

**Untersuchung des Einwachsverhaltens neuartiger
Knochenersatzmaterialien in osteoporotischen
Rattenknochen mittels Histochemie und bildgebender
Massenspektrometrie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nils Döhner

Gießen 2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med Dr. biol. hom. V. Alt

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Rickert

Tag der Disputation: 15.10.2020

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

Ort, Datum

Nils Döhner

Meiner Familie und meiner Partnerin

-Gleichsam Zwergen, auf den Schultern von Riesen-

Johannes von Salisbury

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	2
	2.1 Die Osteoporose und ihre Therapie	2
	2.1.1 Therapie.....	11
	2.1.2 Anti-katabole Medikamente	12
	2.1.3 Anabole Medikamente	13
	2.1.4 Dualer Wirkmechanismus	13
	2.1.5 Vitamin-D	13
	2.1.6 Calcitonin	14
	2.2 Anatomische Beschreibung des Knochens und seiner Matrixbestandteile	14
	2.2.1 Osteoblasten Zelllinie.....	19
	2.2.2 Osteoklasten Zelllinie.....	22
	2.3 Knochenheilung.....	23
	2.4 Einflussfaktoren des Knochenstoffwechsels	30
	2.5 Knochenersatzmaterialien (KEM).....	35
	2.6 Massenspektrometrie TOF-SIMS (Flugzeitsekundärionen-Massenspektrometrie) .	41
	2.7 Strontium	44
	2.7.1 Strontium und seine Signalwege	46
3	Material und Methode	49
	3.1 Tiermodell-Genehmigung	49
	3.2 Tiermodell und Studiendesign.....	49
	3.3 Material PPGC+S 5:5 ^{III} bzw. 3:7 ^{III}	51
	3.4 Osteoporoseinduktion.....	54

3.5 Operation des Femurs mit Generierung eines Frakturspaltes und	
Materialeinbringung.....	56
3.5.1 Euthanasie der Tiere.....	59
3.5.2 Entnahme der Femora	59
3.5.3 Fixierung und Einbettung in Technovit 9100 ©.....	60
3.5.4 Zuschnitt der Technovit© Blöcke	63
3.5.5 Anfertigen der 5µm Schnitte	63
3.6 Färbemethoden	64
3.6.1 Movat Pentachrom Färbung- Ablauf.....	64
3.6.2 Movat Farbgebung	67
3.6.3 Versilberung nach von Kossa und van Gieson.....	68
3.7 Enzymhistochemische Analyse	71
3.7.1 Nachweis der Tartrat resistenten Sauren Phosphatase (TRAP)	71
3.7.2 Nachweis der Alkalischen Phosphatase (ALP/TNAP).....	73
3.8 Anfertigen von Bildern zur Histomorphometrie und Dokumentation.....	75
3.8.1 Festlegung der ROI für die Histomorphometrie.....	76
3.9 Massenspektrometrie TOF-SIMS (Flugzeitsekundärionen-Massenspektrometrie) .	76
3.10 Statistik.....	79
3.11 Statistik der intakten Platten pro Subgruppe	80
4 Ergebnisse	81
4.1 Postoperativer Verlauf.....	81
4.2 Deskriptive Histologie.....	83
4.2.1 Zur Färbung nach Movat.....	84
4.2.2 Zur Färbung nach von Kossa/van Gieson	84
4.3 Histomorphometrie.....	85

4.3.1 Knochenneubildung	85
4.3.2 Unmineralisiertes Gewebe	87
4.3.3 TRAP-positive Zellen	89
4.3.4 ALP-positiv eingefärbte Fläche	91
4.4 TOF-SIMS Analyse in Leerdefekt, PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III}	93
5 Diskussion	95
5.1 Frakturmodell	95
5.2 Plattenbrüche	97
5.3 Material PPGC+S	97
5.4 Knochenneubildung verstärkt bei PPGC+S 3:7 ^{III}	99
5.5 Enzymhistochemie ALP und TRAP	101
5.6 Strontiumfreisetzung	103
6 Zusammenfassung	106
6.1 Summary.....	107
7 Literaturverzeichnis	108
8 Anhang	123
8.1 Tabellenverzeichnis	123
8.2 Abbildungsverzeichnis	124
8.3 Beiträge zu Postern.....	127
8.4 Abkürzungsverzeichnis	128
9 Danksagung.....	131
10 Lebenslauf	132

1 Einleitung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Heilung eines critical sized defect am ovariectomierten Rattenmodell nach Einbringung zweier neuartiger Knochenersatzmaterialien (KEM) mit unterschiedlicher Strontiumkonzentration, bzw. einer Kontrollgruppe. Da die Wirkmechanismen von Strontiumionen von der Therapie mit Strontiumranelat gut belegt sind, ist die lokale Bereitstellung mit Umgehung der systemischen Nebenwirkung bei oraler Strontiumgabe ein denkbarer Ansatz osteoporosebedingte Brüche besser in der Heilung zu unterstützen. Die Fragen dieser Arbeit sind:

1. Kann eine höhere Strontiumkonzentration im KEM PPGC+S (3:7 ^{III} (90%) im Vergleich zu 5:5 ^{III} (37%)) mehr Knochenneubildung ermöglichen?
2. Ist die Strontiumfreisetzung aus den KEM mittels bildgebender Massenspektrometrie nachzuweisen?

2 Literaturübersicht

2.1 Die Osteoporose und ihre Therapie

Die WHO definiert die Osteoporose als: „eine Erkrankung, bei welcher sich eine Verminderung der Knochenmasse feststellen lässt, ohne dass sich das Verhältnis der mineralisierten zur nicht-mineralisierten Matrix verschiebt“¹⁷⁹.

Die Osteoporose ist eine systemische Erkrankung, die eine Verminderung der Knochenqualität hervorruft, was wiederum einen Hauptrisikofaktor für eine Fraktur darstellt¹². Die Trabekel (Bälkchenstruktur) des osteoporotischen Knochens weisen untereinander weniger Kontakte auf und sind dünner als im gesunden Knochengewebe⁷⁴. Der Knochen ist also auf Ebene seiner Mikroarchitektur geschwächt^{12,179}.

Charakteristisch für osteoporotische Frakturen ist die geringe Krafteinwirkung bei welcher der Knochen bereits nachgibt (Fragilitätsfraktur)^{12,179}. Das Vorliegen einer Fragilitätsfraktur wird dann angenommen, wenn der Unfallmechanismus niedrigtraumatisch ist, das heißt es genügt ein Sturz aus geringer Höhe (z.B. Standhöhe) um bei niedriger Krafteinwirkung eine Fraktur auszulösen⁴⁹.

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, das bedeutet sie betrifft alle Knochen im Körper, diese aber unterschiedlich stark. Spongiöser Knochen, wie man ihn vor allem in den Wirbelkörpern und den Enden der langen Röhrenknochen findet, erfährt eine bedeutend höhere Umbaurate und ist daher bei Osteoporose besonders stark betroffen¹⁶¹. Metaphysäre Frakturen des Femurs (Schenkelhalsfrakturen), der Wirbelkörper und des distalen Radius sind die Prädilektionsstellen der Osteoporose-assoziierten Frakturen⁷⁴.

Die Frühmortalität von Patienten mit Schenkelhalsfrakturen liegt trotz adäquater Operation und Nachbehandlung bei circa 25%, und steht in deutlichem Zusammenhang mit der Immobilisierung und deren Komplikationen wie Embolien und Lungenentzündungen^{12,218}.

Der Verdacht auf das Vorliegen einer Osteoporose ergibt sich bei Patienten mit Zustand nach langjähriger Glukokortikoidtherapie, bei Körpergrößenminderung um mehr als vier Zentimeter, bei niedrigtraumatischen Brüchen der Wirbelkörper oder des Radius, bei Schenkelhalsfrakturen und andauernden Formen von Rückenschmerzen bei Frauen um das 50. Lebensjahr. Klinisch gibt es außerdem ein blickdiagnostisches Phänomen. Der unbedeckte Rücken eines Osteoporosepatienten, weist häufig ein „Tannenbaumphänomen“ auf. Die Höhenminderung aufgrund multipler Wirbelkörperverformungen und Einbrüche lässt Hautfalten entstehen, welche herabhängend an einen Tannenbaum erinnern^{12,74,161}.

Ab dem Vorliegen einer oder mehrerer der in Tab.2.1-a (Tab.=Tabelle) genannten Risikofaktoren empfiehlt es sich eine *Basisdiagnostik* durchzuführen⁵⁰: Laut der *DVO Leitlinie 2017* besteht eine generelle Empfehlung zur *Basisdiagnostik* bei Frauen ab dem 70. Lebensjahr und Männern ab dem 80. Lebensjahr, da in dieser Alterskohorte das Frakturrisiko steigt⁵⁰.

Die *Basisdiagnostik* umfasst eine ausführliche Anamnese, DEXA-Messung der Knochendichte, den klinischen Befund und das Basislabor (s.u.)^{49,50}. Zurückliegende Frakturen, etwaige Medikamenteneinnahme, Blutuntersuchungen, Malignome, Abnahme der Muskelkraft und Koordination, hierfür insbesondere der Timed-up and go-, Chair-raising und Tandemstandtest, sollen evaluiert werden^{49,50}.

Bei klinischem Verdacht sollte sich eine mehrstufige *Basisdiagnostik* anschließen, welche unter Umständen auch eine Bildgebung mittels Röntgen BWS/LWS, auf jeden Fall aber eine Blutentnahme beinhaltet^{12,49,50}. Zu den im Blut zu bestimmenden Parametern gehören, die in Tab.2.1-b erwähnten Risikofaktoren.

Tab.2.1-a: Risikofaktoren, welche ein erhöhtes Auftreten der Osteoporose begünstigen

Bei Frauen ab dem 50. LJ und Männern ab dem 60. LJ
Proximale Femurfraktur in der Elterngeneration
Untergewicht
Multiple Stürze, erhöhte Sturzgefahr, auch bei der Einnahme sturzbegünstigender Medikamente (Anxiolytika/Benzodiazepine und deren Z-Abkömmlinge, Antidepressiva, Neuroleptika, Antihypertensiva, Anticholinergika, Antiemetika)
Immobilität
Hormonablativ Therapie oder Hypogonadismus beim Mann
Rauchen und/oder COPD
Herzinsuffizienz
Hypercortisolismus (M. Cushing)
Gastrektomie nach Billroth II
Zöliakie (Sprue)
Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2
Hyperthyreose
Chronische Niereninsuffizienz
Spondylitis ankylosans, Systemischer Lupus Erythematodes und Rheumatoide Arthritis
Depression
Alle anderen Erkrankungen, welche mit Knochenverlust assoziiert sind
Chronische Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren
Inhalative Glukokortikoide
Glitazone (Antidiabetika)
Aromatasehemmer
Cumarine (Vitamin-K Antagonisten)
Alkoholische Leberkrankheit

Quelle:^{49,70,99,50,50}

Tab.2.1-b: Basisdiagnostik, zur Abklärung bei dem Verdacht auf Osteoporose

Basislabor	
Laborparameter	Fragestellung
alkalische Phosphatase im Serum	Erhöht bei Osteomalazie
Serum-Calcium	Erhöht bei primärem Hyperparathyroidismus, erniedrigt bei sekundärem Hyperparathyreoidismus, Malabsorption
Serum-Phosphat	Erhöht in späten Stadien der Niereninsuffizienz und sekundärem renalen Hyperparathyreoidismus
Optional Serum-Natrium	Niedrige Werte sind mit vertebrealen und nicht-vertebrealen Frakturen assoziiert
Blutsenkungsgeschwindigkeit plus C-reaktives Protein	Abklärung von möglichen Differentialdiagnosen entzündlicher Genese, z.B. M. Waldenström
Serumelektrophorese	Ausschluss eines Multiplen Myeloms und entzündlicher Ursachen inklusive rheumatischer Erkrankungen
Blutbild	Als Nachweis für eine blande (intakte) Knochenmarksfunktion, Entzündung, maligne Erkrankung oder Zöliakie
Parathormon	Hinweis auf renale Osteopathie
Kreatinin-Clearance	Zum Ausschluss einer renalen Osteopathie
TSH	Werte unter 0,3 mU/L jeglicher Genese sind ein Risikofaktor für Frakturen
Optional Testosteron beim Mann	Hormonmangel
Optional Vitamin D3	Vitaminmangel
Optional Resorptionsparameter	Erhöhte Knochenumbaurate
γ -GT	Um leberbedingte Erhöhung der alkalischen Phosphatase aufzudecken

Quellen:^{49,74,99,50}

Der Grad der Knochenmineralisierung bzw. der Schweregrad der Osteoporose kann mit osteodensitometrischen Methoden bestimmt werden^{49,74,210,50}. Die beiden wichtigsten klinischen Methoden sind die dual X-ray absorptiometry (DEXA, Zweiennergie-Röntgenabsorptiometrie) und die quantitative Computertomographie (μ CT)^{49,50}.

In der Routinediagnostik wird der DEXA Methode der Vorrang eingeräumt, wobei die μ CT Untersuchung eine höhere prädiktive Genauigkeit des Auftretens von Wirbelkörperfrakturen ermöglichen kann⁵⁰. Im Standard-Röntgenbild wird eine Osteoporoseerkrankung erst sichtbar, wenn ca. 30% des Knochenmineralanteils abgebaut sind⁸⁶.

Die DEXA Methode ist 1990 durch *Mazess et al.* zum ersten Mal *in vivo* untersucht worden¹⁴⁷. Die Messung mit DEXA erfolgt am liegenden Patienten. Ein fächerförmiger Röntgenstrahl wird auf den optimalen Messort gerichtet, meist das proximale Femur, die Lendenwirbelsäule oder die gesamte Hüfte, und erzeugt ein Röntgenbild, dass von einer Computersoftware automatisch ausgewertet wird^{12,62}. Bei einer Reihe von Sonderfällen kann die Messung auch am Radius der nichtdominanten Hand vorgenommen werden. Diese Sonderfälle sind: Eine schwere Adipositas, wenn keine Messung oder Auswertung an den oben genannten Orten möglich ist und bei primärem Hyperparathyroidismus⁶². Die Ergebnisse können verfälscht werden, wenn die Aorta sklerosiert ist, vertebrale Frakturen bestehen, der Patient zu stark auf eine Seite rotiert liegt oder Osteophyten bzw. Spondylophyten und Skoliosis an der Wirbelsäule bestehen^{50,61}. Die Einheit der mit DEXA bestimmten Flächenknochendichte ist: $[\frac{g}{cm^2}]$ ⁷⁴.

Die μ CT Untersuchung ist eine radiologische Untersuchungstechnik, welche eine höhere Strahlenbelastung als DEXA verursacht¹². Sie ist die einzige Methode die eine volumetrische Knochendichte in $[\frac{g}{cm^3}]$ bestimmt¹⁷⁹. Jeder Computertomograph ist mit einer Software-Nachrüstung in der Lage, den Mineralsalzgehalt zu bestimmen^{12,74}. Mit μ CT Messungen ist es möglich spongiösen Knochen unabhängig von corticalem Knochen zu untersuchen^{12,179,74,179}. Die empirisch ermittelte Frakturschwelle liegt bei ca. $\frac{100mg}{cm^3}$, das heißt ab diesem Wert häuft sich die Inzidenz von Knochenbrüchen⁷⁴. Bislang konnte sich die μ CT zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit proximaler Femur- und vertebraler Frakturen nicht gegen die etabliertere DEXA durchsetzen^{50,73}. Der Hauptgrund dafür ist die fehlende prospektive Datenlage und die fehlenden Referenzwerte⁵⁰. Die μ CT kommt in der Forschung an KEM vielfach zum Einsatz, um die Ergebnisse der Histologie zu komplementieren^{4,7,90,135,140,95,158,173,185,226}. Klinisch relevant ist die DEXA Methode.

Für den Fall, dass DEXA-Messungen an der Hüfte oder der Lendenwirbelsäule schwierig zu erheben sind, kann eine μ CT Untersuchung diskutiert werden, weil die Vorhersage von Frakturen an der untersuchten Körperstelle gleich gut wie mittels der DEXA vorrausgesagt werden kann⁵⁰.

DEXA kommt allerspätestens dann zum Einsatz, wenn Hinweise auf eine Osteoporose oder eine Fraktur, die ins oben beschriebene Schema passen, vorliegen⁵⁰. DEXA dient außerdem der Verlaufsbeobachtung einer Osteoporosetherapie und zum Monitoring bei rheumatischen Erkrankungen, die bekanntermaßen (besonders durch Langzeitgabe von Glukokortikoiden) zu Knochenverlust führen können^{62,137}. DEXA ist die Referenzmethode, um die Knochendichte (bone mineral density, BMD) äußerst exakt, reproduzierbar und präzise zu bestimmen^{62,179}. Eine Herausforderung für DEXA Messungen sind Patienten mit großem Weichteilmantel¹⁷⁹.

Bei der DEXA Messung ist es entscheidend, wie weit das ermittelte Ergebnis der BMD, von den Normmittelwerten der sogenannten peak bone mass (PBM) eines gesunden Kollektivs abweicht⁵⁰. Die PBM ist der Zeitpunkt, an dem die höchste individuelle Knochenmasse vorhanden ist, dies ist meist einige Jahre nach dem Epiphysenschluss junger normalgewichtiger Menschen der Fall⁹³. Die PBM ist also der Zeitraum, in welchem die größte je gebildete Knochenmasse bei jungen gesunden Menschen des gleichen Geschlechts vorliegt^{74,161}. Frauen haben eine geringere PBM als Männer und verlieren mit dem Sistieren ihrer Gonadenfunktion, der Menopause, auch mit einer höheren Rate an Knochenmasse, als dies bei gleichalten Männern der Fall ist⁹⁹.

Aus der Sicht der Ingenieurwissenschaften ist die Stärke einer Struktur ungefähr das Quadrat der Dichte der Struktur, weshalb die Knochenflächendichte in $[\frac{g}{cm^2}]$ ein guter Surrogatparameter für die Knochenstärke ist⁹³. Der mit DEXA ermittelte T-Wert ist ein Vergleichswert einer individuellen Messung mit dem Mittelwert der BMD eines gesunden Vergleichskollektiv (gleiche Hautfarbe und bestenfalls gleiches Geschlecht), ausgedrückt in Standardabweichung^{12,74,179}. Das Vergleichskollektiv für die Messung des proximalen Femur bzw. Femurhals sollte nach ISCD (International society for clinical densitometry) Kriterien die Datenbasis der T-Scores der NHANES III-Studie sein, welche die BMD 20- 29 jähriger kaukasischer Frauen untersuchte²¹⁰. Dieses Vergleichskollektiv kann laut ISCD sogar für Patienten aller ethnischen Gruppen verwendet werden²¹⁰.

Für die Messung der Wirbelsäule empfiehlt die ISCD die Benutzung von Daten der Gerätehersteller^{49,210,50}. Anhand der mit DEXA ermittelten BMD konnten die Folgen von Frakturen und mit Behinderung gelebten Jahren („years lived with disability“) weltweit erfasst und ausgewertet werden¹⁹⁴. Die BMD ist wahrscheinlich zu einem Großteil genetisch festgelegt, kann aber auch durch Umweltfaktoren wie Lebensstil, Aktivitätsgrad und Ernährung beeinflusst werden²²¹. Eine mehr als -2,5-fache Standardabweichung der BMD von der Norm zeigt eine Osteoporose an¹⁷⁹. Eine Osteopenie wird bei einem T-Wert von -1,0-facher bis -2,5-facher Standardabweichung vom Mittelwert diagnostiziert, siehe hierzu Tab.2.1-c¹⁷⁹.

Als manifest bezeichnet die WHO eine Osteoporose erst, wenn es zusätzlich zu einer Fraktur gekommen ist, die einen klaren Zusammenhang zur Osteoporose hat¹⁷⁹. Unterhalb von einer -1,0-fachen Standardabweichung liegt ein Normalbefund vor⁷⁴. Der ebenfalls gebräuchliche Z-Wert dient dem rein deskriptiven Vergleich bei gleichalten Menschen des gleichen Geschlechts und hat keine routinediagnostische Bedeutung.

Tab.2.1-c: T-Wert-Standardabweichungen, zur Beurteilung des Osteoporosegrades

T-Wert	Knochendichte
Unter -1,0 SD	Normalbefund
-1,0 bis -2,5 SD	Osteopenie
Ab -2,5 SD	Osteoporose
Ab -2,5 plus Fraktur	Schwere Osteoporose

Quelle: ¹⁷⁹

Die Epidemiologie der Osteoporose konnte aus Hochrechnungen von Krankenkassendaten beurteilt werden. Die Osteoporose betrifft beide Geschlechter¹². In der Bundesrepublik Deutschland lebten im Jahr 2009 ca. 6,3 Millionen an Osteoporose erkrankte Menschen, von denen 1,1 Millionen Männer und 5,2 Millionen Frauen waren. Für die Altersgruppe ab 50 Jahren ist das Risiko zu erkranken besonders hoch, denn ab dieser Lebensphase ist jeder 17. Mann und jede 4. Frau von Osteoporose betroffen. Allerdings haben postmenopausale Frauen ein dreifach so hohes Risiko für eine osteoporoseassoziierte Hüftfraktur im Vergleich zu Männern hohen Alters⁷⁸. Nach Geburt eines Kindes führt die Laktation zu einer Abnahme der BMD, die sechs Monate nach dem Abstillen nur teilweise ausgeglichen werden kann².

Dies bedeutet, dass das Stillen den Calcium-Haushalt der Mütter stark in Anspruch nimmt und eine Postpartum-Osteoporose begünstigen kann (s.u.). Aus den Basisdaten der Studie von *Peyman et al.* ergibt sich, dass von den erkrankten Menschen innerhalb des dreijährigen Beobachtungszeitraums (2006-2009) mehr als 50% eine osteoporoseassoziierte Fraktur erlitten⁸⁷.

Ein mathematisches Modell von *Bleibler et al.* geht davon aus, dass sich die Zahl der osteoporoseassoziierten Frakturen allein in Deutschland vom Jahr 2010 bis 2050 von ca. 115.000 auf 270.000 Fälle pro Jahr mehr als verdoppeln und sich die Kosten von 1,0 Milliarden auf 6,1 Milliarden versechsfachen werden²¹. Daraus lässt sich die sozioökonomische Bedeutung ableiten, welche in Zukunft offenbar zunehmen wird.

Die Betrachtung der globalen Prävalenz im Blick sei ergänzend erwähnt, dass bei einer Untersuchung der Bevölkerung mit weißer Hautfarbe feststellbar ist, dass 15% der Frauen über ihrem 65. Lebensjahr an einer erkennbaren Osteoporose leiden. Außerdem haben sich 30% der Bevölkerung mit weißer Hautfarbe bis zu ihrem 75. Lebensjahr eine Fraktur zugezogen, die durch die Folgen einer Osteoporose entstand¹⁶¹.

Der Interimsreport der WHO schätzt das Lebenszeitrisko von Frauen kaukasischer Abstammung, eine osteoporoseassoziierte Hüftfraktur zu erleiden, auf 15% ein⁷⁸. Beim Vergleich des Lebenszeitriskos kaukasischer Frauen für osteoporoseassoziierte Hüftfrakturen zu dem von Menschen schwarzer Hautfarbe, ergibt sich für Menschen schwarzer Abstammung ein 33%iges, für Asiaten und Menschen hispanischer Abstammung ein 50%iges Risiko. In der „Global Burden of Disease Study“ von 2013 wird die Osteoporose nicht als eigene Krankheit aufgelistet. Die Osteoporose ist vielmehr subsumiert als Ursache von pathologischen Frakturen, welche Bestandteil der Risikofaktoren für das Spektrum muskuloskelettaler Erkrankungen sind. Muskuloskelettale Erkrankungen, Weichteilverletzungen inklusive Frakturen sind zusammengefasst für 20% aller im Jahr 2013 weltweit mit Behinderung gelebter Jahre (YLD, years lived with disability) verantwortlich²¹⁹. *Dunkley* schätzt die Zahl der weltweit von Osteoporose betroffenen Menschen auf 200 Millionen ein, und zählt die Osteoporose zu den zehn häufigsten Krankheiten¹².

Die pathologischen Entitäten (umschriebene Einheiten) der Osteoporose sind die primäre und die sekundäre Osteoporose¹².

Die primäre Form der Osteoporose (Typ 1 Osteoporose) tritt oft nach der Menopause der Frau und erst später im Leben beim Mann auf, ohne dass eine klare Ursache definiert werden kann (idiopathisch)⁹⁹.

Sie ist meist eine sogenannte high turnover (hoher Umsatz der Resorption) Osteoporose, da hier initial viel Knochenverlust eintritt.

Die sekundäre Form der Osteoporose ist die Entität, bei der die Ursache ergründet werden kann: hohe Dosierungen und Langzeittherapie mit Glukokortikoiden (iatrogene Ursache), Diabetes Typ 1 und 2, Hyperparathyreoidismus (endokrin), Hypophosphatasie, Osteogenesis imperfecta, Marfan- und Ehlers-Danlos-Syndrom (hereditär), rheumatische Erkrankungen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, rheumatische Arthritis (immunogen), Alimentation, Tumorassoziiierung (z.B. Plasmozytom; myelogen), aber auch chronische Nierenerkrankung (komplexe Osteopathien), oder körperliche Inaktivität können der Grund für eine Osteoporoseerkrankung sein¹⁸⁰. Seltene Formen sind die juvenile, die Schwangerschafts-assoziierte und die Postpartum- Osteoporose^{74,187}.

Zusätzlich wird eine senile Osteoporose (Typ 2 Osteoporose) beschrieben, die durch eine allgemeine Zellarmut und daher als low-turnover (geringer Umsatz der Resorption/ des Remodeling) Typ mit geringen Maxima des Knochenverlusts assoziiert ist^{41,99}.

Beeinflussbare Risikofaktoren der Osteoporose, bzw. ein Risiko für eine geringe BMD, sind das Rauchen, Alkoholismus, unzureichende Calciumzufuhr, geringe körperliche Aktivität und Vitamin D Mangel^{93,179}.

2.1.1 Therapie

Für die Osteoporosetherapie kommen anti-katabole, anabole und antikatabol-anabole Wirkmechanismen zum Einsatz. Die Gruppe der anti-katabolen Medikamente wird von Bisphosphonaten, Antikörpern gegen RANKL (Denosumab) und selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) gebildet. Anabol wirkt die intermittierende Gabe von Parathormon (PTH); außerdem gibt es einen Antrag auf FDA- Zulassung eines Antikörpers gegen Sclerostin (Romosozumab©)^{48,191}. Der duale antikatabol-anabole Wirkmechanismus kommt bei der oralen Gabe von Strontium zum Tragen, bzw. wird darauf weiter unten besonders eingegangen, Vitamin D3 ist sowohl für Knochenauf- wie auch -abbau von Bedeutung^{126,178}.

Für die Therapie der postmenopausalen Osteoporose sind aktuell die Wirkungen von Alendronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat, Bazedoxifen, Denosumab, Östrogenen, Teriparatid (rhPTH), Parathormon, Raloxifen und (mit der DVO Leitlinie Osteoporose aus dem Jahr 2014) ehemals Strontiumranelat am stärksten evidenzbasiert gesichert und daher durch die DVO Leitlinie 2017 empfohlen^{49,50}. Diese Medikamente reduzieren das Auftreten von Frakturen über mindestens drei Jahre⁴⁹. Anders ausgedrückt liegt die Number needed to treat (NNT) über 3 bis 5 Jahre zwischen 13 bis 22 Patienten⁵⁰. Die Osteoporosetherapie bei Männern stützt sich auf Bisphosphonate und Teriparatid. Sekundäre Osteoporosen werden ebenfalls mit Bisphosphonaten und Teriparatid und zusätzlich noch mit Denosumab (nach Hormonablation der Männer mit Prostata-Carcinom) behandelt^{49,50}.

2.1.2 Anti-katabole Medikamente

Bisphosphonate (BP) sind eine der wichtigsten Medikamentengruppen zur Behandlung der Osteoporose. Sie hemmen die Aktivität der Osteoklasten, können die Knochenmasse erhöhen, während die Frakturrate gesenkt wird^{12,117}. BP sind stabile Abkömmlinge des anorganischen Pyrophosphats. Bisphosphonate der zweiten Generation sind sehr hydrophil, daher gelangen sie im Magen-Darm-Trakt nur durch parazellulären Transport in den Kreislauf. Lediglich 50% der absorbierten Menge BP gelangt in den Knochen. BP der zweiten und dritten Generation enthalten stickstoffhaltige Seitenketten, die an einem Enzym (s.u.) des Osteoklasten binden und somit deren Aktivität inhibieren. Sie stören den Stoffwechsel der Osteoklasten, indem sie die Posttranslationale Modifikation (PTM), respektive die Isoprenylation von Proteinen im Mevalonsäure-Signalweg (Cholesterinbildung) im Enzym Farnesyl-pyrophosphat-synthetase hemmen. Die Faktoren Rab, Rac, Rho, welche GTP binden, erhalten daher keine PTM, dies führt zum programmierten Zelltod (Apoptose) der Osteoklasten⁵⁸. Vor einer Bisphosphonattherapie muss zwingend ein Zahnstatus erhoben und eine zahnärztliche Unbedenklichkeit ausgesprochen werden, da es unter BP zu einer Kieferknochennekrose (BP associated osteonecrosis of the jaw BP-NOJ) kommen kann. Im Kollektiv der Osteoporosepatienten mit BP-Therapie betrifft eine BP-NOJ 0,1% aller Behandelten¹¹⁷. Die Folge sind Zahnverlust und gefährliche Fistelbildungen. Für einige BP wird eine zehnjährige Halbwertszeit im Knochengewebe angenommen⁵⁸.

Der RANKL Antikörper Denosumab verhindert die Differenzierung von Präosteoklasten zu Osteoklasten, was zu einer Verminderung der vertebrealen-, der Hüft- und der nicht-vertebralen Frakturen führt. Es fehlen hier derzeit allerdings noch Langzeitstudien^{209,117}.

Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) wirken hemmend auf den Knochenabbau, Levormeloxifen konnte nach 12-monatiger Behandlung bestimmte Knochenresorptionsmarker um 50% senken¹¹⁸. SERMs haben jedoch eine leichte Erhöhung thromboembolischer Vorfälle zur Folge¹¹⁷.

2.1.3 Anabole Medikamente

Zu den knochenbildenden Medikamenten zählt rekombinantes humanes PTH (rhPTH 1-34). Die Gabe erfolgt intermittierend, nur so kann neuer Knochen gebildet werden¹¹⁷. Das rhPTH 1-34 reduziert vertebrale und periphere Frakturen, wobei es maximal 24 Monate angewendet werden darf^{5049,117}.

Jüngst ist der monoklonale Antikörper Romosozumab klinisch getestet worden, er erkennt und bindet das Protein Sclerostin (Scl). Die Wirkung ist osteoanabol, da Romosozumab zu einer Erhöhung der Knochenbildung, Knochenmasse und Knochenstärke führt. Romosozumab hatte vorerst aufgrund ungeklärter kardiovaskulärer Nebenwirkungen keine Zulassung erhalten¹⁹¹. In der FRAME Extension Studie wurden hingegen keine kardiovaskulären Nebenwirkungen festgestellt, eine Zulassung von Romosozumab steht noch aus¹²⁹.

2.1.4 Dualer Wirkmechanismus

Strontium hat eine anabole und anti-katabole Wirkweise. Das Medikament Strontiumranelat besitzt eine einzigartige Fähigkeit, nämlich das Ungleichgewicht der Osteoporose hin zu einer positiven Knochenbilanz zu wenden. Dies geschieht über eine Inhibierung der Osteoklastendifferenzierung und eine Steigerung der Osteoblastendifferenzierung^{25,90,126,192}. Der Vertrieb wurde durch den Hersteller aufgrund seines kardiovaskulären Risikoprofils im August 2017 eingestellt²⁴.

2.1.5 Vitamin D

Vitamin D3 scheint positive Effekte auf die Heilung bei proximalen Femurfrakturen zu haben⁵⁶. Vitamin D3 soll seine volle Wirkung nur in Verbindung mit einer Calcium-Supplementierung entfalten können¹⁷⁸. Es wird angenommen, dass die Bildung von RANKL durch Osteozyten und Osteoblasten durch tägliche Gabe des Vitamin D3 verringert, und der Calciumhaushalt durch die Wirkung des Vitamin D3 auf seinem Optimum konstant gehalten wird. Die Wirkung von Cholecalciferol *in vitro* widerspricht der Wirkung *in vivo*. *In vitro* stimuliert Cholecalciferol die Osteoklastogenese und RANKL Produktion. *In vivo* wird hingegen eine hemmende Wirkung auf Osteoklasten-, sowie eine positive Wirkung auf RANKL-negative Zellen der Osteoblastenzelllinie postuliert^{178,207}.

2.1.6 Calcitonin

Calcitonin wird von den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und kann als Gegenpart des Parathormons aus den Nebenschilddrüsen verstanden werden. Der Calcitonin Rezeptor befindet sich auf den Osteoklasten. Calcitonin hemmt die Osteoklastenaktivität und hat somit eine antiosteolytische Wirkung. Außerdem wird Calcitonin bei Malignomerkrankungen zur Reduktion der Hypercalcämie eingesetzt. Die Darreichungsform als Nasenspray ist vom Markt genommen worden, da es zu einer generellen Erhöhung des Risikos der Malignombildung führte^{209,117}. Das Calcitonin des Lachses ist die häufigste Ausgangssubstanz, und wird subkutan und intramuskulär appliziert. Die Applikation „per os“ wird derzeit klinisch erprobt. Eine Off-Label Anwendung nach Wirbelkörperfrakturen und tumorassoziierten Osteolysen kann zur Reduktion von Schmerzen beitragen.

2.2 Anatomische Beschreibung des Knochens und seiner Matrixbestandteile

Das Skelett besteht aus etwas mehr als 200 Knochen und hat einen Anteil an der fettfreien Masse (das sind individuell zwischen 55-96% vom Gesamtkörpergewichts) von 16%, was in etwa dem Gewicht der Haut entspricht^{5,108,176}. Das Knochengewebe zählt zu den Binde- und Stützgeweben. Während die äußere Gestalt genetisch festgelegt zu sein scheint, ist die Feinstruktur maßgeblich durch den Grad der Belastung bestimmt. Diese Feststellung wird als das *Wolffsche Gesetz*, bezeichnet⁵. Die Knochen gewährleisten neben ihrer Stützfunktion den Schutz der inneren Organe, ermöglichen die Fortbewegung und halten durch Bereitstellung von Calcium den Mineralhaushalt aufrecht, zudem können sie Wachstumsfaktoren aus ihrer Matrix freisetzen und dienen ab der Geburt als wichtigster Ort der Blutbildung sowie als Entstehungsort der Vorläufer von B- und T-Zellen des Immunsystems^{28,48}. Knochen setzt sich zusammen aus der Knochengrundsubstanz mit ihren organischen- und anorganischen Anteilen und den Knochenzellen. Zu Recht gilt der Knochen daher als ein Verbundmaterial²⁸. Grundsätzlich sind beim Menschen zwei Arten von Knochen, Geflecht- und Lamellenknochen, zu unterscheiden.

Geflechtknochen, synonym auch als Faserknochen bezeichnet, ist dadurch charakterisiert, dass die Kollagenfasern (Typ 1) in ihrem Verlauf ungeordnet nebeneinanderliegen. Bis zum ersten Lebensjahr wird der embryonal gebildete Faserknochen mehr und mehr durch Osteone (s.u.) ersetzt, und dadurch zu Lamellenknochen umgebaut. Bei adulten Menschen findet sich mancherorts noch ein natürlicher Rest des Geflechtknochens, zum Beispiel im knöchernen Part des Innenohrlabyrinths. Außerdem ist eine sekundäre Frakturheilung durch die Kallusbildung aus Geflechtknochen charakterisiert, der erst nachfolgend durch Lamellenknochen ersetzt wird.

Lamellenknochen ist die hochorganisierte Form des Knochengewebes. Die Grundsubstanz aus mehrheitlich Kollagen Typ 1 Fasern liegt schichtweise um ein gemeinsames gefäßführendes Zentrum, dem Havers'schen Kanal. Das Besondere ist, dass die Kollagenfasern einer Schicht die gleiche schraubenartige und parallel verlaufende Struktur aufweisen. Ebenso ist die nächste aufgelagerte Schicht schraubenartig und parallel verlaufend strukturiert, aber deren Drehrichtung ist entgegengesetzt zur vorigen. Diese Abfolge der wechselnden Orientierung der Kollagenfibrillen ermöglicht die hohe Festigkeit des Knochens. Bis heute ist unklar, wie die Osteoblasten diesen präzisen Mechanismus der Kollagenablagerung, mit Ähnlichkeit zur Sperrholzstruktur, bewerkstelligen⁴⁴.

Die Schichtabfolge wird auch als Lamellenstruktur (Lamellae) bezeichnet. Das Periost ist die zweischichtige Knochenhaut, die alle Knochenaußenflächen bedeckt. Hierin findet man Blutgefäße, Osteoprogenitorzellen und Nervenfasern. Innerhalb des von der Kompakta umschlossenen Knochenvolumens findet man die Spongiosa, eine trabekuläre (bälkchenartige) Knochensubstanz.

Die Lamellen der Spongiosa sind flächig übereinander gelagert, und gleichen makroskopisch einem Schwamm.

Die Spongiosa bildet ein Hohlraumsystem (Cavitas medullaris) aus, in welchem das rote blutbildende Knochenmark (Medulla ossium) geschützt liegt. In langen Röhrenknochen gibt es die Besonderheit, dass das Knochenmark stärker fetthaltig ist und nur wenig zur Blutbildung beiträgt. Dieser Umstand verstärkt sich physiologisch bei Menschen in der Seneszenz.

Das Verhältnis von corticalem zu spongiösem Knochen liegt bei 9:1, wobei pro Jahr 3% des corticalen, aber 30% des spongiösen Knochens einem Umbau unterliegen¹⁰⁸. Insgesamt ergibt das ca. 6% Umwandlungsrate im Skelett pro Jahr. Der Knochen hat durch seine dichte äußere Corticalis und die schwammartige innere Trabekelstruktur eine optimale Leichtbauweise, bzw. ein austariertes Verhältnis von Gewicht zu Härte⁴⁸.

Der Vorteil der Leichtbauweise dient dem Zweck, eine dichtere und mehr krafttragende äußere Hülle zu erhalten, welche ein weniger dichtes, leichtes Inneres umschließt und somit schützt¹⁵¹.

In der Kompakta ist die kleinste histologische und funktionelle Einheit das Osteon. Es besteht aus unter 20 Knochenlamellen, ist etwa kreisrund und misst 100-400 µm im Durchmesser. Das Osteon liegt um einen Havers'schen Kanal, welcher ein im Kanal befindliches Havers'sches Gefäß beherbergt. Die Osteone sind, wie weiter oben beschrieben, konzentrisch um diese Zentralstruktur angeordnet. Für die Durchblutung des Knochens tritt proximal exakt ein großlumiges Gefäß (Arteria Nutricia) durch die Kompakta in die Diaphyse ein und verzweigt sich zuallererst in die Mikrogefäße im Knochenmark. Diese versorgen die Spongiosa, die für sich genommen ohne eigene Gefäße ist und nur durch Diffusion erreicht wird. Der Knochen ist deswegen gut durchblutet, da er der Ort der Blutbildung ist und als Mineralsalzreservoir für die Calciumhomöostase dient.

Die Spongiosa hat eine maximale Dicke von höchstens 300µm, was einen ausreichenden Transport zu den Osteozyten sicherstellt. Anschließend ändern die Gefäße ihren Verlauf und wenden sich zurück zur Versorgung der longitudinal zur Knochenachse verlaufenden Havers'schen Gefäße. Untereinander sind die Havers'schen Gefäße durch rechtwinklig zu ihnen verlaufende Volkmann Kanäle (Canales perforantes), die ebenfalls ein arterielles Gefäß enthalten, verbunden.

Das Periost und Endost wird gleichfalls durch Volkmann-Kanäle und deren Gefäße erreicht und so an die Blutversorgung angeschlossen.

Das Endost bedeckt sämtliche inneren Oberflächen; es beherbergt humane mesenchymale Stromazellen (hMSCs), Osteoprogenitoren und reife ruhende Osteoklasten und -blasten. Das Endost ist daher ein wichtiges Reservoir für alle Arten des Knochenumbaus.

Die Zellen des Knochens sind Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und die Osteomacs. Der enorme Freiraum zwischen diesen Zellen wird von einer Extrazellulärmatrix gebildet. Die Extrazellulärmatrix besteht aus fibrillärem Typ 1 Kollagen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen sowie Hydroxylapatitkristallen und enthält eine geringe Menge gebundener Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF1) und Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs)⁴⁸.

Die feste Phase des Knochens wurde 1926 durch *de Jong* mittels Röntgen Diffraktometrie als kristallines Calcium Phosphat erkannt¹¹⁰. Dieser Nachweis konnte in den Folgejahren analytisch bestätigt werden. Stöchiometrisch ist der hexagonale Kristall aus Hydroxylapatit folgendermaßen zu beschreiben: $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ^{28,36}. Spuren von Magnesium, Fluor, Kalium und Karbonaten sind nachgewiesen worden. Der Gewichtsprozentanteil des Knochens ergibt eine Zusammensetzung von ca. 65% aus mineralischen Bestandteilen und zu 35% aus organischen Anteilen des Trockengewichts von Knochen. Die organische Masse beinhaltet ungefähr 25% Wasser, betrachtet man das Knochen-Feuchtgewicht. Es befinden sich nur wenige Prozent Fett in der Knochenmatrix⁵.

Nicht kollagene Proteine des Knochens wie Osteonektin, Osteocalcin, Knochen-Sialoprotein 2 (Bone sialoprotein, BSP), Osteopontin (OPN), Knochen morphogenetische Proteine (Bone morphogenetic proteins: BMPs), Hyaluronan, MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein), TNAP und Proteoglykane (Decorin und Biglykan, beides SLRPs, small leucin rich proteins), machen zusammen circa 5% des Proteinanteils aus²⁸. Osteocalcin ist das häufigste nicht kollagene Knochenprotein²⁶. Bone sialoprotein ist ein Promoter der Nukleation (Keimbildung), der zur Mineralisierung führt. Decorin und Biglycan binden TGF- β , ein Zytokin der Zelldifferenzierung. MEPE als löslicher Faktor hat vermutlich eine Funktion bei der Inhibierung der Osteoklastogenese¹²³. Es befindet sich auch ein exogen entstandener Proteinanteil von Serumalbumin in der Matrix, der anteilig nur wenige Prozent ausmacht.

