

***In vivo* Osseointegration und Degradationsverhalten von
Magnesiumphosphat-Mineralen für den Knochenersatz**

von Lena Marie Sophie Schröter

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

***In vivo* Osseointegration und Degradationsverhalten von
Magnesiumphosphat-Mineralen für den Knochenersatz**

von Lena Marie Sophie Schröter
aus München

München 2022

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am:
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der
Universität Ulm

Mentorin: Univ.-Prof. Dr. Anita Ignatius

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 30. Juli 2022

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....		VIII
I	EINLEITUNG.....	1
1.	Knochengewebe und -regeneration.....	1
2.	Knochenersatzmaterialien.....	3
2.1.	Klinische Indikationen	3
2.2.	Anforderungen	4
2.3.	Einteilung.....	5
2.4.	Calciumphosphat-basierte KEM.....	6
3.	Magnesiumphosphat-basierte KEM	7
3.1.	Magnesium im Knochenmetabolismus	8
3.2.	Magnesiumphosphat-Zemente	12
3.2.1.	Zementformulierung und Reaktionsmechanismen.....	13
3.2.2.	Abbindeverhalten und rheologische Eigenschaften.....	13
3.2.3.	Mechanische Eigenschaften und Porosität.....	15
3.2.4.	Biologisches Verhalten <i>in vitro</i>	19
3.2.5.	Biologisches Verhalten <i>in vivo</i>	19
3.3.	Magnesiumphosphat-Granulate.....	22
4.	Ziel der Studie.....	23
II	MATERIAL UND METHODEN	24
1.	Herstellung der zu untersuchenden Materialien	24
1.1.	Herstellung des Ausgangsmaterials	24
1.2.	Zemente für die Implantation im Knochen	24
1.3.	Formkörper für die subkutane Implantation.....	25
1.4.	Granulate für die Implantation im Knochen.....	25
2.	Sterilisation der Materialien	26
3.	Tierversuch	26
3.1.	Tiermodell	26
3.2.	Versuchsdesign.....	27
3.3.	Operation	28

3.4.	Postoperatives Management.....	34
3.5.	Fluoreszenzmarkierung	34
3.6.	Versuchsende	35
4.	Probenaufbereitung und -analysen	35
4.1.	Probenpräparation	35
4.2.	Biomechanischer Indentationstest.....	37
4.3.	Mikro-Computertomographie (μ CT)	40
4.4.	Histologie	41
4.4.1.	Methylmethacrylat-Histologie	41
4.4.2.	Paraffin-Histologie	45
5.	Statistische Auswertung.....	47
III	ERGEBNISSE.....	48
1.	Klinischer Verlauf.....	48
2.	Magnesiumphosphat-Zemente	48
2.1.	Makroskopie	48
2.2.	Qualitative Methylmethacrylat-Histologie	49
2.3.	Quantitative Methylmethacrylat-Histologie	54
2.4.	Fluoreszenzmarkierung	55
2.5.	Paraffin-Histologie	58
3.	Magnesiumphosphat-Granulate	60
3.1.	Makroskopie	60
3.2.	Biomechanik.....	61
3.3.	Mikro-Computertomographie (μ CT)	62
3.4.	Qualitative Methylmethacrylat-Histologie	64
3.5.	Quantitative Methylmethacrylat-Histologie	68
3.6.	Fluoreszenzmarkierung	69
3.7.	Paraffin-Histologie	72
4.	Subkutane Implantate	72
4.1.	Makroskopie	72
4.2.	Mikro-Computertomographie (μ CT)	73
4.3.	Methylmethacrylat-Histologie	75

IV	DISKUSSION	77
1.	Kritische Betrachtung der Methodik	77
1.1.	Tier- und Implantationsmodell	77
1.2.	Eignung der Untersuchungsmethoden	82
2.	Eignung der untersuchten Materialien	85
2.1.	Magnesiumphosphat-Zemente.....	85
2.2.	Magnesiumphosphat-Granulate.....	89
3.	Ausblick	92
V	ZUSAMMENFASSUNG	93
VI	SUMMARY	95
VII	TABELLENVERZEICHNIS.....	97
VIII	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	98
IX	LITERATURVERZEICHNIS	103
	DANKSAGUNG.....	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	Analysis of variance
AMP	Amorphes Magnesiumphosphat
BFR	Bone formation rate
β -TCP	β -Tricalciumphosphat
CDHA	Calciumdefizienter Hydroxylapatit
CPC(s)	Calciumphosphat-Zement(e)
CGRP	Calcitonin gene-related polypeptide- α
COL10A1	Kollagen Typ X
d	Durchmesser
DDK1	Dickkopf-related protein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-Modul	Elastizitätsmodul
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FMZ	Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg
h	Höhe
HA	Hydroxylapatit
HBDCs	Human bone-derived cells
hBMSCs	Human bone marrow stromal cells
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.m.	Intramuskulär
IL-6	Interleukin-6
i.v.	Intravenös
KEM	Knochenersatzmaterialien
KG	Körpergewicht
l	Länge
L_0	Initiale Probenhöhe
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
Lig.	Ligamentum
MagT1	Magnesium Transporter 1
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen,
mg HA/cm ³	Milligramm Hydroxylapatit pro Kubikzentimeter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MPC(s)	Magnesiumphosphat-Zement(e)
NaCl	Natriumchlorid
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PBS	Phosphate buffered saline

PDSCs	Periosteum-derived stem cells
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PLR	Powder-to-liquid ratio
PMMA	Polymethylmethacrylat
μ CT	Mikro-Computertomographie
ROI	Region of interest
s.c.	Subkutan
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAP	Tartrat-resistant acid phosphatase
TRPM7	Transient receptor potential cation channel 7
VEGF	Vacular endothelial growth factor
VOI	Volume of interest
VKB	Vorderes Kreuzband

I EINLEITUNG

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien (KEM) ist indiziert, wenn die Regenerationskapazität des Knochengewebes nicht ausreicht, um in einem angemessenen Zeitraum die Heilung herbeizuführen. So stellen Knochendefekte kritischer Größe oder solche, die aufgrund zusätzlicher Erkrankungen (z.B. Osteoporose) nicht durch den natürlichen Regenerationsprozess ausheilen, ein häufiges Behandlungsproblem dar (GREENWALD et al., 2001). Nach wie vor gilt hier, im Hinblick auf die Wiederherstellung der knöchernen Struktur, die autologe Knochentransplantation als „Goldstandard“ für die Therapie, was dazu führt, dass weltweit jährlich über zwei Millionen Knochentransplantationen durchgeführt werden (GIANNOUDIS et al., 2005; HEINEMANN et al., 2013). Damit ist Knochengewebe nach Blut das zweithäufigste transplantierte Gewebe (FINKEMEIER, 2002; CAMPANA et al., 2014). Dies ist jedoch nicht unumstritten, da autologer Knochen nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht und ein operativer Zweiteingriff erforderlich ist. Dieser ist für den Patienten mit einer zusätzlichen Belastung, zusätzlichen Schmerzen, einem längeren Krankenhausaufenthalt, sowie mit Risiken (u.a. Blutverlust, Infektion, Nervenschädigung) verbunden (YOUNGER und CHAPMAN, 1989; BANWART et al., 1995; EBRAHEIM et al., 2001; ST JOHN et al., 2003). Daher werden neben natürlichen KEM auch eine Vielzahl an artifiziellen KEM zur Behandlung von Knochendefekten eingesetzt. Diese sollen alleine oder im Zusammenwirken mit zusätzlichen stabilisierenden Hilfsmitteln das fehlende Knochengewebe ersetzen, um durch eine strukturelle und mechanische Unterstützung den Regenerationsprozess zu fördern (AMINI et al., 2012).

1. Knochengewebe und -regeneration

Knochengewebe verleiht dem Körper seine Stabilität und übernimmt damit Stütz-, Schutz- und Formgebungsfunktion (SEEMAN, 2009). Zudem dient es dem Organismus als Calcium- und Phosphatspeicher (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Entsprechend seiner Makrostruktur wird zwischen dem äußeren kortikalen Knochengewebe (Kompakta) und dem inneren trabekulären

Knochengewebe (Spongiosa) unterschieden (CLARKE, 2008). An seiner Oberfläche ist das Knochengewebe, ausgenommen von den Gelenkflächen und Sehneninsertionsstellen, von einer dünnen fibrösen Membran, dem Periost (außen) bzw. Endost (innen) überzogen. Knochengewebe setzt sich aus knochenspezifischen Zellen (Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten), sowie einer extrazellulären Matrix zusammen.

Die extrazelluläre Knochenmatrix besteht zu ~65 % aus einer anorganischen (mineralischen) Komponente, die hauptsächlich von calciumdefizientem Hydroxylapatit gebildet wird, zu ~25 % aus einer organischen Komponente, die überwiegend aus Kollagen Typ I besteht, sowie zu ~10 % aus Wasser (CLARKE, 2008). Das Zusammenwirken der elastischen Kollagenfibrillen und der mechanisch stabilen mineralischen Anteile bewirken eine hohe Druck-, Biege- und Zugfestigkeit des Knochens (NAIR et al., 2013). In die extrazelluläre Hartschicht des Knochens eingebettet befindet sich ein Netzwerk von Osteozyten, ehemaligen und metabolisch weitgehend inaktiven Osteoblasten, die über ihre Zellfortsätze in feinen Knochenkanälchen miteinander in Verbindung stehen. Ihre Funktion liegt in der Erhaltung der Knochenmatrix, der Calciumhomöostase und der Wahrnehmung mechanischer Reize (COMPTON und LEE, 2014). Für die Knochenbildung sind Osteoblasten verantwortlich, die die nicht mineralisierte, organische Grundsubstanz des Knochens, das sogenannte Osteoid, produzieren und es anschließend mineralisieren (SALHOTRA et al., 2020). Osteoklasten, mehrkernige Zellen, die für den Knochenabbau verantwortlich sind, sezernieren proteolytische Enzyme und Protonen für den Abbau der organischen bzw. mineralischen Grundsubstanz (BONEWALD, 2011).

Knochengewebe ist ein komplexes, dynamisches Gewebe, das kontinuierlichen Umbauprozessen (sog. „Remodeling“) durch Osteoblasten und Osteoklasten unterliegt (RAISZ, 1999). Es weist zudem eine bemerkenswerte Regenerationsfähigkeit auf, sodass Verletzungen in der Regel wieder vollständig ausheilen („*restitutio ad integrum*“) (WILDEMANN et al., 2021). Hier wird zwischen der primären (direkten) und der weitaus häufiger auftretenden sekundären (indirekten) Frakturheilung differenziert (CLAES et al., 2012; EINHORN und GERSTENFELD, 2015; LOI et al., 2016).

Während bei der primären Frakturheilung durch direktes Einwachsen von kapillarreichem Bindegewebe und dem Auswachsen von Osteonen eine knöcherne Überbrückung und Regeneration erreicht wird, verläuft die sekundäre Frakturheilung über die Bildung eines Kallusgewebes in mehreren Phasen (Hämatombildungs-, Inflammations-, Granulations-, Kallushärtungs- und Remodelingphase) ab.

2. Knochenersatzmaterialien

Übersteigen Knochendefekte eine kritische Größe („critical sized defects“), wird die Selbstheilungsfähigkeit des Knochengewebes überschritten. Ein Defekt kritischer Größe wird definiert als die kleinste Größe eines knöchernen Defekts, der während der Lebenszeit des Individuums nicht spontan ausheilt (SCHMITZ und HOLLINGER, 1986; AABOE et al., 1995), oder der weniger als 10 % knöcherne Regeneration zeigt (GUGALA et al., 2007; PNEUMATICOS et al., 2010). In diesen Fällen ist der Einsatz von KEM indiziert.

2.1. Klinische Indikationen

Die klinischen Anwendungsbereiche für die Verwendung von KEM sind vielfältig und stellen sich in verschiedenen Bereichen der Orthopädie und Unfallchirurgie, sowie der Tumor-, Wirbelsäulen- und Oralchirurgie (FERNANDEZ DE GRADO et al., 2018). So werden KEM u.a. für die Überbrückung von Trümmerzonen nach schweren Knochentraumata (HAGEN et al., 2012) und bei Kompressionsfrakturen im spongiosen Bereich (z.B. für eine Vertebro- oder Kyphoplastie bei osteoporotischer Wirbelkörperfraktur) (BOHNER, 2008) eingesetzt. Auch finden sie bei der Augmentation größerer ossärer Defekte Anwendung, die durch Tumorresektion, Knochenzysten oder durch osteomyelitische Herde entstanden sind (WANG und YEUNG, 2017). Ferner kommen KEM bei Umstellungsosteotomien, sowie Arthro- und Spondylodesen zum Einsatz (FERNANDEZ DE GRADO et al., 2018). Zudem werden sie in der Oralchirurgie bei der Augmentation von Knochendefekten (z.B. im Rahmen eines Sinuslifts, nach Wurzelspitzenresektion) angewendet (KAO und SCOTT, 2007; ZHAO et al., 2021).

2.2. Anforderungen

Im Idealfall kommt das verwendete KEM dem natürlichen Knochengewebe in seinen Eigenschaften möglichst nahe und unterstützt die Knochenregeneration. Neben einer guten Biokompatibilität und mechanischen Stabilität sollte das KEM osteokonduktive Eigenschaften aufweisen. Es sollte also die Fähigkeit besitzen, als Leitschiene für das Einwachsen von neugebildetem Knochengewebe zu dienen, was zudem zu einer guten Osseointegration des Implantats führt (BOBBERT und ZADPOOR, 2017). Dabei wird die Adhäsion und das Einwandern knochenbildender Zellen, sowie eine Vaskularisation durch eine gewisse Rauigkeit der Oberfläche und eine interkonnektierende Porosität mit Makroporen ($> 100 \mu\text{m}$) unterstützt (GALOIS und MAINARD, 2004; KARAGEORGIU und KAPLAN, 2005; SAIKIA et al., 2008). Des Weiteren weist ein KEM idealerweise osteoinduktive Eigenschaften auf, stimuliert also die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondroblasten und Osteoblasten und regt folglich die Knochenneubildung an (BAUER und MUSCHLER, 2000). Da letztere Eigenschaften von synthetischen Biomaterialien in der Regel nicht erfüllt werden und natürlicher Knochen nach wie vor die besten biologischen und biomechanischen Eigenschaften besitzt (DIMITRIOU et al., 2011), ist das KEM bestenfalls resorbierbar, sodass es in einem angemessenen Zeitraum wieder durch körpereigenes Knochengewebe ersetzt wird (BOHNER, 2010). Dabei sollte die Degradation des Implantats und eine damit verbundene Abnahme der mechanischen Stabilität idealerweise so an die Knochenneubildungsrate angepasst sein, dass das neugebildete Knochengewebe allmählich mechanische Belastung aufnehmen kann (GARTZKE et al., 2020). Für die klinische Anwendung muss das KEM zudem sterilisierbar, möglichst kostengünstig und einfach in der klinischen Handhabung sein (HEINEMANN et al., 2013).

Trotz intensiver Forschung gibt es bis heute kein KEM, das all diesen Anforderungen gerecht wird. Die meisten synthetischen KEM weisen osteokonduktive Eigenschaften auf, nur sehr wenige besitzen osteoinduktive Eigenschaften (FERNANDEZ DE GRADO et al., 2018). Ferner ist es insbesondere bei mechanisch belasteten Implantationsorten schwierig, die Anforderungen an mechanischer Stabilität bei gleichzeitiger Porosität und

Degradierbarkeit zu vereinen. Um ein Implantatversagen zu vermeiden und eine knöcherne Regeneration zu gewährleisten, sollte die Degradationsrate idealerweise der Knochenneubildungsrate entsprechen (BOHNER, 2010).

2.3. Einteilung

Einen Überblick über unterschiedliche KEM gibt Tabelle 1. Es kann zwischen autologen, allogenen, xenogenen und alloplastischen KEM unterschieden werden. Die begrenzte Verfügbarkeit autologer und allogener KEM, die je nach Art des KEMs fehlende mechanische Stabilität, sowie das (wenn auch geringe) Risiko einer Infektionsübertragung oder Immunreaktion bei allogenen oder xenogenen KEM (STRONG et al., 1996; ZIMMERMANN und MOGHADDAM, 2011), führte zu der Entwicklung einer großen Anzahl alloplastischer KEM. Dabei handelt es sich um (teil-) synthetische Biomaterialien, zu denen u.a. Calciumphosphat-basierte KEM, Biogläser und Polymere (z.B. Polymethylmethacrylat, PMMA) gehören.

Tabelle 1: Überblick über verschiedene KEM, die klinisch eingesetzt werden. Nach (BHATT und ROZENTAL, 2012), Copyright (2012), gedruckt mit Erlaubnis von Elsevier.

Knochenersatzmaterial		Osteo- konduktion	Osteo- induktion	Osteo- genese	Osseo- integration	Struktur- festigkeit
Autologer Knochen	Spongios	+++	+++	+++	+++	-
	Kortikal	±	+	+	+	+++
Allogener Knochen	Spongios	+	±	-	++	-
	Kortikal	+	-	-	+	+++
	Demineralisierte Knochenmatrix	+	++	-	++	±
Synthetische / alloplastische KEM	Calciumsulfate	+	-	-	++	+
	Hydroxylapatit	+	-	-	-	++
	Calciumphosphat- Biokeramiken	+	-	-	+	++
	Calciumphosphat- Zemente	+	-	-	+	+
	Bioaktive Gläser	+	-	-	-	-
	Polymethylmeth- acrylat (PMMA)	-	-	-	-	+++

2.4. Calciumphosphat-basierte KEM

In der klinischen Praxis haben sich Calciumphosphat-basierte KEM (v.a. Hydroxylapatit (HA) und β -Tricalciumphosphat (β -TCP)) aufgrund ihrer guten Biokompatibilität, die der ähnlichen Zusammensetzung zur mineralischen Phase des Knochens geschuldet ist, sowie ihrer Osteokonduktivität und Degradierbarkeit gut etabliert und werden hier seit Jahrzehnten eingesetzt (WANG und YEUNG, 2017). Sie sind für die medizinische Anwendung als gesinterte Keramiken oder als selbstaushärtende Knochenzemente verfügbar (LEGEROS, 2002; BOHNER et al., 2012).

Calciumphosphat-Keramiken, die für die klinische Anwendung in Form von Blöcken oder Zylindern erhältlich sind, werden mittels Hochtemperaturverfahren hergestellt. Dabei führt eine zunehmend hohe Sintertemperatur (1000-1500° C) zu einer gesteigerten Dichte und mechanischen Festigkeit (HEINEMANN et al., 2013). Die damit einhergehende geringere Porengröße wirkt sich jedoch nachteilig auf die Degradierbarkeit der gesinterten Keramiken aus. Insbesondere HA ist aufgrund seiner geringen Mikroporosität und der schlechten Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen kaum degradierbar (MANGANO et al., 2008; GINEBRA et al., 2018). Der Abbau *in vivo* erfolgt dementsprechend nur zu einem sehr geringen Anteil passiv und ist weitestgehend auf eine aktive zelluläre Degradation durch Osteoklasten (und folglich auf die Grenzfläche zwischen Zelle und Material) beschränkt (WENISCH et al., 2003; BOHNER et al., 2005; DETSCH et al., 2008; SHEIKH et al., 2015). Um einen schnelleren Abbau des Materials zu erreichen, werden keramische KEM auch in der Form von Granulat angewendet. Hier ist, zusätzlich zur Werkstoffporosität, eine interkonnektierende Makroporosität vorhanden, was eine Zellinfiltration ermöglicht und die Oberfläche vergrößert (YAMADA und EGUSA, 2018). Ein Nachteil ist jedoch die initial fehlende mechanische Stabilität des Granulats. Ferner ist ggf. eine Abdeckung mit einer Membran erforderlich, um ein Abwandern der Granulatkörner in umliegendes Gewebe zu verhindern (XU et al., 2012).

Durch die Anwendung von Calciumphosphaten in der Form von Knochenzementen kann hingegen ein mechanisch festes Implantat im

Knochendefekt erreicht werden (ZHANG et al., 2014). Zudem bieten Zemente den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer Injizierbarkeit auch unregelmäßig geformte Hohlräume formschlüssig auffüllen (LARSSON und HANNINK, 2011). Allerdings sind Calciumphosphat-basierte Knochenzemente (CPCs) ohne weitere Maßnahme nur mikroporös, was ihre Degradation erschwert. So sind HA-Zemente (stöchiometrischer HA $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ oder calciumdefizienter HA (CDHA, $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$) *in vivo* kaum abbaubar (SCHRÖTER et al., 2020), was auch der sehr geringen Löslichkeit bei physiologischem pH geschuldet ist. Eine höhere chemische Löslichkeit (und damit passive Degradierbarkeit) besitzen Brushit-Zemente ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), die unter sauren pH Bedingungen ($\text{pH} < 4,2$) gebildet werden. Hier kommt es jedoch *in vitro* wie *in vivo* häufig zu einer Phasenumwandlung von Brushit in gering lösliche Phasen wie HA, Whitlockit oder Octacalciumphosphat, wodurch wiederum die Degradation erheblich verlangsamt wird (TAS, 2016; GALLO et al., 2017). Ein weiterer Nachteil von CPCs ist ihre inhärente Sprödigkeit (WAGONER JOHNSON und HERSCHLER, 2011), was ihren Einsatz weitgehend auf mechanisch nicht oder nur teilweise lasttragende Implantationsbereiche beschränkt, oder die Kombination mit einer stabilisierenden Osteosynthese erfordert.

3. Magnesiumphosphat-basierte KEM

Die Verwendung von Magnesiumphosphat-Mineralen ist eine relativ neue Entwicklungsrichtung im Bereich der KEM. Magnesiumphosphat-basierte KEM besitzen im Vergleich zu Calciumphosphat-basierten KEM eine verbesserte Degradierbarkeit durch eine höhere passive Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen bei ebenfalls guter Biokompatibilität (TAYLOR et al., 1963; WU et al., 2008b; WU et al., 2008a; KANTER et al., 2014; OSTROWSKI et al., 2016; NABIYOUNI et al., 2018). Zudem zeigen Magnesiumphosphat-Zemente (MPCs) neben einer schnellen Resorption *in vivo* eine hohe initiale Druckfestigkeit (SEEHRA et al., 1993; ARAMENDÍA et al., 1999; SHASHKOVA et al., 2000; YANG et al., 2000; PARK et al., 2016). Im Gegensatz zu den in der Literatur vielfach untersuchten metallischen Magnesiumimplantaten und Magnesiumlegierungen, liegt Magnesium hier bereits in ionischer Form (Mg^{2+}) vor. Bei der Degradation von

Magnesiumphosphat-Mineralen *in vivo* entsteht daher im Vergleich zu reinem Magnesium kein Wasserstoffgas und kein alkalischer pH-Wert durch die Bildung von Magnesiumhydroxid ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) (STAIGER et al., 2006; WALKER et al., 2014). Stattdessen kommt es bei der Auflösung von Magnesiumphosphat-Mineralen zur Freisetzung von biokompatiblen Mg^{2+} und HPO_4^{2-} Ionen, wobei für Mg^{2+} eine konzentrationsabhängige osteostimulative Wirkung beschrieben wurde (NABIYOUNI et al., 2018). Damit stellen Magnesiumphosphat-basierte KEM einen vielversprechenden Ansatz dar, wurden bislang jedoch nur in relativ wenigen Studien untersucht.

3.1. Magnesium im Knochenmetabolismus

Magnesium in seiner ionischen Form ist nach Calcium, Kalium und Natrium das vierthäufigste Kation, sowie das zweithäufigste intrazelluläre Kation im menschlichen Körper und übernimmt hier eine Vielzahl essentieller Funktionen (WEISINGER und BELLORÍN-FONT, 1998; WOLF und CITTADINI, 2003). So ist Mg^{2+} als Komplexpartner von Adenosintriphosphat (ATP) von wichtiger Bedeutung für den zellulären Energiemetabolismus und ist direkter und indirekter Bestandteil bzw. Aktivator von zahlreichen Enzymen. Darüber hinaus spielt Mg^{2+} eine Rolle für die Replikation und Transkription von DNA (Desoxyribonukleinsäure) und Translation von mRNA (messenger ribonucleic acid). Extrazellulär ist Mg^{2+} an der Stabilisierung von Zellmembranen und der Aktivität von Calcium-Kanälen beteiligt. Über die Hälfte des Gesamtmagnesiums im Körper (ca. 25 g) ist – gebunden an HA – in das mineralisierte Knochengewebe eingelagert, der Rest befindet sich überwiegend intrazellulär in Muskel- und Weichgewebe und nur etwa 1 % im Serum (SARIS et al., 2000; SWAMINATHAN, 2003).

Der Effekt von Magnesium-Ionen, die von implantierten magnesiumhaltigen KEM abgegeben werden, auf das umgebende Knochengewebe ist bisher in nur wenigen Studien untersucht worden. In der Umgebung von degradierbaren Magnesiumlegierungen, die Mg^{2+} freisetzen, wurde jedoch eine verbesserte Knochenregeneration beobachtet (WITTE et al., 2005; STAIGER et al., 2006; WITTE et al., 2007). Die zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen für diesen osteostimulativen Effekt von Mg^{2+} sind jedoch noch weitgehend unklar.

Einfluss von Mg²⁺ auf Osteogenese und Osteoblastenadhäsion

In einer *in vitro* Studie von Yoshizawa et al. wurde nach der Stimulation von humanen Knochenmark Stromazellen (human bone marrow stromal cells, hBMSCs) mit 10 mM MgSO₄ eine hochregulierte Expression von Kollagen Typ X (COL10A1) beobachtet, welches vermehrt in frühen Stadien der Knochenregeneration exprimiert wird (YOSHIZAWA et al., 2014). Zudem wurde eine gesteigerte Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (vascular endothelial growth factor, VEGF), eines wichtigen angiogenen Signalproteins, beschrieben. Hohe Konzentrationen von > 20 mM MgSO₄ wirkten sich jedoch nachteilig auf das Wachstum der hBMSCs aus, was einen konzentrationsabhängigen Effekt der Magnesium-Ionen nahelegt. Weiter zeigten Lin et al., dass Magnesium-Ionen selektiv den MAP-ERK-Signalweg (MAP – Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, ERK – extracellular signal-regulated kinases) aktivieren und damit die Proliferation, Migration und Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten anregen, was wiederum zu einer vermehrten Knochenbildung führt. Dabei wurde dem Magnesium Transporter 1 (MagT1) eine entscheidende Bedeutung beigemessen, welcher den Einstrom von Mg²⁺ in die Zellen vermittelt (LIN et al., 2019). In einer Studie von Zhang et al. wurde nach der Implantation eines magnesiumhaltigen intramedullären Pins in den Femur von Ratten eine erhöhte Knochenneubildung am peripheren Kortex beobachtet (ZHANG et al., 2016). Laut den Autoren kommt es zur Abgabe und zu einem gesteigerten Einstrom von Mg²⁺ in sensorische Nervenendigungen. Dies führt zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von neuronalem calcitonin gene-related polypeptide- α (CGRP). Das freigesetzte CGRP wiederum aktiviert den CGRP-Rezeptor periostaler Stammzellen (periosteum-derived stem cells, PDSCs) und resultiert letztendlich in einer gesteigerten osteogenen Differenzierung der PDSCs. Ein weiterer Mechanismus, mit dem sich der osteostimulative Effekt von Magnesium-Ionen erklären lässt, wurde von Hung et al. beschrieben. So wurde berichtet, dass die Stimulation mit 10 mM Mg²⁺ zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und zu einer signifikant hochregulierten Expression von β -Catenin in hBMSCs führt (HUNG et al., 2019).

Ferner scheint die Modifikation von KEM mit Mg^{2+} zu einer erleichterten Osteoblastenadhäsion zu führen. Die Zelladhäsion an ein implantiertes Material stellt eine wichtige Voraussetzung für dessen Osseointegration dar (CHEN et al., 2018). Sie wird in erster Linie durch Membran-assoziierte Adhäsionsrezeptoren der Integrin-Superfamilie vermittelt (GRONOWICZ und MCCARTHY, 1996; REZANIA und HEALY, 1999). Eine Studie von Zreiqat et al. zeigte, dass die Adhäsion von humanen Knochenzellen (human bone-derived cells, HBDCs) auf einer biokeramischen Oberfläche durch deren Modifikation mit Mg^{2+} in Folge einer gesteigerten Expression von $\alpha 5\beta 1$ -, $\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ -Integrinrezeptoren verbessert werden konnte (ZREIQAT et al., 2002). Eine andere Studie legte dar, dass die Integration von Mg^{2+} in Titanium signifikant die Adhäsion von Präosteoblasten (MC3T3-E1) an dessen Oberfläche erhöhte und zu einer vermehrten mRNA Expression von Integrinen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$) führte (PARK et al., 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Integration von Mg^{2+} in Biomaterialien die Zelladhäsion fördert und damit die Osseointegration verbessert.

Einfluss von Mg^{2+} auf Osteoklasten

In einer Studie von Wu et al. wurde der Einfluss von Magnesium (in Form von Magnesiumchlorid bzw. Magnesiumextrakt) in verschiedenen Konzentrationen auf kultivierte Osteoklasten untersucht (WU et al., 2014). Die Autoren stellten dar, dass $MgCl_2$ mit steigender Konzentration die Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten zunächst förderte, ab einer Konzentration von 15 mM $MgCl_2$ jedoch hemmte. Im Gegensatz dazu schien das Magnesiumextrakt mit steigender Konzentration die osteoklastäre Aktivität zu reduzieren, während sie bei niedrigeren Konzentrationen erhöht wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Effekte von Magnesium-Ionen auf die Knochenregeneration nicht nur konzentrationsabhängig sind, sondern dabei auch die Herkunft von Mg^{2+} eine Rolle spielt. In einer weiteren Studie etablierten die Autoren eine Kokultur von Osteoblasten und Osteoklasten, um den Einfluss von Magnesiumextrakt in verschiedenen Verdünnungen zu evaluieren (WU et al., 2015). Die Ergebnisse zeigten, dass das Magnesiumextrakt in bestimmten Konzentrationen einen positiven Effekt auf Osteoblasten, jedoch einen inhibitorischen Effekt auf Osteoklasten aufwies.

Immunomodulatorische und angiogenetische Effekte von Mg²⁺

Die Implantation eines KEMs führt zu einer mehr oder weniger starken Immunantwort des Körpers (Blut-Material-Interaktionen, Inflammation, Fremdkörperreaktion, fibröse Einkapselung) (BRYERS et al., 2012), die im schlimmsten Fall zu einer starken Entzündung und infolgedessen bis zum Implantatversagen führen kann (HAN et al., 2014). Eine gewisse milde Immunreaktion jedoch fördert den Regenerationsprozess, einschließlich der Angio- und Osteogenese (BRYERS et al., 2012). In einer Studie von Wang et al. wurde beobachtet, dass die Modifikation eines Calciumphosphat-Zements (CPC) mit Magnesium eine M2-Polarisation von Makrophagen förderte, was in einer verringerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und IL-6 (Interleukin-6) resultierte (WANG et al., 2016). Gleichzeitig wurde das, die Osteogenese fördernde Zytokin TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) vermehrt exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass Mg²⁺ das Entzündungsgeschehen so moduliert, dass es zu einer verbesserten Knochenregeneration kommt. Zudem wurde im Falle des mit Mg²⁺ modifizierten Zements ein besseres Wachstum kultivierter HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) und eine stärkere Expression angiogener Gene (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM), Angiogenin) beobachtet, was eine verbesserte Angiogenese durch Mg²⁺ nahelegt. Da der Prozess der Knochenneubildung an den Prozess der Angiogenese gebunden ist (KUSUMBE et al., 2014; WANG et al., 2016), könnte dieser Effekt ebenfalls zu einer verbesserten Knochenregeneration beitragen. Auch in einer Studie von Maier et al. wurde von einer vermehrten Proliferation von HUVECs durch Magnesium berichtet (MAIER et al., 2004), während Lin et al. eine vermehrte Expression von VEGF in kultivierten BMSCs *in vitro*, sowie *in vivo* eine gesteigerte Neovaskularisation und Knochenregeneration in einem Calvaria-Defektmodell in der Ratte beobachteten (LIN et al., 2019).

Zusammenfassend deuten diese Studien darauf hin, dass Mg²⁺ über verschiedene Mechanismen die Knochenregeneration fördern kann, indem es konzentrationsabhängig die Osteogenese und Osteoblastenadhäsion unterstützt, die Osteoklastenaktivität beeinflusst und außerdem immunomodulatorische und angiogene Effekte besitzt, die sich positiv auf die

Knochenheilung auswirken können. Diese (in-)direkten Effekte könnten sich vorteilhaft bei der Anwendung von Magnesiumphosphaten als KEM erweisen, was diese zu vielversprechende Kandidaten für Knochenersatz macht.

3.2. Magnesiumphosphat-Zemente

Die Verwendung von MPCs hat eine relativ lange Geschichte u.a. im Bereich der Bauindustrie, in der sie aufgrund ihres schnellen Abbindeverhaltens und der hohen initialen mechanischen Festigkeit eingesetzt werden (SEEHRA et al., 1993; ARAMENDÍA et al., 1999; SHASHKOVA et al., 2000; YANG et al., 2000; PARK et al., 2016). Eine eher neue Entwicklungsrichtung ist jedoch der medizinische Einsatz von MPCs für den Knochenersatz (NABIYOUNI et al., 2018). Im Gegensatz zu den klinisch etablierten CPCs, ist hier Mg^{2+} das dominante Kation. In Tabelle 2 findet sich ein Überblick wichtiger Magnesiumphosphat-Verbindungen, die unter Normalbedingungen stabil sind. Dabei handelt es sich, abgesehen von Farringtonit, um hydratisierte Verbindungen, die durch Präzipitation aus wässrigen Lösungen synthetisiert werden (TAMIMI et al., 2011).

*Tabelle 2: Magnesiumphosphat-Verbindungen, ihr Löslichkeitsprodukt und berechnete absolute Löslichkeit bei 25°C. Mit * gekennzeichnete Verbindungen sind metastabil in Wasser (TAYLOR et al., 1963; ABBONA et al., 1982; GOLUBEV et al., 2001; BHUIYAN et al., 2008). Nach (NABIYOUNI et al., 2018), Copyright 2017, gedruckt mit Erlaubnis von Elsevier.*

Magnesiumphosphat-Verbindung	Summenformel	Löslichkeitsprodukt -log(K_{sp})	Löslichkeit in mg/L	Mg/P Verhältnis
Bobierit (Trimagnesiumphosphat Octahydrat)	$Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$	25.2	1.46	1.5
Brucit (Magnesiumhydroxid)	$Mg(OH)_2$	11.2	6.79	-
Cattiit (Trimagnesiumphosphat Hydrat) *	$Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$	23.1	6.20	1.5
Dittmarit	$NH_4MgPO_4 \cdot H_2O$	unbekannt	unbekannt	1
Farringtonit (Trimagnesiumphosphat)	$Mg_3(PO_4)_2$	23.4	2.15	1.5
Hannayit	$(NH_4)_2Mg_3(HPO_4)_4 \cdot 8H_2O$	unbekannt	unbekannt	0.75
K-Struvit (Magnesiumkaliumphosphat Hexahydrat)	$KMgPO_4 \cdot 6H_2O$	10.6	78.0	1
Magnesia (Magnesiumoxid)	MgO	25.0	$1.27 \cdot 10^{-8}$	-
Newberyit (Magnesiumhydrogenphosphat Trihydrat)	$MgHPO_4 \cdot 3H_2O$	5.51-5.82	$(1.69-2.54) \cdot 10^3$	1
Schertelit	$(NH_4)_2Mg(HPO_4)_2 \cdot 4H_2O$	unbekannt	unbekannt	0.5
Struvit (Magnesiumammoniumphosphat Hexahydrat)	$NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$	9.94-13.4	8.38-119	1

3.2.1. Zementformulierung und Reaktionsmechanismen

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von MPCs wird meist kristallines Magnesia (Magnesiumoxid, MgO) (WU et al., 2008b; MESTRES und GINEBRA, 2011; YANG et al., 2014a) oder Farringtonit (Trimagnesiumphosphat, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) (GROSSARDT et al., 2010; VORNDRAN et al., 2011) verwendet, aber auch der Einsatz von Brucit (Magnesiumhydroxid, $\text{Mg}(\text{OH})_2$) (ZHOU et al., 2013; ROSTAMI, 2014) und amorphem Magnesiumphosphat (AMP) (BABAIE et al., 2016) ist beschrieben worden. Diese feste, pulverförmige Komponente reagiert mit löslichen Phosphatsalzen, wie beispielsweise Phosphorsäure (H_3PO_4), Ammoniumdihydrogenphosphat (ADHP, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP, $(\text{NH}_4)_2(\text{HPO}_4)$), Natriumdihydrogenphosphat (NDHP, NaH_2PO_4) oder Kaliumdihydrogenphosphat (KDHP, KH_2PO_4) in einer exothermen Säure-Basen-Reaktion zum jeweiligen Endprodukt. Dabei können die Phosphatsalze entweder in der wässrigen Phase gelöst sein (EWALD et al., 2011; KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018) oder mit in die pulverförmige Phase integriert werden (YANG und QIAN, 2010; MESTRES und GINEBRA, 2011). Der genaue Abbinde Mechanismus von MPCs ist nicht abschließend geklärt, aber es wird mehrheitlich davon ausgegangen, dass es durch die Mischung der festen und flüssigen Phase des Zements zunächst zu einer Lösung der Edukte und über die Bildung eines amorphen Gels zur Präzipitation der Produkte kommt (NEIMAN und SARMA, 1980; YANG et al., 2014b). Die mechanische Festigkeit des ausgehärteten Zements wird durch die Verzahnung der Hydrationsprodukte bzw. ausgefallten Kristallite erreicht. Als Produkt der Abbinde Reaktion entstehen, je nach Ausgangsmaterial, beispielsweise Struvit ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), K-Struvit ($\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Newberyit ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Schertelit ($(\text{NH}_4)_2\text{Mg}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) oder Dittmarit ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (NABIYOUNI et al., 2018).

