

**Effekte von bioaktivem Glas in einem Strontium-haltigen
Calciumphosphat-Pastenzement in einem metaphysären
Frakturdefekt kritischer Größe bei ovariectomierten Ratten**

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

vorgelegt von Inga Swantje Christin Kramer
aus Köln

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Experimentellen Unfallchirurgie
der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: PD Dr. med. Ulrich Thormann

Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Wöstmann

Tag der Disputation: 30.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Knochen	1
1.1.1. Bone remodeling	1
1.1.2. Frakturheilung	2
1.2. Osteoporose und Osteopenie	4
1.2.1. Ätiologie	4
1.2.2. Epidemiologie	5
1.2.3. Medikamentöse Therapie der postmenopausalen Osteoporose	6
1.3. Osteoporosebedingte Frakturen	8
1.4. Osteoporotisches Frakturmodell der Ratte	9
1.5. Knochenersatzmaterialien	11
1.5.1. Calciumphosphat-Zemente	12
1.5.2. Strontium-modifizierte Calciumphosphat-Zemente	13
1.5.3. Calciumphosphat-Pastenzemente	13
1.5.4. Bioaktives Glas	14
1.6. Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Verwendete Knochenersatzmaterialien	16
2.2. Studiendesign und Tierversuchsgenehmigung	17
2.3. Studiendurchführung	17
2.4. Knochendichtemessung mittels DXA-Gerät	18
2.5. Versuchstiere	19
2.6. Operative Eingriffe	19
2.6.1. Ovariectomie	19
2.6.2. Postoperative Versorgung	20
2.6.3. Osteotomie des proximalen Femurs	20

2.6.4.	Euthanasie der Tiere und Gewinnung der Proben	22
2.7.	Einbettung der Proben in Technovit® 9100	23
2.8.	Vorbereitung der Knochengewebeprobe	24
2.9.	Histologische Standardfärbungen.....	24
2.9.1.	Movat-Pentachrom-Färbung.....	24
2.9.2.	Von Kossa-van Gieson-Färbung.....	25
2.10.	Enzymhistochemische Nachweise	26
2.10.1.	Tartrat-resistente saure Phosphatase	26
2.10.2.	Alkalische Phosphatase	27
2.11.	Immunhistochemische Nachweise	28
2.12.	Histomorphometrische Auswertung.....	32
2.13.	Statistische Auswertung.....	34
3.	Ergebnisse.....	35
3.1.	Probenumfang	35
3.2.	Handhabung der Knochenersatzmaterialien intraoperativ	35
3.3.	Histologische und histochemische Beobachtungen.....	36
3.3.1.	Deskriptive Histologie anhand der Movat-Pentachrom-Färbung	36
3.3.2.	Histomorphometrische Auswertung der Knochenneubildung.....	42
3.3.3.	Osteoidbildung.....	43
3.3.4.	Marker des Knochenaufbaus	45
3.3.5.	Marker des Knochenabbaus.....	48
3.3.6.	Angiogenese.....	54
3.3.7.	Marker der extrazellulären Matrix	55
3.3.8.	RANKL/OPG-System	57
4.	Diskussion	61
4.1.	Frakturmodell und Methodik	62
4.2.	Einordnung der Ergebnisse in Hinblick auf die Strontium-Wirkung <i>in vivo</i>	63

4.3. Stimulation von Osteogenese und Biodegradation durch MBG	66
4.4. Klinische Aspekte der Strontium-substituierten Calciumphosphat-Pastenzemente.....	71
4.5. Schlussfolgerung	73
5. Zusammenfassung.....	74
6. Summary.....	75
7. Abkürzungsverzeichnis	76
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	78
9. Literaturverzeichnis	82
10. Posterbeitrag	95
11. Ehrenwörtliche Erklärung	96
12. Danksagung	97
13. Lebenslauf	98

1. Einleitung

1.1. Knochen

Knochengewebe setzt sich zusammen aus organischen Bestandteilen (30 %) und einem anorganischen Anteil (70 %). Die organische Knochensubstanz besteht zum größten Teil aus Kollagen Typ I (95 %) und nichtkollagenen Proteinen wie Osteocalcin und Knochenproteoglykan. Die anorganische Knochenmatrix stellt eine Mineralphase dar, die zu 95 Gew.-% aus Knochen-Hydroxylapatit besteht (Felsenberg 2001). Diese Substanz entspricht nicht der hydratisierten Calciumphosphat-Keramik Hydroxylapatit, sondern ist Carbonat-haltig und ergänzt mit Fremdionen wie Magnesium und Natrium (Hing 2004). Neben seiner Funktion als Stützgewebe ist das Knochengewebe das wichtigste Mineraldepot für Calcium und Phosphat (Felsenberg 2001).

1.1.1. Bone remodeling

Das Knochengewebe unterliegt einem ständigen Zusammenspiel von Knochenabbau und Knochenaufbau, dem sogenannten *bone remodeling*. *Bone remodeling* dient dem Erhalt der Knochenmasse und Mineralhomöostase sowie der Anpassung an unterschiedliche mechanische Belastung und der Reparatur von Mikrofrakturen (Lerner 2006). Mineralisierte Knochenmatrix wird durch Osteoklasten abgebaut, während Knochenmatrix-synthetisierende Osteoblasten auf der Knochenoberfläche Osteoid, also mineralisierbare Knochenmatrix, auflagern, das anschließend mineralisiert wird. Osteoklasten und Osteoblasten mit ihren entsprechenden Vorläuferzellen bilden zusammen mit Osteozyten *basic multicellular units*, die durch organisierte Interaktionen untereinander das *bone remodeling* gestalten (Curtis et al. 2016).

Initial erfolgt die Aktivierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen durch die Vorläufer der Osteoblasten. Die Osteoklasten-Vorläuferzellen werden rekrutiert, um sich auf der Knochenoberfläche als mehrkernige Präosteoklasten zu organisieren. Als ausgereifte Osteoklasten binden sie an die Knochenoberfläche um diese durch Resorption abzubauen (Clarke 2008).

Osteoblasten exprimieren Zytokine wie Osteoprotegerin (OPG), *receptor for activation of nuclear factor κ B Ligand* (RANKL) und *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) als Mediatoren der Osteoklastogenese. Bindet RANKL an den *receptor for activation of nuclear factor κ B* (RANK) auf Osteoklasten-Vorläuferzellen, wird die

Osteoklastenformation ausgelöst. M-CSF stimuliert ebenfalls die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen und fördert die Expression von RANK (Boyce et al. 2003). OPG fungiert dahingegen als Inhibitor der Interaktion von RANK mit RANKL und verhindert dadurch die Osteoklastogenese (Clarke 2008).

In den durch die Osteoklasten entstandenen Resorptionslakunen binden mononukleäre Zellen, die Reste der organischen Matrix wie Kollagen abbauen. Bei diesem Prozess werden Wachstumshormone aus der extrazellulären Knochenmatrix freigesetzt, die die Rekrutierung und Aktivierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen verursachen (Lerner 2006). Die Vorläuferzellen synthetisieren die neue Knochenmatrix und exprimieren *bone morphogenic proteins* (BMP), die ihre Differenzierung fördern. Im Verlauf differenzieren die Zellen zu reifen Osteoblasten, die Osteoid produzieren. Darauf folgt die Phase der Mineralisation des Osteoids (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al. 2006).

Das physiologische Gleichgewicht von Abbau und Aufbau des Knochengewebes ist bei der Knochenstoffwechselstörung Osteoporose zugunsten eines vermehrten Knochenabbaus verlagert. Dies beruht auf einer verstärkten Osteoklastenaktivität und gleichzeitig verringerter knochenbildender Aktivität. Bei Frauen ist dieser Prozess nach der Menopause aufgrund einer gesteigerten Frequenz des *bone remodeling* beschleunigt (Curtis et al. 2016; Lerner 2006).

1.1.2. Frakturheilung

Knochen heilt nach initialem Trauma entweder durch direkte, intramembranöse Frakturheilung oder indirekte Frakturheilung. Direkte oder auch primäre Knochenheilung erfordert eine anatomisch korrekte Reposition und eine stabile Osteosynthese der Fraktur, so dass die Fraktarenden sich nicht gegeneinander bewegen können. Sind diese Voraussetzungen gegeben, kann sich die Knochenstruktur schnell regenerieren ohne eine Remodellierungsphase zu durchlaufen (Marsell und Einhorn 2011). Aufgrund des Kontakts der Kortikales können Osteoklasten einen Resorptionskanal zum benachbarten Knochenfragment schaffen. In den Kanal dringen Blutgefäße und Osteoprogenitorzellen vor, die sich zu Osteoblasten differenzieren und den Resorptionskanal mit Knochenmatrix auffüllen (Einhorn 1998).

Besteht jedoch eine mechanische Instabilität, erfolgt die indirekte oder sekundäre Frakturheilung. Sie tritt oft bei konservativer Frakturbehandlung, sowie operativen Versorgungsmethoden wie intramedullärer Marknagelung und Behandlung mittels Fixateur externe auf.

Bei diesen Behandlungsformen kommt es über eine Kallusformation zu einer schrittweisen Konsolidierung der Fraktur (Perren 2002). Die indirekte Frakturheilung ist eine Kombination aus enchondraler und intramembranöser Knochenheilung (Einhorn 1998).

Nach der Kontinuitätsunterbrechung eines diaphysären Knochens durch ein Trauma bildet sich im Frakturspalt ein Hämatom aus peripherem und intramedullärem Blut (Marsell und Einhorn 2011). Die Verletzung von Blutgefäßen und dem umliegenden Gewebe führt zur Initiation einer Inflammation mit Freisetzung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen. Rekrutiert werden hierdurch in das Frakturhämatom unter anderem neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Makrophagen phagozytieren im Verlauf die abgestorbenen Neutrophile und initiieren die enchondrale Ossifikation (Claes et al. 2012).

In der *Reparationsphase* beginnt am Periost mit etwas Abstand zum Bruchspalt die intramembranöse Ossifikation und es wird ein periostaler, harter Kallus aus Geflechtknochen gebildet (Marsell und Einhorn 2011). Das Frakturhämatom wird schrittweise durch ein zellreiches Granulationsgewebe ersetzt (Claes et al. 2012). Mit einwachsenden Blutgefäßen migrieren mesenchymale osteochondrale Vorläuferzellen in den Frakturspalt, um sich dort zu Chondroblasten zu differenzieren und als Chondrozyten zu proliferieren (Barnes et al. 1999; Dimitriou et al. 2005).

Zwischen den Frakturrenden erfolgt intraosseal die enchondrale Ossifikation mit Bildung von Knorpelmatrix durch die Chondrozyten, sodass ein weicher Kallus geformt wird. Mit ausreichender mechanischer Stabilität der Fraktur hypertrophieren Chondrozyten des weichen Kallus nahe dem Geflechtknochen des harten Kallus und die extrazelluläre Matrix mineralisiert. Die mineralisierte Matrix wird ersetzt durch von Osteoblasten gebildeten Geflechtknochen (Barnes et al. 1999). Geflechtknochen bietet bereits biomechanische Stabilität, er erfüllt jedoch aufgrund einer irregulären Anordnung von Kollagenfasern nicht die biomechanischen Eigenschaften von normalem Knochengewebe. Deshalb erfolgt in der letzten Phase der Knochenheilung, der Remodellierungsphase, der Umbau des harten Kallus durch *bone remodeling* zu Lamellenknochen (Marsell und Einhorn 2011). Dieser zeichnet sich durch eine ausgeprägte Organisation von Kollagenfasern aus (Buckwalter et al. 1996). Hierbei sind eine ausreichende Blutversorgung und genügend mechanische Stabilität entscheidend (Carano und Filvaroff 2003).

Die Knochenheilung von diaphysären Frakturen langer Röhrenknochen ist von der metaphysären Knochenheilung zu unterscheiden. Innerhalb der ersten Tage nach einer Fraktur

sind die Heilungsmuster diaphysärer und metaphysärer Frakturen ähnlich. Im weiteren Verlauf zeigt sich dahingegen bei metaphysären Frakturen eine bedingte oder ausbleibende Formation von periostalem Kallus und endostaler Heilung mit Bildung von Mikrokallus (Stürmer et al. 2010). Auch heilt der Knochen unter erfolgreicher Stabilisierung schneller als in der Diaphyse (Jarry und Uhthoff 1971).

1.2. Osteoporose und Osteopenie

Die Weltgesundheitsorganisation definiert die Osteoporose als eine Erkrankung, die sich durch einen Knochenmasseverlust auszeichnet und bei der es durch eine verschlechterte Mikroarchitektur des Knochengewebes zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit kommt mit folglich erhöhtem Frakturrisiko (World Health Organization (WHO) Study Group 1994).

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine systemische Skeletterkrankung. Klinische Bedeutung gewinnt sie durch das Auftreten von Frakturen und hierdurch bedingte Komplikationen. Klinisch diagnostizieren lässt sich die Osteoporose anhand der Messung der Knochenflächendichte in g/cm^2 mittels *dual X-ray absorptiometry* (DXA). Hierbei wird der Knochenmineralgehalt an Lendenwirbelsäule und/oder proximalem Femur bestimmt (Dachverband Osteologie e.V. 2014).

Die Knochenflächendichte wird angegeben als T-Wert, der definiert wird als die Anzahl an Standardabweichungen vom Mittelwert einer normalverteilten Referenzpopulation gesunder Erwachsener im Alter von 20 bis 29 Jahren. Laut WHO besteht Osteoporose bei einem T-Wert mehr als 2,5 Standardabweichungen unter der Norm, also unter -2,5. Bei einem T-Wert zwischen -1 und -2,5 besteht eine Osteopenie, die Vorstufe der Osteoporose (World Health Organization (WHO) Study Group 1994). Ein pathologischer T-Wert stellt die Indikation zur medikamentösen Therapie dar.

1.2.1. Ätiologie

Unterschieden werden die postmenopausale, senile und idiopathische Osteoporose als primäre Osteoporose von der sekundären Osteoporose.

Altersbedingt sinkt bei Frauen das Leistungsvermögen der Ovarien, wodurch es postmenopausal zu einer reduzierten Ausschüttung des Sexualhormons Östrogen kommt. Östrogen inhibiert den Knochenabbau durch Hemmung der Osteoklastenaktivität, sodass es postmenopausal aufgrund von Östrogenmangel zu einem Knochenmasseverlust des

trabekulären Knochens kommt, der auch als Typ I-Osteoporose bezeichnet wird (Armas und Recker 2012). Durch den erhöhten Knochenabbau wird bei der postmenopausalen Osteoporose auch von einer *high-turnover*-Osteoporose gesprochen (Mehl et al. 2002).

Die senile Osteoporose, auch bekannt als Typ II-Osteoporose, betrifft dahingegen Frauen und Männer ab dem 70. Lebensjahr. Der physiologische Alterungsprozess sorgt in Verbindung mit einer mangelhaften Substitution von Calcium und Vitamin D und einem Mangel an Bewegung für einen allgemeinen Knochenmasseverlust sowohl des trabekulären als auch des kortikalen Knochens (Awasthi et al. 2018). Bei verminderter Zahl an reifen Osteoklasten und Osteoblasten, die ein reduziertes *bone remodeling* bedingen, handelt es sich um eine *low-turnover*-Osteoporose (Mehl et al. 2002).

Die idiopathische Osteoporose, als weitere Form der primären Osteoporose, kann als idiopathische juvenile Osteoporose Kinder zwischen acht und 14 Jahren betreffen und durch eine verminderte Calciumresorption und Hypercalziurie hervorgerufen werden (Awasthi et al. 2018).

Die sekundäre Osteoporose kann durch Änderung des Lebensstils mit z.B. Nikotinabusus oder Immobilisation, genetische Erkrankungen oder endokrine Störungen, wie Hypercortisolismus, Diabetes mellitus oder Hyperparathyreoidismus hervorgerufen werden. Ein weiterer Grund für diese Form des Knochenmasseverlusts ist die Langzeittherapie mit Osteoporose-induzierenden Medikamenten wie Glucocorticoiden, Heparin oder Immunsuppressiva (Sözen et al. 2017).

1.2.2. Epidemiologie

In Deutschland waren 2009 schätzungsweise 6,3 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt. Bei der Mehrheit der Erkrankten handelte es sich mit 5,2 Millionen um Frauen. Im selben Jahr wurde bei einer Inzidenz von 2,1 % von 885000 Neuerkrankungen pro Jahr ausgegangen. In einem Zeitraum von vier Jahren wird mehr als die Hälfte der Erkrankten mindestens eine osteoporosebedingte Fraktur erleiden (Hadji et al. 2013). Das Lebenszeitrisiko für eine osteoporosebedingte Fraktur liegt bei 40 % bis 50 % für Frauen und 13 % bis 22 % für Männer. Am häufigsten treten proximale Femurfrakturen, Wirbelkörperfrakturen und distale Unterarmfrakturen auf (Johnell und Kanis 2005). Eine eingeschränkte Lebensqualität, sowie eine erhöhte Mortalität sind die Folgen osteoporosebedingter Frakturen (Konopka et al. 2009; Jahelka et al. 2009).

Aufgrund des demographischen Wandels der westlichen Nationen, wird die Inzidenz osteoporotischer Frakturen ansteigen. Die Kosten für die Behandlung der Osteoporose und osteoporotischer Frakturen sowie Hospitalisierungen und die Behandlung von Komplikationen können in der Zukunft eine noch größere ökonomische Belastung des Gesundheitssystems darstellen (Johnell und Kanis 2005).

1.2.3. Medikamentöse Therapie der postmenopausalen Osteoporose

Neben einer Basistherapie aus oraler Einnahme von Calcium und Vitamin D sowie ausreichender körperlicher Betätigung, gibt es zur Therapie einer gesicherten postmenopausalen Osteoporose und bei osteoporosebedingten Frakturen noch weitere medikamentöse Therapieansätze (Awasthi et al. 2018). Diese Therapieansätze lassen sich mit anabolen, antiresorptiv-wirkenden Medikamenten und Medikamenten, die beide Funktionen vereinen, realisieren.

Anabole Therapieansätze

Zu den anabolen Arzneimitteln zählen Parathormon-Analoga wie Teriparatid. Sie fördern unter anderem die Proliferation der Vorläuferzellen der Osteoblasten, steigern die Osteoblastenfunktion und damit die Knochenbildung (Hegde et al 2016). In Tiermodellen konnte bestätigt werden, dass die Mineralisation des Frakturkallus durch die Gabe von Parathormon-Analoga nach Fraktur verbessert werden konnte (Andreassen et al. 1999). Auch bei postmenopausalen Frauen konnte eine Verbesserung der Frakturheilung durch eine frühe Kallusformation unter Therapie mit Teriparatid verzeichnet werden (Ohtori et al. 2012).

Antiresorptive Therapieansätze

Antiresorptive Medikamente wirken gezielt auf Faktoren und Signalwege, um die Knochenresorption durch Osteoklasten zu unterdrücken.

Bisphosphonate führen zu einer Hemmung der Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption und reduzieren nachweislich das Auftreten von Frakturen (Russell 2011; Rebolledo et al. 2011). Sie gehören zur gängigen medikamentösen Osteoporosetherapie und reduzieren das Risiko für das Auftreten von Frakturen beim Menschen (Yong und Logan 2021). Der Knochendichtegehalt wie auch das Kallusvolumen bei osteoporotischer Fraktur sind nachweislich im Tiermodell erhöht (Hegde et al. 2016).

Ähnliche Auswirkungen zeigt der rekombinante monoklonale Antikörper Denosumab. Er bewirkt durch die Hemmung der Aktivierung von Osteoklasten durch Osteoblasten eine

Verminderung der Knochenreduktion (Awasthi et al. 2018). In der klinischen FREEDOM-Studie konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Denosumab zu keiner vermehrten verzögerten Knochenheilung bei nicht-vertebralen Frakturen führt und allgemein das Risiko für eine vertebrale wie auch non-vertebrale Fraktur bei Frauen mit Osteoporose reduziert (Adami et al. 2012).

Da die Hormonersatztherapie mit Östrogen in der Langzeittherapie bei postmenopausaler Osteoporose das Risiko für Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinome erhöht, wurden die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) entwickelt. Ein Vertreter der SERM in der Prophylaxe und Therapie der postmenopausalen Osteoporose ist Raloxifen. SERM wirken antiresorptiv und verbessern durch vermehrte Kallusbildung und Mineralisation des Knochens die Frakturheilung bei ovariectomierten Ratten (Hegde et al. 2016). Jedoch besteht bei Einnahme von Raloxifen ein erhöhtes Risiko für Thromboembolien und Thrombosen (Awasthi et al. 2018).

Strontiumranelat

Ein weiteres Arzneimittel in der Behandlung der Osteoporose, das sowohl antiresorptive als auch anabole Eigenschaften vereint, ist Strontiumranelat (Marie 2007).

Durch die Verbindung von zwei Strontium-Ionen mit Ranelinsäure entsteht das Strontiumsalz. Strontium-Ionen ähneln in ihrer Struktur Calciumionen und ersetzen diese in Hydroxylapatitkristallen. Dies führt zu einer verbesserten Mineralisation und erhöhten Knochendichte von heilendem, osteoporotischem Knochen (Awasthi et al. 2018).

Auf zellulärer Ebene kann Strontium, wie auch Calcium, den calciumsensitiven Rezeptor auf Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen aktivieren und so die Osteoblastendifferenzierung positiv beeinflussen (Marie 2007). Gleichzeitig bewirkt die Aktivierung des calciumsensitiven Rezeptors eine Stimulation von Phospholipase C, was wiederum über NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) im Zellkern die Apoptose von reifen Osteoklasten induziert (Hurtel-Lemaire et al. 2009).

Eine weitere antiresorptive Eigenschaft von Strontiumranelat ist die Herunterregulation und Hemmung des RANKL auf Präosteoblasten und Osteoblasten durch die vermehrte Expression von OPG durch osteoblastäre Zellen. Die ausbleibende Stimulation der Osteoklastogenese bei Bindung von OPG an RANKL führt zu einer verminderten Osteoklastenaktivität und hemmt die Knochenresorption (Marie 2007).

Die antiresorptive und gleichzeitig knochenbildende Wirkung konnte anhand von Tiermodellen an ovariectomierten Ratten nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich unter

Therapie mit Strontiumranelat nach Fraktur eine gesteigerte Knochenneubildung und ein größeres Kallusvolumen mit vermehrter trabekulärer Knochenmasse (Marie 2007; Li et al. 2010). Nachweislich konnte das Risiko für das Auftreten von vertebrealen und nicht-vertebralen Frakturen bei postmenopausaler Osteoporose unter Therapie mit Strontiumranelat reduziert werden (Meunier Pierre J. et al. 2004; Reginster et al. 2005).

Es bestand seit der Zulassung von Protelos[®] (Handelsname von Strontiumranelat) 2004 nur eine eingeschränkte Indikation für schwere postmenopausale Osteoporose mit hohem Frakturrisiko, da die systemische Gabe von Strontiumranelat als orales Arzneimittel einige Nebenwirkungen barg. Häufige Nebenwirkungen sind Diarrhoe und Übelkeit, sowie Kopfschmerzen. Zu den schwerwiegenden Nebenwirkungen, die seltener auftreten, zählen kardiovaskuläre Ereignisse, venöse Thromboembolien, Krampfanfälle und das Hypersensitivitätssyndrom DRESS (*drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*) (Tabatabaei-Malazy et al. 2017).

Nach weiterer Einschränkung der Indikation aufgrund der Nebenwirkungen und daraus resultierenden rückläufigen Verordnungen wurde die Produktion 2017 eingestellt (Kasperk und Ziegler 2017).

1.3. Osteoporosebedingte Frakturen

Osteoporotische Veränderungen des Knochens betreffen neben dem kortikalen Knochen der Diaphyse vorwiegend das Trabekelsystem der Metaphyse (Wronski et al. 1985; Peng et al. 1994). Somit treten osteoporosebedingte Frakturen überwiegend in metaphysären Bereichen von langen Röhrenknochen auf, bei denen häufig ein Niedrigasanztrauma ausreicht, um eine Fraktur zu verursachen (Larsson 2002).

Mit einer Abnahme der trabekulären Konnektivität und einer Dickenabnahme der Knochenbälkchen verliert der trabekuläre Knochen an Dichte und Festigkeit (Boivin et al. 2000; Bailey et al. 1999). Im Zusammenspiel mit einer veränderten Mikroarchitektur durch einen reduzierten Mineralgehalt des Knochens steigt das Frakturrisiko (Boskey et al. 2005).

Wie oben erwähnt, differieren die diaphysäre und metaphysäre Knochenheilung in ihrer periostalen Kallusbildung. Auch osteoporotischer Knochen zeigt diese Eigenschaft. Osteoporosebedingte Frakturen der Metaphyse weisen eine geringere Kallusbildung des Periost auf als solche der Diaphyse (Stürmer et al. 2010).

Frakturen bei älteren Patienten und Patienten mit Osteoporose sind häufiger mit orthopädischen Komplikationen und einer verzögerten Wiedererlangung der funktionellen Kompetenz assoziiert (Barrios et al. 1993). Auch wird bei diesen Patienten eine verzögerte Knochenheilung vermutet (Goldhahn et al. 2008). Eine häufige Komplikation von osteoporotischen Frakturen ist die unzureichende Immobilisation mittels operativer Versorgung. Eine suffiziente Fixierung von Osteosynthesematerial ist aufgrund der verminderten Knochenqualität erschwert (Wong et al. 2005). Dies kann mit erheblicher Instabilität der Fraktur ein Versagen des Osteosynthesematerials oder das Auftreten einer Pseudarthrose begünstigen. Die Pseudarthrose bezeichnet das Ausbleiben einer vollständigen knöchernen Durchbauung einer Fraktur innerhalb von 6 Monaten (Kuner et al. 1996).

1.4. Osteoporotisches Frakturmodell der Ratte

Zur Untersuchung und Überprüfung von neuen Ansätzen in der Behandlung der Osteoporose und osteoporotischer Frakturen dienen Tiermodelle zur präklinischen Testung antiosteoporotischer Arzneimittel, Implantate oder Biomaterialien. Da Osteoporose naturgemäß nur beim Menschen und Primaten auftritt, muss sie bei Tieren erst induziert werden. Hierbei gilt die ovariectomierte Ratte als das am häufigsten verwendete Tiermodell (Namkung-Matthai et al. 2001; Kubo et al. 1999; Dorozhkin 2013; Egermann et al. 2005). Durch die Ovariectomie wird eine artifizielle Menopause hervorgerufen und führt bei der Ratte in Kombination mit einer Calcium-armen Diät innerhalb kurzer Zeit zu einem Verlust an Knochenmasse des trabekulären Knochens (Egermann et al. 2005; Namkung-Matthai et al. 2001; Kubo et al. 1999; Turner 2001). Allerdings kann mittels Tiermodellen, wie dem der ovariectomierten Ratte, nur annähernd ein humaner postmenopausaler Zustand erreicht werden (Egermann et al. 2005).

Die hier vorliegende Arbeit verwendet das durch Heiss et al. (2012) beschriebene Tiermodell zur Induktion von Osteoporose bei Sprague Dawley Ratten als standardisiertes Modell. Für die Studie wurden die Knochenflächendichten des Femurs und der Wirbelsäule bei Ratten ohne und mit Ovariectomie nach einem und drei Monaten Standzeit der Tiere bestimmt. Bei den ovariectomierten Tieren zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Senkung der Knochenflächendichte mit T-Werten unter -2,5. Die Etablierung eines gut reproduzierbaren osteoporotischen bzw. osteopenen Rattenmodells bildet die Grundlage zur Untersuchung von Frakturheilung und die Anwendung von Knochenersatzmaterialien für osteoporotischen Knochen *in vivo* (Heiss et al. 2012).

Im Weiteren bedarf es eines geeigneten Frakturmodells, das die Pathophysiologie osteoporotischer Frakturheilung der klinischen Situation beim Menschen nachempfunden. Der Frakturdefekt sollte sich, aufgrund der oben beschriebenen Lokalisation osteoporosebedingter Frakturen, im metaphysären Bereich des Knochens befinden. Dennoch existieren nur wenige Frakturmodelle, bei denen eine metaphysäre Osteotomie im Kleintier durchgeführt wurde. Vereinfachte metaphysäre Frakturmodelle mit einer unvollständigen Kontinuitätsunterbrechung durch partielle Osteotomie oder ein Bohrloch sind ungeeignet, da sie nicht der klinisch relevanten Situation entsprechen (Wong et al. 2018; Tao et al. 2015; McDonald et al. 2012; Bindl et al. 2013). Die Mehrzahl der Frakturmodelle mit kompletter Osteotomie basieren auf einem durch Stürmer et al. entwickelten Tiermodell, bei dem eine beidseitige metaphysäre Tibiaosteotomie und gleichzeitig eine Ovariectomie durchgeführt wurde (Stürmer et al. 2010; Komrakova et al. 2015). Jedoch sollten beidseitige komplette Osteotomien vermieden werden, da dies negative Wirkung auf das Belastungsmuster der Tiere während der Heilungsphase hat (Auer et al. 2007). Auch kann bei diesem Frakturmodell zum Zeitpunkt der Osteotomie nicht von einem osteopenen oder osteoporotischen Knochenstatus gesprochen werden (Cheung et al. 2016). Stürmer et al. (2010) wählten außerdem in ihrer Studie einen kleinen Frakturdefekt von 0,5 mm Größe, der sich eher zur Untersuchung von Prozessen der Frakturheilung oder Effekten von systemisch verabreichten antiosteoporotischen Arzneimitteln eignet (Wong et al. 2018).

Zur Testung von Knochenersatzmaterialien auf ihre Fähigkeit die Frakturheilung von osteoporotischem Knochen zu verbessern bedarf es eines Frakturdefekts, der das Einbringen von Ersatzmaterialien in Form von Knochenzementen oder *Scaffolds* erlaubt und von kritischer Größe ist. Es sollte sich also um einen *critical size defect* handeln, ein Defektspalt mit kritischer Größe, der ohne Intervention nicht heilt (ASTM Standard F2721 2008). Hierzu entwickelte die Arbeitsgruppe um Alt et al. (2013) ein metaphysäres Frakturmodell der ovariectomierten Ratte, auf dem die vorliegende Arbeit basiert. Initial erfolgte die Ovariectomie und nach einer Standzeit der Tiere von zwölf Wochen mit multi-defizitärer Diät wurde im Zuge einer einseitigen distalen Femurosteotomie ein keilförmiger Frakturspaltdefekt mit kritischer Größe gewählt. Ein 3 mm messender Frakturspalt ohne implantiertes Knochenersatzmaterial war nach der Standzeit durchgebaut. Bei einem Frakturspalt von medial 5 mm messend zeigte sich nach sechs Wochen keine adäquate Konsolidierung und es konnte von einem Frakturspalt kritischer Größe gesprochen werden. Mit dem Nachweis einer knöchernen Durchbauung des Frakturspaltdefekts kritischer

Größe unter der Anwendung eines implantierten Ersatzmaterials würde die Verbesserung der Frakturheilung in diesem Modell bestätigt werden (Alt et al. 2013). Das von Alt et al. entwickelte Tiermodell wurde bereits für mehrere Knochenersatzmaterialien zur Verbesserung der Knochenheilung unter osteopenem Knochenstatus getestet (Thormann et al. 2013; Ray et al. 2016; Ray et al. 2018). Jedoch konnte anhand dieser Studien auch gezeigt werden, dass bei der Testung eines Frakturspalts von medial 4 mm ohne Einsatz eines Knochenersatzmaterials eine knöcherne Konsolidierung innerhalb von sechs Wochen ausblieb und somit ebenfalls von einem *critical size defect* gesprochen werden kann (Thormann et al. 2013).

1.5. Knochenersatzmaterialien

Als Goldstandard zum Knochenersatz im klinischen Alltag der Traumatologie und Orthopädie gelten autologe Transplantate (Giannoudis et al. 2005). Dieses patienteneigene Material ist nur begrenzt verfügbar und die Gewinnung des Gewebes z.B. aus dem Beckenkamm birgt Komplikationen (Dimitriou et al. 2011). Mit Allografts von humanen Spendern besteht die Gefahr für das Auftreten einer Immunreaktion oder Übertragung von Krankheiten. Um diese Komplikationen und die Begrenztheit der humanen Materialien zu umgehen, bedarf es der Entwicklung synthetisch hergestellter Knochenersatzmaterialien (Hing 2004). Hierzu zählen biologische oder synthetisch hergestellte Materialien, mit denen knöcherne Defekte rekonstruiert werden können.

Die Biomaterialien sollten über verschiedene Charakteristika wie Biokompatibilität, Osteokonduktivität, Osteoinduktivität, Osseointegration, Resorbierbarkeit und eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Knochengewebe verfügen (Giannoudis et al. 2005).

Zeigt sich ein Biomaterial bei Kontakt mit einem Wirtsgewebe gut verträglich, trotz möglicher leichter Abwehrreaktion, kann von Biokompatibilität gesprochen werden (Williams 1999).

Osteokonduktivität beschreibt die Eigenschaft eines Knochenersatzmaterials die Knochenbildung zu verbessern und auch das Einwachsen von umgebendem Knochengewebe zu fördern (Stevens 2008). Osteoinduktive Bestandteile von Biomaterialien können die Differenzierung von Progenitorzellen zu osteoblastären Zellen und so die Knochenbildung positiv beeinflussen (Hing 2004). Passiert eine Integration des Biomaterials in den umgebenden Knochen, so wird von Osseointegration gesprochen (Stevens 2008).

Lässt sich ein Knochenersatzmaterial durch ein biologisches System schrittweise abbauen, so kann es als resorbierbar bezeichnet werden. Biodegradation bezeichnet in Bezug auf Biomaterialien den Zerfall eines Materials in seine einzelnen Komponenten, reduziert die Komplexität der chemischen Verbindung oder erodiert (LeGeros 1993).