Den Großteil des Kollagenanteils (90% der organischen Phase) bildet Typ 1 Kollagen, es finden sich allerdings auch Spuren von Typ III, V und FACIT Kollagen (Fibrillen assoziiertes Kollagen mit unterbrochener Tripelhelix). FACIT Kollagene sind Brückenkollagene.

Diese Funktion können sie aufgrund ihrer absichtlich gestörten Tripelhelixanordnung wahrnehmen⁴⁴. Der Knochen ist ein biologischer **Verbundstoff**, in dem die organischen Anteile ein Gerüst für die Nukleation von Hydroxylapatit bilden.

Ähnlich wie ein mit Stahl armierter Beton ist Knochen einerseits durch den Kristallanteil druckfest, andererseits aufgrund der Kollagenfibrillen zugfest. Die Triphelixstruktur des Kollagens entsteht aus Prokollagen 1, welches durch die Osteoblasten gebildet wird. Die einzelnen Fibrillen lagern sich selbstständig zusammen und agglomerieren zu immer größeren Fibrillen²⁸.

Die Verbindungen zwischen den Kollagenfibrillen akkumulieren im Alterungsprozess neben physiologischen enzymatischen (bspw. Pyridinolin) auch nicht-enzymatische cross-links aus advanced-glycation-endproducts (AGEs); das führt zur Zunahme der altersbedingten Matrixsteifigkeit²⁸. Die enzymatischen cross-links werden bei Knochenresorption freigesetzt und eignen sich bedingt als Marker des Knochenabbaus⁶⁷.

AGEs, also nicht-enzymatische cross-links, sind ein Phänomen der endogenen Glykation wenn Lipide oder Proteine mit Kohlenhydraten reagieren (dies wirkt sich negativ auf die Tragfähigkeit und Festigkeit des Knochens aus)²⁸. Die Glykosaminoglykane und Proteoglykane scheinen eine wichtige Rolle für die Festigkeit und die Biegsamkeit des calcifizierten Gewebes zu spielen²⁰. Die Präosteoklasten sind auf Osteopontin (OPN), als Verankerung angewiesen¹⁸⁴. Die Präosteoklasten binden über OPN, ein Knochenmatrixprotein, das eine RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparagin) enthält, an Integrinrezeptoren ($\beta 1$ und $\alpha \nu \beta 3$), die in der Osteoklastenmembran verankert sind^{61,113}. OPN interagiert mit der Extrazellulärmatrix auch über Kollagen Typ 1¹⁸⁵. Zu den RGD enthaltenden Proteinen gehören außerdem Bone sialoprotein (BSP), Dentin Matrixprotein 1 (DMP1), Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) und Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)⁶⁸. Diese Proteine, OPN, DMP1, BSP, DSPP und MEPE, gehören zur Familie der SIBLING-Proteine (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein); sie sind äußerst flexibel und binden rasch an verschiedene Strukturen.

Unter anderem haben sie die Funktion andere Proteine und/-oder die Mineralphase in Knochen und Zähnen zu überbrücken und so mit diesen Bindungspartnern einen biologisch aktiven Komplex zu formen^{18,69}.

Die SIBLING-Proteine sind lösliche, sekretierte Proteine, die über Integrine auch autokrine und parakrine Funktionen wahrnehmen¹⁸. Alle SIBLING-Proteine sind als

starke Bindungspartner des Hydroxylapatit bekannt⁶⁹. Die Matrixproteine scheinen allgemein einen regulatorischen Einfluss auf Zellbindung und Mineralisierung des Knochens zu haben.

2.2.1 Osteoblasten Zelllinie

Das Skelett erwachsener Menschen befindet sich in einem kontinuierlichen Abbau-, Aufbau- und Umbauprozess, dem sogenannten Remodeling¹⁸⁷. Dies ist ein Prozess, welcher durch die Koordinierung des Aktivitätsgrades von Osteoblasten, Osteoklasten und deren Vorläufer- sowie Nachfolgerzellen gesteuert wird. Das Remodeling des Knochens geschieht an abgegrenzten Bereichen vielerorts im gesamten Skelett⁸³. Innerhalb eines beliebigen abgegrenzten Bereiches dauert der Umbau mehrere Monate, und dient dazu, den Knochen zu ersetzen^{139,83,139}. Die Osteoblasten überleben einige Wochen. Die aktiven Formen der am Umbau beteiligten Zellen finden sich an weniger als 10% der Knochenoberfläche. Das Remodeling findet sich bei erwachsenen Menschen häufiger als das im Folgenden beschriebene Modeling. Der Begriff Modeling beschreibt die Anpassung des Knochens auf geänderte biomechanische Belastungsansprüche, es findet auch statt während der Wachstumsphase junger Menschen und ist entscheidend für die Umformung von Geflecht- in Lamellenknochen⁴⁴. Modeling ist dadurch gekennzeichnet, dass Osteoblasten und Osteoklasten getrennt voneinander aktiviert sind.

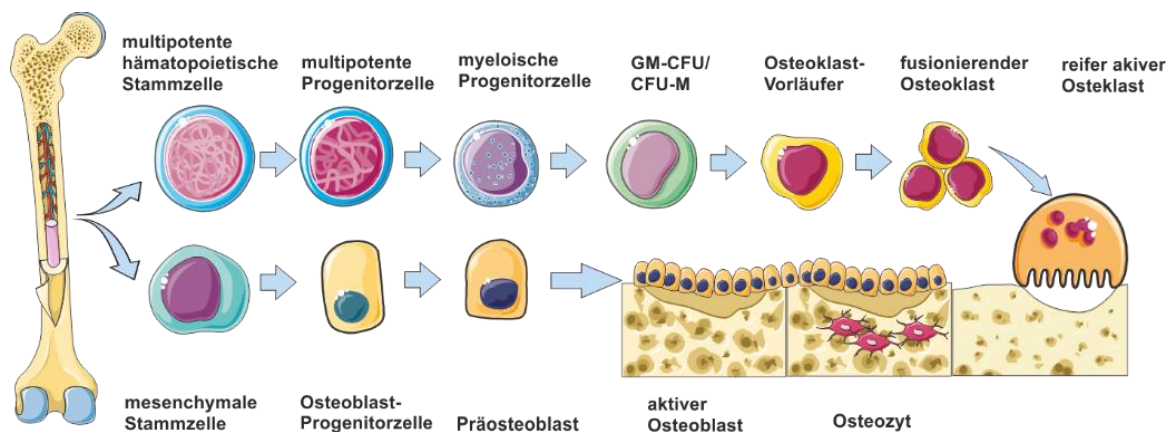


Abbildung 1: Knochenzelllinie von der multipotenten hämatopoietischen Stammzelle, bzw. mesenchymaler Stammzelle zum Osteozyten bzw. Osteoblasten (Eigenentwurf)

Osteoblasten entstehen aus multipotenten Bone marrow derived stromal cells (BMSCs). Diese Stammzellen sind in der Lage, sich über Osteoblasten Vorläuferzellen, Präosteoblasten und sekretorische Osteoblasten zu Osteozyten zu differenzieren (s. Abbildung 1). Außerdem können sich BMSCs zu Adipozyten und Chondroblasten differenzieren⁵⁷.

Osteoblasten-Progenitorzellen finden sich im Periost, Endost und den Havers-Kanälen. Sie sind mesenchymaler Herkunft. Sie stellen ein Zellreservoir dar, aus dem bei der Notwendigkeit von Knochenumbauprozessen, z.B. einer Frakturheilung oder veränderter Beanspruchung des Skeletts zuerst Präosteoblasten, dann Osteoblasten und zuletzt Bone Lining cells sowie Osteozyten differenzieren⁶⁵. Bone lining cells bedecken den endostalen Knochen und liegen unter dem Periost, während diese Lokalität aktuell keinen Auf- oder Abbau erfährt, weil sie sich in einer ruhenden Phase befinden. Sie sind vermutlich eine Art Blut-Knochenschranke, weil sie am Zu- und Abfluss von Ionen in die extrazelluläre Flüssigkeit des Knochens mitwirken⁷². Bone-lining-cells stehen über Cadherine mit Osteoblasten in direktem Kontakt.

Die aktiven Osteoblasten sind kubisch geformte einkernige Zellen¹⁰⁷. Da sie die Matrixproteine des Knochens sezernieren, exprimieren sie im hohen Maß die hierzu benötigten Zellorganellen von proteinbildenden Zellen. Diese sind das raue Endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat⁷². Als Bestandteile des Endosts liegen die Osteoblasten perlschnurartig aufgereiht auf einer Matte von unmineralisiertem Knochengewebe (Osteoid), wobei sie wenige Prozent der Knochenoberfläche bedecken. Jeder neue Knochen wird zuerst aus einem unmineralisiertem Geflecht, dem Osteoid, aufgebaut, welches hauptsächlich aus Kollagen Typ 1 und in geringerem Maße Typ 4 Kollagen besteht.

Neben dem Kollagen wird das Osteoid auch aus Glukosaminoglykanen sowie einigen Glykoproteinen gebildet. Die Proteine des Knochens sind für dessen Härte und das Elastizitätsmodul entscheidend. Fehlen die Proteoglykane und Glykosaminoglykane, dann verliert der Knochen an Tragkraft²⁰.

Osteoblasten sind polarisierte Zellen, die ihre sekretorischen Vesikel auf die naszierende (im Entstehen begriffene) Knochengrundsubstanz geben. Es sind die Osteoblasten, welche den Kristalisationskeim zur Biomineralisierung auf die Matrix des Osteoids geben. Die Vesikel beinhalten die ersten vorgeformten Kristalle aus Hydroxylapatit, die innerhalb des Vesikels anwachsen, bis sie diese rupturieren (zerreißen) und sich frei an die Kollagenfasern anlagern können.

Auf der Außenseite der Vesikelmembran befindet sich das gewebeunspezifische Enzym alkalische Phosphatase (TNAP). Osteoblasten nutzen für die Biomineralisierung des Knochens TNAP¹⁰⁹.

Das Enzym TNAP spaltet anorganische Pyrophosphate und organische Phosphate wodurch die hemmende Wirkung auf die Biomineralisation des Knochens aufgehoben wird. Deswegen stehen anorganische Phosphate für die Synthese von Hydroxylapatit zur Verfügung¹⁶⁷. TNAP eignet sich daher als ein Osteoblasten Differenzierungsmarker.

Osteoblasten kommunizieren mit den sogenannten Osteozyten mittels Zell-Zell Kontakten⁵¹. Die Osteozyten stellen mit über 90% die mengenmäßig größte Zellart des Knochengewebes dar^{19,48,188}. Osteozyten sind die Osteoblasten, welche sich selbst erfolgreich mit Knochensubstanz eingebaut haben und wichtige Aufgaben der Signalvermittlung über den Knochenzustand an andere Zellen weitergeben. Man nennt die Osteozyten, welche als Marker CD44 besitzen, daher auch die terminale Stufe der Osteoblastendifferenzierung. Die Ausbildung von bis zu 50 Dendriten pro Osteozyten geschieht in der Phase des Überganges vom Osteoblasten zum Osteozyten. Das Protein E11/gp38, auch Podoplanin genannt, wird mit der Veranlassung der Ausbildung von den Dendriten in Verbindung gebracht⁷². Die Osteozyten gelten als Taktgeber des Remodeling indem sie Osteoblasten und Osteoklasten regulieren und den Reiz mechanischer Belastung des Skeletts über adaptive Knochenumbauvorgänge beantworten^{51,187}.

Mit Trage- und Scherkräften (shear stress) belastete Osteozyten veranlassen das Abwandern von Osteoklasten aus dem betreffenden Knochenareal¹⁹⁹.

Ihrer zentralen Rolle im Remodeling des Knochens ist erst im letzten Jahrzehnt wissenschaftlich Rechnung getragen worden, da neue Ergebnisse Hinweise dazu lieferten.

Osteozyten sind trotz ihrer Abstammung aus der osteoblastären Zelllinie zu einer gewissen Osteolyse fähig⁴⁴.

Die osteozytären Zellkörper liegen in kleinen Höhlen des Knochens, den Lacunae. Die Osteozyten bilden ein funktionelles Synzitium, indem sie über dendritische (baumartig verzweigte) Zellausläufer in den Canaliculli (Kanälchen zwischen den Lacunae) untereinander kommunizieren¹³⁹.

Die Zellfortsätze stehen über Connexin 43 enthaltende Gap junctions im Austausch¹⁹. Hierdurch wird ein verzweigtes Hohlraumsystem gebildet, das den Transport von Signalmolekülen einiger kDa Größe ermöglicht.

Die Fortsätze erreichen die Osteoblasten und -klasten und ziehen bis ins Periost und das Endost des kortikalen Knochens und auf die Oberflächen des trabekulären Knochens¹⁸⁷. Das Absterben von Osteozyten wird mit einer Verminderung der Knochenmasse in Verbindung gebracht¹⁹. Im Alter ist die Dichte von Osteozyten pro mm³ Knochen geringer als die Osteozytendichte junger Menschen¹⁵⁵. Die Fähigkeit der Osteozyten Scherkräfte in Signale umzuwandeln wird als Mechanotransduktion bezeichnet. Für die Qualität des Knochens ist die Vitalität, aber auch die gute Ausprägung der Konnektivität unter den Osteozyten von hoher Bedeutung¹¹⁹.

2.2.2 Osteoklasten Zelllinie

Die Osteoklasten sind knochenspezifische mehrkernige Riesenzellen (Syncytien), mit ca. 10 Kernen pro Zelle¹⁷. Osteoklasten sind eine Subspezies von phagozytierenden Zellen. Sie leiten sich von blutbildenden Stammzellen im Knochenmark ab¹⁷. Aus dem gemeinsamen Ursprung CD34⁺ (cd= cluster of differentiation, Nr. 34 positiv; cd= Unterscheidungsgruppe) multipotenter hämatopoietischer Stammzellen entstehen über myeloische Progenitorzellen, Myeloblasten (CFU= colony forming unit= Kolonie bildende Einheit; GM-CFU=Granulozyten Makrophagen; CFU-M=Monozyten) Monozyten und frühe Prä-Osteoklasten, sich fusionierende sogenannte späte Prä-Osteoklasten und abschließend die aktiven, polarisierten und mehrkernigen Osteoklasten (s. Abbildung 1)^{17,83}.

Osteoklasten machen nur wenige Prozent der Knochenzellen aus und gehen nach etwa zwei bis vier Wochen Aktivität in die Apoptose über. Die Osteoblasten benötigen für das Wiederauffüllen der Resorptionslakune etwa drei bis sechs Monate und gehen zu 50-70% in die Apoptose über, der Rest differenziert sich zu Osteozyten (s.o.)⁴⁴.

Dort wo der Knochen umgebaut oder abgebaut werden soll haften Osteoklasten mit ihrer apikalen Seite an. Sie bilden eine zirkuläre sealing zone (Haftzone, auch als Versiegelungszone bezeichnet) auf dem Knochen aus. Über eine Subform der Integrine ($\beta 1$ und $\alpha \beta 3$) kann eine gute Haftung der Osteoklasten an Knochenmatrixproteine der SIBLING-Familie, welche die RGD-Aminosäuresequenz enthalten (Arginin-Glycin-Aspartat), erfolgen^{69,113}. Diese Knochenmatrixproteine sind Bone Sialoprotein und Osteopontin (BSP, OPN)^{69,184}. Die sogenannte clear zone (freier Bereich) ist in der Betrachtung eines zweidimensionalen Schnittes durch einen aktiven Osteoklasten der

Bereich, in dem keine Organellen, sondern ein Aktinring vorliegt, der die Anheftung des Osteoklasten verstärkt.

Die Osteoklasten geben durch ihre stark gefaltete ruffled border (dt. Bürstensaummembran) Cathepsin-K, MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), Gelatinase, Protonen und reaktive Sauerstoffspezies (aus dem Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) auf das Knochengewebe⁷². Diese Kombination aus Protonen (der pH liegt bei ca. 4,5), welche die anorganischen Calcium-Komplexe auflösen, und proteolytischen Moleküle, welche die Proteine des Knochens degradieren (spalten), resorbiert den Knochen innerhalb der Versiegelungszone und löst nun dessen demaskierte (freiliegenden) organische Bestandteile enzymatisch auf. Derart angegriffen formt sich auf trabekulärem Knochen eine als Howship'sche Lakune bezeichnete Einbuchtung aus. Im Gegensatz dazu werden in die Kompakta des Knochens zylindrische Kanäle gebohrt. Die Versiegelungszone schützt die Umgebung außerhalb des Osteoklasten vor dessen sauren und denaturierenden Produkten. Die Abbauprodukte werden durch Endozytose in die Osteoklasten aufgenommen und vermittelt durch den Prozess der Transzytose nach basal, also auf die Osteoklastenrückseite und in die extrazelluläre Umgebung, befördert.

Die Bildung von Osteoklasten wird maßgeblich durch die zwei Zytokine M-CSF und RANKL angeregt²⁰⁸. RANKL ist ein Mitglied der TNF Superfamilie. Ein weiterer Knochenzelltyp aus der Reihe der Makrophagen dessen Funktion in einer positiven Osteoblasten Steuerung liegen könnte sind die Osteomacs. Sie befinden sich nahe bei aktiven Osteoblasten und können auch zu Osteoklasten werden⁴.

2.3 Knochenheilung

Die Knochenheilung ist ein vielschichtiger biologischer Vorgang, welcher durch eine genau regulierte Abfolge von Heilungsschritten charakterisiert ist¹⁸⁵. Es sind mehrere tausend Gene an diesen Vorgängen beteiligt¹⁴⁵. Die biochemischen und anatomischen Vorgänge sind sehr gründlich untersucht worden, um ein allgemeines Verständnis der Knochenheilung zu ermöglichen¹⁴⁵.

Unser Wissen über die Knochenheilung stammt zu einem Großteil von der Ursachenforschung über Krankheiten, die mit gesteigerter oder verminderter Knochenmasse einhergehen⁴⁸.

Knochen zählt zu den wenigen Geweben des menschlichen Körpers, die nach Zerstörung eine narbenfreie Ausheilung erreichen können. Diese Eigenschaft wird als *Restitutio ad integrum* bezeichnet^{66,100,132,145}. Im Allgemeinen heilen Frakturen innerhalb von sechs bis acht Wochen aus¹³². Stabile Verhältnisse können nur geschaffen werden, wenn osteogene Zellen, eine natürliche oder künstliche Gerüstmatrix, osteoinduktive Wachstumsfaktoren und eine optimale, anregende und dennoch schützende mechanische Umgebung bzw. mechanische Reize vorherrschen. Dies ist also ein viergliedriges Konzept, das als „diamond concept“ bezeichnet wurde^{66,79}.

Die Frakturheilung kann durch desmale und chondrale Ossifikation erfolgen⁴¹. Stabile Frakturen heilen eher durch desmale, instabile Frakturen durch chondrale Ossifikation aus. Es gibt Autoren, die eine Einteilung vornehmen in direkte (**primäre**) Heilung durch desmale Ossifikation einerseits und andererseits indirekte (**sekundäre**) Heilung, die sowohl desmale als auch chondrale Ossifikation beinhaltet¹³².

Bei der chondralen Ossifikation wird ein knorpelig vorgeformtes Modell des Knochens sukzessive durch Knochengewebe ersetzt⁴⁸. Die desmale Ossifikation läuft gänzlich anders ab. In der embryonalen Knochenentwicklung lässt sich dieser Typus der Knochenbildung an den flachen Knochen wie Schädel, Teilen der Mandibula und Klavikula beobachten. Verdichtete Mesenchymzell-Ansammlungen differenzieren sich zu Osteoid produzierenden Osteoblasten aus^{5,48}.

Bei instabilen Knochenbrüchen stellt die indirekte bzw. sekundäre Frakturheilung die häufigere Form dar, weil eine direkte Heilung eine anatomische Fixation, wie z.B. eine operative Osteosynthese mittels interner Platten etc. durch den Chirurgen erfordert^{66,139,145}. Daher wird auf die **sekundäre Frakturheilung** im Folgenden besonders eingegangen (s. Abbildung 2).

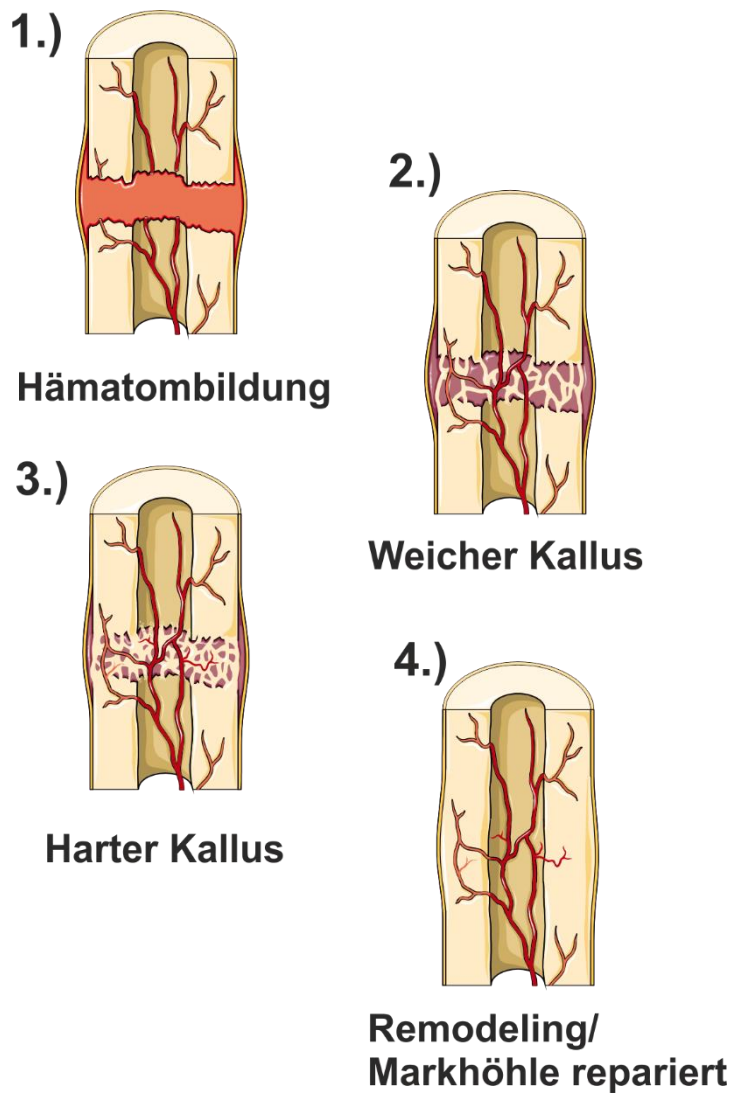


Abbildung 2: Stadien der sekundären Frakturheilung, zuerst erfolgt die Bildung von Hämatomgewebe, gefolgt von der Bildung des weichen Kallus, im Anschluss die Bildung eines harten Kallus, danach das Remodeling (Eigenentwurf)

Die Phasen der Frakturheilung überlappen einander und sind am ehesten als kontinuierlicher Prozess zu verstehen. Nach einem Trauma entsteht zunächst ein Frakturhämatom mit Entzündungsreaktion, das nahezu alle Faktoren für eine gute Knochenheilung enthält¹⁴⁵.

Bei instabilen Frakturen bildet sich ein Knorpelmodell, das als weicher Kallus (lat. Schwiele) bezeichnet wird. Aus diesem weichen Kallus bildet sich durch Vaskularisierung und (Bio-)Mineralisierung der Extrazellulärmatrix der harte Kallus aus⁴¹.

Ein Trauma ruft durch Verletzung von Knochen und angrenzenden Weichteilen zuallererst eine Phase der **Bildung von Hämatomgewebe** hervor, in dem sich

Knochenmarkzellen, peripheres und intramedulläres Blut befinden. Die Komplementkaskade wird aktiviert. Leukozyten, Lymphozyten, Blutplättchen Makrophagen und Osteoklasten werden aktiv und exprimieren unter anderem TGF- β , FGF, PDGF, IGF-1, BMP 2,4, und 7, Osteonectin IL-1, IL-6 und GM-CSF¹³². Ein gewisses Maß einer temporären und fein regulierten Entzündungsreaktion ist also notwendig, um den Heilungsprozess zu vollziehen. Diese Phase der Entzündung dauert bis zum siebten Tag nach Frakturereignis an^{66,132}. Humane mesenchymale Stammzellen werden durch stromal-cell-derived factor 1 und seinen Zielrezeptor auf hMSCs den CXCR-4-Rezeptor zur Migration in die betroffenen Areale angeregt (sogenanntes homing/Heimkehren, Zielfliegen)^{145,185}. Aus der Reihe beteiligter Interleukine sind IL-1 und 6 maßgeblich von Belang und regen die Angiogenese an.

Die zweite Phase ist die **Bildung des weichen Kallus**. Diese umfasst die Chondrogenese, chondrale und desmale Ossifikation, Synthese fibrösen Gewebes sowie die Angiogenese¹⁸⁵. Das wesentliche Merkmal ist die Bildung eines knorpeligen Kallus als Gerüststruktur welcher nachfolgend mineralisiert, dann resorbiert und abschließend durch Geflechtknochen ersetzt wird¹⁴⁵. Von zellulärer Seite beteiligen sich Makrophagen, Chondroblasten, Fibroblasten, Endothelzellen und Osteoklasten. Außerdem werden TGF- β , IL-1 und 6 Kollagene II, X und III, FGF, PDGF, IGF-1 und SMADS gebildet¹³².

Das fibrinreiche Granulationsgewebe bietet die Grundlage dafür, dass Knorpelzellen mit der chondralen Knochenbildung zwischen den Frakturrenden beginnen können. Das Maximum der Weichkallusbildung liegt zwischen dem siebten und neunten Tag (posttraumatisch), wobei die desmale Ossifikation zwei Wochen nach Frakturgeschehen anzuhalten scheint¹³². Zeitgleich beginnt angrenzend zu den Frakturrenden bereits die Bildung von subperiostalem, hartem Kallus durch desmale Ossifikation. Das Vorhandensein und das erfolgreiche Anlocken von hMSCs aus diversen Körperkompartimenten scheint von essentieller Bedeutung zu sein^{132,145}.

Knochenmorphogenetische Faktoren sollen hierbei die desmale Ossifikation und Heilungskaskade positiv beeinflussen. Die hMSCs können sich zu Chondroblasten differenzieren und die Knorpel-spezifischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Proteoglykane sezernieren, was eine erste mechanische Stabilität bewirkt^{139,145,185}.

Der Knorpel hypertrophiert in einer typischen Zone, die gleichnamig als hypertrophe Zone bekannt ist und wird nur vorübergehend mineralisiert^{139,145,185}.

Chondroklasten beginnen damit den Knorpel zu degradieren, um ein Einwachsen von Blutgefäßen zu ermöglichen, welche für den Nährstoff- und Zelltransport zuständig sind.

Ebenso macht die Apoptose der Chondroblasten Platz für einwandernde Osteoblasten^{139,185}. Die Schlüsselrolle für die Vaskularisierung hat der Vascular endothelial growth factor (VEGF)^{139,145}. VEGF besitzt Rezeptoren im Endothel, vor allem den VEGFR-2 Rezeptor (Flk-1/KDR), welcher wahrscheinlich für die Vermittlung der meisten bislang bekannten Zellantworten auf das Binden von VEGF verantwortlich ist¹⁰⁵.

Nun wird mit der dritten Phase der **Bildung eines harten Kallus** das Voranschreiten der Knochenregeneration durch die Resorbierung des knorpeligen Kallus und durch das Ersetzen mit knöchernem Kallus die Ossifikation vorangetrieben^{145,185}. Einen bedeutenden Anteil hat hierbei der weiter oben beschriebene Signalweg über Wingless-Integrationside (Wnt) Signalmoleküle. Die Wnt-Signalkaskade ist in der Lage, hMSCs zur Differenzierung in Osteoblasten zu stimulieren und positiv auf die Knochenbildung einzuwirken¹⁴⁵. Schrittweise wird Geflechtknochen gebildet und ersetzt den weichen Kallus. M-CSF, RANKL und OPG sollen hier die Rekrutierung von Osteoklasten und Osteoblasten verstärken, was zur Knochenneubildung führt¹⁴⁵. Chondrozyten und Osteoblasten sind mittels der TNAP im Stande Hydroxylapatit-Kristallisationskeime in Matrixvesikel-Ausknospungen ihrer Zellmembran zu bilden^{145,167}. Diese Vesikel werden auf die Extrazellulärmatrix abgelegt und dienen dem Ausfällen weiterer Calciumphosphate, sofern eine genügend hohe Konzentration derselben vorliegt. Diesem Vorgang der Nukleation (Keimbildung) verdankt der Knochen seine autoregulatorische Mineralisierung. Das Maximum der Hartkallusbildung ist üblicherweise an den Tagen 10-14 (posttraumatisch) erreicht, allerspätestens jedoch nach 18 Wochen^{66,132,145}.

Phase Nummer vier wird durch den **Vorgang des Remodelings** repräsentiert. Der Geflechtknochen wird durch höherwertigen lamellären Knochen ersetzt. Der überschüssige Kallus wird resorbiert.

Abgestimmte Umbaumaßnahmen führen schlussendlich zu einer normalen Knochenarchitektur im Sinne des Wolffschen Gesetzes¹³². Feron und Mauprivez schätzen die Dauer des posttraumatischen Remodelings auf Monate bis Jahre ein, bis der Körper sich also wieder vollständig an die Belastung adaptiert hat⁶⁶. Das Remodeling erneuert das menschliche Skelett physiologisch im Schnitt alle zehn Jahre¹²⁵.

Das Remodeling und Modeling des Knochens sind die beiden entscheidenden Prozesse der Knochenheilung und dienen außerdem der Mineralhomöostase^{48,182}. Man stelle sich den Knochen als Calciumquelle für den ganzen Körper vor, die bedingt durch unsere Evolution als Reservoir angelegt wurde (calciumreiches Meer vs. calciumarmes Festland)¹²⁵. Beim Modeling wird Knochen ohne vorherige Resorption gebildet, im Gegensatz zum Remodeling, wo initial eine Resorption erforderlich ist. Das Modeling ist ein Prozess, bei dem Osteoblasten und Osteoklasten unabhängig voneinander agieren und der Knochen geformt oder umgeformt wird. Das periostale Wachstum im Alter ist vermutlich auch auf Modeling zurückzuführen. Modeling bestimmt die Entwicklung und das Wachstum des menschlichen Skeletts, es spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Anpassung auf gesteigerte Beanspruchung durch körperliche Betätigung¹²⁵.

Der menschliche Körper ist dabei in der Lage, zielgerichtet auszuwählen, welche Knochenabschnitte einer **Umbauphase des Remodeling** bedürfen. Nur dort wird tatsächlich mit dem Umbau begonnen. Während des Remodeling sind die Knochenneubildung und Resorption eng miteinander verzahnt⁴⁸. Die Ursachen für die Initiierung können Schäden, veränderte Belastung durch äußere Kräfte oder die notwendig gewordene Abräumung gealterten Knochens sein²⁰¹. Das Remodeling ist ein oberflächlicher Prozess. Circa 90% der trabekulären Knochenbildung findet auf vorher resorbierter Oberfläche statt. Der Anfang des Remodeling wird durch eine Struktur, die einem Überdach ähnelt, bestehend aus einwandernden bone lining cells/ Osteoblasten, dem sogenannten bone remodeling compartment (BRC), gebildet. Sie wird auch canopy (Baldachin) genannt und dient als Osteoblastenreservoir¹⁰⁷. Erst diese vor der Umgebung schützende Abschirmung des umzubauenden Knochenbereichs scheint die interzelluläre Kommunikation von Endothelzellen, Knochenzellen, Gefäßzellen und vermutlich auch Immunzellen am Ort des Geschehens zu ermöglichen, welche man in ihrer Gesamtheit als basic multicellular unit (BMU) bezeichnet^{139,182,201}.

Die Ausbildung eines canopy ist ein Oberflächenphänomen, d.h. es findet nur auf trabekulärem Knochen statt.

Die BMU im corticalen Knochen hingegen ist konisch geformt und wird daher im angelsächsischen Sprachgebrauch als „cutting cone“ bezeichnet. Der cutting cone kann auch als der Ausläufer, der den neuen Knochen bildenden BMU bezeichnet werden. Der cutting cone besteht aus Osteoklasten.

Der sogenannte „closing cone“ am Ende des cutting cones wird aus Osteoblasten gebildet und ist assoziiert mit einsprossenden Gefäßen und peripheren Nerven²⁰¹.

Die Phasen des Remodelings umfassen je nach Autor vier oder fünf Abschnitte^{44,132,182}. Das Remodeling gliedert sich nach Raggatt in die fünf Phasen Aktivierung, Resorption, Umkehr/Übergangsphase, Bildung und Beendigung¹⁸². Der Anfang wird markiert durch die Aktivierung und die Rekrutierung der Osteoklasten. Danach beginnen die Osteoklasten mit der zweiten Phase der Resorption des Knochens. Die Übergangsphase ist die Zwischenphase, die sich an die Resorptionsphase anschließt und vor der letzten Phase, der Knochenneuformation, stattfindet. Teilweise soll es hier auch zufällig zur Aktivierung kommen. Gesichert ist, dass reparaturbedürftige Knochenabschnitte definitiv gezielt aktiviert werden⁴⁴. Die vier bzw. fünf Schritte sind fein aufeinander abgestimmt und können nur durch das Zusammenwirken von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten ablaufen, da diese die temporäre histologische Einheit der sogenannten basic multicellular unit (BMU) s.o. bilden. Eine fortwährende und lebenslange Anpassung an den Grad der mechanischen Beanspruchung, Verheilung von Knochenbrüchen und die Calciumhomöostase bedingen das kontinuierliche Remodeling und Modeling des Knochens. Gealterter und beschädigter oder unbelasteter Knochen wird durch Osteoklasten vollständig abgeräumt, ein Prozess, der ebenso exakt orchestriert und entscheidend für die Tragfähigkeit des Knochens ist wie die Knochenneubildung¹⁸².

Die Gewichtung des Umbaus in den unterschiedlichen Knochenkompartimenten des spongiösen bzw. corticalen Knochens hängt mit dem höheren Umsatz des Remodeling von spongiösem Knochen zusammen. Da der Umsatz des Remodeling in der Spongiosa auf 80% geschätzt wird, was deutlich höher ist als im corticalen Knochen bzw. der Kompakta, haben Knochen mit höherem trabekulären Anteil auch eine gesteigerte Anfälligkeit für Schwankungen ihrer Homöostase¹²⁵. Die Wirbelkörper haben einen hohen Anteil trabekulären bzw. spongiösen Knochens von 25:75 für trabekulären Knochen. Der Femurkopf weist eine Ratio von 50:50 auf, die radiale Diaphyse ist ein Extrembeispiel für den Gegensatz mit einer Ratio von 95:5⁴⁴.

Es wird als Hypothese für die gesteigerte Umbaurate angesehen, dass der spongiöse Knochen durch seine insgesamt größere Oberfläche und seine Lage nahe zum Knochenmark dessen chemischen Faktoren und Zellinteraktionen in höherer Konzentration ausgesetzt ist. Dies hat seine Bewandnis, und zwar dient die gute Blutversorgung der Aufrechterhaltung der mineralischen Homöostase des Körpers.

Die **primäre Frakturheilung** wird in Kontakt- und Spaltheilung unterteilt und kommt nur vor, wenn eine chirurgisch fixierte Situation geschaffen wurde. In diesem Fall kann direkt ein cutting cone gebildet werden und die gegenüberliegenden adaptierten Frakturende können sofort mit einer Geschwindigkeit von 50-100µm/ Tag in Form einer tunnelartigen Struktur vorantreibend durchbohrt und somit verbunden werden^{132,145}.

Kontaktheilung kann lediglich bei einer maximalen Spaltbreite von 200µm stattfinden, läuft dann aber simultan mit knöcherner Überbrückung und Ausbildung des Haver'schen Systems ab¹³². Spaltheilung ist dann möglich, wenn der Abstand größer als 200µm aber immer noch kleiner als 1mm ist. Hier wird rechtwinkelig zur Frakturspaltachse lamellärer Knochen gebildet, der allerdings noch mechanisch schwach ist. Erst nach einem Remodelling durch cutting cones, nach ungefähr acht Wochen ab Frakturgeschehen, ist eine Heilung des Knochens erreicht^{132,145}.

2.4 Einflussfaktoren des Knochenstoffwechsels

Die Verflechtung des Knochenstoffwechsels mit den Stoffwechselprozessen im Körper wird bei Betrachtung einiger Pathologien deutlich. Einige Krebsarten führen zu Osteolysen (Auflösung von Knochengewebe). Gezeigt werden konnte dies bei Metastasen des Prostata- bzw. Mama-Karzinoms und des Multiplen Myeloms¹³⁹. Die Erkrankung an Diabetes vom Typ 1, rheumatischen Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen konnten mit Osteoporose in Verbindung gebracht werden^{12,108,220}. Jenseits von diesen schon lange bekannten Zusammenhängen nimmt die Erforschung der Osteoimmunologie an Bedeutung zu. Der recht neue Forschungszweig der Osteoimmunologie führte zu Ergebnissen, die die räumliche Nähe des Abwehrsystems zum Knochengewebe näher beleuchten. Die Lymphozyten, die als Immungedächtnis bezeichnet werden können, halten sich bevorzugt im Knochenmark auf. Das hat naheliegende Gründe, weil zahlreiche Signalmoleküle der Lymphozyten, die Interleukine, dort auch auf die Osteoklasten und Osteoblasten einwirken können.

Während der Knochenabbau durch lymphozytäres IL-1, IL-17, IL-6, IL-15, TNF-α und IL-11 gefördert wird, inhibieren die Faktoren IL-18, IL-13, IL-10, IL-4, Interferon-γ und GM-CSF den Knochenabbau, sie wirken also protektiv auf die Matrix²²⁰.

Auf zellulärer Ebene bestehen zahlreiche Möglichkeiten der Interaktion, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen können und diese sollen im Folgenden in einer Zusammenschau dargestellt werden. Der Crosstalk unter den Osteoblasten und -klasten während der Zyklen der Knochenneubildung findet vermutlich durch Zell-Zell Kontakte statt. Bislang konnte in vivo allerdings kein direkter Kontakt von reifen Osteoblasten und Osteoklasten gezeigt werden⁷². Semaphorin 4D der Osteoklasten hemmt während der Resorption die Osteoblasten, Semaphorin 3A der Osteoblasten wirkt hemmend auf die Osteoklasten vor der Knochenneubildung. EphrinB2 Domänen des Osteoklasten binden wahrscheinlich an EphrinB4 Domänen des Osteoblasten und diese wirken regulatorisch aufeinander ein^{72,233}. Der Osteozyt bildet die Proteine Sclerostin und Dickkopf-1, welche den Wnt-Signalweg der Knochenbildung hemmen. Der Osteozyt ist die Hauptquelle für RANKL, welches die Osteoklastogenese, Aktivierung und Resorption fördert^{44,47,170,229}.

Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher RANKL abfangender Lockvogel-Rezeptor (decoy receptor) wird von Osteozyten, Osteoblasten, Stromazellen und Fibroblasten gebildet und wirkt gegenregulatorisch auf das RANKL ein. Sclerostin ist ein von den Osteozyten parakrin (in die angrenzende Umgebung) sezerniertes und bei zu geringer mechanischer Belastung gebildetes Protein, das hemmend auf den Wnt-Signalweg wirkt. Dies hat eine verstärkte Resorption des Knochens zur Folge.

Die Sexualhormone beider Geschlechter wirken positiv auf die Knochenmasse ein. Ein Defizit von Östrogen bei Frauen nach der Menopause, gepaart mit der relativ hohen westlichen Lebenserwartung, führt dazu, dass Frauen annähernd 50% des Lebens in einem Östrogendefizit verbringen¹⁰¹. Östrogenmangel führt zu einem Absterben von Osteozyten und ist schädlich für die Struktur des Knochens^{44,198}. Auch beim männlichen Geschlecht zeigt sich durch die Involution der Gonadenfunktion eine gesteigerte Knochenumbaurate. Östrogene und Calcitonin hemmen die Osteoklastogenese^{48,101}. Calcitonin wird von den C-Zellen der Schilddrüse ausgeschüttet, wenn der Blutspiegel von Calcium zu hoch ist und hemmt die Osteoklastenaktivität über eine direkte Rezeptorinteraktion auf Osteoklasten⁴⁸. Die Östrogenrezeptoren befinden sich auf den Osteoblasten und ihre Aktivierung vermindert die IL-6 Bildung. Dies kann die Osteoklastogenese verringern⁷⁴. Ein Östrogenmangel im Nager-Ovarektomiemodell beeinträchtigt die Heilung des Knochens⁶. Östrogenmangel hat im Tierversuch die Menge der TNF- α Produktion von T-Zellen erhöht, was über den TNF- α p55 Rezeptor zur Heraufregulierung von MCSF und RANKL, mit nachfolgend gesteigerter

Osteoklastogenese geführt hat³⁹. Östrogen kann als eine Art knochensparendes Hormon verstanden werden, das imstande ist Apoptose bei Osteoklasten- und Prä-Osteoklasten durch den Fas-Todesrezeptor auszulösen⁴⁸.

Die Osteoklasten werden durch die erhöhte Ratio von RANKL zu OPG, vermehrter Freisetzung der beiden Zytokine IL-1 und IL-6, und dem kontinuierlichen Einwirken von Parathormon zur Fusion, Aktivierung und Resorption angeregt^{135,157}. PTH steigert die Osteoklastaktivität indirekt, indem es an Rezeptoren aus hMSCs und Osteoblasten bindet und diese somit zur RANKL und MCSF Produktion stimuliert⁴⁸. MCSF kann direkt auf Präosteoklasten/Monozyten am c-fms Rezeptor wirken⁴⁸. Parathormon wirkt protektiv auf das Überleben der Osteoblasten und Osteoklasten⁴⁸. Das Parathormon related Protein (PTHrp) kann ebenfalls am PTH-Rezeptor binden und ist vermutlich teilweise für den Calciumverlust stillender Frauen verantwortlich^{2,139,201}. Das Ende der Resorptionsphase im Remodeling Zyklus ist vermutlich durch eine Kopplung der herausgelösten Matrixfaktoren TGF- β , IGF-1, PDGF und BMPs mit den Osteoklasten bedingt. IGF-1 ist imstande den IGF-Rezeptor auf Osteoklasten zu aktivieren, was zur Osteoklastogenese führt⁴⁸. TGF- β ist ein potenter herunterregulierender Faktor des RANKL von Osteoblasten, und stoppt so die osteoklastäre Resorption⁷².

