

**Evaluierung der Auswirkung von nanosilberfunktionalisierten Knochenimplanta-
ten auf die osteoblastogenen Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix in einem
etablierten tierexperimentellen Modell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Belal Sayed Mohamed Abdo

aus

Kairo, Ägypten

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Experimentellen Unfallchirurgie,

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachterin: Prof. Dr. Klaudia Giehl

Tag der Disputation: 12.11.2024

Für meine Familie

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Implantatassoziierte Infektionen	1
1.1.1	Einteilung und Epidemiologie.....	1
1.1.2	Risikofaktoren	2
1.1.3	Pathogenese	3
1.1.4	Klassifikation	5
1.1.5	Diagnose.....	6
1.1.6	Therapie.....	7
1.1.7	Prävention der implantatassoziierten Infektionen	9
1.2	Silbernanopartikel.....	11
1.3	Knochen.....	14
1.3.1	Morphologie und Funktion.....	14
1.3.2	Remodeling	16
1.3.3	Osteoblasten	16
1.3.4	Osteoblastogenese	17
1.3.5	Runx2	20
1.3.6	Osterix	22
1.4	Zielsetzung der Studie.....	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Knochenimplantate	25
2.2	Tierexperimentelle Versuche	27
2.2.1	Tiermodell und Versuchsdesign.....	27
2.2.2	Versuchsdurchführung	27
2.2.3	Postoperative Betreuung	28

2.2.4	Euthanasie und Probenentnahme	28
2.2.5	Probenaufbereitung	29
2.3	Immunhistochemie	29
2.3.1	Antikörper	30
2.3.2	Herstellung der Lösungen	31
2.3.3	Etablierung der Färbeprotokolle.....	32
2.3.4	Färbeprotokoll Runx2	34
2.3.5	Färbeprotokoll Osterix	37
2.3.6	Negativkontrollen.....	40
2.4	Histomorphometrie	40
2.5	Statistische Auswertung.....	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Histomorphometrische Analyse der Runx2-Immunhistochemie.....	46
3.1.1	Relative Gesamtzahl der Runx2-immunpositiven Zellen	46
3.1.2	Relative Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten	50
3.1.3	Relative Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten.....	55
3.2	Histomorphometrische Analyse der Osterix-Immunhistochemie	60
3.2.1	Relative Gesamtzahl der Osterix-immunpositiven Zellen	60
3.2.2	Relative Anzahl der Osterix-immunpositiven Osteoblasten	63
3.2.3	Relative Anzahl der Osterix-immunpositiven Präosteoblasten.....	66
4	Diskussion	70
4.1	Studiendesign und das Tiermodell.....	70
4.2	Funktionalisierung der Implantate mit AgNP.....	72
4.3	Verwendete Knochenimplantate.....	74
4.4	Methodik und Herausforderungen bei der Analyse der Knochenstrukturen	77

4.5	Einfluss der AgNP-funktionalisierten Implantate auf die Regulation von Runx2 und Osterix.....	80
4.6	Auswirkungen von Antibiotika auf die Osteogenese und deren Potenzial für die Beschichtung von Implantaten.....	85
4.7	Implantatwahl unter Berücksichtigung der Osteoblastogenese: Schlussfolgerungen zum Einsatz von AgNP	88
5	Zusammenfassung.....	90
6	Summary	91
7	Abkürzungsverzeichnis.....	92
8	Abbildungsverzeichnis.....	94
9	Tabellenverzeichnis.....	97
10	Literaturverzeichnis.....	98
11	Publikationsverzeichnis	130
12	Ehrenwörtliche Erklärung	131
13	Danksagung.....	132

1 Einleitung

1.1 Implantatassoziierte Infektionen

In den letzten Jahrzehnten haben künstliche Materialien in der modernen Medizin in verschiedenen Bereichen eine enorme Bedeutung erlangt. Blasenkatheter, Koronarstents, Osteosynthesematerialien und viele andere sind mittlerweile unverzichtbare Hilfsmittel in der medizinischen Versorgung von Patienten geworden (Joung, 2013; Kamath et al., 2015; Li et al., 2015). Besonders in der Orthopädie und Traumatologie haben die kontinuierliche Weiterentwicklung von Osteosynthesematerialien und Endoprothesen zu einem medizinischen Durchbruch bei der Behandlung von chronischen Gelenkerkrankungen und der Stabilisierung komplexer Frakturen geführt (Kamath et al., 2015; Otto-Lambertz et al., 2017; Southwood et al., 1985).

Trotz der enormen Vorteile von orthopädischen Implantaten und ihrer routinemäßigen Verwendung stellen ihre relevante Komplikationen eine große Herausforderung für behandelnde Ärzte dar. Eine der schwerwiegendsten Komplikationen in der Traumatologie und Orthopädie ist die implantatassoziierte Infektion, die schwer zu diagnostizieren ist und trotz chirurgischer Interventionen, moderner operativen Verfahren, präoperativer Antibiotika-Prophylaxe und gegebenenfalls postoperativer Antibiotika-Gabe eine langfristige komplexe Behandlung erfordert (Kurtz et al., 2010; Mühlhofer et al., 2020; Renz, Müller, et al., 2016; Walter et al., 2012; Zimmerli, 2014.; Zucker & Michel, 2008). Darüber hinaus stellt die implantatassoziierte Infektion eine erhebliche psychische und physische Belastung für Patienten dar und ist eine der größten wirtschaftlichen Herausforderungen für das Gesundheitssystem (Gundtoft et al., 2017; Walter et al., 2022; Zucker & Michel, 2008).

1.1.1 Einteilung und Epidemiologie

Der Begriff "Implantatassoziierte Infektionen" bezieht sich auf Infektionen, die sowohl im Zusammenhang mit Prothesen als auch mit Osteosynthese-Materialien auftreten können. Für eine erfolgreiche Behandlung sind jeweils eine spezifische diagnostische Strategie und ein zielgerichteter Behandlungsplan erforderlich (Trampuz & Zimmerli, 2008).

1.1.1.1 Periprothetische Infektion

Die periprothetische Infektion ist eine drastische Komplikation, die nach der Implantation eines Gelenkersatzes auftreten kann. In den letzten Jahren ist die Anzahl der implantierten Gelenkprothesen aufgrund der gestiegenen Lebenserwartung und der erhöhten Mobilitätsenerwartungen im Alter deutlich angestiegen. Damit einhergehend hat auch die Zahl der periprothetischen Infektionen zugenommen (Kamath et al., 2015; Kurtz et al., 2007). Die Inzidenz einer periprothetischen Gelenkinfektion liegt bei Primärendoprothesen zwischen 1 und 2 % und bei Revisionsendoprothesen zwischen 4 und 5 % (Corvec et al., 2012; Izakovicova et al., 2019).

1.1.1.2 Osteosyntheseassoziierte Infektion

Die osteosynthesenassoziierte Infektion ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen, die nach einer osteosynthetischen Frakturversorgung auftreten kann und erfordert oft eine langfristige Behandlung durch Experten, um erfolgreich behandelt zu werden. Die Inzidenz von osteosyntheseassoziierten Frakturen beträgt 1–5 %, kann jedoch bei komplexen und offenen Frakturen, insbesondere offenen Frakturen dritten Grades, auf bis zu 30 % ansteigen (Metsemakers et al., 2017.; Trampuz & Zimmerli, 2006).

1.1.2 Risikofaktoren

Die Entstehung von Infektionen im Zusammenhang mit Implantaten wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Dazu gehören zunächst allgemeine Risikofaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, höheres Alter, Adipositas, Niereninsuffizienz, Immunsuppression und bestehende Infektionserkrankungen (Bongartz et al., 2008; Crowe et al., 2015; Dowsey & Choong, 2009; Gortler et al., 2018; Kortram et al., 2017.; Mühlhofer et al., 2017). Einschließlich dessen, die Faktoren, die mit der operativen Versorgung zusammenhängen, wie z. B. Zeitpunkt der Operation, die chirurgische Erfahrung des Operateurs, die Operationsmethode bzw. die Implantatwahl, die Dauer der Operation sowie der Sterilisationsgrad innerhalb des Operationssaals und während der Operation. (Harrison et al., 2012; Izakovicova et al., 2019; Khatod et al., 2003; Liang et al., 2014; Metsemakers et al., 2015; Young et al., 2012).

Zusätzlich zu allen vorherigen Faktoren gibt es die besonderen Risikofaktoren bei osteosynthesenassoziierte Infektion, die mit dem Trauma bzw. mit der Fraktur selbst zusammenhängen, wie z. B. das Ausmaß der Wundkontamination bei offenen Frakturen, der Grad der Schädigung von Haut und Weichteilen, begleitende Verletzungen von Blutgefäßen und Nerven oder die Entwicklung eines Kompartmentsyndroms (Gustilo, 1979; Liang et al., 2014; Metssemakers et al., 2015; Suzuki et al., 2010).

1.1.3 Pathogenese

Implantatassoziierte Infektionen können auf zwei Arten entstehen: durch exogene Kontamination oder hämatogene Kontamination. Exogene Kontaminationen treten perioperativ auf, wenn Mikroorganismen während oder kurz nach der Operation in die Operationswunde eindringen, oder durch die nahe Ausbreitung einer benachbarten Infektion, wie Hautinfektionen oder Infektionen des angrenzenden Gelenks (Maathuis et al., 2005). Bei der osteosynthesenassoziierte Infektion kann die exogene Kontamination durch das initiale penetrierende Trauma verursacht werden (Trampuz & Zimmerli, 2006). Die hämatogenen Kontaminationen stammen von entfernten Infektionsherden (z. B. einer Lungen-, Zahn- oder Harnwegsinfektion) und werden über Blut oder Lymphflüssigkeit übertragen. Im Vergleich zur periprothetischen Infektion sind hämatogene Kontaminationen bei osteosyntheseassoziierten Infektionen relativ selten (Murdoch et al., 2001).

Die am häufigsten verursachenden Mikroorganismen sind grampositive Kokken wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), koagulasenegative Staphylokokken und Enterokokken. Aerobe gramnegative Bazillen, einschließlich *Escherichia coli* (*E. coli*), *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), sowie Anaerobier wie *Propionibacterium acnes* und *Fingoldia magna* sind weniger häufige Ursachen von Infektionen (Cobo & del Pozo, 2011; Kuehl et al., 2019). Polymikrobielle Infektionen treten oft bei offenen Frakturen auf und haben eine schlechte Prognose (Trampuz & Zimmerli, 2006). Das Vorhandensein eines Fremdkörperimplantats begünstigt das Auftreten einer Infektion, da die minimale Infektionsdosis in Gegenwart eines Fremdkörpers um etwa das 100.000-fache verringert wird (Zimmerli et al., 1982).

Die Bildung von Biofilmen stellt eine erhebliche Herausforderung bei der Behandlung der implantatassoziierten Infektionen dar. Die Entwicklung eines Biofilms ist ein komplexer Prozess, der in mehrere Hauptstadien unterteilt werden kann. Im ersten Stadium

erfolgt die Adhäsion der Mikrobenzellen an die Oberfläche der Implantate. Im zweiten Stadium wird eine extrazelluläre Polysaccharidmatrix produziert, gefolgt von der Entwicklung der Biofilmarchitektur im dritten Stadium. Im vierten Stadium erfolgt die Reifung des Biofilms; und im fünften Stadium lösen sich die Bakterien aus dem Biofilm (Lasa, 2006; Renz et al., 2015) (Abbildung 1).

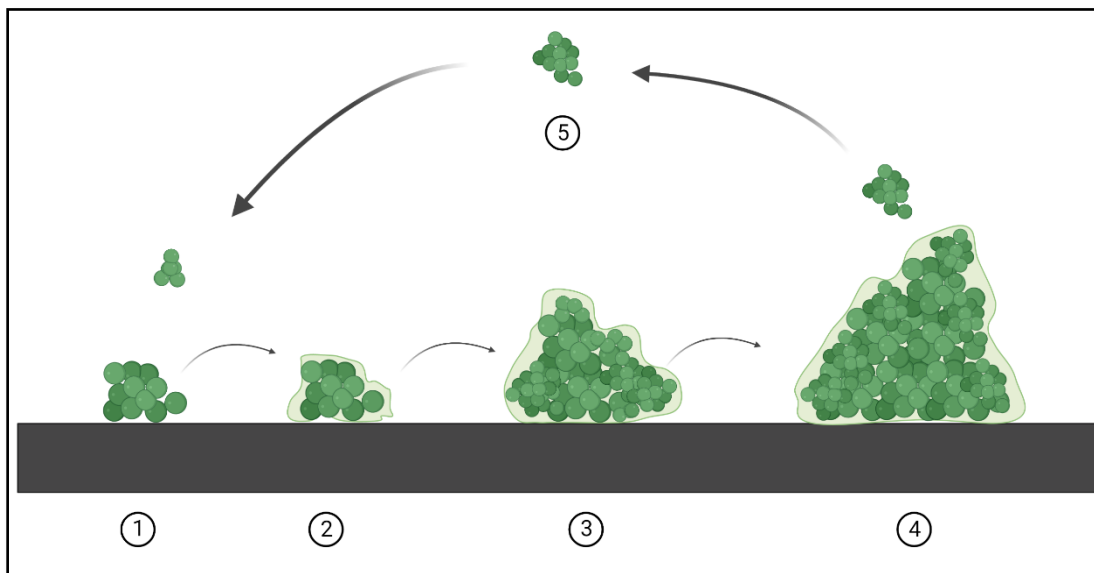


Abbildung 1: Fünfstufiger Prozess der Biofilm-Entwicklung. In Stufe 1 erfolgt die initiale Zellanhaftung an der Oberfläche, gefolgt von Stufe 2, bei der eine extrazelluläre Exopolysaccharidmatrix produziert wird. In Stufe 3 beginnt die frühe Biofilmarchitektur zu entstehen, die sich in Stufe 4 weiterentwickelt. In Stufe 5, lösen sich die bakteriellen Zellen aus dem Biofilm; Modifiziert nach Lasa, 2006.

Die Bakterien in Biofilmen weisen im Vergleich zu ihren planktonischen Formen einzigartigen Eigenschaften und Resistenz gegen die Immunsystemkomponente von Zellen und Antikörper sowie gegen antimikrobielle Substanzen auf. Die fehlende Mikrozirkulation auf den Implantaten macht es schwierig, den Mikroben mit Antibiotika entgegenzuwirken und dadurch sind die in den Biofilmen lebenden Mikroben viel widerstandsfähiger als ihren planktonischen Formen (Renz et al., 2015; Zimmerli et al., 2004). Ein effektiver therapeutischer Ansatz beinhaltet die Verwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen, die sowohl sensibel auf Bakterien reagieren als auch in der Lage sind, die Biofilmmatrix aufzubrechen (Trampuz & Zimmerli, 2008; H. Wu et al., 2015).

1.1.4 Klassifikation

In der Literatur gibt es viele Klassifikationen für periprothetische Infektionen. Die Klassifikation von Renz et al. wird im deutschsprachigen Raum häufig verwendet, da sie sowohl die zeitliche Komponente als auch die Pathogenese der Infektion berücksichtigt. Sie basiert bei perioperativen Infektionen auf dem Zeitpunkt des Symptombeginns nach der Operation und bei hämatogenen Infektionen auf der Zeit seit dem ersten Auftreten der Symptome. Dabei werden periprothetische Infektionen in akute und chronische Infektionen klassifiziert. Diese Klassifikation deutet auf den Reifegrad des vorhandenen Biofilms hin und ist entscheidend für die Wahl der passenden Behandlungsstrategie (Kuiper et al., 2014; Renz et al., 2016). Die akute Infektion wird entsprechend der Pathogenese in zwei Kategorien eingeteilt: akut perioperativ mit Symptomen, die innerhalb von weniger als vier Wochen nach der Operation auftreten, und akut hämatogen mit einer Symptombdauer von weniger als drei Wochen. Die akuten periprothetischen Infektionen werden in der Regel durch hochvirulente Mikroorganismen wie *S. aureus*, *Streptococci spp.* und gramnegative Bazillen mit noch unreifem Biofilm verursacht (Renz et al., 2016). Die chronische periprothetische Infektion wird ebenfalls nach der Pathogenese in chronisch perioperative Infektion und chronisch hämatogene Infektion eingeteilt. Die chronische perioperative Infektion oder auch späte Infektion oder *low-grad infection* genannt, tritt nach 4 Wochen postoperativ auf. Die chronisch hämatogene Infektion bezieht sich auf eine Infektion mit Symptombdauer von über drei Wochen. Die beiden werden durch niedrigvirulente Mikroorganismen wie *koagulasenegative Staphylokokken* oder *Propionibacterium acnes* verursacht (Renz et al., 2016).

Für osteosyntheseassoziierte Infektionen gibt es ebenfalls in der Literatur mehrere Klassifikationen, die die Frakturheilung, die Ausdehnung der Infektion, den Reifegrad des Biofilms und die Behandlungsmöglichkeiten berücksichtigen (Baecker et al., 2020; Metsemakers et al., 2018). Abhängig vom Zeitpunkt des Auftretens werden osteosyntheseassoziierte Infektionen in Frühinfektionen und Spätinfektionen bzw. akute und chronische Infektionen eingeteilt. Diese Klassifikation hat therapeutische Konsequenzen und ist weit verbreitet im klinischen Einsatz. Frühinfektionen treten innerhalb von sechs Wochen nach der Operation auf und sind in der Regel lokal begrenzt, während Spätinfektionen nach sechs Wochen auftreten und mit einem erhöhten Risiko für eine Osteomyelitis und lokale Ausbreitung verbunden sind (Renz et al., 2016).

1.1.5 Diagnose

Die Diagnose einer implantatassoziierten Infektion beruht auf einem multimodalen Ansatz, der eine Kombination aus klinischen, radiologischen, laborchemischen, mikrobiologischen und histopathologischen Kriterien umfasst, die zur Bestimmung der Diagnose herangezogen werden (Baecker et al., 2020; Karczewski et al., 2018).

Für die Diagnose einer osteosyntheseassoziierten Infektion wurde von der "*Fracture-related Infection (FRI) Consensus Group*" ein klarer Algorithmus entwickelt, der auf hinweisenden suggestiven und beweisenden konfirmatorischen diagnostischen Kriterien basiert (Depypere et al., 2020; Metsemakers et al., 2018). Die beiden Kriterien werden in der folgenden Tabelle illustriert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Diagnostischer konfirmatorische und suggestive Kriterien der FRI Consensus Group (Depypere et al., 2020; Metsemakers et al., 2018).

Konfirmatorischen Kriterien	Suggestive Kriterien
<p><u>Klinische Zeichen</u> - freiliegende Osteosynthesematerial, Fistelbildung, eitriges Sekretion</p> <p><u>Mikrobiologische Befunde</u> - Keimnachweis in 2 unabhängigen tiefen Gewebeproben</p> <p><u>Histopathologische Befunde</u> - Nachweis von Bakterien in tiefen Gewebeproben – Mindestens 5 PMN/HPF</p>	<p><u>Klinische Zeichen</u> - lokale oder systemische Infektzeichen, Gelenkergüsse, persistierende oder neu aufgetretene Wundsekretion</p> <p><u>Laborchemische Befunde</u> - erhöhte Entzündungswerte (Leukozyten, CRP, etc.)</p> <p><u>Radiologische Befunde</u> - Osteolysen, Implantatlockerung, Sequestrierung, Pseudarthrose.</p> <p><u>Mikrobiologische Befunde</u> - Keimnachweis nur in einer der tiefen Gewebeproben</p>

(CRP) C-reaktives Protein, (HPF) high power field, (PMN) polymorphonuclear cells

Für die Diagnose einer periprothetischen Gelenkinfektion wurde eine neue Definition von der *European Bone & Joint Infection Society* (EBJIS) in Zusammenarbeit mit der *European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology* (EFORT), der *Musculoskeletal Infection Society* (MSIS) und der *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) erstellt. Die Definition präsentiert eine neuartige Herangehensweise mit drei Stufen zur Diagnose, die auf robusten Evidenzen basiert und im klinischen Alltag von großem Nutzen sein kann. Dieser Ansatz umfasst

eine Kombination von klinischen, laborchemischen, mikrobiologischen, histologischen und bildgebenden Befunden. Die drei Stufen basieren auf einem Ampel-System, jeweils bestimmten Kriterien, bei dem Grün darauf hinweist, dass eine Infektion unwahrscheinlich ist, Gelb darauf hinweist, dass eine Infektion wahrscheinlich ist und Rot darauf hinweist, dass eine Infektion bestätigt ist (McNally et al., 2021).

1.1.6 Therapie

Eine erfolgreiche Behandlung der implantatassoziierten Infektionen erfordert in der Regel eine komplexe Therapie mit geeigneten chirurgischen Eingriffen in Verbindung mit einer langfristigen antimikrobiellen Therapie, idealerweise mit einem Wirkstoff, der auf adhärenzte Biofilm-Mikroorganismen abzielt (Metsemakers et al., 2020; Zimmerli et al., 2004). Die multidisziplinäre Teamarbeit ist ein Schlüsselaspekt in der Therapie von implantatassoziierten Infektionen. Die Zusammenarbeit zwischen Chirurgen, Infektiologen, Apothekern, Pflegekräften und ggf. Internisten und Intensivmedizinern ist erforderlich, und daher ist die Behandlung der implantatassoziierten Infektionen teilweise auf große Zentren begrenzt (Li et al., 2018; Metsemakers et al., 2020). Bevor ein Behandlungsplan erstellt wird, müssen das Behandlungsziel und seine Eignung für die Diagnose sorgfältig bestimmt werden. Die Behandlungsziele bei periprothetischen Infektionen sind die komplette Eradikation der Infektionen und die Wiederherstellung der Funktion des betroffenen Gelenks. Bei der osteosyntheseassoziierten Infektion ist das Therapieziel, die Fraktur zu konsolidieren und eine chronische Osteomyelitis zu verhindern. Solange der vorhandene Biofilm die Knochenheilung nicht stört, ist die vollständige Eradikation der Infektion nicht immer das primäre Behandlungsziel (Metsemakers et al., 2020; Trampuz & Zimmerli, 2008).

Das Management von osteosyntheseassoziierten Infektionen beruht auf zwei Hauptkonzepten: 1) Debridement plus antimikrobieller Therapie und Implantatretention (DAIR) oder 2) Debridement plus antimikrobieller Therapie und Entfernung der Implantate, falls die Konsolidierung abgeschlossen ist, oder Implantatwechsel, falls die Konsolidierung noch nicht vollständig ist, in Einzel- oder Mehrfachoperationen, um die Stabilität bis zur Konsolidierung aufrechtzuerhalten (Morgenstern et al., 2021; Trampuz & Zimmerli, 2006). Jedes Debridement umfasst die Ausräumung von Eiter, die Entfernung von nekrotischem Gewebe und von befallenem Knochengewebe sowie die Entnahme von Proben

zur mikrobiologischen und histologischen Beurteilung (Depypere et al., 2020; Grammatopoulos et al., 2017).

Die Behandlung der periprothetischen Infektion variiert je nach Klassifikation der Infektion. Bei den frühen postoperativen Infektionen, die innerhalb von 4 Wochen nach der Implantation auftreten, oder bei akuten hämatogenen Infektionen, die durch eine Dauer der Symptome von weniger als 3 Wochen gekennzeichnet sind, ist die empfohlene Behandlung die Durchführung eines Débridement plus Antibiotikatherapie und Implantatretention (DAIR) mit Austausch des beweglichen Teils der Prothese (Renz & Trampuz, 2015; Sendi et al., 2017). Bei den späten postoperativen Infektionen oder chronischen hämatogenen Infektionen mit mehr als drei Wochen andauernder Symptomatik und bereits vorhandenem reifem Biofilm ist der komplette Austausch der Prothesen die Therapie der Wahl. Abhängig vom Zustand der Knochen und Weichteile, vorangegangener Revisionseingriffe sowie der Art des Organismus und dessen Resistenzgrad wird der Prothesenwechsel in einer einzeitigen, zweizeitigen oder gegebenenfalls dreizeitigen Operation durchgeführt (Renz & Trampuz, 2015; Zimmerli et al., 2004).

In Unabhängigkeit von der chirurgischen Strategie wird eine antibiotische Behandlung für mindestens insgesamt zwölf Wochen durchgeführt werden. Bei einer Implantatentfernung nach verheilter Fraktur kann eine Antibiotikatherapie von sechs Wochen ausreichend sein. Eine empirische Antibiotikatherapie sollte zügig mit kalkulierten Antibiotika begonnen und dann im Verlauf entsprechend den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchung und des Antibioarms deeskaliert werden. Die initiale intervenösen Therapie kann nach 7 bis 14 Tagen bei trockenen Wundverhältnissen und in Abhängigkeit von der gesamten Situation auf Oral umgestellt werden (Depypere, Kuehl, et al., 2020; Renz & Trampuz, 2015). Als biofilmaktives Antibiotikum gegen grampositive Bakterien spielt Rifampicin eine große Rolle in der Therapie implantatassoziiertes Infektionen. Bei der Anwendung von Rifampicin sollten mehrere Aspekte wie Indikation, Dosierung, Wechselwirkungen, orale Verfügbarkeit des kombinierten Antibiotikums und Nebenwirkungen sorgfältig betrachtet werden, um Resistenzentwicklungen zu vermeiden (Achermann et al., 2013; Zimmerli & Sendi, 2019). Bei der mehrstufigen Implantatwechselstrategie wird die bisher etablierte Antibiotikapause mit anschließender Punktion vor der Reimplantation aufgrund der geringen Sensitivität und Infektionsgefahr durch Punktion nicht mehr empfohlen. Die antibiotische Therapie mit bakteriziden und biofilmaktiven Antibiotika

sollte nach der Reimplantation noch für maximal sechs Wochen oder insgesamt 12 Wochen nach der Explantation fortgesetzt werden (Renz & Trampuz, 2015; Tan et al., 2018).

1.1.7 Prävention der implantatassoziierten Infektionen

Die präventiven Maßnahmen gegen die implantatassoziierte Infektionen lassen sich in präoperative, perioperative und postoperative Phasen unterteilen (Geffers et al., 2001; WHO, 2016). Zu den präoperativen Maßnahmen gehören die allgemeine Handhygiene für die Mitglieder des Operationsteams, die Vorbereitung des Operationsfeldes des Patienten wie Haarentfernung und das präoperative Baden oder Duschen des Patienten (Greene, 2012; Mangram et al., 1999; Uçkay et al., 2013; WHO, 2016). Es ist hinlänglich bekannt und in mehreren Studien belegt, dass die präoperative prophylaktische Antibiotikungabe das Infektionsrisiko senkt (Classen et al., 1992; Uçkay et al., 2013; WHO, 2016). In einer randomisierten klinischen Studie konnte Boxma et al. (1996) überzeugend zeigen, dass eine angemessene Einzeldosis-Antibiotikaphylaxe die implantatbedingten Infektionen nach der chirurgischen Versorgung geschlossener Frakturen effektiv reduziert. Insgesamt wurden 2.195 Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Inzidenz von oberflächlichen und tiefen Wundinfektionen nach Verabreichung von Placebo betrug 8,3%, im Vergleich zu 3,6% in der Ceftriaxon-Gruppe. Die Rate nosokomialer Infektionen im ersten Monat lag bei 10,2% für die Placebo-Gruppe und bei lediglich 2,3% für die Ceftriaxon-Gruppe.

Da *S. aureus* zu den häufigsten Bakterien gehört, die implantatassoziierte Infektionen verursachen, gehört das präoperative Screening bzw. die Dekolonisation in den meisten Kliniken zu den präoperativen Standardmaßnahmen. In Notfallsituationen, zum Beispiel bei traumatisierten Patienten, bei denen ein chirurgischer Eingriff sofort durchgeführt werden muss, ist dieser Ansatz unter Umständen nicht durchführbar (Shukla et al., 2009; Thyagarajan et al., 2009; WHO, 2016). Derzeit gibt es einige laufende Forschungsprojekte, die an der Entwicklung eines wirksamen Impfstoffs gegen *S. aureus* arbeiten, der in Zukunft eine vorbeugende Rolle bei implantatassoziierten Infektionen spielen könnte (Jansen et al., 2013).

Zu den perioperativen Präventionsmaßnahmen gehören die allgemeinen Bedingungen im Operationssaal einschließlich der Belüftung, Ein- und Ausgangsregeln für den

Operationssaal, Operationskleidung, chirurgische Handhygiene, Sterilisation von den chirurgischen Instrumenten, Abdecktüchern und Folien (Greene, 2012; Webster & Alghamdi, 2015; WHO, 2016). Hinzu kommen die operationstechnischen Faktoren wie die Blutungsmenge, Operationsdauer, Debridement, Wundverschluss und Wunddrainage (Dumville et al., 2016; R. Krishnan et al., 2016; Mangram et al., 1999; WHO, 2016). Zusätzlich zu den patientenspezifischen Faktoren wie z. B. Normothermie, Normoglykämie (Forbes et al., 2009; Golden et al., 1999). Die Anpassung und Kontrolle all dieser Faktoren beeinflusst die Infektionsprävention während der Operation. Die postoperative Prävention erfordert die Einhaltung der Händehygiene durch das medizinische Personal und eine aseptische Vorgehensweise bei dem regelmäßigen Verbandwechsel zur Vermeidung der Wundkontamination (WHO, 2016). Einige Autoren empfehlen die prophylaktische Gabe von Antibiotika bei den minimalinvasiven Eingriffen wie Endoskopie, Koloskopie und Zahneingriffe insbesondere bei Hochrisikopatienten, um transiente bakterielle Infektionen zu minimieren (Chen et al., 2014).

Trotz all dieser prophylaktischen Maßnahmen ist die Inzidenz von implantatassoziierten Infektionen immer noch hoch. Daher ist es dringend erforderlich, wirksame Strategien zu entwickeln, um das Risiko von implantatassoziierten Infektionen zu minimieren. Einige lokale Strategien zur Minderung des Infektionsrisikos haben in vielen Studien bisher positive Ergebnisse gezeigt. Eine lokale Prävention kann erreicht werden, indem Implantate aus Materialien mit antibakteriellen Eigenschaften hergestellt werden, einschließlich Silber (Ag), Kupfer (Cu), Zink (Zn) und Polymeren wie Chitosan, oder indem die Implantatoberfläche mit Substanzen wie Antibiotika oder Silber beschichtet wird, die den Implantaten antibakterielle Eigenschaften verleihen (Bakhsheshi-Rad et al., 2017; Chen et al., 2016; Karahaliloglu et al., 2016; Raphael et al., 2016; Sun et al., 2016). Aufgrund seiner antibakteriellen Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien, einschließlich multiresistenter Bakterien, ist Silber vielversprechend für die Beschichtung von Implantaten (Chen et al., 2017; Percival et al., 2011).

1.2 Silbernanopartikel

Seit der Entdeckung von Antibiotika sind sie zu einem zentralen Bestandteil geworden, den Mediziner zur Bekämpfung von Infektionen einsetzen. Jedoch hat der häufige und übermäßige Gebrauch von Antibiotika zur Entwicklung antibiotikaresistenter Bakterienstämme geführt, was mit einer hohen Krankheitslast und Sterblichkeit verbunden ist. Infolgedessen war es notwendig, nach Alternativen für die Therapie und Prophylaxe von Infektionen zu suchen (Klein et al., 2018; Morones et al., 2005).

Silber ist ein Metall, das seit Tausenden von Jahren für die Herstellung von Schmuck und Münzen verwendet wird. Aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften wurde es auch von den alten Ägyptern und Griechen zur Behandlung von Wunden, Verbrennungen und anderen therapeutischen und präventiven Anwendungen eingesetzt (Chen & Schluesener, 2008; Ebrahiminezhad et al., 2016; Wijnhoven et al., 2009). Mit dem Fortschritt der Industrie fand Silber Einzug in verschiedene Branchen wie die Lebensmittelindustrie, Kosmetik, Haushaltsgeräte und Textilien, sowie in die medizinische Industrie für Wundverbände, Zahnimplantate, Herzimplantate, Katheter und chirurgische Instrumente (Cohen et al., 2007; Lansdown, 2010; Maillard & Hartemann, 2013; Wijnhoven et al., 2009). Als einer der Edelmetalle ist Silber ein chemisches Element mit dem Elementsymbol Ag und der Ordnungszahl 47. Neben seiner hohen thermischen und elektrischen Leitfähigkeit ist Silber sehr formbar (Seiler et al., 1988). Aufgrund der hohen Reaktivität von Silberionen besitzt es antimikrobielle Eigenschaften, indem es an Proteine bindet und strukturelle Veränderungen in mikrobiellen Zellwänden und DNA-Membranen verursacht, die letztendlich zum Absterben der Zellen führen. Ein weiterer Vorteil von Silberionen ist die Hemmung der bakteriellen Vermehrung, indem sie an die bakterielle DNA binden und deren Eigenschaften verändern (Castellano et al., 2007; Lansdown, 2002).

Durch die Nanotechnologie konnte Silber in Nanoform umgewandelt werden, das im Allgemeinen kleiner als 100 nm ist und 20 bis 15.000 Silberatome enthält (Chen & Schluesener, 2008). Das Nanosilber oder auch Silbernanopartikel (AgNP) genannt, weist im Gegensatz zu größeren Partikeln andere physikalische und chemische Eigenschaften auf und zeigen eine effiziente antimikrobielle Wirkung aufgrund ihrer deutlich größeren Oberfläche, die effektive kontinuierliche Ag-Ionenfreisetzung und eine große Kontaktfläche mit den Mikroorganismen bietet (Chen & Schluesener, 2008; Lok et al., 2006).

AgNP wirken auf verschiedene Weisen gegenüber mikrobiellen Zellen. AgNP haften an der Zellmembran von Bakterien, dringen in diese ein und verursachen Membranschäden sowie Veränderungen in der Transportaktivität an der Zelloberfläche. AgNP interagieren zudem mit Proteinen, Ribosomen und DNA in der Bakterienzelle, was zur Denaturierung im Zytoplasma sowie zur Inaktivierung von Enzymen führt. Darüber hinaus induzieren AgNP eine Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies / *Reactive oxygen species* (ROS) innerhalb der Zellen und modulieren das zelluläre Signalwegsystem. All diese Mechanismen führen zur erhöhten intrazellulären Toxizität, stören die Atmungskette und die Zellteilung, und letztendlich zum mikrobiellen Zelltod. Aufgrund dieser vielfältigen Wirkungsweisen zeigen AgNP eine hohe Wirksamkeit gegenüber mikrobiellen Zellen und bieten potenzielle Anwendungen in der antimikrobiellen Therapie (Dakal et al., 2016; Feng et al., 2000; Roy et al., 2019) (Abbildung 2).

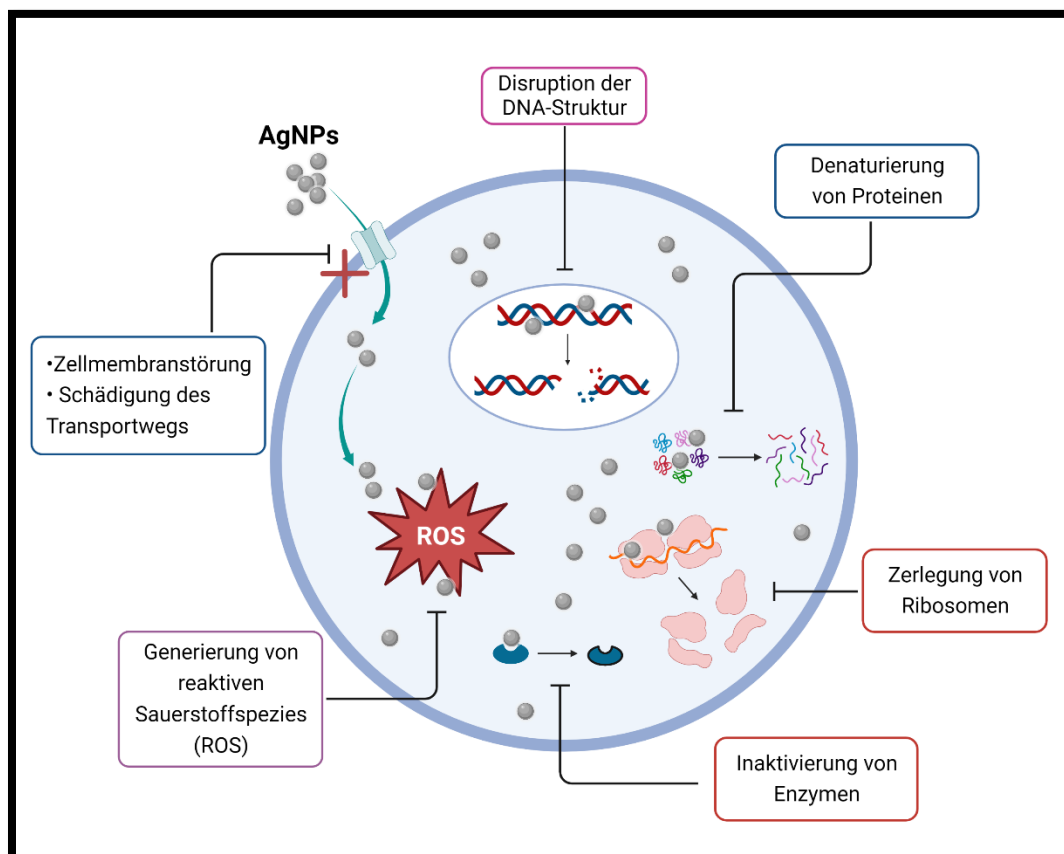


Abbildung 2: Mechanismus der antimikrobiellen Aktivität von Silbernanopartikeln; modifiziert nach Dakal et al. (2016).