Haben Knochenersatzmaterialien die Fähigkeit durch biologische Interaktion mit ansässigen Zellen das umgebende Gewebe zu regenerieren, kann von bioaktiven Materialien ausgegangen werden (Stevens 2008).

Im Folgenden sollen die Biomaterialien, die Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, näher beleuchtet werden.

1.5.1. Calciumphosphat-Zemente

Calciumphosphat, oder auch Calciumorthophosphat genannt, ähnelt in seiner Beschaffenheit der anorganischen Mineralphase des Knochens und eignet sich in Form von Zementen und Pasten optimal als Knochenersatzmaterial (Hing 2004). Neben guter Biokompatibilität und Osteokonduktivität zeichnen sich Calciumphosphat-Zemente durch die Fähigkeit zur direkten Bindung an Knochengewebe aus. Sie sind aktiv resorbierbar über zelluläre Mechanismen durch körpereigene Makrophagen, Monozyten und Osteoklasten und passiv durch chemische Auflösung in Körperflüssigkeiten (Ginebra et al. 2012).

Konventionelle Calciumphosphat-Zemente sind Pulvermischungen, die aus einem oder mehreren Calciumorthophosphaten, sogenannte Präkursoren, bestehen. Nach der Mischung mit einer wässrigen Phase formen sie eine Paste, die innerhalb kurzer Zeit unter Ausbildung einer stabilen Calciumphosphat-Phase aushärtet (Dorozhkin 2013). Hierbei sind zwei Reaktionsprodukte möglich, die unterschieden werden können: Ein Hydroxylapatit-bildender Zement oder ein Brushit-bildender Zement. Das Abbinden des Zements passiert abhängig vom pH-Wert bei einem pH-Wert unterhalb von 4,2 zu Brushit (Calciumhydrogenphosphat-dihydrat), das sich bei Mineralisation und Abbau von Apatiten findet, und oberhalb von 4,2 zu Hydroxylapatit. Im Gegensatz zu Acrylknochenzementen, wie PMMA (Polymethylmethacrylat), die in der Orthopädie häufig verwendet werden, passiert das Abbinden des Zements nicht als exotherme Reaktion. Dies ermöglicht das Einbringen von Medikamenten und biologisch aktiven Molekülen in den Zement und er kann dadurch als Wirkstoffträger fungieren (Ginebra et al. 2012).

Es wurden mit Ionen substituierte oder angereicherte Calciumphosphat-Zemente entwickelt, die durch lokale Freisetzung der Ionen eine Reaktion des Knochengewebes hervorrufen. Hierzu zählen biologisch wirksame Ionen wie Magnesium, Silikat oder Strontium (Sheikh et al. 2015a).

1.5.2. Strontium-modifizierte Calciumphosphat-Zemente

Mit Strontium modifizierte Calciumphosphat-Zemente sind Knochenzemente, die nach der Implantation lokal biologisch aktive Strontium-Ionen freisetzen (Schumacher et al. 2013).

Wie unter 1.2.3 beschrieben, findet Strontium in der antiosteoporotischen Therapie Anwendung in Form von oral verabreichtem Strontiumranelat. Der duale Effekt von Strontium sorgt für eine Stimulation des Knochenaufbaus und gleichzeitiger Hemmung der Osteoklastogenese (Marie 2007). Mit einer Bioverfügbarkeit von lediglich ca. 20 % bei oral aufgenommenem Strontium stellt die Inkorporation von biologisch aktiven Strontium-Ionen in einen Knochenzement eine Möglichkeit dar, die antiosteoporotische Wirkung von Strontium durch lokale Freisetzung bei osteoporosebedingten Frakturen zu verstärken (Leeuwenkamp et al. 1990; Schumacher et al. 2013). Auch können durch die lokale Anwendung von Strontium-Ionen schwerwiegende Nebenwirkungen, wie etwa bei der oralen Strontiumranelattherapie vermieden werden (Kern et al. 2019).

Zur Herstellung eines mit Strontium ergänzten oder substituierten Calciumphosphat-Zements bedarf es dann einer Pulvermischung mit mindestens einem Strontium-haltigen Präkursor. Nach dem Abbinden des Zements unterscheidet man, wie auch bei den reinen Calciumphosphat-Zementen, zwischen Hydroxylapatit- und Bruschit-bildenen Knochenzementen (Schumacher und Gelinsky 2015).

In Studien zur Testung von Strontium-substituierten Calciumphosphat-Zementen *in vivo* konnte neben einer gesteigerten Knochenneubildung eine vermehrte Materialdegradation im Vergleich zu Strontium-freien Knochenzementen gezeigt werden (Thormann et al. 2013; Baier et al. 2013; Pina et al. 2010).

1.5.3. Calciumphosphat-Pastenzemente

Die Verarbeitungseigenschaften von konventionellen Calciumphosphat-Zementen sind problematisch. Die Verarbeitungszeit der Pulver-Flüssigkeit-Zemente nach Mischung von Pulver und wässriger Phase ist auf wenige Minuten beschränkt. Intraoperativ erschwert diese zeitliche Limitation die Vorbereitung und Applizierbarkeit des Zements

(Ginebra et al. 2010). Um die Verarbeitungszeit zu verlängern wurden in der Vergangenheit Zementformulierungen entwickelt, bei denen die rheologischen Eigenschaften verändert waren (Lode et al. 2018). Anstatt einer wässrigen Phase wird eine wasserfreie Flüssigkeit zur Herstellung des Calciumphosphat-Zements verwendet. Die hierbei entstehende Calciumphosphat-Paste härtet erst nach der Applizierung in einen Gewebedefekt durch das Herauspresse der wasserfreien Phase durch Körperflüssigkeiten aus (Ginebra et al. 2010). Als wasserfreie Phasen wurden unter anderem Glycerin, Polyethylenglycol oder eine Öl-basierte Suspension zur Vorbereitung eines Calciumphosphat-Pastenzements getestet (Carey et al. 2005; Heinemann et al. 2013). Die *premixed* (vorgemischten) Calciumphosphat-Zemente können somit unter kontrollierten Bedingungen hergestellt und als gebrauchsfertige Pasten bis zur Verwendung gelagert werden (Heinemann et al. 2013). Diese Zementformulierung erlaubt eine minimalinvasive Applizierbarkeit mittels Spritze.

1.5.4. Bioaktives Glas

Ein weiteres Knochenersatzmaterial, das sich durch gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität auszeichnet, ist bioaktives Glas (Giannoudis et al. 2005). Bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten bildet bioaktives Glas eine Schicht aus Hydroxylcarbonatapatit auf seiner Oberfläche und schafft damit eine stabile Verbindung zwischen Biomaterial und Knochen. Hydroxylcarbonatapatit ähnelt strukturell Hydroxylapatit des Knochens (Hench 1998).

Es lassen sich zwei verschiedene Herstellungsprozesse für bioaktives Glas unterscheiden: der Schmelz-Abschreck-Prozess, bei dem die Ausgangsstoffe bei Temperaturen von ca. 1300 °C geschmolzen werden und dann zur gewünschten Partikelgröße zerkleinert werden, und das Sol-Gel-Verfahren, bei dem Silica-Nanopartikel zu einem Gel verarbeitet werden und dann nach dem Erhitzen auf ca. 700 °C für mehrere Stunden zu Pulver verarbeitet werden (Wu und Chang 2012; Zhu et al. 2008). Das mittels Sol-Gel-Verfahren hergestellte Bioglas bietet den Vorteil, dass das Material eine höhere intrinsische Porosität aufweist und für die Fertigung sind niedrigere Temperaturen erforderlich als für das Schmelz-Abschreck-Verfahren. Dies macht das Beladen des Bioglasses mit Arzneimitteln oder Wachstumsfaktoren möglich (Wu und Chang 2012). Das Sol-Gel-Bioglas lässt sich noch weiter kategorisieren in nicht-mesoporöses und mesoporöses bioaktives Glas (Hum und Boccaccini 2012).

Im Vergleich zu nicht-mesoporösem Bioglas verfügt mesoporöses, bioaktives Glas (MBG) über eine große Oberfläche mit vielen intrinsischen Porenkanälen. Die Porengröße kann zwischen 5 nm und 20 nm variieren (Wu und Chang 2012).

Bei der Degradation des MBG werden Ionen freigesetzt, die die Osteogenese stimulieren und MBG zeigt eine gesteigerte knochenbildende Bioaktivität (Zhao et al. 2004; Renno et al. 2013).

Außerdem zeigte sich in *in vitro*- und *in vivo*-Studien eine Stimulation der Angiogenese durch bioaktives Glas (Gorustovich et al. 2010; Hoppe et al. 2011).

1.6. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Effekte von mesoporösem, bioaktivem Glas in einem mit Strontium modifizierten Calciumphosphat-Pastenzement anhand eines etablierten metaphysären Frakturmodells mit Frakturspaltdefekt kritischer Größe der ovariectomierten Ratte zu untersuchen. Zum Vergleich dienten eine Kontrollgruppe ohne Knochenersatzmaterial und ein Bioglas-freier, Strontium-substituierter Calciumphosphat-Pastenzement. Die hierzu durchgeführten histologischen, enzym- und immunhistochemischen Untersuchungen in Verbindung mit histomorphometrischen Auswertungen sollen der Bestätigung oder Widerlegung der folgenden Hypothese dienen:

- Das mesoporöse, bioaktive Glas im Strontium-substituierten Calciumphosphat-Pastenzement verbessert die Knochenneubildung sowie die Materialdegradation mit vermehrtem Einwachsen von Bindegewebe und verstärkter Vaskularisierung.

Besonderheit der getesteten Strontium-substituierten Calciumphosphat-Zemente ist ihr Pastencharakter, der eine unbegrenzte Verarbeitungszeit verspricht. Hierzu soll anhand der gemachten Beobachtungen während der tierexperimentellen Studie folgende Hypothese überprüft werden:

- Pastenzemente bieten eine einfache Handhabung und Applizierbarkeit.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Knochenersatzmaterialien

Bei den in dieser Studie verwendeten Knochenersatzmaterialien handelte es sich um mit Strontium modifizierte Calciumphosphat-Pastenzemente. Die beiden Pastenzemente sind Weiterentwicklungen der im Zuge des von der Deutschen Forschungsgesellschaft finanziell unterstützten Sonderforschungsbereichs Transregio 79 Projekts in Kooperation mit dem Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung der Technischen Universität Dresden entwickelte Calciumphosphat-Knochenzemente. Im Speziellen handelte es sich um den Pulver-Flüssigkeitszement S100, der mit Strontium modifiziert wurde und der schon *in vivo* im Knochendefektmodell bei ovariectomierten Ratten untersucht werden konnte (Thormann et al. 2013).

Als Grundlage zur Herstellung der Pastenzemente diente ein Präkursor-Pulver mit einem Anteil von 57,3 Gewichtsprozent (Gew.-%) α -Tricalciumphosphat (α -TCP), 24,8 Gew.-% Calciumhydrogenphosphat (DCPA), 3,8 Gew.-% Hydroxylapatit (HA) und 14,1 Gew.-% Calciumcarbonat (CaCO_3). Bei den beiden Pastenzementen pS100 und pS100G10 wurde das Präkursor-Pulver des Zements dann durch eine vollständige Substitution der Komponente Calciumcarbonat durch Strontiumcarbonat (SrCO_3) modifiziert (Lode et al. 2018). Nach dem Abbinden handelte es sich um einen Hydroxylapatit-bildenden Strontium-substituierten Calciumphosphat-Zement.

pS100

Für den erwähnten S100 Pulver-Flüssigkeitszement wurde eine wässrige Phase verwendet. Diese wässrige Phase wurde bei dem pS100 Pastenzement durch eine biokompatible Ölphase als Trägerflüssigkeit ersetzt. Zur Generierung einer Paste wurde dem Präkursor-Pulver 2,5 Gew.-% Dikaliumhydrogenphosphat mit einer ölbasierten Suspension bestehend aus synthetischen kurzkettigen Triglyzeriden, Miglyol 812, zugegeben. Zuletzt wurde der Zement mit einer Ölphase mit zwei oberflächenaktiven Agenzien, Cremophor ELP und Amphisol A, vermischt. Die Ölphase machte das Ersatzmaterial mithilfe einer Spritze injizierbar in den Frakturspalt. Die Abbindung des Zements passierte durch den Kontakt der Ölphase mit Wundflüssigkeit im Frakturspaltdefekt, sodass die Ölphase aus dem Zement herausgedrückt werden sollte und dieser so aushärten konnte. Diese Eigenschaft verschaffte dem Ersatzmaterial eine praktisch uneingeschränkte Verarbeitungszeit (Lode et al. 2018).

pS100G10

Der Pastenzement pS100G10 basierte auf pS100. Neben Strontium wurde der injizierbare Calciumphosphat-Zement hier mit, im Vergleich zu der Zementmatrix, raschresorbierbarem MBG ergänzt. Das MBG bestand aus etwa 45 bis 169 µm großen Partikeln, die insgesamt 10 Gew.-% des Zements ausmachten. Die Zusammensetzung des pS100G10 lautet wie folgt: 51,6 Gew.-% α -Tricalciumphosphat (α -TCP), 22,3 Gew.-% Calciumhydrogenphosphat (DCPA), 3,4 Gew.-% Hydroxylapatit (HA) und 12,7 Gew.-% Strontiumcarbonat (SrCO_3) und 10,0 Gew.-% MBG. Hergestellt wurde das mesoporöse Glas (CaO-SiO_2) mithilfe des Sol-Gel-Prozesses (Wagner et al. 2019).

Die bioaktive Glaskomponente sollte der Porenbildung des Ersatzmaterials dienen, die das Einwachsen von Gewebe erlauben und so die Knochenneubildung fördern sollte.

2.2. Studiendesign und Tierversuchsgenehmigung

In dieser Studie wurden drei Versuchsgruppen miteinander verglichen. Die erste Gruppe, der Leerdefekt, diente als Kontrollgruppe. Hier wurde der Frakturspaltdefekt mit kritischer Größe nicht mit Ersatzmaterial gefüllt. Die anderen beiden Gruppen waren die Ersatzmaterialgruppen, wobei hier bei den Versuchstieren pS100 oder pS100G10 in den Frakturspaltdefekt eingebracht wurde. Für die Ersatzmaterialgruppen waren jeweils elf Versuchstiere und für den Leerdefekt zehn Tiere vorgesehen. Somit ergab sich für die drei Versuchsgruppen insgesamt ein Probenumfang von 32 Tieren. Die für die Untersuchung vorgesehenen Versuchstiere wurden randomisiert den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet.

Vor Beginn der Studie wurde der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des vom Regierungspräsidium Darmstadt unter der Antragsnummer v54 – 19c 20/15 – FU/1121 genehmigt. Nach der Genehmigung erfolgte die Durchführung der Studie in der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt.

2.3. Studiendurchführung

Bei 32 weiblichen, zehn Wochen alten Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurde eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt zur Induktion von Osteoporose. Direkt nach diesem ersten Eingriff wurde bei den Tieren mittels DXA die Knochendichte vor der Induktion eines osteopenen Knochenstatus bestimmt. Von diesem

Zeitpunkt an bis zum Ende der Studie erhielten die Tiere eine osteoporosefördernde Diät. Nach 12 Wochen erfolgte der zweite Eingriff bei den Ratten. Vor dieser Operation wurde erneut mithilfe des DXA-Geräts die Knochendichte gemessen. Im distalen linken Femur wurde zur Erzeugung eines Frakturdefekts mit kritischer Größe eine Osteotomie durchgeführt. Die Osteotomie wurde mit einer belastungsstabilen Plattenosteosynthese versorgt und die Knochenersatzmaterialien pS100 und pS100G10 wurden in den jeweiligen Versuchsgruppen in den Frakturdefekt implantiert. In der Kontrollgruppe wurde der Frakturspalt leer belassen. Nach weiteren sechs Wochen erfolgte die Tötung der Versuchstiere mittels Kohlenstoffdioxidgas-Narkose und die operierten Femurknochen wurden durch Präparation entnommen und für die histologische Untersuchung vorbereitet. Die entnommenen Proben wurden mit dem Einbettungssystem Technovit 9100 eingebettet. Von den Blöcken wurden dann mithilfe eines Rotationsmikrotoms dünne Schnitte angefertigt, die auf Objektträgern fixiert wurden und die für die einzelnen histologischen und histochemischen Färbungen verwendet wurden.

2.4. Knochendichtemessung mittels DXA-Gerät

Die Knochendichte bei den Versuchstieren vor und drei Monate nach der Induktion eines osteopenen Knochenstatus wurde mithilfe des DXA (Lunar Prodigy, GE Healthcare, Deutschland) gemessen. Die erste Messung erfolgte somit direkt nach der Ovariectomie, um den Ausgangswert der Knochendichte festzuhalten. Kurz vor der Femurosteotomie fand die zweite Messung statt, sodass die Verringerung der Knochendichte mit erniedrigtem T-Wert bestätigt werden konnte. Dafür wurden die Tiere narkotisiert und in ventraler Lage auf dem Gerät platziert. Es wurde eine Aufnahme posterior-anterior der gesamten Wirbelsäule, der Hüften und Hintergliedmaßen gemacht. Für die Analyse der Knochendichteverringerng dienten als Bezugspunkte linker und rechter Femurknochen und Lendenwirbelkörper. Die Analyse der Scans erfolgte mittels des Kleintiermodus der enCORE Software (GE Healthcare, Deutschland). Vor Beginn jeder Messreihe musste das Gerät kalibriert werden.

Die Durchführung beruhte auf einem durch Heiss et al. 2012 beschriebenen Verfahren zur Induktion eines osteopenen Knochenstatus bei Ratten (Heiss et al. 2012).

2.5. Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um weibliche Sprague Dawley Ratten, die im Alter von zehn Wochen in den Ställen der ZFE der Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt untergebracht wurden. In der ZFE fanden auch die operativen Eingriffe statt. Die Tiere wurden artgerecht bis zu den operativen Eingriffen in Typ 4 Käfigen mit erhöhten Decken, die ihnen *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter erlaubten, in Gruppen mit drei bis vier Tieren gehalten. Jeweils nach den operativen Eingriffen wurden die Tiere für 24 Stunden in Einzelkäfigen gehalten, die mit Zellstoff ausgelegt waren, um die Verletzungsgefahr zu senken. Die Raumtemperatur (RT) betrug 22°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 40-60%.

2.6. Operative Eingriffe

2.6.1. Ovariectomie

Nach einer Eingewöhnungsphase von zehn Tagen begann die Induktion der Osteoporose durch eine bilaterale Ovariectomie. Die Versuchstiere erhielten zuerst für kurze Zeit eine Inhalationsnarkose über ein Narkosegerät (Univet Porta, Groppler, Deggendorf, Deutschland) mit Isofluran (4 vol.-%) (Forene®, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland) in einer Induktionskammer. Daraufhin erhielten die Tiere eine subkutane Injektion mit 0,1 ml Buprenorphin (Temgesic®, Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) zur Analgesie. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde den Versuchstieren Augensalbe (Bepanthen, Bayer, Leverkusen, Deutschland) in die Augen gegeben. Es wurde ein dorsaler Zugang gewählt, sodass die Versuchstiere am Rücken im Bereich der Brust- und Lendenwirbel mit einer Schermaschine rasiert wurden. Die Ratten wurden auf einer Wärmematte mit einer maximalen Temperatur von 38°C auf dem Operationstisch platziert und erhielt über eine Atemmaske zur Aufrechterhaltung der Narkose Isofluran 1 vol.-% und Sauerstoff 0,5 l/min. Nun konnte das Operationsfeld mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt und mit Braunol® (Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert werden. Nachdem der Zugang zu dem Peritonealraum geschaffen war, wurde das Ovar aufgesucht, die Blutversorgung durch Koagulation der Gefäße unterbunden (Abb. 1a) und erst danach das Ovar abgetrennt (Abb. 1b). Die einzelnen Bauchschichten wurden mithilfe von resorbierbarem Faden mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Haut wurde ebenfalls mit Einzelknopfnähten und zuletzt mit Wundverschlussklammern geschlossen.

Dieser Eingriff erfolgte bei jeder Ratte bilateral. Nach Abschluss der Naht wurden die Wunden mit einem transparenten Sprühverband (Opsite, Smith & Nephew, Deutschland) besprüht zum Schutz der Operationsnähte.

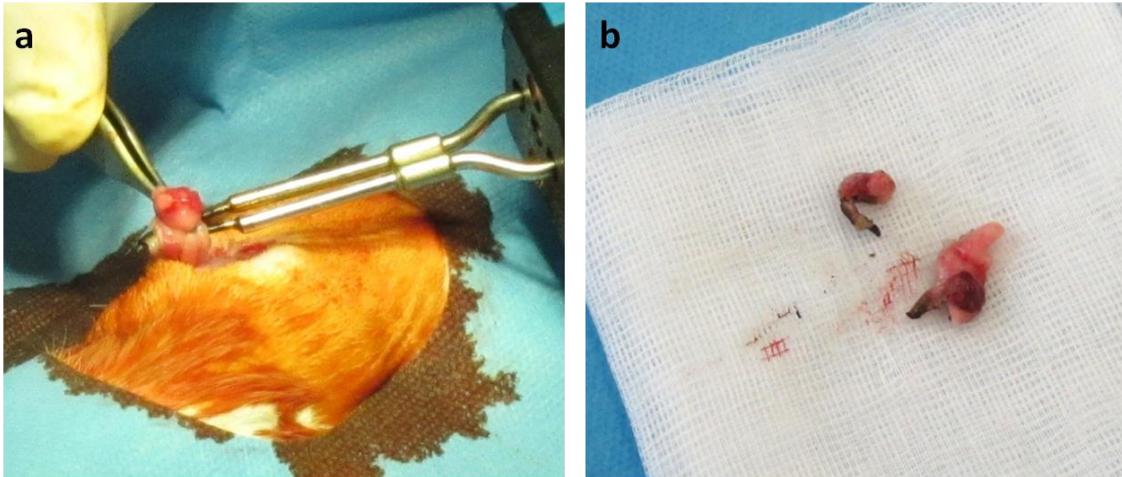


Abb. 1 a, b: Abtrennung der Ovarien mittels Koagulation (a) und entnommene Ovarien (b)

2.6.2. Postoperative Versorgung

Nach der Operation erfolgte dann sofort die DXA-Messung, um den Ausgangswert der Knochendichte festzuhalten. Die Tiere wurden anschließend nach Wiedererlangung des Bewusstseins in Einzelkäfige gelegt, in denen sie *ad libitum* Zugang zu einem Gemisch aus Trinkwasser und Tramadol (Tramadolor® 100 mg/ml, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) bis sieben Tage nach der Operation hatten, zur Linderung der postoperativen Schmerzen. Nach diesem ersten Eingriff begann auch die osteoporosefördernde Diät mit dem Calcium-, Phosphat-, Vitamin D3-, Soja- und Phytoöstrogen-freien Spezialfutter (Altromin-C1034, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland). Nach 24 Stunden wurden die Versuchstiere wieder in ihre ursprünglichen Käfige zu Gruppen aus drei bis vier Ratten gesetzt.

2.6.3. Osteotomie des proximalen Femurs

Nach einer Standzeit von zwölf Wochen erfolgte mit der Osteotomie am linken Femur der zweite operative Eingriff bei den Versuchstieren. Auch hier erhielten die Tiere wieder eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran. Zuerst erfolgte erneut die Knochendichtemessung mithilfe des DXA-Geräts, um die Knochendichteabnahme nach Ovariectomie und osteoporosefördernder Diät zu bestimmen. Darauf folgend wurden die Tiere mit einem implantierbaren elektronischen Transponder (IPTT 300, Biomedic Data Systems

Inc., Seaford, DE, USA) versehen, der den Tieren in der Nackenregion unter die Haut implantiert wurde. Somit konnten die Tiere von dort an dem Versuchsprotokoll entsprechend den jeweiligen Versuchsgruppen zugeordnet werden. Die weitere präoperative Vorbereitung erfolgte ähnlich der Ovariectomie. Die Tiere erhielten subkutan Buprenorphin (0,01 mg/kgKG) zur Analgesie und Augensalbe wurde den Tieren in die Augen gegeben. Mit der Schermaschine wurde die linke Hintergliedmaße lateral rasiert. Das Versuchstier wurde auf eine Wärmematte auf dem Operationstisch in Rechtsseitenlage gelegt, das Operationsgebiet steril abgedeckt und mit Braunol® desinfiziert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielten die Ratten über eine Atemmaske Isofluran (1 vol.-% und Sauerstoff 0,5l/min) mittels Narkosegerät.

Über eine 4 cm lange Inzision erfolgte der operative Zugang an der lateralen Oberschenkelseite. Durch die kraniokaudale Spaltung der Fascia lata von der Diaphyse bis zu den Kondylen des linken Femurs, die Spaltung der Muskulatur zwischen dem M. vastus lateralis femoris und dem M. biceps femoris und die darauffolgende Luxation der Patella, wurde das linke distale Femur freigelegt. Für die belastungsstabile Plattenosteosynthese wurde eine vorgeformte T-Platte mit 8 Löchern (1,2 mm Profyle Hand Standardplatte, Typ XS, Leibinger®, Stryker®, Freiburg, Deutschland) um ein Loch an der T-Plattenbasis gekürzt, an die Struktur der Femurkondylen angepasst und dann an das laterale Femur angelegt. Die Schraubenlöcher wurden gebohrt und die T-Platte wurde mit den dazugehörigen 1,2 mm im Durchmesser messenden Schrauben am lateralen Femur fixiert. Dafür wurden zwei 8 mm lange Schrauben an den Kondylen verschraubt und eine 6 mm Schraube knapp unterhalb der Metaphyse. Der proximale Teil der T-Platte wurde mithilfe von vier 6 mm Schrauben an der Diaphyse fixiert. Die Osteotomie im metaphysären Bereich des Femurs erfolgte mit einer Ultraschallknochensäge (Piezosurgery® 3, Spezial-Knochensägeblatt 0,35 mm OT7S-3, Mectron, Köln, Deutschland) unter ständiger Kühlung durch Ringerlösung. Mit der Knochensäge konnte ein keilförmiger Frakturspalt gesägt werden, der medial am distalen Femur 0,35 mm maß und lateral zur angebrachten T-Platte 4 mm Länge aufwies (Abb. 2a). In den Frakturspalt wurde dann nach dem Studienprotokoll zufällig entweder eines der Ersatzmaterialien pS100 oder pS100G10 eingebracht (Abb. 2b, c), oder das Versuchstier gehörte der Kontrollgruppe an und der Frakturspalt wurde leer belassen.

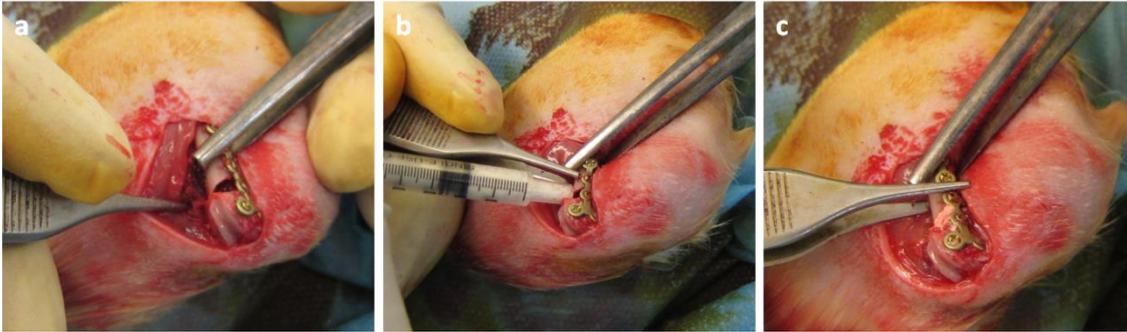


Abb. 2 a-c: Aufnahmen des distalen Femurs mit keilförmigem Frakturspaltdefekt nach der Osteotomie (a), Injektion des Pastenzements pS100G10 in Frakturspaltdefekt mithilfe einer Spritze (b) und aufgefüllter Frakturspaltdefekt (c).

Abschließend erfolgte die Reposition der Patella und die Inzision der Muskulatur wurde schichtweise genäht. Die Haut wurde dann mit Wundverschlussklammern verschlossen und zuletzt mit einem Sprühverband versiegelt.

Postoperativ wurden die Tiere nach Wiedererlangung des Bewusstseins, wie schon nach der Ovariectomie, in Einzelkäfige gelegt. Die Tiere erhielten hier wieder ein Gemisch aus Wasser und Tramadol, sowie die spezielle osteoporosefördernde Diät. Nach 24 Stunden wurden die Tiere wieder mit den ihnen bekannten Tieren in ihren ursprünglichen Käfigen zusammengeführt.

2.6.4. Euthanasie der Tiere und Gewinnung der Proben

Nach einer weiteren Standzeit von sechs Wochen nach der Femurosteotomie erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere schmerzfrei mittels einer Narkose durch Kohlenstoffdioxidgas in einer Kammer.

Die Tiere konnten mithilfe des elektronischen Transponders im Nacken ihrer Versuchsgruppe zugeordnet werden. Zur Gewinnung der Proben wurde die linke hintere Extremität vom Rumpf durch Präparation abgetrennt und das operierte Femur konnte freipräpariert werden. Zuletzt wurde die T-Platte zunächst begutachtet, von dem Femur abgeschraubt und der Knochen auf Stabilität überprüft. Stabilität war gegeben, wenn nach dem Entfernen der Platte der distale und der proximale Femuranteil der Fraktur nicht dislozierten.

Die für die histologische Untersuchung vorgesehenen Rattenknochen mussten sofort nach der Entnahme in 4% Paraformaldehyd fixiert werden. Dafür wurde der proximale Femurkopf mit einer Handsäge abgesägt, um das Eindringen der Fixierungslösung zu erleichtern.

2.7. Einbettung der Proben in Technovit® 9100

Bei Technovit® 9100 handelt es sich um ein Kunststoffeinbettssystem der Firma Heraeus Kulzer aus Wehrheim, Deutschland, das auf Methylmethacrylat basiert. Mit dem Einbettungssystem können Dünnschnitte von unentkalkten Knochengewebeproben hergestellt werden.

Die Einbettung der Rattenknochen begann mit der Fixierung der Proben in 4% Paraformaldehyd (PFA, Roth Nr. 0335 in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer) nach Lilli für 48 Stunden. Nach sechsmaligem Spülen mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2 – 7,4) folgte die Entwässerung in vergälltem Ethanol (Stockmeier Chemie Nr. 1001043227002) in destilliertem Wasser (*Aqua dest*) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 4x 100%, dann 100% Ethanol *pro analysi* [Merck Nr. 100014]) für jeweils einen Tag bei Raumtemperatur auf dem Rüttler in einem Plastiktopf mit Deckel.

Nach der Entwässerung diente dann Xylol (Roth Nr. 9713) als ein Intermedium. In zwei Durchläufen über jeweils zwölf Stunden wurden die Proben wieder auf dem Rüttler bei RT im Lösungsmittel aufbewahrt. Als nächstes folgte die Präinfiltration. Dafür wurden jeweils die Gebrauchslösungen mit der Basislösung Technovit 9100 (Heraeus Kulzer Nr. 66006735) hergestellt. Für die Präinfiltrationslösung 1 wurde die stabilisierte Basislösung mit Xylol zu gleichen Teilen gemischt. Präinfiltrationslösung 2 und 3 wurden erzeugt mit der 250 ml Basislösung und 1,25 g 0,5%igem Härter 1 (Heraeus Kulzer Nr. 64709022). Für die Präinfiltration 2 wurde stabilisierte Basislösung verwendet und entstabilisierte Basislösung für Präinfiltration 3. Entstabilisiert wurde die Basislösung durch Chromatographie mit Aluminiumoxid (Roth Nr. X908) in einer Chromatographiesäule. Jeder Präinfiltrationslösung wurden die Proben für einen Tag auf dem Rüttler bei RT ausgesetzt. Für die darauffolgende Infiltration wurden 200 ml der entstabilisierten Basislösung in ein Becherglas gegeben, welches wiederum in einen Plastikbecher gestellt wurde. Portionsweise wurden dann 20 g PMMA (Heraeus Kulzer Nr. 66010251) dazugegeben, der Plastikbecher verschlossen und für 30 min ruhen gelassen. Nach dem Ablauf der Zeit wurde 1 g von Härter 1 zugefügt und es wurde gerührt bis die Lösung klar wurde. Dann wurde das Becherglas auf 250 ml mit Basislösung aufgefüllt. Die Proben wurden dann für sechs Tage bei 4°C in die Infiltrationslösung gelegt. Als nächster Schritt folgte die Polymerisation. Für die Polymerisationslösung wurden die Stammlösungen A und B hergestellt. Hierzu wurde erneut die entstabilisierte Basislösung verwendet. Für die Stammlösung A

wurden 400 ml Basislösung in ein Becherglas gegeben, was wiederum in einen weißen Plastikbecher gestellt wurde. Dann wurden 80 g PMMA unter Rühren dazugegeben. Der Plastikbecher wurde verschlossen und für 30 min stehen gelassen. Danach wurden 3 g von Härter 1 hinzugefügt und gerührt bis die Lösung klar wurde. Zuletzt wurde die Stammlösung auf 500 ml mit Basislösung aufgefüllt. Stammlösung B enthielt 44 ml der entstabilisierten Basislösung, 17,6 ml Härter 2 (Heraeus Kulzer Nr. 66039185) und 2 ml Polymerisationsregler (Heraeus Kulzer Nr. 66039184). Alle Bestandteile wurden gemischt. Zur Polymerisation wurde Stammlösung A zu neun Teilen und Stammlösung B zu einem Teil vermischt. Die zu einbettenden Proben wurden in ovale Einbettformen gelegt und dabei alle in selber Position ausgerichtet. Die Polymerisationslösung wurde über die Proben gegossen bis die Einbettform voll war und die Proben konnten über zwei Tage bei -4°C polymerisieren. Zum Temperieren der Proben wurden die Formen dann für etwa eine 1 Stunde im Kühlschrank bei 4°C gelagert und abschließend erwärmt auf RT.