Bei einigen Erkrankungen ist die Aktivität der Osteoklasten gesteigert, bei einigen Arten von Knochenmetastasen und entzündlicher Arthritis, sogar derart, dass es zu regelrechten Osteolysen kommt. IL-6 und RANKL werden z.B. bei Parodontitis durch Immunzellen gebildet und stimulieren die Migration von Osteoklasten und diese greifen den alveolären Zahnhalteapparat an⁷².

Damit sich humane mesenchymale Stromazellen (hMSCs) zu Osteoblasten ausdifferenzieren, bedarf es der zeitlich exakt orchestrierten Abfolge der Expression der Knochen morphogenetischen Proteine (BMPs). Dies sind Proteine, die agonistisch auf den Wingless related integration site-Signalweg wirken (z.B. Wnt3a und Wnt5a).

Entscheidend für die Differenzierung der hMSCs zu Osteoblasten ist auch die Synthese der Transkriptionsfaktoren Distal-less homeobox5 (Dlx5), Osterix (Osx) und Runt-related transcription factor 2 (Runx2)^{108,72,108}. Der (canonical/vorschriftsmäßige) Wnt Signalweg ist unentbehrlich während der embryonalen Osteogenese und im erwachsenen Knochen⁴⁸. Positiv auf die Osteoblastenaktivität wirken die osteozytären Faktoren Prostaglandin E2 (PGE₂), Stickstoffmonoxid (NO) und Kinasen⁴⁴.

Das aktive Vitamin D ($1,25[\text{OH}]_2\text{-(Calcitriol)}$) steuert die Expression des TRPV6 Calciumkanals der Enterozyten. Dies ist der selektive Calciumkanal, der im Duodenum und Jejunum für die aktive Calciumaufnahme zuständig ist^{43,48}. Durch die Enterozyten im Dünndarmbürstensaum wird das Calcium aktiv aufgenommen, es kann aber auch passiv parazellulär diffundieren. Weiterhin steuert Calcitriol die Expression von intrazellulärem Calbindin, das Protein, welches das Calcium nach Aufnahme durch die Enterozyten im Zytosol behält, und der Calcium-pumpenden ATPase PMCA1, welche das Calcium am basalen Pol aus der Zelle ausscheidet. Vermutlich ist die Hauptwirkung des Calcitriol, wenn es um die positive Wirkung auf den Knochenaufbau geht, die Aufrechterhaltung konstanter Blutcalciumspiegel¹⁷⁸.

Vitamin D verringert die RANKL Bildung von Osteoblasten²⁰⁷. Manche Quellen sprechen Calcitriol aber auch eine positive Wirkung auf den Knochenabbau durch Aktivierung der Osteoklasten zu⁴⁸. Das Calcitriol kann als lipophiles Molekül durch die Plasmamembran (Doppellipidschicht) von Zellen diffundieren und im Zytoplasma an den intrazellulären Vitamin D Rezeptor (VDR) binden. An dem VDR befinden sich nukleäre Lokalisationsstellen, die ein Eintreten in den Nukleus ermöglichen. VDR und Calcitriol können gemeinsam mit dem 9-cis-retinoic-acid-receptor (RXR) interagieren. Das Heterodimer aus VDR/RXR, genannt Vitamin D responsive Element (VDRE), wird von der DNA Sequenz in der Promotorregion von Zielgenen gebunden und aktiviert die Genexpression von TRPV6 (Calciumkanal im Enterozyten des Darms) und Calbindin, einem zytosolischen calciumbindenden Protein (Niere und Darm)^{29,103}.

Vitamin K, auch als Phyllochinon bzw. Menachinon bezeichnet, (besonders in Grünkohl und anderem dunklen Blattgemüse enthalten) aktiviert durch Carboxylierung das Knochenprotein Osteocalcin (siehe weiter unten), damit es seine Funktion als Calciumbinder ausführen kann¹⁶⁴.

In einer Studie aus dem Kollektiv der Framingham heart study an 888 Männern und Frauen war die Inzidenz von Hüftfrakturen signifikant höher in der Gruppe mit der untersten Quartile der Menge an Vitamin K Aufnahme verglichen mit der Gruppe mit der Quartile der höchsten Menge der Vitamin K Aufnahme²⁶.

Aus der Knochenmatrix können während der Resorption nachfolgende Faktoren gelöst werden und den Knochenaufbau anregen: Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF1), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Knochenmorphogenetische Proteine (bone

morphogenetic proteins BMPs), transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β) und Platelet derived Growth factor (PDGF). Der Calciumspiegel im Blut wird durch das Wechselspiel von Parathormon, Calcitonin und Calcitriol in sehr engen Grenzen aufrechterhalten. BMPs führen durch Aktivierung von Osteoprogenitorzellen zur enchondralen Ossifikation⁸⁵. BMPs, dies sind Faktoren der Transforming growth factor- β Superfamilie, binden am BMP I und II Rezeptor, an den sich downstream- (stromabwärts des Signalwegs) intrazellulär SMAD1, 5, und 8 Proteine anlagern. Diese SMAD Proteine formen einen Komplex mit SMAD1, translozieren in den Nukleus der Osteoblasten, wo sie mit dem Transkriptionsfaktor Runx2 eine Genexpression aktivieren¹⁰⁸. BMP Rezeptoren wurden bisher bei Osteoblasten, Chondroblasten, Hippocampus, Lunge und Leber gefunden⁵⁴. Die Bezeichnung BMPs rührt daher, dass diese Proteinklasse zur ektopen Knochenbildung anregen kann^{36,108}.

Es gibt Autoren, die den Knochen aufgrund seiner metabolischen Fähigkeiten als endokrin aktives Organ bezeichnen. Die Osteoklasten befreien durch ihre Ansäuerung aus der Bindung mit dem Knochenmineral die carboxylierte Form von Osteocalcin (OCN). Das OCN ist als decarboxyliertes Molekül imstande über den Blutstrom bis zur Pankreas zu gelangen und wirkt dort positiv auf die β -Zellproliferation und die Insulinfreisetzung. OCN kann im Fettgewebe die Adiponectin Expression erhöhen, was ebenfalls eine erhöhte Insulinsensitivität zur Folge hat¹²⁸. OCN hat eine Wirkung im Hodengewebe, wo es die Leydig-Zellen zu einer gesteigerten Testosteronproduktion anregt^{72,84}.

Das Matrixprotein Osteopontin (OPN) ist für die Zunahme von Fettgewebe durch low-grade Entzündung bei Adipositas, Insulinresistenz, Nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD) und Diabetes mellitus mitverantwortlich¹¹³. OPN wirkt außerdem chemotaktisch auf Entzündungszellen respektive ²¹⁹Makrophagen¹⁸⁵.

Eine weitere wichtige Aufgabe kommt den Produkten der Osteozyten zu^{48,181}. Sclerostin ist ein parakrin- (in die angrenzende Umgebung) sezerniertes, von Osteozyten gebildetes Protein.

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF-23) ist ein osteozytäres Protein, das zur Phosphathomöostase beiträgt, indem es die Ausscheidung von Phosphat anregt und die Vitamin D Aktivierung hemmt⁴⁸. Desweiteren wird es als Antwort auf eine gesteigerte Ca/Phosphat Aufnahme gebildet und wirkt auf die Niere und Nebenschilddrüse ein^{72,181}.

Auch das Nervensystem hat Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel, es kann über sympathische Aktivierung die osteoblastären β 2-Membranrezeptoren aktivieren, was konsekutiv die Abnahme der Knochenbildung und Zunahme der Resorption bedingt⁴⁸.

2.5 Knochenersatzmaterialien (KEM)

Die Geschichte des Knochenersatzes reicht Jahrtausende zurück. Es gibt viele Hinweise, dass die Chirurgen alter Zivilisationen wie Inka, Bretonen, Polynesier und die Bewohner Nordafrikas in der Lage waren, Kranioplastien durchzuführen und die Patienten diese Eingriffe überlebten¹⁹³. Die ersten Füllmaterialien für entstandene Defektlöcher sollen Gold- und Silberplättchen sowie Kalebassen (Kürbisschalen) gewesen sein, einige Funde zeigen eine passgenaue Einheilung in den Schädelknochen¹⁹³. Eine erste Knochenverpflanzung zwischen zwei Spezies wurde von *Meekeren* im Jahr 1668 berichtet²³. Der holländische Chirurg berichtete von einem russischen Kollegen, der bei einem Patienten eine Hiebverletzung des Schädels durch den Einsatz eines Knochenfragments von einem Hund erfolgreich ausheilen konnte¹⁹³.

Jährlich werden weltweit circa zwei Millionen Knochenersatzoperationen durchgeführt³⁶. Die Hauptindikation für KEM ist die Defektauffüllung¹²². Hierbei ist der Großteil autogenen Ursprungs (s.u.), was nach wie vor der Goldstandard der Therapie ist^{63,108}.

Aber aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an der Entnahmestelle des menschlichen Körpers, postoperativen Komplikationen wie Infektionen, Blutverlust, kosmetischen - und neurovaskulären Schäden und Schmerzen an der Entnahmestelle, stellt dies leider ein natürlich begrenztes Reservoir dar^{36,85,108}. Die Verwendung von Knochentransplantaten ist beim Menschen weltweit die zweithäufigste Art der Gewebetransplantation, direkt nach Bluttransfusionen³⁶.

Ein Knochenimplantat kann **xenogenen**, **allogenen** oder **autogenen** Ursprungs sein. **Xenogene** Transplantate stammen, wie weiter oben dargestellt, von einer Spezies ab, beispielsweise des Hundes, und werden auf eine andere Spezies (bspw. Mensch) übertragen. Heute kommen in der Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie demineralisierte, gefriergetrocknete bovine (vom Rind-) und porcine (vom Schwein stammende) Xenografts zum Einsatz (z.B. Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Geistlich, Schweiz, Endobon®, Merck Co., Darmstadt, Deutschland, beide vom Rind).

Auf Korallen basierende Produkte sind in prozessierter Hydroxyapatit- und naturbelassener Calciumcarbonatstruktur auf dem Markt erhältlich (Interpore®, Pro-Osteon®, Interpore International, Inc., Irvine, USA).

Die Prozessierung beraubt das Transplantat dabei seiner zellulären Bestandteile und der inhärenten (innewohnenden) mechanischen und osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften, mit der Konsequenz vorrangig osteokonduktive Eigenschaften zu besitzen.

Allogene Knochentransplantate werden interindividuell innerhalb derselben Spezies, z.B. von einem Menschen auf einen anderen Menschen, übertragen, wobei sie meist von Totspendern oder Spenden von totalen Hüftersatzoperationen stammen. Für allogene KEM bedarf es eines hohen Kosten- und Logistik-Aufwands, um in einer sogenannten Knochenbank den sterilisierten und tiefgekühlten Spenderknochen stets vorrätig halten zu können. Die Übertragung bisher unbekannter, infektiöser Bestandteile ist hier keineswegs ausgeschlossen³⁶.

Autogene Transplantate zeichnen sich dadurch aus, dass der Empfänger sein eigener Spender ist. Dies wird daher auch als intraindividuelle Spende bezeichnet. Der eigene Knochen wird dabei meist aus dem Beckenkamm, aber auch aus Fibula, Kinn, Mandibula, Schädelanteilen oder den Rippen entnommen, um einen Knochendefekt aufzufüllen^{36,63}.

Biomaterialien werden nach *Meyers et al.* als solche Materialien definiert, die zuerst auf molekularer Ebene synthetisiert werden und sich dann zu größeren Strukturen zusammenfügen lassen (sogenanntes bottom up Verfahren). Sie weisen hierarchische Strukturen auf, die von der kleineren zur größeren Baueinheit variieren und synergistisch zusammenwirken, meist in wässriger Umgebung bei Umgebungstemperatur (englisch, ambient temperature) hergestellt wurden und deren Komponenten multifunktional sind (Anmerkung: Im vorliegenden Fall ist dies das Strontium, das einerseits als Wirkstoff und andererseits knochensuchendes Spurenelement in neugebildeten Knochen eingebaut werden kann). Außerdem sind Biomaterialien für den Körper selbstheilungsfördernd, weil sie lokale Wachstumsreize fördern und mit der Umgebung in Austausch stehen¹⁵¹.

Ein KEM ist ein Biomaterial, welches einer ganzen Reihe von Ansprüchen genügen muss: KEM sollen keine Mutagenität oder Immunreaktion hervorrufen, sterilisierbar und klinisch einfach zu applizieren, zudem passgenau modellierbar sein, die Zelladhäsion ermöglichen und bioaktiv sein (physiologische Interaktion mit Empfänger), einstellbar

resorbierbar sein, eine optimale Porosität für Zellmigration und Nährstoffdiffusion bieten, in ein dreidimensionales Gerüst formbar sein, potentiell als Wirkstoffträger (z.B. Antibiotika, Wachstumsfaktoren) dienen, eine Lastkraftübertragung in den umgebenden Knochen ermöglichen, und kostengünstig herstellbar sein^{36,94,100,120}. Eine hohe Porosität ist mit einer gesteigerten Knochenneubildung assoziiert¹⁷¹. Es ist bislang kein Material bekannt, das all diese vorgenannten Eigenschaften in sich vereint^{77,100}.

Zudem sollte ein KEM noch folgende drei Eigenschaften besitzen (s.Tab.2.5-a):

Osteokonduktion (ist das dreidimensionale Leitschienenverhalten für einwandernde Knochenzellen und Blutgefäße, was eine Voraussetzung für das Knochenremodeling ist, Einwachsen in den Empfängerknochen und schleichende Substitution, Ersatz des KEM durch Empfängerknochen^{80,85,100}.)

Osteoinduktion (hiermit wird die Fähigkeit zur Stammzellrekrutierung und der Anstoß zur Differenzierung in Osteoblasten gemeint, die zur Knochenneubildung führt)^{80,85}. Ein osteoinduktives Material ist dazu fähig, heterotopisch Knochen zu bilden, also in Gewebearten, in denen Knochen normalerweise nicht vorkommt¹⁵.

Osteogenese (ist die Eigenschaft zur Knochenneubildung, die nur von empfängereigenen oder transplantierten vitalen Spenderzellen erfüllt wird, da diese sich in Knochen bildende Zellen differenzieren können)^{80,100,133,146,161}.

In der angelsächsischen Literatur gibt es außerdem den von der Food and Drug administration anerkannten Begriff der **Osteostimulation**, der eine Aktivierung der Empfängerzellen durch ein KEM oder seine gelösten Bestandteile beschreibt⁹⁴.

Bislang bleibt die Forschung und Entwicklung noch hinter diesen hohen Zielsetzungen zurück und es ist wenig wahrscheinlich, dass wir jemals in der Lage sein werden, alle Faktoren gleichsam optimieren zu können und so eine Panazee (Allheilmittel) erhalten könnten^{85,100}.

Tab.2.5-a: Eigenschaften von KEM und Produktbeispiele

Eigenschaften von KEM	Erläuterung	Produktbeispiele
Osteogenese	Enthalten zelluläre Bestandteile für die Entwicklung und Bildung von Knochen	Autograft, Aspirat vom Knochenmark
Osteokonduktion	<u>Passive</u> Scaffoldeigenschaft bewirkt, dass Zellen migrieren, und schleichend das KEM ersetzen Porosität erlaubt Einwuchs	Autograft, Allograft, BMPs zusammen mit Scaffold, synthetische Materialien und Additive (z.B. Polycaprolactone)
Osteoinduktion	<u>Aktive</u> Eigenschaft, sogenanntes cell-recruitment und anziehende Wirkung über Zytokine und oder Wachstumsfaktoren	Bone-morphogenetic-proteins 2 and 7

Eine Einteilung der Materialien, die zur Heilung von Knochendefekten zum Einsatz kommen können, sieht folgendermaßen aus (s. Tab.2.5-b): Transplantate (autogen, allogen, xenogen), Keramiken und deren Derivate (Hydroxyapatite, Tricalciumphosphate, Calciumsulfate), Wachstumsfaktoren (demineralisierte Knochenmatrix, Plättchenreiches Plasma, Knochen morphogenetische Faktoren), Polymere (natürliche wie Kollagen und synthetische wie PMMA, Polylactide und Polycaprolactone), experimentelle Materialien (mineralisiertes wärmebehandeltes Rattan-Holz) sowie Kompositmaterialien (aus Kollagen und Hydroxylapatit)³⁶.

Tab.2.5-b: Gruppen von KEM

Gruppen von KEM	Beispiele kommerzieller Produkte
Füllungsstoffe bzw. Arzneimittelabgabe möglich	Mineralbasiert/: Keramiken Calciumsulfat, -phosphat, Biogläser, Aluminiumkeramiken
	Polymerbasiert/: synthetisch Polylactide, Polyglycolsäure, Polyanhydride, Polycaprolacton, Polymethylmethacrylate
Wachstumsfaktoren	Allograft basiert: demineralisierte Knochenmatrix (DBM) (human oder bovin), (gering) osteokonduktiv
	Rekombinant: (stärker) Bone-morphogenetic-proteins 2 and 7,
Mineralbasierte KEM	Calciumsulfate
	Tricalciumphosphate
	Calciumphosphate
	Hydroxylapatite: low temperatur, Sedimentation
	Hydroxylapatite: high temperatur, gesintert
	Derivate natürlicher Korallen
Metalle	Titaniumgerüste, Magnesiumgerüste, Tantal, Eisenschäume (experimentell)
Komposite	Beispiele: Collagen-Calciumphosphate (plus X) Calciumphosphate plus Polymer Hydroxylapatit/ Chitosan oder polylactid
Natürliche Polymere	Kollagen, Fibrin, Gelatine, Glykosaminoglykane (Hyaluronan, Chondroitinsulfat), Zellulose, Stärke, Alginat, Agarose, Dextran, Seidenderivate, Chitosan aus Krebstieren

Quellen: 35,77,116,120,124,146,154

Hench und Jones heben hervor, dass die Versorgung großer Knochendefekte neuartige KEM erfordert, da die Tragfähigkeit vorhandener KEM zurzeit nur für kleine Knochendefekte beschrieben ist. KEM sollen optimaler Weise die Lastkräfte auf den sie umgebenden Knochen übertragen. Das Problem des sogenannten stress-shielding, also die vermehrte unphysiologische Lastkraftübertragung im Implantat vorbei am umgebenden Knochen mit folgendem adaptiven remodeling (Verlust an Knochenmasse), sei bislang unzulänglich beachtet bzw. verhindert worden. Eine Möglichkeit robustere und tragfähigere bioaktive Materialien zu erhalten, könnte die Herstellung von Kompositmaterialien sein⁹⁴.

Bei geminderter Frakturheilung spielt neben der Verwendung der drei Eckpunkte von Wachstumsfaktoren, Scaffolds (Gerüststrukturen) und humanen mesenchymalen Stammzellen der Faktor der mechanischen Einflüsse eine gleichrangige Rolle. Diese Hypothese findet als das „diamond concept“ postuliert durch *Giannoudis et al.* für die Behandlung bei erschwerter Frakturheilung ihren Ausdruck, wie es bei non-union (Falschgelenkbildung) und osteoporotisch bedingten Frakturen der Fall ist⁷⁹.

In der Zukunft wird vorraussichtlich die zellbasierte Gentherapie, bei der virale und non-virale Vektoren (lat. Träger) zum Einsatz kommen, eine Relevanz in der Therapie haben^{85,108}. Diese Vektoren sind im Stande, spendereigene humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) durch Osteoinduktion zur Knochenregeneration zu bringen³⁶. Das tissue engineering ist ein weiteres Feld, das in der nahen Zukunft weitreichende Anwendung finden wird. Hierbei wird spendereigenes Knochenmark entnommen, hMSCs werden isoliert, dann kultiviert und inklusive eines biologischen Faktors, beispielsweise eines Wachstumsfaktors, auf ein Scaffold (Gerüst) aus Biomaterial gegeben, welches idealerweise eine einstellbare Degradation aufweist^{8,73}.

Klinisch bedeutsam sind bislang keramische KEM wie Calcium-Phosphat-Zemente und Tricalciumphosphate, da sie kosteneffektiv und sicher sind. Außerdem finden die rekombinant hergestellten Knochenmorphogenetischen Proteine 2 und 7 für die Indikationen der Wirbelsäulenversteifung, Versorgung der offenen Tibiafraktur [BMP 2] und tibialer Non-Union (auch Pseudarthrose genannt = Falschgelenkbildung) [BMP 7] in der Klinik Anwendung^{36,82,100}.

KEM werden größtenteils durch Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen/Osteoklasten abgebaut^{190,223}. Es kann als bewiesen bezeichnet werden, dass die

Degradierung von KEM von proinflammatorischen Prozessen bestimmt wird¹⁹⁰. Diese immunologischen Prozesse könnten in der Zukunft vielleicht so exakt beeinflussbar sein, dass eine optimale Abbaurate von KEM bei zeitgleicher optimaler Höhe der knochenheilenden Immunantwort einstellbar ist¹⁹⁰.

2.6 Massenspektrometrie TOF-SIMS (Flugzeitsekundärionen-Massenspektrometrie)

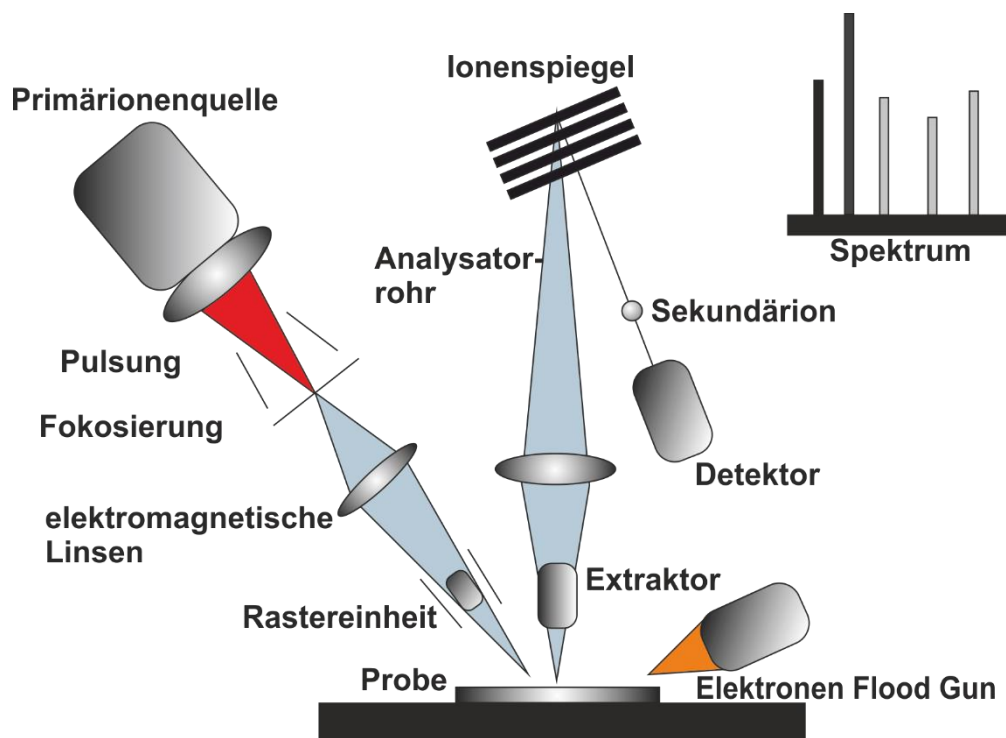


Abbildung 3: TOF-SIMS Schemazeichnung (Eigenentwurf)

Abbildung 3 zeigt das Schema der TOF-SIMS. Primärionen aus der Primärionenquelle, auch Liquid-Metal-Ion-Gun (LMIG) genannt, lösen Sekundärionen durch eine Stoßkaskade von der Probenoberfläche ab.

Diese fliegen durch den Extraktor im Analysatorrohr zum Ionenspiegel, der die Ionen auf den Detektor lenkt. Die Probe wird Zeile für Zeile abgescannt. Durch Auswertung am PC (Programm: Surface Lab 6, Firma Ion TOF) kann ein Spektrum und ein zweidimensionales Bild erstellt werden. (Quelle: Eigener Entwurf; unter Verwendung von Corel Draw X6).

Die Massenspektrometrie TOF-SIMS (Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry) zu Deutsch Flugzeit Sekundärionenmassenspektrometrie, ermöglicht es dem Untersucher eine exakte chemische Information einer Oberfläche zu erhalten.

Mit der TOF-SIMS findet eine Charakterisierung der untersuchten Oberfläche statt, inklusive der Darstellung von der räumlichen Verteilung der atomaren bzw. molekularen Zusammensetzung. Die Oberfläche wird dabei minimal zerstäubt, das heißt, dass untersuchte Material wird durch Ionenbeschuss minimal abgetragen. Die TOF-SIMS wurde in den Materialwissenschaften zur Oberflächenanalyse entwickelt, um z.B. Mineralien und neuartige Werkstoffe, wie Legierungen und Halbleiterelektronik zu untersuchen. Die TOF-SIMS kommt zunehmend in den Lebenswissenschaften zur Anwendung, weil sie sowohl anorganisches als auch organisches Material detektieren kann^{96,163,186,217}.

Mit TOF-SIMS lassen sich generell Analysen der obersten Materialschicht anfertigen. Diese Schicht wird als erste Monolage bezeichnet. Laut *van Vaeck et.al.* beträgt die Informationstiefe des TOF SIMS, einige Monolagen²¹⁶. *Vickerman* beschreibt, dass die Informationstiefe bei ca. einem Nanometer liegt²¹⁷. TOF-SIMS zeichnet sich durch eine hohe Massenauflösung, geringe Nachweisgrenze, hohe Sensitivität, hohe laterale Auflösung (unter 300 nm) und hohen Massen-Messbereich aus^{97,186,204}. Da der Knochen Spurenelemente wie z.B. Fluor in geringen Konzentrationen enthält, eignet sich TOF SIMS besonders als Nachweismethode von Spurenelementen in der Biomaterialforschung¹⁶³.

Die TOF-SIMS Geräte arbeiten mit einem Ultrahochvakuum von 10^{-11} mbar bis 10^{-7} mbar¹⁹⁶. TOF-SIMS Geräte verfügen über eine Schleuse, eine Kamera zur optischen Navigationskontrolle der korrekten Höhe und Position über dem Probenhalter, einen Extraktor (ein Energiefiltersystem), einen Analysator (dies ist das Flugrohr des Massenspektrometers) inklusive Ionenspiegel und die Detektoreinheit.

Die Detektoreinheit besteht bei den meisten Geräten aus Mikroplatten, das sind Bauteile bestehend aus einer Blei-Glas-Matrix, die beim Sekundärionenauftreffen eine Kaskade an Elektronen produziert und damit ein Signal erzeugen. Für die Aufzeichnung gehen keine Ionen verloren²¹⁷. In dieser Arbeit wurden alle Messungen mit einer TOF-SIMS 5-100 Maschine durchgeführt (IONTOF, Münster, Deutschland) (Abbildung 11). TOF-SIMS analysiert die Moleküle und Atome, die die Oberfläche des Festkörpers nach

Beschuss mit hochenergetischen Ionen (geladene Teilchen), den sogenannten Primärionen, verlassen¹⁸⁹. Der Aufprall der energiereichen Primärionen auf die Oberfläche bewirkt, dass die obersten Teilchen durch Stoßkaskaden herausgelöst werden²¹⁷. Dabei handelt es sich um Cluster, Atome oder Moleküle, Elektronen sowie Molekülfragmente²¹⁷.

Die herausgelösten, geladenen Teilchen bezeichnet man als Sekundärionen. Die entstandenen Sekundärionen werden in einem elektrischen Feld auf eine gleichbleibende Energie beschleunigt und zu einem Detektor gelenkt. Die Fluggeschwindigkeit ist abhängig von der unterschiedlichen Ionenmasse¹⁸⁶. Mit TOF-SIMS können positive und negative Sekundärionen detektiert werden. Der Strahlenschuss ist gepulst, das heißt ein Ionenstrahl wird mit einer exakt definierten Zykluslänge von einigen Mikrosekunden Dauer ausgesendet. Nach dem Auftreffen im 45° Winkel auf die Oberfläche gelangen die herausgelösten Sekundärionen angezogen durch 2000 eV (Elektronenvolt) Extraktorspannung in den feldfreien Analysator. Durch den Ionenbeschuss lädt sich die Probe elektrisch auf, dies wird sofort nach dem Ende des Primärionenstrahlenschusses durch einen ausgleichenden Elektronenbeschuss mit einer niederenergetischen Elektronenquelle neutralisiert.

Die präzise Zykluslänge des Primärionenstrahls ist von grundlegender Bedeutung für die anschließende Flugzeitmessung. Der Beginn für die Flugzeitberechnung ist das Ende des Primärionenstrahlbeschusses, und mit dem Auftreffen auf den Detektor wird die Stoppzeit definiert. Mit diesen genau festgelegten Zeitpunkten ermöglicht die Software eine sehr exakte Berechnung der Flugzeiten. Die Flugzeitmessung ist die Kernidee der Massenanalyse mit TOF-SIMS¹⁸⁹. Die Flugzeitmessung benötigt eine kalibrierte Computeruhr, hohe Rechenleistung des Computers zur Bewältigung der großen Datenmengen und ein Flugstreckenrohr von definierter Länge (hier 100 cm).

Da die verschiedenen Ionen eine unterschiedliche Masse und somit charakteristische Flugzeit besitzen, kann für jeden beschossenen Pixel ein komplettes Massenspektrum erstellt werden. Das Massenspektrum wird als Beziehung von Masse zu Ladung [m/z] angegeben²¹².

TOF-SIMS ist eine semiquantitative Methode, das heißt es werden keine absoluten Verhältnisse aufgezeichnet. Die Intensitätsunterschiede innerhalb einer Probe lassen sich gut darstellen. Die höchste Zählrate bekommt den größten Helligkeitswert zugewiesen.

Eine flächige Probe kann mittels der TOF-SIMS abgerastert werden und von dieser Fläche kann die Software ein digitales Ionenbild errechnen. Dieser sogenannte Bildgebungsmodus kommt in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Die Bildgebung erfolgt durch ein Abspeichern aller detektierten Massensignale, welche von der Software in ein digitales Koordinatensystem eingespeist werden. Deswegen programmiert der Untersucher vor Beginn des Experiments das automatische Vorrücken der Probenhalterposition nach jedem Beschusszyklus auf einer festgelegten Fläche. Mittels der TOF-SIMS können je nach Fragestellung feste oder gefriergetrocknete biologische Proben analysiert werden. Insbesondere können naturbelassene bzw. so gut wie unbehandelte organische Materialien untersucht werden^{127,217}.

2.7 Strontium

Strontium hat im Periodensystem der Elemente die Nummer 38, es steht in der zweiten Hauptgruppe, den Erdalkalimetallen, zusammen mit Calcium. Strontium findet man in der Natur in der Mineralform $\text{Sr}[\text{SO}_4]$ (Celestit) und $\text{Sr}[\text{CO}_3]$ (Strontianit). Über die Nahrung werden täglich, vornehmlich aus Gemüse und Getreiden, 2-4 mg Strontium aufgenommen^{37,3,37,143}. Strontium kommt im menschlichen Skelett zum Vergleich der Calciummenge natürlicher Weise zu 0,035% vor³⁷. Strontium und Calcium haben eine sehr ähnliche Pharmakokinetik im Körper, unter anderem aufgrund des ähnlichen Atomradius und Eigenschaften als Ion^{27,37}. Strontium wird im Darm weniger gut absorbiert als Calcium, was an dem größeren Atomradius von Strontium liegen könnte³⁷. Einmal aufgenommen, wird Strontium im Körper verteilt und kann leicht in die Zellen ein- und austreten. Die Ausscheidung erfolgt über Fäzes (Stuhl), Schweiß und Urin, wobei der Anteil von Strontium, der im Darm nicht aufgenommen werden kann innerhalb weniger Tage ausgeschieden wird³. Strontium zählt wie Blei und Fluor zu den Knochensuchern unter den Elementen¹⁸⁰.

Das bedeutet, dass sie ähnlich wie Calcium in den Knochen eingebaut werden. Der Großteil, das sind weit über 90% der aufgenommenen Strontiummenge, akkumuliert im Knochen. Das trifft besonders für wachsenden Knochen zu, da wachsender Knochen bei Kindern, Strontium in seine Kristallanteile inkorporiert, wohingegen Strontium bei ausgebildeten Knochen eher aufgelagert wird. In beiden Fällen verbleibt Strontium sicherlich über Jahre im Knochen^{3,180}. Das therapeutische Agens der Osteoporose Therapie ist Strontiumranelat, ein Komplex, der zwei Atome Strontium enthält^{49,117,192}.

Die meisten Forschungsergebnisse beziehen sich auf die orale Substitution. Strontiumranelat löst sich nach oraler Aufnahme und Resorption im Darm in seine Bestandteile Ranelinsäure und Strontium. Das Ranelat dient also als Chelatbildner, d.h. zur Komplexyierung des Wirkstoffes Strontium. Seit 2014 darf Strontiumranelat nur noch verschrieben werden, wenn kein anderes Osteoporosemedikament Wirkung zeigt oder gegenangezeigt ist¹¹⁷.

Es ist bekannt, dass Strontium, gleich welcher Applikationsform, auf den CaSR (Calcium- sensitiven Rezeptor), welcher auf der Membran von Osteoblasten und Osteoklasten lokalisiert ist, wirkt und dort den Wnt-Signalweg und die Calcineurin Dephosphorylierung, sowie den MAPK bzw. ERK ½ Signalweg stimuliert und somit eine Aktivierung bewirkt^{25,90,192,230}. Der CaSR spielt eine wichtige Rolle bei der Calcium-Homöostase (Gleichgewicht) und der Protein-Erkennung im Darm. So findet man den CaSR vornehmlich auf den Nebenschilddrüsenzellen und C-Zellen der Schilddrüse. Ebenso ist der CaSR in Hirn, Haut, Gastrointestinaltrakt, Darm, Pankreas, Leber, Plazenta und Knochenmark gefunden worden⁴⁶. Er kommt somit nahezu ubiquitär vor. Die Aktivierung des CaSR durch di- und trivalente (zwei- bzw. dreifach geladene) metallische Agonisten ist schon länger gesichert¹⁰⁴. *Colella et al.* bezeichnen Strontium als einen orthosterischen Agonisten (Typ 1 Calcimimetikum) des CaSR mit calciumgleicher Potenz⁴⁵. Osteoblasten replizieren sich nach Sr^{2+} - Bindung, wohingegen Osteoklasten in die Apoptose (den programmierten Zelltod) eintreten und außerstande sind, eine Versiegelungszone zu bilden^{25,192}. Dies wird als dualer Wirkmechanismus bezeichnet^{25,90,126}. Es soll noch einen anderen Kationen empfindlichen Mechanismus geben, dieser wird vermutlich über den GPRC6A-Rezeptor vermittelt, da selbst bei CaSR-Knockout-Mäusen (=Gen ist deaktiviert worden) die Osteoblasten mehr Replikation zeigen¹⁹². Strontiumranelat greift in den RANK/RANKL/OPG Signalweg ein⁹⁰. Man findet eine herunterregulierte Osteoklastogenese, weil OPG vermehrt und RANKL vermindert gebildet werden³⁷. Tierversuche mit lokaler Freisetzung haben die Wirkung von strontiumhaltigen Knochenersatzmaterialien in vivo aufgezeigt^{212,230}. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Strontium auf den Knochen anabol (aufbauend) wirkt indem es Osteoblasten anregt und Osteoklasten hemmt.

2.7.1 Strontium und seine Signalwege

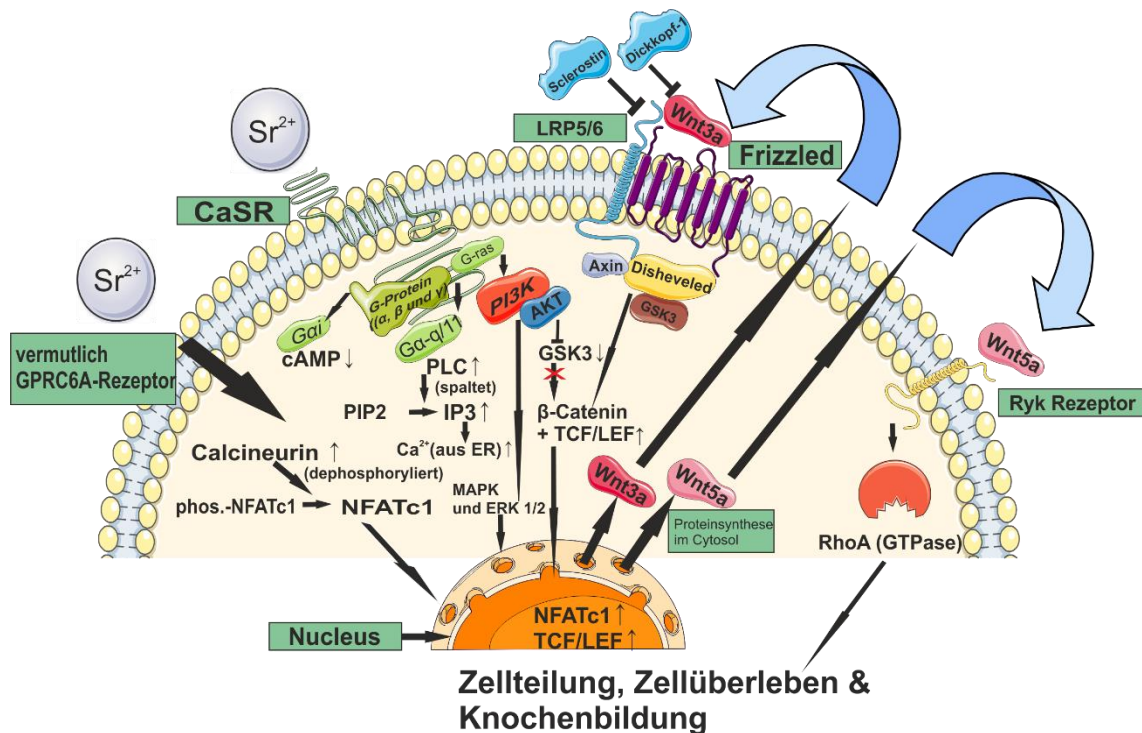


Abbildung 4: Strontium-Signalkaskade an der Zellmembran und im Zytosol des Osteoblasten (Eigenentwurf)

Zu Abbildung 4: (Eigener Entwurf nach einem Schema von Saidak¹⁹²; Graphik erstellt mit SMART-ART, von Servier Medical; unter Verwendung von Corel Draw X6).

Strontium (Sr^{2+}) aktiviert an den Osteoblasten den Wnt/ β -Catenin Signalweg²³⁰. Strontium (Sr^{2+}), in der Zeichnung als silberne Kugel dargestellt, kann vermutlich über den GPRC6A-Rezeptor auf die Zelle einwirken und dort über eine Calcineurin Erhöhung eine Dephosphorylierung und Translokation von NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells) in den Zellkern bewirken¹⁹². Dies fördert die Expression von Wnt3a. Der Transkriptionsfaktor NFATc1 ist während der Differenzierung von Osteoblasten und Knochenneubildung aktiv²²⁷.

Wnt3a führt zur Translokation von β -Catenin und Expression von Wnt5a. Wnt5a wiederum aktiviert seinen Rezeptor den Ryk(-Wnt-Ligand) Rezeptor und dieser die downstream (in der Signalkaskade weiter unten) nachgeschaltete GTPase RhoA.

Am CaSR (Calcium sensing Rezeptor) bewirkt Sr^{2+} eine Konformationsänderung, die über inhibierendes $\text{G}_{\alpha i}$ und aktivierendes $\text{G}_{\alpha-q/11}$ eine Erhöhung der PLC und nachfolgende IP_3 Erhöhung mit dem Resultat von Ca^{2+} Ausstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum bewirkt¹⁹².

Über den PI3K/AKT-Signalweg wird GSK3 inaktiviert, welches in seiner Aufgabe β -Catenin abzubauen gehemmt wird. Die Ubiquitinierung im Proteasom ist aufgehoben, das β -Catenin akkumuliert im Zytosol und wird in den Kern translokalisiert. Sobald Wnt3a an seinen Rezeptor Frizzled und dessen Co-Rezeptor LRP 5/6 bindet, hat dies ebenfalls eine Inhibierung des β -Catenin Abbaus zur Folge. Im Nucleus bewirkt β -Catenin die Transkription von Wnt-abhängigen Exons. Dies geschieht mit der Komplexierung des β -Catenin bzw. der Regulierung durch lymphoid enhancing factor (LEF) und T-cell Faktoren (TCF)²⁸. Das RhoA (Ras homolog gene family member A) ist für viele proliferative Vorgänge der Zellentwicklung, des Wachstums und der Knochenbildung wichtig. Strontium aktiviert den Wnt/ β -Catenin Signalweg²³⁰. Eine Rolle spielt auch die MAPK Kaskade und der ERK $\frac{1}{2}$ Signalweg^{28,45,104}. Zwei wichtige inhibitorische Proteine des Wnt-Signalweges sind Scerlostin und DKK-1.