Die bakterizide Wirksamkeit von AgNP wurde in zahlreichen Forschungsarbeiten untersucht und ihr effektives Potenzial gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen nachgewiesen. Beispielsweise berichtete Feng et al. (2000) über die bakterizide Wirkung von Silberionen gegen *S. aureus* und *E. coli*. Die bakterizide Aktivität von AgNP gegen *E. coli* als Modell für gramnegative Bakterien konnte von Sondi und Salopek-Sondi (2004) bestätigt werden. Andererseits führt die Kombination von Standardantibiotika mit den Silbernanopartikeln zur signifikanten Verstärkung der bakteriziden Aktivität Silbernanopartikeln gegen die pathogenen Bakterien *S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa* (Bonde et al., 2012). Ferner wiesen die AgNP auch antimykotische Aktivität gegen *Candida albicans* (*C. albicans*) als Modell für Pilze auf (Kim et al., 2009).

Trotz der ausgezeichneten antimikrobiellen Wirkung von AgNP muss berücksichtigt werden, dass AgNP in Abhängigkeit von ihrer Partikelgröße zytotoxische Wirkungen gegen Gewebezellen verursachen können (Kim et al., 2012). Andererseits ist auch zu beachten, dass der weit verbreitete Einsatz von AgNP zur Entwicklung von Resistenz bei Mikroorganismen führen kann. Es gibt bereits einen Nachweis von Silver et al., dass Silberresistenz in plasmidkodierten Salmonellen beobachtet werden konnte (Silver, 2003).

1.3 Knochen

1.3.1 Morphologie und Funktion

Das Knochengewebe ist eines der härtesten Gewebe im menschlichen Körper und besteht aus mineralisiertem Binde- und Stützgewebe. Es bildet zusammen das menschliche Skelett, welches den passiven Teil des Bewegungsapparates darstellt (Buck & Dumanian, 2012; Zilles & Tillmann, 2010). Das Skelett eines erwachsenen Menschen besteht aus 206 bis 213 Knochen, bietet die strukturelle Unterstützung für den ganzen Körper, dient dem Ansatz von Bändern und Muskeln und schützt die inneren Organe und Strukturen. Im Knochenmark befinden sich mesenchymale Stammzellen (MSC), die für die Regeneration von Stütz- und Bindegewebe verantwortlich sind, sowie hämatopoetische Stammzellen (HSC), die die primären Zellen für die Blutbildung darstellen. Darüber hinaus spielt Knochengewebe eine Rolle bei der Mineralstoffhomöostase. Als größter Kalziumspeicher im Körper haben die Knochen eine wichtige metabolische Funktion in der Regulation des Blutkalziumspiegels und des Kalzium-Phosphathaushaltes (Erlebacher et al., 1995; Mackiewicz et al., 2012; Taichman, 2005).

Basierend auf ihrer Form lassen sich die Knochen in sechs Gruppen einteilen: 1) Röhrenknochen (*Ossa longa*) wie Femur, Ulna und Metakarpalknochen, 2) kurze Knochen (*Ossa brevia*) wie Karpal- und Tarsalknochen, 3) flache Knochen (*Ossa plana*) wie das Os parietale, Os occipitale und die Scapula, 4) luftgefüllte Knochen (*Ossa pneumatica*) wie die Maxilla, Os frontale und Os sphenoidale, 5) Sesambeine oder Sesamknochen (*Ossa sesamoidea*) wie die Patella und 6) unregelmäßig geformte Knochen (*Ossa irregularia*), die keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden können, wie die Wirbelkörper (Aumüller et al., 2020; Buck & Dumanian, 2012). Die Knochen können makroskopisch in Substantia compacta (auch Kortikalis genannt) und Substantia spongiosa unterteilt werden. Die Substantia compacta ist dicht und fest und umgibt den Markraum, während die Substantia spongiosa aus trabekulärem Knochengewebe besteht, das in Form von Platten und Stäbchen ins Knochenmarkfach eingestreut ist. Beim menschlichen Skelett besteht etwa 80 % der Knochenmasse aus kortikalem Knochen und etwa 20 % aus trabekulärem Knochen. Das Verhältnis von kortikalem zu trabekulärem Knochen variiert jedoch je nach Lage und Knochentyp (Aumüller et al., 2020; Hadjidakis et Androulakis, 2006).

Die Röhrenknochen bestehen aus drei Teilen: Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse. Die Diaphyse, die sich im Schaft des Knochens befindet, besteht aus der Substantia compacta und dem Cavum medullare. Die Metaphyse verbindet die Diaphyse mit den Epiphysen und enthält während des Wachstums die Epiphysenfugen. Die Epiphyse bildet die Enden der Röhrenknochen und enthält Substantia spongiosa mit dazwischen liegenden Cellulae medullares, umgeben von einer dünnen Schicht kortikalem Knochen (Aumüller et al., 2020).

Histologisch lassen sich zwei Knochenarten unterscheiden: Geflechtknochen und Lamellenknochen. Geflechtknochen, auch bekannt als Primärknochen, entstehen während der Knochenneubildung, wie zum Beispiel bei Knochenaufbau und Frakturheilung, und wird im Erwachsenenalter fast immer durch Lamellenknochen, auch bekannt als Sekundärknochen, ersetzt. Geflecht- und Lamellenknochen unterscheiden sich in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und der Anordnung der Kollagenfibrillen. Die Matrix von Geflechtknochen ist weniger mineralisiert und hat einen höheren Wassergehalt. Im Gegensatz dazu ist der Lamellenknochen aufgrund seiner faserigen Struktur und des höheren Mineralgehalts deutlich stabiler und belastbarer (Buck & Dumanian, 2012; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die Grundbausteine von Knochen sind die Knochenmatrix, die aus anorganischen und organischen Komponenten besteht, sowie die Knochenzellen. Die Zusammensetzung und Organisation der einzelnen Knochenkomponenten können je nach Knochenart und Reifestadium variieren. Die Knochenmatrix besteht zu etwa 50-70% aus anorganischer Matrix, die hauptsächlich Kalziumphosphat-Hydroxylapatit mit geringen Mengen an Carbonat, Magnesium und Phosphorsäure enthält. Zusätzlich besteht sie zu etwa 20-40% aus organischer Matrix, die vor allem aus Kollagen Typ I, Proteoglykanen und Glykoproteinen wie Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN) und Osteonectin besteht. Der Wassergehalt beträgt etwa 5-10% und der Fettgehalt ist geringer als 3% (Grabowski, 2015; Mackiewicz et al., 2012). Etwa 10% des gesamten Knochenvolumens machen Knochenzellen aus. Die Präosteoblasten differenzieren sich zu Osteoblasten, entwickeln sich weiter zu Saumzellen und schließlich zu Osteozyten, wobei sie ihren Ursprung in MSC haben. Diese zelluläre Sequenz ist essenziell für die Genese und das Remodeling des Knochengewebes. Im Gegensatz dazu sind Osteoklasten, die vom hämatopoetischen Zellen abstammen, hauptsächlich für den Abbau von Knochengewebe verantwortlich (Buck & Dumanian, 2012; Florencio-Silva et al., 2015).

1.3.2 Remodeling

Bone Remodeling bezeichnet den kontinuierlichen Prozess des Umbaus und der Regenerierung von Knochen, der nicht nur darauf abzielt, unreifen Geflechtknochen durch Lamellenknochen zu ersetzen, sondern auch die dauerhafte funktionelle Eignung von Knochen entsprechend ihren Funktionen zu verbessern. Eine sorgfältig regulierte Balance zwischen Knochensynthese und Knochenresorption ist entscheidend für den Remodeling-Prozess. Eine Fehlregulierung dieser Balance kann zu Knochenerkrankungen wie Arthrose, Osteoporose und Wachstumsstörungen führen (Eriksen, 1986.; Siddiqui & Partridge, 2016). Das Remodeling findet sich im sogenannten *Bone Remodeling Compartment* (BRC) statt, wo verschiedene Zellgruppen, die als *Basic Multicellular Units* (BMUs) bezeichnet werden, zusammenarbeiten und sequenziell aktiv sind. Diese BMUs bestehen aus Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und einer Kapillarblutversorgung, und werden von "Bone Lining Cells" als Dach bedeckt. Die zellulären Aktivitäten der BMUs variieren je nach Art des Knochens im Skelett und dem Alter, und ihre Struktur variiert je nachdem, ob sie sich im trabekulären oder kortikalen Knochen befinden (Hauge et al., 2001; Siddiqui & Partridge, 2016). Der Remodeling-Zyklus ist in Schritten reguliert und dauert etwa 120 Tage in der Substantia corticalis und etwa 200 Tage in der Substantia spongiosa (Agerbaek et al., 1991; Eriksen, Gundersen, et al., 1984; Eriksen, Melsen, et al., 1984).

Der Remodeling-Prozess ist stark reguliert und wird von lokalen und systemischen Faktoren beeinflusst, wodurch die Osteoklasten- und Osteoblastendifferenzierung und damit die Knochenresorption und -bildung reguliert werden.

1.3.3 Osteoblasten

Osteoblasten sind spezialisierte Knochenbildende Zellen, die eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung des Knochengewebes spielen. Ihre Hauptfunktion besteht darin, die organische Matrix des Knochens zu produzieren und abzusondern, die alkalische Phosphatase (ALP), OPN, OCN, Kollagen Typ I und anderen spezifischen Matrixproteinen enthält sowie die Regulation der Mineralisierung des Knochengewebes, indem sie Hydroxyapatit-Kristalle ablagern, die zur Verkalkung führen und den Knochen ihre charakteristische Härte und Festigkeit verleihen (Bellido, 2014; Bilezikian et al., 2002). Die Osteoblasten ordnen sich in epithelartigem Muster auf der Oberfläche der

Knochenbälkchen an und besitzen einen einzelnen Zellkern, eine große Anzahl an Mitochondrien, Ribosomen und Lysosomen sowie einen gut entwickelten Golgi-Apparat. Diese Zellorganellen ermöglichen es den Osteoblasten, ihre metabolische Aktivität auszuführen (Marks & Popoff, 1988).

Osteoblasten entstehen aus MSC, die sich zu Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten differenzieren. Mit fortschreitender Reifung und Differenzierung werden sie schließlich zu voll funktionsfähigen Osteoblasten, die die Proteine und anderen Komponenten produzieren, die die Knochenmatrix ausmachen (Bellido, 2014; Chamberlain et al., 2007). Einige dieser Osteoblasten werden während der Synthese in die verkalkte Knochenmatrix eingebettet und differenzieren sich zu Osteozyten. Andere bleiben auf der Knochenoberfläche als inaktive Saumzellen. Die überschüssigen Osteoblasten gehen schließlich in die Apoptose über (Eriksen, 2010; Uchihashi et al., 2013) (Abbildung 3).

1.3.4 Osteoblastogenese

Die Osteoblastogenese ist ein komplexer Prozess, bei dem sich MSC zu reifen Osteoblasten differenzieren. Dieser Vorgang verläuft in mehreren Stufen und wird durch verschiedene Kaskaden und Faktoren reguliert, die von einer Vielzahl von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden (Chau et al., 2009; Zuo et al., 2012). Zu den wichtigsten Signalwegen, die an der Regulation der Osteoblastogenese beteiligt sind, gehören der *Wingless-related integration site* (Wnt)-, *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)-, *Fibroblast growth factor* (FGF)-, *Parathyroid hormone* (PTH) or *PTH-related protein* (PTHrP)-, *Insulin-like growth factors* (IGF)- und Hedgehog (Hh)-Signalwege. Diese Signalwege werden durch spezifische Liganden aktiviert, die an ihre jeweiligen Rezeptoren binden und eine Signalkaskade auslösen, die letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt (Hojo et al., 2015; Zuo et al., 2012). Verschiedene Transkriptionsfaktoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der Osteoblastogenese. Hierzu zählen unter anderem *Runx-related transcription factor 2* (*Runx2*), *Osterix*, *Msx*, *Dlx5* und *Activating transcription factor 4* (*ATF4*). Diese Faktoren sind von entscheidender Bedeutung für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten und kontrollieren die Genexpression von wichtigen Knochenbildungs-Genen (Chau et al., 2009; Komori et al., 1997; Nakashima & de Crombrughe, 2003) (Abbildung 3).

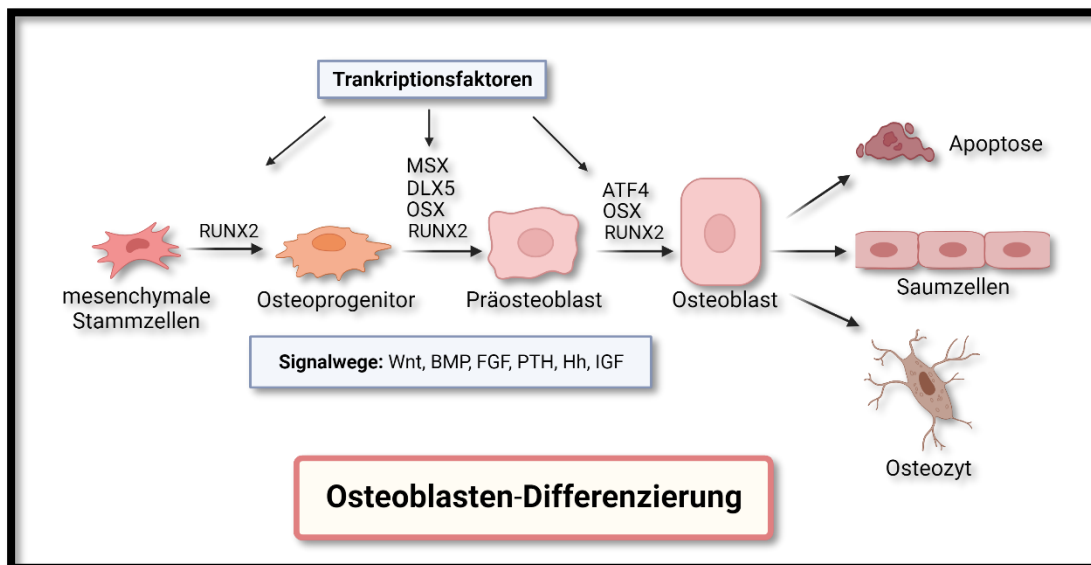


Abbildung 3: Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu reifen Osteoblasten. Wnt: Wingless-related integration site, BMP: Bone Morphogenetic Protein, FGF: Fibroblast growth factor, PTH: Parathyroid hormone, IGF: Insulin-like growth factors, Hh: Hedgehog.

Der Wnt-Signalweg reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen, einschließlich der Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung (Baron et al., 2006; Clevers, 2006; Kobayashi et al., 2008). In Osteoblasten binden Wnt-Proteine an Frizzled-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, was die Aktivierung von nachgeschalteten Signalmolekülen wie Disheveled und Beta-Catenin auslöst. Beta-Catenin transloziert dann in den Zellkern und interagiert mit T-Zell-Faktor/Lymphoid-Enhancer-Faktor (TCF/LEF)-Transkriptionsfaktoren, um die Expression von Genen zu fördern, die an der Knochenbildung beteiligt sind (Arce et al., 2006; Clevers, 2006). Neben dem kanonischen Wnt-Signalweg gibt es auch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, der in Osteoblasten aktiv ist. Dieser Signalweg aktiviert Signalkaskaden wie die Planar Cell Polarity (PCP)- und die Wnt/Ca²⁺-Kaskade, um seine Wirkung zu entfalten. Insgesamt tragen beide Signalwege zur Regulation der Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung bei (Gao, 2012; Johnson & Rajamanan, 2006). Zusätzlich dazu interagieren die Signalketten PTH und des BMP ebenfalls mit dem Wnt-Signalweg, wodurch sie zusätzliche eine Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Knochen spielen (Hojo et al., 2015; Song et al., 2021).

Der BMP-Signalweg ist ein weiterer wesentlicher Mechanismus in der Osteoblastendifferenzierung und Knochenentwicklung (Wan & Cao, 2005). Die BMP-Gruppe, insbesondere *BMP2*, gehört zur TGF- β -Superfamilie und stimuliert die Osteoblastendifferenzierung sowie die Knochenbildung durch Bindung an Typ-I- und Typ-II-BMP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Noël et al., 2004; Wan & Cao, 2005). Die Aktivierung des BMP-Signalwegs löst entweder den Smad-abhängigen (kanonischen) oder den Smad-unabhängigen (nicht-kanonischen) Signalweg aus. Im kanonischen Signalweg führt die Aktivierung der Rezeptoren zur Bildung von aktivierten Smad-Proteinen (R-Smad), bestehend aus *Smad1/5/8-Smad4*-Komplexen. Diese komplexe Formation interagiert mit *Runx2* im Zellkern, um die Osteoblastendifferenzierung zu initiieren. Im nicht-kanonischen Signalweg ist der TAK1-MKK3/6-p38 MAPK-Signalweg an der Aktivierung von *Runx2* und *Osterix* beteiligt, die durch die Bindung von BMPs vermittelt wird (Chen et al., 2012; Lee et al., 2000; Wan & Cao, 2005). Jede Störung in den Komponenten dieser Signalwege können zu verschiedenen Entwicklungsproblemen im Skelett führen (Chen et al., 2012; Wan & Cao, 2005).

FGF ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der in verschiedenen Geweben vorkommt und eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum, Differenzierung und Entwicklung spielt (Marie, 2003). Es gibt über 20 verschiedene Arten von FGFs, von denen jeder eine spezifische Funktion erfüllt. In Bezug auf die Knochenbildung ist *FGF-2*, auch bekannt als basischer FGF, besonders wichtig, da er ein wichtiger Regulator der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten ist. *FGF-2* wird von Osteoblasten und Osteozyten produziert und bindet an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, bekannt als FGF-Rezeptoren. Dies führt zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, einschließlich der MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege, die zur Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Überleben beitragen (Marie, 2003; Ornitz & Marie, 2002; Tokuda et al., 2000).

Der PTH/PTHrP-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Differenzierung von Osteoblasten und der Knochenbildung. PTH wird in den Nebenschilddrüsen produziert und bindet an den PTH-Rezeptor auf der Oberfläche von Osteoblasten und Osteozyten, was zur Aktivierung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP)-Signalwegs und der Protein-Kinase-A (PKA) führt. Das aktivierte PKA phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie CREB (cAMP Response Element Binding Protein), die in den Zellkern transloziert werden und die Expression von Genen fördern, die an der

Knochenbildung beteiligt sind (Datta & Abou-Samra, 2009; Qin et al., 2004a). PTHrP wird von verschiedenen Zellen produziert, einschließlich Osteoblasten und Osteozyten, und bindet ebenfalls an den PTH-Rezeptor, was zu einer ähnlichen Aktivierung des cAMP-Signalwegs und der PKA führt. PTHrP kann auch direkt auf die Differenzierung von Osteoblasten einwirken, indem es die Expression von Osteoblasten-assoziierten Genen wie Osteopontin und Kollagen fördert (Datta & Abou-Samra, 2009). Es wurde nachgewiesen, dass PTH sowohl die Proteinexpression als auch die Transkriptionsaktivität von *Runx2* erhöht (Krishnan et al., 2003).

Neben dem bekannten Signalweg gibt es auch andere Signalwege, die die Differenzierung von Osteoblasten regulieren können, darunter der Signalweg des Hh und der IGF-Signalweg. Hh fördert die Differenzierung von Osteoblasten durch Steigerung der Expression von *Runx2* und *Osterix* (Shimoyama et al., 2007a). Der IGF-Signalweg aktiviert Effektoren wie PI3K, Akt und MAPK, die die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie *Runx2* und *Osterix* regulieren. Zudem stimuliert IGF die Expression von BMPs und FGFs, die auch wichtige Regulatoren der Osteoblastogenese sind. Außerdem beeinflusst IGF die Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, was die Knochenresorption und damit den Knochenumbau steuert (Canalis, 1993; Grey et al., 2003). Insgesamt sind die Signale, die bei der Osteoblastogenese beteiligt sind, äußerst komplex, dynamisch und beinhalten Interaktionen zwischen mehreren Signalwegen und Faktoren. Diese Interaktionen sind eng reguliert, um eine angemessene Knochenentwicklung und -erhaltung sicherzustellen

1.3.5 *Runx2*

Runx2, auch bekannt als *core-binding factor subunit alpha-1 (CBFA1)*, ist ein Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Knochengewebe spielt. Er gehört zur Runx-Familie von Transkriptionsfaktoren, die die DNA-bindende Domäne "Runt" enthalten und aus *Runx1*, *Runx2* und *Runx3* bestehen. Diese Transkriptionsfaktoren sind an verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt (Komori, 2017; Otto et al., 1997). Runx2-Proteine enthalten neben der Runt-Homologie-Domäne (RHD) auch weitere funktionale Domänen wie die Glutamin/Alanin-reiche Domäne (QA), das Kernlokalisierungssignal (*Nuclear Localization Signal* - NLS), die Prolin/Serin/Threonin-reiche Domäne (PST), das Kernmatrix-Zielsignal (*Nuclear Matrix*

Targeting Signal - NMTS), die Repressionsdomäne (RD) und die VWRPY-Domäne. Diese Domänen spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Transkription von *Runx2* und dessen Funktion in der Knochenentwicklung und -homöostase. Sie sind an Protein-Protein-Interaktionen, subzellulärer Lokalisierung, posttranslationalen Modifikationen und transkriptioneller Regulation beteiligt. Das komplexe Zusammenspiel zwischen diesen Domänen und anderen molekularen Ereignissen bestimmt die Gesamtfunktion von *Runx2* (Ziros et al., 2008). *Runx2* wird von zwei Promotoren, P1 und P2, reguliert, die jeweils zu unterschiedlichen Transkriptvarianten führen, die Typ II bzw. Typ I *Runx2* kodieren (Fujiwara et al., 1999; Ziros et al., 2008).

Die Expression von *Runx2* wurde in Osteoblasten und Chondrozyten beobachtet. In Chondrozyten ist die Expression von *Runx2* in ruhenden Chondrozyten gering, jedoch erhöht sie sich in prähypertrophen Chondrozyten und bleibt in terminalen hypertrophen Chondrozyten hoch (Enomoto et al., 2000; Inada et al., 1999). In undifferenzierten mesenchymalen Zellen wird *Runx2* exprimiert und seine Expression wird während der Entwicklung zu Präosteoblasten hochreguliert. In unreifen Osteoblasten erreicht *Runx2* seine maximale Expression. Allerdings wird die Expression von *Runx2* während der Reifung von Osteoblasten herunterreguliert, um einen ordnungsgemäßen Knochenumbau und -erhalt zu ermöglichen (Maruyama et al., 2007; Qin et al., 2019).

Runx2 wird als ein Hauptregulator der Differenzierung von Osteoblasten betrachtet. Es reguliert primär die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Präosteoblasten und fördert anschließend ihre Reifung zu Osteoblasten. Darüber hinaus stimuliert *Runx2* die Expression von Genen, die für die Bildung der Knochenmatrix von großer Bedeutung sind, wie beispielsweise Kollagen Typ-I, OCN und ALP. Diese Gene sind unerlässlich für eine korrekte Knochenmineralisierung und die Aufrechterhaltung der Knochenmasse. *Runx2* interagiert zudem mit anderen Transkriptionsfaktoren und Ko-Regulatoren, um die Genexpression während der Differenzierung von Osteoblasten zu steuern und bildet so ein komplexes regulatorisches Netzwerk, das die Entstehung und Reifung der *osteoblast lineage* kontrolliert. Neben seiner Rolle in der Knochenbildung spielt *Runx2* auch eine Rolle bei der Regulation der Reifung von Chondrozyten, der Angiogenese und der Entwicklung der Zähne (Komori et al., 1997; Schroeder et al., 2005). *Runx2* wird von einer Vielzahl von Signalwegen reguliert, darunter BMP, Wnt, Hh, PTHrP und FGF, die spezifische Transkriptionsfaktoren und Co-Regulatoren aktivieren oder inhibieren, um die Expression von *Runx2* zu modulieren (Lee et al., 2000; Marie, 2003; Qin et

al., 2004; Shimoyama et al., 2007; Wan & Cao, 2005). Des Weiteren interagieren andere Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren wie *Osterix*, *Dlx5*, *ATF4* und β -Catenin mit *Runx2* und modulieren seine Transkriptionsaktivität (Komori, 2017; Nakashima et al., 2002; Roca et al., 2005). In Mäusen mit Deletion von *Runx2* wurde eine Beeinträchtigung der Osteoblastogenese bzw. der Knochenbildung und eine verminderte Reifung von Chondrozyten beobachtet (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997).

1.3.6 Osterix

Osterix, auch bekannt als *Sp7*, ist ein Transkriptionsfaktor der SP/KLF-Familie mit einer Zinkfinger-Domäne. Er wird in Zellen der Osteoblasten-Linie und Chondrozyten exprimiert und in verschiedenen Tumoren wurde eine Überexpression gefunden (Nakashima et al., 2002; Qu et al., 2019; Suske et al., 2005). Die subzelluläre Lokalisation von *Osterix* ist auf den Zellkern beschränkt, was auf seine Funktion als nukleärer Transkriptionsfaktor hinweist. *Osterix* ist an der Regulation der Differenzierung von Osteoblasten, der Mineralisierung der extrazellulären Matrix und der Knochenbildung beteiligt und spielt daher eine entscheidende Rolle im genetischen Programm der Knochenbildung (Kaback et al., 2008; Nakashima et al., 2002). *Osterix* enthält am C-Terminus eine DNA-bindende Domäne mit drei C2H2-typischen Zinkfingern. Diese Zinkfinger ermöglichen es *Osterix*, spezifisch an DNA zu binden und die Transkription von Genen zu regulieren. Zusätzlich enthält *Osterix* eine prolin- und serinreiche Transaktivierungsdomäne, die durch Interaktion mit Co-Faktoren und dem Transkriptionsapparat die Expression von Genen steuert, die für die Funktion von Osteoblasten bei der Knochenbildung erforderlich sind, wie Kollagen Typ I, OCN, OPN, Osteonectin und Bone-Sialoprotein. Dadurch spielt *Osterix* eine entscheidende Rolle bei der korrekten Differenzierung und Funktion von Osteoblasten während der Knochenentwicklung und der Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase (Kaback et al., 2008; Nakashima et al., 2002; Renn & Winkler, 2009). Darüber hinaus spielt *Osterix* auch eine Rolle bei der Hemmung der Chondrozytendifferenzierung, um das Gleichgewicht zwischen Knochen- und Knorpelbildung aus mesenchymalen Vorläuferzellen aufrechtzuerhalten (Kaback et al., 2008).

Osterix interagiert kooperativ mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wobei die wichtigste Interaktion mit *Runx2* stattfindet. Diese Interaktion führt zu einer synergistischen Induktion der Genexpression. Während der Osteoblastogenese ist *Runx2* entscheidend für die Bildung von Präosteoblasten aus MSC, während *Osterix* entscheidend für die

Differenzierung von Präosteoblasten in reife und funktionale Osteoblasten ist. Eine präzise zeitliche Steuerung und Regulation ihrer Expression sind entscheidend für die normale Knochenbildung. Darüber hinaus beeinflusst *Runx2* direkt die Expression von *Osterix* (Artigas et al., 2014; Nishio et al., 2006; Sinha & Zhou, 2013).

Die Regulation der Expression von *Osterix* ist ein komplexer Vorgang, der sowohl *Runx2*-abhängige als auch *Runx2*-unabhängige Signalwege involviert (Nishio et al., 2006). Der BMP/Smads/*Runx2*-Signalweg wird als der kanonische Mechanismus für die *Runx2*-abhängige Regulation von *Osterix* angesehen, bei dem *Runx2* entweder direkt oder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren die Expression von *Osterix* reguliert, wie zum Beispiel *Nfic* und *ZIP1*. Des Weiteren kooperiert *Osterix* in einer wechselseitigen Weise mit anderen Transkriptionsfaktoren wie *Dlx5* und *myocyte enhancer factor-2* (*Mef2*), um die Regulation von *Runx2* zu beeinflussen (Lee et al., 2014; Lee et al., 2003; Matsubara et al., 2008).

Neben den *Runx2*-abhängigen Signalwegen wurden auch mehrere *Runx2*-unabhängige Signalwege in der Regulation der *Osterix*-Expression identifiziert. Diese Wege werden durch Signalmoleküle wie BMP, TGF- β und FGF induziert, die nachfolgende Signalkaskaden wie Smads, MAPK oder *Erythroblast Transformation Specific* (ETS) aktivieren und dadurch zu einer direkten oder indirekten Regulation der *Osterix*-Expression führen (Felber et al., 2015; Matsubara et al., 2008; Subramaniam et al., 2016).

Eine Dysregulation der *Osterix*-Expression oder Aktivität kann zu verschiedenen skelettalen Störungen und Pathologien führen, wie zum Beispiel Osteogenese imperfecta, Osteoporose und Osteosarkom (Lapunzina et al., 2010; Timpson et al., 2009).

1.4 Zielsetzung der Studie

Das Ziel dieser experimentellen Studie ist es, ein tiefgreifendes und umfassendes Verständnis der biologischen und klinischen Auswirkungen von mit AgNP-funktionalisierten Implantaten auf die Osteoblastogenese zu erlangen. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der Analyse der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix*, die eine Schlüsselrolle in der Differenzierung von Osteoblasten spielen und somit für die Knochenregeneration und -bildung essenziell sind. Die Studie bedient sich eines experimentellen Tiermodells, in dem Implantate aus verschiedenen Materialien (PMMA-Zement, Titan, Kollagen Typ I, jeweils ohne Funktionalisierung, mit AgNP oder zusätzlichem Gentamicin) eingesetzt und nach einer Verweildauer von vier Wochen oder sechs Monaten analysiert wurden. Die spezifischen Forschungsziele umfassen:

- Analyse des Einflusses von mit AgNP-funktionalisierten Implantaten verschiedener Materialien auf die Population von Runx2- und Osterix-positiven Osteoblasten und Präosteoblasten, mit Fokus auf deren zeitliche Entwicklung über vier Wochen und sechs Monate.
- Vergleich der osteoblastogenen Effekte von mit AgNP-funktionalisierten Implantaten aus unterschiedlichen Materialzusammensetzungen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Regulation der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix*.

Das Erreichen dieser Ziele wird nicht nur zur wissenschaftlichen Erkenntnis beitragen, sondern auch praktische Anwendungen in der klinischen Praxis beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten wesentlich dazu beitragen, die Einsatzmöglichkeiten und Risikobewertungen von mit AgNP-funktionalisierten Implantaten zu optimieren und somit einen bedeutenden Fortschritt in der Entwicklung effizienter und sicherer Knochenersatzmaterialien darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Knochenimplantate

In dieser Studie wurden verschiedene Implantatmaterialien (PMMA-Knochenzement, Titan, Kollagen Typ I) mit unterschiedlichen Dotierungen verwendet. Die Implantate wurden in 72 Tiere, die in 12 Gruppen aufgeteilt waren, implantiert. Die Euthanasie erfolgte entweder nach 4 Wochen (Gruppen 1-6) oder nach 6 Monaten (Gruppen 7-12).

Die PMMA-Zementimplantate wurden entweder mit 4000 µg AgNP/g Zement (Gruppe 1 und 7) oder mit 4000 µg AgNP/g Zement plus Gentamicinsulfat (1,34%) (Gruppe 2 und 8) dotiert und in ausgehärteter Form implantiert. Die Titanimplantate bestanden aus Rohmaterial (TiAl6V4-ELI) und wurden durch plasmaelektrolytische Oxidation behandelt. Die Oxidation erfolgte unter Verwendung eines Elektrolyts, das entweder 0% AgNP (Gruppe 3 und 9) oder 5% AgNP enthielt (Gruppe 4 und 10). Die Kollagenimplantate bestanden aus resorbierbaren Kollagenzylindern vom Typ I, die entweder mit 4000 µg AgNP/g Kollagen (Gruppe 5 und 11) oder ohne AgNP (Kontrollgruppe, Gruppe 6 und 12) funktionalisiert wurden.

Die AgNP wurden von rent Scientist GmbH (Regensburg, Deutschland) hergestellt und von aap Biomaterials GmbH (Dieburg, Deutschland) in die Osteosynthesematerialien integriert. Die Knochenersatzmaterialien wurden mithilfe der AgPURE W50 Nano-Ag-Dispersion (rent Scientist) dotiert. Die AgNP in der Funktionalisierung der Osteosynthesematerialien hatten eine Größe von ca. 15 nm.

Die Knochenimplantate mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einer Länge von 2 cm wurden in das Tibiaplateau eingesetzt und in die Knochenmarkhöhle der Ratten eingebracht (Abbildung 4).

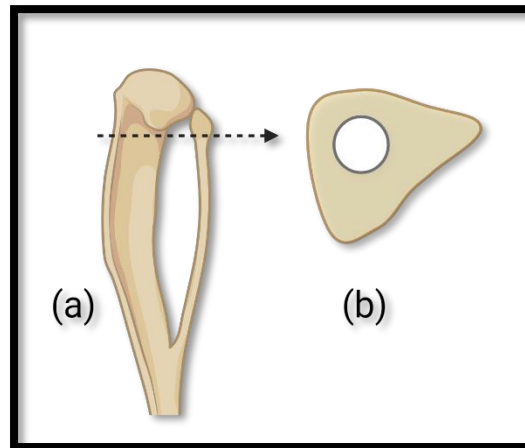


Abbildung 4: (a) Rattentibia, (b) Querschnitt der implantierten Rattentibia

Die nachfolgende Tabelle fasst die Verteilung der zwölf Gruppen nach Implantattyp und Zeitpunkt der Euthanasie der Versuchstiere zusammen.

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Versuchstiere mit den verschiedenen Implantaten

Implantat (n=6 pro Gruppe)	Standzeit	
	4 Wochen	6 Monate
PMMA-Zementimplantat mit AgNP	Gruppe 1	Gruppe 7
PMMA-Zementimplantat mit Gentamicin und AgNP	Gruppe 2	Gruppe 8
Titanimplantat ohne AgNP	Gruppe 3	Gruppe 9
Titanimplantat mit AgNP	Gruppe 4	Gruppe 10
Kollagenimplantat mit AgNP	Gruppe 5	Gruppe 11
Kollagenimplantat ohne AgNP	Gruppe 6	Gruppe 12

2.2 Tierexperimentelle Versuche

Die in dieser Studie verwendeten Präparate stammen aus dem nachfolgend beschriebenen Tiermodell, welches bereits durch die Kollegen der experimentellen Unfallchirurgie im Rahmen des BioNanoCare-Projekts (FKZ 03X0103D) durchgeführt wurde.

2.2.1 Tiermodell und Versuchsdesign

Die Tierversuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (V 54 – 19 c 20 15 h 01 GI Nr. 20/14 Nr.120/2012). Bei den in dieser Studie verwendeten Versuchstieren handelte es sich um 72 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Zum Zeitpunkt der Operation waren alle Tiere 16 Wochen alt und wogen etwa 400g. Die Unterbringung der Tiere und die Durchführung der Versuche erfolgten im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere wurden vor Beginn der Experimente für eine ausreichende Akklimatisierungsphase von drei Wochen eingestellt und erhielten handelsübliches Futter und Wasser ad libitum. Für den Versuch wurden die Tiere in 12 Gruppen mit jeweils 6 Ratten eingeteilt, was insgesamt 72 Ratten ergab. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Tiere mit Stanzlöchern gemäß einem Ohrmarken-Schema gekennzeichnet.

Nach einer postoperativen Standzeit von vier Wochen bzw. sechs Monaten wurden jeweils 36 Tiere euthanasiert und anschließend wurden Proben entnommen

2.2.2 Versuchsdurchführung

Die Operationen an den Versuchstieren wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Während des Tierversuchs wurden die üblichen chirurgischen Verfahren sorgfältig und streng eingehalten. Es wurden umfassende Maßnahmen zur Infektionsprävention während der Operation getroffen. Eine kontinuierliche und ausreichende Schmerzlinderung wurde während des gesamten Eingriffs gewährleistet. Die Vitalparameter jedes Tieres wurden überwacht und bei Bedarf angepasst.

Die Ratten wurden in Rückenlage auf dem Operationstisch positioniert. Für die Implantation des Knochenersatzmaterials im proximalen Unterschenkel wurde ein Zugang zum intramedullären Kanal der Tibia über der Tuberositas tibiae geschaffen. Nach Präparation und Bohren wurde das Implantat mit einer Länge von 2 cm und einer Breite von 1,5 mm in den Markkanal der Tibia eingesetzt. Um Oberflächenschäden durch Instrumente zu vermeiden, erfolgte die Implantation von Zement- und Titanimplantaten manuell per Hand. Bei den Kollagenimplantaten konnte ein Applikator verwendet werden. Am Ende des Eingriffs wurde die Wunde schichtweise verschlossen. Um eine Kontamination durch Kratzen oder Lecken der Wunde zu verhindern, wurde ein Wundsprühpflaster auf die Naht aufgebracht.

Die Tiere wurden in einer warmen, kontrollierten Umgebung gehalten und ihre Vitalparameter wurden regelmäßig überprüft, bis sie wieder bei Bewusstsein waren.

2.2.3 Postoperative Betreuung

Postoperativ wurden die Ratten initial für sieben Tage einzeln gehalten, um Verletzungen und Kontaminationen zu vermeiden. Ab dem achten Tag nach dem Eingriff wurden die Ratten unter Standardbedingungen in Gruppen von vier Tieren gehalten. Es wurde darauf geachtet, eine ausreichende Schmerzlinderung in der postoperativen Phase sicherzustellen. Das allgemeine Wohlbefinden der Tiere wurde täglich überprüft. Mithilfe eines *Scoring Sheets* wurden mehrere physiologische Parameter kontinuierlich analysiert und dokumentiert. Bei Auffälligkeiten erfolgte eine tierärztliche Untersuchung. Es wurde keine systemische Erkrankung bei den Tieren festgestellt und es trat kein Gewichtsverlust von mehr als 10 % des Ausgangsgewichts vor der Operation auf, weshalb keine vorzeitige Euthanasie erforderlich war.

2.2.4 Euthanasie und Probenentnahme

Die Euthanasie der Ratten erfolgte nach einer postoperativen Zeitspanne von 4 Wochen bzw. 6 Monaten, während die Tiere unter Narkose waren. Nach einer vorsichtigen makroskopischen Präparation der Muskeln und des umliegenden Gewebes wurden die Tibiae der Versuchstiere zusammen mit den Implantaten entnommen.