2.8. Vorbereitung der Knochengewebeproben

Die polymerisierten Technovit-Blöcke wurden mithilfe des Trennschleifsystems Exakt 310 der Firma EXAKT Advanced Technologies GmbH (Norderstedt, Deutschland) in kleinere Blöcke gesägt, um überschüssiges Einbettmaterial zu entfernen. Für die histologische Untersuchung konnten dann die Technovit Blöcke mittels Rotationsmikrotom (Leica RM2155, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) in $5\ \mu\text{m}$ dicke Dünnschnitte geschnitten werden. Um zu verhindern, dass Implantatmaterial aus dem Schnitt herausfällt, wurde vor jedem Schnitt ein passendes Stück Kawamoto Cryofilm Type 2 C(9) (Section-Lab Co. Ltd., Hiroshima, Japan) auf den Block geklebt, dieser dann geschnitten und der auf der Folie klebende Schnitt mithilfe eines Haft-Aufklebers (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf einem Objektträger (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) mit der Folie nach unten fixiert. Die histologischen Schnitte konnten dann gefärbt werden.

2.9. Histologische Standardfärbungen

2.9.1. Movat-Pentachrom-Färbung

Bei der Movat-Pentachrom-Färbung handelt es sich um eine polychromatische Färbung, die es erlaubt, in einem Gewebe mehrere Komponenten des Bindegewebes darzustellen und zu differenzieren. Somit ergibt sich nach der Färbung mit fünf Farbstoffen folgendes

Ergebnis: Muskulatur: rot, mineralisiertes Gewebe: gelb, Knorpel: blau-grün, elastische Fasern: rot, Zellkerne: blauschwarz, Zytoplasma: rötlich (Olah et al. 1977). Für die Movat-Pentachrom-Färbung wurden alle verwendeten Farbstoffe vor Gebrauch gefiltert. Zu Beginn wurden die Schnitte zweimal jeweils 10 min mit (2-Methoxyethyl)-Acetat (MEA, Merck Nr. 806061, Darmstadt, Deutschland) deplastifiziert, um danach in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 min zu stehen. Die Schnitte wurden dann dreimal jeweils 3 min in *Aqua dest* gespült. Mit Alcian Blau (Chroma Nr. 2C-005, Münster, Deutschland) wurden die Schnitte für 35 min gefärbt und danach 10 min in Leitungswasser gestellt. Daraufhin erfolgte die Stabilisierung in alkalischem Ethanol (20 ml 25% Ammoniak [Roth Nr. P093] + 180 ml 96% vergälltem Ethanol, pH >8) für 60 min. Die Schnitte wurden für 5 min unter laufendem Leitungswasser gespült und dann in *Aqua dest* eingetaucht. Hiernach folgte die Kernfärbung in Eisenhämatoxylin nach Weigert mit Lösung A und B (Roth Nr. X906, bzw. X907, Karlsruhe, Deutschland) im Verhältnis 1:1 für 14 min. Die Schnitte wurden anschließend in *Aqua dest* kurz eingetaucht und dann wieder unter laufendem Leitungswasser gewässert. Im Anschluss an die Wässerung wurden die Schnitte mit Brillant-Crocein-Säurefuchsin [0,1 g Brillant Crocein R (Chroma Nr. 1B-109) in 99,5 ml *Aqua dest*, dazu 0,5 ml Essigsäure (Merck Nr. 100063); 0,1 g Säurefuchsin (Chroma Nr. 1B-525) in 99,5 ml *Aqua dest* und 0,5 ml Essigsäure] für 6 min gefärbt. Danach erfolgte das Differenzieren erst mit 0,5%iger Essigsäure für 1 min und dann mit 5%iger Phosphorwolframsäure [5 g Phosphorwolframsäure (Merck Nr. 100583) in 100 ml *Aqua dest*] für 3 min. Anschließend wurde nochmals für 2 min mit der 0,5%igen Essigsäure gespült. Mit 100%igem Ethanol *p.a.* erfolgten für jeweils 2 min drei weitere Spülschritte. Die letzte Färbung mit Safran du Gatinais [6 g Safran du Gatinais (Chroma Nr. 5A-394) in 100 ml verg.100%igem Ethanol; für 48 Stunden bei 50°C inkubieren] dauerte 23 min. Die Schnitte wurden nach der Färbung in 100%igen Ethanol eingetaucht und nachfolgend 2 min in 100%igen Ethanol gestellt. Abschließend wurden die Schnitte jeweils 10 min in Xylol entwässert und konnten mit DePex (Serva Nr. 18243, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt werden.

2.9.2. Von Kossa-van Gieson-Färbung

Die Von Kossa-van Gieson-Färbung lässt sich unterteilen in die Von Kossa-Färbung, mit der mineralisiertes Gewebe dargestellt werden kann, und die Van Gieson-Färbung, die Bindegewebe und Kollagen anfärbt. Bei Von Kossa werden durch den Austausch von

Kalzium in Carbonaten und Phosphaten durch Silberionen und die anschließende Reduktion der Silberionen zu metallischem Silber die verkalkten Bereiche in der Knochengewebeprobe schwarz gefärbt (Schneider 2021). Die Van Gieson-Färbung zeigt als Färberegebnis: kollagene Fasern: rot, Osteoid: dunkelpink, Interzellulärsubstanz im hyalinen Knorpel: rot-gelb, elastische Fasern: blassgelb.

Vor Beginn der Färbung der Schnitte mussten diese erst mittels MEA dreimal für je 10 min deplastifiziert werden. Darauf folgte eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 2 min pro Küvette. Dann wurden die Schnitte für 5 min in bidestilliertem Wasser (*Aqua bidest*) gewässert. Zuerst erfolgte die Von-Kossa-Färbung mit einer 3%igen Silbernitratlösung [3 g Silbernitrat (AppliChem Nr. 131459, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml *Aqua dest*] für 10 min. Die Schnitte wurden anschließend dreimal je 2 min in *Aqua bidest* gespült. Zum Reduzieren des Silbernitrats wurde 10%iges Natriumkarbonat-Formaldehyd [10 g Natriumkarbonat (Merck Nr. A135) in 25 ml 37% Formaldehyd (Merck Nr. 104002) und auf 100 ml mit *Aqua dest* aufgefüllt] verwendet. Nach 2 min wurde kontrolliert, da die Schnitte nicht zu dunkel sein sollten. Sie wurden dann unter fließendem Leitungswasser für 10 min gespült. Zur Fixierung der Färbung diente 5%iges Natriumthiosulfat [5 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat (Merck Nr. 106509) in 100 ml *Aqua dest*]. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte nach 5 min zweimal 2 min in *Aqua dest* gestellt. Die Gegenfärbung erfolgte mittels 0,8%igem Methylgrün [1 g des Farbstoffs (Vector Nr. H-3402) in 100 ml *Aqua dest* und 25 ml Ethanol] für 5 min. In Leitungswasser für 10 min und danach in *Aqua dest* dreimal für 2 min wurden die Schnitte gespült.

Nun folgte die Van Gieson-Färbung. Hier wurde mit Eisenhämatoxylin nach Weigert mit Lösung A und B im Verhältnis 1:1 für 6 min gefärbt. Die Schnitte wurden nach der Färbung für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült und es folgte das Färben mit der Van Gieson-Färbelösung (Chroma Nr. 2E-050) für 20 min. Zur Entwässerung wurden die Schnitte kurz einige Male in 96%igen Ethanol getaucht und für 1 min in 100%igen Ethanol gestellt. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für je 5 min in Xylol gestellt und danach mit DePex eingedeckt.

2.10. Enzymhistochemische Nachweise

2.10.1. Tartrat-resistente saure Phosphatase

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) wird von ein- oder mehrkernigen Makrophagen, sowie von ortsspezifischen Osteoklasten produziert. Der enzymhistochemische

Nachweis von TRAP in Knochengewebeproben passiert durch eine granuläre Rotfärbung von TRAP-positiven Zellen mittels Echtrotsalz.

Vor Beginn mussten für die Färbelösung zwei Lösungen angesetzt werden. Dafür wurden für die Lösung 1 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat (Sigma-Aldrich Nr. N6125, Steinheim, Deutschland) in 125 µl N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich Nr. D4551) gelöst. Lösung 2 enthielt 57,5 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat (Merck Nr. 106663) und 35 mg Echtrotsalz (Sigma-Aldrich Nr. 368881) jeweils gelöst in 1ml Na-Acetatpuffer (8,2 g Natriumacetat [Merck Nr. 106280] in 1 l *Aqua dest*, pH 5,2 mit HCl [Roth Nr. P074] einstellen). Lösung 1 wurde dann in Lösung 2 pipettiert und diese Färbelösung musste vor Gebrauch gefiltert werden.

Die Schnitte wurden zweimal für je 10 min deplastifiziert mittels MEA und anschließend in Küvetten mit einer absteigenden Alkoholreihe gestellt für jeweils 5 min. Darauf folgte eine Wässerung mit *Aqua dest* dreimal je 5 min. Die Schnitte wurden dann für 10 min in 0,1 M Na-Acetatpuffer mit einem pH von 5,2 gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde der Objektträger um die Knochengewebeprobe trockengewischt und in eine feuchte Kammer gelegt. Mittels Pap-Pen (Vector Laboratories Nr. H-4000, Burlingame, CA, USA) wurden die Schnitte umrandet. Auf die Schnitte wurde die gefilterte Färbelösung gegeben und die feuchte Kammer wurde für etwa 2 Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Im Anschluss wurden die Proben dreimal in *Aqua dest* gespült für je 5 min. Es folgte die Gegenfärbung mit Shandon Instant Hämatoxylin (Thermo Fisher Scientific Nr. 6765015, Dreieich, Deutschland) im Verhältnis zu *Aqua bidest* 1:1 für 20 s. Nach dieser Färbung konnten die Objektträger durch kurzes Schwenken in *Aqua dest* gespült werden und danach zum Bläuen unter fließendes Leitungswasser gestellt werden für 10 min. Es folgten 5 min in *Aqua dest* und danach konnten die Knochengewebeproben mit Kaisers Glyceringelatine (Roth Nr. 6474) eingedeckt werden.

2.10.2. Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wird von Osteoblasten bei der Knochenbildung produziert. Ein positiver Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) zeigt sich durch eine Blaufärbung durch das Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz.

Zu Beginn wurden die Schnitte mit MEA zweimal je 10 min deplastifiziert und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe gestellt. Hiernach folgte die Wässerung zweimal in *Aqua dest* für je 5 min. In 0,1 M Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 9,4 (12,1 g Tris

[Roth Nr. 4588] auf 1 l *Aqua dest*, pH 9,4 mit HCl einstellen] wurden die Schnitte für 10 min gespült. Darauffolgend wurden die Objektträger um die Schnitte trockengewischt, mit Pap-Pen umrandet und in eine feuchte Kammer gelegt. Auf die Objektträger wurde das gefilterte Phosphatase-Substrat 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat mit Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz (BCIP/NBT, KPL Nr. 50-81-08, Gaithersburg, MD, USA) gegeben und für 2 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Färbelösung abgeklopft und die Schnitte wurden dreimal je 5 min in *Aqua dest* gespült. Es folgte die Gegenfärbung mit gefiltertem Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Roth Nr. N069) für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal je 5 min in *Aqua dest* gespült. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und zweimal je 5 min in Xylol. Abschließend konnten die Schnitte mit Eukitt (Sigma-Aldrich Nr. 03989) eingedeckt werden.

2.11. Immunhistochemische Nachweise

Die Immunhistochemie dient der Identifizierung von bestimmten Antigenen auf Zelloberflächen oder an Matrixproteinen von Zellen in Gewebeproben durch die Bindung von spezifischen Antikörpern an diese Antigene. Für die immunhistochemischen Nachweise wurden zwei verschiedene Detektionssysteme für bestimmte Antigene in den Knochengewebeproben verwendet, bei denen es sich um indirekte Methoden der Detektion handelt: das ABC- und das EnvisionTM-Detektionssystem. Hierbei wird der Zweitantikörper enzymkonjugiert und nicht, wie bei der direkten Methode, der Primärantikörper. Abschließend wird die Detektionsmethode mittels eines Chromogens visualisiert.

Bei der ABC-Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an die Zelloberfläche oder an ein Matrixprotein der Zelle, also ein Epitop. An diesen Antikörper wird dann ein biotinylierter Sekundärantikörper gebunden und darauf folgt die Reaktion des Sekundärantikörpers mit dem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex. Hier wurde das Vectastain® Elite ABC-HRP Kit der Firma Vector Laboratories aus Burlingame, CA, USA (PK-6100) verwendet und mit dem Chromogen Vector NovaRED Peroxidase Substrate Kit (SK-4800) konnten die Detektionsstellen mit braun-rötlichem Reaktionsprodukt angezeigt werden.

Das EnvisionTM-Detektionssystem ist eine Polymerkonjugat-Methode, bei der der sekundäre Antikörper mit einem Polymerkonjugat, das enzymbeladen ist, konjugiert ist. In der Gewebeprobe bindet dann der unkonjugierte Primärantikörper an das Epitop und im

nächsten Schritt kann dann der enzymkonjugierte sekundäre Antikörper an den primären Antikörper binden. Es wurde das Envision™-System Dako Envision™ + System HRP (DAB) der Firma Dako aus Santa Clara, CA, USA verwendet (für primäre Antikörper aus der Maus: K4006; Kaninchen: K4010). Das Polymerkonjugat ist hier ein Meerrettich-Peroxidase-markiertes (Horseradish Peroxidase, HRP) Polymer, das mit dem sekundären Antikörper konjugiert ist. Als Chromogen diente Diaminobenzidin (DAB), welches ein braunfarbendes Reaktionsprodukt hervorbrachte.

Im Folgenden werden die einzelnen Primärantikörper und ihre Spezifitäten genauer erläutert.

Bei jedem Färbevorgang lief eine Negativkontrolle mit, bei der der primäre Antikörper durch Verdünnungspuffer (Dako Nr. S302283) ersetzt wurde.

Bone morphogenic protein 2

Das Bone morphogenic protein 2 (BMP-2) zeigt als Mitglied der transforming growth factor β -Superfamilie mit der Induktion der Osteoblastendifferenzierung osteoinduktive Eigenschaften. Verwendet wurde im Versuch als Primärantikörper der polyklonale BMP-2-Antikörper (Acris Nr. AP20597PU-N), Herford, Deutschland).

OPG

Das Vorkommen von OPG wurde mithilfe des polyklonalen OPG-Antikörper (Abbiotec Nr. 250800, San Diego, CA, USA) nachgewiesen.

RANKL

Im Versuch wurde als Primärantikörper der polyklonale RANKL-Antikörper der Firma Acris (AP30826PU-N) verwendet.

Glattmuskuläres α -Actin

Das glattmuskuläre α -Actin (α -smooth muscle actin, α -SMA) findet sich in den glatten Muskelzellen von Gefäßwänden und markiert so Gefäße durch die Antigen-Antikörper-Reaktion. In unserer Studie wurde ein monoklonaler α -SMA-Antikörper der Firma Dako (Nr. M0851) genutzt.

Osteocalcin

Osteocalcin (OCN) ist ein Osteoblasten-spezifisches Hormon. Im Versuch wurde OCN mithilfe des monoklonalen OCN-Antikörpers (R+D MAB1419, Minneapolis, MN, USA) nachgewiesen.

ED1

Zum Nachweis von Monozyten im osteoporotischen Rattenknochen diente der monoklonale ED1-Antikörper (Chemicon MAB1435, Limburg an der Lahn, Deutschland).

Tabelle 1 zeigt alle in dieser Studie verwendeten immunhistochemischen Marker mit Art der Vorbehandlung, Verdünnung, verwendeter Sekundärantikörper und Detektionssystem sowie das verwendete Chromogen.

Tabelle 1: Verwendete immunhistochemische Marker

Antigen	Vorbehandlung	Verdünnung	Sekundärantikörper	Detektionssystem	Chromogen
BMP-2	Citratpuffer mit pH 6,0 bei 60°C für 30 min	1:50	Ziege-Anti-Kaninchen (Vector BA-1000)	ABC	NovaRED
OPG	Keine	1:200	Ziege-anti-Maus (Dako Envision)	Envision™	DAB
RANKL	Citratpuffer mit pH 6,0 bei 60°C für 60 min	0,6µg/ml	Ziege-anti-Maus (Dako Envision)	Envision™	DAB
α-SMA	Keine	1:100	Ziege-anti-Maus (Dako Envision)	Envision™	DAB
OCN	Citratpuffer mit pH 6,0 bei 60°C für 60 min	1:100	Ziege-Anti-Kaninchen (Dako Envision)	Envision™	DAB
ED1	Keine	1:3000	Ziege-Anti-Kaninchen (Dako Envision)	Envision™	DAB

Zuerst mussten die Knochengewebeproben mittels MEA viermal jeweils 5 min deplastifiziert werden, um danach in eine absteigende Alkoholreihe gestellt zu werden. Anschließend wurden die Schnitte zweimal jeweils 5 min in einem Tris-Waschpuffer (WP) gespült. Für den WP wurde erst eine Stammlösung angesetzt. Hierfür wurden 60,57 g Tris Base (Roth Nr. 4855) und 87,66 g Natriumchlorid (Sigma-Aldrich Nr. 31434) abgewogen und vorerst in 800 ml *Aqua dest* gelöst. Mit 25%iger Salzsäure (Roth Nr. X897) erfolgte die Einstellung des pH-Werts auf 7,4 und zuletzt wurde die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt. Zur WP-Herstellung wurden dann 900 ml *Aqua dest* mit 100 ml der Stammlösung gemischt. Schließlich wurden der Lösung 250 µl Triton-X-100 (Roth Nr. 3051)

hinzugefügt und auf der Rührplatte mindestens 30 min gerührt. Nach der Spülung in WP folgte die Vorbehandlung je nach Primärantikörper (siehe Tabelle 1). Hierfür wurden die Schnitte in Citratpuffer laut Tabelle 1 inkubiert (Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure (Roth Nr. 3958) + Stammlösung B 0,1 M Natriumzitat-dihydrat (Merck Nr. 106448): 41 ml B werden in 400ml *Aqua dest* gelöst, der pH mit A auf einen Wert von 6,0 eingestellt und auf 500ml mit *Aqua dest* aufgefüllt). War für einen Primärantikörper eine Vorbehandlung vorgesehen, so folgten nach Ablauf der Zeit zwei weitere Spülungen in WP für je 5 min. Zum Peroxidaseblock wurden die Schnitte für 5 min in 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung gestellt. Diese wurde frisch hergestellt mit 7 ml 30%igem Wasserstoffperoxid (Merck Nr. 822287) und 63 ml des WP. Nun wurden die Schnitte erneut zweimal je 5 min mit WP gespült. Nach der Spülung wurden die Objektträger um die Schnitte getrocknet, mit dem Pap-Pen umrandet und der primäre AK konnte auf die Knochengewebeproben gegeben werden. Der Primärantikörper war mit Verdünnungspuffer verdünnt und für jeden Schnitt waren jeweils 100 µl der Verdünnungspuffer-Antikörper-Lösung vorgesehen. Über Nacht bei 4°C wurden die Proben in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag mussten die Schnitte eine Stunde bei RT inkubieren und konnten nach der Inkubationszeit jeweils separat mit einer Einmalpipette mit WP einige Male abgespült werden um danach dreimal für je 5 min im WP zu stehen. Bei dem Vectastain® System folgte hier nun die Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Dafür wurden 3492 µl 1%iges bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich Nr. A3912) in Tris-NaCl-Puffer (TBS: Stammlösung zehnfach mit 60,57g Tris [Roth Nr. 4855.2] und 87,66g Natriumchlorid [Sigma-Aldrich Nr. 31434] in 1 l *Aqua dest* gelöst. pH-Einstellung auf 7,4 mit 25%iger Salzsäure; für Gebrauchslösung 100 ml Stammlösung mit 900 ml *Aqua dest*) mit 500 µl Rattenserum (Sigma-Aldrich Nr. R9759) und 8 µl des sekundären Antikörpers (Vector) gemischt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei RT in der feuchten Kammer. Danach wurden die Objektträger einzeln mit WP gespült und dann zweimal je 5 min in WP gestellt. Anschließend wurde mit 2,5 ml TBS und jeweils einem Tropfen von Lösung A und B aus dem Vectastain® Elite ABC-HRP Kit der Avidin-Biotin-Enzym-Komplex vorbereitet, der dann auf die Knochengewebeproben gegeben wurde und 30 min bei RT in der feuchten Kammer inkubieren sollte.

Bei dem Envision™-System wurde zunächst für 10 min mit 12,5% Rattenserum in 1%igem BSA (Sigma-Aldrich) in TBS blockiert. Dafür wurde die Lösung auf die Schnitte

gegeben und nach 10 min wurden die Objektträger abgeklopft und der sekundäre AK wurde auf die Knochengewebeprobe getropft. Die Schnitte wurden 45 min bei RT inkubiert. In beiden Systemen folgten dann weitere Spülschritte bei dem die Objektträger wieder separat mit WP gespült wurden und dann zweimal je 5 min in WP und zweimal je 2 min in *Aqua dest* gestellt wurden.

Es folgten die Färbungen mit den Substrat-Chromogenen NovaRed für das ABC-System und DAB für das EnvisionTM-System. Beide Chromogene mussten frisch angesetzt werden. NovaRED wurde mit 5ml *Aqua bidest*, drei Tropfen Reagenz 1, zwei Tropfen Reagenz 2, zwei Tropfen Reagenz 3 und zwei Tropfen der Hydroperoxidase gemischt, auf die Schnitte gegeben und für 30 min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Für das Färben mit DAB wurden 1ml Substratpuffer und ein Tropfen Chromogen gemischt. Die Lösung wurde auf die Proben gegeben und 45 min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Hier schlossen sich bei beiden Detektionssystemen Spülschritte an. Die Objektträger wurden separat mit *Aqua bidest* und danach viermal je 5 min mit *Aqua dest* gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Instant Shandon Hämatoxylin (Thermo Fisher Scientific) verdünnt in *Aqua bidest* im Verhältnis 1:2 für 20 s. Die Objektträger wurden direkt mit *Aqua dest* einzeln gespült und für 10 min in Leitungswasser gestellt. Nach einem weiteren Spülschritt für 5 min in *Aqua dest* wurden die Knochengewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und abschließend zweimal je 2 min in Xylol gestellt, um danach mit DePex eingedeckt zu werden.

2.12. Histomorphometrische Auswertung

Histomorphometrie zeichnet sich aus durch die quantitative Analyse durch Messungen von Geweben in lichtmikroskopischen Aufnahmen. Die Aufnahmen für die Auswertung wurden mithilfe einer Leica DCF 7000 T Kamera (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit Standardauflösung von 1920 x 1440 Pixeln gemacht, die an ein Leica DM5500B Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) angeschlossen war. Es wurde die Software Leica Application Suite X, 1.9.13747 (LAS X, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) genutzt. Zur Auswertung der Färbungen diente das Fotobearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS6 Extended (San Jose, CA, USA). Mithilfe dieses Programms konnten in den Knochengewebeproben, anhand der Bestimmung von Pixeln gleicher Farbe, Flächen (in mm²) quantitativ erfasst werden. Hierzu musste erst ein Bereich festgelegt werden, der der Auswertung der histologischen Färbungen dienen konnte. In

den mit Movat-Pentachrom gefärbten Schnitten wurde die *Region of Interest* (ROI) festgelegt, die dem früheren keilförmigen Frakturspaltdefekt nach der Osteotomie entsprechen sollte mit 0,35 mm an der medialen Seite des Rattenfemurs und 4 mm an der lateralen Seite. Diese ROI wurde in alle weiteren Auswertungen von lichtmikroskopischen Bildern desselben Rattenknochens mit anderen Färbungen über die gleiche Stelle gelegt, so dass immer von derselben zu analysierenden Fläche auszugehen war.

Die histomorphometrische Auswertung fand ihre Anwendung bei der Movat-Pentachrom-Färbung, der Von Kossa-Van Gieson-Färbung und der ALP-Färbung. In diesen Färbungen erfolgte jeweils die Ermittlung der Flächen der *void* (schnittbedingte Risse) (Abb. 3a), der alten Knochen trabekel sowie der Materialfragmente in den Materialgruppen pS100 und pS100G10 (Abb. 3b). Zur Bestimmung des Parameters BV/TV wurde in der Movat-Pentachrom-Färbung das neugebildete Knochengewebe als *bone volume* (BV) erfasst (Abb. 3c) und *tissue volume* (TV) als das Bindegewebe der Knochengewebeprobe. In der Von Kossa-Van Gieson-Färbung konnte das unmineralisierte Gewebe, das Osteoid, flächig bestimmt werden. Mithilfe des *osteoid volume* (OV) bezogen auf das BV wurde dann der Anteil des unmineralisierten Gewebes in der ROI ermittelt. Die Aktivität der ALP wurde in der Färbung ebenfalls flächig erfasst. Alle weiteren Färbungen wurden durch Zählungen ausgewertet oder rein deskriptiv analysiert.

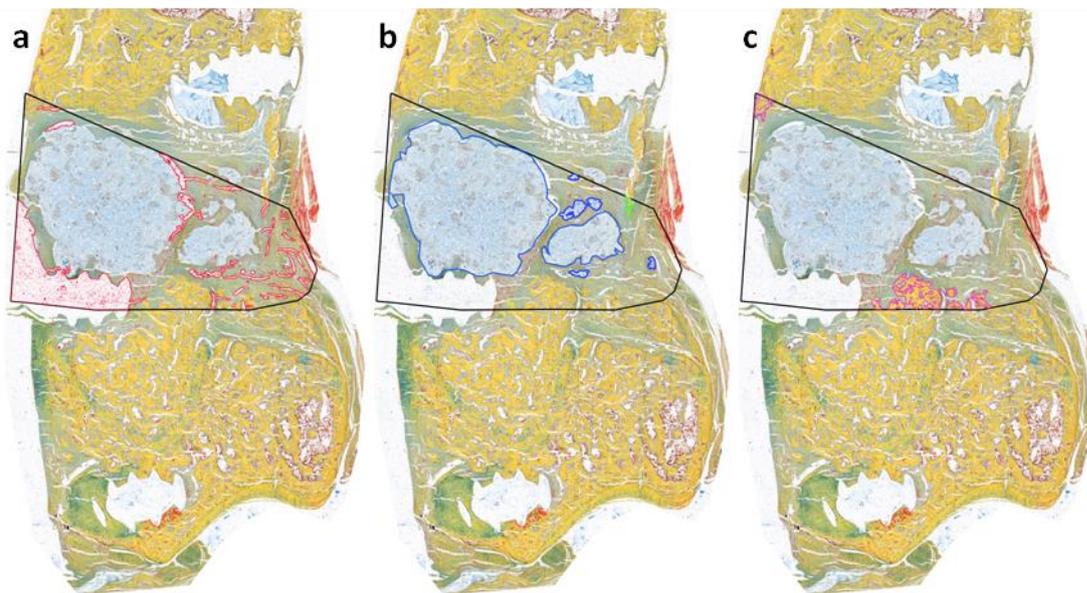


Abb. 3 a-c: Beispiel der histomorphometrischen Auswertung anhand der Movat-Pentachrom-Färbung für einen Knochenschnitt der pS100G10-Gruppe. In schwarz die ROI als ehemaliger Frakturspaltdefekt und in rot die schnittbedingten Risse (*void*) (a). Materialfragmente in blau umrandet und alte Knochen trabekel in grün (b). In c sind die Bereiche des neugebildeten Knochens in der ROI pink umrahmt.

Für die Bestimmung der Fragmentierung der untersuchten Ersatzmaterialien wurden drei aufeinanderfolgende Serienschnitte im Rattenknochenpräparat ausgewertet. In dieser Auswahl wurde die Anzahl an Materialfragmenten erfasst und ein Mittelwert gebildet.

2.13. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten der histologischen und histochemischen Färbungen wurden mithilfe des Statistikprogramms SPSS (IBM SPSS Statistics 24, IBM, Ehningen, Deutschland) statistisch ausgewertet. Zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen untereinander fanden in der vorliegenden Arbeit die One-Way-ANOVA (Analysis of Variance) mit post-hoc Tests und der Mann-Whitney-U-Test Anwendung.

Zeigten sich die Gruppen normalverteilt wurde die One-Way-ANOVA, auch Varianzanalyse genannt, angewandt zum Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen. Zur Untersuchung auf statistische Unterschiede der Versuchsgruppen untereinander wurde als post-hoc Test die Bonferroni-Korrektur angewendet. Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten zwei unabhängige Gruppen auf einen statistischen Unterschied verglichen werden, wenn eine Normalverteilung der Daten nicht vorausgesetzt werden konnte.

Das Signifikanzniveau wurde festgesetzt für $p=0,05$. Bei p-Werten zwischen 0,051 und 0,059 wurde von einer Tendenz zur Signifikanz ausgegangen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden Balkendiagramme erstellt, die Mittelwerte und einen Fehlerbalken mit \pm einem Standardfehler zeigten.

3. Ergebnisse

3.1. Probenumfang

Von den zunächst 32 Versuchstieren für alle Versuchsgruppen zu Beginn der Studie waren nach Beendigung dieser 21 Knochengewebeproben (Leerdefekt: n=7, pS100: n=7, pS100G10: n=7) auswertbar.

In der Leerdefekt-Gruppe zeigte sich bei der Explantation der osteopenen Femurknochen ein Tier mit einer Infektion des Frakturspaltdefekts. Diese Probe konnte nicht ausgewertet werden. Zwei weitere Knochengewebeproben zeigten nach der Einbettung in Technovit 9100[®] Dislokationen, sodass diese Proben ebenfalls nicht auswertbar waren.

In der Versuchsgruppe, bei der der pS100-Pastenzement implantiert wurde, verstarb eines der elf Versuchstiere aus unerklärlichem Grund. Drei der verbliebenen zehn Proben zeigten sich nach der Explantation als nicht auswertbar. In zwei dieser Knochengewebeproben fand sich eine Infektion. Bei der dritten Probe war die Osteotomieplatte gebrochen und daraufhin der Rattenfemur disloziert.

In der pS100G10-Gruppe starb ein Versuchstier vor Ende der Studie. Bei den übrigen zehn Versuchstieren zeigten sich bei der Probenentnahme zwei Knochengewebeproben, die nicht in die Auswertung mit einbezogen werden konnten. Ein Tier zeigte eine Infektion des Kniegelenks. Bei einem weiteren Tier ließ sich ein Plattenbruch mit Dislokation beobachten. Nach der Einbettung fand sich in einer weiteren Probe eine Dislokation des Rattenfemurs aufgrund eines Einbettungsfehlers. Für die histologische Untersuchung und Auswertung waren pro Versuchsgruppe schließlich jeweils sieben Knochengewebeproben vorgesehen.

3.2. Handhabung der Knochenersatzmaterialien intraoperativ

Die beiden Strontium-substituierten Calciumphosphat-Pastenzemente pS100 und pS100G10 waren in gebrauchsfertige Spritzen abgefüllt. Nach dem Anbringen der Osteosyntheseplatte an das distale Femur und der Osteotomie im metaphysären Bereich des Femurs konnte bei den zufällig zugeordneten Versuchstieren das Knochenersatzmaterial ohne weitere Vorbereitung in den Frakturspalt injiziert werden. Sowohl der pS100 als auch der pS100G10 ließen sich problemlos aus den Spritzen herausdrücken. Im Frakturspalt wurden die Knochenzemente anmodelliert, sodass der gesamte Defekt ausgefüllt war.

3.3. Histologische und histochemische Beobachtungen

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der einzelnen histologischen sowie histochemischen Färbungen zusammengetragen vorgestellt. Die Auswertungen der Leerdefekt-Gruppe erfolgten in Kooperation mit den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. Seemun Ray (Movat), Dr. Nils Döhner (TRAP-, ALP- und Von Kossa-Van Gieson-Färbung) und Dr. Lucretia Franz-Forsthoffer (RANKL und α -SMA) durchgeführt. Dr. Seemun Ray übernahm ebenfalls die Auswertung der Movat-Färbung für die in dieser Studie getesteten Materialien pS100 und pS100G10.

Im Folgenden wird für den Leerdefekt alternativ die englische Bezeichnung *empty defect* verwendet.

3.3.1. Deskriptive Histologie anhand der Movat-Pentachrom-Färbung

Mithilfe der Movat-Pentachrom-Färbung, die als Übersichtsfärbung und zur Histomorphometrie diente, konnten Aussagen über die Frakturheilung sechs Wochen nach der Femurosteotomie und Neubildung von mineralisiertem Gewebe in den unentkalkten Knochengewebeproben getroffen werden. Nach sechs Wochen wäre im Verlauf der Frakturheilung von einer reparativen Phase auszugehen. Die osteopenen Ratten, bei denen kein Ersatzmaterial eingesetzt wurde, die Leerdefekt-Gruppe, zeigten eine verzögerte Knochenheilung mit überwiegend fibrocartilaginärem Gewebe (grün-blau) in großen Bereichen der ROI ohne knöcherne Überbrückung (Abb. 4a). Zeigte sich ein Kallus, so war dieser weich mit dem fibrösen und knorpeligen Gewebe an der medialen und lateralen Seite des Femurs sichtbar (Abb. 4b). Es waren Fettzellen zu finden sowie in einer Probe Muskulatur, die in die ROI hineinragte und vermehrt Gefäße zeigte. Allgemein war in den ROIs der Knochengewebeproben ohne Ersatzmaterial eine irreguläre Verteilung von Gefäßen zu erkennen. Auf die alten Knochen trabekel des Femurs appositionell aufgelagert zeigte sich gelegentlich eine Mineralisation (hellgelb) (Abb. 4c). In allen Knochengewebeproben dieser Versuchsgruppe waren einzelne Knochensplitter und -fragmente (dunkelgelb), die bei der Osteotomie in die ROI gelangt sein könnten, zu finden.