3.2.2. Abbindeverhalten und rheologische Eigenschaften

Eine hervorzuhebende Eigenschaft von MPCs ist ihre kurze Abbindezeit, in der die für die bestimmungsgemäße Beanspruchung erforderliche Festigkeit erreicht wird. Die Abbindezeit ist ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Zementen, die als Knochenersatzmaterialien Anwendung finden sollen. Der Zement muss einerseits langsam genug abbinden, damit in der klinischen

Anwendung ausreichend Zeit für das Anmischen und die Applikation bleibt, sowie gegebenenfalls notwendige Anpassungen vorgenommen werden können (OSTROWSKI et al., 2016). Andererseits sollte der Zement aber auch schnell genug abbinden, um möglichst zeitnah mechanische Stabilität zu erreichen und um einen zügigen Fortgang des operativen Eingriffes zu gewährleisten. Man unterscheidet bei Zementen zwischen der initialen Abbindezeit, innerhalb welcher der Zement appliziert sein sollte, und der finalen Abbindezeit, während der keine Verformung des Zements stattfinden sollte, um eine Rissbildung im Implantat zu vermeiden (DRIESSENS et al., 1998). Für die meisten klinischen Indikationen wird eine optimale initiale Abbindezeit von 3 Minuten (dentale Applikationen) bzw. 8 Minuten (orthopädische Applikationen) und eine maximale finale Abbindezeit von etwa 15 Minuten angenommen (CONSTANTZ et al., 1995; KHAIROUN et al., 1998; ZHANG et al., 2014). Für MPCs im biomedizinischen Bereich wurden, je nach Formulierung des Zements, initiale Abbindezeiten von < 1 bis > 90 Minuten beschrieben (NABIYOUNI et al., 2018). Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die das Abbindeverhalten beeinflussen. Dazu gehören – ähnlich wie bei CPCs – sowohl materialabhängige Eigenschaften (z.B. Zementformulierung (KLAMMERT et al., 2010), Partikelgröße des Ausgangspulvers (KLAMMERT et al., 2010; VORNDRAN et al., 2011), Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis (powder-to-liquid ratio, PLR) (MOSEKE et al., 2011; WANG et al., 2013b), Mg/P Verhältnis (YANG und WU, 1999), Einsatz von Abbindeverzögerern (MESTRES und GINEBRA, 2011; MOSEKE et al., 2011)), als auch umweltbedingte Einflussfaktoren (z.B. Temperatur, Feuchtigkeit) (YANG und WU, 1999; YANG et al., 2014b). So ist es beispielsweise für die Anwendung im medizinischen Bereich von Bedeutung, dass der Zement auch bei Körpertemperatur und in der Anwesenheit von Blut in der Lage ist abzubinden, wobei letzteres die Abbindezeit und die finale mechanische Festigkeit des Zements signifikant beeinflussen kann (MUSHA et al., 2010).

Nur in wenigen Studien wurden Angaben zu Zementeigenschaften von MPCs wie Kohäsion und Injizierbarkeit gemacht. Die Kohäsionszeit ist die Zeit, in der der Zement angemischt, injiziert und ggf. geformt wird (DRIESSENS et al., 1998). Sie sollte kürzer als die initiale Abbindezeit sein, aber mindestens 2 Minuten betragen, da das Anmischen in der Regel 1 Minute beansprucht.

So wurde in einer Studie von Mestres et al. für einen MPC eine Kohäsionszeit von < 7 Minuten angegeben (MESTRES et al., 2013), was der Anforderung für den klinischen Einsatz genügt. Auch die Injizierbarkeit von MPCs ist nur in wenigen Publikationen beschrieben worden, wobei sich diesbezüglich meist nur qualitative Angaben in der Literatur finden (GULOTTA et al., 2008; WU et al., 2008b; MESTRES et al., 2013). Sie ist eine wichtige Voraussetzung für die klinische Applikation des Zements in einen Knochendefekt, insbesondere bei minimalinvasiven Verfahren wie beispielsweise der Vertebroplastie. Hier kommt es beim Injizieren des Zements zu einer Drucksteigerung am Kanüleneingang, was zu einer Trennung der Fest- und der Flüssigphase (sog. filter-pressing-Effekt) und damit zu einem anderen als dem erwarteten Ausgangsprodukt führen kann (BOHNER und BAROUD, 2005). Eine Verbesserung der Injizierbarkeit wurde bei MPCs u.a. durch eine erhöhte Kristallinität des Ausgangsmaterials (OSTROWSKI et al., 2015), einer Erniedrigung der PLR (WU et al., 2008b; MOSEKE et al., 2011; OSTROWSKI et al., 2015), oder der Verwendung von Verflüssigungszusätzen (MOSEKE et al., 2011) erreicht. Als Additive um die Injizierbarkeit und die Kohäsion zu erhöhen sind u.a. Chitosan, Glycerin, Carboxymethylcellulosen, oder Nanopartikel verwendet worden (OSTROWSKI et al., 2016).

3.2.3. Mechanische Eigenschaften und Porosität

Eine vorteilhafte Eigenschaft von Zementen gegenüber anderen Applikationsformen ist, neben der Injizierbarkeit, dass das ausgehärtete Implantat eine gewisse mechanische Stabilität aufweist, was insbesondere bei der Anwendung in (partiell) lasttragenden Bereichen eine Rolle spielt. Im Idealfall entsprechen die mechanischen Eigenschaften eines KEMs denen des natürlichen Knochens (CLAES et al., 1997). Letztere variieren jedoch, je nach anatomischer Lokalisation und Art des Knochengewebes (kortikaler vs. trabekulärer Knochen), erheblich. Ferner sind die mechanischen Ansprüche an ein KEM abhängig von der jeweiligen klinischen Indikation (z.B. Vertebroplastie vs. Sinuslift-Operation) und unterscheiden sich bei mechanisch belasteten (z.B. Implantation im Wirbelkörper (ISHIGURO et al., 2010; NAKANO et al., 2012)) und mechanisch nicht oder teilbelasteten Implantaten. Zudem werden sie von Alter, Geschlecht und dem

Gesundheitszustand des Patienten beeinflusst. Auch wenn die idealen mechanischen Eigenschaften eines Knochenzements für z.B. die Vertebroplastie nicht genau definiert worden sind (HEINI und BERLEMANN, 2001; VERLAAN et al., 2004; YANG und ZOU, 2011), ist es naheliegend, dass sich diese bei osteoporotischen und nicht osteoporotischen Wirbelkörpern (z.B. nach traumatischer Kompressionsfraktur) unterscheiden. So erhöhen biomechanisch sehr steife Zemente, wie das häufig verwendete (nicht degradierbare) PMMA (Polymethylmethacrylat) das Frakturrisiko für benachbarte Wirbelkörper (WILCOX et al., 2006; BOGER et al., 2007; BOGER et al., 2008). Dies liegt daran, dass das Elastizitätsmodul (E-Modul) mit ca. 2-3 GPa deutlich höher ist als das von spongiösem Knochen (0,05-0,8 GPa) (BANSE et al., 2002). Zur Steifigkeit oder zum E-Modul von MPCs gibt es kaum Angaben in der Literatur. Kanter et al. ermittelten für einen Struvit-bildenden Zement in zwei verschiedenen PLRs ein apparentes E-Modul von etwa 7-8 GPa *in vitro* (KANTER et al., 2014). Dieses nahm jedoch nach der *in vivo* Implantation in ovinen trabekulären Knochen durch die Degradation des Materials innerhalb von vier Monaten auf < 1 GPa ab.

Der am häufigsten ermittelte Parameter um die mechanischen Eigenschaften von MPCs für den Einsatz im biomedizinischen Bereich zu bestimmen ist, ähnlich wie bei CPCs, die axiale Druckfestigkeit. In der Literatur wurden für MPCs Druckfestigkeiten zwischen 20-66 MPa beschrieben (NABIYOUNI et al., 2018), wobei eine maximale Druckfestigkeit von 85 MPa in einer Studie von Yu et al. beobachtet wurde (YU et al., 2010). Die für MPCs angegebenen Druckfestigkeiten ähneln denen von humanem kortikalem Knochengewebe (130-190 MPa). Sie sind jedoch höher als die von trabekulärem Knochengewebe (4-12 MPa) (WAGONER JOHNSON und HERSCHLER, 2011). Im Vergleich dazu besitzen CPCs ähnliche Druckfestigkeiten wie MPCs: Für Bruscht-bildende Zemente wurden meist Werte unter 20 MPa (bis max. 52 MPa) gemessen (HOFMANN et al., 2009), während die meisten kommerziell erhältlichen Apatit-bildenden Zemente Druckfestigkeiten von etwa 30 MPa (bis max. 80 MPa) aufweisen (ZHANG et al., 2014). Ein bedeutender Unterschied ist jedoch, dass MPCs im Vergleich zu CPCs ihre Druckfestigkeit relativ schnell nach Beginn der Abbindereaktion erreichen. So wurde in einer Studie von Mestres und Ginebra dargestellt, dass bei einem

Struvit-bildenden Zement unter physiologischen Bedingungen bereits eine Stunde nach dem Starten der Abbindereaktion 60 % der finalen Druckfestigkeit erreicht wurden (MESTRES und GINEBRA, 2011). Die vollständige finale Druckfestigkeit von ca. 50 MPa wurde nach insgesamt zwei Stunden gemessen. Im Vergleich dazu hatte ein CPC nach zwei Stunden erst 14 % seiner finalen Druckfestigkeit von ca. 38 MPa erlangt. Diese frühe hohe mechanische Druckfestigkeit von MPCs ist eine hervorzuhebende Eigenschaft, die aus der Bauindustrie bekannt ist und hier für den Einsatz von MPCs für schnelle Reparaturarbeiten genutzt wird (SEEHRA et al., 1993; ARAMENDÍA et al., 1999; SHASHKOVA et al., 2000; YANG et al., 2000; PARK et al., 2016). Im klinischen Einsatz könnte sie vorteilhaft für eine frühe postoperative Mobilisation des Patienten sein.

Es ist zu beachten, dass ein direkter Vergleich der in der Literatur beschriebenen biomechanischen Eigenschaften nur eingeschränkt möglich ist, da die ermittelten Werte von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst werden können. Dazu gehören einerseits die allgemeinen Testbedingungen (u.a. Testmethode, Umgebung bei der Abbindereaktion) und andererseits materialbedingte Faktoren wie die Partikelgröße (KLAMMERT et al., 2010; VORNDRAN et al., 2011) und Oberfläche (YANG und WU, 1999), das Mg/P-Verhältnis (YANG und WU, 1999), sowie PLR und Porosität des Zements (KANTER et al., 2014). Insbesondere der Zusammenhang zwischen Porosität und mechanischer Stabilität ist allgemein anerkannt (YANG et al., 2014b), d.h. mit steigender Porosität ist von einer niedrigeren Festigkeit auszugehen.

Die Porosität von KEM gilt für viele Indikationen als vorteilhaft für eine verbesserte Vaskularisation, zelluläre Infiltration und Osseointegration, sowie eine beschleunigte Degradation des Implantats (BOHNER et al., 2011). Für andere Indikationen wiederum, wie beispielsweise endodontische Applikationen, kann eine niedrigere Porosität vorteilhaft sein, um die Degradation zu verlangsamen (MESTRES et al., 2014). Folglich ist bei der Entwicklung von Knochenzementen, je nach Einsatzbereich, eine gute Balance zwischen Porosität und mechanischer Stabilität gefordert. MPCs weisen (wie CPCs) keine Makro-, sondern nur eine Mikroporosität ($< 1 \mu\text{m}$) auf. Diese variiert bei MPCs im biomedizinischen Bereich zwischen 4-22 %

(WANG et al., 2013b; MESTRES et al., 2014) und ist folglich niedriger als die von CPCs mit etwa 30-55 % (ZHANG et al., 2014). Die Mikroporosität und damit auch die mechanischen Eigenschaften eines Knochenzements werden stark von der PLR beeinflusst (HALL et al., 1998; WANG et al., 2013b). So berichteten Wang et al., dass die Druckfestigkeit eines K-Struvit Zements von 50 MPa (PLR 3 gml⁻¹) mit zunehmender PLR auf 10 MPa (PLR 7 gml⁻¹) abnahm (WANG et al., 2013a). Ferner stellten Kanter et al. dar, dass bei einem Struvitbildenden Zement eine Erniedrigung der PLR (durch einen höheren Flüssigkeitsanteil) von 3 gml⁻¹ zu 2 gml⁻¹, zu einer Erhöhung der Porosität von 5 % auf 7 % und zu einer Verringerung Druckfestigkeit von 66 MPa zu 58 MPa führte (KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018). Zudem wurde beobachtet, dass die Veränderung der PLR bei MPCs eine geringere Auswirkung auf die Porosität und die Druckfestigkeit hatte als bei einem ebenfalls untersuchten CPC (Bruschit). Dies kann dadurch erklärt werden, dass in der Abbindereaktion von MPCs eine Erhöhung der wässrigen Phase zu einer gesteigerten Umsetzung in das hydratisierte Reaktionsprodukt führt (HALL et al., 1998; WANG et al., 2013b), während bei CPCs kein oder nur wenig Wasser in der Abbindereaktion verbraucht wird (O'NEILL et al., 2017).

Nach der Applikation des Zements ist das Implantat jedoch nicht nur einer axialen Druckbelastung ausgesetzt, sondern unterliegt – je nach Implantationsort – auch Zug- und Scherkräften (NO et al., 2014). Letztere wurden für MPCs bisher kaum untersucht. Es wurde lediglich in einer Studie von Meininger et al. für Magnesiumphosphat-Scaffolds berichtet, dass diese eine deutlich niedrigere Zug- und Biegefestigkeit im Vergleich zu ihrer Druckfestigkeit aufwiesen (MEININGER et al., 2016), was dem Verhalten eines spröden Materials entspricht. Diese Sprödigkeit ist ein bekanntes Problem bei der Verwendung von CPCs für den Knochenersatz (WAGONER JOHNSON und HERSCHLER, 2011; KRUGER und GROLL, 2012) und könnte auch bei MPCs im klinischen Einsatz zu einer Beschränkung auf mechanisch teilbelastete oder nicht belastete Knochendefekte führen (OSTROWSKI et al., 2016). Mögliche Ansätze zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von MPCs stellen die Integration von Fasern oder Polymeren dar (GOLAFSHAN et al., 2020), wozu für CPCs bereits viele Studien vorliegen (WAGONER JOHNSON und HERSCHLER, 2011; KRUGER und GROLL, 2012; GEFFERS et al., 2015).

3.2.4. Biologisches Verhalten *in vitro*

Die Zytokompatibilität von MPCs wurde in verschiedenen *in vitro* Studien untersucht, wobei hier in der Regel murine (MC3T3-E1) (KLAMMERT et al., 2010; ZHOU et al., 2013) oder humane (MG-63) (WU et al., 2008a; EWALD et al., 2011; VORNDRAN et al., 2011; YANG et al., 2014a) ostoblastenähnliche Zellen Verwendung fanden. Bei der Kultivierung dieser Zellen auf MPCs konnte hier insgesamt eine vermehrte Proliferation und zelluläre Aktivität im Vergleich zu einer Kultivierung auf CPCs beobachtet werden. Eine kanzerogene oder mutagene Wirkung eines aus MgO hergestellten MPCs konnte in einer Studie von Yu et al. durch verschiedene Tests (u.a. Ames-Test, Mikrokerntest, UDS-Test) ausgeschlossen werden (YU et al., 2010).

In einer *in vitro* Studie untersuchten die Autoren verschiedene, aus MgO und einem Phosphatsalz (NaH_2PO_4 und/oder $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) hergestellte MPCs, auf potentielle intrinsische antibakterielle Eigenschaften (MESTRES und GINEBRA, 2011; MESTRES et al., 2013). Die Ergebnisse zeigen, dass die Zemente (je nach Formulierung) eine bakterizide bzw. bakteriostatische Wirkung gegenüber *S. sanguinis* Kulturen besaßen, was auf die Entwicklung eines alkalischen pHs während der Abbindereaktion zurückgeführt wurde. In einer späteren Studie konnten auch gegen *E. coli*, *A. actinomycetemcomitans* und *P. aeruginosa* antimikrobielle Eigenschaften dieser MPCs nachgewiesen werden. Diese intrinsische antibakterielle Wirkung ist vorteilhaft für Knochenzemente, die bei CPCs meist durch die Integration von Antibiotika erreicht wird (GINEBRA et al., 2012).

3.2.5. Biologisches Verhalten *in vivo*

Trotz der vielversprechenden Eigenschaften von MPCs als KEM, wurden diese Materialien bisher nur in einer sehr überschaubaren Anzahl von *in vivo* Studien untersucht. Wie CPCs besitzen MPCs eine gute Biokompatibilität. So sind bisher im Tiermodell keine Anzeichen für ein Entzündungsgeschehen, eine Fremdkörperreaktion oder -abstoßung nach Implantation von MPCs beobachtet worden (GULOTTA et al., 2008; HIRVINEN et al., 2009; SCHENDEL und PEAUROI, 2009; KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018).

Eine Eigenschaft von MPCs, die für CPCs nicht beschrieben ist, ist ihre Adhäsivität, die für OsteoCrete® (Bone Solutions Inc., Texas, U.S.) in mehreren

in vivo Studien untersucht wurde. OsteoCrete® ist aktuell der einzig kommerziell erhältliche, von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) zugelassene MPC (NABIYOUNI et al., 2018). So wurde der Zement hinsichtlich seiner Eignung für die Fixierung von Schrauben in Metakarpal- und Metatarsalknochen im Pferdmodell analysiert und zeigte hier gute adhäsive Eigenschaften, sowie eine gesteigerte Osteogenese am angrenzenden Knochen (HIRVINEN et al., 2009). Zudem untersuchten Gulotta et al. den MPC in einem VKB (vorderes Kreuzband)-Rekonstruktionsmodell im Kaninchen für die Fixierung eines Sehnen transplantats an Tibia und Femur (GULOTTA et al., 2008). In dieser Studie konnte, an der mit dem Zement augmentierten Insertionsstelle der Semitendinosussehne, eine verbesserte Fixierung am Knochen und eine gesteigerte Knochenneubildung beobachtet werden. Ferner publizierten Waselau et al. eine Studie, in der im Pferdmodell eine verbesserte Stabilisation und Regeneration von metatarsalen Knochenfragmenten durch die Verwendung des MPCs im Vergleich zu einem kommerziellen CPC beschrieben wird (WASELAU et al., 2007). Auch für die Fixation von kraniotomierten Knochendeckeln wurde OsteoCrete® im Kaninchenmodell untersucht und zeigte hier gute adhäsive Eigenschaften und eine schnellere Degradation als ein kommerzieller CPC (SCHENDEL und PEAUROI, 2009). Es wurde bisher jedoch in der Literatur nicht analysiert, ob die Adhäsivität dieses degradierbaren MPCs auch für andere MPCs gilt, oder ob dafür die spezielle Formulierung von OsteoCrete® verantwortlich ist.

In einer *in vivo* Studie wurde die Eignung eines MPCs mit intrinsischen antimikrobiellen Eigenschaften (MESTRES und GINEBRA, 2011; MESTRES et al., 2013) für die lokale Behandlung einer perioperativ induzierten Osteomyelitis (*S. aureus*) im Kaninchenmodell untersucht (MESTRES et al., 2019). Im Vergleich zu einem mit Doxycyclin modifizierten CPC konnte durch die Implantation des MPC eine bessere Eindämmung der Infektion erreicht werden, auch wenn eine Elimination derselben nicht möglich war.

Hinsichtlich des Degradationsverhaltens *in vivo* untersuchten Yu et al. einen aus MgO und NH₄H₂PO₄ hergestellten MPC in der Form von präformierten Zementzylindern nach orthotoper und heterotoper (intramuskulärer) Implantation im Kaninchenmodell (YU et al., 2010). Der MPC zeigte sechs

Monate nach der Implantation in die mediale Femurkondyle der Kaninchen neben einer guten Osseointegration eine zunehmende Degradation mit gleichzeitiger Knochenneubildung. Nach intramuskulärer Implantation nahm die initial hohe Druckfestigkeit der Implantate von 85 MPa innerhalb von drei Monaten auf 24 MPa ab, was auf die Degradation zurückgeführt, aber nicht als nachteilig für die Knochenregeneration erachtet wurde. Veränderungen des Serummagnesiums und Serumphosphats nach der Implantation wurden nicht beobachtet und die Implantate wiesen eine gute Biokompatibilität auf.

Kanter et al. verglichen einen Struvit-bildenden MPC mit einem Bruschit-bildenden CPC und einem CDHA-bildenden Referenzzement im Schafsmodell (KANTER et al., 2014). Die Struvit- und Bruschit-Zementformulierungen wurden in zwei verschiedenen PLRs (2 gml^{-1} und 3 gml^{-1}) und damit unterschiedlichen Porositäten in einem unbelasteten Bohrlochdefekt im trabekulären Knochen der medialen Femurkondyle untersucht. Während die Bruschit-bildenden Zemente und der CDHA Zement nach zehn Monaten Implantation nahezu unverändert waren, wurde bei den Struvit-bildenden Zementen eine nahezu vollständige Degradation beobachtet. Hier wies der Zement in der niedrigeren PLR (und damit der höheren Porosität) ein schnelleres Abbauverhalten auf. Insgesamt zeigten beide MPCs ein überlegenes Degradationsverhalten im Vergleich zu den CPCs, bei gleichzeitiger Knochenregeneration und guter Biokompatibilität. Dabei nahm die mechanische Stabilität der Implantate durch die Degradation zwar zunächst ab, wurde jedoch im Zeitverlauf durch neugebildetes Knochengewebe wieder auf physiologische Werte angehoben. Die höhere Abbaugeschwindigkeit des Struvit-Zements wurde mit der höheren passiven Löslichkeit bei physiologischem pH erklärt, während die CPCs laut den Autoren vorrangig über zelluläre aktive Prozesse abgebaut wurden. Auch bei der Implantation in einen teilbelasteten Knochendefekt in der proximalen Tibia (IGNATIUS et al., 1997; SIMON et al., 2003) zeigten beide Struvit-Zemente eine schnelle Degradation bei gleichzeitiger Knochenregeneration, wobei die mechanische Belastung die Abbaugeschwindigkeit bzw. Knochenneubildung nicht signifikant zu beeinflussen schien (KANTER et al., 2018).

3.3. Magnesiumphosphat-Granulate

Neben der Applikation in der Form von Zementen, können KEM klinisch auch in Form von Granulat angewendet werden. Granulate werden insbesondere in der Zahnmedizin zur Augmentation ossärer Defekte im Bereich der Implantologie (z.B. Sinuslift), Oralchirurgie, Parodontologie oder Endontologie (z.B. nach Wurzelspitzenresektion) eingesetzt, um beispielsweise vor dem Setzen eines Implantats ein stabiles neues Knochenlager aufzubauen (ZHAO et al., 2021). In der klinischen Anwendung haben sich Calciumphosphat-basierte Granulate gut etabliert, die in der Regel aus HA, β -TCP, oder einer Mischung der beiden Calciumphosphate bestehen. Durch die Granulatschüttung entsteht zusätzlich zur vorhandenen Werkstoffporosität eine interkonnektierende Makroporosität mit Porengrößen $> 100 \mu\text{m}$, sodass eine osteokonduktive Matrix bereitgestellt wird, in die neugebildetes Knochengewebe einwachsen kann. Ein Nachteil könnte jedoch die eher scharfkantige Form dieser Granulate und damit eine potentielle Gewebereizung sein, die meist durch das Zerkleinern eines ausgehärteten Materialblocks hergestellt werden. Zudem kommt es aufgrund der sehr langsamen Degradation, die der geringen Löslichkeit der Calciumphosphate geschuldet ist und die mehrere Jahre in Anspruch nehmen kann (MERTEN et al., 2001; HORCH et al., 2006), meist zur Bildung eines osseokeramischen Komposits durch das Einwachsen von Knochen. Eine Verbesserung könnte hier durch Materialien mit einer höheren passiven Löslichkeit *in vivo*, wie Magnesiumphosphat-basierten KEM, erreicht werden. So untersuchten Fuchs et al. sphärische, mit Calcium substituierte Magnesiumphosphat-Granulate in femoralen Knochendefekten im Kaninchenmodell (FUCHS et al., 2021). Neben einer guten Biokompatibilität wurde eine gute Osseointegration, sowie eine kontinuierliche Degradation mit gleichzeitiger Knochenregeneration beobachtet. Bei der Kontrolle aus HA waren hingegen nach zwölf Wochen Implantation kaum Anzeichen einer Degradation erkennbar. Zudem könnte die sphärische Form der Granulatkörner, die mittels Emulsionsverfahren (CHRISTEL et al., 2014) hergestellt wurden, zu einer besseren Regeneration *in vivo* beigetragen haben. Zur Beurteilung der Eignung von Magnesiumphosphat-basiertem Granulat als KEM sind jedoch weitergehende Studien erforderlich.

4. Ziel der Studie

Ziel der Studie war es, die Eignung von zwei verschiedenen Magnesiumphosphat-Mineralen, Struvit und K-Struvit, in zwei unterschiedlichen Applikationsformen, als Zement und als Granulat, für den Knochenersatz im Schafsmodell zu untersuchen.

Für die Beurteilung der Biokompatibilität, Osseointegration und Degradation, sowie der Knochenregenerationskapazität der Magnesiumphosphat-basierten KEM, wurden die Materialien nach zwei und vier Monaten Implantation im trabekulären Knochen analysiert. Hierzu wurde der Struvit- bzw. K-Struvit-Zement in einen teilbelasteten Knochendefekt in der proximalen Tibia injiziert und das Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat in einen unbelasteten Knochendefekt in der medialen Femurkondyle eingebracht. Um die Materialien auf osteoinduktive Eigenschaften hin zu untersuchen, wurden sie zudem heterotop in Form von präformierten zylindrischen Formkörpern subkutan implantiert.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Herstellung der zu untersuchenden Materialien

Die Entwicklung und Herstellung der Magnesiumphosphat-basierten KEM erfolgte durch den Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde (FMZ) der Universität Würzburg. Es wurden zwei verschiedene Materialien, Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) und K-Struvit ($\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in zwei verschiedenen Applikationsformen, als Zement und als Granulat, für die Implantation im Knochen hergestellt. Zudem wurden von jedem Material zylindrische Formkörper für die subkutane Implantation angefertigt.

1.1. Herstellung des Ausgangsmaterials

Für die Herstellung des Ausgangspulvers Farringtonit (Trimagnesiumphosphat, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) wurden $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat; Alfa Aesar, Ward Hill, USA) und $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (Magnesiumhydroxid; VWR International, Radnor, USA) in einem molaren Verhältnis von 2:1 gemischt und für 5 Stunden bei 1100 °C gesintert. Der entstandene Sinterkuchen wurde gemahlen und auf eine Partikelgröße von unter 355 µm gesiebt.

1.2. Zemente für die Implantation im Knochen

Die Herstellung der Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) und K-Struvit ($\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Zemente erfolgte in einem Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis (PLR, powder-to-liquid ratio) von 1 gml⁻¹. Dafür wurden jeweils 5 g $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ mit 5 ml Lösung angerührt. Letztere bestand im Falle des Struvit-Zements aus 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diammoniumhydrogenphosphat) und 0,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Ammoniumdihydrogenphosphat), im Falle des K-Struvit-Zements aus 3 M K_2HPO_4 (Dikaliumhydrogenphosphat) und 0,5 M KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat). Das Farringtonit-Pulver wurde für den Tierversuch portionsweise in Plastikbechern mit Schraubdeckelverschluss (Dr. Junghans® Medical GmbH, Bad Lausick, Deutschland) abgefüllt, die zugehörige Lösung in 15 ml Falcon Tubes (Falcon® Conical Centrifuge Tubes, Corning, New York, USA) (Abbildung 1 A, B). So konnte intraoperativ die Lösung zu dem Pulver in den

Becher gegeben werden. Hier wurde der Zement anschließend mithilfe eines Spatels angerührt und zur Injektion in eine Spritze überführt.

1.3. Formkörper für die subkutane Implantation

Aus beiden Zementvarianten wurden am FMZ zylindrische Formkörper ($d = 10 \text{ mm}$, $h = 3 \text{ mm}$) für die subkutane Implantation hergestellt (Abbildung 1 D). Der Zement wurde dafür mit einer PLR von 1 gml^{-1} aus den gleichen Komponenten wie in Kapitel 1.2 beschrieben angerührt und in entsprechend große Gießformen aus Silikon gegossen. Dort härtete er für 24 Stunden bei 37 °C und 100% Luftfeuchte aus. Für den Tierversuch wurden pro Materialvariante jeweils vier Stück in einen Plastikbecher (Dr. Junghans® Medical GmbH, Bad Lausick, Deutschland) verpackt.

1.4. Granulate für die Implantation im Knochen

Die Struvit- und K-Struvit-Granulate wurden am FMZ mittels Emulsionsverfahren hergestellt. Bei diesem Verfahren wird ein flüssiger Schlicker mithilfe eines Tensids in einer Ölphase dispergiert und härtet anschließend durch eine Zementreaktion aus. Diese Methodik ermöglicht die Herstellung von sphärischen, abgerundeten Granulatkörnern mit einer glatten Oberfläche (CHRISTEL et al., 2014). Für die Herstellung des Granulats wurde zunächst wieder eine Struvit- bzw. K-Struvit-Zementpaste in einer PLR von 1 gml^{-1} angerührt. Für das K-Struvit-Granulat wurde die Zusammensetzung der Lösung minimal zu $2.5 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$ und $1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ verändert, um für beide Granulate eine ähnliche Größenverteilung zu erhalten. Der Zement wurde anschließend mittels Emulsionsverfahren in einer Öl-Tensid-Mischung (Öl: Miglyol® 812, Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland; Tensid: Tween® 80, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) unter Rühren für 1 Stunde zu Granulatkörnern umgesetzt. Nach Abschluss der Granulierung wurde das Granulat gesiebt und mit Aceton, Isopropanol und Milli-Q® Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gespült. Letztlich wurde das Granulat für 12 Stunden bei 37 °C getrocknet und auf eine Größe von 1 bis $1,4 \text{ mm}$ Durchmesser gesiebt (Abbildung 1 C). Die Granulate wurden für die Verwendung im Tierversuch in Plastikbecher (Dr. Junghans® Medical GmbH, Bad Lausick, Deutschland) abgefüllt, wobei pro Bohrlochdefekt jeweils 3 g Granulat veranschlagt wurden.



Abbildung 1: Für die in vivo Implantation verwendete Materialien: (A, B) Lösung und Pulver zum Anrühren der Struvit- und K-Struvit-Zemente. (C) Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat. (D) Struvit- bzw. K-Struvit-Formkörper.

2. Sterilisation der Materialien

Die Materialien wurden für den Tierversuch in Sterilisationsverpackungen eingeschweißt und durch γ -Bestrahlung bei > 25 kGy sterilisiert.

3. Tierversuch

Der Tierversuch wurde am 19. Juni 2019 durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Reg.-Nr. 1451) und unter den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG), der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) und der Richtlinie 2010/63/EU (Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere) durchgeführt.

3.1. Tiermodell

Insgesamt wurden 14 adulte (4-6 Jahre), weibliche Merino-Schafe mit einem mittleren Gewicht von 103 ± 14 kg für den Tierversuch verwendet. Die Tiere wurden von einem regionalen Schäferbetrieb bezogen und zur Eingewöhnung sechs Wochen vor Versuchsbeginn am Tierforschungszentrum der Universität Ulm eingestallt. Die Unterbringung erfolgte in Kleingruppen in mit Stroh eingestreuten Boxen. Frisches Wasser aus Selbsttränken und Heu standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Mittels einer Zeitschaltuhr wurde ein künstlicher 12 Stunden-langer Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten. Um sicherzustellen, dass keine trächtigen Tiere in den Versuch aufgenommen wurden, erfolgte vor Operationsbeginn zum Trächtigkeitsausschluss eine zweimalige Ultraschalluntersuchung im Abstand von acht Wochen.

3.2. Versuchsdesign

Die 14 Schafe wurden randomisiert in zwei Versuchsgruppen zu je sechs Tieren eingeteilt, dabei wurde ein Reservetier pro Gruppe für eventuelle Zwischenfälle in die Studie eingeschlossen (Tabelle 3). Auf Kontrollgruppen (Leerdefekt und Kontrollmaterial CDHA) wurde aus ethischen Gründen verzichtet, da diese bereits in einer Vorstudie untersucht wurden (KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018).

Um die Anzahl an Versuchstieren zu reduzieren, wurde jedes Schaf bilateral operiert. Pro Tier wurden zwei Magnesiumphosphat-basierte Materialien, Struvit und K-Struvit, in jeweils zwei verschiedenen Applikationsformen, als Zement und als Granulat, implantiert. Die Zemente wurden in einen teilbelasteten, keilförmigen Defekt (6 x 14 x 24 mm) injiziert, der 3 mm unterhalb und parallel zum medialen Tibiaplateau gesetzt wurde (IGNATIUS et al., 1997; SIMON et al., 2003). Das Granulat wurde in einen mechanisch unbelasteten Bohrlochdefekt (d = 10 mm, l = 15 mm) in der medialen Femurkondyle eingebracht. Um die Osteoinduktivität der implantierten Materialien zu analysieren, wurden zudem pro Bein vier Formkörper (d = 10 mm, h = 3 mm) im medialen Oberschenkelbereich subkutan implantiert.

Entsprechend der zu erwartenden Degradationszeit wurden zwei verschiedene Implantationszeiträume von zwei und vier Monaten untersucht.

Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsgruppen.

	Material	Applikationsformen	Standzeit	Tierzahl
Gruppe 1	Struvit K-Struvit	Zement (Tibia) Granulat (Femur) Formkörper (subkutan)	2 Monate	6 + 1*
Gruppe 2			4 Monate	6 + 1*
* Je 1 Reservetier pro Gruppe für eventuelle Zwischenfälle (z.B. Narkosezwischenfall)				12 + 2*

3.3. Operation

Anästhesie und Operationsvorbereitung

Die Prämedikation erfolgte mit 0,2 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2 % Injektionslösung für Tiere: Rinder, Pferde, Hunde, Katzen, Bayer Vital GmbH) intramuskulär (i.m.). Für die perioperative Analgesie wurde den Tieren 4 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Rinder, Zoetis GmbH, Deutschland) und als perioperative Infektionsprophylaxe 10 mg/kg KG Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl® LA 20 %, Veyx-Pharma GmbH, Deutschland) subkutan (s.c.) verabreicht.

Nach Eintritt der sedativen Wirkung der Prämedikation wurden die Tiere in einer Transportkarre in den Operationsvorbereitungsraum gebracht und ein Venenkatheter (Vasofix® Braunüle® 20 G, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) in die *V. auricularis lateralis* gelegt. Anschließend wurde die Anästhesie nach Wirkung mit 5-10 mg/kg KG Thiopental-Natrium (Thiopental Inresa 0,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland) intravenös (i.v.) eingeleitet. Die Narkosetiefe wurde anhand des Lid- und Schluckreflexes kontrolliert. Nach dem Ablegen wurden die Tiere mittels Laryngoskop mit einem Endotrachealtubus der Größe 12 intubiert, der an einem Maulkeil fixiert wurde. Anschließend wurden sie unverzüglich an ein Inhalationsnarkosegerät angeschlossen. Zudem wurde nach der Intubation eine Pansensonde geschoben, um einer Pansentympanie vorzubeugen. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Isofluran (Isofluran Baxter, Baxter GmbH, Deutschland) in Sauerstoff unter Spontanatmung. Die Vitalparameter wurden während der Anästhesie kontinuierlich überwacht und im Anästhesieprotokoll vermerkt. Um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern, wurde vor und während der Operation eine Augensalbe (Vidisc®, Dr. Gerhard Mann GmbH, Deutschland) appliziert. Ferner wurde den Tieren über den Venenkatheter eine isotonische Elektrolytlösung (Jonosteril®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) zur perioperativen Flüssigkeitssubstitution verabreicht.

Nach dem Scheren der beiden Hintergliedmaße wurde das Operationsfeld gründlich mit Jodseife gewaschen (Jodosept PVP®, Vetoquinol GmbH, Deutschland) und mit Alkohol (70 %) entfettet. Anschließend wurden die

Tiere in den Operationssaal gefahren und auf einer Wärmematte in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Das Operationsfeld wurde mehrfach mit einem alkoholischem Hautantiseptikum (Kodan® Tinktur Forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Deutschland) desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgedeckt.

Chirurgischer Zugang

Die Tiere wurden bilateral operiert. Pro Seite wurde randomisiert jeweils eine Materialvariante (Struvit oder K-Struvit) in zwei verschiedenen Applikationsformen (Zement und Granulat), sowie in Form von vier subkutanen Formkörpern implantiert. Der operative Zugang erfolgte jeweils medial auf Höhe des Kniegelenks (Abbildung 2 A). Nach Palpation des *Lig. collaterale mediale* wurde die Haut mittels eines Skalpell von proximal nach distal ca. 15-20 cm lang inzidiert, kranial und parallel zum medialen Seitenband. Im Anschluss erfolgte schichtweise die Durchtrennung des subkutanen Gewebes (Abbildung 2 B), der *Fascia femoralis superficialis* und der *Fascia genus*, um das *Lig. collaterale mediale* darzustellen. Um die Knochendefekte im Anschluss an die Implantation der Materialien abzudecken, wurde kranial des medialen Seitenbandes an der medialen Fläche der proximalen Tibia ein Faszienlappen über 3-4 cm von distal nach proximal bis kurz vor den Gelenkspalt präpariert (Abbildung 3 A), ohne das Kniegelenk zu eröffnen. Dieser wurde während der Operation mit einer, in steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) getränkten Kompresse abgedeckt, um einem Austrocknen des Gewebes entgegenzuwirken.