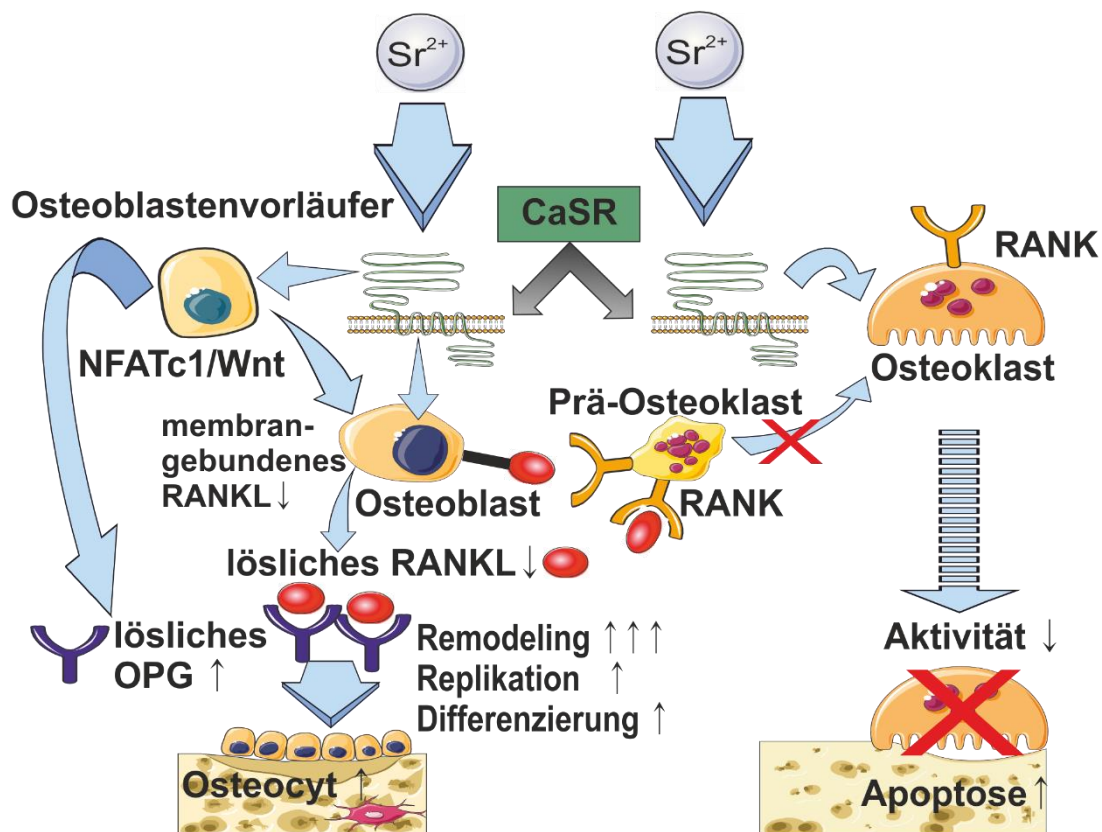


Abbildung 5: Wirkung von Strontium auf Osteoblasten bzw. Osteoklasten (Eigenentwurf)

Zu Abbildung 5: (Quelle: Eigener Entwurf; Grafik wurde mit SMART-ART von Servier erstellt; unter Verwendung von Corel Draw X6).

Der CaSR (Calcium sensing receptor) ist sowohl auf Osteoblasten- als auch auf der Osteoklastenmembran lokalisiert¹⁴⁴. Es wird angenommen, dass seine Aktivierung durch Strontium bereits in der Zelllinie der mesenchymalen Osteoblasten Vorläuferzellen (Präkursorzellen) geschehen könnte²³⁰. Osteoblasten werden durch die Aktivierung des CaSR mit Strontium zur Proliferation und Knochenbildung angeregt. Der entgegengesetzte Effekt zeigt sich bei den Osteoklasten. Die Osteoklasten werden durch die Bindung von Strontium am CaSR zur Apoptose gebracht, zeigen weniger Aktivität und stehen den Resorptionsvorgängen somit in geringer Anzahl zur Verfügung. Osteoprotegerin (OPG), ein Vertreter der Tumor necrosis factor Superfamilie, wird durch das Wirken von Strontium auf die Osteoblasten vermehrt gebildet. OPG ist ein decoy- (Lockvogel) Rezeptor, der die lösliche Form von RANKL bindet und neutralisiert. Strontium bewirkt eine verminderte Bildung von RANKL in der membrangebundenen osteoblastären Form.

3 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit geht aus dem Sonderforschungsbereich Transregio 79 (im Folgenden SFB TRR 79) hervor. Dieser SFB TRR 79 besteht zwischen den universitären Standorten Heidelberg, Gießen und Dresden. Er gliederte sich in 19 Teilbereiche. Die Teilbereiche bestanden aus den Gebieten Materialentwicklung (M-Teilprojekte), den Tiermodellen (T-Teilprojekten) und den Zentralprojekten (Z-Teilprojekt). Die Forschungen dieser vorliegenden Arbeit fanden im Rahmen der Teilprojekte T2 und M5 statt, die von Prof. Dr. med. Dr. biol. Hom. Volker Alt, PD Dr. med. Ulrich Thormann bzw. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Janek und Dr. rer. nat. Marcus Rohnke geleitet wurden.

3.1 Tiermodell-Genehmigung

Das Regierungspräsidium Darmstadt (RP Darmstadt) erteilte am 08.04.2016 die Genehmigung für das Versuchsvorhaben „Stimulation der osteoporotischen Frakturdefektheilung bei Osteoporose“ mit der Nummer: Gen. Nr. FU/1121. Diese Genehmigung ist befristet bis zum 07.04.2019. Die Genehmigung erfolgt gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in Verbindung mit §§ 15 ff der Tierschutz-Versuchstierverordnung. Die Tierversuche für die vorliegende Arbeit wurden in der Zentralen Forschungseinrichtung der Goethe Universität in Frankfurt am Main durchgeführt.

3.2 Tiermodell und Studiendesign

Als Grundlage für das gewählte murine Modell (murin: Nagetiere betreffend; oft für Maus aber auch Ratte) dienen die Ergebnisse der Studien von *Alt et al.* 2012, *Thormann und Ray et al.* 2013 und *Thormann und El Khawassna et al.* 2014^{7,211,212}. Das verwendete Modell geht daher aus den oben genannten Studien hervor.

Für das Gesamtprojekt wurden 207 weibliche Sprague Dawley Ratten von der Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sandhofer Weg 7, 97633, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Für den in dieser Arbeit untersuchten Aspekt wurden 24 Ratten verwendet.

Die Ratten sind zu Beginn des Versuches 12 Wochen alt und weisen alle ein durchschnittliches Gewicht von ca. 300g auf. Insgesamt wurden neun Versuchgruppen gebildet. Die erste Tiermodellgruppe ist die zum Vergleich dienende Kontrollgruppe (Leerdefekt). Dieser Bezeichnung liegt zugrunde, dass der critical size defect leer, das heißt ohne Knochenersatzmaterial belassen wurde. Alle anderen acht Tiermodellgruppen stehen für jeweils ein Knochenersatzmaterial. Je eine Materialart wird in einer Übergruppe, bzw. -Subzweiergruppe, getestet. Eine bekannte Stoffvariante, bzw. eine leicht modifizierte Variante und ihre Muttersubstanz werden gegenübergestellt erprobt.

Tab.3.2-a: Übersicht aller KEM im SFB TRR 79, inklusive der hier untersuchten KEM

Gruppennummer	Knochenersatzmaterial	
1	Leerdefekt, kein KEM enthalten	
2	PPGC+S III 5:5	erste Zweiergruppe
3	PPGC+S III 3:7	
4	pS100	zweite Zweiergruppe
5	pS100G10	
6	B30H20	dritte Zweiergruppe
7	B30K20	
8	MK-HCM	vierte Zweiergruppe
9	MK-K	

Im Versuchsaufbau sind drei Versuchsfelder bearbeitet worden: Biomechanik, Molekularbiologie und Histomorphometrie. Das Versuchsfeld Histomorphometrie ist Gegenstand dieser Arbeit. Es wurde die erste Zweiergruppe untereinander und mit dem Leerdefekt verglichen (s.Tab.3.2-a). Die Zuordnung von jeweils 3-mal acht, respektive 24 Tieren in eine der drei Versuchsgruppen, d.h. Leerdefekt, PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III}, und eines der drei Versuchsgebiete Biomechanik, Molekularbiologie und Histomorphometrie erfolgte randomisiert. Aus den Vorversuchen wissen wir, dass acht Tiere pro Gruppe für die Histomorphometrie ausreichend sind, um für die gefundenen Unterschiede zwischen den Gruppen valide statistische Aussagen treffen zu können⁷.

Die Versuche sind so aufwendig, dass in mehreren zeitlich auseinanderliegenden Chargen operiert wurde. Die verwendeten Proben wurden aus der ersten, zweiten und dritten Charge von insgesamt fünf Chargen gewonnen.

Der zeitliche Aufbau des Versuchs gliedert sich wie folgt: die Tiere sind 12 Wochen alt, wenn sie in der Versuchsanstalt eintreffen. Jedes Tier ist in einer Kleingruppe von drei bis vier Tieren untergebracht. Die Tiere haben freien Zugang zu Wasser und Nahrung (ad libitum). Die Käfige befinden sich in einem vollklimatisierten Raum. Klimatisch sind die Räume konstant auf eine Temperatur von 22°C und eine Luftfeuchte von 40-60% eingestellt. Für Ab- und Zuluft ist fortwährend gesorgt. Nach zehn Tagen Akklimatisierung erfolgt der erste Eingriff unter Narkose, die Ovariectomie (s.u.). Das ist der Tag 1 von insgesamt 132 Tagen. 90 Tage danach werden die Knochenersatzmaterialien in einer Operation mit der Osteotomie unter Narkose eingesetzt (s.u.). Sieben Wochen post operationem, das ist der Tag 132 im Versuchsaufbau, werden die Tiere durch eine Überdosis Kohlenstoffdioxid euthanasiert.

3.3 Material PPGC+S 5:5^{III} bzw 3:7^{III}

PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III} sind Kompositmaterialien und wurden an der TU Dresden innerhalb der Professur für Biomaterialien durch den Kooperationspartner *Dr. Benjamin Kruppke* als Weiterentwicklung eines mit Gelatine modifizierten Monetits als Knochenersatzmaterial entwickelt¹²¹. Es handelt sich um ein degradierbares Knochenersatzmaterial, dessen Komponenten sich am Aufbau des Knochens orientieren und nach der Implantation freigesetzt werden, um den Aufbau gesunden Knochens im Defekt zu stimulieren. Das Material ist ein Verbundwerkstoff, exakter bezeichnet ist es ein mit *Strontiumphosphat funktionalisiertes Kompositmaterial*. Freundlicherweise wurden beide Materialvarianten im Rahmen des Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ durch das Teilprojekt: „Dreiphasiger Verbundwerkstoff für den Knochenersatz auf der Basis von Kollagen, Silikat und Calciumphosphatphasen“ von *Dr. Benjamin Kruppke* für die Versuche zur Verfügung gestellt. Das Ausgangsmaterial wird in einem Batchprozess durch Präzipitation erzeugt (Präzipitation ist die Fällung eines festen gelösten Stoffes aus einer Lösung). Ein Batchprozess dient zur Chemikaliensynthese kleiner Produktmengen. Nacheinander werden Einzelprozesse mit begrenztem Fassungsvermögen abgearbeitet.

Bei PPGC+S handelt sich um ein Material aus gelatinemodifiziertem Calcium-/Strontiumphosphat, dessen Ionenverhältnis in der Fällungslösung variiert und mit dem Kürzel 5:5 bzw. 3:7 beschrieben ist. Der Name leitet sich vom Herstellungsprozess ab, es

ist eine mit **P**hosphat **p**rästrukturierte **G**elatine, die mit **C**alcium und/oder **S**trontium mineralisiert wird. Die Mineralisierungslösung beinhaltet eine Ratio Calcium zu Strontium von 5:5, wodurch im abgeschiedenen Material ein Verhältnis von Ca 63% zu Sr 37% vorliegt, respektiv 3:7, mit einem Verhältnis von 10% zu 90% von Ca/Sr. Gelatine ist das hydrolysierte Produkt aus denaturiertem tierischem Bindegewebe. Es wird meist, wie hier verwendet, aus Schwein- oder alternativ aus Rinderschlachtestren gewonnen. Gelatine enthält beachtliche Mengen von Hydroxyprolin, der Aminosäure, die mengenmäßig den größten Anteil von Kollagen Typ I, dem Hauptkollagen des Knochens, ausmacht. Gelatine zeichnet sich als ein gutes Trägermaterial für KEM aus, daher gibt es bereits fünf kommerzielle gelatinehaltige KEM auf DBM-Basis mit FDA-Zulassung^{168,215}. Gelatine ist außerdem gut biokompatibel^{32,168,169,231}. Das hier verwendete Material enthält ca. 26 Masseprozent Gelatine. Nach der Fällung wird das Präzipitat, d.h. der Niederschlag, abzentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Die Probekörperherstellung erfolgt, indem das Präzipitat abermals in einer Pufferlösung resuspendiert und ein Vernetzungsmittel (EDC/NHS; 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid und N-Hydroxysuccinimidester) beigemischt wird. Das Vernetzungsmittel EDC/NHS dient dem chemischen Verbinden (cross-linking) von Proteinen. Diese neue Suspension wird in spezielle Well-Platten pipettiert, zentrifugiert und gefriergetrocknet. Durch schonende Gefrier Trocknung wird dem gefrorenen Substrat Wasser entzogen. Dies ergibt die porösen Proben, welche in einem letzten Schritt mittels Skalpell in eine keilförmige Geometrie, passgenau für den im Versuchsaufbau gesetzten Critical size defect (CSD), gebracht werden, siehe Abbildung 6. Die römische III zeigt diese spezielle Abfolge von Präzipitation, Pufferlösung und Sedimentation an, die sich in Versuchen als überlegene Vorgehensweise im Vergleich zum hochdichten Verpressen des gelatinemodifizierten Minerals herausstellte. Nur so entstehen hoch poröse Strukturen innerhalb des Materials vergleichbar mit Schäumen. Die Porosität liegt bei ca. 80%, dies ist der Volumenanteil des Hohlraums am Gesamtvolumen. Die Poren haben eine durchschnittliche Größe von 1-2 µm.

In Zellkultur Nährlösungen zeigten beide Materialien gutes Anhaften, gute Proliferation von humanen mesenchymalen Stammzellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten.

Im Fall von PPGC+S 5:5^{III} fusionierten Monozyten und zeigten Resorptionsaktivität. Die Osteoblasten differenzierten schneller bei PPGC+S 3:7^{III} verglichen mit PPGC+S 5:5^{III}. PPGC+S 5:5^{III} senkte den pH-Wert stärker herab und setzte vermehrt Phosphationen frei,

wohingegen PPGC+S 3:7 ^{III} keinen Einfluss auf den pH-Wert und die Phosphatkonzentration hatte (aus Materialbeschreibung des assoziierten Dr. Benjamin Kruppke). Anhand der vorausgehenden Materialanalysen bezüglich der *in vitro* Degradation ist zu erwarten, dass sich PPGC+S 5:5 ^{III} rascher auflöst beziehungsweise abgebaut wird als PPGC+S 3:7 ^{III}. Die Probekörper werden in Keilform zurechtgeschnitten und durch Gamma Strahlung mit der Energiedosis von 25 kGy sterilisiert. Es handelt sich bei dem degradierbaren Knochenersatzmaterial um einen applizierbaren Werkstoff zur Defektfüllung, der durch die Modifizierung mit Strontium eine einstellbare lokale Freisetzung des selbigen erlaubt. Der Effekt wird hierbei nicht systemisch (= im ganzen Körper) sondern vor Ort bewirkt.

Das Strontium kann so seine Wirkung auf die Zellen entfalten und wird außerdem in neu gebildeten Knochen eingebaut. Dies ist gewünscht, da die orale Gabe von Strontiumranelat seit 2014 solange gegenangezeigt ist, bis andere Präparate zur Behandlung der Osteoporose nicht vertragen werden oder kontraindiziert sind.

Dies hängt mit einer deutlichen Erhöhung des kardiovaskulären Risikos zusammen, weil eine hohe Dosis der oralen Strontiumtherapie für das Erreichen einer ausreichend hohen lokalen Wirkstoffkonzentration am Knochen notwendig ist¹¹⁷.



Abbildung 6: Zum Vergleich liegen der entnommene knöchernen Keil aus dem CSD (schwarzer Pfeil) und das Material PPGS+S (weißer Pfeil) aneinander

3.4 Osteoporoseinduktion

Die Operation der Eierstockentnahme markierte den Tag 1 von 132, und damit den Versuchsbeginn. Um die Tiere für die Operation vorzubereiten, wurden sie aus den Stallungen zur Operationseinheit gebracht. Zur Stressminimierung wurde während des Transportes ein großes grünes Operationstuch über die Käfigbox gelegt. Die Ratten wurden einzeln aus dem Käfig entnommen. In der Narkosebox erfolgte die inhalative Allgemeinanästhesie. Die Narkose geschah durch 4vol% Isofluran. Aufrechterhalten wurde die Allgemeinanästhesie durch 1vol% Isofluran Gemisch mit Sauerstoff 0,5 L/min. Der Zufluss des Narkosegases wurde über eine passende Maske sichergestellt. Eine vorbeugende nuchale s.c. Gabe von 0,01 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic ©, Schering-Plough, USA) zur Schmerzstillung ist durchgeführt worden. Jedes einzelne Tier wurde durch eine subkutan injizierbare Chippung mit einem individuellen auf eine eindeutige Nummer programmierbaren Transponder (IPT-300 Transponder, vormals: Bio Medica Data Systems, B.M.D.S, heute: Plexx, Niederlande) markiert. Dieser Chip kann per RFID Technologie manuell vorprogrammiert und kontaktlos mit dem Handgerät (IPTT, 7009 Reader, ehemals: B.M.D.S., heute: Plexx, Niederlande) ausgelesen werden.

Die Tiere wurden gewogen und die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit einer Salbe versorgt (Bepanthen, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Die erste DEXA (dual energy X-Ray absorptiometry) Messung der Knochendichte erfolgte vor Beginn der ersten Operation in Narkose. Das verwendete Gerät ist das Lunar Prodigy. Es wird vertrieben von der Firma GE Healthcare, Deutschland.

Die bilaterale Ovariectomie (OVX) erfolgte von dorsal, auf Höhe der Rücken-Lendenwirbel. Dazu wurde das Fell dort behutsam rasiert. Die Positionierung der Ratte erfolgte in Bauchseitenlage. Die Schnauze der Tiere passt in ein vorgeformtes Mundstück der Narkosemaske. Die sterile Unterlage befand sich auf einer Wärmematte (Fa. TCM, Heidelberg), die die Tiere während der OP vor Unterkühlung bewahrte. Das OP Gebiet ist nun mit Braunol©-Lösung (7,5g Povidon-Iod in 100g Lösung, B. Braun, Melsungen Deutschland) dreimalig desinfiziert worden. Da das Gebiet als aseptisch betrachtet wird, führte der Chirurg die Tupfer zirkulär von innen nach außen. Nach dem sterilen Abdecken (Steriles Angiographietuch, Brachial angiography, Mölnlycke Health Care, Großbritannien) wurde eine ca. 1,5 bis 2cm Inzision auf Höhe der Rücken-Lendenwirbel vorgenommen. Das Bindegewebe unter der Haut wurde stumpf freipräpariert.

Unter Sicht und dem Schutz einer vorgehaltenen Schere drang der Operateur mit dem Skalpell in die Bauchhöhle ein und ließ Luft in diese eindringen. Es folgte die Darstellung von Uterus und Ovar. Das Ovar wurde freigelegt, und mit einer Pinzette extrakorporal fixiert. Eine Ligatur mit 3/0 Prolene (Firma Ethicon, Johnson&Johnson, Vereinigte Staaten von Amerika) unterband die Versorgung. Der Eileiter wurde nahe beim Eierstock unter Verwendung eines Kauters abgetrennt (s. Abbildung 7). Kontralateral ergab sich das gleiche Vorgehen zwecks bilateraler Ovariectomie. Die Gewebeschichten wurden lege artis mehrschichtig verschlossen. Die Haut wurde zusätzlich zur Knotennaht (2/0 Vicryl, Ethicon, Johnson&Johnson, Vereinigte Staaten von Amerika) mit chirurgischem Klammernähten durch einen chirurgischen Stapler (Weck Visistat 35 W, Firma Teleflex, Irland) verschlossen.

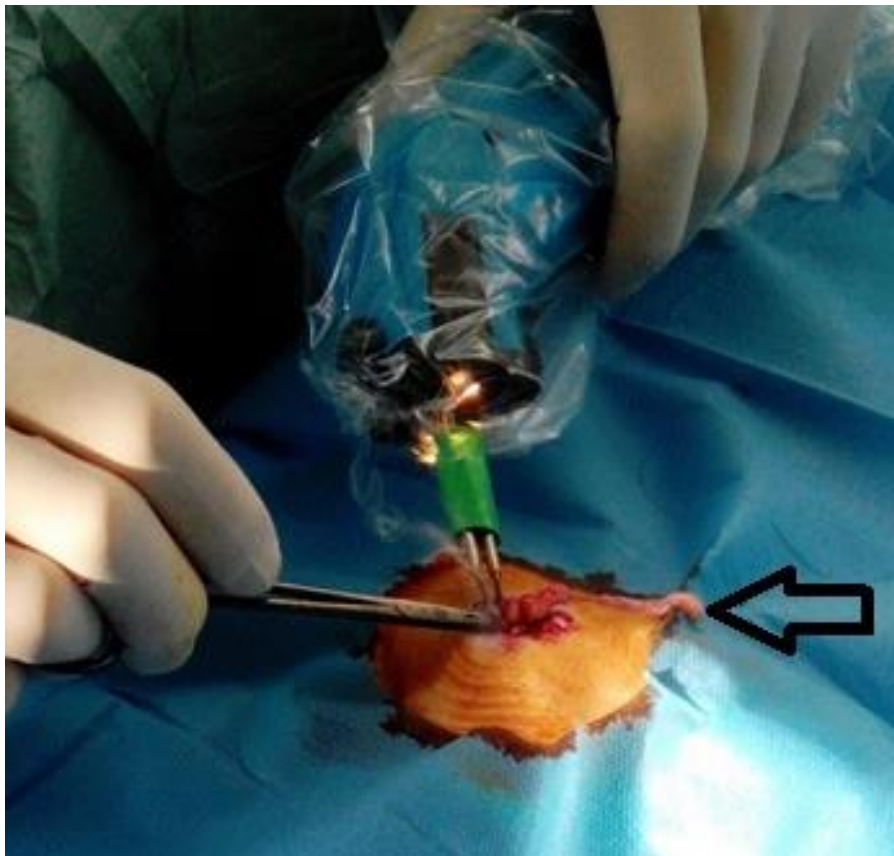


Abbildung 7: Bilaterale Ovariectomie an einer narkotisierten Ratte, der Elektrokoagulator trennt die Ovarien ab (Pfeil zeigt auf eines der beiden Ovarien)

Das Wundspray Nobecutan© deckte als oberste Schicht die Wunde wasserdicht ab. Für 24 Stunden verweilten die Tiere in einer Einzelbox. Die Einzelbox ist mit einer Zellstoffunterlage ausgelegt worden und bot Zugang zu Futter und Spezialwasser. Das Spezialwasser ist mit Tramadol (100mg/100ml Lösung, HEXAL AG, Holzkirchen, Deutschland) versetzt worden. Es enthielt dieses Analgetikum in der Konzentration von 0,66mg/ml. Die Tiere wurden in der Box ohne Holzspäne belassen, damit sie sich ohne weitere Irritationen erholen konnten. Bis die Tiere ihr Bewusstsein zurückerlangten, wurden sie in dem ruhigen und lichtgeschützten OP-Vorbereitungsraum behalten. Erst nach 24 Stunden kamen die Tiere in dieselbe Gruppe zurück wie vor der OP, und zwar gemeinsam in einen großen Käfig, in welchem sie nach Freigabe durch den zuständigen Tierarzt zurück in die großen Stallungen transportiert werden konnten.

Zeitgleich mit dem Operationsdatum der OVX, d.h. von Tag 1 der 132 Tage an, erhielten die Tiere eine Mangeldiät mit dem Spezialfutter C1034 (Altromin, Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland). Hierbei handelt es sich um eine Calcium-, Vitamin D3-, und Phosphorarme Diät. Jede Versuchsgruppe erhielt diese Mangeldiät nach der Entnahme der Eierstöcke. Diese Diät führt zusammen mit einer OVX gesichert zu einem osteoporotischen Knochenstatus der Tiere (Alt et al. 2013, und Thormann et al. 2013).

3.5 Operation des Femurs mit Generierung eines Frakturspaltes und Materialeinbringung

Die Operation am Femur dient der Einbringung der zu untersuchenden Knochenersatzmaterialien (nachfolgend KEM). Das Frakturmodell beinhaltet das Einbringen eines Defekts kritischer Größe (critical sized defect, CSD). Charakterisiert ist ein CSD dadurch, dass innerhalb von sechs Wochen, oder zur Lebenszeit des Tieres, ohne chirurgische Intervention, keine stabile knöcherne Überbrückung entstehen kann^{7,11,60,175,205}. Die Operation fand am Tag 90 des Versuchs statt. Wenn neuartige Biomaterialien *in vivo* untersucht werden, ist ein CSD Tiermodell die wichtigste Methode um fundierte Erkenntnisse zu erhalten⁶⁰.

Die Anästhesie erfolgte wie weiter oben unter dem Punkt „Osteoporose induzieren“ beschrieben durch eine inhalative Gabe von Isofluran aus einem Narkosegerät und einer s.c. Injektion von Buprenorphin.

An den Tieren erfolgte präoperativ, sobald sie unter Inhalationsnarkose standen, ein zweites Mal eine Knochendichtemessung mittels der DEXA Methode. Das Gewicht der Tiere wurde ein weiteres Mal bestimmt. Die Augen der Ratten wurden behutsam mit Bepanthensalbe © benetzt und so vor dem Austrocknen während der Operation geschützt. Die Lagerung der Tiere erfolgte in Rechtsseitenlage. Nur so hatte der Operateur Zugriff auf die zuvor freirasierte linke Oberschenkelregion. Das Tier wurde lokal auf der linken Oberschenkelseite mit Braunol © desinfiziert. Das sterile Abdecken minimierte die Keimverschleppung in das OP-Gebiet. Der Operateur inzidierte longitudinal vom distalen Femur Richtung proximal. Der Schnitt hatte eine Länge von ungefähr drei bis vier Zentimetern. Er reichte vom Kniegelenk bis zur mittleren Länge des Oberschenkels. Die Faszia lata ist mit derselben Länge eröffnet worden. Die ischiokrurale Muskulatur wurde vom Oberschenkelstrecker getrennt. Auf diese Weise wurde das Femur zugänglich.

Der Knochen wurde nun belastungsstabil mit einer T-Platte für die Handchirurgie (Stryker, Leibinger Miniplatte, Typgröße XS, schmal, 8-Loch) osteosynthetisch versorgt. Dazu wurde die Platte mit der Schneidezange (Stryker, Kat. 62-20125) um ein Loch gekürzt. Ebenfalls glich der Chirurg die Platte an den Verlauf des Rattenfemurs mit der Biegezange (Stryker, Kat. Nr. 62-21723) an. Die distalen Löcher wurden zuerst durch Auflage der Miniplatte als Schablone gebohrt und dann mit 1,2 mm Schrauben (Stryker, zum Leibinger System gehörend) fixiert. Erst wenn alle sieben Löcher gebohrt und verschraubt (Schraubendreher, Stryker, Kat. Nr. 62-17004) worden waren, nahm der Operateur die Osteotomie vor. Zur Verwendung kam eine Ultraschallsäge der Firma Mectron, Deutschland (Piezosurgery 3, Sägeblatt OT7S-3). Die Osteotomie wurde ständig durch eine integrierte Leitung mit Ringerlösung versorgt und durch diesen Flüssigkeitsstrom gekühlt, da der Vorgang des Sägens Wärme erzeugt. Ein keilförmiges Stück Knochen konnte herausgetrennt werden. Lateral hatte der Defekt eine Größe von 4 mm, medial ist er 0,35 mm weit gewesen. In die entstehende Lücke wurde das keilförmige vorgeformte KEM eingesetzt, bzw. in der Kontrollgruppe leer belassen (s. Abbildung 8).

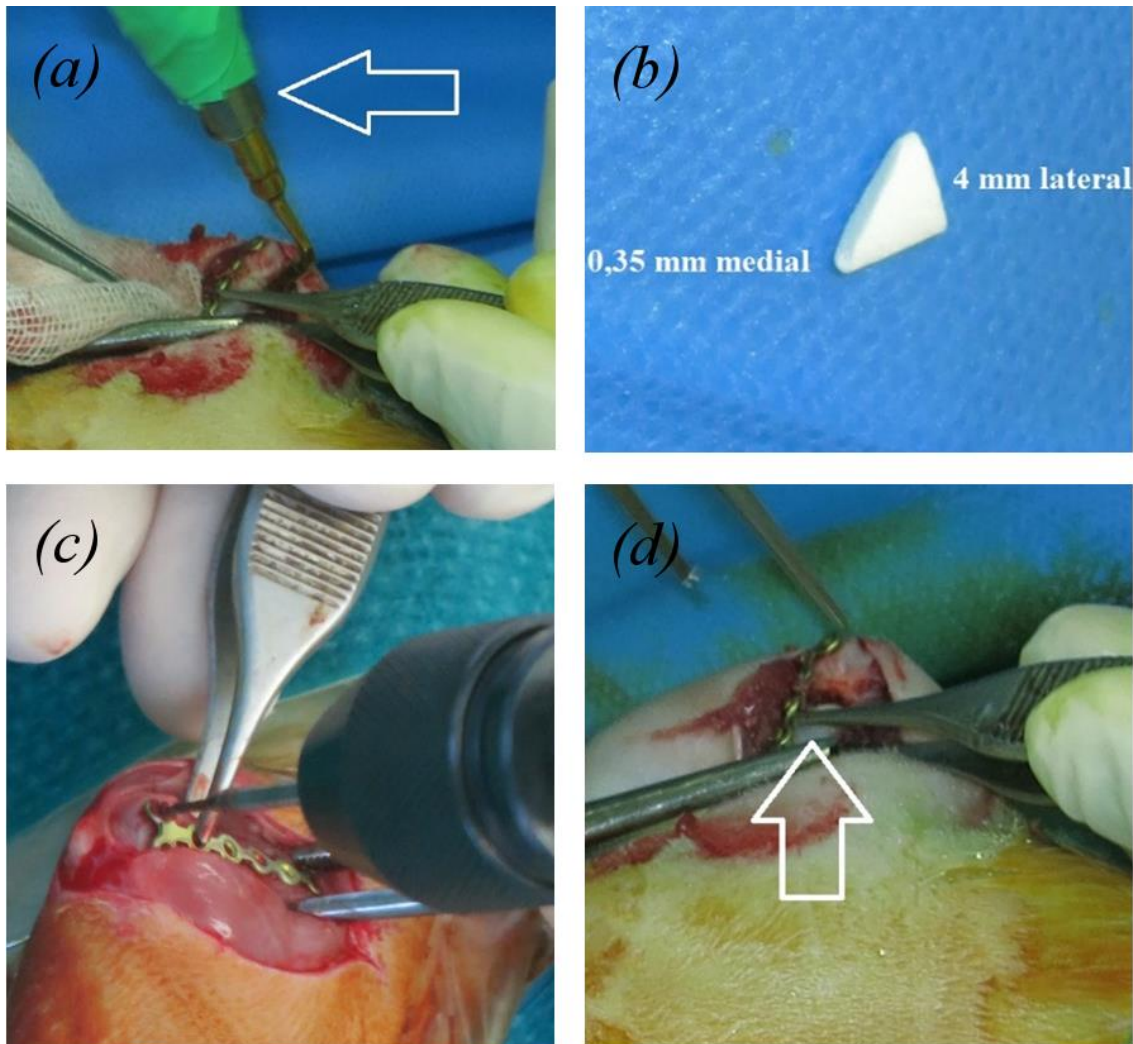


Abbildung 8: (a): Setzen des keilförmigen Defekt (CSD) mittels oszillierender Säge (Pfeil nach links (b): keilförmiges KEM PPGC+S^{III} 3:7 zur Defektfüllung; PPGC+S^{III} 5:5 sieht makroskopisch identisch aus; (c): Einbringen der Schrauben in die T-Miniplatte im Rattenfemur; (d) CSD ist mit PPGC+S gefüllt (Pfeil zeigt auf KEM-Keil)

Die Wunde wurde schichtweise verschlossen. Eine Naht verschloss die Muskulatur, eine weitere die Haut, eine Klammernaht bildete die oberste Schicht. Nobecutan© Spray schloss die Wunde wasserdicht ab. Das postoperative Geschehen glich der OVX. Die Ratten erhielten Tramadol im Trinkwasser und es erfolgte erneut eine Einzelhaltung für 24 Stunden.

3.5.1 Euthanasie der Tiere

Am 132. Tag nach Versuchsbeginn wurden die Tiere mit einer Überdosis CO₂ in einem eigens hierfür bereitgestellten Apparat (CO₂ Box, Ehret, Firma Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel) getötet. Unmittelbar daran schloss sich das Feststellen des Todes nach klinischen Gesichtspunkten an.

3.5.2 Entnahme der Femora

Im Anschluss an die Euthanasie erfolgte die Entnahme der Femurknochen bei allen Tieren, die für die histologische Untersuchung vorgesehen waren. Dafür wurde die Haut über den linken Oberschenkeln mit einem Skalpell freipräpariert und das Bein vom Körper getrennt. Das Weichgewebe wurde vorsichtig vom Knochen gelöst.

Nun konnten die Mini-T-Platten losgeschraubt werden (Schraubendreher, Nr. 62-17004, V4 Stryker Deutschland). Sobald die Knochen ohne Platte auf einer Unterlage lagen, sah der Untersucher, ob eine Infektion vorliegt (s. Abbildung 9). Die Knochen wurden auf Ödeme, Infektionen und Stabilität hin untersucht. Alle auffälligen Aspekte wurden protokolliert.

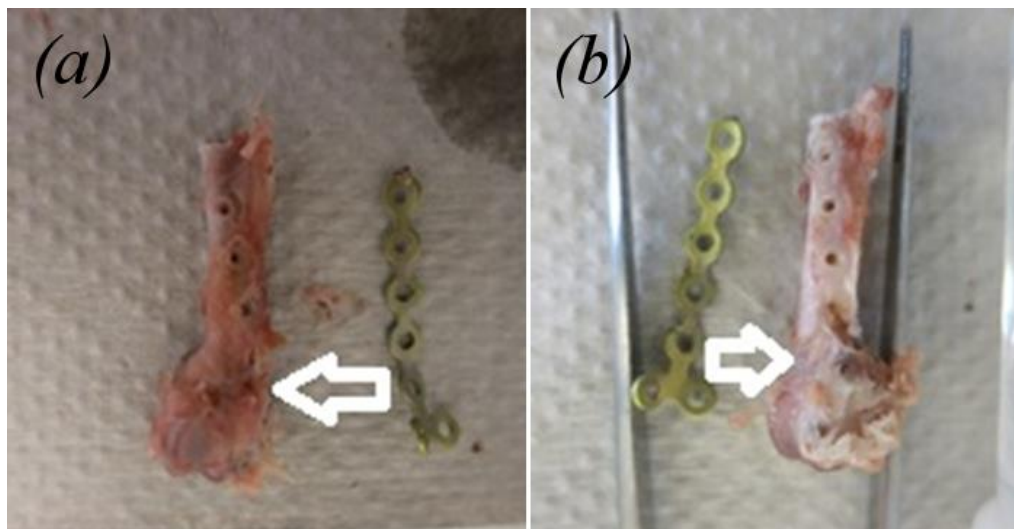


Abbildung 9: Entnommener Rattenfemur mit Material PPGC+S^{III}, (a) aus Subgruppe 2, (b) Subgruppe 3, Pfeile zeigen auf den ehemaligen CSD, Lage anatomisch korrekt & identisch, siehe Schraubenverlauf

3.5.3 Fixierung und Einbettung in Technovit 9100 ©

Die Oberschenkelknochen wurden nach dem Protokoll des Herstellers entsprechend in das Polymethylmethacrylat Gemisch von Heraeus Kulzer (Hanau, Deutschland) Technovit 9100© eingebettet. Bei dieser Einbettung bleibt der mineralische Anteil des Knochens und die Knochenersatzmaterialien an Ort und Stelle erhalten.

Es bedarf keiner Dekalzifizierung des Knochens. Direkt nach der Entnahme lagerten die Knochenproben zur Fixierung für 48 Stunden im Kühlschrank in einer Pufferlösung bestehend aus 4% Paraformaldehyd in 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer bei pH 7,2-7,4. Der Probentransport erfolgte zum Erhalt der Proteinstruktur immer auf Eis in einer Styroporbox. Um den Knochen einzubetten wurde er aus der gekühlten Pufferlösung entnommen, und sechsmalig mit Natriumphosphatpuffer, mit einem pH von 7,2-7,4 gespült. Die Entwässerung geschah in einer aufsteigenden Alkoholreihe auf einer Rüttelplatte (s.Tab.3.5-a). Die Chemikalien und Bezugsfirmen finden sich in Tab.3.5-d.

Tab.3.5-a: Alkoholreihe für Technovit©-Einbettung

Schritt	Alkohol	Dauer auf der Rüttelplatte
1	70%	Zwei Tage
2	70%	Zwei Tage
3	80%	Drei Tage
4	96%	Zwei Tage
5	100% (1)	Drei Tage
6	100% (2)	Drei Tage
7	100% (3)	Zwei Tage
8	100% (4)	Zwei Tage
9	100% p.a.	Einen Tag

Im Anschluss durchliefen die Proben zwei zwölfstündige Standzeiten in Xylol. Nachfolgend wurden die Knochen durch drei Präinfiltrationslösungen (PIL) (für drei Tage PIL 1, zwei Tage PIL 2 und drei Tage PIL 3) geschleust (s.Tab.3.5-c). Abschließend verweilten die Proben in der Infiltrationslösung I, II und III für jeweils sechs Tage. Der Hersteller hält fünf essenzielle Komponenten für Technovit 9100© bereit (s.Tab.3.5-b).

Tab.3.5-b: Komponenten für Technovit®

Name	Menge	Komponenten
Technovit® 9100 Basislösung stabilisiert (Methylmethacrylat+ Hydrophilisierungsmittel)	1000ml	1
Technovit® 9100 PMMA Pulver	120g	2
Technovit® 9100 Härter 1 (Peroxidverbindung)	Acht Beutel zu je 1g	3
Technovit® 9100 Härter 2 (katalytische Wirkung auf Härter 1, hiermit kann bei Minustemperaturen die Polymerisation vonstatten gehen)	10ml	4
Technovit® 9100 Regler (reaktive organische Verbindung, ebenfalls zur gleichförmigen Polymerisation unterhalb von 0°C)	5ml	5

Tab.3.5-c: Infiltrationslösungen für Technovit®-Einbettung

Lösung	Komponenten
Präinfiltrationslösung 1	Stabilisierte Basislösung: Xylol (1:1) (125ml+125ml)
Präinfiltrationslösung 2	Stabilisierte Basislösung + Härter Nr. 1 (250ml+ 1,25 g)
Präinfiltrationslösung 3	Entstabilisierte Basislösung + Härter Nr. 1 (250ml+1,25g)
Infiltrationslösung	Entstabilisierte Basislösung + PMMA + Härter 1 (250ml+ 20g PMMA (Pulver 2) + 1g Härter)

Tab.3.5-d: Chemikalien für die Einbettung mit Technovit© 9100

Chemikalienbestellnummer-& Bezugsfirma	
Xylol	Fa. Roth, Nr. 9713.3
Etahmol 522 vergällt mit 1% Petroläther	Fa. Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Ethanol p.a.	Fa. Merck, Nr. 1.00014
Technovit 9100 Basisflüssigkeit	Fa. Heraeus Kulzer, Nr. 66006735
Technovit 9100 PMMA-Pulver	Fa. Heraeus Kulzer, Nr. 66010251
Technovit 9100 Härter 1	Fa. Heraeus Kulzer, Nr. 64709022
Technovit 9100 Härter 2	Fa. Heraeus Kulzer, Nr. 66039185
Technovit 9100 Regler	Fa. Heraeus Kulzer, Nr. 66039184
Parafilm	Fa. Bemis Company, Nr. 32436000
Edisonite (zur Endreinigung der Geräte)	Fa. Schülke, Nr. 230050
Einmalpipette 25 ml	Fa. Falcon, Nr. 3575254.3
Plastikpipette 5 ml	Fa. Alpha Laboratories, Nr. LW4728
Aluminiumoxid	Fa. Roth, Nr. X908
Ethanol p.a.	Fa. Riedel-de Haen, Nr. 32205

Die Umwicklung mit Alufolie schützt die Plastikflasche vor Licht. Arbeiten mit Technovit© 9100 finden stets unter dem Abzug statt, da die austretenden Gase die Atemwege reizen. Zur eigentlichen Einbettung wurden die Stammlösungen A und B miteinander in einem Becherglas im Verhältnis 9:1 Volumenanteile vermischt (s.Tab.3.5-e). Ovale Plastikformen (Heraeus Kulzer GmbH, Form zum Einbetten von histologischen Präparaten, 63450 Hanau), welche 10 ml des A+B Gemisches fassen, wurden bodendeckend mit der Einbettmasse gefüllt. Die Knochen wurden aus den Spülkassetten entnommen und zusammen mit einer eindeutigen papierenen Markierung in die Plastikformen gegeben. Die Form wurde luftblasenfrei gefüllt. Zur Versiegelung der Formen wurde ein ovaler Ausschnitt von Parafilm© benutzt (Bemis Company, USA). Die Proben wurden anschließend bei -4°C für 48 Stunden im Kühlschrank zur Polymerisation gelagert. Während der Aushärtung musste gekühlt werden, da es sich um eine exotherme Reaktion handelte. Dies soll eine etwaige Denaturierung der Proteine verhindern. Nach zwei Tagen im Kühlschrank folgte die Temperierung der Proben für einige Stunden auf +4 °C im Kühlschrank, so dass sie keinen zu starken Temperaturwechseln unterlagen.

Tab.3.5-e: Stammlösungen für die Polymerisation von Technovit®

Stammlösungen für die Polymerisation	
Stammlösung A	500ml Basislösung, entstabilisiert 80g PMMA, 3g Härter 1 (lagerfähig in 500ml Plastikflasche bei -20°C)
Stammlösung B	44ml Basislösung, entstabilisiert 4ml Härter 2 2ml Polymerisations Regler

3.5.4 Zuschnitt der Technovit® Blöcke

Für die weitere Bearbeitung wurden die ovalen PMMA Blöcke mit dem darin enthaltenen Knochen in eine rechteckige Form zurechtgeschnitten. Dies geschah mit einer speziellen Säge (Firma Exakt, Diamant Bandsäge, 310 CL, Exakt Apparatebau, GmbH 22851 Norderstedt). Das Sägeblatt ist für das Schneiden der harten Proben optimal, da die Sägeseite mit feinen Diamanten besetzt ist.

3.5.5 Anfertigen der 5µm Schnitte

Die Schnitte der Proben wurden durch die Laborbetreuerin dieser Arbeit, Dr. Seemun Ray, angefertigt. Ein Rotationsmikrotom (Typ: RM2155) der Firma Leica Instruments GmbH (69226, Nussloch, Deutschland) kam für das Abtrennen von 5µm dünnen Schnitten zur Anwendung. Das Mikrotommesser (Typ: D-Messer, Nr. 26022, HM 16cm/d, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) ist nachschleifbar.