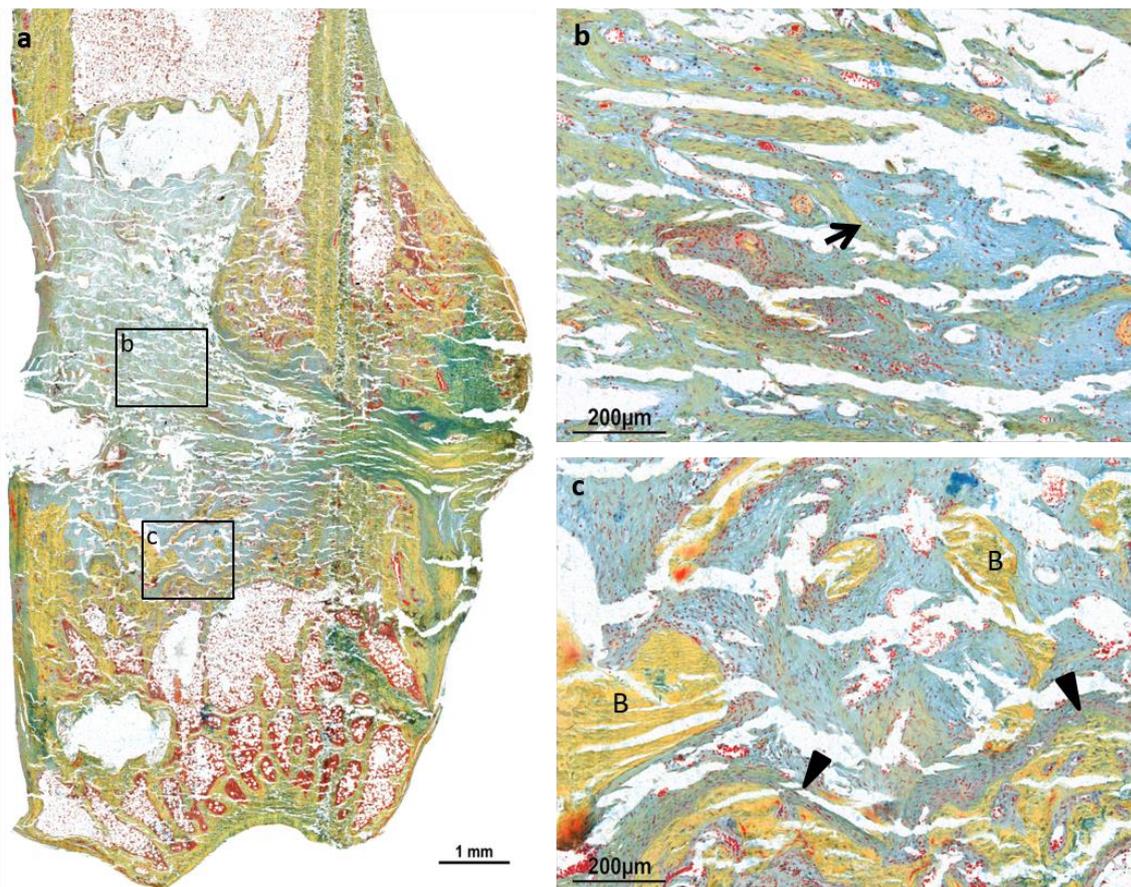


Abb. 4 a-c: Übersichtsaufnahme und Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung einer repräsentativen Probe der Leerdefekt-Gruppe. Übersichtsaufnahme des Rattenfemurs (a). Fibrocartilaginäres Bindegewebe (→) (b). Distale Knochenoberfläche (▶) mit Knochensplintern umgeben von fibrocartilaginärem Bindegewebe (c). B = Bone.

Zur Verbesserung der Knochenheilung wurde den osteopenen Ratten ein Strontium-haltiger Calciumphosphat-Zement in Form einer Paste in den Frakturspaltdefekt implantiert, der sich auch positiv auf den zellulären Metabolismus auswirken sollte. Der Pastenzement pS100 zeigte sich nach den sechs Wochen Standzeit der osteopenen Ratten als nicht abgebautes, überwiegend unfragmentiertes Knochenersatzmaterial in den Knochengewebe-proben (hellblau) (Abb. 5a). In allen Rattenknochen war eine Fragmentierung des Ersatzmaterials zu erkennen. Allerdings fand sich in sechs der sieben Proben ein größeres Materialfragment und darum herum einige kleinere Fragmente. Nur eine Probe zeigte mehrere kleine pS100-Materialfragmente. Direkt um die Ersatzmaterialreste an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche fand sich ein zellreiches, fibrocartilaginäres Gewebe (grünblau) mit Gefäßanschnitten (Abb. 6a, 6b). Auch zwischen den Materialfragmenten in den bindegewebigen Strängen waren diese zu finden und außerdem war hier vereinzelt schon mineralisiertes Gewebe (hellgelb) zu erkennen (Abb. 5b, 6a). Mineralisation und

neugebildete Knochentrabekel fanden sich vermehrt auf den Lagerknochen des Frakturspalts aufgelagert. Stellenweise zeigte sich eine artifizielle, präparatorische bedingte Ablösung des Bindegewebes von dem Ersatzmaterial (Abb. 5c).

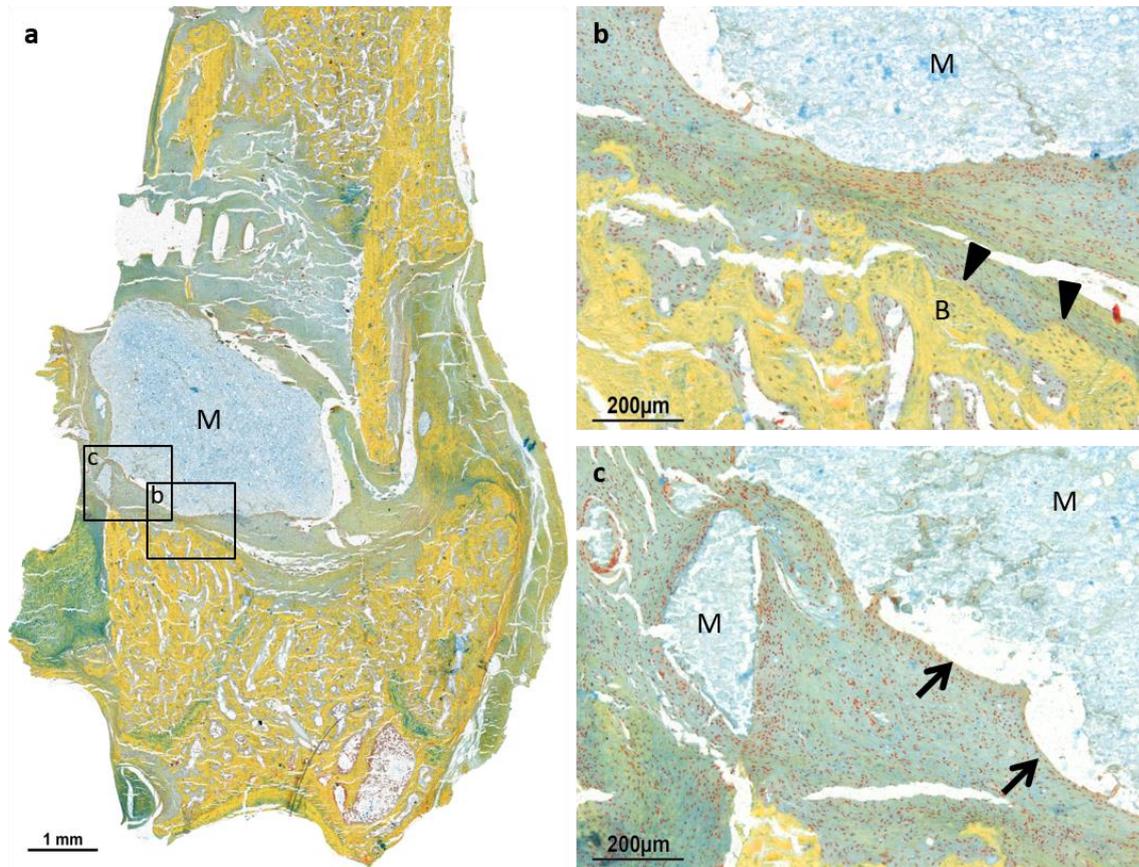


Abb. 5 a-c: Übersichtsaufnahme und Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung einer repräsentativen Probe der pS100-Gruppe. Übersichtsaufnahme des Rattenfemurs mit blauangefärbten pS100-Zement (M) (a). Knochenneubildung auf dem Lagerknochen (▶) (b). Von zellreichem Bindegewebe umgebene Materialfragmente mit Ablösung des Bindegewebes vom Material (→) (c). B = Bone, M = Material.

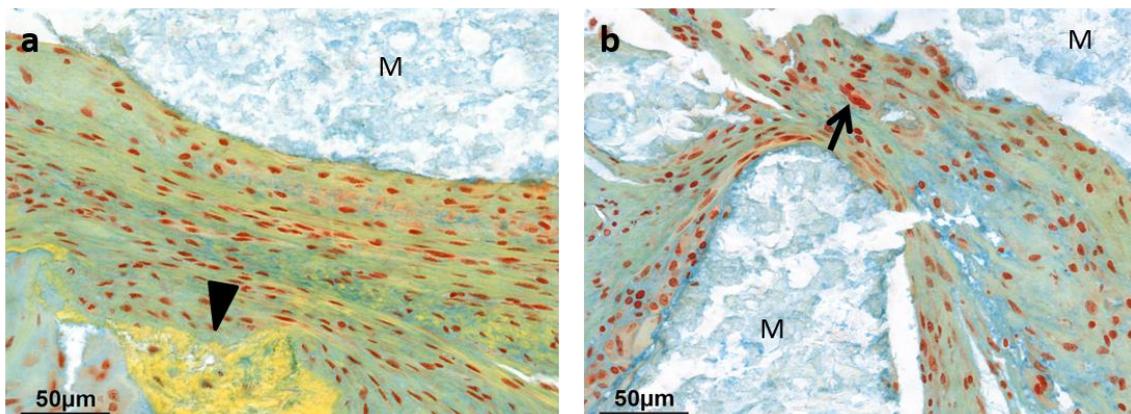


Abb. 6 a, b: Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung der pS100-Gruppe. Mineralisierte, gelbe Bereiche (▶) im Bindegewebe nahe am Material (a). Fibrokartilaginäres Bindegewebe mit Zellen direkt an der Grenzfläche zum Material, Gefäßanschnitt (→) (b). M = Material.

Um den Abbau des Pastenzements durch höhere Porosität des Ersatzmaterials zu fördern, wurde dem Strontium-haltigen Calciumphosphat-Zement das im Vergleich zur Zementmatrix raschresorbierbare MBG zugefügt. Nach sechs Wochen war auch dieser Zement mit den Glaspartikeln in den Knochengewebeproben noch nicht abgebaut (Abb. 7a). Der pS100G10 zeigte eine deutliche Materialfragmentierung bei drei Tieren, bei denen mehrere kleine Fragmente zu erkennen waren. In den anderen vier Tieren fanden sich, wie bei dem pS100, ein bis zwei größere Materialreste und mehrere kleine Ersatzmaterialfragmente. In der ROI fand sich direkt um die Materialfragmente zellreiches, fibrokartilaginäres Bindegewebe (Abb. 7c). Häufig ließen sich zwischen den Materialresten in den bindegewebigen Strängen mineralisiertes Gewebe (hellgelb), sowie Gefäßanschnitte beobachten (Abb. 7c). Neben beginnend mineralisierten Bereichen zeigten sich den Lagerknochen trabekeln aufgelagert Bereiche mit Chondrozyten (dunkelgrün) aufgelagert als Zeichen einer Knorpelbildung (Abb. 7b).

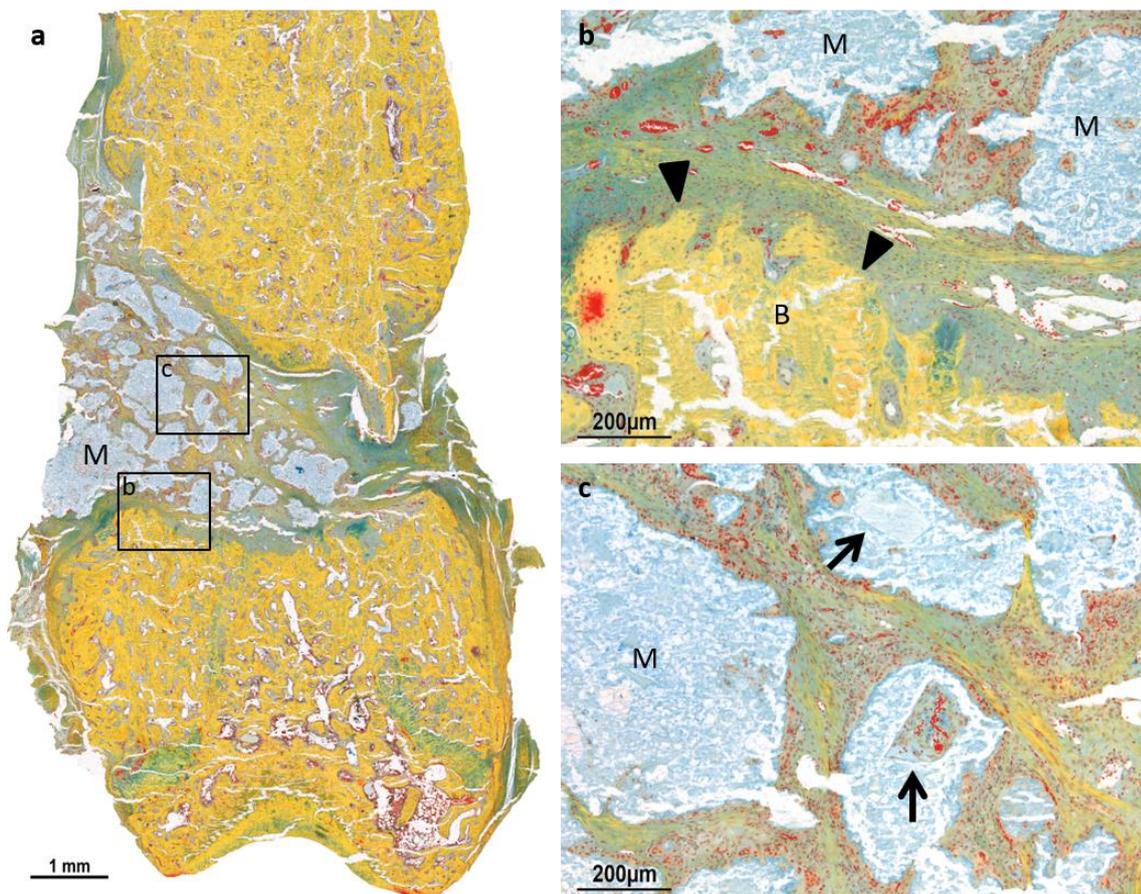


Abb. 7 a–c Übersichtsaufnahme und Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung einer repräsentativen Probe der pS100G10-Gruppe. Übersichtsaufnahme des Rattenfemurs mit blauangefärbten pS100G10-Zement (M) (a). Knochenneubildung am Lagerknochen (►) und Gefäßanschnitten (b). Fragmentiertes Material im Zentrum der ROI mit auffälligen Partikeln (→) in Materialfragmenten (c). B = Bone, M = Material.

Im Unterschied zu der pS100-Gruppe, war die Material-Bindegewebe-Grenzfläche des pS100G10-Zements deutlich vermehrt mit mehrkernigen Riesenzellen besiedelt und ebenfalls fanden sich hier zahlreiche mit Erythrozyten gefüllte Gefäßanschnitte (Abb. 8a, 8c u. 8d). Auf Strukturen, die sich inmitten der Materialfragmente befanden, ließen sich Zellen erkennen, die den vorherrschenden Zellen des umliegenden Bindegewebes ähnelten (Abb. 8c). Besonders zeigten sich hier Fibroblasten.

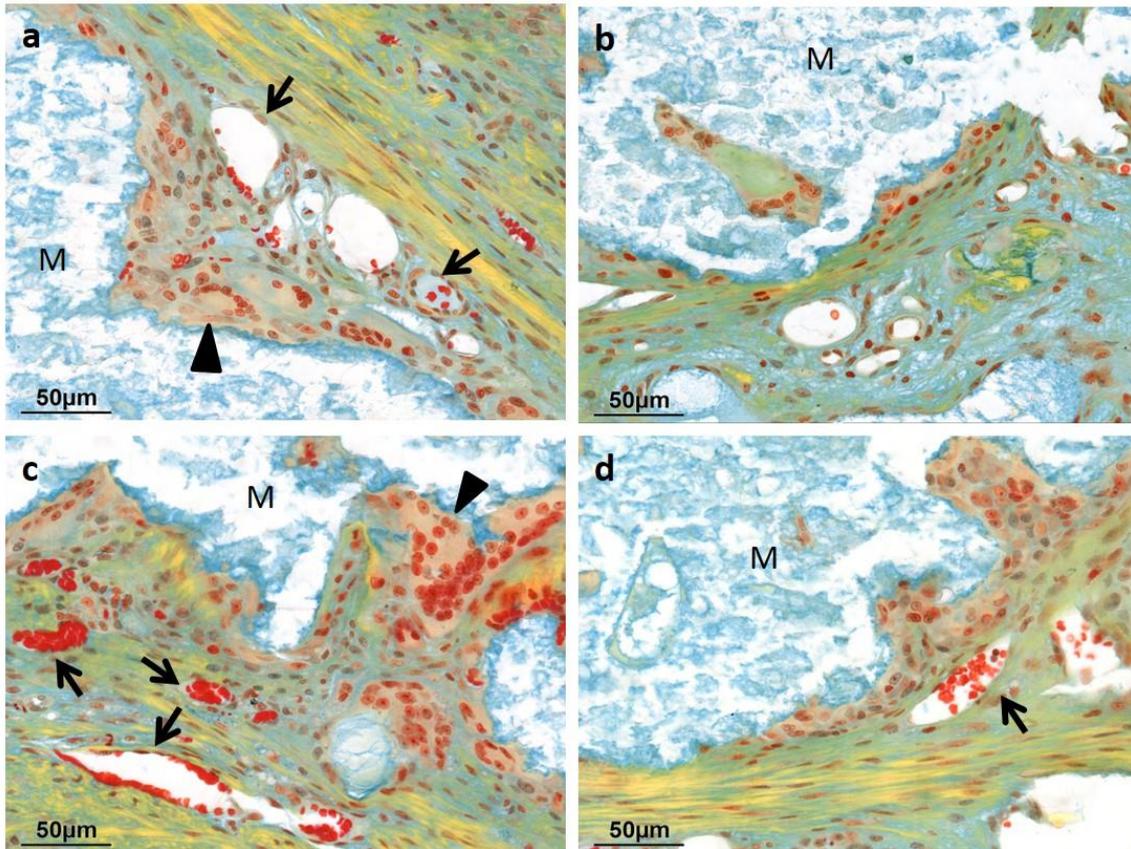


Abb. 8 a-d: Detailaufnahmen der Material-Bindegewebe-Grenzfläche in der Movat-Pentachrom-Färbung für pS100G10. Zellbesiedelter Bereich (▶) am Materialfragment mit Gefäßanschnitten (→) (a) und im Fragment nah der Material-Bindegewebe-Grenzfläche (b). Zellreiche Materialoberfläche mit mehrkerniger Riesenzelle (▶) sowie Gefäßanschnitte mit Erythrozyten (→) im Bindegewebe nah am Material (c, d). M = Material.

Fragmentierung

Beide in dieser Arbeit getesteten Ersatzmaterialien pS100 und pS100G10 zeigten in allen Knochengewebeproben eine gewisse Fragmentierung, wie oben bereits beschrieben. In der statistischen Auswertung zeigte sich mit Tendenz zur Signifikanz ($p=0,055$) eine erhöhte Anzahl an Materialfragmenten in der pS100G10-Gruppe mit dem MBG im Vergleich zur pS100-Gruppe (Abb. 9).

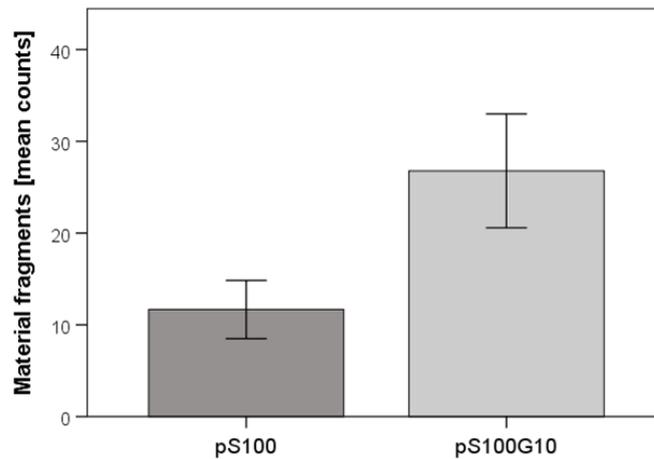


Abb. 9: Graphische Darstellung der Mittelwerte für die Auszählung von Materialfragmenten in drei verschiedenen Schnitten für die pS100-Gruppe (n=6) und die pS100G10-Gruppe (n=6). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

Partikel in den pS100G10-Materialfragmenten

Im direkten Vergleich der Knochenzementanteile in den Schnittpräparaten ließen sich in der Gruppe mit dem MBG in allen Knochenschnitten innerhalb der Materialfragmente Partikel beobachten, die in der pS100-Gruppe fehlten. Im Gegensatz zum pS100G10-Zement war der Calciumphosphat-Zement ohne Bioglas homogen strukturiert. In den Proben des pS100G10-Pastenzements zeigte sich in sechs der sieben Rattenknochenproben mindestens eines der sichtbaren Partikel besiedelt mit Zellen. Die Partikel waren rosa gefärbt (Abb. 10 b, 10d). Die Zellen, die auf diesen Zementanteilen des pS100G10 zu erkennen waren, zeigten eine ähnliche Morphologie, wie die Zellen an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche (Abb.10f). Dazu fanden sich sogar einige Gefäßanschnitte mit Erythrozyten nahe oder direkt auf den Partikeln (Abb. 10a, 10f).

Die Partikel befanden sich meist am Rand der Materialfragmente. Es ließen sich Knochengewebebeobachten, bei denen eine bindegewebige Verbindung von dem Partikel im Materialfragment zu dem umliegenden Bindegewebe zu finden war (Abb. 10b, 10e). Ebenfalls zu beobachten waren Proben, die Partikel inmitten eines Materialfragments mit Zellbesiedelung oder direktem Kontakt zu Zellanordnungen zeigten (Abb. 10d).

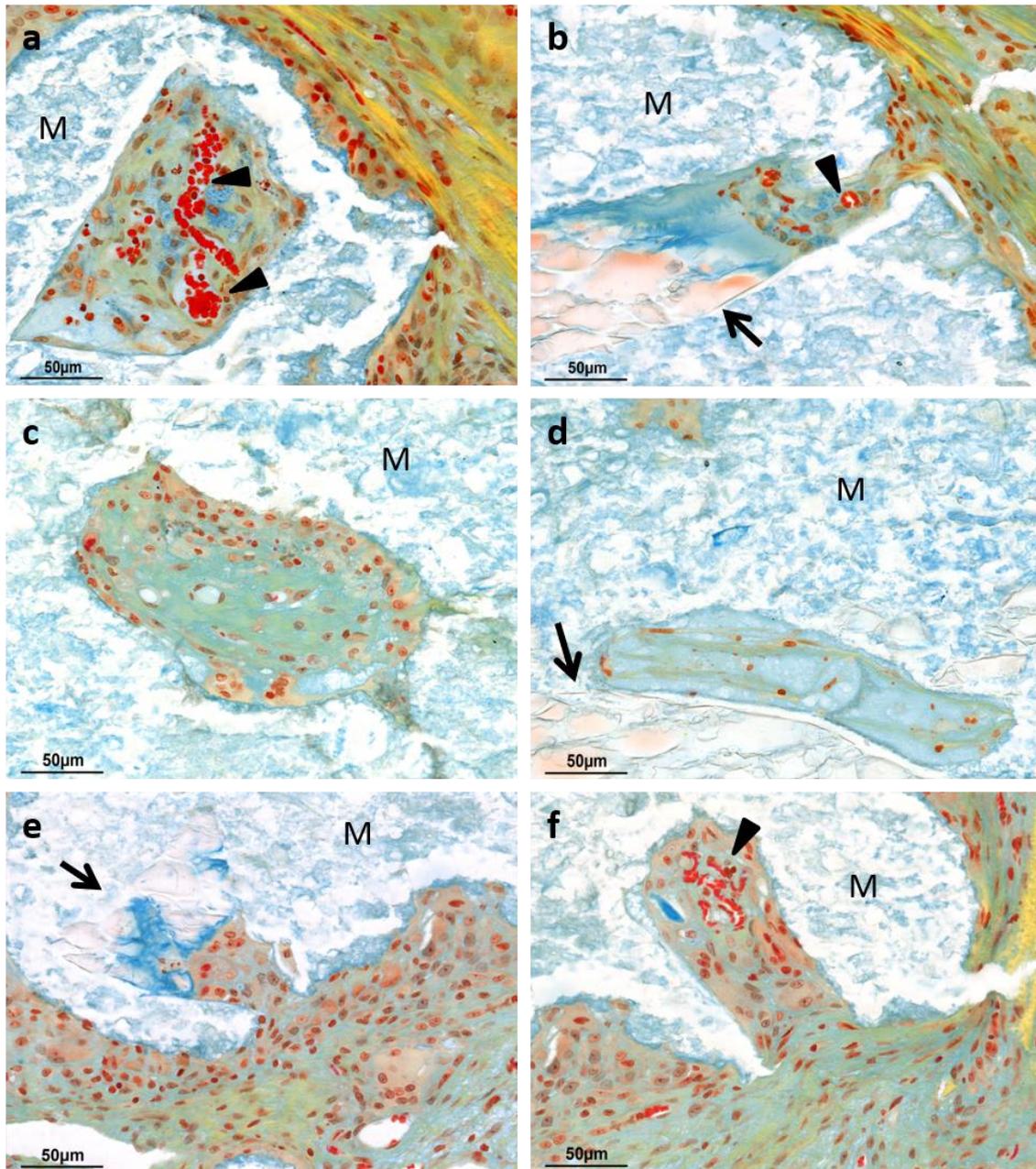


Abb. 10 a-f: Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung der pS100G10-Gruppe. Repräsentativ werden drei verschiedene Proben (a-b, c-d, e-f) der pS100G10-Gruppe gezeigt. Mehrere Gefäßanschnitte (▶) (a, f) sowie Bindegewebszellen im Material (a, c, d). Einwachsen von Bindegewebe in das Material (f) mit Kontakt zum MBG (→) (b, d, e). M = Material.

3.3.2. Histomorphometrische Auswertung der Knochenneubildung

Zur Bestimmung der prozentualen Neubildung von mineralisiertem Knochengewebe in der ROI diente der strukturelle Parameter BV/TV, der mithilfe von Flächenbestimmungen in den Knochengewebeproben in der Movat-Pentachrom-Färbung quantifiziert wurde. Die statistische Auswertung zeigte eine signifikant höhere Neubildung von

mineralisiertem Gewebe für pS100G10 ($p < 0,001$) und pS100 ($p < 0,001$) im Vergleich zum Leerdefekt (Abb. 11). Der Vergleich innerhalb der Materialgruppen ergab einen signifikanten Unterschied mit vermehrtem mineralisiertem Gewebe bei pS100G10 im Vergleich zu pS100 ($p = 0,03$).

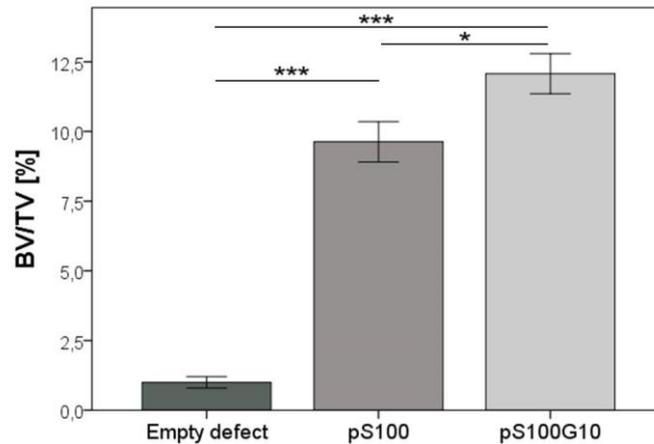


Abb. 11: Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung der Knochen-neubildung des Leerdefekts ($n=7$), der pS100-Gruppe ($n=7$) und der pS100G10-Gruppe ($n=7$). Angewendet wurde ein One-way Anova mit Bonferroni Korrektur. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

3.3.3. Osteoidbildung

Das in der Movat-Pentachrom-Färbung bestimmte mineralisierte Gewebe in den unentkalkten Knochengewebeproben musste nun weiter spezifiziert werden. Zur Differenzierung von unmineralisiertem Gewebe, dem Osteoid, in dunkelpink und mineralisiertem Knochengewebe in schwarz wurde die Kombination der Von Kossa-Van Gieson-Färbung genutzt. Kollagen und Bindegewebe zeigten sich in dieser Färbung hellpink.

In den Proben des Leerdefekts ließ sich viel hellpink angefärbtes Gewebe, das mit einigen etwas stärker pink angefärbten Kollagensträngen durchzogen war, beobachten. Osteoid zeigte sich in der ROI nahe assoziiert zu den Lagerknochentrabekeln.

Insgesamt weniger Osteoid ließ sich dahingegen in den Ersatzmaterialgruppen an der Oberfläche des Lagerknochens erkennen. Auch in diesen Proben fanden sich einige hellpinke Bereiche, die kollagene Fasern im Bindegewebe um die Materialfragmente erkennen ließen.

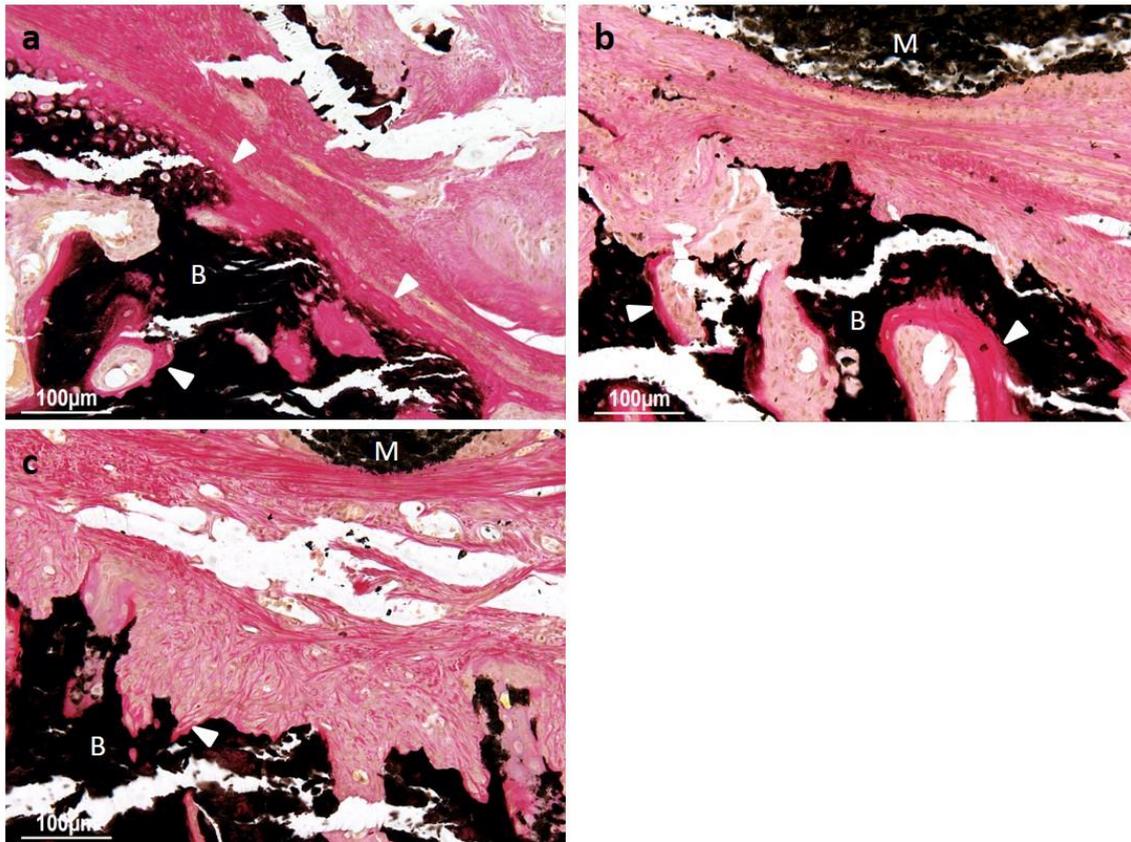


Abb. 12 a-c: Detailaufnahmen der Von Kossa-Van Gieson-Färbung aller Versuchsgruppen. Osteoid (► in weiß) aufgelagert auf Lagerknochenstrabekel im Leerdefekt (a), pS100 (b) und pS100G10 (c). B = Bone, M= Material

Histomorphometrische Auswertung der Bildung von Osteoid

Für die quantitative Bestimmung der Osteoidbildung wurde der Parameter OV/BV ermittelt. Hier spiegeln sich auch die Beobachtungen der deskriptiven Histologie wider mit signifikant höherer Osteoidformation der Leerdefekt-Gruppe im Vergleich zu den Materialgruppen pS100 ($p=0,009$) und pS100G10 ($p=0,004$) (Abb. 13). Innerhalb der Materialgruppen ergab sich im Vergleich kein signifikanter Unterschied ($p=0,372$). Unter den Versuchsproben fanden sich zwei Knochengewebeproben der pS100G10-Gruppe, die nicht auswertbar waren.