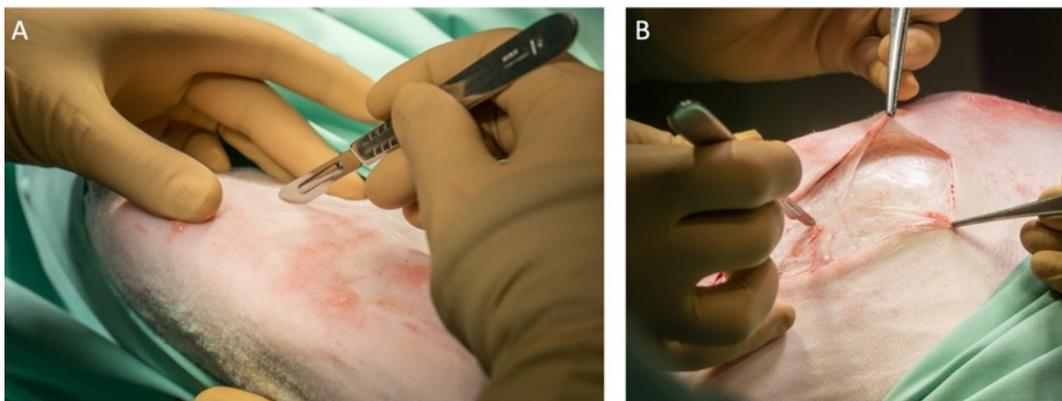


Abbildung 2: Medialer Zugang zu proximaler Tibia und medialer Femurkondyle mit proximo-distalem Hautschnitt, parallel zum *Lig. collaterale mediale*.

Operationstechnik tibialer Knochendefekt

Für das Setzen des keilförmigen Defekts in der Tibia wurde ein speziell für diesen Zweck entwickeltes Frässystem (Eigenkonstruktion des Institutes für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universitätsklinikum Ulm), bestehend aus einer Druckluft-Fräsmaschine mit Aufsatz und einer Fräslehre mit abnehmbarer Positionshilfe, verwendet. Zur Positionierung der Fräslehre wurden zunächst zwei Kirschner Bohrdrähte ($d = 1,6 \text{ mm}$, $l = 150 \text{ mm}$, Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) 3 mm unterhalb des Gelenkspaltes an der medialen Fläche der Tibia gesetzt (Abbildung 3 B).

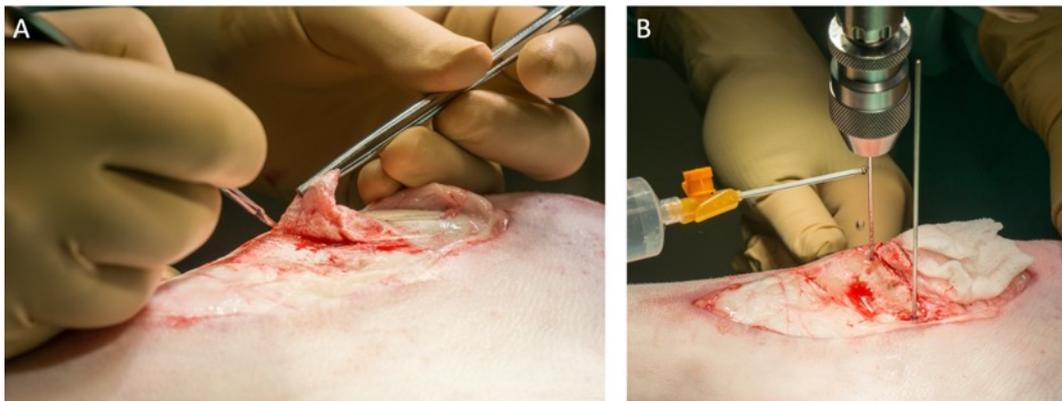


Abbildung 3: (A) Präparation des Fasziennippels. (B) Setzen der Kirschner Bohrdrähte 3 mm unterhalb des Tibiaplateaus.

Über die Bohrdrähte wurde die mit der Fräslehre verbundene Positionshilfe gefädelt und mit Hilfe dreier Stellschrauben ausgerichtet. Mit einem 2,5 mm Bohrer wurden diaphysär unikortikale Bohrlöcher angebracht. In diesen wurde die Fräslehre mittels selbstschneidenden Kortikalisschrauben ($d = 2,7 \text{ mm}$, $l = 16 \text{ mm}$, Depuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) befestigt (Abbildung 4 A). Danach wurden die Kirschner Bohrdrähte und die Positionshilfe entfernt (Abbildung 4 B).

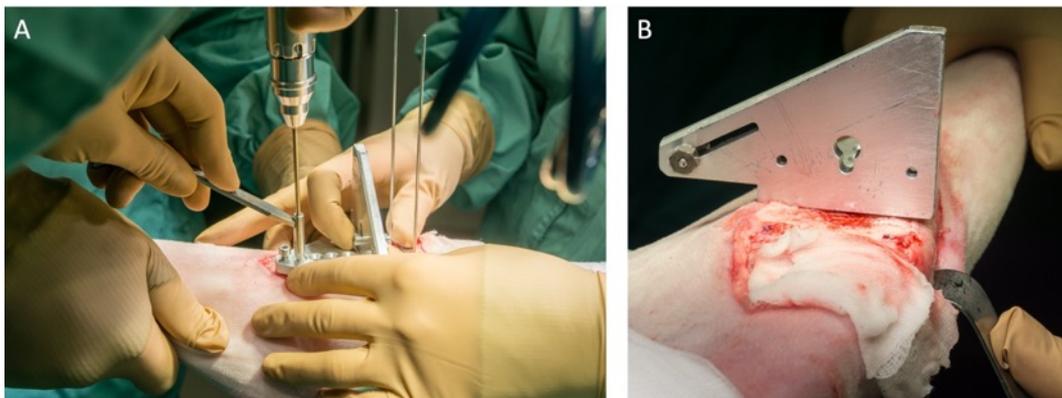


Abbildung 4: (A) Ausrichten der Fräslehre mit Positionshilfe anhand der Kirschner Bohrdrähte und Fixierung der Fräslehre. (B) Platzierte Fräslehre nach Entfernung der Positionshilfe.

Anschließend wurde mit einer Fräse ($d = 6 \text{ mm}$) schrittweise, unter kontinuierlicher Spülung mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland), 3 mm unterhalb und parallel zum Tibiaplateau ein keilförmiger Defekt in der proximalen Tibia ($6 \times 14 \times 24 \text{ mm}$) gesetzt (Abbildung 5 A). Das Fräsen erfolgte schrittweise, wobei nach jedem Fräsvorgang anfallende Knochenspäne entfernt und der Fräser gereinigt wurde. Anhand eines Testimplantats konnte die Defektgröße überprüft werden (Abbildung 5 B). Nach dem Erreichen der gewünschten Tiefe wurde die Fräslehre entfernt. Der Knochendefekt wurde gespült und vorübergehend mit einer sterilen Kompresse tamponiert (Abbildung 5 C), bevor die zu untersuchenden Zemente angemischt und in den Defekt eingebracht wurden.

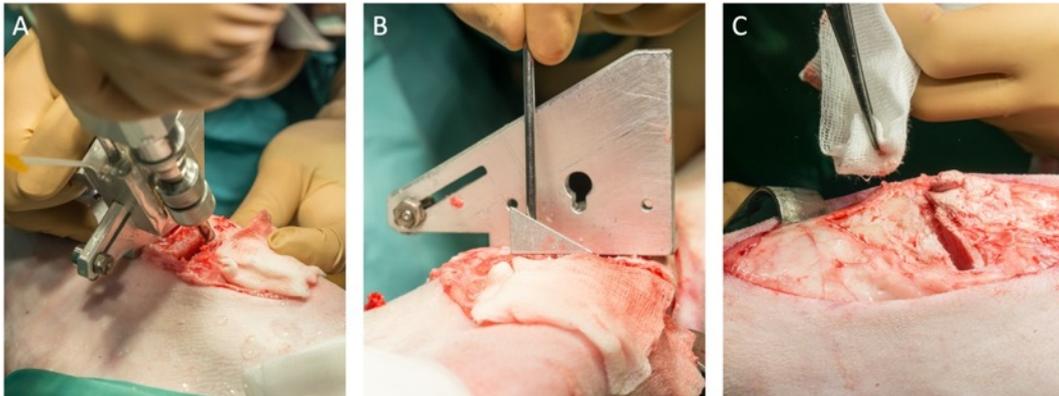


Abbildung 5: (A) Schrittweises Fräsen des keilförmigen Defekts in der proximalen Tibia unter Spülung mit steriler Kochsalzlösung. (B) Überprüfen der Größe des Defekts mithilfe eines Probeimplantats. (C) Keilförmiger Defekt in der proximalen Tibia nach Entfernung der Fräslehre.

Anrühren und Implantation der Zemente

Pro Hintergliedmaße wurde eine Materialvariante, Struvit oder K-Struvit, implantiert. Zum Anrühren des Zements wurde die jeweilige Lösung zu dem dazugehörigen Pulver gegeben. Mithilfe eines Spatels wurde der Zement für eine Dauer von 1 Minute angerührt, bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hatte und eine homogene Masse entstanden war. Anschließend wurde der Zement für die Applikation in eine Spritze (10 ml BD Plastipak™ Spritzen mit Luer-Lok™-Ansatz, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) gefüllt, die mit einer Verschlusskappe (Combi-Stopper Verschlusskonus, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) versehen war. Das Abbindeverhalten und die Viskosität des Zements wurde durch das hin- und herbewegen der Spritze überprüft. Die optimale Viskosität zur Applikation war im Falle des Struvit-

Zements nach 2-3 Minuten erreicht, beim K-Struvit-Zement nach 5-7 Minuten. Sobald der Zement ausreichend viskös war, erfolgte die Injektion in den tibialen Knochendefekt (Abbildung 6). Nach dem Aushärten des Zements wurde der Operationsbereich mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) gespült.



Abbildung 6: (A) Injektion des Zements in den tibialen Knochendefekt. (B) Keilförmiger Defekt in der proximalen Tibia mit implantiertem Zement.

Operationstechnik femoraler Bohrlochdefekt

Die Faszieninzision kranial des medialen Seitenbandes wurde für den operativen Zugang zur medialen Femurkondyle nach proximal erweitert und es wurde bis zum Knochen präpariert. Für das Setzen des zylindrischen Defekts wurde hier, unter der Retraktion des *M. rectus femoris*, mit einem 2,5 mm Bohrer vorgebohrt. Anschließend wurde mit einem 10 mm Bohrer, der mit einem Abstandshalter versehen war, ein zylindrischer Bohrlochdefekt ($d = 10 \text{ mm}$, $h = 15 \text{ mm}$) gesetzt (Abbildung 7 A). Anfallende Knochenespäne wurden entfernt, der Bohrlochdefekt gespült und bis zur Implantation des zu untersuchenden Materials mit einer sterilen Kompresse austamponiert.

Implantation des Granulats

Das Struvit- bzw. das K-Struvit-Granulat wurde zunächst mithilfe eines Spatels mit autologem Blut vermischt, das intraoperativ anhand eines zweiten Venenverweilkatheters (Vasofix® Braunüle® 20G, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) aus der *V. auricularis lateralis* gewonnen wurde. Daraufhin wurde es mit dem Spatel in den Bohrlochdefekt in der medialen Femurkondyle eingebracht (Abbildung 7 B, C).

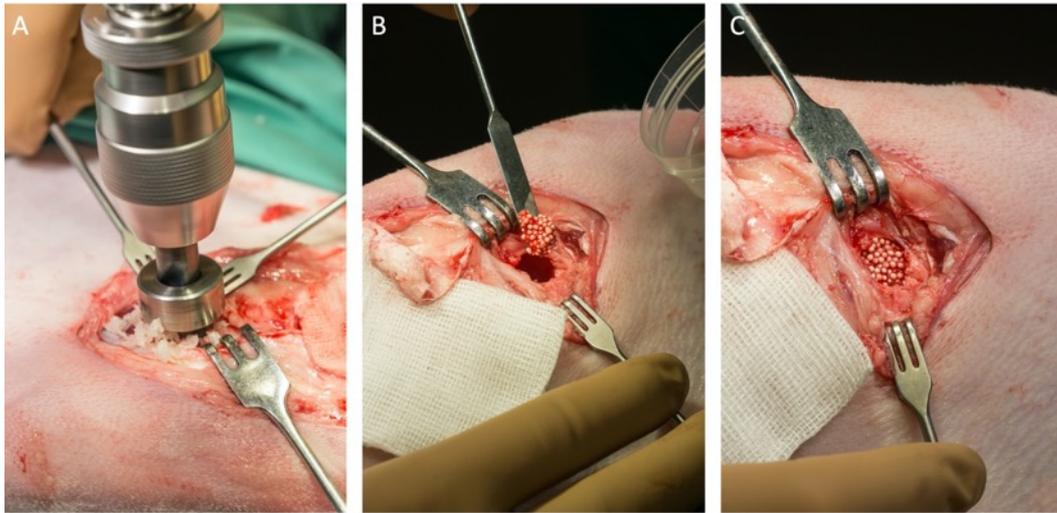


Abbildung 7: (A) Bohren des zylindrischen Defekts in der medialen Femurkondyle. (B) Einbringen des mit autologem Blut vermischten Granulats in den Bohrlochdefekt. (C) Implantiertes Granulat vor Wundverschluss.

Im Anschluss wurden pro Materialvariante vier Formkörper ($d = 10 \text{ mm}$, $h = 3 \text{ mm}$) subkutan implantiert, mit einem Abstand von 5-10 cm zur Hautinzision (Abbildung 8 A). Danach erfolgte der schichtweise Verschluss von Faszie und Subkutis durch Einzelknopfhefte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 2-0, Ethicon®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Deutschland) (Abbildung 8 B) und der Verschluss der Haut mit Klammern (Manipler® AZ 35 W Einweg-Hautklammergerät, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) (Abbildung 8 C).

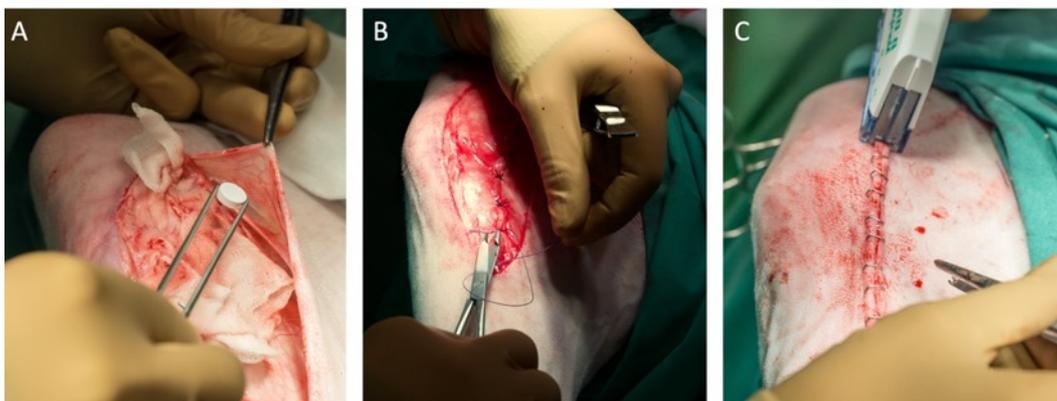


Abbildung 8: (A) Subkutane Implantation der Zement-Formkörper. (B) Schichtweiser Wundverschluss von Faszie, Subkutis und (C) Haut.

Letztlich wurde die Haut mit einem Hautantiseptikum (Octenisept®, Schülke & Mayr, Deutschland) gereinigt und zum Schutz der Operationswunde ein Sprühverband (OPSITE Spray Sprühverband, Smith & Nephew GmbH, Deutschland) aufgebracht.

Im Anschluss wurde die kontralaterale Hintergliedmaße steril abgedeckt und

operativ ebenso verfahren wie zuvor beschrieben. Hier wurde jeweils die andere der zwei Materialvarianten (Struvit bzw. K-Struvit) implantiert.

3.4. Postoperatives Management

Postoperativ wurden die Tiere in eingestreute Boxen gebracht. Nach dem Wiedereinsetzen des Schluckreflexes erfolgte die Extubation und das Ziehen des Venenkatheters. Die Schafe blieben während der Aufwachphase bis zum Wiedererlangen ihrer Steh- und Gehfähigkeit unter ständiger Beobachtung. Zur postoperativen Analgesie und als Antibiose wurde den Tieren über weitere drei Tage hinweg 4 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Rinder, zoetis GmbH, Deutschland) und 10 mg/kg KG Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl® LA 20 %, Veyx-Pharma GmbH, Deutschland) s.c. verabreicht. In der ersten Woche wurde täglich eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt und die Belastung der Hintergliedmaßen überprüft. Zudem wurden täglich die Wunden kontrolliert und bei Bedarf mit einem Hautantiseptikum (Octenisept®, Schülke & Mayr, Deutschland) gereinigt. Bis zum Entfernen der Hautklammern nach 10-12 Tagen wurden die Schafe in Zweierboxen gehalten, anschließend wurden sie wieder in größere Gruppenboxen eingestallt.

3.5. Fluoreszenzmarkierung

Zur Darstellung der Knochenneubildung wurde der neu mineralisierte Knochen durch die Gabe von zwei verschiedenen Fluorochromen in einem Abstand von 14 Tagen markiert (Tabelle 4). Die Tiere mit einer Standzeit von zwei Monaten erhielten die erste Injektion von 25 mg/kg KG i.v. Tetracyclinhydrochlorid (Ursocyclin® 10 % pro inj., Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Deutschland) vier Wochen, die zweite Injektion von 10 mg/kg KG i.v. Calceingrün (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Deutschland) sechs Wochen *post operationem*. Den Tieren mit der viermonatigen Standzeit wurden die Fluorochrome nach elf und dreizehn Wochen verabreicht.

Tabelle 4: Postoperative i.v. Applikation fluoreszierender Farbstoffe.

Farbstoff	Applikationszeitpunkte	
	2 Monate Standzeit	4 Monate Standzeit
Tetracyclin	4 Wochen	11 Wochen
Calceingrün	6 Wochen	13 Wochen

3.6. Versuchsende

Je nach Implantationszeitraum wurden die Tiere nach zwei bzw. vier Monaten durch sachkundiges Personal des Tierforschungszentrums Oberberghof mittels Bolzenschuss betäubt und durch Blutentzug getötet. Danach wurden beide Hintergliedmaßen für weitergehende Analysen explantiert.

4. Probenaufbereitung und -analysen

4.1. Probenpräparation

Im Anschluss an die Explantation erfolgte die Präparation der Hintergliedmaßen. Währenddessen wurden die makroskopischen Befunde in einem Präparationsprotokoll festgehalten und die einzelnen Arbeitsschritte und Befunde mithilfe von Fotos dokumentiert.

Nach einem medialen Hautschnitt wurden die subkutan implantierten Formkörper entnommen und in 4 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden Haut, Muskulatur und umgebendes Bindegewebe entfernt und die regionalen Lymphknoten auf makroskopische Auffälligkeiten untersucht. Femur und Tibia wurden durch die Durchtrennung der Seiten- und Kreuzbänder voneinander getrennt und die Menisken entfernt. Danach wurde das distale Ende des Femurs und das proximale Ende der Tibia abgesägt.

Um die Implantate darzustellen, wurde die mediale Fläche von Tibia und Femur mittels einer rotierenden Schleifmaschine (TG 250, Jearn Wirtz, Düsseldorf, Deutschland) vorsichtig angeschliffen (Abbildung 9 und 10, Arbeitsschritt 2), bis das darüber gelegene Bindegewebe entfernt und das jeweilige Implantat gut sichtbar war. Im Anschluss wurden mithilfe einer Diamant-Bandsäge (EXAKT 300, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Deutschland) die lateralen Kondylen von Femur und Tibia entfernt (Abbildung 9 und 10, Arbeitsschritt 3).

An der Tibia wurde zunächst von medial eine ca. 7 mm dicke Scheibe für die Methylmethacrylat-Histologie (Abbildung 9, Arbeitsschritt 4) und in einem zweiten Schritt eine ca. 2 mm dicke Scheibe für die Paraffin-Histologie mit der Diamant-Bandsäge abgesägt (Abbildung 9, Arbeitsschritt 5). Beide Proben wurden im Anschluss in 4 % Formaldehyd fixiert.

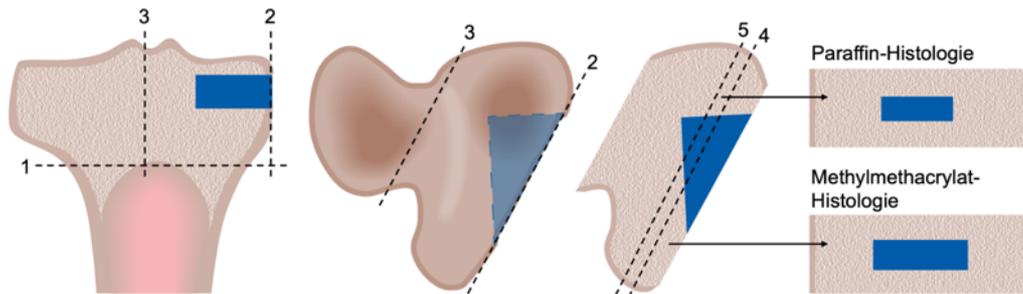


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Schnittführung bei der Anfertigung der histologischen Präparate des Tibiaplateaus. Die einzelnen Arbeitsschritte (1-5) sind als nummerierte gestrichelte Linien, der implantierte Zement ist in blauer Farbe dargestellt. Es wurde jeweils eine 2 mm dicke Scheibe für die Paraffin-Histologie und eine 7 mm dicke Scheibe für die Methylmethacrylat-Histologie angefertigt.

An der medialen Femurkondyle wurde der Knochen mit einer Entfernung von 1 cm Implantat abgetrennt (Abbildung 10, Arbeitsschritt 4), sodass ein ca. 3,5 x 3,5 x 3 cm großer Quader mit dem Implantat in der Mitte entstand. Von dieser Probe wurde von medial eine 5 mm dicke, planparallele Scheibe für den biomechanischen Indentationstest abgesägt (Abbildung 10, Arbeitsschritt 5), die bis zur Durchführung des Tests in, mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) getränkten Kompressen feucht gehalten wurde. Eine weitere, ca. 7 mm dicke Scheibe wurde von medial für die Untersuchung mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) und für die Methylmethacrylat-Histologie gewonnen (Abbildung 10, Arbeitsschritt 6). Letztlich wurde eine ca. 2 mm dicke Scheibe für die Paraffin-Histologie abgetrennt (Abbildung 10, Arbeitsschritt 7). Die Proben für die Histologie wurden in 4 % Formaldehyd fixiert.

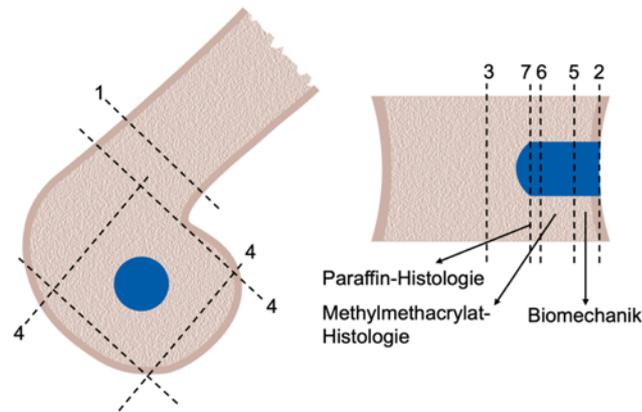


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Schnittführung bei der Anfertigung der Scheiben für die biomechanische und histologische Untersuchung der medialen Femurkondyle. Die einzelnen Arbeitsschritte (1-7) sind als nummerierte gestrichelte Linien, das implantierte Granulat ist in blauer Farbe dargestellt. Es wurde jeweils eine 5 mm dicke Scheibe für die biomechanische Untersuchung, eine 2 mm dicke Scheibe für die Paraffin-Histologie und eine 7 mm dicke Scheibe für die Methylmethacrylat-Histologie angefertigt.

4.2. Biomechanischer Indentationstest

Die femoralen Proben wurden einer biomechanischen Untersuchung unterzogen. Anhand eines Indentationstests wurde die Steifigkeit des Granulats vor und nach Implantation in die mediale Femurkondyle ermittelt.

Proben für die biomechanische Untersuchung

Wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 4.1) wurde eine 5 mm dicke, planparallele Scheibe der medialen Femurkondyle für die Biomechanik verwendet, die bis zur Prüfung in, mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) getränkten Kompressen feucht gehalten wurde. Der Indentationstest erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Präparation.

Um die Veränderung der Materialeigenschaften des Granulats durch die *in vivo* Implantation darzustellen, wurde das Granulat zusätzlich *ex vivo* (vor der Implantation) mittels Indentationstest untersucht. Dazu wurde an einem Schafs-Femur, der von einem lokalen Schäfer bezogen wurde, ein Bohrlochdefekt ($d = 10 \text{ mm}$) an der medialen Femurkondyle gesetzt, wie oben beschrieben (siehe Kapitel 3.3). Das Femur wurde ebenso präpariert und gesägt wie die Femora aus dem Tierversuch (siehe Kapitel 4.1). Letztlich wurde eine 5 mm dicke Scheibe mit dem zylindrischen Defekt in der Mitte abgetrennt, wobei an einer Seite der Scheibe ein dünner Knochensteg belassen wurde. In diesen Knochendefekt wurde das, mit Schafsblut vermischte

Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat gefüllt und anhand eines Indentationstest die Steifigkeit des Granulats im Defekt ermittelt. Zudem wurde als Referenz die Steifigkeit von nativem trabekulären Knochengewebe an 5 mm dicken Knochenscheiben aus einer intakten medialen Schafs-Femurkondyle ermittelt.

Prüfaufbau

Der Indentationstest wurde an einer Materialprüfmaschine des Typs Z 10 (Zwick GmbH und Co. KG, Ulm, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde die jeweilige Probe auf einer Druckplatte (Zwick GmbH und Co. KG, Ulm, Deutschland) positioniert und über einen Indenter (Eigenbau des Institutes für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik) einer axialen Kraft ausgesetzt (Abbildung 11). Für die Proben aus dem Tierversuch wurde hierfür ein Indenter mit einem Durchmesser von 4 mm verwendet. Das lose Granulat vor der Implantation wurde hingegen mit einem 10 mm Indenter getestet, um zu verhindern, dass das Granulat während der Prüfung seitlich aus dem Bohrlochdefekt herausgedrückt wurde. Die bei der Messung auftretenden Kräfte wurden durch einen 1 kN Kraftaufnehmer (Typ U1, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland) mit einer Genauigkeit von 0,23 % ermittelt. Die auftretende Verformung der Probe wurde über einen Messtaster (MT 1201, Dr. Johannes Heidenhain GmbH, Traunreut, Deutschland) mit einem Messbereich von 12 mm und einer Messgenauigkeit von $\pm 1 \mu\text{m}$ erfasst.

Um den Nullpunkt der Prüfung zu definieren, wurde vor dem Einbau des Messtasters eine Referenzfahrt durchgeführt. Dazu wurde der Indenter in Richtung der Druckplatte gefahren, bis er an diese andockte. Dieser Punkt wurde als Referenz festgelegt. Anschließend wurde der Messtaster eingebaut und die Proben auf der Druckplatte so positioniert, dass der Indenter mittig über dem Implantat ausgerichtet war.

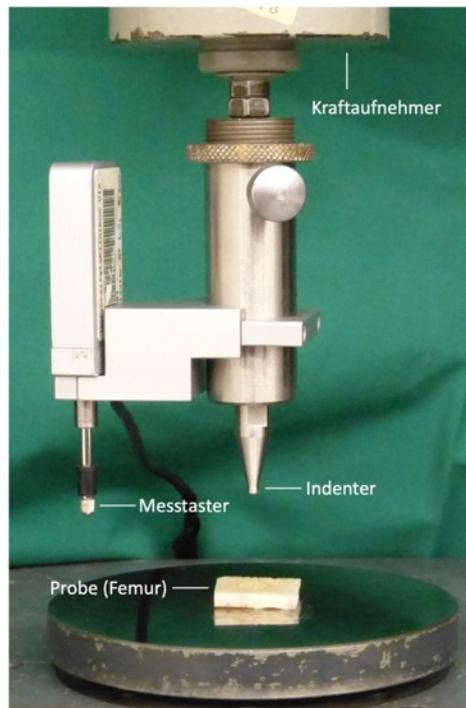


Abbildung 11: Prüfaufbau des biomechanischen Indentationstests. Über einen Indenter wurde eine axiale Belastung zentral auf die Probe ausgeübt. Mithilfe des Messtasters wurde die bei der Belastung auftretende Verformung der Probe erfasst.

Durchführung der Prüfung

Die Prüfung wurde mit einer Vorkraft von 2 N und einer Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min durchgeführt. Die Aufzeichnung der erfassten Daten (Kraft-Weg-Diagramm) erfolgte mit der zugehörigen Prüfsoftware TestXpert II (Zwick GmbH und Co. KG, Ulm, Deutschland). Die Steifigkeit K_{lin} in N/mm wurde anhand der Steigung des Graphen im linearen Bereich des aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagramms ermittelt (Abbildung 12).

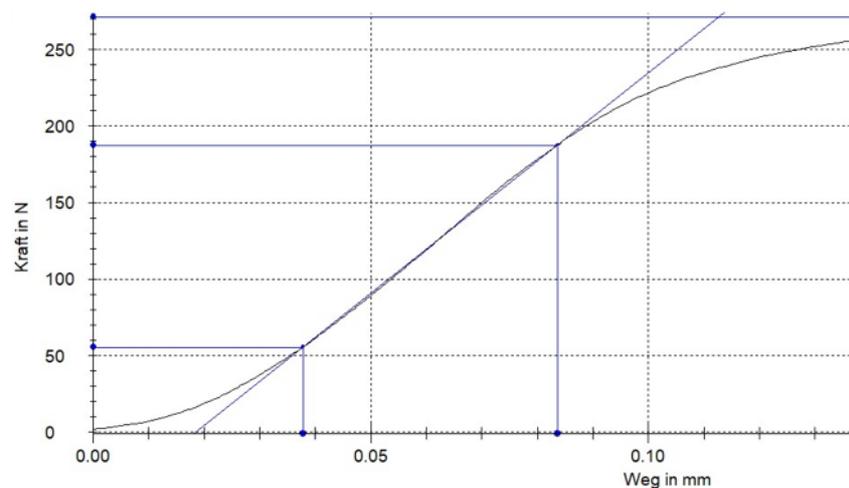


Abbildung 12: Kraft-Weg-Diagramm der biomechanischen Prüfung mit eingezeichneter Steigung im linearen Bereich des Graphen zur Ermittlung der Steifigkeit K_{lin} in N/mm der Probe.

4.3. Mikro-Computertomographie (μ CT)

Sowohl die in 4 % Formaldehyd fixierten Femur-Proben als auch die subkutanen Formkörper wurden nach der Präparation mittels μ CT (Skyscan 1172, Bruker MicroCT, Kontich, Belgien) analysiert. Dazu wurden die Proben bei 100 kV und 100 mA gescannt, die femoralen Proben mit einer Auflösung von 30 μ m, die subkutanen Implantate mit einer Auflösung von 17 μ m. Bei jedem Scan wurden zwei Phantome mit bekannter HA-Menge (250 mg HA/cm³ und 750 mg HA/cm³, Bruker MicroCT, Kontich, Belgien) mitgeführt. Die Rekonstruktion und Auswertung der Datensätze erfolgte mit der dazugehörigen Software NRecon, DataViewer und CTAn (Bruker MicroCT, Kontich, Belgien). Um Veränderungen durch die Implantation *in vivo* darzustellen, wurde das Material zusätzlich *ex vivo* (vor der Implantation) gescannt und auf die gleiche Weise analysiert wie die Proben nach der Implantation.

Femur Proben

Da die implantierten Materialien, Struvit und K-Struvit, eine ähnliche Mineraleichte wie trabekulärer Knochen aufweisen, war es nicht möglich einen Grenzwert innerhalb der Graustufen zu definieren, um die Implantate von Knochengewebe zu unterscheiden. Um Veränderungen durch eine mögliche Knochenneubildung innerhalb des Defektbereiches und/oder durch eine Degradation der implantierten Materialien quantitativ zu erfassen, wurde daher die apparente Mineraleichte (mineral density, MD in mg HA/cm³) im Defektbereich ermittelt. Dazu wurde ein zirkuläres „volume of interest“ (VOI) in dem Bereich des ursprünglichen Bohrlochdefekts und mit dessen Durchmesser ($d = 10$ mm) definiert (Abbildung 13), wobei die Auswertung über einen Bereich von 1 mm Höhe erfolgte. Innerhalb dieses VOIs wurde anschließend mithilfe der Software CTAn (Bruker MicroCT, Kontich, Belgien) die Mineraleichte bestimmt.

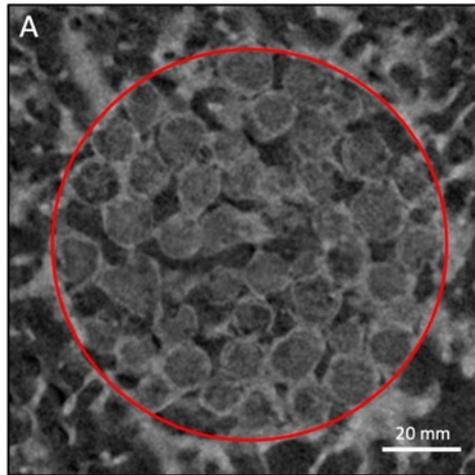


Abbildung 13: VOI zur Bestimmung der apparenten Mineraleichte ($d = 10 \text{ cm}$) innerhalb des mit Granulat gefüllten Bohrlochdefekts in der medialen Femurkondyle.

Subkutane Implantate

Um die Degradation der subkutan implantierten Formkörper zu quantifizieren, wurde das Volumen der Formkörper *ex vivo* vor und nach der Implantation *in vivo* ermittelt. Hierfür wurde mittels der Software CTAn (Bruker MicroCT, Kontich, Belgien) das Objektvolumen (in mm^3) erfasst.

4.4. Histologie

4.4.1. Methylnmethacrylat-Histologie

Anfertigung der histologischen Schliffe

Die Tibia- und Femur-Proben mit den implantierten Materialien, sowie die subkutanen Formkörper wurden für zwei bis fünf Tage in 4 % Formaldehyd fixiert und dann für ca. 4 Stunden unter fließendem Leitungswasser gewässert. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (40–100 % Ethanol) und eine Entfettung mit Xylol. Für die Anfertigung der Kunststoff-Schliffe entsprechend der Trenn-Dünnschliff-Technik von Donath (DONATH und BREUNER, 1982) wurden die fixierten, entwässerten und entfetteten Proben anschließend mit Methylnmethacrylat (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) infiltriert. Die Aushärtung erfolgte unter der Zugabe von Benzoylperoxid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Nonylphenyl-Polyethylenglykol-Acetat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Danach wurden die polymerisierten Gewebeblöcke planparallel zwischen zwei Objektträger aufgebracht. Hierfür wurde die nicht zu untersuchende Probenseite mithilfe

eines kaltpolymerisierenden Drei-Komponenten-Klebers (Technovit® 4000, Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) auf einem Objektträger befestigt. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde die Oberfläche des Gewebeblockes mit einem Mikroschleifsystem (400 CS, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) angeschliffen, bis die histologisch zu untersuchende Fläche gut sichtbar war. Nach Politur der Oberfläche wurde ein zweiter Objektträger anhand einer Präzisionsklebepresse (402, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf den Gewebeblock geklebt (Technovit® VLC 7200, Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) und anhand einer Bandsäge (EXAKT 300, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Deutschland) ein Trennschnitt hergestellt. Aus diesem wurden anschließend mit dem Mikroschleifsystem (400 CS, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) Dünnschliffe mit einer Schliffdicke von ca. 80–100 µm hergestellt und abschließend die Oberfläche poliert. Um die Fluoreszenz der Proben zu erhalten, wurde bei der Probenaufbereitung eine Lichtexposition weitestgehend vermieden, indem die Proben während der einzelnen Arbeitsschritte abgedeckt und lichtgeschützt gelagert wurden. Noch vor der Färbung der Dünnschliffe erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tibia- und Femur-Präparate.

Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde bei den Tibia- und den Femur-Präparaten die Knochenneubildung im Bereich der degradierenden Implantate beurteilt. Dafür wurden die Dünnschliffe noch vor der Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop (DMI6000B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) qualitativ ausgewertet und anhand der Software LAS AF (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 50-facher Vergrößerung eingescannt. Für die Darstellung der Tetracyclin- bzw. der Calceingrün-Fluoreszenz wurden zwei verschiedene Anregungsfilter (Filterwürfel L5 ET bzw. LED 405, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Tetracyclin stellte sich gelb, Calceingrün leuchtend grün dar.

Bei den Tibia-Präparaten wurde zusätzlich die Knochenneubildungsrate (bone formation rate, BFR in $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$) fluoreszenzmikroskopisch (Axiophot 451887, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) bestimmt. Um die Knochenneubildungsrate in dem Bereich, in dem der degradierende Zement durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt wurde, zu bestimmen, wurde eine direkt an den proximalen Rand des Zements angrenzende, rechteckige „region of interest“ (ROI) von ca. 11 mm^2 gewählt (Abbildung 14). Zum Vergleich wurde die Knochenneubildungsrate in einer zweiten, gleich großen ROI im peripheren trabekulären Knochen ermittelt. Innerhalb dieser ROIs wurden die Abstände der gelben Tetracyclin- und grünen Calcein-Banden mithilfe der Software Osteomeasure™ (Osteometrics Inc., Decatur, GA, USA) bestimmt und anhand dieser die Knochenneubildungsrate berechnet.

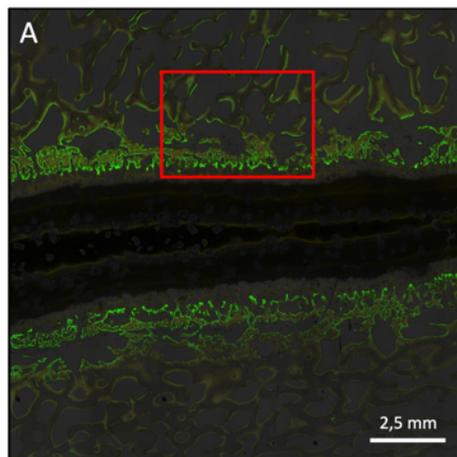


Abbildung 14: ROI zur Bestimmung der Knochenneubildungsrate (Tibia).