Nach Einspannen des Probenblocks in die Vorrichtung war es nun notwendig, sich unter optischer Kontrolle im Trimm Modus bis zum Anschnitt des Knochenlagers vorzuarbeiten (s.Abbildung 10). Nach dem ersten Anschnitt von Knochen folgten oft noch Korrekturen des optimalen Schneidewinkels, um frontale Schnitte des gesamten Defektbereichs zu erreichen. Um Schnitte ohne Materialverlust zu generieren, wurde ein passend zur Blockgröße zugeschnittener Kawamoto Film (Cryofilm type II c (9), 1,5 cm Weite, Section Lab-Co., Ltd., Japan) auf den Probenblock geklebt. Beim Schneiden klebt der Schnitt dann auf der Folie und wird anschließend mit Doppelklebepunkten (Haft Aufkleber, elektrisch nichtleitend, Firma Plano, Best. Nr. G304) auf einem Objektträger

(geschliffen und geputzte Objektträger mit Mattrand, 75 x 26mm, Firma R. Langenbrinck, 79312 Emmendingen) fixiert.

Pro Probe fertigten wir 20-30 Schnitte an. Für die nachfolgenden Experimente wurden die im Hinblick auf ihre Vollständigkeit besten Schnitte verwendet. Die Objektträger wurden bis zur Verwendung in Aufbewahrungsboxen gelagert.



Abbildung 10: Block des eingebetteten Knochens der Subgruppe 2 im Mikrotom mit Kawamoto-Folie (Pfeil zeigt auf nicht klebenden goldenen Teil der Folie)

3.6 Färbemethoden

Die Färbungen entsprechen in der Abfolge den laboreigenen Protokollen, respektive den Standardarbeitsanweisungen der experimentellen Unfallchirurgie Gießen.

3.6.1 Movat Pentachrom Färbung- Ablauf

Die Movat Pentachromfärbung ist im Jahr 1955 in Toronto durch den rumänisch-kanadischen Pathologen *Henry Zoltan Movat* entwickelt worden²²⁴. Mit der Färbung nach *Movat* gelingt die gleichzeitige Darstellung unterschiedlicher intra- und extrazellulärer Bestandteile in Hart- und Weichgeweben^{55,165,213}. Der wichtigste Unterschied zu anderen Färbemethoden ist die klare Abgrenzung zwischen Osteoid (rot) und mineralisiertem Knochen (gelb)¹⁶⁵. Die Movatfärbung ist eine substanzspezifische Färbung, da sie die Strukturen aufgrund chemischer Reaktionen färbt⁵⁵. Als Voraussetzung für die Anwendung an Knochenschnitten ist bereits 1966 durch *Burkhardt* die Methylmethacrylat-Einbettung von Knochenproben mit guten Ergebnissen etabliert worden, ohne dass diese Schnitte vorher eine Decalcifizierung erfahren haben³³. Die

Schnitte wurden damals wie heute aus einem Block durchpolymerisierten Methylmethacrylats, inklusive darin enthaltenen Knochen, angefertigt. Es handelt sich bei der „Movat Färbung“ um eine Pentachrom Färbung (s.Tab.3.6-c). Das heißt, es werden fünf Farbesubstanzen verwendet²¹³. Saure Glykosamine haben eine negative Ladung (aufgrund Sulfat- bzw. Carboxylgruppen) und binden deswegen den positiv geladenen Farbstoff Alcianblau^{142,213}. Der Kernfärbung dient Eisenhämatoxylin. Es färbt die Zellkerne durch Lackbildung blauschwarz, wobei das Eisen einerseits das Oxidationsmittel des Hämatoxylins, andererseits die Beize zur Bindung des Farbstoffes ist¹⁴². Das Brillant-Crocein zusammen mit dem Säurefuchsin färbt das Zytoplasma rötlich an²¹³. Safran-du-Gâtinais färbt kollagenes Bindegewebe hellgelb²¹³. Der reife Knochen wird dunkelgelb gefärbt¹⁸⁵. Die Phosphorwolframsäure dient zur Differenzierung, also der Entfernung überschüssiger Farbe nach regressiver Färbung (einer gewollt überschüssigen Färbung)^{142,165}.

Alle Färbelösungen wurden vor Benutzung filtriert. Sämtliche Färbeschritte finden auf einem Rüttler statt. Eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien gibt Tab.3.6-a. Wie die Reagenzien vorbereitet worden sind, steht in Tab.3.6-b.

In MEA, 2-Methoxyethyl-acetat, wurden die Technovit 9100 Schnitte für drei mal zehn Minuten deplastifiziert. Es folgte eine Rehydrierung durch die absteigende Alkoholreihe, 100%, 96%, 70%, für jeweils 2 Minuten und zweimaliges Spülen für drei Minuten mit destilliertem Wasser. Auf die Beschaffenheit der verwendeten Wässer (destilliert/undestilliert) kommt es besonders an, da die darin enthaltenen Mengenverhältnisse von Ionen die Farbaufnahme maßgeblich beeinflussen.

Als erstes wurden saure Glykosaminoglykane für 30 Minuten mit Alcianblau gefärbt. Das zehnminütige Verweilen in Leitungswasser und eine anschließende einstündige Standzeit in alkalischem EtOH (Ethanol) fixierte diesen Färbeschritt. Nochmals wurde Leitungswasser, diesmal allerdings fließend, genutzt. Kurzes Abspülen durch Eintauchen in dH₂O (Aqua. dest.) erfolgte im Anschluss. Die nachfolgende Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert aus den Komponenten A und B, 1 zu 1 gemischt jeweils 25 ml, färbte die Zellkerne nach zehn Minuten blauschwarz an. Das destillierte Wasser spülte die Proben und Leitungswasser ist sieben Minuten fließend auf den Küvettenrand gerichtet worden. Brillant-Crocein und Säure Fuchsin dienten dazu, das Zytoplasma rötlich zu färben.

Die Mischung beider Substanzen wirkte über sieben Minuten ein. Es folgte die kurze spülende Anwendung mit 0,5 %-iger Essigsäure und eine dreiminütige Einwirkzeit der Phosphorwolframsäure, was in Kombination diese Stufe fixiert hat. Chemisch gereinigter EtOH (p.a. Alkohol) wurde für zwei Minuten angewendet. Eine Lösung des wertvollsten Farbstoffes dieser Färbemethode, Safran du Gâtinais, färbte nun für exakt 23 Minuten mineralisierten Knochen und kollagenes Bindegewebe gelb. Eine lichtmikroskopische Kontrolle einiger Stichproben erfolgte, um diesen kritischen Schritt nötigenfalls noch länger durchführen zu können. Zweimaliges Spülen in 100%igem EtOH, dabei genügt das Eintauchen, und in Xylol für zwei mal fünf Minuten, bilden die letzten Schritte im Färbeprotokoll. Die Schnitte wurden mit der leeren Kawamoto-Film-Unterseite auf einen Objektträger mit einem kleinen Tropfen DEPEX-Polystyrollösung (100ml Einbettungsmedium, Firma Serva, Heidelberg) aufgeklebt. Auf die den Knochenschnitt tragende Seite kommt ebenfalls ein kleiner Tropfen Depex. Das Deckglasscheibchen wird mit Bleigewichten beschwert und der gesamte Objektträger über Nacht im belüfteten Abzug getrocknet. Am nächsten Tag können Depex-Überstände mit dem Skalpell entfernt werden. Die Färbung nach Movat wurde zusammen mit Lucretia Franz-Forsthoffer erlernt und kooperativ durchgeführt.

Tab.3.6-a: Movat-Reagenzien

Chemikalie	Firma und Bestellnummer
Alkohol.Ethanol 522 vergällt mit 1% Petroläther	Fa. Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Fa. Roth, Nr. 9713.3; 2,5 Liter
(2-Methoxyethyl)-Acetat (MEA)	Fa. Merck, Nr. 8.06061
Essigsäure	Fa. Merck, Nr. 1.00063
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung A	Fa. Roth, Best. Nr. X906
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung B	Fa. Roth, Best. Nr. X907
Filterpapiere HK83,1, MN 615 ¼; Durchmesser 185 mm	Fa. Roth, Nr. 175511148
Ammoniaklösung 32%	Fa. Roth, Nr. P093.1
Alcian Blau	Fa. Chroma, Nr. 2C-005
Brilliant Crocein R	Fa. Chroma, Nr. 1B-109
Säurefuchsin	Fa. Chroma, Nr. 1B-525
Phosphorwolframsäure	Fa. Merck, Nr. 1.00583
Safran du Gâtinais	Fa. Chroma, Nr. 5A-394

Tab.3.6-b: Anleitung zur Vorbereitung der Lösungen (Movat)

Alle Lösungen in gläsernen Standzylindern ansetzen	
Alkalischen Ethanol herstellen	20 ml 25% Ammonium Hydroxid plus 180 ml 96% Ethanol, pH >8 (25% Ammoniak= 78 ml Ammoniak plus 22ml aqua dest.)
Hämatoxylinlösung A und B nach Weigert	1 Teil A plus 1 Teil B (lichtgeschützt 7 Tage haltbar)
Lösung A= Brilliant Crocein-R: 0,1 g Brilliant Crocein R in 99,5 ml Aqua dest. lösen, dann 0,5 ml Essigsäure zugeben und filtrieren.	Arbeitslösung: Mischung aus Lösung A und B im Verhältnis 5:1
Lösung B=Säurefuchsin: 0,1 g Säurefuchsin in 99,5 ml Aqua dest. lösen, dann 0,5 ml Essigsäure zugeben und filtrieren	
Phosphorwolframsäure	5 g Phosphorwolframsäure in 100 ml Aqua dest. lösen
Safran du Gâtinas	6 g Safran d.G. in 100 ml 100%igem Ethanol lösen, bei 50°C für 48 Stunden im Wärmeschrank inkubieren, anschließend vor Gebrauch filtrieren

3.6.2 Movat Farbgebung

Tab.3.6-c: Movat-Farbgebung

Gewebe	Farbgebung
Mineralisierter Knochen	dunkelgelb
Kollagen	leuchtend gelb
Mineralisierter Knorpel	blau – grün
Osteoid	dunkel – rot
Elastische Fasern	rot
Zellkerne	blauschwarz
Cytoplasma	rötlich
Saure Glykosaminoglykane	leuchtend hellblau
Knorpelgewebe, je nach Fixierung	rötlich bis gelb

3.6.3 Versilberung nach von Kossa und van Gieson

Die Kombination zweier Färbemethoden ergibt die *von Kossa /van Gieson Färbung*. Der Zweck des Silbernitrats bei der *von Kossa* Technik ist als indirekter Calciumnachweis zu beschreiben. Die Calciumkarbonate und -phosphate verlieren während des Färbevorgangs im Austausch gegen Silberionen ihren Anteil an Calcium³⁸. Durch Reduktion mit Natriumkarbonat entsteht metallisches Silber¹⁴². Die Methode nach *von Kossa* ist spezifisch für Calciumphosphate, bzw. um calcifizierte gegen uncalcifizierte Gewebe abzugrenzen^{71,165}. Aufgrund der Verwendung von Silberionen ist die Methode wiederum recht unspezifisch, weil Fettsäuren, oder Verunreinigungen mit Chloriden, Phosphaten, Sulfaten und Carbonaten vorliegen, mit denen die Silberionen auch reagieren können, wobei mit diesen Verunreinigungen im Knochengewebe nur bedingt gerechnet werden muss¹⁴². Professor Dr. Julius von Kóssa entwickelte diese Färbemethode bereits 1900 in Budapest, als Nachweis verkalkter Nierenarterien im Tiermodell¹¹¹.

Das unmineralisierte Gewebe wird durch die Bestandteile der *van-Gieson*-Färbung gefärbt. Das Kollagen, Muskel- und Bindegewebe kommen so zur Darstellung. Die Muskulatur erhält eine gelbe Farbe, das Kollagen ist rot gefärbt¹⁴². Zur Färbung der Kerne wird das Eisenhämatoxylin nach *Weigert*, auch Eisenhämlack (Lack= Farbstoff plus Beize) genannt, verwendet. Weigerts Eisenhämatoxylin besteht aus der chromogenen Stammlösung A (1 g Hämatoxylin in 100 ml 96% Ethanol) und der Stammlösung B (1,5g FeCl₃ in 100 ml Aquadest plus 1ml 25% Salzsäure), die als Beize und Oxidationsmittel dient¹⁴². Es ist beständig gegen die Wirkung der Pikrinsäure, welche in einem nachfolgenden Schritt des Färbeprotokolls zur Anwendung kommt¹⁷⁴. Zwei Farbstoffe bilden die Pikrofuchsin-Mischung, das sind Pikrinsäure (gelbfärbend) und Säurefuchsin (rotfärbend), die verwendet werden, weil sie unterschiedlich tief und schnell färben (Pikrinsäure ist feindisperser und höher konzentriert als das Säurefuchsin)¹⁴². Zu den einzelnen Komponenten und deren Vorbereitung beachte Tab.3.6-d und Tab.3.6-e. Nach *von Kossa/van Gieson* ist der mineralisierte Knochen schwarz, Osteoid rot gefärbt (s.Tab.3.6-f)¹⁹⁵. Die einzelnen Schritte werden in sauberen gläsernen Küvetten durchgeführt. Zuerst wurden die Proben mit 2-Methoxyethylacetat deplastifiziert. Dieser Schritt wurde drei Mal für jeweils 10 Minuten wiederholt. Es folgte eine jeweilige zweiminütige Standzeit in der absteigenden Alkoholreihe von 100%, 96%, 80% mit abschließend 70%. Das Entacrylieren, d.h. Deplastifizieren endete durch ein fünf Minuten dauerndes Rehydrieren in Aqua bidest. In einer 3% Silbernitrat-Lösung verweilten die

Proben für 10 Minuten. Es folgte dreimaliges Waschen in Aqua bidest. In 10 %iger - Natriumkarbonat—Lösung (10 g Sodiumcarbonat + 25 ml Formaldehyd 37% in 100 ml Aqua bidest.) wurde das Silbernitrat zwei Minuten lang reduziert. Nach zehnminütigem Spülen unter fließendem Leitungswasser erfolgte das Fixieren in 5 % Natriumthiosulfat (5 g Natriumthiosulfat in 100 ml Aqua bidest.), an das sich ein zweimaliges Eintauchen, für jeweils zwei Minuten, in Aqua dest. nahtlos anknüpft. Dieser Schritt bricht die Reaktion ab. Die Methylgegenfärbung benötigt fünf Minuten, und wurde gefolgt von einer Verweildauer von zehn Minuten in Leitungswasser, danach dreimaliges Waschen in Aqua dest. für jeweils zwei Minuten. Das Prozedere setzte sich mit der *van Gieson* Färbemethode fort, deren erster Part die sechsminütige Inkubation in Eisenhämatoxylin nach Weigert ist. Hiernach wird 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Inkubation der Proben in der Färbelösung nach *van Gieson* wurde von 5 auf 20 Minuten verlängert, um eine kräftigere Farbgebung zu erhalten. Dreimaliges Eintauchen in 96 %-igen Alkohol und einminütiges Verweilen in 100%-igen Alkohol entwässert die Knochenschnitte, bevor sie zweimal für fünf Minuten in Xylol stehen und abschließend mit dem Polystyrolgemisch Depex luftblasenfrei eingedeckt werden konnten. Zur Trocknung blieben die Objekträger für einen Tag lang unter den entlüftenden Abzügen im Labor. Die Färbung nach von Kossa/van Gieson wurde zusammen mit Lucretia Franz-Forsthoffer erlernt und kooperativ durchgeführt.

Tab.3.6-d: Reagenzien (inkl. Lieferanten) der von Kossa/van Gieson Färbung

Reagenzien	
Alkohol	Fa. Stockmeier Chemie, Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther, Best. Nr. 1001043227002, 16kg (20,3 l)
Xylol	Fa. Roth, Best. Nr. 9713.3, 2,5l
MEA (2-methoxyetyl-acetat)	Fa. Merck, Best. Nr. 8.06061, 1l
Silbernitrat	Fa. Sigma Aldrich, Best. Nr. 31630-100G-R
Natriumcarbonat	Fa. Merck, Best. Nr. 1.063922.0500, 500g
37%-ige Formaldehydlösung	Fa. Merck, Best. Nr. 1.04002.2500, 2,5l
Natriumthiosulfat	Fa. Merck, Best. Nr. 106.509
Methylgrün	Fa. Roth, Best. Nr. 5159.2, 10g
Eisenhämatoxylin nach Weigert	Fa. Roth, Lösung A, Best. Nr. X906.1, 500 ml Roth, Lösung B, Best. Nr. X907.1, 500 ml
Van Gieson	Fa. Chroma, Best. Nr. 2E050
Depex	Fa. VWR, Best. Nr. 361254D

Tab.3.6-e: Anleitung für die Vorbereitung der Lösungen (vKvG)

3 % Silbernitrat	3 g auf 100 ml Aqua dest., und Lagerung in einer braunen Flasche
10% Natriumkarbonat-formaldehyd	10 g Natriumkarbonat+ 25ml 37% Formaldehyd, auf 100 ml Aqua dest. aufgefüllt
5 % Natriumthiosulfat	Die Lösung muss immer frisch angesetzt werden, 5 g auf 100 ml Aqua dest.
Methylgrün	1 g Methylgrün auf 100 ml Aqua dest. + 25ml Ethanol
Hämatoxylin A und B nach Weigert	1 Teil A und 1 Teil B vermischen, diese Lösung ist bei 4 °C 7 Tage haltbar

Tab.3.6-f: von Kossa/van Gieson-Farbgebung

Es entstehen folgende Farbgebungen:	
Zellkerne	schwarzbraun
Cytoplasma	gelb bis hellbraun
Retikulinfasern	ungefärbt bis blassrot
Basalmembranen	ungefärbt bis blassrot
Kollagene fasern	rot
Elastische fasernetze	blassgelb
Membranen	blassgelb
Interzellulärsubstanz im hyalinen Knorpel	rot-gelb
Verkalkter Knochen	schwarz
Cytoplasma von Muskelzellen	gelb
Erythrozyten	gelb
Fett	ungefärbt

3.7 Enzymhistochemische Analyse

3.7.1 Nachweis der Tartrat-resistenten Sauren Phosphatase (TRAP)

TRAP Isoform 5b ist eine Enzymunterform Saurer Phosphatasen, welche fast ausschließlich von aktiv den Knochen abbauenden Osteoklasten gebildet wird, und sich daher optimal als Marker dieser Zellen verwenden lässt^{88,153,225}. Außerhalb der Zellreihen des mononukleären Phagozytensystems kommt TRAP in den sekretorischen Zellen des Leber-, Pankreas- und Nierenmesangium vor⁹. Die Isoform TRAP 5b kommt in den Osteoklasten auf der Ruffled Border, den Lysosomen, den Golgi Zisternen und den Transzytosevesikeln vor^{9,88,134}. Saure Phosphatase lässt sich durch L (+) -Tartrat-haltige Lösungen nachweisen. Die Aufgabe von TRAP ist unter anderem die Bildung von zur Reaktion neigenden Sauerstoffspezies (ROS), ein freies Radikal, durch Haber-Weiss-Fenton Reaktion im aktiven Zentrum zu sein. Dort liegt ein Eisenatom vor, das als Elektronendonator dient. ROS können das mengenmäßig häufigste Kollagen des Knochens, Kollagen Typ 1, enzymatisch andauen und außerdem unter sauren Bedingungen hydrolytisch auf einige Phosphatester und Anhydride wirken^{31,76,162}. Die Rolle von TRAP beim Knochenabbau besteht also darin, den endozytierten organischen Knochenanteil zu zersetzen. TRAP befähigt die Osteoklasten zur Migration (aktiven Fortbewegung), indem es die Anheftung an die Knochenmatrix herunter reguliert⁶¹. TRAP ist essentiell für die chondrale Ossifikation und ein Mangel führt im Mäusemodell zu milder Osteopetrose⁹¹. TRAP ist besonders wichtig für die Skelettentwicklung langer Knochen im Bereich der Metaphyse während der chondralen Ossifikation²². Die TRAP-Nachweismethode dieser Arbeit unterscheidet nicht zwischen den Isoformen und färbt auch andere Tartrat resistente saure Phosphatasen an (Makrophagen, Chondroblasten).

Zur Vorbereitung wurde das Eindeckmedium, Kaisers Glyceringelatine, in einem warmen Wasserbad verflüssigt, damit es am Ende des Färbeprotokoll sofort zur Benutzung bereitstand. Eine Feuchte Kammer, auch Inkubationskammer genannt, wurde mit Papier aus dem Laborbedarf und Aqua dest. vorbereitet. Das Entacryllieren erfolgte durch zweimalige Standzeit von zehn Minuten in MEA (2-methoxyethyl-acetat). Es schloss sich eine absteigende Ethanolreihe mit jeweils fünf Minuten Verweildauer an.

Es folgte zweimaliges Spülen in Aqua dest. für jeweils fünf Minuten. Für zehn Minuten wurden die Schnitte in einer Küvette mit 0,1 molarem Natrium-Acetatpuffer, pH 5,2, belassen. Die Schnitte wurden nun alle mit einem Pap - Pen umkreist, der die Färbelösung auf dem Schnitt hält. Die Färbelösung wurde durch den aufgesetzten Filter aus der Spritze auf die Proben gegeben. Es reichten wenige Tropfen für ein vollständiges Benetzen aus. Die Feuchte Kammer wird bei 37°C im Wärmeschrank für 95 Minuten inkubiert. Die Reagenzien für den TRAP-Nachweis gibt Tab.3.7-a an. Zur Kontrolle der erfolgreichen Anfärbung wurden einzelne Präparate stichprobenartig unter einem Lichtmikroskop auf die Intensität der Färbung hin untersucht. Die Farbstofflösung konnte nun vorsichtig auf einer festen und saugfähigen Unterlage abgeklopft werden. Es schloss sich ein dreimaliges Spülen in Aqua dest. für jeweils fünf Minuten an. Es folgte ein ein - bis zweiminütiges Gegenfärben mit Hämatoxylin, dessen Erfolg lichtmikroskopisch überprüft worden ist. Dem kurzen Eintauchen in Aqua dest. folgte das zehnminütige Verweilen in Leitungswasser. Der abschließende Schritt ist fünfminütiges Spülen in Aqua dest. Die Proben konnten hiernach mit der vorbereiteten erwärmten Kaisers Glyceringelatine eingedeckt werden. Das Deckglas sollte den Schnitt vollständig überdecken.

Tab.3.7-a: Reagenzien für den Enzymnachweis der TRAP

Reagenzien und Laborbedarf inkl. Lieferanten	
Pap Pen	Fa. Kisker, Best. Nr. MKP-2
Spritzenfilter	Fa. Pall Corporation, 32 mm mit 0,2 µm Membran, Best. Nr. 4652
Ethanol	Fa. Stockmeier Chemie, Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther, Best. Nr. 1001043227002
Xylol	Fa. Roth, Best. Nr. 9713.3, 2,5l
Di-natrium-dihydrat	Fa. Merck, Best. Nr. 1.06663
Natriumacetat p.a.	Fa. Merck, Best. Nr. 1.062.680.250
Naphthol-as-tr.phosphat	Fa. Sigma-Aldrich, Best. Nr. N6125-IG
N-n-dimethylformamid	Fa. Sigma-Aldrich, Best. Nr. D-4551
Echtrotsalz, fast red tr-salt	Fa. Aldrich, Best. Nr. 36,888-1
Shandon instant Hämatoxylin	Fa. Thermo Scientific, Best. Nr. 6765015
Kaisers Glyceringelatine	Fa. Roth, Best. Nr. 6474.1

3.7.2 Nachweis der Alkalischen Phosphatase (ALP/TNAP)

Von den vier bekannten menschlichen Isoformen der Alkalischen Phosphatase kommt für die spezifische Fragestellung der Knochen die Tissue non-specific Alkalische Phosphatase (TNAP) in Frage. Da bei Knochenumbauprozessen ALP involviert ist, welches als TNAP auf Osteoblasten vorkommt, interessiert den Untersucher diese Unterform¹⁰⁹. Die TNAP ist ein vielerorts (z.B. Knochen, Leber und Niere) vorkommendes Enzym. Das Enzym Alkalische Phosphatase ist an den Osteoblasten auf deren Matrixvesikel-Membranen lokalisiert und kann auch als lösliche Form gefunden werden^{10,81}.

Diese Vesikel werden apikal von der Osteoblastenmembran, zwecks Mineralisierung des Knochens, abgeschnürt⁸¹. ALP wird daher korrekter Weise als membrangebundenes Ektoenzym bezeichnet. Die TNAP verringert die lokale Konzentration von anorganischem Pyrophosphat. So hebt TNAP die hemmende Wirkung des anorganischen Pyrophosphats auf die Hydroxyapatit Bildung auf und ermöglicht das Wachstums der Kristallanteile des Knochens¹⁶⁷. Dies ist die sogenannte Biomineralisierung (siehe Kapitel 2.2.1). Die Konzentration der alkalischen Phosphatase des Leber-/ Knochen-Typs ist bei gesteigertem Knochenumsatz erhöht.

Wenn aktive Osteoblasten im histologischen Schnitt vorhanden sind, färbt die Lösung diese zuverlässig an. Die chemischen Edukte, die zur Färbung führen, sind BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat), welches ein künstliches chromogenes (farbbildendes) Substrat der ALP ist und NBT (Nitroblautetrazolium). BCIP wird zu einem blauen Indigo Farbstoff oxidiert, das NBT wird zu blauem Diformazan reduziert. Daraus entsteht eine tiefblaue Farbgebung der Reaktionsprodukte^{148,230}. Die Methode wurde durch *Burstone* als Naphthol-AS-TR-Phosphatmethode eingeführt³⁴. Es handelt sich um eine sogenannte simultan ablaufende Azokupplung^{112,142,136,142}. Bei der Einbettung ist Vorsicht geboten, weil die hohen Temperaturen der exothermen Polymerisierung die thermolabile TNAP (Inaktivierung >65°) inaktivieren könnten¹⁹⁷. Eine Auflistung der benötigten Reagenzien und die Schritte zu deren Vorbereitung finden sich in Tab.3.7-b bzw. Tab.3.7-c.

Eine „Feuchte Kammer“, auch Inkubationskammer genannt, wurde mit Papier aus dem Laborbedarf (fusselfrei; bspw. Kleenex© Papierhandtücher) und Aqua dest. vorbereitet. Es wurde während des gesamten Nachweisprozesses unter dem Abzug gearbeitet.

Das Deplastifizieren erfolgt durch MEA für zwei Mal zehn Minuten pro Küvette. Die Proben durchliefen die absteigende Alkoholreihe von 100% über 96% auf 70%. Anschließend erfolgte die dreimalige Rehydrierung in Aqua dest. für je fünf Minuten. Das Aqua dest. wurde von allen Schnitten abgeklopft. Mit einem Pap Pen wurde ein Kreis um die Schnitte gezogen. Diese Markierung benötigte ca. 30 sec. zum Trocknen. Die Proben konnten nun in eine Küvette mit Tris-Puffer gegeben werden, in der sie für zehn Minuten inkubierten.

Die folgenden Schritte waren das Entnehmen der Proben aus der Tris-Puffer Küvette, das Trocknen und das horizontale Auflegen in die Feuchte Kammer. Die Färbelösung wurde durch den aufgesetzten Filter aus der Spritze auf die Proben gegeben. Es reichten wenige Tropfen für ein vollständiges Benetzen aus. Die Markierung des Pap-Pens hielt die Färbelösung als Benetzung über dem Knochenschnitt fest.

Die verschlossene Feuchte Kammer (=Inkubationskammer) wurde in einem Wärmeschrank für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Eine kurze und stichprobenartige mikroskopische Kontrolle des Erfolgs der Färbung hat stattgefunden. Das Färbesubstrat konnte nun mit Aqua dest. abgespült werden. Es folgte dreimaliges Spülen in Aqua dest. pro Küvette für 5 Minuten Standzeit. Gegengefärbt werden die Knochenproben in Kernechtrot-Aluminiumsulfat für fünf Minuten. Die Färbelösung wurde vor der Anwendung filtriert. Das dreimalige Spülen in Aqua dest. schloss sich an. Die Entwässerung erfolgte durch das Passieren der aufsteigenden Alkoholreihe über 70%, 96% auf 100% für je fünf Minuten. In Xylol standen die Proben zu guter Letzt zwei Mal für fünf Minuten. Das Eindecken erfolgte mit einem Tropfen Eukitt unterhalb und oberhalb des Kawamoto-Films. Im Anschluss erfolgte das Abtrennen der Goldfolie des Kawamoto-Films und das Aufbringen auf einen neuen beschrifteten Objektträger. Die Trocknungsdauer beträgt 24 Stunden, die Deckgläser waren währenddessen mit Gewichten beschwert.

Tab.3.7-b: Reagenzien für den Enzymnachweis der TNAP

Reagenzien inkl. Lieferanten	
Pap-pen	Fa. Kisker, Nr. MKP-2
Spritzenfilter:32 Milimeter mit 0,2 µm Membran	Fa. Pall Corporation, Nr. 4652
Phosphatase Substrat BCIP/NBT	Fa. KPL, Nr. 50-81-08
Kernechtrot-aluminiumsulfat	Fa. Roth, Nr. N069
Tris	Fa. Roth, Nr. 4855
Ethanol	Fa. Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
(2-methoxyethyl)-acetat (mea)	Fa. Merck, Nr. 8.06061
Xylol	Fa. Roth, Nr. 9713
Eukitt	Fa. Sigma Aldrich, Nr. 0389

Tab.3.7-c: Schritte zur Vorbereitung der Lösungen

Vorbereitung der Lösungen	
0,1 m Tris-puffer, ph von 9,4	Stammlösung 1M: 121,1 g Tris auf 1l Aqua dest; der pH soll mittels 25 %-iger Salzsäure auf pH 9,4 gebracht werden
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Fertiglösung vor Gebrauch filtrieren

3.8 Anfertigen von Bildern zur Histomorphometrie und Dokumentation

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden in fünffacher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop Leica DM 5500B (Leica Bensheim, Deutschland) unter Verwendung der aufgesetzten Kamera (Leica DFC 7000T) und unter Zuhilfenahme der firmeneigenen Software LAS-X (Version 3.0.1.15878, ©2016) angefertigt. Die Nachbearbeitung wurde mit der Software Photoshop© in der Version CS 6 (Firma Adobe Systems Incorporated, USA) vorgenommen. Die Zellzählung der TRAP positiven Zellen erfolgte mittels des Programms FIJI/ ImageJ (Version 1.51 n, 64-bit, Wayne Rasband, National Institute of health, USA).

3.8.1 Festlegung der ROI für die Histomorphometrie

Die Region of Interest (ROI, zu Deutsch: der interessierende Bereich) wurde von Dr. Seemun Ray anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen der Färbung nach Movat festgelegt. Die ROI wurde in den Bereich des Defekts kritischer Größe gelegt. Die erkennbaren Endstücke der Osteotomie bilden die Ränder der festgelegten ROI. Diese ROI-Fläche wurde im Programm Photoshop per Drag and Drop Funktion kongruent auf die Bilder der Färbungen nach Kossa/van Gieson und die enzymhistochemischen Nachweise ALP und TRAP übertragen. Durch das komplette Durchtrennen der Knochen verlieren diese an Stabilität. Die Knochen haben daher eine leichte und bei jeder Ratte individuelle Abweichung der CSD-Form durch den Versuchsaufbau erfahren. Dies entspricht in den meisten Fällen einer Verkleinerung der ROI durch den Versuchsaufbau.

Alle Färbemethoden, Färbung nach *Movat*, von *Kossa van Gieson*, ALP und TRAP Enzymhistochemie wurden mit der gleichen ROI vermessen. Alle Werte sind in [mm²] ermittelt worden und wurden im ersten Schritt in einer Excel Tabelle erfasst. Anschließend wurden die erfassten Daten mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Science) in der Version 24 © (IBM Corporation 2017) selbstständig statistisch ausgewertet.

3.9 Massenspektrometrie TOF-SIMS (Flugzeitsekundärionen-Massenspektrometrie)

In dieser Studie wurden fixierte, in Technovit 9100 © eingebettete und anschließend entplastete Rattenknochen-Schnitte verwendet. Die Knochenprobe befand sich auf einer einseitig adhäsiven Spezialfolie.

Bei der Vorbereitung der Proben ist Achtsamkeit geboten. Verunreinigungen mit Staub wurden vor dem Einsatz in die Geräteschleuse händisch mit einer Pinzette und durch Herunterblasen mit einer Stickstoffdüse entfernt. Das Berühren des Probenhalters mit bloßen Fingern soll vermieden werden, weil dies zum Anhaften von Fetten führen kann, welche innerhalb der Vakuumkammer ausgasen und die Messungen verfälschen könnten. Durch die Erfahrung aus vorhergehenden Experimenten der SFB TRR 79 Teilprojekte M5, T2 sowie einer schwedischen Forschungsgruppe um *Malmberg* zeigte sich, dass der

Bismutcluster Bi_3^+ (Primärion) gut für die Untersuchung von Knochengewebe verwendet werden kann^{141,212}.

Die 5 μm dünnen Knochenschnitte sind auf der Kawamotofolie angeheftet und wurden nach zweimaligem zehnminütigem Deplastifizieren in MEA durch Dr. Seemun Ray sorgsam auf der gesamten Länge mit speziellen doppelseitigen Adhäsivpunkten unterklebt (Haft Aufkleber, elektrisch nichtleitend, Firma Plano, (Best. Nr. G304) und auf einen Objekträger (Stage) aufgebracht (s. Abbildung 12).

Vor jeder Messung wurde die Apparatur über ein detailliertes Protokoll kalibriert und für die Messung vorbereitet. Die Apparatur ist auf Abbildung 11 zu sehen. Die Beschreibung für dieses Protokoll würde den Rahmen dieser Methodenbeschreibung überspannen.

Die Messungen wurden im Rahmen des SFB TRR 79 in Kooperation mit M.Sc. Christine Kern durchgeführt.

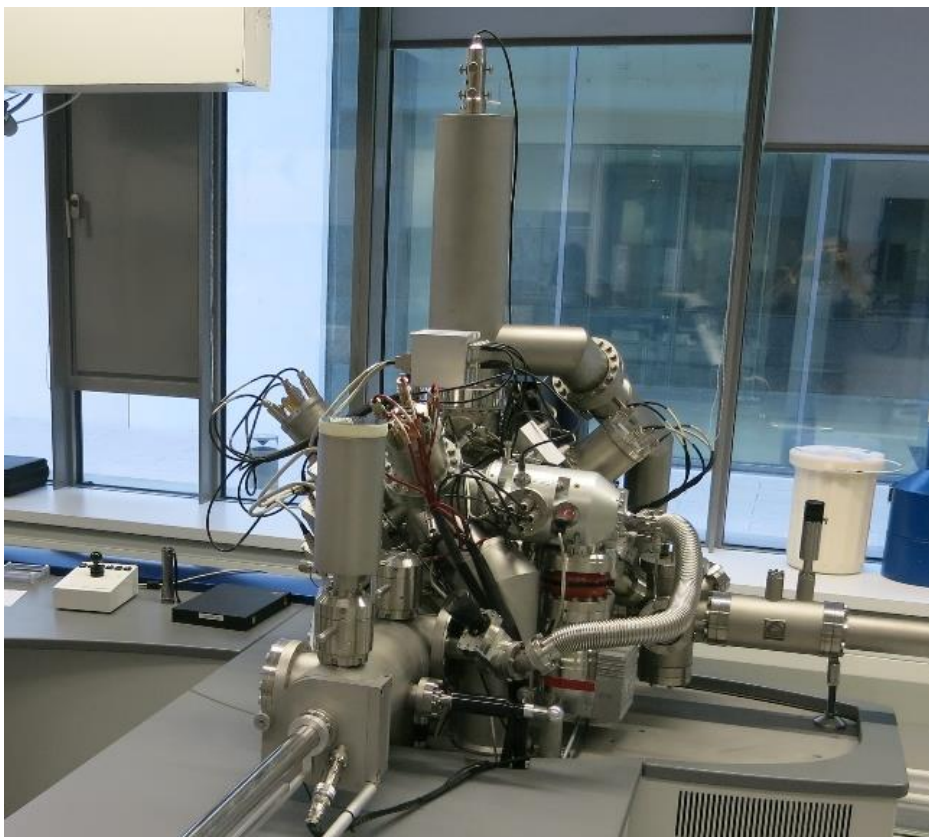


Abbildung 11: TOF-SIMS 5-100 im Gießener Labor der Physikalischen Chemie

Folgende Versuchparameter sind standardisiert für die Reproduzierbarkeit der Messungen gewählt worden (Tab.3.9-a):

Tab.3.9-a: TOF-SIMS Versuchsparmeter

Versuchsparmeter	
Primärionen	Bismut ₃ ⁺ (Cluster-) Ionen bei 0,8 µA Emissionsstrom
Analyzer Setting	1keV_3keV_VSP (virtual sample potential, dies kann automatisch die Ladung ausgleichen)
Modus	2D-Large Modus
Shots/pixel	10
Frames per Patch	10 (das Sichtfeld im Programm ist ein Patch)
maximale patch länge	0,4 mm
scan anzahl	2 (bei Leerdefekten) bzw. 3 Scans (für Knochen mit Biomaterialien)
Größe der Fläche	Ca. 12 x 6 mm bzw. 15 x 9 mm (Landmarke bei der Diaphyse ist die erste erkennbare Schraube bei der ROI)
Energie der Quelle	25 kV der Bismut-Quelle (LMIG)
Zykluslänge	60 µSec

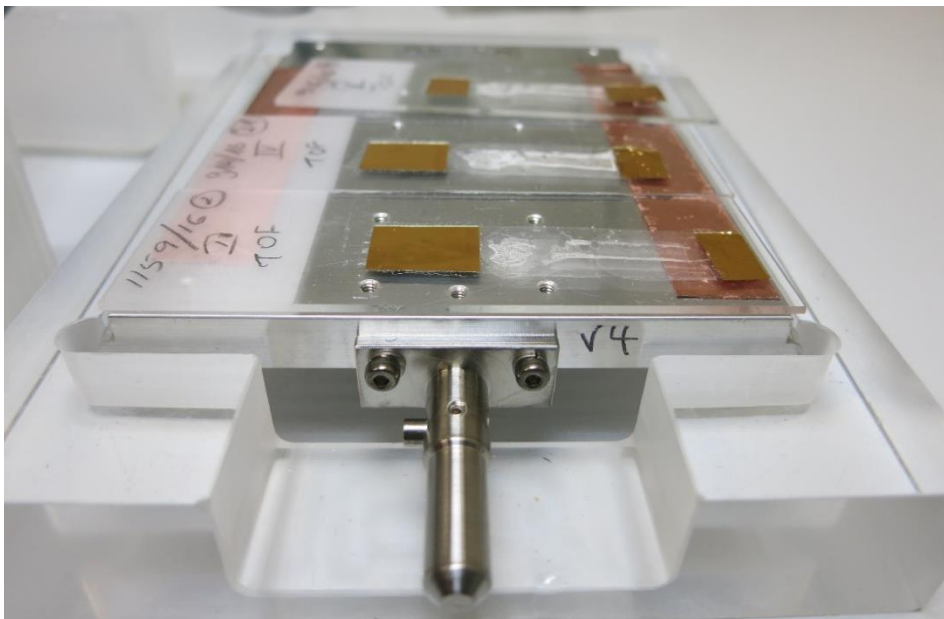


Abbildung 12: Stage mit aufgebrauchten Objektträgern der Subgruppen 2 und 3, fertig für die Analyse im TOF-SIMS

3.10 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der Software SPSS© Version 24, IBM USA, durchgeführt. Die Histomorphometrie der Movat-gefärbten Schnitte dient dazu, eine einheitliche ROI für die Übertragung und Histomorphometrie auf die Fotografien der anderen Färbemethoden zu ermöglichen.

Zur Überprüfung der Daten auf die Voraussetzung der Normalverteilung wurde der deskriptive, und nach Lilliefors angepasste, Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Es handelt sich dabei um einen stabilen, nicht-parametrischen Test für Ein-Stichproben Verfahren. Er eignet sich für kleine Stichproben wie im vorliegenden Fall. Der Kolmogorov-Smirnov Test ist selbst bei Ausreißern robust.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sind unabhängige Stichproben, da die Messungen an verschiedenen Tieren erfolgten. Die Verteilung der Werte einer Gruppe hat keine unmittelbare Beziehung zu den Werten der anderen Gruppe. Die Nullhypothese der statistischen Tests lautet: es besteht kein Unterschied der Mittelwerte zwischen den untersuchten Gruppen. Die Signifikanztestung der Hypothese wurde mit folgenden Tests durchgeführt:

Der Mann-Whitney-U Test ist ein nicht-parametrischer Test und kam zur Anwendung bei Ablehnung der Annahme der Normalverteilung durch den Test nach Kolmogorov-Smirnov, weil die Daten bei nicht-parametrischer Verteilung nicht-normalverteilt sind. Die Stichproben Gruppen wurden dabei als zwei unabhängige Stichproben in die Software eingepflegt.

Der Mann-Whitney-U Test kam zur Anwendung nach Bestimmung des mineralisierten und unmineralisierten Gewebes und der Anzahl TRAP-positiver Zellen, da bei beiden deskriptiven Vortests auf Normalverteilung eine abweichend hohe Schiefe (Norm: $\pm 0,5$; +1,367 bei TRAP und +2,064 bei von Kossa) bzw. eine hohe Kurtosis (Norm: $\pm 1,5$; +1,811 bei TRAP und +5,485 bei Kossa) vorlagen. Bei Normalverteilung der Daten wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (engl.: *analysis of variance*) genutzt, um die drei Gruppen auf die Nullhypothese hin zu überprüfen. Die ANOVA kann verwendet werden, wenn Daten normalverteilt sind (auch als parametrisch bezeichnet).

3.11 Statistik der intakten Platten pro Subgruppe

Zur Statistischen Darstellung der Plattenbrüche wurden die drei ersten Subgruppen (Leerdefekt, PPGC+S III 5:5 und PPGC 3:7) aus der ersten, zweiten, dritten und vierten Charge untereinander verglichen. Es gingen alle Tiere mit in die Berechnung ein, welche in der Molekularbiologie- und Histologie ausgewertet wurden. Die Rechnung bezieht daher alle Tiere der Chargen eins bis vier ein, die in einer der Subgruppen „Leerdefekt“, PPGC+S 5:5^{III} oder PPGC+S 3:7^{III} behandelt wurden. Die Molekularbiologie ist ausdrücklich kein Gegenstand der vorliegenden Arbeit, weil dies den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschritten hätte. Die Berechnung erfolgte mit dem *open source* (frei benutzbaren) Online Tool *MedCalc* © *Software bvba*, Belgien in der Version vom 03.10.2017. Mit dem Verfahren „*Comparisons of means calculator*“ wurden die Unterschiede beobachteter Mittelwerte zwischen zwei unabhängigen Stichproben verglichen. Die Nullhypothese besagt, dass kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Zuerst werden die gepoolten Standardabweichungen, dann der Fehler der Standardabweichungen zwischen den Mittelwerten ausgerechnet, abschließend folgt dann das Bestimmen des Signifikanzniveaus, oder *p*-Wert genannt, mit Hilfe des *t*-Tests.

4 Ergebnisse

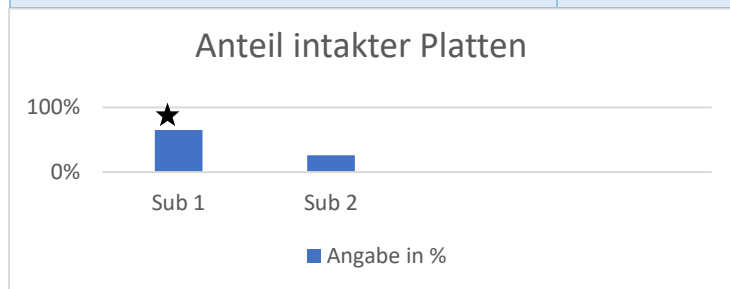
4.1 Postoperativer Verlauf

Von den insgesamt 207 Tieren überlebten alle bis auf eins die Operation beziehungsweise den Beobachtungszeitraum. In den Chargen eins bis vier (von insgesamt fünf Chargen) wurden 20 Tiere für Leerdefekt, 19 für PPGC+S 5:5^{III} bzw. 18 für PPGC+S 3:7^{III} ausgewählt. In der vorliegenden Arbeit wurden aus den ersten drei Chargen insgesamt 24 von 206 Tiere bestimmt, um in drei Subgruppen mittels (enzym-) histochemischen und oberflächenanalytischen Verfahren untersucht zu werden. Die Genesung inklusive Wundheilung und Verlauf der Wiedergewinnung der vollen Mobilität wurde dokumentiert. Bei wenigen Tieren mussten neue Klammernähte gesetzt werden, da sie sich diese Fremdkörper gegenseitig entfernt hatten, als sie gruppenweise in Käfige zusammengelegt worden sind. Es kam zu keinen äußerlich sichtbaren Infektionen. Kein Tier zeigte Anzeichen eines versuchsbedingten Leidens. Bei zwei Tieren von 206 war zum Zeitpunkt der Euthanasie und Entnahme der Femora (6 Wochen postoperativ) das Kniegelenk entzündungsbedingt zu sehr verändert, so dass diese aus der Auswertung herausfielen. Alle plattenfreien Femora wurden so gehandhabt, als seien sie instabil, um die Integrität des Achsverlaufs zu gewährleisten. Von 24 Tieren der Chargen eins bis drei konnten 20 in die vorliegende Auswertung einfließen, weil vier Femora zu starke Achsabweichungen und Deformitäten aufwiesen. Die Plattenbruch-Statistik bezieht sich auf Tiere aus den Chargen eins bis vier. Der Anteil intakter Platten lag bei 65% für Leerdefekt, bei 26% für PPGC+S 5:5^{III} und 61% für PPGC+S 3:7^{III}. Signifikante Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der Gruppen Leerdefekt zu PPGC+S 5:5^{III} ($p=0,02$) und PPGC+S 5:5^{III} zu PPGC+S 3:7^{III} ($p=0,03$), keine Signifikanz lag beim Vergleich zwischen Leerdefekt und PPGC+S 3:7^{III} vor ($p=0,8$).

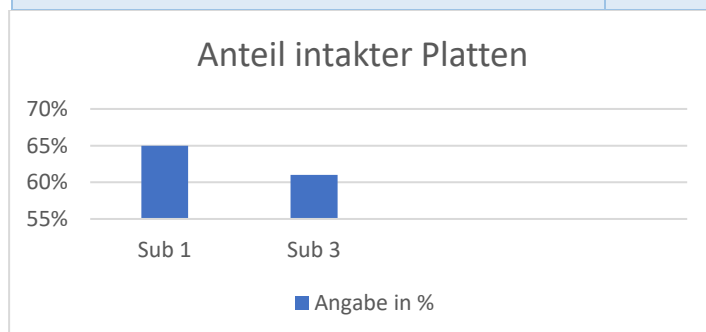
Der Unterschied der Prozentwerte intakter Platten zwischen Leerdefekt und der Subgruppe PPGC+S 5:5^{III} bzw. PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III} ist statistisch signifikant, d.h. sie sind kein Zufallsergebnis (s.Tab.4.1-a, Abbildung 13, und Tab.4.1-c, Abbildung 15). Der Unterschied der Prozente intakter Platten zwischen Leerdefekt und PPGC+S 3:7^{III} liegt im Zufallsbereich (Tab.4.1-b und Abbildung 14). Der Leerdefekt weist prozentual mehr stabile Platten auf als PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III}. PPGC+S 3:7^{III} weist prozentual mehr stabile Platten auf als PPGC+S 5:5^{III}.

Tab.4.1-a: Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt und PPGC+S 5:5 ^{III}

	Leerdefekt	PPGC+S 5:5 ^{III}
Anteil intakter Platten	65 %	26 %
N (Anzahl der Tiere)	20	19
Differenz	39 %	
95 % Konfidenzintervall	4,2835 bis 64,9844	
DF (Freiheitsgrade)	1	
Signifikanzniveau	$p=0,0159 (*)$	
Chi-Quadrat	5,813	

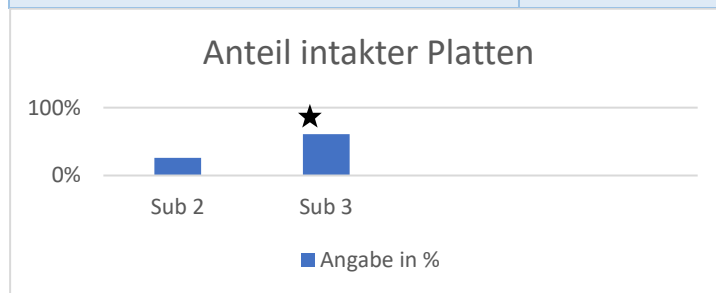
**Abbildung 13: Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt (Sub 1) und PPGC+S 5:5 ^{III} (Sub 2)**
(* gibt das Signifikanzniveau (*) $p < 0,05$ an)**Tab.4.1-b: Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt und PPGC+S 3:7 ^{III}**

	Leerdefekt	PPGC+S 3:7 ^{III}
Anteil intakter Platten	65 %	61 %
N (Anzahl der Tiere)	20	18
Differenz	4 %	
95 % Konfidenzintervall	-28,4646 bis 36,0546	
DF (Freiheitsgrade)	1	
Signifikanzniveau	$p= 0,8012 (ns)$	
Chi-Quadrat	0,063	

**Abbildung 14: Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt (Sub 1) und PPGC+S 3:7 ^{III} (Sub 3)**
(keine Signifikanz, ns)

Tab.4.1-c: Anteil intakter Platten zwischen PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III}

	PPGC+S 5:5 ^{III}	PPGC+S 3:7 ^{III}
Anteil intakter Platten	26 %	61 %
N (Anzahl der Tiere)	19	18
Differenz	35 %	
95% Konfidenzintervall	-0,5199 bis 62,5331	
DF (Freiheitsgrade)	1	
Signifikanzniveau	0,0340 (*)	
Chi-Quadrat	4,494	

**Abbildung 15: Anteil intakter Platten zwischen PPGC+S 5:5^{III} (Sub 2) & PPGC+S 3:7^{III} (Sub 3)**
(Signifikanzniveau (*) $p < 0,05$)

4.2 Deskriptive Histologie

Für die Beurteilung der Färbemethoden wurden einheitliche Kriterien festgelegt. In die Auswertung gingen folgende Aspekte mit ein: Bei der Färbung nach Movat sind dies: das Ausmaß der Verformung des Knochens, der Grad der Überbrückung des Knochens, Beurteilung des Grades der Schnittkantenabrundung, Grad der Kallusbildung, sowie welcher Zelltyp und wie häufig und wieviel unmineralisiertes (grüne und rote Farbgebung) bzw. mineralisiertes Gewebe (Gelbton) vorliegen, Vorliegen von Materialresten. Für die Färbung nach von Kossa/van Gieson sind folgende Kriterien von Bedeutung: der Grad der Mineralisierung (schwarze Farbe), der Grad an Osteoid Bildung (dunkelrosa) und der Grad an Bindegewebe sowie Knochenmark (helles Rosa).

In der Subgruppe 1, Leerdefekt, wurden sieben Tiere ausgewertet, in der Subgruppe 2, PPGC+S 5:5^{III} waren es fünf Tiere, in der Subgruppe 3, PPGC+S 3:7^{III} sind acht Tiere untersucht worden.

4.2.1 Zur Färbung nach Movat

A) In der Subgruppe 1 zeigen sich keine Achsabweichungen und Deformationen. Es fand sich bei keiner Probe eine knöcherne Überbrückung. Die Osteotomie-Kanten sind bei sechs von sieben Tieren deutlich erkennen. Sechs von sieben Tieren zeigten eine deutliche mediale Kallusformation. Hierbei waren der vorwiegende Zelltyp Knorpelzellen. Zudem lag viel unmineralisiertes Bindegewebe vor. Es war kein Material im Knochen.

B) Drei von fünf Knochen in der Subgruppe 2 sind frei von Achsabweichungen und Deformationen, zwei von fünf sind leicht nach medial abweichend geformt. Es ist keine Überbrückung des critical size defect ersichtlich. Eine Probe von fünf zeigt sehr stark durchmineralisierten medialen Kallus. Durch starkes Knochenwachstum sind die Schnittkanten überwachsen und dadurch abgerundet. Es ist mäßig viel Fasergewebe und Knorpelgewebe zu erkennen. Kein Material nachweisbar.

C) Sieben von acht Knochen der Subgruppe 3 zeigen sich frei von Achsabweichungen und Deformationen, nur eine Probe weicht etwas nach medial ab. Zwei von acht Tieren sind annähernd im medialen Kallusbereich überbrückt. Die Schnittkanten der untersuchten Knochen sind alle durch Knochenumbauvorgänge abgeflacht und Richtung ROI mit einer sichtbaren Schicht neuen Knochens überwachsen. Dies stellt vermutlich die Ossifikationsfront dar. Bei fünf von acht Knochen zeigt sich eine Kallusbildung, die auf ihre Größe bezogen sehr klein ausfällt und stark mineralisiert ist. Es finden sich regelrechte Knochenbildungszentren und Streifen der Mineralisierung. Der Zelltyp der hypertrophen Chondrozyten ist zahlreich. Es sind große, nestähnliche Felder aus Chondroblasten zu erkennen. **Vier von acht Tieren weisen Reste des Kompositmaterials auf.**

4.2.2 Zur Färbung nach von Kossa/van Gieson

Die Subgruppe 1 besitzt wenig neue Mineralisierung. Das Bindegewebe ist reichlich vorhanden. Es ist viel Osteoid zu erkennen. Für die Subgruppe 2 konnte eine deutliche Mineralsierung erkannt werden. Das spärlich vorhandene Bindegewebe weicht zugunsten eines mengenmäßig stärker vorhandenen Osteoids in den Hintergrund. In der Subgruppe 3 findet sich insgesamt ein starker Grad der Mineralisierung. Nur wenig Osteoid konnte gefunden werden. Es ist viel Bindegewebe vorhanden.

4.3 Histomorphometrie

4.3.1 Knochenneubildung

Die Histomorphometrie der definierten ROIs zeigte eine statistisch signifikante Zunahme der Knochenneubildungsrate, bei ansteigender Strontiumkonzentration, in mm^2 , in der ursprünglichen Defektzone, für die Gruppe PPGC+S 3:7 ^{III} [$0,332 \pm 0,038$] im Vergleich zu PPGC+S 5:5 ^{III} [$0,065 \pm 0,028$] ($p < 0,001$) und zur Kontrollgruppe respektive Leerdefekt [$0,036 \pm 0,010$] ($p < 0,001$).

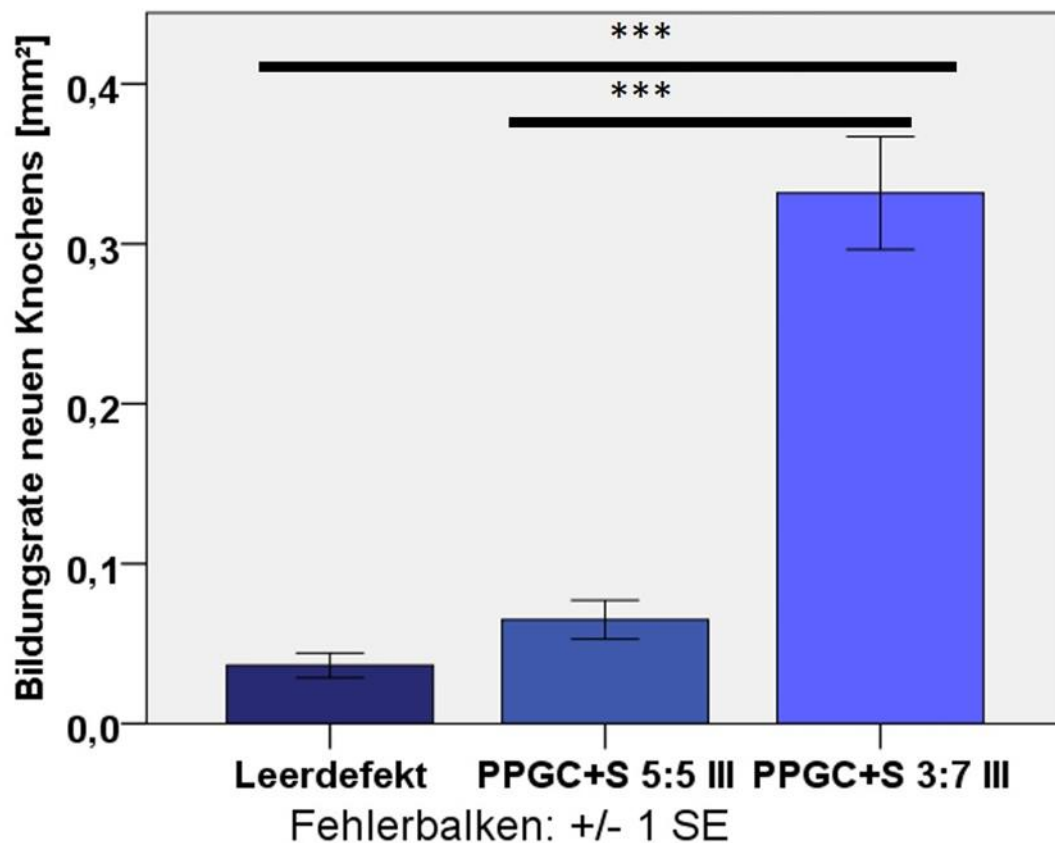


Abbildung 16: Knochenbildungsrate in den drei untersuchten Gruppen

Abbildung 16 zeigt die histomorphometrische Analyse der Knochenneubildung in den untersuchten Gruppen Leerdefekt, PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III} in der Zone des Defekts kritischer Größe bzw. der ROI. Die Sternsymbole stehen für (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$.

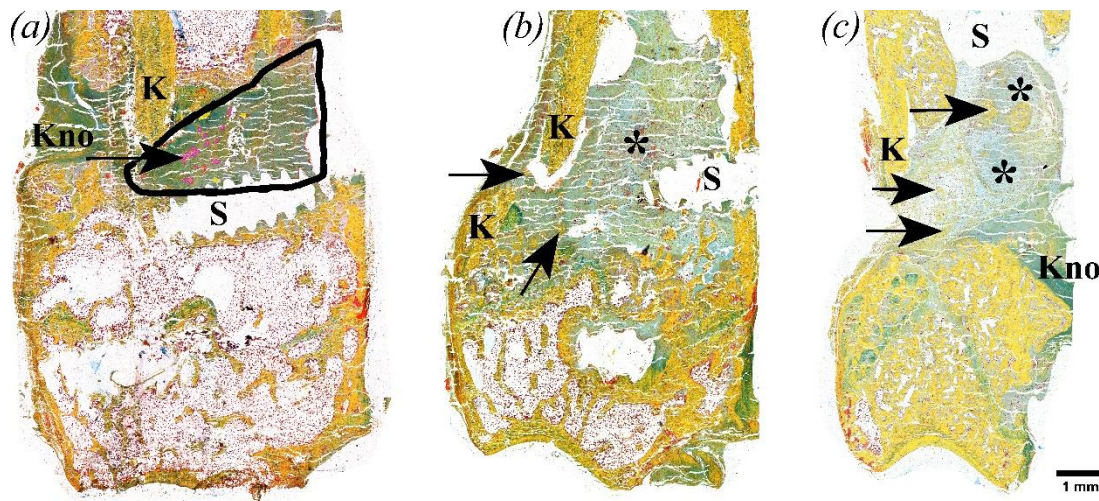


Abbildung 17: Übersicht über den distalen Femur (Movat Färbung) von Sub 1, 2 und 3. 5-fach vergrößert. Die Symbole bedeuten: (K) (Lager-)Knochen, (Kno) Knorpelgewebe, (S) Schraube, (*) Materialreste, (→) neugebildeter Knochen in der ROI (Region of interest). A) Sub1, B) Sub2, C) Sub3.

Die Abbildung 17 zeigt repräsentative Knochenschnitte im Übersichtsformat aller drei Subgruppen, in der Movat-Pentachromfärbung. Der Knochenschnitt (a) zeigt die originale Umrandung der ROI in schwarzer Farbe, die zur Histomorphometrie genutzt worden ist.

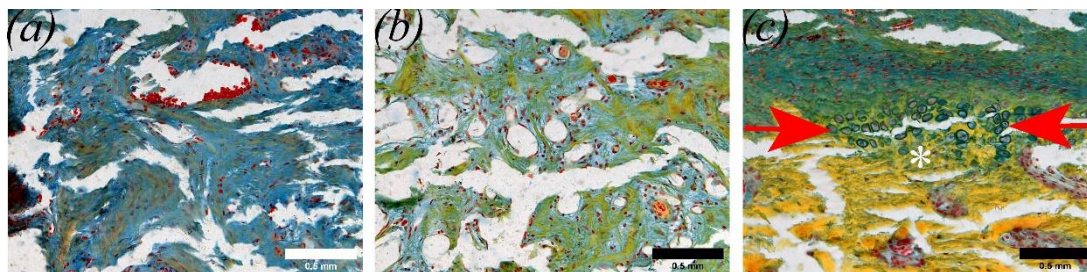


Abbildung 18: Movat Detailaufnahmen, 20-fach vergrößert, 500µm Skala im rechten unteren Bildrand. Die Symbole bedeuten: (*) neugebildeter Knochen, (→) hypertrophe Chondrozyten in der Mineralisationszone des neugebildeten Knochens.

Die Detailaufnahmen der Movat-Färbung in Abbildung 18 zeigen die vorgefundenen Merkmale (s.o. 4.3.1 Knochenneubildung) der Subgruppen, wobei in aufsteigender Reihenfolge die Menge an neugebildetem Knochen von Sub1 (a) über Sub2 (b) bis zu Sub3 (c) signifikant zunimmt.

4.3.2 Unmineralisiertes Gewebe

Das unmineralisierte Gewebe über der trabekulären Fläche in mm² war am meisten in der Kontrollgruppe (Leerdefekt), gefolgt von PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III} vorhanden, welches ein Hinweis für eine gesteigerte Mineralisierung in Gegenwart von PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III} ist. Der gefundene Unterschied ist signifikant zwischen der Gruppe Leerdefekt verglichen mit PPGC+S 3:7^{III} ($p=0,004$) und zwischen PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III} ($p=0,02$).

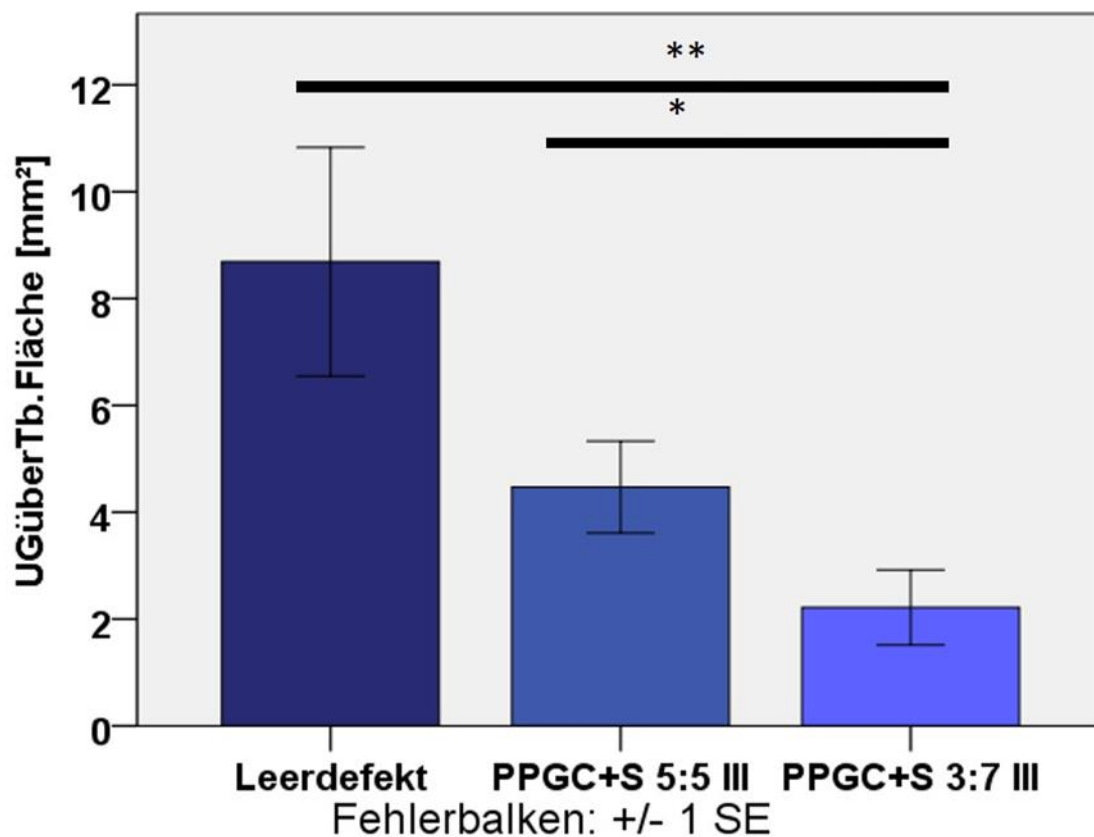


Abbildung 19: Unmineralisiertes Gewebe in den drei Gruppen

Abbildung 19 zeigt die histomorphometrische Analyse des unmineralisierten Gewebes über der trabekulären Fläche gemessen in mm² in den untersuchten Gruppen Leerdefekt, PPGC+S 5:5^{III} und PPGC+S 3:7^{III} in der Zone des Defekts kritischer Größe bzw. der ROI. Die Sternsymbole stehen für (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$.

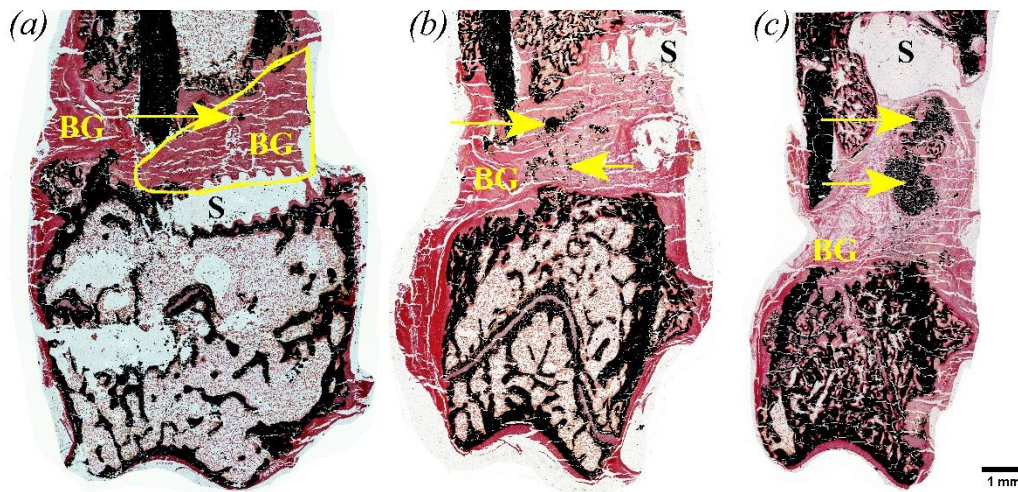


Abbildung 20: von Kossa/ van Gieson Färbung, 5-fach vergrößert, A) Sub1, B) Sub2, C) Sub3.

Die Abbildung 20 zeigt repräsentative Knochenschnitte im Übersichtsformat aller drei Subgruppen, in der von Kossa/van Gieson Färbung. Der Knochenschnitt (a) zeigt die originale Umrandung der ROI in gelber Farbe, die zur Histomorphometrie genutzt worden ist. Pfeile (→) zeigen auf mineralisierte Bereiche, (BG) steht für Bindegewebe, (S) für Schraubenkanäle.

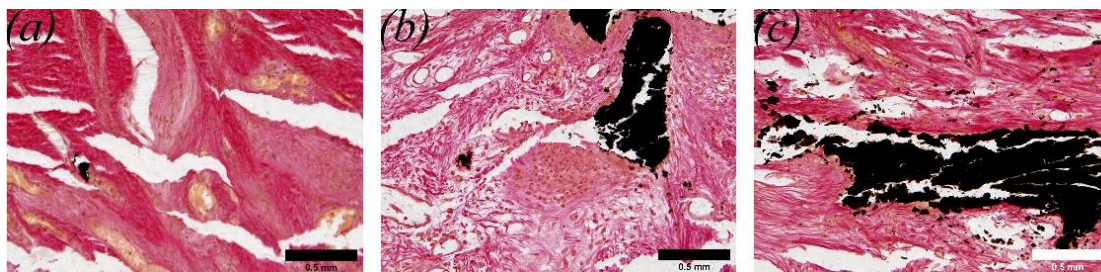


Abbildung 21: Detailaufnahmen von Kossa/van Gieson Färbung, 20-fach vergrößert, 500µm Skala im rechten unteren Bildrand

Die Abbildung 21 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Subgruppen 1,2 und 3. Wie den Bildern mittels der von Kossa/van Gieson Färbung eingefärbten Schnitte zu entnehmen ist, wird in der der absteigenden Reihung von Sub1 (a) über Sub2 (b) bis zu Sub3 (c), immer mehr Knochen/mineralisierte Matrix über der trabekulären Fläche gefunden.

4.3.3 TRAP-positive Zellen

Die Färbung mittels TRAP Enzymhistochemie diente der Quantifizierung TRAP-positiver Zellen in der ROI. Für die statistische Auswertung wurde die Zählrate auf den trabekulären Knochen normalisiert. TRAP positive Zellen waren in der Leerdefektgruppe mit einer höheren Anzahl vorzufinden verglichen mit PPGC+S 3:7 ^{III} ($p=0,03$) und hatten ebenfalls eine höhere Zählrate in PPGC+S 5:5 ^{III} verglichen mit PPGC+S 3:7 ^{III} ($p=0,008$).

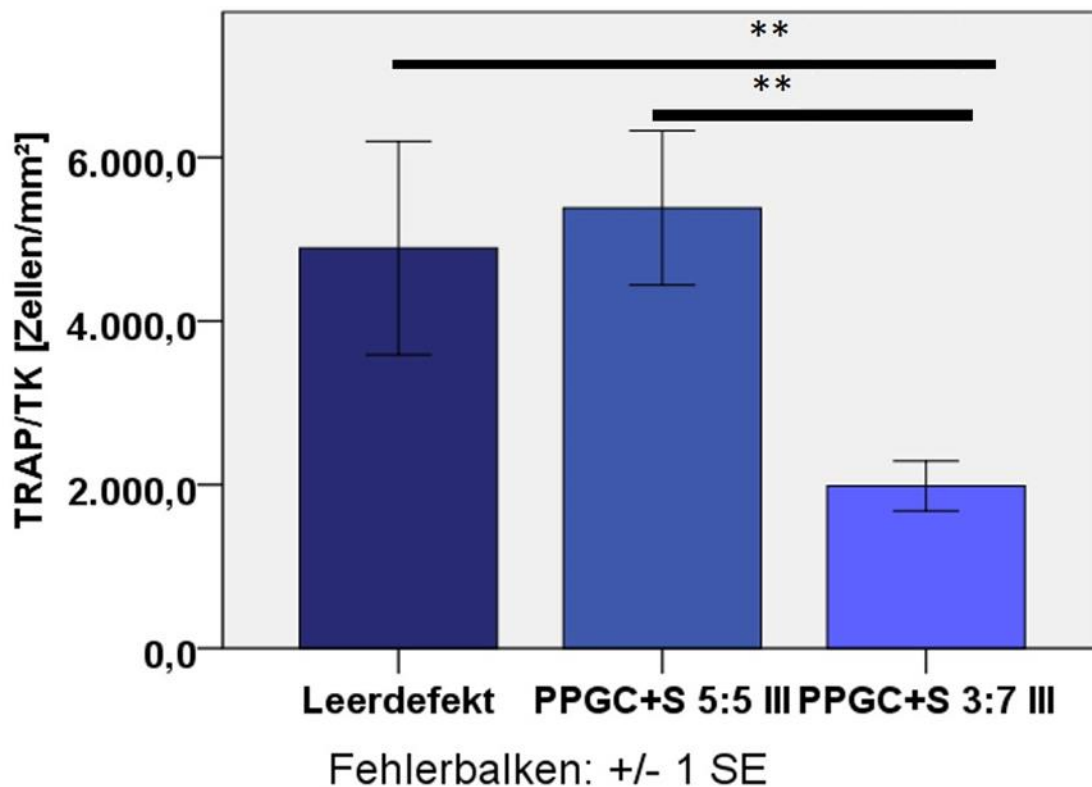


Abbildung 22: TRAP-positive Zellen in Verhältnis zur Trabekelfläche

Die Abbildung 22 veranschaulicht die Anzahl TRAP-positiver Zellen pro mm² des trabekulären Knochens in den untersuchten Gruppen Leerdefekt, PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III} in der Zone des Defekts kritischer Größe bzw. der ROI. Die Sternsymbole stehen für (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$.

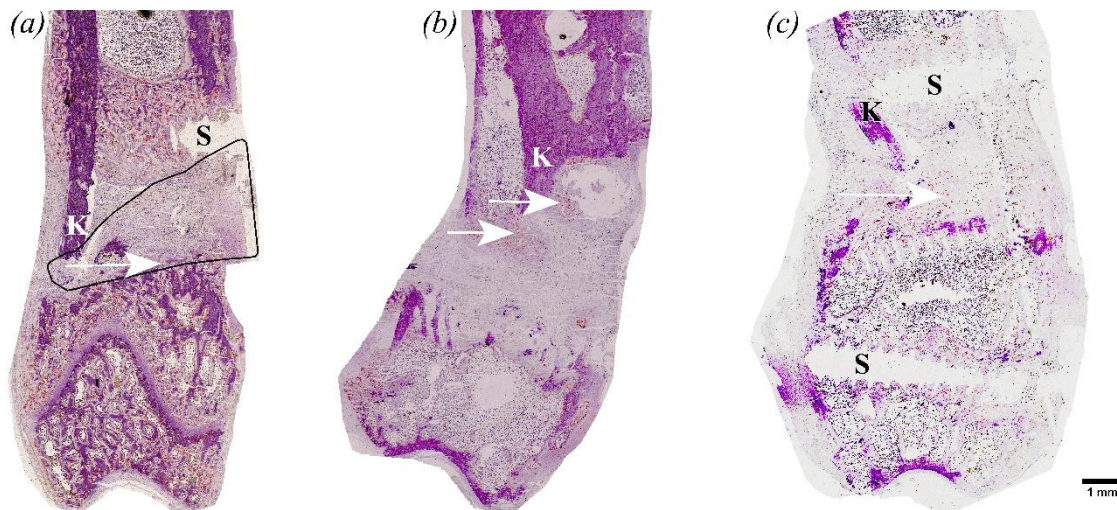


Abbildung 23: TRAP Färbung, 5-fach vergrößert, 1mm Skala im rechten Unterrand des Bildes, A) Sub1, B) Sub2, C) Sub3. Die Symbole bedeuten: (K) Lagerknochen (S) Schraube, (→) TRAP-positive Fläche/Osteoklasten in der ROI (Region of interest). Der Knochenschnitt (a) zeigt die originale Umrandung der ROI in schwarzer Farbe, die zur Histomorphometrie genutzt worden ist.

Die Abbildung 23 zeigt repräsentative Knochenschnitte im Übersichtsformat (5-fach vergrößert) aller drei Subgruppen, nach der Enzymhistochemiefärbung zum TRAP-Nachweis.

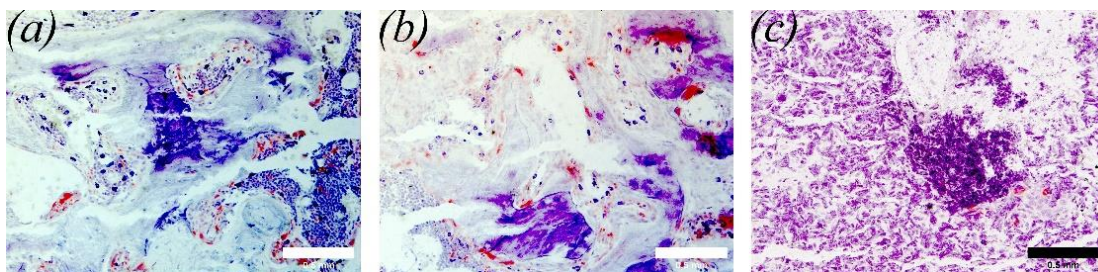


Abbildung 24: Detailaufnahme TRAP-Nachweis, 20-fach vergrößert, 500µm Skala im rechten Unterrand. Rote Zellen sind TRAP positiv.

Die Abbildung 24 von Lichtmikroskopieaufnahmen der Subgruppen 1,2 und 3 in der TRAP-Enzymhistochemie, zeigt, dass im Vergleich von Sub1 (a) und Sub2 (b) zu Sub3 (c) signifikant weniger TRAP-positive Zellen (rot gefärbt) über der trabekulären Fläche gefunden worden sind.

4.3.4 ALP – ALP-positiv eingefärbte Fläche

Die ALP positiv gefärbte Fläche wurde über die gesamte Gewebefläche der ROI normalisiert. Die Werte in Bezug auf die Kontrollgruppe bzw. den Leerdefekt waren höher für PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III}. Der Unterschied zwischen Leerdefekt und PPGC+S 3:7 ^{III} liegt bei ($p=0,05$).

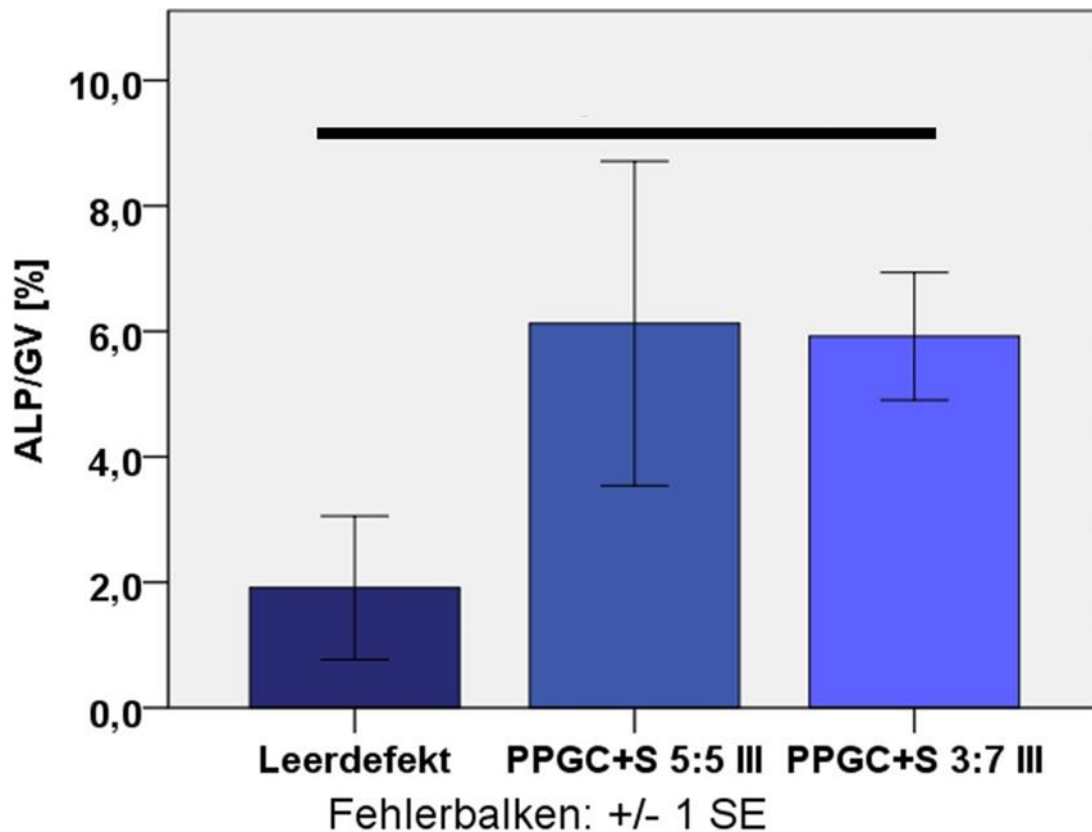


Abbildung 25: ALP positive Fläche nach ALP-Nachweis ohne Signifikanz

Die Abbildung 25 zeigt die ALP positive Fläche über der gesamten Gewebefläche in den untersuchten Gruppen Leerdefekt, PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III} in der Zone des Defekts kritischer Größe bzw. der ROI.

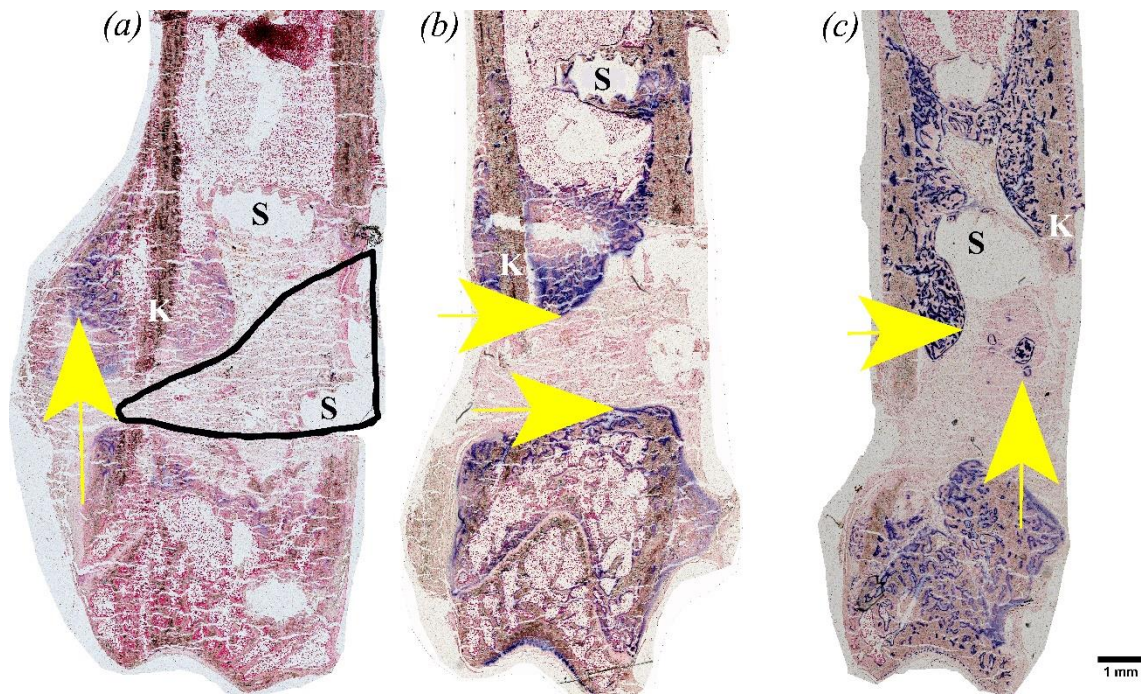


Abbildung 26: ALP Nachweis, 5-fach vergrößert. Die Symbole bedeuten: (Sch) Schraube, (*) Materialreste, (→) ALP-positive Fläche/angefärbte Osteoblasten in der ROI (Region of interest). A) Sub1, B) Sub2, C) Sub3.

Die Abbildung 26 zeigt repräsentative Knochenschnitte im Übersichtsformat (5-fach vergrößert) aller drei Subgruppen, nach dem enzymhistochemischen Nachweis der ALP. Der Knochenschnitt (a) zeigt die originale Umrandung der ROI in schwarzer Farbe, die zur Histomorphometrie genutzt worden ist.



Abbildung 27: Detailaufnahmen ALP-Nachweis, 20-fach vergrößert, mit 500µm Skala. Blauer Zellsaum bedeutet hier liegen Osteoblasten vor, diese sind ALP positiv

Die Abbildung 27 von 20-fach vergrößerten Photomikroskopieaufnahmen der Subgruppen 1 (a), 2 (b) und 3 (c) in der ALP-Enzymhistochemie, zeigt, dass mit der Tendenz zur Signifikanz zwischen Sub1 und Sub3 signifikant mehr ALP-positive Fläche/angefärbte Osteoblasten über der trabekulären Fläche der Subgruppe3/PPGC+S^{III} 3:7 gefunden worden sind.

4.4 TOF-SIMS Analyse in Leerdefekt, PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III}

Die TOF-SIMS wurde genutzt, um die Strontiumverteilung in allen drei Gruppen bestimmen zu können. Die Auswertung der Verteilung zeigte eine Anzahl natürlicher Hintergrund-Zählimpulse von maximal 12 counts bei der Leerdefekt Gruppe, die als Kontrollmenge diente. Für die Gruppen PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III} konnte eine mittlere Anzahl der Zählimpulse von ca. 35 bzw. 25 gezeigt werden. Die räumliche Signalintensität lag am höchsten in der Gruppe PPGC+S 3:7 ^{III}, hier wurde außerdem eine maximale Menge der Zählimpulse von 98 dargestellt. Eine Strontiumdiffusion konnte in beiden Gruppen PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III} gefunden werden. Diese war bis zu 3 mm von den Schnittkannten der Osteotomie entfernt nachweisbar. Das Calciumsignal war in den Kortices aller drei untersuchten Gruppen nachzuweisen. Ebenso war in den Bereichen der Überreste des Biomaterials bei einigen Proben noch ein Calciumsignal vorhanden. Das Überlappen des Calciumsignals mit dem Kollagensignal im Bereich der Knochenneubildung in der ROI erklärt sich aus der physiologischen Funktion des Kollagens bei der Knochenneubildung als Matrix für die Mineralisierung. Die Abbildungen 28, 29 und 30 zeigen repräsentative Overlay-Darstellungen (übereinander gelegte Pixel-Darstellung) bzw. Strontium-Signale der Subgruppen.

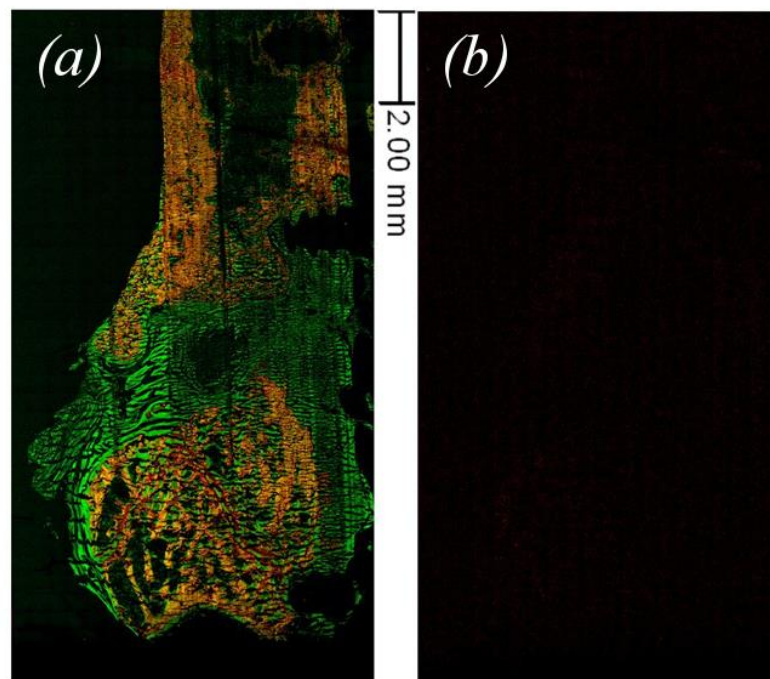


Abbildung 28: Subgruppe 1, (a) Overlay, (b) Hintergrundrauschen des Sr⁺-Signals; (7 counts)

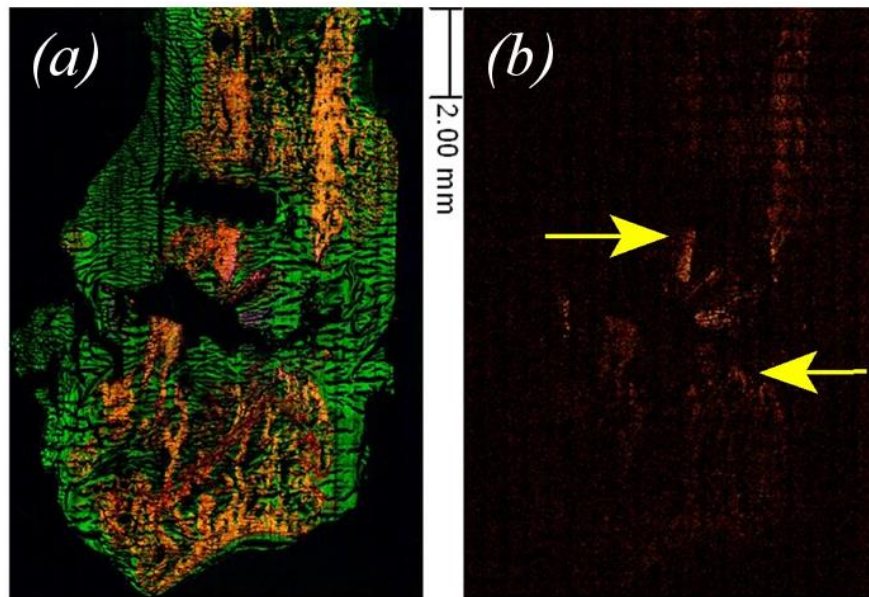


Abbildung 29: Subgruppe 2, (a) Overlay der Counts von Calcium (Ca⁺), Prolinfragment (C₄H₈N⁺) und Strontium (Sr⁺), (b) Sr⁺-Signal, in den umgebenden Knochen ist deutlich Strontium diffundiert (Pfeile); (3 counts)

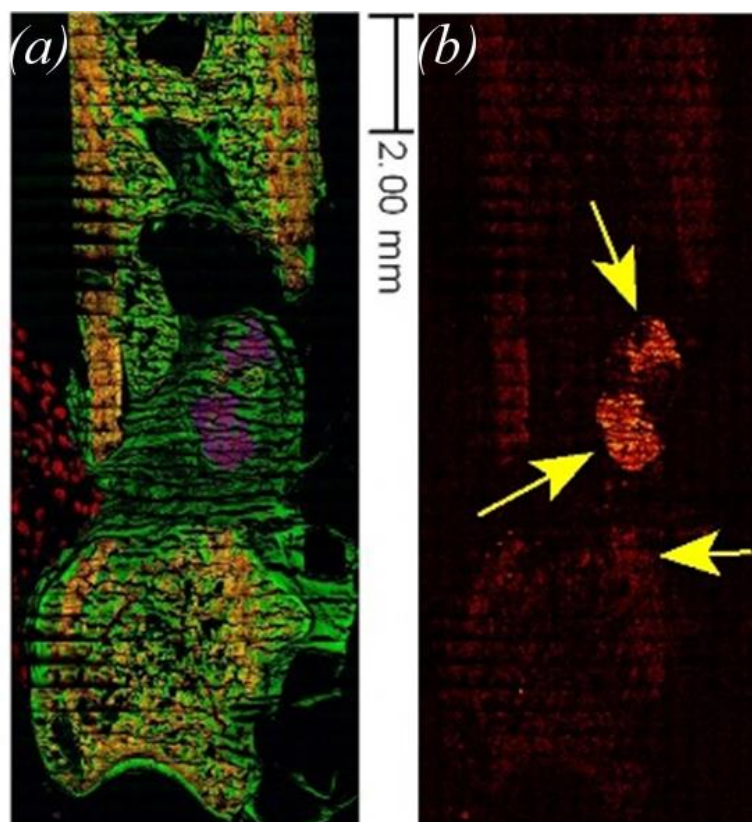


Abbildung 30: Subgruppe 3, (a) Overlay der Counts von Calcium (Ca⁺), Prolinfragment (C₄H₈N⁺) und Strontium (Sr⁺), (b) deutlicher Strontiumanteil in der Bildmitte und dessen Umgebung, Sr⁺-Signal (Pfeile); (20 counts)

5 Diskussion

5.1 Frakturmodell

Um neuartige Biomaterialien erfolgreich an Lebewesen testen zu können, sollte das verwendete Tiermodell so weit wie möglich der klinischen Situation entsprechen. *Kalu* definiert geeignete Tiermodelle, als bei einem lebenden Tier induzierbare oder von allein auftretende Knochenverluste aufgrund eines ovariellen Hormondefizits. Dabei sollten die Eigenschaften des Knochenverlustes möglichst nahe an die klinische Situation postmenopausaler Osteoporosepatientinnen heranreichen¹¹⁴. Obwohl die Anatomie und Physiologie von Primaten am ehesten mit der Knochenphysiologie des Menschen vergleichbar sind, und Tierversuche sich hier optimal eignen würden, beschränken hohe Kosten und ethische Gesichtspunkte deren Verwendung in der Osteoporoseforschung⁴⁰. An Rattenknochen sind schon zahlreiche Studien zur Ovariectomie und Defekten kritischer Größe durchgeführt worden, einige davon an der calvaria (Schädeldecke)^{6,149,156,166,205,230}, andere an langen Knochen^{114,177}.

Generell häufen sich beim Menschen osteoporotische Brüche dort, wo viel spongioser Knochen vorliegt, also an distalem Radius, Oberarm, Wirbelkörper und Femur. Diese Knochen sind in der Altersgruppe der über 75-Jährigen der *loco typico* (typischer Ort) osteoporotischer Frakturen, wobei die osteoporotischen Frakturen weit über 70% aller Frakturen an diesen Orten ausmachen⁸⁷. Das in dieser Studie verwendete metaphysär lokalisierte „critical size defect“-Rattenfemurmodell kommt der klinischen Situation deswegen besonders nahe, da die meisten osteoporotischen Frakturen im metaphysären Bereich der langen Knochen wie dem Femur auftreten^{7,12}. *Hettwer* gibt zu bedenken, dass es außer einer noch genaueren Definition des Critical Size Defects (CSD) als Abgrenzung zur unkritischen Größe beim Menschen auch einer evidenzbasierten Empfehlung zum Vorgehen bei unterschiedlichen vorliegenden Situationen eines CSD bedarf¹⁰⁰. Innerhalb der ersten drei Monate des Lebens einer Sprague Dawley Ratte erreicht die trabekuläre Knochenmasse ihre Peak bone mass¹³¹. Die Ratten des Modells in dieser Arbeit sind bei Ankunft im Labor 12 Wochen alt und haben daher ihre Peak bone mass erreicht.

Um den osteoporotischen Knochenstatus und seine Folgen beim Menschen nachzuempfinden, bedarf es zukünftig mehr metaphysärer Frakturmodelle⁴¹.

Turner warnt aufgrund der geringen Homologie der meisten Tiere mit dem Menschen vor einer direkten Übertragung der Ergebnisse aus den Osteoporose-Tiermodellversuchen, hebt aber die Wichtigkeit der Grundlagenforschung am Tier hervor²⁰⁰. Aerssens *et al.* konstatieren, man solle das Rattenmodell in der Knochenforschung als klinische Vorstufe betrachten, bevor es am Großtiermodell zu weiterführenden Versuchen kommt. Beide mahnen zur Vorsicht der vorschnellen Übertragung von Ergebnissen auf den Menschen¹. Bei der Forschung am Menschen sind bei der Studiengruppenbildung Grenzen gesetzt. Das hat den Grund, dass große interindividuelle Unterschiede in der Lebensstilführung in Bezug auf Ernährung, Vitaminhaushalt (vor allem Vitamin D und K), Alkoholkonsum und Rauchgewohnheiten vorliegen. Raucher und Alkoholiker haben ein erhöhtes Frakturrisiko und ebenso ein erhöhtes Risiko der Non-Union (Falschgelenkbildung)^{92,115,172}. Die hohe humane Lebenserwartung und das nur schleichende Entstehen einer Osteoporose verkomplizieren außerdem einen (ohnehin in engen ethischen Grenzen stattfindenden) vergleichbaren Versuchsaufbau. Vorrangig erlauben es Tiermodelle der Forschung, die mannigfaltigen Faktoren, die bei der Untersuchung von Menschen eine Rolle spielen, auszuklammern. Hauptsächlich sind hiermit die Lebensspanne und unterschiedliche Lebensführung gemeint²⁰⁰.

Bei gesunden Sprague Dawley Ratten findet sich eine Verlangsamung des Knochenwachstums zwischen 8 und 11 Monaten, wobei nach 12 Monaten Lebenszeit meist kein neuer Knochenaufbau feststellbar ist und sich keine Hinweise für eine altersassoziierte Osteopenie ergeben (Minderung der Knochendichte). Das heißt, es findet kaum noch eine Veränderung der Knochenneubildung auf zellulärer Ebene statt¹³¹. Vielmehr beginnt der geringe Verlust des spongiösen Knochens zwischen dem 9. und 12. Monat, der aber bis zum 16. Monat kaum ins Gewicht fällt. Es wäre also durchaus zielführend, ein Langzeitmodell zu entwerfen, welches untersucht, in welchem Zeitraum die Knochenersatzmaterialien (KEM) einen relevanten Knochenaufbau bei gesunden wie auch ovariectomierten und mit einem CSD osteotomierten Ratten zeigen. Dies wird in weiteren Versuchen geklärt werden müssen. Nichtsdestotrotz ist das Rattenmodell ein angemessenes Tiermodell für die Erforschung skelettaler Fragestellungen, da sich die zugrundeliegenden Mechanismen für die Knochenhomöostase bei gesunden und kranken Menschen und Ratten durchaus gleichen^{75,131}.

Um aus der gegebenen Anzahl an Versuchstieren, die nicht zuletzt auch aufgrund des finanziellen Spielraums begrenzt ist, eine optimale Information zu gewinnen, wurden mehrere Untersuchungsmethoden angewendet. Selbstverständlich wäre es möglich, noch weitere Verfahren als die hier verwendeten zum Einsatz zu bringen, was unter Umständen einen zusätzlichen Informationsgewinn bedeuten könnte.

Generell spricht die Tatsache, dass kein Tier in diesem Versuch vor der Euthanasie gestorben oder Anzeichen einer schwerwiegenden Komplikation zeigte, für eine Eignung des verwendeten Modells.

5.2 Plattenbrüche

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Plattenbrüche aufgezeichnet und statistisch ausgewertet. Wie auch beim Menschen spiegeln die Plattenbrüche in dem vorliegenden Experiment die klinische Realität wider. Es kommt trotz intraoperativ stabiler Situation hin und wieder im weiteren Verlauf zum Materialversagen, häufig aufgrund einer Osteoporose bzw. einer dadurch bedingten Frakturheilungsstörung^{16,228}. Die Plattenbrüche sind somit Ausdruck einer gestörten bzw. ausbleibenden knöchernen Heilung. Der Anteil intakter Platten war in der Kontrollgruppe (65 %) ähnlich der der Subgruppe PPGC+S 3:7^{III} (61 %), wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Für beide Gruppen gab es jeweils einen signifikanten Unterschied zur Subgruppe PPGC+S 5:5^{III}, was Hinweise darauf liefern könnte, dass es in der letzten Gruppe erhebliche Störungen bei der Knochenbruchheilung gegenüber den beiden anderen Gruppen gegeben haben muss. Es kann jedoch nur spekuliert werden, welche Gründe hierfür verantwortlich sind. Einen Hinweis könnte die Tatsache liefern, dass das PPGC+S 5:5^{III}-Material sich sehr schnell aufgelöst haben muss, da es in keiner Probe nach 6 Wochen noch nachweisbar war. Eventuell haben zelluläre Materialdegradationsprozesse in diesem Zusammenhang einen negativen Effekt auf die Knochenbruchheilung gehabt und deshalb zu einer solch hohen Plattenversagungsrate geführt.

5.3 Material PPGC+S

Der verwendete Zement weist eine Porosität von 80 % auf. *Vestermark* empfiehlt eine Porosität von 50-60 %¹⁴³. Eine hohe Porosität ist mit höherer Knochenneubildungsrate assoziiert¹⁷¹. Es gibt bereits mehrere kommerzielle Zemente mit ähnlich hoher Porosität wie sie die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufweisen. Als Beispiele sollen hier das Biomaterial der Firma Actifuse auf Calciumphosphatbasis plus Silikon genannt werden, das für Füllung von Defekten und zur Spinalfusion in Großbritannien zugelassen ist. Dieses KEM weist eine 80 %-ige Porosität auf. Bedeutsam ist auch das KEM der Firma Optex, ein Kompositmaterial aus Hydroxyapatit und Tricalciumphosphat. Es besitzt 70 % Porosität und ist für Tumorosteolysen und Defektauffüllung geeignet¹²⁴. Da das in dieser Studie verwendete PPGC+S KEM den dual wirksamen Anti-Osteoporose Wirkstoff Strontium enthält, ist es für die Anwendung bei Frakturen aufgrund einer high turnover Osteoporose (postmenopausale Osteoporose) gedacht und vermutlich bei einer low turnover Osteoporose weniger wirksam, weil hier viel weniger Zellen vorzufinden sind, auf die das therapeutische Agens einen Effekt haben könnte. Über die exakte Abbaurate gelatinehaltiger KEM ist über eine Literaturrecherche aufgrund der wenigen *in vivo* Studien nur wenig in Erfahrung zu bringen.

Es sind fünf kommerzielle KEM aus DBM (demineralisierter Knochenmatrix) erhältlich, welche als Trägermaterial Gelatine enthalten, die alle durch die FDA freigegeben sind. Diese KEM heißen: Opteform® (u.M.= unbekannte Menge DBM), Altiva® (u.M. DBM), Optefil® (24% DBM) (alle drei von der Firma Exatech, USA/UK), Osteofil® (24% DBM, Medtronic Spinal & Biologics, Irland) und BioSet™ (24% DBM, RTI Surgical®, USA). Von diesen hat nur Osteofil® eine evidenzbasierte Level 4 Einteilung^{169,215}. Die Level 4 Eingruppierung bedeutet, dass nur Fallstudien ohne Kontrollgruppe vorliegen²¹⁵. Obwohl Gelatine intuitiv wenig tragfähig erscheinen mag, genügten die Eigenschaften von Osteofil® den FDA-Ansprüchen, so dass dieses KEM für lumbar- und cervical Vertebrafusionen zugelassen werden konnte. Ein *in vivo* Experiment zeigte, dass Gelatine als alleiniges KEM in einem CSD Modell an männlichen Wistar Ratten nach 8 Wochen, verglichen mit dem Autograft, vollständig degradiert worden ist und zugleich mehr biokompatibel war als die Kontrolle mit Chitosan-Gelatine und Chitosan allein. Es konnte hartes Bindegewebe (auch Knorpel und Knochen) an die Stelle des KEM aus Gelatine treten¹⁶⁸. Ein erhöhter Anteil Gelatine führte *in vitro* zu vermehrter Wasseransammlung im KEM³². Dies spielt eine Rolle, wenn man bedenkt, dass die

Menge bzw. Größe von KEM zur Defektfüllung exakt passen muss, sich aber im Falle gelatinehaltiger KEM nach Kontakt mit der Körperflüssigkeit ausdehnen kann.

Im Material PPGC+S kam EDC/NHS; 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid und N-Hydroxysuccinimidester als Vernetzungsmittel zum Einsatz.

Yao et al. setzten einem gelatinehaltigen KEM als Vernetzungsmittel Glutaraldehyd zu, um die Abbaurate des biodegradierbaren Polymers Gelatine zu verlangsamen²³¹. Im Versuchsaufbau von *Yao et al.* wurden gesunde Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer an der Calvaria (Schädeldecke) ostektomiert. Hier lag also weder eine systemische Erkrankung noch eine erhöhte mechanische Belastung vor, ganz im Gegensatz zum Versuchsaufbau in dieser Arbeit.

So konnte nach 4, 8 bzw. 12 Wochen Versuchsdauer makroskopisch noch einiges von gelatinehaltigem KEM gefunden werden²³¹. In der zukünftigen Forschung könnten weitere Optimierungen stattfinden, um den Gelatinegehalt genau so anzupassen, dass das Material PPGC+S weniger schnell abgebaut wird und gleichzeitig die Eigenschaft der gesteigerten Knochenneubildung durch Wirkstofffreisetzung, wie z.B. Strontium, erhalten bleibt. Grundsätzlich stellt sich die Frage, welcher Gelatineanteil ein sinnvoller Bestandteil von KEM sein kann. Die Anbieter kommerzieller gelatinehaltiger KEM halten sich bezüglich der verwendeten Menge an Gelatine bedeckt²¹⁵. Es ist wichtig, die hohe Abbaurate von PPGC+S zu optimieren, da hierunter scheinbar die Tragfähigkeit zu schnell abnahm und dies vermutlich zu den Plattenbrüchen führte. Das Ziel ist eine bewegungs- bzw. beübungsstabile Situation im Knochen post operationem zu erhalten. Die Untersuchung der Immunprozesse am Interface (Grenzregion) zwischen Empfängergewebe und KEM ist eine weitere Option, die das Material PPGC+S noch biokompatibler machen könnte; denn es gilt mittlerweile als anerkannt, dass die Feinregulation der Immunantwort im Empfängergewebe einerseits die Abbaurate von KEM (z.B. durch Fremdkörperriesenzellen) und andererseits die optimale Knochenheilung im Defekt steuert¹⁹⁰. Eine Knochenneubildung, die den CSD komplett ausfüllt, konnte durch das KEM PPGC+S in diesem Versuch leider nicht erzielt werden. Für die zukünftige Forschung kann überlegt werden, eine weitere Gruppe Versuchstiere mit einer strontiumfreien Variante PPGC zu testen, um einen weiteren Vergleichsparameter für die strontiumhaltigen KEM zu erhalten.

5.4 Knochenneubildung verstärkt bei PPGC+S 3:7 ^{III}

Das Element Strontium ist in der Form als orales Pharmakon Strontiumranelat und als Bestandteil von synthetischen KEM in der Lage, die Knochenarchitektur zu verbessern²⁷. Dies gilt insbesondere für die BMD von Femurkopf, gesamter Hüfte und lumbaler Wirbelsäule⁹⁰.

In einer Studie an 1649 Frauen, die an Osteoporose litten, war eine dreijährige orale Strontiumranelattherapie imstande, das Frakturrisiko im Vergleich zur Placebogruppe um 41 % zu senken¹⁵⁰.

Strontium wirkt anti-resorptiv und positiv auf den Knochenaufbau ein, was als dualer Wirkmechanismus bezeichnet wird und ein Alleinstellungsmerkmal des Strontiums darstellt^{25,37,42,90,126,192}. Außer der vormals möglichen oralen Therapie sollte eine lokale Gabe von Strontium in KEM in Betracht gezogen werden²⁰³. Dies ist darin begründet, dass die orale Therapie mit Strontium seit 2014 aufgrund kardiovaskulärer Nebenwirkung zurückhaltend verordnet werden sollte. Im Mai 2017 hatte der Hersteller *Servier* die weltweite Einstellung des Vertriebs von Strontiumranelat angekündigt und bis August 2017 vollzogen²⁴.

In der vorliegenden Studie fand keine Analyse von extraossären Geweben auf den Strontiumgehalt statt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Werte relativ zum Gewicht der Ratten, unter den Werten einer oralen Therapiedosis des Strontiumranelats liegen. Dies lässt sich aus der Studie von *Zhang et al.* 2013 ableiten. Dort war die gefundene Konzentration von Strontium im Urin höher als im Blut, was als ein Hinweis auf eine Verstoffwechselung und Ausscheidung zu werten ist.

Es scheint so, als habe die rein lokale Gabe im KEM in dem Versuchsaufbau von *Zhang et al.* eine ausreichende Wirkung erzielt, ohne hohe systemische Strontiumdosierungen zu erfordern²³². Bislang gibt es keine Daten, die auf eine Toxizität von Strontium als Additiv in KEM hinweisen. Es gibt bereits aber eine kommerzielle Variante eines strontiumhaltigen KEM (StronBoneTM, RepRegen, United Kingdom)²⁷. *Sriranganathan et al.* und das *US-amerikanische Public Health statement* zu Strontium weisen darauf hin, dass ein optimaler Wert für den Strontiumanteil gefunden werden muss, da der Knochen durch zu hohe Strontiumanteile brüchig wird^{3,206}. Die Notwendigkeit, den Strontiumanteil optimal einzustellen, ist sicherlich auch in unserem Versuchsaufbau ein für die Zukunft wichtiger Gesichtspunkt.

Unsere Studie nutzt den Defekt kritischer Größe am metaphysären Femur von Ratten, was eine bislang neuartige Herangehensweise darstellt. Im Vergleich zur Leerdefekt Kontrollgruppe und zu PPGC+S 5:5 ^{III} (37 % Strontium) hat PPGC+S 3:7 ^{III} (90 % Strontium) eine deutliche Knochenneubildung gezeigt. Der gefundene Unterschied war statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Färbung nach Kossa kann als Gegenteil zur Knochenneubildung verstanden werden. Es fand sich nach der Art des Färbens nach von Kossa weniger unmineralisiertes Gewebe in PPGC+S 3:7 ^{III} verglichen mit der Gruppe PPGC+S 5:5 ^{III} und dem Leerdefekt. Die historisch entstandenen Färbemethoden nach Movat und von Kossa/van Gieson, können durch ihre weltweite und jahrzehntelange Anwendung und immer wieder bestätigten Ergebnisse in der Histologie als valide betrachtet werden. Die vorhandene Knochenneubildung konnte also anhand der Färbemethoden validiert werden.

Die Unterschiede in der Knochenneubildung waren signifikant zwischen Leerdefekt und in PPGC+S 3:7 ^{III} ($p=0,004$) und zwischen PPGC+S 5:5 ^{III} und in PPGC+S 3:7 ^{III} ($p=0,019$). Diese histomorphometrischen Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein^{42,143,232}. Der Strontiumzusatz in einem Hydroxyapatitzement ist außerdem bezüglich seiner mechanischen Bindung mit Knochen in einem Ziegenmodell zur Hüftendoprothesenrevision dem klassischen PMMA überlegen¹⁵⁹.

Je mehr Strontiumanteil das KEM PPGC+S enthielt, desto mehr Knocheneubildung konnte beobachtet werden.

5.5 Enzymhistochemie ALP und TRAP

TRAP kommt im hämatopoietischen Gewebe, unter anderem in aktivierten Makrophagen, und in den Osteoklasten vor^{13,31,76,88,153,225}. TRAP 5b ist spezifisch für Osteoklasten, und Makrophagen^{13,89}. Es soll beachtet werden, dass also auch andere Zellen als knochenassoziierte Osteoklasten bei der Histomorphometrie mitgezählt werden, sicherlich auch in dieser Arbeit, weil eine exakte Unterscheidung der TRAP-Isoformen allein mit dieser TRAP Enzymhistochemie unmöglich ist. Seit vielen Jahren ist TRAP ein zuverlässiger Osteoklastenmarker^{9,76}. Die Osteoklastenaktivität wird von einem Anstieg der TRAP 5b Synthese begleitet³¹. Die Gewebespezifität der TRAP 5b

für Knochenosteoklasten ist gut ausgeprägt. Gerade für die Entwicklung langer Knochen, und bei der chondralen Ossifikation spielt TRAP eine Rolle, dies konnte im adulten Mausmodell gezeigt werden²². In unserem Modell wird speziell die metaphysäre Knochenbildung untersucht.

Am apikalen Pol der Osteoklasten, der funktionellen sekretorischen Domäne (FSD), wird TRAP 5b per Exozytose aus den transzytotischen Vesikeln zuerst in die interstitielle Flüssigkeit, dann in den Blutkreislauf sezerniert^{31,102}.

TRAP 5b ist ein sensibler Parameter des Knochenstoffwechsels in humanen Serumproben^{13,31}. In der vorliegenden Arbeit führte Strontium zu einer Abnahme der Osteoklastenzahl, dies stimmt mit der Literatur überein^{25,106,173,196}. Es handelt sich bei TRAP um einen guten Marker für Osteoklasten, besonders für die grundlegende Fragestellung in dieser Studie, auch wenn ebenfalls andere TRAP-positive Zellen wie z.B. Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen mitgefärbt werden können. Das Vorliegen von mehr TRAP-positiven Zellen in Subgruppe 2 im Vergleich zum Leerdefekt könnte darin begründet liegen, dass die Immunantwort der Versuchstiere auf das KEM durch Osteoklasten, Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen zwar durch beide PPGC+S Varianten ausgelöst wurde, aber nur die höhere Strontiumkonzentration in der Variante PPGC+S^{III} 3:7 imstande war zu einer Osteoklasten-Abnahme zu führen.

TNAP ist eine von vier Unterformen des ubiquitären Glykoproteins ALP, ein zweifach Zink-, einfach Magnesium enthaltendes und einfach Calcium bindendes Metalloenzym, und kommt in Knochen, Leber und Niere vor^{152,197}. Die Erstbeschreibung erfolgte bereits 1907 durch *Suzuki et al.*²¹⁴. Im Allgemeinen katalysieren ALPs die Hydrolyse von Phosphatmonoestern unter basischen Bedingungen und sind in der Gestalt als TNAP-Unterform mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit an der Kalzifizierung des Knochens beteiligt¹⁹⁷. Seit 1960 besteht eine Enzymfärbemethode nach Burstone zum TNAP Nachweis³⁴. Als Marker für knochenbildende Aktivität hat sich TNAP in Studien zu Hartgewebe bewährt^{81,133,183}. *Li et al.* fanden eine Stimulation der osteogenen Differenzierung von MC3T3-E1 Zellen (Osteoblastenvorläufern) eines Mg-Ca-Sr enthaltenden KEM unter anderem anhand des Markers ALP/TNAP¹³⁰.

Das knochenspezifische TNAP kann außerdem als Serummarker der Knochenneubildung bei Menschen verwendet werden^{59,67}. Die knochenspezifische TNAP macht über 50 % des menschlichen Serums-ALP Wert aus¹⁹⁷.

TNAP ist ein früher histologischer Osteoblastenmarker²⁵. TNAP ist in der vorliegenden Arbeit in den Versuchsgruppen mit strontiumhaltigen KEM im Vergleich zum Leerdefekt hochreguliert. Dieses Ergebnis, die Fähigkeit von Strontium den verwendeten Knochenaufbaumarker TNAP herauf- und die Knochenresorption gleichzeitig herunter zu regulieren, deckt sich mit den Ergebnissen anderer in vitro und in vivo Studien^{14,25,30,150,230,232}.

Die beiden verwendeten Marker sind somit so zellspezifisch wie möglich. Es ergeben sich geringe falsch positive Ergebnisse wie es bei jeder naturwissenschaftlichen Messung der Fall ist. *Delgado-Ruiz et al.* stellen fest, dass über 43 Variable zur Analyse von Knochenheilung genutzt werden. Ein Umstand, der leider große Streuung der Ergebnisse in diesem Wissenschaftszweig bedingt⁵². Forscher müssen sich auf etablierte Methoden stützen, um valide Daten erzeugen zu können. Dies können die hier verwendeten Marker leisten. Verschiedene Bestrebungen wurden unternommen, um die Histomorphometrie zu definieren und zu vereinheitlichen⁵³. Eine weitere Verbesserung der Histomorphometrie könnte mit der weltweiten Verwendung standardisierter open Source Software und deren Plugins, wie z.B. ImageJ (Wayne Rasband, National insititute of health, USA) gelingen, welches sich zurzeit noch in der Erprobungs- und Ausbesserungsphase befindet.

5.6 Strontiumfreisetzung

Okazaki et al. verglichen TOF-SIMS in der Analytik des Knochens mit anderen Oberflächenanalysemethoden und konnte zeigen, dass TOF SIMS bei der Untersuchung von Hydroxylapatit und Fluoroapatit den Oberflächenanalysemethoden HR-TEM, FT-IR und XRD überlegen war¹⁶³. Schon *Ni et al.* zeigten, dass TOF-SIMS eine geeignete Methode für die Analytik strontiumhaltiger Knochenzemente in Knochenproben sein kann. Allerdings nutzten sie bei der TOF-SIMS Messung eine Gallium-Primärionenquelle¹⁶⁰.

Sjövall et al., *Malmberg et al.* und *Richter et al.* untersuchten erfolgreich die generelle Anwendbarkeit von Bi_3^+ an biologischen Proben, unter anderem zum Nachweis von Na^+ , K^+ und Lipiden von Hirn, Nieren und Eingeweiden von Ratten, bzw. menschlichem

Unterhautfettgewebe^{141,186,202}. *Malmberg et al.* beschreiben die hohe erfolgreiche Ausbeute großer Hydroxyapatitfragmente bei der Untersuchung von Hamsterknochen mit Bi_3^+ Clusterionen¹⁴¹. *Eriksson et al.* nutzen Bi_3^+ Cluster, um die Grenzfläche von Titaniumimplantaten und Knochen an männlichen Sprague Dawley Ratten zu untersuchen und konnten große Hydroxylapatitfragmente detektieren⁶⁴. *Henss et al.* zeigten in zwei Studien die gute Anwendbarkeit der TOF-SIMS für die Untersuchung von Knochengewebe an den Wirbelkörpern aus einem Langzeitmodell ovariectomierter zehn Wochen alter weiblicher Sprague Dawley Ratten, bzw. die Quantifizierung des Calciumgehalts anhand eines Knochenstandards mit der Gegenstellung anderer Oberflächenanalysemethoden^{97,98}.

Die Vorgehensweise zur Herstellung der Knochenproben wie sie in dieser Studie durch Technovit 9100 © Einbettung und Schneiden mit dem Mikrotom vorgenommen worden ist, wurde bereits andernorts als Methode der Wahl beschrieben⁹⁶.

TOF SIMS analysiert die oberen 1-2 nm einer Oberfläche. Dies ist genau der Bereich, der für die Interaktion von Gewebe und Knochen von Interesse ist^{138,217}. Die laterale Auflösung liegt optimiert bei ca. 200-300 nm, was einen genauen örtlichen Nachweis der jeweiligen Substanzen ermöglicht¹²⁷.

Auch wenn im Gegensatz zu matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI), eher kleine Moleküle, z.B. Proteine detektiert werden können, ist die räumliche Information der TOF-SIMS von hohem Vorteil, insbesondere um Aussagen auf subzellulärer Ebene treffen zu können. Die Quantifizierung mit TOF-SIMS ist möglich, bedarf aber eines besonderen Aufwands, da kleinste Unterschiede auf der Oberfläche eine Auswirkung auf die Sekundärionenausbeute haben¹²⁷. Um die Aussagekraft der Messungen in der Studie zu sichern, wurde als Peak das Prolinfragment des Kollagen Typ 1 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$) verwendet. Der $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ Peak stimmte in den vorhergehenden Versuchen unzweifelhaft mit der Aminosäure Prolin bzw. dem Kollagen Typ 1 überein⁹⁶⁻⁹⁸. Für PPGC+S konnte eine Diffusion über mehrere Millimeter im Lagerknochen und neu gebildeten Knochen gezeigt werden. Für die Subgruppe 2 wurde Strontium in der Peripherie des ehemaligen Defektbereichs-, für die Subgruppe 3 vermehrt im ehemaligen Defektbereich nachgewiesen. In einer Studie am CSD bei Sprague Dawley Ratten mit strontiumhaltigem Calciumphosphatzement konnte, wie in der vorliegenden Arbeit, die Strontiumdiffusion im Knochen über einige Millimeter Strecke nachgewiesen werden²¹².

Wang *et al.* untersuchten erfolgreich ein Gelatine-enthaltendes Knochenersatzmaterial mit der TOF-SIMS und konnten die grundsätzliche Anwendbarkeit bei hochporösen Knochenmaterialien somit bestärken²²².

Wang *et al.* konstatieren weiter, dass es von enormer Bedeutung ist, für eine TOF-SIMS Untersuchung eine möglichst ebene Oberfläche zu schaffen²²². Dies gelingt mit dem hier verwendeten Schneideprotokoll und der Unterklebetechnik mit Adhäsivpunkten. Zusätzlich ließe sich für eine quantitative Untersuchung des Strontiumgehalts zusätzlich eine principal component analysis (PCA; Mehrfachmessung plus statistische Auswertung) durchführen¹³⁸. Für die Untersuchung von Knochen kann eine Kombination aus XPS und der PCA mit TOF-SIMS sehr genaue quantitative Aussagen liefern¹³⁸.

Ein Zusatz von Strontium hat in einem Hydroxylapatit bone-graft-extender KEM im Hundemodell, in einem mesoporösem Glas enthaltenen Scaffold-KEM bei einem ovariectomierten Wistar Rattenmodell und in einem Collagen-Strontium-Hydroxylapatit KEM im Calvaria-Defect-Modell an Sprague Dawley Ratten zu einer vermehrten Bildung von Knochen als das jeweilige Kontroll KEM ohne Strontiumzusatz geführt^{143,230,232}. Auf der zellulären Ebene hat die TOF-SIMS die Strontiumaufnahme in Osteoklasten aufzeigen können¹⁹⁶.

Aufgrund der schnellen Degradierung und Auswaschung des PPGC+S KEM konnte in dieser Arbeit unterschiedlich genau (mehrere Millimeter vom CSD entfernt) nachgewiesen werden, mit welchem Abstand und welcher geometrischen Gesetzmäßigkeit aus der CSD-Region heraus Strontium in die Umgebung diffundiert ist.

Schlussfolgerung

1. Der Strontiumzusatz zum KEM PPGC+S ermöglicht eine vermehrte Bildung neuen Knochens.
2. Die Strontiumfreisetzung und -ausbreitung aus degradierbarem, biokompatiblen KEM (PPGC+S) ist im Knochen mittels TOF-SIMS nachweisbar.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neuartige Kompositmaterialien mit unterschiedlichem Strontiumgehalt im osteoporosemimetischen, metaphysären critical-size-defect-Modell als Knochenersatzmaterial am Rattenfemur mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die beiden Knochenersatzmaterialien PPGC+S 5:5 ^{III} (37 % Sr^{2+}) bzw. PPGC+S 3:7 ^{III} (90 % Sr^{2+}) wurden dabei der Leerdefektgruppe gegenübergestellt. 24 weibliche Sprague Dawley Ratten wurden randomisiert den drei Gruppen (A) Leerdefekt (n=8), (B) PPGC+S 5:5 ^{III} (n=8) und (C) PPGC+S 3:7 ^{III} zugewiesen.

Die Osteoporose wurde durch eine Kombination aus einer zwölfwöchigen Mangeldiät (calcium-, Vitamin D3-, und phosphorarm) mit bilateraler Ovariectomie induziert. Die Materialeinbringung erfolgte nach 90 Tagen in einen critical size defect in Form einer keilförmigen Osteotomie im metaphysären Abschnitt des linken Femurs mit vollständiger Kontinuitätsunterbrechung und Stabilisierung mit T-Miniplatten. Die Probengewinnung fand nach Euthanasie sechs Wochen post operationem statt.

Für die Auswertung wurden zwei etablierte histochemische Färbungen, nach Movat bzw. von Kossa/ van Gieson und zwei enzymhistochemische Färbungen, ALP- bzw. TRAP-Nachweis, angewandt. Die Knochenschnitte wurden nach erfolgreicher Färbung fotodokumentiert und mittels Auswertesoftware bearbeitet, so dass eine statistische histomorphometrische Auswertung möglich gewesen ist. Zusätzlich wurde die Strontiumfreisetzung mittels der TOF-SIMS analysiert.

Makroskopisch konnte bei keiner der drei Gruppen eine knöcherne Überbrückung festgestellt werden. Biomaterialresiduen waren nur bei PPGC+S 3:7 ^{III} nachweisbar.

Histomorphometrisch zeigte sich eine vermehrte Knochenneubildung für das strontiumreichere KEM PPGC+S 3:7 ^{III}, (90 % Sr^{2+}) im Vergleich zu PPGC+S 5:5 ^{III} (37 % Sr^{2+}) und der Leerdefektgruppe. Der duale Wirkmechanismus von Strontium kann als bestätigt angesehen werden. Im neugebildeten Knochen und im Lagerknochen konnte mittels TOF-SIMS Strontium, im Sinne einer einige Millimeter weit reichenden Diffusion, nachgewiesen werden.

6.1 Summary

This work focused on two new bone substitute materials (BSM) in an osteoporosis-mimetic metaphyseal critical size defect in a rodent model. The two BSMs contained differing amounts of strontium PPGC+S 5:5 ^{III} (37 % Sr²⁺) and PPGC+S 3:7 ^{III} (90 % Sr²⁺) and were compared to an empty (i.e. material-free) control group. 24 female Sprague-Dawley rats were randomly distributed to one of the three groups (A) empty control group (n=8), (B) PPGC+S 5:5 ^{III} (n=8) and (C) PPGC+S 3:7 ^{III}.

Osteoporosis was induced through a combination of a twelve week long deficient diet (poor in Calcium, Vitamin-D and Phosphorus) and bilateral ovariectomy. The implantation of BSM was performed ninety days later into a critical size defect of the distal femur with a wedge osteotomy at the distal metaphysis of the femur, and internal stabilization with a T miniplate. Euthanasia and harvesting of the samples was done six weeks after femur surgery.

Two well established histochemical (Movat, van Kossa/van Gieson) and two enzyme-histochemical staining methods (ALP and TRAP) were used to evaluate the new BSMs. Bone cross-sections were photo-documented after successful staining and images digitally processed for histomorphometric measurements to be carried out. Additionally, the release of strontium was analyzed using TOF-SIMS.

Macroscopically in none of the three groups the critical size defect was locally bridged over. Residues of the biomaterial were only found in the BSM group (C) PPGC+S 3:7 ^{III}.

Histomorphologically a higher amount of newly formed bone was found for the BSM PPGC+S 3:7 ^{III}, (90 % Sr²⁺) compared to PPGC+S 5:5 ^{III} (37 % Sr²⁺) and control. The dual mode of action of strontium can be considered confirmed. Both in the newly formed bone and in the pre-existing bone strontium diffusion was shown using TOF-SIMS with strontium being detected several millimetres away from the original ROI.

7 Literaturverzeichnis/References

References

1. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality. Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998;139:663–670.
2. Affinito P, Tommaselli GA, Di Carlo C, Guida F, Nappi C. Changes in bone mineral density and calcium metabolism in breastfeeding women. A one year follow-up study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81:2314–2318.
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Public health service. *Public health statement - Strontium*, 2004.
4. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26:1517–1532.
5. Alexander Bob. *Duale Reihe Anatomie*. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2010.
6. Almeida JM de, Bosco AF, Faleiros PL, et al. Effects of oestrogen deficiency and 17beta-estradiol therapy on bone healing in calvarial critical size defects treated with bovine bone graft. *Archives of oral biology*. 2015;60:631–641.
7. Alt V, Thormann U, Ray S, et al. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta biomaterialia*. 2013;9:7035–7042.
8. Ami R. Amini, Cato T. Laurencin, and Syam P. Nukavarapu. Bone tissue Engineering Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. 2012;40:363–408.
9. Angel NZ, Walsh N, Forwood MR, Ostrowski MC, Cassady AI, Hume DA. Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15:103–110.
10. Anh DJ, Dimai HP, Hall SL, Farley JR. Skeletal Alkaline Phosphatase Activity Is Primarily Released from Human Osteoblasts in an Insoluble Form, and the Net Release Is Inhibited by Calcium and Skeletal Growth Factors. *Calcified Tissue International*. 1998;62:332–340.
11. Arnold JS. A simplified model of wound healing III—the critical size defect in three dimensions. *Mathematical and Computer Modelling*. 2001;34:385–392.
12. Atilla Dunky, Winfried Graninger, Manfred Herold, Josef Smolen, Axel Wanivenhaus. *Praktische Rheumatologie. Fünfte aktualisierte und erweiterte Auflage*. 5th ed. Wien: Springer, 2012.
13. Bandorski M. *Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Isoform 5b. Ein neuer Serummarker der Knochenresorption bei Hämodialyse-Patienten*. Marburg, 2015.
14. Barbara A, Delannoy P, Denis BG, Marie PJ. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism*. 2004;53:532–537.

15. Barradas AMC, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials. Current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *eCM*. 2011;21:407–429.
16. Barrios C, Broström L-A, Stark A, Walheim G. Healing Complications After Internal Fixation of Trochanteric Hip Fractures. The Prognostic Value of Osteoporosis. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 1993;7:438–442.
17. Bar-Shavit Z. The osteoclast. A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;102:1130–1139.
18. Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KUE, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs). Multifunctional proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2008;8:212–226.
19. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified Tissue International*. 2014;94:25–34.
20. Bertassoni LE, Swain MV. The contribution of proteoglycans to the mechanical behavior of mineralized tissues. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2014;2014:91–104.
21. Bleibler F, Konnopka A, Benzinger P, Rapp K, König H-H. The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany—a demographic simulation model. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2013;24:835–847.
22. Blumer MJF, Hausott B, Schwarzer C, Hayman AR, Stempel J, Fritsch H. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mechanisms of development*. 2012;129:162–176.
23. Boer HH de. The history of bone grafts. *Clinical orthopaedics and related research*. 1988;292–298.
24. Bolland MJ, Grey A. Cessation of strontium ranelate supply. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2017;357:j2580.
25. Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate. Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008;42:129–138.
26. Booth SL, Tucker KL, Chen H, et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71:1201–1208.
27. Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in biotechnology*. 2013;31:594–605.
28. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *Journal of dental research*. 2010;89:1333–1348.
29. Bouillon R, van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption. Molecular vitamin D mediated mechanisms. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88:332–339.
30. Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *British journal of pharmacology*. 2009;157:1291–1300.

31. Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *Molecular pathology : MP*. 2002;55:65–72.
32. Bundela H, Bajpai AK. Designing of hydroxyapatite-gelatin based porous matrix as bone substitute: Correlation with biocompatibility aspects. *Express Polym. Lett.* 2008;2:201–213.
33. Burkhardt R. Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarkes. *Blut*. 1966;14:30–46.
34. Burstone MS. HISTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON ENZYMATIC PROCESSES IN BONES AND TEETH. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1960;85:431–444.
35. Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects. Any specific needs? *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S56-63.
36. Campana V, Milano G, Pagano E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2014;25:2445–2461.
37. Cannata-Andía JB. Action mechanism of strontium ranelate. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2010;2:5–9.
38. Carleton HM. *Histological technique*. 3rd ed. London: Oxford Univeristy Press, 1957.
39. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106:1229–1237.
40. Cesnjaj M, Stavljenić A, Vukicević S. In Vivo Models in the Study of Osteopenias. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*. 1991;29:211–219.
41. Cheung WH, Miclau T, Chow SK-H, Yang FF, Alt V. Fracture healing in osteoporotic bone. *Injury*. 2016;47:S21-S26.
42. Cianferotti L, D'Asta F, Brandi ML. A review on strontium ranelate long term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. Review. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2013;5:127–139.
43. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological reviews*. 2005;57:427–450.
44. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
45. Colella M, Gerbino A, Hofer AM, Curci S. Recent advances in understanding the extracellular calcium-sensing receptor. *F1000Research*. 2016;5.
46. Conigrave et al AD. L-Amino acid sensing by the calcium-sensing receptor. A general mechanism for coupling protein and calcium metabolism? *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:879.
47. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *The New England journal of medicine*. 2016;375:1532–1543.
48. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *Journal of cell science*. 2011;124:991–998.
49. Dachverband Osteologie e.V. *Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen*.

- Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.*, 2014.
50. Dachverband Osteologie e.V. *Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und Männern. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.* 2017, 2017.
 51. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte. An endocrine cell ... and more. *Endocrine reviews*. 2013;34:658–690.
 52. Delgado-Ruiz RA, Calvo Guirado JL, Romanos GE. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clinical oral implants research*. 2015.
 53. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28:2–17.
 54. Di Chen, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 2004;22:233–241.
 55. Doello K. A new pentachrome method for the simultaneous staining of collagen and sulfated mucopolysaccharides. *The Yale journal of biology and medicine*. 2014;87:341–347.
 56. Doetsch AM, Faber J, Lynnerup N, Wätjen I, Bliddal H, Danneskiold-Samsøe B. The effect of calcium and vitamin D3 supplementation on the healing of the proximal humerus fracture. A randomized placebo-controlled study. *Calcified Tissue International*. 2004;75:183–188.
 57. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–317.
 58. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic proceedings*. 2008;83:1032–1045.
 59. Eastell R, Hannon RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2008;67:157–162.
 60. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin SV. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP). Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2017;71:1293–1312.
 61. EK-RYLANDER B, ANDERSSON G. Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase. *Experimental cell research*. 2009;316:443–451.
 62. El Maghraoui A, Roux C. DXA scanning in clinical practice. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2008;101:605–617.
 63. Endres S, Kratz M, Heinz M, et al. Biokompatibilitätstestung unterschiedlich sterilisierter bzw. desinfizierter allogener Knochentransplantate im Vergleich zum Goldstandard der autologen Knochenspende--Eine "In-vitro"-Analyse der Immunmodulation. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*. 2005;143:660–668.
 64. Eriksson C, Malmberg P, Nygren H. Time-of-flight secondary ion mass spectrometric analysis of the interface between bone and titanium implants. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2008;22:943–949.

65. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World journal of stem cells*. 2013;5:136–148.
66. Féron J-M, Mauprivez R. Fracture repair. General aspects and influence of osteoporosis and anti-osteoporosis treatment. *Injury*. 2016;47:S10-S14.
67. Fink E, Cormier C, Steinmetz P, Kindermans C, Le Bouc Y, Souberbielle JC. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2000;11:295–303.
68. Fischer A-C. *Histologische und biomechanische Analyse des Frakturkallus unter kritischer weicher Fixation zu verschiedenen Zeitpunkten post Osteotomie am Schafmodell*. Berlin: mbv, 2009.
69. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;280:460–465.
70. Fiß T, Meinke C. Pharmazeutische Zeitung online: Stürze bei Senioren. Gefahren erkennen und vermeiden. *Pharmazeutische Zeitung online*. 2012;09.
71. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94:1597–1604.
72. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue. Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*. 2015;2015:421746.
73. Florian Despang. *Hydroxylwerkstoffe & Biokeramiken mit aparallel orientierten Porenkanälen für das Tissue Engineering von Knochen*. Dresden.
74. Freyschmidt J. *Skeletterkrankungen. Klinisch-radiologische Diagnose und Differentialdiagnose*. 4th ed.: Springer, 2016.
75. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone and Mineral*. 1992;18:227–236.
76. Galvão MJ, Santos A, Ribeiro MD, Ferreira A, Nolasco F. Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method. *European journal of histochemistry : EJH*. 2011;55:e1.
77. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015;81:112–121.
78. Genant HK, Cooper C, Poor G, et al. Interim Report and Recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. *Osteoporosis International*. 1999;10:259–264.
79. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing. The diamond concept. *Injury*. 2007;38:S3-S6.
80. Goldberg VM, Stevenson SDVM. Natural History of Autografts and Allografts. *Clinical orthopaedics and related research*. 1987;225:7–16.
81. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2007;18:444–448.

-
82. Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2002;84:2123–2134.
 83. Gregory R., Mundy. *Bone remodeling and its disorders*. 1995th ed. London: Martin Dunitz Ltd., 1995.
 84. Guntur AR, Rosen CJ. Bone as an endocrine organ. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2012;18:758–762.
 85. Gupta A, Kukkar N, Sharif K, Main BJ, Albers CE, El-Amin Iii SF. Bone graft substitutes for spine fusion. A brief review. *World journal of orthopedics*. 2015;6:449–456.
 86. Gütthof S. *Das mündliche Examen. Innere medizin und Chirurgie*. 2nd ed. München: Urban & Fischer; Elsevier, 2016.
 87. Hadji P, Klein S, Gothe H, et al. The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST). An analysis of routine health insurance data. *Deutsches Arzteblatt international*. 2013;110:52–57.
 88. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b. A novel serum marker of bone resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15:1337–1345.
 89. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clinical laboratory*. 2006;52:499–509.
 90. Hamdy NAT. Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2009;48 Suppl 4:iv9-13.
 91. Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122:3151–3162.
 92. Heaney RP. Bone mass, nutrition, and other lifestyle factors. *The American Journal of Medicine*. 1993;95:S29-S33.
 93. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, et al. Peak bone mass. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2000;11:985–1009.
 94. Hench LL, Jones JR. Bioactive Glasses:. Frontiers and Challenges. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2015;3:1–12.
 95. Henriques Lourenço A, Neves N, Ribeiro-Machado C, et al. Injectable hybrid system for strontium local delivery promotes bone regeneration in a rat critical-sized defect model. *Scientific reports*. 2017;7:5098.
 96. Henss A, Hild A, Rohnke M, Wenisch S, Janek J. Time of flight secondary ion mass spectrometry of bone-Impact of sample preparation and measurement conditions. *Biointerphases*. 2015;11:02A302.
 97. Henss A, Rohnke M, El Khassawna T, et al. Applicability of ToF-SIMS for monitoring compositional changes in bone in a long-term animal model. *Journal of the Royal Society, Interface*. 2013;10:20130332.

-
98. Henss A, Rohnke M, Knaack S, et al. Quantification of calcium content in bone by using ToF-SIMS--a first approach. *Biointerphases*. 2013;8:31.
 99. Herold G. *Innere Medizin 2015. Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Köln: Eigenverlag, 2015.
 100. Hettwer W. Synthetischer Knochenersatz. Aktuelle Entwicklungen und Perspektiven. *Der Orthopäde*. 2017;46:688–700.
 101. Hick C, Hick A. *Intensivkurs Physiologie*. 6th ed. München: Urban & Fischer, 2009.
 102. Hirvonen MJ, Fagerlund K, Lakkakorpi P, Väänänen HK, Mulari MTK. Novel perspectives on the transcytotic route in osteoclasts. *BoneKEy reports*. 2013;2:306.
 103. Hochberg Z'e. *Vitamin D and rickets. Vitamin D receptor*. Basel etc.: S. Karger, 2003.
 104. Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2003;4:530–538.
 105. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2. Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling*. 2007;19:2003–2012.
 106. Hurtel-Lemaire AS, Mentaverri R, Caudrillier A, et al. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284:575–584.
 107. Jensen PR, Andersen TL, Hauge E-M, Bollerslev J, Delaissé J-M. A joined role of canopy and reversal cells in bone remodeling--lessons from glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*. 2015;73:16–23.
 108. Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. *International journal of dentistry*. 2012;Article ID 148261:148261.
 109. John P. Bilezikian. *Principles of bone biology. Third edition; Volume 1*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.
 110. Jong WF de. La Substance Minérale Dans les Os. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1926;45:445–448.
 111. Julius von Kóssa. *Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkung*. Budapest, 1900.
 112. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg, 1996.
 113. Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin. A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Molecular metabolism*. 2014;3:384–393.
 114. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*. 1991;15:175–191.
 115. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. The use of multiple sites for the diagnosis of osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2005;17:527–534.
 116. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26:5474–5491.

-
117. Karow T. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis*. 24th ed. Puhlheim: Thomas Karow, 2015.
118. Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Lories RJ, et al. The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis. Opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments? *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;73:336–348.
119. Kerschnitzki M, Kollmannsberger P, Burghammer M, et al. Architecture of the osteocyte network correlates with bone material quality. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28:1837–1845.
120. Kolk A, Handschel J, Drescher W, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012;40:706–718.
121. Kruppke B, Farack J, Wagner A-S, et al. Gelatine modified monetite as a bone substitute material. An in vitro assessment of bone biocompatibility. *Acta biomaterialia*. 2016;32:275–285.
122. Kühn K-D, Berberich C, Bösebeck H. Knochenersatzwerkstoffe als lokale Wirkstoffträger. Aktueller Stand bei Ersatzstoffen verschiedenen Ursprungs. *Der Orthopäde*. 2017.
123. Kulkarni RN, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J. Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes. Involvement of MEPE. *Calcified Tissue International*. 2010;87:461–468.
124. Kurien T, Pearson RG, Scammell BE. Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice. *Bone & Joint Journal*. 2013;95-B:583–597.
125. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling. Potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2016;8:225–235.
126. Larsson S, Fazzalari NL. Anti-osteoporosis therapy and fracture healing. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2012;134:291–297.
127. Lee MS, Aoyagi S. *Mass-Spectrometry Handbook. TOF-SIMS Applications to Bioimaging and Biomolecule Evaluation Methods*. 1st ed.: Wiley, 2012.
128. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007;130:456–469.
129. Lewiecki EM, Dinavahi RV, Lazaretti-Castro M, et al. One Year of Romosozumab Followed by Two Years of Denosumab Maintains Fracture Risk Reductions: Results of the FRAME Extension Study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2018.
130. Li M, He P, Wu Y, et al. Stimulatory effects of the degradation products from Mg-Ca-Sr alloy on the osteogenesis through regulating ERK signaling pathway. *Scientific reports*. 2016;6:32323.
131. Li XJ, Lee WSS, Ke H.Z., Mori S., Akamine T. Age-Related Changes of Cancellous and Cortical Bone Histomorphometry in Female Sprague-Dawley Rats. *Scanning microscopy international/Cells and Materials*. 1991;1.
132. Lieberman JR. *Bone regeneration and repair. Biology and clinical applications*. Totowa N.J.: Humana, 2005.

-
- 133.Lin L, Chow KL, Leng Y. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2009;89:326–335.
- 134.LJUSBERG J, Wang Y, Lång P, et al. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:28370–28381.
- 135.Lloyd SAJ, Yuan YY, Kostenuik PJ, et al. Soluble RANKL induces high bone turnover and decreases bone volume, density, and strength in mice. *Calcified Tissue International*. 2008;82:361–372.
- 136.Lojda Z, Gossrau R, Schiebler TH. *Enzymhistochemische Methoden*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg, 1976.
- 137.Lorente-Ramos R, Azpeitia-Armán J, Muñoz-Hernández A, García-Gómez JM, Díez-Martínez P, Grande-Bárez M. Dual-energy x-ray absorptiometry in the diagnosis of osteoporosis. A practical guide. *AJR. American journal of roentgenology*. 2011;196:897–904.
- 138.Lu HB, Campbell CT, Graham DJ, Ratner BD. Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS. *Analytical chemistry*. 2000;72:2886–2894.
- 139.Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 5th ed. Stuttgart: Thieme, 2015.
- 140.Lye KW, Tideman H, Wolke JCG, Merckx MAW, Chin FKC, Jansen JA. Biocompatibility and bone formation with porous modified PMMA in normal and irradiated mandibular tissue. *Clinical oral implants research*. 2013;24:100–109.
- 141.Malmberg P, Bexell U, Eriksson C, Nygren H, Richter K. Analysis of bone minerals by time-of-flight secondary ion mass spectrometry: a comparative study using monoatomic and cluster ions sources. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2007;21:745–749.
- 142.Maria Mulisch UW. *Mikroskopische Technik*. 19th ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2015.
- 143.Marianne Toft Vestermark. Strontium in the Bone-Implant Interface. PhD Thesis. *DANISH MEDICAL BULLETIN*. 2011;58:1–30.
- 144.Marie PJ. The calcium-sensing receptor in bone cells. A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone*. 2010;46:571–576.
- 145.Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42:551–555.
- 146.Matassi F. New biomaterials for bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2011;8:21–24.
- 147.Mazess RB, Barden HS, Bisek JP, Hanson J. Dual-energy x-ray absorptiometry for total-body and regional bone-mineral and soft-tissue composition. *The American journal of clinical nutrition*. 1990;51:1106–1112.
- 148.McGadey J. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie*. 1970;23:180–184.
- 149.Messora MR, Nagata MJH, Dornelles RCM, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *Journal of periodontal research*. 2008;43:723–729.

150. Meunier Pierre J., Roux Christian, Seeman Ego, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis*. *Obstetrics & Gynecology*. 2004;103:992.
151. Meyers MA, Chen P-Y, Lin AY-M, Seki Y. Biological materials. Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*. 2008;53:1–206.
152. Millán JL. Alkaline Phosphatases. Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic signalling*. 2006;2:335–341.
153. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified Tissue International*. 1982;34:285–290.
154. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J. Surg*. 2001;71:354–361.
155. Mullender MG, van der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*. 1996;18:109–113.
156. Nagata MJ, Furlaneto FA, Moretti AJ, et al. Bone healing in critical-size defects treated with new bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2010;95:269–275.
157. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand. Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275:768–775.
158. Neves N, Campos BB, Almeida IF, et al. Strontium-rich injectable hybrid system for bone regeneration. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2016;59:818–827.
159. Ni GX, Chiu KY, Lu WW, et al. Strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement in revision hip arthroplasty. *Biomaterials*. 2006;27:4348–4355.
160. Ni GX, Lu WW, Xu B, et al. Interfacial behaviour of strontium-containing hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone. *Biomaterials*. 2006;27:5127–5133.
161. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*. 7th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2014.
162. Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, et al. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone*. 2000;27:575–584.
163. Okazaki M, Hirata I, Matsumoto T, Takahashi J. Advantages of TOF-SIMS analysis of hydroxyapatite and fluorapatite in comparison with XRD, HR-TEM and FT-IR. *Dental materials journal*. 2005;24:508–514.
164. O'Keefe JH, Bergman N, Carrera-Bastos P, Fontes-Villalba M, DiNicolantonio JJ, Cordain L. Nutritional strategies for skeletal and cardiovascular health. Hard bones, soft arteries, rather than vice versa. *Open heart*. 2016;3:e000325.
165. Olah AJ, Simon A, Gaudy M, Herrmann W, Schenk RK. Differential Staining of Calcified Tissues in Plastic Embedded Microtome Sections by A Modification of Movat's Pentachrome Stain. *Stain Technology*. 2009;52:331–337.
166. Oliveira, deC SA, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, JR, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2015;44:649–655.

-
- 167.Orimo H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch*. 2010;77:4–12.
- 168.Oryan A, Alidadi S, Bigham-Sadegh A, Moshiri A. Comparative study on the role of gelatin, chitosan and their combination as tissue engineered scaffolds on healing and regeneration of critical sized bone defects: an in vivo study. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2016;27:155.
- 169.Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2014;9:18.
- 170.Paolo Fedi. Isolation and Biochemical Characterization of the Human Dkk-1 Homologue, a Novel Inhibitor of Mammalian Wnt Signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:19465–19472.
- 171.Paulo MJ, Santos MA, Cimatti B, Gava NF, Riberto M, Engel EE. Osteointegration of porous absorbable bone substitutes. A systematic review of the literature. *Clinics*. 2017;72:449–453.
- 172.Pearson RG, Clement RGE, Edwards KL, Scammell BE. Do smokers have greater risk of delayed and non-union after fracture, osteotomy and arthrodesis? A systematic review with meta-analysis. *BMJ open*. 2016;6:e010303.
- 173.Peng S, Liu XS, Huang S, et al. The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment. Involvement of osteoprotegerin. *Bone*. 2011;49:1290–1298.
- 174.Penney DP, Powers JM, Frank M, Willis C, Churukian C. Analysis and testing of biological stains-- The Biological Stain Commission Procedures. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 2009;77:237–275.
- 175.Petite H, Viateau V, Bensaïd W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature biotechnology*. 2000;18:959–963.
- 176.Plowman SA, Smith DL. *Exercise Physiology. For health, fitness, and performance*. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2014.
- 177.Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *BioMed research international*. 2014;2014:348635.
- 178.Prof Ian R Reid MD, Mark J Bolland PhD, Andrew Grey MD. Effects of vitamin D supplements on bone mineral density:. a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2013;383:146–155.
- 179.Professor Kanis, J.A. et al. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group.;1994.
- 180.Pschyrembel W. *Pschyrembel. klinisches Wörterbuch*. 261st ed. Berlin: Walter de Gruyter, 2007.
- 181.Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118:3820–3828.
- 182.Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285:25103–25108.
- 183.Rattner A, Sabido O, Le J, et al. Mineralization and Alkaline Phosphatase Activity in Collagen Lattices Populated by Human Osteoblasts. *Calcified Tissue International*. 2000;66:35–42.

184. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87:4473–4475.
185. Rentsch C, Schneiders W, Manthey S, Rentsch B, Rammelt S. Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomatter*. 2014;4:e27993-1 -e27993-11.
186. Richter K. *Application of imaging TOF-SIMS in cell and tissue research*. Schweden, 2007.
187. Rochefort GY. The osteocyte as a therapeutic target in the treatment of osteoporosis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2014;6:79–91.
188. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte. The unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010;21:1457–1469.
189. Rohnke M, Henss A, Kokesch-Himmelreich J, et al. Mass spectrometric monitoring of Sr-enriched bone cements--from in vitro to in vivo. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013;405:8769–8780.
190. Rolvien T, Barbeck M, Wenisch S, Amling M, Krause M. Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. *International journal of molecular sciences*. 2018;19.
191. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, et al. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *The New England journal of medicine*. 2017;377:1417–1427.
192. Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling. Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacology & therapeutics*. 2012;136:216–226.
193. Sanan A, Haines S. Repairing Holes in the Head. A History of Cranioplasty. *Neurosurgery*. 1997;40:588–603.
194. Sánchez-Riera L, Carnahan E, Vos T, et al. The global burden attributable to low bone mineral density. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:1635–1645.
195. Schinke T, Schilling AF, Baranowsky A, et al. Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. *Nature medicine*. 2009;15:674–681.
196. Schumacher M, Wagner AS, Kokesch-Himmelreich J, et al. Strontium substitution in apatitic CaP cements effectively attenuates osteoclastic resorption but does not inhibit osteoclastogenesis. *Acta biomaterialia*. 2016;37:184–194.
197. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase. An overview. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2014;29:269–278.
198. Shlomo Melmed, P. Michael Conn. *Endocrinology. Basic and Clinical Principles*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005.
199. Sian Djien Tan. *Osteocyte Apoptosis and Bone Adaption. Dissertation*. Amsterdam: Print Partners Ipskamp, 2008.
200. Simon Turner A. Animal models of osteoporosis - necessity and limitations. *eCM*. 2001;1:66–81.
201. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption. A multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEY reports*. 2014;3:481.
202. Sjövall P, Johansson B, Belazi D, et al. TOF-SIMS analysis of adipose tissue from patients with chronic kidney disease. *Applied Surface Science*. 2008;255:1177–1180.

-
203. Skripitz R, Kurth A, Roth A. Medikamentöse Verbesserung der Implantateinheilung. *Der Orthopäde*. 2015;44:703–709.
204. Sodhi RNS. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS):--versatility in chemical and imaging surface analysis. *The Analyst*. 2004;129:483–487.
205. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*. 2012;7:1918–1929.
206. Sriranganathan D, Kanwal N, Hing KA, Hill RG. Strontium substituted bioactive glasses for tissue engineered scaffolds. The importance of octacalcium phosphate. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2016;27:39.
207. Takahashi N, Udagawa N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKEy reports*. 2014;3:495.
208. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews. Genetics*. 2003;4:638–649.
209. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;142:155–170.
210. The international Society For Clinical Densitometry. *Official Positions 2015. Adult & Pediatric*, 2015.
211. Thormann U, El Khawassna T, Ray S, et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury*. 2014;45:487–493.
212. Thormann U, Ray S, Sommer U, et al. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*. 2013;34:8589–8598.
213. Torzewski M. Die Movat-Pentachromfärbung – eine farbenprächtige Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten. *MK*. 2015;2:204–208.
214. U. Suzuki KY, M. Takaishi. Ueber ein Enzym "Phytase", das "Anhydro-oxy-methylen-diphosphorsäure" spaltet. *The bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University*. 1907.
215. van der Stok J, Hartholt KA, Schoenmakers DAL, Arts JJC. The available evidence on demineralised bone matrix in trauma and orthopaedic surgery: A systematic review. *Bone & joint research*. 2017;6:423–432.
216. van Vaeck L, Adriaens A, Gijbels R. Static secondary ion mass spectrometry (S-SIMS) Part 1: methodology and structural interpretation. 1999.
217. Vickerman JC. *Surface analysis. The principal techniques*. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2000.
218. Volker Schumpelick, Niels M. Bleese, Ulrich Mommsen. *Chirurgie*. 5th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2000.
219. Vos T, Barber RM, Bell B, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;386:743–800.
220. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, et al. Osteoimmunology. Interplay between the immune system and bone metabolism. *Annual review of immunology*. 2006;24:33–63.

-
221. Wang C-L, Tang X-Y, Chen W-Q, Su Y-X, Zhang C-X, Chen Y-M. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women. A meta-analysis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2007;18:295–305.
222. Wang D, Poologasundarampillai G, van den Bergh W, et al. Strategies for the chemical analysis of highly porous bone scaffolds using secondary ion mass spectrometry. *Biomedical materials (Bristol, England)*. 2014;9:15013.
223. Wenisch S, Stahl J-P, Horas U, et al. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts. Fine structural microscopy. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2003;67:713–718.
224. wikipedia.org. Movat's stain; Zugriff vom 18.02.2018, 16:40 Uhr.
225. William Lau KH, David J Baylink. Osteoblastic Tartrate-Resistant Acid Phosphatase:. Its Potential Role in the Molecular Mechanism of Osteogenic Action of Fluoride. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. 2003;18:1897–1900.
226. Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*. 2005;26:4817–4827.
227. Winslow MM, Pan M, Starbuck M, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Developmental cell*. 2006;10:771–782.
228. Wirtz C, Abbassi F, Evangelopoulos DS, Kohl S, Siebenrock KA, Krüger A. High failure rate of trochanteric fracture osteosynthesis with proximal femoral locking compression plate. *Injury*. 2013;44:751–756.
229. Xiong J, Piemontese M, Onal M, et al. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS one*. 2015;10:e0138189.
230. Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2011;29:981–991.
231. Yao C-H, Liu B-S, Hsu S-H, Chen Y-S. Calvarial bone response to a tricalcium phosphate-genipin crosslinked gelatin composite. *Biomaterials*. 2005;26:3065–3074.
232. Zhang Y, Wei L, Chang J, et al. Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating in vitro proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and in vivo regeneration of osteoporotic bone defects. *J. Mater. Chem. B*. 2013;1:5711.
233. Zhao C, Irie N, Takada Y, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell metabolism*. 2006;4:111–121.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

1. Tab.2.1-a:	Risikofaktoren, welche ein erhöhtes Auftreten der Osteoporose begünstigen.....	4
2. Tab.2.1-b:	Basisdiagnostik, zur Abklärung bei dem Verdacht auf Osteoporose	5
3. Tab.2.1-c:	T-Wert Standarabweichungen, zur Beurteilung des Osteoporosegrades	8
4. Tab.2.5-a:	Eigenschaften von KEM und Produktbeispiele.....	38
5. Tab.2.5-b:	Gruppen von KEM	39
6. Tab.3.2-a:	Überischt aller KEM im SFB TRR79, inklusive der hier untersuchten KEM.....	50
7. Tab.3.5-a:	Alkoholreihe für Technovit©-Einbettung	60
8. Tab.3.5-b:	Komponenten für Technovit©	61
9. Tab.3.5-c:	Infiltrationslösungen für Technovit©-Einbettung.....	61
10. Tab.3.5-d:	Chemikalien für die Einbettung mit Technovit© 9100	62
11. Tab.3.5-e:	Stammlösungen für die Polymerisation von Technovit©	63
12. Tab.3.6-a:	Movat-Reagenzien	66
13. Tab.3.6-b:	Anleitung zur Vorbereitung der Lösungen (Movat).....	67
14. Tab.3.6-c:	Movat-Farbgebung.....	67
15. Tab.3.6-d:	Reagenzien (inkl. Lieferanten) der von Kossa/van Gieson Färbung....	69
16. Tab.3.6-e:	Anleitung für die Vorbereitung der Lösungen (vKvG).....	70
17. Tab.3.6-f:	von Kossa/van Gieson-Farbgebung.....	70
18. Tab.3.7-a:	Reagenzien für den Enzymnachweis der TRAP	72
19. Tab.3.7-b:	Reagenzien für den Enzymnachweis der TNAP	75
20. Tab.3.7-c:	Schritte zur Vorbereitung der Lösungen	75
21. Tab.3.9-a:	TOF-SIMS Versuchsparmeter	78
22. Tab.4.1-a:	Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt und PPGC+S 5:5 ^{III}	82
20. Tab.4.1-b:	Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt und PPGC+S 3:7 ^{III}	82
21. Tab.4.1-c:	Anteil intakter Platten zwischen PPGC+S 5:5 ^{III} und PPGC+S 3:7 ^{III}	83

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Knochenzelllinie von der multipotenten hämatopoietischen Stammzelle, bzw. mesenchymaler Stammzelle zum Osteozyten bzw. Osteoblasten (Eigenentwurf; mit SMART ART von Servier erstellt).....	19
Abbildung 2:	Stadien der sekundären Frakturheilung zuerst erfolgt die Bildung von Hämatomgewebe, gefolgt von der Bildung des weichen Kallus, im Anschluss die Bildung eines harten Kallus, danach das Remodeling (Eigenentwurf; ebenfalls mit SMART ART von Servier)	25
Abbildung 3:	TOF-SIMS Schemazeichnung (Eigenentwurf; mit Corel Draw).....	41
Abbildung 4:	Strontium-Signalkaskade an der Zellmembran und im Zytosol des Osteoblasten (Eigenentwurf; mit SMART ART von Servier).....	46
Abbildung 5:	Wirkung von Strontium auf Osteoblasten bzw. Osteoklasten (Eigenentwurf; mit SMART ART von Servier)	48
Abbildung 6:	Zum Vergleich liegen der entnommene knöcherne Keil aus dem CSD (schwarzer Pfeil) und d.Material PPGC+S (weißer Pf.) aneinander.....	53
Abbildung 7:	Bilaterale Ovariectomie an einer ovariectomierten Ratte, der Elektrokauter trennt die Ovarien ab (Pfeil zeigt auf eines der beiden Ovarien)	55
Abbildung 8:	(a): Setzen des keilförmigen Defekts (CSD) mittels oszillierender Säge (Pfeil nach links); (b): keilförmiges KEM PPGC+S ^{III} 3:7 zur Defektfüllung; PPGC+S ^{III} 5:5 sieht makroskopisch identisch aus; (c): Einbringen der Schrauben in die T-Miniplatte im Rattenfemur; (d): CSD ist mit PPGC+S gefüllt (Pfeil zeigt auf KEM Keil)	58
Abbildung 9:	Entnommener Rattenfemur mit Material PPGC+S ^{III} , (a) aus Subgruppe 2, (b) Subgruppe 3, Pfeile zeigen auf den ehemaligen CSD, Lage anatomisch korrekt & identisch, siehe Schraubenverlauf	59

Abbildung 10:	Block des eingebetteten Knochens der Subgruppe 2 im Mikrotom mit Kawamoto-Folie (Pfeil zeigt auf nicht klebenden goldenen Teil der Folie).....	64
Abbildung 11:	TOF-SIMS 5-100 im Gießener Labor der Physikalischen Chemie	77
Abbildung 12:	Stage mit aufgebrauchten Objektträgern der Subgruppen 2 und 3, bereit für die Analyse im TOF-SIMS.....	78
Abbildung 13:	Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt (Sub 1) und PPGC+S 5:5 ^{III} (Sub 2) (* gibt das Signifikanzniveau (*) $p < 0,05$ an).....	82
Abbildung 14:	Anteil intakter Platten zwischen Leerdefekt (Sub 1) und PPGC+S 3:7 ^{III} (Sub3) (keine Signifikanz, ns)	82
Abbildung 15:	Anteil intakter Platten zwischen PPGC+S 5:5 ^{III} (Sub 2) & PPGC+S 3:7 ^{III} (Sub 3) (* gibt das Signifikanzniveau (*) $p < 0,05$ an).....	83
Abbildung 16:	Knochenbildungsrate in den drei untersuchten Gruppen	85
Abbildung 17:	Übersicht über den distalen Femur (Movat Färbung) von Sub1, 2 und 3. 5-fach vergrößert, die Symbole bedeuten: (K) (Lager-)Knochen, (Kno) Knorpelgewebe, (S) Schraube, (*) Materialreste, (→) neugebildeter Knochen in der ROI (Region of interest). A) Sub1, B)Sub2, C)Sub3	86
Abbildung 18:	Movat Detailaufnahmen, 20-fach vergrößert, 500µm Skala im rechten unteren Bildrand. Die Symbole bedeuten: (*) neugebildeter Knochen, (→) hypertrophe Chondrozyten in der Mineralisationszone des neugebildeten Knochens	86
Abbildung 19:	Unmineralisiertes Gewebe in den drei Gruppen	87
Abbildung 20:	von Kossa/van Gieson Färbung, 5-fach vergrößert, A) Sub1, B) Sub2, C) Sub3	88
Abbildung 21:	Detailaufnahmen von Kossa/van Gieson Färbung, 20-fach vergrößert, 500µm im rechten unteren Bildrand	88
Abbildung 22:	TRAP-positive Zellen in Verhältnis zur Trabekelfläche	89

Abbildung 23:	TRAP Färbung, 5-fach vergrößert, 1mm Skala im rechten Unterrand des Bildes, A) Sub1, B) Sub2, C) Sub3. Die Symbole bedeuten: (K) Lagerknochen (S) Schraube, (→) TRAP-positive Fläche/Osteoklasten in der ROI (Region of interest). Der Knochenschnitt (a) zeigt die originale ROI in schwarzer Farbe, die zur Histomorphometrie genutzt worden ist.. 90
Abbildung 24:	Detailaufnahme TRAP-Nachweis, 20-fach vergrößert, 500µm Skala im rechten Unterrand. Rote Zellen sind TRAP positiv 89
Abbildung 25:	ALP positive Fläche nach ALP Nachweis ohne Signifikanz..... 91
Abbildung 26:	ALP Nachweis, 5-fach vergrößert. Die Symbole bedeuten: (Sch) Schraube, (*) Materialreste, (→) ALP-positive Fläche/ angefärbte Osteoblasten in der ROI (Region of interest). A) Sub1, B) Sub2, C) Sub3 92
Abbildung 27:	Detailaufnahmen ALP-Nachweis, 20-fach vergrößert, mit 500µm Skala rechts unten im Bild. Blauer Saum bedeutet hier liegen Osteoblasten vor, diese sind ALP positiv 92
Abbildung 28:	Subgruppe 1, (a) Overlay, (b) Hintergrundrauschen des Sr^+ -Signals; (7 counts) 93
Abbildung 29:	Subgruppe 2, (a) Overlay der Counts von Calcium (Ca^+), Prolinfragment ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$) und Strontium (Sr^+), (b) Sr^+ -Signal, in den umgebenden Knochen ist deutlich Strontium diffundiert (Pfeile); (3counts) 94
Abbildung 30:	Subgruppe 3, (a) Overlay der Counts von Calcium (Ca^+), Prolinfragment ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$) und Strontium (Sr^+), (b) deutlicher Strontiumanteil in der Bildmitte und dessen Umgebung, Sr^+ -Signal (Pfeile); (20 counts) 94

8.3 Beiträge zu Postern

1.) Posterbeitrag vom Autor selber, für die DGBM Tagung 2017 Würzburg:

-Detection of Strontium release from two new composite bone graft substitute materials with differing amounts of strontium

Döhner N.^{1,2}, Kern C.¹, Ray S.², Thormann U.², Alt V.², Kruppke B.³, Hanke T.³, Rohnke M.¹, Janek J.¹

¹Justus-Liebig-University of Giessen, Institute for Physical Chemistry, Gießen, Deutschland

²Justus-Liebig-University of Giessen, Laboratory of Experimental Trauma Surgery, Gießen, Deutschland

³Technische Universität Dresden, Max Bergmann Center of biomaterials Dresden, Dresden, Deutschland

2.) Posterbeitrag von Christine Kern für die TOF-SIMS Konferenz 2017

in Krakau:

-Strontium Detection in Bone Sections via ToF-SIMS

Christine Kern¹, Marcus Rohnke¹, **Nils Döhner**^{1,2}, Seemun Ray², Volker Alt², Jürgen Janek¹

(1) *Institute for Physical Chemistry, Justus-Liebig-University of Giessen, Germany*

(2) *Laboratory of Experimental Trauma Surgery, Justus-Liebig-University of Giessen, Germany*

8.4 Abkürzungsverzeichnis

AGEs	advanced glycation endproducts
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
Bi₃⁺	Bismut-Cluster
BMD	bone mineral density
BMScs	Bone marrow derived stromal cells
BMU	basic multicellular unit
BP	Bisphosphonat; BP-NOJ : Bisphosphonat assoziierte Kiefernekrose
BRC	bone remodeling compartment
BSM	bone substitute material
CaSR	Calcium sensing receptor
CD	Cluster of differentiation; Protein Oberflächenmarker
CFU	colony forming unit; koloniebildende Einheit
COPD	Chronisch obstruktive Lungenkrankheit
CSD	critical sized defect; Defekt kritischer Größe
DEXA	Dual X-ray absorptiometry
DKK-1	Dickkopf-1
DLX5	distal-less homebox 5
DMP-1	Dentin-Matrixprotein
DSPP	Dentin Sialoprotein
Endokrin	von den (Hormon-) Drüsen her
eV	Elektronenvolt
ERK1/2	Extracellular-signal regulated kinase
FACIT	Fibrillen assoziiertes Kollagen mit unterbrochener Tripelhelix
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor; FGF-23 Fibroblastenwachstumsfaktor 23
FSD	funktionelle sekretorische Domäne
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
hereditär	vererblich
hMSCs	humane mesenchymale Stromazellen
HR-TEM	hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie
IGF-1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IL	Interleukin
K⁺	Kalium

KEM	Knochenersatzmaterial
LEF	lymphoid enhancing factor
LMIG	Liquid metal ion gun
MAPK	mitogen-activated protein kinase-Weg
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MEPE	matrix extracellular phosphoglycoprotein
MMP-9	matrixmetalloprotein 9
Na⁺	Natrium
NO	Stickstoffmonoxid
OCN	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
Osteoid	unmineralisiertes Knochengewebe
OSX	osterix, Transkriptionsfaktor
OVX	Ovarektomie; Entnahme der Eierstöcke
PBM	peak bone mass; Zeitpunkt der maximalen Knochendichte
PCA	principal component analysis
PDGF	Platelet derived Growth factor; Wachstumsfaktor der Blutplättchen
PGE₂	Prostaglandin E ₂ ; Entzündungsvermittelnde körpereigene Substanz
PTH	Parathormon; rhPTH rekombinantes humanes PTH (Teriparatid©)
µCT	quantitative Computertomographie
RANKL	Rezeptoraktivator des nukleären Faktors kappa beta Ligand
RGD	Aminosäuresequenz aus Argining-Glycin-Asparagin
ROI	Region of interest; untersuchte Fläche
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SCI	Sclerostin
SD	Standardabweichung
SERM	selektiver Östrogenrezeptor Modulator
SLRP	small leucin rich protein
SMAD	Proteine der Signalübertragung der TGF-β-Rezeptoren, Zellentwicklung und Wachstum
TCF	T-Zell-Faktoren
TGF-β	transforming growth factor beta; ein Zytokin

TNAP	gewebeunspezifische alkalische Phosphatase
TOF-SIMS	Flugzeit Sekundärionen Massenspektrometrie
TRAP	tartrate-resitant acid phosphatase
TRPV6	Calciumkanal der Enterozyten im Darm
VEGF	vascular endothelial growth factor
VDR	Vitamin-D Rezeptor
Wnt	Wingless related integration site-Signalweg
YLD	years lived with disability
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy; Röntgenphotoeltronenspektroskopie
XRD	X-ray diffraction; Kristallstrukturanal

9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Professor Dr. med. Dr. biol. hom. Volker Alt für die Überlassung des Themas, und die Möglichkeit unter besten Voraussetzungen geforscht haben zu können. Ohne den Einsatz und die Hilfe der Mitarbeiter aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie um Frau Professor Dr. Lips und der Arbeitsgemeinschaft von Herrn Professor Dr. Janek, wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt stehe. Mein Dank gilt insbesondere Dr. Marcus Rohnke und Dr. Seemun Ray, meinen beiden Betreuern, welche mir immer mit Rat und Tat bei Seite standen und mir die Welt der Wissenschaft offenlegten. Dr. Seemun Ray danke ich für die Unterweisungen in die klassischen Färbemethoden. Dr. Marcus Rohnke danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen als Fachfremder die Gerätschaften im Physikalisch-Chemischen Institut benutzt haben zu dürfen. Dr. Marcus Rohnke ist es zu verdanken, dass ich Teile der Ergebnisse auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 2017 in Form eines Posters und vor der gesamten AG Janek, in Form einer Präsentation, vorstellen durfte. Ebenso wurde ich durch Dr. Rohnke und das Teilprojekt T2 zu drei Treffen des Sonderforschungsbereiches Transregio 79 mitgenommen, und bekam so tiefe Einblicke in die Organisation und Hintergründe der Wissenschaft. Das bereichert meine Erfahrung enorm.

Allen Mitdoktoranden danke ich für die erlebte Kurzweil, und die fruchttragende Zusammenarbeit. Vor allem danke ich Lucretia Franz-Forsthoffer und Christine Kern für gute gemeinsame Arbeit. Frau Dr. Sommer und Ida Oberst aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie bin ich für ihre Geduld, Zuspruch und Hingabe dankbar, was es mir ermöglichte rasch mit der Arbeit voranzukommen. Dies war mir stets eine große Hilfe. Dem native speaker Kevin Krieger gilt Dank für die Anmerkung zur Summary.

PD Dr. Ulrich Thormann und Dr. Matthäus Budak danke ich für die Erläuterungen während der Tieroperationen und darum herum. Herrn Dr. Benjamin Kruppke danke ich für die Bereitstellung des Knochenersatzmaterials und die Anmerkungen zur Beschreibung seines Materials.

Ohne die Unterstützung meiner engen Freunde und vor allem meiner Familie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt in besonderer Weise meiner lieben Partnerin, die meine große Hingabe für die Arbeit auffing.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde in der Druckversion aus Datenschutzgründen entfernt.