2.2.5 Probenaufbereitung

Mit Hilfe einer Bandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland) wurden die entnommenen Knochen in Scheiben mit einer Dicke von 3 mm gesägt. Die Knochenschnitte wurden zunächst für 24 Stunden in einer 4%igen Paraformaldehydlösung in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2–7,4) bei Kühlschranktemperatur fixiert und anschließend sechsmal mit dem gleichen Puffer gespült. Der Puffer wurde aus einer Stammlösung (1000 ml: 230 ml 27,6 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat bei 4°C und 770 ml 35,6 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat bei Raumtemperatur (RT), jeweils in Aqua bidest) hergestellt, die im Verhältnis 1:1 mit Aqua bidest zur Gebrauchslösung verdünnt wurde. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Proben entkalkt. Die Proben wurden in einem Paraffin-Einbettautomaten (TP 1050, Leica, Wetzlar, Deutschland) durch eine aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Nach der Einbettung wurden die Proben mit Hilfe des Rotationsmikrotoms (RM 2155, Leica, Wetzlar, Deutschland) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten.

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Labormethode, bei der Antikörper eingesetzt werden, um spezifische Antigene in Gewebeproben nachzuweisen. Es gibt zwei verschiedene Methoden: die direkte und indirekte Methode. Unabhängig von der gewählten Methode ist der erste Schritt bei dieser Technik die spezifische Bindung des primären Antikörpers an das Zielantigen. Diese Interaktion kann entweder direkt oder indirekt sichtbar gemacht werden, indem eine chromogene Reaktion durch Reporterenzyme wie Meerrettichperoxidase (HRP) oder ALP katalysiert wird. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper selbst mit den Reporterenzymen markiert, während bei der indirekten Methode der Primärantikörper durch einen biotinylierten sekundären Antikörper gebunden wird (Chi & Chandy, 2007; Magaki et al., 2019).

Im nächsten Schritt wird ein Avidin-Biotin-Komplex hinzugefügt, der an den sekundären Antikörper bindet. Durch Zugabe eines Chromogens oder Substrats entsteht eine Farbreaktion, die das markierte Antigen sichtbar macht (Chi & Chandy, 2007; Magaki et al., 2019) (Abbildung 5).

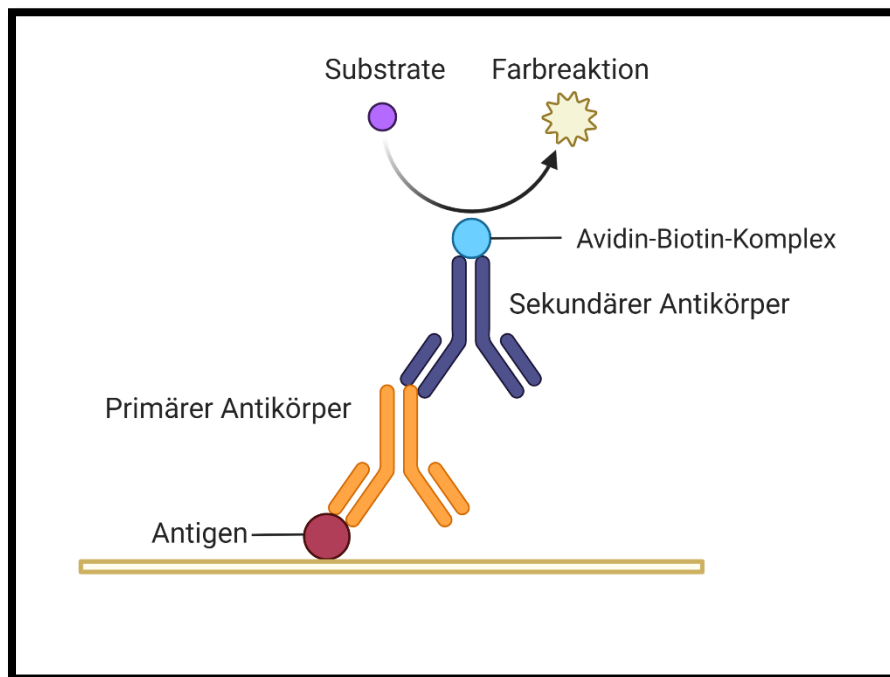


Abbildung 5: Avidin-Biotin-Komplex, modifiziert nach Bratthauer, 2010.

2.3.1 Antikörper

Für die Detektion von Runx2 wurde der monoklonale Anti-Runx2-Antikörper [EPR22858-106] ChIP-Grade, der aus Kaninchen gewonnen wurde und gegen Rattengewebe gerichtet ist, verwendet. Dieser Antikörper wurde von Abcam (Cambridge, England, Nr. ab236639) bereitgestellt und in einem Verdünnungspuffer (VP) (Antibody Diluent, Dako, Hamburg, Deutschland) im Verhältnis von 1:500 verdünnt.

Für die Detektion von Osterix wurde ein monoklonaler Anti-Sp7/Osterix-Antikörper [EPR21034], der aus Kaninchen gewonnen wurde und gegen Rattengewebe gerichtet ist, von Abcam (Nr. ab227820) verwendet. Auch dieser Antikörper wurde in einem VP verdünnt, jedoch im Verhältnis von 1:1500.

2.3.2 Herstellung der Lösungen

TBS (Tris-NaCl) -Puffer:

Stammlösung: 60,57 g Tris Base (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 87,66 g NaCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) werden in 1000 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt, indem 25%ige Salzsäure (Carl Roth) hinzugefügt wird.

TBS-Puffer: Die Stammlösung enthält 0,5 M Tris und 1,5 M NaCl. Durch Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. entsteht der gebrauchsfertige Puffer mit einer Endkonzentration von 50 mM Tris und 150 mM NaCl.

Waschpuffer:

Der Waschpuffer besteht aus TBS-Puffer (pH 7,4) mit 0,025% Triton X-100. Zur Herstellung werden 100 ml der TBS-Stammlösung (enthält 0,5 M Tris und 1,5 M NaCl) mit 900 ml destilliertem Wasser und 0,25 ml Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermischt. Nach der Verdünnung enthält der Waschpuffer eine Endkonzentration von 50 mM Tris, 150 mM NaCl und 0,025% Triton X-100 (entspricht etwa 0,4 mM Triton X-100).

Tris-EDTA Puffer, pH 9,0:

Zur Herstellung des Tris-EDTA-Puffers werden 1,21 g Tris Base (10 mM, Carl Roth) und 0,37 g Titriplex II (1 mM EDTA, Merck) in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 25%iger Salzsäure (Carl Roth) auf 9,0 eingestellt. Anschließend werden 0,5 ml Tween 20 (0,05%, Carl Roth) hinzugefügt. Der fertige Puffer enthält 10 mM Tris, 1 mM EDTA und 0,05% Tween 20 (ca. 0,4 mM).

Blockierungslösung:

Die Blockierungslösung wird aus 189 ml Waschpuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,025% Triton X-100) und 21 ml 30%igem H₂O₂ (ca. 3% bzw. 0,88 M) hergestellt.

2.3.3 Etablierung der Färbeprotokolle

Runx2:

Für die experimentellen Untersuchungen wurden Paraffinschnitte von Mausmilz verwendet, da eine positive Reaktion erwartet wurde. Zur Evaluierung der optimalen Färbemethode wurden zwei Ansätze verfolgt. Erstens wurde eine Antigen-Demaskierung durch Erhitzung der Schnitte in einem Tris-EDTA-Puffer bei verschiedenen Temperaturen (60°, 70°, 80°, 90°, 100° und 110°C) für unterschiedliche Zeitintervalle (20 min, 60 min und 120 min) und unter Anwendung verschiedener Kühlmethoden (10 min Kälteschock, sofortige Überführung in destilliertes Wasser und 30 min Abkühlung bei (RT)) durchgeführt. Zweitens wurden verschiedene Konzentrationen (Antikörperverdünnung von 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500 und 1:2000) getestet. Negativkontrollen wurden bei jeder Markierung durchgeführt, indem der Primärantikörper durch den VP ersetzt wurde, um potenzielle unspezifische und Hintergrundfärbungen zu erkennen und auszuschließen.

Die Evaluierung der Isotypkontrolle erfolgte mit dem von Abcam bereitgestellten *Rabbit-IgG* (Ab 172730), wobei Konzentrationen von 1:500 und 1:1000 verwendet wurden.

Das optimale Färbeergebnis für Runx2 wurde mithilfe der ABC-Methode unter Verwendung des Elite-ABC-HRP-Kits (Peroxidase, Standard, PK-6100, Vector), erzielt. Hierbei wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt, nachdem das Gewebe zuvor für 120 min bei 60°C in einem Tris-EDTA-Puffer mit einem pH-Wert von 9 erhitzt und anschließend für 30 min bei RT abgekühlt wurde.

Osterix:

Zur Bestimmung der optimalen Färbemethode für Osterix wurden zwei Ansätze verfolgt. Erstens wurde eine Antigen-Demaskierung durch Erhitzen der Schnitte in Tris-EDTA-Puffer (pH 9,0) und Citratpuffer (pH 6,0) bei 60°C für verschiedene Zeitintervalle (30 min und 60 min) sowie anschließendes Abkühlen mittels eines 10-minütigen Kälteschocks durchgeführt. Zweitens wurden verschiedene Konzentrationen (Antikörper-Verdünnung von 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500 und 1:2000) getestet. Bei jedem Färbeverfahren wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen der Primärantikörper durch den

VP ersetzt wurde, um unspezifische Anfärbungen und Hintergrundfärbungen zu erkennen und auszuschließen

Für die Färbung von Osterix erwies sich die Verwendung des Elite-ABC-Kits (Vector) und eine Primärantikörper-Verdünnung von 1:1500 nach vorherigem Erhitzen des Gewebes für 60 min bei 60°C in Tris-EDTA-Puffer (pH 9,0) und anschließendem Abkühlen mittels eines 10-minütigen Kälteschocks als die beste Methode.

Tabelle 3: Die primären Antikörper

Primär Antikörper	Wirtspezies	Firma	Verdünnung
Anti-RUNX2 Antikörper [EPR22858-106]	Rabbit monoclonal	Abcam (ab236639)	1:500 4°C über Nacht
Anti-Sp7 / Osterix Antikörper [EPR21034]	Rabbit monoclonal	Abcam (ab227820)	1:1500 4°C über Nacht

2.3.4 Färbeprotokoll Runx2

Zur Visualisierung von Runx2 wurde, wie bereits erwähnt, ein monoklonaler Anti-Runx2-Antikörper [EPR22858-106], ChIP-Grade (ab236639) verwendet, der aus Kaninchen stammt und gegen Rattengewebe gerichtet ist. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

Zu Beginn wurde eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte durchgeführt. Dies erfolgte durch zweimaliges Baden in Xylol für jeweils 5 Minuten und anschließende Rehydratierung in Aceton für 10 min sowie einer Mischung aus Aceton und Waschpuffer (WP) im Verhältnis 1:1 für weitere 10 min bei RT. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal mit WP für 5 min gespült.

Zur Demaskierung des Antigens wurden die Gewebeschnitte in einem Tris-EDTA-Puffer mit einem pH-Wert von 9 für 120 min bei 60°C im Schnellkochtopf gekocht. Nach einer Abkühlzeit von 30 min bei RT wurden die Gewebeschnitte zweimal für jeweils 5 min mit WP gewaschen.

Zur Verringerung der Hintergrundfärbung erfolgte eine Blockierung mit 3%igem H₂O₂ in WP für 5 min, gefolgt von zweimaligem Spülen mit WP für jeweils 5 min. Um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern, wurden alle folgenden Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper Runx2 (ab236639) in einer Verdünnung von 1:500 wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Am zweiten Tag wurde zunächst ein zehnfaches Abspülen mit WP durchgeführt, indem eine Quetschpipette verwendet wurde. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal für jeweils 5 min bei RT mit WP gewaschen. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper [Ziege anti-Kaninchen (Vector, BA-1000)] in einer Verdünnung von 1:500 in 1% *Bovine Serum Albumin* (BSA) in TBS mit 12,5% Rattenserum bei RT, gefolgt von zweimaligem Spülen mit WP für jeweils 5 min. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit den Vectastain Elite ABC-Kits (Vector) bei 4°C, gefolgt von zweimaligem Spülen mit WP für jeweils 5 min und einem zusätzlichen Spülen mit Aqua dest. für 5 min. Danach wurde eine 5-minütige Inkubation mit dem Nova Red HRP Substrate Kit (Peroxidase, SK-4800, Vector) bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt,

gefolgt von einem Abspülen mit Aqua bidest. und einem dreimaligen Spülen mit Aqua dest., jeweils für 5 min.

Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung (Shandon Instant-Hämatoxylin, 6765015, Thermo Scientific) im Verhältnis 1:3 verdünnt in Aqua bidest für 15 Sekunden durchgeführt. Nach einem Abspülen mit Aqua dest. erfolgte eine 10-minütige Tropfspülung mit Leitungswasser, gefolgt von einem Spülen mit Aqua dest. für 5 min.

Abschließend wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol (EtOH), 96% EtOH und 100% EtOH) sowie zweimal in Xylol für jeweils 5 min dehydriert. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit DePeX (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

Färbungen, bei denen durch das Kochen im Tris-EDTA Puffer, pH 9,0 starke Zerstörungen der Präparate auftraten, wurden gegebenenfalls wiederholt.

Tabelle 4: Färbeprotokoll Runx2

Entparaffinieren	Xylol	2 x 5' RT	
	Aceton	1 x 10' RT	
	Aceton / Waschpuffer 1:1	1 x 10' RT	
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	
Vorbehandlung	Tris-EDTA Puffer, pH 9,0	2 h 60°C	30 min abkühlen in RT
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	
Blockieren	3% H ₂ O ₂ in Waschpuffer	5' RT	
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	
Inkubation	primärer Antikörper Runx2 ab236639, 1:500	Über Nacht 4°C	feuchte Kammer Kontrolle: Verdünnungspuffer
Spülen	Waschpuffer	3 x 5' RT	Vorher 10x mit Quetschpipette abspülen
Inkubation	Sek. Antikörper 3b, Ziege anti-Kaninchen, Vector, 1:500	30' RT	feuchte Kammer
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	mehrmals abspülen, Rüttler
Färben	Vectastain Elite ABC-Kit	30' RT	feuchte Kammer
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	mehrmals abspülen, Rüttler
Spülen	Aqua dest.	1 x 5' RT	Rüttler
Färben	Nova Red	5' RT	Dunkelheit
Spülen	Aqua bidest	abspülen	Spritzflasche
Spülen	Aqua dest.	3 x 5'	Rüttler
Gegenfärbung	Hämatoxylin 1+3	15"	
Spülen	Aqua dest.	abspülen	Spritzflasche
Bläuen	Leitungswasser	10'	
Spülen	Aqua dest.	5'	
Entwässern	EtOH 70%ig	5'	
	EtOH 96%ig	5'	
	EtOH 100%ig	5'	
	Xylol	2 x 5'	
Eindeckeln	Depex		

2.3.5 Färbeprotokoll Osterix

Für die Darstellung von Osterix wurde, wie bereits erwähnt, ein monoklonaler Anti-Sp7/Osterix-Antikörper [EPR21034] verwendet, der aus Kaninchen stammt und gegen Rattengewebe gerichtet ist. Der Antikörper wurde von Abcam (ab227820) bezogen und in einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt.

Zu Beginn wurde eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte durchgeführt. Dies erfolgte durch zweimaliges Baden in Xylol für jeweils 5 min und anschließende Rehydratisierung in Aceton für 10 min sowie einer Mischung aus Aceton und WP im Verhältnis 1:1 für weitere 10 min bei RT. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal mit WP für 5 min gespült.

Um das Antigen zu demaskieren, wurden die Gewebeschnitte in einem Tris-EDTA-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 für 60 min bei 60°C im Schnellkochtopf gekocht. Nach einer Kälteschockbehandlung (ca. 4°C) für 10 min wurden die Gewebeschnitte zweimal für jeweils 5 min in WP gewaschen.

Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung erfolgte eine Blockierung mit 3%igem H₂O₂ in WP für 5 min, gefolgt von zweimaligem Spülen mit WP für jeweils 5 min. Um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern, wurden alle folgenden Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-SP7 (ab227820) in einer Verdünnung von 1:1500 erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Am zweiten Tag wurde zunächst ein zehnfaches Abspülen mit WP durchgeführt, indem eine Quetschpipette verwendet wurde. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal für jeweils 5 min bei RT mit WP gewaschen. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper [Ziege anti-Kaninchen (Vector, BA-1000)] in einer Verdünnung von 1:500 in 1% BSA in TBS mit 12,5% Rattenserum bei RT, gefolgt von zweimaligem Spülen mit WP für jeweils 5 min. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit den Vectastain Elite ABC-Kits (Vector) bei 4°C, gefolgt von zweimaligem Spülen mit WP für jeweils 5 min und einem zusätzlichen Spülen mit Aqua dest. für 5 min. Danach wurde eine 5-minütige Inkubation mit Nova Red (Vector) bei 4°C im Dunkeln durchgeführt, gefolgt von einem Abspülen mit Aqua bidest. und dreimaligem Spülen

mit Aqua dest. für jeweils 5 min. Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung im Verhältnis 1:3 verdünnt in Aqua bidest. für 15 Sekunden durchgeführt. Nach einem Abspülen mit Aqua dest. erfolgte eine 10-minütige Tropfspülung mit Leitungswasser, gefolgt von einem Spülen mit Aqua dest. für 5 min.

Abschließend wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% EtOH, 96% EtOH und 100% EtOH) sowie zweimal in Xylol für jeweils 5 min dehydriert. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit DePeX eingedeckt.

Färbungen, bei denen durch das Kochen im Tris-EDTA Puffer, pH 9,0 starke Zerstörungen der Präparate auftraten, wurden gegebenenfalls wiederholt.

Tabelle 5: Färbeprotokoll Osterix

Entparaffinieren	Xylol	2 x 5' RT	
	Aceton	1 x 10' RT	
	Aceton / Waschpuffer 1:1	1 x 10' RT	
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	
Vorbehandlung	Tris-EDTA Puffer, pH 9,0	1h 60°C	10 min Kälteschock
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	
Blockieren	3% H ₂ O ₂ in Waschpuffer	5' RT	
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	
Inkubation	primärer Antikörper SP7/Osterix in Verdünnungspuffer 1:1500	Über Nacht 4°C	feuchte Kammer Kontrolle: Verdünnungspuffer
Spülen	Waschpuffer	3 x 5' RT	Vorher 10x mit Quetschpipette abspülen
Inkubation	Sek. Antikörper 3b, Ziege anti-Kaninchen, Vector, 1:500	30' RT	feuchte Kammer
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	mehrmals abspülen, Rüttler
Färben	Vectastain Elite ABC-Kit	30' RT	feuchte Kammer
Spülen	Waschpuffer	2 x 5' RT	mehrmals abspülen, Rüttler
Spülen	Aqua dest.	1 x 5' RT	Rüttler
Färben	Nova Red	5' RT	Dunkelheit
Spülen	Aqua bidest.	abspülen	Spritzflasche
Spülen	Aqua dest.	3 x 5'	Rüttler
Gegenfärbung	Hämatoxylin 1+3	25"	
Spülen	Aqua dest.	abspülen	Spritzflasche
Bläuen	Leitungswasser	10'	
Spülen	Aqua dest.	5'	
Entwässern	EtOH 70%ig	5'	
	EtOH 96%ig	5'	
	EtOH 100%ig	5'	
	Xylol	2 x 5'	
Eindeckeln	Depex		

2.3.6 Negativkontrollen

Als Kontrollen für unspezifische Farbreaktionen bei der Durchführung der Immunhistochemie von Runx2 und Osterix wurden zusätzliche Paraffinschnitte verwendet. Anstelle des primären Antikörpers wurden diese Schnitte mit einem VP inkubiert. Durch die anschließende Applikation des sekundären Antikörpers und die Durchführung aller weiteren Schritte der Immunhistochemie konnten mögliche unspezifische Bindungen und daraus resultierende Färbeergebnisse ausgeschlossen werden.

Durch diese Kontrollversuche wurde gewährleistet, dass jegliche Färbung auf spezifische Bindung des primären Antikörpers an das Zielprotein zurückzuführen war. Die Negativkontrollen zeigten keine Anzeichen einer Farbreaktion, was die Spezifität und Zuverlässigkeit der Immunhistochemie für die Detektion von Runx2 und Osterix bestätigt.

2.4 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie wird als computergestützte quantitative Methode definiert, die es ermöglicht, die Mikroarchitektur, das Remodeling und den Metabolismus von Knochengewebe anhand von Mikrofotografien von Knochenschnitten zu bewerten. Moderne Techniken werden eingesetzt, um histologische Informationen aus den Präparaten zu extrahieren und zu messen. Diese Messungen werden anschließend in numerische Werte umgewandelt, die für den Vergleich zwischen den Präparaten verwendet werden können (Kulak et al., 2010; Malluche et al., 1982).

In dieser Studie wurden die gefärbten Paraffinschnitte für die histomorphometrische Analyse im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität mit einem digitalen Licht-Fotomikroskop (Mikroskop: DM5500 B, Kamera: DFC7000 T, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) fotografiert und digitalisiert. Dabei wurden sowohl Übersichts- als auch Detailaufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen erstellt. Zur Erstellung eines Übersichtsbildes wurden Einzelbilder mithilfe von LAS X, Version 3.7.3.23245, zusammengeführt.

Die Fotografien der gefärbten Paraffinschnitte, die mit einem 10-fachen Mikroskopobjektiv aufgenommen wurden, wurden für die quantitative histomorphometrische Analyse mithilfe der Bildbearbeitungssoftware Fiji Image J (Version 2.1.0/1.53c, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) bearbeitet (Schindelin et al., 2012).

Dabei wurde nach dem Öffnen der Fotos und der Einstellung des Maßstabs (1,55 Pixel/ μm) der Mittelpunkt der Implantatstelle bzw. des Defektbereichs sowie des Granulationsgewebes, in dem sich die Implantate befanden, ermittelt (Abbildung 6).

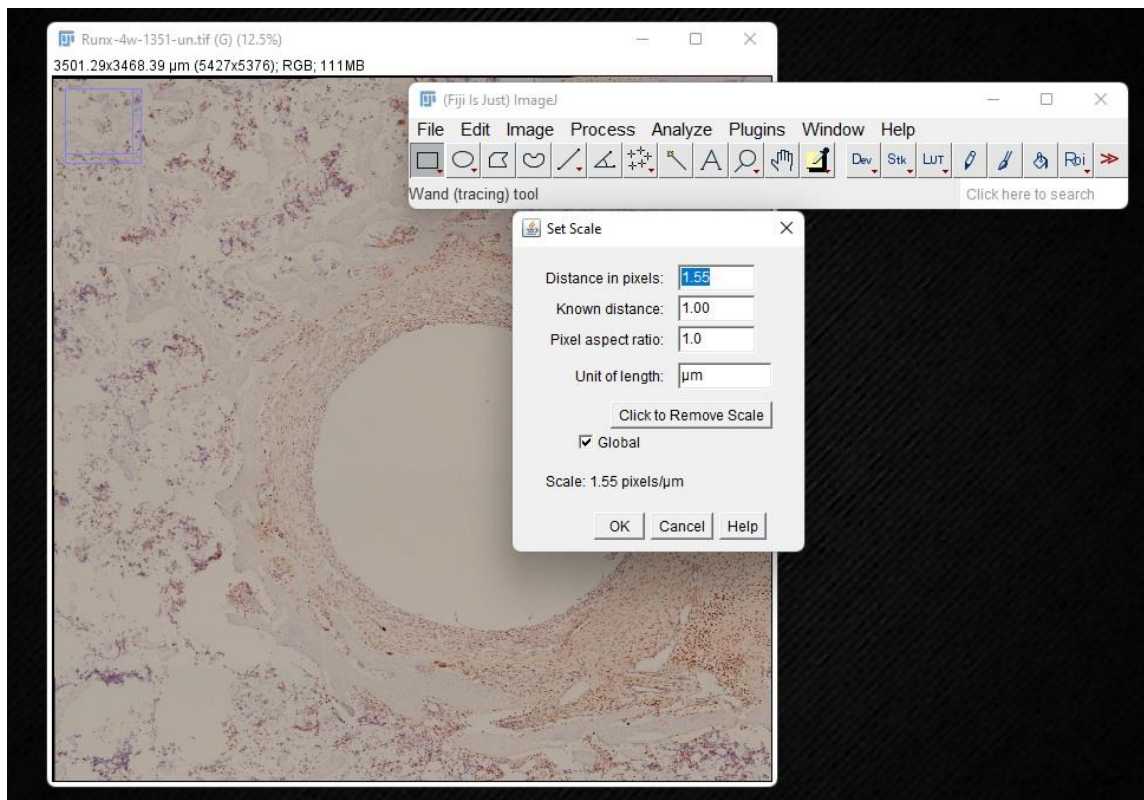


Abbildung 6: Einstellen des Maßstabes (1.55 Pixel/ μm)

Anschließend wurde eine *Region of Interest* (ROI) in Form eines Kreises mit einem Durchmesser von 2000 μm definiert. Die Festlegung der ROI basierte auf der Kenntnis, dass die Implantate einen Durchmesser von 1500 μm aufweisen, und um den engen Bereich um die Implantatstelle einzuschließen, wurde der ROI um 500 μm erweitert (Abbildung 7).

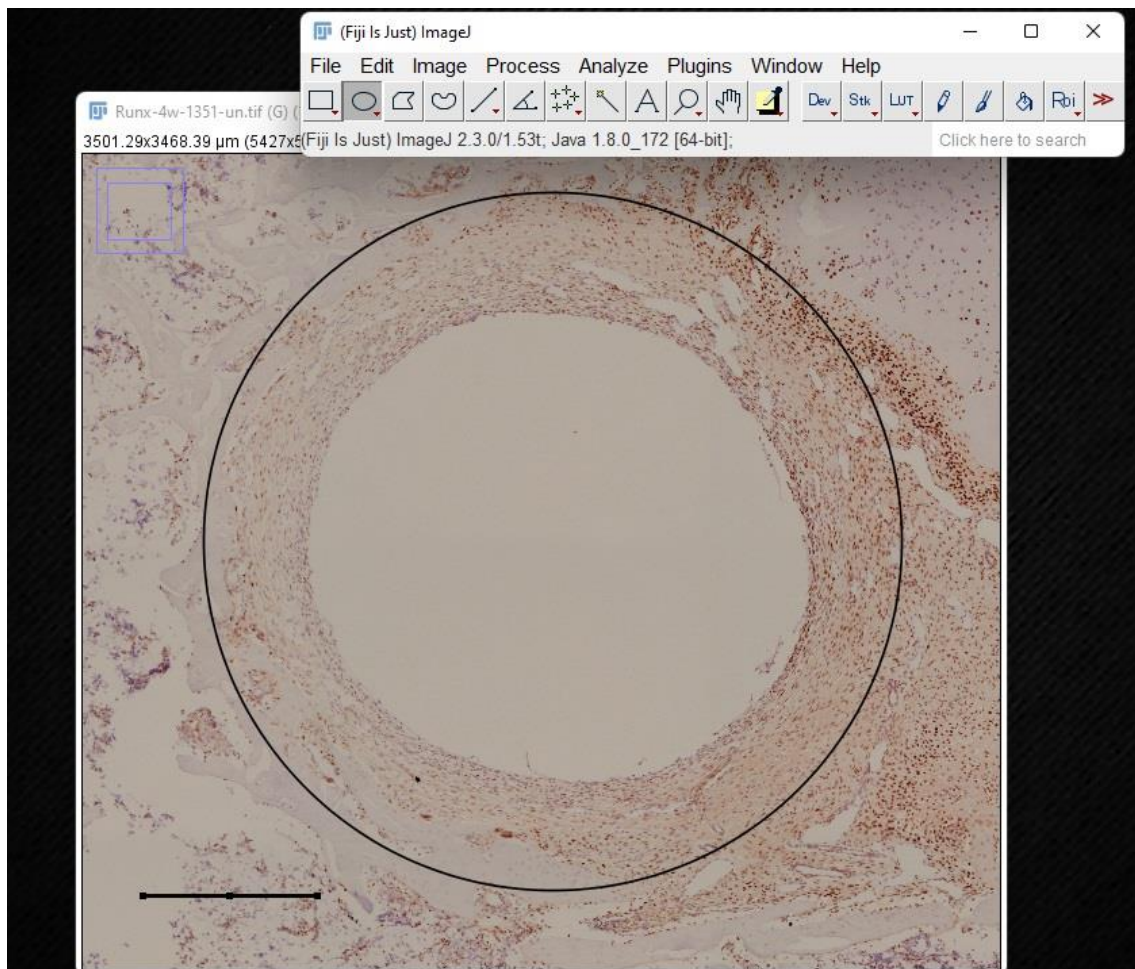


Abbildung 7: Bestimmung der ROI in Form eines Kreises mit einem Durchmesser von 2000 μm , Maßstab 500 μm

Dann wurden mithilfe des Segmentierten Linien-Tools die Knochen trabekel innerhalb der ROI markiert. Die Knochen kortikalis innerhalb des ROI wurde ausgeschlossen. Die markierten Knochen trabekel wurden dem ROI-Manager hinzugefügt, gespeichert und vermessen. Dabei wurden der Umfang und die Oberfläche der Trabekel bestimmt (Abbildung 8).

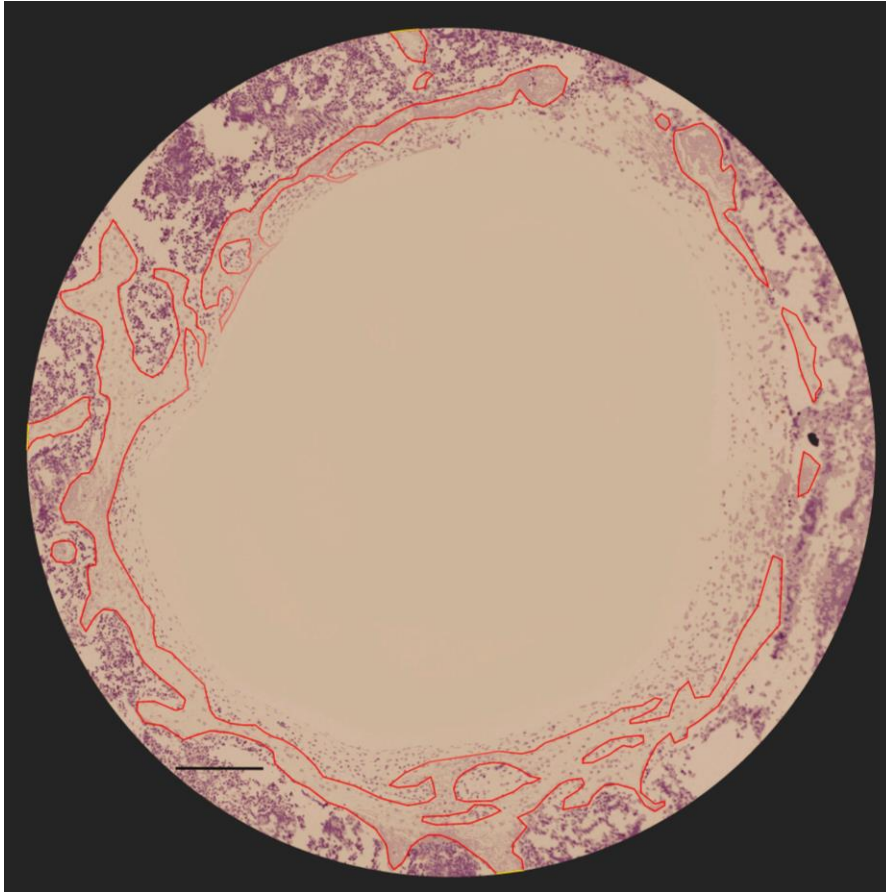


Abbildung 8: Die roten Linien begrenzen die Trabekel innerhalb der ROI, Maßstab 200 μm .

Anschließend wurden die Anzahl der Runx2-positiven bzw. Osterix-positiven Zellen, einschließlich Osteoblasten, und Präosteoblasten, gezählt (Abbildungen 9 und 10).

Die gesammelten Daten wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle exportiert und dort weiterverarbeitet. Die gesamte histomorphometrische Untersuchung wurde auf einem HP-Laptop (Modell 15-da1320ng) durchgeführt.

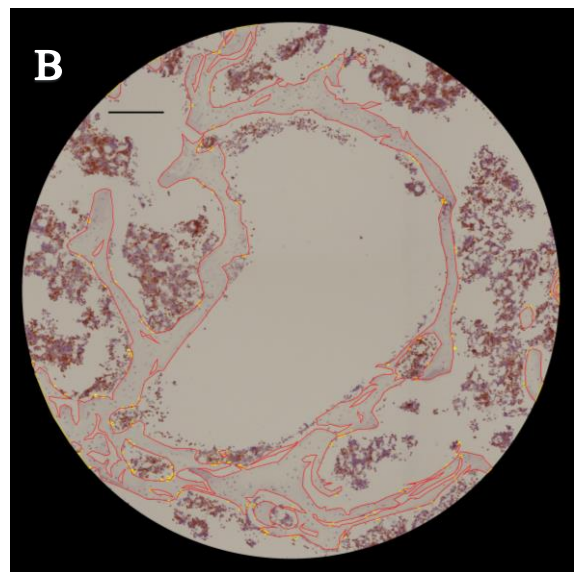
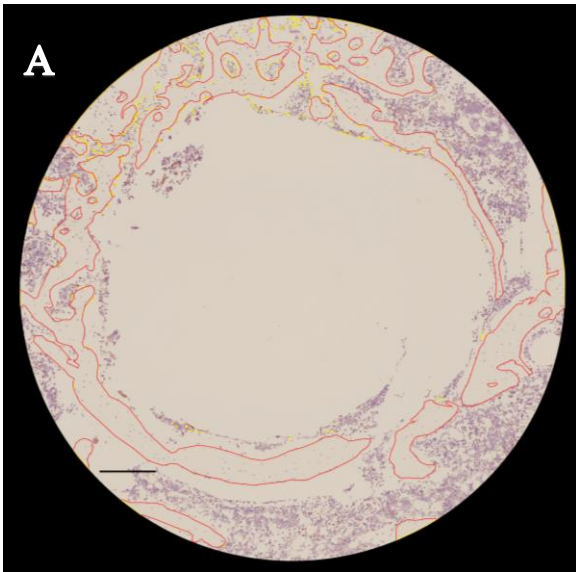


Abbildung 9: Darstellung von Trabekel innerhalb des ROI, markiert durch rote Linien, und positiven Zellen, markiert durch gelbe kleine Punkte. Maßstab 200 μm .

A) Darstellung eines Runx2-Objekträgers nach einer Standzeit von 4 Wochen.

B) Darstellung eines Runx2-Objekträgers nach einer Standzeit von 6 Monaten.

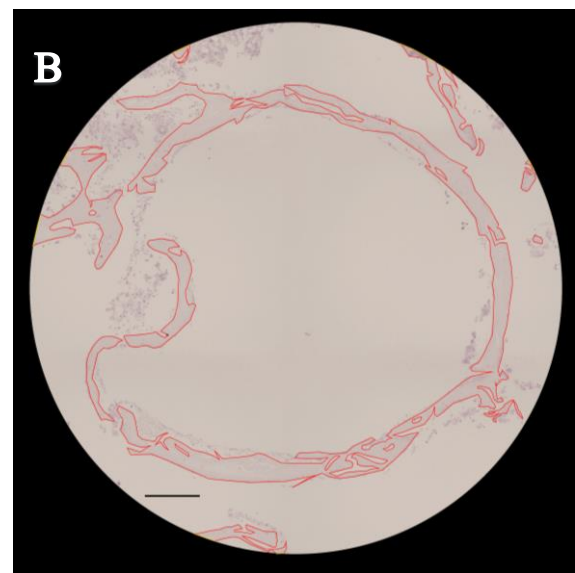
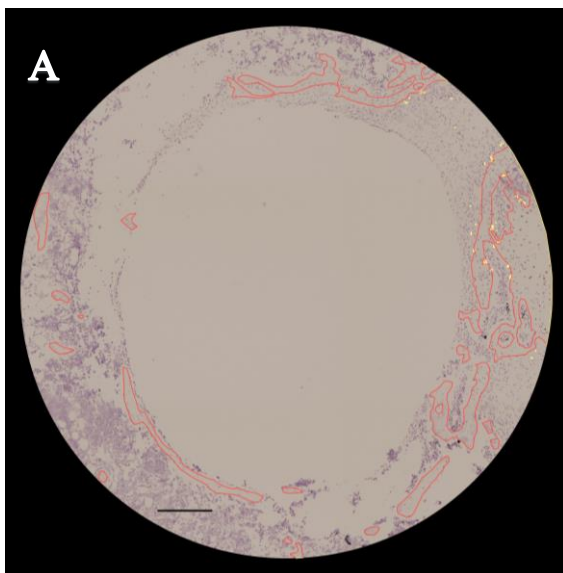


Abbildung 10: Darstellung von Trabekel innerhalb des ROI, markiert durch rote Linien, und positiven Zellen, markiert durch gelbe kleine Punkte. Maßstab 200 μm .

A) Darstellung eines Osterix-Objekträgers nach einer Standzeit von 4 Wochen.

B) Darstellung eines Osterix-Objekträgers nach einer Standzeit von 6 Monaten.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung der SPSS Statistics Software (Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp) durchgeführt. Die Werte waren nicht normal verteilt, deswegen wurden die nicht parametrische Tests verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05^*$ (für signifikante Unterschiede) bzw. $p \leq 0,01^{**}$ (für hochsignifikante Unterschiede) festgelegt. Die Verteilung der Daten in den Gruppen wurde durch Boxplots grafisch dargestellt. Die Box repräsentiert den Interquartilsabstand und definiert den Wertebereich zwischen dem 25%- und 75%-Perzentil. Die Whiskers erstrecken sich vom oberen bzw. unteren Ende der Box bis zum höchsten bzw. niedrigsten Wert, der noch innerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands liegt. Datenpunkte außerhalb dieser Grenzen werden als Ausreißer (°) oder Extremwerte (☆) dargestellt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der histomorphometrischen Analysen wurde die Gesamtzahl der immunpositiven Zellen ermittelt, sowie die Anzahl der Runx2- und Osterix-positiven Präosteoblasten und Osteoblasten separat quantifiziert. Zusätzlich wurde die Beziehung dieser Zelltypen zur Trabekelfläche und zum Trabekelumfang untersucht, indem die relativen Werte berechnet wurden.