Bei den femoralen Präparaten mit dem implantierten Struvit- bzw. K-Struvit-Granulaten war eine quantitative Auswertung nicht möglich, da insbesondere nach vier Monaten Implantation keine klar definierbaren Banden erkennbar waren, sondern die Fluoreszenz eher diffus erschienen. Daher erfolgte hier nur eine qualitative Beurteilung der Präparate.

Färbung der histologischen Schliffe

Anschließend an die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Dünnschliffe für die lichtmikroskopische Auswertung mit Toluidinblau und Fuchsin (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) gefärbt (ROMEIS et al., 1989). Dadurch lassen sich Weichgewebe, Osteoidsäume, Zellkerne und Zellplasma blau anfärben. Die mineralisierte Knochenmatrix stellt sich

hingegen, abhängig von der Mineralisation des Gewebes, von zartrosa bis rotviolett dar. Die Schriffe wurden hierfür mit 0,35 % Ameisensäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angeätzt und unter fließendem Leitungswasser, sowie für 1 Minute in destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Präparate für 20 Minuten bei 40 °C in eine Färbelösung aus Toluidinblau, Fuchsin und 30 % Ethanol gegeben. Nach Spülung unter fließendem Leitungswasser erfolgte die Differenzierung in 70 % Ethanol und eine zweimalige Spülung in destilliertem Wasser für jeweils 2 Minuten. Nach dem Trocknen wurden die Schriffe eingedeckelt und histologisch ausgewertet.

Lichtmikroskopische Auswertung

Die qualitative histologische Auswertung der gefärbten Dünnschliffe erfolgte lichtmikroskopisch (DMI6000B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) unter verschiedenen Vergrößerungen. Bei der Beurteilung der Präparate wurde insbesondere auf das Vorliegen inflammatorischer Prozesse, den Kontakt zwischen Implantat und umgebenden Knochengewebe, sowie auf eine mögliche Degradation der Materialien und etwaiges neugebildetes Knochengewebe geachtet.

Um die Degradation der Implantate und die Knochenneubildung innerhalb des Defektbereichs zu quantifizieren, wurden die Tibia- und Femur-Präparate mit einem Lichtmikroskop (DMI6000B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und der LASX Software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 50-facher Vergrößerung eingescannt. Anschließend wurde mittels Histomorphometrie jeweils der prozentuale Anteil von Zement bzw. Granulat, Knochengewebe und Weichgewebe im Defektbereich ermittelt. Hierfür wurde bei den Präparaten der Tibia eine der Defekthöhe entsprechende quadratische ROI in das Zentrum des Knochendefekts bzw. Implantats gelegt (Abbildung 15 A). Da die Defekt- bzw. Implantathöhe in den histologischen Präparaten von der Schnittebene abhängig ist und nicht jeder Schnitt exakt im rechten Winkel zur Oberfläche des Implantats angefertigt werden konnte, wurde eine etwas größere ROI (7 x 7 mm) als die ursprüngliche Defekthöhe (6 mm) gewählt. Für die histomorphometrische Auswertung der femoralen Präparate wurde ein zirkuläres ROI mit einem

Durchmesser von 10 mm, entsprechend der ursprünglichen Defektgröße, festgelegt (Abbildung 15 B). Innerhalb der definierten ROIs wurde anschließend manuell der Anteil von Zement bzw. Granulat, Knochengewebe und Weichgewebe bestimmt. Diese wurden zur Berechnung des jeweiligen prozentualen Gewebeanteils in das Verhältnis zur entsprechenden ROI gesetzt.

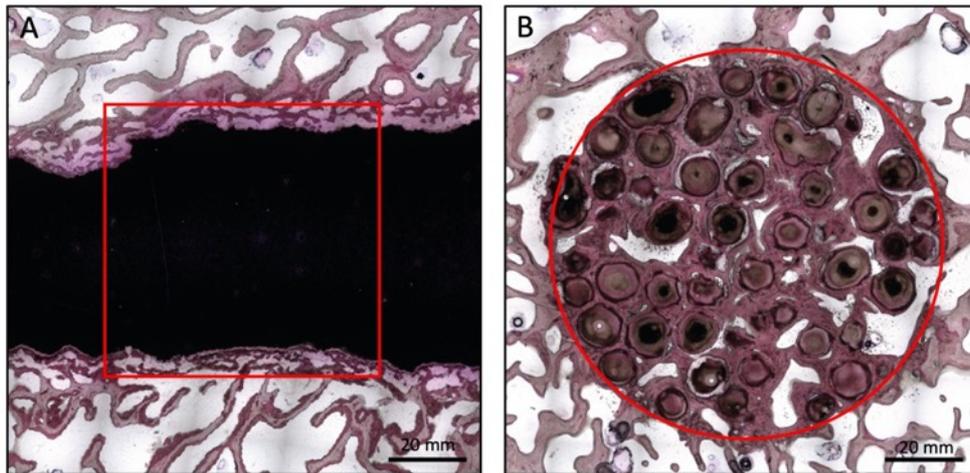


Abbildung 15: ROIs zur histomorphometrischen Auswertung von (A) Tibia und (B) Femur.

4.4.2. Paraffin-Histologie

Anfertigung der Paraffin-Schnitte

Die für 48 Stunden in 4 % Formaldehyd fixierten Femur- und Tibia-Proben für die Paraffin-Histologie wurden unter fließendem Leitungswasser gewässert, und für drei Monate in Ehtylendiamintetraessigsäure (EDTA, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entkalkt. Anschließend wurden die Präparate in einem Gewebereinbettautomaten (MTM, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 40–100 %) entwässert, mit Xylol entfettet und in 60 °C heißes Paraffin eingebettet (Paraffinausgießstation MPS/P2, SLEE medical, Mainz, Deutschland). Nach dem Aushärten wurden anhand eines Rotationsmikrotom (Cut 6062, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) ca. 6 µm dicke histologische Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Färbung

Die Paraffin-Schnitte von Tibia und Femur wurden zur Darstellung von Osteoklasten mittels tartrat-resistenter saurer Phosphatase (tartrat-resistant acid phosphatase, TRAP) angefärbt. Mithilfe dieser enzymhistochemischen

Färbemethode lassen sich TRAP-positive Zellen wie Osteoklasten durch eine homogene rote Färbung bzw. mehr oder weniger dichte rote Granulation der Zellen darstellen. Für die Färbung wurden die Proben zunächst im Wärmeschrank bei 60 °C für 30 Minuten mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100–70 %) rehydriert. Anschließend wurden die Präparate bei 37 °C für ca. 30 Minuten in die TRAP-Färbelösung (Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) getaucht und nach Spülung in destilliertem Wasser für 1 Minute mit Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, getrocknet und eingedeckelt.

Auswertung

Die Auswertung der TRAP-gefärbten Paraffin Schnitte erfolgte qualitativ und quantitativ unter einem Lichtmikroskop (Axiophot 451887, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) anhand der Software Osteomeasure™ (Osteometrics Inc., Decatur, GA, USA). In Abgrenzung zu anderen TRAP-positiven Zellen wie z.B. Makrophagen, wurden als Osteoklasten nur TRAP-positive Zellen mit ≥ 3 Zellkernen definiert, die direkt an der Knochen- oder Zement-Oberfläche lokalisiert waren.

Um bei den Tibia-Präparaten die aktive Degradation der Zemente durch Osteoklasten quantitativ zu erfassen, wurde die Anzahl der Osteoklasten an der Zementoberfläche (number of osteoclasts per cement perimeter, N.Oc/Cm.Pm) bestimmt. Dafür wurden, unter 200-facher Vergrößerung, jeweils drei Sichtfelder an der proximalen bzw. distalen Knochen-Implantat Kontaktfläche manuell ausgewertet.

Die TRAP-gefärbten Femur-Präparate mit dem implantierten Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat wurden lediglich qualitativ beurteilt.

5. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden anhand der Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) statistisch ausgewertet und zunächst auf Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk-Test).

Normalverteilte Daten wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Post-hoc-Test (Tukey-Test) untersucht. Dazu gehörten die Daten der biomechanischen Untersuchung, der μ CT Analyse der femoralen Proben, der Fluoreszenzmarkierung, der Paraffin-Histologie und fast alle histomorphometrischen Daten. Nicht normalverteilt waren die Daten der μ CT Analyse der subkutanen Formkörper, sowie ein Teil der histomorphometrischen Daten der femoralen Proben (relativer Anteil an K-Struvit-Granulat). Für die nicht normalverteilten Daten wurde ein Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet, um Unterschiede zwischen beiden Materialvarianten zu erfassen. Die Unterschiede zwischen den Implantationszeiträumen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Post-hoc-Test (Dunn's-Korrektur) getestet.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0.05$ festgesetzt. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Diagrammen als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

III ERGEBNISSE

1. Klinischer Verlauf

Der operative Eingriff und die Aufwachphase nach der Anästhesie verliefen bei allen Schafen komplikationslos. Die Tiere hatten postoperativ nach maximal einer Stunde ihr Steh- und Gehvermögen wieder erlangt. In den ersten ein bis zwei Tagen wurden die Hintergliedmaßen noch vorsichtig belastet, innerhalb weniger Tage normalisierte sich das Gangbild jedoch vollständig. Die Wundheilung verlief ohne Komplikationen, Anzeichen für eine Wundinfektion oder eine Wundheilungsstörung waren nicht vorhanden. Nach ca. zehn Tagen konnten die Hautklammern entfernt werden.

2. Magnesiumphosphat-Zemente

2.1. Makroskopie

Makroskopisch waren weder nach zwei noch nach vier Monaten Hinweise für eine Entzündung erkennbar, die regionalen Lymphknoten erschienen physiologisch. Im Bereich des operativen Zugangs war das Weichteilgewebe gering- bis mittelgradig fibrosiert. Die Knochendefekte mit den implantierten Materialien waren medial von einer derben Bindegewebsschicht überzogen, die im Falle des K-Struvit-Zements stärker ausgeprägt war. Nach der Entfernung des Bindegewebes und dem Anschleifen der medialen Tibia waren beide Zementtypen gut sichtbar. Nach vier Monaten war nach Entfernen des Bindegewebes medial über den Zementen teilweise eine dünne, wie Knochengewebe aussehende Schicht zu erkennen. Die Zemente schienen fest mit dem umgebenden Gewebe verbunden zu sein, eine knöcherne Integration der Implantate konnte makroskopisch jedoch nicht beurteilt werden.

Sowohl bei den Struvit-, als auch bei den K-Struvit-Implantaten war bereits zwei Monate nach der Implantation makroskopisch eine vom Rande des Implantats ausgehende Degradation erkennbar, die nach vier Monaten weiter fortgeschritten war (Abbildung 16). Insbesondere der K-Struvit-Zement hatte deutlich an Umfang verloren (Abbildung 16 C, D). In dem Bereich, in dem der jeweilige Zement degradiert war, hatte sich neues Gewebe von einer leicht

gelblichen Farbe gebildet, das makroskopisch wie Knochengewebe aussah. Beim Struvit-Zement befand sich dieses Gewebe zu beiden Untersuchungszeitpunkten in engem Kontakt mit der Oberfläche des Implantats (Abbildung 16 A, B). Im Falle des K-Struvits war nach zwei Monaten bei einem Teil der Proben eine die Implantate umgebende, makroskopisch wie Bindegewebe aussehende Gewebeschicht zu erkennen (Abbildung 16 C). Diese wurde jedoch nach vier Monaten durch gelbliches, wie Knochen erscheinendes Gewebe ersetzt (Abbildung 16 D), das bis an die Oberfläche der Implantate heranreichte. Teilweise war eine rotbräunliche Verfärbung der Struvit-Zemente zu beobachten. Bei den K-Struvit-Zementen fiel nach zwei Monaten eine Zweisechichtigkeit auf, mit einer äußeren helleren und einer inneren geringgradig dunkleren Schicht (Abbildung 16 C). Diese war jedoch nach vier Monaten Implantation nicht mehr sichtbar (Abbildung 16 D).

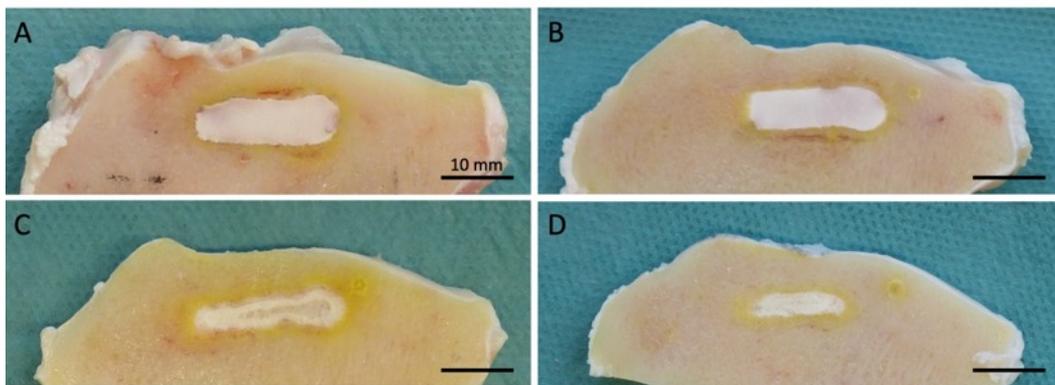


Abbildung 16: Repräsentative makroskopische Aufnahmen des Struvit- bzw. K-Struvit-Zements nach 2 und 4 Monaten Implantation in der proximalen Tibia: Struvit nach 2 (A) und 4 (B) Monaten, K-Struvit nach 2 (C) und 4 (D) Monaten.

2.2. Qualitative Methylmethacrylat-Histologie

Die Struvit-Implantate waren bereits nach zwei Monaten Implantation fast vollständig von neu gebildetem trabekulären Knochengewebe umgeben (Abbildung 17 A). Um den Zement hatten sich zentripetal Knochen trabekel gebildet, die sich dicht an die Zementoberfläche anlagerten (Abbildung 18 A). Auf der Oberfläche der neugebildeten Knochen trabekel fanden sich Osteoblasten (bone lining cells) und Osteoidsäume, während in der neugebildeten Knochenmatrix Osteozyten dargestellt werden konnten (Abbildung 19 A). Zwischen den einzelnen Trabekeln waren in Zementnähe zahlreiche, in Bindegewebe eingebettete Zementfragmente bzw. -partikel (Abbildung 18 A), sowie neu gebildete Blutgefäße zu beobachten. Die Menge

an Zementpartikeln schien mit zunehmender Entfernung von der Zementoberfläche abzunehmen. Die Partikel waren stellenweise umgeben von Lymphozyten und von Zellen mit einem Makrophagen-ähnlichen Erscheinungsbild, ein immunhistochemischer Nachweis derselben wurde jedoch nicht durchgeführt. Auch intrazellulär aufgenommene Zementpartikel ließen sich darstellen (Abbildung 19 A*), was für eine aktive zelluläre Resorption der Struvit-Implantate spricht. An der Oberfläche des Zements waren zudem vereinzelt Osteoklasten aufzufinden. Der Zement erschien homogen kristallin, vereinzelt war hier der Einschluss von Luftbläschen zu beobachten. An den Rändern machten die Struvit-Implantate einen aufgehellten bzw. aufgelockerten Eindruck, wobei die Oberfläche des Zements unregelmäßig erschien (Abbildung 18 A).

Nach vier Monaten zeigte sich eine zunehmende Degradation des Struvit-Zements (Abbildung 17 B). Es war eine Reduktion der Größe des Implantats zu beobachten, die Ränder des Zements erschienen zunehmend aufgehellte. In dem Bereich, in dem der Zement degradiert war, hatte sich Knochengewebe gebildet. Im Zeitverlauf hatten sich die neugebildeten Knochen trabekel verdichtet und verbreitert, sodass nach vier Monaten Implantation eine zunehmende Osseointegration des Struvit-Zements zu beobachten war (Abbildung 18 B). Insbesondere an den lateralen Randzonen des Implantats waren dichte Knochen trabekel entstanden. Ferner war eine zunehmende Mineralisation des Knochengewebes zu beobachten (Abbildung 19 B). Die Menge an Bindegewebe zwischen den einzelnen Trabekeln schien abgenommen zu haben, stattdessen hatte sich in den Zwischenräumen vermehrt Knochenmark gebildet. Im entstandenen Markraum fanden sich Fettzellen mit eingelagerten Zementfragmenten und -partikeln (Abbildung 19 B).

Im Vergleich zu den Struvit-Zementen, war bei den K-Struvit-Zementen eine deutlich schnellere Degradation zu beobachten. Bereits nach zwei Monaten hatten sich die K-Struvit-Implantate in ihrer Größe stark verringert (Abbildung 17 C). Der Zement wies zu diesem Zeitpunkt einen porös und aufgelockert erscheinenden inneren Zementkern und eine äußere eher homogene Zone auf, wobei das Implantat peripher aufgehellte erschien, und

den Eindruck machte, als würde sich der Zement am Rand in einzelne Zementpartikel auflösen. An diesen Randbereich des K-Struvit-Zements hatten sich nach zwei Monaten Implantation teilweise direkt neugebildete Knochen trabekel angelagert, an deren Oberfläche Osteoidsäume und Osteoblasten erkennbar waren. Stellenweise umschloss das Knochengewebe die freigesetzten Zementpartikel (Abbildung 20 A). Häufig wurde jedoch eine Schicht aus zellreichem Bindegewebe zwischen der Zementoberfläche und dem neugebildeten Knochen beobachtet (Abbildung 20 A, B). In diesem zellreichen Bereich fanden sich neben Fibrozyten und Kapillaren auch Lymphozyten, Makrophagen, Osteoprogenitorzellen und vereinzelt Fremdkörperriesenzellen, sowie zahlreiche, in das Bindegewebe eingebettete Zementpartikel.

Nach vier Monaten Implantation war diese zellreiche Bindegewebsschicht an der Oberfläche des Zements nahezu vollständig durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt worden, das sich zunehmend dicht an den degradierenden Zementkern anlagerte (Abbildung 20 C). Insgesamt zeigten die Implantate nach vier Monaten eine gute Osseointegration. Stellenweise fanden sich jedoch nach wie vor zellreiche bindegewebige Areale mit eingelagerten Zementfragmenten und -partikeln an der Zementoberfläche. Zementreste waren auch in den neugebildeten Knochen trabekeln, sowie im entstandenen Markraum bzw. im Bindegewebe dazwischen zu sehen (Abbildung 20 D). An der Oberfläche der Trabekel waren Osteoid und Osteoblasten zu erkennen. Ferner war mit zunehmender Entfernung von der Zementoberfläche eine beginnende Mineralisation des Knochengewebes zu beobachten. Der Zement erschien nicht mehr „zweischichtig“, sondern machte nach vier Monaten den Eindruck, als hätte sich die äußere Zone aufgelöst, sodass nur noch der innere Zementkern vorhanden war (Abbildung 17 D). Dieser erschien zunehmend porös und aufgelockert. Insgesamt hatten die K-Struvit-Zemente nach vier Monaten ihre Größe deutlich reduziert, wobei das degradierte Material durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt worden war.

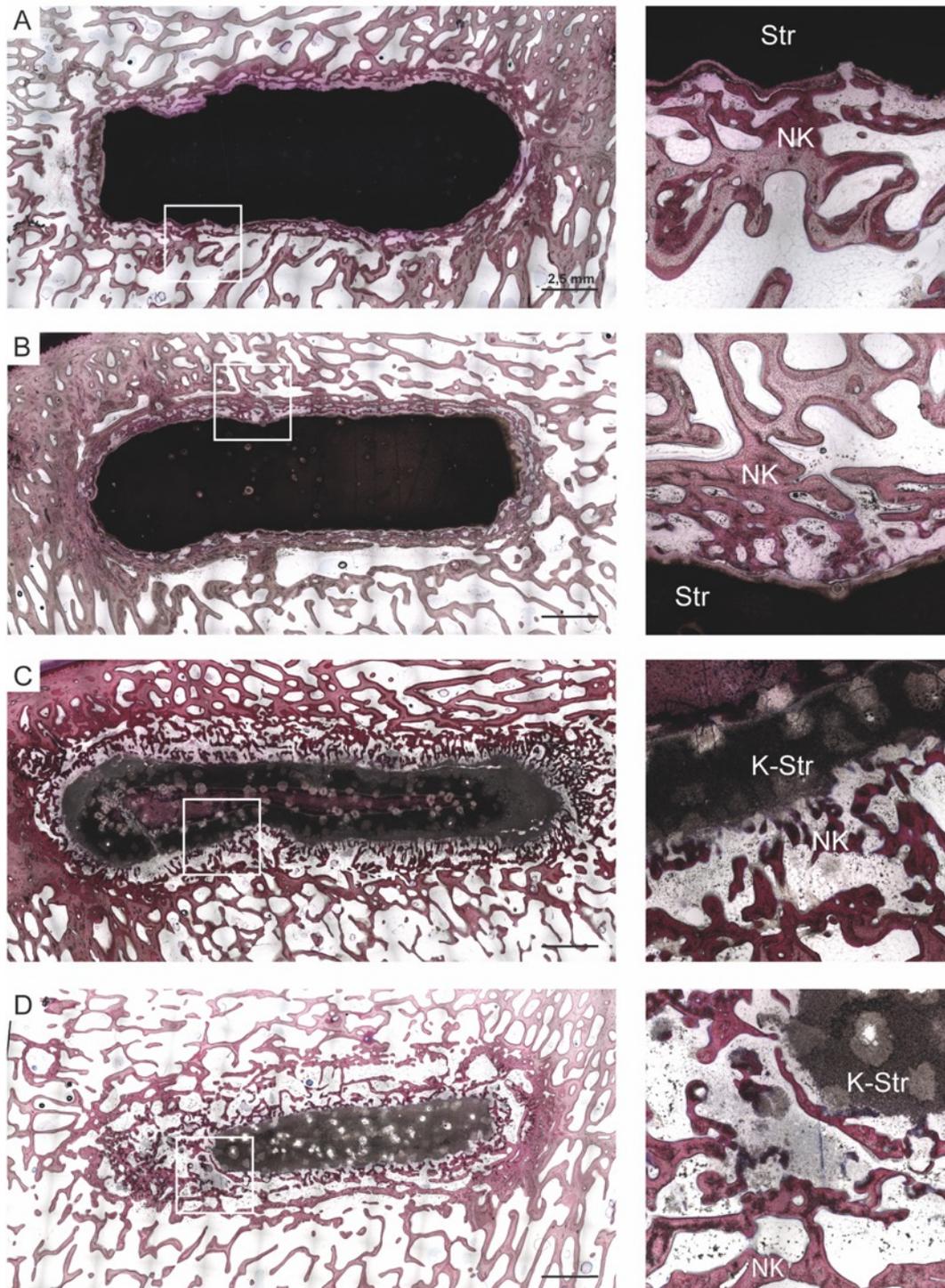


Abbildung 17: Repräsentative histologische Abbildungen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Zement augmentierten Knochendefekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte der Implantat-Knochen Kontaktfläche (rechts). Struvit-Zement nach (A) 2 und (B) 4 Monaten. K-Struvit-Zement nach (C) 2 und (D) 4 Monaten. Str – Struvit-Zement, K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe. Paragon Färbung.

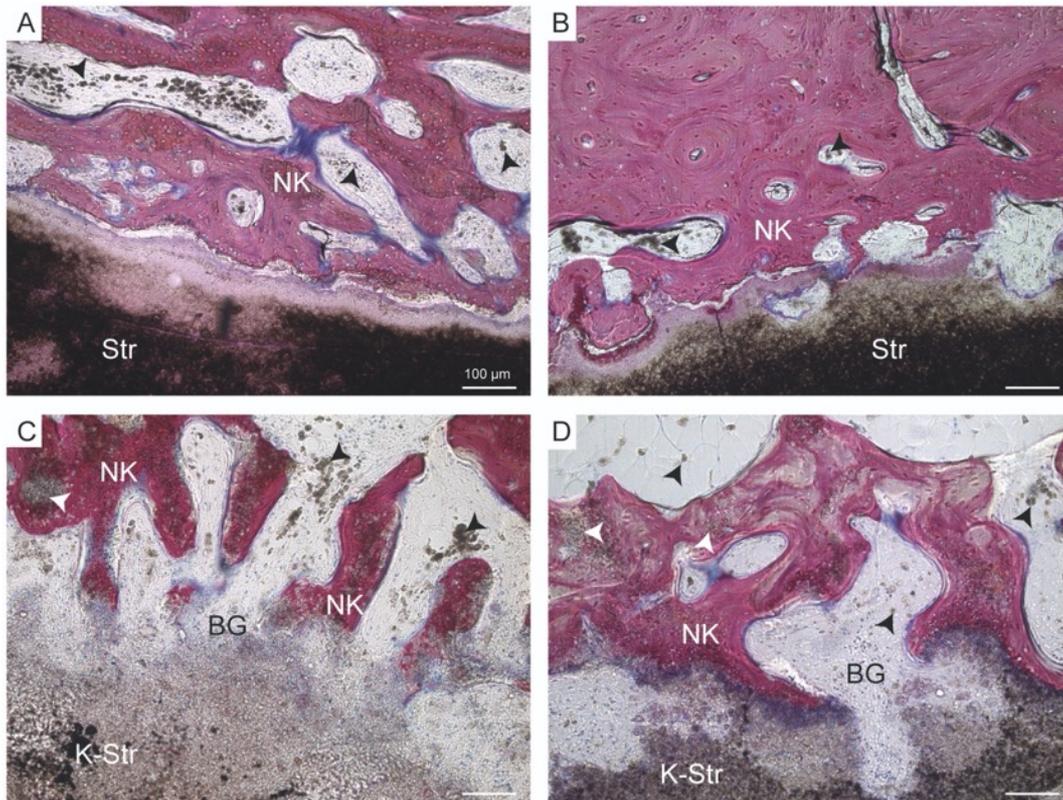


Abbildung 18: Kontaktfläche zwischen Zement und Knochen: Struvit-Zement (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation, K-Struvit-Zement (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Zement, K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe, BG – zellreiches Bindegewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel zwischen den neugebildeten Knochen trabekeln, weiße Pfeile – in Knochen trabekeln eingelagerte Zementpartikel. Paragon Färbung. 100-fache Vergrößerung.

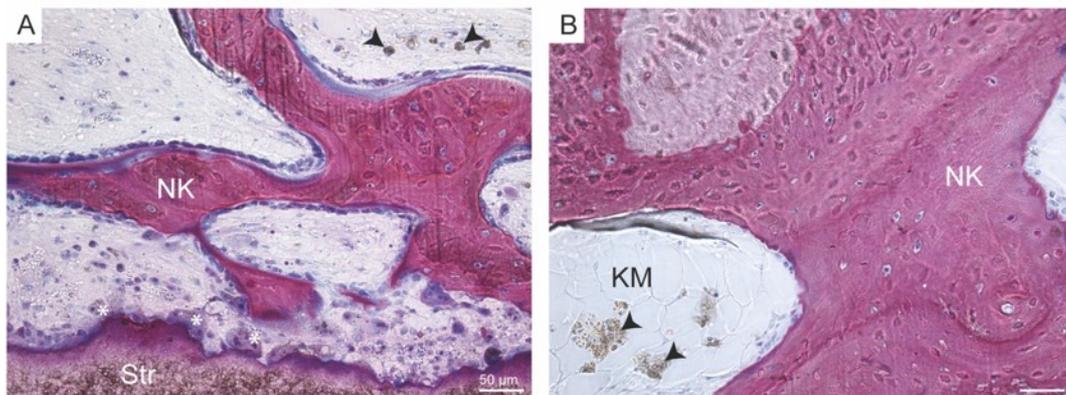


Abbildung 19: Knochenneubildung in den mit Struvit-Zement augmentierten tibialen Defekten. Paragon Färbung. 200-fache Vergrößerung. (A) Osteoblasten und Osteoidsäume an der Oberfläche der neugebildeten Knochen trabekel 2 Monate nach der Implantation, zelluläre Resorption des Struvit-Zements mit intrazellulär aufgenommenen Zementpartikeln (*). (B) Mineralisierung der neugebildeten Knochen trabekel 4 Monate nach der Implantation, Zementpartikel zwischen den Fettzellen des Knochenmarks. Str – Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel zwischen den neugebildeten Knochen trabekeln.

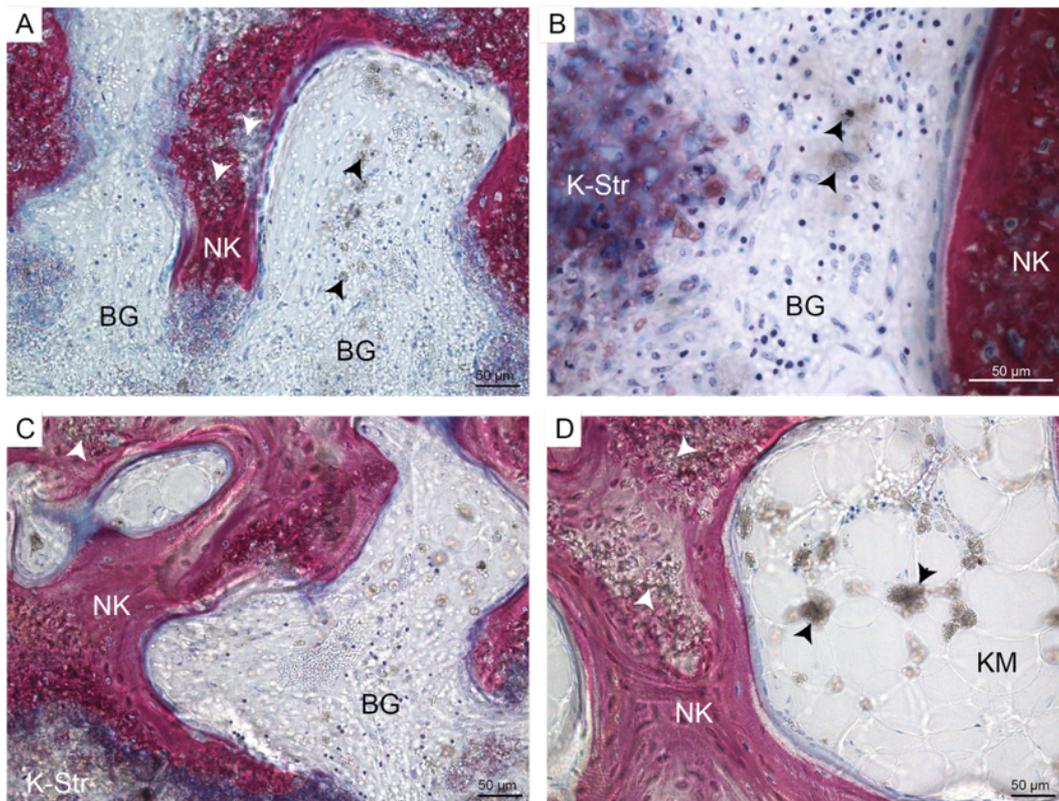


Abbildung 20: Knochenneubildung in den mit K-Struvit-Zement augmentierten tibialen Defekten (A, B) 2 und (C, D) 4 Monate nach der Implantation. Paragon Färbung. (A) Zellreiche Bindegewebsschicht an der Zementoberfläche mit sich neubildenden Knochen trabekeln; 200-fache Vergrößerung. (B) Zellreiche Bindegewebszone mit Fibroblasten, Lymphozyten, Osteoprogenitorzellen und Zementpartikeln; 400-fache Vergrößerung. (C) Osseointegration des K-Struvit-Zements nach 4 Monaten Implantation, zunehmende Mineralisierung des neugebildeten Knochengewebes; 200-fache Vergrößerung. (D) Zementpartikel zwischen den Fettzellen des Knochenmarks; 200-fache Vergrößerung. K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe, BG – zellreiches Bindegewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel zwischen den neugebildeten Knochen trabekeln, weiße Pfeile – in Knochen trabekel eingelagerte Zementpartikel.

2.3. Quantitative Methylmethacrylat-Histologie

Der relative Anteil an Zement betrug bei den Struvit-Zementen nach zwei Monaten Implantation 83 %, nach vier Monaten hatte er auf 75 % abgenommen (Abbildung 21 A). Bei den K-Struvit-Zementen hingegen reduzierte sich der relative Zementanteil signifikant von 56 % nach zwei Monaten auf 37 % nach vier Monaten. Damit wies der K-Struvit-Zement ein signifikant schnelleres Degradationsverhalten als der Struvit-Zement auf.

Gleichzeitig wurde in den Defekten, die mit dem K-Struvit-Zement gefüllt worden waren, zu beiden Untersuchungszeitpunkten ein signifikant höherer relativer Knochenanteil beobachtet (Abbildung 21 B). Dieser verhielt sich umgekehrt zum Zementanteil und nahm über den Implantationszeitraum zu. Während der relative Knochenanteil in den mit Struvit-Zement augmentierten

Defekten nach zwei Monaten 7 % und nach vier Monaten 13 % betrug, stieg dieser beim K-Struvit im Zeitverlauf signifikant von 16 % auf 29 % an.

Die schnellere Degradation der K-Struvit-Zemente ging jedoch auch mit einem signifikant höheren relativen Anteil an Weichgewebe zu beiden Untersuchungszeitpunkten einher (Abbildung 21 C). Der relative Anteil an Weichgewebe im ursprünglichen Defektbereich stieg in den mit Struvit augmentierten Knochendefekten von 10 % (nach zwei Monaten) auf 11 % (nach vier Monaten) an, beim K-Struvit erhöhte er sich hingegen signifikant von 28 % auf 34 %.

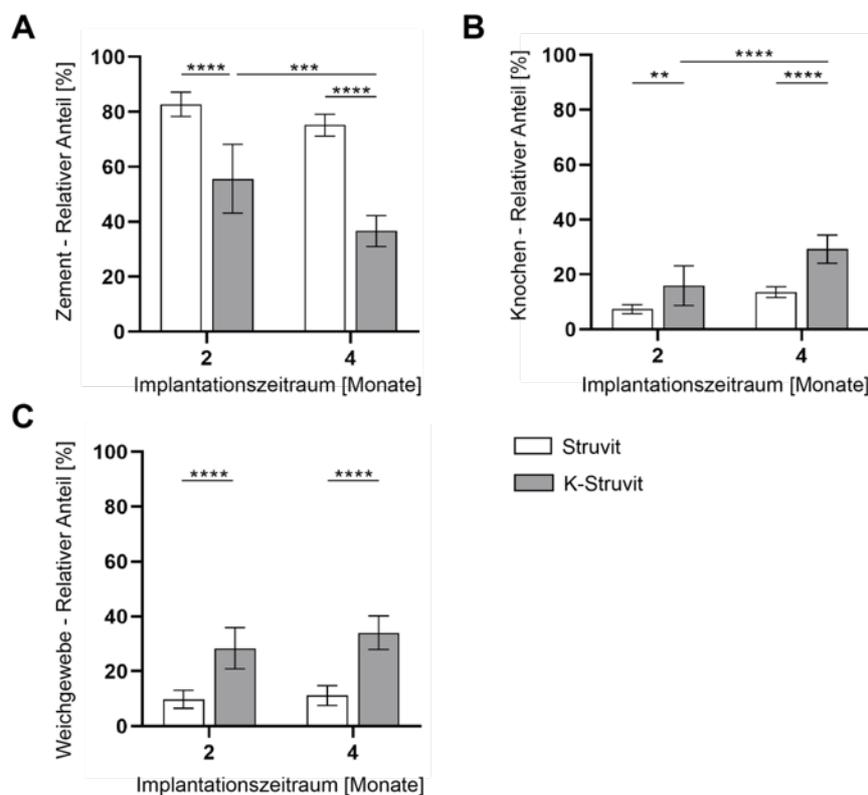


Abbildung 21: Quantitative Histologie der mit Struvit- bzw. K-Struvit-Zement augmentierten Defekte in der Tibia: Relativer Anteil an (A) Zement, (B) Knochen und (C) Weichgewebe im Defektbereich nach 2 und 4 Monaten Implantation. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

2.4. Fluoreszenzmarkierung

Insgesamt erschien bei den Struvit- und den K-Struvit-Präparaten die Fluoreszenz in dem, an die Zementoberfläche angrenzenden Knochengewebe von stärkerer Intensität, als im umgebendem trabekulären Knochengewebe (Abbildung 22). Dies deutet auf eine gesteigerte Knochenneubildung in dem Bereich hin, in dem der degradierende Zement durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt wurde. Insgesamt machte die Fluoreszenz in den,

an die Zementoberfläche angrenzenden Bereichen nach zwei Monaten einen stärker ausgeprägten Eindruck als nach vier Monaten Implantation.

Das Calcein stellte sich bei beiden Materialvarianten und zu beiden Untersuchungszeitpunkten überwiegend als markante Banden dar. Die Tetrazyklin-Fluoreszenz war stellenweise als klar definierte Banden sichtbar, erschien aber meist diffus, was vermutlich auf Knochenumbauprozesse zurückzuführen ist. Direkt an der Zementoberfläche fanden sich hauptsächlich Tetrazyklin-Fluoreszenzbanden, was darauf hindeutet, dass sich neuer Knochen zunächst an der Oberfläche des Implantats bildete, an den sich später gebildeter Knochen anlagerte.

Die Knochenneubildungsrate wurde, innerhalb einer ROI an der Oberfläche der degradierenden Zemente, durch die Auswertung der Abstände zwischen den verschiedenen Fluoreszenzbanden (Tetrazyklin, Calcein) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Knochenneubildungsrate an der Zementoberfläche war bei beiden Materialvarianten zu beiden Untersuchungszeitpunkten vergleichbar. Bei beiden Zementtypen war die Knochenneubildungsrate im Vergleich zum umgebenden trabekulären Knochengewebe ($0,21 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$) nach zwei und vier Monaten erhöht, wobei im Zeitverlauf eine Abnahme derselben zu beobachten war. Nach zwei Monaten betrug sie $0,96 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$ (Struvit) bzw. $0,90 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$ (K-Struvit) und reduzierte sich nach vier Monaten Implantation auf $0,54 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$ (Struvit) bzw. $0,59 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$ (K-Struvit).