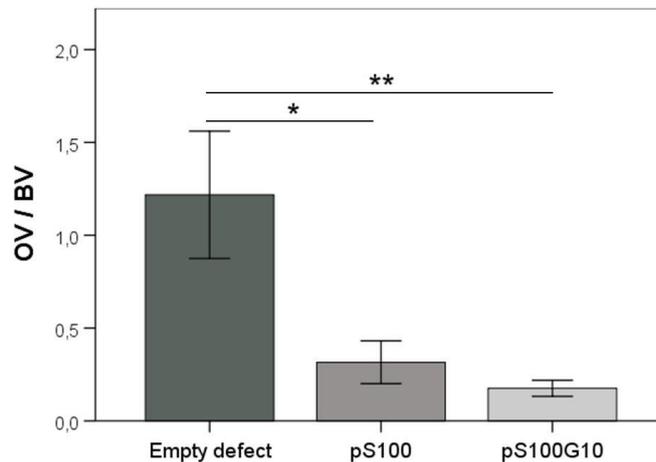


Abb. 13: Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung der Osteoidformation in der ROI mit Leerdefekt (n=7), pS100 (n=7) und pS100G10 (n=5). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

3.3.4. Marker des Knochenaufbaus

ALP

Die ALP als Marker für die Osteoblastenaktivität zeigte sich als blauer Saum auf den Lagerknochen trabekeln des Frakturspalts. In allen Versuchsgruppen waren Versuchstiere, die sowohl starke Färbungen auf der Knochen trabekeloberfläche zeigten als auch schwache bis keine Färbung. Grundsätzlich fanden sich eher schwache ALP-Aktivitäten in der Leerdefekt-Gruppe (Abb. 14a). Nur zwei der sieben Proben zeigten eine deutliche Blaufärbung in der ROI auf der Knochenoberfläche. Stärkere Reaktionen ließen sich bei den Materialgruppen beobachten (Abb. 14b, 14c). Bei dem pS100-Pastenzement fand sich eine Probe, bei der keine ALP-Aktivität in der festgelegten ROI nachgewiesen werden konnte. Die restlichen Proben dieser Gruppe zeigten alle Blaufärbungen auf der Knochenoberfläche und damit eine erhöhte Osteoblastenaktivität an. In der Gruppe mit dem implantierten pS100G10 war ebenfalls eine vermehrte ALP-Aktivität an den Knochen trabekeln anhand einer stellenweise kräftigen Blaufärbung zu erkennen.

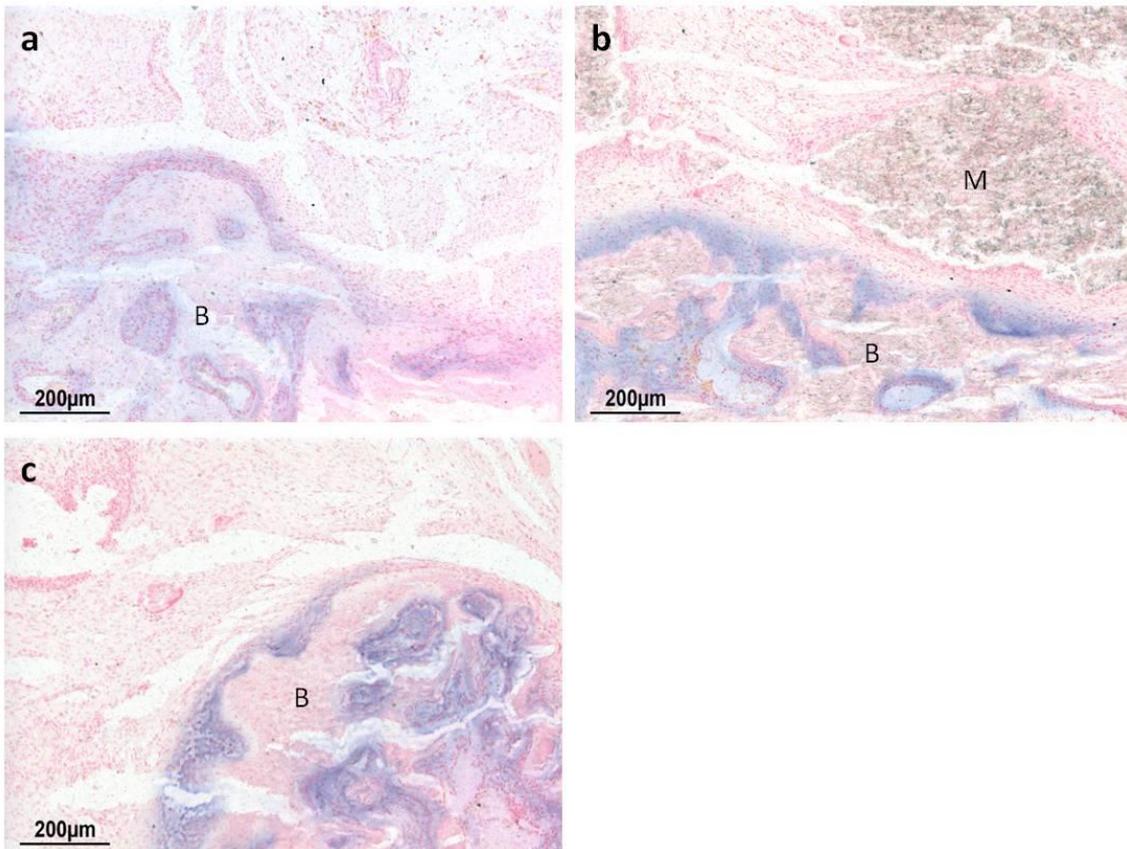


Abb. 14 a-c: Detailaufnahmen des Nachweises von ALP für alle Versuchsgruppen. Blasse Blaufärbung an der distalen Knochenoberfläche des Frakturdefekts in der Leerdefekt-Gruppe (a). Kräftigere Blaufärbung in den Materialgruppen pS100 (b) und pS100G10 (c) an der distalen Knochenoberfläche. B= *Bone*, M=Material

Histomorphometrische Auswertung der Osteoblastenaktivität

Zur Quantifizierung der Osteoblastenaktivität wurde die ALP-positive Fläche bestimmt und normalisiert auf das BV. In den Materialgruppen ließ sich im Gegensatz zum Leerdefekt eine erhöhte Osteoblastenaktivität mittels Histomorphometrie nachweisen. Hierbei zeigte sich statistische Signifikanz beim Vergleich des Leerdefekts mit der pS100-Gruppe ($p=0,037$) (Abb. 15). Auch im Vergleich mit der pS100G10-Gruppe war ein Unterschied zu erkennen, jedoch erreichten die Werte keine statistische Signifikanz ($p=0,063$). Mit $p=0,775$ zeigte sich kein Unterschied innerhalb der Ersatzmaterialgruppen.

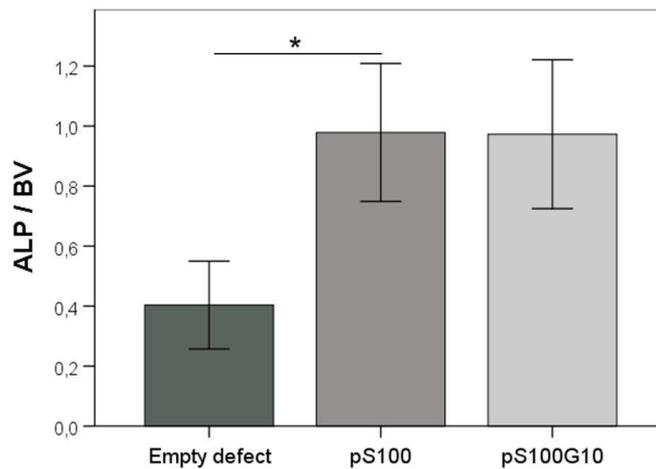


Abb. 15: Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung der Osteoblastenaktivität für Leerdefekt (n=6), pS100 (n=6) und pS100G10 (n=7). Angewendet wurde ein Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

OCN

An der Oberfläche der Lagerknochen trabekel von Ratten der Leerdefekt-Gruppe konnten OCN-positive Reaktionen am Rande der ROI ausgemacht werden (Abb. 16). In den Materialgruppen wurde besonders der Zement gelb-bräunlich angefärbt (Abb. 17a, 17c). Auch vereinzelt kräftig braun angefärbte Bereiche an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche ließen OCN-positive Reaktionen erkennen. Eine klare Detektion von OCN-positiven Zellen ließ sich jedoch nicht ausmachen, sondern es ließen sich unregelmäßig angefärbte flächige Bereiche erkennen (Abb. 17b, 17d).

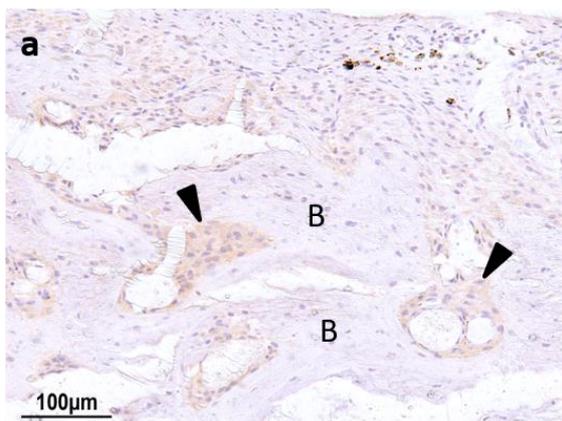


Abb. 16: Detailaufnahme des Nachweises von Osteocalcin für den Leerdefekt. Osteocalcin-positive Reaktionen (►) auf der Lagerknochenoberfläche am Rande der ROI. B = bone.

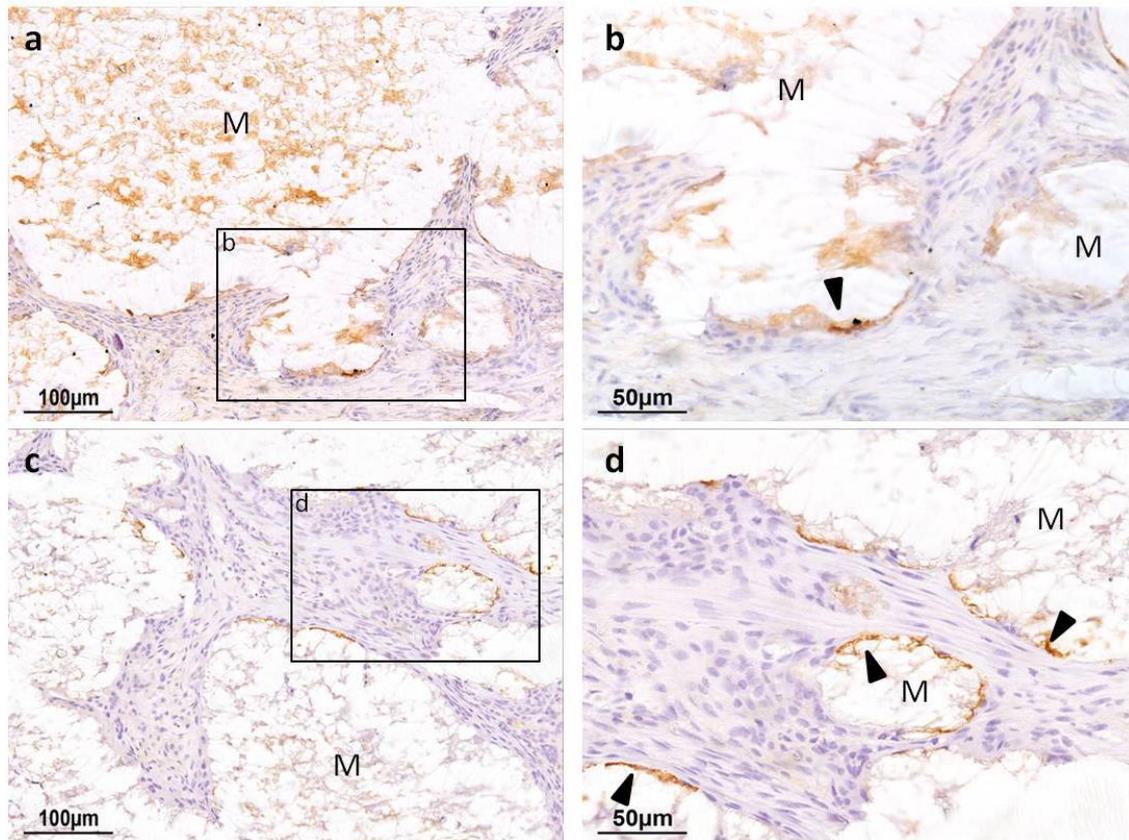


Abb. 17 a-d: Detailaufnahmen des Nachweises von Osteocalcin für die Ersatzmaterialgruppen. Osteocalcin-positive Reaktionen (►) in der pS100-Gruppe (a, b), sowie in Proben der pS100G10-Gruppe (c, d) an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche. M= Material.

3.3.5. Marker des Knochenabbaus

TRAP

Um die Aktivität reifer Osteoklasten im osteoporotischen Knochen in Gegenwart des antiosteoklastisch wirkenden Strontium im Knochenersatzmaterial zu beleuchten, wurde die von Osteoklasten gebildete TRAP in den Rattenknochenproben nachgewiesen. Das Enzym wird nicht ausschließlich von Osteoklasten produziert, sondern auch von den phagozytotischen ein- oder mehrkernigen Makrophagen.

Im Leerdefekt fanden sich die TRAP-positiven Zellen in der ROI grundsätzlich vermehrt auf dem Knochengewebe und in unmittelbarer Nachbarschaft zur Knochenoberfläche (Abb. 18a). In den Ersatzmaterialgruppen ließen sich die TRAP-positiven Zellen vereinzelt an den Trabekeln des Lagerknochens des Frakturspalts beobachten und häufig an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche (Abb. 18b, 18c). In zwei Proben der pS100-Gruppe waren in der ROI keine TRAP-positiven Reaktionen zu finden.

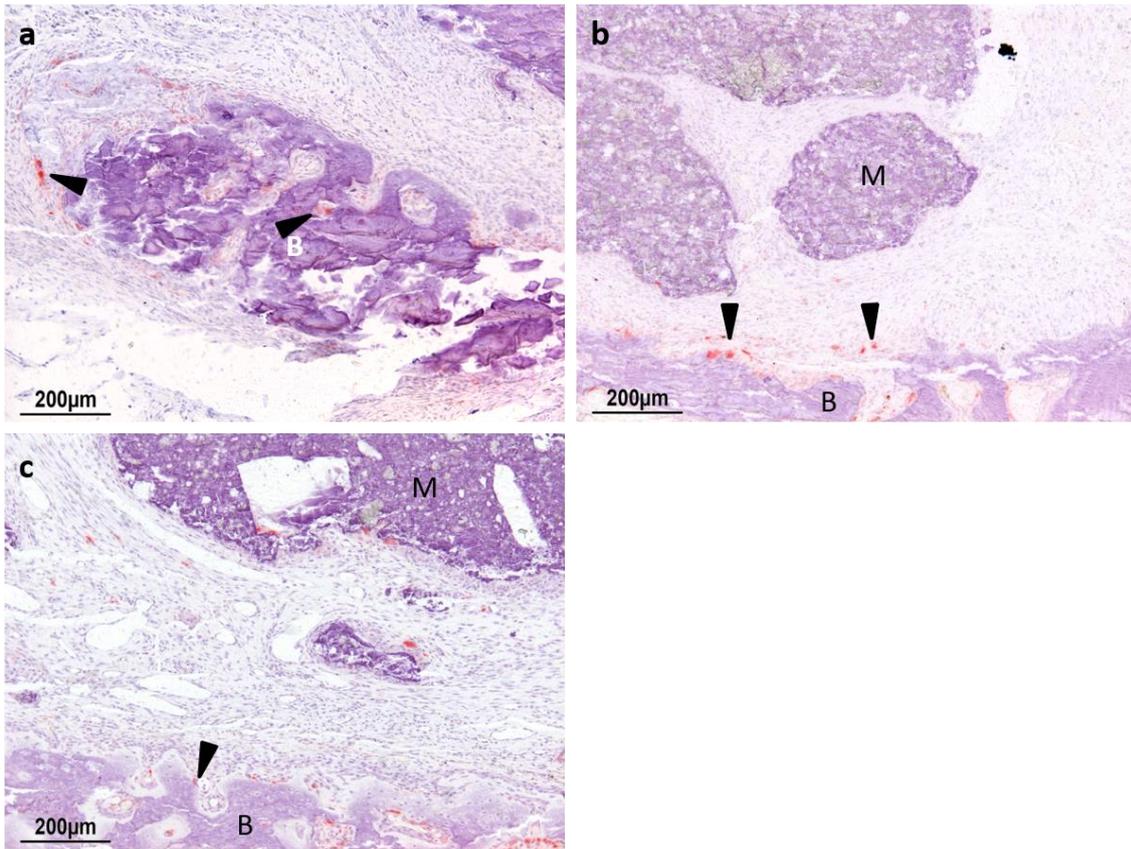


Abb. 18 a-c: Detailaufnahmen von TRAP-positiven Zellen für alle Versuchsgruppen. Viele TRAP-positive Zellen (▶) an der Knochenoberfläche eines Knochenfragments in der Leerdefektgruppe (a). TRAP-positive Zellen an der Knochenoberfläche und vereinzelt an der Materialoberfläche von pS100 und pS100G10 (▶) (b, c). B=Bone, M=Material.

Im statistischen Vergleich der Versuchsgruppen zeigten sich signifikant vermehrt TRAP-positive Zellen im Leerdefekt im Gegensatz zur pS100- ($p=0,004$) und pS100G10-Gruppe ($p=0,003$) normalisiert auf BV (Abb. 19). Bei den Materialgruppen zeigte sich kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p=0,144$).

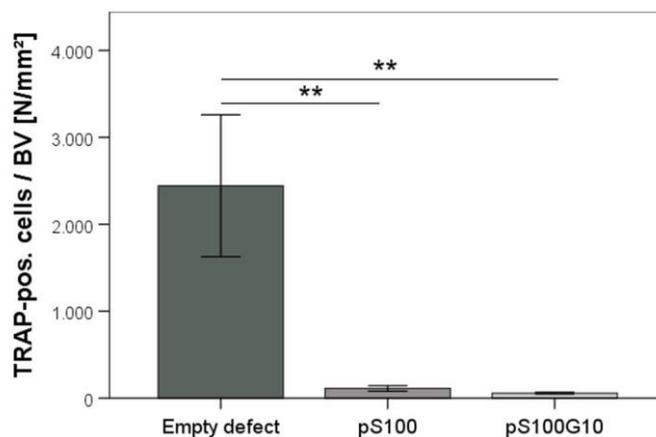


Abb. 19: Graphische Darstellung der nachgewiesenen TRAP-positiven Zellen normalisiert auf BV für den Leerdefekt ($n=7$), die pS100- ($n=5$) und pS100G10-Gruppe ($n=6$). Angewendet wurde ein Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

TRAP an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche

TRAP-positive Reaktionen ließen sich in den Materialgruppen vermehrt um die Materialfragmente erkennen. In der pS100-Gruppe zeigten sie sich besonders an der Oberfläche des Zements nahe des Lagerknochens am Rande der ROI (Abb. 20a, 20b). Im Vergleich dazu fanden sich zahlreiche TRAP-positive Zellen in der pS100G10-Gruppe auch im Zentrum der ROI um die Zementfragmente (Abb. 20c, 20d).

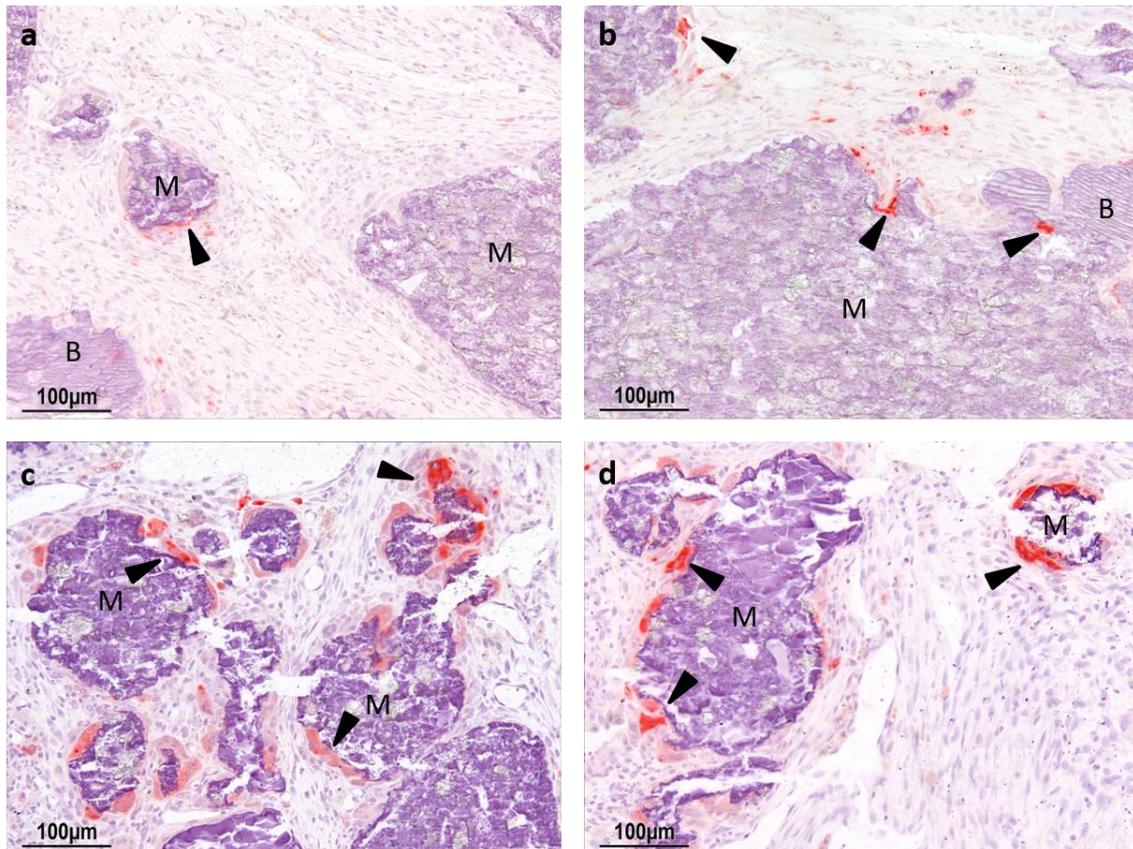


Abb. 20 a-d: Detailaufnahmen von TRAP-positiven Zellen (▶) an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche in je zwei verschiedenen Bereichen einer Probe von pS100 (a, b) und pS100G10 (c, d). B=Bone, M=Material.

Im Unterschied zur pS100-Gruppe zeigten sich in der pS100G10-Gruppe von allen gezählten positiven Reaktionen anteilig mehr TRAP-positive Zellen an den Materialfragmenten. Die Werte erreichten im Vergleich statistische Signifikanz mit $p=0,042$ (Abb. 21).

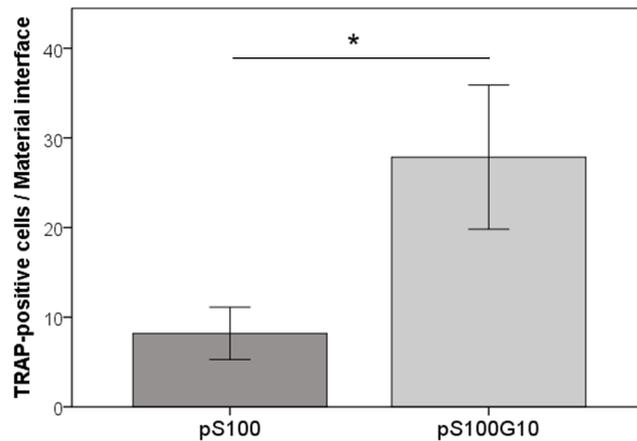


Abb. 21: Graphische Darstellung der nachgewiesenen TRAP-positiven Zellen an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche für pS100 (n=5) und pS100G10 (n=7). Es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$

ED1

Um die Zellen, die mit TRAP angefärbt werden konnten und sich an der Materialoberfläche zeigten, noch weiter zu untersuchen, wurde das Antigen ED1 mithilfe von Immunhistochemie detektiert. Bei ED1 handelt es sich um einen Antikörper gegen CD 68 in den Zellen der Monozyten/Makrophagen-Reihe bei Ratten.

In den osteoporotischen Knochengewebeproben ohne Ersatzmaterial zeigte sich eine irreguläre Verteilung von ED1-positiven Zellen im Frakturspaltdefekt (Abb. 22a). In einigen Proben ließen sich vermehrt positive Reaktionen um die Knochenfragmente und -splitter in der ROI beobachten. Bei pS100 als auch bei pS100G10 ließen sich die positiven Reaktionen ebenfalls auf den Lagerknochen trabekeln erkennen (Abb. 22b, 22c).

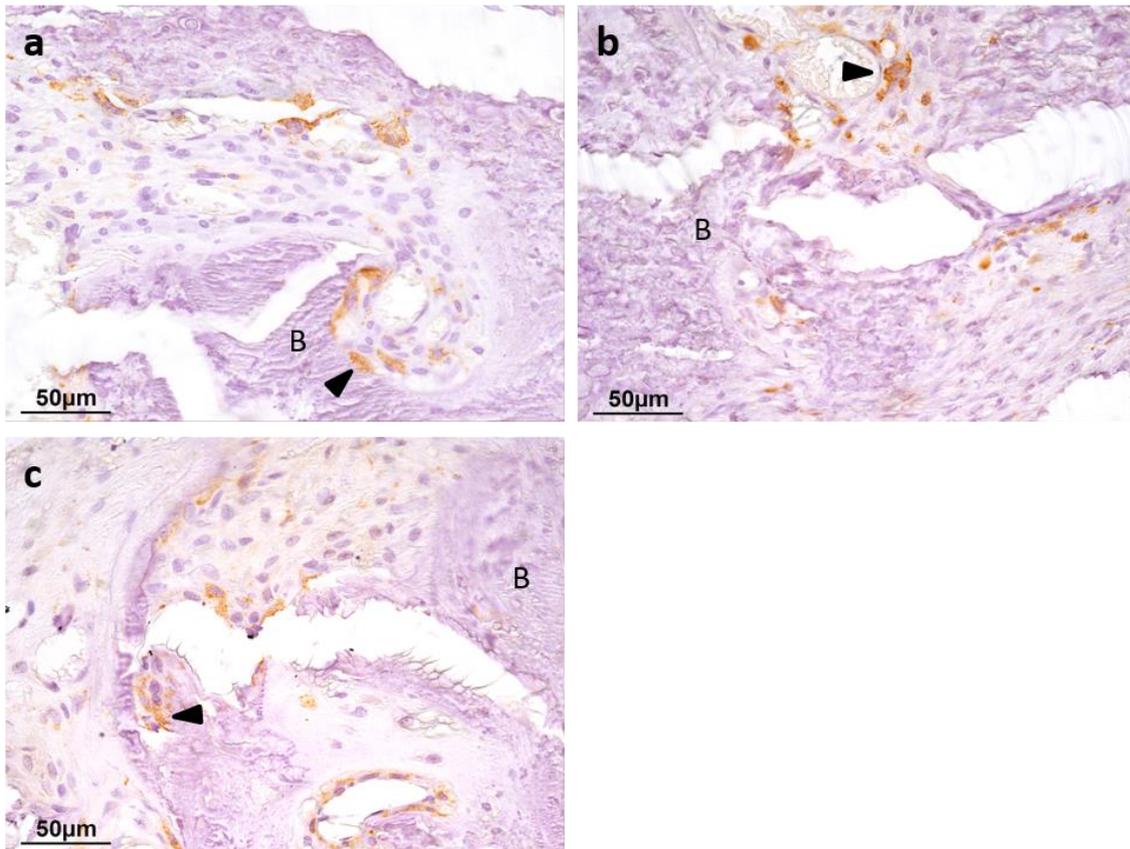


Abb. 22 a-c: Detailaufnahmen von ED1-positiven Zellen für alle Versuchsgruppen an der Knochenoberfläche. Leerdefekt (a), pS100- (b) und pS100G10-Gruppe (c) mit ED1-positiven Zellen (►). B = Bone

ED1 an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche

Die Ersatzmaterialgruppen zeigten vermehrt Degradationsprozesse an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche mit vielen ED1-positiven Zellen direkt um die Materialfragmente (Abb. 23a-d).

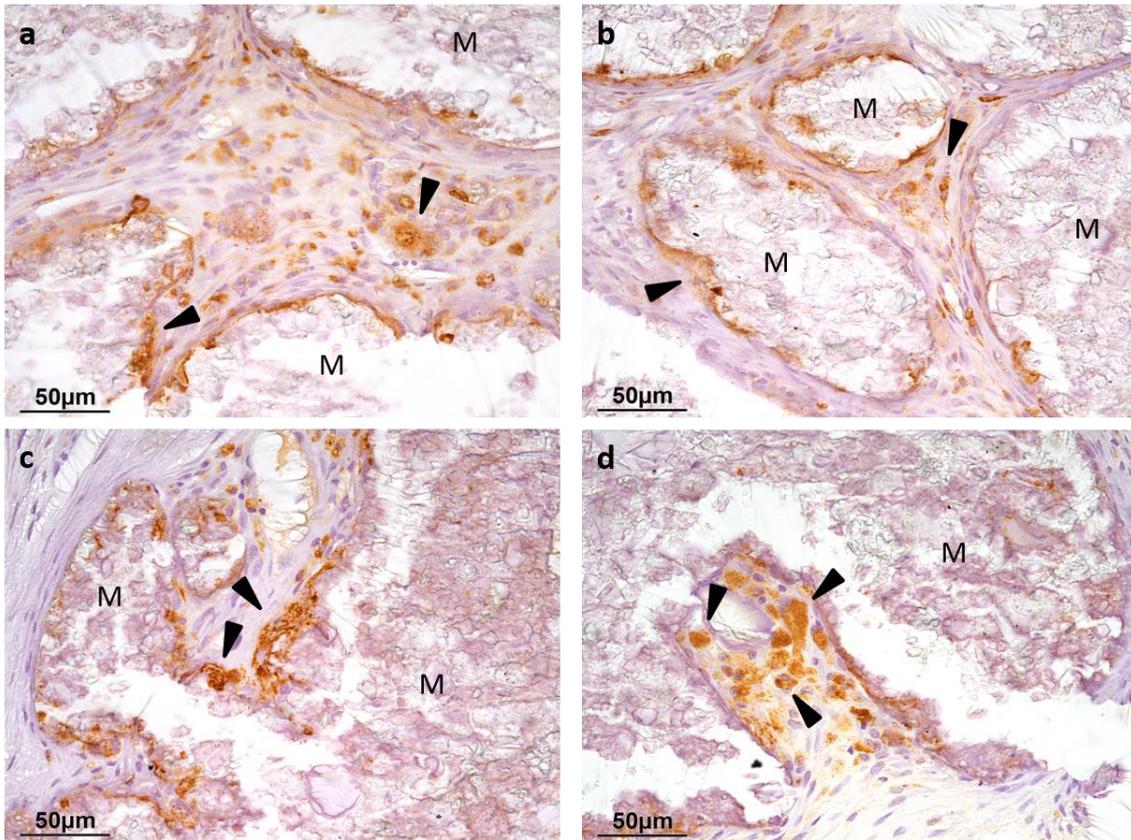


Abb. 23 a-d: Detailaufnahmen von ED1-positiven Zellen (►) direkt an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche in je zwei verschiedenen Bereichen einer Probe von pS100 (a, b) und pS100G10 (c, d). M= Material.

Der Vergleich innerhalb der Ersatzmaterialgruppen von ED1-positiven Zellen in der ROI ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,565$) (Abb. 24).

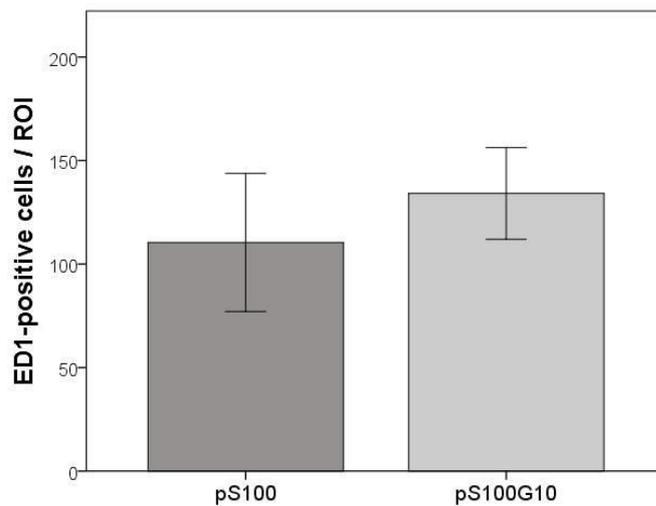


Abb. 24: Graphische Darstellung der nachgewiesenen ED1-positiven Zellen an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche der Proben der pS100- ($n=7$) und pS100G10-Gruppe ($n=7$). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

3.3.6. Angiogenese

α -SMA

Zur Untersuchung der Blutgefäßneubildung in der ROI diente der immunhistochemische Nachweis von α -SMA zur Detektion von Gefäßanschnitten in den lichtmikroskopischen Aufnahmen. Blutgefäße in Muskelgewebe, das den Knochen umgab und auch in die ROI hineinragte, wurden nicht erfasst.