Die Osteoblasten wurden innerhalb des ROI histologisch als kubische, mononukleäre Zellen identifiziert, die sich spezifisch an den Oberflächen der Knochen trabekeln befanden. Die Präosteoblasten wurden innerhalb des ROI histologisch als Zellen identifiziert, die eine ovale bis spindelförmige Zellmorphologie mit Proliferationspotential aufweisen und befanden sich in unmittelbarer Nähe des Knochengewebes innerhalb des Granulationsgewebes, welches zwischen den reifen Osteoblasten und dem Knochenmarkgewebe liegt (Narimatsu et al., 2010).

3.1 Histomorphometrische Analyse der Runx2-Immunhistochemie

3.1.1 Relative Gesamtzahl der Runx2-immunpositiven Zellen

Für die Auswertung von Runx2 wurden insgesamt 67 Objektträger ($n = 67$) untersucht. Bei der Analyse der relativen gesamten Anzahl der Runx2-positiven Zellen in Bezug auf die Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI (All/TbAr) zeigte der Kolmogorov-Smirnov-Test keine normale Verteilung der Daten der 12 Gruppen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$; Abbildung 11, Tabelle 6).

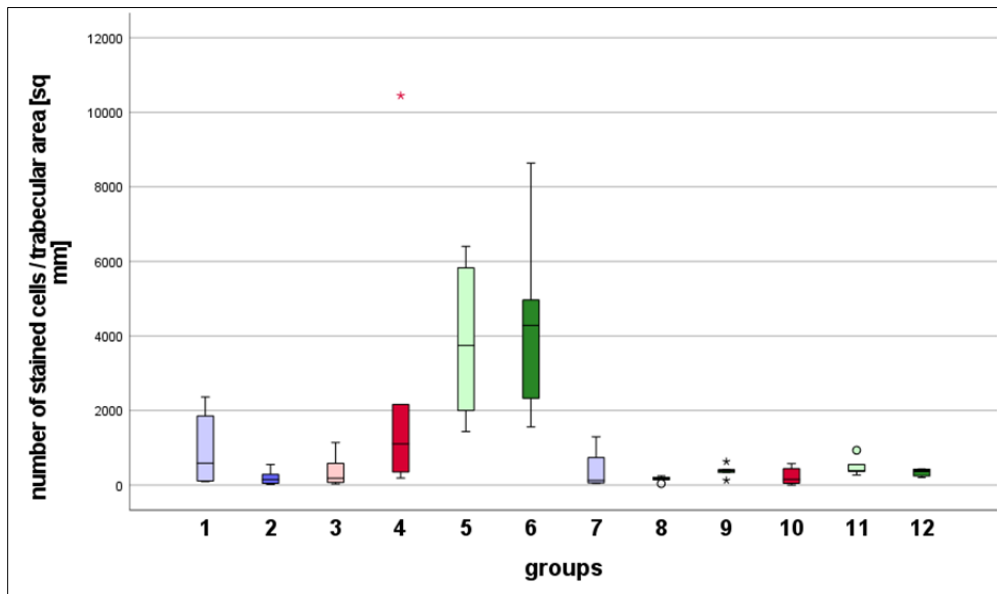


Abbildung 11: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Runx2-positiven Zellen in Relation zur Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen. Statistische Ausreißer und Extremwerte werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

Tabelle 6: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Runx2 immunpositiven Zellen in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	934,8 \pm 389,2 n/ mm^2	Gruppe 7	4	398,5 \pm 301 n/ mm^2
Gruppe 2	6	201,9 \pm 80,8 n/ mm^2	Gruppe 8	6	163,1 \pm 30 n/ mm^2
Gruppe 3	6	367,4 \pm 174,4 n/ mm^2	Gruppe 9	5	381,5 \pm 80,3 n/ mm^2
Gruppe 4	6	2561,7 \pm 1614,6 n/ mm^2	Gruppe 10	6	230 \pm 96,4 n/ mm^2
Gruppe 5	6	3863 \pm 825,6 n/ mm^2	Gruppe 11	5	503,4 \pm 117,2 n/ mm^2
Gruppe 6	6	4343,4 \pm 1018 n/ mm^2	Gruppe 12	5	338,8 \pm 46,8 n/ mm^2

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

Beim paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-Test zeigte sich lediglich eine signifikante Reduktion in der relativen Anzahl der gesamten Runx2-immunpositiven Zellen bezogen auf die Trabekelfläche nach 6 Monaten im Vergleich zur postoperativen Standzeit nach 4 Wochen in den Gruppen mit Kollagenimplantate ($p = 0,004$ für den Vergleich von 5 und 11, sowie für den Vergleich von 6 und 12; Abbildung 12).

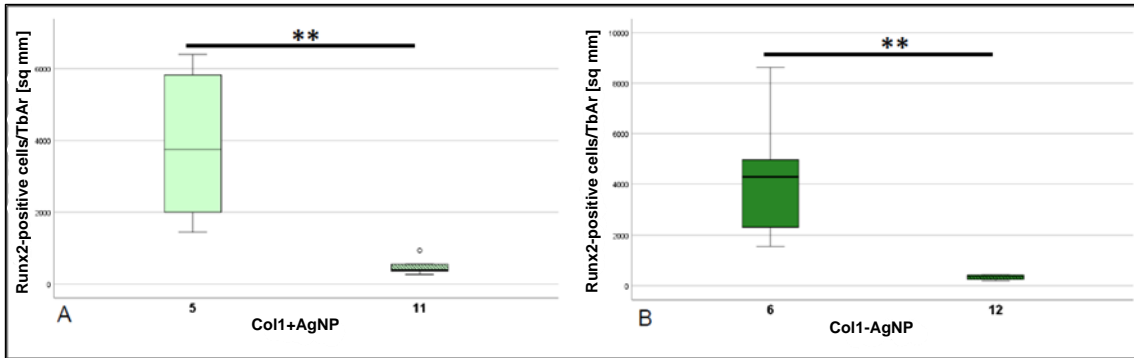


Abbildung 12: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Zellen bezogen auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Kollegenimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 5 und Gruppe 11 (mit Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 6 und Gruppe 12 (ohne Silbernanopartikel)

**Signifikanter Unterschied bei $p < 0,004$, Der Kreis markiert einen statistischen Ausreißer.

Bei der Analyse der relativen gesamten Anzahl der Runx2-positiven Zellen im Verhältnis zum Trabekelperimeter (mm) innerhalb des ROI (All/TbS) zeigte der Kolmogorov-Smirnov-Test ebenfalls keine normale Verteilung der Daten der 12 Gruppen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test ergab auch hier einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$; Abbildung 13, Tabelle 7).

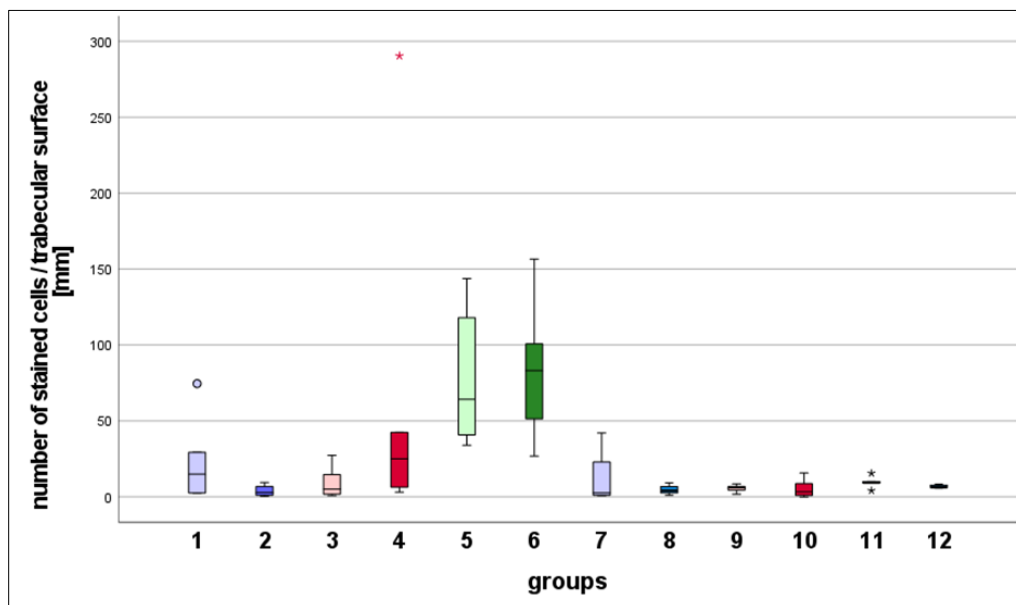


Abbildung 13: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Runx2-positiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Bei der Analyse im Verhältnis zum Trabekelumfang zeigte sich im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-Test lediglich eine hochsignifikante Reduktion der relativen Anzahl der gesamten Runx2-immunpositiven Zellen in den Gruppen mit Kollagenimplantaten nach 6 Monaten im Vergleich zu 4 Wochen ($p = 0,004$ für den Vergleich von 5 und 11 sowie für den Vergleich von 6 und 12; Abbildung 14).

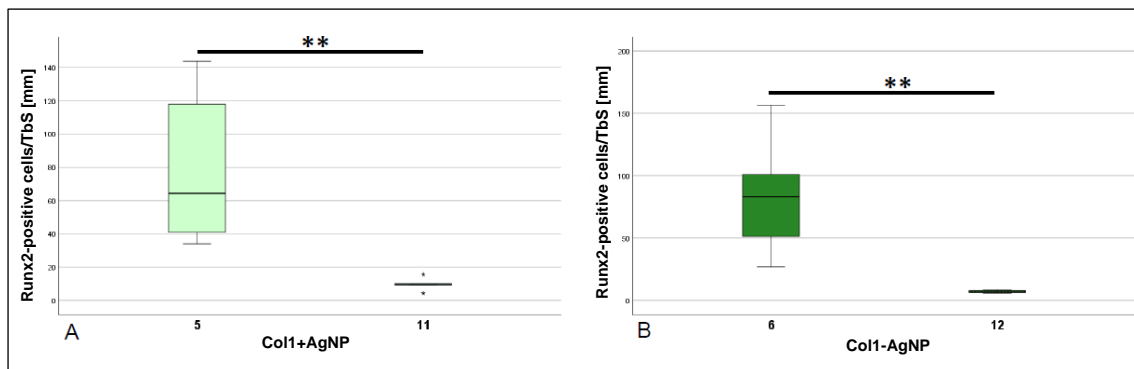


Abbildung 14: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Zellen bezogen auf die Trabekelumfang bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 5 und Gruppe 11 (mit Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 6 und Gruppe 12 (ohne Silbernanopartikel)

**Signifikanter Unterschied bei $p < 0,004$, Die kleine Sterne markieren statistischen Ausreißer

Tabelle 7: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Runx2 immunpositiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	23,16 \pm 11,13 n/mm	Gruppe 7	4	12,04 \pm 10,03 n/mm
Gruppe 2	6	3,909 \pm 1,45 n/mm	Gruppe 8	6	4,682 \pm 1,199 n/mm
Gruppe 3	6	9,137 \pm 4,16 n/mm	Gruppe 9	5	5,540 \pm 1,142 n/mm
Gruppe 4	6	65,44 \pm 45,5 n/mm	Gruppe 10	6	5,339 \pm 2,477 n/mm
Gruppe 5	6	77,52 \pm 18,0 n/mm	Gruppe 11	5	9,644 \pm 1,807 n/mm
Gruppe 6	6	83,67 \pm 18,22 n/mm	Gruppe 12	5	6,891 \pm 0,493 n/mm

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

3.1.2 Relative Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten

In der Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI (Ob/TbAr) zeigte der Kolmogorov-Smirnov-Test keine normale Verteilung der Daten der 12 Gruppen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test stellte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen fest ($p < 0,001$; Abbildung 15, Tabelle 8).

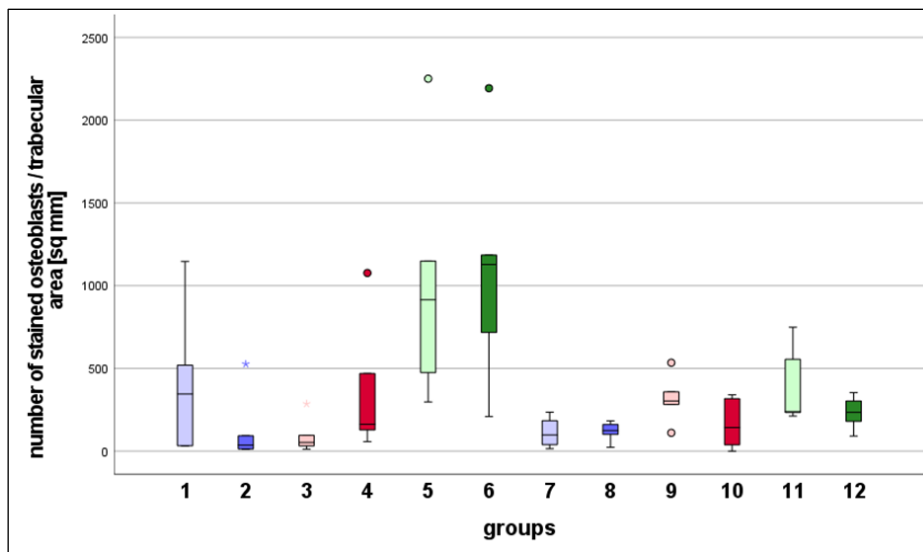


Abbildung 15: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten in Relation zur Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

Unter Verwendung des Mann-Whitney-Tests wurde bei der Analyse der Titanimplantate eine signifikante Steigerung der Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche nach 6 Monaten im Vergleich zur Ausgangszeit nach 4 Wochen festgestellt ($p = 0,017$). Diese signifikante Steigerung wurde bei den Titanimplantaten ohne Silberbeschichtung beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten die Titanimplantate mit Silberbeschichtung keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,485$; Abbildung 16).

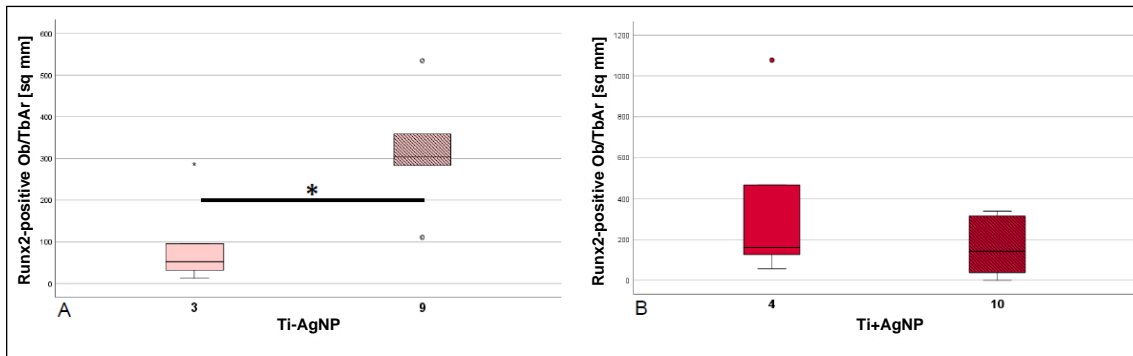


Abbildung 16: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Titanimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 3 und Gruppe 9 (ohne Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 4 und Gruppe 10 (mit Silbernanopartikel)

*Signifikanter Unterschied bei $p = 0,017$. Die Kreise und kleinen Sterne markieren statistische Ausreißer.

Bei den Kollagenimplantaten wurde ebenfalls die Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten analysiert. Es wurde keine Signifikanz zwischen den Gruppen 5 und 11 festgestellt ($p = 0,082$). Allerdings wurde eine signifikante Reduktion der Anzahl immunpositiver Osteoblasten für das mit AgNP-funktionalisierte Kollagenimplantat beobachtet ($p = 0,03$; Abbildung 17).

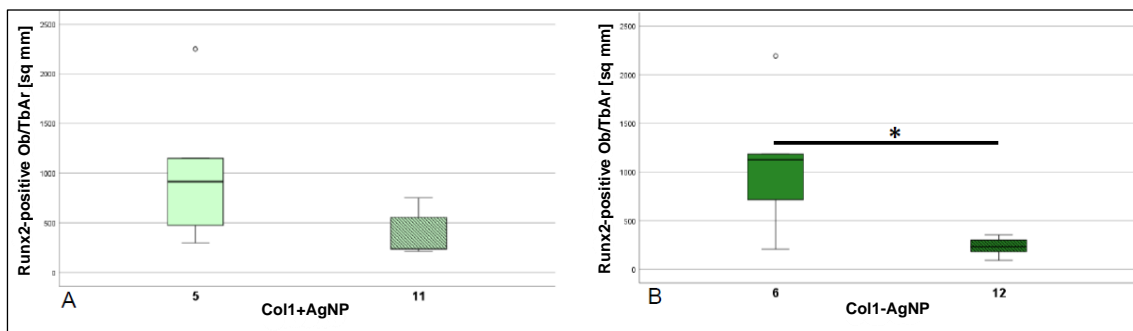


Abbildung 17: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 5 und Gruppe 11 (mit Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 6 und Gruppe 12 (ohne Silbernanopartikel)

*Signifikanter Unterschied bei $p = 0,03$. Die Kreise markieren statistische Ausreißer.

Tabelle 8: Durchschnittliche Anzahl der Runx2 immunpositiven Osteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (±) SEM	Variable	N	Mittelwert (±) SEM
Gruppe 1	6	403,5 ± 168,6 n/mm ²	Gruppe 7	4	112,1 ± 47,77 n/mm ²
Gruppe 2	6	119,6 ± 82,34 n/mm ²	Gruppe 8	6	119,9 ± 23,03 n/mm ²
Gruppe 3	6	88,63 ± 41,39 n/mm ²	Gruppe 9	5	318,0 ± 68,16 n/mm ²
Gruppe 4	6	342,8 ± 157,9 n/mm ²	Gruppe 10	6	163,8 ± 60,41 n/mm ²
Gruppe 5	6	1000,4 ± 284,7 n/mm ²	Gruppe 11	5	397,9 ± 108,2 n/mm ²
Gruppe 6	6	1093,8 ± 267,3 n/mm ²	Gruppe 12	5	232,8 ± 45,98 n/mm ²

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

Bei der Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten im Verhältnis zum Trabekelperimeter (mm) innerhalb des ROI (Ob/TbS) ergab der Kolmogorov-Smirnov-Test erneut keine normale Verteilung der Daten der 12 Gruppen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,002$; Abbildung 18, Tabelle 9).

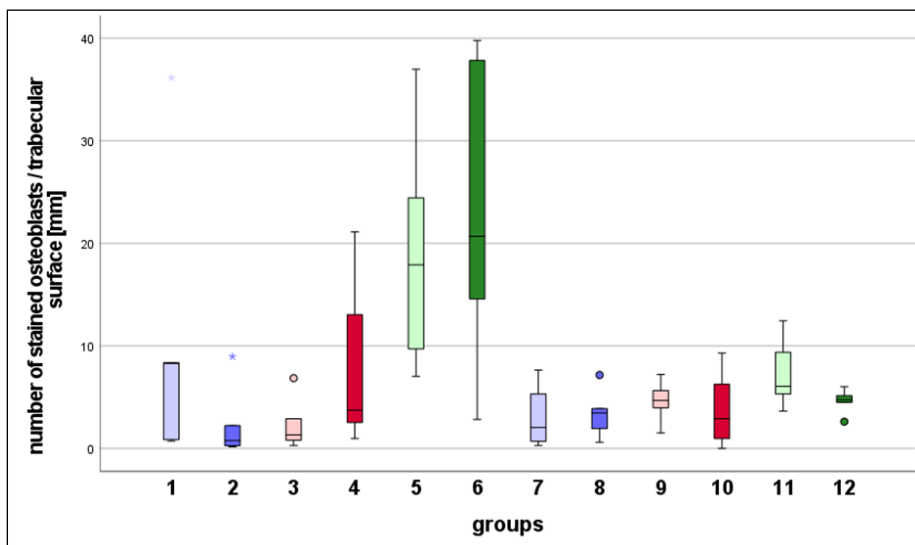


Abbildung 18: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

Bei der Analyse der Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang (mm) im ROI mittels des Mann-Whitney-Tests ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die Gruppe der Titanimplantate ohne AgNP ($p = 0,126$ für 3 versus 9 und $p = 0,485$ für 4 versus 10; Abbildung 19).

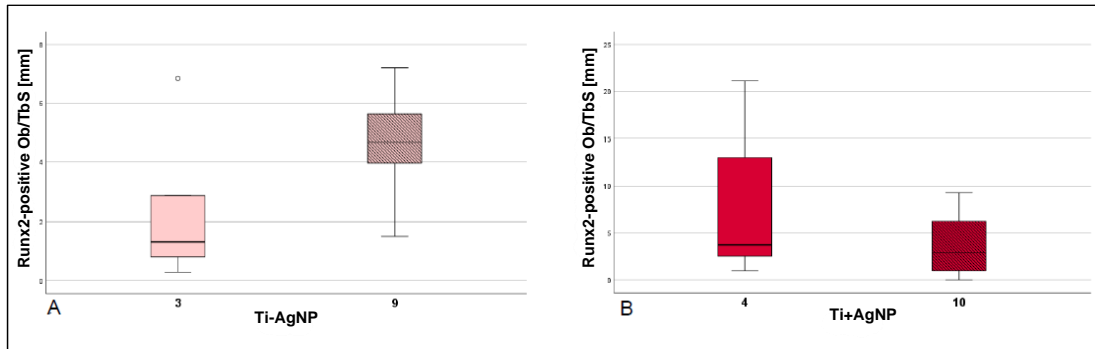


Abbildung 19: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang (mm) bei den Gruppen mit Titanimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 3 und Gruppe 9 (ohne Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 4 und Gruppe 10 (mit Silbernanopartikel)

Der Kreis markiert einen statistischen Ausreißer.

Bei den Kollagenimplantaten wurde jedoch eine signifikante Reduktion nach 6 Monaten für das silberfunktionalisierte Implantat festgestellt, während der Unterschied am Kollagenimplantat ohne AgNP nicht signifikant war ($p = 0,03$ für 5 versus 11 und $p = 0,052$ für 6 versus 12). Es konnte jedoch eine tendenzielle Reduktion für das Kollagenimplantat ohne AgNP beobachtet werden (Abbildung 20).

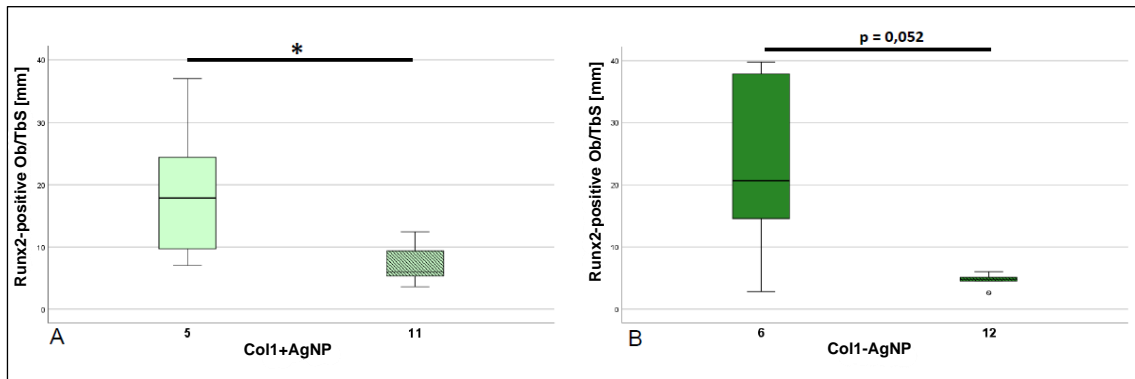


Abbildung 20: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Osteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang bei den Gruppen mit Kollegenimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 5 und Gruppe 11 (mit Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 6 und Gruppe 12 (Ohne Silbernanopartikel)

*Signifikanter Unterschied bei $p = 0,03$. Der Kreis markiert einen statistischen Ausreißer.

Tabelle 9: Durchschnittliche Anzahl der Runx2 immunpositiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	10,44 \pm 5,355 n/mm	Gruppe 7	4	3,002 \pm 1,646 n/mm
Gruppe 2	6	2,190 \pm 1,387 n/mm	Gruppe 8	6	3,416 \pm 0,906 n/mm
Gruppe 3	6	2,245 \pm 0,995 n/mm	Gruppe 9	5	4,598 \pm 0,945 n/mm
Gruppe 4	6	7,518 \pm 3,229 n/mm	Gruppe 10	6	3,717 \pm 1,496 n/mm
Gruppe 5	6	18,99 \pm 4,480 n/mm	Gruppe 11	5	7,362 \pm 1,574 n/mm
Gruppe 6	6	22,73 \pm 5,757 n/mm	Gruppe 12	5	4,600 \pm 0,562 n/mm

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

3.1.3 Relative Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten

Der Kolmogorov-Smirnov-Test ergab, dass die Daten der 12 Gruppen in Bezug auf die relative Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten im Verhältnis zur Trabekelfläche (mm^2) innerhalb des ROI (PreOb/TbAr) keine normale Verteilung aufweisen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$; Abbildung 21, Tabelle 10).

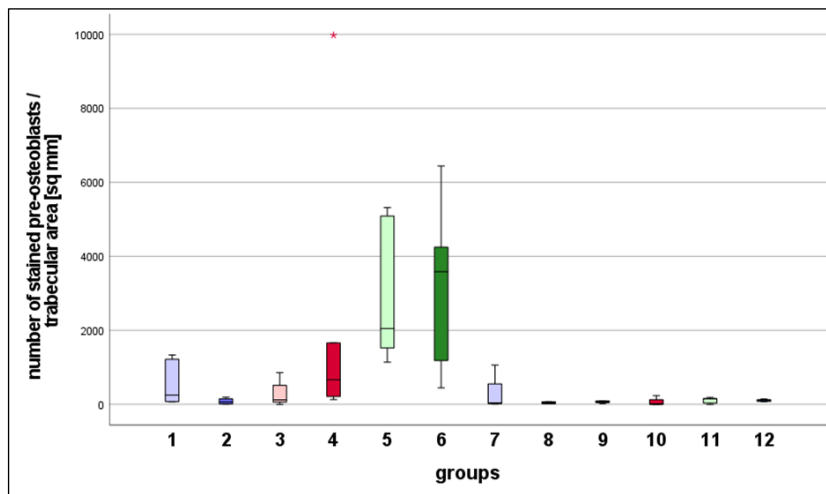


Abbildung 21: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Der Stern markiert einen statistischen Ausreißer.

Der Mann-Whitney-Test ergab, dass für die Gruppen mit Titanimplantaten ohne AgNP keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Präosteoblasten in Relation zur Trabekelfläche festgestellt wurden. Hingegen wurde in der Gruppe mit AgNP eine hochsignifikante Reduktion nach 6 Monaten im Vergleich zu 4 Wochen festgestellt ($p = 0,247$ für 3 versus 9 und $p = 0,009$ für 4 versus 10; Abbildung 22).

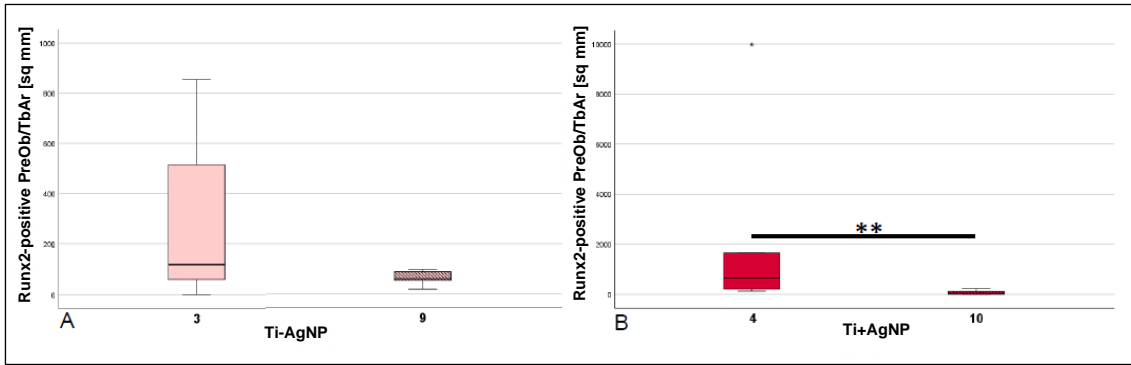


Abbildung 22: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Titanimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 3 und Gruppe 9 (ohne Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 4 und Gruppe 10 (mit Silbernanopartikel)

**Hochsignifikanter Unterschied bei $p = 0,009$, Das kleine Sternchen markiert einen statistischen Ausreißer

Bei der Betrachtung der Präosteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche im ROI wurde sowohl bei den kollagenbasierten Implantaten mit Silber (Col1+AgNP) als auch bei den kollagenbasierten Implantaten ohne Silber (Col1-AgNP) eine hochsignifikante Reduktion der Anzahl von Runx2-positiven Zellen festgestellt ($p = 0,004$ für 5 versus 11 und für 6 versus 12; Abbildung 23).

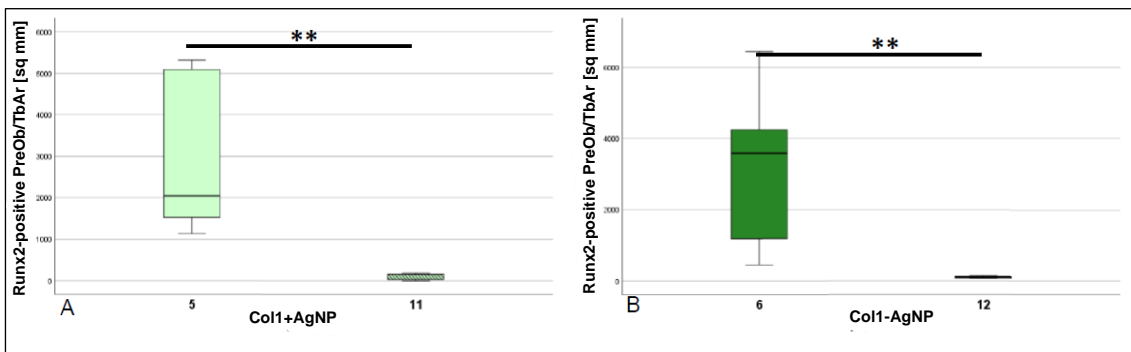


Abbildung 23: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Kollegenimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 5 und Gruppe 11 (mit Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 6 und Gruppe 12 (ohne Silbernanopartikel)

**Hochsignifikanter Unterschied bei $p = 0,004$

Tabelle 10: Durchschnittliche Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (±) SEM	Variable	N	Mittelwert (±) SEM
Gruppe 1	6	531,2 ± 242,5 n/mm ²	Gruppe 7	4	286,5 ± 258,4 n/mm ²
Gruppe 2	6	82,25 ± 32,35 n/mm ²	Gruppe 8	6	43,27 ± 10,11 n/mm ²
Gruppe 3	6	278,7 ± 137,2 n/mm ²	Gruppe 9	5	63,52 ± 13,97 n/mm ²
Gruppe 4	6	2219 ± 1572 n/mm ²	Gruppe 10	6	66,08 ± 39,44 n/mm ²
Gruppe 5	6	2862,6 ± 754,2 n/mm ²	Gruppe 11	5	105,4 ± 37,18 n/mm ²
Gruppe 6	6	3249,5 ± 885,7 n/mm ²	Gruppe 12	5	105,9 ± 13,86 n/mm ²

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

Bei der Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten im Verhältnis zum Trabekelumfang (mm) innerhalb des ROI (PreOb/TbS) ergab der Kolmogorov-Smirnov-Test erneut keine normale Verteilung der Daten der 12 Gruppen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zeigte ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$; Abbildung 24, Tabelle 11).

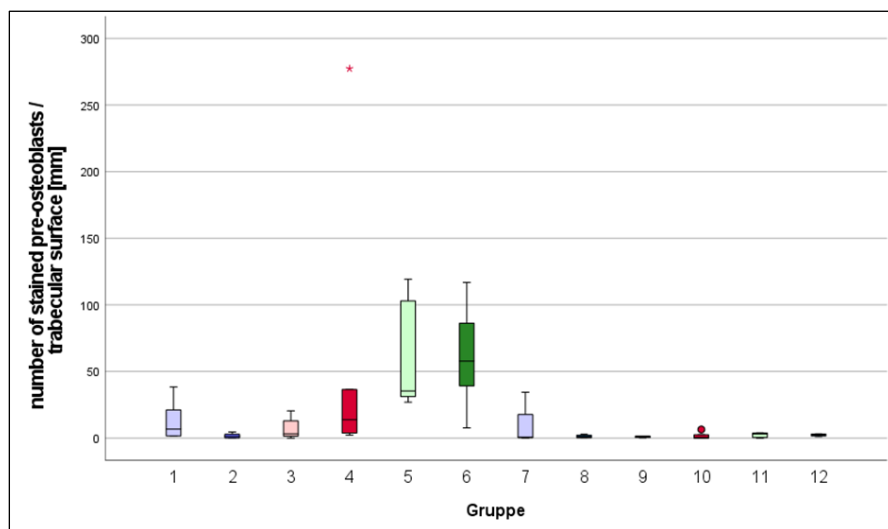


Abbildung 24: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen. Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Sterne (*) markiert.

Beim Vergleich der Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang mittels des Mann-Whitney-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gruppe mit Titanimplantaten ohne AgNP (Ti-AgNP) festgestellt werden. Hingegen zeigte die Gruppe mit silberhaltigen Titanimplantaten (Ti+AgNP) eine signifikante Reduktion nach 6 Monaten im Vergleich zu 4 Wochen ($p = 0,082$ für 3 versus 9 und $p = 0,026$ für 4 versus 10; Abbildung 25).

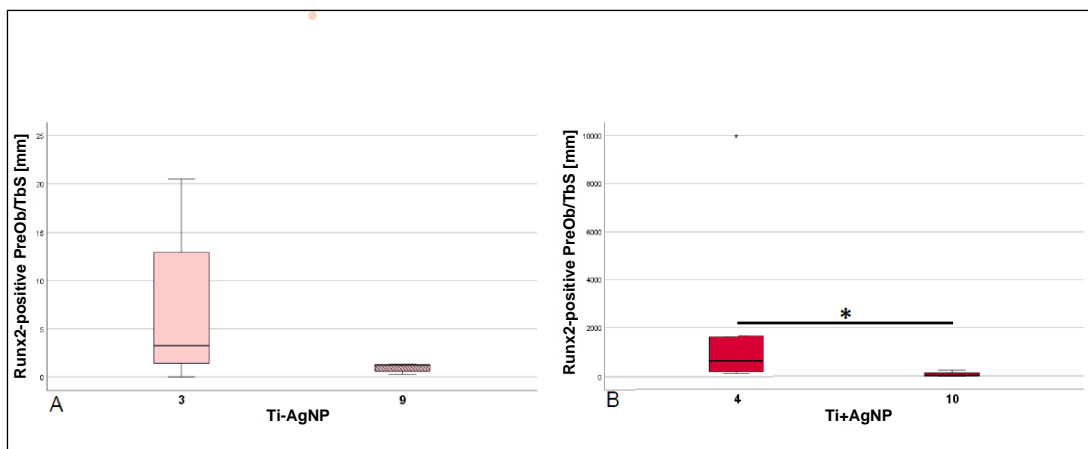


Abbildung 25: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang bei den Gruppen mit Titanimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 3 und Gruppe 9 (ohne Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 4 und Gruppe 10 (mit Silbernanopartikel)

*Signifikanter Unterschied bei $p = 0,026$. Das kleine Sternchen markiert einen statistischen Ausreißer.

Bei den Kollagenimplantaten wurde ebenfalls in Bezug auf den Trabekelumfang eine signifikante Reduktion der Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten nach 6 Monaten im Vergleich zu 4 Wochen festgestellt. Dies galt sowohl für die Kollagenimplantate mit Silberfunktionalisierung als auch für die ohne Silberfunktionalisierung ($p = 0,004$ für 5 versus 11 und für 6 versus 12; Abbildung 26).

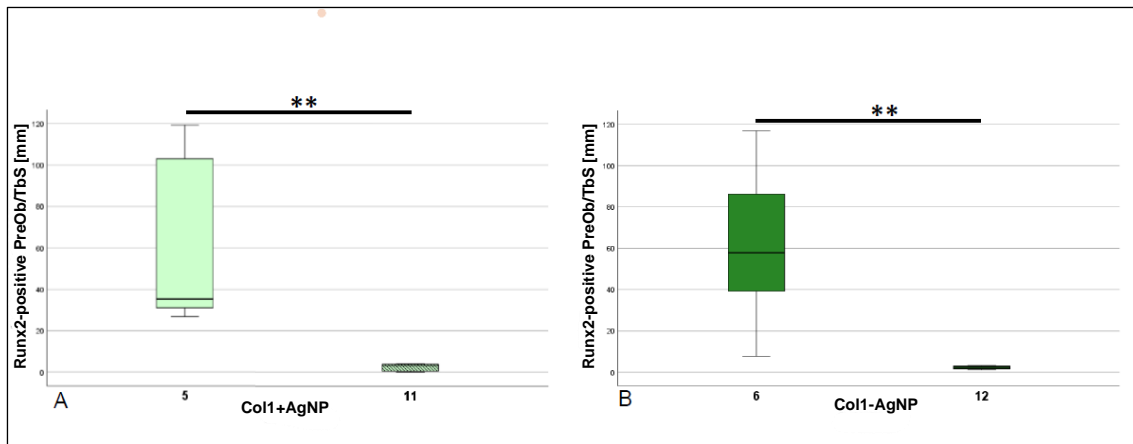


Abbildung 26: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang bei den Gruppen mit Kollegenimplantaten nach 4 Wochen und 6 Monaten.

A: Vergleich zwischen Gruppe 5 und Gruppe 11 (mit Silbernanopartikel)

B: Vergleich zwischen Gruppe 6 und Gruppe 12 (ohne Silbernanopartikel)

**Hochsignifikanter Unterschied bei $p = 0,004$

Tabelle 11: Durchschnittliche Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	12,72 \pm 6,053 n/mm	Gruppe 7	4	9,041 \pm 8,461 n/mm
Gruppe 2	6	1,719 \pm 0,738 n/mm	Gruppe 8	6	1,267 \pm 0,410 n/mm
Gruppe 3	6	6,892 \pm 3,293 n/mm	Gruppe 9	5	0,942 \pm 0,221 n/mm
Gruppe 4	6	57,92 \pm 44,22 n/mm	Gruppe 10	6	1,622 \pm 1,043 n/mm
Gruppe 5	6	58,53 \pm 16,83 n/mm	Gruppe 11	5	2,282 \pm 0,847 n/mm
Gruppe 6	6	60,94 \pm 15,56 n/mm	Gruppe 12	5	2,291 \pm 0,377 n/mm

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

3.2 Histomorphometrische Analyse der Osterix-Immunhistochemie

3.2.1 Relative Gesamtzahl der Osterix-immunpositiven Zellen

Es wurden insgesamt 67 Objektträger ($n = 67$) für die Auswertung von Osterix untersucht. Bei der Analyse der relativen Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Bezug auf die Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI (All/TbAr) konnte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests keine normale Verteilung der Daten der 12 Gruppen festgestellt werden. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. In den Gruppen 8 und 9 wurden keine immunpositiven Zellen nachgewiesen, weshalb der Mittelwert als 0 angegeben wurde ($p = 0,019$; Abbildung 27, Tabelle 12).

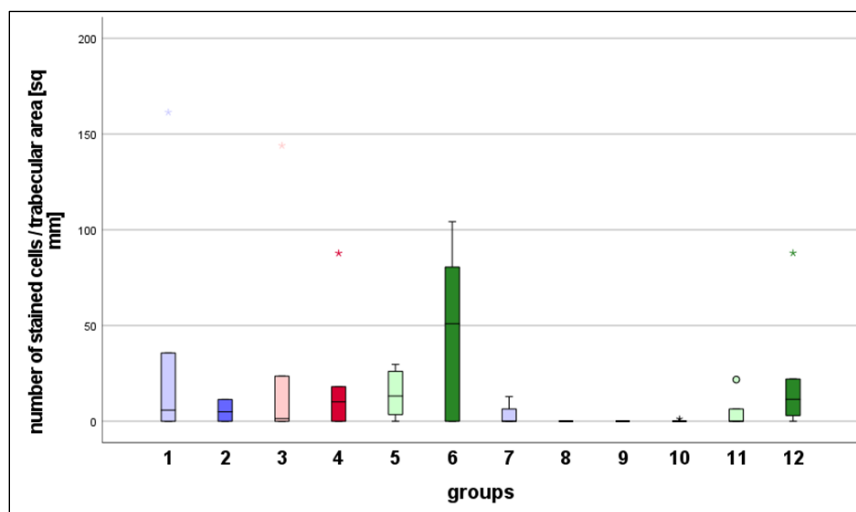


Abbildung 27: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Osterix-positiven Zellen in Relation zur Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

Beim paarweisen Vergleich mittels des Mann-Whitney-Tests wurde bei Betrachtung der relativen Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Bezug auf die Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI (All/TbAr) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Abbildung 28).

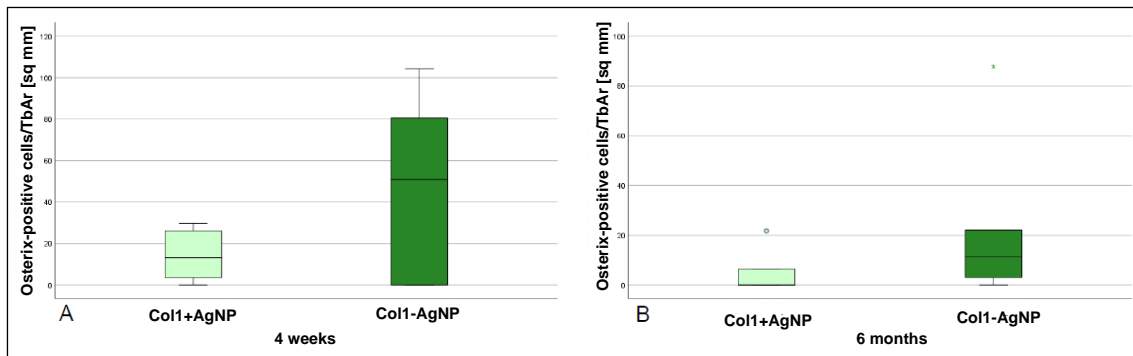


Abbildung 28: Vergleich der relativen Anzahl der gesamten Osterix-immunpositiven Zellen in Bezug auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten.

A: Vier Wochen nach der Implantation zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5 (mit AgNP) und 6 (ohne AgNP) feststellbar ($p = 0,310$, Mann-Whitney-U-Test).

B: Sechs Monaten nach der Implantation zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 11 (mit AgNP) und 12 (ohne AgNP) zu beobachten ($p = 0,222$, Mann-Whitney-U-Test).

Statistische Ausreißer werden durch kleine Kreise und Sterne markiert.

Tabelle 12: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Osterix-immunpositiven Zellen in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	234,6 \pm 195,5 n/mm ²	Gruppe 7	4	3,204 \pm 3,204 n/mm ²
Gruppe 2	6	5,444 \pm 2,445 n/mm ²	Gruppe 8	6	0 n/mm ²
Gruppe 3	6	130,9 \pm 99,83 n/mm ²	Gruppe 9	5	0 n/mm ²
Gruppe 4	6	21,02 \pm 13,73 n/mm ²	Gruppe 10	6	0,189 \pm 0,189 n/mm ²
Gruppe 5	6	14,27 \pm 5,008 n/mm ²	Gruppe 11	5	5,631 \pm 4,219 n/mm ²
Gruppe 6	6	47,79 \pm 17,54 n/mm ²	Gruppe 12	5	24,88 \pm 16,20 n/mm ²

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

Bei der Analyse der relativen Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Bezug auf den Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI (All/TbS) wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests festgestellt, dass die Daten der 12 Gruppen keine normale Verteilung aufweisen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,021$; Abbildung 29, Tabelle 13).

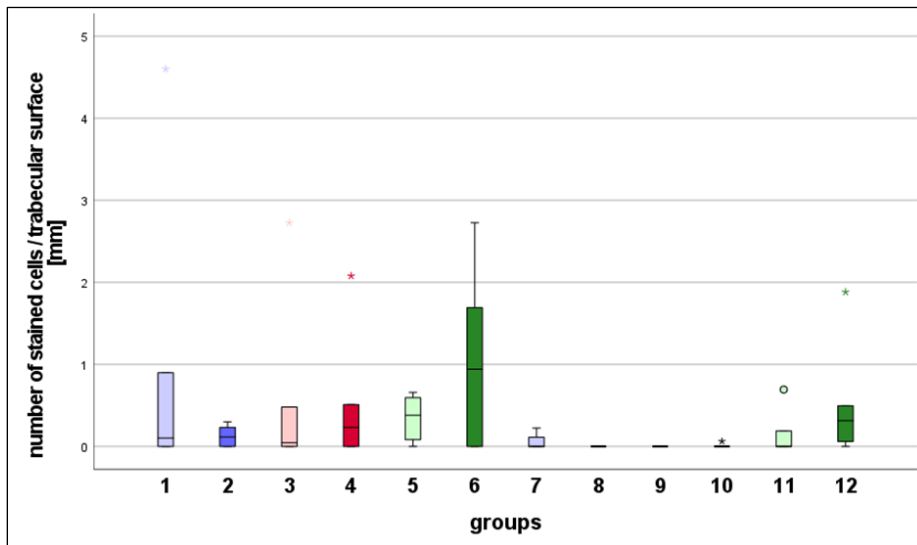


Abbildung 29: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Osterix-positiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

Beim paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-Test wurde bei Betrachtung der relativen Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Bezug auf den Trabekelumfang innerhalb der ROI ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt (Abbildung 30).

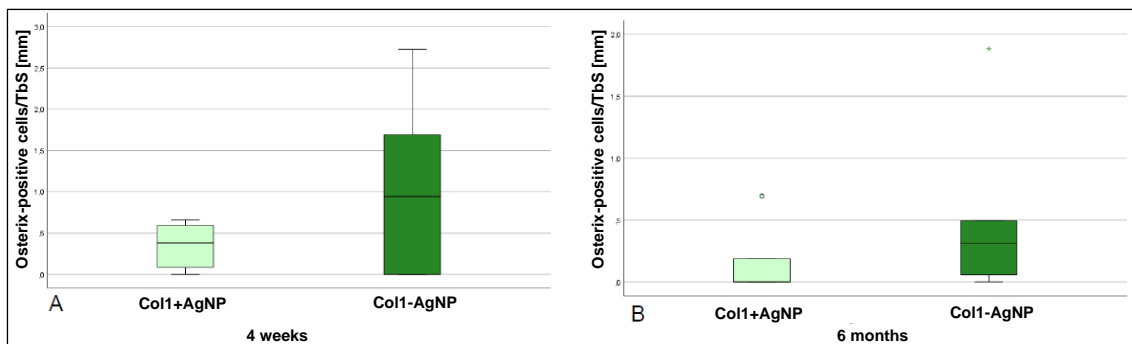


Abbildung 30: Vergleich der relativen Anzahl der gesamten Osterix-immunpositiven Zellen in Bezug auf den Trabekelumfang bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten.

A: Vier Wochen nach der Implantation zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5 (mit AgNP) und 6 (ohne AgNP) feststellbar ($p = 0,394$, Mann-Whitney-U-Test).

B: Sechs Monate nach der Implantation zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 11 (Kollagenimplantate mit AgNP) und 12 (Kollagenimplantate ohne AgNP) zu beobachten ($p = 0,31$, Mann-Whitney-U-Test).

Statistische Ausreißer werden durch kleine Kreise und Sterne markiert.

Tabelle 13: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Osterix immunpositiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (±) SEM	Variable	N	Mittelwert (±) SEM
Gruppe 1	6	5,053 ±3,998 n/mm	Gruppe 7	4	0,056 ±0,056 n/mm
Gruppe 2	6	0,021 ±0,058 n/mm	Gruppe 8	6	0 n/mm
Gruppe 3	6	2,538 ±1,936 n/mm	Gruppe 9	5	0 n/mm
Gruppe 4	6	0,509 ±0,325 n/mm	Gruppe 10	6	0,010 ±0,010 n/mm
Gruppe 5	6	0,349 ±0,114 n/mm	Gruppe 11	5	0,176 ±0,134 n/mm
Gruppe 6	6	1,050 ±0,433 n/mm	Gruppe 12	5	0,550 ±0,344 n/mm

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

3.2.2 Relative Anzahl der Osterix-immunpositiven Osteoblasten

Bei der Untersuchung der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI (Ob/TbAr) wurde festgestellt, dass die Daten der 12 Gruppen gemäß dem Kolmogorov-Smirnov-Test nicht normal verteilt sind. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,131$; Abbildung 31-32, Tabelle 14).

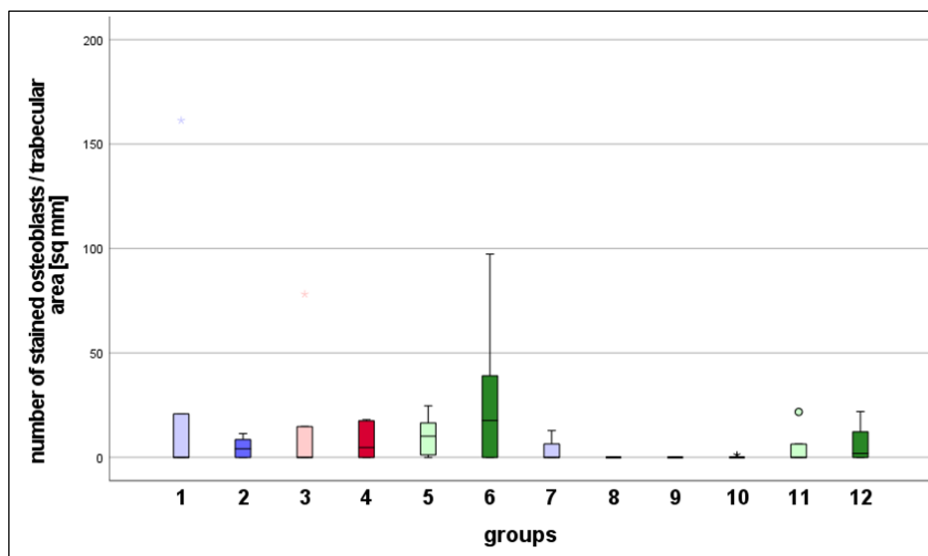


Abbildung 31: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Relation zur Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

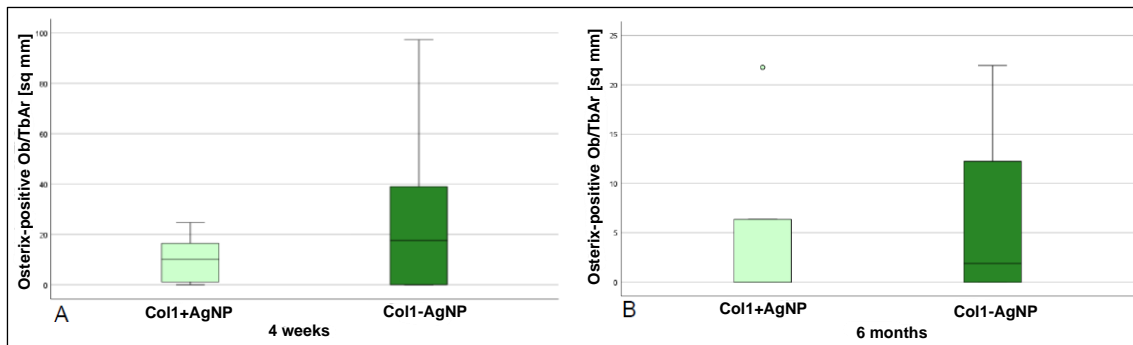


Abbildung 32: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-immunpositiven Osteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten.

A: Vier Wochen nach der Implantation zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5 (Kollagenimplantate mit AgNP) und 6 (Kollagenimplantate ohne AgNP) feststellbar.

B: Sechs Monate nach der Implantation zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 11 (Kollagenimplantate mit AgNP) und 12 (Kollagenimplantate ohne AgNP) zu beobachten.

Statistische Ausreißer werden durch kleine Kreise und Sterne markiert.

Tabelle 14: Durchschnittliche Anzahl der Osterix-immunpositiven Osteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	148,7 \pm 115,2 n/mm ²	Gruppe 7	4	3,204 \pm 3,204 n/mm ²
Gruppe 2	6	4,696 \pm 2,148 n/mm ²	Gruppe 8	6	0 n/mm ²
Gruppe 3	6	66,59 \pm 49,58 n/mm ²	Gruppe 9	5	0 n/mm ²
Gruppe 4	6	7,505 \pm 3,375 n/mm ²	Gruppe 10	6	0,189 \pm 0,189 n/mm ²
Gruppe 5	6	10,43 \pm 3,850 n/mm ²	Gruppe 11	5	5,631 \pm 4,219 n/mm ²
Gruppe 6	6	28,61 \pm 15,63 n/mm ²	Gruppe 12	5	7,227 \pm 4,331 n/mm ²

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

Bei der Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI (Ob/TbS) wurde festgestellt, dass die Daten der 12 Gruppen gemäß dem Kolmogorov-Smirnov-Test ebenfalls nicht normal verteilt sind. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,131$; Abbildung 33-34, Tabelle 15).

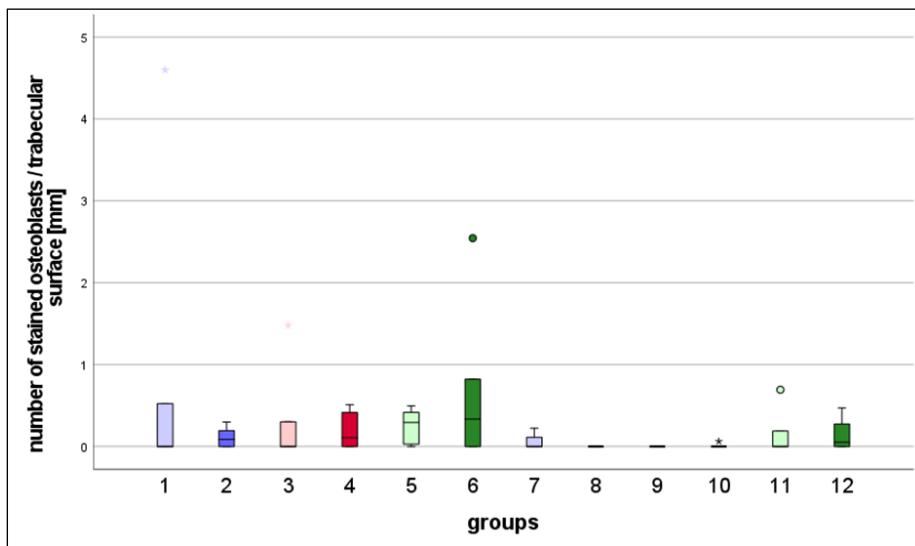


Abbildung 33: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

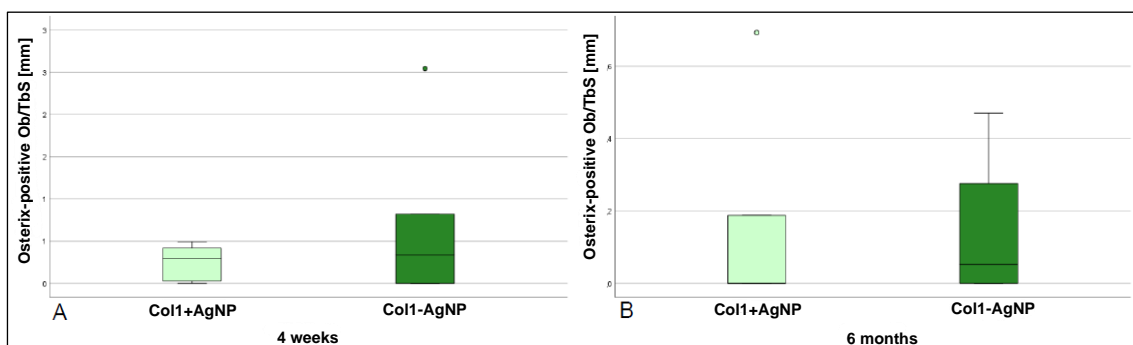


Abbildung 34: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-immunpositiven Osteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten.

A: Vier Wochen nach der Implantation zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5 (mit AgNP) und 6 (ohne AgNP) feststellbar.

B: Sechs Monate nach der Implantation zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 11 (mit AgNP) und 12 (ohne AgNP) zu beobachten.

Statistische Ausreißer werden durch kleine Kreise und Sterne markiert.

Tabelle 15: Durchschnittliche Anzahl der Osterix immunpositiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (±) SEM	Variable	N	Mittelwert (±) SEM
Gruppe 1	6	3,283 ± 2,375 n/mm	Gruppe 7	4	0,056 ± 0,056 n/mm
Gruppe 2	6	0,111 ± 0,053 n/mm	Gruppe 8	6	0 n/mm
Gruppe 3	6	1,289 ± 0,962 n/mm	Gruppe 9	5	0 n/mm
Gruppe 4	6	0,189 ± 0,089 n/mm	Gruppe 10	6	0,010 ± 0,010 n/mm
Gruppe 5	6	0,254 ± 0,084 n/mm	Gruppe 11	5	0,176 ± 0,134 n/mm
Gruppe 6	6	0,672 ± 0,403 n/mm	Gruppe 12	5	0,160 ± 0,093 n/mm

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

3.2.3 Relative Anzahl der Osterix-immunpositiven Präosteoblasten

Bei der Untersuchung der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI (PreOb/TbAr) wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests festgestellt, dass die Daten der 12 Gruppen keine normale Verteilung aufweisen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. In den Gruppen 7, 8, 9, 10 und 11 wurden keine immunpositiven Präosteoblasten nachgewiesen, weshalb der Mittelwert als 0 angegeben wurde ($p = 0,006$; Abbildung 35, Tabelle 16).

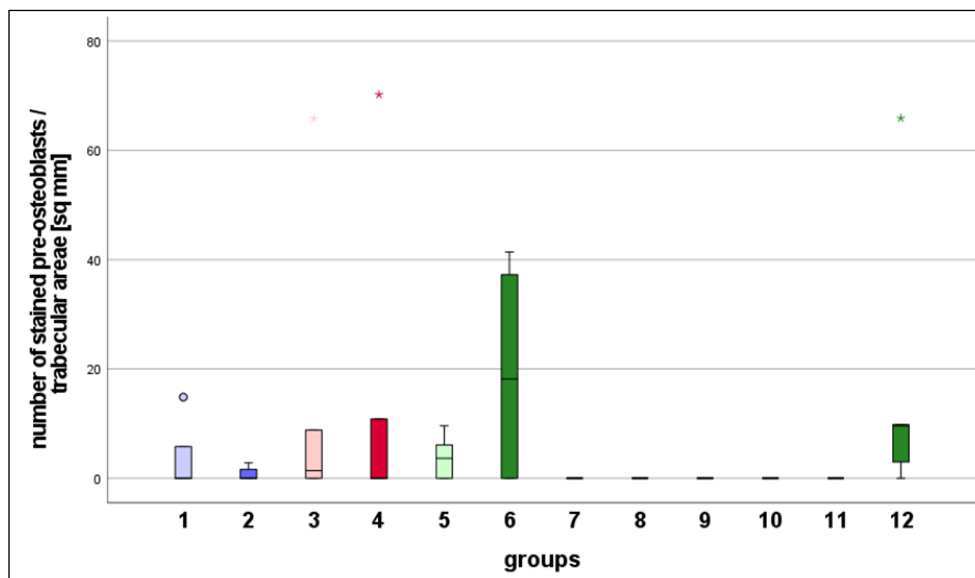


Abbildung 35: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Relation zur Trabekelfläche (mm^2) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

Beim paarweisen Vergleich mittels des Mann-Whitney-Tests zeigte sich lediglich eine signifikante Reduktion in der relativen Anzahl der Runx2-immunpositiven Präosteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche nach sechs Monaten in der Gruppe 11 (AgNP-haltige Kollagenimplantate) im Vergleich zur Gruppe 12 (Kollagenimplantate ohne Funktionalisierung mit AgNP) ($p = 0,032$). Der Vergleich zwischen der Gruppe 5 (AgNP-haltige Kollagenimplantate) und der Gruppe 6 (ohne Funktionalisierung mit AgNP) nach vier Wochen zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,310$; Abbildung 36).

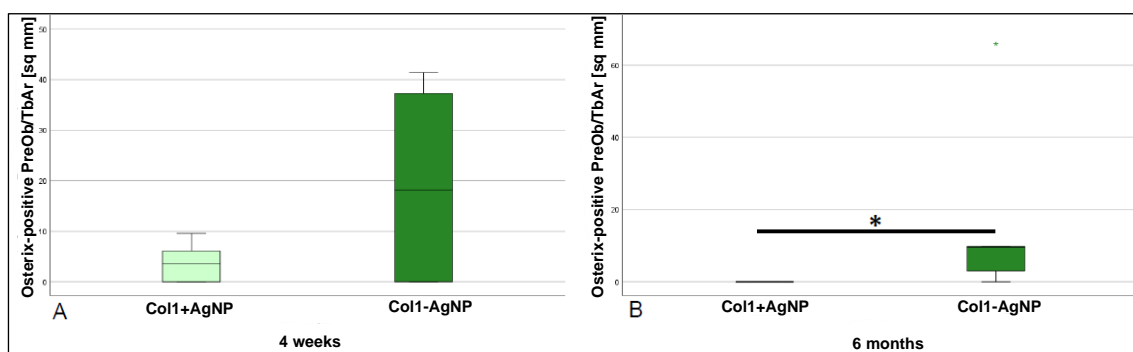


Abbildung 36: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-immunpositiven Präosteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten.

A: Vier Wochen nach der Implantation zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5 (mit AgNP) und 6 (ohne AgNP) feststellbar ($p = 0,310$, Mann-Whitney-U-Test).

B: Sechs Monate nach der Implantation zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 11 (mit AgNP) und 12 (ohne AgNP) ($* p = 0,032$, Mann-Whitney-U-Test).

Statistische Ausreißer werden durch kleine Kreise und Sterne markiert.

Tabelle 16: Durchschnittliche Anzahl der Osterix-immunpositiven Präosteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	85,74 \pm 81,65 n/mm ²	Gruppe 7	4	0 n/mm ²
Gruppe 2	6	0,531 \pm 0,498 n/mm ²	Gruppe 8	6	0 n/mm ²
Gruppe 3	6	64,39 \pm 50,27 n/mm ²	Gruppe 9	5	0 n/mm ²
Gruppe 4	6	13,51 \pm 11,48 n/mm ²	Gruppe 10	6	0 n/mm ²
Gruppe 5	6	3,836 \pm 1,543 n/mm ²	Gruppe 11	5	0 n/mm ²
Gruppe 6	6	19,17 \pm 7,771 n/mm ²	Gruppe 12	5	17,65 \pm 12,21 n/mm ²

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

Bei der Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang (mm) innerhalb der ROI (PreOb/TbS) wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests festgestellt, dass die Daten der 12 Gruppen keine normale Verteilung aufweisen. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,006$; Abbildung 37, Tabelle 17).

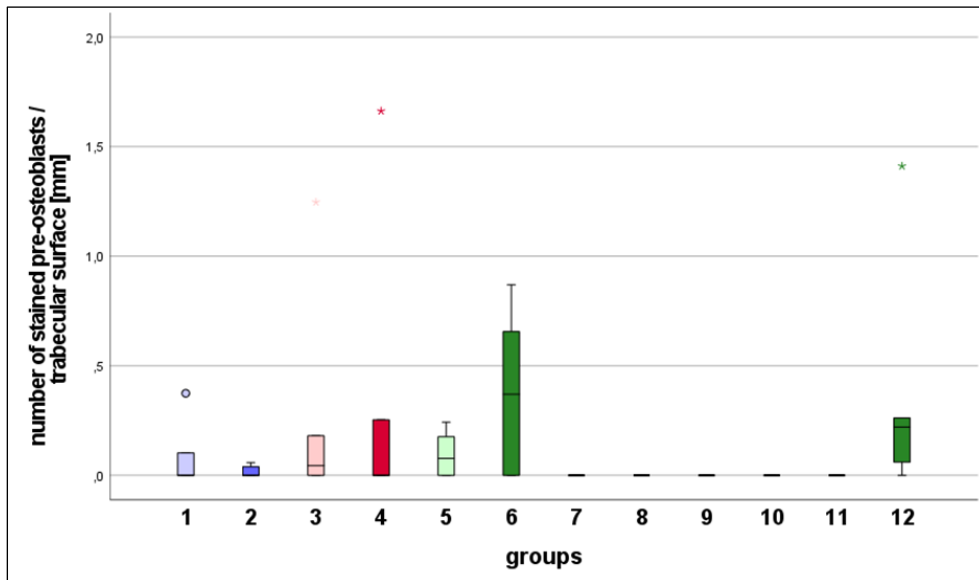


Abbildung 37: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekel (mm) innerhalb der ROI in den 12 Gruppen.

Statistische Ausreißer werden in der Abbildung durch Kreise (°) und Sterne (*) markiert.

Beim paarweisen Vergleich mittels des Mann-Whitney-Tests wurde ebenfalls nur eine signifikante Reduktion in der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang nach sechs Monaten in der Gruppe 11 (AgNP-haltige Kollagenimplantate) im Vergleich zur Gruppe 12 (Kollagenimplantate ohne Funktionalisierung mit AgNP) festgestellt ($p = 0,032$). Der Vergleich zwischen der Gruppe 5 (AgNP-haltige Kollagenimplantate) und der Gruppe 6 (ohne Funktionalisierung mit AgNP) nach vier Wochen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,310$; Abbildung 38).

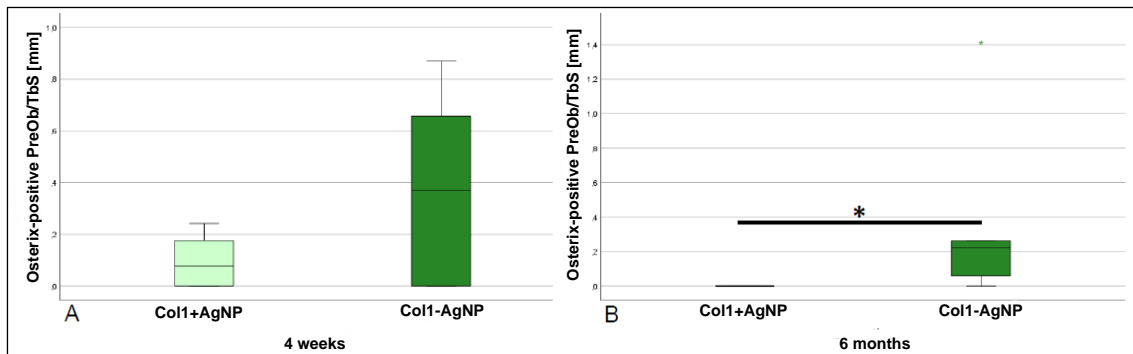


Abbildung 38: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-immunpositiven Präosteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten. A: Vier Wochen nach der Implantation zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5 (Kollagenimplantate mit AgNP) und 6 (Kollagenimplantate ohne AgNP) feststellbar ($p = 0,310$, Mann-Whitney-U-Test).

B: Sechs Monate nach der Implantation zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 11 (mit AgNP) und 12 (ohne AgNP) (* $p = 0,032$, Mann-Whitney-U-Test).

Statistische Ausreißer werden durch kleine Kreise und Sterne markiert

Tabelle 17: Durchschnittliche Anzahl der Osterix-immunpositiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen

Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM	Variable	N	Mittelwert (\pm) SEM
Gruppe 1	6	1,769 \pm 1,675 n/mm	Gruppe 7	4	0 n/mm
Gruppe 2	6	0,016 \pm 0,010 n/mm	Gruppe 8	6	0 n/mm
Gruppe 3	6	1,249 \pm 0,975 n/mm	Gruppe 9	5	0 n/mm
Gruppe 4	6	0,319 \pm 0,272 n/mm	Gruppe 10	6	0 n/mm
Gruppe 5	6	0,095 \pm 0,040 n/mm	Gruppe 11	5	0 n/mm
Gruppe 6	6	0,378 \pm 0,150 n/mm	Gruppe 12	5	0,390 \pm 0,260 n/mm

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, N: Anzahl der Objektträger

4 Diskussion

In dieser Studie wurde sich mit der Fragestellung beschäftigt, wie sich AgNP-haltige Implantate auf die Entwicklung von Osteoblasten auswirken. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die spezifischen Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix* gelegt, die eine Schlüsselrolle bei der Osteoblastenentwicklung spielen. Um ein umfassendes Bild zu erhalten, wurden verschiedene Implantattypen verwendet und die Auswirkungen in einem Rattenmodell über einen Zeitraum von 4 Wochen und 6 Monaten hinweg beobachtet und analysiert. Dies ermöglichte es, sowohl kurz- als auch langfristige Effekte der Funktionalisierung mit AgNP auf die Osteoblastenentwicklung zu erfassen und einer kritischen Bewertung zu unterziehen. Eingehend erörtert wird, inwiefern die Ergebnisse das derzeitige Verständnis für die Rolle von AgNP bei der Osteoblastenentwicklung erweitern.

4.1 Studiendesign und das Tiermodell

In dieser Studie dienten 16 Wochen alte männliche Sprague-Dawley-Ratten als Versuchstiere. Diese Wahl berücksichtigte sowohl das Gewicht (ungefähr 400 g) als auch die Größe der Ratten, um interindividuelle Unterschiede zu minimieren. Ratten werden oft in präklinischen Studien eingesetzt, bevor größere Tiermodelle und schließlich klinische Studien in Betracht gezogen werden (Denayer et al., 2014; O’Loughlin et al., 2008). Die Entscheidung für männliche Ratten wurde getroffen, um zyklusabhängige Schwankungen im Östrogenspiegel zu umgehen, die bei weiblichen Ratten auftreten und den Knochenstoffwechsel beeinflussen könnten (Hong et al., 2011). Das Alter der Versuchstiere spielt eine wichtige Rolle, da es die Knochenheilung und biologische Prozesse im Knochen beeinflusst. Bei jungen Ratten könnten Entwicklungseffekte den eigentlichen Effekt der Implantatheilung überlagern. Bei Ratten steigt die Wachstumsrate zwischen der ersten und fünften Woche an und nimmt dann bis zum Erreichen der skelettalen Reife, die ungefähr zwischen der 11,5. und 13. Woche eintritt, ab (Hunziker & Schenk, 1989; Kember, 1973). Bei älteren Ratten wurde eine verlangsamte Frakturheilung beobachtet, die möglicherweise auf eine reduzierte Genexpression für die mitochondriale Energieproduktion zurückzuführen ist (Bergman et al., 1996; Histing et al., 2011; Lu et al., 2005). Daher

wurde in dieser Studie darauf geachtet, Ratten gleichen Alters zu verwenden, um altersbedingte Effekte zu minimieren. Erwachsene Ratten bieten mehrere Vorteile für diese Art von Forschung. Ihr trabekulärer Knochen dient als passendes Modell zur Untersuchung des menschlichen trabekulären Knochens. Ihre Anatomie ist optimal für die Untersuchung von Knochendefekten und Implantaten (Kimmel & Wronski, 1990; O'Loughlin et al., 2008). Zudem sind Ratten aufgrund ihrer Größe und ihrer Anpassungsfähigkeit an Laborbedingungen eine kosteneffiziente Option für solche Studien.

Die proximale Tibia in Ratten stellt einen gut etablierten Implantationsort dar und bietet mehrere Vorteile. Ihre anatomische Struktur, insbesondere die histologische Beschaffenheit der metaphysialen Spongiosa, ermöglicht eine präzise quantitative Messung der Trabekelflächen, was für die Beurteilung der Knochenheilung und -integration von Implantaten entscheidend ist (Dayer et al., 2006; Yamazaki et al., 1999). Darüber hinaus hat sich die proximale Tibia als vorteilhafter Ort für die Untersuchung von Knochendefekten und die Implantation von biologisch abbaubaren Schrauben erwiesen. Eine Studie zeigte, dass die Implantation von biologisch abbaubaren Schrauben, die mit BMP-2 beladen waren, in die proximale Tibia von Ratten zu einer verbesserten Osteointegration zwischen dem Implantat und dem osteoporotischen Knochen führte (Jin et al., 2018).

Die Wahl der Standzeiten von 4 Wochen und 6 Monaten bei Ratten in dieser Studie ist strategisch und basiert auf dem Verständnis der Knochenheilungsprozesse und der spezifischen Lebensdauer und Wachstumsrate von Ratten. Die Standzeit von 4 Wochen entspricht in etwa der Phase der Knochenneubildung und Remodellierung nach einer Fraktur oder Implantation. In dieser Phase beginnt der Knochen, sich um das Implantat herum zu formen und zu reifen, was durch histomorphometrische Analysen sichtbar gemacht werden kann (Chakkalakal et al., 1999; Wray & Lynch, 1959). Die Untersuchung über einen Zeitraum von sechs Monaten ermöglicht es, die langfristige Knochenintegration, um das Implantat zu beurteilen. Zu diesem Zeitpunkt wurde erwartet, dass der Knochen eine stabile und ausgereifte Struktur um das Implantat herum entwickelt hat (Clarke, 2008). Darüber hinaus bietet dieser Zeitrahmen die Gelegenheit, den Effekt einer längeren Exposition bzw. des längeren Verbleibs von AgNP-dotierten Implantaten auf die Osteoblastogenese zu überwachen und zu prüfen, ob eventuell zytotoxische Effekte auftreten können, wie in anderen Studien nachgewiesen wurde (Ahamed et al., 2008; Piao et al., 2011).

4.2 Funktionalisierung der Implantate mit AgNP

Implantatassoziierte Infektionen bilden eine signifikante Herausforderung in der postoperativen Erholung und der langfristigen Funktion von Implantaten. Die Forschung konzentriert sich daher auf innovative Strategien zur Modifikation von Implantatoberflächen, um sie sowohl antiadhäsiv als auch antimikrobiell zu gestalten (Alt, 2017).

Die Integration von Heparin in Beschichtungen aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften ist ein Ansatz, der das Potenzial hat, die bakterielle Adhäsion zu verringern (Arciola et al., 2012). Ergänzend dazu werden hydrophile Polymerbürsten erforscht, die eine effektive Barriere gegen Bakterien bilden könnten (Neoh & Kang, 2011). Die Anwendung von Chitosan und seinen antimikrobiellen Eigenschaften, insbesondere gegen Biofilme antibiotikaresistenter *Staphylokokken* (Arciola et al., 2012), sowie der Einsatz natürlicher antimikrobieller Peptide als neue therapeutische Optionen gegen Infektionen (Kang et al., 2012), sind weitere wichtige Forschungsfelder. Zudem zeigt die Nutzung von mit Goldnanopartikeln dotiertem Bioglas und Titanoxid-Nanopartikeln, angereichert mit Stickstoff und Silberoxid, die vielversprechenden Möglichkeiten der Nanotechnologie in der Implantatbeschichtung (Grandi et al., 2011; Wu et al., 2010).