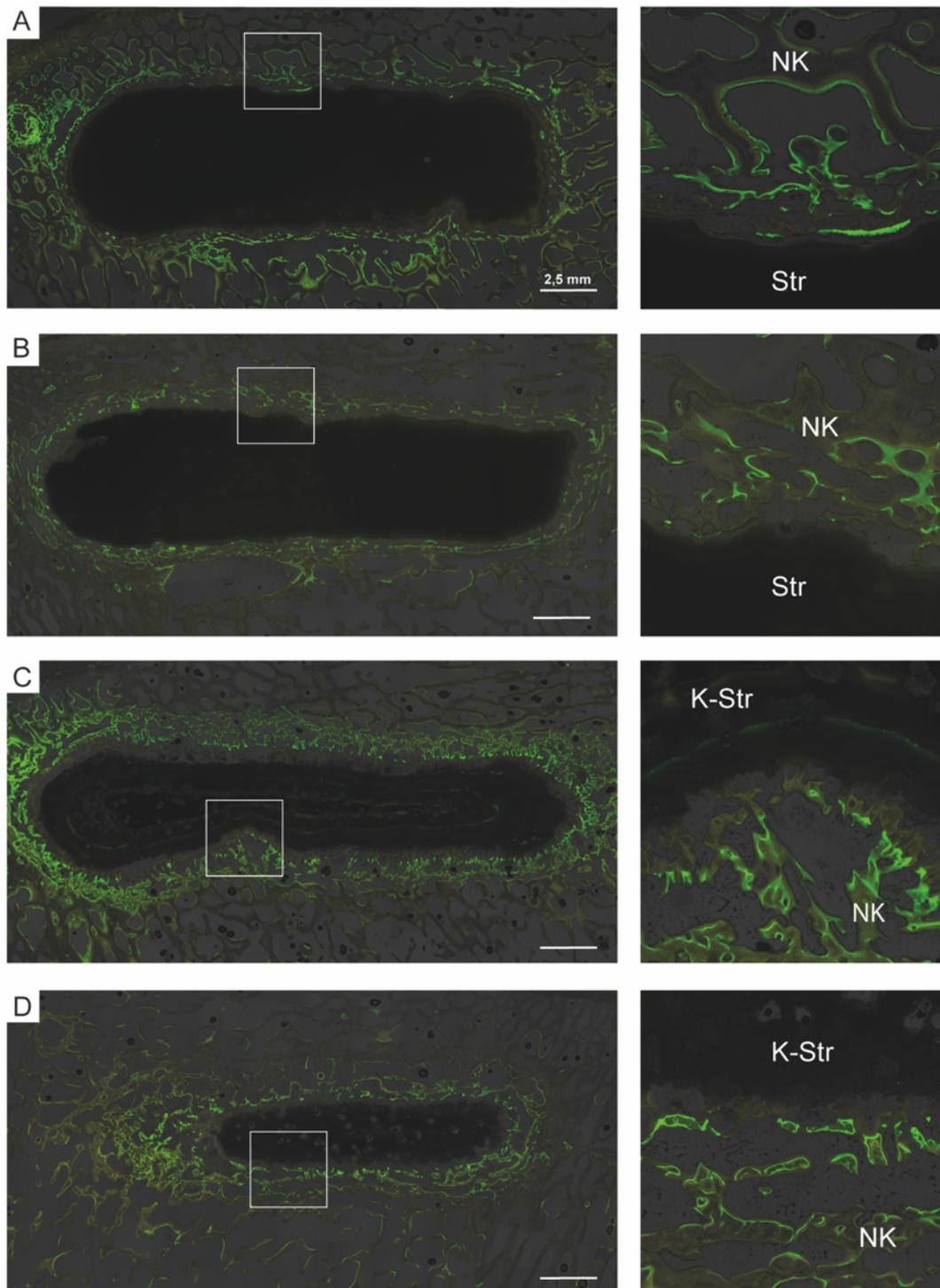


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Zement augmentierten Knochendefekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte (rechts) der Implantat-Knochen Kontaktfläche. Struvit-Zement (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation. K-Struvit-Zement (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str - Struvit-Zement, K-Str - K-Struvit-Zement, NK - neugebildetes Knochengewebe.

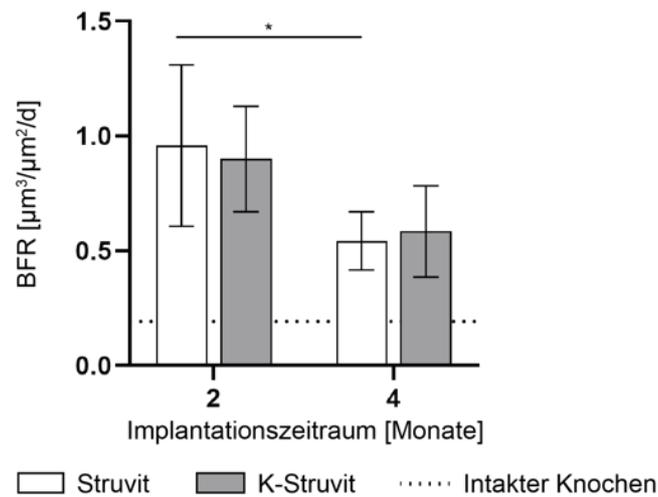


Abbildung 23: Knochenneubildungsrate (bone formation rate, BFR in $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$) an der Oberfläche der Struvit- bzw. K-Struvit-Zemente. * $p < 0,05$.

2.5. Paraffin-Histologie

Sowohl bei den Struvit- als auch bei den K-Struvit-Zementen konnten zu beiden Untersuchungszeitpunkten TRAP-positive, mehrkernige Zellen an der Zementoberfläche und an den neugebildeten Knochen trabekeln nachgewiesen werden (Abbildung 24), was für eine aktive (zelluläre) Degradation der Materialien spricht. Die quantitative Auswertung der TRAP-gefärbten Paraffin-Schnitte ergab für Struvit eine signifikant höhere Anzahl an Osteoklasten an der Zementoberfläche (number of osteoclasts per cement perimeter, N.Oc/Cm.Pm) im Vergleich zu K-Struvit, für beide Implantationszeiträume (Abbildung 25). Diese blieb im Zeitverlauf für beide Materialvarianten fast unverändert, was darauf hindeutet, dass die Osteoklastenaktivität an der Zementoberfläche eher material- als zeitabhängig war.

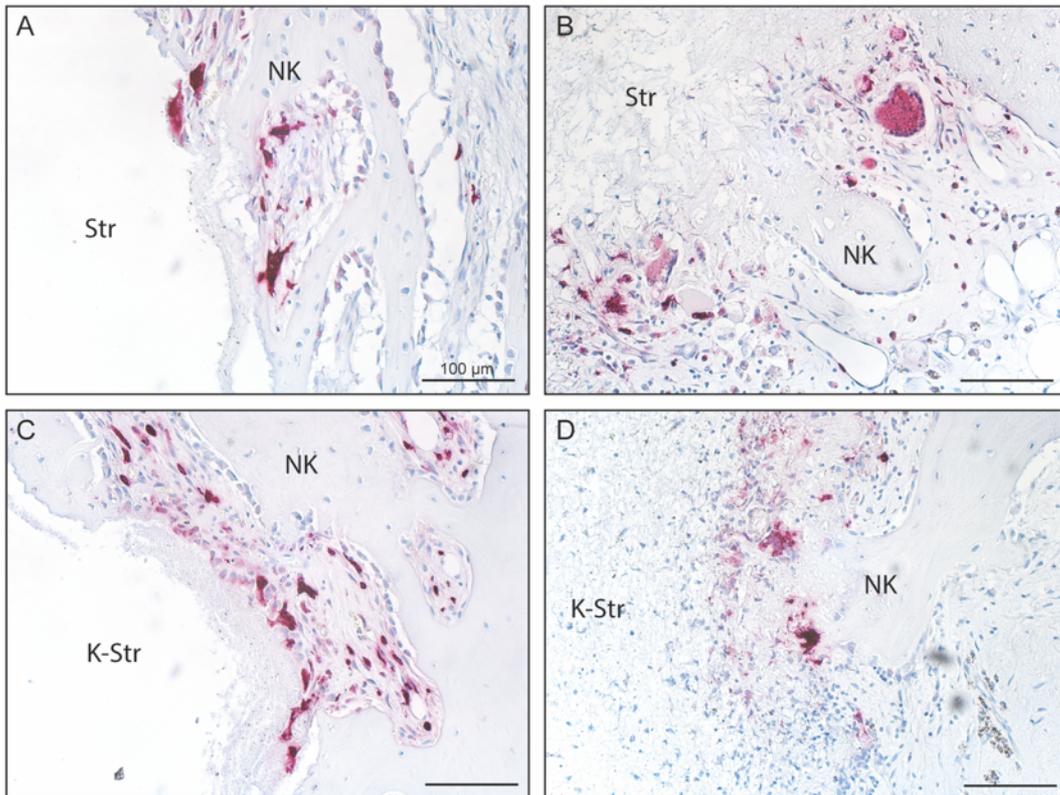


Abbildung 24: Osteoklasten an der Zementoberfläche in den mit (A, B) Struvit bzw. (C, D) K-Struvit augmentierten Knochendefekten in der Tibia. Struvit-Zement nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation. K-Struvit-Zement nach (C) 2 und (D) 4 Monaten Implantation. TRAP Färbung, 200-fache Vergrößerung. Str – Struvit-Zement. K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe.

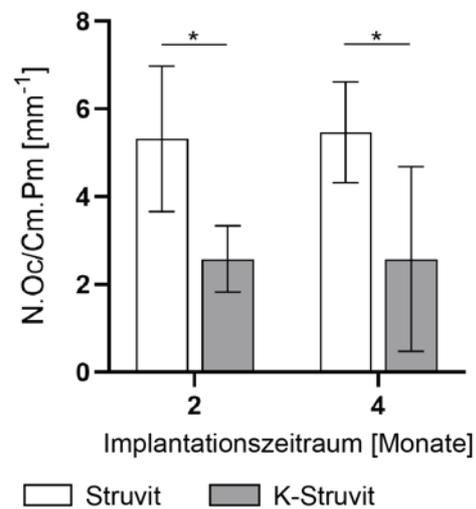


Abbildung 25: Quantitative Analyse der TRAP-gefärbten Paraffin Schnitte: Anzahl der Osteoklasten an der Oberfläche der Struvit- bzw. K-Struvit-Zemente (Osteoclast number per cement perimeter, N.Oc/Cm.Pm in mm^{-1}) nach 2 und 4 Monaten Implantation. * $p < 0,05$.

3. Magnesiumphosphat-Granulate

3.1. Makroskopie

Wie bei den Zementen waren bei den implantierten Granulaten makroskopisch keine Anzeichen für ein Entzündungsgeschehen erkennbar. Medial waren die Knochendefekte von einer Bindegewebsschicht bedeckt. Die Defekte mit dem K-Struvit-Granulat erschienen eingesunken, wobei dieser Bereich mit Bindegewebe gefüllt war.

Nach dem Anschleifen der Struvit-Präparate waren die einzelnen Granulatkörner deutlich erkennbar, die in neugebildetes, wie Knochen aussehendes, leicht gelblich gefärbtes Gewebe eingebettet waren (Abbildung 26 A, B). Das Granulat schien dabei fest mit dem umgebenden Gewebe verbunden zu sein, wobei eine knöcherne Integration makroskopisch nicht beurteilt werden konnte.

Bei den mit K-Struvit-Granulat gefüllten Defekten waren hingegen bereits nach zwei Monaten nur noch vereinzelt Granulatkörner sichtbar (Abbildung 26 C). Stattdessen hatte sich hier im Defektbereich von marginal nach zentral neues, wie Knochengewebe erscheinendes Gewebe gebildet, das sich an die verbliebenen Granulatkörner anlagerte und mit diesen einen festen Verbund bildete. Dieses Gewebe war im Vergleich zum umgebenden trabekulären Knochengewebe leicht gelblich gefärbt. Im zentralen Bereich war jedoch nach zwei Monaten bei nahezu allen Präparaten etwas helleres, wie Bindegewebe erscheinendes Gewebe vorhanden, das die teilweise noch sichtbaren Granulatkörner umschloss. Dieses schien jedoch im Zeitverlauf durch Knochengewebe ersetzt zu werden. Nach vier Monaten war es zentral nur noch in geringen Umfang bei zwei von sieben Präparaten erkennbar (Abbildung 26 D), bei den übrigen Proben war es gar nicht mehr vorhanden.

Insgesamt zeigte sich bei beiden Materialvarianten eine zunehmende Degradation der Granulate (Abbildung 26). Während das Struvit-Granulat jedoch zu beiden Untersuchungszeitpunkten noch deutlich erkennbar war, erschien das K-Struvit-Granulat bereits nach zwei Monaten nahezu vollständig resorbiert, nach vier Monaten waren vereinzelte Granulatkörner makroskopisch kaum noch zu erkennen.

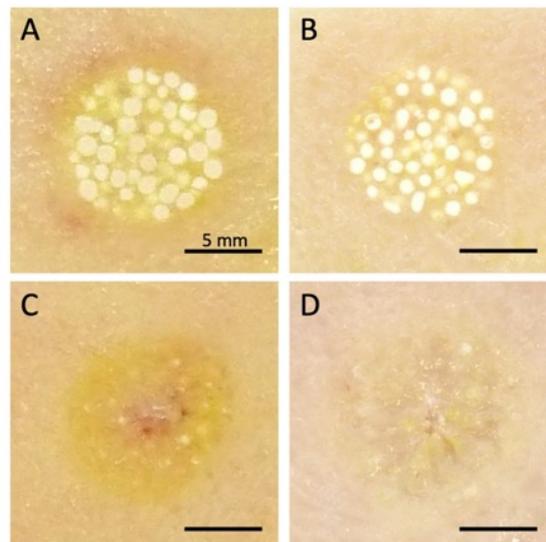


Abbildung 26: Repräsentative makroskopische Aufnahmen des (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Granulats nach 2 und 4 Monaten Implantation in der medialen Femurkondyle: Struvit nach 2 (A) und 4 (B) Monaten, K-Struvit nach 2 (C) und 4 (D) Monaten.

3.2. Biomechanik

Der *ex vivo* (vor der Implantation) durchgeführte Indentationstest ergab für beide Materialvarianten des Granulats eine ähnliche Steifigkeit, mit einem Mittelwert von 170,3 N/mm für das Struvit- und 108,6 N/mm für das K-Struvit-Granulat (Abbildung 27).

Die Bohrlochdefekte, die mit dem Struvit-Granulat augmentiert worden waren, wiesen nach zwei Monaten eine höhere Steifigkeit von 437,1 N/mm als *ex vivo* auf, die nach vier Monaten signifikant auf 2879,0 N/mm angestiegen war. Die Steifigkeit innerhalb des ursprünglichen Defektbereichs erreichte damit Werte, die vergleichbar bzw. etwas höher waren als die ermittelte Steifigkeit des trabekulären Knochengewebes (1585,6 N/mm) der medialen Femurkondyle.

Bei den mit K-Struvit-Granulat gefüllten Knochendefekten hingegen kam es im Vergleich zu der *ex vivo* ermittelten Steifigkeit initial zu einer geringfügigen Abnahme. Nach zwei Monaten Implantation betrug die Steifigkeit hier 94,7 N/mm. Die Steifigkeit der Proben stieg nach vier Monaten Implantation auf 651,2 N/mm an, war jedoch signifikant niedriger als die der Struvit-Präparate zum gleichen Untersuchungszeitpunkt und blieb unter dem Niveau des trabekulären Knochengewebes.

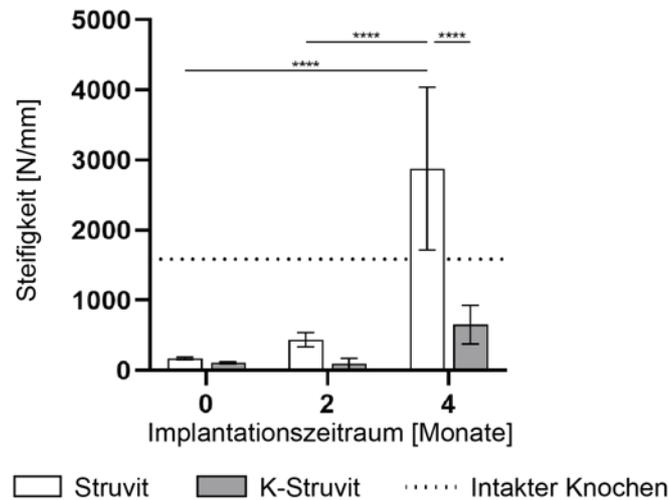


Abbildung 27: Steifigkeit in N/mm der mit Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat augmentierten Defekte in der medialen Femurkondyle nach 0 (*ex vivo*), 2 und 4 Monaten Implantation. **** $p < 0,0001$.

3.3. Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die Auswertung der μ CT Analyse erfolgte zunächst qualitativ. Sowohl das Struvit- als auch das K-Struvit-Granulat wies eine ähnliche Röntgendichte wie das trabekuläre Knochengewebe auf (Abbildung 28). Die einzelnen Granulatkörner waren in den μ CT-Schnittbildern der *ex vivo* Scans deutlich als runde, röntgendichte Strukturen erkennbar (Abbildung 28 A, D).

Bei den Schnittbildern der, mit Struvit-Granulat augmentierten Defekte war nach zwei Monaten eine dünne Schicht aus Knochengewebe um die einzelnen Granulatkörner sichtbar (Abbildung 28 B). Diese wies eine höhere Röntgendichte als das Granulat auf und schien die einzelnen Körner, direkt auf diesen aufliegend, zu verbinden. Nach vier Monaten war diese Schicht stärker ausgeprägt und füllte die Bereiche zwischen den Granulatkörnern vermehrt aus (Abbildung 28 C), was auf eine zunehmende Knochenneubildung in den Hohlräumen zwischen den Granulatkörnern hinweist. Die Ränder des Bohrlochdefekts erschienen im Zeitverlauf zunehmend sklerosiert.

Das K-Struvit-Granulat hingegen war bereits nach zwei Monaten Implantation kaum noch erkennbar (Abbildung 28 E), was auf dessen nahezu vollständige Degradation hindeutet. Stattdessen waren vom Defektrand ausgehende trabekelähnliche, röntgendichte Strukturen erkennbar, die auf neugebildetes Knochengewebe schließen lassen. Diese Strukturen verdichteten sich innerhalb von vier Monaten Implantation und füllten den Defektbereich im

Zeitverlauf zunehmend von marginal nach zentral aus (Abbildung 28 D).

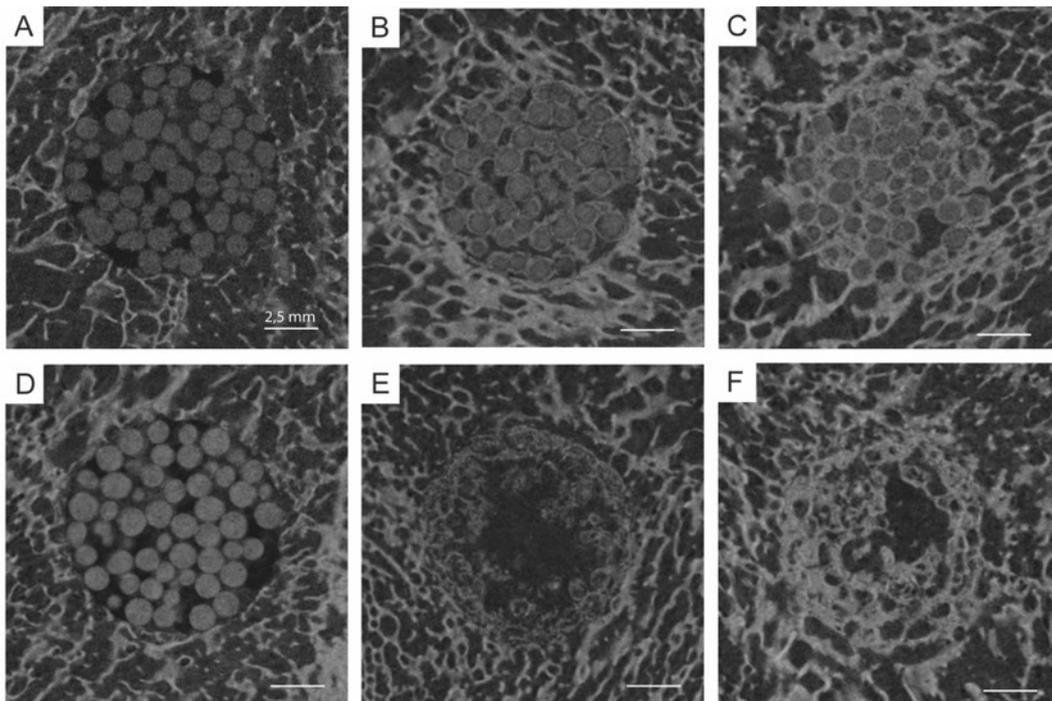


Abbildung 28: Mikro-computertomographische Schnittbilder der mit (A-C) Struvit bzw. (D-F) K-Struvit augmentierten Knochendefekte der medialen Femurkondyle: Struvit-Granulat (A) *ex vivo*, sowie (B) 2 und (C) 4 Monate nach Implantation *in vivo*. K-Struvit-Granulat (D) *ex vivo*, sowie (E) 2 und (F) 4 Monate nach Implantation *in vivo*.

Aufgrund der ähnlichen Mineraldichte von Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat und dem umgebenden trabekulären Knochengewebe war es nicht möglich anhand des μ CTs einen Grenzwert festzulegen, um eindeutig zwischen dem implantierten Granulat und dem Knochengewebe zu unterscheiden (siehe Kapitel II4.3). Daher konnte für die quantitative Auswertung der μ -CT Untersuchung lediglich die apparente Mineraldichte innerhalb des ursprünglichen Defektbereichs bestimmt werden (Abbildung 29).

Initial (*ex vivo*) wiesen die mit dem Struvit-Granulat gefüllten Knochendefekte eine signifikant niedrigere apparente Mineraldichte als jene, die mit dem K-Struvit-Granulat behandelt worden waren. Diese stieg in den mit Struvit-Granulat augmentierten Defekten jedoch im Zeitverlauf signifikant an, was auf eine zunehmende Knochenneubildung im Defektbereich hindeutet. Nach vier Monaten war die apparente Mineraldichte in den augmentierten Defekten vergleichbar mit der des umgebenden trabekulären Knochengewebes.

In den mit dem K-Struvit-Granulat gefüllten Bohrlochdefekten hingegen nahm die apparente Mineraldichte innerhalb der ersten zwei Monate der

Implantation signifikant ab, was auf eine sehr schnelle Degradation der Granulate zurückzuführen sein könnte. Auf die initiale Abnahme folgte jedoch ein signifikanter Anstieg der apparenten Mineraldichte, was eine Knochenneubildung im Defektbereich vermuten lässt. Nach vier Monaten war diese, in den mit K-Struvit augmentierten Defekten, zwar noch unter der des umgebenden Knochengewebes, hatte sich dieser aber zunehmend angenähert. Sowohl nach zwei als auch nach vier Monaten war die Mineraldichte der mit K-Struvit-Granulat augmentierten Defekte signifikant niedriger, als die der mit Struvit-Granulat behandelten Defekte.

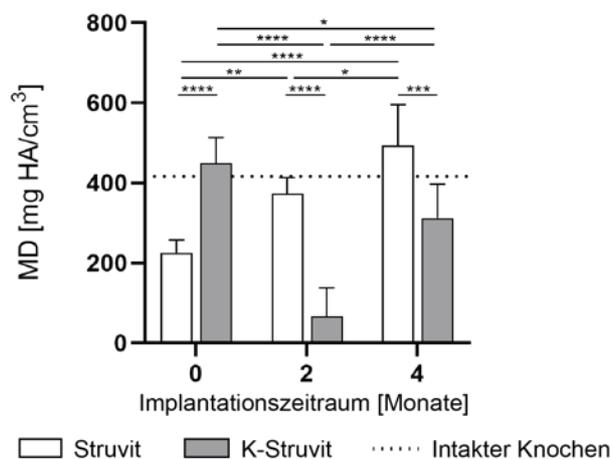


Abbildung 29: Apparente Mineraldichte (mineral density, MD in mg HA/cm³) im Defektbereich der mit Struvit- und K-Struvit-Granulat augmentierten femoralen Bohrlochdefekte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.4. Qualitative Methylmethacrylat-Histologie

Die einzelnen Körner des Struvit-Granulats waren sowohl nach zwei (Abbildung 30 A), als auch nach vier Monaten (Abbildung 30 B) Implantation deutlich erkennbar, vereinzelt waren eingeschlossene Luftbläschen in den Granulatkörnern zu beobachten. Im Zeitverlauf zeigte das Struvit-Granulat Anzeichen einer zunehmenden Degradation. Die Ränder der einzelnen Granulatkörner erschienen nach zwei Monaten Implantation ausgefranst und peripher aufgehellt (Abbildung 31 A und 32 A). Nach vier Monaten Implantation war eine Zunahme der peripheren Aufhellung der Granulatkörner zu beobachten: An einen dunkel erscheinenden Granulatkern schloss sich eine hellere mittlere und eine äußere rosa gefärbte Schicht an (Abbildung 31 B). Um die Granulatkörner und in den Zwischenräumen hatte sich bereits nach zwei Monaten im gesamten Defektbereich neues Knochengewebe gebildet (Abbildung 30 A, 31 A und 32 A). Im Markraum

zwischen den Kochentrabekeln waren vereinzelt Granulatpartikel zwischen den einzelnen Fettzellen zu beobachten, teilweise waren auch in das Knochengewebe eingelagerte Granulatreste erkennbar. An der Oberfläche der Trabekel waren regelmäßig Osteoblasten und Osteoid darstellbar. Das Knochengewebe im Defektbereich nahm mit zunehmender Implantationsdauer deutlich zu, nach vier Monaten war der Bereich zwischen den Granulatkörnern fast vollständig von Knochengewebe ausgefüllt, das sich ohne Zwischenraum an das degradierende Granulat angelagert hatte (Abbildung 30 B, 31 B und 32 B).

In den mit K-Struvit-Granulat augmentierten Knochendefekten war hingegen bereits nach zwei Monaten Implantation eine fast vollständige Degradation des Granulats zu beobachten (Abbildung 30, 31 C und 33 A). Reste des K-Struvit-Granulats, sowie Granulatfragmente und -partikel waren im gesamten Defektbereich aufzufinden. Insbesondere zentral war häufig eine, in Bindegewebe eingebettete Ansammlung aus Granulatresten darstellbar. Um diese waren regelmäßig Zellansammlungen (Lymphozyten, Makrophagen) im Sinne einer „Resorptionszone“ zu beobachten (Abbildung 33 A). Von marginal nach zentral hatte sich im ehemaligen Defektbereich Knochengewebe gebildet, teilweise zirkulär um die fast vollständig degradierten Granulatkörner, teilweise in den Bereichen dazwischen (Abbildung 31 C). Die Trabekeldicke und -dichte schien zum Zentrum des Defekts hin abzunehmen (Abbildung 30 C), zentral war nur bei etwa der Hälfte der Präparate Knochengewebe darstellbar. Zwischen den Knochentrabekeln hatte sich im peripheren Defektbereich Knochenmark gebildet, im zentralen Bereich war meist Bindegewebe vorhanden. Nach vier Monaten Implantation war der Defektbereich nahezu vollständig von neugebildetem Knochengewebe durchsetzt, wobei im peripheren Bereich eine Zunahme der Knochentrabekeldicke und -dichte zu beobachten war (Abbildung 30 D). Zelluläre Infiltrate waren kaum noch vorhanden, Bindegewebe war lediglich vereinzelt im Zentrum des ehemaligen Defekts zu sehen. Reste des K-Struvit Granulats waren im gesamten ehemaligen Defektbereich im Knochenmark zwischen den Fettzellen, sowie zum Teil ringförmig eingelagert in den neugebildeten Knochen darstellbar (Abbildung 31 C und 33 B).

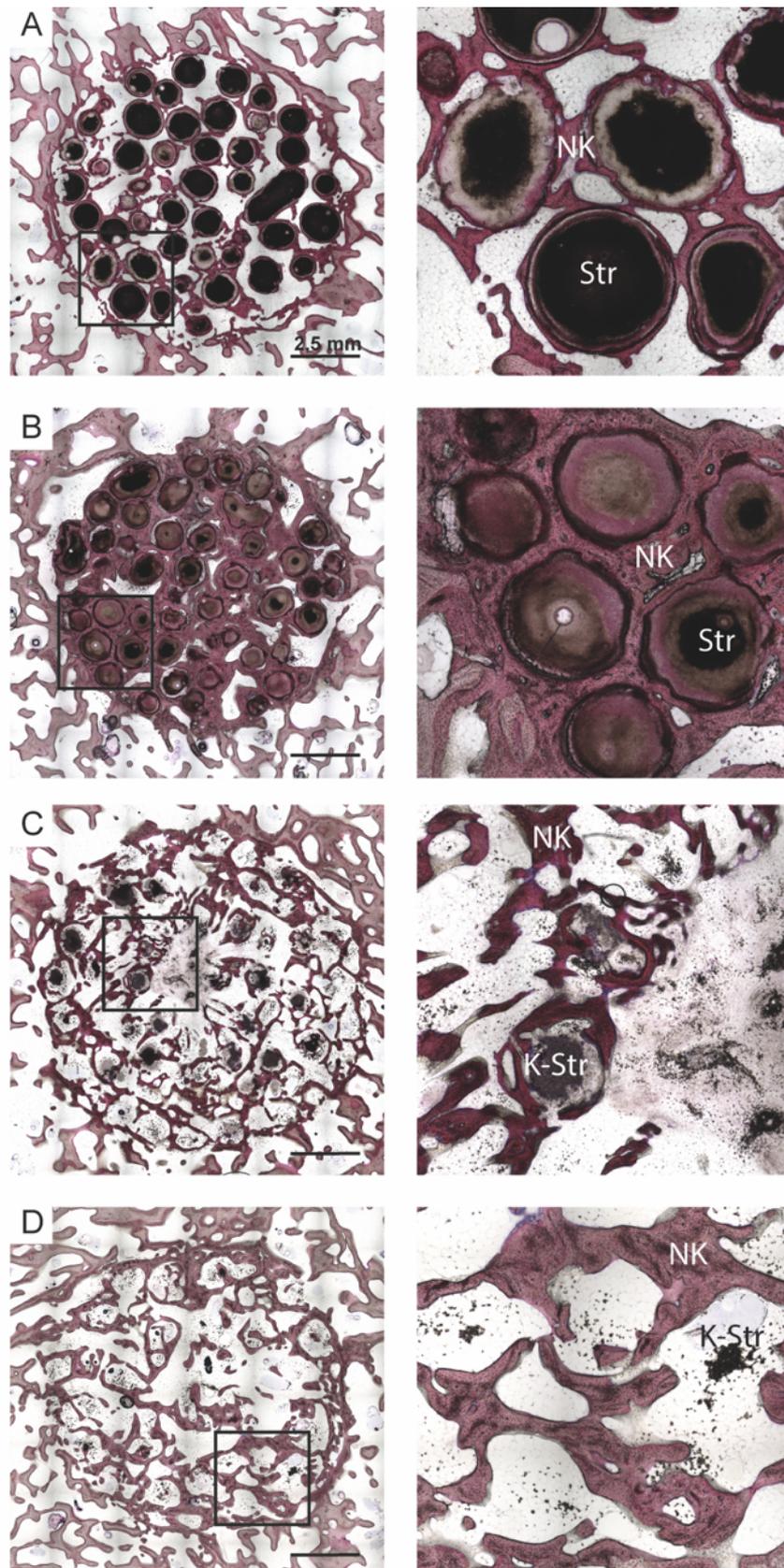


Abbildung 30: Repräsentative histologische Abbildungen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Granulat augmentierten Knochendefekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte (rechts). Struvit-Granulat (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation. K-Struvit-Granulat (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Granulat, K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe. Paragon Färbung.

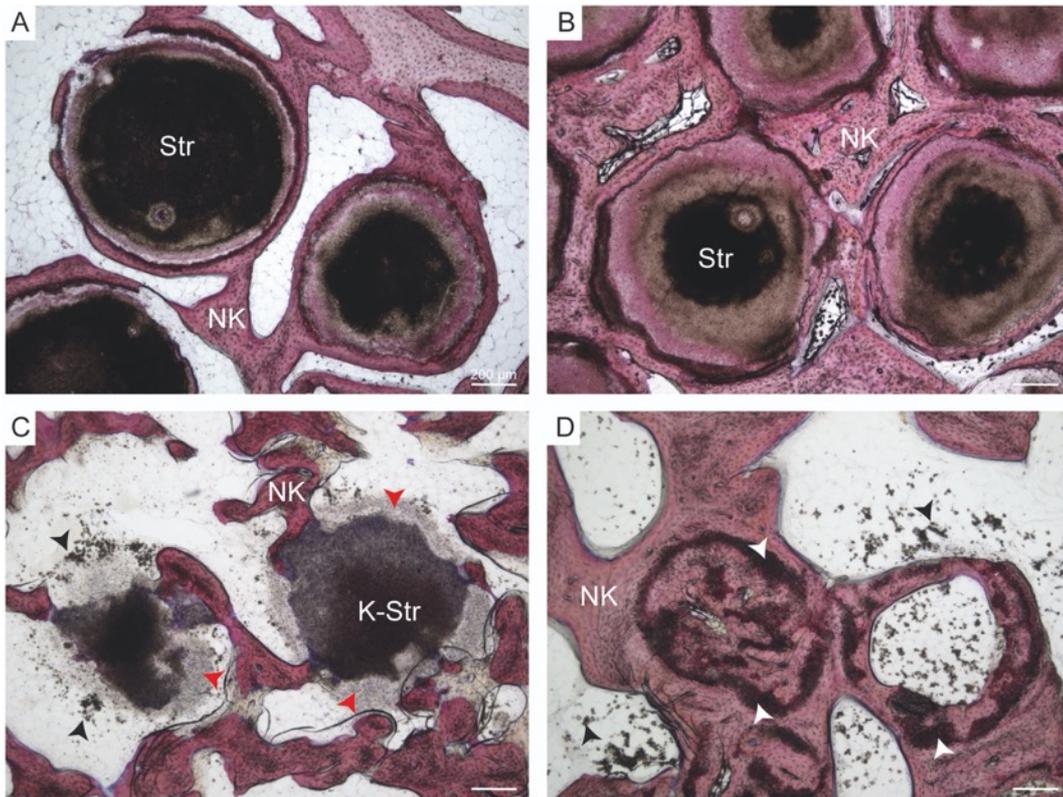


Abbildung 31: Knochenneubildung in den mit (A, B) Struvit- und (C, D) K-Struvit- Granulat augmentierten Defekten in der medialen Femurkondyle: Struvit-Granulat (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation, K-Struvit-Granulat (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Granulat, K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe, schwarze Pfeile – Granulartartikel zwischen den neugebildeten Knochentrabekeln, weiße Pfeile – in Knochentrabekel eingelagerte Granulatreste, rote Pfeile – zellreiche Resorptionszone. Paragon Färbung. 50-fache Vergrößerung.

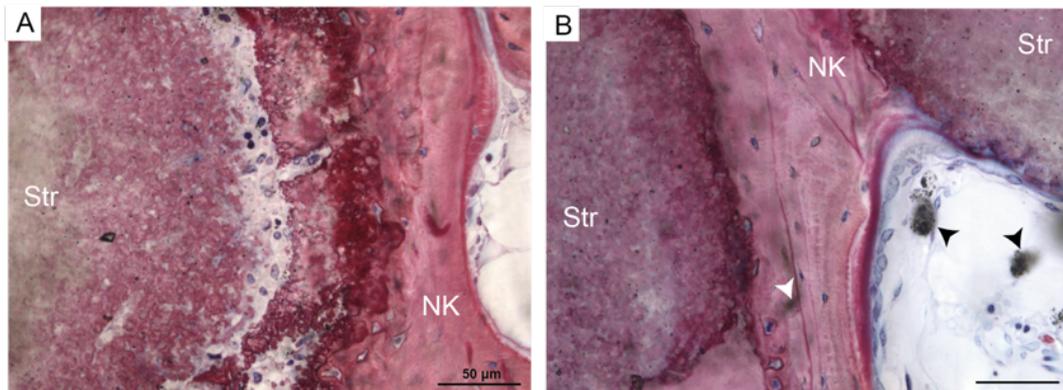


Abbildung 32: Kontaktfläche zwischen Struvit-Granulat und Knochen nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation. (A) Zellinfiltration und Knochenneubildung an der Oberfläche eines Granulatkorns. (B) Zunehmende Osseointegration des Struvit-Granulats nach 4 Monaten Implantation. Str – Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe, Pfeile – Granulartartikel im Markraum (schwarze Pfeile) bzw. eingeschlossen in Knochengewebe (weißer Pfeil). Paragon Färbung. 400-fache Vergrößerung.

