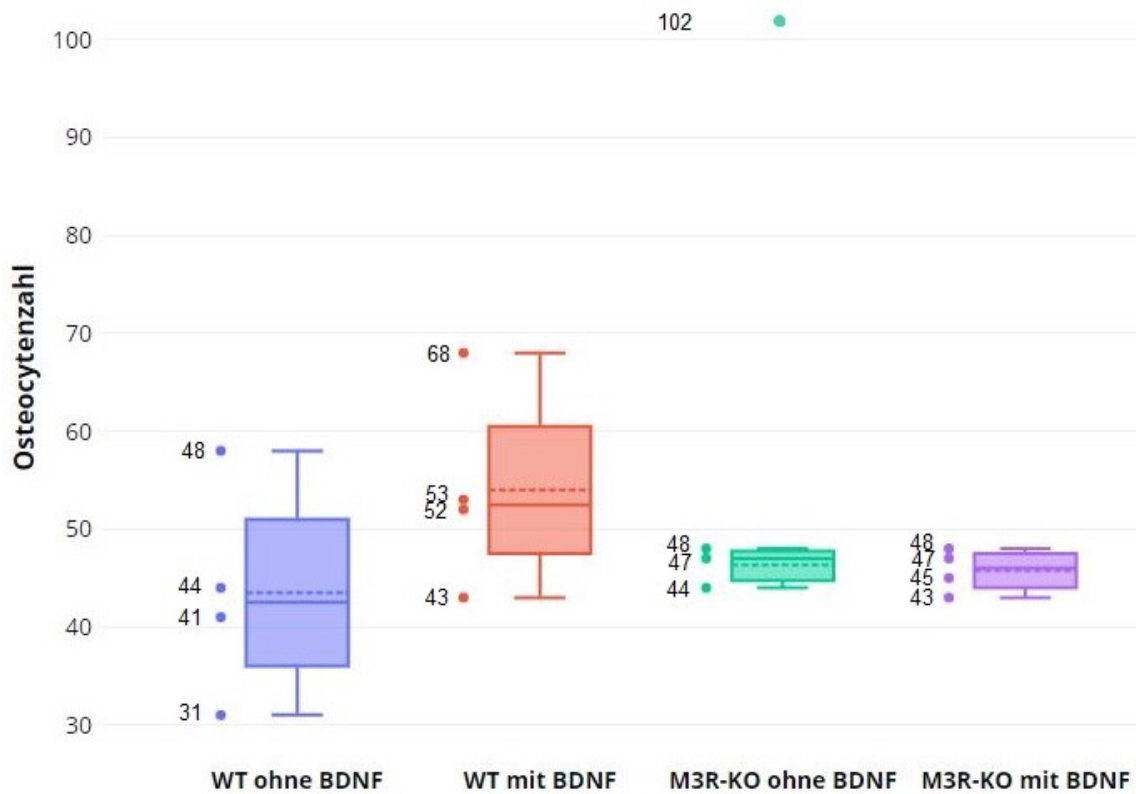


Abb. 18: Vergleich der Osteocytenzahlen im neugebildeten Knochen

Die Punkte neben den Kastengrafiken geben die Osteocytenzahlen im neugebildeten Knochen an der Zementgrenzfläche pro ausgewertetem Knochenschnitt in der jeweils dargestellten Gruppe an, wobei ein Punkt die Anzahl an Osteocyten in einer Probe darstellt. In den Kastengrafiken ist der Mittelwert der Osteocytenzahlen der entsprechenden Gruppe jeweils mit einer gestrichelten Linie markiert, der Ausreißer in der M3R-KO-Gruppe ohne BDNF (102 Osteocyten) wurde dabei nicht berücksichtigt.

4 Diskussion

Um die Wirkung von mit BDNF modifiziertem MBG-haltigem CPC als Knochenersatzmaterial im metaphysären Frakturspalt an osteoporotischen M3R-KO-Mäusen zu untersuchen, wurden ToF-SIMS- und EDX-Messungen, sowie die Lichtmikroskopie mit Osteocytenanalyse durchgeführt. Das MBG als Trägerstoff für BDNF konnte wie erwartet durch die Siliciumverteilung detektiert werden, und es stellte sich heraus, dass insgesamt 2 wt% MBG, die dem CPC beigemischt wurden, zu wenig waren, um eine signifikante Verbesserung der Frakturheilung im osteoporotischen Knochen zu erzielen, da sich nur wenige Partikel auflösen konnten. Es zeigte sich jedoch auch, dass an den Stellen, wo sich Partikel aufgelöst haben und Poren im Zement entstanden sind, eine Frakturheilung stattfand. Entlang der Zementgrenzfläche konnten durch Kombination von ToF-SIMS und Lichtmikroskopie calciumreiche mineralisierte Areale, sowie Osteoid, Knorpel und Granulationsgewebe innerhalb der Knochenneubildungszonen erkannt werden. Die Mineralisierung zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen den Gruppen in den semiquantitativen ToF-SIMS-Verteilungen von Ca^+ und in der EDX-Quantifizierung von Ca / P . Die Osteocytenanalyse ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des lichtmikroskopischen Aussehens, die Anzahl der Osteocyten schien in der WT-Gruppe mit BDNF jedoch leicht erhöht (aber nicht signifikant) zu sein im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne BDNF, was zu einer verstärkten Knochenneubildung passt, die sich in dieser Gruppe anhand der bildlichen Darstellungen andeutete.

Der CPC-MBG-BDNF-Verbundstoff scheint also positive Auswirkungen zu haben, sollte aber weiter angepasst werden, da gezeigt werden konnte, dass zu wenig MBG (mit BDNF) enthalten war, um eine deutliche Verbesserung der Frakturheilung bei Osteoporose zu erreichen.

4.1 ToF-SIMS-Auswertungen

Durch die chemische Information, die durch die Massenspektren und -bilder bei der ToF-SIMS-Analyse gewonnen wurde, war es möglich, mehr über die an der Zementgrenzfläche stattfindenden Mechanismen zu erfahren, wie beispielsweise den Mineralisierungsprozess und die Auflösung von Zement und MBG-Partikeln. Als Primärionen wurden Bi_3^+ -Clusterionen verwendet, da diese die Entstehung größerer organischer

Sekundärionen begünstigt, die bei der Analyse von biologischen Gewebeproben nützlich sind (Malmberg et al. 2007).

Um eine Vorstellung über das Verhalten des CPC-MBG-BDNF-Verbundstoffs während der Frakturheilung zu erhalten war eine chemische Oberflächenanalyse notwendig. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden der biologischen Gewebeanalyse, konnten hier anhand der Verteilung der erzeugten Sekundärionen von Silicium, das den Hauptbestandteil des MBG darstellt, dessen Partikel genau identifiziert und deren Auflösung charakterisiert werden. Pro Maus waren einzelne, manchmal sogar gar keine MBG-Partikel im Zement der Knochenpräparate angeschnitten. Diejenigen, die vom Zement eingeschlossen waren und nicht mit dem Knochenmark in Kontakt standen, konnten nicht abgebaut werden und waren, genauso wie sie in den pastösen Zement gemischt wurden als ca. 100-200 µm große Teilchen im CPC verstreut, wiederzufinden. Nur in wenigen Schnitten waren randständige mesoporöse bioaktive Glaspartikel zu finden. Nur diese konnten jedoch durch Kontakt mit umliegendem Gewebe vollständig abgebaut und resorbiert werden. Durch die ToF-SIMS-Messungen konnten die Stellen an denen BDNF freigesetzt wurde dadurch indirekt, aber eindeutig gefunden werden. Dies waren jedoch so wenige, vor allem in der M3R-KO-Gruppe, dass keine ausreichende BDNF-Wirkung erzielt werden konnte und damit auch keine eindeutige Aussage über die Wirkung des Wachstumsfaktors auf die Frakturheilung bei Osteoporose getroffen werden kann. Dort, wo sich eine Pore durch Auflösung eines BDNF-haltigen MBGs gebildet hat, war im osteoporotischen Knochen jedoch eine ausgeprägte Knochenneubildung sichtbar. In der entsprechenden Vergleichsgruppe ohne BDNF fanden sich keine randständigen Partikel, und somit keine Porenbildung im Zement, sodass hier kein direkter Vergleich möglich war.

In nicht osteoporotischem Knochen der WT-Gruppen waren in jeweils zwei Beispielen aufgelöste randständige Partikel mit Porenbildung zu finden. Hier scheint das BDNF-funktionalisierte CPC-MBG-Komposit im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne BDNF für die Frakturheilung von Vorteil zu sein. Dies konnte histomorphometrisch von Kauschke et al. (2018b) nachgewiesen werden: Es zeigte sich eine stärkere Wirkung von BDNF bei nicht osteoporotischen Mäusen, die Knochenbildung bei WT-Mäusen, die das BDNF-funktionalisierte Zement-MBG-Komposit erhielten, war im Vergleich zu Kontroll-WT-Mäusen ohne BDNF signifikant erhöht. Diese Knochenneubildungszone ist neben einer Zunahme an mineralisiertem Gewebe auch durch das vermehrte Vorhandensein von Osteoid, Knorpel oder Granulationsgewebe charakterisiert, sodass eine Förderung der Frakturheilung in nicht osteoporotischem Knochen durch das BDNF-funktionalisierte CPC-MBG-Komposit vermutet werden kann.

Zu Beginn der Studie war es nicht möglich mehr als die hier verwendeten 2 wt% MBG zum Zement zu mischen, ohne das Abbinden zu gefährden, mittlerweile können bis zu 10 wt% zugegeben werden, ohne die mechanischen Eigenschaften des CPC-MBG-Komposits zu beeinträchtigen (Schumacher et al. 2017). Daher sind weitere Studien mit höheren BDNF- und MBG-Konzentrationen nötig, um eine deutliche Wirkung auf die Frakturheilung bei Osteoporose zu erreichen. Diese wichtige Erkenntnis konnte durch die Möglichkeit der genauen Lokalisierung der MBG-Partikel in Bezug zu übrigen Gewebe durch ToF-SIMS-Auswertungen gewonnen werden. Da sich die Methode dadurch als nützlich erwies, könnte es auch sinnvoll sein, zukünftig mehr als einen Schnitt des Femurs pro Maus mittels ToF-SIMS zu analysieren, um möglicherweise mehr Stellen zu finden, an denen sich Partikel aufgelöst haben.

Auch Pharmaka oder Biomarker können mittels ToF-SIMS nachgewiesen werden, wenn spezifische Fragmente eindeutig identifiziert wurden, und besondere Bestandteile der Oberfläche können lokalisiert und zurückverfolgt werden (Bich et al. 2014). Die Charakterisierung modifizierter Implantatoberflächen und die Analyse der Grenzfläche zwischen Implantat und Knochengewebe mittels ToF-SIMS kann daher die Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien und Medikamente mit optimierter Funktionalität unterstützen. Neben den jeweiligen Standardanforderungen der Biomaterialien spielt nämlich die Wirkstofffreisetzung und -verteilung im Gewebe eine wesentliche Rolle für die Entwicklung dieser (Rohnke et al. 2017). ToF-SIMS-Untersuchungen wurden in diesem Zusammenhang beispielsweise schon erfolgreich verwendet, um die Sr^{2+} -Verteilung als Hinweis für Freisetzung und Resorption *in vitro* und *in vivo* aus Sr-modifizierten Knochenersatzmaterialien bei osteoporotischem Knochen zu bestimmen (Rohnke et al. 2013; Rohnke et al. 2017; Ray et al. 2016).

Ein Nachteil von ToF-SIMS-Analysen ist, dass es schwierig oder unmöglich ist große Moleküle zu detektieren, wenn durch die Fragmentierung keine spezifischen Sekundärionen entstehen, die nur in diesem Molekül vorkommen. Der hier verwendete Wachstumsfaktor BDNF ist ein großes organisches Molekül, und hat daher kein spezifisches Fragment, dessen Detektion charakteristisch für dessen Vorhandensein wäre. Daher konnte die Verteilung dieses Wachstumsfaktors auch nicht direkt nachvollzogen werden. Das mit BDNF funktionalisierte MBG, welches als Trägerstoff diente, konnte jedoch eindeutig detektiert werden, sodass eine indirekte Lokalisation bis zur Auflösung der MBG-Partikel auch von BDNF möglich ist.

Um die Materialzusammensetzung besser zu verstehen und spezifische Komponenten lokalisieren zu können, sind Methoden erforderlich, die detaillierte chemische Informationen liefern und es ermöglichen, Gewebearten, Mineralgehalt und Verteilung mit hoher Empfindlichkeit und hoher räumlicher Auflösung zu definieren, sodass die Lücke zwischen Gewebe- und Mineralanalyse geschlossen wird (Henss et al. 2013). Diese Information wurden auch hier geliefert: Die kombinierte Analyse von organischen Bestandteilen wie Knochen und Bindegewebe in Verbindung mit der Detektion der siliciumreichen anorganischen Glaspartikel in räumlicher Beziehung zueinander macht das Nachvollziehen der BDNF-Freisetzung indirekt möglich und gilt daher als Alleinstellungsmerkmal dieser Methode und ist damit ein nützliches zusätzliches Analyseverfahren neben herkömmlichen Gewebsuntersuchungen zur Charakterisierung funktionalisierter Knochenersatzmaterialien.