Die Nutzung der AgNP zieht aufgrund ihrer umfassenden antimikrobiellen Wirkung gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen großes Interesse auf sich. Verschiedene Studien haben den Einfluss von AgNP auf die Bildung von Biofilmen untersucht, wobei ein breites Spektrum an Wirkungen festgestellt wurde. Besonders hervorgehoben wird in der Literatur die Fähigkeit der AgNP die Bildung von Biofilmen zu hemmen (Liao et al., 2019; Ruparelia et al., 2008; Siddique et al., 2020). Experimentelle Befunde bestätigen, dass AgNP das Anhaften und Wachstum von Mikroorganismen, die Biofilme bilden, einschränken können. So zeigten Li et al. (2010) eine signifikante Reduzierung der Biofilmbildung bei *E. coli* durch AgNP, und Ruparelia et al. (2008) beobachteten eine Hemmung der Biofilmbildung bei *E. coli*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) und *S. aureus*. Die antimikrobielle Wirkung von AgNP wird überwiegend ihrer Fähigkeit zugeschrieben, Silberionen freizusetzen, die in zelluläre Prozesse eingreifen und das Bakterienwachstum hemmen. Diese Freisetzung von Silberionen ist abhängig von der Größe, Form und Oberflächenladung der Nanopartikel, wie Liao et al. (2019) in ihrer Studie mit *P. aeruginosa* feststellten.

Interessanterweise zeigten Siddique et al. (2020) die Wirksamkeit von AgNP gegen multiresistente *Klebsiella pneumoniae*-Stämme, wobei eine AgNP-Konzentration von 100 µg/ml die Biofilmbildung um bis zu 86% reduzierte. Auch Estevez et al. (2020) berichteten über die störende Wirkung von biogene Silbernanopartikel auf Biofilme von *E. coli* und *C. albicans*.

Die antibakterielle Aktivität von AgNP gegen multiresistente Mikroorganismen konnte in der Arbeit von Alt et al. (2004) nachgewiesen werden. Dabei wurde ein mit AgNP beladener Knochenzement gegen *Methicillin-resistente Staphylococcus epidermidis* (MRSE) und *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus* (MRSA) getestet. Der Vergleich erfolgte mit PMMA-Knochenzement, der mit metallischen Silberpartikeln von 5-50 nm Größe beladen war, sowie mit Gentamicin-Zement und reinem Zement. Nur der AgNP-Zement zeigte eine hohe antibakterielle Aktivität gegen MRSE und MRSA, im Gegensatz zu Gentamicin-Zement und reinem Zement, die keine antibakterielle Wirkung gegen diese Erreger aufwiesen.

Die Toxizität von AgNP und ihre möglichen nachteiligen Auswirkungen auf unterschiedliche biologische Systeme sind ein wachsendes Anliegen. Besonders relevant ist dabei, dass die Dosierung der AgNP in diesen Implantaten variieren kann. Das Verständnis der potenziellen Toxizität bei unterschiedlichen Dosierungen und Formen der AgNP, sowie deren Größe, Stabilisierung, Zeit- und Dosisabhängigkeit ist entscheidend.

Die Forschung zu AgNP in orthopädischen Implantaten hat unterschiedliche Ergebnisse hervorgebracht. Chernousova & Epple (2013) haben in einer umfassenden Literaturstudie aufgezeigt, dass das therapeutische Fenster von AgNP sehr schmal ist und dass die toxikologischen Daten der Wirkung von AgNP auf Mikroorganismen, Zellen und mehrzellige Organismen sich überschneiden können. Pauksch und Kollegen (2014b) haben festgestellt, dass AgNP in Form einer Dispersion zytotoxische Effekte auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten ausüben und von diesen Zelltypen aufgenommen werden. Jedoch zeigte eine weitere Studie von Pauksch et al. (2013), dass dieselben AgNP, wenn auf Titanimplantaten immobilisiert, über einen Zeitraum von 21 Tagen keine toxischen Wirkungen auf dieselben Zelllinien hatten. Die in der Studie von Pauksch et al. (2013) verwendeten Implantate wurden auch in der vorliegenden Studie eingesetzt.

Des Weiteren deutet die Studie von Cao et al. (2011) darauf hin, dass die Einbindung von AgNP in Biomaterialien zu einer verringerten Zytotoxizität führen könnte, indem die

zelluläre Aufnahme von AgNP reduziert wird. Xie et al. (2019) demonstrierten eine Hybridbeschichtung mit AgNP, die eine ausgezeichnete Anti-Biofilm-Effizienz zeigte und die osteogene Differenzierung stimulierte. Van Hengel et al. (2017) entwickelten poröse Titanimplantate, die durch Einbettung von AgNP biofunktionalisiert wurden und eine starke antimikrobielle Aktivität ohne Zytotoxizität zeigten.

Neben der lokalen Toxizität ist auch die potenzielle systemische Toxizität von AgNP ein wichtiger Aspekt. Studien, wie jene von Olugbodi et al. (2023), deuten darauf hin, dass die subdermale Verabreichung von AgNP oxidativen Stress verursachen und die Funktionen von Leber, Niere und Herz bei männlichen Wistar-Ratten beeinträchtigen kann. Diese Ergebnisse weisen auf die Notwendigkeit einer sorgfältigen Bewertung der Sicherheit von AgNP in orthopädischen Anwendungen hin, insbesondere im Hinblick auf ihre potenzielle systemische Toxizität.

4.3 Verwendete Knochenimplantate

In der Orthopädie und Traumatologie werden verschiedene Implantatarten verwendet, um Probleme mit Knochendefekten und Endoprothesen zu adressieren. Allerdings können bakterielle Kontaminationen auf den Oberflächen dieser Implantate ihre Effektivität beeinträchtigen. Daher ist es besonders wichtig, nach Materialien zu suchen, die antimikrobielle Eigenschaften besitzen. In dieser Studie wurden verschiedene Materialien, die mit AgNP zur Infektionsprävention modifiziert wurden, untersucht, um zu ermitteln, wie geeignet sie für die Knochenbildung sind.

Knochenzemente dienen oft als Knochenersatz, insbesondere bei endoprothetischen Eingriffen, in der Wirbelsäulen Chirurgie bei osteoporotischen Zuständen und bei der Behandlung von Osteomyelitis mit Knochendefekten. Bei Zement als dauerhaftem Implantat ist eine anhaltende Freisetzung von Silber erwünscht. In dieser Studie wurden festgeformte Zementimplantate verwendet, um eine gleichbleibende Qualität der Implantate zu gewährleisten. Die PMMA-basierten Zementimplantate waren mit 4000 µg AgNP/g Zement angereichert. Zur weiteren Infektionsprophylaxe wurden Zementimplantate mit Gentamicinsulfat in einer Konzentration von 1,34 % zusätzlich zum AgNP untersucht. Diese doppelt angereicherten Implantate wurde in der Arbeit von Pauksch et al. (2014a)

untersucht und wiesen eine AgNP-Freisetzung von rund 2,7 ng/g/mm² am fünften Tag und 3,5 ng/g/mm² nach 30 Tagen auf. In dieser Untersuchung verzichteten wir zur Reduktion der Tierzahl auf eine Kontrollgruppe ohne AgNP, da die Biokompatibilität von Zementen mit AgNP sowie von Zement mit Gentamicin bereits in in-vivo- und in-vitro-Studien belegt wurde (Lucke et al. 2003; Pauksch et al. 2014a).

Slane et al. (2015) untersuchten Acryl-Knochenzement, der mit AgNP imprägniert war, und stellten eine signifikante Reduktion der Biofilmbildung fest, was auf ein hohes Potenzial für den Einsatz in der primären Endoprothetik hinweist, insbesondere zur Verhinderung bakterieller Oberflächenbesiedelung. Ebenso fanden Soni et al. (2023) heraus, dass AgNP-beladenes PMMA, ergänzt mit Vancomycin oder Gentamicin, eine deutlich verbesserte Wirksamkeit gegen biofilmbildende Mikroorganismen zeigte. Im Kontrast dazu berichteten Krassnig et al. (2021), dass die Beimischung von Nanosilber oder verschiedenen Konzentrationen von Silbersulfat zu Knochenzement keine effektiven bakteriziden oder antimykotischen Konzentrationen freisetzte. Sie schlugen jedoch vor, dass bestimmte Konzentrationen von Silbersulfat als temporäre Abstandhalter bei der Behandlung von periprothetischen Infektionen wirksam sein könnten.

Titanimplantate sind in der Orthopädie und Traumatologie aufgrund ihrer hervorragenden Biokompatibilität, Korrosionsbeständigkeit und mechanischen Stabilität von zentraler Bedeutung (Neuman et al., 1975; Wang et al., 2019; Woo et al., 1984). Titan-Knochenimplantate stellen ein Beispiel für nicht-permanente Implantate dar, bei denen dennoch eine langfristige Freisetzung von Silber angestrebt wird.

In dieser Studie wurde die Titanimplantate, hergestellt aus Rohtitan (TiAl6V4-ELI), zunächst durch Vibrationszylinder poliert und mittels Ultraschall in Aceton und Ethanol gereinigt. Um die Keimbesiedlung zu verhindern, erfolgte eine Beschichtung der Titanoberfläche mit AgNP durch plasmaelektrolytische Oxidation. Für diese Oberflächenmodifikation kam eine Nano-Ag-Elektrolytdispersion (ras materials GmbH) mit 5 % AgNP zum Einsatz. Nach der Reinigung der Titanscheiben mit deionisiertem Wasser und Ethanolbehandlung zeigte die AgNP-Beschichtung eine Freisetzungsrate von 1,6 ng/g/mm² pro Tag, welche mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen wurde (Pauksch et al., 2013). Für die Erzeugung einer vergleichbaren Oberfläche wurden die Titanimplantate der Kontrollgruppe ohne AgNP ebenfalls mittels des plasmaelektrolytischen Verfahrens behandelt.

Die Beschichtung von Titanimplantaten mit AgNP wurde als Strategie zur Verhinderung von implantatassoziierten Infektionen erforscht und in mehreren experimentellen Studien hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung und Biokompatibilität untersucht (Cao et al., 2011; Chen & Schluesener, 2008; Sun & Liu, 2012). Wei et al. (2022) entwickelten eine Methode zur Herstellung einer anpassbaren Polydopamin (pDA)-Beschichtung auf AgNP, um die Zytotoxizität deutlich zu reduzieren, während antibakterielle Eigenschaften und Biokompatibilität erhalten bleiben. Die Studie betont die Bedeutung der genauen Kontrolle von Aggregatzuständen und Schichtdicke zur Verringerung der Zytotoxizität. Selvamani et al. (2022) zeigten, dass laserassistierte Nanotexturierung und die Immobilisierung von AgNP auf Titanimplantaten die Mineralisierung von Knochenzellen und antimikrobielle Eigenschaften verbesserten, was einen vielversprechenden Ansatz für schnelle Oberflächenmodifikationen von biomedizinischen Metallimplantaten darstellt. Croes et al. (2018) biofunktionalisierten poröse Titanimplantate mittels elektrophoretischer Abscheidung (EPD) mit Chitosan-Beschichtungen, die verschiedene Konzentrationen von AgNP oder Vancomycin enthielten, und erreichten eine vollständige Eliminierung oder Reduktion der Anzahl anhaftender planktonischer *S. aureus* um bis zu vier Größenordnungen in vitro. San et al. (2022) berichteten von einer erhöhten antibakteriellen Aktivität gegen *MRSA* mit porösen Titanimplantaten, die mit reduziertem Graphenoxid/AgNP beschichtet waren, im Vergleich zu solchen, die nur mit AgNP beschichtet waren.

Kollagen repräsentiert ein fundamentales Element in der menschlichen Physiologie, indem es eine wesentliche Rolle in der strukturellen Integrität und Funktionalität diverser Gewebe übernimmt. Als das prävalenteste Protein im menschlichen Organismus bildet es einen integralen Bestandteil der extrazellulären Matrix und trägt signifikant zur Homöostase des Bewegungsapparates bei, insbesondere im Kontext der Geweberegeneration und -reparatur (Kellesarian et al., 2018; Nehrer et al., 1997). In der aktuellen Studie wurden Kollagenvliesimplantate untersucht, die aus resorbierbaren Zylindern des Kollagen Typ I konstruiert sind und mit einer Konzentration von 4000 µg AgNP pro Gramm Kollagen angereichert wurden. Diese resorbierbaren Implantate dienen als Modell, um die kurzfristige Freisetzung von AgNP zu untersuchen und deren potentielle Implikationen zu evaluieren.

Die breite Anwendung von Kollagen Typ I als Biomaterial basiert auf seinen charakteristischen Eigenschaften, wie einer ausgedehnten Oberflächenstruktur, hoher Porosität

und einem effizient verknüpften Porensystem (Sun et al., 2008). Untersuchungen zeigen, dass Metallimplantate, die mit Kollagen Typ I beschichtet sind, die Osseointegration verbessern (Kellesarian et al., 2018; Morra et al., 2006).

Die Anwendung von auf Kollagen basierenden Nanokompositen mit integrierten AgNP wurde in Bezug auf die Regeneration von Knochengewebe und die Kontrolle von Infektionen untersucht. Zhang et al. (2015) belegten, dass in Kollagen eingebettete AgNP die Proliferation und osteogene Differenzierung von MSC sowohl in vitro als auch in einem Mäuse-Femurfrakturmodell anregten, was möglicherweise die Frakturheilung über den TGF- β /BMP-Signalweg fördert. Sun et al. (2015) entwickelten ein Kollagen-AgNP/BMP-2-Komposit für die verbesserte Heilung infizierter Knochen, welches sowohl starke antibakterielle Eigenschaften aufwies als auch die osteoblastische Differenzierung ohne Beeinträchtigung der Zellfunktionen unterstützte. Bakare et al. (2016) formulierten einen PHBV-Film mit Kollagen und Ag/BSA NPs, der effektiven antimikrobiellen Wirkung gegen pathogene Mikroorganismen bei geringer Toxizität für Osteoblasten zeigte.

Bemerkenswerterweise gibt es nur begrenzte Forschungsergebnisse bezüglich der spezifischen Auswirkungen auf die Osteoblastogenese, was eine Lücke in unserem Verständnis der vollen potenziellen Anwendbarkeit dieses Biomaterials in der klinischen Praxis darstellt.

4.4 Methodik und Herausforderungen bei der Analyse der Knochenstrukturen

Die Immunhistochemie ist eine zentrale Methode in der Knochenforschung, die es ermöglicht, spezifische Proteine in verschiedenen Zelltypen des Knochengewebes zu identifizieren und deren Verteilung zu analysieren. Indem sie detaillierte Informationen über Proteinexpressionsmuster auf zellulärer und molekularer Ebene bereitstellt, erweist sich die Immunhistochemie als eine evidenzbasierte Methode, die entscheidend für die Untersuchung und das Verständnis sowohl pathologischer als auch physiologischer Zustände des Knochens ist (Idleburg et al., 2021; Puleo & Nanci, 1999). In dieser Studie wurde die

Immunhistochemie angewandt, um die räumliche Verteilung von Runx2- und Osterix-positiven Osteoblasten und Präosteoblasten zu ermitteln, die Schlüsselrollen in der Osteoblastogenese spielen. Durch manuelle Zählung dieser Zellen und deren Korrelation mit der Fläche und dem Umfang der Knochen trabekel konnte die Präsenz wichtiger Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Phasen der Knochenbildung quantifiziert werden.

Die Histomorphometrie am Knochen ist eine entscheidende Methode zur detaillierten Analyse der Knochenmikroarchitektur, die insbesondere in der Erforschung und Behandlung von Knochenerkrankungen wie Osteoporose von Bedeutung ist (Recker et al., 2005). Ihre Fähigkeit, subtile Veränderungen in der Knochenstruktur zu erkennen, übertrifft herkömmliche bildgebende Verfahren und spielt eine wichtige Rolle in der Früherkennung pathologischer Veränderungen. Darüber hinaus ist sie für die personalisierte Medizin von Bedeutung, da sie eine individuelle Beurteilung des Knochenzustandes ermöglicht. Trotz dieser Vorteile ist die Methode durch ihre Invasivität, den hohen Zeit- und Ressourcenaufwand sowie die Begrenzung auf lokale Knochenqualitäts- und -quantitätsinformationen eingeschränkt (Compston, 2004). Zudem kann die Variabilität in der Probenentnahme die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Diese Aspekte sind entscheidend für die Bewertung der Anwendbarkeit der Histomorphometrie in der klinischen Praxis und Forschung und erfordern eine sorgfältige Abwägung im Kontext der spezifischen Forschungsziele und klinischen Anforderungen.

Die Mikro-Computertomographie (Micro-CT) hat sich als eine wertvolle und nicht-invasive Methode zur Analyse der Knochenstruktur etabliert, war jedoch für die vorliegende Studie nicht ideal geeignet. Der Grund hierfür liegt in der begrenzten Fähigkeit der Micro-CT, zelluläre Details und biochemische Prozesse darzustellen, obwohl sie eine hochauflösende, dreidimensionale Visualisierung und präzise Messungen von Knochenparametern ermöglicht (He et al., 2017). Trotz ihrer Vorteile, wie Zeitersparnis und die Möglichkeit für wiederholbare in vivo-Studien, sprechen die höheren Kosten, die begrenzte Verfügbarkeit und die potenzielle Strahlenbelastung bei in vivo-Anwendungen gegen den Einsatz der Micro-CT in diesem speziellen Forschungskontext (He et al., 2017; Tamminen et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden mehrere herausfordernde Aspekte bei der Analyse der Knochenstruktur identifiziert, die eine detaillierte Betrachtung erfordern. Ein zentraler Punkt war die präzise Unterscheidung zwischen Kortikalis und Spongiosa sowie die

zuverlässige Identifikation von Implantatlöchern, Granulationsgewebe und potenziellen Artefakten. Diese Differenzierung ist für die genaue Beurteilung der Knochenheilung und -integration von Implantaten von entscheidender Bedeutung. Ein weiteres wesentliches Element der Studie war die zeitliche Verzögerung zwischen der Implantation und den nachfolgenden Messungen, die nach 4 Wochen und 6 Monaten durchgeführt wurden. Die Unmöglichkeit, die Ausgangswerte der Knochentrabekelflächen zum Zeitpunkt der Operation zu erfassen, führte zu einer Lücke in den Daten, die die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen könnte, da nicht sichergestellt werden kann, dass alle Tiere zu Beginn der Studie über eine vergleichbare Knochenstruktur verfügten. Darüber hinaus spielte die Beschaffenheit der Knochentrabekel selbst, die aus schwammähnlichen Bälkchen bestehen und sich dynamisch an unterschiedliche Belastungen anpassen, eine wichtige Rolle in der Untersuchung. Die Tatsache, dass die Versuchstiere nach der Operation in Makrolonkäfigen untergebracht waren, führte zu einer eingeschränkten Bewegungsfreiheit, was wiederum die Belastung der Knochentrabekel beeinflusste. Diese Einschränkung der Bewegung könnte die Knochenstruktur und damit die Ergebnisse der Studie beeinflusst haben. Diese Faktoren verdeutlichen die Komplexität der Knochenstrukturanalyse und unterstreichen die Notwendigkeit einer sorgfältigen und umfassenden Bewertung der gesammelten Daten.

Im Rahmen der histomorphometrischen Untersuchungen dieser Studie wurden spezifische Parameter zur Beurteilung der Knochenzellaktivität und -dynamik herangezogen. Die Analyse umfasste die quantitative Erfassung der Gesamtzahl immunpositiver Zellen, die als Indikator für die zelluläre Aktivität innerhalb des Knochengewebes dient. Des Weiteren wurde die Anzahl der positiven Präosteoblasten ermittelt, um Einblicke in die frühen Phasen der Osteoblastendifferenzierung zu gewinnen. Zusätzlich wurde die Anzahl der Osteoblasten bestimmt, um die aktive Knochenbildung zu quantifizieren. Um eine präzise und standardisierte Auswertung zu gewährleisten, wurden diese Parameter in Relation zur Knochenfläche bzw. zum Trabekelumfang gesetzt. Hierfür wurde eine einheitliche ROI definiert, die eine konsistente und vergleichbare Basis für die Messungen über alle Proben hinweg bot. Diese methodische Herangehensweise ermöglichte es, die zellulären Komponenten des Knochenumbaus in einem definierten mikroanatomischen Kontext zu quantifizieren und zu analysieren. Die Festlegung einer standardisierten ROI ist von entscheidender Bedeutung, um die Variabilität zwischen den Proben zu minimieren und die Genauigkeit der Ergebnisse zu maximieren.

Für die histomorphometrische Analyse in dieser Studie wurde die Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* eingesetzt, die sich durch ihre Kostenfreiheit und Benutzerfreundlichkeit auszeichnet. Diese Software ermöglichte eine einfache und semiautomatisierte quantitative Analyse der relevanten Parameter, wodurch eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sichergestellt wurde. Eine vollständig automatisierte Auswertung war jedoch nicht realisierbar, da spezifische Unterscheidungen, wie die Differenzierung der gefärbten Bereiche im Trabekelwerk von jenen im Knochenmark, eine manuelle Bewertung erforderten. Diese Art der differenzierten Analyse konnte nur durch menschliche Expertise gewährleistet werden, was die Notwendigkeit einer kombinierten Herangehensweise aus Softwareunterstützung und menschlichem Urteilsvermögen unterstreicht.

4.5 Einfluss der AgNP-funktionalisierten Implantate auf die Regulation von Runx2 und Osterix

In dieser experimentellen Studie wurde die Verteilung und Anzahl von Runx2- und Osterix-immunpositiven Zellen in verschiedenen experimentellen Gruppen untersucht, darunter Gruppen mit und ohne AgNP-haltige Implantate. Die Ergebnisse zeigen eine Variation in der Anzahl der immunpositiven Zellen in Bezug auf Trabekelfläche und Trabekelumfang, was auf unterschiedliche osteogene Aktivitäten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen hindeutet.

Die relativen Anzahlen von Runx2-immunpositiven Zellen wurden in Bezug auf die Trabekelfläche und den Trabekelumfang analysiert. Es lag keine normale Verteilung der Daten der Gruppen beim Kolmogorov-Smirnov-Test vor, sowohl in Relation zur Trabekelfläche als auch zum Trabekelumfang. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zeigte in beiden Fällen einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, was auf eine heterogene Verteilung der Runx2-positiven Zellen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen hinweist. Paarweise Vergleiche mit dem Mann-Whitney-Test zeigten eine signifikante Reduktion in der relativen Anzahl der gesamten Runx2-immunpositiven Zellen, bezogen sowohl auf die Trabekelfläche als auch auf den Trabekelumfang, nach 6 Monaten im Vergleich zu 4 Wochen in den Gruppen mit Kollagenimplantaten sowohl

mit als auch ohne AgNP. Die Untersuchung der Runx2-positiven Osteoblasten ergab ähnliche Trends. Bei den Titanimplantaten wurde eine signifikante Zunahme der Runx2-positiven Osteoblasten in Relation zur Trabekelfläche nach 6 Monaten im Vergleich zur Ausgangszeit nach 4 Wochen festgestellt, allerdings nur bei Implantaten ohne AgNP. Bei den Kollagenimplantaten wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Osteoblasten in Relation zur Trabekelfläche zwischen den Gruppen mit und ohne AgNP festgestellt. Eine signifikante Reduktion der Anzahl immunpositiver Osteoblasten nach 6 Monaten wurde jedoch in den Gruppen mit Kollagenimplantaten ohne AgNP beobachtet. In Bezug auf den Trabekelumfang ergaben sich andere Ergebnisse: Eine signifikante Reduktion nach 6 Monaten wurde für das silberfunktionalisierte Implantat nachgewiesen, während der Unterschied bei den Kollagenimplantaten ohne AgNP nicht signifikant war. Dennoch wurde eine tendenzielle Reduktion bei den Kollagenimplantaten ohne AgNP berechnet. Die Analyse der Runx2-positiven Präosteoblasten offenbarte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Es wurde eine signifikante Reduktion der Präosteoblasten in den Gruppen mit AgNP-haltigen Titanimplantaten nach 6 Monaten beobachtet. Zudem zeigte sich eine signifikante Reduktion bei den Kollagenimplantaten mit und ohne AgNP.

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die Beschaffenheit des Implantatmaterials, die Anwesenheit von AgNP und die Implantationsdauer entscheidende Determinanten in der Regulation der Runx2-positiven Zellpopulationen darstellen. Speziell bei den Titanimplantaten weist die beobachtete Reduktion der Runx2-Expression, insbesondere nach einer Dauer von sechs Monaten, auf eine potenzielle inhibierende Wirkung der AgNP auf die Osteoblastendifferenzierung in Kombination mit Titan hin. Die Befunde von Lafzi et al. (2023) zeigen eine partielle Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen, wobei sie eine initiale Steigerung der osteogenen Genexpression in MC3T3-E1-Zellen feststellten, die auf mit Nanohydroxylapatit und Silber/Strontium beschichteten Titanplatten kultiviert wurden. Nach sieben Tagen wurde nicht nur eine signifikante Erhöhung der Silberionenfreisetzung beobachtet, sondern auch eine deutliche Zunahme der Expression der Runx2, OPN und OCN in den mit Silber/Strontium beschichteten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne Silber/Strontium. Diese signifikanten Unterschiede in der Genexpression waren jedoch nach 14 Tagen nicht mehr feststellbar. Diese Ergebnisse deuten möglicherweise auf einen negativen Einfluss der Implantationsdauer auf die Regulation von Runx2 hin.

Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien positive Effekte von AgNP auf die Runx2-Regulation. Xie et al. (2019) beobachteten, dass niedrig dosierte AgNP die Zellviabilität reduzierten, die Zellmembranpermeabilität erhöhten und die Expression verschiedener osteogener Marker wie ALP, Kollagen Typ I, OCN störten, während gleichzeitig die Expression von Runx2 und *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) in osteoblastenähnlichen Zellen (MG-63-Zellen) verstärkt wurde. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Zheng et al. (2012), wo Ag-implantiertes Titan mit einer nanostrukturierten Oberfläche gute antimikrobielle Eigenschaften zeigte, ohne die Osteoblastenfunktion oder die Expression von für den Phänotyp relevanten Genen wie ALP, OCN und Runx2 zu beeinträchtigen. Es muss allerdings beachtet werden, dass diese Studien in vitro durchgeführt wurden und keine Langzeituntersuchungen über einen Zeitraum von sechs Monaten einschlossen.

Die Studienergebnisse bei Kollagenimplantaten, unabhängig vom Vorhandensein von AgNP, weisen nach einer Implantationsdauer von sechs Monaten auf eine Verringerung der Runx2-positiven Zellen hin. Diese Befunde spiegeln teilweise die Ergebnisse von Chen et al. (2018) wider, die eine verstärkte osteogene Differenzierung durch AgNP-beschichtete Kollagenmembranen in vitro demonstrierten. An den Tagen 3 und 6 wurde bei C3H101/2-Zellen eine erhöhte Expression von osteogenen Markern wie Runx2, ALP und OPN festgestellt, wohingegen bei einer verlängerten Kulturdauer bis zum 9. Tag kein signifikanter Unterschied in der Genexpression beobachtet wurde. Dies deutet auf eine möglicherweise zeitlich begrenzte Wirkung der AgNP-funktionalisierung auf die osteogene Aktivität hin und unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu den Langzeiteffekten von AgNP auf die Osteoblastendifferenzierung.

Im Gegensatz dazu fand die Studie von Sun et al. (2015), dass BMP-2/AgNP/Kollagen-Scaffold-Komposite die Adhärenz und Proliferation von Knochenmarkstammzellen nicht beeinträchtigten, sondern zu einer Steigerung der Runx2-Expression führten, wie die Genexpressionsanalyse mittels *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* (qRT-PCR) zeigte. Darüber hinaus erweitert die Forschung von Qian et al. (2019) das Verständnis im Bereich Scaffold-Design durch die Einführung von dreifachen Modifikationen: Silberimprägnierung, Kollagenbeschichtung und Elektrospinning. Das Ziel war es, eine optimale Balance zwischen Biokompatibilität, antimikrobiellen Eigenschaften und osteogener Wirksamkeit zu erreichen. Ihre Ergebnisse zeigten eine deutlich

gesteigerte Aktivität der ALP sowie erhöhte BMP2- und Runx2-Expressionsniveaus im Vergleich zu Kontrollen, was auf das erfolgreiche Zusammenspiel dieser Modifikationen hindeutet.

Bei der Analyse der Gesamtzahl Osterix-immunpositiver Zellen zeigte der Kolmogorov-Smirnov-Test keine Normalverteilung der Daten, was die Anwendung nicht-parametrischer Tests wie Kruskal-Wallis und Mann-Whitney rechtfertigte. Der signifikante Unterschied, der im Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gruppen festgestellt wurde, deutet auf eine heterogene Verteilung der Osterix-positiven Zellen hin, was unterschiedliche osteogene Reaktionen in den jeweiligen Gruppen nahelegt. Interessanterweise ergaben paarweise Vergleiche keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, was auf subtile Unterschiede in der Expression von Osterix hindeutet, die möglicherweise durch andere Faktoren als die Anwesenheit von AgNP beeinflusst werden. Bei der parallelen Analyse von Osterix-positiven Osteoblasten zeigte der Kolmogorov-Smirnov-Test keine normale Verteilung der Daten. Der Kruskal-Wallis-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, was darauf hindeutet, dass AgNP keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten hat. Diese Erkenntnis wurde durch paarweise Vergleiche bestätigt. Die Variationen in der Anzahl dieser Zellen waren gering und zeigten keine eindeutigen Trends in Bezug auf die Anwesenheit von AgNP.

Interessanterweise zeigte die Analyse der Osterix-positiven Präosteoblasten unterschiedliche Ergebnisse. Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, was auf eine erhöhte Variabilität in der Anzahl dieser Zellen hindeutet. Besonders auffällig war der signifikante Rückgang der Osterix-positiven Präosteoblasten in der Gruppe mit AgNP-haltigen Kollagenimplantaten nach sechs Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von AgNP in Kollagenimplantaten einen subtilen, jedoch signifikanten Einfluss auf die frühen Stadien der Osteoblastendifferenzierung haben könnte, der mit der Dauer der Implantatplatzierung zusammenhängt. In späteren Stadien und bei der Gesamtzahl der Osterix-positiven Zellen ist jedoch kein deutlicher Einfluss zu beobachten. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu den Erkenntnissen von Xu et al. (2019), die die Rolle von AgNP in den osteogenen Wegen von humanen periodontalen Ligamentfibroblasten (HPDLFs) untersuchten. In ihrer Untersuchung setzten Xu et al. eine Reihe von Assays ein, um die konzentrationsabhängigen Effekte von AgNP auf HPDLFs zu erläutern. Bemerkenswerterweise stellten sie fest, dass Konzentrationen im Bereich von 25-100 μm die osteogene

Differenzierung förderten, was sich durch eine erhöhte Aktivität der ALP, die Hochregulierung von *Runx2*, *OCN*, *Osterix* und Kollagen Typ I-Expression zeigte. Die vorhandene wissenschaftliche Literatur weist auf eine signifikante Forschungslücke hinsichtlich der Auswirkungen von AgNP auf den Transkriptionsfaktor *Osterix* hin, was die Notwendigkeit weiterer detaillierter Untersuchungen in diesem Bereich unterstreicht.

In der vorliegenden Studie wurde keine signifikante Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix* durch PMMA-Implantate festgestellt, was als Indiz für eine ausbleibende negative Auswirkung der AgNP-Zementimplantate mit Gentamycin interpretiert werden kann. Die Untersuchungen von Alt et al. (2004) zeigten, dass Knochenzement, angereichert mit AgNP, in quantitativen und qualitativen Zytotoxizitätstests keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu einer nicht-toxischen Kontrollgruppe aufwies, was auf eine adäquate biologische Verträglichkeit des mit AgNP versehenen Knochenzements hindeutet. Die Studie von Prokopovich et al. (2015) offenbarte, dass die Verwendung von mit Ölsäure beschichteten AgNP dem Knochenzement antimikrobielle Eigenschaften verleiht, ohne die mechanischen Eigenschaften oder die Zytokompatibilität negativ zu beeinflussen, was potenziell ähnliche Effekte auf die Osteoblastendifferenzierung nahelegt. Jedoch muss die Osteogenese unter diesen Formen von Implantaten weiter untersucht werden, um diese Theorie zu bestätigen.

Der Einsatz der qRT-PCR zur Messung der Genexpression von *Runx2* und *Osterix* wäre in diesem Kontext von Nutzen gewesen. Diese Aspekte sollten in zukünftigen Forschungsarbeiten Berücksichtigung finden.

Im aktuellen wissenschaftlichen Diskurs stellt die Untersuchung des Einflusses von AgNP-Knochenimplantaten auf die Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix* in vivo ein noch wenig erforschtes Gebiet dar. Diese Feststellung basiert auf der bis zum Zeitpunkt der Studie verfügbaren Literatur und unterstreicht die Innovativität und Relevanz des Forschungsvorhabens. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass mit dem kontinuierlichen Fortschritt und der Veröffentlichung neuer Forschungsergebnisse zusätzliche wichtige Erkenntnisse in diesem Bereich zukünftig aufgedeckt werden könnten.

4.6 Auswirkungen von Antibiotika auf die Osteogenese und deren Potenzial für die Beschichtung von Implantaten

Antimikrobielle Knochenimplantate repräsentieren einen signifikanten Fortschritt in der orthopädischen und traumatologischen Medizin. Die Beschichtung dieser Implantate mit antibakteriellen Substanzen, einschließlich der Verwendung von Antibiotika, oder ihre intrinsischen antimikrobiellen Eigenschaften, die sich aus der Materialzusammensetzung ergeben, bieten eine wirksame Prophylaxe gegen die Kolonisation durch pathogene Mikroorganismen. Die sorgfältige wissenschaftliche Evaluation der Auswirkungen dieser Beschichtungen auf die Osteogenese, sowohl in positiver als auch potenziell negativer Hinsicht, ist von entscheidender Bedeutung. Dieser Aspekt stellt einen wichtigen Forschungsfokus dar und ist für die zukünftige Entwicklung und Anwendung von Knochenimplantaten unerlässlich.

Die Anwendung von lokalen Antibiotika, insbesondere Gentamicin, bietet eine effektive Prophylaxe gegen postoperative Infektionen. Gentamicin wird aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums gegen verschiedene Bakterienarten häufig verwendet. Diese Methode zielt darauf ab, hohe lokale Antibiotikakonzentrationen direkt am Implantationsort zu erreichen, um das Infektionsrisiko zu minimieren. Allerdings müssen bei dieser Strategie potenzielle Risiken wie Antibiotikaresistenzen und mögliche allergische Reaktionen berücksichtigt werden. Die Studie von Chang et al. (2006) veranschaulicht, dass hohe Konzentrationen von Gentamicin (100 µg/ml und 200 µg/ml) die Proliferation und Differenzierung von MSC in osteogene und chondrogene Richtungen hemmen können, was potenziell den Knochenheilungsprozess beeinträchtigt. Pountos et al. (2014) stellten indes fest, dass klinisch übliche Gentamicin-Konzentrationen die Proliferation und osteogene Differenzierung von MSC nicht beeinflussen, während höhere Konzentrationen das Zellwachstum und die osteogene Aktivität signifikant hemmen. Demgegenüber weist die Studie von Same et al. (2022) auf möglicherweise weniger besorgniserregende Aspekte von Gentamicin hin. Sie berichteten über eine Hochregulierung osteogener Marker-Gene, einschließlich Runx2, in Hydrogelen, die mit Gentamicin angereichert wurden und auf MSC aus menschlichem Zahnmark angewendet wurden, was auf eine potenzielle Förderung der osteoblastischen Differenzierung hindeutet.

Diese Erkenntnisse von Same et al. (2022) korrespondieren teilweise mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, die im Kontrast zu den Befunden von Chang et al. (2006) und Pountos et al. (2014) steht. In der vorliegenden Studie wurden PMMA-basierte Zementimplantate untersucht, die entweder mit AgNP (4000 µg/g) allein oder in Kombination mit Gentamicinsulfat (1,34 % Konzentration) funktionalisiert waren. Es wurde keine signifikante Regulation der Transkriptionsfaktoren Runx2 oder Osterix festgestellt, was darauf hindeuten könnte, dass AgNP in Kombination mit Gentamicin möglicherweise keinen negativen Einfluss auf diese Schlüsseltranskriptionsfaktoren ausübt. Diese Befunde legen nahe, dass die Kombination von Gentamicin und AgNP in einem in-vivo-Umfeld unterschiedliche Effekte auf die Osteogenese haben könnte als in vitro beobachtet. Dies unterstreicht die Bedeutung, das Implantatumfeld und die spezifische Zusammensetzung bei der Bewertung der Effekte von gentamicinfunktionalisierten Implantaten auf die Knochenregeneration zu berücksichtigen.

Die Auswirkungen weiterer Antibiotika auf die Osteogenese, unter Berücksichtigung der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix*, wurden in verschiedenen Studien untersucht. Manzano-Moreno et al. (2023) erforschten den Einfluss von Amoxicillin und Clindamycin auf die Genexpression von Osteoblasten. Dabei wurde festgestellt, dass Clindamycin in einer Konzentration von 150 µg/mL die Expression von Runx2 und Osterix signifikant erhöht, während Amoxicillin selektiv bestimmte Gene beeinflusste. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Clindamycin die osteogene Aktivität fördern und somit als Dekontaminationsmittel für Knochentransplantate geeignet sein könnte. In der Studie von Zollino et al. (2012) wurde der Einfluss des *Bactercline Anatase Coatings* (BAC), einer Beschichtung mit antimikrobiellen Eigenschaften, auf die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten untersucht. Die qRT-PCR-Analyse zeigte, dass BAC die Aktivierung von Osterix und anderen für die Knochenbildung relevanten Genen bewirkte, während eine reduzierte Expression von Runx2 festgestellt wurde. Diese Befunde verdeutlichen das komplexe Wechselspiel zwischen dieser Art von antimikrobiellen Beschichtungen und osteogenetischen Prozessen. Toledano-Osorio et al. (2023) untersuchten die Wirkung von doxycyclin-getränkten Kollagenmembranen auf Osteoblasten und fanden heraus, dass Doxycyclin, ein Breitbandantibiotikum der Tetracyclin-Klasse, die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen steigert, einschließlich einer Überexpression von Runx2 und Osterix. Diese Erkenntnisse unterstreichen das Potenzial von Doxycyclin zur Förderung der Knochenregeneration. Die osteogenetische Wirkung von

Vancomycin und Tobramycin auf MSC wurde in einer Studie von Yu et al. (2020) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kombination dieser Antibiotika weder die Zellviabilität noch die Proliferation der MSC beeinträchtigte. Interessanterweise förderte Tobramycin die osteogene Differenzierung der MSC und konnte sogar die durch Vancomycin gehemmte osteogene Potenz wiederherstellen. Dies wurde durch einen Anstieg der osteogenesebezogenen mRNA-Expression, darunter Kollagen Typ 1, ALP, Runx2 und OCN, besonders in der Tobramycin-Gruppe, verdeutlicht, was auf eine überlegene Rolle von Tobramycin im Vergleich zu Vancomycin hinsichtlich der Unterstützung der Osteogenese hinweist.

In einer weiteren Untersuchung von Xie et al. (2022) zur Masquelet-Technik, ein Verfahren zur Behandlung großer Knochenerlöcher durch die Schaffung einer induzierten Membran um einen temporären Knochenzement-Spacer, wurde der Einfluss unterschiedlicher Vancomycinkonzentrationen in PMMA-Spacern auf die osteogene Kapazität evaluiert. Es stellte sich heraus, dass niedrigere Vancomycinkonzentrationen (1-4 g pro Zementdosis) die proliferative, osteogene und angiogene Kapazität der induzierten Membranen nicht beeinträchtigten und sogar förderten. Im Gegensatz dazu zeigten höhere Konzentrationen (6-10 g pro Zementdosis) negative Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Osteoblasten sowie auf die Angiogenese und Proliferation, was die Notwendigkeit einer sorgfältigen Dosierung von Vancomycin in der Knochenregeneration unterstreicht. Zhang et al. (2017) untersuchten in einem Kaninchenmodell mit *S. aureus*-Knocheninfektion die kombinierte Wirkung von Icarin und Vancomycin. Es wurde festgestellt, dass Icarin in der Lage war, die durch hohe Vancomycin-Konzentrationen verursachte Hemmung der Osteoblastenaktivität zu überwinden und positiv auf die BMP2/Runx2-Signalwege einzuwirken, was auf das Potenzial von Icarin in der postinfektiösen Knochenheilung hinweist.

Diese umfassenden Forschungsergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer ausgewogenen und gezielten Anwendung von Antibiotika in der Beschichtung von Knochenimplantaten, um sowohl Infektionsrisiken zu minimieren als auch die Knochenheilung zu fördern.

4.7 Implantatwahl unter Berücksichtigung der Osteoblastogenese: Schlussfolgerungen zum Einsatz von AgNP

Die vorliegende Dissertation hat sich mit der Bedeutung von AgNP-funktionalisierten Implantaten für die Osteoblastogenese auseinandergesetzt. Trotz der anerkannten antimikrobiellen Vorteile von Silbernanopartikeln legen die Ergebnisse nahe, dass ihr Einsatz in der Knochenheilung und -integration differenziert betrachtet werden muss.

Bei Titanimplantaten zeigt sich, dass eine Beschichtung mit AgNP die frühe Differenzierung von Osteoblasten verzögern kann. Dies impliziert, dass die Anwendung solcher Implantate auf klinische Situationen beschränkt werden sollte, in denen ein hohes Infektionsrisiko besteht und die antimikrobiellen Eigenschaften die potenzielle Verzögerung der Knochenheilung rechtfertigen.

In der untersuchten Anwendung von Kollagenscaffolds zeigte sich, dass die hohe Konzentration von 4000 μg AgNP pro Gramm Kollagen mit höher Freisetzungsrates einen signifikant negativen Effekt auf die Transkriptionsfaktoren der Osteoblastogenese hat. Diese Beobachtung ist besonders bedeutsam, da Kollagen als ein häufig verwendetes Material in der Geweberegeneration gilt. Hierbei muss die Abwägung zwischen antimikrobieller Wirkung und möglicher Beeinträchtigung der Knochenheilung durch eine hohe Freisetzungsrates sorgfältig erfolgen.

Bei PMMA-Scaffolds, die sowohl mit AgNP funktionalisiert als auch zusätzlich mit Gentamicin behandelt waren, konnte keine signifikante Beeinträchtigung der Osteoblastogenese festgestellt werden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass PMMA-Scaffolds mit AgNP-Funktionalisierung und einer zusätzlichen Gentamicinfunktionalisierung potenziell ohne schädliche Auswirkungen auf die Knochenphysiologie verwendet werden könnten. Ein solcher Einsatz könnte insbesondere in der Prophylaxe zur Verhinderung von Infektionen bei Implantaten vorteilhaft sein.

Insgesamt betont diese Arbeit die Notwendigkeit einer individuellen Betrachtung verschiedener Implantatmaterialien und deren Interaktion mit AgNP. Die Entscheidung für oder gegen die Verwendung von AgNP-funktionalisierten Implantaten sollte auf einer gründlichen Abwägung der Vor- und Nachteile basieren, wobei die spezifischen Eigenschaften des Implantatmaterials und die klinische Indikation berücksichtigt werden

müssen. Weiterführende Studien sind erforderlich, um die Langzeitwirkungen von AgNP auf die Knochenregeneration und -integration zu verstehen und um optimierte Funktionalisierungsmethoden zu entwickeln, die sowohl die antimikrobiellen Vorteile maximieren als auch die osteogenen Prozesse unterstützen.

5 Zusammenfassung

Implantatassoziierte Infektionen stellen ein signifikantes Problem in der Traumatologie und Orthopädie dar. Der Einsatz von AgNP zur Funktionalisierung von Implantaten hat sich als innovative Methode mit effektiver antimikrobieller Wirkung erwiesen. Die Auswirkungen von AgNP auf die Osteoblastogenese sind jedoch noch unzureichend erforscht. In dieser Dissertation wurde der Einfluss von AgNP-haltigen Implantaten auf die frühe Phase der Osteoblastogenese und deren Schlüsseltranskriptionsfaktoren, *Runx2* und *Osterix*, untersucht.

In der Studie wurden AgNP-funktionalisierte Scaffolds aus PMMA, Titan und Kollagen Typ I sowie Kontrollgruppen mit AgNP-freien Implantaten (n = 72) in die Tibiae von Sprague-Dawley Ratten implantiert. Nach einer Standzeit von 4 Wochen und 6 Monaten wurden die Tibiaquerschnitte präpariert und immunhistochemische Untersuchung für *Runx2* und *Osterix* durchgeführt. Die histomorphometrische Auswertung umfasste die Quantifizierung der *Runx2*- und *Osterix*-positiven Präosteoblasten und Osteoblasten in Relation zur Trabekelfläche und dem Trabekelumfang.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion der *Runx2*-positiven Präosteoblasten an den mit AgNP beschichteten Titanimplantaten nach 6 Monaten im Vergleich zu den Ergebnissen nach 4 Wochen. Eine Zunahme von *Runx2*-positiven Osteoblasten an diesen Implantaten wurde nicht beobachtet. Bei den AgNP-funktionalisierten Kollagenscaffolds wurde ebenfalls eine Reduktion der *Runx2*-positiven Präosteoblasten und Osteoblasten festgestellt. Diese Ergebnisse wurden durch die *Osterix*-Immunhistochemie bestätigt, während keine Regulation von *Osterix* an den Titanimplantaten und keine Regulation von *Runx2* oder *Osterix* bei den PMMA-Implantaten beobachtet wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass AgNP-beschichtete Titanimplantate die Osteoblastendifferenzierung verzögern können, was ihren Einsatz auf hochinfektiöse Fälle limitiert. Bei Kollagenscaffolds mit hoher AgNP-Freisetzungsrate wurden negative Auswirkungen auf die Osteoblastogenese beobachtet, was eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Abwägung erfordert. Im Kontrast dazu zeigen AgNP-funktionalisierte PMMA-Scaffolds mit und ohne Gentamycin keine signifikante Beeinträchtigung der Osteoblastogenese, was ihren Einsatz in der Knochenheilung und Infektionsprävention bei Implantaten vielversprechend erscheinen lässt.

6 Summary

Implant associated infections present a significant challenge in trauma and orthopedic surgery. The use of AgNP for implant functionalization has proven to be an innovative method with effective antimicrobial properties. However, the impact of AgNP on osteoblastogenesis remains insufficiently explored. This dissertation investigates the influence of AgNP-containing implants on the early phase of osteoblastogenesis and its key transcription factors, *Runx2* and *Osterix*.

In the study, AgNP-functionalized scaffolds made of PMMA, titanium, and type I collagen, as well as control groups with AgNP-free implants ($n = 72$), were implanted into the tibiae of Sprague-Dawley rats. After a period of 4 weeks and 6 months, tibial cross-sections were prepared, and immunohistochemical analyses for Runx2 and Osterix were conducted. The histomorphometric evaluation included the quantification of Runx2 and Osterix -positive preosteoblasts and osteoblasts in relation to the trabecular area and perimeter.

The results showed a significant reduction in Runx2-positive preosteoblasts in AgNP-coated titanium implants after 6 months compared to the 4-week results. An increase in Runx2-positive osteoblasts in these implants was not observed. In AgNP-functionalized collagen scaffolds, a reduction in Runx2-positive preosteoblasts and osteoblasts was noted. These findings were confirmed by Osterix immunohistochemistry, while no regulation of Osterix was observed in the titanium implants, and no regulation of Runx2 or Osterix was detected in the PMMA implants. The study's findings suggest that AgNP-coated titanium implants may have a negative effect on osteoblast differentiation, limiting their use to cases with high infection risk. In collagen scaffolds with high AgNP release rates, negative impacts on osteoblastogenesis were observed, necessitating careful benefit-risk assessment. In contrast, AgNP-functionalized PMMA scaffolds, with and without gentamicin, showed no significant impairment in osteoblastogenesis, making their use in bone healing and infection prevention in implants promising.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Silber
AgNP	Silbernanopartikel
ALP	Alkalische Phosphatase
ATF4	Activating transcription factor 4
Aqua dest.	Destilliertem Wasser
B. subtilis	Bacillus subtilis
BAC	Bactercline Anatase Coatings
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMUs	Basic Multicellular Units
BRC	Bone Remodeling Compartment
BSA	Bovine Serum Albumin
C. albicans	Candida albicans
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBFA1	Core-binding factor subunit alpha-1
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer
DAIR	Débridement, Antibiotikatherapie und Implantatretention
E. coli	Escherichia coli
EBJIS	European Bone & Joint Infection Society
E-FORT	European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology
EPD	Elektrophoretischer Abscheidung
ESCMID	European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ETS	Erythroblast Transformation Specific
FGF	Fibroblast growth factor
FRI	Fracture related infection
Hh	Hedgehog
HPDLFs	Humanen periodontalen Ligamentfibroblasten
HPF	High power field
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzellen

IGF	Insulin-like growth factors
Mef2	Myocyte enhancer factor-2
Micro-CT	Mikro-Computertomographie
MRSA	Methicillin-resistente Staphylococcus aureus
MRSE	Methicillin-resistente Staphylococcus epidermidis
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
NLS	Nuclear Localization Signal
NMTS	Nuclear Matrix Targeting Signal
OCN	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PCP	Planar Cell Polarity
PKA	Protein-Kinase-A
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMN	Polymorphonuclear cells
PST	Prolin/Serin/Threonin-reiche Domäne
PTH	Parathyroid hormone
PTHrP	PTH-related protein
QA	Glutamin/Alanin-reiche Domäne
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RANKL	Receptor Activator of NF-kB Ligand
RD	Repressionsdomäne
RHD	Runt-Homologie-Domäne
ROI	Region of Interest
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
Runx2	Runt-related transcription factor 2
S. aureus	Staphylococcus aureus
TCF/LEF	T-Zell-Faktor/Lymphoid-Enhancer-Faktor
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
VP	Verdünnungspuffer
Wnt	Wingless-related integration site
WP	Waschpuffer
Zn	Zink

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fünfstufiger Prozess der Biofilm-Entwicklung	4
Abbildung 2: Mechanismus der antimikrobiel Aktivität von AgNP.....	12
Abbildung 3: Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten	18
Abbildung 4: Darstellung der implantierten Rattentibia	26
Abbildung 5: Avidin-Biotin-Komplex	30
Abbildung 6: Einstellen des Maßstabes	41
Abbildung 7: Bestimmung der ROI	42
Abbildung 8: Begrenzung der Trabekel innerhalb der ROI.....	43
Abbildung 9: Darstellung von Runx2 nach 4 Wochen und 6 Monaten.	44
Abbildung 10: Darstellung von Osterix nach 4 Wochen und 6 Monaten.	44
Abbildung 11: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Runx2-positiven Zellen in Relation zur Trabekelfläche	47
Abbildung 12: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Zellen bezogen auf die Trabekelfläche bei den Kollegenimplantaten.....	48
Abbildung 13: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Runx2-positiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang	48
Abbildung 14: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Zellen bezogen auf den Trabekelumfang bei den Kollegenimplantaten	49
Abbildung 15: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten in Relation zur Trabekelfläche.	50
Abbildung 16: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Titanimplantaten.....	51
Abbildung 17: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Kollegenimplantaten.....	51
Abbildung 18: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang	52
Abbildung 19: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang bei den Titanimplantaten.....	53
Abbildung 20: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang bei den Kollegenimplantaten	54

Abbildung 21: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelfläche	55
Abbildung 22: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Titanimplantaten.....	56
Abbildung 23: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten bezogen auf die Trabekelfläche bei den Kollagenimplantaten	56
Abbildung 24: Analyse der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang	57
Abbildung 25: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang bei den Titanimplantaten	58
Abbildung 26: Vergleich der relativen Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten bezogen auf den Trabekelumfang bei den Kollagenimplantaten	59
Abbildung 27: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Osterix-positiven Zellen in Relation zur Trabekelfläche	60
Abbildung 28: Vergleich der relativen Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Bezug auf die Trabekelfläche bei den Kollagenimplantaten.	61
Abbildung 29: Analyse der relativen Gesamtanzahl der Osterix-positiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang	62
Abbildung 30: Vergleich der relativen Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Bezug auf den Trabekelumfang bei den Kollagenimplantaten.	62
Abbildung 31: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Relation zur Trabekelfläche	63
Abbildung 32: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche bei den Kollagenimplantaten	64
Abbildung 33: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang	65
Abbildung 34: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang bei den Kollagenimplantaten	65
Abbildung 35: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Relation zur Trabekelfläche	66
Abbildung 36: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Bezug auf die Trabekelfläche bei den Kollagenimplantaten	67
Abbildung 37: Analyse der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang	68

Abbildung 38: Vergleich der relativen Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Bezug auf den Trabekelumfang bei den Kollagenimplantaten.69

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnostischer Kriterien der FRI Consensus Group.....	6
Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Versuchstiere mit den verschiedenen Implantaten....	26
Tabelle 3: Die primären Antikörper	33
Tabelle 4: Färbeprotokoll Runx2	36
Tabelle 5: Färbeprotokoll Osterix	39
Tabelle 6: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Runx2-positiven Zellen in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen.....	47
Tabelle 7: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Runx2-positiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen.....	49
Tabelle 8: Durchschnittliche Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen	52
Tabelle 9: Durchschnittliche Anzahl der Runx2-positiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen.....	54
Tabelle 10: Durchschnittliche Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen.....	57
Tabelle 11: Durchschnittliche Anzahl der Runx2-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen.....	59
Tabelle 12: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen.....	61
Tabelle 13: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Osterix-positiven Zellen in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen.....	63
Tabelle 14: Durchschnittliche Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen	64
Tabelle 15: Durchschnittliche Anzahl der Osterix-positiven Osteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen.....	66
Tabelle 16: Durchschnittliche Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Relation zur Trabekeloberfläche in den verschiedenen Gruppen.....	67
Tabelle 17: Durchschnittliche Anzahl der Osterix-positiven Präosteoblasten in Relation zum Trabekelumfang in den verschiedenen Gruppen.....	69

10 Literaturverzeichnis

- Achermann, Y., Eigenmann, K., Ledergerber, B., Derksen, L., Rafeiner, P., Clauss, M., Nüesch, R., Zellweger, C., Vogt, M., & Zimmerli, W. (2013). Factors associated with rifampin resistance in staphylococcal periprosthetic joint infections (PJI): a matched case-control study. *Infection*, *41*(2), 431–437. <https://doi.org/10.1007/S15010-012-0325-7>
- Agerbaek, M. O., Eriksen, E. F., Kragstrup, J., Mosekilde, L., & Melsen, F. (1991). A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone and Mineral*, *12*(2), 101–112. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(91\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0169-6009(91)90039-3)
- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., & Hong, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *233*(3), 404–410. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.015>
- Alt, V. (2017). Antimicrobial coated implants in trauma and orthopaedics—A clinical review and risk-benefit analysis. *Injury*, *48*(3), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2016.12.011>
- Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Domann, E., & Schnettler, R. (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, *25*(18), 4383–4391. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.078>
- Arce, L., Yokoyama, N. N., & Waterman, M. L. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene 2006 25:57*, *25*(57), 7492–7504. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210056>
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., & Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, *33*(26), 5967–5982. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.031>
- Artigas, N., Ureña, C., Rodríguez-Carballo, E., Rosa, J. L., & Ventura, F. (2014). Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-regulated interactions between osterix and

- runx2 are critical for the transcriptional osteogenic program. *Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 27105–27117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576793>
- Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spänel-Borowski, K., Wennemuth, G., Wolff, W., Wurzinger, L. J., & Zilch, H.-G. (2020). *Duale Reihe Anatomie*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-007-170976>
- Baecker, H., Frieler, S., Schildhauer, T.A. J. Gessmann & Y. Hanusrichter. (2020). Implantatassoziierte Infektionen in der Traumatologie. *Orthopäde* 49, 702–709. <https://doi.org/10.1007/s00132-020-03948-y>
- Bakare, R., Hawthorne, S., Vails, C., Gugssa, A., Karim, A., Stubbs, J., & Raghavan, D. (2016). Antimicrobial and cell viability measurement of bovine serum albumin capped silver nanoparticles (Ag/BSA) loaded collagen immobilized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) film. *Journal of Colloid and Interface Science*, 465, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.041>
- Bakhsheshi-Rad, H. R., Hamzah, E., Low, H. T., Kasiri-Asgarani, M., Farahany, S., Akbari, E., & Cho, M. H. (2017). Fabrication of biodegradable Zn-Al-Mg alloy: Mechanical properties, corrosion behavior, cytotoxicity and antibacterial activities. *Materials Science and Engineering: C*, 73, 215–219. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.11.138>
- Baron, R., Rawadi, G., & Roman-Roman, S. (2006). Wnt Signaling: A key regulator of bone mass. *Current Topics in Developmental Biology*, 76, 103–127. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)76004-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)76004-5)
- Bellido, T. (2014). Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified Tissue International*, 94(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/S00223-013-9774-Y>
- Bergman, R. J., Gazit, D., Kahn, A. J., Gruber, H., Mcdougall, S., & Hahn, T. J. (1996). Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 11(5), 568–577. <https://doi.org/10.1002/JBMR.5650110504>
- Bilezikian, J. P., Raisz, L. G. Lawrence G., & Rodan, G. A. (2002). *Principles of bone biology*. 1696.

- Bonde, S. R., Rathod, D. P., Ingle, A. P., Ade, R. B., Gade, A. K., & Rai, M. K. (2012). *Murraya koenigii* -mediated synthesis of silver nanoparticles and its activity against three human pathogenic bacteria. *Nanoscience Methods*, *1*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1080/17458080.2010.529172>
- Bongartz, T., Halligan, C. S., Osmon, D. R., Reinalda, M. S., Bamlet, W. R., Crowson, C. S., Hanssen, A. D., & Matteson, E. L. (2008). Incidence and risk factors of prosthetic joint infection after total hip or knee replacement in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, *59*(12), 1713–1720. <https://doi.org/10.1002/ART.24060>
- Boxma, H., Broekhuizen, T., Patka, P., & Oosting, H. (1996). Randomised controlled trial of single-dose antibiotic prophylaxis in surgical treatment of closed fractures: the Dutch Trauma Trial. *Lancet (London, England)*, *347*(9009), 1133–1137. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)90606-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)90606-6)
- Bratthauer, G. L. (2010). The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *588*, 257–270. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_26
- Buck, D. W., & Dumanian, G. A. (2012). Bone Biology and Physiology. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *129*(6), 1314–1320. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824eca94>
- Canalis, E. (1993). Insulin like growth factors and the local regulation of bone formation. *Bone*, *14*(3), 273–276. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(93\)90151-Y](https://doi.org/10.1016/8756-3282(93)90151-Y)
- Cao, H., Liu, X., Meng, F., & Chu, P. K. (2011). Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials*, *32*(3), 693–705. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.09.066>
- Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., Payne, W. G., Smith, D. J., & Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*, *4*(2), 114–122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x>
- Chakkalakal, D. A., Strates, B. S., Mashoof, A. A., Garvin, K. L., Novak, J. R., Fritz, E. D., Mollner, T. J., & McGuire, M. H. (1999). Repair of segmental bone defects in

- the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone*, 25(3), 321–332.
[https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00167-2)
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739–2749.
<https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2007-0197>
- Chang, Y., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (2006). Toxic effects of gentamicin on marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 452, 242–249. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000229324.75911.c7>
- Chau, J. F. L., Leong, W. F., & Li, B. (2009). Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histology and Histopathology*, 24(12), 1593–1606. <https://doi.org/10.14670/HH-24.1593>
- Chen, A., Haddad, F., Lachiewicz, P., Bolognesi, M., Cortes, L. E., Franceschini, M., Gallo, J., Glynn, A., Gonzalez Della Valle, A., Gahramanov, A., Khatod, M., Lazarinis, S., Lob, G., Nana, A., Ochsner, P., Tuncay, I., Winkler, T., & Zeng, Y. R. (2014). Prevention of late PJI. *The Journal of Arthroplasty*, 29(2 Suppl), 119–128. <https://doi.org/10.1016/J.ARTH.2013.09.051>
- Chen, G., Deng, C., & Li, Y. P. (2012). TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 272–288. <https://doi.org/10.7150/IJBS.2929>
- Chen, M., Yang, L., Zhang, L., Han, Y., Lu, Z., Qin, G., & Zhang, E. (2017). Effect of nano/micro-Ag compound particles on the bio-corrosion, antibacterial properties and cell biocompatibility of Ti-Ag alloys. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 906–917. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.02.142>
- Chen, M., Zhang, E., & Zhang, L. (2016). Microstructure, mechanical properties, bio-corrosion properties and antibacterial properties of Ti–Ag sintered alloys. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 350–360.
<https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.01.081>
- Chen, P., Wu, Z., Leung, A., Chen, X., Landao-Bassonga, E., Gao, J., Chen, L., Zheng, M., Yao, F., Yang, H., Lidgren, L., Allan, B., Liu, Y., Wang, T., & Zheng, M. (2018). Fabrication of a silver nanoparticle-coated collagen membrane with anti-bacterial

- and anti-inflammatory activities for guided bone regeneration. *Biomedical Materials*, 13(6), 065014. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aae15b>
- Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2007.10.004>
- Chernousova, S., & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636–1653. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201205923>
- Chi, V., & Chandy, K. G. (2007). Immunohistochemistry: paraffin sections using the Vectastain ABC kit from vector labs. *Journal of Visualized Experiments*, 8. <https://doi.org/10.3791/308>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3 Suppl: S131. <https://doi:10.2215/CJN.04151206>
- Classen, D. C., Evans, R. S., Pestotnik, S. L., Horn, S. D., Menlove, R. L., & Burke, J. P. (1992). The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgical-wound infection. *The New England Journal of Medicine*, 326(5), 281–286. <https://doi.org/10.1056/NEJM199201303260501>
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469–480. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.10.018>
- Cobo, J., & del Pozo, J. L. (2011). Prosthetic joint infection: diagnosis and management. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(9), 787–802. <https://doi.org/10.1586/eri.11.95>
- Cohen, M. S., Stern, J. M., Vanni, A. J., Kelley, R. S., Baumgart, E., Field, D., Libertino, J. A., & Summerhayes, I. C. (2007). In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surgical Infections*, 8(3), 397–404. <https://doi.org/10.1089/sur.2006.032>
- Compston, J. (2004). Bone histomorphometry-the renaissance? *Bonekey-Osteovision*, 1(5), 9–12. <https://doi.org/10.1138/20040129>
- Corvec, S., Portillo, M. E., Pasticci, B. M., Borens, O., & Trampuz, A. (2012). Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *The*

International Journal of Artificial Organs, 35(10), 923–934.

<https://doi.org/10.5301/ijao.5000168>

Croes, M., Bakhshandeh, S., van Hengel, I. A. J., Lietaert, K., van Kessel, K. P. M., Pouran, B., van der Wal, B. C. H., Vogely, H. C., Van Hecke, W., Fluit, A. C., Boel, C. H. E., Alblas, J., Zadpoor, A. A., Weinans, H., & Amin Yavari, S. (2018). Anti-bacterial and immunogenic behavior of silver coatings on additively manufactured porous titanium. *Acta Biomaterialia*, 81, 315–327.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.051>

Crowe, B., Payne, A., Evangelista, P. J., Stachel, A., Phillips, M. S., Slover, J. D., Inneh, I. A., Iorio, R., & Bosco, J. A. (2015). Risk factors for infection following total knee arthroplasty: A Series of 3836 Cases from One Institution. *The Journal of Arthroplasty*, 30(12), 2275–2278. <https://doi.org/10.1016/J.ARTH.2015.06.058>

Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1831. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01831/BIBTEX>

Datta, N. S., & Abou-Samra, A. B. (2009). PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cellular Signalling*, 21(8), 1245. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2009.02.012>

Dayer, R., Rizzoli, R., Kaelin, A., & Ammann, P. (2006). Low protein intake is associated with impaired titanium implant osseointegration. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(2), 258–264. <https://doi.org/10.1359/JBMR.051009>

Denayer, T., Stöhrn, T., & Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, 2(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/J.NHTM.2014.08.001>

Depypere, M., Kuehl, R., Metsemakers, W. J., Senneville, E., McNally, M. A., Obrebsky, W. T., Zimmerli, W., Atkins, B. L., & Trampuz, A. (2020). Recommendations for systemic antimicrobial therapy in fracture-related infection: A Consensus from an international expert group. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 34(1), 30. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001626>

Depypere, M., Morgenstern, M., Kuehl, R., Senneville, E., Moriarty, T. F., Obrebsky, W. T., Zimmerli, W., Trampuz, A., Lagrou, K., & Metsemakers, W. J. (2020). Pathogenesis and management of fracture-related infection. *Clinical Microbiology and*

Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 26(5), 572–578.

<https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.08.006>

Dowsey, M. M., & Choong, P. F. M. (2009). Obese diabetic patients are at substantial risk for deep infection after primary TKA. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 467(6), 1577–1581. <https://doi.org/10.1007/S11999-008-0551-6>

Dumville, J. C., Gray, T. A., Walter, C. J., Sharp, C. A., Page, T., Macefield, R., Blencowe, N., Milne, T. K. G., Reeves, B. C., & Blazeby, J. (2016). Dressings for the prevention of surgical site infection. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003091.PUB4>

Ebrahiminezhad, A., Raee, M. J., Manafi, Z., Sotoodeh Jahromi, A., & Ghasemi, Y. (2016). Ancient and novel forms of silver in medicine and biomedicine. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies*, 2(1), 122.

<https://doi.org/10.18869/nrip.jamsat.2.1.122>

Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T., & Komori, T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8695–8702.

<https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8695>

Eriksen E. F. (1986). Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three-dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev.* 1986 Nov;7(4):379-408. doi: 10.1210/edrv-7-4-379

Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 11(4), 219–227. <https://doi.org/10.1007/S11154-010-9153-1>

Eriksen, E. F., Gundersen, H. J. G., Melsen, F., & Mosekilde, L. (1984). Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 5(5), 243–252. [https://doi.org/10.1016/0221-8747\(84\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0221-8747(84)90066-3)

Eriksen, E. F., Melsen, F., & Mosekilde, L. (1984). Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: A kinetic model for bone resorption in 20 normal

- individuals. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 5(5), 235–242.
[https://doi.org/10.1016/0221-8747\(84\)90065-1](https://doi.org/10.1016/0221-8747(84)90065-1)
- Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Gitelman, S. E., & Derynck, R. (1995). Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, 80(3), 371–378.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90487-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90487-5)
- Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., & Alborés, S. (2020). Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. *Molecules*, 25(9), 2023.
<https://doi.org/10.3390/molecules25092023>
- Felber, K., Elks, P. M., Lecca, M., & Roehl, H. H. (2015). Expression of osterix is regulated by FGF and Wnt/ β -Catenin signalling during osteoblast differentiation. *Plos One*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0144982>
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668.
[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3)
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Forbes, S. S., Eskicioglu, C., Nathens, A. B., Fenech, D. S., Laflamme, C., McLean, R. F., & McLeod, R. S. (2009). Evidence-based guidelines for prevention of perioperative hypothermia. *Journal of the American College of Surgeons*, 209(4).
<https://doi.org/10.1016/J.JAMCOLLSURG.2009.07.002>
- Fujiwara, M., Tagashira, S., Harada, H., Ogawa, S., Katsumata, T., Nakatsuka, M., Komori, T., & Takada, H. (1999). Isolation and characterization of the distal promoter region of mouse *Cbfa1*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1446(3), 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(99\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00113-X)
- Gao, B. (2012). Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Current Topics in Developmental Biology*, 101, 263–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394592-1.00008-9>

- Geffers, C., Gastmeier, P., Daschner, F., & Rüden, H. (2001). Prävention postoperativer Wundinfektionen. "Evidence-based"-Empfehlungen. *Zentralblatt Für Chirurgie*, *126*(2), 84–92. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12415>
- Golden, S. H., Peart-Vigilance, C., Kao, W. H. L., & Brancati, F. L. (1999). Perioperative glycemic control and the risk of infectious complications in a cohort of adults with diabetes. *Diabetes Care*, *22*(9), 1408–1414. <https://doi.org/10.2337/DIA-CARE.22.9.1408>
- Gortler, H., Rusyn, J., Godbout, C., Chahal, J., Schemitsch, E. H., & Nauth, A. (2018). Diabetes and healing outcomes in lower extremity fractures: A systematic review. *Injury*, *49*(2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.11.006>
- Grabowski, P. (2015). Physiology of bone. *Endocrine Development*, *28*, 33–55. <https://doi.org/10.1159/000380991>
- Grammatopoulos, G., Bolduc, M. E., Atkins, B. L., Kendrick, B. J. L., McLardy-Smith, P., Murray, D. W., Gundle, R., & Taylor, A. H. (2017). Functional outcome of debridement, antibiotics and implant retention in periprosthetic joint infection involving the hip: a case-control study. *The Bone & Joint Journal*, *99-B*(5), 614–622. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.99B5.BJJ-2016-0562.R2>
- Grandi, S., Cassinelli, V., Bini, M., Saino, E., Mustarelli, P., Arciola, C. R., Imbriani, M., & Visai, L. (2011). Bone reconstruction: Au nanocomposite bioglasses with antibacterial properties. *The International Journal of Artificial Organs*, *34*(9), 920–928. <https://doi.org/10.5301/IJAO.5000059>
- Greene, L. R. (2012). Guide to the elimination of orthopedic surgery surgical site infections: an executive summary of the association for professionals in infection control and epidemiology elimination guide. *American Journal of Infection Control*, *40*(4), 384–386. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2011.05.011>
- Grey, A., Chen, Q., Xin, X., Callon, K., & Cornish, J. (2003). Parallel phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways subserve the mitogenic and antiapoptotic actions of insulin-like growth factor I in osteoblastic cells. *Endocrinology*, *144*(11), 4886–4893. <https://doi.org/10.1210/EN.2003-0350>

- Gundtoft P. H., Pedersen A. B., Varnum C., Overgaard S. (2017). Increased mortality after prosthetic joint infection in primary THA. *Clin Orthop Relat Res.* 2017 Nov;475(11):2623-2631. doi: 10.1007/s11999-017-5289-6
- Gustilo, R. B. (1979). Use of antimicrobials in the management of open fractures. *Archives of Surgery*, 114(7), 805–808.
<https://doi.org/10.1001/archsurg.1979.01370310047010>
- Hadjidakis et Androulakis. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1), 385–396. <https://doi.org/10.1196/annals.1365.035>
- Harrison, T., Robinson, P., Cook, A., & Parker, M. J. (2012). Factors affecting the incidence of deep wound infection after hip fracture surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 94(2), 237–240. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.94B1.27683>
- Hauge, E. M., Qvesel, D., Eriksen, E. F., Mosekilde, L., & Melsen, F. (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(9), 1575–1582.
<https://doi.org/10.1359/JBMR.2001.16.9.1575>
- He, T., Cao, C., Xu, Z., Li, G., Cao, H., Liu, X., Zhang, C., & Dong, Y. (2017). A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model. *Scientific Reports*, 7(1), 16270.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16465-4>
- Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD. (2011). Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011 Oct;49(4):591-9. doi: 10.1016/j.bone.2011.07.007
- Hojo, H., Ohba, S., & Chung, U. II. (2015). Signaling pathways regulating the specification and differentiation of the osteoblast lineage. *Regenerative Therapy*, 1, 57–62.
<https://doi.org/10.1016/J.RETH.2014.10.002>
- Hong, L., Zhang, G., Sultana, H., Yu, Y., & Wei, Z. (2011). The effects of 17- β estradiol on enhancing proliferation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in

- vitro. *Stem Cells and Development*, 20(5), 925–931.
<https://doi.org/10.1089/SCD.2010.0125>
- Hunziker, E. B., & Schenk, R. K. (1989). Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *The Journal of Physiology*, 414(1), 55–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017676>
- Idleburg, C., Lorenz, M. R., DeLassus, E. N., Scheller, E. L., & Veis, D. J. (2021). Immunostaining of skeletal tissues. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2221, 261–273. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0989-7_15
- Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T., Endo, N., Kitamura, Y., Kishimoto, T., & Komori, T. (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Developmental Dynamics*, 214(4), 279–290.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199904\)214:4<279::AI-DAJA1>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214:4<279::AI-DAJA1>3.0.CO;2-W)
- Izakovicova, P., Borens, O., & Trampuz, A. (2019). Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Reviews*, 4(7), 482–494.
<https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180092>
- Jansen, K. U., Girgenti, D. Q., Scully, I. L., & Anderson, A. S. (2013). Vaccine review: “Staphylococcus aureus vaccines: problems and prospects.” *Vaccine*, 31(25), 2723–2730. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2013.04.002>
- Jin, E.-S., Kim, J. Y., Lee, B., Min, J., Jeon, S. R., Choi, K. H., & Jeong, J. H. (2018). Biodegradable screws containing bone morphogenetic protein-2 in an osteoporotic rat model. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 61(5), 559–567.
<https://doi.org/10.3340/jkns.2017.0297>
- Johnson, M. L., & Rajamannan, N. (2006). Diseases of Wnt signaling. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 7(1–2), 41–49. <https://doi.org/10.1007/S11154-006-9003-3>
- Joung, Y.-H. (2013). INJ development of implantable medical devices: From an engineering perspective. *International Neurology Journal*.
<https://doi.org/10.5213/inj.2013.17.3.98>

- Journal, A. I., Karahaliloglu, Z., Kilicay, E., Denkbaz, B., & Denkbaz, E. B. (2016). Antibacterial chitosan/silk sericin 3D porous scaffolds as a wound dressing material. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *45*(6), 1172–1185.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1203796>
- Kaback, L. A., Soung, D. Y., Naik, A., Smith, N., Schwarz, E. M., O’Keefe, R. J., & Drissi, H. (2008). Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *Journal of Cellular Physiology*, *214*(1), 173–182.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21176>
- Kamath, A. F., Ong, K. L., Lau, E., Chan, V., Vail, T. P., Rubash, H. E., Berry, D. J., & Bozic, K. J. (2015). Quantifying the burden of revision total joint arthroplasty for periprosthetic infection. *The Journal of Arthroplasty*, *30*(9), 1492–1497.
<https://doi.org/10.1016/j.arth.2015.03.035>
- Kang, S.-J., Kim, D.-H., Mishig-Ochir, T., & Lee, B.-J. (2012). Antimicrobial peptides: Their physicochemical properties and therapeutic application. *Archives of Pharmaceutical Research*, *35*(3), 409–413. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0302-9>
- Karczewski D, Winkler T, Perka C, Müller M. (2018). The preoperative microbial detection is no prerequisite for the indication of septic revision in cases of suspected periprosthetic Joint Infection. *Biomed Res Int.*, *21*;2018:1729605. doi: 10.1155/2018/1729605. PMID: 30035117; PMCID: PMC6032972.
- Kellesarian, S. V., Malignaggi, V. R., Kellesarian, T. V., Bashir Ahmed, H., & Javed, F. (2018). Does incorporating collagen and chondroitin sulfate matrix in implant surfaces enhance osseointegration? A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *47*(2), 241–251.
<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.10.010>
- Kember NF. (1973). Aspects of the maturation process in growth cartilage in the rat tibia. *Clin Orthop Relat Res.* 1973 Sep;(95):288-94. PMID: 4754213
- Khatod, M., Botte, M. J., Hoyt, D. B., Meyer, R. S., Smith, J. M., & Akeson, W. H. (2003). Outcomes in open tibia fractures: relationship between delay in treatment and infection. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, *55*(5), 949–954. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000092685.80435.63>

- Kim, K.-J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S.-K., Choi, J.-S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on *Candida albicans*. *BioMetals*, *22*(2), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9159-2>
- Kim, T.-H., Kim, M., Park, H.-S., Shin, U. S., Gong, M.-S., & Kim, H.-W. (2012). Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *100A* (4), 1033–1043. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34053>
- Kimmel, D. B., & Wronski, T. J. (1990). Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcified Tissue International*, *46*(2), 101–110. <https://doi.org/10.1007/BF02556093>
- Klein, E. Y., van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(15), E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
- Kobayashi, Y., Maeda, K., & Takahashi, N. (2008). Roles of Wnt signaling in bone formation and resorption. *Japanese Dental Science Review*, *44*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.JDSR.2007.11.002>
- Komori, T. (2017). Roles of runx2 in skeletal development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *962*, 83–93. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2_6
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, *89*(5), 755–764. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80258-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80258-5)
- Kortram, K., Bezstarosti, H., Metsemakers, W.-J., Raschke, M. J., Van Lieshout, E. M. M., & Verhofstad, M. H. J. (2017). Risk factors for infectious complications after open fractures; a systematic review and meta-analysis. *International Orthopaedics (SICOT)* *41*, 1965–1982. <https://doi.org/10.1007/s00264-017-3556-5>
- Krassnig, R., Hohenberger, G., Schwarz, A., Goessler, W., Feierl, G., Wildburger, R., & Windhager, R. (2021). In vitro testing of silver-containing spacer in periprosthetic

- infection management. *Scientific Reports*, 11(1), 17261.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-96811-9>
- Krishnan, R., MacNeil, S. D., & Malvankar-Mehta, M. S. (2016). Comparing sutures versus staples for skin closure after orthopaedic surgery: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 6(1). <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2015-009257>
- Krishnan, V., Moore, T. L., Ma, Y. L., Helvering, L. M., Frolik, C. A., Valasek, K. M., Ducey, P., & Geiser, A. G. (2003). Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Molecular Endocrinology*, 17(3), 423–435. <https://doi.org/10.1210/ME.2002-0225>
- Kuehl, R., Tschudin-Sutter, S., Morgenstern, M., Dangel, M., Egli, A., Nowakowski, A., Suhm, N., Theilacker, C., & Widmer, A. F. (2019). Time-dependent differences in management and microbiology of orthopaedic internal fixation-associated infections: an observational prospective study with 229 patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2018.03.040>
- Kuiper, J. W. P., Willink, R. T., Moojen, D. J. F., van den Bekerom, M. P. J., & Colen, S. (2014). Treatment of acute periprosthetic infections with prosthesis retention: Review of current concepts. *World Journal of Orthopedics*, 5(5), 667–676.
<https://doi.org/10.5312/WJO.V5.I5.667>
- Kulak, C. A. M., Moreira Kulak, C. A., & Dempster, D. W. (2010). Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010 Mar;54(2):87-98. doi: 10.1590/s0004-27302010000200002
- Kurtz, S. M., Ong, K. L., Lau, E., Bozic, K. J., Berry, D., & Parvizi, J. (2010). Prosthetic joint infection risk after TKA in the medicare population. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 468(1), 52–56. <https://doi.org/10.1007/s11999-009-1013-5>
- Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., & Halpern, M. (2007). Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 89(4), 780–785. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00222>
- Lafzi, A., Esmail Nejad, A., Rezai Rad, M., Namdari, M., & Sabetmoghaddam, T. (2023). In vitro release of silver ions and expression of osteogenic genes by MC3T3-E1 cell line cultured on nano-hydroxyapatite and silver/strontium-coated titanium plates. *Odontology*, 111(1), 33–40. <https://doi.org/10.1007/S10266-022-00747-Z>

- Lansdown, A. B. (2002). Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wound Care*, 11(4), 125–130.
<https://doi.org/10.12968/JOWC.2002.11.4.26389>
- Lansdown, A. B. G. (2010). A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/910686>
- Lapunzina, P., Aglan, M., Temtamy, S., Caparrós-Martín, J. A., Valencia, M., Letón, R., Martínez-Glez, V., Elhossini, R., Amr, K., Vilaboa, N., & Ruiz-Perez, V. L. (2010). Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *The American Journal of Human Genetics*, 87(1), 110–114.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.016>
- Lasa, I. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology*. Mar;9(1):21-8. PMID: 16636986.
- Lee, D. S., Choung, H. W., Kim, H. J., Gronostajski, R. M., Yang, Y. Il, Ryoo, H. M., Lee, Z. H., Kim, H. H., Cho, E. S., & Park, J. C. (2014). NFI-C regulates osteoblast differentiation via control of osterix expression. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(9), 2467–2479. <https://doi.org/10.1002/STEM.1733>
- Lee, K.-S., Kim, H.-J., Li, Q.-L., Chi, X.-Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J. M., Kim, E.-G., Choi, J.-Y., Ryoo, H.-M., & Bae, S.-C. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Molecular and Cellular Biology*, 20(23), 8783–8792. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.23.8783-8792.2000>
- Lee, M. H., Kwon, T. G., Park, H. S., Wozney, J. M., & Ryoo, H. M. (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(3), 689–694.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.058>
- Li, C., Renz, N., & Trampuz, A. (2018). Management of periprosthetic joint infection. *Hip & Pelvis*, 30(3), 138. <https://doi.org/10.5371/HP.2018.30.3.138>
- Li, J., Stachowski, M., & Zhang, Z. (2015). Application of responsive polymers in implantable medical devices and biosensors. *Switchable and Responsive Surfaces and*

Materials for Biomedical Applications, 259–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-713-2.00011-0>

Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ou-Yang, Y. S., & Chen, Y. Ben. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1115–1122. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-2159-5>

Liang, Y., Fang, Y., Tu, C., Yao, X., & Yang, T. (2014). Analyzing risk factors for surgical site infection following Pilon fracture surgery. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 27(8), 650–653.

Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., Cheng, Z., Dai, G., Wu, G., Wang, L., & Chen, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 1469–1487. <https://doi.org/10.2147/IJN.S191340>

Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P. K.-H., Chiu, J.-F., & Che, C.-M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>

Lu, C., Miclau, T., Hu, D., Hansen, E., Tsui, K., Puttlitz, C., & Marcucio, R. S. (2005). Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *Journal of Orthopaedic Research*. 23(6), 1300–1307. <https://doi.org/10.1016/J.ORTHRES.2005.04.003.1100230610>

Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Haas, N. P., & Raschke, M. (2003). Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*, 32(5), 521–531. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(03\)00050-4](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(03)00050-4)

Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>

Maathuis, P. G. M., Neut, D., Busscher, H. J., van der Mei, H. C., & van Horn, J. R. (2005). Perioperative contamination in primary total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, NA;(433), 136–139. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000149997.14631.0c>

- Mackiewicz, Z., Niklińska, W. E., Kowalewska, J., & Chyczewski, L. (2012). Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49(4), 558–569. <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0079>
- Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019; 1897:289-298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Maillard, J.-Y., & Hartemann, P. (2013). Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 373–383. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.713323>
- Malluche, H. H., Sherman, D., Meyer, W., & Massry, S. G. (1982). A new semiautomatic method for quantitative static and dynamic bone histology. *Calcif Tissue Int.* 1982 Sep;34(5):439-48. doi: 10.1007/BF02411282
- Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. (1999). Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Centers for disease control and prevention (CDC) Hospital infection control practices advisory committee. *Am J Infect Control.* 1999 Apr;27(2):97-132; quiz 133-4; discussion 96. PMID: 10196487
- Manzano-Moreno, F. J., González-Acedo, A., de Luna-Bertos, E., García-Recio, E., Ruiz, C., & Reyes-Botella, C. (2023). Effect of amoxicillin and clindamycin on the gene expression of markers involved in osteoblast physiology. *Journal of Dental Sciences.* <https://doi.org/10.1016/j.jds.2023.07.015>
- Marie, P. J. (2003). Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*, 316(1–2), 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00748-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00748-0)
- Marks, S. C., & Popoff, S. N. (1988). Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy*, 183(1), 1–44. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001830102>
- Maruyama, Z., Yoshida, C. A., Furuichi, T., Amizuka, N., Ito, M., Fukuyama, R., Miyazaki, T., Kitaura, H., Nakamura, K., Fujita, T., Kanatani, N., Moriishi, T., Yamana, K., Liu, W., Kawaguchi, H., Nakamura, K., & Komori, T. (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Developmental Dynamics: An Official Publication*

of the American Association of Anatomists, 236(7), 1876–1890.

<https://doi.org/10.1002/DVDY.21187>

Matsubara, T., Kida, K., Yamaguchi, A., Hata, K., Ichida, F., Meguro, H., Aburatani, H., Nishimura, R., & Yoneda, T. (2008). BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29119–29125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801774200>

McNally, M., Sousa, R., Wouthuyzen-Bakker, M., Chen, A. F., Soriano, A., Vogely, H. C., Clauss, M., Higuera, C. A., & Trebse, R. (2021). The EBJIS definition of periprosthetic joint infection. *The Bone & Joint Journal*, 103-B (1), 18–25. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.103B1.BJJ-2020-1381.R1>

Metsemakers, W. J., Morgenstern, M., McNally, M. A., Moriarty, T. F., McFadyen, I., Scarborough, M., Athanasou, N. A., Ochsner, P. E., Kuehl, R., Raschke, M., Borens, O., Xie, Z., Velkes, S., Hungerer, S., Kates, S. L., Zalavras, C., Giannoudis, P. v., Richards, R. G., & Verhofstad, M. H. J. (2018). Fracture-related infection: A consensus on definition from an international expert group. *Injury*, 49(3), 505–510. <https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2017.08.040>

Metsemakers, W.-J., Handojo, K., Reynders, P., Sermon, A., Vanderschot, P., & Nijs, S. (2015). Individual risk factors for deep infection and compromised fracture healing after intramedullary nailing of tibial shaft fractures: A single centre experience of 480 patients. *Injury*, 46(4), 740–745. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.12.018>

Metsemakers, W.-J., Morgenstern, M., Senneville, E., Borens, Olivier, Geertje, Govaert, A. M., Onsea, J., Depypere, M., Richards, · R Geoff, Trampuz, A., Michael, ·, Verhofstad, H. J., Stephen, ·, Kates, L., Raschke, · Michael, Martin, ·, McNally, A., William, ·, & Obrebsky, T. (2020). General treatment principles for fracture-related infection: recommendations from an international expert group on behalf of the Fracture-Related Infection (FRI) group 1. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 140, 1013–1027. <https://doi.org/10.1007/s00402-019-03287-4>

Metsemakers WJ, Onsea J, Neutjens E, Steffens E, Schuermans A, McNally M, Nijs S. (2017). Prevention of fracture-related infection: a multidisciplinary care package. *Int Orthop*. 2017 Dec;41(12):2457-2469. doi: 10.1007/s00264-017-3607-y

- Morgenstern, M., Kuehl, R., Zalavras, C. G., McNally, M., Zimmerli, W., Burch, M. A., Vandendriessche, T., Obremsky, W. T., Verhofstad, M. H. J., & Metsemakers, W. J. (2021). The influence of duration of infection on outcome of debridement and implant retention in fracture-related infection. *The Bone & Joint Journal*, *103-B*(2), 213–221. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.103B2.BJJ-2020-1010.R1>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, *16*(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Morra, M., Cassinelli, C., Cascardo, G., Mazzucco, L., Borzini, P., Fini, M., Giavaresi, G., & Giardino, R. (2006). Collagen I-coated titanium surfaces: Mesenchymal cell adhesion and *in vivo* evaluation in trabecular bone implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *78A*(3), 449–458. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30783>
- Mühlhofer, H. M. L., Pohlig, F., Kanz, K.-G., Lenze, U., Lenze, F., Toepfer, A., Kelch, S., Harrasser, N., von Eisenhart-Rothe, R., & Schauwecker, J. (2017). Prosthetic joint infection development of an evidence-based diagnostic algorithm. *European Journal of Medical Research*, *22*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40001-017-0245-1>
- Mühlhofer H, Renz N, Zahar A, Lüdemann M, Rudert M, Hube R, Frommelt L, Ascherl R, Perka C, von Eisenhart-Rothe R. (2021). Diagnosis of periprosthetic joint infection: Development of an evidence-based algorithm by the work group of implant-associated infection of the AE-(German Society for Arthroplasty). *Der Orthopäde*. 2021 Apr;50(4):312-325. German. doi: 10.1007/s00132-020-03940-6
- Murdoch, D. R., Roberts, S. A., Fowler, V. G., Shah, M. A., Taylor, S. L., Morris, A. J., & Corey, G. R. (2001). Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(4), 647–649. <https://doi.org/10.1086/318704>
- Nakashima, K., & de Crombrughe, B. (2003). Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in Genetics*, *19*(8), 458–466. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00176-8)
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & De Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor

- Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5)
- Narimatsu, K., Li, M., de Freitas, P. H. L., Sultana, S., Ubaidus, S., Kojima, T., Zhucheng, L., Ying, G., Suzuki, R., Yamamoto, T., Oda, K., & Amizuka, N. (2010). Ultrastructural observation on cells meeting the histological criteria for preosteoblasts - a study in the mouse tibial metaphysis. *Journal of Electron Microscopy*, 59(5), 427–436. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfq021>
- Nehrer, S., Breinan, H. A., Ramappa, A., Young, G., Shortkroff, S., Louie, L. K., Sledge, C. B., Yannas, I. V., & Spector, M. (1997). Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*, 18(11), 769–776. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00001-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00001-X)
- Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2011). Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(8), 2808–2819. <https://doi.org/10.1021/am200646t>
- Neuman, G., Spangberg, L., & Langeland, S. (1975). Methodology and criteria in the evaluation of dental implants. *Journal of Endodontics*, 1(6), 193–202. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(75\)80196-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(75)80196-8)
- Nishio, Y., Dong, Y., Paris, M., O’Keefe, R. J., Schwarz, E. M., & Drissi, H. (2006). Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*, 372, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.12.022>
- Noël, D., Gazit, D., Bouquet, C., Apparailly, F., Bony, C., Ponce, P., Millet, V., Turge-man, G., Perricaudet, M., Sany, J., & Jorgensen, C. (2004). Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 22(1), 74–85. <https://doi.org/10.1634/STEM-CELLS.22-1-74>
- O’Loughlin, P. F., Morr, S., Bogunovic, L., Kim, A. D., Park, B., & Lane, J. M. (2008). Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 90(Supplement_1), 79–84. <https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01585>
- Olugbodi, J. O., Lawal, B., Bako, G., Onikanni, A. S., Abolenin, S. M., Mohammud, S. S., Ataya, F. S., & Batiha, G. E.-S. (2023). Effect of sub-dermal exposure of silver

- nanoparticles on hepatic, renal and cardiac functions accompanying oxidative damage in male Wistar rats. *Scientific Reports*, 13(1), 10539.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-37178-x>
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & Development*, 16(12), 1446–1465. <https://doi.org/10.1101/GAD.990702>
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W. H., Beddington, R. S. P., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B., & Owen, M. J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89(5), 765–771. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80259-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80259-7)
- Otto-Lambertz, C., Yagdiran, A., Wallscheid, F., Eysel, P., & Jung, N. (2017). Periprosthetic infection in joint replacement - Diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt International*, 114(20). <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0347>
- Pauksch, L., Franke, J., Schnettler, R., & Lips, K. S. (2014a). Synergistic toxicity of gentamicin- and nanosilver-doped polymethylmethacrylate bone cement on primary human osteoclasts. *Cells Tissues Organs*, 199(5–6), 384–392.
<https://doi.org/10.1159/000371341>
- Pauksch, L., Hartmann, S., Rohnke, M., Szalay, G., Alt, V., Schnettler, R., & Lips, K. S. (2014b). Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 439–449.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.037>
- Pauksch, L., Hartmann, S., Szalay, G., Alt, V., Schnettler, R., Lips, K. S. (2013). Biocompatibility of an antibacterial nanosilver-coated titanium implant on primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *BioMedSciDirect Publications*, 2013; 4(4): 3719-3726
- Percival, S. L., Slone, W., Linton, S., Okel, T., Corum, L., & Thomas, J. G. (2011). The antimicrobial efficacy of a silver alginate dressing against a broad spectrum of clinically relevant wound isolates. *International Wound Journal*, 8(3), 237–243.
<https://doi.org/10.1111/J.1742-481X.2011.00774.X>

- Piao, M. J., Kang, K. A., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, S., Choi, J. Y., Choi, J., & Hyun, J. W. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*, *201*(1), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.010>
- Pountos, I., Georgouli, T., Henshaw, K., Howard, B., & Giannoudis, P. V. (2014). Mesenchymal Stem Cell physiology can be affected by antibiotics: An in vitro study. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*. *2014 Oct 27;60(4):1-7*. PMID: 25350512
- Prokopovich, P., Köbrick, M., Brousseau, E., & Perni, S. (2015). Potent antimicrobial activity of bone cement encapsulating silver nanoparticles capped with oleic acid. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *103*(2), 273–281. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33196>
- Puleo, D. A., & Nanci, A. (1999). Understanding and controlling the bone implant interface. *Biomaterials*, *1999 Dec;20(23-24):2311-21*. doi: 10.1016/s0142-9612(99)00160-xIF: 14.0 Q1 . PMID: 10614937.
- Qian, Y., Zhou, X., Zhang, F., Diekwisch, T. G. H., Luan, X., & Yang, J. (2019). Triple PLGA/PCL scaffold modification including silver impregnation, collagen coating, and electrospinning significantly improve biocompatibility, antimicrobial, and osteogenic properties for orofacial tissue regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *11*(41), 37381–37396. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b07053>
- Qin, L., Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2004). Parathyroid hormone: A double-edged sword for bone metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *15*(2), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.01.006>
- Qin, X., Jiang, Q., Miyazaki, T., & Komori, T. (2019). Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells. *Human Molecular Genetics*, *28*(6), 896–911. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDY386>
- Qu, S., Wu, J., Bao, Q., Yao, B., Duan, R., Chen, X., Li, L., Yuan, H., Jin, Y., & Ma, C. (2019). Osterix promotes the migration and angiogenesis of breast cancer by

- upregulation of S100A4 expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(2), 1116–1127. <https://doi.org/10.1111/JCMM.14012>
- Raphel, J., Holodniy, M., Goodman, S. B., & Heilshorn, S. C. (2016). Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials*, 84, 301–314. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.01.016>
- Recker, R., Masarachia, P., Santora, A., Howard, T., Chavassieux, P., Arlot, M., Rodan, G., Wehren, L., & Kimmel, D. (2005). Trabecular bone microarchitecture after alendronate treatment of osteoporotic women. *Current Medical Research and Opinion*, 21(2), 185–194. <https://doi.org/10.1185/030079904X20259>
- Renn, J., & Winkler, C. (2009). Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Developmental Dynamics: An official publication of the American Association of Anatomists*, 238(1), 241–248. <https://doi.org/10.1002/DVDY.21836>
- Renz, N., Cabric, S., Janz, V., & Trampuz, A. (2015). Sonikation in der Diagnostik periprothetischer Infektionen. *Der Orthopäde*, 44(12), 942–945. <https://doi.org/10.1007/s00132-015-3192-y>
- Renz, N., Hubacher, T., Kleber, C., Trampuz, A., Muri, G., & Bern, M. B. (2016). Infektionen nach osteosynthetischer Frakturversorgung. *Swiss medical forum - Schweizerisches Medizin-Forum 2016*;16(4):85-91. doi: 10.4414/smf.2016.02499.
- Renz, N., Müller, M., Perka, C., & Trampuz, A. (2016). Implant-associated infections – diagnostics. *Chirurg*, 87(10), 813–821. <https://doi.org/10.1007/s00104-016-0234-x>
- Renz, N., Perka, C., & Trampuz, A. (2016). Management of periprosthetic infections of the knee. *Der Orthopäde*, 45(1), 65–71. <https://doi.org/10.1007/S00132-015-3217-6>
- Renz, N., & Trampuz, A. (2015). Periprothetische Infektionen: aktueller Stand der Diagnostik und Therapie. *Orthopädie & Rheuma*, 18(6), 20–28. <https://doi.org/10.1007/s15002-015-0779-y>
- Roca, H., Phimphilai, M., Gopalakrishnan, R., Xiao, G., & Franceschi, R. T. (2005). Cooperative interactions between Runx2 and homeodomain protein-binding sites are critical for the osteoblast-specific expression of the bone sialoprotein gene. *Journal*

of Biological Chemistry, 280(35), 30845–30855.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M503942200>

Roy, A., Bulut, O., Some, S., Kumar Mandal, A., & Deniz Yilmaz, M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. January 2019. *Royal Society of Chemistry Advances* 9(5):2673-2702 <https://doi.org/10.1039/c8ra08982e>

Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>

Same, S., Navidi, G., Samee, G., Abedi, F., Aghazadeh, M., Milani, M., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2022). Gentamycin-loaded halloysite-based hydrogel nanocomposites for bone tissue regeneration: fabrication, evaluation of the antibacterial activity and cell response. *Biomedical Materials*, 17(6), 065018. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac94ad>

San, H., Paresoglou, M., Minneboo, M., van Hengel, I. A. J., Yilmaz, A., Gonzalez-Garcia, Y., Fluit, A. C., Hagedoorn, P.-L., Fratila-Apachitei, L. E., Apachitei, I., & Zadpoor, A. A. (2022). Fighting antibiotic-resistant bacterial infections by surface biofunctionalization of 3D-Printed porous titanium implants with reduced graphene oxide and silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9204. <https://doi.org/10.3390/ijms23169204>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schroeder, T. M., Jensen, E. D., & Westendorf, J. J. (2005). Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews*, 75(3), 213–225. <https://doi.org/10.1002/BDRC.20043>

Seiler, H. G., Sigel, H., & Sigel, A. (1988). *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:20015779

- Selvamani, V., Kadian, S., Detwiler, D. A., Zareei, A., Woodhouse, I., Qi, Z., Peana, S., Alcaraz, A. M., Wang, H., & Rahimi, R. (2022). Laser-assisted nanotexturing and silver immobilization on titanium implant surfaces to enhance bone cell mineralization and antimicrobial properties. *Langmuir*, 38(13), 4014–4027. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c00008>
- Sendi, P., Lötscher, P. O., Kessler, B., Graber, P., Zimmerli, W., & Clauss, M. (2017). Debridement and implant retention in the management of hip periprosthetic joint infection: outcomes following guided and rapid treatment at a single centre. *The Bone & Joint Journal*, 99-B (3), 330–336. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.99B3.BJJ-2016-0609.R1>
- Shimoyama, A., Wada, M., Ikeda, F., Hata, K., Matsubara, T., Nifuji, A., Noda, M., Amano, K., Yamaguchi, A., Nishimura, R., & Yoneda, T. (2007). Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2411. <https://doi.org/10.1091/MBC.E06-08-0743>
- Shukla, S., Nixon, M., Acharya, M., Korim, M. T., & Pandey, R. (2009). Incidence of MRSA surgical-site infection in MRSA carriers in an orthopaedic trauma unit. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, 91(2), 225–228. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.91B2.21715>
- Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., Khurshid, M., Afzal, M., Malik, I. R., Shahzad, M., Qureshi, U., Khan, Z. U. H., & Muzammil, S. (2020). Effect of silver nanoparticles on biofilm formation and EPS production of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed Research International*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/6398165>
- Siddiqui JA, Partridge NC. (2016). Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016 May;31(3):233-45. doi: 10.1152/physiol.00061.2014
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, 27(2–3), 341–353. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00047-0)

- Sinha, K. M., & Zhou, X. (2013). Genetic and molecular control of Osterix in skeletal formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, *114*(5), 975–984.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24439>
- Slane, J., Vivanco, J., Rose, W., Ploeg, H. L., & Squire, M. (2015). Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. *Materials Science & Engineering, Materials for Biological Applications*, *48*, 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.11.068>
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, *275*(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- Song, D., He, G., Shi, Y., Ni, J., & Long, F. (2021). Functional interaction between Wnt and Bmp signaling in periosteal bone growth. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90324-1>
- Soni, J. F., Ribeiro, V. S. T., Cieslinski, J., de Andrade, A. P., Dantas, L. R., Pereira, B. Z., de Almeida, B. M. R. C., Suss, P. H., & Tuon, F. F. (2023). Evaluation of silver nanoparticle-impregnated PMMA loaded with vancomycin or gentamicin against bacterial biofilm formation. *Injury*, *54*, 110649. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2023.02.032>
- Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenbils MA. (1985). Infection in experimental hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br*. 1985 Mar;*67*(2):229-31.
doi: 10.1302/0301-620X.67B2.3980532
- Subramaniam, M., Pitel, K. S., Withers, S. G., Drissi, H., & Hawse, J. R. (2016). TIEG1 enhances Osterix expression and mediates its induction by TGF β and BMP2 in osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *470*(3), 528–533. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.01.112>
- Sun, C., Che, Y., & Lu, S. (2015). Preparation and application of collagen scaffold-encapsulated silver nanoparticles and bone morphogenetic protein 2 for enhancing the repair of infected bone. *Biotechnology Letters*, *37*(2), 467–473.
<https://doi.org/10.1007/s10529-014-1698-8>
- Sun, D., Xu, D., Yang, C., Chen, J., Shahzad, M. B., Sun, Z., Zhao, J., Gu, T., Yang, K., & Wang, G. (2016). Inhibition of Staphylococcus aureus biofilm by a copper-

- bearing 317L-Cu stainless steel and its corrosion resistance. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 744–750. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.07.050>
- Sun, J., Zheng Y, Li J & Liu X. (2012). Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. *International Journal of Nanomedicine*, 875. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28450>
- Sun, Y., Wang, L., Sun, L., Guo, C., Yang, T., Liu, Z., Xu, F., & Li, Z. (2008). Fabrication, characterization, and application in surface-enhanced Raman spectrum of assembled type-I collagen-silver nanoparticle multilayered films. *The Journal of Chemical Physics*, 128(7). <https://doi.org/10.1063/1.2832322>
- Suske, G., Bruford, E., & Philipsen, S. (2005). Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics*, 85(5), 551–556. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2005.01.005>
- Suthar, J. K., Vaidya, A., & Ravindran, S. (2023). Toxic implications of silver nanoparticles on the central nervous system: A systematic literature review. *Journal of Applied Toxicology*, 43(1), 4–21. <https://doi.org/10.1002/jat.4317>
- Suzuki, T., Morgan, S. J., Smith, W. R., Stahel, P. F., Gillani, S. A., & Hak, D. J. (2010). Postoperative surgical site infection following acetabular fracture fixation. *Injury*, 41(4), 396–399. <https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2009.11.005>
- Taichman, R. S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2631-9. doi: 10.1182/blood-2004-06-2480
- Tamminen, I. S., Isaksson, H., Aula, A. S., Honkanen, E., Jurvelin, J. S., & Kröger, H. (2011). Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 29(4), 442–448. <https://doi.org/10.1007/s00774-010-0236-6>
- Tan, T. L., Kheir, M. M., Rondon, A. J., Parvizi, J., George, J., Higuera, C. A., Shohat, N., & Chen, A. F. (2018). Determining the role and duration of the “Antibiotic holiday” period in periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*, 33(9), 2976–2980. <https://doi.org/10.1016/J.ARTH.2018.04.019>

- Thyagarajan, D., Sunderamoorthy, D., Haridas, S., Beck, S., Praveen, P., & Johansen, A. (2009). MRSA colonisation in patients admitted with hip fracture: implications for prevention of surgical site infection. *Acta Orthopaedica Belgica*, *75*(2), 252–257.
- Timpson, N. J., Tobias, J. H., Richards, J. B., Soranzo, N., Duncan, E. L., Sims, A.-M., Whittaker, P., Kumanduri, V., Zhai, G., Glaser, B., Eisman, J., Jones, G., Nicholson, G., Prince, R., Seeman, E., Spector, T. D., Brown, M. A., Peltonen, L., Smith, G. D., Evans, D. M. (2009). Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood. *Human Molecular Genetics*, *18*(8), 1510–1517. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp052>
- Tokuda, H., Kozawa, O., & Uematsu, T. (2000). Basic fibroblast growth factor stimulates vascular endothelial growth factor release in osteoblasts: divergent regulation by p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Bone and Mineral Research*, *15*(12), 2371–2379. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.12.2371>
- Toledano-Osorio, M., de Luna-Bertos, E., Toledano, M., Manzano-Moreno, F. J., García-Recio, E., Ruiz, C., Osorio, R., & Sanz, M. (2023). Doxycycline-doped collagen membranes accelerate in vitro osteoblast proliferation and differentiation. *Journal of Periodontal Research*, *58*(2), 296–307. <https://doi.org/10.1111/jre.13091>
- Trampuz, A., & Zimmerli, W. (2006). Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*, *37*(2 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2006.04.010>
- Trampuz, A., & Zimmerli, W. (2008). Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Current Infectious Disease Reports 2008 10:5*, *10*(5), 394–403. <https://doi.org/10.1007/S11908-008-0064-1>
- Uchihashi, K., Aoki, S., Matsunobu, A., & Toda, S. (2013). Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone*, *52*(1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2012.09.001>
- Uçkay, I., Hoffmeyer, P., Lew, D., & Pittet, D. (2013). Prevention of surgical site infections in orthopaedic surgery and bone trauma: state-of-the-art update. *The Journal of Hospital Infection*, *84*(1), 5–12. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2012.12.014>

- van Hengel, I. A. J., Riool, M., Fratila-Apachitei, L. E., Witte-Bouma, J., Farrell, E., Zadpoor, A. A., Zaat, S. A. J., & Apachitei, I. (2017). Selective laser melting porous metallic implants with immobilized silver nanoparticles kill and prevent biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials*, *140*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.030>
- Walter, G., Kemmerer, M., Kappler, C., & Hoffmann, R. (2012). Treatment algorithms for chronic osteomyelitis. *Deutsches Arzteblatt International* (Vol. 109, Issue 14, pp. 257–264). Deutscher Ärzte-Verlag GmbH. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0257>
- Walter, N., Rupp, M., Baertl, S., Hinterberger, T., & Alt, V. (2022). Prevalence of psychological comorbidities in bone infection. *Journal of Psychosomatic Research*, *157*, 110806. <https://doi.org/10.1016/J.JPSYCHORES.2022.110806>
- Wan, M., & Cao, X. (2005). BMP signaling in skeletal development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *328*(3), 651–657. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.11.067>
- Wang, H., Su, K., Su, L., Liang, P., Ji, P., & Wang, C. (2019). Comparison of 3D-printed porous tantalum and titanium scaffolds on osteointegration and osteogenesis. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, *104*. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109908>
- Webster, J., & Alghamdi, A. (2015). Use of plastic adhesive drapes during surgery for preventing surgical site infection. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2015*(4). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006353.PUB4>
- Wei, Z., Li, K., Wang, S., Wen, L., Xu, L., Wang, Y., Chen, Z., Li, W., Qiu, H., Li, X., & Chen, J. (2022). Controllable AgNPs encapsulation to construct biocompatible and antibacterial titanium implant. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1056419>
- WHO. (2016). Global guidelines for the prevention of surgical site infection, second edition. *World Health Organization*, 27–37. <http://apps.who.int/bookorders.%0Ahttp://www.who.int>
- Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., de Meent, V.,

- Dekkers, S., de Jong, W. H., van Zijverden, M., Sips, A. J. A. M., & Geertsma, R. E. (2009). Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*, 3:2, 109-138, DOI: 10.1080/17435390902725914
- Woo, S. L., Lothringer, K. S., Akeson, W. H., Coutts, R. D., Woo, Y. K., Simon, B. R., & Gomez, M. A. (1984). Less rigid internal fixation plates: historical perspectives and new concepts. *Journal of Orthopaedic Research*, 1(4), 431-449. <https://doi.org/10.1002/JOR.1100010412>
- Wray, J. B., & Lynch, C. J. (1959). The vascular response to fracture of the tibia in the rat. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 41-A, 1143-1148.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/IJOS.2014.65>
- Wu, P., Xie, R., Imlay, K., & Shang, J. K. (2010). Visible-light-induced bactericidal activity of titanium dioxide co-doped with nitrogen and silver. *Environmental Science & Technology*, 44(18), 6992. <https://doi.org/10.1021/ES101343C>
- Xie, H., Wang, P., & Wu, J. (2019). Effect of exposure of osteoblast-like cells to low-dose silver nanoparticles: uptake, retention and osteogenic activity. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 260-267. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1552594>
- Xie, J., Wang, W., Fan, X., Li, H., Wang, H., Liao, R., Hu, Y., & Zeng, M. (2022). Masquelet technique: effects of vancomycin concentration on quality of the induced membrane. *Injury*, 53(3), 868-877. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.11.003>
- Xie, K., Zhou, Z., Guo, Y., Wang, L., Li, G., Zhao, S., Liu, X., Li, J., Jiang, W., Wu, S., & Hao, Y. (2019). Long-term prevention of bacterial infection and enhanced osteoinductivity of a hybrid coating with selective silver toxicity. *Advanced Healthcare Materials*, 8(5). <https://doi.org/10.1002/adhm.201801465>
- Xu, Y., Zheng, B., He, J., Cui, Z., & Liu, Y. (2019). Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts by regulating the RhoA-TAZ axis. *Cell Biology International*, 43(8), 910-920. <https://doi.org/10.1002/cbin.11180>

- Yamazaki, M., Shiota, T., Tokugawa, Y., Motohashi, M., Ohno, K., Michi, K., & Yamaguchi, A. (1999). Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 87(4), 411–418. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(99\)70239-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(99)70239-8)
- Young S, Lie SA, Hallan G, Zirkle LG, Engesæter LB, Havelin LI. (2013). Risk factors for infection after 46,113 intramedullary nail operations in low- and middle-income countries. *World J Surg. 2013 Feb*;37(2):349-55. doi: 10.1007/s00268-012-1817-4
- Yu, L., Fei, Q., Lin, J., Yang, Y., & Xu, Y. (2020). The osteogenic effect of local delivery of vancomycin and tobramycin on bone marrow stromal cells. *Infection and Drug Resistance, Volume 13*, 2083–2091. <https://doi.org/10.2147/IDR.S261767>
- Zhang, R., Lee, P., Lui, V. C. H., Chen, Y., Liu, X., Lok, C. N., To, M., Yeung, K. W. K., & Wong, K. K. Y. (2015). Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(8), 1949–1959. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.07.016>
- Zhang, Y., Shen, L., Mao, Z., Wang, N., Wang, X., Huang, X., Hu, Y., Shou, D., & Wen, C. (2017). Icariin enhances bone repair in rabbits with bone infection during post-infection treatment and prevents inhibition of osteoblasts by vancomycin. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00784>
- Zilles, K., & Tillmann, B. N. (2010). *Anatomie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69483-0>
- Zimmerli, W. (2014). Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/joim.12233>
- Zimmerli, W., & Sendi, P. (2019). Role of rifampin against Staphylococcal biofilm infections in vitro, in animal models, and in orthopedic-device-related infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01746-18>
- Zimmerli, W., Trampuz, A., & Ochsner, P. E. (2004). Prosthetic-joint infections. *The New England Journal of Medicine*, 351(16). <https://doi.org/10.1056/NEJMRA040181>

- Zimmerli, W., Waldvogel, F. A., Vaudaux, P., & Nydegger, D. E. (1982). Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *The Journal of Infectious Diseases*, *146*(4), 487–497.
<https://doi.org/10.1093/INFDIS/146.4.487>
- Ziros, P. G., Basdra, E. K., & Papavassiliou, A. G. (2008). Runx2: of bone and stretch. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(9), 1659–1663.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2007.05.024>
- Zollino, I., Girardi, A., Palmieri, A., Cura, F., Sollazzo, V., Brunelli, G., & Carinci, F. (2012). Anatase-based implants nanocoating on stem cells derived from adipose tissue. *Implant Dentistry*, *21*(2), 118–123.
<https://doi.org/10.1097/ID.0b013e31824bc948>
- Zucker, C., Michel, M.D. (2008). Sozioökonomische Aspekte der Hüft-Revisionsendoprothetik im Zeitalter der DRGs. In: Wirtz, D.C., Rader, C., Reichel, H. (eds) Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-75649-1_9
- Zuo, C., Huang, Y., Bajis, R., Sahih, M., Li, Y. P., Dai, K., & Zhang, X. (2012). Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporosis International*, *23*(6), 1653–1663. <https://doi.org/10.1007/S00198-012-1909-X>

11 Publikationsverzeichnis

National

Special-ePoster Präsentation

18. Jahrestagung der Deutschen Wirbelsäulengesellschaft (Stuttgart 2023):

"Regulation der Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix nach Implantation nanosilberhaltiger Knochenersatzmaterialien"

Vortrag

6. Science Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Gießen 2023):

"Einfluss nanosilberhaltiger Knochenersatzmaterialien auf die Entwicklung von Osteoblasten in vivo"

International

Posterpräsentation

25th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) Annual Congress (Hamburg 2024):

"Effect of nanosilver-containing bone substitute materials on early osteogenesis in vivo"

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

13 Danksagung

Zuallererst möchte ich meine aufrichtige und tief empfundene Dankbarkeit gegenüber Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips, der Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen, ausdrücken. Sie hat mir nicht nur das faszinierende Thema dieser Arbeit anvertraut, sondern mich auch mit ihrer großen Expertise und wertvollen Ratschlägen unterstützt. Als Doktormutter war sie eine unersetzliche Stütze in allen Phasen meiner Forschung.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum Gießen. Seine herausragende Unterstützung und die Bereitstellung erstklassiger Ressourcen, insbesondere des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, haben maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ich möchte auch Ida Oberst aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen meinen außerordentlichen Dank aussprechen. Ihre Geduld, ihr Fachwissen und ihre Hilfsbereitschaft beim Einarbeiten in verschiedene Laborprozesse waren für mich von unschätzbarem Wert. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an Frau Dr. Ursula Sommer für ihre Anleitung beim Umgang mit dem Leica Mikroskop und ihre wertvollen Tipps für den praktischen Teil der Arbeit.

Zudem danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des BioNanoCare-Projekts (FKZ 03X0103D) und der aap Biomaterials GmbH für die Bereitstellung der Osteosynthesematerialien.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre endlose Unterstützung und Ermutigung danken. Meine tiefste Wertschätzung und Dankbarkeit gilt meiner geliebten Ehefrau Sherifa Mahmoud. Ihre unerschütterliche Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Liebe waren nicht nur mein emotionaler Anker, sondern auch die entscheidenden Säulen, die mir den Weg zum erfolgreichen Abschluss meiner Promotion ebneten.