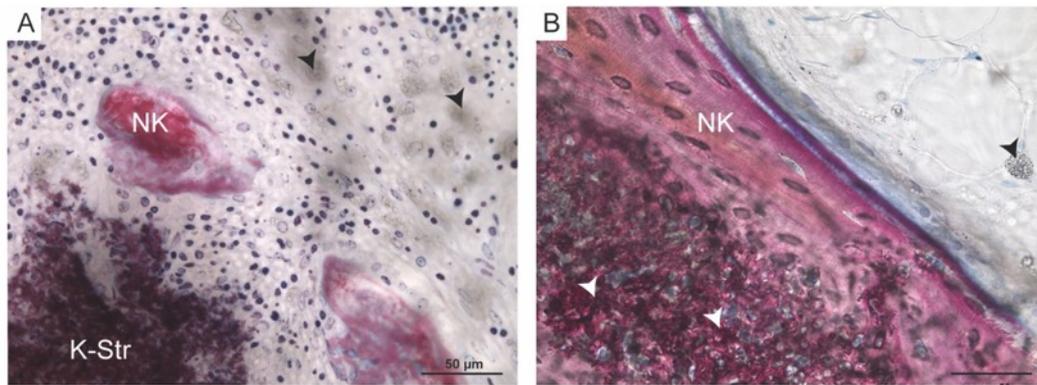


Abbildung 33: K-Struvit-Granulat nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation. (A) Zellreiche Resorptionszone und sich neubildendes Knochengewebe an der Oberfläche eines degradierenden K-Struvit-Granulatkorns. (B) Neugebildetes Knochengewebe mit integrierten K-Struvit-Granulatresten nach 4 Monaten Implantation. K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe, schwarze Pfeile – Granulatpartikel. Paragon Färbung. 400-fache Vergrößerung

3.5. Quantitative Methylmethacrylat-Histologie

Der relative Anteil an Granulat im ursprünglichen Defektbereich nahm bei beiden Materialvarianten im Zeitverlauf ab (Abbildung 34 A). Auch in der Applikationsform des Granulats zeigte K-Struvit eine signifikant schnellere Degradation als Struvit. Nach zwei Monaten betrug der relative Anteil an Struvit-Granulat 34 %, nach vier Monaten hatte er sich auf 30 % reduziert. Der relative Anteil an K-Struvit-Granulat war zu beiden Untersuchungszeitpunkten signifikant geringer, dieser reduzierte sich von 9 % nach zwei Monaten auf lediglich 2 % nach vier Monaten Implantation.

Wie bei den Zementen verhielt sich der relative Anteil an Knochengewebe auch hier umgekehrt zum relativen Anteil an Implantat in den Defekten und nahm bei beiden Materialvarianten im Zeitverlauf zu (Abbildung 34 B). Insgesamt waren die Anteile jedoch für die mit Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat augmentierten Defekte für beide Implantationszeiträume ähnlich. So lag der relative Anteil an Knochengewebe nach zwei Monaten bei 35 % (Struvit) bzw. 32 % (K-Struvit) und nach vier Monaten bei 43 % (Struvit) bzw. 39 % (K-Struvit).

Die schnellere Degradation des K-Struvit-Granulats ging wiederum mit einer signifikant größeren relativen Menge an Weichgewebe zu beiden Untersuchungszeitpunkten einher (Abbildung 34 C). Diese betrug in den mit K-Struvit augmentierten Defekten sowohl nach zwei als auch nach vier Monaten 60 %. In den mit Struvit-Granulat gefüllten Defekten hingegen nahm der relative Anteil an Weichgewebe im Zeitverlauf von 31 % auf 28 % ab.

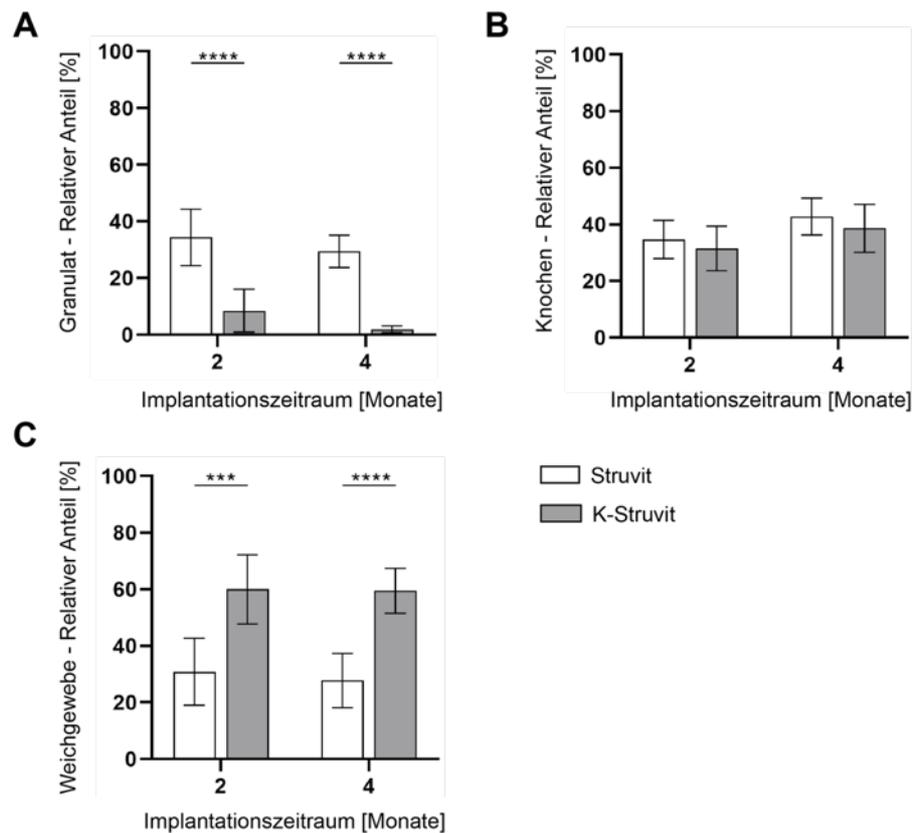


Abbildung 34: Quantitative Histologie der mit Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat augmentierten Defekte in der medialen Femurkondyle: Relativer Anteil an (A) Granulat, (B) Knochen und (C) Weichgewebe im Defektbereich nach 2 und 4 Monaten Implantation. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.6. Fluoreszenzmarkierung

Durch die Auswertung der Abstände zwischen verschiedenen Fluoreszenzbanden kann im intakten Knochen die Knochenneubildungsrate ermittelt werden. Bei Heilungsvorgängen und insbesondere bei längeren Untersuchungszeiträumen gelingt dies nicht immer, da der Knochen intensiv umgebaut wird und bereits eingelagerte Farbbanden wieder abgebaut werden können. Bei den mit Granulat augmentierten Knochendefekten war eine quantitative Auswertung nicht möglich, da sich insbesondere vier Monate nach der Implantation vielfach ungeordnete, diffuse Banden zeigten. Zudem wiesen die Granulate eine starke Autofluoreszenz auf, sodass die Fluoreszenzbanden nicht klar zu definieren waren. Allerdings konnten qualitative Unterschiede beobachtet werden.

Sowohl bei den mit Struvit, als auch bei den mit K-Struvit augmentierten Knochendefekten fiel eine erhöhte Intensität der Fluoreszenz im Defektbereich im Vergleich zum umgebenden Knochengewebe auf, was auf

eine gesteigerte Knochenneubildung schließen lässt (Abbildung 35).

Bei den mit Struvit-Granulat augmentierten Defekten war nach zwei Monaten eine ausgeprägte Autofluoreszenz der Granulatkörner erkennbar (Abbildung 35 A). Diese erschien jedoch nach vier Monaten Implantation eher diffus und liess nicht mehr klar von den Fluoreszenzbanden des neugebildeten Knochengewebes, das sich zwischen den Granulatkörnern gebildet hatte, unterscheiden (Abbildung 35 B). Nach zwei Monaten hatte sich, bei den mit Struvit-Granulat gefüllten Bohrlochdefekten, zirkulär um die Granulatkörner und in den Zwischenräumen neues Knochengewebe gebildet (Abbildung 35 A). Die Tetrazyklin-Fluoreszenz des Knochengewebes war als dünne Bande direkt an der Oberfläche der Granulatkörner erkennbar. Daran schlossen sich klar definierte Calcein-Fluoreszenzbanden an, die zirkulär die Granulatkörner umschlossen. Nach vier Monaten Implantation schien die Menge an Knochengewebe zwischen den Granulatkörnern zugenommen zu haben. Sowohl die Tetrazyklin- als auch die Calcein-Fluoreszenz waren nicht mehr als klare Banden erkennbar, sondern erschienen eher diffus (Abbildung 35 B), was auf ein kontinuierliches Remodeling des Knochens schließen lässt.

Bei den Defekten, die mit K-Struvit augmentiert worden waren, waren bereits nach zwei Monaten keine Granulatkörner, sondern lediglich Reste davon erkennbar (Abbildung 35 C). Stattdessen hatte sich in dem ursprünglichen Defektbereich neues Knochengewebe gebildet. Dieses wies eine erhöhte Intensität der Tetrazyklin- und Calcein-Fluoreszenz im Vergleich zum umgebenden trabekulären Knochen auf und deutet auf eine gesteigerte Knochenneubildung hin. Die Fluoreszenz im Defektbereich schien jedoch im Zeitverlauf etwas an Intensität zu verlieren (Abbildung 35 D), was auf eine nachlassende Knochenneubildungsrate vier Monate nach der Implantation schließen lässt.

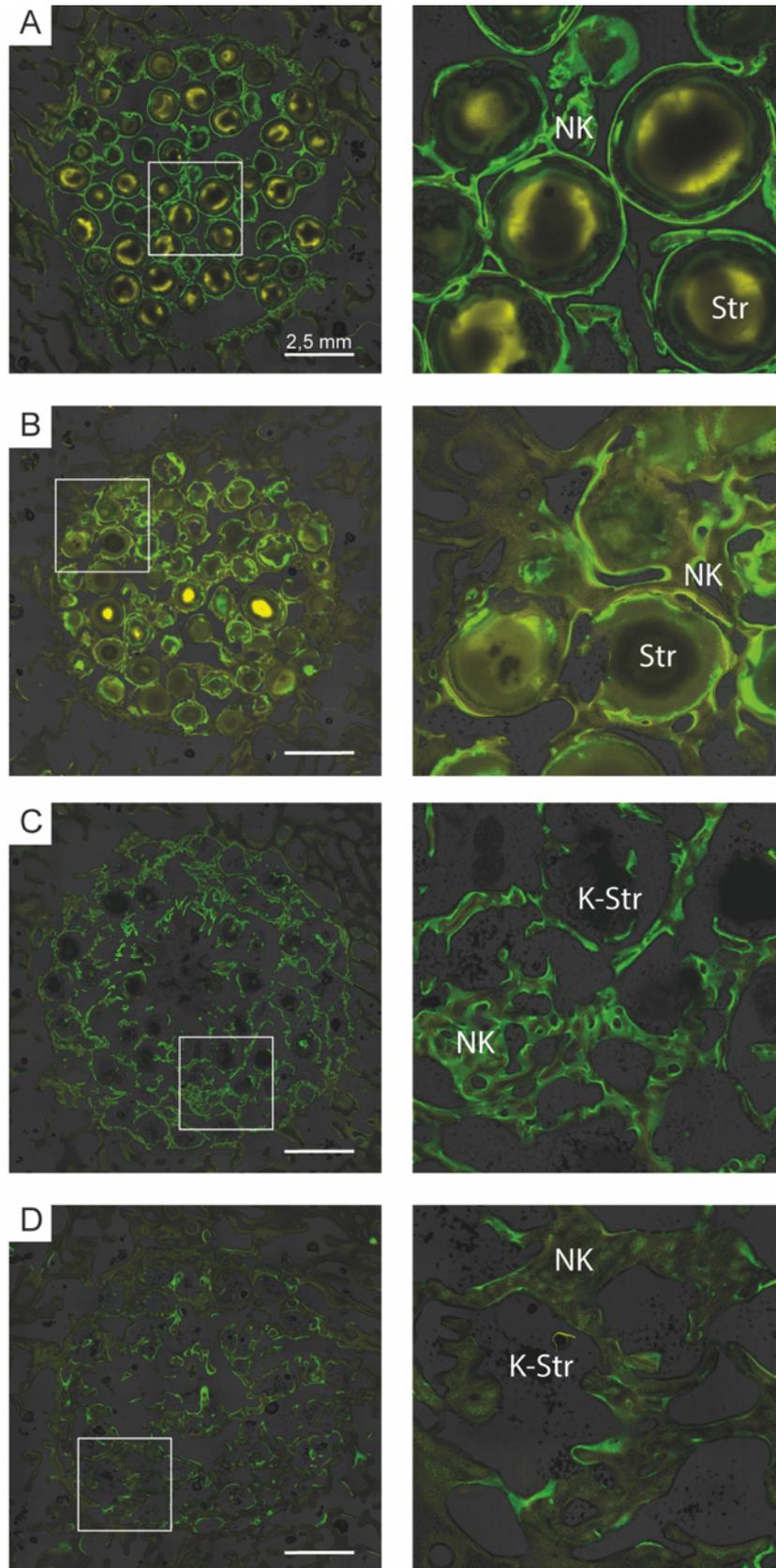


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Granulat augmentierten Knochendefekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte (rechts) der Struvit-Granulat (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation. K-Struvit-Granulat (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Granulat, K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe.

3.7. Paraffin-Histologie

Für die Paraffin-Histologie der femoralen Proben wurde der mediale Probenanteil, also der Randbereich des Defekts mit den implantierten Materialien, verwendet. Hier war nur bei wenigen Paraffin Schnitten noch ausreichend Probenmaterial für eine Auswertung vorhanden. Zudem war das K-Struvit-Granulat bereits nach zwei Monaten fast vollständig degradiert, sodass eine quantitative Auswertung zur Bestimmung der Osteoklastenzahl an der Granulat-Oberfläche nicht möglich war. Daher erfolgte lediglich eine qualitative Beurteilung der wenigen auswertbaren, TRAP-gefärbten Paraffin-Schnitte. Bei den Struvit-Präparaten konnten nach vier Monaten Implantation Osteoklasten an der Oberfläche der einzelnen Granulatkörner dargestellt werden (Abbildung 36 A). In den mit K-Struvit augmentierten Bohrlochdefekten waren nach zwei Monaten Implantation Osteoklasten an der Granulatoberfläche erkennbar (Abbildung 36 B).

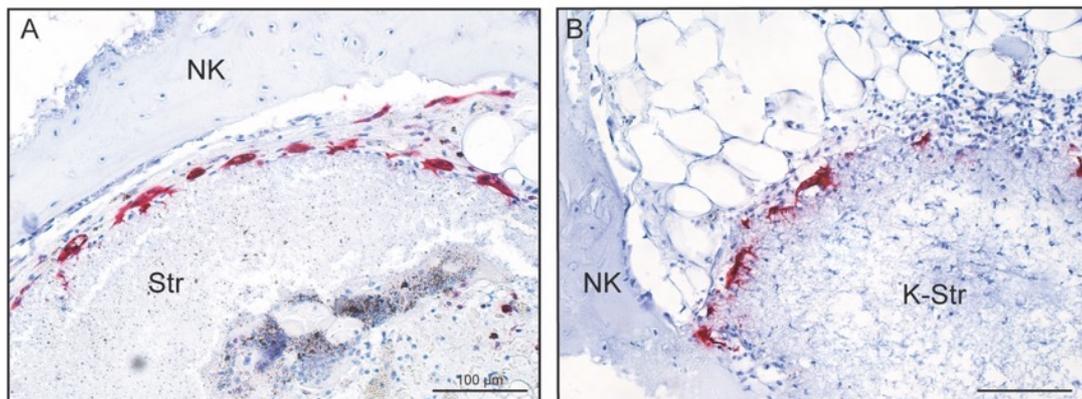


Abbildung 36: Osteoklasten an der Granulatoberfläche in den mit Struvit bzw. K-Struvit augmentierten Knochendefekten in der medialen Femurkonyle. (A) Struvit-Granulat nach 4 Monaten Implantation. (B) K-Struvit-Granulat nach 2 Monaten Implantation. TRAP Färbung, 200-fache Vergrößerung. Str - Struvit-Granulat, K-Str - K-Struvit-Granulat, NK - neugebildetes Knochengewebe.

4. Subkutane Implantate

4.1. Makroskopie

Die subkutan implantierten Formkörper der Struvit-Zemente waren zwei und vier Monate nach der Implantation unter der Haut palpierbar und bei der Präparation makroskopisch deutlich erkennbar, wurden jedoch im Zeitverlauf kleiner (Abbildung 37 A, B). Die K-Struvit-Formkörper hingegen hatten bereits nach zwei Monaten deutlich an Umfang verloren, nach vier Monaten waren sie fast vollständig degradiert (Abbildung 37 C, D). Nur etwa die Hälfte

der Implantate war noch bei der Probenpräparation auffindbar, bei den restlichen Implantaten ist von einer vollständigen Resorption innerhalb der vier Monate auszugehen.

Sowohl die Struvit als auch die K-Struvit Implantate lagen reaktionslos eingebettet im subkutanen Gewebe, makroskopisch fanden sich keine Hinweise für ein Entzündungsgeschehen oder eine Fremdkörperreaktion.

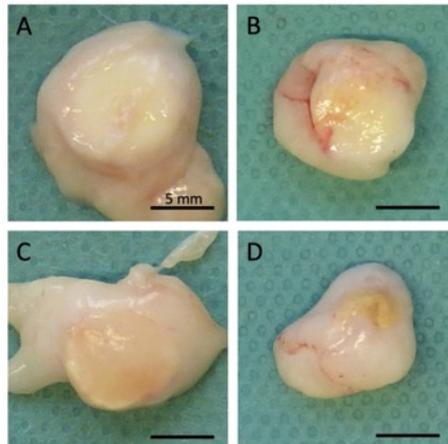


Abbildung 37: Repräsentative makroskopische Aufnahmen der subkutan implantierten Formkörper mit umgebendem subkutanem Gewebe: Struvit nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation, K-Struvit nach (C) 2 und (D) 4 Monaten Implantation.

4.2. Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die subkutan implantierten Struvit-Formkörper stellten sich in den μ CT Schnittbildern als röntgendichte, zylindrische Strukturen dar (Abbildung 38 A, B). Sowohl nach zwei und vier Monaten Implantation waren kleine kreisförmige Aufhellungen in den Struvit-Formkörpern zu sehen, was vermutlich auf Lufteinschlüsse bei der Herstellung zurückzuführen ist. Im Zeitverlauf war eine Reduktion der Größe der Struvit-Implantate zu beobachten, was für eine voranschreitende Degradation des implantierten Materials spricht (Abbildung 38 A, B). Die K-Struvit-Formkörper machten bereits nach zwei Monaten einen sehr aufgelockerten Eindruck und erschienen stark degradiert (Abbildung 38 C). Nach vier Monaten waren sie kaum noch als röntgendichte Strukturen erkennbar (Abbildung 38 D).

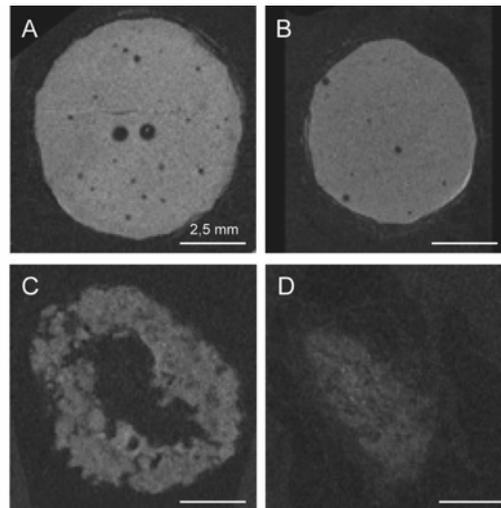


Abbildung 38: Mikro-computertomographische Schnittbilder der subkutan implantierten (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Formkörper: Struvit nach (A) 2 und (B) 4 Monaten, K-Struvit nach (C) 2 und (D) 4 Monaten.

Um die Degradation der Materialien zu quantifizieren, wurde anhand des μ CTs das Volumen der Implantate ermittelt (Abbildung 39). Das Volumen der subkutan implantierten Formkörper nahm bei beiden Zementtypen im Zeitverlauf signifikant ab. Nach vier Monaten war das Volumen der K-Struvit-Implantate signifikant geringer als das der Struvit-Implantate, was auf eine schnellere passive Degradierbarkeit des Materials schließen lässt.

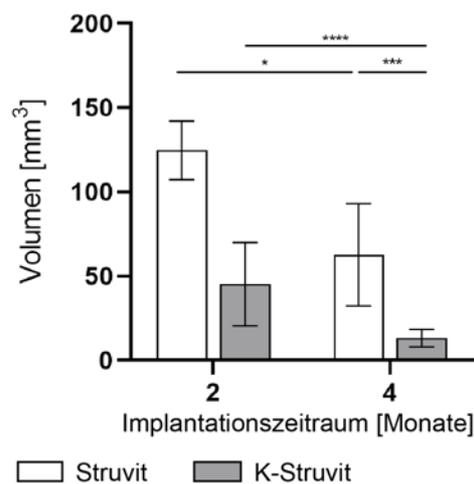


Abbildung 39: Volumen in mm^3 der Struvit bzw. K-Struvit Formkörper nach 2 und 4 Monaten subkutaner Implantation. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.3. Methylnmethacrylat-Histologie

Die subkutan implantierten Struvit- und K-Struvit-Formkörper waren zu beiden Untersuchungszeitpunkten jeweils von parallelfaserigem Bindegewebe umgeben (Abbildung 40).

Die Struvit-Implantate stellten sich sowohl nach zwei als auch nach vier Monaten als kompakte Strukturen mit einer leicht aufgerauten Oberfläche und gelegentlich vorkommenden Lufteinschlüssen dar. Im Zeitverlauf verloren die Implantate an Umfang. Bereits nach zwei Monaten war stellenweise neugebildetes Knochengewebe an der Oberfläche zu erkennen, direkt mit dieser in Kontakt stehend (Abbildung 40 A). In die Knochenmatrix eingeschlossene Osteozyten, sowie Osteoblasten und Osteoidsäume an der Oberfläche des Knochengewebes konnten regelmäßig dargestellt werden. In dem, das Implantat unmittelbar umgebenden parallelfaserigen Bindegewebe waren neben Fibrozyten vereinzelt Osteoprogenitorzellen, Lymphozyten und Makrophagen, sowie eine Vielzahl von Zementpartikeln erkennbar. Nach vier Monaten Implantation war eine Zunahme der Menge an Knochengewebe zu beobachten (Abbildung 40 B).

Die K-Struvit-Formkörper waren bereits nach zwei Monaten Implantation stark degradiert (Abbildung 40 C). Die Implantate machten insgesamt einen sehr porösen und ausgefransten Eindruck. Insbesondere an der Oberfläche und an den vorkommenden Poren schien sich das Material in eine Vielzahl von Zementfragmenten und -partikeln aufzulösen. An der Oberfläche der Implantate waren stellenweise Zellinfiltrationen (Lymphozyten, Makrophagen) zu beobachten. Nach vier Monaten erschienen die wenigen, zu diesem Zeitpunkt noch auffindbaren K-Struvit-Formkörper zunehmend aufgelöst und porös, teilweise waren nur noch in Bindegewebe eingelagerte Zementreste erkennbar. Vereinzelt war nach vier Monaten Implantation eine Knochenneubildung an der Oberfläche und in den Poren der Implantate darstellbar (Abbildung 40 D).

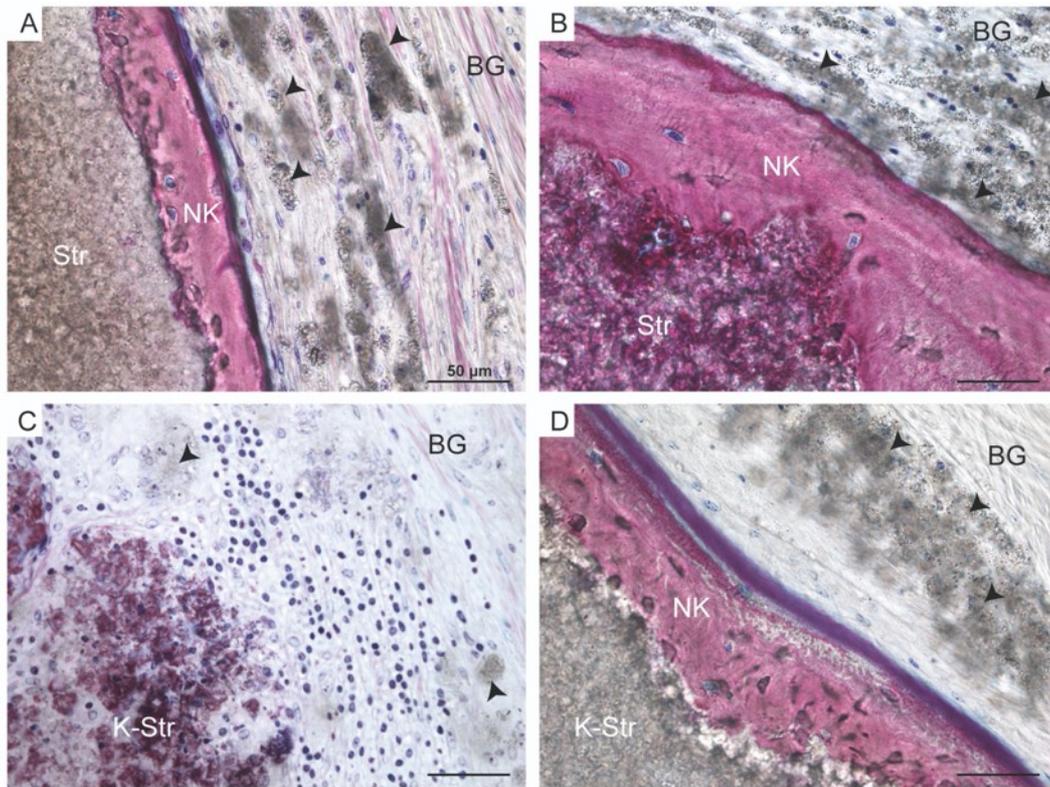


Abbildung 40: (A, B) Neugebildetes Knochengewebe an der Oberfläche der subkutan implantierten Struvit-Formkörper nach (A) 2 und (B) 4 Monaten. (B) Zellreiches Bindegewebe an der Oberfläche der subkutanen K-Struvit-Formkörper nach zwei Monaten. (D) Neugebildetes Knochengewebe an der Oberfläche der subkutanen K-Struvit-Formkörper nach 4 Monaten. Str – Struvit, K-Str – K-Struvit, NK – neugebildetes Knochengewebe, BG – Bindegewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel. Paragon Färbung, 400-fache Vergrößerung.

IV DISKUSSION

Ziel der Studie war es, zwei verschiedenen Magnesiumphosphat-Mineraie, Struvit und K-Struvit, auf ihre Eignung als KEM *in vivo* zu untersuchen. Die Materialien wurden in zwei unterschiedlichen Applikationsformen, als Zement und als Granulat, in ovinen trabekulären Knochen, sowie heterotop als subkutane Formkörper implantiert. Die Zemente wurden in einen teilbelasteten Knochendefekt in der proximalen Tibia injiziert, die Granulate wurden in einen unbelasteten Bohrlochdefekt in der medialen Femurkondyle eingebracht. Zwei und vier Monate nach der Implantation erfolgte die makroskopische, biomechanische, mikro-computertomographische, fluoreszenzmikroskopische und histologische Auswertung. Die Ergebnisse zeigten eine gute Biokompatibilität aller Materialien. Bei den Struvit-Zementen wurde in den tibialen Knochendefekten eine kontinuierliche Degradation mit gleichzeitiger Knochenneubildung beobachtet. Die K-Struvit-Zemente wiesen ein signifikant schnelleres Degradationsverhalten auf, nach vier Monaten Implantation waren sie fast vollständig resorbiert und durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt worden. Die K-Struvit-Granulate in den femoralen Defekten waren bereits zwei Monate nach der Implantation kaum noch vorhanden, stattdessen hatte sich im ursprünglichen Defektbereich trabekuläres Knochengewebe gebildet. Bei den Struvit-Granulaten wurde eine kontinuierliche Degradation und komplette Osseointegration nach vier Monaten beobachtet, was in einem mechanisch stabilen Granulat-Knochen-Komposit resultierte.

1. Kritische Betrachtung der Methodik

1.1. Tier- und Implantationsmodell

Um ein KEM hinsichtlich seiner Biokompatibilität, der Osseointegration, sowie seines Degradationsverhaltens und seiner Knochenregenerationskapazität zu beurteilen, ist ein geeignetes Tiermodell für die Implantation erforderlich. Dabei sollen die im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse möglichst gut auf die klinische Anwendung im Menschen übertragbar sein, wobei jedes Tiermodell seine Vor- und Nachteile aufweist (PEARCE et al., 2007; REICHERT et al., 2009;

LI et al., 2015; MCGOVERN et al., 2018; DE LACERDA SCHICKERT et al., 2020).

Präklinisch wird für die Untersuchung von KEM *in vivo* als Kleintiermodell häufig das Kaninchen eingesetzt, bevor das Biomaterial im Großtiermodell getestet wird. Das Knochengewebe von Kleintieren wie Mäusen, Ratten und Kaninchen besitzt jedoch im Vergleich zum Menschen einen weitaus schnelleren Metabolismus und damit eine höhere Regenerationskapazität (WANCKET, 2015). Ferner unterschieden sich die Dimensionen der Knochen stark von denen des Menschen, was demzufolge auch die Größe des angewendeten Knochendefektmodells einschränkt. Dies limitiert die Übertragbarkeit der im Kleintiermodell erzielten Ergebnissen auf die klinische Situation. In dieser Hinsicht sind Großtiermodelle besser für die Beurteilung implantierter KEM geeignet (REICHERT et al., 2009).

Für die präklinische Untersuchung von KEM im Großtiermodell wird als Spezies häufig das Schaf eingesetzt, nicht zuletzt aufgrund der kostengünstigen Haltung und des einfachen Umgangs mit den Tieren (WANCKET, 2015). Vorteilhaft ist zudem, dass ausgewachsene Schafe ein ähnliches Körpergewicht wie erwachsene Menschen besitzen. Dementsprechend sind auch Größe und Makrostruktur der Knochen vergleichbar (NEWMAN et al., 1995). Die Zusammensetzung der mineralischen Knochengrundsubstanz, sowie das Knochenremodeling und die Knochenbildungsrate sind ähnlich bei Schaf (1.2-1.5 mm/Tag) und Mensch (1.0-1.5 mm/Tag) (PEARCE et al., 2007). Die Knochendichte von ovinem trabekulären Knochengewebe ist bei Jungtieren noch vergleichbar zu der des Menschen, steigt jedoch im Verlauf des Knochenwachstums und der -reifung an (NAFEI et al., 2000). So besitzt das trabekuläre Knochengewebe von ausgewachsenen Schafen in langen Röhrenknochen insgesamt eine höhere Knochendichte ($0,61 \text{ g/cm}^3$) im Vergleich zum Menschen ($0,43 \text{ g/cm}^3$) und dementsprechend auch eine höhere mechanische Festigkeit (NAFEI et al., 2000; REICHERT et al., 2009). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Knochendichte von der Lokalisation im Körper beeinflusst wird. So ist laut einer Studie die apparente Knochendichte des trabekulären Knochengewebes in den Wirbelkörpern von Schafen sogar um ein 5 bis 6-Faches höher als beim Menschen (LIEBSCHNER, 2004). Zudem bestehen geschlechts- und

saisonabhängige Unterschiede in der Knochendichte bei Schafen, die bei der Interpretation von Ergebnissen im Tierversuch nicht außer Acht gelassen werden sollten. Hinsichtlich der Mikrostruktur des Knochens besitzen Schafe vor allem eine primäre Knochenstruktur, während der Mensch eine sekundäre Knochenstruktur mit Osteonen aufweist (EITEL et al., 1981). Insgesamt ist das in der vorliegenden Studie gewählte Tiermodell Schaf jedoch gut als für die Untersuchung von KEM geeignet, unter der Berücksichtigung der genannten Unterschiede bei der Interpretation der im Versuch generierten Ergebnisse (PEARCE et al., 2007). Aufgrund der sich während des Wachstum ändernden Knochenstruktur (NAFEI et al., 2000) wurden im vorliegenden Versuch ausschließlich adulte Schafe verwendet.

Als Implantationsmodell wurden zwei verschiedene Knochendefekte im trabekulären Knochengewebe verwendet, ein teilbelasteter keilförmiger Defekt in der proximalen Tibia für die Applikation der Zemente und ein unbelasteter (bzw. minimal belasteter) Knochendefekt in der medialen Femurkondyle für die Applikation des Granulats.

Der teilbelastete tibiale Knochendefekt ist als Implantationsmodell gut etabliert und wurde in mehreren Studien für die Untersuchung von KEM und Implantaten unter mechanisch (teil-)belasteten Bedingungen verwendet (IGNATIUS et al., 1997; SIMON et al., 2003; IGNATIUS et al., 2005; HARMS et al., 2012; KANTER et al., 2018; REITMAIER et al., 2018; STEIN et al., 2020). Es wurde gezeigt, dass ungefähr ein Drittel der axialen Gelenkkraft auf das Implantat übertragen werden, wobei hier vor allem eine Druckbelastung vorliegt (SIMON et al., 2003). Im Hinblick auf die mechanische Stabilität der Zemente unter teilbelasteten Bedingungen ist das tibiale Defektmodell entsprechend aussagekräftig.

Der gewählte Bohrlochdefekt zur Untersuchung der Magnesiumphosphat-Granulate ist ein weit verbreitetes Implantationsmodell für die Untersuchung resorbierbarer KEM (APELT et al., 2004; THEISS et al., 2005; VON RECHENBERG et al., 2013). Da das Granulat initial keine mechanische Stabilität gewährleistet, wie auch die in der vorliegenden Studie *ex vivo* gemessene Steifigkeit der Materialien darlegt, ist der Bohrlochdefekt als unbelastetes Modell für die Untersuchung dieser Applikationsform geeignet.

Die kritische Größe beider Defektmodelle wurde in einer vorangehenden Studie anhand einer Kontrollgruppe mit Leerdefekten nachgewiesen (KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018). Hier war nach 10 Monaten lediglich Bindegewebe darstellbar, eine spontane Heilung der Knochendefekte trat nicht auf. Die Größe der Defekte ist damit für die Beurteilung, ob die KEM eine Knochenregeneration ermöglichen, angemessen. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Studie auf diese Kontrollgruppe verzichtet, um die Anzahl an Tieren entsprechend des 3-R-Prinzips zu reduzieren.

Die Defektgröße gibt auch das Implantatvolumen vor, welches einen Einfluss auf die Degradation der implantierten KEM hat (FLAUTRE et al., 1999). Um die Materialien hinsichtlich ihres Degradationsverhaltens im menschlichen Knochengewebe zu beurteilen, sollte das Volumen des Implantats im Tierversuch möglichst dem der klinischen Anwendung entsprechen. Dieses ist bei letzterer jedoch stark von der jeweiligen klinischen Indikation abhängig. In der vorliegenden Studie wurden ca. 1 ml in den tibialen Knochendefekt injiziert. Im Vergleich dazu wurden beispielsweise in einer klinischen Studie im Rahmen einer Kyphoplastie zur Augmentation frakturierter Wirbelkörper ca. 4-8 ml (LIBICHER et al., 2005; KLEIN et al., 2017) verwendet. Für Knochenzysten wurden in einer anderen klinischen Studie bis zu 30 ml Knochenzement in den Defekt eingebracht (DONG et al., 2020). Damit ist das im vorliegenden Tierversuch verwendete Volumen deutlich geringer als das bei bestimmten klinischen Indikationen eingebrachte Volumen, was eine Limitation der Studie darstellt. Insgesamt ist jedoch im Großtiermodell Schaf eine Defektgröße möglich, die den klinischen Gegebenheiten deutlich besser entspricht als beispielsweise eine (im Vergleich zum Schafsmodell) bis zu 6-fach kleinerer Defektgröße im Kaninchen. Das Implantatvolumen des Granulats hingegen, mit dem die femoralen Defekte augmentiert wurden, dürfte denen in der oralchirurgischen Anwendung benötigten Volumina relativ nahekommen. Dementsprechend lassen sich beim Granulat hinsichtlich der Defektgröße die in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse gut auf die klinische Anwendung (z.B. Sinsuslift) übertragen.

Um das Degradationsverhalten der Magnesiumphosphat-basierten KEM im Zeitverlauf beurteilen zu können wurde bei der ersten Gruppe die

Probenentnahme und -analyse nach zwei Monaten, bei der zweiten Gruppe nach vier Monaten durchgeführt. Die Implantationszeiträume wurden anhand der Ergebnisse einer vorhergehenden Studie (KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018) gewählt und anhand der erwarteten Degradationsrate der KEM festgelegt. In der Vorstudie waren nach vier Monaten ca. 1/3 eines Struvit-bildenden Zements mit einer PLR von 2 gml⁻¹ degradiert, nach sieben Monaten war der Zement nahezu vollständig resorbiert (KANTER et al., 2018). In der vorliegenden Studie wurde der Zement in einer niedrigeren PLR von 1 gml⁻¹ und damit mit einer höheren Mikroporosität verwendet, sodass eine schnellere Degradation erwartet wurde. Auch bei dem im vorliegenden Versuch implantierten K-Struvit-bildenden Zement wurde aufgrund der höheren passiven Löslichkeit mit einem schnelleren Abbau gerechnet, was die Ergebnisse auch bestätigten. Zwar waren nach vier Monaten Implantation beide Zementvarianten nicht vollständig durch neugebildeten Knochen ersetzt worden, die gewählten Implantationszeiträume sind aber zur Beurteilung des Degradationsverhaltens ausreichend. Dies gilt auch für das Granulat. Dieses weist durch die Granulatschüttung eine größere Oberfläche auf, sodass bei dieser Applikationsform von einer schnelleren Degradation ausgegangen wurde, die sich in der vorliegenden Studie auch bestätigte.