Die Knochenmineralisation bei Frakturheilungen und Knochenimplantaten kann durch Ionenverteilungen von Ca^+ , CaO^+ , CaOH^+ oder auch größeren Fragmenten des HAs wie zum Beispiel $\text{Ca}_5\text{P}_3\text{O}_{12}^+$ analysiert werden (Malmberg und Nygren 2008). Gleichzeitig kann auch Bindegewebe anhand der Sekundärionen CH_4N^+ , $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}^+$ und $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$, die Bruchstücke der Aminosäure Prolin sind, welche eine der Hauptkomponenten von Kollagen Typ 1 ist, dargestellt werden (Sanni et al. 2002). In dieser Studie gelang die Darstellung von Knochen und Knochenzement am besten durch die Verteilungsbilder von Ca^+ , kollagenreiches Gewebe konnte durch die Verteilung von $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ abgebildet werden. Durch *Overlays* dieser beiden Sekundärionenverteilungen konnte in allen vier Mäusegruppen eine Knochenneubildung aus unmineralisiertem kollagenreichem Gewebe und calciumreichen bereits mineralisierten Knochenschollen an der Grenzfläche des Zements detektiert werden. Eine genauere Differenzierung der unmineralisierten Areale innerhalb der Knochenneubildungszonen ist bisher nicht möglich, da die Sekundärionen auch hier nicht spezifisch sind, sondern nur auf das Vorkommen von Kollagen hindeuten. Durch vergleichende lichtmikroskopische Betrachtungen war es aber möglich Osteoid, Knorpel und Granulationsgewebe zu identifizieren. Bereits in anderen Studien wurde ToF-SIMS als Methode benutzt, um Knochengewebe zu charakterisieren (Henss et al. 2013; Malmberg et al. 2007; Malmberg und Nygren 2008; Palmquist et al. 2012). Dabei wurden vor allem Verteilungen der Fragmente des HAs untersucht. Durch Ca^+ -Verteilungen in räumlichen Bezug zu anderen Gewebearten konnte eine Knochenneubildung festgestellt werden: beispielsweise in beschichteten makroporösen Eisenschäumen in einem metaphysären Knochendefektmodell bei Ratten (Ray et al. 2018). In Tiermodellen mit unterschiedlichen Implantatmaterialien konnte ebenfalls eine Knochenneubildung bestehend aus teils mineralisierten teils unmineralisierten Arealen an der

Implantatgrenzfläche festgestellt werden (Thormann et al. 2013; Palmquist et al. 2012). Auch zur Überprüfung der Knochenzusammensetzung und -struktur in osteoporotischen Tiermodellen wurde die ToF-SIMS-Analyse schon eingesetzt und konnte degenerative Knochenveränderungen detailliert darstellen (Henss et al. 2013). Die Trabekeldichte war dort zum Beispiel reduziert, was auch in dieser Studie auf den ToF-SIMS-Übersichtsaufnahmen der M3R-KO-Mäuse am Trabekelnetzwerk des ursprünglichen Knochens teilweise sichtbar war. Anhand der Verteilungsbilder von Ca^+ schien die Mineralisierung des neugebildeten Knochens jedoch in allen Gruppen ähnlich und homogen zu sein.

35 Tage nach Einbringen des Knochenersatzmaterials wurde nur ein kleiner Teil des Zements abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt. Der hier verwendete HA-bildende CPC zeigt generell eine langsame Resorption, die erst nach einigen Monaten bis Jahren abgeschlossen ist (Ambard und Mueninghoff 2006; Apelt et al. 2004). In dieser Phase der Frakturheilung kann daher noch keine Durchbauung des CPCs erwartet werden, und auch die Gewebsneubildung entspricht zunächst einem knöchern-hyalinknorpeligen Ersatzgewebe, dem provisorischen Kallus, der im Laufe von Wochen bis Monaten in reifen Lamellenknochen umgewandelt wird (Bigham-Sadegh und Oryan 2015). Auch hier hätte ein größerer Anteil an MBG zu einer stärkeren Porenbildung und Degradation und damit Infiltration durch neues Gewebe geführt. Nichtsdestotrotz ist eine Knochenneubildung und ein Gewebeeinwachsen in entstandene Poren sowohl bei gesunden als auch bei osteoporotischen Mäusen sichtbar, was die Biokompatibilität und Osteokonduktivität dieses Materials bestätigt. Die Technik der ToF-SIMS-Messungen in biologischem Gewebe ist daher für Untersuchungen des Mineralisierungsprozesses an Implantatoberflächen nützlich und unterstützt die Bewertung der Materialien (Eriksson et al. 2008).

Auch bei Titanimplantaten der Tibia im Tiermodell wurde die Grenzfläche mittels ToF-SIMS untersucht, um das Integrationsverhalten zu analysieren (Zou et al. 1997; Eriksson et al. 2008; Eriksson et al. 2007). Dabei konnte die knöcherne Integration an der Grenzfläche zwischen zwei verschiedenen Materialien durch verschiedene Sekundärionen von Implantatmaterial und Knochen gut charakterisiert werden. Nachteil bei der Beurteilung der knöchernen Integration in dieser Studie ist, dass der Knochenzement hier genauso wie der Knochen aus Calciumphosphaten besteht, die Sekundärionen von Implantat und Knochen sich hier also nicht unterscheiden. Es konnte eine knöcherne Integration durch den lückenlosen Übergang von Zement in neugebildetes Gewebe festgestellt werden, und CPC und Knochen können auch durch die verschiedenen Farbintensitäten bei der bildlichen Darstellung unterscheiden werden: Je intensiver das Rot, desto mehr Calcium konnte detektiert werden, sodass Zement intensiver rot, und Knochen schwächer rot dargestellt ist. Die genaue Grenzfläche und Wechselwirkungen zwischen Zement und

neugebildetem Knochen lassen sich jedoch mittels ToF-SIMS nicht so gut erkennen wie an der Grenzfläche zwischen zwei chemisch stark unterschiedlich zusammengesetzten Materialien mit verschiedenen charakteristischen Sekundärionen.

Die gemessenen *Counts* der Sekundärionen bieten semiquantitative Aussagen zu den entsprechenden Oberflächenkonzentrationen, grobe Unterschiede der Mineralisierung können beispielsweise durch Vergleich durchschnittlicher Zählraten von Calcium- oder Phosphor-Sekundärionen pro definierte Fläche erkannt werden (Henss et al. 2013). Absolute Zahlen können jedoch nicht einfach bestimmt werden, sodass dazu andere Methoden wie EDX-Messungen nötig sind, die in dieser Studie durchgeführt wurden. Weitere Limitationen von ToF-SIMS-Messungen sind, dass die Proben vakuumkompatibel und am besten nicht oder wenig chemisch vorbehandelt sein müssen, um Messungen nicht zu verfälschen oder sogar unmöglich zu machen (Henss et al. 2015). So musste auch hier beispielsweise vorher die Einbettmasse der Knochenschnitte oberflächlich entfernt werden, und nach bestimmten histologischen Färbungen waren keine ToF-SIMS-Messungen an denselben Schnitten mehr möglich, sodass benachbarte Schnitte benutzt werden mussten, die nicht mehr 100 %-ig vergleichbar waren.

Die parallele Erfassung aller chemischen Informationen der Probenoberfläche bot jedoch viele Vorteile. Um neue Knochenersatzmaterialien und den Prozess dessen knöcherner Integration besser zu verstehen, werden neuartige Analysewerkzeuge wie ToF-SIMS benötigt, die sonst eher im Bereich der Materialwissenschaften Anwendung finden, wobei sowohl die chemischen als auch die strukturellen Aspekte der Knochen-Implantat-Schnittstelle wichtig sind. Durch Kombination von ToF-SIMS mit herkömmlichen Gewebsuntersuchungen wie Lichtmikroskopie und REM werden detaillierte chemische Informationen mit strukturellen Informationen verknüpft, wodurch eine vollständige Charakterisierung anatomischer Strukturen an der Knochen-Implantat-Grenzfläche ermöglicht wird (Palmquist et al. 2012). Daher stellt die ToF-SIMS-Analyse ein wertvolles zusätzliches Werkzeug dar.

4.2 EDX-Quantifizierung und Ca / P-Verhältnis

Die Rasterelektronenmikroskopie bietet im Vergleich zur ToF-SIMS eine unübertroffene Bildgebung von Knochen und Knochen-Implantat-Grenzfläche, liefert aber nur in Kombination mit anderen Techniken wie der energiedispersiven Röntgenspektroskopie Informationen über die Probenzusammensetzung. Es können nur Elementverteilungen wie

die von Ca, P, und O, aber keine Molekülverteilungen erfasst werden (Malmberg und Nygren 2008).

EDX-Mappings bestätigten die Verteilung von Calcium und Silicium der ToF-SIMS-Analysen. Durch Verwendung der Nachbarschnitte stimmten die Verteilungen jedoch nicht zu 100% überein. EDX-Messungen haben den Vorteil, dass hier neben der Elementverteilung auch quantitative Aussagen zur Gewebszusammensetzung gemacht werden können (Lu et al. 2000). Es ist dadurch möglich, an beliebigen Stellen absolute Werte der elementaren Zusammensetzung zu bestimmen. Calcium- und Phosphor-Gehalt konnte daher an verschiedenen Stellen innerhalb des Zements, ursprünglichen oder neugebildeten Knochens bestimmt werden. Um genaue Messwerte zu erhalten, ist jedoch eine Kalibrierung an geeigneten Standards notwendig, daher kann es zu Messungenauigkeiten gekommen sein. Diese systematischen Fehler und andere instrumentelle Störparameter wurden durch die Ratio-Technik, bei der ein Quotient aus zwei Messergebnissen mit gleichem Fehler gebildet wird, bei der Berechnung eines Ca / P-Verhältnisses eliminiert. Die Genauigkeit dieser Methode kann außerdem durch das Vorhandensein von Fett, Knochenmark und Kollagen im Messfeld eingeschränkt sein. Weiterhin werden in den meisten Fällen Knochenproben mit Lösungsmitteln behandelt, wodurch etwas Calcium und Phosphor verloren geht und das Ca / P-Verhältnis gestört wird (Tzaphlidou und Zaichick 2004). Auch die rissige Oberfläche trägt zu Messungenauigkeiten bei, da die Schnittdicke nur 5 μm beträgt.

Die berechneten Verhältnisse des Zements, ursprünglichen und neugebildeten Knochens lassen sich in keiner Gruppe eindeutig einer bestimmten stöchiometrischen Calciumphosphatphase zuordnen, da sich die Ca / P-Verhältnisse zwischen den Referenzwerten der verschiedenen Calciumphosphatphasen und auch außerhalb dieser befanden. Da die Zusammensetzung nicht punktuell, sondern auf kleinen Flächen gemessen wurde, woraus das Ca / P-Verhältnis berechnet wurde, kann es sich um Mischformen aus den verschiedenen Calciumphosphaten handeln. Vor allem beim neugebildeten Knochen, der sich teilweise in der frühen Mineralisierungsphase befindet, sind verschiedene Calciumphosphatphasen wahrscheinlich, die mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an verschiedenen Stellen innerhalb einer Probe vorkommen, was die größte Streuung der Werte im neugebildeten Knochen erklären könnte.

ACP und OCP konnten bereits als Vorstufen von HA nachgewiesen werden (Campi et al. 2012). ACP wird mit einem breiten Spektrum des Ca / P-Verhältnisses zwischen 1,2 und 2,2 angegeben, und auch OCP und HA weisen durch nichtstöchiometrischen Aufbau in organischem Gewebe dementsprechend stark variierenden Ca / P-Verhältnisse

auf (Driessens et al. 1978; Canillas et al. 2017). Dies würde ebenfalls die kleineren Unterschiede der Messwerte des Zements im Vergleich zum Knochen erklären, da der Knochenzement aus einer definiert zusammengesetzten chemisch hergestellten Substanz besteht, die im Organismus nur noch aushärtet. CPCs basierend auf α -TCP (= α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mit dem Ca / P-Verhältnis von 1,5) härten in wässriger Lösung unter Bildung eines calciumdefizienten HA aus (Yubao et al. 1997). Da der hier verwendete Knochenzement neben dem Hauptbestandteil α -TCP aus weiteren Bestandteilen wie DCPA (= Dicalcium-phosphate-anhydrous = CaHPO_4), Calciumcarbonat (= CaCO_3) und PHA (= präzipitiertes Hydroxylapatit) besteht, liegt das Ca / P-Verhältnis des endgültig gebildeten Apatits ungefähr zwischen 1,5 und 1,69. In früheren Untersuchungen konnte nach Aushärtung ein carbonisiertes calciumdefizientes HA mit nicht umgesetzten Resten von DCPA und TCP nachgewiesen werden (Heinemann et al. 2013). Dazu passend wurden hier im Durchschnitt etwas niedrigere Ca / P-Verhältnisse im Knochenzement im Vergleich zu stöchiometrischem HA bestimmt.

Auch in Studien mit anderen Messmethoden konnten stark schwankende Ca / P-Verhältnisse gemessen werden. EDX gilt generell als geeignete Methode zur Ca- und P-Quantifizierung in Knochenproben, da sich die Messungen im Vergleich mit anderen etablierten Methoden in Bezug auf Genauigkeit und Zuverlässigkeit wenig unterscheiden (Akesson et al. 1994).

Schwankungen des Ca / P-Molverhältnisses wurden im menschlichen Knochen zwischen 0,58 und 2,34 bestimmt und erreichen nur selten den theoretischen Wert von 1,67 (Sotiropoulou et al. 2015). Einflussfaktoren, die für Variationen in der Zusammensetzung verantwortlich sind, sind vor allem Knochentyp (cortical / trabekulär, Geflechtknochen / Lamellenknochen) und Lokalisation im Körper, Alter oder Geschlecht (Kyriazis und Tzaphlidou 2004; Speller et al. 2005). Jüngerer neugebildeter Knochen weist geringere Ca / P-Verhältnisse auf, da die Kristallisation mit fortschreitendem Alter stattfindet (Ruffoni et al. 2007), das heißt jüngerer Knochen hat größere Anteile an HA-Vorstufen wie ACP und OCP, die geringere Ca / P-Verhältnisse aufweisen (Termine und Posner 1966). Auch bei den hier durchgeführten EDX-Analysen ergaben sich im neugebildeten Knochen im Vergleich zu ursprünglichem Knochen fast in allen Proben egal welcher Gruppe tendenziell niedrigere Mittelwerte der Ca / P-Verhältnisse. Da jedoch insgesamt große Schwankungen der Ca / P-Verhältnisse vorlagen, sind keine signifikanzbasierten Aussagen möglich.

Aber auch bei Knochenerkrankungen wie Osteoporose können Änderungen des Ca / P-Verhältnisses ein empfindliches Maß zur Erkennung von Mineralveränderungen

darstellen, denn eine Abnahme der Knochendichte kann auf eine Abnahme von entweder Ca oder P oder auf Veränderungen beider zurückzuführen sein.

In der Literatur finden sich gegensätzliche Angaben zur Beeinflussung des Ca / P-Verhältnisses durch Osteoporose: Zoehrer et al. (2012) fanden in humanen osteoporotischen Femurköpfen ein erhöhtes Ca / P-Verhältnis basierend auf einer Abnahme von P und Zunahme von Ca. Kourkoumelis et al. (2012) stellten bei Kaninchen signifikant niedrigere Ca / P-Verhältnisse der trabekulären Abschnitte im Vergleich zu corticalem Knochen fest, die wahrscheinlich die remodellierungsinduzierte Bildung des jüngeren trabekulären metabolisch aktiveren Knochens widerspiegeln. Bei Osteoporose, die entzündungsbedingt induziert wurde, waren die Ca / P-Verhältnisse des trabekulären Knochens jedoch nicht verändert, Ca- und P-Konzentrationen nahmen also unter einem konstanten Verhältnisschema durch Verlust von Knochenmasse ab. Im Gegensatz dazu waren die Ca / P-Verhältnisse des osteoporotischen corticalen Knochens im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert, die Verringerung der Knochendichte wird in diesem Fall auch von nichtproportionalen Konzentrationsänderungen von Ca und P begleitet. Auch Henss et al. (2013) stellten bei Ratten eine Abnahme des Ca / P-Verhältnisses der Osteoporosegruppe (Ovarektomie + Mangeldiät) durch Abnahme des Ca-Gehalts fest, was auf eine niedrigere Knochenqualität hinweist, wohingegen sich in der Referenzgruppe ohne Osteoporose eine Zunahme des Ca / P-Verhältnisses mit der Zeit beobachten lässt. Baslé et al. (1990) zeigten keine nachweisbaren Veränderungen der Elementkonzentrationen in Biopsien von Beckenknochen bei osteoporotischen Patienten, sodass das Verhältnis gleichblieb.

Auch in dieser Arbeit fanden sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Ca / P-Verhältnissen der osteoporotischen Mäuseknochen im Vergleich zu Knochen der WT-Mäuse, da es innerhalb der Gruppen schon zu großen Streuungen der Messwerte kam.

Das molare Ca / P-Verhältnis ist zwar ein Parameter, der zur Charakterisierung der Knochenmineralisierung herangezogen werden kann, da es sich bei den verschiedenen Calciumphosphatphasen unterscheidet, ist jedoch keine übliche Methode um den Einfluss von bestimmten Pharmaka oder lokalen Zusatzstoffen des Knochenzements auf die Frakturheilung zu untersuchen. Es lässt sich durch die hier dargestellten Ergebnisse vermuten, dass BDNF keinen Einfluss auf die Bildung der Calciumphosphatphasen hat. Durch die große Streuung der Werte, die zudem keine erkennbaren Veränderungen der Versuchsgruppe mit BDNF im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne BDNF zeigten, hat sich die Methode in dieser Studie jedoch als wenig aussagekräftig in Bezug auf Effekte des CPC-MBG-BDNF-Verbundstoffs auf die Mineralisierung erwiesen. Dies könnte auch

mit der vorher schon beschriebenen geringen Anzahl randständiger Partikel und damit geringen BDNF-Freisetzung zusammenhängen.

Um in weiteren Studien eventuelle Veränderungen der Calciumphosphatphasen durch modifizierte Knochenersatzmaterialien besser erkennen zu können, könnte zusätzlich die Transmissionselektronenmikroskopie von Interesse sein.

4.3 Osteocyten-Analyse

Dadurch, dass eine bessere Frakturheilung durch BDNF erhofft wurde, könnte auch eine erhöhte Osteocytenzahl, eine veränderte Morphologie dieser oder eine verstärkte Mineralisierung in der Umgebung der Osteocyten erwartet werden. Diese Erwartungen konnten nicht bestätigt werden. In der Gruppe der WT-Mäuse mit BDNF-funktionalisiertem Zement waren zwar durchschnittlich etwas mehr Osteocyten an der Zementgrenzfläche zu finden, der Anstieg war jedoch im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe ohne BDNF nicht signifikant. Die Osteocytenzahl innerhalb des gesamten neugebildeten Knochens, die hier bestimmt wurde, kann als Maß für die Knochenneubildung gesehen werden, da mit der Menge an neugebildetem Knochen auch die Osteocytenzahl steigt. Das Ergebnis passt daher zu der leicht vermehrten Knochenneubildung, die in der WT-Gruppe mit BDNF gemessen wurde (Kauschke et al. 2018b). In den osteoporotischen Gruppen war kein Unterschied der Osteocytenzahl durch BDNF festzustellen, was durch die unzureichende Freisetzung von BDNF durch wenige randständige aufgelöste MBG-Partikel vor allem in den M3R-KO-Gruppen erklärbar sein könnte.

An den Stellen, wo von einer BDNF-Freisetzung ausgegangen werden kann, zeigten die Osteocyten im neugebildeten Knochen keine veränderte Morphologie, sondern sahen in allen Proben ähnlich aus, sodass BDNF keine Auswirkungen darauf zu haben scheint, oder mögliche Veränderungen lichtmikroskopisch und durch ToF-SIMS-Detailaufnahmen nicht erfasst werden können. Auch Ida-Yonemochi et al. (2017), die die Stimulation der Knochenbildung in einem mandibulären Osteotomie-Modell der Ratte durch Injektion von BDNF testeten, beschrieben keine Veränderungen der Osteocyten, sondern schlossen aufgrund von starker TrkB-Expimierung auf Osteocytenoberflächen durch BDNF, die eine Signalkaskade mit folgender Osteoblastenstimulation auslöst, auf verstärkten Knochenaufbau bzw. sklerotische Veränderungen. Es ist bekannt, dass Osteocyten den Knochenumbau über Zell-Zell-Interaktionen mit Osteoklasten und Osteoblasten regulieren (Goldring 2015).

Ein Einfluss auf die Osteocyten könnten auch der CPC oder das MBG haben. Veränderungen dadurch würden in allen Gruppen gleichermaßen auftreten. Für Implantatmaterialien wie CPC und bioaktives Glas konnten schon stimulierende Effekte auf Osteoblasten festgestellt werden (Hoppe et al. 2011; Yu et al. 2013). Veränderungen der Osteocyten wurden bisher jedoch wenig untersucht.

Es wurde festgestellt, dass im neugebildeten Geflechtknochen rund um Knochenimplantate Osteocyten unregelmäßig verteilt sind (Haga et al. 2011), ansonsten wurden histologische Veränderungen von Osteocyten um Implantate nicht beschrieben, da Knochenersatzmaterialien eher auf die osteoblastäre Differenzierung und Proliferation zielen, um den Knochenaufbau zu fördern (Fini et al. 2004; Arcos et al. 2014; Sterling und Guelcher 2014; Long et al. 2007). Untersuchungen fokussieren daher auf Faktoren, die diese osteogenen und osteoinduktiven Eigenschaften beeinflussen und auf die Signalisation zwischen Osteocyten und Osteoblasten bzw. Osteoklasten, und nicht auf die Osteocyten an sich.

Ob BDNF neben der Osteoblastenstimulation einen Einfluss auf die Osteocyten hat, der ähnlich wie bei Nervenzellen (Arvanian 2013; Ortiz-López et al. 2017) oder Endothelzellen (Donovan et al. 2000) eine stabilisierende Wirkung als *survival factor* hat, konnte hier nicht beantwortet werden und wurde in anderen Studien noch nicht adressiert. Die Osteocytendichte, die als Anzahl pro definierter Knochenneubildungsfläche verstanden wird, wäre dabei interessant. Diese scheint in allen Gruppen ähnlich zu sein, wurde aber hier nicht genau bestimmt, da keine größeren aneinanderhängenden mineralisierten Flächen neugebildeten Knochens vorlagen, sondern die mineralisierten Flächen klein und innerhalb des unmineralisierten Gewebes verteilt waren, sodass eine Messung innerhalb eines bestimmten gröÙeneinheitlichen Areals in jedem Schnitt nicht sinnvoll gewesen wäre. Da BDNF bei der Frakturheilung eine Rolle spielt (Asaumi et al. 2000), könnte die Osteocytenzahl bzw. die Osteocytendichte in zukünftigen Studien mit höherer BDNF-Freisetzung von Interesse sein, um diesen stabilisierenden Effekt weiterhin zu untersuchen.

Auch die Probenverarbeitung ist für die Analyse der Osteocyten von Bedeutung. Durch das Schneiden der in Technovit eingebetteten Mäusefemora wird das Gewebe rissig und inadhärent. Diese Zerstückelung des Gewebes, vor allem der kleinen Mineralisierungszonen des neugebildeten Knochens, hat die Auswertung hier deutlich erschwert. Vor allem bei ToF-SIMS-Messungen ist eine glatte Schnittfläche wichtig, um Oberflächenartefakte zu vermeiden. Hier könnten andere Schnittpräparationen eventuell von Vorteil sein. Dadurch, dass ungefärbte Nachbarschnitte zur ToF-SIMS-Untersuchung

verwendet werden mussten, da bei der Silberfärbung das Calcium aus den Knochnschnitten herausgelöst wurde, konnten zudem nicht alle histologisch identifizierten Osteocyten mittels ToF-SIMS wiedergefunden werden, oder ein Vergleich war nicht exakt möglich, was auch mit der Schnittdicke (5 µm) zusammenhängt und dadurch die vorher identifizierten Osteocyten (Größe 10-40 µm) an der Oberfläche des benachbarten Schnitts zufällig nicht mehr oder nur teilweise getroffen wurden.

Trotzdem konnte durch ToF-SIMS-Scans erkannt werden, dass sich keine Sklerosierung oder verstärkte Mineralisierung in der Osteocytenumgebung fand. In allen Gruppen war eine gleichermaßen homogene Ca⁺-Verteilung mittels ToF-SIMS-Messungen zu sehen. Die Beobachtungen von Ida-Yonemochi et al. (2017), die Sklerosierungen im Alveolarknochen nach BDNF-Injektion feststellten, konnten hier also nicht bestätigt werden. Auch die von Busse et al. (2009) festgestellte inhomogene Mineralisierung im osteoporotischen Knochen konnte hier nicht nachgewiesen werden. Osteocyten können zwar durch die großflächige canaliculäre Vernetzung mögliche Veränderungen auch über eine größere Distanz anregen, dadurch dass hier aber erst eine teilweise Mineralisierung mit beginnender Ausbildung der Canaliculi vorliegt, wären mögliche Veränderung der Mineralisierung eher in der direkten Osteocytenumgebung zu erwarten. Dadurch, dass das canaliculäre Netzwerk im neugebildeten Knochen noch nicht vollständig ausgebildet ist (Bonewald 2011), und teilweise mit Knochenmatrix überlagert ist, welche dann als oberflächlichste analysierte Schicht sichtbar wird, konnten Canaliculi mittels ToF-SIMS nur ansatzweise erkannt werden.

Die rundliche Form der Osteocyten mit kurzen Ausläufern im neugebildeten Knochen im Vergleich zum typischen länglichen Aussehen im corticalen ursprünglichen Knochen kann durch die erst beginnende Mineralisierung in der Phase der Kallushärtung fünf Wochen nach der Operation erklärt werden. Es zeigte sich ein deutlich weniger ausgeprägtes canaliculäres Netzwerk. Zu diesem Zeitpunkt liegt noch kein reifes Knochengewebe vor, sodass die Canaliculi noch nicht vollständig ausgebildet sind und die Osteocyten sich noch in einer stoffwechselaktiveren Zwischenstufe befinden und dadurch noch nicht als Netzwerk aus synthesearmen flachen Zellen vorliegen (Knese 1979; Capulli et al. 2014). Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Morphologie der Osteocyten je nach Alter und Knochentyp unterscheidet. In trabekulärem Knochen sind sie runder als in corticalem Knochen, wo sie eine langgezogene Morphologie aufweisen (Currey 2003), und in neugebildetem jungem Knochen sind sie rund und unregelmäßig eingebettet im Vergleich zu einer regelmäßigen Organisation des osteocytären canaliculären Netzwerks nach allmählicher Remodellierung (Haga et al. 2011; Okada et al. 2002). Diese Unterschiede zwischen neugebildetem und ursprünglichem Knochen

waren in allen Gruppen ähnlich zu sehen, sodass keine deutlich schnellere Frakturheilung in bestimmten Gruppen im Vergleich zu anderen vorzuliegen schien.

Bei Osteoporose finden sich verschiedene Ergebnisse zur Osteocytendichte. Meist wird von einer reduzierten Osteocytendichte bei Patienten mit seniler Osteoporose berichtet, die mit der verringerten Anzahl von Osteoblasten zusammenhängt, die zum Einbetten in die Matrix verfügbar sind (Mullender et al. 2005; Pietschmann und Kersch-Schindl 2004) und auch bei postmenopausaler Osteoporose konnte eine signifikante Reduktion der Osteocyten und Osteoblasten festgestellt werden (Pavel et al. 2016). Andererseits konnten aber auch höhere Osteocytenzahlen im osteoporotischen Knochen gemessen werden mit der Erklärung, dass weniger Knochen pro Zelle produziert wird (Mullender et al. 1996). Im Gegensatz dazu war die Osteocytenzahl hier in den mineralisierten Zonen des neugebildeten Knochens in allen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, auch zwischen den gesunden und den osteoporotischen Gruppen konnten keine deutlich differierenden Osteocytenanzahlen nachgewiesen werden. Morphologische Unterschiede der Osteocyten der jeweiligen Knochenneubildungszonen waren ebenfalls nicht zu erkennen. Die Osteocyten sahen im Vergleich der WT- mit M3R-Gruppen ähnlich aus. Auch im ursprünglichen Knochen waren keine deutlichen Unterschiede der Osteocyten zwischen WT- und M3R-KO lichtmikroskopisch anhand der versilberten Knochen-schnitte zu erkennen. Dadurch, dass der osteoporotische Knochenstatus bei den M3R-KO-Mäusen auf anderen Mechanismen beruht, kann es daher hier zu anderen Ergebnissen im Vergleich zu menschlicher Osteoporose gekommen sein. Auch Lips et al. (2015) beschrieben keine Änderung der Osteocytenzahl der M3R-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen. Es konnten jedoch morphologische Unterschiede der Osteoblasten und Osteocyten, wie beispielsweise ein aufgetriebenes Cytoplasma bei den M3R-KO-Mäusen transmissionselektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Lips et al. 2015).

Ob der BDNF-funktionalisierte MBG-CPC-Verbundstoff die Osteocyten im osteoporotischen Knochen beeinflusst, sollte zukünftig in Studien mit höherer BDNF-Freisetzung untersucht werden, da auch hier das Problem der zu wenigen aufgelösten MBG-Partikel mit entsprechend wenig oder keiner BDNF-Freisetzung in den Versuchsgruppen eine eindeutige Wirkung auf die Osteocyten beeinträchtigt.

4.4 CPC-MBG-BDNF-Komposit als Knochenersatzmaterial

Viele medikamenten- oder zellbeladene Ersatzmaterialien wurden erforscht, aber nur wenige haben eine Zulassung für die kommerzielle Verwendung erhalten (Arcos et al. 2014). Knochenzemente basierend auf Calciumphosphat bewiesen schon lange Zeit gute Ergebnisse als Implantatmaterialien bei osteoporotischen Frakturen beispielsweise zur Defektfüllung oder zur Augmentation von Osteosynthesematerialien (Dorozhkin 2008). Vorteile wie Injizierbarkeit, Osteokonduktivität, niedrige Aushärtungstemperaturen, sowie eine ausreichende mechanische Primärstabilität machen CPCs zu geeigneten Knochenersatzmaterialien (Hillmeier et al. 2004). Durch die exzellente Biokompatibilität und die Verwendbarkeit als Trägerstoff, werden sie häufig eingesetzt (Wang et al. 2014). Als Grundsubstanz des Knochenersatzmaterials wurde daher auch hier ein CPC benutzt. Wie erwartet, zeigte der hier verwendete CPC-MBG-BDNF-Verbundstoff als Knochenersatzmaterial keine negativen Effekte auf das Gewebe. Knochenneubildung zeigte sich in unmittelbarer Nähe zum Implantat, es hat sich keine Kapsel um das Ersatzmaterial gebildet, sodass von einer guten Biokompatibilität ausgegangen werden kann.

Je nach Zusammensetzung der Zementpaste unterscheidet sich jedoch die Resorbierbarkeit der ausgehärteten Calciumphosphate. Der hier verwendete pastöse CPC basiert auf α -TCP, welches zu den HA-bildenden CPCs gehört. Diese werden generell nur langsam resorbiert (Ambard und Mueninghoff 2006). Es konnte auch hier beobachtet werden, dass nur wenig des eingebrachten CPCs abgebaut wurde. Nach Euthanasie der Tiere nach 35 Tagen war der Großteil noch vorhanden, lediglich die Grenzfläche zeigte sich durch beginnende Materialauflösung leicht zerklüftet aufgeraut als Zeichen der knöchernen Integration und Osteokonduktivität des Materials. Langsam abgebautes Ersatzmaterial konnte kontinuierlich durch neuen Knochen ersetzt werden.

Durch Zusatz von MBG-Partikeln konnte die Porosität durch Porenbildung nach Auflösung von MBG-Partikeln, die in Kontakt mit Knochenmark standen, gesteigert und somit die Abbaubarkeit des CPCs und die knöcherne Integration beschleunigt werden. Es wurde mesoporöses bioaktives $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ Glas mit einem molaren Verhältnis von $\text{Si / Ca / P} = 80 / 15 / 5$ der Zementpaste vor Einbringen in den Frakturspalt beigemischt. Nach 35 Tagen zum Ende der Studie waren alle Glaspartikel mit Gewebekontakt aufgelöst. Im Vergleich zu verschiedenen anderen Zusammensetzungen zeigten MBG-Partikel mit der hier verwendeten Zusammensetzung und Herstellung in Studien mit humanen Knochenzellen die beste in-vitro-Bioaktivität (Zhu et al. 2008). Wassermoleküle können in das offene Silicatnetzwerk des bioaktiven Glases leicht eindringen, was zur

Auflösung und Freisetzung von Ionen führt. Die Löslichkeit bioaktiver Gläser kann je nach Struktur und Zusammensetzung, wodurch sich chemische Eigenschaften ändern, von hervorragendem bis hin zu keinem Abbau variiert werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, bioaktive Gläser an klinische Anforderungen anzupassen (Brauer 2015). Um eine erhöhte Porosität des Knochenzements zu erreichen, wurden in unserer Studie leicht lösliche bioaktive Glaspartikel verwendet. Dies ist jedoch nur zielführend, wenn genügend Partikel durch Gewebekontakt aufgelöst werden können.

Einer der Gründe, der zu einer schlechteren Knochenregeneration führt, wenn synthetische Ersatzstoffe verwendet werden, ist auf den Mangel an Osteoinduktivität zurückzuführen (Wang und Yeung 2017). Auch hier spielt die Zusammensetzung des bioaktiven Glases eine Rolle, denn bei verschiedenen Biogläsern konnten alleine dadurch schon proangiogene und osteoinduktive Eigenschaften festgestellt werden (Hoppe und Boccacini 2015). Das in diesem Zusammenhang am besten erforschte Bioglas ist das mit der 45S5 Zusammensetzung (= 45 wt% SiO₂, 25 wt% CaO, 25 wt% Na₂O, 5 wt% P₂O₅), ein osteogenes Potential ist aber auch für andere Zusammensetzungen bewiesen, unter anderem für die in dieser Studie verwendete.

Zudem kann die fehlende Osteoinduktivität von CPCs durch Zusatzstoffe, für die sich MBG als Freisetzungssysteme als geeignet erwiesen, ergänzt werden. Vor allem zeichnet MBG sich durch eine hohe Beladungseffizienz aus (Baino et al. 2018), weshalb es als Arzneimittelabgabesystem von großem Interesse ist: das mesoporöse Netzwerk von Hohlräumen erlaubt es diesen Materialien, Arzneimittel einzuschließen, sie weisen dadurch eine verbesserte Adsorptionseigenschaft und eine vorhersagbare Freisetzungskinetik auf (Vallet-Regí et al. 2012; Schumacher et al. 2017). Das *Drug-Releasing*-Profil von MBG ist durch eine anfänglich schnelle gefolgt von einer langsamen Freisetzung gekennzeichnet (Zhao et al. 2008). Durch Einschluss von 100-250 µm kleinen Partikeln in CPC kann die Freisetzung von Zusatzstoffen, wie in diesem Fall BDNF, kontrolliert werden. Einzelne Partikel werden im Verlauf der CPC-Resorption aufgelöst und setzen erst dann BDNF frei, sodass es nicht zu einer Stoßfreigabe zu Beginn kommt, sondern dass zu verschiedenen Zeitpunkten während der Frakturheilung BDNF abgegeben wird. Durch Nutzung der MBG-Partikel als Abgabesystem für BDNF wurde eine verstärkte Knochenneubildung erhofft. Es kann davon ausgegangen werden, dass BDNF ausschließlich oder zumindest größtenteils an den Stellen freigesetzt wurde, wo sich randständige MBG-Partikel aufgelöst haben, und nicht frei durch die Zementmatrix diffundiert, wie es bei direkter Versetzung von CPC mit Pharmaka angenommen wird (Ginebra et al. 2012). Durch die Resorption des löslichen MBGs, das in den entsprechenden Gruppen mit BDNF versetzt war, konnte dieser Wachstumsfaktor seine Wirkung entfalten.

Insgesamt wurden jedoch zu wenige MBG-Partikel dem Zement beigemischt, sodass keine ausreichende Wirkung bei allen Versuchstieren erzielt werden konnte. Vor allem in der Gruppe der osteoporotischen Mäuse fanden sich in den hier analysierten Schnitten zufällig fast keine Poren durch randständige aufgelöste Partikel. Es könnte daher sinnvoll sein in zukünftigen Studien mehrere Schnitte eines Knochens zu untersuchen, um dann eventuell weitere Partikelporen am Rand des Zements zu finden.

Auch durch einen höheren Partikelanteil könnte beim osteoporotischen Knochen eine positive Wirkung von BDNF sichtbar werden, da die Menge zugesetzter Pharmaka eine entscheidende Rolle spielt: In diesem Experiment wurden zu wenige MBG-Partikel dem Zement beigemischt, sodass die BDNF-Freisetzung als nicht ausreichend beschrieben werden kann. Es wurden nur 21 ng BDNF pro Maus eingebracht. Dies war die maximale Menge, die an die MBG-Partikel gebunden werden konnte. Da sich nur in einzelnen Knochenschnitten randständige Partikel fanden, wodurch sich das MBG auflösen und in den entsprechenden Gruppen BDNF freigesetzt wurde, konnte keine eindeutige Aussage über die Wirkung von BDNF getroffen werden. In dieser Studie wurden 2 wt% MBG in den Knochenzement gemischt. Durch die Zugabe eines höheren Anteils an Glaspartikeln wäre es zwar zu einer vermehrten BDNF-Freisetzung gekommen, jedoch war dies zum Zeitpunkt des Studienbeginns nicht möglich, ohne das Abbinden des Zements zu gefährden. MBG kann außerdem die mechanischen und physikalischen Eigenschaften eines Zementmaterials verändern (Rezwan et al. 2006). Es könnte sich durch einen höheren Glaspartikelanteil der Zusammenhalt des CPC-MBG-Verbundstoffes reduzieren. Insbesondere für orthopädische Anwendungen sollten Knochenersatzmaterialien robust sein, um eine Primärstabilität der Fraktur zu garantieren. Sowohl die mechanische Primärstabilität als auch die biologische knöchernen Integration bzw. der langsame knöchernen Ersatz des Implantatmaterials sind von Bedeutung. Eine Möglichkeit wäre, mehr aber dafür kleinere MBG-Partikel zu verwenden, die dann gleichmäßiger verteilt wären. Mittlerweile ist es möglich bis zu 10 wt% MBG zuzugeben, ohne dass die mechanischen Eigenschaften des CPC-MBG-Komposits beeinträchtigt werden (Schumacher et al. 2017).

Durch einen längeren Beobachtungszeitraum, der einen kontinuierlichen Abbau des CPCs und eine schrittweise Auflösung weiterer MGB-Partikel mit BDNF-Freisetzung mit sich bringen würde, könnte in weiteren Studien auch die längerfristige Wirkung von BDNF-funktionalisiertem CPC-MBG-Knochenzement getestet werden.

Weitere Versuche sind jedoch diesbezüglich nötig und sinnvoll, um ein geeignetes Knochenersatzmaterial zu kreieren, vor allem weil angenommen werden kann, dass eine

höhere BDNF-Freisetzungsrates die Frakturheilung im osteoporotischen Knochen stimulieren könnte. Es konnte gezeigt werden, dass BDNF die Zellzahl humaner MSCs von osteoporotischen Spendern erhöht und bei einer Konzentration von 40 ng / ml die osteogene Differenzierung dieser steigert (Kauschke et al. 2018a). In der Studie von Ida-Yonemochi et al. (2017) wurden 5 µg BDNF in einen Unterkieferdefekt im Rattenmodell injiziert, nach 28 Tagen war die Regeneration signifikant beschleunigt und es wurde Osteosklerose induziert. Positive Auswirkungen von BDNF auf die Knochenbildung wurden bereits in vitro für eine murine Präosteoblasten-Zelllinie beobachtet (Ida-Yonemochi et al. 2017).

Einige weitere Studien geben Hinweise auf diese positiven wünschenswerten Eigenschaften von BDNF während der Frakturheilung:

Während Neurotrophine bekannte Schlüssel-moleküle für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Nervensystems sind, legen zunehmende Forschungsergebnisse nahe, dass sie auch eine wichtige Rolle im Knochen spielen: Verschiedene Zellen sowie Gewebe des Frakturkallus exprimieren Neurotrophine und ihre Rezeptoren und es wurde gezeigt, dass die lokale Anwendung von BDNF die Knochenheilung und die Wiederherstellung von parodontalem Gewebe durch Stimulierung der Knochen- und Knorpelbildung fördert (Su et al. 2018).

BDNF konnte in Osteoblasten-ähnlichen Zellen oder Osteoblasten in verschiedenen Modellen nachgewiesen werden und mehrfach konnten Hinweise darauf gegeben werden, dass BDNF eine potentielle Rolle während des Knochenumbaus und der Knochenbildung bei der Frakturheilung spielt, die Regeneration von Alveolarknochen fördert und an Differenzierungsprozessen beteiligt ist (Asaumi et al. 2000; Aiga et al. 2006; Kilian et al. 2014; Cai et al. 2010; Jimbo et al. 2014; Guo et al. 2016). Ebenfalls können Neurotrophine, insbesondere BDNF, eine positive Rolle bei der Förderung der Chondrogenese und Knorpelbildung spielen (Yamashiro et al. 2001). Eine verstärkte Knochenneubildung mit vermehrt fibrocartilaginären Anteilen konnte auch in unserer Studie vor allem in der Knochenneubildungszone der mit BDNF versorgten WT-Mäuse gefunden werden (Kauschke et al. 2018b).

Eine proangiogene und stabilisierende Wirkung von BDNF auf Endothelzellen wurde bisher für Kapillaren und Blutgefäße am Herz beschrieben (Donovan et al. 2000; Kermani und Hempstead 2007). Generell stimuliert BDNF die Migration von Endothelzellen (Matsuda et al. 2012), was dazu beitragen kann, die Geweberegeneration auch beispielsweise bei der Frakturheilung zu beschleunigen.

Bei größeren Knochendefekten, die bei osteoporotischen Frakturen meist auftreten und zudem langsam heilen (Nikolaou et al. 2009), sind Knochenersatzmaterialien nötig, die die Fraktur stabilisieren, Defekte füllen oder Osteosynthesematerial befestigen, sodass eine einfache Injektion von Wachstumsfaktoren wie BDNF nicht sinnvoll ist und der Umweg über ein geeignetes Trägermaterial gegangen werden sollte.

Knochenersatzmaterialien können das Zellverhalten und damit die Frakturheilung stark beeinflussen. Die Wechselwirkung zwischen Zellen und Material kann Prozesse wie Proliferation oder Differenzierung von Zellen regulieren. Der CPC-MBG-BDNF-Verbundstoff sollte in Zusammenschau der dargestellten Ergebnisse aus dieser und der anderen dargestellten Studien (Kauschke et al. 2018a; Kauschke et al. 2018b; Ida-Yonemochi et al. 2017; Asaumi et al. 2000; Aiga et al. 2006; Kilian et al. 2014; Cai et al. 2010; Jimbo et al. 2014; Guo et al. 2016; Yamashiro et al. 2001; Su et al. 2018; Donovan et al. 2000; Kermani und Hempstead 2007; Matsuda et al. 2012) daher weiterentwickelt und erforscht werden.

4.5 Osteoporose

Bei der immer älter werdenden Gesellschaft in Europa, in der ca. 20% der Bevölkerung älter als 65 Jahre alt ist (Eurostat 2018), werden auch Alterserkrankungen wie Osteoporose und die damit auftretenden Frakturen immer häufiger. Eine von drei Frauen und mindestens einer von sechs Männern werden in ihrem Leben eine osteoporotische Fraktur erleiden (Kanis et al. 2013a).

Typ-1-Osteoporose bezieht sich auf die schnelle Phase des Knochenverlustes, die ungefähr 5-10 Jahre nach der Menopause durch erhöhte Osteoklastenaktivität beobachtet wird, betrifft hauptsächlich trabekulären Knochen und manifestiert sich klinisch meist durch Frakturen des distalen Radius und der Wirbelkörper. Während postmenopausale Osteoporose durch Östrogenmangel verursacht wird, wird senile Osteoporose Alterungsprozessen wie Osteoblastendysfunktion zugeschrieben. Diese Osteoporose des Typs 2 umfasst sowohl trabekulären als auch corticalen Knochen. Neben Wirbelkörperfrakturen sind Hüftfrakturen charakteristisch für diese Art von Osteoporose (Pietschmann et al. 2009).

Auch bei der M3R-KO-Maus kommt es zu einer verminderten Knochendichte. Es wurde bereits gezeigt, dass die M3R-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus einen

osteoporotischen Phänotyp zeigt, und dadurch weder einer speziellen Diät noch Ovar-ektomien unterzogen werden muss, wie es in den meisten osteoporotischen Tiermodellen nötig ist (Kliemann et al. 2012; Lips et al. 2015). Das hier genutzte Modell eignet sich daher, um die Wirkung spezieller Ersatzmaterialien zu testen, da die klinische Situation osteoporotischer Frakturen widergespiegelt wird. Trotzdem bringt das Mausmodell auch Nachteile mit sich: Knochen dieser Mäuse ist zwar mit osteoporotischem Knochen vergleichbar, jedoch führen andere Mechanismen als beim Menschen zu Osteoporose. Im Vergleich zum Menschen ist die Gewichtsbelastung auf Frakturen bei Mäusen zudem wesentlich geringer, und Materialeigenschaften und Knochenregenerationsprozesse von Knochen verschiedener Zuchtstämme unterscheiden sich (Akhter et al. 2004; Li et al. 2001). Weiterhin haben kleine Nagetiere wie Mäuse eine primitivere Knochenstruktur ohne das im menschlichen corticalen Knochen vorliegende Havers-System, bei dem die funktionellen Einheiten des Knochens aus einem zentralen Knochenkanal und konzentrisch darum angeordneten Knochenlamellen bestehen (Nunamaker 1998). Obwohl sich die Knochenstruktur unterscheidet, ist der Prozess der Frakturheilung sehr ähnlich, sodass die Maus ein gutes Modell für die Frakturheilungsforschung ist (Haffner-Luntzer et al. 2016). Sowohl die Biokompatibilität des Implantatmaterials als auch dessen Stimulation der Frakturheilung bei Osteoporose können analysiert werden.

Typischerweise sind Frakturen der langen Röhrenknochen, die im Rahmen von Osteoporose auftreten, in der Metaphyse lokalisiert (Anil et al. 2010). Meist treten diese Frakturen am proximalen Femur auf (Warriner et al. 2011), aufgrund der komplizierten Handhabung in diesem Bereich im Mausmodell wurde ein distaler Frakturspalt erzeugt, da distale Femurfrakturen bei älteren Patienten die zweithäufigsten Fragilitätsfrakturen des Femurs darstellen (Nieves et al. 2010).

Die Stimulation der Osteoblastendifferenzierung zielt auf osteoporotische Patienten ab, da bekannt ist, dass bei Osteoporose das Potenzial zur Differenzierung zu Osteoblasten abnimmt und die Differenzierung zu Adipocyten erhöht ist (Wang et al. 2016). Die osteogene Differenzierung von humanen MSC ist also zugunsten der adipogenen Differenzierung gestört (Valenti et al. 2011), weshalb osteoporotischer Knochen spezielle osteoinduktive Materialien, die die osteoblastäre Differenzierung stimulieren, benötigt. Der hier erstmalig getestete CPC-MBG-BDNF-Verbundstoff könnte in verbesserter Zusammensetzung auf Grundlage der beschriebenen Ergebnisse diesen Eigenschaften gerecht werden. Vor diesem vielversprechenden Hintergrund sollten weitere in-vivo-Studien erfolgen, denn die wichtigsten klinischen Folgen von Osteoporose sind Frakturen aufgrund geringerer Knochenmasse und mikroarchitektonischer Verschlechterung des Knochengewebes. Durch die schlechte Knochenqualität und die verminderte

osteoblastische Aktivität ist der erfolgreiche Einsatz von Biomaterialien zur Frakturstabilisierung oder Augmentation bei osteoporotischen Patienten beeinträchtigt (Cornell 2003). Osteoporotisch bedingte Frakturen ziehen oft Komplikationen nach sich, die Heilung ist verzögert (Nikolaou et al. 2009), es treten Implantatversagen oder Re-Frakturen auf. Folglich kommt es zu einer verlängerten Immobilität, was zu höheren Morbiditätsraten führt (Leslie und Morin 2014).

Während eine systemische Osteoporosetherapie langsam abläuft, wirkt eine lokale Freisetzung osteogener Wirkstoffe bei osteoporotischen Frakturen schnell und zielgenau, um die Knochenstärke und -qualität an der benötigten Stelle zu erhöhen, sowie die Knochenheilungsperiode zu reduzieren und die Entwicklung einer problematischen Pseudarthrose zu verhindern (Kyllönen et al. 2015). Außerdem können lokale Abgaben Nebenwirkungen und Überdosierungsrisiken begrenzen. BDNF hat beispielsweise neben der untersuchten Wirkung bei der Frakturheilung wichtige andere Funktionen im Körper, die nicht adressiert werden, sondern nur den Zielort effektiv erreichen sollen. Die pharmakologische Modifikation von Knochenersatzmaterialien stellt als lokale Methode zur Verbesserung der knöchernen Integration und Heilung osteoporotischer Frakturen daher einen wichtigen Baustein in der Therapie der Osteoporose dar. Defektfüllende Ersatzmaterialien wie CPC sind wegen ihrer exzellenten Biokompatibilität, Osteokonduktivität und niedrigen Abbinde-temperatur häufig eingesetzt und auch als Trägerstoffe geeignet (Wang et al. 2014). Bei der Entwicklung solcher modifizierter Materialien ist es von besonderer Bedeutung neben den Materialeigenschaften auf die Eigenschaften des systemisch erkrankten Knochens zu achten.

4.6 Ausblick

Der Einsatz von verbesserten Knochenersatzmaterialien beispielsweise durch Funktionalisierung mit Wachstumsfaktoren, die die knöcherne Integration und den Heilungsprozess stimulieren, wäre im klinischen Alltag vor allem im systemisch erkrankten Knochen, der eine schlechtere Selbstheilung aufweist, wünschenswert.

Nach erfolgreicher Anwendung von BDNF *in vitro* bei osteoporotischen Stammzellen (Kauschke et al. 2018a) erfolgte hier der erste *in vivo* Schritt am Tiermodell. Erstmals wurde an einem osteoporotischen Mausfrakturmodell ein mit BDNF funktionalisierter CPC-MBG-Verbundstoff als Knochenersatzmaterial im metaphysären Knochen bei Osteoporose getestet. Durch ToF-SIMS- und vergleichende REM-, EDX-, und

lichtmikroskopische Auswertungen konnte vor allem an Zementspalten, die durch Auflösung von MBG-Partikeln entstanden sind, in den Gruppen mit BDNF eine deutliche Knochenneubildung detektiert werden. Jedoch waren nur in einzelnen Proben BDNF-beladene MBG-Partikel aufgelöst und auch innerhalb des Zements nur wenige Partikel zu finden.

Um einen signifikanten Einfluss von BDNF auf die Frakturheilung bei Osteoporose in vivo zu bestätigen, sollte in zukünftigen Modellen durch Veränderungen der prozentualen Zusammensetzung der Komponenten des Verbundstoffs die Wirkung von BDNF auf die Frakturheilung verbessert werden und durch längere Beobachtungszeiträume verifiziert werden. Durch einen höheren Anteil an MBG-Partikeln als Trägerstoff für BDNF und dementsprechend höheren BDNF-Konzentrationen, könnte auch dessen Freisetzung erhöht werden, die in diesem Modell mit 2 wt% MBG und 21 ng BDNF nicht ausreichend war. Die ideale Zusammensetzung erfordert daher weitere Forschungsarbeit, wobei die Erkenntnisse aus den ToF-SIMS-Messungen bei der Materialentwicklung beachtet werden sollten. Wichtig ist dabei neben der osteoinduktiven Eigenschaften durch Funktionalisierung auch weiterhin auf die mechanische Stabilität des Knochenersatzmaterials zu achten, sodass Lockerungen, Dislokationen oder Refrakturen vermieden werden. Auf der einen Seite könnte durch mehr MBG-Partikel eine höhere Porosität und gesteigerte BDNF-Freisetzung mit folglich Osteoinduktivität erreicht werden, auf der anderen Seite ist die Stabilität ebenso eine wichtige Aufgabe des Komposits, da gerade osteoporotische Frakturen oft Sekundärkomplikationen nach operativer Versorgung mit sich bringen.

Ziel ist ein für den klinischen Alltag einsatzbereites Knochenersatzmaterial zu schaffen, das an die Anforderungen des osteoporotischen Knochens angepasst ist. Die idealen Knochenersatzstoffe sollten also biokompatibel, resorbierbar, osteokonduktiv, osteoinduktiv, strukturell ähnlich dem natürlichen Knochen und einfach und schnell zu benutzen sein.

5 Zusammenfassung

Osteoporose gilt als einer der Hauptrisikofaktoren für eine verzögerte Frakturheilung, weshalb neue Knochenersatzmaterialien auf eine Verbesserung dieser zielen. CPC ist durch seine Osteokonduktivität und Biokompatibilität als Grundbaustein geeignet, und wurde in dieser Studie zur Stimulation der Knochenneubildung im murinen metaphysären Frakturspalt in Form von pastösem α -TCP-basiertem HA-bildendem Knochenzement mit BDNF-gekoppelten MBG-Partikeln versetzt. ToF-SIMS, REM / EDX und Lichtmikroskopie wurden zur Auswertung der Knochen-Zement-Grenzfläche benutzt.

ToF-SIMS-Messungen konnten verschiedene Material- und Gewebeverteilungen in räumlichem Bezug zueinander darstellen. Im Vergleich mit EDX-*Mappings* und lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten diese, dass an der Grenzfläche und in Poren des mit BDNF funktionalisierten CPC-MBG-Komposits sowohl bei WT- als auch bei osteoporotischen M3R-KO-Mäusen eine Knochenneubildung bestehend aus unmineralisiertem und bereits mineralisiertem Gewebe stattfand. Durch Auflösung von MBG-Partikeln und daraus resultierender Porenbildung wurde der Zementabbau und die knöcherne Integration an entsprechenden Stellen beschleunigt. Das meiste Material war nach 35 Tagen zum Ende des Experiments jedoch noch vorhanden. Mithilfe der chemischen Verteilung der ToF-SIMS und EDX-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass peripher im Zement liegende MBG-Partikel sich durch Kontakt mit dem Knochenmark auflösen und resorbiert werden konnten. Durch den hier verwendeten Anteil an MBG-Partikeln von 2 wt% lagen vor allem in der osteoporotischen Gruppe jedoch fast keine randständigen Partikel vor, weshalb die BDNF-Freisetzung aus dem Material als nicht ausreichend einzustufen ist. Aus diesem Grund konnten auch durch das Ca / P-Verhältnis bei der EDX-Quantifizierung und durch die Osteocytenauswertung keine deutlichen Unterschiede in den Gruppen mit BDNF im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne BDNF erkannt werden. An Poren, wo von einer BDNF-Wirkung ausgegangen werden kann, waren keine auffälligen Veränderungen der Osteocyten sowie der Mineralisierung sichtbar.

Zum einen kann schlussgefolgert werden, dass ein zu geringer Anteil an MBG (+ BDNF) dem CPC beigemischt wurde, zum anderen ist dadurch keine sichere Aussage über einen positiven Effekt von dem daher ebenfalls zu wenig freigesetzten BDNF möglich. Um eine deutliche Wirkung auf die Frakturheilung erzielen und diese beurteilen zu können, sollten deshalb in zukünftigen Studien deutlich mehr Partikel mit höheren Konzentrationen an BDNF als in dieser Studie möglich waren, dem Zement beigemischt werden.

6 Summary

Osteoporosis is considered to be one of the major risk factors for delayed fracture healing, therefore new implant materials are targeting the osteoinductive effect. Because of its osteoconductivity and biocompatibility CPC is a suitable material, which contains BDNF-coupled MBG particles to stimulate new bone formation in the murine metaphyseal fracture gap in the form of a pasty α -TCP-based HA-forming bone cement in this study. ToF-SIMS, REM / EDX and histological stainings were used to evaluate the interface of bone and implant material.

ToF-SIMS measurements were able to show distributions of different materials and tissues in spatial relation to each other. Compared with EDX mappings and histological analyses ToF-SIMS measurements revealed that bone formation of unmineralized bone matrix and partly mineralized tissue occurred at the interface and infiltrated the pores of the BDNF-functionalized CPC-MBG composite in both WT and osteoporotic M3R-KO mice. The dissolution of MBG particles and resulting pore formation accelerated cement removal and bone integration. However, most of the material was still present at the end of the study after 35 days. The chemical distribution of the ToF-SIMS and EDX measurements revealed that MBG particles located peripherally in the cement could dissolve and be resorbed by contact with the bone marrow. Due to the amount of MBG particles of 2 wt% which was used here, especially in the osteoporotic group almost no marginal particles were detected, so the BDNF release can be classified not to be sufficient. For this reason, also the Ca / P ratio of EDX quantification and the evaluation of osteocytes did not show any clear differences in the groups with BDNF compared to the control groups without BDNF. In pores where a release of BDNF can be expected no obvious changes in osteocytes and mineralization were seen.

Therefore, it can be concluded that, on the one hand the amount of MBG (+ BDNF), which was added to the CPC, was not enough and, on the other hand, no reliable statement about a positive effect of BDNF, which is also under-released, is possible. In order to achieve a clear effect on the fracture healing, in future studies more particles with higher concentrations of BDNF that was possible in this study should be added to the cement.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α -TCP	α -Tricalciumphosphat
ACh	Acetylcholin
ACP	Amorphes Calciumphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMD	Bone Mineral Density / Knochenmineraldichte
BMP	Bone morphogenetic protein
Ca	Calcium
CPC	Calciumphosphatzement
DCPA	Dicalcium-phosphate-anhydrous
dest.	destilliert
EDX	Energy-dispersive X-ray
HA	Hydroxylapatit
KO	Knock-out
M3R	muskarinischer Acetylcholinrezeptor 3
MBG	mesoporöses bioaktives Glas
MSC	mesenchymale Stammzellen
mAChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
OCP	Octacalciumphosphat
P	Phosphor
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PMMA	Polymethylmethacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskop
Si	Silicium
Sr	Strontium
TGF	Transforming growth factor
ToF-SIMS	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
Trk	Tropomyosin-receptor related kinase
WT	Wildtyp
wt%	Gewichtsprozent

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktionsprinzip der ToF-SIMS-Analyse	17
Abb. 2: Mausfrakturmodell intraoperativ, modifiziert nach Kauschke et al. (2018b)	21
Abb. 3: Quantifizierung mittels EDX.....	25
Abb. 4: Calciumverteilung am Beispiel eines Knochenschnitts einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF	30
Abb. 5: ToF-SIMS-Aufnahmen eines Knochenschnitts einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF	32
Abb. 6: Knochenschnitt einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF	34
Abb. 7: Knochenschnitt einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF.....	36
Abb. 8: Knochenschnitt einer Wildtyp-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF.....	37
Abb. 9: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF	39
Abb. 10: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF ..	40
Abb. 11: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF, modifiziert nach (Kauschke et al. 2018b).....	42
Abb. 12: Ca / P-Verhältnisse des Zements, ursprünglichen und neugebildeten Knochens der Wildtyp-Mäuse mit MBG-haltigem CPC mit oder ohne BDNF im Vergleich	43
Abb. 13: Ca / P-Verhältnisse des Zements, ursprünglichen und neugebildeten Knochens der M3R-KO-Mäuse mit MBG-haltigem CPC mit oder ohne BDNF im Vergleich	44
Abb. 14: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF ..	48
Abb. 15: Knochenschnitt einer M3R-KO-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF	49
Abb. 16: Knochenschnitt einer WT-Maus mit MBG-haltigem CPC ohne BDNF	50
Abb. 17: Knochenschnitt einer WT-Maus mit MBG-haltigem CPC mit BDNF.....	51
Abb. 18: Vergleich der Osteocytenzahlen im neugebildeten Knochen.....	53

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über verschiedene Calciumphosphate, modifiziert nach Sheikh et al. (2015)	6
Tab. 2: Gemittelte Ca / P-Verhältnisse beider Proben je Gruppe.....	45

7.4 Literaturverzeichnis

Aiga, A.; Asaumi, K.; Lee, Y.; Kadota, H.; Mitani, S.; Ozaki, T.; Takigawa, M. (2006): Expression of neurotrophins and their receptors tropomyosin-related kinases (Trk) under tension-stress during distraction osteogenesis. In: *Acta medica Okayama* 60 (5), S. 267–277.

Akesson, K.; Grynepas, M. D.; Hancock, R. G.; Odselius, R.; Obrant, K. J. (1994): Energy-dispersive X-ray microanalysis of the bone mineral content in human trabecular bone. A comparison with ICPEs and neutron activation analysis. In: *Calcified tissue international* 55 (3), S. 236–239.

Akhter, M. P.; Fan, Z.; Rho, J. Y. (2004): Bone intrinsic material properties in three inbred mouse strains. In: *Calcified tissue international* 75 (5), S. 416–420.

Alt, V.; Thormann, U.; Ray, S.; Zahner, D.; Dürselen, L.; Lips, K. et al. (2013): A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. In: *Acta biomaterialia* 9 (6), S. 7035–7042.

Ambard, A. J.; Mueninghoff, L. (2006): Calcium phosphate cement. Review of mechanical and biological properties. In: *Journal of prosthodontics: official journal of the American College of Prosthodontists* 15 (5), S. 321–328.

Anil, G.; Guglielmi, G.; Peh, W. C. G. (2010): Radiology of osteoporosis. In: *Radiologic clinics of North America* 48 (3), S. 497–518.

Apelt, D.; Theiss, F.; El-Warrak, A. O.; Zlinszky, K.; Bettschart-Wolfisberger, R.; Böhner, M. et al. (2004): In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. In: *Biomaterials* 25 (7-8), S. 1439–1451.

Arcos, D.; Boccaccini, A. R.; Böhner, M.; Diez-Perez, A.; Epple, M.; Gomez-Barrena, E. et al. (2014): The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis. In: *Acta biomaterialia* 10 (5), S. 1793–1805.

Arvanian, V. (2013): Role of neurotrophins in spinal plasticity and locomotion. In: *Current pharmaceutical design* 19 (24), S. 4509–4516.

Asaumi, K.; Nakanishi, T.; Asahara, H.; Inoue, H.; Takigawa, M. (2000): Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. In: *Bone* 26 (6), S. 625–633.

Baino, F.; Hamzehlou, S.; Kargozar, S. (2018): Bioactive glasses. Where are we and where are we going? In: *Journal of functional biomaterials* 9 (1).

Barrios, C.; Broström, L. A.; Stark, A.; Walheim, G. (1993): Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures. The prognostic value of osteoporosis. In: *Journal of orthopaedic trauma* 7 (5), S. 438–442.

Baslé, M. F.; Mauras, Y.; Audran, M.; Clochon, P.; Rebel, A.; Allain, P. (1990): Concentration of bone elements in osteoporosis. In: *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 5 (1), S. 41–47.

Beckmann, J.; Lips, K. S. (2013): The non-neuronal cholinergic system in health and disease. In: *Pharmacology* 92 (5-6), S. 286–302.

- Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Katche, C.; Slipczuk, L.; Rossato, J. I.; Goldin, A. et al. (2008): BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7), S. 2711–2716.
- Bellantone, M.; Coleman, N. J.; Hench, L. L. (2000): Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. In: *Journal of biomedical materials research* 51 (3), S. 484–490.
- Bellucci, D.; Sola, A.; Cannillo, V. (2016): Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase. State of the art and current applications. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 104 (4), S. 1030–1056.
- Bich, C.; Touboul, D.; Brunelle, A. (2014): Biomedical studies by ToF-SIMS imaging. In: *Biointerphases* 10 (1), S. 18901.
- Bigham-Sadegh, A.; Oryan, A. (2015): Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. In: *International wound journal* 12 (3), S. 238–247.
- Binkley, D. M.; Grandfield, K. (2017): Advances in multiscale characterization techniques of bone and biomaterials interfaces. In: *ACS Biomaterials, Science and Engineering*, S. 3678–3690.
- Blom, E. J.; Klein-Nulend, J.; Klein, C. P.; Kurashina, K.; van Waas, M. A.; Burger, E. H. (2000): Transforming growth factor-beta1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. In: *Journal of biomedical materials research* 50 (1), S. 67–74.
- Bonewald, L. F. (2011): The amazing osteocyte. In: *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (2), S. 229–238.
- Brauer, D. S. (2015): Bioactive glasses-structure and properties. In: *Angewandte Chemie (International edition in English)* 54 (14), S. 4160–4181.
- Brown, W. E.; Chow, L. C. (1976): Chemical properties of bone mineral. In: *Annual Review of Material Science* 6 (1), S. 213–236.
- Busse, B.; Hahn, M.; Soltau, M.; Zustin, J.; Püschel, K.; Duda, G. N.; Amling, M. (2009): Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis. Mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. In: *Bone* 45 (6), S. 1034–1043.
- Cai, X.; Luo, E.; Yuan, Q. (2010): Interaction between Schwann cells and osteoblasts in vitro. In: *International journal of oral science* 2 (2), S. 74–81.
- Campi, G.; Ricci, A.; Guagliardi, A.; Giannini, C.; Lagomarsino, S.; Cancedda, R. et al. (2012): Early stage mineralization in tissue engineering mapped by high resolution X-ray microdiffraction. In: *Acta biomaterialia* 8 (9), S. 3411–3418.
- Canillas, M.; Pena, P.; Aza, A. H. de; Rodríguez, M. A. (2017): Calcium phosphates for biomedical applications. In: *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 56 (3), S. 91–112.

- Capulli, M.; Paone, R.; Rucci, N. (2014): Osteoblast and osteocyte. Games without frontiers. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 561, S. 3–12.
- Caulfield, M. P. (1993): Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. In: *Pharmacology & Therapeutics* 58 (3), S. 319–379.
- Chao, M. V. (2003): Neurotrophins and their receptors. A convergence point for many signalling pathways. In: *Nature reviews. Neuroscience* 4 (4), S. 299–309.
- Chen, L.; Zhu, Z.; Peng, X.; Wang, Y.; Wang, Y.; Chen, M. et al. (2014): Hepatic magnetic resonance imaging with T2* mapping of ovariectomized rats. Correlation between iron overload and postmenopausal osteoporosis. In: *European radiology* 24 (7), S. 1715–1724.
- Cheung, W. H.; Mclau, T.; Chow, S. K.; Yang, F. F.; Alt, V. (2016): Fracture healing in osteoporotic bone. In: *Injury* 47, S. 21-S26.
- Clarke, B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 3 (3), S. 131-139.
- Cohen Jr., M. M. (2006): The new bone biology. Pathologic, molecular, and clinical correlates. In: *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A (23), S. 2646–2706.
- Cornell, C. N. (2003): Internal fracture fixation in patients with osteoporosis. In: *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 11 (2), S. 109–119.
- Cosman, F.; Beur, S. J. de; LeBoff, M. S.; Lewiecki, E. M.; Tanner, B.; Randall, S.; Lindsay, R. (2014): Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. In: *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 25 (10), S. 2359–2381.
- Crane, N. J.; Popescu, V.; Morris, M. D.; Steenhuis, P.; Ignelzi, M. A. (2006): Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. In: *Bone* 39 (3), S. 434–442
- Currey, J. D. (2003): The many adaptations of bone. In: *Journal of biomechanics* 36 (10), S. 1487–1495.
- Dahl, O. E.; Garvik, L. J.; Lyberg, T. (1994): Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. In: *Acta orthopaedica Scandinavica* 65 (2), S. 147–153.
- Donovan, M. J.; Lin, M. I.; Wiegand, P.; Ringstedt, T.; Kraemer, R.; Hahn, R. et al. (2000): Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. In: *Development* 127 (21), S. 4531–4540.
- Dorozhkin, S. V. (2008): Calcium orthophosphate cements for biomedical application. In: *Journal of Materials Science* 43 (9), S. 3028–3057.
- Dorozhkin, S. V.; Epple, M. (2002): Biological and medical significance of calcium phosphates. In: *Angewandte Chemie International Edition* 41 (17), S. 3130–3146.
- Driessens, F. C.; Khairoun, I.; Boltong, M. G.; Planell, J. A. (1997): Design of a calcium phosphate bone cement suitable for the fixation of metal endoprotheses. In: *Bioceramics* 10, S. 279-281.

- Driessens, F. C.; van Dijk, J. W.; Borggreven, J. M. (1978): Biological calcium phosphates and their role in the physiology of bone and dental tissues I. Composition and solubility of calcium phosphates. In: *Calcified Tissue Research* 26 (2), S. 127–137.
- Duque, G.; Troen, B. R. (2008): Understanding the mechanisms of senile osteoporosis. New facts for a major geriatric syndrome. In: *Journal of the American Geriatrics Society* 56 (5), S. 935–941.
- Eanes, E. D.; Meyer, J. L. (1977): The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH. In: *Calcified Tissue Research* 23 (1), S. 259–269.
- Eglen, R. M. (2006): Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. In: *Autonomic & autacoid pharmacology* 26 (3), S. 219–233.
- Eidelman, N.; Eanes, E. D. (2001): Role of OCP in biological processes. In: *Monographs in oral science* 18, S. 50–76.
- En-Nosse, M.; Hartmann, S.; Trinkaus, K.; Alt, V.; Stigler, B.; Heiss, C. et al. (2009): Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis. In: *Cell and Tissue Research* 338 (2), S. 203–215.
- Ensrud, K. E.; Crandall, C.J. (2017): Osteoporosis. In: *Annals of internal medicine* 167 (3), S. 17–32.
- Epple, M. (2003): Biomaterialien und Biomineralisation. Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag (Teubner Studienbücher Chemie), S. 66.
- Eriksson, C.; Malmberg, P.; Nygren, H. (2008): Time-of-flight secondary ion mass spectrometric analysis of the interface between bone and titanium implants. In: *Rapid communications in mass spectrometry* 22 (7), S. 943–949.
- Eriksson, C.; Ohlson, K.; Richter, K.; Billerdahl, N.; Johansson, M.; Nygren, H. (2007): Callus formation and remodeling at titanium implants. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 83 (4), S. 1062–1069.
- Eurostat (2018): Europäische Union: Altersstruktur in den Mitgliedsstaaten im Jahr 2017. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/248981/umfrage/altersstruktur-in-den-eu-laendern/>.
- Fillingham, Y.; Jacobs, J. (2016): Bone grafts and their substitutes. In: *The bone & joint journal* 98-B (1 Suppl A), S. 6–9.
- Fini, M.; Giavaresi, G.; Torricelli, P.; Borsari, V.; Giardino, R.; Nicolini, A.; Carpi, A. (2004): Osteoporosis and biomaterial osteointegration. In: *Biomedicine & pharmacotherapy* 58 (9), S. 487–493.
- Fletcher, J. S.; Vickerman, J. C. (2010): A new SIMS paradigm for 2D and 3D molecular imaging of bio-systems. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 396 (1), S. 85–104.
- Florencio-Silva, R.; Sasso, G.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M. J.; Cerri, P. S. (2015): Biology of bone tissue. Structure, function, and factors that influence bone cells. In: *BioMed research international* 2015, S. 1-17.

- Gautam, D.; Gavrilova, O.; Jeon, J.; Pack, S.; Jou, W.; Cui, Y. et al. (2006): Beneficial metabolic effects of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency. In: *Cell metabolism* 4 (5), S. 363–375.
- Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. (2005): Bone substitutes. An update. In: *Injury* 36 (3), S. 20-27.
- Ginebra, M.; Canal, C.; Espanol, M.; Pastorino, D.; Montufar, E. B. (2012): Calcium phosphate cements as drug delivery materials. In: *Advanced drug delivery reviews* 64 (12), S. 1090–1110.
- Goldhahn, J.; Suhm, N.; Goldhahn, S.; Blauth, M.; Hanson, B. (2008a): Influence of osteoporosis on fracture fixation - a systematic literature review. In: *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 19 (6), S. 761–772.
- Goldhahn, J.; Scheele, W. H.; Mitlak, B. H.; Abadie, E.; Aspenberg, P.; Augat, P. et al. (2008b): Clinical evaluation of medicinal products for acceleration of fracture healing in patients with osteoporosis. In: *Bone* 43 (2), S. 343–347.
- Goldring, S. R. (2015): The osteocyte. Key player in regulating bone turnover. In: *RMD open* 1 (1).
- Grifka, J.; Kuster, M. (2011): Orthopädie und Unfallchirurgie. Für Praxis, Klinik und Facharztprüfung. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Guo, Y.; Dong, S.; Chen, X.; Jing, Y.; Yang, M.; Yan, H. et al. (2016): Integrating epigenomic elements and GWASs identifies BDNF gene affecting bone mineral density and osteoporotic fracture risk. In: *Scientific reports* 6, S. 30558.
- Haffner-Luntzer, M.; Kovtun, A.; Rapp, A. E.; Ignatius, A. (2016): Mouse Models in Bone Fracture Healing Research. In: *Current Molecular Biology Reports* 2 (2), S. 101–111.
- Haga, M.; Nozawa-Inoue, K.; Li, M.; Oda, K.; Yoshie, S.; Amizuka, N.; Maeda, T. (2011): A morphological analysis on the osteocytic lacunar canalicular system in bone surrounding dental implants. In: *Anatomical record* 294 (6), S. 1074–1082.
- Haga, T. (2013): Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 89 (6), S. 226–256.
- Heinemann, S.; Rössler, S.; Lemm, M.; Ruhnnow, M.; Nies, B. (2013): Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. In: *Acta biomaterialia* 9 (4), S. 6199–6207.
- Heiss, C.; Govindarajan, P.; Schlewitz, G.; Hemdan, N. Y. A.; Schliefer, N.; Alt, V. et al. (2012): Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. In: *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 18 (6), S. 199-207.
- Hench, L. L.; Jones, J. R. (2015): Bioactive glasses. Frontiers and challenges. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3, S. 194.

- Henss, A.; Hild, A.; Rohnke, M.; Wenisch, S.; Janek, J. (2015): Time of flight secondary ion mass spectrometry of bone-Impact of sample preparation and measurement conditions. In: *Biointerphases* 11 (2).
- Henss, A.; Rohnke, M.; El Khassawna, T.; Govindarajan, P.; Schlewitz, G.; Heiss, C.; Janek, J. (2013): Applicability of ToF-SIMS for monitoring compositional changes in bone in a long-term animal model. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 10 (86).
- Hillmeier, J.; Meeder, P. J.; Nöldge, G.; Kock, H. J.; Da Fonseca, K.; Kasperk, H. C. (2004): Augmentation von Wirbelkörperfrakturen mit einem neuen Calciumphosphat-Zement nach Ballon-Kyphoplastie. In: *Der Orthopäde* 33 (1), S. 31–39.
- Hoppe, A.; Boccaccini, A. R. (2015): Biological impact of bioactive glasses and their dissolution products. In: *Frontiers of oral biology* 17, S. 22–32.
- Hoppe, A.; Güldal, N. S.; Boccaccini, A. R. (2011): A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. In: *Biomaterials* 32 (11), S. 2757–2774.
- Ida-Yonemochi, H.; Yamada, Y.; Yoshikawa, H.; Seo, K. (2017): Locally produced BDNF promotes sclerotic change in alveolar bone after nerve injury. In: *PloS one* 12 (1).
- Jimbo, R.; Tovar, N.; Janal, M. N.; Mousa, R.; Marin, C.; Yoo, D. et al. (2014): The effect of brain-derived neurotrophic factor on periodontal furcation defects. In: *PloS one* 9 (1).
- Jones, J. R. (2015): Reprint of. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. In: *Acta biomaterialia* 23, S. 53-82.
- Jones, J. R.; Brauer, D. S.; Hupa, L.; Greenspan, D. C. (2016): Bioglass and bioactive glasses and their impact on healthcare. In: *International Journal of Applied Glass Science* 7 (4), S. 423–434.
- Josten, C. (2012): Osteoporotische Frakturen. Was ist neu? In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 83 (10), S. 857.
- Kajiya, M.; Shiba, H.; Fujita, T.; Ouhara, K.; Takeda, K.; Mizuno, N. et al. (2008): Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (23), S. 16259–16267.
- Kanis, J. A.; Borgström, F.; Compston, J.; Dreinhöfer, K.; Nolte, E.; Jonsson, L. et al. (2013a): SCOPE. A scorecard for osteoporosis in Europe. In: *Archives of osteoporosis* 8, S. 144.
- Kanis, J. A.; McCloskey, E. V.; Johansson, H.; Cooper, C.; Rizzoli, R.; Reginster, J-Y (2013b): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. In: *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 24 (1), S. 23–57.
- Kauschke, V.; Gebert, A.; Calin, M.; Eckert, J.; Scheich, S.; Heiss, C.; Lips, K. S. (2018a): Effects of new beta-type Ti-40Nb implant materials, brain-derived neurotrophic factor, acetylcholine and nicotine on human mesenchymal stem cells of osteoporotic and non-osteoporotic donors. In: *PloS one* 13 (2).

- Kauschke, V.; Lips, K. S.; Heiss, C.; Schnettler, R. (2014): Expression of muscarinic acetylcholine receptors M3 and M5 in osteoporosis. In: *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 20, S. 869–874.
- Kauschke, V.; Schneider, M.; Jauch, A.; Schumacher, M.; Kampschulte, M.; Rohnke, M. et al. (2018b): Effects of a pasty bone cement containing brain-derived neurotrophic factor-functionalized mesoporous bioactive glass particles on metaphyseal healing in a new murine osteoporotic fracture model. In: *International journal of molecular sciences* 19 (11).
- Kermani, P.; Hempstead, B. (2007): Brain-derived neurotrophic factor. A newly described mediator of angiogenesis. In: *Trends in cardiovascular medicine* 17 (4), S. 140–143.
- Kilian, O.; Hartmann, S.; Dongowski, N.; Karnati, S.; Baumgart-Vogt, E.; Hartel, F. V. et al. (2014): BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft* 196 (5), S. 286–295.
- Klein, R. F. (2008): Genetics of osteoporosis – Utility of mouse models. In: *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interaction* 8, S. 287–290.
- Kliemann, K.; Kneffel, M.; Bergen, I.; Kampschulte, M.; Langheinrich, A.C.; Durselen, L. et al. (2012): Quantitative analyses of bone composition in acetylcholine receptor M3R and alpha7 knockout mice. In: *Life sciences* 91 (21-22), S. 997–1002.
- Kling, J. M.; Clarke, B. L.; Sandhu, N. P. (2014): Osteoporosis prevention, screening, and treatment. A Review. In: *Journal of Women's Health* 23 (7), S. 563–572.
- Knese, K. (1979): Stützgewebe und Skelettsystem. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Die Gewebe. 5. Teil, 2 / 5).
- Kourkoumelis, N.; Balatsoukas, I.; Tzaphlidou, M. (2012): Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. In: *Journal of biological physics* 38 (2), S. 279–291.
- Kyllönen, L.; D'Este, M.; Alini, M.; Eglin, D. (2015): Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. In: *Acta biomaterialia* 11, S. 412–434.
- Kyriazis, V.; Tzaphlidou, M. (2004): Skeletal calcium/phosphorus ratio measuring techniques and results. I. Microscopy and microtomography. In: *TheScientificWorldJournal* 4, S. 1027–1034.
- Leslie, W. D.; Morin, S. N. (2014): Osteoporosis epidemiology 2013. Implications for diagnosis, risk assessment, and treatment. In: *Current opinion in rheumatology* 26 (4), S. 440–446.
- Li, X.; Gu, W.; Masinde, G.; Hamilton-Ulland, M.; Rundle, C. H.; Mohan, S.; Baylink, D. J. (2001): Genetic variation in bone-regenerative capacity among inbred strains of mice. In: *Bone* 29 (2), S. 134–140.
- Lindner, T.; Kanakaris, N. K.; Marx, B.; Cockbain, A.; Kontakis, G.; Giannoudis, P. V. (2009): Fractures of the hip and osteoporosis. The role of bone substitutes. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 91 (3), S. 294–303.

- Link, D. P.; van den Dolder, J.; van den Beucken, J. J.; Wolke, J. G.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A. (2008): Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF-beta 1 loaded gelatin microparticles. In: *Biomaterials* 29 (6), S. 675–682.
- Lips, K. S.; Kneffel, M.; Willscheid, F.; Mathies, F. M.; Kampschulte, M.; Hartmann, S. et al. (2015): Altered ultrastructure, density and cathepsin K expression in bone of female muscarinic acetylcholine receptor M3 knockout mice. In: *International immunopharmacology* 29 (1), S. 201–207.
- Liu, P.; Chen, Y.; Feng, C.; Lin, Y.; Yu, T. (2011): Muscarinic acetylcholine receptors present in human osteoblast and bone tissue. In: *European journal of pharmacology* 650 (1), S. 34–40.
- Lode, A.; Heiss, C.; Knapp, G.; Thomas, J.; Nies, B.; Gelinsky, M.; Schumacher, M. (2017): Strontium-modified premixed calcium phosphate cements for the therapy of osteoporotic bone defects. In: *Acta biomaterialia*.
- Long, W. G. de; Einhorn, T. A.; Koval, K.; McKee, M.; Smith, W.; Sanders, R.; Watson, T. (2007): Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 89 (3), S. 649–658.
- Lu, B.; Nagappan, G.; Lu, Y. (2014): BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. In: *Handbook of experimental pharmacology* 220, S. 223–250.
- Lu, H. B.; Campbell, C. T.; Graham, D. J.; Ratner, B. D. (2000): Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS. In: *Analytical chemistry* 72 (13), S. 2886–2894.
- Maeda, S. S.; Lazaretti-Castro, M. (2014): An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. In: *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 58 (2), S. 162–171.
- Mahamid, J.; Sharir, A.; Gur, D.; Zelzer, E.; Addadi, L.; Weiner, S. (2011): Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles. A cryo-electron microscopy study. In: *Journal of structural biology* 174 (3), S. 527–535.
- Malmberg, P.; Bexell, U.; Eriksson, C.; Nygren, H.; Richter, K. (2007): Analysis of bone minerals by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. A comparative study using monoatomic and cluster ions sources. In: *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* 21 (5), S. 745–749.
- Malmberg, P.; Nygren, H. (2008): Methods for the analysis of the composition of bone tissue, with a focus on imaging mass spectrometry (TOF-SIMS). In: *Proteomics* 8 (18), S. 3755–3762.
- Mark, H.; Penington, A.; Nannmark, U.; Morrison, W.; Messina, A. (2004): Microvascular invasion during endochondral ossification in experimental fractures in rats. In: *Bone* 35 (2), S. 535–542.
- Matsuda, S.; Fujita, T.; Kajiyama, M.; Takeda, K.; Shiba, H.; Kawaguchi, H.; Kurihara, H. (2012): Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin α v β 3-FAK cascade. In: *Journal of cellular physiology* 227 (5), S. 2123–2129.

- Matsui, M.; Motomura, D.; Karasawa, H.; Fujikawa, T.; Jiang, J.; Komiya, Y. et al. (2000): Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17), S. 9579–9584.
- McCann, R. M.; Colleary, G.; Geddis, C.; Clarke, S. A.; Jordan, G. R.; Dickson, G. R.; Marsh, D. (2008): Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 26 (3), S. 384–393.
- Moore, D. C.; Frankenburg, E. P.; Goulet, J. A.; Goldstein, S. A. (1997): Hip screw augmentation with an in situ-setting calcium phosphate cement. An in vitro biomechanical analysis. In: *Journal of orthopaedic trauma* 11 (8), S. 577–583.
- Morgan, E. F.; Yetkinler, D. N.; Constantz, B. R.; Dauskardt, R. H. (1997): Mechanical properties of carbonated apatite bone mineral substitute. Strength, fracture and fatigue behaviour. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8 (9), S. 559–570.
- Moroni, A.; Hoang-Kim, A.; Lio, V.; Giannini, S. (2006): Current augmentation fixation techniques for the osteoporotic patient. In: *Scandinavian journal of surgery: SJS: official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society* 95 (2), S. 103–109.
- Mouriño, V.; Boccaccini, A. R. (2010): Bone tissue engineering therapeutics. Controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 7 (43), S. 209–227.
- Mulisch, M.; Welsch, U. (Hg.) (2015): *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Mullender, M. G.; Tan, S. D.; Vico, L.; Alexandre, C.; Klein-Nulend, J. (2005): Differences in osteocyte density and bone histomorphometry between men and women and between healthy and osteoporotic subjects. In: *Calcified tissue international* 77 (5), S. 291–296.
- Mullender, M. G.; van der Meer, D. D.; Huiskes, R.; Lips, P. (1996): Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. In: *Bone* 18 (2), S. 109–113
- Nakahashi, T.; Fujimura, H.; Altar, C. A.; Li, J.; Kambayashi, J.; Tandon, N. N.; Sun, B. (2000): Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. In: *FEBS Letters* 470 (2), S. 113–117.
- Nakanishi, T.; Takahashi, K.; Aoki, C.; Nishikawa, K.; Hattori, T.; Taniguchi, S. (1994): Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line. In: *Biochemical and biophysical research communications* 198 (3), S. 891–897.
- Niethard, F. U.; Pfeil, J.; Biberthaler, P. (2017): *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 8., unveränderte Auflage (Duale Reihe).
- Nieves, J. W.; Bilezikian, J. P.; Lane, J. M.; Einhorn, T. A.; Wang, Y.; Steinbuch, M.; Cosman, F. (2010): Fragility fractures of the hip and femur. Incidence and patient characteristics. In: *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 21 (3), S. 399–408.

- Nikolaou, V. S.; Efstathopoulos, N.; Kontakis, G.; Kanakaris, N. K.; Giannoudis, P. V. (2009): The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. In: *Injury* 40 (6), S. 663–668.
- Nunamaker, D. M. (1998): Experimental models of fracture repair. In: *Clinical orthopaedics and related research* (355), S. 56-65.
- Nygren, H.; Malmberg, P. (2007): High resolution imaging by organic secondary ion mass spectrometry. In: *Trends in biotechnology* 25 (11), S. 499–504.
- Oe, K.; Miwa, M.; Sakai, Y.; Lee, S. Y.; Kuroda, R.; Kurosaka, M. (2007): An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 89 (1), S. 133–138.
- Okada, S.; Yoshida, S.; Ashrafi, S. H.; Schraufnagel, D. E. (2002): The canalicular structure of compact bone in the rat at different ages. In: *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 8 (2), S. 104–115.
- Ortiz-López, L.; Vega-Rivera, N. M.; Babu, H.; Ramírez-Rodríguez, G. B. (2017): Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Cell Survival and the Migration of Murine Adult Hippocampal Precursor Cells During Differentiation In Vitro. In: *Neurotoxicity research* 31 (1), S. 122–135.
- Palmquist, A.; Emanuelsson, L.; Sjövall, P. (2012): Chemical and structural analysis of the bone-implant interface by TOF-SIMS, SEM, FIB and TEM. Experimental study in animal. In: *Applied Surface Science* 258 (17), S. 6485–6494.
- Panzavolta, S.; Torricelli, P.; Bracci, B.; Fini, M.; Bigi, A. (2009): Alendronate and Pamidronate calcium phosphate bone cements. Setting properties and in vitro response of osteoblast and osteoclast cells. In: *Journal of inorganic biochemistry* 103 (1), S. 101–106.
- Pavel, O. R.; Popescu, M.; Novac, L.; Mogoantă, L. Ț.; Pavel, L. Ț. P.; Vicaș, R. M.; Trăistaru, M. R. (2016): Postmenopausal osteoporosis - clinical, biological and histopathological aspects. In: *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 57 (1), S. 121–130.
- Pietschmann, P.; Kersch-Schindl, K. (2004): Knochenqualität - wissenschaftliche Aspekte versus praktischer Relevanz. In: *Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen* 11 (3), S. 24–26.
- Pietschmann, P.; Rauner, M.; Sipos, W.; Kersch-Schindl, K. (2009): Osteoporosis. An age-related and gender-specific disease - a mini-review. In: *Gerontology* 55 (1), S. 3–12.
- Pisani, P.; Renna, M. D.; Conversano, F.; Casciaro, E.; Di Paola, M.; Quarta, E. et al. (2016): Major osteoporotic fragility fractures. Risk factor updates and societal impact. In: *World journal of orthopedics* 7 (3), S. 171–181.
- Pountos, I.; Georgouli, T.; Henshaw, K.; Bird, H.; Jones, E.; Giannoudis, P. V. (2010): The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic

- differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. In: *Journal of orthopaedic trauma* 24 (9), S. 552–556.
- Rahaman, M. N.; Day, D. E.; Bal, B. S.; Fu, Q.; Jung, S. B.; Bonewald, L. F.; Tomsia, A. P. (2011): Bioactive glass in tissue engineering. In: *Acta biomaterialia* 7 (6), S. 2355–2373.
- Ray, S.; Thormann, U.; Eichelroth, M.; Budak, M.; Biehl, C.; Rupp, M. et al. (2018): Strontium and bisphosphonate coated iron foam scaffolds for osteoporotic fracture defect healing. In: *Biomaterials* 157, S. 1–16.
- Ray, S.; Thormann, U.; Sommer, U.; El Khassawna, T.; Hundgeburth, M.; Henss, A. et al. (2016): Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Injury* 47 Suppl 1, S. 52-61.
- Reinhart, V.; Bove, S. E.; Volfson, D.; Lewis, D. A.; Kleiman, R. J.; Lanz, T. A. (2015): Evaluation of TrkB and BDNF transcripts in prefrontal cortex, hippocampus, and striatum from subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. In: *Neurobiology of disease* 77, S. 220–227.
- Renno, A. C. M.; van de Watering, F. C. J.; Nejadnik, M. R.; Crovace, M. C.; Zanotto, E. D.; Wolke, J. G. C. et al. (2013): Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement. An evaluation. In: *Acta biomaterialia* 9 (3), S. 5728–5739.
- Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, Aldo Roberto (2006): Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. In: *Biomaterials* 27 (18), S. 3413–3431.
- Rohnke, M.; Henss, A.; Kokesch-Himmelreich, J.; Schumacher, M.; Ray, S.; Alt, V. et al. (2013): Mass spectrometric monitoring of Sr-enriched bone cements - from in vitro to in vivo. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (27), S. 8769–8780.
- Rohnke, M.; Pfitzenreuter, S.; Mogwitz, B.; Henß, A.; Thomas, J.; Bieberstein, D. et al. (2017): Strontium release from Sr²⁺-loaded bone cements and dispersion in healthy and osteoporotic rat bone. In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 262, S. 159–169.
- Ruffoni, D.; Fratzl, P.; Roschger, P.; Klaushofer, K.; Weinkamer, R. (2007): The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process. In: *Bone* 40 (5), S. 1308–1319.
- Russell, T. A.; Leighton, R. K. (2008): Comparison of autogenous bone graft and endothermic calcium phosphate cement for defect augmentation in tibial plateau fractures. A multicenter, prospective, randomized study. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 90 (10), S. 2057–2061.
- Sanni, O. D.; Wagner, M. S.; Briggs, D.; Castner, D. G.; Vickerman, J. C. (2002): Classification of adsorbed protein static ToF-SIMS spectra by principal component analysis and neural networks. In: *Surface and Interface Analysis* 33 (9), S. 715–728.
- Schumacher, M.; Lode, A.; Helth, A.; Gelinsky, M. (2013): A novel strontium(II)-modified calcium phosphate bone cement stimulates human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. In: *Acta biomaterialia* 9 (12), S. 9547–9557.

- Schumacher, M.; Reither, L.; Thomas, J.; Kampschulte, M.; Gbureck, U.; Lode, A.; Gelin-sky, M. (2017): Calcium phosphate bone cement/mesoporous bioactive glass composites for controlled growth factor delivery. In: *Biomaterials science* 5 (3), S. 578–588.
- Serre, C. M.; Papillard, M.; Chavassieux, P.; Boivin, G. (1993): In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite. An ultra-structural comparison of three types of biomaterials. In: *Biomaterials* 14 (2), S. 97–106.
- Sheikh, Z.; Abdallah, M.; Hanafi, A. A.; Misbahuddin, S.; Rashid, H.; Glogauer, M. (2015): Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials. In: *Materials* 8 (11), S. 7913–7925.
- Shi, Y.; Oury, F.; Yadav, V. K.; Wess, J.; Liu, X. S.; Guo, X. E. et al. (2010): Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. In: *Cell metabolism* 11 (3), S. 231–238.
- Short, A. R.; Koralla, D.; Deshmukh, A.; Wissel, B.; Stocker, B.; Calhoun, M. et al. (2015): Hydrogels That Allow and Facilitate Bone Repair, Remodeling, and Regeneration. In: *Journal of materials chemistry. B* 3 (40), S. 7818–7830.
- Skaper, S. D. (2012): The neurotrophin family of neurotrophic factors. An overview. In: *Methods in molecular biology* 846, S. 1–12.
- Sodhi, R. N. S. (2004): Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS): versatility in chemical and imaging surface analysis. In: *The Analyst* 129 (6), S. 483–487.
- Sotiropoulou, P.; Fountos, G.; Martini, N.; Koukou, V.; Michail, C.; Kandarakis, I.; Nikiforidis, G. (2015): Bone calcium/phosphorus ratio determination using dual energy X-ray method. In: *Physica medica: an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology: official journal of the Italian Association of Biomedical Physics* 31 (3), S. 307–313.
- Speller, R.; Pani, S.; Tzaphlidou, M.; Horrocks, J. (2005): MicroCT analysis of calcium/phosphorus ratio maps at different bone sites. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 548 (1-2), S. 269–273.
- Sterling, J. A.; Guelcher, S. A. (2014): Biomaterial scaffolds for treating osteoporotic bone. In: *Current osteoporosis reports* 12 (1), S. 48–54.
- Su, Y.; Zhou, X.; Foster, B. K.; Grills, B. L.; Xu, J.; Xian, C. J. (2018): Roles of neurotrophins in skeletal tissue formation and healing. In: *Journal of cellular physiology* 233 (3), S. 2133–2145.
- Takeda, K.; Shiba, H.; Mizuno, N.; Hasegawa, N.; Mouri, Y.; Hirachi, A. et al. (2005): Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. In: *Tissue engineering* 11 (9-10), S. 1618–1629.
- Termine, J. D.; Posner, A. S. (1966): Infra-red determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates. In: *Nature* 211 (5046), S. 268–270.
- Thormann, U.; El Khawassna, T.; Ray, S.; Duerselen, L.; Kampschulte, M.; Lips, K. et al. (2014): Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. In: *Injury* 45 (3), S. 487–493.

- Thormann, U.; Ray, S.; Sommer, U.; El Khassawna, T.; Rehling, T.; Hundgeburth, M. et al. (2013): Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Biomaterials* 34 (34), S. 8589–8598.
- Tzaphlidou, M.; Zaichick, V. (2004): Sex and age related Ca/P ratio in cortical bone of iliac crest of healthy humans. In: *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 259 (2), S. 347–349.
- Valenti, M. T.; Garbin, U.; Pasini, A.; Zanatta, Mi.; Stranieri, C.; Manfro, S. et al. (2011): Role of ox-PAPCs in the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) and Runx2 and PPAR γ 2 expression in MSCs-like of osteoporotic patients. In: *PLoS one* 6 (6).
- Vallet-Regí, M.; Izquierdo-Barba, I.; Colilla, M. (2012): Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery. In: *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 370 (1963), S. 1400–1421.
- Verron, E.; Gauthier, O.; Janvier, P.; Pilet, P.; Lesoeur, J.; Bujoli, B. et al. (2010): In vivo bone augmentation in an osteoporotic environment using bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite. In: *Biomaterials* 31 (30), S. 7776–7784.
- Vickerman, J. C.; Briggs, D. (Hg.) (2013): ToF-SIMS. Materials analysis by mass spectrometry. 2nd edition. Manchester, Chichester, West Sussex: SurfaceSpectra Limited; imp IM Publications.
- Wang, C.; Meng, H.; Wang, X.; Zhao, C.; Peng, J.; Wang, Y. (2016): Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in osteoblasts and adipocytes and its role in treatment of osteoporosis. In: *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 22, S. 226–233.
- Wang, P.; Zhao, L.; Chen, W.; Liu, X.; Weir, M. D.; Xu, H. H. K. (2014): Stem cells and calcium phosphate cement scaffolds for bone regeneration. In: *Journal of dental research* 93 (7), S. 618–625.
- Wang, W.; Yeung, K. W. K. (2017): Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair. A review. In: *Bioactive materials* 2 (4), S. 224–247.
- Warriner, A. H.; Patkar, N. M.; Curtis, J. R.; Delzell, E.; Gary, L.; Kilgore, M.; Saag, K. (2011): Which fractures are most attributable to osteoporosis? In: *Journal of clinical epidemiology* 64 (1), S. 46–53.
- Webb, J. C. J.; Spencer, R. F. (2007): The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 89 (7), S. 851–857.
- Weicker, H.; Althoff, H.; Baumgartner, G.; Beckmann, R.; Betke, K.; Bettex, M. et al. (1967): Erkrankungen der Stützgewebe Erkrankungen des Blutes und der blutbildenden Organe. Berlin, Heidelberg: Springer (Handbuch der Kinderheilkunde, 6), S. 45.
- Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. (2008): Acetylcholine beyond neurons. The non-neuronal cholinergic system in humans. In: *British journal of pharmacology* 154 (8), S. 1558–1571.

- World Health Organization (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]: Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (2004): WHO Scientific Group on the assessment of osteoporosis at primary health care level: Summary meeting report.
- Wu, C.; Fan, W.; Chang, J.; Xiao, Y. (2013): Mesoporous bioactive glass scaffolds for efficient delivery of vascular endothelial growth factor. In: *Journal of biomaterials applications* 28 (3), S. 367–374.
- Yamashiro, T.; Fukunaga, T.; Yamashita, K.; Kobashi, N.; Takano-Yamamoto, T. (2001): Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. In: *Bone* 28 (4), S. 404–409.
- Yu, L.; Li, Y.; Zhao, K.; Tang, Y.; Cheng, Z.; Chen, J. et al. (2013): A novel injectable calcium phosphate cement-bioactive glass composite for bone regeneration. In: *PLoS one* 8 (4).
- Yubao, L.; Xingdong, Z.; Groot, K. de (1997): Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. In: *Biomaterials* 18 (10), S. 737–741.
- Zhang, Q.; Zhang, Y.; Chen, W.; Zhang, B.; Wang, S. (2013): Long-term controlled release of ¹²⁵I-tagged BMP-2 by mesoporous bioactive glass with ordered nanopores. In: *Experimental and therapeutic medicine* 6 (6), S. 1443–1448.
- Zhang, Z.; Zhang, Y.; Zhou, Z.; Shi, H.; Qiu, X.; Xiong, J.; Chen, Y. (2017): BDNF regulates the expression and secretion of VEGF from osteoblasts via the TrkB/ERK1/2 signaling pathway during fracture healing. In: *Molecular medicine reports* 15 (3), S. 1362–1367.
- Zhao, L.; Yan, X.; Zhou, X.; Zhou, L.; Wang, H.; Tang, J.; Yu, C. (2008): Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. In: *Microporous and Mesoporous Materials* 109 (1-3), S. 210–215.
- Zhu, Y.; Wu, C.; Ramaswamy, Y.; Kockrick, E.; Simon, P.; Kaskel, S.; Zreiqat, H. (2008): Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. In: *Microporous and Mesoporous Materials* 112 (1-3), S. 494–503.
- Zoehrer, R.; Perilli, E.; Kuliwaba, J. S.; Shapter, J. G.; Fazzalari, N. L.; Voelcker, N. H. (2012): Human bone material characterization. Integrated imaging surface investigation of male fragility fractures. In: *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 23 (4), S. 1297–1309.
- Zou, L.; Zhang, D.; Wang, W. (1997): Analysis of pure titanium implants-bone interface by TOF-SIMS. In: *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waikē zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery* 11 (6), S. 372–375.

7.5 Publikationsverzeichnis

Kauschke, Vivien; Schneider, Maike; Jauch, Annika; Schumacher, Matthias; Kampschulte, Marian; Rohnke, Marcus; Henss, Anja; Bamberg, Coralie; Trinkaus, Katja; Gelinsky, Michael; Heiss, Christian; Lips, Katrin Susanne (2018): Effects of a Pasty Bone Cement Containing Brain-Derived Neurotrophic Factor-Functionalized Mesoporous Bio-active Glass Particles on Metaphyseal Healing in a New Murine Osteoporotic Fracture Model. In: *International journal of molecular sciences* 19 (11).
DOI: 10.3390/ijms19113531.

8 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen herzlich bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, und die zum Gelingen beigetragen haben. Vielen Dank zunächst an Prof. Dr. Dr. Christian Heiß und Prof. Dr. Jürgen Janek für die Möglichkeit, die Labore und Geräte innerhalb des Instituts der Experimentellen Unfallchirurgie und der Physikalischen Chemie nutzen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Katrin Lips, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Ich danke ihr für die interessante Themenstellung, allzeit hilfsbereite Betreuung und Unterstützung, und konstruktive Kritik. Ebenso danke ich Dr. Marcus Rohnke, der meine Doktorarbeit als zweiter Betreuer begleitet hat, für sein Engagement, die inhaltlichen Anregungen, und insbesondere die ToF-SIMS-Einarbeitung mit fachlichen Hinweisen dazu. In diesem Zusammenhang auch ein herzlicher Dank an Dr. Anja Henß, die mir dabei ebenfalls zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern und Doktoranden der Experimentellen Unfallchirurgie und des Physikalisch-Chemischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen, und des Zentrums für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung der Technischen Universität Dresden, die mich unterstützt haben, für Hilfestellungen jeglicher Art danken: Dabei gilt ein besonderer Dank an Vivien Kauschke und alle Anderen, die am Tiermodell beteiligt waren und mir somit Proben zur Verfügung gestellt haben, Dr. Klaus Pepler und Dr. Boris Mogwitz für die freundliche Unterstützung bei den REM / EDX-Messungen und die damit verbundenen Erläuterungen, Ida Oberst, Rainer Braun und Dr. Ursula Sommer für die Erklärungen zu histologischen Färbungen und dem Fotomikroskop, und auch Prof. Dr. Michael Gelinsky und Dr. Matthias Schumacher, die für das Knochenersatzmaterial verantwortlich sind.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich vielseitig und verständnisvoll unterstützt haben, mir den Rücken freigehalten haben und immer ein offenes Ohr hatten.