Im Leerdefekt ließen sich Gefäße irregulär im Bindegewebe verteilt beobachten (Abb. 25a). Diese zeigten vermehrt ein kleines Lumen. Stellenweise fanden sich großlumige Gefäße. Hier wiesen diese keine starke Antigen-Antikörper-Reaktion auf.

In den Ersatzmaterialgruppen zeigten sich die Gefäßanschnitte um die Materialreste (Abb. 25c). Somit fanden sich in den bindegewebigen Strängen um die Materialfragmente Gefäßanschnitte, die kleine Lumen erkennen ließen (Abb. 25b). Darüber hinaus ließen sich auch im Randgebiet des Frakturspaltdefekts Gefäßanschnitte mit sowohl kleinen als auch stellenweise großen Lumen beobachten.

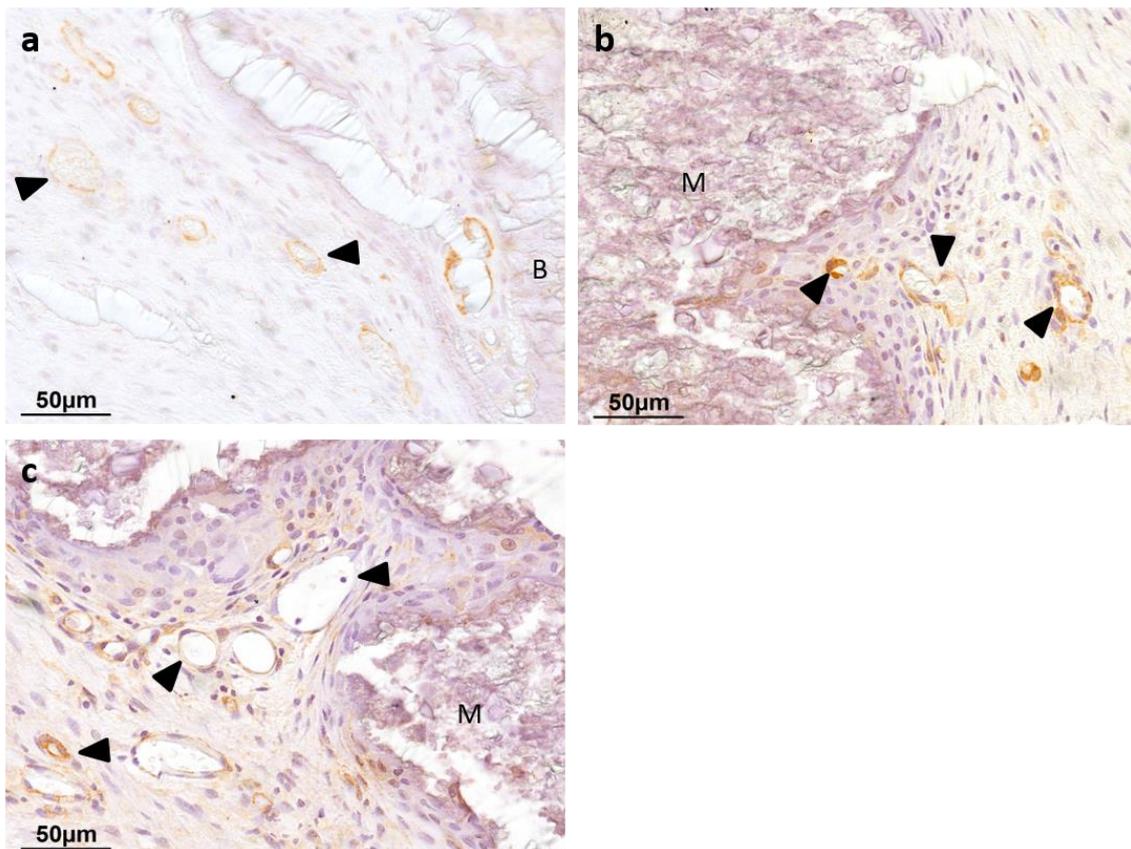


Abb. 25 a-c: Detailaufnahmen des Nachweises von α -SMA (\blacktriangleright) pS100 (a,b) und pS100G10 (c,d) nahe der Lagerknochenoberfläche (a,c) und zentral in der ROI (b,d). B= *bone*, M= *Material*

In der pS100G10-Gruppe fanden sich statistisch signifikant vermehrt Gefäße in der ROI um die Materialfragmente im Vergleich mit dem Leerdefekt ($p=0,031$). Der Vergleich innerhalb der Ersatzmaterialgruppen ergab keinen signifikanten Unterschied der Blutgefäßanzahl in der ROI ($p=0,078$). Innerhalb der Gruppen Leerdefekt und pS100 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p=0,223$) (Abb. 26).

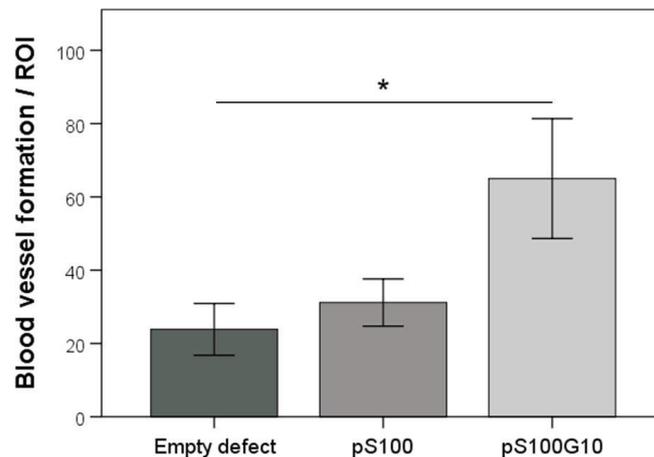


Abb. 26: Graphische Darstellung der mithilfe von α -SMA nachgewiesenen Blutgefäße in den Proben des Leerdefekts ($n=7$), des pS100 ($n=6$) und pS100G10 ($n=6$). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

3.3.7. Marker der extrazellulären Matrix

BMP-2

Als von Osteoblasten exprimiertes Protein mit osteoinduktiven Eigenschaften, zeigte BMP-2 in der Immunhistochemie in allen Versuchsgruppen auf der Lagerknochenoberfläche des Frakturspaltdefekts eine ausgeprägte Expression. Jedoch ließ sich in der Leerdefekt-Gruppe ein positiver BMP-2-Proteinnachweis nur auf Verknöcherungen des Rattenknochens innerhalb der ROI und auf den Knochenfragmenten und -splittern erkennen (Abb. 27a, 27b). Im Gegensatz dazu fand sich in den Materialgruppen neben starkem BMP-2-Nachweis auf den Knochenoberflächen des Frakturspaltdefekts (Abb. 27c, 27e) eine auffällige BMP-2-Expression der ein- und mehrkernigen Zellen der Material-Bindegewebe-Grenzfläche saumartig direkt um die Materialfragmente (Abb. 27d, 27f). Bei diesen Zellen handelt es sich unter anderem um Riesenzellen bzw. Makrophagen (Abb. 27f).

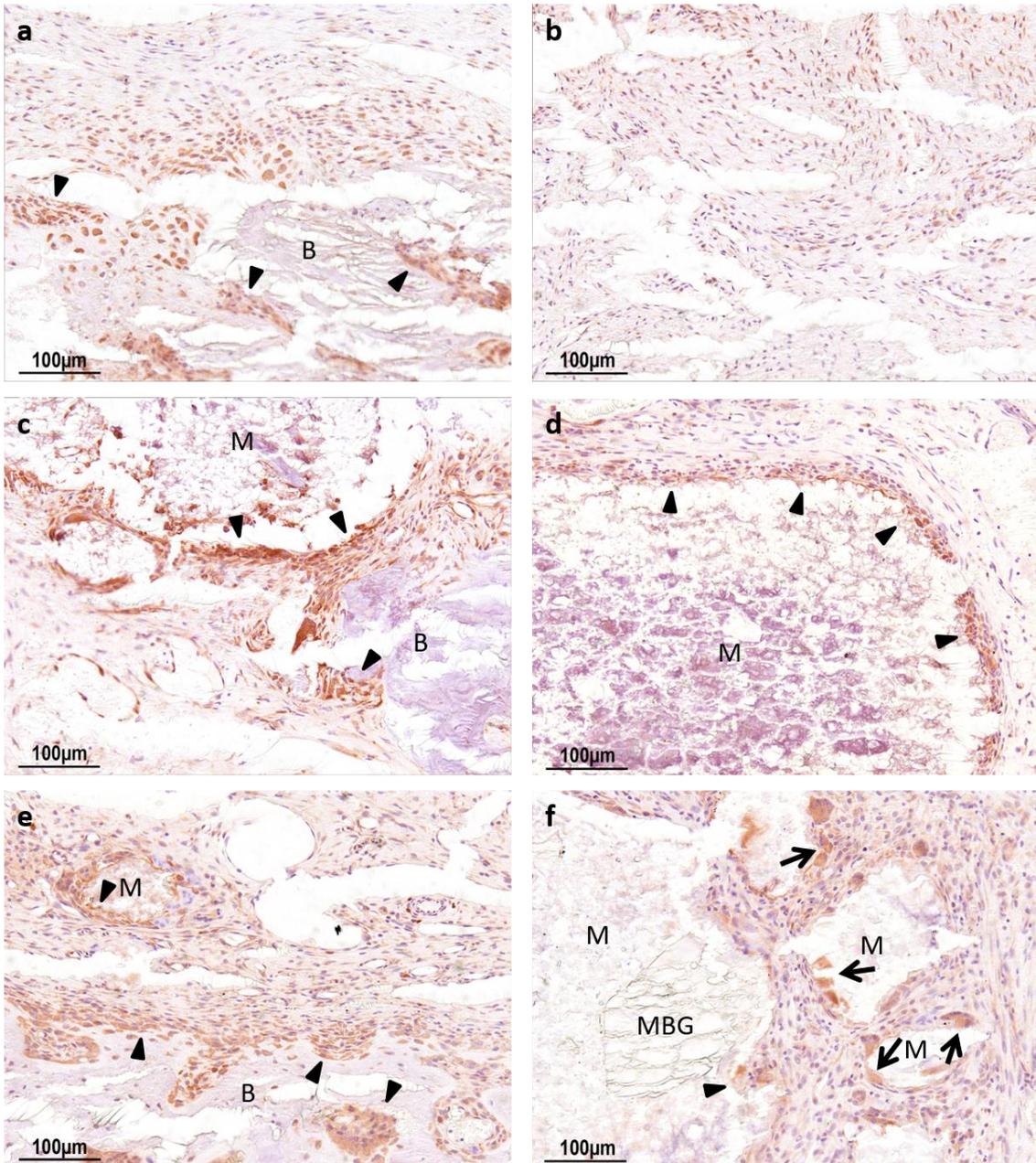


Abb. 27 a-f: Detailaufnahmen der Detektion von BMP-2 (▶) für alle Versuchsgruppen am Knochen (a, c, e) und im Zentrum der ROI (b, d, f). BMP-2-Nachweis auf der Knochenoberfläche und vereinzelt in der ROI für den Leerdefekt (a, b). Vermehrte BMP-2-Expression um die Materialfragmente für pS100 (c, d) und pS100G10 (e, f). Riesenzellen (→) M=Material, B= Bone, P = Partikel.

3.3.8. RANKL/OPG-System

RANKL

Als Schlüsselregulator der Osteoklastogenese zeigte RANKL im osteopenen Knochen in den Proben der Kontrollgruppe, dem Leerdefekt, mehr detektierte Antigen-Antikörper-Reaktionen in der gesamten ROI (Abb. 28a, 28b) als in den Versuchstieren mit dem antiosteoklastisch-wirkenden Strontium-haltigen Knochenersatzmaterial (Abb. 29a, 29b).

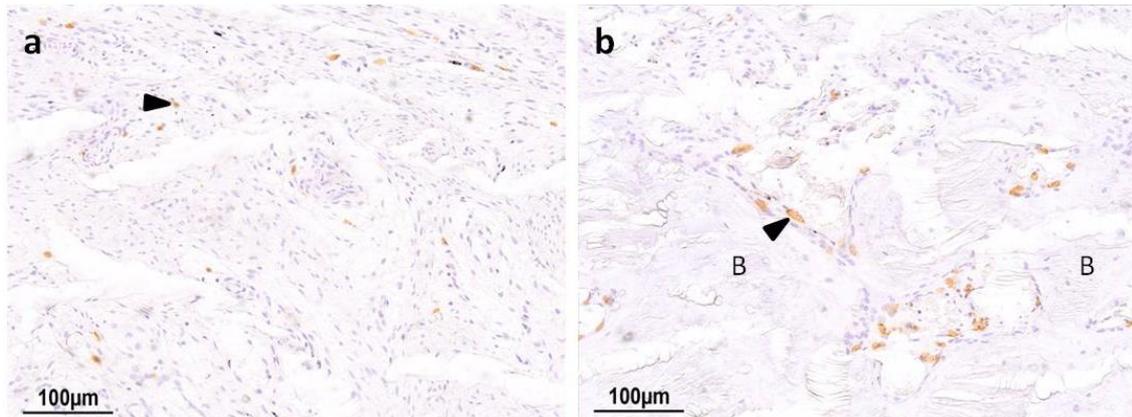


Abb. 28 a, b: Detailaufnahmen des Nachweises von RANKL für den Leerdefekt. RANKL-positive Zellen (▶) im Zentrum der ROI im Bindegewebe (a) und an der Lagerknochenoberfläche (b). B= bone

Fanden sich immunhistochemische Reaktionen in den Materialgruppen, so ließen sich diese nur an den Knochen trabekeln erkennen (Abb. 29a, 29b).

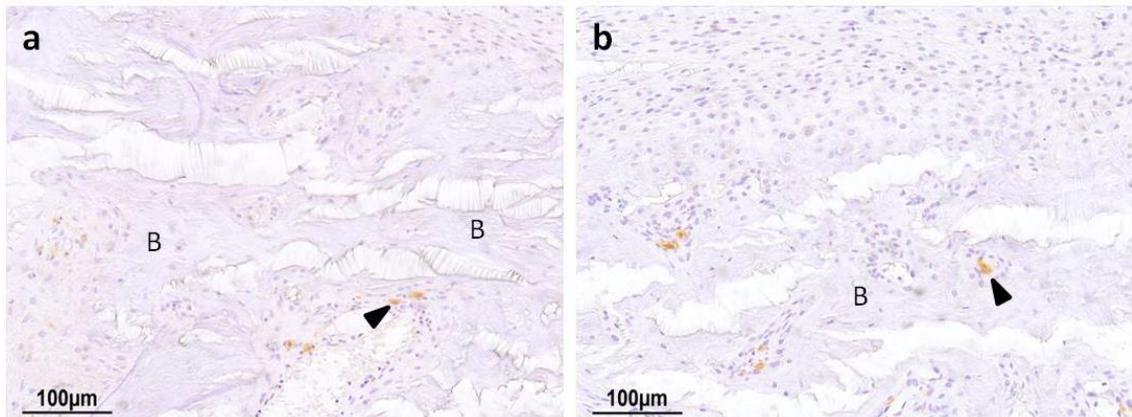


Abb. 29 a, b: Detailaufnahmen des Nachweises von RANKL für die Ersatzmaterialgruppen. RANKL-positive Reaktionen (▶) in der pS100- (a) und pS100G10-Gruppe (b) an der Knochenoberfläche. B= bone

Die Nachweisbarkeit von RANKL war in den Ersatzmaterialgruppen signifikant geringer als in der Leerdefektgruppe (pS100: $p=0,003$; pS100G10: $p=0,004$). Innerhalb der

Gruppen mit dem implantierten Pastenzement konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ($p=0,389$) (Abb. 30).

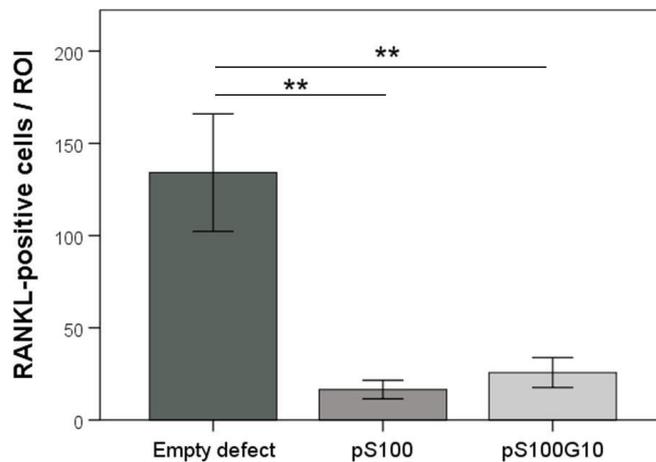


Abb. 30: Graphische Darstellung der nachgewiesenen RANKL-positiven Zellen für den Leerdefekt ($n=7$), die pS100- ($n=6$) und pS100G10-Gruppe ($n=7$). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

OPG

Das von Osteoblasten sezernierte OPG hemmt durch die Bindung an RANKL die Osteoklastogenese. OPG-Expression fand sich im Leerdefekt an den Knochen trabekeln des Frakturspaltdefekts und vereinzelt in der ROI verteilt (Abb. 31a). In Gegenwart der Strontium-haltigen Ersatzmaterialien zeigten sich stellenweise um die Materialfragmente detektierte Zellen (Abb. 31b, 31c). In einigen Proben der pS100G10-Gruppe, in denen die auffälligen Partikel eine Zellbesiedelung zeigten, fanden sich starke OPG-Reaktionen (Abb. 31c).

In der statistischen Auswertung zeigte sich im Vergleich der drei Versuchsgruppen je ein signifikanter Unterschied der pS100-Gruppe zum Leerdefekt und zur pS100G10-Gruppe (Leerdefekt: $p=0,028$; pS100G10: $p=0,006$). Der Vergleich der beiden Materialgruppen ergab keinen signifikanten Unterschied im Nachweis von OPG-positiven Zellen ($p=0,1$) (Abb. 32).

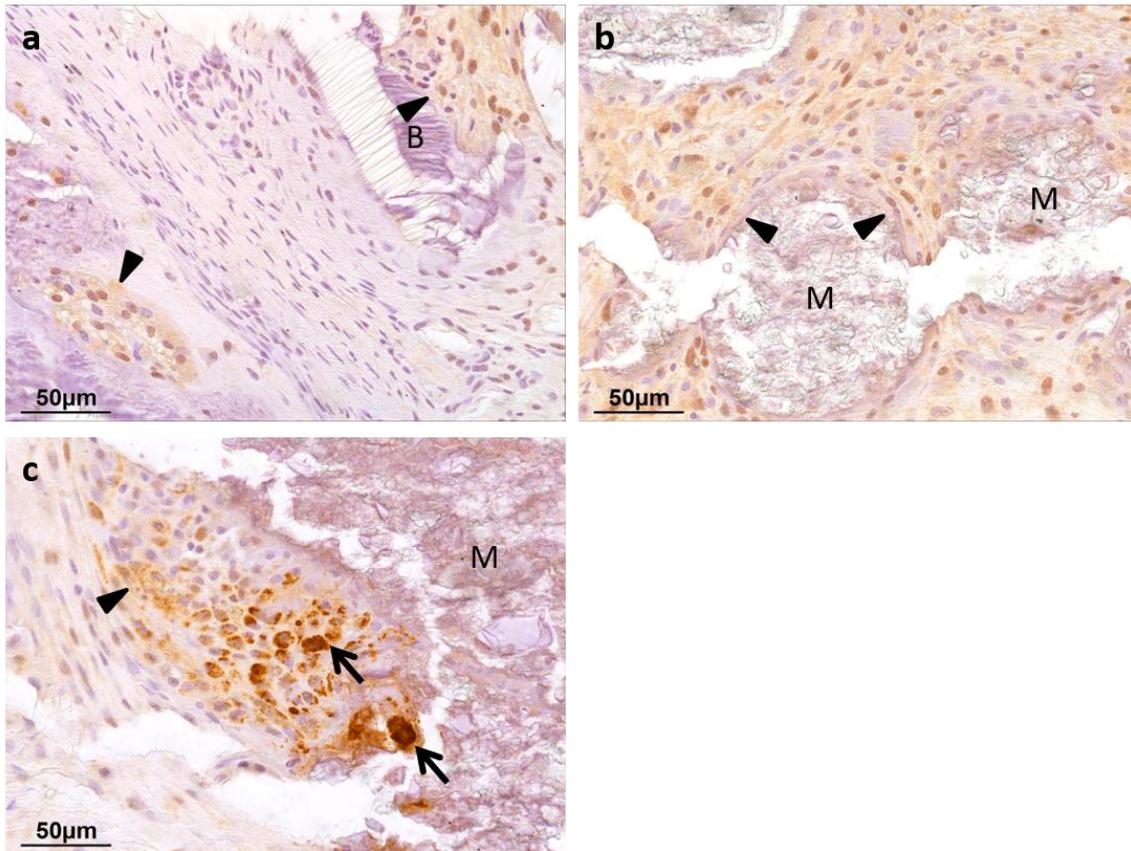


Abb. 31 a-c: Detailaufnahmen des Nachweises von OPG (▶) für alle Versuchsgruppen. Braunfärbung an Knochenoberfläche (a) des Leerdefekts. Zentral in der ROI um Materialfragmente braune Färbung (b). Kräftige OPG-Reaktionen an der Materialoberfläche der pS100G10-Gruppe (→) (c). B= *bone*, M= *Material*

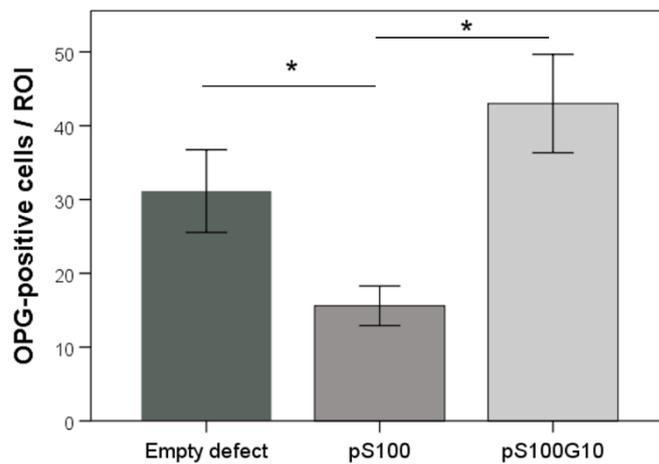


Abb. 32: Graphische Darstellung der nachgewiesenen OPG-positiven Zellen für den Leerdefekt (n=7), die pS100- (n=7) und pS100G10-Gruppe (n=7). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.

RANKL/OPG-Ratio

Die RANKL/OPG-Ratio erlaubt eine Aussage über das zelluläre Gleichgewicht im Frakturspaltdefekt sechs Wochen nach der Femurosteotomie. Erhöht zeigt sich die Ratio mit erhöhter Osteoklastenaktivität z.B. bei einer *high-turnover*-Osteoporose. Bei den osteoporotischen Versuchstieren ohne Ersatzmaterial ließ sich eine erhöhte RANKL/OPG-Ratio beobachten. Die mit Strontium modifizierten Materialgruppen zeigten dahingegen im Vergleich zum Leerdefekt eine statistisch signifikant niedrigere RANKL/OPG-Ratio (pS100: p=0,004; pS100G10: p=0,003) (Abb. 33).

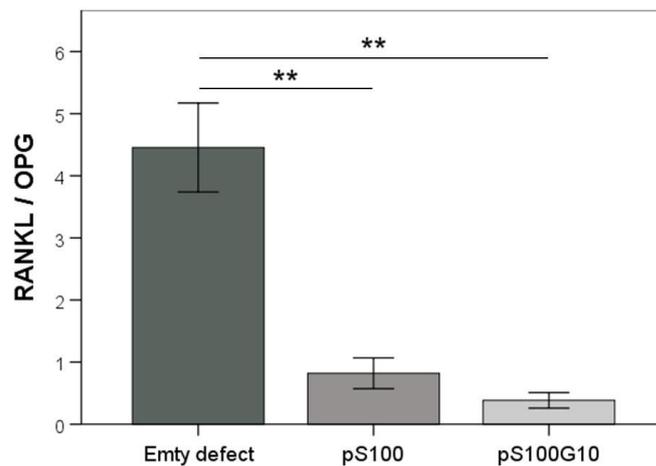


Abb. 33: Graphische Darstellung der RANKL/OPG-Ratio für alle Versuchsgruppen (Leerdefekt: n=7; pS100: n=6; pS100G10: n=6). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,005; ***: p < 0,001.

4. Diskussion

Die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien, die die Heilung und Regeneration von osteoporosebedingten Frakturen und somit das Outcome der Patienten verbessern, stellt eine Herausforderung dar. Bei steigenden Inzidenzen im Zuge des demographischen Wandels der westlichen Gesellschaft wird das Thema noch relevanter. Kriterien wie Biokompatibilität, Osteokonduktivität und Resorbierbarkeit machen gut kompatible Knochenersatzmaterialien aus (Giannoudis et al. 2007). Calciumphosphat-Zemente verfügen über diese Kriterien und durch die Substitution von bioaktiven Strontium-Ionen konnte nachweislich eine vermehrte Knochenneubildung erreicht werden (Thormann et al. 2013; Baier et al. 2013). Ebenfalls konnte eine verbesserte Materialdegradation durch die Strontium-modifizierten Calciumphosphat-Zemente beobachtet werden (Thormann et al. 2013).

Jedoch war die Resorptionsrate noch zu gering, um eine verbesserte knöcherne Durchbauung des Frakturdefekts kritischer Größe und gleichzeitig ausreichend Stabilität zu garantieren (Wagner et al. 2019). Zur Beschleunigung des Materialabbaus wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung der Technischen Universität Dresden ein Strontium-substituierter Calciumphosphat-Zement entwickelt, der mit mesoporösem, bioaktivem Glas versetzt war. Das Bioglas wird beschrieben als raschresorbierbar im Vergleich zur Zementmatrix und sollte das Einwachsen von Bindegewebe und damit die Materialdegradation beschleunigen (Wagner et al. 2019). Weitere Besonderheit des Zements war, dass dieser premixed und somit ein gebrauchsfertiger Pastenzement war (Lode et al. 2018).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Effekte des Strontium-substituierten Calciumphosphat-Pastenzements, der mit mesoporösem bioaktivem Glas ergänzt war, nach der Implantation in einen keilförmigen, metaphysären Frakturspaltdefekt kritischer Größe bei Ratten mit osteopenem Knochenstatus. Zum Vergleich diente ein Strontium-substituierter Calciumphosphat-Pastenzement ohne zugesetzte Glaspartikel sowie eine Versuchsgruppe, bei der der Frakturdefekt ohne Auffüllung mit Ersatzmaterial belassen wurde. Die hierbei erbrachten Ergebnisse sollen in den Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstands eingeordnet werden. Ebenfalls soll der Einsatz von Pastenzementen in Bezug auf klinische Aspekte wie Handhabung und

Applizierbarkeit in Verbindung mit in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen beleuchtet und diskutiert werden.

4.1. Frakturmodell und Methodik

Mithilfe des in der vorliegenden Arbeit angewendeten Tiermodells der ovariectomierten Sprague Dawley Ratte in Kombination mit einer speziellen Ernährung der Tiere konnte in mehreren Studien nachweislich eine reduzierte Knochenflächendichte provoziert und Osteopenie bzw. Osteoporose bei den Tieren induziert werden (Heiss et al. 2012; Alt et al. 2013; Ray et al. 2016). Das Modell war gut reproduzierbar. Das angewendete Frakturmodell war ebenfalls zuvor mehrfach erfolgreich in der Untersuchung der osteoporotischen bzw. osteopenen Frakturheilung und Testung verschiedener Biomaterialien erprobt (Thormann et al. 2013; Ray et al. 2016; Ray et al. 2018). Während der Realisierung der Studie verstarben zwei der 32 Versuchstiere an postoperativen Komplikationen. Nach Einbettung und Schneiden der Rattenknochen zeigte sich dann bei einigen Knochnschnitten eine fehlende Auswertbarkeit. Das Anlegen einer ROI war nicht möglich.

Versagt implantiertes Osteosynthesematerial bei niedriger Knochenqualität oder tritt eine Pseudarthrose auf, so gestaltet sich die weitere Therapie des osteopenen oder osteoporotischen Knochens als schwierig. Im klinischen Alltag ist dies ein bekanntes Problem. Grund hierfür sind Frakturdefekte mit kritischer Größe, bei denen eine knöcherne Überbrückung innerhalb des normalen Heilungsintervalls ausbleibt (Alt et al. 2013). Das autologe Knochentransplantat als Goldstandard birgt in der Gewinnung Komplikationen (Dimitriou et al. 2011). Um die osteoporotische Frakturheilung zu unterstützen und komplikationsreiche Verläufe zu minimieren, bedarf es also der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien, die den Anforderungen des systemisch erkrankten Knochens angepasst sind. Diese sollten anhand von Defekten kritischer Größe getestet werden, um die klinische Situation widerzuspiegeln (Alt et al. 2013). In der vorliegenden Studie dient hierzu die Leerdefekt-Gruppe, bei der der Frakturdefekt mit kritischer Größe belassen wird.

Nach sechs Wochen zeigten sich die Frakturdefekte des Leerdefekts wie auch der Materialgruppen nicht knöchern konsolidiert. Die Frakturheilung des osteopenen Knochens ist allgemein verzögert. Eine Verzögerung der Knochenheilung beschrieben schon Alt et al. (2013) bei der Entwicklung des in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Frakturdefektmodells bei der ovariectomierten Ratte. Dennoch konnten wir eine verbesserte Frakturheilung durch die Implantation der Biomaterialien beobachten.

Die Testung des mit MBG versetzten Strontium-substituierten Calciumphosphat-Pastenzements im Zuge einer tierexperimentellen Studie ist die erste ihrer Art.

4.2. Einordnung der Ergebnisse in Hinblick auf die Strontium-Wirkung *in vivo*

In diesem Abschnitt werden die in dieser Studie gemachten Beobachtungen im Hinblick auf die Wirkung von Strontium eingeordnet. Bevor die osteogenen und antiresorptiven Effekte durch Strontium diskutiert werden, soll zunächst die Bestimmung und das Ausmaß der *in vivo* Strontiumfreisetzung beleuchtet werden.

Ein Verfahren, das sich zur Untersuchung der Elutionskinetik von Strontium in Knochenersatzmaterialien bewährt hat, ist die *time-of-flight* Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) (Ni et al. 2010; Thormann et al. 2013; Ray et al. 2018; Kruppke et al. 2020). Das Verfahren erlaubt den Nachweis und die Charakterisierung von komplexen organischen und anorganischen Verbindungen an Materialoberflächen mit einer Auflösung im Nanometerbereich (Fletcher und Vickerman 2013).

Thormann et al. (2013) konnten anhand von ToF-SIMS für den Vorgänger-Knochenzement der in der vorliegenden Studie untersuchten Knochenersatzmaterialien, S100, Strontium bis zu 5 mm entfernt von der Materialoberfläche detektiert werden. Als Tiermodell diente hierfür dasselbe, wie in der vorliegenden Arbeit. Die Kontrollgruppe war ebenfalls ein Leerdefekt, bei der der keilförmige Frakturspaltdefekt mit kritischer Größe von 4 mm nach Osteosynthese ohne Knochenersatzmaterial belassen wurde. Einhergehend mit der Beobachtung der lokalen Strontiumfreisetzung wiesen sie eine signifikant erhöhte Knochenneubildung für den S100 im Vergleich zu einem konventionellen Calciumphosphat-Zement und dem Leerdefekt nach. In der Studie wurde aus den Beobachtungen geschlossen, dass sich Strontium positiv auf die Osteogenese auswirkt. In den Bereichen, in denen via histomorphometrischer Auswertung Knochenneubildung nachgewiesen wurde, zeigten sie mittels ToF-SIMS eine Inkorporation von Strontium in den neuen Knochen (Thormann et al. 2013). Ähnliche Beobachtungen der *in vivo*-Strontiumfreisetzung konnten für den pS100-Zement durch Kern et al. (2019) mittels ToF-SIMS anhand von T9100-Knochenschnitten gemacht werden. Bei den Proben handelte es sich um dieselben Versuchstiere, wie in der vorliegenden Studie. Hierbei konnte sechs Wochen nach der Implantation des Knochenersatzmaterials 4 bis 6 mm entfernt von der Materialoberfläche

Strontium im Rattenknochen detektiert werden. Auch eine Inkorporation von Strontium in trabekulären und kortikalen Knochen konnten sie nachweisen (Kern et al. 2019).

Baier et al. (2013) untersuchten anhand eines Bohrlochdefekts am distalen Femur einen Strontium-freien und einen Strontium-modifizierten Calciumphosphat-Zement in ovariectomierten Ratten. Neben einer schnelleren Osseointegration des Strontium-haltigen Knochenzements in den osteoporotischen Knochen zeigte sich auch eine vermehrte Knochenneubildung (Baier et al. 2013).

Auch in unserer Studie zeigten beide Materialgruppen, pS100 und pS100G10, eine signifikant verbesserte Knochenneubildung im Vergleich mit dem Leerdefekt sechs Wochen nach der Implantation.

Der osteogene Effekt des pS100-Zements wurde durch Lode et al. (2018) *in vitro* anhand von humanen, mesenchymalen Stromazellen nachgewiesen. Durch die lokale Freisetzung der Strontium-Ionen wurde die Proliferation von Vorläuferzellen der Osteoblasten und die Osteogenese mehr stimuliert als in Gegenwart des reinen Calciumphosphat-Pastenzements (Lode et al. 2018).

In vivo konnten wir in unserer Studie anhand des signifikant gesteigerten Nachweises von ALP in der Enzymhistochemie für den Pastenzement ohne Zusatz von Bioglas im Vergleich zum Leerdefekt die begünstigte Osteogenese durch Strontium zeigen. ALP dient als Marker für die Osteoblastenaktivität, da es im Prozess der Knochenbildung von proliferierenden Osteoblasten freigesetzt wird (Chen et al. 2013).

Unmineralisiertes Osteoid fand sich vermehrt dem Lagerknochen aufgelagert in der Leerdefekt-Gruppe. Gegenteilige Resultate erbrachten Thormann et al. (2013) in ihrer Studie. Hier wurde im Leerdefekt wenig Osteoid gefunden, dafür aber am meisten Osteoidbildung in der Materialgruppe mit dem Strontium-modifizierten Calciumphosphat-Zement (Thormann et al. 2013). Ebenfalls konträre Ergebnisse erbrachten Wong et al. (2004) anhand eines Tiermodells mit gesunden Kaninchen bei denen mittels Bohrlochdefekt ein mit Strontium versetzter Hydroxylapatit-Knochenzement getestet wurde. Die Autoren beschreiben eine dem Knochen aufgelagerte, dickere Osteoidschicht im Vergleich zu einem konventionellen PMMA-Knochenzement im Bohrlochdefekt (Wong et al. 2004). Der getestete Strontium-haltige Hydroxylapatit ist im Vergleich zu PMMA osseointegrativ und osteoinduktiv, wodurch sich diese Beobachtung erklären lässt. Bei nachweislich vermehrter Bildung von mineralisierter Knochenmatrix für die Materialgruppen, könnten unsere Beobachtungen durch eine schnellere Mineralisation des Osteoids erklärt werden. Mehr

Instabilität durch fehlendes Biomaterial im Frakturspaltdefekt und alleiniger Osteosynthese könnten die größeren Osteoidauflagerungen des Leerdefekts erklären.

Neben den knochenbildenden Eigenschaften zeigen die bioaktiven Strontium-Ionen der Biomaterialien auch antiresorptive Effekte.

Zur Einschätzung des Gleichgewichts zwischen Knochenresorption und Osteoklastogenese dient die RANKL/OPG Ratio als wichtiger Indikator (Marie 2007). In der vorliegenden Studie konnten wir eine signifikant erhöhte RANKL/OPG Ratio durch signifikant erhöhte RANKL-Expression für den Leerdefekt im Vergleich zu den beiden Knochenersatzmaterialgruppen nachweisen. Dies unterstützt die Annahme, dass die Osteoklastenaktivität bei den osteopenen Ratten erhöht ist. Die lokale Wirkung von Strontium bedingt im Frakturspaltdefekt wiederum die Unterdrückung der Osteoklastogenese und eine Hemmung des Knochenabbaus. Ähnliche Beobachtungen machten Thormann et al. (2013) bei der Testung des Vorgängers der beiden Biomaterialien pS100 und pS100G10, S100, mit einer erhöhten RANKL-Expression. Innerhalb der beiden getesteten Materialgruppen, pS100 und pS100G10, zeigte sich in Bezug auf die RANKL/OPG-Ratio ein vergleichbares Ergebnis.

Der Nachweis von TRAP kann unter anderem Anhalt für die Osteoklastenaktivität geben. Das Enzym wird von phagozytierenden Zellen wie Osteoklasten bei der Knochenresorption und von Makrophagen freigesetzt (Hayman 2008). Mit einer signifikant erhöhten Anzahl an TRAP-positiven Zellen für den Leerdefekt verglichen jeweils mit den beiden Materialgruppen kann erhöhte Osteoklastenaktivität angenommen werden. In Bezug auf pS100 und pS100G10 konnten TRAP-positive Zellen vor allem an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche gefunden werden. Auch für den Strontium-substituierten Calciumphosphat-Zement S100 wurde beschrieben, dass TRAP-positive Zellen besonders an der Materialoberfläche zu finden waren (Thormann et al. 2013).

Von den TRAP-positiv detektierten Zellen kann es sich nicht bei allen erfassten um Osteoklasten handeln, da der Marker nicht spezifisch genug für diese ist und durchaus auch Makrophagen und mehrkernigen Fremdkörperriesenzellen unter den detektierten Zellen sind (Hayman 2008; Thormann et al. 2013). Dennoch fanden sich im Leerdefekt vermehrt TRAP-positive Zellen an der Knochenoberfläche, sodass hier das Auftreten von knochenassoziierten Osteoklasten bei osteopenem Knochenstatus wahrscheinlich ist. Zhang et al. (2014) untersuchten mithilfe eines parodontalen Knochendefekts in ovariectomierten Ratten ein Strontium-versetztes MBG-*scaffold* und eine Strontium-freie Variante des MBG.

Hierbei konnten sie zeigen, dass mit der Ergänzung des Biomaterials durch Strontium die Anzahl der TRAP-positiven Zellen signifikant geringer war im Unterschied zu reinem MBG. Auch sie schlossen aus diesen Ergebnissen auf eine Suppression der Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten durch Strontium (Zhang et al. 2014). Eine weitere Versuchsgruppe zur Testung einer Strontium-freien Pastenzement-Variante fehlt in unserer Studie. Mit ihr wäre eine genauere Einordnung des Effekts von Strontium auf die Knochenheilung unter Verwendung eines reinen Calciumphosphat-Pastenzements möglich gewesen. Jedoch orientierten wir uns in der Planung unserer Studie an den Ergebnissen für den Calciumphosphat-Zement S100, der Vorgänger von pS100 und pS100G10. Dieser hatte, wie zuvor bereits beschrieben, im Vergleich zu seiner Strontium-freien Variante, einem konventionellen Calciumphosphat-Zement, in vivo bereits durch die lokale Freisetzung von Strontium eine signifikant verbesserte Knochenneubildung gezeigt (Thormann et al. 2013). Wir verzichteten deshalb in unserer Studie auf die Testung eines Strontium-freien Pastenzements.

4.3. Stimulation von Osteogenese und Biodegradation durch MBG

Für den ebenfalls durch unsere Arbeitsgruppe entwickelten Strontium-modifizierten Calciumphosphat-Zement S100 wurde eine deutlich verbesserte Knochenneubildung und Materialdegradation nach sechs Wochen Standzeit der Versuchstiere im Vergleich zu einem Strontium-freien Knochenzement beschrieben (Thormann et al. 2013). Jedoch war der Materialabbau allgemein nach dieser Zeit nur gering fortgeschritten. Dieses Phänomen lässt sich erklären durch die kompakte Struktur von Calciumphosphat-Knochenzementen und ihr Mangel an Porosität, wodurch eher nur an der Materialoberfläche eine Degradation passiert (Hasan et al. 2019). Mit der Ergänzung von MBG sollte in unserer Studie die Porenbildung des Strontium-substituierten Calciumphosphat-Zements pS100G10 begünstigt werden, da das Bioglas schneller löslich ist als der Calciumphosphat-Zement (Schumacher et al. 2017). Dadurch sollte der Abbau des Materials im Versuchszeitraum von sechs Wochen beschleunigt sowie das Einwachsen von Bindegewebe und gleichzeitig die Knochenneubildung gesteigert werden.

In der Movat-Pentachrom-Färbung der pS100G10-Gruppe ließen sich in den Materialfragmenten die MBG-Partikel erkennen. Im Randbereich der Fragmente der pS100G10-Gruppe fielen zellbesiedelte MBG-Partikel auf. Da die Zellbesiedlung morphologisch dem umliegenden Granulationsgewebe entsprach, lässt dies eine Invasion von

umliegendem Bindegewebe vermuten. Erklärt werden könnte dies durch die Auflösung des bioaktiven Glases. In der dabei entstehenden Pore siedeln Zellen an, die die Degradation des Materials weiter vorantreiben können.

Die vermehrte Porenbildung des pS100G10 wurde ebenfalls durch Kern et al. (2020) mithilfe von ToF-SIMS beobachtet. Anhand derselben T9100-Knochenschnitte wie in der vorliegenden Arbeit erfolgten Messungen zur Detektion von Hydroxylapatit, Silizium, Strontium und Kollagen für pS100 und pS100G10 sowie für den Leerdefekt. Kern et al. beschreiben für pS100G10 Poren im Bereich von teilweise oder komplett aufgelösten MBG-Partikeln. In diesen Poren der Zementmatrix konnten sie Kollagenfasern mit ToF-SIMS detektieren. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung ließ sich eine derartige Porenbildung für den Bioglas-freien Pastenzement pS100 nicht erkennen (Kern et al. 2020).

Ähnliche Beobachtungen machten Hasan et al. (2019) in ihrer tierexperimentellen Studie zur Testung eines mit Bioglas-Mikrokugeln versetzten, Bruschiit-bildenden Calciumphosphat-Zements. Als Frakturmodell diente hier ein Bohrlochdefekt im proximalen Femur von gesunden Kaninchen, der nach vier und 12 Wochen nach Implantation ausgewertet wurde. Die Autoren berichteten von an der Materialoberfläche beobachteten Hohlräumen, die durch den Abbau der Mikrokugeln entstanden waren und das Einwachsen vom umgebenden Gewebe erlaubten. Gleichmaßen wurde hierdurch die Resorption des Materials unterstützt (Hasan et al. 2019).

Bei der Auflösung von Bioglas in körpereigenen Flüssigkeiten wird eine Carbonat-haltige Hydroxylapatitschicht gebildet, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Mineralphase des Knochens eine starke Bindung zwischen bioaktivem Glas und Knochen generieren kann (Hench 1998). Auch kommt es hierbei zur Freisetzung von Ionen wie Calcium und Silizium, die sich positiv auf die Osteoblastenproliferation, die Stimulation der Angiogenese und die Knochenneubildung auswirken können (Hoppe et al. 2011; Ranmuthu et al. 2020). In unserer Studie wurde ein klinisch relevanter Frakturdefekt kritischer Größe angewandt, bei dem der Frakturspalt in den Materialgruppen neben dem Knochenersatzmaterial zum Großteil mit Granulationsgewebe ausgefüllt war und ein direkter Kontakt von Material bzw. MBG und Knochen trat nur vereinzelt auf. Dennoch wiesen Kern et al. (2020) mittels ToF-SIMS, wie zuvor erwähnt, eine Inkorporation von Silizium in den Bereichen des neu gebildeten Knochens für die pS100G10 Gruppe nach. In der Untersuchung diente der Leerdefekt als Kontrollgruppe, in der sich das natürliche Vorkommen

von Silizium im Knochen im Vergleich zum Silizium-Nachweis für die pS100G10-Gruppe nur schwach detektieren ließ (Kern et al. 2020).

Darüber hinaus konnten wir mittels histomorphometrischer Auswertung eine signifikant gesteigerte Knochenneubildung für den mit Bioglas versetzten Knochenzement im Vergleich zum pS100 nachweisen. Dieses Ergebnis gibt ebenfalls den Anhalt für eine verbesserte Degradation des pS100G10, die die Neubildung von Knochen begünstigt haben könnte.

In ihrer Studie wiesen Renno et al. (2013) eine beschleunigte Materialdegradation und gesteigerte Knochenneubildung durch die Beimischung von bioaktivem Glas zu Calciumphosphat-Zementen *in vivo* nach. Insbesondere beobachteten sie, dass mit einer steigenden Rate der Materialdegradation die Neubildung von Knochengewebe gleichermaßen zunahm. Im Zuge ihrer tierexperimentellen Studie wurden sowohl ein reiner Calciumphosphat-Zement also auch ein Polylactid-co-Glycolid-haltiger Calciumphosphat-Zement mit Bioglas versetzt. Die Untersuchung erfolgte anhand eines Bohrlochdefekts am distalen Femur von gesunden Ratten (Renno et al. 2013). Auch Hasan et al. (2019) berichteten von einer gesteigerten Knochenneubildung des mit Bioglas-Mikrokugeln versetzten Calciumphosphat-Zements gegenüber einem Bioglas-freien Zement bei nachweislich schnellerer Materialdegradation. Sowohl Hasan et al. als auch Renno et al. testeten in ihren Studien jeweils Strontium-freie Knochenzemente anhand von gesundem, trabekulärem Knochengewebe mittels Bohrlochdefekten. Bohrlochdefekte garantieren zwar den direkten Kontakt von Knochen und Materialoberfläche, jedoch simulieren sie nicht die biomechanischen Gegebenheiten einer instabilen Fraktur (Alt et al. 2013). Auch der Aspekt des osteopenen Knochenstatus der Tiere floss in den oben beschriebenen Studien nicht mit ein.

Neben einer Stimulation der Osteogenese wird bioaktivem Glas durch die Freisetzung von Silizium und Calcium die Fähigkeit zur Anregung der Gefäßneubildung zugeschrieben (Gorustovich et al. 2010; Hoppe et al. 2011). Dies wurde bereits in mehreren Studien festgestellt (Leach et al. 2006; Renno et al. 2013; Hasan et al. 2019) und bestätigte sich in unserer Studie anhand einer vermehrten α -SMA-Expression der pS100G10-Gruppe. In dem eingewachsenen Bindegewebe zwischen den Materialfragmenten waren viele Gefäßanschnitte zu erkennen. Die vermehrte Angiogenese durch eine beschleunigte Materialdegradation könnte die Osseointegration gefördert haben. Zudem könnte die vermehrte

Porenbildung des pS100G10 sowie die Fragmentierung des Materials mehr Raum für die Neubildung von Gefäßen erlauben.

Allerdings wäre auch ein pro-angiogenetischer Effekt durch die dem Calciumphosphat-Zement zugesetzten Strontium-Ionen bei dem pS100G10 Pastenzement denkbar. In mehreren Studien wurde der positive Effekt von Strontium-Ionen auf die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* bestätigt (Wu et al. 2021; Yan et al. 2022). Für den Vorgänger-Knochenzement von pS100 und pS100G10, S100, konnte ebenfalls im Rattenmodell eine erhöhte Gefäßneubildung anhand des Nachweises von CD31 im Vergleich zu einem konventionellen Calciumphosphat-Zement beobachtet werden (Thormann et al. 2013).

Schumacher et al. (2017) zeigten in ihrer *in vitro*-Studie, dass die in der vorliegenden Studie verwendeten MBG-Partikel durch ihre bessere Löslichkeit die Porosität eines Calciumphosphat-Zements deutlich verbessern konnten und die Autoren eine gesteigerte Degradation erwarteten. Diese Steigerung des Materialabbaus konnten wir in unserer Studie nur bedingt nachweisen, da nur zu einem Zeitpunkt nach sechs Wochen Standzeit der Versuchstiere eine Auswertung erfolgte.

Dennoch konnte die Fragmentierung der Materialreste der pS100G10- und pS100-Gruppe beurteilt werden. Hierbei zeigt sich eine vermehrte Fragmentierung des pS100G10-Zements im Vergleich zum pS100. Grund dafür könnte eine beschleunigte Materialdegradation sein. Bei einer vermehrten Fragmentierung des Knochenzements ergibt sich automatisch eine größere Materialoberfläche, sodass der Abbau des Knochenersatzmaterials noch schneller voranschreiten kann. Auch die Poren an der Materialoberfläche vergrößern die Oberfläche und begünstigen die Degradation der Zementmatrix (Richter et al. 2022). Hingegen birgt das vermehrte Aufkommen von Poren im Material im Sinn einer erhöhten Porosität die Gefahr der Beeinträchtigung der mechanischen Festigkeit des Materials (Hasan et al. 2019). Zu berücksichtigen ist insbesondere, dass die Ratten kurze Zeit nach der Femurosteotomie und dem Einbringen des Knochenzements die Hintergliedmaße wieder voll belasten konnten. Ein mögliches Brechen des Materials im Frakturspalt und das Auftreten der beobachteten Fragmentierung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Es zeigt sich ein Unterschied in der Resorptionsrate von Brushit-bildenden zu Hydroxylapatit-bildenden Calciumphosphat-Zementen. Brushit-bildende Zemente zeichnen sich durch eine deutlich beschleunigte Resorption aus, was auf ihren metastabilen Zustand zurückzuführen ist (Ginebra et al. 2012). Bei den in der vorliegenden Arbeit

getesteten Knochenzementen handelt es sich um Hydroxylapatit-bildende Zemente, die *in vivo* allgemein schlechter resorbierbar sind (Schumacher et al. 2017).

Die Biodegradation von Calciumphosphat-Zementen passiert zum einen durch die Auflösung des Knochenersatzmaterials in extrazellulärer Flüssigkeit und zum anderen durch zellvermittelte Resorption (Sheikh et al. 2015a). Eine wichtige Rolle bei dem zellulären Abbau spielen Zellen der monozytären Zellreihe, die Calciumphosphat-Komponenten phagozytieren. Nach Implantation eines Biomaterials gehören Monozyten und Makrophagen zu den ersten Zellen, die die Material-Bindegewebe-Grenzfläche besiedeln (Sheikh et al. 2015a). An der Material-Bindegewebe-Grenzfläche des pS100G10-Zements, sowie in einzelnen Materialfragmenten ließen sich sechs Wochen nach Implantation Formationen von ein- oder mehrkernigen Zellen erkennen. In Zusammenschau der Ergebnisse der Movat-Pentachrom-Färbung, des Nachweises von TRAP-positiven und ED1-detektierten Zellen ist bei den multinukleären Zellen von phagozytierenden Zellen auszugehen, die für vermehrte Umbauprozesse an der Materialoberfläche sorgen und die Materialresorption beschleunigen. Eine weitere Beobachtung war eine ausgeprägte BMP-2-Expression der ein- oder mehrkernigen Zellen an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche von pS100 und pS100G10. *Bone morphogenic proteins* (BMPs) gehören als Wachstumsfaktoren zur Familie der *transforming growth factor* β . Durch ihre Eigenschaft der Osteoinduktion spielen sie eine wichtige Rolle in der postnatalen Knochenheilung. BMPs werden unter anderem von Osteoblasten exprimiert. Es konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, dass auch Makrophagen BMP-2 freisetzen (Champagne et al. 2002; Honda et al. 2006; Di Chen et al. 2004).

Allgemein wiesen Thormann et al. (2013) für den S100 Knochenzement eine vermehrte Detektion des osteoinduktiven Markers bei ihrem Strontium-versetzten Knochenzement nach, jedoch wurde hier nicht explizit die Materialoberfläche genannt. Champagne et al. (2002) zeigten mittels Molekularbiologie die Expression von BMPs wie BMP-2 und BMP-6 durch Makrophagen auf. In unserer immunhistochemischen Untersuchung könnte also der vermehrte Nachweis von BMP-2 an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche durch die dort angesiedelten phagozytierenden Zellen verursacht worden sein.

Fusionieren Makrophagen miteinander, bilden sich multinukleäre Riesenzellen, die Osteoklasten ähneln. Beide stammen von monozytären Vorläuferzellen ab (Xia und Triffitt 2006). Für langsam resorbierbare, Hydroxylapatit-bildende Calciumphosphat-Zemente wurde durch Yuan et al. (2000) eine unter anderem Osteoklasten-vermittelte Resorption

im Bohrlochdefekt bei Hunden beschrieben. Entscheidend in unserer Studie ist hierbei jedoch der Zusatz von Strontium zu den Calciumphosphat-Zementen, das nachweislich die Osteoklastenaktivität hemmt (Marie 2007). Wir wiesen mit einer signifikant erniedrigten RANKL-Expression für die Ersatzmaterialgruppen im Vergleich zum Leerdefekt eine herunterregulierte Osteoklastenaktivität nach. Bei den ein- und mehrkernigen Zellen an der Material-Bindegewebe muss es sich vorwiegend um Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen handeln. Je nach Partikelgröße nehmen Makrophagen beim Abbau von Calciumphosphat-Zementen die Fragmente und Partikel zur Phagozytose auf, fusionieren zu Riesenzellen oder es erfolgt eine extrazelluläre Degradation des Materials (Sheikh et al. 2015b).

Renno et al. (2013) beschrieben an der Oberfläche ihres im Bohrlochdefekt getesteten Polylactid-co-Glycolid-haltigen Calciumphosphat-Zement mit bioaktivem Glas ebenfalls multinukleäre Riesenzellen. Im Vergleich zum pS100 ist bei dem Bioglas-versetzten Knochenzement von einer vermehrten Oberflächenaktivität auszugehen, die eine gesteigerte Resorption des Materials bedingen kann. Wagner et al. (2019) führten *in vitro*-Untersuchungen mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen anhand des pS100G10-Zements durch. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Resorptionsaktivität der Zellen (Wagner et al. 2019). Die multinukleären Riesenzellen begünstigen auch *in vivo* die Resorption des Knochenersatzmaterials. In Kombination mit dem im Vergleich zum Calciumphosphat schnelleren Abbau des MBG kann Bindegewebe besser einwachsen und die Biodegradation und die Fragmentierung des Materials kann weiter vorangetrieben werden.

4.4. Klinische Aspekte der Strontium-substituierten Calciumphosphat-Pastenzemente

Die in der vorliegenden Arbeit besprochenen Knochenersatzmaterialien sind Pastenzemente. Sie zeichnet aus, dass sie *premixed* sind und können im Gegensatz zu konventionellen Calciumphosphat-Pulver-Flüssigkeit-Zementen ohne eine weitere Vorbereitung direkt in den Knochen eingebracht werden. Pulver-Flüssigkeit-Zemente härten innerhalb kurzer Zeit aus und die Verarbeitungszeit ist stark eingeschränkt (Dorozhkin 2013). Der *premixed*-Charakter des pS100 und pS100G10 erlaubt eine unbegrenzte Verarbeitungszeit und härtet erst aus, wenn er in Kontakt mit Körperflüssigkeiten kommt (Lode et al. 2018).

Auch ist es möglich die Calciumphosphat-Pastenzemente mittels minimalinvasiver Techniken anzuwenden. Für einen durch Heinemann et al. (2013) entwickelten Öl-basierten Pastenzement, der die Basis für den pS100 bildete, wurde die Applikation mittels Spritze anhand von langen Kanülen mit kleinem Durchmesser erfolgreich getestet. Die Verwendung verschieden großer Kanülen macht den Knochenzement vielseitig einsetzbar. Hierzu wurde die minimalinvasive Anwendung durch Lode et al. (2018) für den pS100-Pastenzement im Zuge einer Kyphoplastie untersucht, indem einem humanen Körperspender der Zement in mehrere Wirbelkörper injiziert wurde. Zum Vergleich wurde in weitere Wirbelkörper PMMA-Zement appliziert (Lode et al. 2018). Die Kyphoplastie bezeichnet ein perkutanes, minimalinvasives Operationsverfahren, mit dem Wirbelkörperfrakturen ohne Hinterkantenbeteiligung behandelt werden können. Hierbei wird der frakturierte Wirbelkörper mittels Inflation eines Ballons wieder anatomisch korrekt aufgerichtet gefolgt von der Injektion von Knochenzement in den Wirbelkörper (Teyssédou et al. 2014). Die Untersuchungen von Lode et al. zeigten für den pS100 eine gute Handhabung und Applizierbarkeit des Pastenzements. Die Viskosität des pS100-Zements war während der kompletten Applikation gleichbleibend. Der PMMA-Zement dagegen musste als Pulver-Flüssigkeit-Zement unter Vakuum angerührt werden und härtete innerhalb von Minuten aus (Lode et al. 2018).

Die durch Lode et al. gemachten Beobachtungen für den pS100-Zement konnten wir im Zuge der Femurosteotomie intraoperativ bestätigen. Die Injektion der Pastenzemente pS100 und dem durch bioaktives Glas ergänzte pS100G10 mittels gebrauchsfertiger Spritzen in den Frakturspaltdefekt war problemlos möglich. Das Ausbleiben des Zementmischens intraoperativ birgt einige Vorteile. Zum einen wird die Operationszeit verkürzt. Ginebra et al. (2010) wiesen zum anderen auf die Herstellung eines gebrauchsfertigen Zements unter kontrollierten Bedingungen hin, der bis zur Verwendung gelagert werden könne. Dies steigert die Objektivität und kann die Leistungsfähigkeit des Zements verbessern. Es konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Eigenschaften des Zementendprodukts nach manueller Mischung abhängig vom Operateur variieren können (Grover et al. 2008). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Knochenzemente wurde eine ausreichend hohe Druckbelastbarkeit beschrieben, die der von humanem trabekulärem Knochen ähnelt. Jedoch wurde für den pS100-Zement unter Laborbedingungen eine verzögerte Abbindereaktion im Vergleich zu einem äquivalenten Pulver-Flüssigkeit-Zement gezeigt. Eine mögliche Erklärung der Autoren hierfür war das Verbleiben von Ölresten

im Material, die zu einer lokalen Verzögerung der Zementabbindung geführt haben könnte (Lode et al. 2018). In der klinischen Anwendung könnte dies durch eine unzureichende Festigkeit des Knochenzements eine ungenügende Stabilisierung von Frakturdefekten oder Implantaten bedeuten. Die unter Laborbedingungen erhobenen Beobachtungen spiegeln, laut Lode et al. (2018), jedoch nicht die Gegebenheiten *in vivo* wider. Wie sich der Pastenzement *in vivo* unter mechanischer Belastung verhält, wurde in dieser Arbeit nicht explizit untersucht, sollte aber Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Mit der Entwicklung von wasserfreien Calciumphosphat-Pastenzementen können die Nachteile des manuellen Zementmischens umgangen werden, ohne auf die Eigenschaften von Calciumphosphat-Zementen zu verzichten. Sie sind aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Applizierbarkeit als Knochenzemente gut einsetzbar und eignen sich zur Knochendefektversorgung. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der klinischen Anwendung von Pastenzementen unter anderem mittels minimalinvasiver Systeme.

4.5. Schlussfolgerung

Anhand des metaphysären Frakturmodells mit einem Frakturspaltdefekt von kritischer Größe der ovariectomierten Ratte konnten die Effekte des mit MBG versetzten Strontium-modifizierten Calciumphosphat-Pastenzements untersucht werden.

Im Vergleich zur Bioglas-freien Variante des Calciumphosphat-Pastenzements pS100 konnte gezeigt werden, dass das schneller resorbierbare MBG des pS100G10 die Materialdegradation des Calciumphosphat-Zements fördert und damit das Einwachsen erleichtert, was wiederum mit einer vermehrten Fragmentierung einhergeht. Neben der erhöhten Materialdegradation konnten wir eine verbesserte Knochenneubildung sowie eine verstärkte Angiogenese für den pS100G10 nachweisen.

Die getesteten Knochenersatzmaterialien bieten als *premixed* Pastenzemente eine einfache Handhabung und Applizierbarkeit, ohne die Gefahr einer zu schnellen Abbindung.

5. Zusammenfassung

Zur Verbesserung der Knochenheilung von osteoporotischen Frakturen bedarf es der Entwicklung von kompatiblen, implantierbaren Knochenersatzmaterialien.

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurden die Effekte auf die Knochenheilung von mesoporösem, bioaktivem Glas (MBG) in einem Strontium-substituierten Calciumphosphat-Pastenzement (pS100G10) im Vergleich zu einem Bioglas-freien Strontium-haltigen Calciumphosphat-Pastenzement (pS100) und einer Kontrollgruppe (Leerdefekt) getestet. Die Knochenzemente wurden in einem metaphysären Frakturspalt mit kritischer Größe in ovariectomierten Ratten eingesetzt.

Hierfür wurden 32 weibliche Sprague Dawley Ratten randomisiert den drei Versuchsgruppen zugeordnet: pS100G10 (n=11), pS100 (n=11), Leerdefekt (n=10). 12 Wochen nach der Osteopenieinduktion mittels bilateraler Ovariectomie und multidefizitärer Diät wurde die Femurosteotomie durchgeführt. Am distalen, metaphysären Femur wurde ein 4 mm messender keilförmiger Frakturdefekt jeweils mit einem der Knochenzemente aufgefüllt oder ohne Knochenersatzmaterial belassen. Nach sechs Wochen wurden die Versuchstiere getötet, das Rattenfemur explantiert und für die weitere histologische Auswertung vorbereitet. Insgesamt konnten 21 Rattenfemora (je sieben pro Gruppe) ausgewertet werden.

Die histologischen Knochenschnitte wurden mithilfe der Movat- und Von Kossa-Van Gieson-Färbung histomorphometrisch ausgewertet. ALP- und TRAP-Nachweis als enzymhistochemische Methoden, sowie immunhistochemischer Nachweismethoden für BMP-2, OPG, RANKL, α -SMA, OCN und ED1 wurden durchgeführt und beurteilt.

Nach sechs Wochen Standzeit der Tiere waren sowohl pS100 als auch pS100G10 wenig abgebaut. Die histomorphometrische Auswertung zeigte eine signifikant gesteigerte Knochenneubildung für pS100G10 im Vergleich zu pS100 und der Kontrollgruppe. Zudem konnte für den Knochenzement mit MBG vermehrte Fragmentierung des Materials und Einwachsen von Bindegewebe in die Materialfragmente beobachtet werden. Gleichzeitig konnte die osteoanabole und antiresorptive Wirkung von Strontium in den getesteten Knochenzementen auf den osteopenen Rattenknochen beleuchtet werden. pS100G10 und pS100 überzeugten dazu als Pastenzemente durch ihre Handhabbarkeit.

6. Summary

The improvement of bone healing of osteoporotic fractures requires the development of good compatible, implantable bone substitute materials.

In this animal study effects on bone healing of mesoporous, bioactive glass (MBG) in a strontium-substituted calcium phosphate paste cement (pS100G10) compared to a bioglass-free strontium-containing calcium phosphate paste cement and a control group (Empty defect) were investigated. The bone cements were tested in a metaphyseal critical-size fracture defect in ovariectomized rats.

32 female Sprague Dawley rats were randomized and assigned to the three experimental groups: pS100G10 (n=11), pS100 (n=11), Leerdefekt (n=10). 12 weeks after the induction of osteopenia by bilateral ovariectomy and a multi-deficient diet, femur osteotomy was performed. At the distal, metaphyseal femur a 4 mm wedge-shaped fracture defect was either filled with one of the bone cements or was left empty. After six weeks, the animals were killed, the rat femur was explanted and prepared for further histological analysis. Overall, 21 rat femurs were evaluated, seven for each group.

The histological bone sections were analyzed via Movat staining and Von Kossa-Van Gieson staining using histomorphometry. ALP and TRAP were detected with enzyme-histochemistry methods. Immunohistochemistry was performed to detect BMP-2, OPG, RANKL, α -SMA, OCN and ED1.

Six weeks after implantation of the bone cements, pS100 and pS100G10 were both not completely degraded. The histomorphometric analysis showed a significantly higher new bone formation for pS100G10 in comparison with pS100 and the control group. Besides, we could observe an increased fragmentation of the bone cement with the MBG and tissue ingrowth into the material. Furthermore, the osteoanabolic and antiresorptive effect of strontium on osteopenic rat bone was investigated for the tested bone cements. pS100G10 and pS100 are convincing as premixed paste cements because of good manageability.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
BMPs	<i>bone morphogenic proteins</i>
BMP-2	<i>bone morphogenic protein 2</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BV	<i>bone volume</i>
DAB	Diaminobenzidin
DRESS	<i>drug rash with eosinophilia and systemic symptoms</i>
DXA	<i>dual X-ray absorptiometry</i>
FREEDOM	<i>Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months</i>
Gew.-%	Gewichtsprozent
MBG	mesoporöses, bioaktives Glas
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEA	(2-Methoxyethyl) -Acetat
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
OCN	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OV	<i>osteoid volume</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMMA	Polymethylmethacrylat
RANK	<i>receptor for activation of nuclear factor κB</i>
RANKL	<i>receptor for activation of nuclear factor κB Ligand</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SERM	selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>

ToF-SIMS	<i>Time-of-Flight</i> Sekundärionen-Massenspektrometrie
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
TV	<i>tissue volume</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WP	Waschpuffer
ZFE	Zentralen Forschungseinrichtung

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 a, b: Abtrennung der Ovarien mittels Koagulation (a) und entnommene Ovarien (b)	20
Abb. 2 a-c: Aufnahmen des distalen Femurs mit keilförmigem Frakturspaltdefekt nach der Osteotomie (a), Injektion des Pastenzements pS100G10 in Frakturspaltdefekt mithilfe einer Spritze (b) und aufgefüllter Frakturspaltdefekt (c).....	22
Abb. 3 a-c: Beispiel der histomorphometrischen Auswertung anhand der Movat-Pentachrom-Färbung für einen Knochenschnitt der pS100G10-Gruppe. In schwarz die ROI als ehemaliger Frakturspaltdefekt und in rot die schnittbedingten Risse (<i>void</i>) (a). Materialfragmente in blau umrandet und alte Knochen trabekel in grün (b). In c sind die Bereiche des neugebildeten Knochens in der ROI pink umrahmt.	33
Abb. 4 a-c: Übersichtsaufnahme und Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung einer repräsentativen Probe der Leerdefekt-Gruppe. Übersichtsaufnahme des Rattenfemurs (a). Fibrocartilaginäres Bindegewebe (→) (b). Distale Knochenoberfläche (▶) mit Knochensplittern umgeben von fibrocartilaginärem Bindegewebe (c). B = Bone.	37
Abb. 5 a-c: Übersichtsaufnahme und Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung einer repräsentativen Probe der pS100-Gruppe. Übersichtsaufnahme des Rattenfemurs mit blauangefärbten pS100-Zement (M) (a). Knochenneubildung auf dem Lagerknochen (▶) (b). Von zellreichem Bindegewebe umgebene Materialfragmente mit Ablösung des Bindegewebes vom Material (→) (c). B = Bone, M = Material.	38
Abb. 6 a, b: Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung der pS100-Gruppe. Mineralisierte, gelbe Bereiche (▶) im Bindegewebe nahe am Material (a). Fibrocartilaginäres Bindegewebe mit Zellen direkt an der Grenzfläche zum Material, Gefäßanschnitt (→) (b). M = Material.	38
Abb. 7 a-c Übersichtsaufnahme und Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung einer repräsentativen Probe der pS100G10-Gruppe. Übersichtsaufnahme des Rattenfemurs mit blauangefärbten pS100G10-Zement (M) (a). Knochenneubildung am Lagerknochen (▶) und Gefäßanschnitten (b). Fragmentiertes Material im Zentrum der ROI mit auffälligen Partikeln (→) in Materialfragmenten (c). B = Bone, M = Material.	39

- Abb. 8 a-d:** Detailaufnahmen der Material-Bindegewebe-Grenzfläche in der Movat-Pentachrom-Färbung für pS100G10. Zellbesiedelter Bereich (▶) am Materialfragment mit Gefäßanschnitten (→) (a) und im Fragment nah der Material-Bindegewebe-Grenzfläche (b). Zellreiche Materialoberfläche mit mehrkerniger Riesenzelle (▶) sowie Gefäßanschnitte mit Erythrozyten (→) im Bindegewebe nah am Material (c, d). M = Material..... 40
- Abb. 9:** Graphische Darstellung der Mittelwerte für die Auszählung von Materialfragmenten in drei verschiedenen Schnitten für die pS100-Gruppe (n=6) und die pS100G10-Gruppe (n=6). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$ 41
- Abb. 10 a-f:** Detailaufnahmen der Movat-Pentachrom-Färbung der pS100G10-Gruppe. Repräsentativ werden drei verschiedene Proben (a-b, c-d, e-f) der pS100G10-Gruppe gezeigt. Mehrere Gefäßanschnitte (▶) (a, f) sowie Bindegewebszellen im Material (a, c, d). Einwachsen von Bindegewebe in das Material (f) mit Kontakt zum MBG (→) (b, d, e). M = Material. 42
- Abb. 11:** Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung der Knochenneubildung des Leerdefekts (n=7), der pS100-Gruppe (n=7) und der pS100G10-Gruppe (n=7). Angewendet wurde ein One-way Anova mit Bonferroni Korrektur. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$ 43
- Abb. 12 a-c:** Detailaufnahmen der Von Kossa-Van Gieson-Färbung aller Versuchsgruppen. Osteoid (▶ in weiß) aufgelagert auf Lagerknochen trabekel im Leerdefekt (a), pS100 (b) und pS100G10 (c). B = Bone, M= Material 44
- Abb. 13:** Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung der Osteoidformation in der ROI mit Leerdefekt (n=7), pS100 (n=7) und pS100G10 (n=5). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$ 45
- Abb. 14 a-c:** Detailaufnahmen des Nachweises von ALP für alle Versuchsgruppen. Blasse Blaufärbung an der distalen Knochenoberfläche des Frakturdefekts in der Leerdefekt-Gruppe (a). Kräftigere Blaufärbung in den Materialgruppen pS100 (b) und pS100G10 (c) an der distalen Knochenoberfläche. B= Bone, M=Material..... 46
- Abb. 15:** Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung der Osteoblastenaktivität für Leerdefekt (n=6), pS100 (n=6) und pS100G10 (n=7).

Angewendet wurde ein Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$.
..... 47

Abb. 16: Detailaufnahme des Nachweises von Osteocalcin für den Leerdefekt. Osteocalcin-positive Reaktionen (▶) auf der Lagerknochenoberfläche am Rande der ROI. B = *bone*. 47

Abb. 17 a-d: Detailaufnahmen des Nachweises von Osteocalcin für die Ersatzmaterialgruppen. Osteocalcin-positive Reaktionen (▶) in der pS100-Gruppe (a, b), sowie in Proben der pS100G10-Gruppe (c, d) an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche. M= Material. 48

Abb. 18 a-c: Detailaufnahmen von TRAP-positiven Zellen für alle Versuchsgruppen. Viele TRAP-positive Zellen (▶) an der Knochenoberfläche eines Knochenfragments in der Leerdefektgruppe (a). TRAP-positive Zellen an der Knochenoberfläche und vereinzelt an der Materialoberfläche von pS100 und pS100G10 (▶) (b, c). B=*Bone*, M=*Material*. 49

Abb. 19: Graphische Darstellung der nachgewiesenen TRAP-positiven Zellen normalisiert auf BV für den Leerdefekt (n=7), die pS100- (n=5) und pS100G10-Gruppe (n=6). Angewendet wurde ein Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$ 49

Abb. 20 a-d: Detailaufnahmen von TRAP-positiven Zellen (▶) an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche in je zwei verschiedenen Bereichen einer Probe von pS100 (a, b) und pS100G10 (c, d). B=*Bone*, M=*Material*. 50

Abb. 21: Graphische Darstellung der nachgewiesenen TRAP-positiven Zellen an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche für pS100 (n=5) und pS100G10 (n=7). Es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$ 51

Abb. 22 a-c: Detailaufnahmen von ED1-positiven Zellen für alle Versuchsgruppen an der Knochenoberfläche. Leerdefekt (a), pS100- (b) und pS100G10-Gruppe (c) mit ED1-positiven Zellen (▶). B = *Bone*..... 52

Abb. 23 a-d: Detailaufnahmen von ED1-positiven Zellen (▶) direkt an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche in je zwei verschiedenen Bereichen einer Probe von pS100 (a, b) und pS100G10 (c, d). M= *Material*. 53

Abb. 24: Graphische Darstellung der nachgewiesenen ED1-positiven Zellen an der Material-Bindegewebe-Grenzfläche der Proben der pS100- (n=7) und pS100G10-Gruppe

(n=7). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$	53
Abb. 25 a-c: Detailaufnahmen des Nachweises von α -SMA (►) pS100 (a,b) und pS100G10 (c,d) nahe der Lagerknochenoberfläche (a,c) und zentral in der ROI (b,d). B= bone, M= Material.....	54
Abb. 26: Graphische Darstellung der mithilfe von α -SMA nachgewiesenen Blutgefäße in den Proben des Leerdefekts (n=7), des pS100 (n=6) und pS100G10 (n=6). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$	55
Abb. 27 a-f: Detailaufnahmen der Detektion von BMP-2 (►) für alle Versuchsgruppen am Knochen (a, c, e) und im Zentrum der ROI (b, d, f). BMP-2-Nachweis auf der Knochenoberfläche und vereinzelt in der ROI für den Leerdefekt (a, b). Vermehrte BMP-2-Expression um die Materialfragmente für pS100 (c, d) und pS100G10 (e, f). Riesenzellen (→) M=Material, B= Bone, P = Partikel.....	56
Abb. 28 a, b: Detailaufnahmen des Nachweises von RANKL für den Leerdefekt. RANKL-positive Zellen (►) im Zentrum der ROI im Bindegewebe (a) und an der Lagerknochenoberfläche (b). B= bone	57
Abb. 29 a, b: Detailaufnahmen des Nachweises von RANKL für die Ersatzmaterialgruppen. RANKL-positive Reaktionen (►) in der pS100- (a) und pS100G10-Gruppe (b) an der Knochenoberfläche. B= bone.....	57
Abb. 30: Graphische Darstellung der nachgewiesenen RANKL-positiven Zellen für den Leerdefekt (n=7), die pS100- (n=6) und pS100G10-Gruppe (n=7). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$	58
Abb. 31 a-c: Detailaufnahmen des Nachweises von OPG (►) für alle Versuchsgruppen. Braunfärbung an Knochenoberfläche (a) des Leerdefekts. Zentral in der ROI um Materialfragmente braune Färbung (b). Kräftige OPG-Reaktionen an der Materialoberfläche der pS100G10-Gruppe (→) (c). B= bone, M= Material	59
Abb. 32: Graphische Darstellung der nachgewiesenen OPG-positiven Zellen für den Leerdefekt (n=7), die pS100- (n=7) und pS100G10-Gruppe (n=7). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$	59
Abb. 33: Graphische Darstellung der RANKL/OPG-Ratio für alle Versuchsgruppen (Leerdefekt: n=7; pS100: n=6; pS100G10: n=6). Angewendet wurde der Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$	60
Tabelle 1 Verwendete immunhistochemische Marker.....	29

9. Literaturverzeichnis

- Adami, S.; Libanati, C.; Boonen, S.; Cummings, S. R.; Ho, P.-R.; Wang, A. et al. (2012): Denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis does not interfere with fracture-healing: results from the FREEDOM trial. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 94 (23), S. 2113–2119.
- Alt, V.; Thormann, U.; Ray, S.; Zahner, D.; Dürselen, L.; Lips, K. et al. (2013): A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. In: *Acta biomaterialia* 9 (6), S. 7035–7042.
- Andreassen, T. T.; Ejlersted, C.; Oxlund, H. (1999): Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14 (6), S. 960–968.
- Armas, L. A.; Recker, R. R. (2012): Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. In: *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 41 (3), S. 475–486.
- ASTM Standard F2721 (2008): Standard Guide for Preclinical In Vivo Evaluation in Critical Size Segmental Bone Defects.
- Auer, J. A.; Goodship, A.; Arnoczky, S.; Pearce, S.; Price, J.; Claes, L. et al. (2007): Refining animal models in fracture research. Seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. In: *BMC musculoskeletal disorders* 8, S. 72.
- Awasthi, H.; Mani, D.; Singh, D.; Gupta, A. (2018): The underlying pathophysiology and therapeutic approaches for osteoporosis. In: *Medicinal research reviews* 38 (6), S. 2024–2057.
- Baier, M.; Staudt, P.; Klein, R.; Sommer, U.; Wenz, R.; Grafe, I. et al. (2013): Strontium enhances osseointegration of calcium phosphate cement: a histomorphometric pilot study in ovariectomized rats. In: *Journal of orthopaedic surgery and research* 8, S. 16.
- Bailey, A. J.; Sims, T. J.; Ebbesen, E. N.; Mansell, J. P.; Thomsen, J. S.; Mosekilde, L. (1999): Age-related changes in the biochemical properties of human cancellous bone

collagen. Relationship to bone strength. In: *Calcified tissue international* 65 (3), S. 203–210.

Barnes, G. L.; Kostenuik, P. J.; Gerstenfeld, L. C.; Einhorn, T. A. (1999): Growth factor regulation of fracture repair. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14 (11), S. 1805–1815.

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

Bindl, R.; Oheim, R.; Pogoda, P.; Beil, F. T.; Gruchenberg, K.; Reitmaier, S. et al. (2013): Metaphyseal fracture healing in a sheep model of low turnover osteoporosis induced by hypothalamic-pituitary disconnection (HPD). In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 31 (11), S. 1851–1857.

Boivin, G. Y.; Chavassieux, P. M.; Santora, A. C.; Yates, J.; Meunier, P. J. (2000): Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. In: *Bone* 27 (5), S. 687–694.

Boskey, A. L.; DiCarlo, E.; Paschalis, E.; West, P.; Mendelsohn, R. (2005): Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover osteoporosis. An FT-IR microspectroscopic investigation. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16 (12), S. 2031–2038.

Boyce, B. F.; Xing, L.; Shakespeare, W.; Wang, Y.; Dalgarno, D.; Iuliucci, J.; Sawyer, T. (2003): Regulation of bone remodeling and emerging breakthrough drugs for osteoporosis and osteolytic bone metastases. In: *Kidney international. Supplement* (85), S2-5.

Buckwalter, J. A.; Glimcher, M. J.; Cooper, R. R.; Recker, R. (1996): Bone biology. I. Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. In: *Instructional course lectures* 45, S. 371–386.

Carano, R. A.; Filvaroff, E. H. (2003): Angiogenesis and bone repair. In: *Drug discovery today* 8 (21), S. 980–989.

- Carey, L. E.; Xu, H. H.; Simon, C. G., JR; Takagi, S.; Chow, L. C. (2005): Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. In: *Biomaterials* 26 (24), S. 5002–5014. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15769536>.
- Champagne, C. M.; Takebe, J.; Offenbacher, S.; Cooper, L. F. (2002): Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. In: *Bone* 30 (1), S. 26–31.
- Chen, J.-J.; Zhang, N.-F.; Mao, G.-X.; He, X.-B.; Zhan, Y.-C.; Deng, H.-B. et al. (2013): Salidroside stimulates osteoblast differentiation through BMP signaling pathway. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 62, S. 499–505.
- Cheung, W. H.; Miclau, T.; Chow, S. K.-H.; Yang, F. F.; Alt, V. (2016): Fracture healing in osteoporotic bone. In: *Injury* 47, S21-S26.
- Claes, L.; Recknagel, S.; Ignatius, A. (2012): Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. In: *Nature reviews. Rheumatology* 8 (3), S. 133–143.
- Clarke, B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3 Suppl 3, S131-9.
- Curtis, E. M.; Moon, R. J.; Dennison, E. M.; Harvey, N. C.; Cooper, C. (2016): Recent advances in the pathogenesis and treatment of osteoporosis. In: *Clinical medicine (London, England)* 16 (4), S. 360–364.
- Dachverband Osteologie e.V. (2014): DVO-Leitlinie Osteoporose zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. Kurzfassung und Langfassung, S. 18–160.
- Di Chen; Zhao, M.; Mundy, G. R. (2004): Bone morphogenetic proteins. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22 (4), S. 233–241.
- Dimitriou, R.; Mataliotakis, G. I.; Angoules, A. G.; Kanakaris, N. K.; Giannoudis, P. V. (2011): Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. In: *Injury* 42 Suppl 2, S3-15.
- Dimitriou, R.; Tsiridis, E.; Giannoudis, P. V. (2005): Current concepts of molecular aspects of bone healing. In: *Injury* 36 (12), S. 1392–1404.

Dorozhkin, S. V. (2013): Self-setting calcium orthophosphate formulations. In: *Journal of functional biomaterials* 4 (4), S. 209–311.

Egermann, M.; Goldhahn, J.; Schneider, E. (2005): Animal models for fracture treatment in osteoporosis. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16 Suppl 2, S129-38.

Einhorn, T. A. (1998): The cell and molecular biology of fracture healing. In: *Clinical orthopaedics and related research* (355 Suppl), S7-21.

Felsenberg, D. (2001): Supporting function of collagen and hydroxyapatite. Structure and function of bone. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 30 (6), S. 488–494.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I.; Alobera-Gracia, M. A.; del-Canto-Pingarrón, M.; Blanco-Jerez, L. (2006): Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. In: *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11 (1), E47-51.

Fletcher, J. S.; Vickerman, J. C. (2013): Secondary Ion Mass Spectrometry: Characterizing Complex Samples in Two and Three Dimensions. In: *Analytical Chemistry* 85 (2), S. 610–639.

Giannoudis, P.; Tzioupis, C.; Almalki, T.; Buckley, R. (2007): Fracture healing in osteoporotic fractures. Is it really different? A basic science perspective. In: *Injury* 38 Suppl 1, S90-9.

Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. (2005): Bone substitutes: an update. In: *Injury* 36 Suppl 3, S20-7.

Ginebra, M. P.; Espanol, M.; Montufar, E. B.; Perez, R. A.; Mestres, G. (2010): New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. In: *Acta biomaterialia* 6 (8), S. 2863–2873.

Ginebra, M.-P.; Canal, C.; Espanol, M.; Pastorino, D.; Montufar, E. B. (2012): Calcium phosphate cements as drug delivery materials. In: *Advanced drug delivery reviews* 64 (12), S. 1090–1110.

Goldhahn, J.; Scheele, W. H.; Mitlak, B. H.; Abadie, E.; Aspenberg, P.; Augat, P. et al. (2008): Clinical evaluation of medicinal products for acceleration of fracture healing in patients with osteoporosis. In: *Bone* 43 (2), S. 343–347.

- Gorustovich, A. A.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R. (2010): Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 16 (2), S. 199–207.
- Grover, L. M.; Hofmann, M. P.; Gbureck, U.; Kumarasami, B.; Barralet, J. E. (2008): Frozen delivery of brushite calcium phosphate cements. In: *Acta biomaterialia* 4 (6), S. 1916–1923.
- Hadji, P.; Klein, S.; Gothe, H.; Häussler, B.; Kless, T.; Schmidt, T. et al. (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST). An analysis of routine health insurance data. In: *Deutsches Arzteblatt international* 110 (4), S. 52–57.
- Hasan, M. L.; Kim, B.; Padalhin, A. R.; Faruq, O.; Sultana, T.; Lee, B.-T. (2019): In vitro and in vivo evaluation of bioglass microspheres incorporated brushite cement for bone regeneration. In: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 103, S. 109775.
- Hayman, A. R. (2008): Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. In: *Autoimmunity* 41 (3), S. 218–223.
- Hegde, V.; Jo, J. E.; Andreopoulou, P.; Lane, J. M. (2016): Effect of osteoporosis medications on fracture healing. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 27 (3), S. 861–871.
- Heinemann, S.; Rössler, S.; Lemm, M.; Ruhnow, M.; Nies, B. (2013): Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. In: *Acta biomaterialia* 9 (4), S. 6199–6207.
- Heiss, C.; Govindarajan, P.; Schlewitz, G.; Hemdan, N. Y.; Schliefer, N.; Alt, V. et al. (2012): Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 18 (6), BR199-207.
- Hench, L. L. (1998): Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. In: *Journal of biomedical materials research* 41 (4), S. 511–518.

Hing, K. A. (2004): Bone repair in the twenty-first century. Biology, chemistry or engineering? In: *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 362 (1825), S. 2821–2850.

Honda, Y.; Anada, T.; Kamakura, S.; Nakamura, M.; Sugawara, S.; Suzuki, O. (2006): Elevated extracellular calcium stimulates secretion of bone morphogenetic protein 2 by a macrophage cell line. In: *Biochemical and biophysical research communications* 345 (3), S. 1155–1160.

Hoppe, A.; Güldal, N. S.; Boccaccini, A. R. (2011): A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. In: *Biomaterials* 32 (11), S. 2757–2774.

Hum, J.; Boccaccini, A. R. (2012): Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review. In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 23 (10), S. 2317–2333.

Hurtel-Lemaire, A. S.; Mentaverri, R.; Caudrillier, A.; Cournarie, F.; Wattel, A.; Kamel, S. et al. (2009): The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (1), S. 575–584.

Jahelka, B.; Dorner, T.; Terkula, R.; Quittan, M.; Bröll, H.; Erlacher, L. (2009): Health-related quality of life in patients with osteopenia or osteoporosis with and without fractures in a geriatric rehabilitation department. In: *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 159 (9-10), S. 235–240.

Jarry, L.; Uthoff, H. K. (1971): Differences in healing of metaphyseal and diaphyseal fractures. In: *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie* 14 (2), S. 127–135.

Johnell, O.; Kanis, J. (2005): Epidemiology of osteoporotic fractures. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16 Suppl 2, S3-7.

Kasperk, C.; Ziegler, R. (2017): Osteoporosemittel. In: Ulrich Schwabe, Dieter Paffrath, Wolf-Dieter Ludwig und Jürgen Klauber (Hg.): *Arzneiverordnungs-Report 2017*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 663–671.

Kern, C.; Quade, M.; Ray, S.; Thomas, J.; Schumacher, M.; Gemming, T. et al. (2019): Investigation of strontium transport and strontium quantification in cortical rat bone by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 16 (151), S. 20180638.

Kern, C.; Ray, S.; Gelinsky, M.; Bellew, A. T.; Pirkl, A.; Rohnke, M. (2020): New insights into ToF-SIMS imaging in osteoporotic bone research. In: *Biointerphases* 15 (3), S. 31005.

Komrakova, M.; Weidemann, A.; Dullin, C.; Ebert, J.; Tezval, M.; Stuermer, K. M.; Sehmisch, S. (2015): The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. In: *Calcified tissue international* 97 (4), S. 391–401.

Konnopka, A.; Jerusel, N.; König, H.-H. (2009): The health and economic consequences of osteopenia- and osteoporosis-attributable hip fractures in Germany. Estimation for 2002 and projection until 2050. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 20 (7), S. 1117–1129.

Kruppke, B.; Ray, S.; Alt, V.; Rohnke, M.; Kern, C.; Kampschulte, M. et al. (2020): Gelatin-Modified Calcium/Strontium Hydrogen Phosphates Stimulate Bone Regeneration in Osteoblast/Osteoclast Co-Culture and in Osteoporotic Rat Femur Defects-In Vitro to In Vivo Translation. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (21).

Kubo, T.; Shiga, T.; Hashimoto, J.; Yoshioka, M.; Honjo, H.; Urabe, M. et al. (1999): Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 68 (5-6), S. 197–202.

Kuner, E. H.; Berwarth, H.; Lücke, S. V. (1996): Treatment principles in aseptic pseudarthrosis. In: *Der Orthopade* 25 (5), S. 394–404.

Larsson, S. (2002): Treatment of osteoporotic fractures. In: *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society* 91 (2), S. 140–146.

Leach, J. K.; Kaigler, D.; Wang, Z.; Krebsbach, P. H.; Mooney, D. J. (2006): Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. In: *Biomaterials* 27 (17), S. 3249–3255.

- Leeuwenkamp, O. R.; van der Vijgh, W J; Hüsken, B. C.; Lips, P.; Netelenbos, J. C. (1990): Human pharmacokinetics of orally administered strontium. In: *Calcified tissue international* 47 (3), S. 136–141.
- LeGeros, R. Z. (1993): Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. In: *Clinical materials* 14 (1), S. 65–88.
- Lerner, U. H. (2006): Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. In: *Journal of Dental Research* 85 (7), S. 584–595. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1177/154405910608500703>.
- Li, Y. F.; Luo, E.; Feng, G.; Zhu, S. S.; Li, J. H.; Hu, J. (2010): Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 21 (11), S. 1889–1897.
- Lode, A.; Heiss, C.; Knapp, G.; Thomas, J.; Nies, B.; Gelinsky, M.; Schumacher, M. (2018): Strontium-modified premixed calcium phosphate cements for the therapy of osteoporotic bone defects. In: *Acta biomaterialia* 65, S. 475–485.
- Marie, P. J. (2007): Strontium ranelate: New insights into its dual mode of action. In: *Bone* 40 (5), S5-S8.
- Marsell, R.; Einhorn, T. A. (2011): The biology of fracture healing. In: *Injury* 42 (6), S. 551–555.
- McDonald, M. M.; Morse, A.; Mikulec, K.; Peacock, L.; Yu, N.; Baldock, P. A. et al. (2012): Inhibition of sclerostin by systemic treatment with sclerostin antibody enhances healing of proximal tibial defects in ovariectomized rats. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 30 (10), S. 1541–1548.
- Mehl, B.; Dellling, G.; Schlindwein, I.; Heilmann, P.; Voia, C.; Ziegler, R. et al. (2002): Korrelieren biochemische Knochenstoffwechsellmarker mit einer histologisch gesicherten High- bzw. Low-Turnover-Osteoporose? In: *Medizinische Klinik (Munich, Germany : 1983)* 97 (10), S. 588–594.

- Meunier Pierre J.; Roux Christian; Seeman Ego; Ortolani Sergio; Badurski Janusz E.; Spector Tim D. et al. (2004): The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis*. In: *Obstetrics & Gynecology* 103 (5, Part 1), S. 992.
- Namkung-Matthai, H.; Appleyard, R.; Jansen, J.; Hao Lin, J.; Maastricht, S.; Swain, M. et al. (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. In: *Bone* 28 (1), S. 80–86.
- Ni, G. X.; Lin, J. H.; Chiu, P. K.; Li, Z. Y.; Lu, W. W. (2010): Effect of strontium-containing hydroxyapatite bone cement on bone remodeling following hip replacement. In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 21 (1), S. 377–384.
- Ohtori, S.; Inoue, G.; Orita, S.; Yamauchi, K.; Eguchi, Y.; Ochiai, N. et al. (2012): Teriparatide accelerates lumbar posterolateral fusion in women with postmenopausal osteoporosis: prospective study. In: *Spine* 37 (23), E1464-8.
- Olah, A. J.; Simon, A.; Gaudy, M.; Herrmann, W.; Schenk, R. K. (1977): Differential staining of calcified tissues in plastic embedded microtome sections by a modification of Movat's pentachrome stain. In: *Stain technology* 52 (6), S. 331–337.
- Peng, Z.; Tuukkanen, J.; Zhang, H.; Jämsä, T.; Väänänen, H. K. (1994): The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. In: *Bone* 15 (5), S. 523–532.
- Perren, S. M. (2002): Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation. Choosing a new balance between stability and biology. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 84 (8), S. 1093–1110.
- Pina, S.; Vieira, S. I.; Rego, P.; Torres, P. M.; Da Cruz e Silva, O. A.; Da Cruz e Silva, E. F.; Ferreira, J. M. (2010): Biological responses of brushite-forming Zn- and ZnSr-substituted beta-tricalcium phosphate bone cements. In: *European cells & materials* 20, S. 162–177.
- Ranmuthu, C. D.; Ranmuthu, C. K.; Russell, J. C.; Singhania, D.; Khan, W. S. (2020): Evaluating the Effect of Non-cellular Bioactive Glass-Containing Scaffolds on Osteogenesis and Angiogenesis in in vivo Animal Bone Defect Models. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, S. 430.

- Ray, S.; Thormann, U.; Eichelroth, M.; Budak, M.; Biehl, C.; Rupp, M. et al. (2018): Strontium and bisphosphonate coated iron foam scaffolds for osteoporotic fracture defect healing. In: *Biomaterials* 157, S. 1–16.
- Ray, S.; Thormann, U.; Sommer, U.; Khassawna, T. E.; Hundgeburth, M.; Henß, A. et al. (2016): Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Injury* 47, S52-S61.
- Rebolledo, B. J.; Unnanuntana, A.; Lane, J. M. (2011): A comprehensive approach to fragility fractures. In: *Journal of orthopaedic trauma* 25 (9), S. 566–573.
- Reginster, J. Y.; Seeman, E.; Vernejoul, M. C. de; Adami, S.; Compston, J.; Phenekos, C. et al. (2005): Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (5), S. 2816–2822.
- Renno, A. C.; van de Watering, F. C.; Nejadnik, M. R.; Crovace, M. C.; Zanutto, E. D.; Wolke, J. G. et al. (2013): Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement: An evaluation. In: *Acta biomaterialia* 9 (3), S. 5728–5739.
- Richter, R. F.; Ahlfeld, T.; Gelinsky, M.; Lode, A. (2022): Composites consisting of calcium phosphate cements and mesoporous bioactive glasses as a 3D plottable drug delivery system. In: *Acta biomaterialia*.
- Russell, R. G. (2011): Bisphosphonates: the first 40 years. In: *Bone* 49 (1), S. 2–19.
- Schneider, M. R. (2021): Von Kossa and his staining technique. In: *Histochemistry and cell biology*.
- Schumacher, M.; Gelinsky, M. (2015): Strontium modified calcium phosphate cements - approaches towards targeted stimulation of bone turnover. In: *Journal of materials chemistry. B* 3 (23), S. 4626–4640.
- Schumacher, M.; Henß, A.; Rohnke, M.; Gelinsky, M. (2013): A novel and easy-to-prepare strontium(II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties. In: *Acta biomaterialia* 9 (7), S. 7536–7544.

- Schumacher, M.; Reither, L.; Thomas, J.; Kampschulte, M.; Gbureck, U.; Lode, A.; Gellinsky, M. (2017): Calcium phosphate bone cement/mesoporous bioactive glass composites for controlled growth factor delivery. In: *Biomaterials science* 5 (3), S. 578–588.
- Sheikh, Z.; Abdallah, M.-N.; Hanafi, A. A.; Misbahuddin, S.; Rashid, H.; Glogauer, M. (2015a): Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials. In: *Materials (Basel, Switzerland)* 8 (11), S. 7913–7925.
- Sheikh, Z.; Brooks, P. J.; Barzilay, O.; Fine, N.; Glogauer, M. (2015b): Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. In: *Materials (Basel, Switzerland)* 8 (9), S. 5671–5701.
- Sözen, T.; Özışık, L.; Başaran, N. Ç. (2017): An overview and management of osteoporosis. In: *European journal of rheumatology* 4 (1), S. 46–56.
- Stevens, M. M. (2008): Biomaterials for bone tissue engineering. In: *Materials Today* 11 (5), S. 18–25.
- Stürmer, E. K.; Sehmisch, S.; Rack, T.; Wenda, E.; Seidlova-Wuttke, D.; Tezval, M. et al. (2010): Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. In: *Langenbeck's archives of surgery* 395 (2), S. 163–172.
- Tabatabaei-Malazy, O.; Salari, P.; Khashayar, P.; Larijani, B. (2017): New horizons in treatment of osteoporosis. In: *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 25 (1), S. 2.
- Tao, Z.-S.; Zhou, W.-S.; Tu, K.; Huang, Z.-L.; Zhou, Q.; Sun, T. et al. (2015): Effect exerted by Teriparatide upon Repair Function of β -tricalcium phosphate to ovariectomized rat's femoral metaphysis defect caused by osteoporosis. In: *Injury* 46 (11), S. 2134–2141.
- Teyssédou, S.; Saget, M.; Pries, P. (2014): Kyphoplasty and vertebroplasty. In: *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR* 100 (1 Suppl), S169-79.
- Thormann, U.; Ray, S.; Sommer, U.; Elkhassawna, T.; Rehling, T.; Hundgeburth, M. et al. (2013): Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Biomaterials* 34 (34), S. 8589–8598.

- Turner, A. S. (2001): Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. In: *European cells & materials* 1, S. 66–81.
- Wagner, A.-S.; Schumacher, M.; Rohnke, M.; Glenske, K.; Gelinsky, M.; Arnhold, S. et al. (2019): Incorporation of silicon into strontium modified calcium phosphate bone cements promotes osteoclastogenesis of human peripheral mononuclear blood cells. In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 14 (2), S. 25004.
- Williams, D. F. (1999): *The Williams Dictionary of Biomaterials*: Liverpool University Press.
- Wong, C. T.; Lu, W. W.; Chan, W. K.; Cheung, K. M.; Luk, K. D.; Lu, D. S. et al. (2004): In vivo cancellous bone remodeling on a strontium-containing hydroxyapatite (sr-HA) bioactive cement. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 68 (3), S. 513–521.
- Wong, M.-K.; Leung, F.; Chow, S. P. (2005): Treatment of distal femoral fractures in the elderly using a less-invasive plating technique. In: *International orthopaedics* 29 (2), S. 117–120.
- Wong, R. M.; Choy, M. H.; Li, M. C.; Leung, K.-S.; K-H Chow, S.; Cheung, W.-H.; Cheng, J. C. (2018): A systematic review of current osteoporotic metaphyseal fracture animal models. In: *Bone & joint research* 7 (1), S. 6–11.
- World Health Organization (WHO) Study Group (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. In: *Technical report series* 843.
- Wronski, T. J.; Lowry, P. L.; Walsh, C. C.; Ignaszewski, L. A. (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. In: *Calcified tissue international* 37 (3), S. 324–328.
- Wu, C.; Chang, J. (2012): Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. In: *Interface focus* 2 (3), S. 292–306.
- Wu, X.; Tang, Z.; Wu, K.; Bai, Y.; Lin, X.; Yang, H. et al. (2021): Strontium-calcium phosphate hybrid cement with enhanced osteogenic and angiogenic properties for vascularised bone regeneration. In: *Journal of materials chemistry. B* 9 (30), S. 5982–5997.

Xia, Z.; Triffitt, J. T. (2006): A review on macrophage responses to biomaterials. In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 1 (1), R1-9.

Yan, R.; Li, J.; Wu, Q.; Zhang, X.; Hu, L.; Deng, Y. et al. (2022): Trace Element-Augmented Titanium Implant With Targeted Angiogenesis and Enhanced Osseointegration in Osteoporotic Rats. In: *Frontiers in chemistry* 10, S. 839062.

Yong, E.-L.; Logan, S. (2021): Menopausal osteoporosis: screening, prevention and treatment. In: *Singapore medical journal* 62 (4), S. 159–166.

Yuan, H.; Li, Y.; Bruijn, J. D. de; Groot, K. de; Zhang, X. (2000): Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. In: *Biomaterials* 21 (12), S. 1283–1290.

Zhang, Y.; Wei, L.; Wu, C.; Miron, R. J. (2014): Periodontal regeneration using strontium-loaded mesoporous bioactive glass scaffolds in osteoporotic rats. In: *PloS one* 9 (8), e104527.

Zhao, D.; Yan, X.; Yu, C.; Zhou, X.; Tang, J. (2004): Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 43 (44), S. 5980–5984.

Zhu, Y.; Wu, C.; Ramaswamy, Y.; Kockrick, E.; Simon, P.; Kaskel, S.; Zreiqat, H. (2008): Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. In: *Microporous and Mesoporous Materials* 112 (1-3), S. 494–503.

10. Posterbeitrag

Posterbeitrag von Christine Kern für die Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 2017: *In vivo* study on strontium enriched calcium phosphate bone cements with and without mesoporous bioactive glass. C. Kern, N. Döhner, Inga Kramer, S. Ray, U. Thormann, V. Alt, M. Schumacher, M. Gelinksy, J. Janek and M. Rohnke (2017)

11. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, 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

Inga Kramer

12. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen, für die Möglichkeit einer Promotion in seiner Klinik bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Ulrich Thormann für seine Betreuung dieser Arbeit sowie die freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. Volker Alt, der als Leiter der T2-Arbeitsgruppe unter anderem für die Initiation dieses Projekts verantwortlich war und so meine Dissertation ermöglicht hat.

Meiner Betreuerin Frau Dr. biol. hom. Seemun Ray danke ich für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft und die vielen anregenden Diskussionen.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. med. vet. Ursula Sommer für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Ebenfalls danke ich Christine Kern vom Physikalisch-Chemischen Institut Gießen für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei dem Team für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen für die tatkräftige Unterstützung und die stets freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Ein ganz besonderer Dank geht hierbei an Ida Oberst und Annette Stengel. Der Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie Frau Prof. Dr. Katrin Lips danke ich für die Ermöglichung der Nutzung der Einrichtung.

Ebenfalls danke ich allen Mitdoktoranden für die stets kollegiale Zusammenarbeit. Ganz herzlich möchte ich Jessica Grafe danken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und seiner Ehefrau bedanken, die mich während der gesamten Zeit der Promotion geduldig unterstützt und ermutigt haben.

13. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der Druckversion entfernt.