Im vorliegenden Tierversuch wurden die Materialien auch in Form von präformierten Formkörpern subkutan implantiert, um sie auf potentielle osteoinduktive Eigenschaften hin zu untersuchen. Osteoinduktive KEM besitzen die Fähigkeit, die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten zu stimulieren und damit eine Knochenneubildung anzuregen (HABIBOVIC und DE GROOT, 2007; BARRADAS et al., 2011; BLOKHUIS und ARTS, 2011). Genau genommen besitzen alloplastische KEM wie beispielsweise Calciumphosphat-basierte KEM diese Eigenschaft nicht, da sie keine osteogen wirkenden biologischen Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren) oder Zellen enthalten. Trotzdem wird ihnen eine gewisse Osteoinduktivität zugesprochen, da eine Knochenneubildung regelmäßig an der Oberfläche von heterotop (in Binde- oder Muskelgewebe) implantierten Calciumphosphat-Biokeramiken (YAMASAKI und SAKAI, 1992; KLEIN et al., 1994; POLLICK et al., 1995; RIPAMONTI et al., 2009) und teilweise auch bei CPCs (GOSAIN et al., 2004;

HABIBOVIC et al., 2008) beobachtet wurde. Die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen dafür sind bislang noch weitgehend unklar (BARRADAS et al., 2011). Zum einen könnte die Oberflächenbeschaffenheit der Implantate eine Rolle spielen, die je nach Struktur eine Anheftung von osteoinduktiven Faktoren ermöglichen und dadurch Zellen in der Umgebung zur Differenzierung anregen könnte. Eine andere Theorie geht davon aus, dass bei Calciumphosphat-basierten KEM die bei der Degradation freigesetzten Calcium- und Phosphat-Ionen eine osteoinduktive Wirkung entfalten könnten. In der vorliegenden Studie wurde an der Oberfläche der Struvit-Implantate zu beiden Untersuchungszeitpunkten Knochengewebe nach subkutaner Implantation beobachtet, bei den K-Struvit-Implantaten lediglich nach vier Monaten Implantation. Dementsprechend kann von gewissen osteoinduktiven bzw. osteostimulativen Eigenschaften der implantierten Magnesiumphosphate ausgegangen werden. Dieses könnte zum einen durch die Oberflächenstruktur der mikroporösen Zementformkörper, oder durch bei der Degradation freigesetzte Magnesium-Ionen erklärbar sein. Insgesamt ermöglicht die subkutane Implantation durchaus Rückschlüsse auf ein gewisses osteoinduktives Potential der untersuchten Materialien.

1.2. Eignung der Untersuchungsmethoden

Die durchgeführten makroskopischen und histologischen Auswertungen sind standardmäßige Untersuchungsmethoden für die Beurteilung eines KEMs nach seiner Implantation *in vivo*. Weiter wurde in der vorliegenden Studie fluoreszenzmikroskopische, mikro-computertomographische und biomechanische Untersuchungen durchgeführt.

Mithilfe der Fluoreszenzmarkierung kann die Knochenneubildung im ursprünglichen Defektbereich dynamisch untersucht werden (DEMPSTER et al., 2013). In der vorliegenden Studie wurden als fluoreszierende Farbstoffe für die Markierung des neugebildeten Knochens Tetracyclin und Calceingrün eingesetzt. Diese wurden den Tieren mehrere Wochen nach der Implantation der Materialien in einem Abstand von zwei Wochen intravenös appliziert. In anderen Studien wurden diese Fluorochrome ebenfalls in einem vierzehntägigen Abstand für die Beurteilung der Knochenneubildung nach Implantation resorbierbarer Calciumphosphat-basierter Zemente

(KENT et al., 2018) bzw. Scaffolds (REITMAIER et al., 2018) im Schafsmodell angewendet. Bei den Zementen in der vorliegenden Studie war eine qualitative Bestimmung der Knochenneubildungsrate an der Oberfläche der degradierenden Implantate anhand der Messung des Abstandes der Fluoreszenzbanden möglich, da die Fluoreszenzbanden hier in der Regel klar erkennbar waren. Bei den implantierten Magnesiumphosphat-Granulaten hingegen war eine Ermittlung der Knochenneubildungsrate nicht erfolgreich, da die Fluoreszenz insbesondere nach vier Monaten vielfach ungeordnet und diffus zwischen den degradierenden Granulatkörnern erschien und meist keine klare Fluoreszenzbanden vorhanden waren. Zudem wiesen die Struvit-Granulate eine starke Autofluoreszenz auf. Dies erschwerte die Differenzierung der Banden zusätzlich, sodass insgesamt lediglich eine qualitative Auswertung erfolgen konnte. Insgesamt lässt dies jedoch auf aktive Knochenumbauprozesse schließen. Ähnliches wurde auch in einer Studie für Calciumphosphat-Scaffolds beschrieben, in der ebenfalls nur eine qualitative Beurteilung der Fluoreszenz vorgenommen wurde (REITMAIER et al., 2018).

Die mikro-computertomographische Analyse (μ CT) von Knochengewebe ist eine in präklinischen Tierstudien häufig eingesetzte Methode, um die kortikale und trabekuläre Knochenmorphologie zu untersuchen (BOUXSEIN et al., 2010). Anhand des μ CTs lassen sich röntgendichte Strukturen dreidimensional darstellen und Parameter zur Beurteilung der Knochenmorphologie ermitteln. Auch wenn die histologische Untersuchung unverzichtbare Informationen bezüglich zellulärer und dynamischer Prozesse der Knochenbildung und des Knochenumbaus liefert, ist sie hinsichtlich der lediglich zweidimensionalen Darstellung limitiert. Folglich stellt die dreidimensionale Untersuchung von Knochengewebe mittels μ CT eine wertvolle Ergänzung zur standardmäßig verwendeten Histologie dar. Die in der vorliegenden Studie zu untersuchenden Struvit- und K-Struvit-Granulate besitzen eine ähnliche Mineraleichte wie trabekuläres Knochengewebe, was die hier ermittelten Werte bestätigten. Zur Bestimmung der Mineraleichte wurden während dem Scannen der Proben im μ CT zwei Phantome mit bekannter Dichte mitgeführt. *Ex vivo* wurde für die Granulate innerhalb des femoralen Bohrlochdefekts eine apparente Mineraleichte von $226 \pm 27 \text{ mg HA/cm}^3$ für Struvit und $449 \pm 58 \text{ mg HA/cm}^3$ für K-Struvit

ermittelt. Für ovines femorales trabekuläres Knochengewebe wurden Werte von $416 \pm 68 \text{ mg HA/cm}^3$ bestimmt, welche ähnlich zu denen des Struvit-Granulats und mit denen des K-Struvit-Granulats nahezu identisch sind. Dementsprechend konnte kein Grenzwert definiert werden, um nach der Implantation *in vivo* das, in den femoralen Defekt eingewachsene Knochengewebe von den implantierten Granulatkörnern zu unterscheiden. Auch in anderen Studien war dies bei Calciumphosphat-basierten KEM nicht möglich (CHOPRA et al., 2009; KASUYA et al., 2012). Daher wurde in der vorliegenden Studie lediglich die apparente Mineraleichte des *in vivo* entstandenen Granulat-Knochen-Komposits innerhalb des ursprünglichen Defektbereiches ermittelt. Eine Zunahme der apparenten Mineraleichte ließ Rückschlüsse auf einwachsendes Knochengewebe zu, während eine Abnahme auf eine Degradation der implantierten Materialien hindeutete. In Verbindung mit der histologischen Untersuchung ermöglichte die μCT -Analyse dementsprechend eine gute Beurteilung hinsichtlich des Degradationsverhaltens und der Knochenregenerationskapazität der implantierten Granulate.

Um die biomechanischen Eigenschaften des Granulats *ex vivo* und nach Implantation *in vivo* zu analysieren, wurde in der vorliegenden Studie ein Indentationstest gewählt und dadurch die Steifigkeit der Implantate ermittelt. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass hier im Falle des Struvit-Granulats das *in vivo* entstandene Komposit aus Granulat und Knochen getestet wurde. Aufgrund der Osseointegration der Granulatkörner können die biomechanischen Eigenschaften des Granulats und des neugebildeten Knochengewebes nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Im Falle des K-Struvit-Granulats, das bereits nach zwei Monaten nahezu vollständig abgebaut war, wurde hingegen eher die Steifigkeit des im Defektbereich neugebildeten Knochen- bzw. auch Bindegewebes ermittelt.

2. Eignung der untersuchten Materialien

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Magnesiumphosphat-Minerale, Struvit und K-Struvit, als Zement und als Granulat *in vivo* untersucht. Alle untersuchten Materialien zeigten eine gute Biokompatibilität, unabhängig von der Materialvariante und der jeweiligen Applikationsform. So wurden weder klinisch in der postoperativen Phase noch postmortal in der makroskopischen oder histologischen Auswertung Anzeichen für ein Entzündungsgeschehen oder eine Infektion beobachtet. Die hohe Biokompatibilität von Magnesiumphosphat-basierten KEM wurde auch in anderen Tierstudien für unterschiedliche Magnesiumphosphat-Minerale beschrieben (GULOTTA et al., 2008; HIRVINEN et al., 2009; SCHENDEL und PEAUROI, 2009; KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018).

2.1. Magnesiumphosphat-Zemente

Die in die teilbelasteten tibialen Knochendefekte implantierten Struvit-Zemente zeigten sowohl nach zwei und vier Monaten eine gute Osseointegration, neu gebildete Knochen trabekel hatten sich direkt an die Zementoberfläche angelagert. Bei den K-Struvit-Implantaten hingegen war aufgrund der sehr schnellen Degradation nach zwei Monaten stellenweise eine zellreiche Bindegewebsschicht an der Oberfläche der Zemente zu beobachten. Diese wurde jedoch nach vier Monaten Implantation durch neugebildetes trabekuläres Knochengewebe ersetzt, sodass die K-Struvit-Implantate zu diesem Untersuchungszeitpunkt ebenfalls eine gute Osseointegration aufwiesen. Auch in anderen *in vivo* Studien wurden für MPCs (KANTER et al., 2014; KANTER et al., 2018) und -Scaffolds (KIM et al., 2016) ein gutes Osseointegrationsverhalten nach der Implantation in trabekuläres Knochengewebe beobachtet, was auf gute osteokonduktive Eigenschaften von Magnesiumphosphat-basierten KEM schließen lässt.

Die K-Struvit-Zemente wiesen im Vergleich zu den Struvit-Zementen ein signifikant schnelleres Degradationsverhalten auf (Abbildung 21). Vier Monate nach der Implantation war nur noch etwa ein Drittel des Zements im ursprünglichen Defektbereich vorhanden. Das degradierte Material war durch neu gebildetes Knochengewebe ersetzt worden. Diese schnelle Degradation ist vermutlich auf die höhere passive Löslichkeit der K-Struvit- im

Vergleich zur Struvit-Phase unter physiologischen Bedingungen (NABIYOUNI et al., 2018) zurückzuführen. In einer Studie, in der der einzige kommerziell erhältliche MPC, OsteoCrete®, in einem Calvaria-Defektmodell in Kaninchen untersucht wurde, waren im Vergleich dazu nach sechs Monaten Implantation noch ca. 50 % des ursprünglich injizierten Zementvolumens vorhanden (SCHENDEL und PEAUROI, 2009). Hinsichtlich des schnelleren Knochenmetabolismus von Kaninchen und den kleineren Defektgrößen und demnach geringeren Injektionsvolumen im Vergleich zum Schaf, deutet dies auf eine bemerkenswert schnelle Resorption des K-Struvit-Zements *in vivo* hin.

Die schnelle Degradation des K-Struvit-Zements in den ersten zwei Monaten der Implantation schien initial sogar geringgradig die Knochenneubildungsrate zu übersteigen. Auch wenn dies anfänglich in der Bildung einer bindegewebigen zellreichen Resorptionsschicht an der Oberfläche der K-Struvit-Zemente resultierte, schien dies den weiteren Verlauf der Knochenregeneration nicht zu stören. Nach vier Monaten Implantation war die bindegewebige Schicht durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt worden. Auch wenn diese zellreiche Zone als eine inflammatorische Reaktion auf den schnell degradierenden Zement und die zahlreich freigesetzten Zementpartikel interpretiert werden kann, schien die Anwesenheit von Phagozyten die Knochenneubildung nicht zu beeinträchtigen. Vielmehr scheint es, dass die infiltrierenden Makrophagen und in einem geringeren Umfang auch Osteoklasten die Zementpartikel aktiv resorbierten und damit die Migration von Osteoprogenitorzellen und knochenbildenden Osteoblasten ermöglichten. In diesem Sinne schien die zelluläre Antwort auf das implantierte Material nicht zwangsläufig einen negativen zu Effekt haben, sondern vielmehr den Abbau des K-Struvit-Zements und somit die Knochenneubildung zu unterstützen. Eine ähnliche zelluläre Reaktion wurde in einer anderen Studie für einen Calciumphosphat-basierten Zement beobachtet, auch hier schien dies die Knochenregeneration jedoch nicht zu beeinträchtigen (APELT et al., 2004). Im Vergleich dazu wurde die aktive zelluläre Resorption des langsamer degradierenden Struvit-Zements eher durch Osteoklasten als durch Makrophagen vermittelt, die sowohl nach zwei als auch nach vier Monaten Implantation an der Zementoberfläche dargestellt

werden konnten (Abbildung 24). Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass beide Zementvarianten, Struvit und K-Struvit, sowohl durch aktive, zelluläre Mechanismen, als auch passiv degradiert wurden. Im Falle des K-Struvit-Zements ist jedoch davon auszugehen, dass die sehr schnelle Resorption primär auf eine passive Auflösung aufgrund der hohen Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen zurückzuführen ist. Dass die Degradation von MPCs (wie auch von CPCs) sowohl durch aktive als auch passive Mechanismen erfolgt, wurde auch in einer *in vitro* Studie von Grossardt et al. beschrieben (GROSSARDT et al., 2010).

Die schnelle Resorption der K-Struvit-Zemente wurde im Vergleich zu den Struvit-Zementen von einer signifikant höheren Menge an neugebildetem Knochengewebe im ursprünglichen Defektbereich begleitet. Dies schien primär von der Degradationsgeschwindigkeit abhängig zu sein, da die Knochenneubildungsrate an der Oberfläche bei beiden Zementvarianten zu beiden Untersuchungszeitpunkten vergleichbar war (Abbildung 23). Die Knochenneubildung in den tibialen Defekten könnte zudem durch die osteostimulativen Eigenschaften, die bei beiden Zementvarianten beobachtet wurde, unterstützt worden sein. So hatte sich an der Oberfläche der, im subkutanen Gewebe implantierten Struvit- und K-Struvit-Formkörper nach vier Monaten Knochengewebe gebildet (Abbildung 40). Ein positiver Effekt auf die Knochenneubildung könnte auch auf die Freisetzung von Magnesium-Ionen bei der Degradation zurückzuführen sein, denen (wie in Kapitel I3.1 beschrieben) in verschiedenen *in vitro* Studien ein osteostimulatorischer Effekt zugeschrieben wurde (ZREIQAT et al., 2002; YOSHIZAWA et al., 2014; HUNG et al., 2019).

Die Struvit- bzw. K-Struvit-Zemente wurden in der vorliegenden Studie in einem mechanisch teilbelasteten Knochendefekt untersucht. Im Gegensatz zu verschiedenen CPCs, bei denen von einer Rissbildung im Zement unter mechanischer Belastung nach der Implantation in trabekulärem Knochengewebe berichtet wurde (FRAYSSINET et al., 2000; APELT et al., 2004; GISEP et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2007; SPIES et al., 2010), fielen bei den hier untersuchten Struvit- und K-Struvit-Zementen weder nach zwei noch nach vier Monaten Risse im Implantat auf. Ähnliches wurde auch in der

Vorstudie von Kanter et al. für einen Struvit-bildenden Zement in der gleichen Formulierung, aber mit einer höheren PLR beobachtet (KANTER et al., 2018). Dies könnte zwar auf die relativ schnelle Degradation der MPCs *in vivo* zurückzuführen sein, lässt jedoch auch darauf schließen, dass die Zemente für die im Defekt initial auftretende biomechanische Belastung eine ausreichende mechanische Stabilität aufwiesen. Es ist jedoch fraglich, ob diese in der klinischen Anwendung tatsächlich ausreicht, um in lasttragenden Bereichen (wie beispielsweise in einem Wirbelkörper nach einer Vertebro- oder Kyphoplastie) der mechanischen Belastung Stand zu halten. Da in der vorliegenden Studie kein quantitativer biomechanischer Test hinsichtlich der implantierten Zemente durchgeführt wurde, kann dies aufgrund der hier dargestellten qualitativen Beobachtungen nicht beurteilt werden. Zudem wären hierfür weitergehende Studien erforderlich. Obwohl MPCs, wie eingangs dargestellt, eine höhere initiale mechanische Druckfestigkeit im Vergleich zu CPCs aufweisen, besitzen sie im Vergleich zu ihrer Druckfestigkeit eine deutlich niedrigere Zug- und Biegefestigkeit (MEININGER et al., 2016). Dies ist, ähnlich wie bei CPCs, mit einer entsprechenden Sprödigkeit verbunden. Folglich ist anzunehmen, dass das spröde Verhalten den Einsatz von MPCs in lasttragenden Bereichen limitiert. Eine Verbesserung könnte hier, wie dies für CPCs oftmals untersucht wurde (WAGONER JOHNSON und HERSCHLER, 2011), durch eine Integration von Fasern oder Polymeren erreicht werden. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die mechanische Stabilität resorbierbarer KEM durch die Degradation der Materialien in der Regel abnimmt, wie beispielsweise in einer Studie von Yu et al. berichtet wurde (YU et al., 2010). Hier wurde dargestellt, dass sich die initial hohe Druckfestigkeit eines MPCs von 85 MPa nach intramuskulärer Implantation im Kaninchen innerhalb von drei Monaten auf 24 MPa reduzierte. Ferner stellten Kanter et al. dar, dass der in der vorliegenden Studie untersuchte Struvit-Zement (jedoch in einer höheren PLR) nach vier Monaten Implantation in ovinen trabekulären Knochen über 90 % der initial ermittelten Steifigkeit verloren hatte (KANTER et al., 2014). Im weiteren Zeitverlauf wurde die Steifigkeit jedoch durch neugebildetes Knochengewebe wieder auf physiologische Werte angehoben. Um ein Implantatversagen an mechanisch belasteten Implantationsorten zu vermeiden, sollte dementsprechend die

Degradationsrate so an die Knochenneubildungsrate angepasst sein, dass das neugebildete Knochengewebe allmählich mechanische Belastung aufnehmen kann.

Insgesamt erwiesen sich die in dieser Studie untersuchten Struvit- und K-Struvit-Zemente als biokompatibel, osteokonduktiv, in gewisser Hinsicht osteoinduktiv und sowohl durch aktive zelluläre als auch passive Mechanismen resorbierbar. Insbesondere der K-Struvit-Zement wies eine schnelle Degradation bei gleichzeitiger Knochenregeneration auf, die auf eine höhere passive Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen zurückzuführen ist. Abhängig von der gewünschten Degradationsrate, die von vielen Faktoren (u.a. klinischer Indikation, Implantationsvolumen, Alter und Gesundheitszustand des Patienten) abhängig ist, könnten die in der vorliegenden Studie untersuchten MPCs vielversprechend für die klinische Anwendung unter mechanisch teilbelasteten Bedingungen sein.

2.2. Magnesiumphosphat-Granulate

Das in den mechanisch unbelasteten Knochendefekt implantierte Struvit-Granulat zeigte eine kontinuierliche Degradation, sowie nach zwei Monaten Implantation eine gute, nach vier Monaten eine nahezu vollständige Osseointegration. Nach vier Monaten betrug der relative Anteil an Struvit-Granulat im Defektbereich noch ca. 30 %. Die Degradation des K-Struvit-Granulats hingegen verlief signifikant schneller als die des Struvit-Granulats. Bereits nach zwei Monaten war eine fast vollständige Degradation des K-Struvit-Granulats in den Bohrlochdefekten zu beobachten. Nach vier Monaten Implantation waren im ursprünglichen Defektbereich lediglich 2 % an K-Struvit-Granulat vorhanden. Dies resultierte initial, ähnlich wie bei den K-Struvit-Zementen, teilweise in der Bildung von zellreichem Bindegewebe im Zentrum des ursprünglichen Defektbereichs und deutet darauf hin, dass die Degradationsrate initial die Knochenneubildungsrate überschritten hatte. Dies schien jedoch auch hier die Knochenregeneration nicht weiter zu beeinträchtigen. Nach vier Monaten Implantation war der ursprüngliche Knochendefekt vollständig von neugebildeten Knochen trabekeln durchbaut. Die schnellere Degradation des K-Struvit-Granulats gegenüber dem Struvit-Granulat lässt sich auch hier mit einer höheren passiven Löslichkeit der

K-Struvit-Phase erklären. Im Vergleich zum K-Struvit in der Applikationsform des Zements, schien das K-Struvit-Granulat noch einmal deutlich schneller resorbiert zu werden. Dies könnte auf die Granulatschüttung, die durch die interkonnektierende Makroporosität eine Vergrößerung der Oberfläche des Materials bewirkt, zurückzuführen sein. Auch bei den Granulaten schien die passive Auflösung der primäre Degradationsmechanismus zu sein, obgleich auch eine zelluläre Resorption der Materialien durch Osteoklasten beobachtet werden konnte.

Im Vergleich zu der schnellen Degradation der Magnesiumphosphat-Granulate in der vorliegenden Studie, wurde für Calciumphosphat-Granulate nach Implantation im Knochen *in vivo* eine weitaus langsamere Degradation beschrieben. So wurde beispielsweise in einer Studie von Merten et al. von einer maximalen Resorption eines β -TCP-Granulats von 90 % und eines α -TCP-Granulats von etwa 95 % nach über einem Jahr der Implantation in tibialen Knochengewebe von Minischweinen berichtet (MERTEN et al., 2001). In einer klinischen Studie wurde in Defekten im Kieferknochen der Patienten eine Resorption von > 85 % innerhalb von zwei Jahren ermittelt, welche durch das Beimischen von Knochenchips auf 95 % erhöht werden konnte (HORCH et al., 2006). Die langsame Degradation der oralchirurgisch zu Augmentation ossärer Defekte häufig eingesetzte Calciumphosphat-Granulate (meist β -TCP oder HA) ist ihrer geringen Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen geschuldet (FUKUBA et al., 2021). Fuchs et al. hingegen untersuchten sphärische, mit Calcium substituierte Magnesiumphosphat-Granulate in femoralen Knochendefekten im Kaninchenmodell (FUCHS et al., 2021). Hier wurde innerhalb von drei Monaten eine nahezu vollständige Degradation der implantierten Granulate beobachtet, während die HA-Kontrolle beinahe unverändert erschien. Die schnellere Degradation der Magnesiumphosphat-Granulate entspricht Ergebnissen in der vorliegenden Studie und ist vermutlich der höheren passiven Löslichkeit der Magnesiumphosphate geschuldet.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Zementen, war die vorhandene Menge an neugebildetem Knochengewebe nach zwei und vier Monaten Implantation bei beiden Materialvarianten des Granulats ähnlich.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Falle des Struvit-Granulats neugebildetes Knochengewebe in die interkonnektierenden Makroporen zwischen den einzelnen Granulatkörnern einwachsen konnte. Gleiches war bei den lediglich mikroporösen Zementen nicht möglich, da hier die Knochenneubildung nur in dem Bereich stattfinden konnte, in dem der Zement degradiert worden war. Das Einwachsen von Knochengewebe zwischen die einzelnen Granulatkörner und die nahezu vollständige Osseointegration resultierte in einem mechanisch stabilem Granulat-Knochen-Komposit. Die in der vorliegenden Studie ermittelte Steifigkeit erreichte sogar höhere Werte im Vergleich zu denen des trabekulären Knochengewebes der ovinen Femurkondyle (Abbildung 27). Beim K-Struvit-Granulat hingegen führte die schnelle Degradation zunächst zu einer Abnahme der Steifigkeit, die jedoch im Zeitverlauf durch die Zunahme an neugebildeten trabekulären Knochengewebe wieder anstieg.

Im Gegensatz zu den gängigen Herstellungsmethoden, bei denen beispielsweise durch Zerkleinerung eines Biokeramik-Blocks relativ scharfkantige Granulate entstehen, wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Granulate mittels Emulsionsverfahren hergestellt (CHRISTEL et al., 2014). Dadurch entstehen atraumatische, sphärische Granulatkörner, die in der klinischen Applikation zu einer besseren Knochenregeneration beitragen könnten. Dies könnte insbesondere bei kieferchirurgischen Applikationen, wie beispielsweise einem Sinuslift von Vorteil sein, da hier die Perforation der Sinusmembran eine der am häufigsten beschriebenen klinischen Komplikationen darstellt (STACCHI et al., 2017). Durch die Verwendung von atraumatischen, sphärischen Granulatkörnern könnte dies vermutlich vermieden werden.

Zusammenfassend erwiesen sich die hier untersuchten Struvit- und K-Struvit-Granulate als biokompatibel, osteokonduktiv und resorbierbar. Auch in Form des Granulats war eine im Vergleich zum Struvit signifikant schnellere Degradation des K-Struvits zu beobachten. Das Struvit-Granulat wies im Vergleich dazu eine kontinuierliche Degradation und nahezu vollständige Osseointegration auf, was in einem mechanisch stabilem Granulat-Knochen-Komposit resultierte. Sowohl das Struvit, als auch das K-Struvit-Granulat

erscheinen, entsprechend der gewünschten Degradationsrate und der Größe des zu augmentierenden Knochendefekts, für die klinische Anwendung in mechanisch nicht belasteten Implantationsorten geeignet. Hier könnten die atraumatischen, sphärischen Granulate insbesondere im Bereich der Implantologie, Oralchirurgie, Parodontologie oder Endontologie zur Augmentation ossärer Defekte eingesetzt werden.

3. Ausblick

Insgesamt sind die in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse vielversprechend für den klinischen Einsatz der untersuchten Magnesiumphosphat-Mineralen als KEM. Aufgrund ihres schnellen Degradationsverhaltens bei gleichzeitiger Knochenregeneration, könnten sie eine geeignete Alternative zu den klinisch gut etablierten, aber sehr langsam degradierenden Calciumphosphat-basierten KEM darstellen. Während die Struvit- und K-Struvit-Zemente in mechanisch teilbelasteten Implantationsorten eingesetzt werden könnten, erscheinen die Materialien in Form des Granulats insbesondere für den oralchirurgischen Einsatz in mechanisch unbelasteten Knochendefekten geeignet.

Um die mechanischen Eigenschaften Magnesiumphosphat-basierter KEM für den Knochenersatz zu verbessern, könnte durch die Integration von Polymeren oder Fasern in Zukunft versucht werden, mechanisch stabile Implantate zu entwickeln. Erste Ansätze dafür existieren bereits (GOLAFSHAN et al., 2020). Auch eine Nutzung von Magnesiumphosphat-basierten KEM als lokale Wirkstoffträger wäre möglich, wie dies für Calciumphosphate bereits gut untersucht wurde (GINEBRA et al., 2012). So könnten die Materialien durch die Integration verschiedener Wirkstoffe, wie beispielsweise Antibiotika oder NSAIDs (Nichtsteroidale Antiphlogistika), mit antiinfektiösen bzw. antiinflammatorischen Eigenschaften ausgestattet werden. Auch eine Modifikation mit anti-osteoporotischen Wirkstoffen (z.B. Bisphosphonate), biologisch aktiven Ionen (z.B. Sr^{2+} , Zn^{2+}) oder Wachstumsfaktoren zur Förderung der Knochenregeneration, wäre eine denkbare Weiterentwicklung.

V ZUSAMMENFASSUNG

***In vivo* Osseointegration und Degradationsverhalten von Magnesiumphosphat-Mineralen für den Knochenersatz**

Ist die Regenerationskapazität des Knochengewebes nicht ausreichend, um in einem angemessenen Zeitraum die Heilung herbeizuführen, ist der Einsatz von Knochenersatzmaterialien (KEM) indiziert, wobei die autologe Knochentransplantation nach wie vor als „Goldstandard“ gilt. Da die Verfügbarkeit an autologem Knochen jedoch begrenzt ist und der erforderliche operative Eingriff für den Patienten mit zusätzlichen Risiken und Komorbiditäten an der Entnahmestelle verbunden ist, kommen vermehrt synthetische KEM zum Einsatz. Die in der Klinik gut etablierten Calciumphosphat-Biokeramiken und -Zemente weisen ein langsames Degradationsverhalten *in vivo* und für lastragende Bereiche unzureichende mechanische Eigenschaften auf. Eine vielversprechende Alternative stellen Magnesiumphosphat-basierte KEM dar, welche eine verbesserte Degradierbarkeit durch eine höhere passive Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen bei ebenfalls guter Biokompatibilität und Osteokonduktivität besitzen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, zwei verschiedene Magnesiumphosphate, Struvit und K-Struvit, in zwei unterschiedlichen Applikationsformen, als Zement und als Granulat, auf ihre Eignung als KEM im Schafsmodell zu untersuchen. Die Magnesiumphosphat-Zemente wurden in einen mechanisch teilbelasteten Knochendefekt in der proximalen Tibia, die Granulate in einen mechanisch unbelasteten Bohrlochdefekt in der medialen Femurkondyle eingebracht. Neben der Untersuchung in trabekulärem Knochen wurden die Materialien in Form von präformierten Formkörpern subkutan implantiert. Nach zwei und vier Monaten erfolgte die makroskopische, fluoreszenzmikroskopische, histologische, mikro-computertomographische und biomechanische Auswertung.

Alle untersuchten Materialien erwiesen sich als biokompatibel. Die Struvit-Zemente zeigten eine kontinuierliche Degradation mit gleichzeitiger

Knochenneubildung. Bei den K-Struvit-Zementen hingegen wurde ein signifikant schnelleres Degradationsverhalten beobachtet, was vermutlich auf die höhere passive Löslichkeit der K-Struvit-Phase zurückzuführen ist. Nach vier Monaten Implantation waren etwa zwei Drittel der Implantate resorbiert worden, stattdessen hatte sich neues Knochengewebe gebildet. Auch das K-Struvit-Granulat wurde signifikant schneller als das Struvit-Granulat abgebaut. Bereits zwei Monate nach der Implantation war es nahezu vollständig durch neugebildete Knochen trabekel ersetzt worden. Beim Struvit-Granulat hingegen wurde eine kontinuierliche Degradation und komplette Osseointegration nach vier Monaten beobachtet, was in einem mechanisch stabilen Granulat-Knochen-Komposit resultierte. An der Oberfläche der subkutan implantierten Formkörper konnte bei beiden Materialien Knochengewebe dargestellt werden, was auf eine gewisse Osteoinduktivität der Magnesiumphosphat-Mineralen schließen lässt. Insgesamt erscheinen die Struvit- bzw. K-Struvit-Zemente und -Granulate je nach klinischer Indikation und erwünschter Degradationsgeschwindigkeit als geeignet für den Knochenersatz.

VI SUMMARY

***In vivo* osseointegration and degradation behavior of magnesium phosphate minerals for bone replacement**

If the regeneration capacity of bone tissue is insufficient to enable bone regeneration within a reasonable period of time, the use of bone substitutes is needed. Here, autologous bone grafting still considered to be the gold standard. However, due to a limited availability of autologous bone and because the necessary surgical procedure is associated with additional risks for the patient and comorbidities at the harvest site, synthetic bone substitutes are increasingly being used. The clinically well-established calcium phosphate bioceramics and cements show a slow degradation behavior *in vivo* and poor mechanical properties under weight bearing conditions. Magnesium phosphate-based biomaterials exhibit a similarly good biocompatibility and osteoconductivity, but have been shown to degrade more rapid *in vivo* due to their higher solubility under physiological conditions. Therefore, they might be promising candidates for bone substitution.

The aim of the current study was to evaluate two different magnesium phosphate minerals, struvite and K-struvite, in two different application forms, cement and granules, as bone substitutes in a sheep model. The magnesium phosphate cements were injected into biomechanically partially loaded bone defects in the proximal tibia, the granules were applied into a mechanically unloaded drill-hole defects in the medial femoral condyle. Apart from an investigation in trabecular bone, the materials were implanted subcutaneously in the form of preformed cement cylinders. After two and four months, the implants were harvested for macroscopical, fluorescence, histological, micro-computertomographical and biomechanical analyses.

All of the implanted materials showed a good biocompatibility. The struvite cements displayed a continuous degradation with simultaneous new bone formation. In contrast, the K-struvite cements were degraded significantly more rapid, which can be explained by the higher passive solubility of the K-struvite phase. After four months of implantation more than two thirds of

the implant were resorbed and replaced by newly formed bone tissue. Similarly, the K-struvite granules were degraded significantly more rapid compared to the struvite granules. Already after two months of implantation the K-struvite granules were almost completely replaced by newly formed bone trabeculae. On the contrary, a more continuous degradation and complete osseointegration after four months of implantation was observed for the struvite granules, resulting in a mechanically stable granules-bone-composite. Moreover, bone tissue was observed on the surface of the subcutaneously implanted cement cylinders for both types of materials, indicating a certain osteoinductivity of the magnesium phosphate minerals. In summary, both struvite and K-struvite cements and granules appear promising for the use as bone substitutes, depending on the clinical indication and desired degradation rate.

VII TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Überblick über verschiedene KEM, die klinisch eingesetzt werden. Nach (BHATT und ROZENTAL, 2012), Copyright (2012), gedruckt mit Erlaubnis von Elsevier.....	5
Tabelle 2: Magnesiumphosphat-Verbindungen, ihr Löslichkeitsprodukt und berechnete absolute Löslichkeit bei 25°C. Mit * gekennzeichnete Verbindungen sind metastabil in Wasser (TAYLOR et al., 1963; ABBONA et al., 1982; GOLUBEV et al., 2001; BHUIYAN et al., 2008). Nach (NABIYOUNI et al., 2018), Copyright 2017, gedruckt mit Erlaubnis von Elsevier.....	12
Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsgruppen.	27
Tabelle 4: Postoperative i.v. Applikation fluoreszierender Farbstoffe.....	35

VIII ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Für die in vivo Implantation verwendete Materialien: (A, B) Lösung und Pulver zum Anrühren der Struvit- und K-Struvit-Zemente. (C) Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat. (D) Struvit- bzw. K-Struvit-Formkörper.....26
- Abbildung 2: Medialer Zugang zu proximaler Tibia und medialer Femurkondyle mit proximo-distalem Hautschnitt, parallel zum Lig. collaterale mediale.....29
- Abbildung 3: (A) Präparation des Fasziennappens. (B) Setzen der Kirschner Bohrdrähte 3 mm unterhalb des Tibiaplateaus.30
- Abbildung 4: (A) Ausrichten der Fräslehre mit angebrachter Positionshilfe anhand der Kirschner Bohrdrähte und Fixierung der Fräslehre. (B) Platzierte Fräslehre nach der Entfernung der Positionshilfe.30
- Abbildung 5: (A) Schrittweises Fräsen des keilförmigen Defekts in der proximalen Tibia unter Spülung mit steriler Kochsalzlösung. (B) Überprüfen der Größe des Defekts mithilfe eines Probeimplantats. (C) Keilförmiger Defekt in der proximalen Tibia nach Entfernung der Fräslehre.....31
- Abbildung 6: (A) Injektion des Zements in den tibialen Knochendefekt. (B) Keilförmiger Defekt in der proximalen Tibia mit implantiertem Zement.....32
- Abbildung 7: (A) Bohren des zylindrischen Defekts in der medialen Femurkondyle. (B) Einbringen des mit autologem Blut vermischten Granulats in den Bohrlochdefekt. (C) Implantiertes Granulat vor Wundverschluss.....33
- Abbildung 8: (A) Subkutane Implantation der Zement-Formkörper. (B) Schichtweiser Wundverschluss von Faszie, Subkutis und (C) Haut.33
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Schnittführung bei der Anfertigung der histologischen Präparate des Tibiaplateaus. Die einzelnen Arbeitsschritte (1-5) sind als nummerierte gestrichelte Linien, der implantierte Zement ist in blauer Farbe dargestellt. Es wurde jeweils eine 2 mm dicke Scheibe für die Paraffin-Histologie und eine 7 mm dicke Scheibe für die Methylmethacrylat-Histologie angefertigt.....36
- Abbildung 10: Schematische Darstellung der Schnittführung bei der Anfertigung der Scheiben für die biomechanische und histologische Untersuchung der medialen Femurkondyle. Die einzelnen Arbeitsschritte (1-7) sind als nummerierte gestrichelte Linien, das implantierte Granulat ist in blauer Farbe dargestellt. Es wurde jeweils eine 5 mm dicke Scheibe für die biomechanische Untersuchung, eine 2 mm dicke Scheibe für die Paraffin-Histologie und eine 7 mm dicke Scheibe für die Methylmethacrylat-Histologie angefertigt.37

- Abbildung 11: Prüfaufbau des biomechanischen Indentationstests. Über einen Indenter wurde eine axiale Belastung zentral auf die Probe ausgeübt. Mithilfe des Messtasters wurde die bei der Belastung auftretende Verformung der Probe erfasst.39
- Abbildung 12: Kraft-Weg-Diagramm der biomechanischen Prüfung mit eingezeichneter Steigung im linearen Bereich des Graphen zur Ermittlung der Steifigkeit K_{lin} in N/mm der Probe.39
- Abbildung 13: VOI zur Bestimmung der apparenten Mineraldichte ($d = 10 \text{ cm}$) innerhalb des mit Granulat gefüllten Bohrlochdefekts in der medialen Femurkondyle.41
- Abbildung 14: ROI zur Bestimmung der Knochenneubildungsrate (Tibia). ...43
- Abbildung 15: ROIs zur histomorphometrischen Auswertung von (A) Tibia und (B) Femur.45
- Abbildung 16: Repräsentative makroskopische Aufnahmen des Struvit- bzw. K-Struvit-Zements nach 2 und 4 Monaten Implantation in der proximalen Tibia: Struvit nach 2 (A) und 4 (B) Monaten, K-Struvit nach 2 (C) und 4 (D) Monaten.49
- Abbildung 17: Repräsentative histologische Abbildungen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Zement augmentierten Knochendefekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte der Implantat-Knochen Kontaktfläche (rechts). Struvit-Zement nach (A) 2 und (B) 4 Monaten. K-Struvit-Zement nach (C) 2 und (D) 4 Monaten. Str – Struvit-Zement, K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe. Paragon Färbung.52
- Abbildung 18: Kontaktfläche zwischen Zement und Knochen: Struvit-Zement (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation, K-Struvit-Zement (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Zement, K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe, BG – zellreiches Bindegewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel zwischen den neugebildeten Knochen trabekeln, weiße Pfeile – in Knochen trabekel eingelagerte Zementpartikel. Paragon Färbung. 100-fache Vergrößerung.53
- Abbildung 19: Knochenneubildung in den mit Struvit-Zement augmentierten tibialen Defekten. Paragon Färbung. 200-fache Vergrößerung. (A) Osteoblasten und Osteoidsäume an der Oberfläche der neugebildeten Knochen trabekel 2 Monate nach der Implantation, zelluläre Resorption des Struvit-Zements mit intrazellulär aufgenommenen Zementpartikeln (*). (B) Mineralisierung der neugebildeten Knochen trabekel 4 Monate nach der Implantation, Zementpartikel zwischen den Fettzellen des Knochenmarks. Str – Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel zwischen den neugebildeten Knochen trabekeln.53

- Abbildung 20: Knochenneubildung in den mit K-Struvit-Zement augmentierten tibialen Defekten (A, B) 2 und (C, D) 4 Monate nach der Implantation. Paragon Färbung. (A) Zellreiche Bindegewebsschicht an der Zementoberfläche mit sich neubildenden Knochen trabekeln; 200-fache Vergrößerung. (B) Zellreiche Bindegewebszone mit Fibroblasten, Lymphozyten, Osteoprogenitorzellen und Zementpartikeln; 400-fache Vergrößerung. (C) Osseointegration des K-Struvit-Zements nach 4 Monaten Implantation, zunehmende Mineralisierung des neugebildeten Knochengewebes; 200-fache Vergrößerung. (D) Zementpartikel zwischen den Fettzellen des Knochenmarks; 200-fache Vergrößerung. K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe, BG – zellreiches Bindegewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel zwischen den neugebildeten Knochen trabekeln, weiße Pfeile – in Knochen trabekel eingelagerte Zementpartikel.54
- Abbildung 21: Quantitative Histologie der mit Struvit- bzw. K-Struvit-Zement augmentierten Defekte in der Tibia: Relativer Anteil an (A) Zement, (B) Knochen und (C) Weichgewebe im Defektbereich nach 2 und 4 Monaten Implantation. ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001....55
- Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Zement augmentierten Knochen defekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte (rechts) der Implantat-Knochen Kontaktfläche. Struvit-Zement (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation. K-Struvit-Zement (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Zement, K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe.57
- Abbildung 23: Knochenneubildungsrate (bone formation rate, BFR in $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$) an der Oberfläche der Struvit- bzw. K-Struvit-Zemente. * p < 0,05.....58
- Abbildung 24: Osteoklasten an der Zementoberfläche in den mit (A, B) Struvit bzw. (C, D) K-Struvit augmentierten Knochen defekten in der Tibia. Struvit-Zement nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation. K-Struvit-Zement nach (C) 2 und (D) 4 Monaten Implantation. TRAP Färbung, 200-fache Vergrößerung. Str – Struvit-Zement. K-Str – K-Struvit-Zement, NK – neugebildetes Knochengewebe.59
- Abbildung 25: Quantitative Analyse der TRAP-gefärbten Paraffin Schnitte: Anzahl der Osteoklasten an der Oberfläche der Struvit- bzw. K-Struvit-Zemente (Osteoclast number per cement perimeter, N.Oc/Cm.Pm in mm^{-1}) nach 2 und 4 Monaten Implantation. * p < 0,05.59
- Abbildung 26: Repräsentative makroskopische Aufnahmen des (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Granulats nach 2 und 4 Monaten Implantation in der medialen Femurkondyle: Struvit nach 2 (A) und 4 (B) Monaten, K-Struvit nach 2 (C) und 4 (D) Monaten.....61
- Abbildung 27: Steifigkeit in N/mm der mit Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat augmentierten Defekte in der medialen Femurkondyle nach 0 (ex vivo), 2 und 4 Monaten Implantation. **** p < 0,0001.....62

- Abbildung 28: Mikro-computertomographische Schnittbilder der mit (A-C) Struvit bzw. (D-F) K-Struvit augmentierten Knochendefekte der medialen Femurkondyle: Struvit-Granulat (A) ex vivo, sowie (B) 2 und (C) 4 Monate nach Implantation in vivo. K-Struvit-Granulat (D) ex vivo, sowie (E) 2 und (F) 4 Monate nach Implantation in vivo.....63
- Abbildung 29: Apparente Mineraleichte (mineral density, MD in mg HA/cm³) im Defektbereich der mit Struvit- und K-Struvit-Granulat augmentierten femoralen Bohrlochdefekte. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.64
- Abbildung 30: Repräsentative histologische Abbildungen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit- Granulat augmentierten Knochendefekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte (rechts). Struvit-Granulat (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation. K-Struvit-Granulat (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Granulat, K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe. Paragon Färbung.66
- Abbildung 31: Knochenneubildung in den mit (A, B) Struvit- und (C, D) K-Struvit- Granulat augmentierten Defekten in der medialen Femurkondyle: Struvit-Granulat (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation, K-Struvit-Granulat (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Granulat, K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe, schwarze Pfeile – Granulatpartikel zwischen den neugebildeten Knochentrabekeln, weiße Pfeile – in Knochentrabekel eingelagerte Granulatreste, rote Pfeile – zellreiche Resorptionszone. Paragon Färbung. 50-fache Vergrößerung.....67
- Abbildung 32: Kontaktfläche zwischen Struvit-Granulat und Knochen nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation. (A) Zellinfiltration und Knochenneubildung an der Oberfläche eines Granulatkorns. (B) Zunehmende Osseointegration des Struvit-Granulats nach 4 Monaten Implantation. Str – Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe, Pfeile – Granulatpartikel im Markraum (schwarze Pfeile) bzw. eingeschlossen in Knochengewebe (weißer Pfeil). Paragon Färbung. 400-fache Vergrößerung.....67
- Abbildung 33: K-Struvit-Granulat nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation. (A) Zellreiche Resorptionszone und sich neubildendes Knochengewebe an der Oberfläche eines degradierenden K-Struvit-Granulatkorns. (B) Neugebildetes Knochengewebe mit integrierten K-Struvit-Granulatresten nach 4 Monaten Implantation. K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe, schwarze Pfeile – Granulatpartikel. Paragon Färbung. 400-fache Vergrößerung.....68
- Abbildung 34: Quantitative Histologie der mit Struvit- bzw. K-Struvit-Granulat augmentierten Defekte in der medialen Femurkondyle: Relativer Anteil an (A) Granulat, (B) Knochen und (C) Weichgewebe im Defektbereich nach 2 und 4 Monaten Implantation. *** p < 0,001, **** p < 0,0001....69

- Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Granulat augmentierten Knochendefekte. Übersichtsaufnahmen (links) und vergrößerte Ausschnitte (rechts) der Struvit-Granulat (A) 2 und (B) 4 Monate nach der Implantation. K-Struvit-Granulat (C) 2 und (D) 4 Monate nach der Implantation. Str – Struvit-Granulat, K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe.71
- Abbildung 36: Osteoklasten an der Granulatoberfläche in den mit Struvit bzw. K-Struvit augmentierten Knochendefekten in der medialen Femurkonyle. (A) Struvit-Granulat nach 4 Monaten Implantation. (B) K-Struvit-Granulat nach 2 Monaten Implantation. TRAP Färbung, 200-fache Vergrößerung. Str – Struvit-Granulat, K-Str – K-Struvit-Granulat, NK – neugebildetes Knochengewebe.....72
- Abbildung 37: Repräsentative makroskopische Aufnahmen der subkutan implantierten Formkörper mit umgebendem subkutanem Gewebe: Struvit nach (A) 2 und (B) 4 Monaten Implantation, K-Struvit nach (C) 2 und (D) 4 Monaten Implantation.....73
- Abbildung 38: Mikro-computertomographische Schnittbilder der subkutan implantierten (A, B) Struvit- bzw. (C, D) K-Struvit-Formkörper: Struvit nach (A) 2 und (B) 4 Monaten, K-Struvit nach (C) 2 und (D) 4 Monaten.74
- Abbildung 39: Volumen in mm³ der Struvit bzw. K-Struvit Formkörper nach 2 und 4 Monaten subkutaner Implantation. * p < 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.74
- Abbildung 40: (A, B) Neugebildetes Knochengewebe an der Oberfläche der subkutan implantierten Struvit-Formkörper nach (A) 2 und (B) 4 Monaten. (B) Zellreiches Bindegewebe an der Oberfläche der subkutanen K-Struvit-Formkörper nach zwei Monaten. (D) Neugebildetes Knochengewebe an der Oberfläche der subkutanen K-Struvit-Formkörper nach 4 Monaten. Str – Struvit, K-Str – K-Struvit, NK – neugebildetes Knochengewebe, BG – Bindegewebe, schwarze Pfeile – Zementpartikel. Paragon Färbung, 400-fache Vergrößerung.76

IX LITERATURVERZEICHNIS

- Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; 33: 312-8.
- Abbona F, Lundager Madsen HE, Boistelle R. Crystallization of two magnesium phosphates, struvite and newberyite: Effect of pH and concentration. *Journal of Crystal Growth* 1982; 57: 6-14.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012; 40: 363-408.
- Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Böhner M, Matter S, Auer JA, von Rechenberg B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004; 25: 1439-51.
- Aramendía MA, Borau VV, Jiménez C, Marinas JM, Romero FJ. Synthesis and Characterization of Magnesium Phosphates and Their Catalytic Properties in the Conversion of 2-Hexanol. *J Colloid Interface Sci* 1999; 217: 288-98.
- Babaie E, Lin B, Goel VK, Bhaduri SB. Evaluation of amorphous magnesium phosphate (AMP) based non-exothermic orthopedic cements. *Biomed Mater* 2016; 11: 055010.
- Banse X, Sims TJ, Bailey AJ. Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1621-8.
- Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995; 20: 1055-60.
- Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater* 2011; 21: 407-29; discussion 29.
- Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000: 10-27.
- Bhatt RA, Rozental TD. Bone Graft Substitutes. *Hand Clinics* 2012; 28: 457-68.
- Bhuiyan MIH, Mavinic DS, Koch FA. Thermal decomposition of struvite and its phase transition. *Chemosphere* 2008; 70: 1347-56.
- Blokhuis TJ, Arts JJC. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury* 2011; 42: S26-S9.
- Bobbert FSL, Zadpoor AA. Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone. *Journal of materials chemistry. B* 2017; 5 31: 6175-92.
- Boger A, Heini P, Windolf M, Schneider E. Adjacent vertebral failure after vertebroplasty: a biomechanical study of low-modulus PMMA cement. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 2007; 16: 2118-25.
- Boger A, Böhner M, Heini P, Verrier S, Schneider E. Properties of an injectable low modulus PMMA bone cement for osteoporotic bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2008; 86B: 474-82.

- Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials* 2005; 26: 6423-9.
- Bohner M, Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials* 2005; 26: 1553-63.
- Bohner M. Injectable cements for vertebroplasty and kyphoplasty. In: Balloon Kyphoplasty. Becker S, Ogon M, eds. Vienna: Springer Vienna 2008: 143-8.
- Bohner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Materials Today* 2010; 13: 24-30.
- Bohner M, Loosli Y, Baroud G, Lacroix D. Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta Biomaterialia* 2011; 7: 478-84.
- Bohner M, Galea L, Doebelin N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. *Journal of the European Ceramic Society* 2012; 32: 2663-71.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 229-38.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 1468-86.
- Bryers JD, Giachelli CM, Ratner BD. Engineering biomaterials to integrate and heal: The biocompatibility paradigm shifts. *Biotechnology and Bioengineering* 2012; 109: 1898-911.
- Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25: 2445-61.
- Chen S, Guo Y, Liu R, Wu S, Fang J, Huang B, Li Z, Chen Z, Chen Z. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2018; 164: 58-69.
- Chopra PM, Johnson M, Nagy TR, Lemons JE. Micro-computed tomographic analysis of bone healing subsequent to graft placement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 88: 611-8.
- Christel T, Geffers M, Klammert U, Nies B, Hoss A, Groll J, Kubler AC, Gbureck U. Fabrication and cytocompatibility of spherical magnesium ammonium phosphate granules. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 42: 130-6.
- Claes L, Hoellen I, Ignatius A. Biodegradable bone cements. *Orthopade* 1997; 26: 459-62.
- Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 133-43.
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3 Suppl 3: S131-9.
- Compton JT, Lee FY. A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *J Bone Joint Surg Am* 2014; 96: 1659-68.
- Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, Ross J, Goldstein SA, Jupiter JB, Rosenthal DI. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995; 267: 1796-9.

- de Lacerda Schickert S, van den Beucken J, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA. Pre-Clinical Evaluation of Biological Bone Substitute Materials for Application in Highly Loaded Skeletal Sites. *Biomolecules* 2020; 10
- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 2-17.
- Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater* 2008; 4: 139-48.
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011; 9: 66.
- Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11: 318-26.
- Dong C, Klimek P, Abächerli C, De Rosa V, Krieg AH. Percutaneous cyst aspiration with injection of two different bioresorbable bone cements in treatment of simple bone cyst. *J Child Orthop* 2020; 14: 76-84.
- Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 1998; 212: 427-35.
- Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9: 210-8.
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11: 45-54.
- Eitel F, Klapp F, Jacobson W, Schweiberer L. Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. *Arch Orthop Trauma Surg* 1981; 99: 59-64.
- Ewald A, Helmschrott K, Knebl G, Mehrban N, Grover LM, Gbureck U. Effect of cold-setting calcium- and magnesium phosphate matrices on protein expression in osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 96: 326-32.
- Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Bornert F, Offner D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng* 2018; 9: 2041731418776819.
- Finkemeier CG. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes. *JBJS* 2002; 84: 454-64.
- Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaître J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone* 1999; 25: 35S-9S.
- Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* 2015; 2015: 421746.
- Frayssinet P, Mathon D, Lerch A, Autefage A, Collard P, Rouquet N. Osseointegration of composite calcium phosphate bioceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; 50: 125-30.

- Fuchs A, Kreczy D, Brückner T, Gbureck U, Stahlhut P, Bengel M, Hoess A, Nies B, Bator J, Klammert U, Linz C, Ewald A. Bone regeneration capacity of newly developed spherical magnesium phosphate cement granules. *Clinical Oral Investigations* 2021;
- Fukuba S, Okada M, Nohara K, Iwata T. Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects. *Materials* 2021; 14
- Gallo M, Tadier S, Meille S, Gremillard L, Chevalier J. The in vitro evolution of resorbable brushite cements: A physico-chemical, micro-structural and mechanical study. *Acta Biomater* 2017; 53: 515-25.
- Galois L, Mainard D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study. *Acta Orthop Belg* 2004; 70: 598-603.
- Gartzke A-K, Julmi S, Klose C, Waselau A-C, Meyer-Lindenberg A, Maier HJ, Besdo S, Wriggers P. A simulation model for the degradation of magnesium-based bone implants. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2020; 101: 103411.
- Geffers M, Groll J, Gbureck U. Reinforcement Strategies for Load-Bearing Calcium Phosphate Biocements. *Materials* 2015; 8: 2700-17.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 Suppl 3: S20-7.
- Ginebra M-P, Canal C, Espanol M, Pastorino D, Montufar EB. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64: 1090-110.
- Ginebra MP, Espanol M, Maazouz Y, Bergez V, Pastorino D. Bioceramics and bone healing. *EFORT Open Rev* 2018; 3: 173-83.
- Gisep A, Kugler S, Wahl D, Rahn B. Mechanical characterisation of a bone defect model filled with ceramic cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2004; 15: 1065-71.
- Golafshan N, Vorndran E, Zaharievski S, Brommer H, Kadumudi FB, Dolatshahi-Pirouz A, Gbureck U, van Weeren R, Castilho M, Malda J. Tough magnesium phosphate-based 3D-printed implants induce bone regeneration in an equine defect model. *Biomaterials* 2020; 261: 120302.
- Golubev SV, Pokrovsky OS, Savenko VS. Homogeneous precipitation of magnesium phosphates from seawater solutions. *Journal of Crystal Growth* 2001; 223: 550-6.
- Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, Wilson CR, Toth JM, McIntyre BL. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1155-63; discussion 64-5.
- Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 2 Pt 2: 98-103.
- Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: Integrin-mediated adhesion. *Journal of Orthopaedic Research* 1996; 14: 878-87.

- Grossardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U. Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 3687-95.
- Gugala Z, Lindsey RW, Gogolewski S. New Approaches in the Treatment of Critical-Size Segmental Defects in Long Bones. *Macromolecular Symposia* 2007; 253: 147-61.
- Gulotta LV, Kovacevic D, Ying L, Ehteshami JR, Montgomery S, Rodeo SA. Augmentation of tendon-to-bone healing with a magnesium-based bone adhesive. *Am J Sports Med* 2008; 36: 1290-7.
- Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 25-32.
- Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 2008; 29: 944-53.
- Hagen A, Gorennoi V, Schönermark MP. Bone graft substitutes for the treatment of traumatic fractures of the extremities. *GMS Health Technol Assess* 2012; 8: Doc04.
- Hall DA, Stevens R, Jazairi BE. Effect of Water Content on the Structure and Mechanical Properties of Magnesia-Phosphate Cement Mortar. *Journal of the American Ceramic Society* 1998; 81: 1550-6.
- Han HJ, Kim S, Han DH. Multifactorial evaluation of implant failure: a 19-year retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014; 29: 303-10.
- Harms C, Helms K, Taschner T, Stratos I, Ignatius A, Gerber T, Lenz S, Rammelt S, Vollmar B, Mittlmeier T. Osteogenic capacity of nanocrystalline bone cement in a weight-bearing defect at the ovine tibial metaphysis. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 2883-9.
- Heinemann S, Rössler S, Lemm M, Ruhnnow M, Nies B. Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. *Acta Biomater* 2013; 9: 6199-207.
- Heini P, Berlemann U. Bone substitutes in vertebroplasty. *European Spine Journal* 2001; 10: S205-S13.
- Hirvonen LJM, Litsky AS, Samii VF, Weisbrode SE, Bertone AL. Influence of bone cements on bone-screw interfaces in the third metacarpal and third metatarsal bones of horses. *American Journal of Veterinary Research* 2009; 70: 964-72.
- Hofmann MP, Mohammed AR, Perrie Y, Gbureck U, Barralet JE. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. *Acta Biomater* 2009; 5: 43-9.
- Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35: 708-13.
- Hung C-C, Chaya A, Liu K, Verdalis K, Sfeir C. The role of magnesium ions in bone regeneration involves the canonical Wnt signaling pathway. *Acta Biomaterialia* 2019; 98: 246-55.
- Ignatius A, Unterricker K, Wenger K, Richter M, Claes L, Lohse P, Hirst H. A new composite made of polyurethane and glass ceramic in a loaded implant model: a biomechanical and histological analysis. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8: 753-6.

- Ignatius A, Peraus M, Schorlemmer S, Augat P, Burger W, Leyen S, Claes L. Osseointegration of alumina with a bioactive coating under load-bearing and unloaded conditions. *Biomaterials* 2005; 26: 2325-32.
- Ishiguro S, Kasai Y, Sudo A, Iida K, Uchida A. Percutaneous vertebroplasty for osteoporotic compression fractures using calcium phosphate cement. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2010; 18: 346-51.
- Kanter B, Geffers M, Ignatius A, Gbureck U. Control of in vivo mineral bone cement degradation. *Acta Biomater* 2014; 10: 3279-87.
- Kanter B, Vikman A, Bruckner T, Schamel M, Gbureck U, Ignatius A. Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model. *Acta Biomater* 2018; 69: 352-61.
- Kao ST, Scott DD. A Review of Bone Substitutes. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 2007; 19: 513-21.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26: 5474-91.
- Kasuya A, Sobajima S, Kinoshita M. In vivo degradation and new bone formation of calcium phosphate cement-gelatin powder composite related to macroporosity after in situ gelatin degradation. *J Orthop Res* 2012; 30: 1103-11.
- Kent NW, Blunn G, Karpukhina N, Davis G, de Godoy RF, Wilson RM, Coathup M, Onwordi L, Quak WY, Hill R. In vitro and in vivo study of commercial calcium phosphate cement HydroSet. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018; 106: 21-30.
- Khairoun I, Boltong MG, Driessens FC, Planell JA. Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements. *J Mater Sci Mater Med* 1998; 9: 667-71.
- Kim JA, Lim J, Naren R, Yun HS, Park EK. Effect of the biodegradation rate controlled by pore structures in magnesium phosphate ceramic scaffolds on bone tissue regeneration in vivo. *Acta Biomater* 2016; 44: 155-67.
- Klammert U, Reuther T, Blank M, Reske I, Barralet JE, Grover LM, Kübler AC, Gbureck U. Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. *Acta Biomater* 2010; 6: 1529-35.
- Klein C, de Groot K, Chen W, Li Y, Zhang X. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues. *Biomaterials* 1994; 15: 31-4.
- Klein R, Tetzlaff R, Weiss C, Schafer MK, Tanner M, Wiedenhofer B, Grafe I, Meeder PJ, Noeldge G, Nawroth PP, Kasperk C. Osteointegration and Resorption of Intravertebral and Extravertebral Calcium Phosphate Cement. *Clin Spine Surg* 2017; 30: E291-e6.
- Kobayashi N, Ong K, Villarraga M, Schwardt J, Wenz R, Togawa D, Fujishiro T, Turner AS, Seim HB, 3rd, Bauer TW. Histological and mechanical evaluation of self-setting calcium phosphate cements in a sheep vertebral bone void model. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81: 838-46.
- Kruger R, Groll J. Fiber reinforced calcium phosphate cements -- on the way to degradable load bearing bone substitutes? *Biomaterials* 2012; 33: 5887-900.
- Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 2014; 507: 323-8.

- Larsson S, Hannink G. Injectable bone-graft substitutes: current products, their characteristics and indications, and new developments. *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S30-4.
- LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 81-98.
- Li Y, Chen S-K, Li L, Qin L, Wang X-L, Lai Y-X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of orthopaedic translation* 2015; 3: 95-104.
- Libicher M, Vetter M, Wolf I, Noeldge G, Kasperk C, Grafe I, Da Fonseca K, Hillmeier J, Meeder PJ, Meinzer HP, et al. CT volumetry of intravertebral cement after kyphoplasty. Comparison of polymethylmethacrylate and calcium phosphate in a 12-month follow-up. *European radiology* 2005; 15: 1544-9.
- Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 2004; 25: 1697-714.
- Lin S, Yang G, Jiang F, Zhou M, Yin S, Tang Y, Tang T, Zhang Z, Zhang W, Jiang X. A Magnesium-Enriched 3D Culture System that Mimics the Bone Development Microenvironment for Vascularized Bone Regeneration. *Advanced Science* 2019; 6: 1900209.
- Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 2016; 86: 119-30.
- Maier JAM, Bernardini D, Rayssiguier Y, Mazur A. High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2004; 1689: 6-12.
- Mangano C, Piattelli A, Perrotti V, Iezzi G. Dense hydroxyapatite inserted into postextraction sockets: a histologic and histomorphometric 20-year case report. *J Periodontol* 2008; 79: 929-33.
- McGovern JA, Griffin M, Huttmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms* 2018; 11
- Meininger S, Mandal S, Kumar A, Groll J, Basu B, Gbureck U. Strength reliability and in vitro degradation of three-dimensional powder printed strontium-substituted magnesium phosphate scaffolds. *Acta Biomaterialia* 2016; 31: 401-11.
- Merten HA, Wiltfang J, Grohmann U, Hoenig JF. Intraindividual comparative animal study of alpha- and beta-tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. *J Craniofac Surg* 2001; 12: 59-68.
- Mestres G, Ginebra M-P. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties. *Acta Biomaterialia* 2011; 7: 1853-61.
- Mestres G, Abdolhosseini M, Bowles W, Huang SH, Aparicio C, Gorr SU, Ginebra MP. Antimicrobial properties and dentin bonding strength of magnesium phosphate cements. *Acta Biomater* 2013; 9: 8384-93.
- Mestres G, Aguilera FS, Manzanares N, Sauro S, Osorio R, Toledano M, Ginebra MP. Magnesium phosphate cements for endodontic applications with improved long-term sealing ability. *Int Endod J* 2014; 47: 127-39.

- Mestres G, Fernandez-Yague MA, Pastorino D, Montufar EB, Canal C, Manzanares-Céspedes MC, Ginebra MP. In vivo efficiency of antimicrobial inorganic bone grafts in osteomyelitis treatments. *Materials Science and Engineering: C* 2019; 97: 84-95.
- Moseke C, Saratsis V, Gbureck U. Injectability and mechanical properties of magnesium phosphate cements. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22: 2591-8.
- Musha Y, Umeda T, Yoshizawa S, Shigemitsu T, Mizutani K, Itatani K. Effects of blood on bone cement made of calcium phosphate: problems and advantages. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 92: 95-101.
- Nabiyouni M, Brückner T, Zhou H, Gbureck U, Bhaduri SB. Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications. *Acta Biomater* 2018; 66: 23-43.
- Nafei A, Danielsen CC, Linde F, Hvid I. Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: mechanical and physical properties. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 910-20.
- Nair AK, Gautieri A, Chang S-W, Buehler MJ. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nature Communications* 2013; 4: 1724.
- Nakano M, Hirano N, Zukawa M, Suzuki K, Hirose J, Kimura T, Kawaguchi Y. Vertebroplasty Using Calcium Phosphate Cement for Osteoporotic Vertebral Fractures: Study of Outcomes at a Minimum Follow-up of Two Years. *Asian Spine J* 2012; 6: 34-42.
- Neiman R, Sarma AC. Setting and Thermal Reactions of Phosphate Investments. *Journal of Dental Research* 1980; 59: 1478-85.
- Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995; 16: S277-S84.
- No YJ, Roohani-Esfahani SI, Zreiqat H. Nanomaterials: the next step in injectable bone cements. *Nanomedicine (Lond)* 2014; 9: 1745-64.
- O'Neill R, McCarthy HO, Montufar EB, Ginebra MP, Wilson DI, Lennon A, Dunne N. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. *Acta Biomater* 2017; 50: 1-19.
- Ostrowski N, Sharma V, Roy A, Kumta P. Systematic Assessment of Synthesized Tri-Magnesium Phosphate Powders (Amorphous, Semi-Crystalline and Crystalline) and Cements for Ceramic Bone Cement Applications. *Journal of Materials Science & Technology* 2015; 31
- Ostrowski N, Roy A, Kumta PN. Magnesium Phosphate Cement Systems for Hard Tissue Applications: A Review. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2016; 2: 1067-83.
- Park J-W, Kim Y-J, Jang J-H, Song H. Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 2010; 21: 1278-87.
- Park JW, Kim KH, Ann KY. Fundamental Properties of Magnesium Phosphate Cement Mortar for Rapid Repair of Concrete. *Advances in Materials Science and Engineering* 2016; 2016: 7179403.
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007; 13: 1-10.

- Pneumaticos SG, Triantafyllopoulos GK, Basdra EK, Papavassiliou AG. Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2010; 14: 2561-9.
- Pollick S, Shors EC, Holmes RE, Kraut RA. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53: 915-22; discussion 22-3.
- Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45: 1353-8.
- Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 2009; 30: 2149-63.
- Reitmaier S, Kovtun A, Schuelke J, Kanter B, Lemm M, Hoess A, Heinemann S, Nies B, Ignatius A. Strontium(II) and mechanical loading additively augment bone formation in calcium phosphate scaffolds. *Journal of Orthopaedic Research* 2018; 36: 106-17.
- Rezania A, Healy KE. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *Journal of Orthopaedic Research* 1999; 17: 615-23.
- Ripamonti U, Crooks J, Khoali L, Roden L. The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs. *Biomaterials* 2009; 30: 1428-39.
- Romeis B, Denk H, Künzle H, Plenk HJ, Rüschoff J, Sellner W (1989) *Mikroskopische Technik*, 17. Auflage edn. Urban & Schwarzenberg, München; Wien; Baltimore. 697
- Rostami N (2014) Development of novel magnesium phosphate bone cement
Saikia KC, Bhattacharya TD, Bhuyan SK, Talukdar DJ, Saikia SP, Jitesh P. Calcium phosphate ceramics as bone graft substitutes in filling bone tumor defects. *Indian J Orthop* 2008; 42: 169-72.
- Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT. Mechanisms of bone development and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020; 21: 696-711.
- Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 1-26.
- Schendel SA, Peauroi J. Magnesium-Based Bone Cement and Bone Void Filler: Preliminary Experimental Studies. *Journal of Craniofacial Surgery* 2009; 20
- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986: 299-308.
- Schröter L, Kaiser F, Stein S, Gbureck U, Ignatius A. Biological and mechanical performance and degradation characteristics of calcium phosphate cements in large animals and humans. *Acta Biomater* 2020; 117: 1-20.
- Seehra SS, Gupta S, Kumar S. Rapid setting magnesium phosphate cement for quick repair of concrete pavements characterisation and durability aspects. *Cement and Concrete Research* 1993; 23: 254-66.
- Seeman E. Bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19: 219-33.

- Shashkova I, Kitikova N, Rat'ko A, D'yachenko A. Preparation of calcium and magnesium hydrogen phosphates from natural dolomite and their sorptive properties. *Inorganic Materials - INORG MATER-ENGL TR* 2000; 36: 826-9.
- Sheikh Z, Abdallah MN, Hanafi AA, Misbahuddin S, Rashid H, Glogauer M. Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials. *Materials* 2015; 8: 7913-25.
- Simon U, Augat P, Ignatius A, Claes L. Influence of the stiffness of bone defect implants on the mechanical conditions at the interface-a finite element analysis with contact. *J Biomech* 2003; 36: 1079-86.
- Spies CK, Schnurer S, Gotterbarm T, Breusch SJ. Efficacy of Bone Source and Cementek in comparison with Endobon in critical size metaphyseal defects, using a minipig model. *J Appl Biomater Biomech* 2010; 8: 175-85.
- St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, Schaefer M, Berta SC, Albert T, Hilibrand A. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2003; 32: 18-23.
- Stacchi C, Andolsek F, Berton F, Perinetti G, Navarra CO, Di Lenarda R. Intraoperative Complications During Sinus Floor Elevation with Lateral Approach: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2017; 32: e107-e18.
- Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials* 2006; 27: 1728-34.
- Stein S, Kruck L, Warnecke D, Seitz A, Dürselen L, Ignatius A. Osseointegration of titanium implants with a novel silver coating under dynamic loading. *Eur Cell Mater* 2020; 39: 249-59.
- Strong DM, Friedlaender GE, Tomford WW, Springfield DS, Shives TC, Burchardt H, Enneking WF, Mankin HJ. Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1996: 107-14.
- Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003; 24: 47-66.
- Tamimi F, Nihouannen DL, Bassett DC, Ibasco S, Gbureck U, Knowles J, Wright A, Flynn A, Komarova SV, Barralet JE. Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions. *Acta Biomaterialia* 2011; 7: 2678-85.
- Tas AC. Transformation of Brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) to Whitlockite ($\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$) or Other CaPs in Physiologically Relevant Solutions. *Journal of the American Ceramic Society* 2016; 99: 1200-6.
- Taylor AW, Frazier AW, Gurney EL, Smith JP. Solubility products of di- and trimagnesium phosphates and the dissociation of magnesium phosphate solutions. *Transactions of the Faraday Society* 1963; 59: 1585-9.
- Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Bohner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005; 26: 4383-94.
- Verlaan JJ, Oner FC, Slootweg PJ, Verbout AJ, Dhert WJA. Histologic Changes After Vertebroplasty. *JBJS* 2004; 86: 1230-8.

- von Rechenberg B, Genot OR, Nuss K, Galuppo L, Fulmer M, Jacobson E, Kronen P, Zlinszky K, Auer JA. Evaluation of four biodegradable, injectable bone cements in an experimental drill hole model in sheep. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85: 130-8.
- Vorndran E, Ewald A, Müller FA, Zorn K, Kufner A, Gbureck U. Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22: 429-36.
- Wagoner Johnson AJ, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater* 2011; 7: 16-30.
- Walker J, Shadanbaz S, Woodfield TBF, Staiger MP, Dias GJ. Magnesium biomaterials for orthopedic application: A review from a biological perspective. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2014; 102: 1316-31.
- Wancket LM. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Veterinary Pathology* 2015; 52: 842-50.
- Wang A-j, Yuan Z-l, Zhang J, Liu L-t, Li J-m, Liu Z. Effect of raw material ratios on the compressive strength of magnesium potassium phosphate chemically bonded ceramics. *Materials Science and Engineering: C* 2013a; 33: 5058-63.
- Wang AJ, Zhang J, Li JM, Ma AB, Liu LT. Effect of liquid-to-solid ratios on the properties of magnesium phosphate chemically bonded ceramics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013b; 33: 2508-12.
- Wang M, Yu Y, Dai K, Ma Z, Liu Y, Wang J, Liu C. Improved osteogenesis and angiogenesis of magnesium-doped calcium phosphate cement via macrophage immunomodulation. *Biomaterials Science* 2016; 4: 1574-83.
- Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater* 2017; 2: 224-47.
- Waselau M, Samii VF, Weisbrode SE, Litsky AS, Bertone AL. Effects of a magnesium adhesive cement on bone stability and healing following a metatarsal osteotomy in horses. *American Journal of Veterinary Research* 2007; 68: 370-8.
- Weisinger JR, Bellorín-Font E. Magnesium and phosphorus. *The Lancet* 1998; 352: 391-6.
- Wenisch S, Stahl JP, Horas U, Heiss C, Kilian O, Trinkaus K, Hild A, Schnettler R. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67: 713-8.
- Wilcox R, Vant C, Baroud G. Long-Term Effects of Vertebroplasty: Adjacent Vertebral Fractures. 2006; 16: 265-80.
- Wildemann B, Ignatius A, Leung F, Taitsman LA, Smith RM, Pesántez R, Stoddart MJ, Richards RG, Jupiter JB. Non-union bone fractures. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7: 57.
- Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* 2005; 26: 3557-63.

- Witte F, Ulrich H, Palm C, Willbold E. Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81: 757-65.
- Wolf FI, Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium. *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 24: 3-9.
- Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H, Liu C. Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomater* 2008a; 4: 1873-84.
- Wu F, Su J, Wei J, Guo H, Liu C. Injectable bioactive calcium-magnesium phosphate cement for bone regeneration. *Biomed Mater* 2008b; 3: 044105.
- Wu L, Luthringer BJC, Feyerabend F, Schilling AF, Willumeit R. Effects of extracellular magnesium on the differentiation and function of human osteoclasts. *Acta Biomaterialia* 2014; 10: 2843-54.
- Wu L, Feyerabend F, Schilling AF, Willumeit-Römer R, Luthringer BJC. Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture. *Acta Biomaterialia* 2015; 27: 294-304.
- Xu C, Lei C, Meng L, Wang C, Song Y. Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2012; 100B: 1435-43.
- Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *Journal of Prosthodontic Research* 2018; 62: 152-61.
- Yamasaki H, Sakai H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials* 1992; 13: 308-12.
- Yang G, Liu J, Li F, Pan Z, Ni X, Shen Y, Xu H, Huang Q. Bioactive calcium sulfate/magnesium phosphate cement for bone substitute applications. *Materials Science and Engineering: C* 2014a; 35: 70-6.
- Yang H, Zou J. Filling materials used in kyphoplasty and vertebroplasty for vertebral compression fracture: a literature review. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2011; 39: 87-91.
- Yang J, Qian C. Effect of borax on hydration and hardening properties of magnesium and potassium phosphate cement pastes. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* 2010; 25: 613-8.
- Yang N, Shi C, Yang J, Chang Y. Research Progresses in Magnesium Phosphate Cement-Based Materials. *Journal of Materials in Civil Engineering* 2014b; 26: 04014071.
- Yang Q, Zhu B, Wu X. Characteristics and durability test of magnesium phosphate cement-based material for rapid repair of concrete. *Materials and Structures* 2000; 33: 229-34.
- Yang Q-B, Wu X. Factors influencing properties of phosphate cement-based binder for rapid repair of concrete. *Cement and Concrete Research* 1999; 29: 389-96.
- Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, Sfeir C. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomaterialia* 2014; 10: 2834-42.
- Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192-5.

- Yu Y, Wang J, Liu C, Zhang B, Chen H, Guo H, Zhong G, Qu W, Jiang S, Huang H. Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 76: 496-504.
- Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater* 2014; 10: 1035-49.
- Zhang Y, Xu J, Ruan YC, Yu MK, O'Laughlin M, Wise H, Chen D, Tian L, Shi D, Wang J, Chen S, Feng JQ, Chow DHK, Xie X, Zheng L, Huang L, Huang S, Leung K, Lu N, Zhao L, Li H, Zhao D, Guo X, Chan K, Witte F, Chan HC, Zheng Y, Qin L. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nature Medicine* 2016; 22: 1160-9.
- Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules* 2021; 26
- Zhou H, Agarwal AK, Goel VK, Bhaduri SB. Microwave assisted preparation of magnesium phosphate cement (MPC) for orthopedic applications: A novel solution to the exothermicity problem. *Materials Science and Engineering: C* 2013; 33: 4288-94.
- Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S16-21.
- Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; 62: 175-84.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anita Ignatius für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm. Vielen Dank für Ihre hervorragende Betreuung und Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit, Ihr Vertrauen und die entgegengebrachte Wertschätzung.

Meinen herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Eckhart Wolf für die Übernahme meiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Herrn Prof. Dr. Uwe Gbureck und Friederike Kaiser von der Universität Würzburg danke ich für die Herstellung der implantierten Materialien und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Mein großer Dank gilt Frau Dr. Svenja Stein. Vielen herzlichen Dank für das Beibringen der Operationstechnik, für Deine Hilfe an den Operationstagen und Deine unermüdliche Unterstützung in allen sonstigen Belangen.

Auch danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm. Ganz besonders bedanken möchte ich mich hier bei Benjamin Krüger, den besten Bürokollegen und OP-Assistenten den ich mir hätte wünschen können. Vielen Dank für Deine tatkräftige Mithilfe im OP und vor allem für unsere Freundschaft. Vielen Dank an Kristina Karremann für das Anfertigen der histologischen Präparate und an Morten Vogt für die OP-Fotos.

Danke an die Tierpfleger des Tierforschungszentrums der Universität Ulm, insbesondere an Hermann Klassen, Wilhelm Gebel, Ricco Richter und Kurt Steinhauer für die zuverlässige Versorgung unserer Schafe.

Meinem Partner Steffen danke ich von ganzem Herzen dafür, dass er mich immer wieder daran erinnert, was wirklich wichtig im Leben ist und dafür, dass er in allen Höhen und Tiefen der letzten Zeit für mich da war.

Mein unendlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen.