In-vivo-Untersuchung von Biokompatibilität, Degradationsverhalten und Osseointegration 3D-pulvergedruckter Calcium-Magnesium-Phosphat-Zement Scaffolds

von

Katharina Sophia Elisabeth Kowalewicz

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

In-vivo-Untersuchung von Biokompatibilität, Degradationsverhalten und Osseointegration 3D-pulvergedruckter Calcium-Magnesium-Phosphat-Zement Scaffolds

von Katharina Sophia Elisabeth Kowalewicz

aus Nürnberg

München 2023

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

> Mitbetreuung durch: Dr. Anja-Christina Waselau Franziska Feichtner, Ph.D.

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

Dekan:	UnivProf. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter:	UnivProf. Dr. Andrea Meyer- Lindenberg
Korreferenten:	UnivProf. Dr. Andreas F. Parzefall
	UnivProf. Dr. Benedikt Sabaß
	UnivProf. Dr. Heidrun Potschka
	PrivDoz. Dr. Joachim C. Manning

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Meiner Familie

Teilergebnisse der Langzeitstudie dieser Dissertation wurden als Vortrag auf dem folgenden Fachkongress präsentiert:

2022 ANNUAL MEETING of the German Society for Biomaterials (DGBM)15. – 17. September 2022, Essen, Deutschland

In-vivo investigation of powder-printed calcium magnesium phosphate (CaMgP) cylinders in a rabbit model

Referentin: Franziska Feichtner

Autoren: Katharina Kowalewicz, Franziska Feichtner, Elke Vorndran, Anja-Christina Waselau, Manuel Brückner, Andrea Meyer-Lindenberg

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	5
1.	Knochen	5
1.1.	Biochemie und Zellen des Knochengewebes	5
1.2.	Ossifikation	6
1.3.	Aufbau des Röhrenknochens	7
1.4.	Knochenumbau	7
1.5.	Heilung von Frakturen und knöchernen Defekten	8
2.	Knochenersatz	10
2.1.	Knochentransplantate	10
2.2.	Alloplastische Knochenersatzmaterialien	11
2.2.1.	Bioaktive Gläser	11
2.2.2.	Polymere	12
2.2.3.	Calciumphosphat-Keramiken	13
2.2.4.	Calciumphosphat-Zemente	14
2.2.5.	Magnesiumphosphat-Zemente	16
2.2.6.	Calcium-Magnesium-Phosphat-Zemente	17
3.	Applikationsformen von Knochenersatzzementen	
3.1.	Pasten	
3.2.	Granulate	20
3.3.	3D-pulvergedruckte Scaffolds	22
4.	Untersuchungsmethoden von Knochenersatzmaterialien	24
4.1.	Mikro-Computertomographische Untersuchung	24
4.2.	Histologische Untersuchung	25
4.3.	Analyse durch Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersi	ive
	Röntgenspektroskopie	29
III.	PUBLIKATIONEN	33
1.	Publikation I	33
2.	Publikation II	

IV.	DISKUSSION	85
V.	ZUSAMMENFASSUNG	105
VI.	SUMMARY	107
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	109
VIII.	DANKSAGUNG	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	dreidimensional
μCT	Mikro-Computertomographie
BV	Bone Volume = Knochenvolumen
Ca	Calcium
CaMgP	Calciummagnesiumphosphat
CaP	Calciumphosphat
CDHA	Calcium-defizitäres Hydroxylapatit
CMPC	Calcium-Magnesium-Phosphat-Zement
CPC	Calciumphosphat-Zement
CSD	critical size defect = Knochendefekt kritischer Größe
СТ	Computertomographie
DAHP	Diammoniumhydrogenphosphat
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
et al.	et alteri (lat.: und andere)
FBGCs	Fremdkörperriesenzellen
Н	Wasserstoff
HA	Hydroxylapatit
К	Kalium
М	mol/L (Stoffmengenkonzentration)
Ma%	Gewichtsprozent
Mg	Magnesium
Mg225	Ca0,75Mg2,25(PO4)2 ohne Nachbehandlung
Mg225d	Ca0,75Mg2,25(PO4)2 nachbehandelt mit
	Diammoniumhydrogenphosphat
Mg225p	Ca _{0,75} Mg _{2,25} (PO ₄) ₂ nachbehandelt mit Phosphorsäure
MgO	Magnesiumoxid
MgP	Magnesiumphosphat
MPa	Megapascal
MPC	Magnesiumphosphat-Zement
MRT	Magnetresonanztomographie
Р	Phosphor
PA	Phosphoric acid = Phosphorsäure

PDS	Polydioxanon
PO ₄	Phosphat
ppm	parts per million = Anzahl der Teile pro eine Million Teile
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROI	Region of interest = Bereich von Interesse
RP	Rapid Prototyping
SS/SV	Scaffold Surface/Scaffold Volume =
	Scaffoldoberfläche/Scaffoldvolumen
SV	Scaffold Volume = Scaffoldvolumen
Tb.N	Trabecular Number = Trabekelanzahl
Tb.Sp	Trabecular Separation = Trabekelabstand
Tb.Th	Trabecular Thickness = Trabekeldicke
ТСР	Tricalciumphosphat
Vol%	Volumenprozent

I. EINLEITUNG

weltweit mehrere Millionen Jährlich werden Knochentransplantationen durchgeführt, sodass das Knochengewebe nach Blut das im menschlichen Körper am zweithäufigsten transplantierte Gewebe darstellt (Campana et al. 2014, Kheirallah und Almeshaly 2016). Der Knochen ist ein dynamisches und regeneratives Organ, in dem permanent Auf-, Ab- und Umbauvorgänge stattfinden. Die für die Homöostase des Knochens und die Knochenregeneration nötigen Faktoren, wie eine Matrix für das Wachstum, lebensfähige Zellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten), ausreichende Gefäßversorgung und Stabilität sowie Wachstumsfaktoren, sind in vielen Situationen jedoch nicht alle in ausreichendem Maße vorhanden, wodurch die natürliche Knochenheilung gestört werden kann (Fillingham und Jacobs 2016). Es gibt vielfältige Ursachen, wie beispielsweise Traumata, Tumore, Infektionen oder beeinträchtigte Knochenregeneration (z. B. bei Osteonekrose oder Pseudarthrosen (Non-Unions)), weshalb zur Rekonstruktion großer Knochendefekte Knochentransplantate oder Knochenersatzstoffe benötigt werden (Kheirallah und Almeshaly 2016). Durch die gestiegene Lebenserwartung und zunehmend alternde Weltbevölkerung kommt es zudem zu einem deutlichen Anstieg muskuloskelettaler Erkrankungen wie Osteoporose, Knocheninfektionen oder -metastasen sowie Frakturen, weshalb die Anzahl knochenbezogener medizinischer Behandlungen zunimmt (Agarwal und García 2015).

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung an alternativen Knochenersatzstoffen und der kommerziellen Verfügbarkeit verschiedener Materialien stellen autologe Knochentransplantate immer noch den Goldstandard zur Versorgung knöcherner Defekte dar, da sie die für die Knochenregeneration erforderlichen Eigenschaften der Osteokonduktion, Osteoinduktion sowie Osteogenese aufweisen und den Knochen strukturell unterstützen (Bauer und Muschler 2000, Campana et al. 2014, Kheirallah und Almeshaly 2016, Wang und Yeung 2017). Osteokonduktivität bedeutet, dass das Knochenersatzmaterial aufgrund seiner Struktur und Oberflächenbeschaffenheit dem neugebildeten Knochen als Leitschiene dient. Osteoinduktive Stoffe stimulieren die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und somit die Knochenneubildung. Osteogenetische Materialien beinhalten lebende mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten und (Soldner und Herr 2001, Schieker et al. 2008). Trotz ihrer hervorragenden biologischen Wertigkeit weisen Autografte jedoch auch einige Nachteile wie eine hohe Morbiditätsrate (z. B. persistierende Schmerzen oder Infektionen) und Limitationen in verfügbarer Menge, Größe und Form auf (Rentsch et al. 2012).

Inzwischen wurden zahlreiche alternative Knochenersatzmaterialien, wie z. B. Polymere, Biogläser oder Keramiken, entwickelt, die kommerziell verfügbar sind und klinisch verwendet werden (Schnürer et al. 2003, Rentsch et al. 2012). Unter den Keramiken haben sich besonders die Calciumphosphate (CaPs) etabliert, da sie in ihrer chemischen Zusammensetzung dem im Knochen vorkommenden Apatit sehr ähnlich sind (Schnürer et al. 2003). CaPs sind biokompatibel, biodegradierbar, bioaktiv, osteokonduktiv und teilweise sogar osteoinduktiv (LeGeros 2008). Eine zunehmende Bedeutung als Knochenersatzstoff erhalten auch Calciumphosphat-Zemente (CPCs). Nach Mischung eines feinen Pulvers eines oder mehrerer CaP(s) und einer wässrigen Lösung entsteht eine zähflüssige, formbare Paste, die direkt in den Knochendefekt eingebracht wird, sich dort der Form des Knochens sehr gut anpasst und zu einer festen Masse aushärtet (Dorozhkin 2008). Knochenersatzstoffe aus CaP haben jedoch den Nachteil, dass sie meist nur unzureichende mechanische Eigenschaften aufweisen und relativ langsam und oft nur unvollständig degradieren, was zu Gewebeentzündungen und schlechter Integration in den umgebenden Knochen führen kann (Dorozhkin 2013a, Ostrowski et al. 2016).

Als Alternative zu den CPCs werden zunehmend auch Magnesiumphosphat-Zemente (MPCs) erforscht (Ostrowski et al. 2016). Magnesium spielt nachweislich eine bedeutende Rolle bei der Erhöhung der Knochendichte, der Kalzifizierung und dem Mineralstoffwechsel. *In vitro* zeigten Osteoblasten auf MPCs eine höhere Proliferation und zelluläre Aktivität als auf CPCs (Ostrowski et al. 2016). MPCs weisen zudem eine höhere mechanische Festigkeit, eine höhere Löslichkeit und ein höheres Abbaupotential *in vivo* auf als CPCs (Mestres und Ginebra 2011, Ostrowski et al. 2016, Nabiyouni et al. 2018, Haque und Chen 2020). Da die Anzahl an Veröffentlichungen zu MPCs bisher jedoch begrenzt ist, liegt es nahe die sehr gut erforschten und klinisch erprobten CPCs mit den vielversprechenden MPCs zu kombinieren, um mit Calcium-Magnesium-Phosphat-Zementen (CMPCs) Knochenersatzstoffe mit noch besseren biologischen und mechanischen Eigenschaften zu generieren (Ostrowski et al. 2016). CMPCs in Form von Pasten, Granulaten und vorgehärteten Implantaten wiesen in mehreren *In-Vivo*-Studien stets eine gute Biokompatibilität, rasche Degradation und Osseointegration sowie einen sukzessiven Ersatz der Materialien durch neugebildeten Knochen auf (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Zeng et al. 2012b, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021). Durch Mischung bzw. Behandlung mit einer reaktiven Lösung verändern sich die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Zemente. CMPC Pasten und Granulate, bei welchen durch Reaktion mit Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP) Struvit ausgefällt wurde, zeigten *in vivo* bereits aussichtsreiche Ergebnisse (Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021). Durch Reaktion mit einer sauren Phosphatlösung hingegen kommt es zur Ausfällung von Newberyit und Bruschit (Klammert et al. 2010b, Klammert et al. 2011, Gefel et al. 2022). Newberyit ist als Knochenersatzstoff bisher jedoch wenig erforscht und es ist zum jetzigen Zeitpunkt keine zugängliche Literatur zur Nachbehandlung von CMPCs mit Phosphorsäure (PA) und der *In-Vivo*-Untersuchung von Newberyit-basierten CMPCs verfügbar.

Eine eher neue und vielversprechende Technik zur Herstellung von Knochenersatzstoffen stellt der 3D-Pulverdruck dar. Basierend auf medizinischen Bildgebungsdaten (z. B. Computertomographie (CT)) oder Computer Aided Design (CAD)-Modellen können mit diesem Verfahren patientenspezifische Implantate passgenau produziert und optimal in den Defekt integriert werden (Peters et al. 2006, Vorndran et al. 2008). Aufgrund der hohen dreidimensionalen Druckgenauigkeit können formstabile, dreidimensionale Knochenersatzstoffe mit spezifisch einstellbarer Festkörpergeometrie und innerer Struktur individuell und präzise an den Defekt angepasst werden (Brunello et al. 2016, Zhang et al. 2019). Ausgangsstoffe stellen pulverförmige mineralische CPCs oder MPCs dar (Klammert et al. 2010c, Castilho et al. 2014b). Der 3D-Pulverdruck basierend auf CMPCs wurde in der zugänglichen Literatur noch nicht beschrieben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige *In-Vivo*-Untersuchung 3D-pulvergedruckter CMPC Scaffolds. In zwei aufeinander aufbauenden Studien wurden Scaffolds aus dem keramischen Zementpulver Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO₄)₂ ohne Nachbehandlung (Mg225) sowie mit Nachbehandlung durch Auslagerung in DAHP (Mg225d) oder Infiltration mit PA (Mg225p) hinsichtlich des Einflusses der Nachbehandlung auf die Biokompatibilität, Degradation und Osseointegration der Scaffolds im Kaninchenmodell vergleichend untersucht. Zudem sollte ermittelt werden, ob Mg225, Mg225d und Mg225p geeignete Eigenschaften für weitere Untersuchungen im gewichtstragenden Knochen aufweisen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Knochen

Das Knochengewebe ist aufgrund seiner spezifischen Architektur und Zusammensetzung nach dem Zahngewebe die härteste Substanz des Körpers (Salomon et al. 2008). Es erfüllt im Organismus die Aufgaben der Stützung und Bewegung des Körpers sowie des Schutzes der Weichteile und des zentralen Nervensystems. Es hat als Mineralstoffspeicher von Calcium und Phosphat eine wichtige Stoffwechselfunktion und enthält zudem blutbildende Organe (König und Liebich 2012). Das Knochengewebe wird lebenslang permanent umgebaut (*bone remodeling*) und kann sich so an wechselnde Belastungen anpassen sowie traumatische oder krankheitsbedingte Verletzungen beheben (Soldner und Herr 2001).

1.1. Biochemie und Zellen des Knochengewebes

Das Knochengewebe setzt sich aus Zellen sowie extrazellulärer Matrix zusammen. Es besteht zu ca. 8 % aus Wasser und zu ca. 92 % aus Trockensubstanz. Zwei Drittel der Trockensubstanz werden von Mineralien gebildet, wobei das calcium- und phosphathaltige Hydroxylapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) den Hauptbestandteil darstellt. Ein Drittel der Trockensubstanz besteht aus organischer Matrix, die sich überwiegend (90 %) aus Typ-I-Kollagen und zu einem geringen Teil (10 %) aus nicht-kollagenen Proteinen (Syntheseproteine von Osteoblasten, Plasmaproteine) zusammensetzt (von Engelhardt et al. 2015).

Knochenbildungszellen (Osteoblasten) sind für die Knochenbildung Die verantwortlich und an sämtlichen Wachstums- und Umbauvorgängen beteiligt (Salomon et al. 2008). Sie entstehen aus mesenchymalen Stammzellen, synthetisieren Kollagen und bereiten durch Synthese der alkalischen Phosphatase die Mineralisation vor. Im adulten Skelett befinden sich die meisten Osteoblasten in einem Ruhezustand (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Die Knochenzellen (Osteozyten) entstehen durch die Einmauerung von Osteoblasten in die Knochengrundsubstanz. Sie sind von der Knochenmatrix eingeschlossen und liegen in knöchernen Hohlräumen (Lakunen). Osteozyten stehen über Zytoplasmafortsätze in Knochenkanälchen miteinander in Verbindung, dienen der Erhaltung der Knochenmatrix und spielen eine Rolle bei der Calciumhomöostase (Salomon et al. 2008). Sie stellen 95 % der Knochenzellen im ausgewachsenen Skelett dar und leben Jahre bis zu Jahrzehnte lang (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Die knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten) sind mit Blutzellen verwandte mehrkernige Riesenzellen, die wahrscheinlich aus der gleichen Stammzelle wie Makrophagen und Monozyten entstehen (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Sie befinden sich meist in kleinen Knochenvertiefungen, den sogenannten Howship-Lakunen. Durch Abgabe von H⁺-Ionen erzeugen sie ein saures Milieu, wodurch die Calcium-Verbindungen in den Mineralien der Grundsubstanz gelöst werden. Mittels lysosomaler Enzyme wird die organische Grundsubstanz des Knochens zerlegt und die Matrix-Fragmente schließlich mittels Endozytose abgebaut (Salomon et al. 2008, Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

1.2. Ossifikation

Bei der Knochenbildung können die desmale/direkte und die chondrale/indirekte Ossifikation unterschieden werden. Der durch desmale Ossifikation gebildete Knochen wird auch als Bindegewebsknochen bezeichnet und entsteht direkt aus undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen (Salomon et al. 2008). Die Osteoblasten bilden während der Ossifikation eine unverkalkte Knochenmatrix (Osteoid) aus Typ-I-Kollagen und einem kleinen Anteil an Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Knochenproteinen und lagern sich in diese ein. Durch Mineralisierung kommt es innerhalb von acht bis zehn Tagen zur Bildung der verkalkten Knochengrundsubstanz bzw. Knochenmatrix (Ossein) und der Umwandlung der Osteoblasten zu Osteozyten. Hierbei werden anorganische Knochenbestandteile wie Calciumphosphat (85 - 90%), Calciumcarbonat, Magnesiumfluorid und Calciumfluorid in das Osteoid eingelagert (König und Liebich 2012). Bei der chondralen Ossifikation wird zuerst eine Vorstufe aus hyalinem Knorpel gebildet, die anschließend wieder abgebaut und durch den sogenannten Ersatzknochen ersetzt wird (Salomon et al. 2008). Die Verknöcherung beginnt in der Wachstumszone eines Röhrenknochens (Epiphysenfuge) von innen (enchondrale Ossifikation), am Schaft langer Röhrenknochen erfolgt die Verknöcherung von außen, indem sich eine Knochenhülse anfangs um die Schaftmitte bildet (perichondrale Ossifikation), die sich dann nach proximal und distal bis zu den Knochenenden ausdehnt (Salomon et al. 2008, König und Liebich 2012). Bei beiden Ossifikationsformen entsteht zuerst Geflechtoder Faserknochen, der sich unter mechanischer Belastung in Lamellenknochen umwandelt (Salomon et al. 2008). Während die Kollagenfasern der Knochenmatrix, Blutgefäße und Osteozyten in dem Geflechtknochen unregelmäßig angeordnet sind, weist der Lamellenknochen einen lamellären Aufbau mit geordneter Faserausrichtung sowie aufgrund des höheren Mineralisierungsgrades eine höhere mechanische Festigkeit und geringere Plastizität auf als der Geflechtknochen (Salomon et al. 2008).

1.3. Aufbau des Röhrenknochens

Röhrenknochen setzen sich zusammen aus dem Mittelstück oder Schaft (Diaphyse) und den beiden Endstücken (*Epiphysen*). Die Diaphyse besteht aus der mit gelbem Fettmark gefüllten Markhöhle (Cavum medullare) und dem umgebenden stabilen Knochenmantel (Substantia compacta) aus dichten Knochenlamellen. Die Epiphysen beinhalten ein dichtes Netzwerk feiner Knochenbälkchen (Substantia spongiosa), die von einer dünnen Knochenrinde (Substantia corticalis) umschlossen werden (Nickel et al. 2003). Die Knochentrabekel der Spongiosa werden in ihrer Ausrichtung und Dicke an die von außen wirkenden Druck- und Zugspannungen angepasst. Zwischen den Trabekeln befindet sich das blutbildende rote Knochenmark (König und Liebich 2012). Außen werden die Kompakta und die Kortikalis von einer bindegewebigen Hülle, der äußeren Knochenhaut (Periost), überzogen, die bei dem Knochenwachstum, der Frakturheilung sowie der Blutversorgung eine wichtige Rolle spielt. Die Markhöhle und die Knochenbälkchen der Spongiosa werden von einer inneren Hüllschicht (Endost) aus osteogenen Zellen ausgekleidet bzw. überzogen. Beispiele für Röhrenknochen sind die Knochen der Extremitäten wie der Oberarmknochen (Humerus) oder der Oberschenkelknochen (Femur) (Salomon et al. 2008, König und Liebich 2012).

1.4. Knochenumbau

Der Knochenumbau wird unterschieden in die Mechanismen "Modeling" (Umgestaltung) und "Remodeling" (Materialaustausch). Beim Modeling arbeiten Osteoklasten und Osteoblasten an verschiedenen Stellen des Knochens unabhängig voneinander (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Es handelt sich um einen dynamischen Adaptionsvorgang, bei dem immer eine makroskopische oder mikroskopische Formveränderung des Knochens auftritt (von Engelhardt et al. 2015). Modeling kann beim Ersatz von Geflecht- zu Lamellenknochen, der Frakturheilung, der funktionellen Anpassung der Spongiosa und Kompakta an veränderte mechanische Belastungssituationen sowie in der Wachstumsphase des Skeletts beobachtet werden (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Das Remodeling hingegen ist ein zyklisch ablaufender, kontinuierlicher Erneuerungsmechanismus des Knochens (von Engelhardt et al. 2015). Es findet durch die räumliche und zeitliche Zusammenarbeit von Osteoklasten und Osteoblasten in Bautrupps (*basic mutlticellular units*, *BMUs*) statt und dient dem Austausch alter Knochenmatrix, der Reparatur von Mikroschäden sowie der schnellen Verfügbarkeit von Calcium. Optimalerweise kommt es hierbei weder zum Materialzugewinn noch –verlust. Durch den Matrixabbau der Osteoklasten entstehen an den Trabekeln Resorptionslakunen (Howship-Lakunen) und in der Kompakta Bohrkanäle (Resorptionskanäle), in denen Osteoblasten anschließend neue Knochenlamellen bilden (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

1.5. Heilung von Frakturen und knöchernen Defekten

Bei der Frakturheilung unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Frakturheilung. Die primäre Frakturheilung findet ohne Kallusbildung statt und erfordert eine absolute mechanische Stabilität der Fraktur durch Osteosynthese sowie einen direkten Kontakt der Knochenenden mit minimaler Frakturspaltgröße (Wildemann 2005, Salomon et al. 2008, Hak et al. 2014). Durch das direkte Aussprossen von Blutgefäßen und das Wachstum von Osteonen aus den Bruchflächen heraus kommt es zur knöchernen Überbrückung des Frakturspalts und dem direkten Zusammenwachsen der Frakturenden (Soldner und Herr 2001, Wildemann 2005). Die sekundäre oder natürliche Frakturheilung findet stets beim Vorhandensein eines größeren Frakturspalts bzw. bei ungenügender mechanischer Fixation statt, beinhaltet die Bildung von Frakturkallus und stellt die im klinischen Alltag vorwiegend auftretende Heilungsform dar (z. B. bei nicht-chirurgischer Behandlung einer Fraktur mit einem Gipsverband oder chirurgischer Frakturversorgung mit einem Marknagel) (Wildemann 2005, Bohndorf et al. 2006, Hak et al. 2014). Nachdem das primär auftretende Frakturhämatom bindegewebig ersetzt wurde kommt es zur Bildung von faserknorpeligem Kallus (Knorpelkallus) durch Periost und Endost. Dieser mineralisiert und wird anschließend wieder (Knochenkallus) Geflechtknochen abgebaut und durch ersetzt. Der Geflechtknochen wird abschließend durch Lamellenknochen ersetzt, während sich der Knochenkallus zurückbildet (Salomon et al. 2008).

Der dauerhafte, belastungsstabile Defektverschluss, die möglichst schnelle und anatomisch korrekte Wiederherstellung des Knochens in Länge und Achse sowie Gelenkfunktionen die Gewährleistung von stellen das Ziel jeder Knochendefektbehandlung dar (Schieker und Mutschler 2006, Voggenreiter 2009). Anders als bei Reparationsvorgängen vieler anderer Gewebe des Körpers erfolgt ungestörte Knochenheilung nicht durch Ausbildung eines relativ die undifferenzierten Narbengewebes, sondern durch weitgehende Restitutio ad integrum des Knochengewebes (Koehler und Galanski 1999, Voggenreiter 2009).

Bei struktureller Wiederherstellung eines frakturierten Knochens durch erfolgreiche Knochenregeneration spricht man von einer "Union" (Marsh 1998). Die Heilung wird als abgeschlossen angesehen, wenn der Knochen erneut seine normale Belastbarkeit und Festigkeit erreicht hat, sodass mechanische Last wieder ungehindert übertragen werden kann und bei Belastung oder Palpation keine Schmerzen auftreten (Koehler und Galanski 1999, Voggenreiter 2009, Hak et al. 2014). Trotz bedeutender Fortschritte in der Versorgung von Knochenfrakturen treten bei 5 - 10 % aller Knochenbrüche Frakturheilungsstörungen auf (Raschke und Gasch 2012, Haffner-Luntzer und Ignatius 2019). Ursachen hierfür können z. B. Infektionen, zu geringe Durchblutung des Frakturgebiets, mangelnde Frakturstabilisierung, ungünstige Fragmentreposition, Begleitverletzungen und -erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, Osteoporose) oder ein hohes Alter sein (Raschke und Gasch 2012, Haffner-Luntzer und Ignatius 2019). Von einer spricht über Frakturheilungsstörung man, wenn den physiologischen Heilungszeitraum hinaus eine unzureichende Verknöcherung der Fraktur besteht (Raschke und Gasch 2012). Eine verzögerte Frakturheilung (Delayed-Union) liegt vor, wenn ein Knochenbruch eine Zeitspanne zwischen vier und sechs Monaten zur Konsolidierung benötigt (Haffner-Luntzer und Ignatius 2019). Ist nach mehr als sechs Monaten noch keine vollständige Heilung der Fraktur eingetreten spricht man von fehlender oder inkompletter Frakturheilung (Pseudarthrose, Non-Union) (Voggenreiter 2009, Raschke und Gasch 2012, Haffner-Luntzer und Ignatius 2019). Knochendefekte treten jedoch nicht nur bei Frakturheilungsstörungen, sondern auch in vielen anderen klinischen Situationen auf. Mögliche andere Ursachen können beispielsweise Sturzfrakturen bei Osteoporosepatienten, hochgradige offene Frakturen mit Knochenverlust, hochenergetische Traumen, Schuss- oder Explosionsverletzungen, eine Resektion von Knochenabschnitten aufgrund von Tumoren oder angeborenen Fehlbildungen, ein Knochendebridement erfordernde Infektionen oder kieferchirurgische Operationen sein (Schieker und Mutschler 2006, Schieker et al. 2008, Schemitsch 2017). Es gibt keine Standarddefinition für einen Knochendefekt kritischer Größe (*critical size defect, CSD*). Im Allgemeinen wird jedoch eine intraosseäre Wunde, die trotz operativer Stabilisierung nicht spontan heilt, als Defekt kritischer Größe angesehen (Schmitz und Hollinger 1986, Hollinger und Kleinschmidt 1990, Schemitsch 2017). Beim körpereigenen Versuch der Defektreparatur von CSDs kommt es zur Bildung von fibrösem Bindegewebe anstelle von Knochen, weshalb CSDs eine geplante chirurgische Rekonstruktion erfordern (Hollinger und Kleinschmidt 1990, Schemitsch 2017). Die Behandlung von CSDs stellt eine orthopädische Herausforderung dar und erfordert den Einsatz von Materialien, die den Defekt auffüllen, den Heilungsprozess des Knochens fördern, die Struktur wiederherstellen und den Knochen stabilisieren sollen (Schieker et al. 2008, Roddy et al. 2018).

2. Knochenersatz

Knochenersatzstoffe werden zur Rekonstruktion großer Knochendefekte, welche aufgrund von beispielsweise Tumoren, Infektionen, kongenitalen Defekten, Traumata oder Frakturheilungsstörungen entstehen, benötigt und werden ebenfalls verwendet, wenn die Regenerationsfähigkeit des Knochens zum Beispiel aufgrund von Osteoporose oder Nekrose beeinträchtigt ist (Kheirallah und Almeshaly 2016). Knochenersatzmaterialien können natürlichen (Knochentransplantate) oder synthetischen Ursprungs (alloplastische Knochenersatzmaterialien) sein.

2.1. Knochentransplantate

Natürliche Knochenersatzstoffe werden unterteilt in Autografte, Allografte und Xenografte. Bei autologen Transplantaten wird einem Menschen an einer Körperstelle, z. B. dem Beckenkamm, dem Wadenbein oder den Rippen, Knochen entnommen und ihm an eine andere Knochenstelle transplantiert. Allografte stellen Transplantate dar, bei denen der transplantierte Knochen von einem anderen Individuum als dem Empfänger stammt. Hierbei kann das Knochengewebe von lebenden oder toten Spendern entnommen worden sein. Bei xenogenen Transplantaten ist das Knochengewebe nicht menschlichen Ursprungs, sondern wird beispielsweise von Rindern oder Schweinen entnommen (Campana et al. 2014). Natürliche Knochenersatzstoffe haben jedoch trotz ihrer biomechanischen Stabilität sowie ihrer osteogenen, osteokonduktiven und osteoinduktiven Aktivität zahlreiche Nachteile wie eine begrenzte Verfügbarkeit und die Gefahr von Komplikationen durch das Setzen eines zusätzlichen Traumas (Autografte) sowie die Abstoßung des transplantierten Materials und mögliche Krankheitsübertragung (Allografte, Xenografte) (Soldner und Herr 2001, Campana et al. 2014).

2.2. Alloplastische Knochenersatzmaterialien

Alloplastische Knochenersatzmaterialien sind synthetischen Ursprungs und sollen temporär den körpereigenen Knochen ersetzen, dabei ähnliche mechanische Eigenschaften (Druckfestigkeit, Steifigkeit) wie der zu ersetzende Knochen aufweisen, die Knochenneubildung fördern und gleichzeitig mit lediglich minimaler fibrotischer Reaktion kontinuierlich und vollständig degradieren (Moore et al. 2001, Soldner und Herr 2001, Kolk et al. 2012). Hierfür muss das für den Knochenersatz verwendete Biomaterial geeignete morphologische, biomechanische, toxikologische und chemische Eigenschaften aufweisen (Kheirallah und Almeshaly 2016). Es sollte zudem frei verfügbar, kostengünstig in der Herstellung, sterilisierbar und lagerfähig sowie an einen Defekt anpassbar sein (Lüthkehermölle et al. 2008).

2.2.1. Bioaktive Gläser

Bioaktive Gläser wurden erstmals von Hench et al. (1971) entwickelt. Es handelt sich hierbei um amorphe kompakte, poröse oder pulverförmige Materialien auf der Basis von sauren Oxiden (z. B. Phosphorpentoxid, Siliziumdioxid) und Alkalien wie Calciumoxid, Magnesiumoxid oder Zinkoxid. Die Herstellung von Biogläsern erfolgt durch Mischen der gemahlenen Ausgangssubstanzen und deren mehrstündiger Schmelzung bei ca. 1500 °C. Das so entstandene Glas stellt ein dreidimensionales Phosphoroxid-Siliziumoxid-Netzwerk dar, an das sich die Metallionen der basischen Oxide anlagern. Die Bioaktivität der Oberfläche des Glases ermöglicht das Anwachsen von Knochengewebe (Schnürer et al. 2003, Kolk et al. 2012). Durch Ionenaustauschreaktionen mit dem umgebenden Milieu kommt es unmittelbar nach der Implantation zur Bildung von Hydroxyl-Carbonat-Apatit (HCA) auf der Glasoberfläche, was eine starke mechanische Bindung zwischen Glas und Knochen bewirkt (Schnürer et al. 2003, Hu und Zhong 2009, Kolk et al. 2012). Bioglas erwies sich als Knochenersatz in

verschiedenen *In-vivo-* sowie klinischen Studien als biokompatibel, osteokonduktiv und vollständig resorbierbar (Nandi et al. 2010). Aufgrund ihrer geringen mechanischen Festigkeit und hohen Rissanfälligkeit ist der klinische Einsatz von Biogläsern jedoch limitiert (Rentsch et al. 2012). Sie eignen sich nicht für gewichtstragende Defekte und werden daher vor allem in der rekonstruktiven Gesichtschirurgie, bei der Operationen gutartiger Tumore oder zur Versorgung anderer kleinerer Knochendefekte verwendet (Gerhardt und Boccaccini 2010, Nandi et al. 2010, Ribas et al. 2019).

2.2.2. Polymere

Die für Nahtmaterialien (z. B. PDS II[®], Monocryl[®] (Hersteller: Ethicon), Monosyn[®] oder Novosyn[®] (Hersteller: B. Braun SE)) vielfach klinisch verwendeten bioresorbierbaren Polymere werden in Form von Schrauben, Stiften, Platten oder porösen Scaffolds auch als Knochenersatzmaterialien eingesetzt (Gogolewski 2000, Schnürer et al. 2003). Die Basissubstanzen für die Knochenersatzstoffe stellen aliphatische Polyester wie Polyglycolid, Poly-L-lactid und Poly-D,L-lactid oder Copolymere aus diesen dar, die durch Polykondensation von Glykolsäure bzw. Milchsäure aus den entsprechenden Monomeren Glycolid bzw. Lactid hergestellt werden (Schnürer et al. 2003). Beim Abbau in vivo entstehen durch hydrolytische Spaltung wieder die monomeren Säuren Milchsäure und Glykolsäure, die anschließend zu Kohlendioxid und Wasser zerfallen (Gogolewski 2000). Die Degradationsgeschwindigkeit lässt sich zu einem gewissen Grad durch die Porosität und chemische Zusammensetzung steuern, da Polyglycolide schneller abgebaut werden als Polylactide. Polymere haben jedoch den Nachteil, dass sie bei der Hydrolyse rasch an Festigkeit verlieren und die Freisetzung der Säuren eine lokale pH-Wert Senkung zur Folge hat, was Immunund Fremdkörperreaktionen auslösen kann. Die klinische Anwendung der Polymere als Knochenersatzmaterial ist daher bisher limitiert (Gogolewski 2000, Schnürer et al. 2003, Schieker et al. 2008). Polymere sind zudem nicht röntgendicht und können nur mit einer MRT-Untersuchung nachgewiesen werden. Komposite aus Polylactiden oder Polyglycoliden, die mit Calciumphosphaten gefüllt sind, weisen die ursprünglichen Eigenschaften der Polymere auf. Der Calciumphosphat-Anteil verbessert jedoch die Biointegrierbarkeit und mechanische Festigkeit. Durch die Röntgenopazität des Calciumphosphats zersetzen sich diese Komposite zudem zu röntgendichten Partikeln (Schnürer et al. 2003, Kolk et al. 2012).

2.2.3. Calciumphosphat-Keramiken

Die meisten bioaktiven und bioresorbierbaren Keramiken, die für die Knochenregeneration verwendet werden, basieren auf Calciumphosphaten (CaPs) (Pawelec und Planell 2018). Erstmals vor ca. 100 Jahren entwickelt und in vivo untersucht erlangten CaP-Keramiken in den 1980er Jahren eine Bedeutung als Knochenersatzmaterial (Albee 1920, LeGeros 2002, Schnürer et al. 2003). CaP-Keramiken bestehen aus Calciumhydroxylapatiten und ähneln in ihrer chemischen Zusammensetzung der mineralischen Phase von kalzifiziertem Gewebe wie z. B. Knochen (LeGeros 2008, Wang und Yeung 2017). Die Herstellung von CaP-Keramiken erfolgt, indem in einem Sinterungsprozess unter Anwendung von hohem Druck und Temperaturen von 1000 - 1500 °C die pulverförmigen Ausgangsstoffe keramisiert werden (Schnürer et al. 2003). CaP-Keramiken zeigten in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Studien eine sehr gute Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit, Bioaktivität sowie hervorragende Osteokonduktivität (LeGeros 2008). Sie sind heute ausführlich klinisch erprobt und in Form von porösen sowie nicht-porösen Festkörpern und Granulaten kommerziell erhältlich (Dorozhkin 2013a, Wang und Yeung 2017). Das Ca/P-Verhältnis sowie die Kristall- und Porenstruktur der Keramiken haben einen entscheidenden Einfluss auf die Absorptionsrate und die mechanischen Eigenschaften und somit auf die Eignung als Knochenersatzmaterial (Wang und Yeung 2017). Die meisten CaP-Keramiken sind in ihren mechanischen Eigenschaften ähnlich wie spongiöser Knochen. Sie eignen sich trotz initial teilweise akzeptablen Druckfestigkeiten (bis zu über 100 MPa) nicht für gewichtstragende Defekte, da die Druckfestigkeit nach der Implantation rasch abnimmt, sie spröde sind und lediglich eine geringe Bruchund Schlagfestigkeit sowie relativ geringe Zugfestigkeit aufweisen (Jarcho 1981, LeGeros 2008, Zwingenberger et al. 2012, Dorozhkin 2013a). Die für den Knochenersatz am häufigsten verwendeten CaP-Materialien sind Hydroxylapatit $Ca_{10}(PO_4)_6)(OH)_2),$ Tricalciumphosphat (TCP, (HA, $Ca_3(PO_4)_2$ sowie mehrphasige Formulierungen aus erstgenannten (Dorozhkin 2013a).

HA-Keramiken sind der mineralischen Phase des Knochens, welche hauptsächlich aus HA-Kristallen besteht, in der chemischen Zusammensetzung sehr ähnlich. Die hervorragenden osteokonduktiven sowie osteoinduktiven Eigenschaften von Knochenersatzstoffen aus HA sind daher nicht überraschend (Schnürer et al. 2003, Wang und Yeung 2017). HA weist jedoch ein relativ hohes Ca/P-Verhältnis von 1,67 auf und degradiert nach der Implantation nur sehr langsam oder gar nicht (Schnürer et al. 2003, Rentsch et al. 2012). Es dient dem Knochen lediglich als Leitschiene, wobei die keramischen Implantate meist nur im Randbereich durch osteokonduktive Prozesse in den Knochen integriert werden (Rentsch et al. 2012). HA wird an Stellen mit geringer mechanischer Belastung sowie als Beschichtung auf Implantaten eingesetzt, wodurch diese eine verbesserte Osseointegration und längere Lebensdauer zeigen (Rentsch et al. 2012, Wang und Yeung 2017).

TCP-Keramiken kommen in α - oder β -kristalliner Form vor (Hochtemperaturform α -TCP, Tieftemperaturform β -TCP) (Rentsch et al. 2012). Vor allem β -TCP wurde seit der ersten Erwähnung durch Albee im Jahre 1920 in zahlreichen Studien erforscht und vielfach klinisch eingesetzt (Dorozhkin 2013a). TCP weist ein Ca/P-Verhältnis von 1,5 und eine höhere biologische Abbaugeschwindigkeit auf als HA. Es unterliegt im Gegensatz zu HA chemischen Lösungsprozessen, die zur Degradation von TCP führen (Schnürer et al. 2003, Nandi et al. 2010, Carrodeguas und De Aza 2011). Die In-vivo-Degradation von TCP erfolgt zusätzlich zur Auflösung durch zellulären Abbau durch Osteoklasten und mononukleäre Phagozytose (Nandi et al. 2010, Rentsch et al. 2012). Die kristalline Form α -TCP weist *in vivo* eine höhere Löslichkeit und höhere Bioresobierbarkeit auf als β-TCP (Carrodeguas und De Aza 2011, Heinemann et al. 2011). Obwohl beide kristallinen Formen von TCP vollständig degradieren, eine gute biologische Verträglichkeit und osteokonduktive, teilweise sogar osteoinduktive Eigenschaften aufweisen, kann die vollständige Auflösung bei gleichzeitiger Wiederherstellung des Knochengewebes Monate bis Jahre dauern und ist schlecht vorhersehbar (Kolk et al. 2012, Wang und Yeung 2017, Bohner et al. 2020). So wurden beispielsweise 86 Wochen nach Implantation von α - und β -TCP Granulaten in Minischweinen von beiden Temperaturformen noch Partikel nachgewiesen, die in neugebildete Knochentrabekel integriert waren (Wiltfang et al. 2002). Die Verwendung von Knochenersatzmaterialien aus TCP in lasttragenden Anwendungen wird wegen ihrer geringen Festigkeit kritisch gesehen (Heinemann et al. 2011). TCP wird häufig als Füllmaterial für Knochendefekte, die aufgrund von Traumata oder gutartigen Tumoren entstanden sind, verwendet (Wang und Yeung 2017).

2.2.4. Calciumphosphat-Zemente

Die bioaktiven und degradierbaren Calciumphosphat-Zemente (CPCs) wurden von Brown und Chow (1985) in den 1980er Jahren entwickelt. Es handelt sich hierbei

um Mehrkomponentensysteme, die aus einer oder Pulverkomponente(n) und einer wässrigen Lösung bestehen (Schnürer et al. 2003). Die Abbindereaktion kann durch eine Säure-Base-Reaktion oder Hydrolyse eines metastabilen CaP in wässriger Lösung erfolgen. Einen Ausgangsstoff für die Hydrolyse stellt z. B. a-TCP dar, während die gebräuchlichsten Komponenten für die Säure-Base-Reaktion β -TCP oder Tetracalciumphosphat (Ca₄(PO₄)₂O) (basisch) und Monocalciumphosphat-Monohydrat ($Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$) oder wasserfreies Dicalciumphosphat (CaHPO₄) (sauer) sind (Dorozhkin 2008, Lodoso-Torrecilla et al. 2021). Durch die Mischung des trockenen Pulvers mit der wässrigen Lösung bildet sich eine applizierbare, zähflüssige Paste. Aufgrund chemischer Reaktionen lösen sich die Kristalle des bzw. der Ausgangs-CaP(s) schnell auf und es kommt zur Ausfällung und Verzahnung von Kristallen neu entstandener CaP-Verbindungen, wodurch die Paste in situ aushärtet (Schnürer et al. 2003, Dorozhkin 2008). Trotz der großen Anzahl an Formulierungen können alle CPCs je nach pH-Wert der Paste während der Abbindereaktion in die Stoffgruppen Apatit-Zemente (pH > 6) und Bruschit-Zemente (pH < 6) eingeteilt werden. Das Endprodukt der Abbindereaktion bei Apatit-Zementen stellt ausgefälltes HA und/oder Calcium-defizitäres HA (CDHA) dar, bei Bruschit-Zementen bildet sich Bruschit (CaHPO₄ · 2 H₂O) (Bohner 2000, Dorozhkin 2008). Da der Umsatz der Ausgangsstoffe meist nicht vollständig ist stellt das Fällungsprodukt oft eine Mischung aus den Ausgangssubstanzen und dem Sedimentationsprodukt dar (Schnürer et al. 2003). Beide Zementstoffgruppen weisen eine exzellente Biokompatibilität und Osteokonduktivität auf, degradieren jedoch nur sehr langsam und unvollständig über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren (Ambard und Mueninghoff 2006, Dorozhkin 2008). Da Bruschit-Zemente anders als Apatit-Zemente nicht nur zellulär abgebaut werden, sondern auch einer chemischen Auflösung unterliegen, degradieren sie schneller als Apatit-Zemente (Bohner 2000). Teilweise wird Bruschit in vivo jedoch zu HA umgewandelt, was die Resorptionsrate der Bruschit-Zemente verringert (Constantz et al. 1998), allerdings durch die Umwandlung von Bruschit in wasserfreies Monetit (CaHPO₄) infolge einer Hitzebehandlung der Zemente verhindert werden kann (Klammert et al. 2011, Sheikh et al. 2015b). Die breitere klinische Anwendung der CPCs wird jedoch durch ihre ungenügenden mechanischen Eigenschaften limitiert. CPCs sind spröde und weisen trotz hoher Druckfestigkeiten (60 bis 83 MPa) nur eine niedrige Zugfestigkeit (10 bis 16 MPa) auf (Bohner 2000, Ambard und Mueninghoff 2006).

16

Sie können daher nur in gering oder nicht-belasteten Knochendefekten oder in Kombination mit einer stabilisierenden Osteosynthese angewendet werden (Bohner 2000, Rentsch et al. 2012).

2.2.5. Magnesiumphosphat-Zemente

Magnesiumphosphat-Zemente (MPCs) werden seit den 1990er Jahren zunehmend als Alternative zu den CPCs untersucht. Die für die Herstellung benötigten Komponenten Keramik und Phosphatsalz können beide in Pulverform vorliegen, wobei die Säure-Base-Reaktion nach Zugabe von Wasser erfolgt, oder der Zement kann aus einem Keramikpulver und einem reagierenden Salz, welches in wässriger Lösung vorliegt, gebildet werden. Typische Ausgangsstoffe sind Keramikpulver aus Magnesiumoxid (MgO) oder Farringtonit (Mg₃(PO₄)₂), die mit einer Phosphatsalzlösung wie Phosphorsäure (PA, H₃PO₄), Dinatriumhydrogenphosphat Diammoniumhydrogenphosphat $(Na_2HPO_4),$ (DAHP, $(NH_4)_2HPO_4)$ oder Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄) reagieren (Ostrowski et al. 2016, Nabiyouni et al. 2018). Der Abbindemechanismus von MPCs beruht ähnlich wie bei CPCs auf einer kontinuierlichen Auflösungs- und Fällungsreaktion der Ausgangssubstanzen und Abbindeprodukte, wodurch typischerweise Newberyit (MgHPO₄ · 3H₂O), Struvit (MgNH₄PO₄ · 6H₂O) oder amorphe Produkte mit nicht umgesetzten Ausgangsstoffen entstehen (Vorndran et al. 2011a, Ostrowski et al. 2016). MPCs sind biokompatibel und weisen in vivo eine höhere Löslichkeit, eine schnellere zelluläre Infiltration und ein höheres Abbaupotential auf als CPCs (Ostrowski et al. 2016, Nabiyouni et al. 2018, Haque und Chen 2020). In der Literatur wurde eine passive Resorption durch chemisch-physikalische Auflösung in Magnesium- und Phosphat-Ionen beschrieben (Großardt et al. 2010, Klammert et al. 2011, Kim et al. 2016, Gefel et al. 2022). Auch wenn bei In-vitro-Studien nur eine geringe bzw. keine Beteiligung von Osteoklasten am Materialabbau von MPCs festgestellt wurde (Großardt et al. 2010, Gefel et al. 2022), konnten in verschiedenen In-vivo-Studien Osteoklasten am Implantationsort von MPCs nachgewiesen werden, sodass eine aktive zelluläre Resorption in vivo ebenfalls denkbar ist (Zeng et al. 2012a, Kim et al. 2016, Kanter et al. 2018, Kaiser et al. 2022). MPCs sind zudem osteoinduktiv und zeigen ein stärkeres An- und Einwachsen von Knochen als CPCs, da Magnesium die Osteoblastenproliferation und -differenzierung fördert und deren Aktivität steigert, während dosisabhängig die Osteoklastenbildung gehemmt wird (Wu et al. 2015, He et al. 2016, Ostrowski et al. 2016, Nabiyouni et al. 2018). Im Vergleich zu CPCs weisen MPCs aufgrund ihrer höheren primären Druckfestigkeit (bis 85 MPa) etwas bessere mechanische Eigenschaften auf (Ostrowski et al. 2016). Sie sind jedoch wie alle Keramiken spröde und weisen eine niedrige Zug- und Torsionsfestigkeit auf. Durch die rasche Degradation *in vivo* verschlechtern sich die mechanischen Eigenschaften zudem schnell. Es wird daher erwartet, dass MPCs, ähnlich wie CPCs, klinisch größtenteils nur in gering oder nicht-gewichtstragenden Knochendefekten eingesetzt werden können (Yu et al. 2010, Ostrowski et al. 2016).

2.2.6. Calcium-Magnesium-Phosphat-Zemente

Da die biomedizinische Anwendung der MPCs im Vergleich zu den CPCs bisher noch wenig erforscht ist, liegt es nahe die MPCs mit ihren besseren biologischen und mechanischen Eigenschaften mit den klinisch erprobten CPCs zu Calcium-Magnesium-Phosphat-Zementen (CMPCs) zu kombinieren (Ostrowski et al. 2016, Nabiyouni et al. 2018). Erstmals wurde die Herstellung von CMPCs von Ginebra et al. (1994) beschrieben. Die Kombination kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Zum einen können die CPC und MPC Rohpulver (2 – 4 Komponenten) nach der jeweiligen Sinterung und Mahlung zu einem gewissen Grad gemischt werden, sodass durch Zugabe von Wasser eine Zementpaste gebildet wird (Wu et al. 2008b, Jia et al. 2010, Nabiyouni et al. 2018). Aufgrund unterschiedlicher Partikelgrößen der Zementpulver kann es hierbei jedoch zu einer möglichen Entmischung kommen (Bengel 2019). Zum anderen können die Ca-haltigen Verbindungen vor der Sinterung zu den Mg-haltigen Verbindungen hinzugefügt werden, sodass ein Ca- und Mg-haltiger Sinterkuchen entsteht, welcher zu einem einzigen Ausgangspulver zermahlen wird (Nabiyouni et al. 2018). Derartige CMPC Pulver mit der allgemeinen Formel $Ca_xMg_{(3-x)}(PO_4)_2$ (0 < x < 3) können durch Erhitzen von Mischungen aus Monetit (CaHPO₄), Calciumcarbonat (CaCO₃), Magnesiumhydroxid (Mg(OH)₂) und Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat (MgHPO₄ · 3H₂O) in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen hergestellt werden. Während ein niedriger Ca-Gehalt vorrangig zur Ausbildung von Farringtonit (Mg₃(PO₄)₂) führt, bestehen die gesinterten Pulver mit zunehmendem Ca-Gehalt vermehrt auch aus Stanfieldit (Ca₄Mg₅(PO₄)₆) (Vorndran et al. 2011a). Die Zementabbindereaktion erfolgt anschließend durch Reaktion mit z. B. Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP, (NH₄)₂HPO₄), Zitronensäure (C₆H₈O₇) oder Phosphorsäure (PA, H₃PO₄), wodurch sich je nach verwendeter Lösung die Abbindeprodukte Newberyit, Struvit und/oder Bruschit ausbilden (Klammert et al.

2010b, Vorndran et al. 2011a). In bisherigen *In-vitro-* und *In-vivo-*Studien hat sich gezeigt, dass die CMPCs ihren Einzelkomponenten in verschiedener Hinsicht oft überlegen sind (Wu et al. 2008a, Wu et al. 2008b, Jia et al. 2010, Wei et al. 2010, Vorndran et al. 2011a, Zeng et al. 2012a, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021).

In vitro konnte eine signifikant schnellere Gewichtsabnahme und Degradation der CMPCs im Vergleich zu den CPCs beobachtet werden, wobei mit steigendem Magnesium-Anteil die Degradationsgeschwindigkeit zunahm (Jia et al. 2010). Bei der Kultivierung von Osteoblasten der Zelllinie MG63 auf CMPCs wiesen diese eine gute Zytokompatibilität auf und es konnte auf den CMPCs eine signifikant höhere Zellwachstums- und Proliferationsrate der MG63-Zellen beobachtet werden als auf CPCs oder MPCs (Wu et al. 2008b, Jia et al. 2010, Vorndran et al. 2011a). Eine signifikant höhere alkalische Phosphatase-Aktivität der MG63-Zellen auf CMPCs als auf CPCs deutet darauf hin, dass CMPCs die Zelldifferenzierung erleichtern (Jia et al. 2010). Zudem konnten mit CMPCs (Wu et al. 2008b).

Bei der Untersuchung von CMPCs *in vivo* wurde in verschiedenen Studien eine hervorragende Biokompatibilität ohne Anzeichen für Fremdkörperreaktionen, Entzündungen oder Nekrosen beobachtet. Die CMPCs zeigten rasch eine vollständige Osseointegration, eine schnelle und sukzessive Degradation sowie einen simultanen Ersatz der Materialien durch neugebildeten Knochen (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021). Die Degradation der CMPCs lief schneller und umfangreicher ab als bei den CPCs (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Fuchs et al. 2021). Es wurde zudem nachgewiesen, dass bei den CMPCs eine schnellere und effektivere Osteoneogenese stattfand als bei CPCs oder MPCs (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Zeng et al. 2012b).

3. Applikationsformen von Knochenersatzzementen

3.1. Pasten

Seit einigen Jahren wird an der Herstellung und Optimierung von keramischen Knochenersatzstoffen in der Applikationsform einer *in situ* selbsthärtenden Zementpaste geforscht. CPCs in Form von selbsthärtenden Zementpasten werden bereits seit Jahren stetig verbessert, haben sich klinisch bei zahnmedizinischen und orthopädischen Behandlungen bewährt und sind kommerziell erhältlich (Bohner et

al. 2005, Dorozhkin 2008, Dorozhkin 2013b, O'Neill et al. 2017, Lodoso-Torrecilla et al. 2021). Auch MPCs wurden in Form von Zementpasten in *In-vitro*-Studien und *in vivo* im Kaninchen- und Schafmodell untersucht und sind inzwischen kommerziell erhältlich (Mestres und Ginebra 2011, Kanter et al. 2014, Ostrowski et al. 2016, Kanter et al. 2018, Roller et al. 2018, Kaiser et al. 2022). Zu den relativ neuen, pastenförmigen CMPCs wurden zum jetzigen Zeitpunkt *In-vitro*-Studien sowie *In-vivo*-Studien im Kaninchenmodell publiziert (Ginebra et al. 1994, Wu et al. 2008a, Jia et al. 2010, Vorndran et al. 2011a, Ewald et al. 2019).

Für die *In-vivo*-Anwendung müssen die Zementpasten die Eigenschaften Injektionsfähigkeit und Kohäsion aufweisen (Bohner 2000, Lodoso-Torrecilla et al. 2021). Injektionsfähigkeit bedeutet, dass die Paste durch eine Spritze, mit oder ohne Nadel, unter einer bestimmten Druckbelastung ohne Entmischung vollständig extrudiert werden kann. Wenn die lösliche Phase im Vergleich zur Größe der Pulverpartikel zu flüssig ist, kommt es aufgrund einer Filterpressung zum Homogenitätsverlust und zur Applikation der Flüssigkeit ohne Partikel. Kohäsion ist die Eigenschaft der Paste, die bestimmt ob der Zement in der Flüssigkeit aushärten kann ohne sich zu zersetzen (Bohner 2000, Lodoso-Torrecilla et al. 2021). Bei schlechter Kohäsion, wie es teilweise bei CPCs beschrieben wurde, kann es möglicherweise zum Austritt von Zementpartikeln in Blutgefäße, zur Blutgerinnung und zur Bildung einer potentiell tödlichen Zementembolie kommen (Bernards et al. 2004, Krebs et al. 2007). Durch eine hohe Viskosität des Zements sowie die Verringerung der Partikelgröße des Zementpulvers kann eine gute Kohäsion erreicht werden (Bohner 2000, Lodoso-Torrecilla et al. 2021).

Der bedeutendste Vorteil von selbsthärtenden Zementpasten ist ihre ausgezeichnete Formbarkeit, wodurch sie passgenau an jeden beliebigen Knochendefekt angepasst werden können. Bei der anschließenden Aushärtung *in situ* kommt es durch Verzahnung der ausgefallenen Kristalle zur Bildung eines stabilen Formkörpers und zur Defektstabilisierung (Heinemann et al. 2011, Dorozhkin 2013b). Im Vergleich zu Granulaten oder Blöcken sind Pasten daher in der Handhabung vielseitiger (Dorozhkin 2013b). Die Auffüllung von unregelmäßig geformten Defekten in metaphysärem oder spongiösem Knochen stellt eine typische Indikation für den Einsatz von Pasten aus CPC dar (Heinemann et al. 2011). Zur Frakturstabilisation oder Füllung von Knochendefekten ist sogar eine perkutane chirurgische Applikation von Zementpasten möglich (O'Neill et al. 2017). Diese Applikationsform hat jedoch den Nachteil, dass die Pasten am Implantationsort für einige Minuten aushärten müssen (Kanter et al. 2018, Ewald et al. 2019). Die Abbindezeit der Pasten ist ein kritischer Aspekt: Sie muss langsam genug sein um dem Chirurgen das Anmischen, die Applikation und die Anpassung der Paste zu ermöglichen, jedoch auch schnell genug erfolgen um die Operationsdauer nicht unnötig zu verlängern. Zudem muss die Paste rasch die erforderliche Festigkeit zur mechanischen Unterstützung des Defekts erreichen (Ostrowski et al. 2016). Ein weiterer Nachteil von Pasten ist das Fehlen von Makroporen. Die Porengröße der Mikroporen der meisten Zementpasten liegt bei ca. 1 µm, weshalb Knochen und Gewebe nicht zügig von außen einwachsen können und der Zement lediglich schichtweise von außen nach innen abgebaut werden kann (Bohner 2000). Ein bedeutendes Problem bei der Anwendung von Pasten ist außerdem das Auftreten einer Phasentrennung während der Injektion, was zu einem reduzierten Zementanteil und höheren Flüssigkeitsanteil des Extrudats und damit zur Abnahme der Viskosität, Verlängerung der Abbindezeit, Verringerung der Kohäsion und Abnahme der mechanischen Festigkeit führt. CPCs weisen leider oft eine relativ schlechte Injizierbarkeit auf, weshalb die klinische Anwendung von Zementpasten in der orthopädischen Chirurgie beschränkt ist (O'Neill et al. 2017).

In verschiedenen *In-vivo*-Studien zu CPCs, MPCs oder CMPCs wurden die Zementpasten vor der Implantation in beispielsweise zylindrische Formen aus Edelstahl oder Silikongummi eingebracht. Nach der Aushärtung in den Formen bei einer bestimmten Temperatur können die Pasten bereits als formstabile, dreidimensionale Festkörper in den Defekt implantiert werden (Bodde et al. 2007, Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Yu et al. 2010, Klammert et al. 2011).

3.2. Granulate

Der Begriff Granulation beschreibt in der pharmazeutischen Industrie den Vorgang des Zusammenfügens von Pulverpartikeln zu größeren Einheiten, den Granulaten. Dazu bedarf es eines Bindemittels, welches für den Zusammenhalt des Pulvers sorgt. Während pharmazeutische Granulate üblicherweise zwischen 0,2 und 4 mm groß sind, werden für die orthopädische Chirurgie 1 bis 2 mm große, für die Parodontalchirurgie 0,25 bis 1 mm große Granulate verwendet (Tas 2008).

Granulate auf Basis von HA, ß-TCP oder biphasischen Mischungen aus erstgenannten sind kommerziell erhältlich und werden häufig als Knochenersatzmaterial in der Parodontalchirurgie verwendet, z. B. als Füllmaterial nach Zahnextraktionen oder zum Knochenaufbau bei einem Sinuslift (Verdickung des knöchernen Bodens der Kieferhöhle) (Moseke et al. 2012, Fuchs et al. 2021). Zur Herstellung und *In-vitro-* sowie *In-vivo-*Untersuchung von Granulaten auf Basis von MPCs und CMPCs wurden inzwischen ebenfalls einige Studien publiziert (Zeng et al. 2012a, Christel et al. 2014, Fuchs et al. 2021).

Granulate auf Basis einer Zementpaste werden meist durch mechanische Zerkleinerung von ausgehärteten Zementblöcken hergestellt und können anschließend durch Sieben in verschiedene Granulatgrößen klassiert werden. Sie haben aufgrund ihrer Herstellungstechnik jedoch oft eine unregelmäßige Form und sind scharfkantig, was zu Gewebereizungen, Perforationen oder Entzündungen an der Implantationsstelle führen kann (Moseke et al. 2012, Fuchs et al. 2021).

Andere Ansätze zur Herstellung von Granulaten basieren auf der Mischung von entweder einer wässrigen Suspension aus einer Gelatine- oder Chitosan-Lösung und einem ausgefällten Zementpulver oder eines hydrophilen flüssigen Zementleims mit einer hydrophoben Flüssigkeit (z. B. Öl). Durch kontinuierliches Rühren der dicken Suspension bzw. Dispersion entstehen unter Zugabe eines Tensids ausgehärtete Granulatkugeln im Mikrometerbereich (Paul und Sharma 1999, Komlev et al. 2002, Tas 2008, Moseke et al. 2012, Christel et al. 2014). Ein wesentlicher Vorteil dieser alternativen Herstellungsmethoden ist, dass die Granulate kugelförmig sind, was zu einer schnelleren Heilung *in vivo* führt (Christel et al. 2014). Bei der Applikation des Granulats zusammen mit einer gelbildenden und nach der Injektion aushärtenden Natrium-Alginat-Lösung mit einer Spritze und einer großlumigen Kanüle wurde zudem aufgrund der kugelförmigen Granulatmorphologie eine verbesserte Injektionsfähigkeit festgestellt (Oliveira et al. 2008, Christel et al. 2014).

Granuläre Knochenersatzmaterialien können für unregelmäßige, komplizierte und schwer zugängliche Defekte verwendet werden und zusammen mit einer Flüssigkeit (z. B. Blut) sogar minimalinvasiv appliziert werden. Sie können mit dem Knochendefekt jedoch oftmals nicht in vollständigen und starken Kontakt gebracht werden, was sich nachteilig auf die erfolgreiche und vollständige Knochenregeneration auswirkt (Peters et al. 2006, Lodoso-Torrecilla et al. 2021). Da Granulate von der Implantationsstelle zu driften drohen, ist es nötig, dass sie lokal mehrseitig von Knochen oder zumindest einer Membran für die
Knochenaugmentation umgeben sind (Heinemann et al. 2011, Fuchs et al. 2021). Granulate weisen zudem eine geringe anfängliche mechanische Stabilität auf und können nicht in gewichtstragende Defektsituationen implantiert werden (Fuchs et al. 2021).

3.3. 3D-pulvergedruckte Scaffolds

Zur Herstellung von dreidimensionalen, formstabilen Knochenersatzstoffen werden derzeit verschiedene additive Fertigungsverfahren untersucht, die weitgehend auch als 3D-Druckverfahren bezeichnet werden, und mit welchen durch schichtweise Materialauftragung unterschiedlichste Festkörper produziert werden können (Castilho et al. 2014a, Roseti et al. 2017). Der 3D-Druck wurde Ende der 1980er Jahre entwickelt und zählt zu den Rapid Prototyping (RP) Technologien. Die verwendeten Materialien können pulverförmig, flüssig oder fest sein (Roseti et al. 2017, Wen et al. 2017). Der 3D-Pulverdruck, eine Variante des 3D-Drucks, zählt zu den direkten RP-Verfahren zur Herstellung von Biokeramiken (Vorndran et al. 2008). Hierbei binden organische oder anorganische Bindemittel die pulverförmigen Keramikpartikel lokal durch Polymerverklebung oder eine chemische Zementabbindereaktion, wodurch schichtweise ein dreidimensionaler Festkörper (Scaffold) hergestellt wird (Vorndran et al. 2008, Castilho et al. 2014b).

Der 3D-Pulverdruck auf Basis von keramischen Zementpulvern stellt ein vielversprechendes, einfaches und kosteneffizientes Verfahren mit großem Potential, insbesondere für die präzise Herstellung von individuellen Knochenersatzstoffen zur Rekonstruktion geometrisch komplex geformter und/oder großer Knochendefekte, dar (Klammert et al. 2009, Castilho et al. 2014b, Roseti et al. 2017, Zhang et al. 2019). Auf der Grundlage von medizinischen Bildgebungsdaten (z. B. Computertomographie (CT)) oder Computer Aided Design (CAD)-Modellen können die Knochenersatzstoffe patientenspezifisch angefertigt werden. Der Hauptvorteil der Technik des 3D-Pulverdrucks besteht darin, dass durch die hohe dreidimensionale Druckgenauigkeit formstabile, dreidimensionale Scaffolds mit individuell einstellbarer Form und Struktur optimal passgenau hergestellt werden können (Brunello et al. 2016, Zhang et al. 2019).

Die Verwendung patientenspezifischer, passgenau produzierter Scaffolds ermöglicht eine optimale Integration des Scaffolds in den Defekt und damit einen vollständigen und direkten Kontakt mit dem umgebenden Knochen, was für die erfolgreiche, vollständige Knochenregeneration erforderlich ist (Peters et al. 2006, Vorndran et al. 2008, Klammert et al. 2009, Castilho et al. 2014a, Castilho et al. 2014b, Brunello et al. 2016, Roseti et al. 2017, Zhang et al. 2019). 3D-pulvergedruckte Scaffolds stellen komplexe biomedizinische Gerüste mit mechanischer Stabilität dar, deren äußere Geometrie und innere Struktur auf Makro- und Mikroebene präzise kontrollierbar und spezifisch einstellbar ist (Castilho et al. 2014, Zhang et al. 2019). Die frei regulierbare Festkörpergeometrie und die im Bereich von wenigen 100 µm variabel auf die Defektsituation abstimmbare Makroporosität erlauben eine ideale Einstellung der Scaffoldeigenschaften (Form, biologisches Verhalten, mechanische Stabilität) und damit die größtmögliche Anpassung an die zu ersetzende Gewebeart, was in vivo eine optimale Zellreaktion ermöglicht (Castilho et al. 2014b, Zhang et al. 2019). Aufgrund von Hohlräumen zwischen den Pulverpartikeln weisen die Scaffolds zudem eine hohe Mikroporosität (bis zu über 30 Vol.-%) auf, die sich positiv auf die Vaskularisierung des Scaffolds, das Einwachsen von Zellen sowie die Diffusion von Nährstoffen auswirkt (Boyan et al. 1996, Karageorgiou und Kaplan 2005, Castilho et al. 2014b). Da der 3D-Pulverdruck bei Raumtemperatur durchgeführt wird, ist die Verarbeitung thermosensibler Zusatzstoffe wie z. B. bioaktiver Substanzen sowie deren räumliche Verteilung innerhalb des Scaffoldvolumens möglich (Klammert et al. 2010c).

Die patientenspezifische Herstellung von 3D-pulvergedruckten Scaffolds erfordert jedoch eine gewisse Vorlaufzeit, da der Knochendefekt zuerst mittels CT untersucht werden muss und die Einzelbilder mit einer Bildbearbeitungssoftware in ein 3D-Defektmodell umgewandelt werden müssen. Anschließend wird das Scaffoldmodell dem Defekt entsprechend generiert und das Scaffold schließlich gedruckt. Die Auflösung des 3D-Pulverdruckers sowie die Genauigkeit der Umwandlung des Knochendefekts in ein Modell bestimmen dabei maßgeblich über den anfänglichen Scaffold-Knochen-Kontakt (Lodoso-Torrecilla et al. 2021). Für geplante Operationen, z. B. bei Defekten aufgrund von Knochentumoren oder Knochenzysten, ist diese Technik jedoch hervorragend geeignet (Peters et al. 2006). 3D-pulvergedruckte Knochenersatzstoffe können im Gegensatz zu Pasten oder Granulaten jedoch nicht minimalinvasiv appliziert werden.

Ausgangsstoffe stellen pulverförmige mineralische Knochenzemente, wie zum Beispiel CPCs oder MPCs, dar (Klammert et al. 2010c, Castilho et al. 2014b, Gefel

et al. 2022). Zu 3D-pulvergedruckten CPC Scaffolds wurden bereits zahlreiche *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien mit umfangreichen Daten veröffentlicht, welche von einer guten Biokompatibilität, einem geeigneten biologischen Abbauverhalten sowie osteokonduktiven und sogar osteoinduktiven Eigenschaften und damit der Eignung als Knochenersatzmaterial berichten (Gbureck et al. 2007, Habibovic et al. 2008, Klammert et al. 2010a, Castilho et al. 2014a, Inzana et al. 2014, Vorndran et al. 2015). Auch zu 3D-pulvergedruckten MPC Scaffolds sind bereits Studien publiziert, in welchen eine hohen Dimensionsgenauigkeit, gute mechanische Eigenschaften, hohe *In-vitro*-Löslichkeit und geeignete Zytokompatibilität für Osteoblasten beschrieben wurden (Klammert et al. 2010c, Vorndran et al. 2011b, Meininger et al. 2019, Gefel et al. 2022).

4. Untersuchungsmethoden von Knochenersatzmaterialien

4.1. Mikro-Computertomographische Untersuchung

Die Technologie der Mikro-Computertomographie (μ CT) wurde erstmals Ende der 1980er Jahre von Feldkamp et al. (1989) beschrieben und kann als Weiterentwicklung der Computertomographie (CT) betrachtet werden, weist jedoch auch einige Unterschiede zu dieser auf. Während Ganzkörper-Spiral-CT-Geräte eine maximale isotrope Ortsauflösung von 0,25 – 2,0 mm aufweisen können mit μ CT-Geräten isotrope Ortsauflösungen von 1 – 50 μ m erreicht werden (Engelke et al. 1999, Naegele 2005). In der präklinischen *In-vivo*-Forschung wird die μ CT-Untersuchung in der kardiothorakalen und abdominalen Bildgebung sowie zur Beurteilung von zerebralen, vaskulären oder knöchernen Strukturen eingesetzt (Bag et al. 2010). Von Firmen wie Scanco Medical oder Bruker Corporation sind inzwischen mehrere μ CT-Geräte für *In-vivo*-Untersuchungen kommerziell erhältlich, weshalb in den letzten 20 Jahren ein starker Anstieg an Publikationen zur *In-vivo*-Bildgebung mittels μ CT beobachtet wurde (Bag et al. 2010).

Die µCT-Untersuchung stellt eine geeignete Methode zur Visualisierung und Quantifizierung trabekulärer Knochenmorphologie und -mikroarchitektur dar, deren Genauigkeit von der Ortsauflösung des verwendeten Gerätes abhängt (Ibrahim et al. 2014). Sie erlaubt die großflächige Beurteilung der Knochenstruktur in drei Dimensionen (Ma et al. 2020). In einer zuvor festgelegten Region of Interest (ROI) können nach der Bestimmung eines geeigneten Thresholds, der die knöchernen Strukturen physiologisch und anatomisch möglichst akkurat wiedergibt, verschiedene Parameter wie zum Beispiel Knochenvolumen (BV), Knochenoberfläche (BS), Trabekelanzahl (Tb.N), Trabekeldicke (Tb.Th) oder Trabekelabstand (Tb.Sp) gemessen werden (Bouxsein et al. 2010). Da es sich um eine zerstörungsfreie, wiederholbare Methode handelt, kann sie für die In-vivo-Verlaufskontrolle von Knochenveränderungen bei kleineren Labortieren eingesetzt werden und ermöglicht zudem die ergänzende histologische oder mechanische Untersuchung gescannter Proben (Rüegsegger et al. 1996, Engelke et al. 1999, Bouxsein et al. 2010). Da im µCT jedoch nur mineralisierter Knochen detektiert wird, der Begriff Knochen jedoch definitionsgemäß sowohl die mineralisierte als auch die nicht-mineralisierte Matrix (Osteoid) umfasst, ist zu bedenken, dass die µCT-basierte Untersuchung von Knochenstrukturparametern mit einem großen Fehler behaftet sein kann, wenn die Knochenmineralisierung beeinträchtigt ist (Ma et al. 2020). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die µCT-Untersuchung zur Beurteilung der Osteoneogenese, Osseointegration und In-vivo-Degradation von resorbierbaren Knochenersatzmaterialien geeignet ist (von der Höh et al. 2009, Hampp et al. 2013, Angrisani et al. 2016, Kanter et al. 2018, Kleer et al. 2019, Sarkar et al. 2019, Augustin et al. 2020, Golafshan et al. 2020, Vidal et al. 2020).

4.2. Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung unter einem Lichtmikroskop stellt eine wichtige Methode zur Untersuchung der Degradation und Osseointegration von Knochenersatzstoffen sowie der Gewebereaktion und damit Biokompatibilität auf zellulärer Ebene dar (Jansen et al. 1994, Lindner et al. 2020). Hierfür müssen entnommene Gewebeproben zuerst beispielsweise durch Einbringen in eine wässrige Formaldehydlösung (4 - 10 %) fixiert werden um einen möglichst natürlichen Zustand der Zellstruktur zu erhalten. Nach geeigneter Einwirkdauer wird das Fixiermittel durch Wässerung der Proben oder mittels Pufferlösungen ausgewaschen. Anschließend erfolgt die Dehydrierung durch Überführung der Proben in eine Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration. Intermedien wie beispielsweise Xylol, die mit Alkohol sowie dem Einbettungsmedium mischbar sind, werden eingesetzt um den Alkohol aus dem Gewebe zu drängen, bevor die Probe in das Einbettungsmedium überführt wird (Sinowatz und Hees 2012). Histologische Knochenpräparate können aus entkalkten oder unentkalkten Proben hergestellt werden, wobei sich die Einbettmedien und Schneidetechniken unterscheiden (Lang 2012). Zur Entkalkung der Knochenproben können Säuren

(z. Β. Zitronensäure oder Ameisensäure) oder Chelatbildner Ethylendiamintetraacid (EDTA)) verwendet werden (Lang 2012). Da bei der Entkalkung die eingelagerten Mineralsalze vollständig herausgelöst werden, wird das Knochengewebe weicher und schneidbar (Mulisch und Welsch 2015). Nach der Einbettung in Paraffin, die in der Routinehistologie für die meisten Gewebetypen angewendet wird, können mit einem Schlitten- oder Rotationsmikrotom histologische Dünnschnitte der entkalkten Knochenproben unkompliziert hergestellt werden (Lang 2012, Mulisch und Welsch 2015). Sollen jedoch, z. B. zur Untersuchung von Knochenersatzstoffen sowie der Reaktion des Knochengewebes, sowohl die organischen als auch anorganischen Komponenten des Knochengewebes erhalten werden, werden die Proben nicht entkalkt, weshalb die Herstellung der histologischen Schnitte aufwändiger ist (Mulisch und Welsch 2015). Aufgrund der Härte des Knochengewebes ist keine Einbettung in Paraffin weshalb die Proben in Kunstharze möglich, (Methacrylate) wie Methylmethacrylate (MMA) oder Glycolmethacrylate (GMA) eingebettet werden, da diese Einbettmedien die benötigte Konsistenz und eine ähnliche Härte wie das Knochengewebe aufweisen (Lang 2012). Durch den Erhalt des Weichgewebes und der mineralisierten Knochenanteile weisen die kunstharzeingebetteten Präparate einen sehr hohen morphologischen Informationswert auf (Mulisch und Welsch 2015). Mit der Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath können von den eingebetteten Probenblöcken mit einer Diamantbandsäge Schnitte mit einer Dicke von 30 – 100 µm hergestellt werden, die mit einer Schleifmaschine zeitaufwändig zu 5 – 10 µm dünnen Dünnschliffen weiterverarbeitet werden können (Donath und Breuner 1982, Mulisch und Welsch 2015). Aufgrund der Dicke des Sägeblattes ist ein Materialverlust jedoch unvermeidlich (Mulisch und Welsch 2015). Mit Hartschnittmikrotomen können auch unentkalkten Knochenproben von histologische Dünnschnitte hergestellt werden. wobei sehr harte Knochenersatzstoffe hierbei beim Schneiden oft aus dem umgebenden Gewebe herausbrechen (Willbold und Witte 2010).

Zur Beurteilung der histologischen Schnitte stehen verschiedene Färbemethoden zur Verfügung. Die Toluidinblaufärbung ist eine einfach durchzuführende, gut standardisierbare Kernfärbung und eignet sich in der Knochenhistologie sehr gut als Übersichtsfärbung. Toluidinblau O wurde 1856 von William Perkin entdeckt und seitdem häufig als biologischer Farbstoff verwendet. Es handelt sich um einen kationischen (basischen) Thiazinfarbstoff, der in Wasser und Ethanol löslich ist und auf Substraten mit verfügbaren anionischen Radikalen Basophilie zeigt (Vidal und metachromatische Farbeffekte Mello 2019). Durch ermöglicht die Toluidinblaufärbung eine gute Differenzierung von verschiedenen Geweben. Metachromatische Färbung bedeutet, dass sich eine Struktur nicht in dem Farbton der verwendeten Färbung (d. h. orthochromatisch), sondern in einer anderen Farbe darstellt. So stellen sich bei der Toluidinblaufärbung Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume und Kollagenfasern orthochromatisch blau dar, während Wundheilungsareale Mastzellengranula, frühe oder Knorpelmatrix metachromatisch rotviolett und mineralisierte Hartgewebe ungefärbt bis blassblau erscheinen (Lang 2012, Mulisch und Welsch 2015). Die Toluidinblaufärbung ermöglicht daher eine sehr gute Darstellung zellulärer Details sowie die Unterscheidung zwischen mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Knochen (Osteoid). Sie wird häufig zur histomorphometrischen Messung von zellulären Parametern oder Osteoid sowie zur Beurteilung von nicht-mineralisiertem Skelettgewebe (z. B. Knorpel) verwendet (Ma et al. 2020).

Weitere Färbemethoden, die sich für die Knochenhistologie eignen, sind die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung, die Von-Kossa-Färbung oder die TRAP-Färbung (Lang 2012, Ma et al. 2020). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt die wichtigste histologische Färbung dar (Mulisch und Welsch 2015). Die rasch und einfach durchzuführende Übersichtsfärbung eignet sich zur Darstellung der vorhandenen Gewebe- und Zellarten. Es können z. B. morphologische Veränderungen durch Entzündungen oder Degeneration beurteilt werden. Zellkerne, Knorpelgrundsubstanz, Kalk und andere basophile Substanzen erscheinen blau, während das restliche Gewebe rot und Osteoid rosa gefärbt werden (Lang 2012, Mulisch und Welsch 2015). Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ist eine Trichromfärbung und stellt eine Standardfärbung für die Knochenmorphometrie dar, da neben der guten Zellfärbung mineralisierte und nicht-mineralisierte Knochenmatrix farblich gut abgegrenzt werden können (Gruber 1992, Lang 2012). Mineralisiertes Hartgewebe und Kollagen stellen sich bei dieser Färbung leuchtend grün dar, während sich Osteoid rot, Knorpel violett, Zytoplasma rötlich-braun und Zellkerne braun/blauschwarz anfärben (Gruber 1992, Lang 2012, Mulisch und Welsch 2015). Bei der Von-Kossa-Färbung handelt es sich um eine indirekte Färbemethode, bei der die Silber-Ionen der Färbelösung mit den Carbonat- und Phosphat-Ionen von kalzifiziertem Gewebe reagieren. Die Calcium-Ionen werden aus dem Gewebe verdrängt und die Silber-Ionen durch starke Lichteinwirkung zu metallischem Silber reduziert, sodass kalzifiziertes Gewebe schwarz erscheint (Lang 2012, Schneider 2021). Die Von-Kossa-Färbung ermöglicht daher eine klare Unterscheidung zwischen nicht-mineralisiertem und mineralisiertem Knochen und stellt die Standardfärbung für die Histomorphometrie der Spongiosa von Ratten oder Mäusen dar (Schenk et al. 1984, Ma et al. 2020). Nachteilig an dieser Färbemethode ist jedoch ihre geringe Spezifität (Schneider 2021). Da kalzifizierter Knorpel und mineralisierter Knochen einheitlich schwarz angefärbt werden, werden außerdem strukturelle Details, wie z. B. Remodeling-Einheiten oder Knochenlamellen, innerhalb der kalzifizierten Matrix nicht dargestellt (Schenk et al. 1984, Ma et al. 2020). Als Gegenfärbung kann die McNeal-Färbung angewandt werden (Ma et al. 2020). Die TRAP-Färbung gehört zu den enzym-histochemischen Färbungen. TRAP ist die Abkürzung für die Tartrat-resistente saure Phosphatase (tartrate resistant acid phosphatase), einem Enzym, dessen Aktivität als wichtiger zytochemischer Marker zur Identifizierung von Osteoklasten sowie deren Vorläuferzellen gilt (Ballanti et al. 1997). Die TRAP-Färbung eignet sich daher sehr gut zur Darstellung der Aktivität der Osteoklasten sowie des Ausmaßes der osteoklastischen Knochenresorption (Lang 2012). Während die Tartrat-resistente saure Phosphatase rötlich-pink angefärbt wird, stellt sich das umgebende Gewebe schwach graublau gefärbt oder ungefärbt dar, was eine einfache und genaue Zählung der Osteoklasten ermöglicht (Schäfer 2011, Ma et al. 2020).

Im Fokus der qualitativen histologischen Untersuchung steht meist die Beurteilung der Fremdkörperreaktion auf das Biomaterial, die nach der Implantation in vivo stets auftritt. Nach der Verletzung durch die Implantation kommt es im Wirtsgewebe zu Wechselwirkungen zwischen dem Biomaterial und dem Blut, einer provisorischen Matrixbildung, einer Entzündungs- und Wundheilungsreaktion mit und der Ausbildung von Granulationsgewebe Blutgefäßen, einer Fremdkörperreaktion und schließlich teilweise zur Entwicklung einer fibrösen Kapsel um die implantierten Materialien (Anderson et al. 2008, Sheikh et al. 2015a). Die chemischen und physikalischen Eigenschaften eines Biomaterials haben einen starken Einfluss auf die spezifischen Reaktionen auf das Biomaterial (Klopfleisch und Jung 2017). Die wichtigsten Zellen der Fremdkörperreaktion stellen Makrophagen dar, die teilweise zu Fremdkörperriesenzellen (FBGCs) fusionieren (Sheikh et al. 2015a). Je nach Partikelgröße der implantierten Biomaterialien unterliegen diese unterschiedlichen Abbaumechanismen. Kleinere Fragmente und Partikel mit weniger als 10 µm Durchmesser werden durch Makrophagen phagozytiert. Partikel zwischen 10 und 100 µm im Durchmesser werden von FBGCs abgebaut. Größere Partikel (Durchmesser über 100 µm) werden extrazellulär von Makrophagen und FBGCs durch die Freisetzung von Enzymen und/oder pH-Wert senkende Mechanismen beseitigt. Während bei abbaubaren Materialien jede begleitende Entzündung nach der vollständigen Makrophagen und FBGCs während der gesamten Lebensdauer des Implantats an dessen Oberfläche (Xia und Triffitt 2006, Sheikh et al. 2015a). Dies kann zu einer chronischen Entzündung führen, welche die Bildung einer fibrotischen, kollagenen Kapsel um das Biomaterial zur Folge hat (Klopfleisch und Jung 2017).

Histologische Schnitte können neben der qualitativen Untersuchung auch histomorphometrisch untersucht werden. Die Histomorphometrie des spongiösen Knochens stellt eine gut etablierte, inzwischen unverzichtbare Untersuchungsmethode dar, mit der es möglich ist quantitative Informationen über die Knochenstruktur, die Knochenmineralisierung und die Dynamik des Knochenumbaus zu erhalten (Ma et al. 2020). Sie wird in der Regel an nichtentkalkten Knochenschnitten durchgeführt (Kulak und Dempster 2010). An zweidimensionalen histologischen Schnitten können verschiedene Arten von Messungen vorgenommen werden und so Parameter wie Fläche, Länge, Abstand, oder Anzahl beurteilt werden (Parfitt et al. 1987). Inzwischen sind hierfür zahlreiche automatische Bildanalysen und Softwaresysteme vorhanden (Kulak und Dempster 2010, Egan et al. 2012, Zhang et al. 2016, van 't Hof et al. 2017, Malhan et al. 2018).

4.3. Analyse durch Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) stellt gegenwärtig die gebräuchlichste Methode zur Mikroanalyse und hochauflösenden Abbildung von Festkörperoberflächen dar (Wetzig 2000, Mulisch und Welsch 2015). Es können einzelne Zellen oder Organellen, pflanzliche und tierische Strukturen, aber auch Organ- und Gewebeteile oder ganze Tiere (z. B. Insekten) untersucht werden (Mulisch und Welsch 2015). Mit gängigen Geräten kann hierbei eine Auflösung im Nanometerbereich erreicht werden (Wetzig 2000). Für die REM Untersuchung im Hochvakuum müssen die Präparate in mehreren Schritten vorbereitet werden. Nach der Reinigung der Oberfläche werden die zu untersuchenden Strukturen stabilisiert und getrocknet (Wetzig 2000, Mulisch und Welsch 2015). Da eine elektrische Aufladung elektronisch nichtleitender Proben, wie beispielsweise Polymere oder Keramiken, durch den Primärelektronenstrahl zu unscharfen Bildern bzw. Kontrastverfälschungen führt, werden vor der REM-Analyse dünnste leitende Schichten von beispielsweise Kohlenstoff, Gold oder Platin, auf die Oberfläche der nichtleitenden Materialien aufgedampft oder aufgesputtert (Wetzig 2000, Mulisch und Welsch 2015). Nach der Vorbereitung der Proben wird ein stark gebündelter Primärelektronenstrahl auf die Oberfläche des Präparats gerichtet, woraufhin alle Punkte der Oberfläche Sekundärelektronen emittieren, die von Detektoren erfasst werden (Wetzig 2000, Sinowatz und Hees 2012). Je nach Stärke der Emission erscheinen die verschiedenen Stellen des Präparats in unterschiedlicher Helligkeit, wobei die Intensität vom Auftreffwinkel des Elektronenstrahls und damit dem Oberflächenprofil des Präparats abhängt. Aufgrund der hohen Tiefenschärfe des REM ist eine dreidimensionale Analyse der Präparatoberfläche möglich (Sinowatz und Hees 2012). Die **REM-Analyse** stellt in verschiedenen materialwissenschaftlichen Fachgebieten validierte eine Methode zur Oberflächenuntersuchung von kristallinen Materialien dar. Bei der Untersuchung von Knochenersatzstoffen wurde sie beispielsweise zur Charakterisierung der Oberflächenmorphologie von CaP Granulaten verwendet (Weibrich et al. 2000). Bei der REM-Analyse von Implantaten aus CPC und CMPC Pasten nach der Implantation in vivo wurden beim Vergleich mit den nativen Implantaten Veränderungen der keramischen Mikrostruktur nachgewiesen (Klammert et al. 2011). Andere Methoden der Oberflächenanalyse, die in der biomedizinischen Materialforschung Anwendung finden, sind z. B. die Rutherford-Rückstreu-Spektrometrie (RBS), die Rasterkraftmikroskopie (SFM), die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) oder die Rastertunnelmikroskopie (STM) (Strecker und Persch 1990, Ettl et al. 1996, Mayer 2003, Vickerman und Gilmore 2011).

Eine weitere Technik der Oberflächenanalyse, mit der die Elementzusammensetzung und -verteilung einer Probe genau analysiert werden kann, ist die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX). Durch Beschuss mit werden

einem Elektronenstrahl bestimmter Energie werden von den Atomen der Probe für jedes Element charakteristische Röntgenstrahlen erzeugt und ausgesendet, die detektiert werden und Aufschluss über die verschiedenen Elemente in der Probe geben (Scimeca et al. 2018). Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit (Elementkonzentrationen von mindestens 10 ppm bzw. 0,001 % können detektiert werden) wird die EDX-Analyse in verschiedensten biomedizinischen Bereichen eingesetzt (Scimeca et al. 2014, Scimeca et al. 2018, Migliorini et al. 2019). Es können zum Beispiel Arzneimittel auf das Vorhandensein von Nanopartikeln untersucht werden, die zur Verbesserung der therapeutischen Leistung zugesetzt wurden, Körpergewebe auf die Anreicherung von Schwermetallen untersucht oder in biologischem Gewebe akkumulierte Mineralien (z. B. Calcium) charakterisiert (Scimeca et al. 2018). Auch bei der Untersuchung von Umweltverschmutzungen wie dem Mineral Asbest wird die EDX-Analyse verwendet (Abd Mutalib et al. 2017, Scimeca et al. 2018). In der Forschung an wurde Knochenersatzmaterialien die EDX-Analyse beispielsweise zur Untersuchung der Osteoneogenese, Osseointegration und Materialdegradation von MPC Pasten oder CMPC Granulaten eingesetzt, indem das Auftreten bzw. der Gehalt von Mg-, Ca- und P-Ionen in den Implantatmaterialien und dem neugebildeten Knochen beurteilt wurde (Kanter et al. 2018, Fuchs et al. 2021, Kaiser et al. 2022). Golafshan et al. (2020) haben anhand der homogenen Verteilung von Calcium und Phosphor durch EDX-Analyse des neugebildeten Knochens nach Implantation von 3D-gedruckten MgP Scaffolds die Mineralisierung des neugebildeten Knochens nachgewiesen. Alternativ zur REM-Analyse wurde zur Untersuchung von kristallinen Veränderungen in Bruschit-Zementen nach Implantation im Schafmodell sowie zur Analyse des Mineralgehalts des neugebildeten Knochens die Raman-Mikrospektrometrie verwendet. Da die Raman-Mikrospektrometrie ein optisches Verfahren ist, werden an die Probenvorbereitung und -verarbeitung wesentlich geringere Anforderungen

gestellt. So muss die Probe weder mit einer leitenden Schicht versehen noch die

Untersuchung im Hochvakuum erfolgen. Aufgrund der optischen Analyse mit Licht

(Laser) ist die Auflösung jedoch auf etwa 1 µm begrenzt (Schmitt und Popp 2011).

Durch die Wechselwirkung des eingestrahlten Lichts mit dem zu untersuchenden

Material liefert die Raman-Mikrospektrometrie zudem lediglich Informationen

über die Moleküle und nicht über die Atome der untersuchten Probe, weshalb z. B.

eine Bestimmung des Ca/P-Verhältnisses nicht möglich ist (Penel et al. 1999).

III. PUBLIKATIONEN

1. Publikation I

Das Paper "In-Vivo Degradation Behavior and Osseointegration of 3D Powder-Printed Calcium Magnesium Phosphate Cement Scaffolds" von Kowalewicz et al. wurde am 10. Februar 2021 zur Publikation im Special Issue "Bone Regeneration Materials" des Journals Materials (Basel) akzeptiert und am 17. Februar 2021 online publiziert.

In-Vivo Degradation Behavior and Osseointegration of 3D Powder-Printed Calcium Magnesium Phosphate Cement Scaffolds

Katharina Kowalewicz, Elke Vorndran, Franziska Feichtner, Anja-Christina Waselau, Manuel Brueckner, Andrea Meyer-Lindenberg

Materials **2021**, *14*, 946 DOI: 10.3390/ma14040946



In-Vivo Degradation Behavior and Osseointegration of 3D Powder-Printed Calcium Magnesium Phosphate Cement Scaffolds

Katharina Kowalewicz¹, Elke Vorndran², Franziska Feichtner¹, Anja-Christina Waselau¹, Manuel Brueckner² and Andrea Meyer-Lindenberg^{1,*}

- ¹ Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig Maximilians University Munich, 80539 Munich, Germany; Katharina.Kowalewicz@chir.vetmed.uni-muenchen.de (K.K.); Franziska.Feichtner@chir.vetmed.uni-muenchen.de (F.F.); a.waselau@lmu.de (A.-C.W.)
- ² Department for Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, 97070 Würzburg, Germany; elke.vorndran@fmz.uni-wuerzburg.de (E.V.); manuel_brueckner@hotmail.de (M.B.)
- Correspondence: ameylin@lmu.de; Tel.: +49-89-2180-2628

check for **updates**

Citation: Kowalewicz, K.; Vorndran, E.; Feichtner, F.; Waselau, A.-C.; Brueckner, M.; Meyer-Lindenberg, A. In-Vivo Degradation Behavior and Osseointegration of 3D Powder-Printed Calcium Magnesium Phosphate Cement Scaffolds. *Materials* 2021, 14, 946. https://doi.org/10.3390/ ma14040946

Academic Editor: Bruno Chrcanovic

Received: 19 January 2021 Accepted: 10 February 2021 Published: 17 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). Abstract: Calcium magnesium phosphate cements (CMPCs) are promising bone substitutes and experience great interest in research. Therefore, in-vivo degradation behavior, osseointegration and biocompatibility of three-dimensional (3D) powder-printed CMPC scaffolds were investigated in the present study. The materials Mg225 ($Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO_4)_2$) and Mg225d (Mg225 treated with diammonium hydrogen phosphate (DAHP)) were implanted as cylindrical scaffolds (h = 5 mm, \emptyset = 3.8 mm) in both lateral femoral conducts in rabbits and compared with tricalcium phosphate (TCP). Treatment with DAHP results in the precipitation of struvite, thus reducing pore size and overall porosity and increasing pressure stability. Over 6 weeks, the scaffolds were evaluated clinically, radiologically, with Micro-Computed Tomography (µCT) and histological examinations. All scaffolds showed excellent biocompatibility. X-ray and in-vivo µCT examinations showed a volume decrease and increasing osseointegration over time. Structure loss and volume decrease were most evident in Mg225. Histologically, all scaffolds degraded centripetally and were completely traversed by new bone, in which the remaining scaffold material was embedded. While after 6 weeks, Mg225d and TCP were still visible as a network, only individual particles of Mg225 were present. Based on these results, Mg225 and Mg225d appear to be promising bone substitutes for various loading situations that should be investigated further.

Keywords: farringtonite; stanfieldite; 3D powder printing; scaffold; biocompatibility; degradable bone substitutes; osseointegration; in-vivo Micro-Computed Tomography

1. Introduction

The use of autologous, allogenic or xenogenic grafts is still the gold standard in the surgical treatment of critical size bone defects [1–3]. However, they cannot be used for every type of bone defect and involve various risks, such as trauma or infection at the donor site in the case of autografts [4,5], and the transmission of diseases or rejection of the implanted material in the case of allografts and xenografts [6,7]. Because of the many disadvantages of transplants, there has been intensive research in the field of synthetic bone substitutes in recent years [1,8]. The ideal synthetic replacement material is biocompatible and undergoes continuous resorption and, at the same time, is completely replaced by newly formed bone tissue [1,3]. The advantages of synthetic materials are not only their unlimited availability, but also their defined chemical composition and architecture, as well as the possibility to be manufactured to fit any bone defect [9].

Calcium phosphates (CaPs) have become established due to the similarity of their chemical composition to the mineral phase of bone, their excellent biocompatibility and



osteoconductive and sometimes even osteoinductive properties [10–14]. In 1920, Albee and Morrison reported the first in-vivo use of a CaP material for bone replacement [15]. Since the 1980s, primary CaPs such as ß-tricalcium phosphate (ß-TCP, Ca₃(PO₄)₂) [10] and hydroxyapatite (HA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) [16] have been commercially available as sintered solids, granules or powders, and since the 1990s, also as calcium phosphate cements (CPCs) [17,18]. CPCs are produced by mixing CaP powder with an aqueous solution and are successfully used as bone substitutes in the form of pastes in many fields of application today [19]. However, many CPCs, like most CaP bone substitutes, have the disadvantage of an incomplete and slow degradation from months to years under physiological conditions [20–23]. The broader clinical application of these cements is also limited by their mechanical properties, since CPCs are brittle, have only low impact strength and relatively low tensile strength [23,24].

In contrast to CPCs, magnesium phosphate cements (MPCs) degrade faster, while showing a more pronounced bone ingrowth due to their higher solubility, and are therefore classified as a suitable alternative bone replacement material [25,26]. Combinations of CPCs and MPCs or the combination of CPCs with magnesium (Mg²⁺) in the form of calcium magnesium phosphate cements (CMPCs) or granulates show even better biological properties than CPCs and MPCs alone, since the chemical solubility, osteoconductivity, degradation rate and resorption of CaPs are increased by the modification with Mg²⁺ ions [27–29]. The element Mg²⁺ plays a decisive role in bone metabolism and a lack of Mg²⁺ leads to the loss of trabecular bone mass and increased bone resorption by osteoclasts [30]. The successful use of CMPCs in bone healing has been described in the literature and it has been shown that pastes and pre-hardened cylinders of CMPCs are biocompatible, well-integrated into the surrounding bone and rapidly replaced by newly formed trabecular bone [27,31,32]. However, the use of self-setting cement pastes is limited, e.g., because they are applied into the defect in a viscous condition, have to harden for several minutes at the implant site [33–35] and are difficult to shape in some clinical situations [36]. Biocements, which can be produced using three-dimensional (3D) powder printing to form inherently stable, three-dimensional solids of defined shape, offer a more diverse range of possible applications. The variable external structure and macroporosity allow the framework properties to be optimally adjusted to a specific type of tissue that needs to be replaced [37]. 3D powder-printed scaffolds also have a high microporosity (over 30 vol%), which is created by empty spaces between the powder particles [37] and promotes the diffusion of nutrients, vascularization of the scaffold and ingrowth of cells [38,39]. In the past, research has been conducted on such customizable 3D powder-printed scaffolds made of CPCs [40] and MPCs [41]. The aim of the present study was to develop and investigate rapidly degradable CMPC scaffolds using 3D powder printing, as no in-vivo data could be found in the available literature. Two material groups were tested in vitro regarding the influence of a treatment with diammonium hydrogen phosphate (DAHP, (NH₄)₂HPO₄)) on phase composition, pore size and mechanical stability. In vivo, the scaffolds were observed and assessed regarding their degradation behavior and osseointegration in a non-weightbearing borehole defect in the cancellous part of the lateral femoral condyles in a rabbit model over a period of 6 weeks.

2. Materials and Methods

2.1. Production of the CMPC Scaffolds

Raw material for the development and production of the cylindrical scaffolds (h = 5.0 mm, \emptyset = 3.8 mm) was the ceramic cement powder Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂, which was produced by sintering (1100 °C, 5 h) 0.5 mol CaHPO₄ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), 0.25 mol CaCO₃ (Merck, Darmstadt, Germany), 1.5 mol MgHPO₄·3H₂O (Alfa Aesar, Kandel, Germany) and 0.75 mol Mg(OH)₂ (VWR, Darmstadt, Germany). Reference implants of the same dimensions were made of tricalcium phosphate (TCP, Ca₃(PO₄)₂) cement. Therefore, a 2:1 molar mixture of CaHPO₄ and CaCO₃ was sintered for 5 h at 1350 °C. After manual mechanical crushing of the sinter cakes (grain size approximately 20–30 µm), the powders

were homogeneously mixed with the polymeric binder hydroxypropylmethylcellulose (HPMC, 4 wt%, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) in a ploughshare mixer (M5R, Lödige, Paderborn, Germany). The scaffolds were then manufactured with a 3D powder printer (ZP310, ZCorp., Burlington, VT, USA) with a layer thickness of 100 μ m and a powder-to-liquid ratio of 0.275. The local contact of the HPMC with the printing fluid (degassed water) caused the polymer to swell and thus the ceramic particles to stick together. After drying for 1 h, the scaffolds were removed from the powder bed and freed from adhering powder by compressed air. Subsequently, a multi-stage sintering process with a final sintering temperature of 1100 °C for CMPC or 1350 °C for CPC (heating rate (HR) 1: 120 °C/h, temperature (T) 1: 500 °C, holding time (H) T1: 2 h, HR2: 300 °C/h, T2: 1100 °C/1350 °C, H T2: 4 h) was carried out to burn out the HPMC and compact the ceramic.

The CMPC scaffolds were divided into two material groups. One half of the scaffolds (Mg225) remained untreated after sintering, the other half (Mg225d) received a treatment by immersion (24 h) in an aqueous diammonium hydrogen phosphate solution (3.5 M DAHP, $(NH_4)_2$ HPO₄, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). This led to the following chemical reaction:

$2 \operatorname{Mg}_3(\operatorname{PO}_4)_2 + 3 \operatorname{(NH}_4)_2 \operatorname{HPO}_4 + 36 \operatorname{H}_2 O \rightarrow 6 \operatorname{NH}_4 \operatorname{MgPO}_4 \cdot 6 \operatorname{H}_2 O + \operatorname{H}_3 \operatorname{PO}_4$

All scaffolds have been washed to remove residual powder adherence or salt deposits. For this purpose, the scaffolds were stored in a petri dish on a rocking table (Rocker-Shaker PMR-100, Grant bio, Grant Instruments Ltd., Shepreth, UK) and completely covered with 1 mL washing solution per scaffold (sterile distilled water for 1 h, then phosphate-buffered saline (PBS; 8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.1 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl in 1 L H₂O) for 10 min).

Before implantation, all scaffolds were γ -sterilized by BBF Sterilisationsservice GmbH (Kernen, Germany) with a dose of 32.6 kGy.

2.2. Phase Determination by X-ray Diffraction and Rietveld Method

Prior to the in-vivo investigation, the phase composition of powders of the printed and subsequently finely ground scaffolds was qualitatively determined with monochromatic radiation (1.541 Å) using the X-ray diffractometer D8 Advance (Bruker Corporations, Billerica, MA, USA). The measurement was carried out in the angular range 20: 10–50°, with an increment of 0.02°, a measuring speed of 0.5 s/step and with rotation of the measuring cuvette of 15 rpm. The composition of the powder cement samples was evaluated using the software EVA (Bruker Corporations, Billerica, MA, USA) and reference files of the International Centre for Diffraction Data (ICDD) database. The powder diffraction file (PDF) references relevant for this study are summarized in Table 1. In addition, a quantitative analysis of the phase composition via the Rietveld method [42] was performed using the software TOPAS V6 (Bruker Corporations, Billerica, MA, USA).

Phase	PDF-Reference	
α -TCP (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	06-0200	
β -TCP (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	09-0169	
Farringtonite $(Mg_3(PO_4)_2)$	33-0876	
Periclase (MgO)	04-0829	
Stanfieldite ($Ca_4Mg_5(PO_4)_2$)	11-0231	
Struvite (NH ₄ Mg(PO ₄) \cdot 6 H ₂ O)	15-0762	

Table 1. Summary of powder diffraction file (PDF) references relevant for this study.

2.3. Determination of Compressive Strength and Porosity

The compressive strength of the scaffolds was measured using a universal testing machine (Z010, Zwick GmbH, Ulm, Germany). The measurement was carried out with a 10 kN load cell at a preload of 1 N and a test speed of 1 mm/min on 10 cuboidal specimens,

each measuring 6 mm \times 6 mm \times 12 mm, which were manufactured in the same way as the cylindrical scaffolds. In approximation to the in-vivo situation, the samples were placed in 30 mL sterile PBS at 37 °C for 24 h prior to measurement. The strength was determined immediately after removal from the medium.

The mercury porosimeter Pascal 140/440 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used to determine the open porosity, pore size distribution and median pore size of the samples. For this purpose, previously dried (37 °C, 24 h) fragments of the samples from the compressive strength analysis were used. The porosity was measured in a pressure range from 0.01 kPa to 400 MPa. The data was evaluated by the software SOLID (SOLver of Intrusion Data Ver. 1.6.5, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

2.4. Animal Model

The animal experiment was approved by the regional government of Upper Bavaria in accordance with paragraph 8 of the German Animal Welfare Act (approval number: ROB 55.2-2532.Vet_02-19-64). For this pilot study, the observation period of four female rabbits (Zika rabbits, Asamhof, Kissing, Germany) (age: 6 months, weight: 4.1 ± 0.1 kg) was one (n = 1) and six weeks (n = 3) post-surgery. The CMPC scaffolds and the tricalcium phosphate (TCP) control group were implanted as shown in Table 2. The animals were kept in standardized single-housing conventional cages (Scanbur A/S, Karlslunde, Denmark). They were fed daily with 100 g pellets and ad libitum hay and water.

A the set we	Table 2.	Combinations	of implante	ed materials
--	----------	--------------	-------------	--------------

Animal Number	Scaffold Type (Left Lateral Condyle)	Scaffold Type (Right Lateral Condyle)	Time of Euthanasia in Weeks after Surgery
1	Mg225	Mg225d	1
2	Mg225d	Mg225	6
3	Mg225d	TCP	6
4	Mg225	TCP	6

Prior to surgery, the animals received enrofloxacin (10 mg/kg, Orniflox[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) and meloxicam (0.3 mg/kg, Melosus[®], Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) per os (p.o.). Anesthesia was induced by intramuscular (i.m.) application of ketamine (15 mg/kg, Aneskin[®], Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and medetomidine (0.25 mg/kg, Dorbene vet[®], Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany). The airways were secured by endotracheal intubation. After shaving and sterile preparation of the surgical site (middle of the thigh to just above the tarsal joint), the animals were placed in a supine position. Anesthesia was maintained by inhalation of isoflurane (1.5–2 vol%, simultaneous supply of oxygen 1 L/min). During the operation, the rabbits received 10 μ g/kg/h fentanyl (Fentadon[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) as an intravenous infusion. Buprenorphine (20 μ g/kg, i.m., Bupresol[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) was applied close to the end of the surgical procedure for continuing pain treatment.

The surgical approach was performed through a 5 cm incision of the skin in the area of the left lateral femoral condyle. After preparation of the musculature and exposition of the lateral femoral condyle with aid of a raspatory, a 5 mm deep hole was drilled into the cancellous area of the distal condyle just above the lateral collateral ligament attachment with a drill ($\emptyset = 4$ mm) under protection of the joint capsule. The cylindrical scaffold was inserted accurately into the drill hole (Figure 1). Closure of the musculature was performed in three layers (Monosyn 4/0, Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and the skin was closed with individual sutures (Optilene 4/0, Braun Melsungen AG, Melsungen AG, Melsungen, Germany). The surgical procedure on the contralateral distal femur was then performed in the same way. Immediately following the operation, X-ray examinations in two views and Micro-Computed Tomography (μ CT) examinations of the distal lateral femoral condyles were performed. Medetomidine was antagonized by intramuscular



application of atipamezole (25 mg/kg, Atipam[®], Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany). The rabbits were clinically monitored until the anesthesia had subsided completely.

Figure 1. Three-dimensional (3D) reconstruction of the distal rabbit femur with implanted scaffold in the lateral condyle: (**a**) in craniolateral view and (**b**) in caudal view.

Post-operative follow-up included daily clinical and orthopedic examination of the animals for lameness and pain, as well as wound monitoring until day 14 after surgery. The animals received enrofloxacin once daily (10 mg/kg, p.o.) and meloxicam once daily (0.3 mg/kg, p.o.) for 5 days after surgery. After 10 days, the skin sutures were removed. After the observation periods, the animals were euthanized by intravenous application of propofol (5 mg/kg, Narcofol[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) and pentobarbital (220 mg/kg, Narkodorm[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany), in accordance with animal welfare regulations. The scaffold-bone-complexes were explanted using a diamond band saw (cut-grinder Walter Messner GmbH, Oststeinbek, Germany).

2.4.1. X-ray Examination

The hind limbs of the rabbits were X-rayed in two views (ventrodorsal (VD), mediolateral (ML)) directly after surgery and after 1 respectively 2, 4 and 6 weeks. The images were taken with 54.9 kV and 4.5 mAs (Multix Select DR, Siemens GmbH, Erlangen, Germany). The visibility of the scaffolds in the different X-ray views was assessed using the software dicomPACS[®] vet (Ver. 8.9.5, Oehm und Rehbein GmbH, Rostock, Germany).

2.4.2. In-Vivo Micro-CT (µCT) Examination

The distal femoral condyles of the rabbits were scanned under general anesthesia directly after surgery and after 1 respectively 2, 4 and 6 weeks in an in-vivo μ CT (Xtreme CT II, Scanco Medical, Zurich, Switzerland) with the settings 30.3 μ m isotropic voxel size, 68 kV voltage, 1000/180° projections and 200 ms integration time. The animals were placed in supine position with the hind limbs stretched to the maximum.

Semi-Quantitative Assessment

The semi-quantitative evaluation of the in-vivo µCT scans was carried out using a specific scoring system. The parameters assessed were scaffold position (time of examination: post-op), scaffold demarcation (spatial and grey scale), scaffold degradation (reduction of diameter and height) and scaffold-bone-contact. Score values of 0–2 were assigned for each parameter (Table 3). For a standardized assessment of the scaffold-bone-contact, rotation of the original scan was necessary to obtain a cross-sectional view of the scaffolds

with surrounding cancellous bone [43]. Therefore, the scaffold was manually outlined in the original scan, reoriented and semi-quantitatively evaluated with the software μ CT Evaluation Program V6.6 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland).

Table 3. Scoresheet for the semi-quantitative evaluation of the in-vivo Micro-Computed Tomography (µCT) (Xtreme CT II) scans.

Parameter	Score 0	Score 1	Score 2
Scaffold position	Scaffold completely inside the cancellous condyle	Scaffold mostly (>50%) in the cancellous condyle, partially in the medullary cavity	Scaffold partially in the cancellous condyle, mostly (>50%) in the medullary cavity
Scaffold demarcability	Scaffold cannot be separated from surrounding bone tissue	Scaffold partially separable from surrounding bone tissue	Scaffold can be completely separated from surrounding bone tissue
Scaffold degradation	Scaffold size $h \le 2.5 \text{ mm}$ $\emptyset \le 2 \text{ mm}$	Scaffold size 2.5 mm < h < 4.5 mm 2 mm < \emptyset < 3.5 mm	Scaffold size $h \ge 4.5 \text{ mm}$ $\emptyset \ge 3.5 \text{ mm}$
Scaffold-bone-contact	Broad contact area between scaffold and surrounding bone, numerous trabeculae grown onto the scaffold, no gap visible	Several bone trabeculae between scaffold and surrounding bone, hardly visible gap	No contact between scaffold and surrounding bone, clear gap between bone and scaffold

Quantitative Assessment

To calculate the volume of the scaffolds and the surrounding cancellous bone in the reoriented scan, it was necessary to define material-specific thresholds (Th). By assessing the grey values of the different scaffolds in the scans directly post-op, the following Ths were determined: Mg225: 144, Mg225d: 149, TCP: 216. The Th for cancellous bone (142) was determined based on the µCT scans of both lateral femoral condyles of cadavers of adult Zika rabbits (n = 4) with intact femur bones. To calculate the scaffold volume (SV), a region of interest (ROI) was defined in the scaffold center in accordance with the study by Kleer et al. [43]. The ROI consisted of a cylinder with a diameter of 126 voxels (= 3.82 mm), which corresponds to the diameter of the scaffolds, and a height of 60 slices (\doteq 1.82 mm = 36.4% of the scaffold height) (Figure 2a,b). The calculation of cancellous bone volume (BV), trabecular number (Tb. N) and trabecular thickness (Tb. Th) around the scaffold was performed according to Diefenbeck et al. [44]. For this purpose, the bone was evaluated in the area with a radius 25% larger than the scaffold. BV, Tb. N and Tb. Th were calculated using a hollow cylinder (second ROI) (inner ring: \emptyset = 128 voxels (\doteq 3.88 mm), outer ring: \emptyset = 160 voxels (\doteq 4.85 mm), height: 60 = slices) (Figure 2c). To establish reference values for cancellous bone (BV, Tb. N, Tb. Th), the cancellous part of both distal femoral conducts of cadavers of adult Zika rabbits (n = 4) with intact femur bones was examined. All calculations were performed using the software µCT Evaluation Program V6.6 (Scanco medical, Zurich, Switzerland).



Figure 2. Cylindrical region of interest (ROI) in the scaffold center for measurement of scaffold volume (SV): (**a**) in the original in-vivo μ CT scan (Xtreme CT II) (h = 60 slices $\triangleq 1.82$ mm), (**b**) cylindrical ROI in the reoriented in-vivo μ CT scan ($\emptyset = 126$ voxels ($\triangleq 3.82$ mm)), (**c**) second ROI for measurement of bone volume (BV), trabecular number (Tb. N) and trabecular thickness (Tb. Th) in the scaffold environment (inner ring: $\emptyset = 128$ voxels ($\triangleq 3.88$ mm), outer ring: $\emptyset = 160$ voxels ($\triangleq 4.85$ mm), h = 60 slices $\triangleq 1.82$ mm).

2.4.3. Micro-CT (µCT) 100 Examination

The explanted scaffold-bone-complexes were fixed in 4% formalin solution (Roth, Karlsruhe, Germany) and scanned with a μ CT 100 at Scanco Medical, Zurich, Switzerland. The samples were fixated in falcon tubes using foam blocks to avoid artefacts caused by movements during scanning. The scans were performed with the settings 8 μ m isotropic voxel size, 90 kV voltage, 1000/180° projections and 330 ms integration time. The scans were reoriented and evaluated using the software μ CT Evaluation Program V6.6 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland).

Qualitative Assessment

The qualitative evaluation of the μ CT 100 scans was based on both the original scans and the reoriented scans. In each complete scan, bone trabeculae surrounding the scaffold (amount, greyscale, thickness), scaffold integration into the femoral condyle (ingrowth of new bone trabeculae into the scaffold), scaffold degradation and scaffold demarcation of new bone trabeculae (spatially and by grey scale) were assessed, as well as the scaffold structure (cylindrical shape and presence of a material framework).

Quantitative Assessment

As described above, the measurement of scaffold volume (SV) in the scaffold center as well as the measurements of cancellous bone volume (BV), trabecular number (Tb. N) and trabecular thickness (Tb. Th) in the scaffold environment were carried out in the reoriented scans in two different ROIs (ROI cylinder for calculation SV in the scaffold center: $\emptyset = 478$ voxels ($\triangleq 3.82$ mm), h = 227 slices ($\triangleq 1.82$ mm); ROI hollow cylinder for calculation BV, Tb. N and Tb. Th in the scaffold environment: inner ring: $\emptyset = 485$ voxels ($\triangleq 3.88$ mm), outer ring: $\emptyset = 606$ voxels ($\triangleq 4.85$ mm), h = 227 slices ($\triangleq 1.82$ mm)). The determination of the Ths for the different scaffold materials and the surrounding cancellous bone was performed by visual assessment of the μ CT scans (Ths: Mg225: 296, Mg225d: 304, TCP: 400, bone: 168).

2.4.4. Histological Examination

After fixation in 4% formalin solution (Roth, Karlsruhe, Germany), the scaffold-bonecomplexes were dehydrated in an ascending alcohol series (Roth, Karlsruhe, Germany). The samples were then defatted with xylene (Roth, Karlsruhe, Germany) and embedded with a plastic embedding system based on methyl methacrylate (Technovit 9100[®], Heraeus Kulzer,

uctions. Based on the cutt

Wehrheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Based on the cuttinggrinding technique according to Donath [45], thick sections of 50–80 µm from the center of the scaffold were produced with a diamond band saw (cut-grinder, Walter Messner GmbH, Oststeinbek, Germany) and a grinding machine (lap-grinder, Walter Messner GmbH, Oststeinbek, Germany). The longitudinal axis of the cylinder was perpendicular to the cutting surface of the thick sections. The in-vivo µCT scans were used to determine the scaffold position. A central slide of the sections was routinely stained with a 0.1% toluidine blue O solution [46,47] and evaluated qualitatively. For the preparation of the 0.1% toluidine blue O solution, 1g of Toluidine Blue O (Waldeck, Münster, Germany) was dissolved in 100 mL distilled water to obtain a 1% stock solution. The stock solution was then mixed with a 100 mM phosphate buffer solution at a volume ratio of 1:9 (chemicals from Roth, Karlsruhe, Germany). Before use, the 0.1% toluidine blue O solution was filtered and heated to 60 °C.

Qualitative Evaluation

For qualitative evaluation, the histological sections were examined with a microscope (Zeiss Axio Imager Z.2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). The scaffold area was divided into scaffold center (inner 50%) and marginal area (outer 50%). Scaffold degradation (form and extent of degradation, structure of the scaffolds) and integration into the surrounding cancellous bone, ingrowth of new bone trabeculae, osteoid, connective tissue, blood vessels and bone marrow (magnification $2.5 \times /0.085$) were observed as well as remodeling and resorption processes within the scaffold on the cellular level (appearance of osteoblasts and osteocytes, fibroblasts and fibrocytes, erythrocytes, megakaryocytes, adipocytes, macrophages and giant cells) (magnification $20 \times /0.5$).

2.5. Statistics

The examination of the compressive strength of the cuboidal scaffolds was carried out using analysis of variance (ANOVA), followed by a post hoc test evaluated according to Tukey, for a significance level of p < 0.05 using the software Origin (OriginPro 2016G, OriginLab, Northampton, MA, USA). The base for the determined phase compositions is formed by three X-ray diffractograms each, which were performed on three scaffold powders. The values are given as mean value \pm standard deviation (SD). The clinical, radiological and histological examinations were evaluated descriptively, paying particular attention to the differences between the various materials. The μ CT examination was also carried out descriptively (μ CT 100), and respectively semi-quantitatively using a scoring system (in-vivo μ CT) and quantitatively with the software μ CT Evaluation Program V6.6 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland) (in-vivo μ CT, μ CT 100).

3. Results

3.1. Phase Determination by X-ray Diffraction and Rietveld Method

The different chemical phase compositions are shown in Figure 3 by the X-ray diffraction patterns of Mg225, Mg225d and TCP measured on powders of the previously finely ground scaffolds. The phase determination via the Rietveld method resulted in the following quantitative material compositions: Mg225 consisted of (60.0 ± 0.4) wt% stanfieldite $(Ca_4Mg_5(PO_4)_6)$, (38.1 ± 0.5) wt% farringtonite $(Mg_3(PO_4)_2)$, and (1.9 ± 0.0) wt% periclase (MgO). Mg225d consisted of (59.8 ± 0.8) wt% stanfieldite, (31.2 ± 1.1) wt% farringtonite, (6.9 ± 0.3) wt% struvite $(MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O)$ and (2.1 ± 0.1) wt% periclase. The TCP $(Ca_3(PO_4)_2)$ scaffolds contained (20.4 ± 0.3) wt% α -TCP and (79.6 ± 0.3) wt% ß-TCP.



Figure 3. X-Ray diffraction pattern of Mg225, Mg225d and TCP powders. The most relevant peaks are marked for $\mathbf{\nabla}$: α -TCP, *: β -TCP, ': stanfieldite, f: farringtonite, s: struvite and o: periclase.

3.2. Determination of Compressive Strength and Porosity

The measured compressive strengths of the different scaffold materials were (4.29 \pm 0.77) MPa (Mg225), (10.99 \pm 1.68) MPa (Mg225d) and (7.25 \pm 1.60) MPa (TCP), respectively. The measurements of the different groups differed significantly from one another (p(Mg225d-Mg225) = 0, p(Mg225-TCP) = 1.96066 \times 10⁻⁴, p(TCP-Mg225d) = 7.28018 \times 10⁻⁶).

When the porosity was examined using the mercury porosimeter, Mg225 had a porosity of 58%, Mg225d of 29% and TCP of 37%. The mean pore size was 47 μ m for Mg225, 13 μ m for Mg225d and 30 μ m for TCP (Figure 4).



Figure 4. Porosity, pore size and relative pore volume of: (a) Mg225, (b) Mg225d and (c) TCP.

3.3. Clinical Examination

As of the first day after surgery, all animals were in good general condition. The rabbits showed no signs of pain, lameness or wound healing disorders. Physiological wound healing took place.

3.4. X-ray Examination

The scaffolds had an X-ray density very comparable to that of bone and were visible in the ventrodorsal (VD) image for a shorter time compared to the mediolateral (ML) image. On the X-ray images directly after surgery, all scaffolds were visible in both X-ray views (Figure 5). Over the observation period of 6 weeks, the visibility of the scaffolds decreased differently. Mg225 was only visible in the VD X-ray view directly after surgery, and in the ML view up to week 6. Mg225d was visible in the VD view up to week 4 after surgery, and in the ML view up to week 6. TCP was clearly visible in both X-ray views at all examination times.



Figure 5. (a) Ventrodorsal (VD) X-ray view of the hind limbs directly after surgery with TCP implanted in the right and Mg225 in the left femoral condyle. (b) Magnification of the left knee joint with implanted Mg225 scaffold.

3.5. In-Vivo Micro-CT (µCT) Examination

3.5.1. Semi-Quantitative Assessment

Except for one sample of Mg225d, which was placed at the transition of the cancellous bone to the medullary cavity of the condyle (score 1), all scaffolds were implanted precisely into the cancellous area of the condyle (score 0).

All scaffolds showed increasing integration into the surrounding bone over the observation period (Figure 6). Until the μ CT scan 2 weeks after surgery, all scaffolds were completely demarcable from the surrounding bone tissue (score 2). Four weeks after surgery, both Mg225 scaffolds and one Mg225d scaffold were only partially demarcable (score 1). The second Mg225d scaffold and both TCP scaffolds were still completely demarcable at this time. After 6 weeks, both Mg225 and Mg225d scaffolds, and one TCP scaffold, were only partially demarcable, and the second TCP scaffold was still completely demarcable.

Post-op, no scaffold showed direct contact between scaffold and surrounding bone (score 2). After one week, several bone trabeculae were present between scaffold and surrounding bone in Mg225 (score 1), but not yet in Mg225d (score 2). Two weeks after surgery, the growth of several bone trabeculae was observed in all scaffolds (score 1), except in one TCP scaffold, where numerous bone trabeculae were already present at the scaffold margin (score 0). After 4 and 6 weeks, a wide contact area between scaffold and bone was observed in all scaffolds (score 0).



Figure 6. In-vivo μ CT images (Xtreme CT II) of the scaffolds and the surrounding cancellous bone in the reoriented scans in cross-section over time (immediately after surgery up to 6 weeks); scale bar = 1 mm.

By week 2, all scaffolds showed no marked reduction in size ($h \ge 4.5 \text{ mm}$, $\emptyset \ge 3.5 \text{ mm}$, score 2). In week 4, one Mg225 and Mg225d scaffold each showed dimensions of 2.5 mm < h < 4.5 mm and 2 mm < $\emptyset < 3.5 \text{ mm}$ (score 1), and the other Mg225 and Mg225d scaffold was, as were both TCP scaffolds, still not markedly degraded (score 2). In week 6, all Mg225 and Mg225d scaffolds as well as one TCP scaffold showed dimensions according to score 1, while one TCP scaffold was classified in score 2.

3.5.2. Quantitative Assessment

All scaffolds showed a continuous volume decrease over the 6-week observation period (Mg225: 59.02%, Mg225d: 23.99%, TCP: 38.24%) (Figure 7). A small increase in the volume of all scaffolds in week 2 post-surgery compared to week 1 and directly post-op was noticeable.

BV increased in all scaffolds when compared directly after surgery with week 6, and from week 1 onwards, the BV was always above the values measured for intact cancellous bone. The highest volume was measured in week 2 (Figure 8).

When comparing post-op to week 6, Tb. N increased in Mg225 and TCP and decreased slightly in Mg225d. Post-op, all scaffolds showed an increase in Tb. N, with a peak in week 1 (Mg225d) or respectively week 2 (Mg225, TCP). At the following examinations, Tb. N decreased in all scaffolds up to week 6, and respectively increased again slightly in Mg225 between weeks 4 and 6 (Figure 9a).





Figure 7. Volume degradation of the scaffolds in in-vivo μ CT (Xtreme CT II) over time (immediately after surgery up to 6 weeks) and scaffold volume in μ CT 100 (6 weeks after surgery).



Figure 8. Cancellous bone volume (BV) in the scaffold environment in in-vivo μ CT (Xtreme CT II) over time (immediately after surgery up to 6 weeks) and in μ CT 100 (6 weeks after surgery) compared to intact cancellous bone of the lateral femoral condyle.



Figure 9. (a) Trabecular number and (b) trabecular thickness in the scaffold environment in in-vivo μ CT (Xtreme CT II) over time (immediately after surgery up to 6 weeks) and in μ CT 100 (6 weeks after surgery) compared to intact cancellous bone of the lateral femoral condyle.

Tb. Th increased in all scaffolds over the observation period. When comparing the materials, the largest Tb. Th was found in TCP, while the Tb. Th of Mg225 and Mg225d was at about the same level (Figure 9b).

3.6. Micro CT (µCT) 100 Examination

3.6.1. Qualitative Assessment

After 6 weeks, all scaffolds showed a physiological trabecular bone environment. The implantation area was completely traversed by a dense network of new bone trabeculae, which had a slightly lower radiopacity and measurable thickness ($\emptyset = 0.05-0.1$ mm) than surrounding bone trabeculae ($\emptyset = 0.1-0.2$ mm). The transition between new bone trabeculae within the scaffold and the scaffold surrounding was only partially demarcable, so that the cylindrical shape of the scaffold was no longer visible for Mg225, partially visible for Mg225d and still clearly visible for TCP (Figure 10).

Scaffold residues of Mg225 showed up only as few diffusely scattered single particles ($\emptyset \le 0.2 \text{ mm}$) in the initial implantation area, which were completely embedded in new bone trabeculae. A spatial demarcation between bone trabeculae and scaffold was not always clear and was only possible due to the different radiopacity (Figure 10a,b).

The cylindrical shape of the Mg225d scaffolds was relatively clearly delineable. The initial implantation area contained a network of bone and scaffold material. Some individual particles of the material ($\emptyset \le 0.2$ mm) were scattered in or at the margin of new bone trabeculae (Figure 10c,d).

The scaffold structure of TCP was largely preserved, and the material was clearly distinguishable from bone by means of its grey value. A very dense material skeleton with individual particles scattered in the initial implantation area ($\emptyset \le 0.5$ mm) was found, some of which were integrated into newly formed bone trabeculae and some of which had no bone contact (Figure 10e,f).

3.6.2. Quantitative Evaluation of µCT 100 Scans and Comparison to In-Vivo Examination

Six weeks after surgery, SVs of 1.02 mm³ (Mg225), 3.31 mm³ (Mg225d), and 5.28 mm³ (TCP) were measured in the μ CT 100. The BV was 3.87 mm³ for Mg225, 3.12 mm³ for Mg225d and 6.00 mm³ for TCP. The measured Tb. N was 2.59/mm for Mg225, 1.92/mm for Mg225d and 3.24/mm for TCP, and the Tb. Th was 0.12 mm (Mg225), 0.13 mm (Mg225d) and 0.16 mm (TCP).

47



Figure 10. Scaffolds and surrounding cancellous bone (a,c,e) in the original scan in longitudinalsection and (b,d,f) in the reoriented scan in cross-section in μ CT 100 6 weeks after surgery.

When comparing the μ CT 100 measurements with the in-vivo μ CT measurements of the same time, markedly higher SVs were observed in vivo (Mg225: 6.70 mm³, Mg225d: 13.80 mm³, TCP: 10.65 mm³) (Figure 7), while the BV differed only slightly from the in-vivo measurements (Mg225: 4.03 mm³, Mg225d: 3.08 mm³, TCP: 5.29 mm³) (Figure 8). The Tb. N in the μ CT 100 was markedly higher in all scaffolds than in the in-vivo measurements (Mg225: 1.83/mm, Mg225d: 1.37/mm, TCP: 2.06/mm) (Figure 9a), and the Tb. Th was markedly lower than in vivo (Mg225: 0.20 mm, Mg225d: 0.19 mm, TCP: 0.23 mm) (Figure 9b).

3.7. Histological Examination

All scaffolds showed a physiological cancellous bone environment consisting of numerous trabeculae and bone marrow at the time of examination 1 and 6 weeks after surgery, respectively. There were no signs of an inflammatory reaction.

One week after surgery, Mg225 and Mg225d showed bone contacts on about 50% of their circumference in the form of numerous new, very thin bone trabeculae, which already grew slightly into the scaffold margin. The scaffolds appeared almost circular in cross-section with a largely homogeneous porous structure. The beginning of degradation was visible by individual unbound scaffold particles in the marginal area. In the entire scaffold area, many cells, especially erythrocytes, were visible between the scaffold particles. In the



scaffold margin, connective tissue with many fibroblasts, fibrocytes and lymphocytes had already slightly grown in (Figure 11a,b).

Figure 11. Histological thick sections (toluidine blue staining) from the center of the CMPC (calcium magnesium phosphate cement) scaffolds in cross-section (**a**,**b**) after 1 week and (**c**,**d**) after 6 weeks (magnification $2.5 \times /0.085$). After 1 week, bone trabeculae from the surrounding had grown onto the scaffold and already slightly into the scaffold margin ((*) old bone in lighter blue, (\uparrow) newly formed bone in dark blue, (°) bone marrow). After 6 weeks, new bone trabeculae and (\land) connective tissue traversed the scaffold completely and in the case of (**c**) Mg225, bone marrow had already grown into the scaffold.

After 6 weeks, almost all bone trabeculae from the scaffold surrounding had grown into the scaffold and numerous new bone trabeculae traversed the entire scaffold as a dense network. They appeared somewhat thinner than the trabeculae of the cancellous bone in the scaffold surrounding. At the margins of the many trabeculae within the scaffolds, there was an osteoid layer with numerous osteoblasts deposited on top (Figure 11c,d and Figure 12).



Figure 12. Histological thick sections (toluidine blue staining) of the femoral condyle with TCP scaffold after 6 weeks: (a) as overview and (b) with magnification $2.5 \times /0.085$. Numerous bone trabeculae from the surrounding had grown into the scaffold and traversed it completely ((*) old bone in lighter blue, (\uparrow) newly formed bone in dark blue), as well as (\land) connective tissue. (°) Bone marrow was also already visible within the scaffold.

The round cross-sectional area was still relatively easy to identify in TCP and Mg225d, whereas in Mg225, it could only be guessed at. Centripetal degradation occurred in all scaffolds. The Mg225d and TCP scaffolds were visible as a coherent network with some single dispersed particles, which were mainly present at the margins. It was noticeable that the scaffold material was almost always completely surrounded by trabecular bone (Figures 11d and 12). Only single particles of Mg225 were still present, which were embedded in newly formed bone trabeculae (Figure 11c).

In a more detailed examination of the cells inside the scaffold, Mg225 showed homogeneously distributed blood vessels with erythrocytes and lymphocytes in addition to connective tissue (fibroblasts, fibrocytes) and bone trabeculae (osteoblasts, osteoid, osteocytes), which had a comparable quantity and distribution ratio as in cancellous bone outside the scaffold. In the scaffold marginal area, mainly bone marrow with adipocytes, fat vacuoles and megakaryocytes between the bone trabeculae was found, which was also present in numerous smaller locations in the scaffold center (Figures 11c and 13a).

In the case of Mg225d, connective tissue, bone trabeculae and blood vessels with erythrocytes were also observed throughout the whole scaffold. The large number and density of bone trabeculae in the scaffold center was striking. Connective tissue and blood vessels were increasingly located in the scaffold margins. Bone marrow with few adipocytes and megakaryocytes was only sporadically present in the scaffold margin (Figures 11d and 13b).

TCP showed a homogeneous distribution of bone trabeculae and connective tissue throughout the whole scaffold. Bone marrow was present within the whole scaffold area in the form of numerous adipocytes with small fat vacuoles and was surrounded by connective tissue (Figures 12 and 13c).



Figure 13. Histological thick sections (toluidine blue staining) from the scaffold center of (**a**) Mg225, (**b**) Mg225d and (**c**) TCP after 6 weeks with magnification $20 \times /0.5$. (•) Remaining scaffold material was surrounded by numerous (*) new bone trabeculae, on the margins of which several (†) osteoblasts were deposited. In (**a**) Mg225 and (**c**) TCP, (\Diamond) cell-rich connective tissue with numerous fibrocytes and (Δ) bone marrow (adipocytes with fat vacuoles) were visible between the trabeculae.

4. Discussion

Due to their better biological properties compared to pure CPCs, CPCs with Mg substitution (CMPCs) are increasingly being researched [27-29,35,48] and have proven in various studies to be, in the form of cement pastes, very promising in terms of biocompatibility, osseointegration, successive degradation and absorption [27,28,32,48]. For the treatment of many defects, however, the use of precisely fitting and dimensionally stable bone substitutes of defined shape is necessary. Such materials can be produced using 3D powder printing, but have only been investigated in vivo as CPCs [40] and MPCs [41] so far. In the present study, two different CMPC scaffolds (Mg225, Mg225d) were therefore produced from the ceramic cement powder Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂ using the advantageous powder printing process. The influence of the scaffold treatment with DAHP ((NH₄)₂HPO₄) on phase composition, pore size and mechanical stability was tested in vitro. In vivo, the scaffolds were examined in cancellous bone over 6 weeks for differences in degradation behavior, osseointegration, resorption as well as biocompatibility due to the DAHP treatment. They were compared to TCP and evaluated by regular clinical, radiological, µCT, and histological examinations. The rabbit model and chosen implant location has been described as suitable for in-vivo investigations of ceramic bone substitutes [49].

In the present study, treatment of the CMPC scaffolds with DAHP resulted in a change of the chemical composition: Farringtonite (Mg₃(PO₄)₂) (Mg225: (38.1 ± 0.5) wt%, Mg225d: (31.2 ± 1.1) wt%) was partially dissolved by the solution-precipitation process, whereby the in-vivo easily soluble phase struvite (MgNH₄PO₄·6H₂O) (Mg225d: (6.9 ± 0.3) wt%) precipitated and the chemical solubility of the scaffolds was increased. The solubility products of struvite (5.21 \times 10⁻¹⁵ to 2.12 \times 10⁻¹³ mol³ L⁻³ in the pH range 7.01–9.62) [50] and farringtonite $(6.3 \times 10^{-26} \text{ mol}^5 \text{ L}^{-5})$ [51], which were reported in the literature, correspond to a calculated solubility of 4.25-14.61 mg/L (struvite) [50] and 2.81 mg/L (farringtonite) [51]. The struvite precipitation resulted in a reduction of porosity and median pore size from 58% and 47 μ m (Mg225) to 29% and 13 μ m (Mg225d) respectively, and an increase in compressive strength from 4.29 (Mg225) to 10.99 MPa (Mg225d). The reference TCP was between Mg225 and Mg225d in terms of porosity, pore size and compressive strength. The strong increase in compressive strength due to treatment with DAHP was also described by Klammert et al. [52] for 3D powder-printed scaffolds made of MPC and by Gelli et al. [53] for MPC pastes. Gelli et al. [53] also observed a reduction in porosity when MPC pastes were treated with DAHP.

As described for CMPC pastes in other in-vivo studies in a cylindrical defect model in the distal rabbit femur [27,32], the CMPC scaffolds investigated in this study showed

excellent biocompatibility without signs of inflammation, rejection or necrosis. In the X-ray examination, the scaffolds had a density comparable to that of bone. In the VD image, the CMPC scaffolds were visible for a shorter time compared to the ML image, as the overlapping of the sesamoid bones in the VD image made it difficult to visualize them. The faster decrease in visibility of Mg225 and Mg225d compared to TCP can be explained by the higher radiopacity of TCP due to the higher content of radiopaque Ca²⁺, but also supports the assumption that the degradation of the CMPC scaffolds happens successively faster than that of TCP. Klammert et al. [54] reported radiological changes in a heterotopic rodent model, which indicates a faster and more distinct dissolution of MPCs compared to CPCs.

In the present study, all three investigated materials showed a continuous, over time increasing scaffold degradation and integration into the surrounding bone in the semi-quantitative (in-vivo) μ CT examination. Mg225 was the first material of which both scaffolds could only be partially differentiated from bone tissue after 4 weeks. After one week, growth of bone trabeculae to the margin of the scaffold was already observed in Mg225. After 4 weeks, a wide contact area between scaffold and bone was visible in all materials. In the μ CT 100, the cylindrical shape of Mg225 was no longer identifiable after 6 weeks and scaffold residues were only present as diffusely scattered, individual particles, while the outer contour of Mg225d and its material framework were still clearly visible. The scaffold structure of TCP was largely preserved, and the material was clearly distinguishable from bone with the assistance of the grey value. The implantation area of all three materials was completely traversed by a dense network of new bone trabeculae.

For quantitative assessment of scaffold degradation and integration, the SV and its surrounding BV, Tb. N and Tb. Th were measured. Until week 2, the SV remained more or less constant for all materials, and even a slight increase in volume was observed, which could not be clearly explained in this study. After the implantation of a biodegradable material, protein adsorption and subsequent cellular infiltration, especially of monocytes, macrophages and foreign body cells, occur very rapidly. One to five days later, these cells release cytokines and chemokines, resulting in the recruitment of tissue repair cells after five to fifteen days [55]. It is therefore assumed that in the present study, hardly any cellular resorption processes of the scaffold material were present in the first two weeks after surgery, as the required signal transduction cascade had to proceed first. However, it can be assumed that a slight volume decrease by chemical dissolution occurred in all materials even before week 2. Histology showed that cells and especially new bone trabeculae had already grown into the slightly degraded scaffold after 1 week and were erroneously included in the SV due to the very similar grey value of bone and scaffold material in μ CT. From week 2 onwards, a severe decrease in the scaffold volume was observed in all materials, presumably due to the increasing cellular resorption of the scaffolds. This was more pronounced than the chemical dissolution that probably already occurred previously and was clearly measurable despite the further ingrowth of cells and new bone trabeculae. Mg225 showed a markedly stronger and faster volume decrease than Mg225d and TCP (volume decrease over 6 weeks: Mg225: 59.02%, Mg225d: 23.99%, TCP: 38.24%). The specific degradation mechanisms of the scaffolds investigated in the present study could not be clarified conclusively. However, the degradation of CaP-based biomaterials has been investigated in many studies and chemical dissolution and cellmediated absorption have been assumed [56–58]. In-vitro studies on the degradation of brushite cements have shown that degradation occurs through erosion, fragmentation and dissolution, with calcium and phosphate ions diffusing in solution [59]. For the degradation of CPCs in vivo [24], the same degradation mechanism is assumed as for CaP ceramics [60], although the cell type involved in the degradation varies depending on the cement type. Rapidly resorbable CPCs are removed by macrophages and giant cells that phagocytize cement particles [57,58,61], while CPCs, which are resorbed more slowly over months to years, are removed by osteoclastic cells [21,57]. For MPCs, only passive resorption by chemical dissolution in magnesium and phosphate ions has been

described in the literature so far [54,62]. For the in-vivo degradation of pre-hardened cylinders made of CMPC pastes, Wu et al. [27] have assumed a two-stage degradation mechanism with chemical dissolution and resorption of the material at the initial stage and cell-mediated resorption later on, which we also consider likely for the scaffolds examined in the present study. Both the surface quality and the chemical composition of a biomaterial are decisive for cellular reactions to it [63,64]. In the present study, despite the higher proportion of the chemically poorly soluble phase farringtonite in Mg225, the larger pores and higher porosity resulted in better osseointegration and markedly faster resorption of the Mg225 scaffold compared to Mg225d. The influence of pore size and porosity on the degradation rate has been described in other studies, showing that high porosity and large pores facilitate and improve osteogenesis and osseointegration of the scaffold, as they allow vascularization of the construct and a high oxygen supply [39,65,66]. However, an increase in pore size reduces the mechanical strength of the scaffold and, as bone grows in, the mechanical properties of the scaffold are further reduced by impairment of the framework's structural integrity, which can be critical for regeneration in weightbearing bone [39]. In addition to the compressive strength of a bone replacement material, however, its stiffness (compressive modulus) and the right combination of both mechanical properties play a decisive role in its use to fulfill the mechanical functions of the bone matrix [67]. As compressive strength and stiffness are negatively correlated to the porosity of a material [68,69], it can be assumed that the Mg225 scaffolds have a lower stiffness than the Mg225d and TCP scaffolds, at least prior to implantation. This will possibly change during implantation time in vivo, as the larger pores and porosity of Mg225 facilitate the ingrowth of cells [39,65,66], which has been shown to have an impact on the scaffolds' stiffness [70] and should therefore be taken into account to be evaluated in possible followup studies on CMPC scaffolds. Liverani et al. [70] have investigated the influence of cell colonization on the stiffness properties of collagen scaffolds and observed an increase in the scaffold compressive modulus. Although Mg225d showed less volume degradation than Mg225 and TCP by week 6, an increasing and complete degradation of both CMPC scaffolds over time is nevertheless likely according to the existing literature. Li et al. [71] investigated CMPC scaffolds made of pastes in vivo in the distal rabbit femur and observed a complete degradation of the material and regeneration of bone tissue over 6 months, with the largest bone growth observed between months 1 and 3. The fact that after 6 months no scaffold material could be detected allows the conclusion that possible follow-up studies of the present pilot study do not need to extend beyond 6 months.

In the scaffold environment, a clear increase in BV was observed when comparing directly after surgery to week 6, which was most pronounced in the untreated CMPC (Mg225). Strikingly, the BV was highest for all materials in week 2, and from week 1 onwards, it was always higher than the BV of intact bone of the same localization. As the outer contour of the scaffolds appeared blurry in the in-vivo µCT already from week 1, it is assumed that the chemical dissolution of the scaffolds occurred mainly in the early implantation phase and had a positive influence on the formation of new bone trabeculae. The amount of free Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions is known to have a crucial effect on bone metabolism. A local increase of Ca²⁺ and PO₄³⁻ ions to supra-physiological levels released by osteoclasts during in-vivo bone resorption severely affects the proliferation and differentiation of osteoblasts and the following bone formation [72]. A high Ca²⁺ concentration stimulates the chemotaxis of pre-osteoblasts to bone resorption areas as well as their maturation into bone-producing cells [73], while PO_4^{3-} plays an important role in the regulation of cell cycles and proliferation rates [74]. In the present study, the release of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions during scaffold degradation likely led to a local increase of the Ca^{2+} and $PO_4{}^{3-}$ concentration in the scaffold environment, especially in the early implantation phase. New bone formation was probably stimulated thereby, resulting in a higher BV in the scaffold environment compared to intact cancellous bone. This would also explain the higher BV in the environment of the TCP scaffolds compared to the CMPC scaffolds as they contain a markedly larger amount of Ca²⁺. In addition, the diffusion of scaffold material into the environment probably led to

changes in the microstructure of the scaffolds, which could facilitate the presumably later occurring cell-mediated resorption of the CPC phase and has been suggested in the literature for the degradation of pre-hardened cylinders made of CMPC pastes [27]. However, a stimulation of bone formation by the MPC phases of the scaffolds is also conceivable as an explanation for the high BV. Since Mg²⁺ promotes mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts and osteoblast activity [75–77], it is possible that Mg²⁺ released during the chemical dissolution of the CMPC scaffolds promoted osteoneogenesis. Kanter et al. [78] also found a markedly higher BV in the vicinity of struvite cements compared to intact bone from the same region, which suggests that struvite cements stimulate bone formation, possibly through the Mg²⁺ ions released. In a previous study by Ewald et al. [32], Mg225d cement pastes were examined in a rabbit model and an increase in scaffold-bone-contacts from 6 to 12 weeks was observed. This suggests that for the 3D powder-printed scaffolds of the present study, an increase in osseointegration over time is also to be expected, although this must be clarified in subsequent studies.

Tb. Th increased for all materials over the investigation period, while by comparison of post-op with week 6, Tb. N increased for Mg225 and TCP and decreased slightly for Mg225d. An increase in Tb. Th and decrease in Tb. N was also described by Kanter et al. [78] for struvite cements and indicates that the new bone is continuously remodeled and adapted to the physiological situation.

Since the CMPC scaffolds in the present study had a very similar grey level as surrounding bone, the quantitative in-vivo µCT investigations were validated with additional examinations of the explanted scaffold-bone-complexes in a μ CT 100 at the same time point (6 weeks). Marked differences in the measurements of degradation and osseointegration parameters were found. While all scaffolds showed a lower SV and Tb. Th in the μ CT 100, the Tb. N was higher than in the lower-resolution in-vivo µCT examination. The BV in the scaffold environment was comparable in both measurements. The discrepancy in measurements can be explained by the smaller isotropic voxel size (8 μ m compared to 30.3 μ m) and the resulting higher accuracy of the μ CT 100 measurements. New bone trabeculae in the cylindrical ROI in the scaffold center can be better separated from the scaffold material due to the more differentiated grey scales, and bone trabeculae in the scaffold environment can be detected individually in a more differentiated manner. These observations can also be found in other studies on trabecular microstructure parameters, which also concluded that small trabeculae are poorly represented by low-resolution systems [79,80]. However, since measurements in the μ CT 100 can only be made on the explanted scaffold-bone-complexes after euthanasia of the animals due to the smaller scan range, the in-vivo investigation is nevertheless indispensable for assessing degradation and osseointegration over time.

Histological examinations confirmed the observations from the µCT investigations regarding scaffold degradation and integration. By increasing implantation time, both CMPC scaffolds induced the formation of new bone trabeculae. Contrary to the assumption that a minimum mean pore size of 100 µm is required for the regeneration of mineralized bone tissue within a scaffold in ceramic bone substitutes [81], in the present study, new trabeculae had slightly grown into the margin of scaffolds with a median pore size of 13 to 47 μm already, one week after implantation, and completely traversed the scaffolds of all materials as a dense network after 6 weeks. An osteoid layer with numerous deposited osteoblasts was present at the trabecular meshwork margins. In the case of Mg225 and TCP, cell-rich tissue was already visible, particularly at the margin of the scaffolds, which was evaluated as bone marrow due to the numerous occurrence of adipocytes, erythrocytes and megakaryocytes [82]. Increased bone growth was accompanied by vascularization, centripetal volume degradation and structural loss of the scaffolds, which was also observed in other in-vivo studies [31,32,62]. The scaffold material was almost always completely surrounded by trabecular bone, but while Mg225d and TCP were still visible as a coherent grid network, only single particles of Mg225 were still present. The integration of material particles in new bone was also observed by Kim et al. [62] in a previous in-vivo study with MPCs and suggests that the bone has newly formed, remodeled and matured. As reported

in the literature [27], the clearly visible osseous remodeling processes in the implantation area and the centripetal scaffold degradation seen in the present study indicate a partial cell-mediated dissolution of the scaffolds. However, it was striking that no giant cells or macrophages were observed in the present study.

The higher porosity and pore size of Mg225 compared to Mg225d and TCP provoked faster vascularization, which was also observed for MPC scaffolds of different micropore sizes (25–53 μ m compared to <25 μ m) in another study [62]. A correlation between the pore structure of ceramic scaffolds and their efficiency in bone formation and remodeling was also described [62]. The faster migration of mesenchymal cells and osteoblasts [65,66] into the scaffold finally led to a faster dissolution and osseointegration of the Mg225 scaffold compared to the Mg225d and TCP scaffolds in this study.

The importance of the exact positioning of the scaffold for successful osseointegration is demonstrated by one Mg225b scaffold, which was not inserted exactly into the cancellous part of the condyle, but at the transition of cancellous bone to the medullary cavity. Since it was thus not completely surrounded by bone trabeculae, poorer osseointegration occurred and BV, Tb. N and Tb. Th were markedly lower than with the other Mg225d scaffold during the whole observation period. Furthermore, other studies described implant site-dependent degradation behavior of magnesium-based implants, revealing that scaffolds implanted in cancellous bone close to bone marrow or in the bone marrow degrade faster than in cancellous or compact bone [83–85]. However, no faster degradation of the scaffold implanted at the transition of cancellous bone to the medullary cavity compared to the scaffold implanted in cancellous bone was observed in the present study.

5. Conclusions

The treatment of the scaffold material Mg225 with DAHP, which was investigated in the present pilot study, led to a change of the chemical phase composition and thus to a reduction of pore size and porosity and an increase in compressive strength in Mg225d. The 3D powder-printed materials showed excellent clinical tolerance, biocompatibility and biodegradability, with no signs of inflammation. Degradation with loss of shape and structure, volume decrease as well as the decreasing differentiability from bone tissue was more pronounced and faster in Mg225 than in Mg225d and TCP. The scaffolds showed rapid degradation, good osseointegration and effective osteogenesis, as numerous new bone trabeculae and, in the case of Mg225 and TCP, bone marrow had grown into the scaffolds. As the mechanical stability of the scaffold-bone-complexes in vivo has not been investigated, only a report on the in-vitro stability of the scaffolds is possible at this time. The relatively high porosity of Mg225 and associated low compressive strength promote osteogenesis and osseointegration but make this material unsuitable for use in weightbearing bone. However, Mg225 is probably well-suited as a substitute for cancellous bone in cavities. Based on the results from the present study, Mg225d seems to be a promising bone substitute for the use in complex shaped or more weight-bearing defects. The longer lasting, coherent gridwork serves as a guide for osteogenesis, which could lead to an increase in mechanical stability in the implantation area and needs to be further investigated in follow-up studies.

Author Contributions: Conceptualization, E.V. and A.M.-L.; formal analysis, E.V.; funding acquisition, E.V. and A.M.-L.; measurement and analysis of compressive strength, M.B.; measurement and analysis of porosity, M.B.; scaffold production and measurement of phase determination by X-ray diffraction, E.V.; implementation of in-vivo investigations, K.K., F.F., A.-C.W. and A.M.-L.; evaluation of in-vivo investigations, K.K. and F.F.; methodology, E.V. and A.M.-L.; project administration, E.V., A.-C.W. and A.M.-L.; resources, E.V., A.-C.W. and A.M.-L.; supervision, E.V., F.F., A.-C.W. and A.M.-L.; visualization, K.K. and E.V.; writing—original draft preparation, K.K.; writing—review and editing, F.F., A.-C.W., E.V. and A.M.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Research Foundation (DFG), grant number 417069397, as a collaboration project between the Ludwig Maximilians University Munich and the University of Würzburg within the project "Additive manufacturing of personalized bone implants for application in human and veterinary medicine based on calcium magnesium phosphates".

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to paragraph 8 of the German Animal Welfare Act and approved by the regional government of Upper Bavaria (approval number: ROB 55.2-2532.Vet_02-19-64, approval date: 28 August 2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank Beatrix Limmer, Cristiane Meneghelli Rudolph and Lisa Wurm for the excellent technical support and Lisa Wurm additionally for several draft reviews and editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Kolk, A.; Handschel, J.; Drescher, W.; Rothamel, D.; Kloss, F.; Blessmann, M.; Heiland, M.; Wolff, K.-D.; Smeets, R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials–from space holders to innovative biomaterials. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2012, 40, 706–718. [CrossRef]
- 2. Mahendra, A.; Maclean, A. Available biological treatments for complex non-unions. *Injury* 2007, 38, 7–12. [CrossRef]
- 3. Moore, W.R.; Graves, S.E.; Bain, G.I. Synthetic bone graft substitutes. ANZ J. Surg. 2001, 71, 354–361. [CrossRef]
- Laurie, S.W.; Kaban, L.B.; Mulliken, J.B.; Murray, J.E. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast. Reconstr.* Surg. 1984, 73, 933–938. [CrossRef]
- Arrington, E.D.; Smith, W.J.; Chambers, H.G.; Bucknell, A.L.; Davino, N.A. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1996, 329, 300–309. [CrossRef]
- Keating, J.; McQueen, M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J. Bone Jt. Surg. Br.* 2001, 83, 3–8. [CrossRef]
 Lord, C.; Gebhardt, M.; Tomford, W.; Mankin, H. Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment. *J. Bone Jt. Surg.*
- Am. 1988, 70, 369–376. [CrossRef]
 8. Kheirallah, M.; Almeshaly, H. Bone graft substitutes for bone defect regeneration. A collective review. Int. J. Dent. Oral Sci. 2016, 3, 247–257.
- 9. Zimmermann, G.; Moghaddam, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. Injury 2011, 42, 16–21. [CrossRef]
- LeGeros, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. Clin. Orthop. Relat. Res. 2002, 395, 81–98. [CrossRef]
- 11. LeGeros, R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chem. Rev. 2008, 108, 4742-4753. [CrossRef]
- Habibovic, P.; Gbureck, U.; Doillon, C.J.; Bassett, D.C.; van Blitterswijk, C.A.; Barralet, J.E. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 2008, 29, 944–953. [CrossRef]
- 13. Dorozhkin, S.V.; Epple, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002, 41, 3130–3146. [CrossRef]
- 14. Gross, K.A.; Berndt, C.C. Biomedical application of apatites. Rev. Mineral. Geochem. 2002, 48, 631-672. [CrossRef]
- 15. Albee, F.H. Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. Ann. Surg. 1920, 71, 32. [CrossRef]
- 16. Rosen, H.M.; Ackerman, J.L. Porous block hydroxyapatite in orthognathic surgery. Angle Orthod. 1991, 61, 185–191. [CrossRef]
- 17. Constantz, B.R.; Ison, I.C.; Fulmer, M.T.; Poser, R.D.; Smith, S.T.; van Wagoner, M.; Ross, J.; Goldstein, S.A.; Jupiter, J.B.; Rosenthal, D.I. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* **1995**, *267*, 1796–1799. [CrossRef]
- 18. Kamerer, D.; Hirsch, B.; Snyderman, C.; Costantino, P.; Friedman, C. Hydroxyapatite cement: A new method for achieving watertight closure in transtemporal surgery. *Am. J. Otol.* **1994**, *15*, 47–49.
- Bohner, M.; Gbureck, U.; Barralet, J.E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials* 2005, 26, 6423–6429. [CrossRef]
- Kanter, B.; Geffers, M.; Ignatius, A.; Gbureck, U. Control of in vivo mineral bone cement degradation. Acta Biomater. 2014, 10, 3279–3287. [CrossRef]
- 21. Frakenburg, E.P.; Goldstein, S.A.; Bauer, T.W.; Harris, S.A.; Poser, R.D. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. J. Bone Jt. Surg. Am. 1998, 80, 1112–1124. [CrossRef]
- 22. Kurashina, K.; Kurita, H.; Kotani, A.; Takeuchi, H.; Hirano, M. In vivo study of a calcium phosphate cement consisting of αtricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide. *Biomaterials* **1997**, *18*, 147–151. [CrossRef]

- Ambard, A.J.; Mueninghoff, L. Calcium phosphate cement: Review of mechanical and biological properties. J. Prosthodont. 2006, 15, 321–328. [CrossRef]
- 24. Jarcho, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin. Orthop. Relat. Res. 1981, 157, 259–278. [CrossRef]
- Ostrowski, N.; Roy, A.; Kumta, P.N. Magnesium phosphate cement systems for hard tissue applications: A review. ACS Biomater. Sci. Eng. 2016, 2, 1067–1083. [CrossRef] [PubMed]
- Nabiyouni, M.; Brückner, T.; Zhou, H.; Gbureck, U.; Bhaduri, S.B. Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications. Acta Biomater. 2018, 66, 23–43. [CrossRef] [PubMed]
- 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.* 2008, *4*, 1873–1884. [CrossRef] [PubMed]
- Jia, J.; Zhou, H.; Wei, J.; Jiang, X.; Hua, H.; Chen, F.; Wei, S.; Shin, J.-W.; Liu, C. Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. J. R. Soc. Interface 2010, 7, 1171–1180. [CrossRef]
- 29. Landi, E.; Logroscino, G.; Proietti, L.; Tampieri, A.; Sandri, M.; Sprio, S. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 239–247. [CrossRef]
- Rude, R.; Gruber, H.; Wei, L.; Frausto, A.; Mills, B. Magnesium deficiency: Effect on bone and mineral metabolism in the mouse. Calcif. Tissue Int. 2003, 72, 32–41. [CrossRef]
- Wei, J.; Jia, J.; Wu, F.; Wei, S.; Zhou, H.; Zhang, H.; Shin, J.-W.; Liu, C. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials* 2010, *31*, 1260–1269. [CrossRef]
- Ewald, A.; Kreczy, D.; Brückner, T.; Gbureck, U.; Bengel, M.; Hoess, A.; Nies, B.; Bator, J.; Klammert, U.; Fuchs, A. Development and Bone Regeneration Capacity of Premixed Magnesium Phosphate Cement Pastes. *Materials* 2019, 12, 2119. [CrossRef]
- 33. Vorndran, E.; Ewald, A.; Müller, F.A.; Zorn, K.; Kufner, A.; Gbureck, U. Formation and properties of magnesium-ammoniumphosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO4 system. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 429–436. [CrossRef]
- Driessens, F.; Boltong, M.; Bermudez, O.; Planell, J. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: A pilot study. J. Mater. Sci. Mater. Med. 1993, 4, 503–508. [CrossRef]
- Ginebra, M.; Boltong, M.; Driessens, F.; Bermudez, O.; Fernández, E.; Planell, J. Preparation and properties of some magnesiumcontaining calcium phosphate cements. J. Mater. Sci. Mater. Med. 1994, 5, 103–107. [CrossRef]
- 36. Hollier, L.H.; Stal, S. The use of hydroxyapatite cements in craniofacial surgery. *Clin. Plast. Surg.* 2004, *31*, 423–428. [CrossRef]
- Castilho, M.; Moseke, C.; Ewald, A.; Gbureck, U.; Groll, J.; Pires, I.; Tessmar, J.; Vorndran, E. Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. *Biofabrication* 2014, 6, 015006. [CrossRef]
- Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Dean, D.D.; Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials 1996, 17, 137–146. [CrossRef]
- Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005, 26, 5474–5491. [CrossRef] [PubMed]
- Wen, Y.; Xun, S.; Haoye, M.; Baichuan, S.; Peng, C.; Xuejian, L.; Kaihong, Z.; Xuan, Y.; Jiang, P.; Shibi, L. 3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering: A review. *Biomater. Sci.* 2017, *5*, 1690–1698. [CrossRef]
- Golafshan, N.; Vorndran, E.; Zaharievski, S.; Brommer, H.; Kadumudi, F.B.; 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. [CrossRef] [PubMed]
- 42. Young, R.A. The Rietveld Method; Oxford University Press Inc.: New York, NY, USA, 1993.
- Kleer, N.; Julmi, S.; Gartzke, A.-K.; Augustin, J.; Feichtner, F.; Waselau, A.-C.; Klose, C.; Maier, H.; Wriggers, P.; Meyer-Lindenberg, A. Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, in vivo. *Materialia* 2019, *8*, 100436. [CrossRef]
- 44. Diefenbeck, M.; Mückley, T.; Schrader, C.; Schmidt, J.; Zankovych, S.; Bossert, J.; Jandt, K.D.; Faucon, M.; Finger, U. The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8041–8047. [CrossRef]
- 45. Donath, K.; Breuner, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues* The Säge-Schliff (sawing and grinding) Technique. J. Oral Pathol. **1982**, *11*, 318–326. [CrossRef] [PubMed]
- 46. Willbold, E.; Witte, F. Histology and research at the hard tissue–implant interface using Technovit 9100 New embedding technique. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4447–4455. [CrossRef]
- 47. Huehnerschulte, T.A.; Reifenrath, J.; von Rechenberg, B.; Dziuba, D.; Seitz, J.M.; Bormann, D.; Windhagen, H.; Meyer-Lindenberg, A. In vivo assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model. *Biomed. Eng. Online* **2012**, *11*, 14. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, F.; Su, J.; Wei, J.; Guo, H.; Liu, C. Injectable bioactive calcium–magnesium phosphate cement for bone regeneration. *Biomed. Mater.* 2008, *3*, 044105. [CrossRef]
- Le Guehennec, L.; Goyenvalle, E.; Aguado, E.; Houchmand-Cuny, M.; Enkel, B.; Pilet, P.; Daculsi, G.; Layrolle, P. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2005, 72, 69–78. [CrossRef]
 Sillén, L.G.; Martell, A.E.; Bjerrum, J. Stability Constants of Metal-Ion Complexes; The Chemical Society: London, UK, 1964.
- Taylor, A.; Frazier, A.; Gurney, E.; Smith, J. Solubility products of di-and trimagnesium phosphates and the dissociation of magnesium phosphate solutions. *Trans. Faraday Soc.* **1963**, *59*, 1585–1589. [CrossRef]
- Klammert, U.; Vorndran, E.; Reuther, T.; Müller, F.A.; Zorn, K.; Gbureck, U. Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2010, 21, 2947–2953. [CrossRef]

- Gelli, R.; Mati, L.; Ridi, F.; Baglioni, P. Tuning the properties of magnesium phosphate-based bone cements: Effect of powder to liquid ratio and aqueous solution concentration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019, 95, 248–255. [CrossRef] [PubMed]
- 54. Klammert, U.; Ignatius, A.; Wolfram, U.; Reuther, T.; Gbureck, U. In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 3469–3475. [CrossRef]
- Sheikh, Z.; Brooks, P.J.; Barzilay, O.; Fine, N.; Glogauer, M. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials* 2015, *8*, 5671–5701. [CrossRef] [PubMed]
- Xia, Z.; Grover, L.M.; Huang, Y.; Adamopoulos, I.E.; Gbureck, U.; Triffitt, J.T.; Shelton, R.M.; Barralet, J.E. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. *Biomaterials* 2006, 27, 4557–4565. [CrossRef] [PubMed]
- Apelt, D.; Theiss, F.; El-Warrak, A.; Zlinszky, K.; Bettschart-Wolfisberger, R.; Bohner, M.; Matter, S.; Auer, J.; von Rechenberg, B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004, 25, 1439–1451. [CrossRef]
- 58. Theiss, F.; Apelt, D.; Brand, B.; Kutter, A.; Zlinszky, K.; Bohner, M.; Matter, S.; Frei, C.; Auer, J.A.; Von Rechenberg, B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4383–4394. [CrossRef]
- 59. Grover, L.; Knowles, J.; Fleming, G.; Barralet, J. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2003, 24, 4133–4141. [CrossRef]
- 60. Damien, C.J.; Parsons, J.R. Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *J. Appl. Biomater.* **1991**, *2*, 187–208. [CrossRef]
- 61. Ooms, E.; Wolke, J.; Van Der Waerden, J.; Jansen, J. Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement. J. Biomed. Mater. Res. 2002, 61, 9–18. [CrossRef]
- 62. Kim, J.-A.; Lim, J.; Naren, R.; Yun, H.-S.; Park, E.K. Effect of the biodegradation rate controlled by pore structures in magnesium phosphate ceramic scaffolds on bone tissue regeneration in vivo. *Acta Biomater.* **2016**, *44*, 155–167. [CrossRef]
- 63. Chou, S.-Y.; Cheng, C.-M.; LeDuc, P.R. Composite polymer systems with control of local substrate elasticity and their effect on cytoskeletal and morphological characteristics of adherent cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3136–3142. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, C.; Ramaswamy, Y.; Zhu, Y.; Zheng, R.; Appleyard, R.; Howard, A.; Zreiqat, H. The effect of mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug-release properties of poly (DL-lactide-co-glycolide) films. *Biomaterials* 2009, *30*, 2199–2208. [CrossRef] [PubMed]
- 65. von Doernberg, M.-C.; von Rechenberg, B.; Bohner, M.; Grünenfelder, S.; van Lenthe, G.H.; Müller, R.; Gasser, B.; Mathys, R.; Baroud, G.; Auer, J. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* **2006**, *27*, 5186–5198. [CrossRef] [PubMed]
- Klenke, F.M.; Liu, Y.; Yuan, H.; Hunziker, E.B.; Siebenrock, K.A.; Hofstetter, W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. J. Biomed. Mater. Res. Part A 2008, 85, 777–786. [CrossRef] [PubMed]
- Goodyear, S.R.; Aspden, R.M. Mechanical properties of bone ex vivo. *Methods Mol. Biol.* 2012, *816*, 555–571. [CrossRef] [PubMed]
 Torres-Sanchez, C.; McLaughlin, J.; Bonallo, R. Effect of Pore Size, Morphology and Orientation on the Bulk Stiffness of a Porous
- Ti35Nb4Sn Alloy. J. Mater. Eng. Perform. 2018, 27, 2899–2909. [CrossRef] 69. Nielsen, L.F. Strength and stiffness of porous materials. J. Am. Ceram. Soc. 1990, 73, 2684–2689. [CrossRef]
- Nielsen, L.F. Strength and stiffness of porous materials. J. Am. Ceram. Soc. 1990, 73, 2684–2689. [CrossRef]
 Liverani, C.; Mercatali, L.; Cristofolini, L.; Giordano, E.; Minardi, S.; Porta, G.D.; De Vita, A.; Miserocchi, G.; Spadazzi, C.;
- Tasciotti, E.; et al. Investigating the Mechanobiology of Cancer Cell-ECM Interaction Through Collagen-Based 3D Scaffolds. *Cell. Mol. Bioeng.* **2017**, *10*, 223–234. [CrossRef] [PubMed]
- 71. Li, X.; Niu, Y.; Guo, H.; Chen, H.; Li, F.; Zhang, J.; Chen, W.; Wu, Z.; Deng, Y.; Wei, J. Preparation and osteogenic properties of magnesium calcium phosphate biocement scaffolds for bone regeneration. *J. Instrum.* **2013**, *8*, C07010. [CrossRef]
- Chai, Y.C.; Carlier, A.; Bolander, J.; Roberts, S.J.; Geris, L.; Schrooten, J.; Van Oosterwyck, H.; Luyten, F.P. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater.* 2012, *8*, 3876–3887. [CrossRef]
- 73. Dvorak, M.M.; Riccardi, D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* 2004, 35, 249–255. [CrossRef] [PubMed]
- Conrads, K.A.; Yi, M.; Simpson, K.A.; Lucas, D.A.; Camalier, C.E.; Yu, L.R.; Veenstra, T.D.; Stephens, R.M.; Conrads, T.P.; Beck, G.R., Jr. A combined proteome and microarray investigation of inorganic phosphate-induced pre-osteoblast cells. *Mol. Cell. Proteom.* 2005, *4*, 1284–1296. [CrossRef] [PubMed]
- 75. Wu, L.; Feyerabend, F.; Schilling, A.F.; Willumeit-Römer, R.; Luthringer, B.J. Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture. *Acta Biomater.* 2015, 27, 294–304. [CrossRef] [PubMed]
- 76. He, L.; Zhang, X.; Liu, B.; Tian, Y.; Ma, W. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2016, 49, e5257. [CrossRef]
- 77. Cecchinato, F.; Karlsson, J.; Ferroni, L.; Gardin, C.; Galli, S.; Wennerberg, A.; Zavan, B.; Andersson, M.; Jimbo, R. Osteogenic potential of human adipose-derived stromal cells on 3-dimensional mesoporous TiO2 coating with magnesium impregnation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2015, *52*, 225–234. [CrossRef] [PubMed]
- 78. Kanter, B.; Vikman, A.; Brückner, T.; Schamel, M.; Gbureck, U.; Ignatius, A. Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model. *Acta Biomater.* **2018**, *69*, 352–361. [CrossRef]
- Ibrahim, N.; Parsa, A.; Hassan, B.; van der Stelt, P.; Aartman, I.H.; Wismeijer, D. Accuracy of trabecular bone microstructural measurement at planned dental implant sites using cone-beam CT datasets. *Clin. Oral Implant. Res.* 2014, 25, 941–945. [CrossRef] [PubMed]
Materials 2021, 14, 946

- Issever, A.S.; Link, T.M.; Kentenich, M.; Rogalla, P.; Burghardt, A.J.; Kazakia, G.J.; Majumdar, S.; Diederichs, G. Assessment of trabecular bone structure using MDCT: Comparison of 64-and 320-slice CT using HR-pQCT as the reference standard. *Eur. Radiol.* 2010, 20, 458–468. [CrossRef] [PubMed]
- Hulbert, S.; Young, F.; Mathews, R.; Klawitter, J.; Talbert, C.; Stelling, F. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. J. Biomed. Mater. Res. 1970, 4, 433–456. [CrossRef]
- Travlos, G.S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.* 2006, 34, 548–565. [CrossRef] [PubMed]
- Höh, N.V.D.; Bormann, D.; Lucas, A.; Denkena, B.; Hackenbroich, C.; Meyer-Lindenberg, A. Influence of different surface machining treatments of magnesium-based resorbable implants on the degradation behavior in rabbits. *Adv. Eng. Mater.* 2009, 11, B47–B54. [CrossRef]
- Xu, L.; Yu, G.; Zhang, E.; Pan, F.; Yang, K. In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. J. Biomed. Mater. Res. Part A 2007, 83, 703–711. [CrossRef] [PubMed]
- Zhang, E.; Xu, L.; Yu, G.; Pan, F.; Yang, K. In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. J. Biomed. Mater. Res. Part A 2009, 90, 882–893. [CrossRef] [PubMed]

25 of 25

58

2. Publikation II

Das Paper "Comparison of degradation behavior and osseointegration of 3D powder-printed calcium magnesium phosphate cement scaffolds with alkaline or acid post-treatment" von Kowalewicz et al. wurde am 05.September 2022 zur Publikation in dem Research Topic "Advanced Biomaterials and 3D Printing Technologies in Bone Repair" der Sektion "Biomaterials" des Journals "Frontiers in Bioengineering and Biotechnology" akzeptiert und am 28.September 2022 online publiziert.

Comparison of degradation behavior and osseointegration of 3D powderprinted calcium magnesium phosphate cement scaffolds with alkaline or acid post-treatment

Katharina Kowalewicz, Anja-Christina Waselau, Franziska Feichtner, Anna-Maria Schmitt, Manuel Brückner, Elke Vorndran, Andrea Meyer-Lindenberg

Front. Bioeng. Biotechnol. 10:998254 DOI: 10.3389/fbioe.2022.998254 Frontiers | Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

TYPE Original Research PUBLISHED 28 September 2022 DOI 10.3389/fbioe.2022.998254

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY Chunguang Yang, Institute of Metal Research (CAS), China

REVIEWED BY Wei-Jen Chang, Taipei Medical University, Taiwan Nils-Claudius Gellrich, Hannover Medical School, Germany Yonggang Yan, Sichuan University, China

*CORRESPONDENCE Andrea Meyer-Lindenberg, Andrea.Meyer-Lindenberg@ chir.vetmed.uni-muenchen.de

SPECIALTY SECTION This article was submitted to Biomaterials,

a section of the journal Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

RECEIVED 19 July 2022 ACCEPTED 05 September 2022 PUBLISHED 28 September 2022

CITATION

Kowalewicz K, Waselau A-C, Feichtner F, Schmitt A-M, Brückner M, Vorndran E and Meyer-Lindenberg A (2022), Comparison of degradation behavior and osseointegration of 3D powder-printed calcium magnesium phosphate cement scaffolds with alkaline or acid post-treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10:998254. doi: 10.3389/fbioe.2022.998254

COPYRIGHT

© 2022 Kowalewicz, Waselau, Feichtner, Schmitt, Brückner, Vorndran and Meyer-Lindenberg. This is an openaccess article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Comparison of degradation behavior and osseointegration of 3D powder-printed calcium magnesium phosphate cement scaffolds with alkaline or acid post-treatment

Katharina Kowalewicz¹, Anja-Christina Waselau¹, Franziska Feichtner¹, Anna-Maria Schmitt², Manuel Brückner², Elke Vorndran² and Andrea Meyer-Lindenberg¹*

¹Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany, ²Department for Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Due to the positive effects of magnesium substitution on the mechanical properties and the degradation rate of the clinically well-established calcium phosphate cements (CPCs), calcium magnesium phosphate cements (CMPCs) are increasingly being researched as bone substitutes. A post-treatment alters the materials' physical properties and chemical composition, reinforcing the structure and modifying the degradation rate. By alkaline post-treatment with diammonium hydrogen phosphate (DAHP, $(NH_4)_2HPO_4$), the precipitation product struvite is formed, while post-treatment with an acidic phosphate solution [e.g., phosphoric acid (PA, H₃PO₄)] results in precipitation of newberyite and brushite. However, little research has yet been conducted on newberyite as a bone substitute and PA post-treatment of CMPCs has not been described in the accessible literature so far. Therefore, in the present study, the influence of an alkaline (DAHP) or acid (PA) post-treatment on the biocompatibility, degradation behavior, and osseointegration of cylindrical scaffolds (h = 5.1 mm, $\emptyset = 4.2 \text{ mm}$) produced from the ceramic cement powder Ca0 75 Mg2 25 (PO4)2 by the advantageous manufacturing technique of three-dimensional (3D) powder printing was investigated in vivo. Scaffolds of the material groups Mg225d (DAHP post-treatment) and Mg225p (PA posttreatment) were implanted into the cancellous part of the lateral femoral condyles in rabbits. They were evaluated up to 24 weeks by regular clinical, X-ray, micro-computed tomographic (µCT), and histological examinations as well as scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis and compared with tricalcium phosphate (TCP). All materials showed excellent biocompatibility and rapid osseointegration. While TCP degraded only slightly, the CMPCs showed almost complete degradation. Mg225d demonstrated significantly faster loss of form and demarcability from surrounding bone, scaffold volume reduction, and significantly greater degradation on the side towards the bone marrow than

10.3389/fbioe.2022.998254

to the cortex than Mg225p. Simultaneously, numerous bone trabeculae have grown into the implantation site. While these were mostly located on the side towards the cortex in Mg225d, they were more evenly distributed in Mg225p and showed almost the same structural characteristics as physiological bone after 24 weeks in Mg225p. Based on these results, the acid post-treated 3D powder-printed Mg225p is a promising degradable bone substitute that should be further investigated.

KEYWORDS

stanfieldite, farringtonite, newberyite, 3D powder printing, scaffold, biocompatibility, osseointegration, degradable bone substitute

1 Introduction

Bone substitutes are needed for the reconstruction of large bone defects that occur for example due to trauma, tumors, infections or congenital defects (Kheirallah and Almeshaly, 2016). Due to a longer life expectancy, there is a sharp increase in musculoskeletal diseases such as osteoporosis, bone infections or metastases and fractures, leading to an increase in bone-related medical treatments (Agarwal and García, 2015). Autografts are still the gold standard in the surgical management of critical size bone defects (Kolk et al., 2012). However, natural bone substitutes do not apply to all types of bone defects and carry various risks such as donor site infections or additional trauma in autografts and allografts (Laurie et al., 1984; Arrington et al., 1996) as well as rejection of the implanted material or transmission of diseases through allografts and xenografts (Keating and McQueen, 2001; Campana et al., 2014). Due to these disadvantages, there has been constant research into the development of synthetic bone substitutes in recent years, which have the advantages of defined porosity and chemical composition, precision-fit for any bone defect, sterility and unlimited availability (Zimmermann and Moghaddam, 2011; Kolk et al., 2012; Kheirallah and Almeshaly, 2016). Synthetic bone substitutes exist in various application forms such as granules, scaffolds, blocks or injectable pastes (Fillingham and Jacobs, 2016; Kheirallah and Almeshaly, 2016).

For the production of three-dimensional (3D), dimensionally stable bone substitutes, various additive manufacturing techniques are currently being investigated (Castilho et al., 2014a; Roseti et al., 2017). Using medical imaging data [e.g., computed tomography (CT)] or computer-aided design (CAD) models, the precision-fit production of patient specific implants is possible, which is particularly advantageous in case of large and anatomically complex bone defects (Peters et al., 2006; Castilho et al., 2014a; Castilho et al., 2014b; Brunello et al., 2016; Roseti et al., 2017; Zhang et al., 2019). 3D powder printing has emerged as a promising additive manufacturing technique with great potential for the layer-by-layer production of individual synthetic bone substitutes (Vorndran et al., 2008; Castilho et al., 2014a; Roseti et al., 2017). Raw materials are for example calcium phosphate (CaP), magnesium phosphate (MgP) or calcium magnesium phosphate (CaMgP) cement powders (Klammert et al., 2010b; Castilho et al., 2014b; Kowalewicz et al., 2021). Due to the high printing accuracy of 3D powder printing, dimensionally stable objects with specifically adjustable macro- and microstructure can be optimally produced, allowing the best possible adjustment of the scaffold properties to the tissue type to be replaced and therefore causing an optimal cell reaction *in vivo* (Castilho et al., 2014b; Brunello et al., 2016; Zhang et al., 2019). 3D powderprinted scaffolds also have a high microporosity (up to more than 30 vol%) (Castilho et al., 2014b), which promotes nutrient diffusion, vascularization of the scaffold and cell ingrowth (Boyan et al., 1996; Karageorgiou and Kaplan, 2005).

The ideal synthetic bone graft substitute is biocompatible, has similar mechanical properties as bone and undergoes physicochemical as well as cellular degradation while being replaced by newly formed bone (Moore et al., 2001; Kolk et al., 2012). Due to the similarity of their chemical composition to the mineral phase of bone, an excellent biocompatibility as well as osteoconductive and in some cases even osteoinductive properties, CaPs represent the currently favored synthetic bone substitutes (Dorozhkin and Epple, 2002; Gross and Berndt, 2002; LeGeros, 2002; Habibovic et al., 2008; LeGeros, 2008; Bohner et al., 2020). The majority of CaP bioceramics are chemically based on hydroxyapatite (HA), both types of tricalcium phosphate (a-TCP, ß-TCP) and/or their multiphase formulations (Dorozhkin, 2013). Calcium phosphate cements (CPCs) have been commercially available for years and are clinically applied as solids and cement pastes (Dorozhkin, 2008; Rentsch et al., 2012; Lodoso-Torrecilla et al., 2021). However, many CPCs, like most CaPs, have the disadvantage of incomplete degradation over months to years due to a low solubility under physiological conditions (Kurashina et al., 1997; Frakenburg et al., 1998; Bohner et al., 2003; Ambard and Mueninghoff, 2006; Kanter et al., 2014). The wider clinical application of these cements is also limited by their mechanical properties, as CPCs are brittle, have low impact resistance, and variable compressive strengths (Ambard and Mueninghoff, 2006; Dorozhkin, 2008). Magnesium phosphate cements (MPCs) have a higher compressive strength and, due to their higher solubility, exhibit a greater chemical degradation potential than CPCs, which is associated with faster in-vivo resorption and higher bone ingrowth,

qualifying them as a suitable alternative bone substitute (Mestres and Ginebra, 2011; Ostrowski et al., 2016; Nabiyouni et al., 2018; Haque and Chen, 2020; Gefel et al., 2022). However, unlike CPCs, the biomedical application of MPCs has hardly been investigated so far. It is therefore reasonable to combine the MPCs with their superior biological properties with the well-established CPCs (Ostrowski et al., 2016; Nabiyouni et al., 2018). Several studies have shown that calcium magnesium phosphate cements (CMPCs) exhibit improved biological properties as bone substitutes than the single components and an excellent biocompatibility, good and increasing osseointegration, fast degradation, and rapid replacement by newly formed trabecular bone have been described (Wu et al., 2008a; Wu et al., 2008b; Klammert et al., 2010a; Jia et al., 2010; Wei et al., 2010; Vorndran et al., 2011; Zeng et al., 2012; Ewald et al., 2019; Fuchs et al., 2021).

In a previous short-term in-vivo study by Kowalewicz et al. (2021), CMPC scaffolds fabricated with the advantageous production method of 3D powder printing have yet been investigated and especially the alkaline (diammonium hydrogen phosphate, DAHP) post-treated material Mg225d showed promising initial results regarding degradation and osseointegration. Besides post-treatment with DAHP, which results in precipitation of struvite and has yet also been investigated in vivo for CMPC pastes or granules by other authors (Ewald et al., 2019; Fuchs et al., 2021), the posttreatment can also be carried out with an acidic phosphate solution (Klammert et al., 2010a; Klammert et al., 2011; Gefel et al., 2022), resulting in precipitation of newberyite and brushite. However, newberyite has been little researched as bone substitute so far and there is no accessible literature available on the posttreatment of CMPCs with phosphoric acid (PA). Therefore, the aim of the present study was the development, characterization, and first in-vivo long-term investigation of 3D powder-printed CMPC scaffolds with different physical and chemical properties due to alkaline (DAHP) or acid (PA) post-treatment. The two CMPC material groups Mg225d (DAHP post-treatment) and Mg225p (PA post-treatment) were compared with each other. TCP scaffolds served as reference. For 6, 12, and 24 weeks, respectively, the influence of the different post-treatments on biocompatibility, degradation, and osseointegration behavior of the cylindrical scaffolds was evaluated in a non-weight-bearing borehole defect in the cancellous part of the lateral femoral condyles in rabbits.

2 Materials and methods

2.1 Production and characterization of the scaffolds

2.1.1 Production of the scaffolds

Raw material for the production of the cylindrical CMPC scaffolds (h = 5.1 mm, $\emptyset = 4.2 \text{ mm}$) was the ceramic cement powder Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂. Reference implants with the same

10.3389/fbioe.2022.998254

dimensions were made of tricalcium phosphate (TCP, Ca₃(PO₄)₂) cement (Figure 1A). Therefore, mixtures of calcium hydrogen phosphate (CaHPO₄, J.T. Baker, Philippsburg, United States), calcium carbonate (CaCO₃, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), magnesium hydrogen phosphate (MgHPO4·3H2O, Alfa Aesar, Kandel, Germany), and magnesium hydroxide (Mg(OH)₂, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) were prepared in specific molar ratios (Table 1). These powder mixtures were sintered, ground to powders with a particle size <355 µm using a ball mill, and mixed with 4 wt% hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) before processing in powder printing (Kowalewicz et al., 2021). The scaffolds were fabricated using a 3D powder printer (ZP310, ZCorp., Burlington, United States) (Kowalewicz et al., 2021). After depowdering of the scaffolds with compressed air, the scaffolds underwent a heat treatment to compact the ceramic and burn out the HPMC, which included a debinding step at 500°C for 2 h and a phase-dependent final sintering temperature. Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂ scaffolds were sintered at a final temperature of 1,100°C for 4 h, while TCP scaffolds were sintered at 1,350°C for 4 h. After this sintering process, a second sintering of TCP was performed at 1,000°C for 4 h in order to increase the conversion rate of a-TCP into B-TCP.

The CMPC scaffolds were then divided into two material groups, which were subjected to different post-treatments. Both post-treatment variants were carried out at room temperature. One half of the scaffolds (Mg225d) received post-treatment by immersion (24 h) in an aqueous diammonium hydrogen phosphate solution (3.5 M DAHP, (NH₄)₂HPO₄, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), the other half (Mg225p) was completely infiltrated four times with a phosphoric acid solution (2.0 M PA, (H₃PO₄, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The infiltrations with PA were done with a sufficient amount of liquid (100-160 µl PA per scaffold) to completely fill the pores and the scaffolds were dried at room temperature for 24 h after each infiltration. The post-treated scaffolds were washed in distilled water for 1 h and in phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 10 min. For this purpose, the scaffolds were placed in a Petri dish, completely covered with the washing medium and placed on a rocking table for uniform mixing of the medium.

Before implantation, all scaffolds were γ -sterilized by BBF Sterilisationsservice GmbH (Kernen, Germany) with a radiation of >25 kGy.

2.1.2 Physical and chemical properties of the scaffolds

The compressive strength was measured using a static universal testing machine (Z010, Zwick GmbH, Ulm, Germany). For this purpose, the post-treated scaffolds (n =14 per material), which had been stored in PBS for 1 h, were measured in a wet condition with a 10 kN load cell, at a pre-load of 1 N and a test speed of 1 mm/min.

10.3389/fbioe.2022.998254



TABLE 1 Powder synthesis: Composition of the cement powders and sintering temperature of the raw powders.

Cement powder	Raw materia	l (mol)	Sintering temperature (°C)		
	CaHPO ₄	CaCO ₃	$MgHPO_4\cdot 3H_2O$	Mg(OH) ₂	
Ca _{0.75} Mg _{2.25} (PO ₄) ₂	0.50	0.25	1.50	0.75	1,100
$Ca_3(PO_4)_2$	2.00	1.00	_	_	1,350

Open porosity and pore size distribution were determined on three scaffolds per material type using a mercury porosimeter (Pascal 140/440, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States). For each measurement, an entire cylindrical scaffold was used. Porosity was measured in a pressure range from 0.01 kPa to 400 MPa and data was analyzed using the software SOLID (SOLver of Intrusion Data Ver. 1.6.5, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, United States).

The chemical composition of the post-treated and sterile scaffolds was determined by X-ray powder diffraction and Rietveld analysis. For qualitative phase composition, three scaffolds per material type were ground into powder and each powder was analyzed individually using the Bruker Corporations D8 Advance X-ray diffractometer (Bruker Corporations, Karlsruhe, Germany) with monochromatic radiation (λ = 1.541 Å). The measurement was performed in the scan type locked coupled, within a 20-angular range of 10-40° with an increment of 0.02°, a measurement speed of 0.5 s/step, and under rotation of the measurement cuvette of 15 rpm. The following reference files from the JCPDS database were used for analysis: ß- $Ca_3(PO_4)_2$ (ß-tricalcium phosphate, PDF Ref. 09-0169), $\alpha\text{-}$ Ca₃(PO₄)₂ (a-tricalcium phosphate, PDF Ref. 09-0348), Mg₃(PO₄)₂ (farringtonite; PDF Ref. 33-0876), MgHPO₄·3H₂O (newberyite, PDF Ref. 35-0780), Ca4Mg5(PO4)6 (stanfieldite; PDF Ref. 11-0231), and NH4MgPO4·6H2O (struvite, PDF Ref. 15-0762). Using the Rietveld method (Rietveld, 1969; Reid and Hendry, 2006), a quantitative phase analysis was carried out. Bruker Corporations' TOPAS V6 software (Bruker Corporations, Billerica, MA, United States) was used to perform this analysis.

2.1.3 Scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy analysis of the scaffolds before implantation

For SEM (scanning electron microscopy) and EDX (energy dispersive X-ray spectroscopy) analysis, the scaffolds were fixed in 4% buffered formalin solution (Roth, Karlsruhe, Germany), dehydrated in an ascending series of alcohol (Roth, Karlsruhe, Germany) and defatted with xylene (Roth, Karlsruhe, Germany). Embedding was performed with a resin embedding system based on methyl methacrylate (Technovit® 9100, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. After polymerization, thin sections (thickness = $4 \mu m$, n = 1 per material) were prepared using an automatic rotary microtome (RM2255 Leica, Wetzlar, Germany). After transfer to a water bath, the thin sections were mounted on glass slides (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Germany) coated with ponal-poly-L-lysine. They were then stretched with 96% ethanol, covered with a polyethylene film (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) and dried in a slide press at 37°C for 2 days. Prior to SEM with a field emission electron microscope (Crossbeam CB 340, Zeiss, Oberkochen, Germany), the thin sections were coated with platinum (thickness = 4 nm) using a sputter coater (Leica EM ACE600, Leica Mikrosysteme GmbH,

10.3389/fbioe.2022.998254

Wetzlar, Germany). For EDX imaging, a system with silicon drift detector (INCA Energy 350 AzTec Advanced system with silicon drift detector) from Oxford Instruments, Abingdon, United Kingdom was used. Using an accelerating voltage of 5-10 keV, the scaffolds were examined at a magnification of $\times 24$ and $\times 100$. SEM was used to assess the surface texture and pore structure of the scaffolds, while EDX was used to analyze the distribution of chemical phases based on the occurrence of magnesium (Mg), calcium (Ca) and phosphorus (P).

2.2 Animal model

The animal experiment was approved by the competent authority (Government of Upper Bavaria) according to paragraph 8 of the German Animal Welfare Act (approval number ROB 55.2-2532.Vet_02-19-64). For this study, 36 female adult Zika rabbits (Asamhof, Kissing, Germany) weighing 4.26 ± 0.27 kg were divided into three groups with an observation period of 6, 12 and 24 weeks post-surgery, respectively. According to a fixed implantation scheme, eight scaffolds per material (Mg225d, Mg225p, TCP) and time group were implanted and examined.

The implantation of the scaffolds into the lateral femoral condyles of both hind limbs was performed following a previous study by Kowalewicz et al. (2021). The animals received enrofloxacin (10 mg/kg, Orniflox®, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) as antibiotic and meloxicam (0.3 mg/kg, Melosus[®], Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) as analgesic per os prior to surgery. Induction of anesthesia was performed by intramuscular application of ketamine (15 mg/kg, Aneskin®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and medetomidine (0.25 mg/kg, Dorbene vet[®], Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany). The airways were secured by endotracheal intubation and the animals were placed in supine position after shaving and aseptic preparation of the surgical area. Anesthesia was maintained by inhalation of isoflurane (1.5-2 vol%, simultaneously supply of oxygen 1 L/min). During surgery, the rabbits received 10 µg/kg/h fentanyl intravenously (Fentadon[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) as pain medication.

Surgical access was performed through a skin incision in the area of the right lateral femoral condyle. After dissection of the muscles and visualization of the condyle using a raspatory, an approximately 5 mm deep hole was drilled in the cancellous part of the condyle directly above the attachment of the lateral collateral ligament. The cylindrical scaffold was inserted accurately into the borehole (Figure 1B). Wound closure of the soft tissue (Monosyn 4/0, B. Braun SE, Melsungen, Germany) and the skin (Optilene 4/0, B. Braun SE, Melsungen, Germany) was performed. After completion of the surgical procedure on the first side, the animals received

intravenous buprenorphine (20 μ g/kg, Bupresol^{*}, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) for pain management. The contralateral femur was operated using the same surgical procedure. Immediately after surgery, an *in-vivo* micro-computed tomographic (μ CT) examination (see Section 2.4) was performed of both hindlimbs, and radiographs (see Section 2.3) were obtained in two views. Finally, medetomidine was antagonized by intramuscular application of atipamezole (25 mg/kg, Atipam^{*}, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany).

During the first 14 days after surgery, the animals were clinically and orthopedically examined daily, especially with regard to lameness and pain, and a daily wound assessment was performed. For 5 days, the animals received enrofloxacin (10 mg/kg, Orniflox[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) as antibiotic and meloxicam (0.3 mg/kg, Melosus®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) for pain management per os once daily. At fixed time points (6, 12, and 24 weeks after surgery, respectively), euthanasia of the animals was carried out in accordance with animal welfare regulations by intravenous application of propofol (5 mg/kg, Narcofol*, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) and pentobarbital (200-230 mg/kg, Narkodorm[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany). The femora were collected and adherent soft tissue was removed. The scaffold-bone-complexes were extracted using a diamond band saw (cut-grinder, Walter Messner GmbH, Oststeinbek, Germany).

2.3 X-ray examination

Immediately after surgery and at predefined time points (every 2 weeks until week 12, hereinafter every 4 weeks until week 24), a radiological examination of the rabbits' hind limbs was performed in two views [ventrodorsal (VD), mediolateral (ML)]. The examinations were conducted with the settings 54.9 kV and 4.5 mA (Multix Select DR, Siemens GmbH, Erlangen, Germany). Using the software dicomPACS[®] vet (Ver.8.9.5, Oehm und Rehbein GmbH, Rostock, Germany), the visibility of the scaffolds in the different X-ray views was assessed by two observers.

2.4 In-vivo µCT examination

Immediately after surgery and at the same predefined time points as the radiological examinations, the lateral femoral condyles of the rabbits were examined in an *in-vivo* μ CT (Xtreme CT II, Scanco Medical, Zurich, Switzerland). The scans were performed with the settings 30.3 μ m isotropic voxel size, 68 kV voltage, 1,000/180° projections, and 200 ms integration time. For this purpose, the rabbits were placed in supine position with stretched hindlimbs. For the scan immediately after surgery, anesthesia was maintained with tea

10.3389/fbioe.2022.998254

isoflurane (0.8–1.0 vol%, simultaneously oxygen supply 1.5-2 L/min). For the subsequent scans, anesthesia was induced as for surgery. Due to the shorter duration of anesthesia, the animals were not intubated for these scans but received oxygen (1.5–2 L/min) via a laryngeal mask (v-gel[®] rabbit, Docsinnovent Ltd., London, United Kingdom).

2.4.1 Semi-quantitative evaluation of *in-vivo* µCT scans

With a special modified scoring system (Kowalewicz et al., 2021), the following parameters were assessed by two observers: Scaffold demarcability based on gray value and structure, degradation properties, loss of cylindrical form, occurrence and distinctivity of a resorption zone (area within the scaffold volume characterized by a markedly lower gray value than the scaffold material), and scaffoldbone-contact. Score values from 0–2 were assigned for each parameter examined (Table 2). To obtain the cross-sectional view of the scaffolds with surrounding cancellous bone, it was necessary to rotate the original scan using the software μ CT Evaluation Program V6.6 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland).

2.4.2 Quantitative evaluation of *in-vivo* µCT scans

To calculate various degradation and osseointegration parameters, it was necessary to define material-specific thresholds. The following thresholds (Th) were established by assessing the grey values of the different scaffolds in the scans directly after surgery (n =6 per material): Mg225d: 140, Mg225p: 149, TCP: 219. For cancellous bone at the same location, the Th 142 was determined using μ CT scans of both lateral femoral condyles of adult Zika rabbit cadavers (n = 4) with intact femurs. Scaffold volume (SV) and scaffold surface area to volume ratio (SS/SV) were calculated following the studies of Kowalewicz et al. (2021), Augustin et al. (2020), and Kleer et al. (2019) in a region of interest (ROI) in the scaffold center. This ROI included a cylinder with a diameter of 140 voxels (\triangleq 4.24 mm) and a height of 60 slices (≙1.82 mm) (Figures 1C,D). Bone volume (BV), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular separation (Tb.Sp) in the scaffold environment were calculated also based on the studies of Kowalewicz et al. (2021), Augustin et al. (2020) and Kleer et al. (2019) in a second hollow cylindrical ROI (inner ring: $\emptyset = 144$ voxel ($\triangleq 4.36$ mm), outer ring: $\emptyset = 180$ voxel $(\triangleq 5.45 \text{ mm})$, height = 60 slices) (Figure 1E). To establish reference values for cancellous bone, the cancellous part of both femoral condyles of cadavers of adult Zika rabbits (n = 4) with intact femora was examined. All calculations were performed using the software µCT Evaluation Program V6.6 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland).

2.5 µCT 80 examination

After euthanasia of the animals and extraction of the scaffold-bone-complexes, these were processed as described

10.3389/fbioe.2022.998254

TABLE 2 Scoring system for the semi-quantitative evaluation of the in-vivo µCT scans.

Parameter	Score 0	Score 1	Score 2
Scaffold demarcability (based on grey value and density/structure)	Scaffold not demarcable from surrounding bone tissue	Scaffold partially demarcable from surrounding bone tissue	Scaffold completely demarcable from surrounding bone tissue
Degradation properties	Scaffold uniformly degraded	Scaffold half close to the bone marrow more degraded	Scaffold half close to the bone marrow no longer visible
Loss of form	Cylindrical form no longer recognizable	Cylindrical form partially recognizable	Cylindrical form clearly recognizable
Distinctivity of a resorption zone (area within the scaffold volume with a markedly darker gray value than the scaffold material)	No resorption zone distinctive	Resorption zone indistinctly delineated	Resorption zone distinctly delineated
Scaffold-bone-contact	Broad contact area between scaffold and bone, numerous bone trabeculae on scaffold, no gap visible	Multiple bone trabeculae between scaffold and surrounding bone, barely visible gap	No contact between scaffold and surrounding bone, clear gap between bone and scaffold

TABLE 3 Scoring system for the semi-guantitative evaluation of the µCT 80 scans.

Parameter	Score 0	Score 1	Score 2
Trabecular structures in the scaffold volume: Cross-sectional view	Numerous trabecular structures visible up to the center of the scaffold radius	Trabecular structures visible in $>50\%$ of the scaffold radius, not extending to the center	Trabecular structures visible in the outer $<50\%$ of the scaffold radius
Trabecular structures in the scaffold volume: Longitudinal view	Trabecular structures throughout the scaffold volume	Amount of trabecular structures close to the cortex markedly larger than close to the bone marrow	Trabeculae mainly located close to the cortex, few trabeculae close to the bone marrow

previously in Section 2.1.3. After polymerization, the sample blocks were scanned using a μ CT 80 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland). The scans were performed with settings of 10 μ m isotropic voxel size, 70 kV voltage and 600 ms integration time.

2.5.1 Semi-quantitative evaluation of μCT 80 scans

Using a scoring system developed for this study, the occurrence and location of trabecular structures in cross and longitudinal section of the scaffold volume were assessed in the complete scan by two observers. Score values from 0–2 were assigned for both parameters examined (Table 3).

2.5.2 Quantitative evaluation of µCT 80 scans

Trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular separation (Tb.Sp) were measured within a defined cylindrical ROI in the scaffold center [h = 182 voxels ($\triangleq 1.82$ mm), $\emptyset = 424$ voxels ($\triangleq 4.24$ mm)]. Eight scans per material were used to determine the Ths for cancellous bone (144–235). Reference values for cancellous bone at the same location were determined using scans of eight lateral femoral condyles from adult Zika rabbit cadavers with intact femora. All calculations were performed using the software μ CT Evaluation Program V6.6 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland).

2.6 Histological examination

Thick sections (thickness = $40 \,\mu$ m) of the embedded scaffoldbone-complexes were produced according to the cutting-grinding technique of Donath and Breuner (1982) using a diamond band saw (cut-grinder, Walter Messner GmbH, Oststeinbek, Germany) and a grinding machine (lap-grinder, Walter Messner GmbH, Oststeinbek, Germany). A central section of each implanted scaffold was routinely stained with toluidine blue (0.1% toluidine blue O solution, Waldeck, Münster, Germany) (Willbold and Witte, 2010; Huehnerschulte et al., 2012). The longitudinal axis of the cylinder was perpendicular to the cutting surface. The μ CT 80 scans were used to determine the scaffold position within the condyle.

2.6.1 Semi-quantitative evaluation of histological sections

The stained histological sections were assessed by two observers using a microscope (Zeiss Axio Imager Z.2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Following von Doernberg et al. (2006), the implantation area was divided into three ROIs at ×25 magnification using three rings (IR = inner ring, MR = medial ring, OR = outer ring), with the diameter of the OR (\emptyset = 4.24 mm) corresponding to the scaffold diameter (Figure 1F). In each ROI, a scoring system modified according to von Doernberg et al. (2006), Kleer-Reiter et al. (2021) and

TABLE 4 Scoring system for the semi-quantitative histological evaluation of tissue and cells.

Parameter	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Tissue level				
Scaffold material	0%	1%-25%	26%-50%	>50%
Scaffold material enclosed by bone	0%	1%-25%	26%-50%	>50%
New bone (thin trabeculae, dark blue colored)	0%	1%-25%	26%-50%	>50%
Remodeled bone (trabecular thickness as in environment, light blue colored)	0%	1%-25%	26%-50%	>50%
Granulation tissue/bone marrow	0%	1%-25%	26%-50%	>50%
Cell-rich resorption zone (fibrous tissue)	0%	1%-25%	26%-50%	>50%
Cell level				
Tissue ingrowth				
Fibrous cells/tissue	None/physiological for bone marrow	Slightly increased	Medium increased	Highly increased
Adipocytes	None	Few	Moderate	Many
Precursor cells (bone marrow activity)	None	Few	Moderate	Many
Vascularization ^a (blood vessels)	None	Few	Moderate	Many
Foreign body reaction				
Macrophages ^b	None	Few	Moderate	Many
Foreign body cells ^b	None	Few	Moderate	Many
Bone tissue and cells				
Osteoblasts ^b	None	Few	Moderate	Many
Osteoclasts ^b	None	Few	Moderate	Many
Osteoid	None	Sporadic	Thin layer	Thick layer

^aNone = 0, Few = 1–3, Moderate = 4–6, Many = 7+ blood vessels.

^bNone = 0, Few = 1–5, Moderate = 6–10, Many = 10+ cells.

Augustin et al. (2022) was used to assess in the initial scaffold cross section the percentage area of scaffold material, bone, granulation tissue/bone marrow and resorption zone (celland connective tissue-rich annular zone within the scaffold cross section) as well as the percentage of scaffold material enclosed by bone (Table 4). In each ROI, a second scoring system (Table 4) was used to evaluate the ingrowing tissue at cellular level (fibrous cells/tissue, adipocytes, precursor cells, vascularization/blood vessels, macrophages, foreign body cells (FBC), osteoblasts, osteoclasts, osteoid) in a field of view with fixed position at $\times 100$ magnification. Score values from 0–3 were assigned for each parameter examined (Table 4).

2.6.2 Quantitative evaluation (histomorphometry)

In addition to the semi-quantitative analysis, the thick sections from the scaffold center were quantitatively analyzed by histomorphometry. For this purpose, images of the cross sections (Zeiss Axio Imager 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) were taken at ×20 magnification using the Zeiss Axio Cam Mrc digital camera and the software Zeiss ZEN 3.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). The images were evaluated using the software Zeiss ZEN 3.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). The percentage area of scaffold material, ingrown bone tissue, and soft tissue (granulation tissue, bone marrow) was measured within a predefined circle ($\emptyset = 1,060$ pixels \triangleq diameter of the OR of the semiquantitative examination ($\emptyset = 4.24$ mm) \triangleq scaffold diameter), which was placed centrally around the initial implantation area.

2.7 SEM and EDX analysis of the unstained histological sections

Histological thin sections (n = 2 per material and time group) were prepared and examined by SEM and EDX analysis as previously described in Section 2.1.3. The scaffold center was examined with a magnification of ×28 and ×500. In SEM, the osseointegration of the scaffolds was assessed morphologically based on the surface texture of the thin sections, while in EDX, the presence of material particles was determined based on the occurrence of magnesium ions (CMPCs).

2.8 Statistics

Statistical analysis of the compressive strength and porosity of the scaffolds was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test using Origin

10.3389/fbioe.2022.998254



FIGURE 2

(A–C) Porosity, pore diameter and relative pore volume of (A) Mg225d, (B) Mg225p and (C) TCP. (D–F) SEM analysis (x24 magnification) of a (D) Mg225d, (E) Mg225d, (E) Mg225p and (F) TCP scaffold prior to implantation with (G–I) x100 magnification from the scaffold center of (G) Mg225d, (H) Mg225p and (I) TCP. (D–I) Dark gray areas: pores, light gray areas: scaffold material. (J–L) EDX analysis from the scaffold center of (J) Mg225d, (K) Mg225p and (L) TCP prior to implantation with the same position and magnification as (G–I).

(OriginPro 2022, OriginLab, Northampton, MA, United States). The collected *in-vivo* data were analyzed with SPSS Statistics 26 (IBM Company, Armonk, United States). Using the Shapiro–Wilk test, data were tested for normal

distribution. Normally distributed data were analyzed using analysis of variance (ANOVA followed by Tukey post hoc test/ Welch-ANOVA followed by Games–Howell post-hoc test). For non-normally distributed data, testing for significant

10.3389/fbioe.2022.998254

differences was done using Kruskal–Wallis test with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test. A significance level of p < 0.05 was set for all tests.

3 Results

3.1 Characterization of the scaffolds

3.1.1 Physical and chemical properties of the scaffolds

The compressive strengths of the scaffolds prior to implantation differed significantly from each other (p < 0.001) [Mg225d: (6.00 ± 1.04) MPa, Mg225p: (14.12 ± 3.16) MPa, TCP: (1.95 ± 0.40) MPa].

Mercury porosimeter analysis revealed an open porosity of (27.85 ± 1.67)% for Mg225d (Figure 2A). For Mg225p, an open porosity of (26.85 ± 3.02)% was determined (Figure 2B), while TCP had an open porosity of (42.11 ± 0.78)% (Figure 2C). The porosity of both CMPCs was significantly different compared to TCP (p < 0.001).

Due to the post-treatment of the scaffolds with DAHP (Mg225d) and PA (Mg225p), the following chemical reactions resulted in the partial transformation of stanfieldite and farringtonite into struvite (Mg225d (Eq. 1)), newberyite (Mg225p (Eqs. 2, 3)), and brushite (Mg225p (Eq. 3)), respectively.

$$2Mg_{3}(PO_{4})_{2} + 3(NH_{4})_{2}HPO_{4} + 36H_{2}0 \rightarrow 6NH_{4}MgPO_{4} \cdot 6H_{2}0 + H_{3}PO_{4} (struvite)$$
(1)

$$Mg_{3}(PO_{4})_{2} + H_{3}PO_{4} + 9H_{2}0 \rightarrow$$

$$3MgHPO_{4} \cdot 3H_{2}0 (newberyite)$$
(2)

$$Ca_4Mg_5(PO_4)_6 + 3H_3PO_4 + 23H_2O \rightarrow 4CaHPO_4 \cdot 2H_2O + 5MgHPO_4 \cdot 3H_2O (brushite, newberyite)$$
(3)

The quantitative chemical composition of the scaffolds in wt % is listed in Table 5.

3.1.2 SEM and EDX analysis of the scaffolds before implantation

Analysis of the scaffolds by SEM and EDX showed an increasing porosity of the materials as listed: Mg225p < Mg225d < TCP. Mg225d showed large, interconnected pores as well as rough-appearing areas inside the scaffold, which probably contained unreacted raw powder (stanfieldite, farringtonite) (Figures 2D,G,J; Supplementary Figure S1A). EDX analysis also revealed a lower amount of Ca in the peripheral region of Mg225d than in the roughappearing center, whereas Mg was homogeneously distributed. The matrix of Mg225p appeared more homogeneous and denser in EDX than in Mg225d (Figures 2E,H,K; Supplementary Figure S1B). The reddish areas visible in the EDX analysis (high Ca concentration) were probably comprised of brushite, which is a precipitation product of the reaction with the phosphoric acid (Figure 2K). The TCP scaffolds were composed of morphologically and chemically homogeneous CaP (Figures 2F,I,L; Supplementary Figure S1C).

3.2 Clinical examination

All rabbits were in good general condition following surgery for the duration of the respective observation periods. No animal showed signs of pain or lameness. Physiological wound healing occurred.

3.3 X-ray examination

Since Mg225d and Mg225p showed a radiopacity comparable to that of bone, some scaffolds could not be distinguished from the surrounding bone tissue already directly after surgery. Over the study period, the percentage of visible CMPC scaffolds rapidly decreased in both views and was significantly lower than with TCP from week 4 in ML view ($p \le 0.042$) and from week 6 in VD view (p < 0.001), respectively (Figure 3). The CMPC scaffolds were more difficult to delineate in the VD view due to overlap by the sesamoid bones, and therefore visible less frequent and for shorter periods (Mg225d up to week 12, Mg225p up to week 16) than in the ML view (Mg225d up to week 16, Mg225p up to week 20). All TCP scaffolds were clearly visible in both radiographic views at each examination time point.

3.4 In-vivo µCT examination

3.4.1 Semi-quantitative evaluation of *in-vivo* µCT scans

The demarcability of the CMPC scaffolds from surrounding bone decreased steadily over the 24-weeks study period (Figures 4, 5A; Supplementary Table S1). Between weeks 2 and 6 as well as at weeks 10 and 12, Mg225d was significantly less clearly demarcable from surrounding bone than Mg225p ($p \le 0.023$). From week 16 onwards, the demarcation of all Mg225d scaffolds was no longer possible. All TCP scaffolds were completely demarcable from the surrounding bone by week 24 and thus differed significantly from the CMPC scaffolds from week 6 onwards (p < 0.001).

The phenomenon of faster scaffold degradation on the side towards the bone marrow compared to the side towards the cortex was observed in all materials (Figure 5B; Supplementary Table S2). 6 and 12 weeks after surgery, at least half of the

10.3389/fbioe.2022.998254

TABLE 5 Chemical composition of Mg225d, Mg225p and TCP in wt%.

	Stan	Far	New	Bru	Stru	Periclas	α-ΤСΡ	β-ТСР
Mg225d	59.84 ± 1.05	31.92 ± 1.05			5.91 ± 1.38	2.33 ± 0.53		
Mg225p	25.04 ± 1.29	13.19 ± 0.52	53.33 ± 0.69	8.42 ± 1.10				
TCP							$1.49~\pm~0.83$	98.51 ± 0.83

Stan, Stanfieldit Ca₄Mg₅(PO₄)₆; Far, Farringtonit Mg₃(PO₄)₂; New, Newberyit MgHPO₄:3H₂O; Bru, Brushit CaHPO₄:2H₂O; Stru, Struvit NH₄MgPO₄:6H₂O; Periclas, MgO; α-TCP, alpha-Tricalciumphosphat Ca₃(PO₄)₂; β-TCP, beta-Tricalciumphosphat Ca₃(PO₄)₂.



FIGURE 3

Visibility of the scaffolds in the X-ray in (A) ventrodorsal (VD) and (B) mediolateral (ML) view. Significant differences (p < 0.05) are marked with *: Mg225d—TCP, **: CMPCs—TCP. (C) VD X-ray view of the hind limbs directly after surgery with Mg225d implanted in the left and Mg225p in the right femoral condyle. (D) ML X-ray view of the right hind limb directly after surgery with implanted Mg225p scaffold.

10.3389/fbioe.2022.998254



Mg225p and TCP scaffolds were equally degraded on the side towards the bone marrow and the cortex. At 24 weeks, more severe degradation was observed in the majority of TCP scaffolds on the side towards the bone marrow compared to the side towards the cortex. Mg225d exhibited significantly greater degradation close to the bone marrow than Mg225p and TCP between weeks 2 and 6 (p < 0.001). After 12 weeks, the majority of Mg225d scaffolds (67%) were no longer visible at the side towards the bone marrow.

Over the study period, the loss of cylindrical form of both CMPCs increased steadily and was significantly more pronounced than in TCP from week 4 onwards ($p \le 0.003$), which almost always exhibited a distinct cylindrical form until

week 24 (Figures 4B, 5C; Supplementary Table S3). After 6 weeks, Mg225p (50% of scaffolds) still showed a distinct cylindrical form significantly more often than Mg225d (4% of scaffolds) (p < 0.001).

The CMPCs showed a resorption zone within the scaffolds between weeks 2 and 8, which was observed significantly more frequent and distinct in Mg225d than in Mg225p at weeks 2 and 4 (p < 0.001) (Figures 4A, 5D; Supplementary Table S4). In TCP, such a zone was indistinctly delineated in only a single scaffold at weeks 20 and 24.

Two weeks after surgery, several trabeculae were visible between the scaffold and the surrounding bone in the majority of scaffolds of all materials (Figure 4A,

10.3389/fbioe.2022.998254



materials. (A) Scaffold demarcability, (B) scaffold degradation and (C) scaffold form after 6, 12 and 24 weeks. Due to the lack of demarcability of all Mg225d scaffolds from the bone tissue from week 16 onwards, the evaluation of scaffold degradation and form was no longer possible at week 24. (D) Resorption zone after 2, 4, 6 and 8 weeks (E–J) Quantitative *in-vivo* μ CT evaluation of the scaffolds (IE) scaffold volume (SV), (F) scaffold surface/scaffold volume (SS/SV)] and adjacent cancellous bone [(G) bone volume (BV), (H) trabecular number (Tb.N), (I) trabecular thickness (Tb.Th), (J) trabecular separation (Tb.Sp)] compared to native cancellous bone. Significant differences (p < 0.05) are marked with *: Mg225d–TCP, *: Mg225d–Mg225p, **: CMPCs–TCP, ***: all materials.

Supplementary Table S5). After 8 weeks at the latest, there was always a broad contact area existing between the scaffold and the surrounding bone.

3.4.2 Quantitative evaluation of in-vivo μCT scans

Within the study period (immediately after surgery up to week 24), a significant decrease in SV was observed in the CMPCs (p < 0.001) (Figure 5E). The volume decrease was greatest for Mg225d (Mg225d: 68.47%, Mg225p: 61.75%, TCP: 20.14%). From week 2 onwards, the SV of Mg225d was significantly lower than that of TCP ($p \le 0.042$). Between weeks 6 and 12, Mg225d also had a significantly lower SV than Mg225p ($p \le 0.049$). From week 12 onwards, the CMPCs showed only a slight decrease in volume. In TCP, a significant decrease in SV was observed when comparing between week 12 and immediately

after surgery (p = 0.002), which was followed briefly by a small increase in SV.

SS/SV increased significantly in the CMPCs over the study period of 24 weeks ($p \le 0.001$) (Figure 5F). In TCP, a significant increase was observed between immediately after surgery and week 12 (p = 0.009). For Mg225d, SS/SV was significantly higher than for TCP from week 2 onwards ($p \le 0.001$), for Mg225p this was the case at weeks 2 and 4 and from week 12 ($p \le 0.049$). Between weeks 6 and 10, the SS/SV of Mg225d was significantly greater than that of Mg225p ($p \le 0.023$).

BV in the scaffold environment increased slightly for all materials when comparing immediately after surgery with week 24 (Figure 5G). The significant increase in week 2 ($p \le 0.005$) was striking for all materials, followed by a continuous decrease until week 10 (Mg225d, Mg225p) and week 12 (TCP), respectively. At subsequent time points, the BV was within or slightly above the

physiological range for cancellous bone at this site for all materials.

All materials showed an increase in the Tb.N at week 2, which was significant (p = 0.005) for the CMPCs (Figure 5H). This peak was followed by a continuous decrease until week 8 (Mg225d), week 10 (Mg225p) and week 12 (TCP), respectively. From week 6 onwards, the Tb.N was always within the physiological range for cancellous bone at this site or slightly lower.

After a significant increase until week 2 (Mg225d, TCP) or week 4 (Mg225p) ($p \le 0.007$), the Tb.Th decreased slightly in all materials (Figure 5I). From week 2 onwards, the Tb.Th was higher in every material than in cancellous bone at this site.

Tb.Sp was significantly lower in the CMPCs after 2 weeks than immediately after surgery ($p \le 0.013$) (Figure 5J). From week 2, the Tb.Sp increased again until week 10 (Mg225p) or week 12 (Mg225d, TCP) and was within or slightly above the physiological range for cancellous bone at this site from week 8 onwards.

3.5 µCT 80 examination

3.5.1 Semi-quantitative evaluation of μ CT 80 scans

After 6 weeks, all TCP and the majority of CMPC scaffolds showed trabeculae reaching into the center of the scaffold radius in cross section (Figures 6, 7A; Supplementary Figure S2). 12 and 24 weeks after surgery, new bone trabeculae had grown into the center of the scaffold radius in all Mg225p and all TCP scaffolds, whereas this was significantly less frequent in Mg225d ($p \le 0.005$).

In longitudinal section, at 6 weeks trabeculae were present and evenly distributed (same amount of trabeculae on the side towards the bone marrow as towards the cortex) throughout the scaffold volume in the majority of the CMPC scaffolds (Figure 7B). At 12 weeks, the proportion of Mg225p scaffolds with trabeculae evenly distributed throughout the scaffold volume increased, whereas Mg225d was significantly more likely to have a larger amount of trabeculae towards the cortex than towards the side of the bone marrow (p = 0.001). With TCP, the trabeculae were always evenly distributed throughout the scaffold volume, significantly differing this material from Mg225d at all observation time points ($p \le 0.02$).

3.5.2 Quantitative evaluation of µCT 80 scans

Various changes of bone structure parameters were observed at the implantation sites over the study period. The Tb.N decreased significantly with the CMPCs between weeks 6 and 24 ($p \le 0.013$), while it decreased only slightly with TCP, resulting in significant differences of the Tb.N between all materials at weeks 12 and 24 ($p \le 0.036$) (Figure 7C). 10.3389/fbioe.2022.998254



Cross-sectional μ CT 80 images **(A)** of the scaffolds (Mg225d, Mg225p and TCP) implanted in the distal femoral condyles at 6, 12 and 24 weeks after surgery **(B)** compared to native cancellous bone of the lateral femoral condyle.

The Tb.Th increased significantly in Mg225d and Mg225p between weeks 6 and 24 ($p \le 0.001$) and was always significantly higher with the CMPCs than with TCP ($p \le 0.040$) (Figure 7D).

A significant increase in Tb.Sp was observed in the CMPCs in contrast to TCP, when comparing week 6 with week 24 ($p \le 0.002$) (Figure 7E). At weeks 12 and 24, the Tb.Sp was significantly higher with Mg225d than with TCP ($p \le 0.036$).

3.6 Histological examination

3.6.1 Semi-quantitative evaluation of histological sections

Histologically, a centripetal directed degradation was visible in all materials, steadily increasing over the study period (Figures 8, 9A). At each observation time point, the percentage area of scaffold material in the scaffold cross section of the CMPCs differed significantly from TCP ($p \le 0.041$). The least material was always present from Mg225d, the most from TCP.

The material of all scaffolds was >50% surrounded by bone in the MR and OR after 6 weeks, in the IR this was observed in the majority (\geq 71.4%) of the scaffolds (Supplementary Figure S3A). At 6 weeks, significantly more bone had grown into the CMPC

10.3389/fbioe.2022.998254



scaffolds than into TCP ($p \le 0.004$) (Figure 9B). At 12 and at 24 weeks, the proportion of new, immature bone steadily decreased, while the proportion of remodeled bone increased (Figures 9B,C). This remodeling of newly formed bone occurred more slowly in TCP than in the CMPCs, as evidenced by a still significantly greater amount of newly formed bone at week 12 in TCP compared to the CMPCs (p < 0.001). Nevertheless, after 24 weeks, TCP showed significantly more remodeled bone than the CMPCs (p < 0.001). With increasing bone maturity, the number of osteoblasts and the amount of osteoid at the newly formed bone trabeculae decreased over the course of the study in all materials (Supplementary Figures S3B,C). However, at week 24, TCP still exhibited significantly more osteoid than the CMPCs ($p \le 0.017$).

After 6 weeks, a low to moderate amount of granulation tissue/bone marrow (<50% of scaffold cross-sectional area) with a low to moderate number of adipocytes occurred in most scaffolds (Figures 9D,E). The percentage area of granulation tissue/bone marrow and the number of adipocytes increased markedly in the CMPCs over the study period. At each observation time point, the CMPCs showed significantly more adipocytes (p < 0.001) and at weeks 12 and 24 significantly more granulation tissue/bone marrow than TCP (p < 0.001). Mg225d always exhibited more granulation tissue/bone marrow than

Mg225p. After 24 weeks, all CMPC scaffolds showed numerous adipocytes throughout the implantation area and in the majority of the CMPC scaffolds (Mg225d: 95.8%, Mg225p: 62.5% of ROIs), >50% of the scaffold cross-sectional area consisted of granulation tissue/bone marrow. In contrast, granulation tissue/bone marrow in TCP almost always accounted for a maximum of 25% of the scaffold crosssectional area and in less than half of the ROIs many adipocytes were present after 24 weeks.

Except for the IR of one TCP scaffold, precursor cells were observed in all scaffolds of all materials in each ROI as early as after 6 weeks (Supplementary Figure S3D). An increase in their amount at 12 weeks was followed by a decrease in the amount of precursor cells at week 24 in all materials. Numerous blood vessels were present in all materials at each observation time point, with Mg225p always showing significantly greater vascularization than TCP ($p \le 0.001$) (Supplementary Figure S3E).

Connective tissue with fibrocytes was present in low to moderate amounts in the majority of scaffolds of all materials after 6 weeks (Figure 9F). In the CMPCs, the amount of connective tissue had decreased markedly at 12 weeks and after 24 weeks, it was no longer observed in Mg225d and only sporadically present in Mg225p. In TCP, however, significantly

10.3389/fbioe.2022.998254



more connective tissue with fibrocytes than in the CMPCs was observed at each observation time point (p < 0.001). In all materials, connective tissue was almost always more abundant in the IR than in the MR and OR. A resorption zone (annular zone within the scaffold cross section, containing many cells and connective tissue) was observed after 6 weeks in 25% of the Mg225d scaffolds and in 12.5% of the TCP scaffolds in the IR (score 1) and after 24 weeks in 12.5% of the TCP scaffolds in the MR (score 1) and the IR (score 2) (scoring system in Table 4), respectively (Supplementary Figure S3F).

In the CMPCs, many macrophages were observed in >54% of ROIs at weeks 6 and 12 (Figure 9G). After 24 weeks, only a small or moderate number of macrophages was present in \geq 75% of ROIs in the CMPCs. As many macrophages were observed in TCP throughout the study period, TCP differed significantly from the CMPCs at week 24 ($p \leq 0.001$).

At weeks 6 and 12, few FBCs were present in \geq 50% of the ROIs of the CMPC scaffolds (Figure 9H). In Mg225p, they were significantly more frequent than in Mg225d ($p \leq 0.017$). In TCP, moderate to many FBCs were present at each observation time point (week 6: 50%, week 12: 8.3%, week 24: 37.5% of ROIs), differing it significantly from the CMPCs at week 24 ($p \leq 0.042$).

Overall, however, the number of FBCs decreased over the study period for all materials.

After 6 weeks, moderate to many osteoclasts were present in 41.7% of ROIs in Mg225d and 29.2% of ROIs in Mg225p, and their amount decreased with increasing implantation time (Figure 9I). TCP showed fewer osteoclasts than the CMPCs at 6 weeks and significantly fewer at 12 weeks ($p \le 0.018$). After 24 weeks, no or few osteoclasts were observed in \ge 87.5% of ROIs in all materials.

3.6.2 Quantitative evaluation (histomorphometry)

All scaffolds showed a significant material loss over the study period ($p \le 0.003$) (Figure 9J). After 24 weeks, the CMPC scaffolds were almost completely degraded (percentage of area of scaffold material in the scaffold cross section: Mg225d: 0.85%, Mg225p: 4.63%), while the remaining TCP material comprised 35.14% of the scaffold cross-sectional area. There was always significantly less material present from Mg225d and Mg225p than from TCP (p < 0.001). Additionally, in weeks 12 and 24, there was significantly less material present from Mg225d than from Mg225p ($p \le 0.007$).

10.3389/fbioe.2022.998254



(A–I) Semi-quantitative histological evaluation of the scaffolds and the ingrowing tissue (A–E) at tissue level and (F–I) at cell level after 6, 12 and 24 weeks. *: Significant differences (p < 0.05) between the individual materials. (J–L) Histomorphometric measurement of the percentage area of (J) scaffold, (K) bone and (L) granulation tissue/bone marrow in the scaffold cross section ($\emptyset = 1,060$ pixels \triangleq diameter of the OR of the semi-quantitative evaluation ($\emptyset = 4.24$ mm) \triangleq scaffold diameter). Significant differences (p < 0.05) are marked with *: Mg225d–Mg225p, **: CMPCs–TCP.

After 6 weeks, significantly more bone had grown into the CMPC scaffolds than into the TCP scaffolds ($p \le 0.001$) (Figure 9K). After 12 weeks, the percentage of bone was approximately the same for all materials. After 24 weeks, it was significantly higher in TCP than in the CMPCs ($p \le 0.022$).

Over the study period, the amount of soft tissue (granulation tissue, bone marrow) increased significantly in Mg225d and Mg225p, resulting in significantly more soft tissue with the CMPCs than with TCP at weeks 12 and 24 (p < 0.001) (Figure 9L).

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

10.3389/fbioe.2022.998254



FIGURE 10

(A–C) SEM analysis of histological thin sections (x28 magnification) with (A) Mg225d, (B) Mg225p and (C) TCP scaffold incorporated by newly formed cancellous bone after 12 weeks. (D–F) EDX analysis of histological thin sections (x500 magnification) with (D) Mg225d, (E) Mg225p and (F) TCP particles incorporated by newly formed cancellous bone after 12 weeks. Scale bar = $50 \mu m$.

3.7 SEM and EDX analysis of the unstained histological sections

Small scaffold particles could be detected in SEM and EDX analysis in all materials at all observation time points (Figure 10; Supplementary Figures S4, S5). A continuously increasing material degradation was observed. The material residues appeared as small, sharp-edged particles that were excellently integrated into the surrounding bone. After only 6 weeks, the entire implantation area of Mg225d was infiltrated by bone (Supplementary Figure S4A). The scaffold structure was no longer recognizable, the material was largely replaced by newly formed bone and the remaining particles were enclosed by it (Supplementary Figure S4D). After 12 weeks, the scaffolds were already degraded to a large extend, and after 24 weeks, only smallest particles of Mg225d were still present, incorporated into bone trabeculae (Figure 10A,D; Supplementary Figures S5A,D). The degradation of Mg225p showed a similar course, with always slightly more material present than with Mg225d. From week 12 onwards, the scaffold structure was no longer evident in Mg225p either. As with Mg225d, the scaffold was completely traversed by new bone trabeculae after 6 weeks. Mg225p also showed an excellent osseointegration and almost complete degradation after 24 weeks (Figure 10B,E; Supplementary Figures S4B,E, S5B,E). A greater amount of cement matrix was present with TCP than with the CMPCs at each time point examined, and less extensive material degradation was observed over time. As of 6 weeks, the entire implant site was also infiltrated by new bone. As with the CMPCs, good osseointegration of the scaffold material was observed throughout the study period (Figure 10C,F; Supplementary Figures S4C,F, S5C,F).

4 Discussion

Due to their better mechanical properties as well as their faster degradation compared to CPCs, CMPCs have been increasingly researched in recent years in the form of cement pastes and granules (Wu et al., 2008a; Wu et al., 2008b; Klammert et al., 2010a; Jia et al., 2010; Wei et al., 2010; Vorndran et al., 2011; Zeng et al., 2012; Ewald et al., 2019; Fuchs et al., 2021; Götz et al., 2021). However, for the treatment of many bone defects, threedimensional, dimensionally stable scaffolds are required, that can be produced patient-specifically. Therefore, 3D powder printing has emerged as a promising manufacturing technique for bone substitutes (Castilho et al., 2014a; Roseti et al., 2017; Zhang et al., 2019). This study varied the post-treatment of 3D powder printed CMPC scaffolds produced from the ceramic cement powder Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂ by either immersion in DAHP (alkaline post-treatment) or by infiltration with PA (acid posttreatment), affecting the physical and chemical properties of the scaffolds. The influence of DAHP (Mg225d) or PA (Mg225p) post-treatment on biocompatibility, osseointegration and

degradation behavior of the scaffolds was investigated *in vivo* and compared between the two materials. Scaffolds of the established material TCP served as reference. The scaffolds were implanted into the lateral femoral condyles of rabbits and assessed by regular clinical and radiological (X-Ray and μ CT) examinations up to 24 weeks. After euthanasia of the animals, higher-resolution μ CT 80 and histological examinations were performed on the explanted scaffold-bone-complexes, as well as an analysis by SEM and EDX.

When the compressive strength of the scaffolds was investigated prior to implantation, all materials differed significantly from each other, with TCP having the lowest compressive strength and Mg225p the highest. The examination of the porosity with the mercury porosimeter as well as SEM analysis of the scaffolds before implantation showed that TCP had the highest porosity and Mg225p the lowest. As an increase in pore size and porosity affects the structural integrity of the scaffolds and reduces their mechanical properties (Karageorgiou and Kaplan, 2005), an inverse relationship between porosity and compressive strength has been described in the literature (Vorndran et al., 2011; Zhang et al., 2014; Wang et al., 2019), which was also observed with the materials investigated in this study.

As previously described in studies on CMPCs with the application form of granules, pastes or cylindrical scaffolds (Wu et al., 2008b; Wei et al., 2010; Ewald et al., 2019; Fuchs et al., 2021; Götz et al., 2021; Kowalewicz et al., 2021), the CMPCs investigated in this study as well as TCP showed excellent clinical tolerability with physiological wound healing. No animal showed lameness or pain.

Radiographically, the visibility of the CMPC scaffolds decreased rapidly and was significantly lower than that of TCP in both views from week 6 at the latest, whereas the latter was always still clearly delineable from surrounding bone until week 24. The longer visibility of the TCP scaffolds can be explained by the higher content of radiopaque Ca. However, it could also be an indication of a slower degradation compared to the CMPC scaffolds, which Fuchs et al. (2021) also observed when investigating granules of CMPCs and CPC (HA) in a rabbit model.

The CMPCs showed a significant volume loss as well as a significant increase of the surface area to volume ratio upon *invivo* μ CT examination over the study period. The volume loss was significantly more pronounced with the CMPCs than with TCP. The significantly faster volume degradation of Mg225d compared to Mg225p can be explained by the different chemical and physical properties of the scaffolds. The chemical solubility of the individual phases of the CMPCs increases as listed: farringtonite < struwite < brushite < newberyite (Ostrowski et al., 2016). No data on the solubility of stanfieldite are available in the accessible literature. The cement raw materials farringtonite and stanfieldite are mainly cohered by the binder phases struvite (Mg225d), newberyite and brushite (Mg225p)

10.3389/fbioe.2022.998254

formed during post-treatment with DAHP and PA, respectively (cf. Eqs. 1-3 in Section 3.1.1). The importance of the wt% fraction of the binder phase on the chemical degradation rate has previously been shown in the in-vitro study on scaffolds of farringtonite (76 wt%) and struvite (24 wt%) (TMP-D) and farringtonite (57 wt%) and newbervite (43 wt%) (TMP-P), respectively (Gefel et al., 2022). Despite the higher proportion of the chemically less soluble phase farringtonite, a faster and greater chemical solubility of TMP-D was observed compared to TMP-P. This phenomenon was based on the faster degradation of the low proportion of the binder phase struvite (24 wt%) compared to newberyite (43 wt%), as a result of which the degradation of the cement raw materials proceeded more rapidly (Gefel et al., 2022). In the present study, the same process can be assumed. In Mg225d, the binder phase struvite was probably degraded relatively quickly due to its low wt% content (<6 wt%). Based on the SEM and EDX analysis of Mg225d, it can also be assumed that due to the lower Caoccurrence, more struvite and less stanfieldite was present in the peripheral region of the scaffolds, while areas of unreacted raw powder with low mechanical strength were probably present in the scaffold center. As soon as the outer areas with more struvite had dissolved, the scaffolds lost stability, the remaining cement matrix was no longer sufficiently cohered and rapidly disintegrated into individual particles, which was particularly accelerated by the ingrowth of bone and cells. Despite the higher chemical solubility of newberyite and brushite, the degradation of these binder phases took more time in Mg225p due to the higher wt% content (63.75 wt%) as well as the uniform distribution. Consequently, the scaffold matrix was cohered for a longer time and the degradation was slower than for Mg225d. Since dissolution is a physico-chemical process, it is controlled not only by solubility but also by porosity, pore size and surface area to volume ratio (Dorozhkin, 2013). SEM and EDX analysis of the scaffolds prior to implantation showed that Mg225d had large (\emptyset > 100 µm), interconnected pores, which were not detected in the mercury porosimeter measurement because they were either occluded or beyond the accessible measurement range. Therefore, the porosity and pore size of Mg225d can be assumed to be much larger than in Mg225p. Wei et al. (2010) observed significantly greater weight degradation for CPC and MPC scaffolds with higher microporosity and larger surface area in simulated body fluid (SBF) solution. Also, Kim et al. (2016) observed a faster material degradation with larger pore size during in-vivo investigation of MPC scaffolds. Therefore, it can be assumed that the higher porosity and larger pore size of Mg225d compared to Mg225p investigated in this study had an additional accelerating effect on the degradation rate. The solubility of the scaffolds was also likely enhanced by an increase in the scaffold surface area to volume ratio (SS/SV), which was accompanied by the loss of the cohesive scaffold structure. The significantly larger SS/SV between weeks 6 and 10 for Mg225d compared to Mg225p confirms that the Mg225d scaffolds

disintegrated into individual material particles much faster than Mg225p, which further accelerated the degradation of Mg225d. Since TCP has a relatively low solubility (Wang and Nancollas, 2008; Dorozhkin, 2013), dissolution of the TCP scaffolds investigated in this study occurred only to a very small extent.

Due to the very comparable radiopacity of the scaffolds and bone, distinct differentiation between scaffold material and bone that had grown into the implantation area was not always possible in *in-vivo* μ CT. In this regard, difficulties have also occurred in various other *in-vivo* studies on CaPs, CPCs or MPCs (Chopra et al., 2009; Huber et al., 2009; Kasuya et al., 2012; Kanter, 2014). Therefore, it is likely that newly formed bone was erroneously attributed to the scaffold volume, especially at the later observation time points, which also explains the increase in SV at TCP once again between weeks 12 and 16. However, the histomorphometric examinations in the present study clearly demonstrated the almost complete degradation of the CMPC scaffolds after 24 weeks.

The faster scaffold degradation on the side towards the bone marrow observed in the CMPCs in the present study has also been described by other authors for magnesium-based implants. It is assumed that degradation progresses more rapidly on the side towards the medullary cavity due to the higher blood vessel supply and the weaker trabecular network in the scaffold environment (Xu et al., 2007; Höh et al., 2009; Zhang et al., 2009). In the present study, it can be assumed that due to the overall faster degradation of Mg225d compared to Mg225p, increased material degradation on the side towards the medullary cavity was significantly more pronounced in Mg225d than in Mg225p.

Both CMPCs as well as TCP investigated in this study showed rapid and comprehensive osseointegration in the invivo µCT examination by the presence of a broad direct scaffoldbone-contact after 8 weeks at the latest. This indicates optimal surface properties as well as excellent biocompatibility and osteogenesis of the scaffolds. The formation of an extensive direct bone-implant contact has also been demonstrated in other studies on CMPCs (Wu et al., 2008b; Wei et al., 2010; Ewald et al., 2019; Fuchs et al., 2021). The high microporosity of the 3D powder-printed scaffolds compared to cement pastes results in a large surface area, which has a positive effect on the integration into the surrounding bone. Various in-vivo studies have shown that improved osteogenesis and osseointegration occur with porous compared to solid implants, as pores allow cell migration and proliferation as well as vascularization (Karageorgiou and Kaplan, 2005). In-vitro investigations of CPC and MPC scaffolds have shown that the presence of micropores in particular has a positive effect on cell growth (Wei et al., 2010). A porous surface also improves mechanical interlocking and stability at the critical interface between scaffold and surrounding bone (Karageorgiou and Kaplan, 2005).

In the present study, the significant increase in BV observed in the adjacent scaffold environment at week 2 for all materials 10.3389/fbioe.2022.998254

was striking, suggesting an osteoconductive and even possible osteoinductive effect of the materials. Kanter (2014) also observed an increased BV in the implant environment compared to peripheral bone when studying CPCs and MPCs in a sheep model. However, she also observed increased bone formation in direct proximity around empty borehole defects. Albrektsson and Johansson (2001) assumed that even a trauma to the bone results in osteoinduction. Therefore, it is also possible that in the present study, increased BV and osteoinduction in the scaffold vicinity was only induced by the trauma of drilling. However, as no comparative empty borehole defect was assessed in the present study, this phenomenon could not be clarified conclusively. The maximum increase in BV at week 2 was followed by a continuous decrease in BV until week 10 (CMPCs) or week 12 (TCP) and an approach to the physiological volume of cancellous bone. An osteoconductive and even slightly osteoinductive effect of the materials investigated in this study is nevertheless suspected, as the BV in the immediate vicinity of the CMPCs as well as of TCP was always slightly higher or in the upper reference range of physiological bone at this location. It is known, that the release of ions from degrading implants can greatly influence the formation of new bone around an implant (Ostrowski et al., 2016). A high Mg-concentration promotes osteoblast proliferation and differentiation and increases their activity (Wu et al., 2015; He et al., 2016) and a local increase of Caand PO4 -ions to a supra-physiological level has a positive effect on new bone formation (Chai et al., 2012). The higher BV in the vicinity of TCP at 24 weeks is probably caused by the higher Cacontent of the material compared with the CMPCs and the higher amount of remaining scaffold material releasing ions until the end of the study. The osteoconductive character as well as the promotion of osteogenesis and bone regeneration by CMPCs has yet been described by other authors (Wu et al., 2008b; Wei et al., 2010; Ewald et al., 2019; Fuchs et al., 2021). Studies on MPCs (Kim et al., 2016; Ostrowski et al., 2016; Kanter et al., 2018; Nabiyouni et al., 2018; Sarkar et al., 2019) and TCP (Walsh et al., 2008; Samavedi et al., 2013; Bohner et al., 2020) also demonstrated an osteoconductive behavior of these materials as well as the stimulation of bone formation.

In the present study, a decrease in Tb.N as well as an increase in Tb.Th and Tb.Sp over the study period was observed for all materials in the *in-vivo* μ CT in the scaffold vicinity, as well as for the CMPCs in the higher-resolution μ CT 80 within the initial scaffold volume. This progression was also observed by Kanter et al. (2018) when investigating MPCs. It suggests that the newly formed bone remodeled, adapted to the physiological situation and matured over the study period, resulting in the renewed presence of nearly physiological cancellous bone within the initial scaffold volume of Mg225p after 24 weeks. By week 24, a high Tb.N with small Tb.Th and Tb.Sp occurred within the scaffold volume of TCP, revealing a slower speed of bone remodeling, possibly because the large amount of remaining material spatially

inhibited trabecular growth and bone maturation. Additionally, μCT 80 examinations of the scaffold longitudinal sections showed that the newly formed bone trabeculae within the initial scaffold volume were mostly located in the implantation area close to the cortex in Mg225d, whereas they were more evenly distributed in Mg225p with regard to their localization. This can be explained by the fact that Mg225d degraded significantly faster on the side towards the bone marrow than Mg225p and that new bone formation close to the bone marrow could not follow the degradation rate of the scaffold. Ewald et al. (2019) observed a decrease in bone-implantcontact in the faster degrading material when comparing 6 to 12 weeks during the in-vivo investigation of CMPC pastes and also assumed too rapid material degradation as a reason. In Mg225p, the material particles probably served as a guide for the new bone for a longer period of time, allowing a more uniform trabecular network to be formed.

In histology, all scaffolds examined in the present study quickly showed good osseointegration and replacement by newly formed trabecular bone increasing over time. Within the observation period, the amount of immature bone and osteoid and the number of osteoblasts in the initial implantation area of all materials decreased, while simultaneously the amount of remodeled, mature bone increased, which is typical for bone maturation (Hadjidakis and Androulakis, 2006; Katsimbri, 2017). The large amount of precursor cells in the bone marrow observed mainly after 12 weeks was also studied by Kanter et al. (2018). It can be considered as an active state of cell organization, resulting in centripetally directed formation of trabecular bone (Kanter et al., 2018). In TCP, significantly more immature bone after 12 weeks and significantly more osteoid after 24 weeks than in the CMPCs was still observed. This suggests that bone maturation occurred more slowly with TCP and was not yet completed at the end of the study period. The significantly higher proportion of bone in TCP compared to the CMPCs after 24 weeks is in contradiction with results from other in-vivo studies on CPCs and CMPCs in rabbits (Wu et al., 2008b; Wei et al., 2010). As bone ingrowth is facilitated by increased porosity and pore size (Karageorgiou and Kaplan, 2005), the greater amount of bone observed with TCP in the present study could be attributed to the significantly higher porosity of TCP compared to the CMPCs.

Within the implantation area of the CMPCs, the amount of granulation tissue rich of blood vessels and cells as well as the number of adipocytes increased continuously over the study period. At the same time, the amount of connective tissue with fibrocytes decreased markedly, resulting in no (Mg225d) or only sporadic (Mg225p) appearance after 24 weeks. This indicates that the ingrowing tissue has transformed into mature, physiological bone marrow, as this is also described in the literature (Travlos, 2006; Horowitz et al., 2017; Nombela-Arrieta and Manz, 2017; Lucas, 2021). TCP demonstrated significantly less granulation tissue/bone marrow at weeks

10.3389/fbioe.2022.998254

12 and 24 and at each observation time point significantly more connective tissue with fibrocytes than the CMPCs. It is likely that in TCP, due to the slower bone maturation, only little bone marrow was yet formed within the numerous small fibrovascular islets over the study period of 24 weeks. Possibly, the high amount of bone observed with TCP slowed down this remodeling process due to the spatial restriction of the granulation tissue. However, since complete bone replacement with restitutio ad integrum of the bone tissue is described in the literature for TCP (Wiltfang et al., 2002; Horch et al., 2006; Kolk et al., 2012), the formation of physiological bone marrow is also likely with a longer observation time.

FBCs express important growth factors for new blood vessel formation and a correlation between the amount of FBCs and the vascularization rate was observed in a study on TCP granules (Ghanaati et al., 2010; Al-Maawi et al., 2021), which could not be confirmed in the present study. Even though moderate to many FBCs were frequently present with TCP, at each observation time point significantly fewer blood vessels occurred within the implantation area of TCP than with Mg225p. Possibly, this could also be due to the spatial limitation of bone and scaffold material with TCP.

For all materials in the present study, centripetal directed degradation was observed in the histological examination, continuously increasing over the course of the investigation. The CMPCs differed significantly from TCP at each observation time point and were almost completely degraded after 24 weeks, whereas numerous particles of TCP were still present at the end of the study. As supposed for the in-vivo degradation of CMPCs by Wu et al. (2008b) and Wei et al. (2010), a two-step degradation mechanism is also assumed for the CMPC scaffolds investigated in this study. The previously described first step of chemical dissolution of the cements during the early implantation time resulted in surface enlargement and thus alteration of the microstructure of the scaffolds, which likely facilitated the cell-mediated resorption that occurred later in the second step. In-vivo degradation of CaP-based biomaterials is also thought to occur by a combination of chemical dissolution and cell-mediated resorption (Theiss et al., 2005; Dorozhkin, 2013). For rapidly resorbable CPCs such as brushite, mainly macrophages and FBCs are involved in the resorption process, whereas slowly resorbable CPCs such as apatite are degraded by osteoclasts (Apelt et al., 2004; Theiss et al., 2005; Dorozhkin, 2008, 2013). For MPCs, passive resorption by chemical dissolution in magnesium and phosphate ions has been described (Klammert et al., 2011; Kim et al., 2016). Gefel et al. (2022) could not detect an involvement of osteoclasts in the degradation of MPCs in in-vitro studies. In various in-vivo studies, however, osteoclasts were observed at the implantation site of MPCs, indicating a possible active cellular resorption as well (Zeng et al., 2012; Kim et al., 2016; Kanter et al., 2018). In the present study, both numerous macrophages and multinucleated cells located directly at the scaffold material were

observed. The number of macrophages decreased strongly in the CMPCs with advanced implantation time and degradation of the scaffolds, suggesting that they were involved to a large extent in material degradation. The FBCs observed with the CMPCs especially at the early observation time points were probably also involved in the cellular degradation. The significantly more frequent occurrence of FBCs at weeks 6 and 12 in Mg225p than in Mg225d correlates with the still greater amount of remaining scaffold material in Mg225p at these time points and supports this hypothesis. Furthermore, since with the CMPCs, slightly (week 6) or even significant (week 12) more osteoclasts were observed than with TCP, it is reasonable to assume that they were also participating in the degradation of the MPC phases. However, the increased occurrence of osteoclasts with the CMPCs could also be due to the fact that these cells were substantially involved in physiological bone remodeling, as also described in the literature (Hadjidakis and Androulakis, 2006). With TCP, many macrophages and some FBCs were present at each observation time point, and their amount was significantly higher than with the CMPCs at week 24. Therefore, it can be assumed that these two cell types were mainly responsible for the material degradation of TCP. Since the complete degradation of TCP happens rather slowly (Moore et al., 2001; Kolk et al., 2012; Bohner et al., 2020) and at the end of the study period larger amounts of potentially material-resorbing cells were still present, it can be assumed that the degradation of TCP was not yet completed after 24 weeks. However, as also described in the literature (Wiltfang et al., 2002), in the present study cellular degradation may have been impaired by the fact that a very high proportion of the numerous TCP fragments still present after 24 weeks were completely surrounded by the newly formed bone trabeculae and were therefore not accessible for further degradation for the time being. The final degradation of these particles occurs only when the material is exposed during remodeling processes of the newly formed bone (Wiltfang et al., 2002).

The resorption zone, found with an annular area of darker gray value within the scaffold volume of the CMPCs between weeks 2 and 8 in the *in-vivo* µCT scans, could be identified in the histological examination as fibrovascular, macrophage-rich stroma between the material core and the ingrowing bone trabeculae. Investigating brushite or K-struvite cements, other authors have also observed such a fibrovascular resorption zone around the cement during the early implantation period (up to 2 months) (Constantz et al., 1998; Frayssinet et al., 2000; Apelt et al., 2004; Kaiser et al., 2022). As this zone was significantly more frequent in Mg225d than in Mg225p and TCP, it is reasonable to assume a connection with the scaffold degradation rate. It is likely that the volume degradation in Mg225d and in some cases also in Mg225p proceeded too rapidly, rendering the attachment of the newly formed bone trabeculae to the scaffold material impossible, as also assumed for K-struvite by Kaiser et al. (2022). However, the fibrovascular

10.3389/fbioe.2022.998254

zone formed to bridge the defect was in the present study at the latest after 10 weeks replaced by ingrowing trabecular bone.

Using SEM and EDX analysis, the surface texture of the thin sections of the scaffold-bone-complexes and the occurrence, respectively amount, of Mg in the implantation area have clearly demonstrated the presence of small scaffold particles in all materials by week 24. The results are consistent with the histological findings and confirm excellent osseointegration, almost complete degradation of the CMPCs, and replacement of the scaffolds by trabecular bone. In a study by Fuchs et al. (2021), EDX analysis of CMPCs granules also showed increasing degradation over time and their replacement by bone tissue based on the detection of Mg, Ca, and P. For TCP, very good osseointegration and osteoneogenesis were also observed in the present study, but only a slight progression of degradation occurred.

5 Conclusion

This study varied the post-treatment of 3D powder printed CMPC scaffolds by either immersion in DAHP or by infiltration with PA, and the influence of the post-treatment on the in-vivo performance of the scaffolds was examined. In a non-weight-bearing borehole defect in rabbits, both investigated CMPCs, Mg225d (alkaline post-treatment with DAHP) and Mg225p (acid posttreatment with PA), showed excellent biocompatibility and osseointegration, over time continuously increasing and almost complete degradation, and replacement of the scaffolds by newly formed bone trabeculae, which underwent continuous remodeling and adaption to the physiological situation. Post-treatment with DAHP resulted in significantly faster degradation with loss of cylindrical form, demarcability from surrounding bone, and scaffold volume in Mg225d than in Mg225p and TCP. Mg225d also showed significantly greater degradation on the side towards the medullary cavity than Mg225p and TCP. In TCP, degradation was significantly less than in the CMPCs after 24 weeks. All materials rapidly showed an ingrowth of numerous bone trabeculae into the scaffold. While in Mg225d, the trabeculae were predominantly located in the implantation area towards the cortex, in Mg225p they were more evenly distributed and showed almost the same structural properties as physiological bone at this localization after 24 weeks. The rapid degradation of Mg225d as well as the rapid breakdown of the scaffold framework into individual material particles probably had a negative effect on the uniform trabecular ingrowth. Therefore, and due to the low compressive strength of Mg225d, which presumably further decreased with increasing implantation time, this material is not suitable for application in weight-bearing bone. Since Mg225d nevertheless had a positive influence on osteoneogenesis, its use as a bone substitute in nonweight-bearing bone, such as for a sinus lift, would be feasible. In the present study, Mg225p showed, due to its higher compressive strength, optimal degradation rate for concurrent new bone formation, and excellent osteoneogenesis throughout the scaffold

10.3389/fbioe.2022.998254

volume, promising properties for use as degradable bone substitute to be further investigated in weight-bearing bone.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Regional Government of Upper Bavaria, Munich, Germany (approval number: ROB 55.2-2532.Vet_02-19-64).

Author contributions

Conceptualization and methodology, EV and AM-L; Investigation KK, A-CW, FF, A-MS, MB, EV, and AM-L; Resources, A-CW, EV, and AM-L; Writing-original draft preparation, KK; Writing-review and editing, A-CW, FF, EV, and AM-L; Visualization, KK and EV; Supervision, A-CW, FF, EV, and AM-L; Project administration, A-CW, EV, and AM-L; Funding acquisition, EV and AM-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by the German Research Foundation (DFG), grant number 417069397, as part of the

References

Agarwal, R., and García, A. J. (2015). Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 94, 53–62. doi:10.1016/j.addr.2015.03.013

Al-Maawi, S., Barbeck, M., Vizcaíno, C. H., Egli, R., Sader, R., Kirkpatrick, C. J., et al. (2021). Thermal treatment at 500°C significantly reduces the reaction to irregular tricalcium phosphate granules as foreign bodies: An *in vivo* study. Acta Biomater. 121, 621–636. doi:10.1016/j.actbio.2020.11.034

Albrektsson, T., and Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* 10 (2), 96–101. doi:10.1007/s005860100282

Ambard, A. J., and Mueninghoff, L. (2006). Calcium phosphate cement: Review of mechanical and biological properties. *J. Prosthodont*. 15 (5), 321–328. doi:10.1111/j. 1532-849X.2006.00129.x

Apelt, D., Theiss, F., El-Warrak, A., Zlinszky, K., Bettschart-Wolfisberger, R., Bohner, M., et al. (2004). *In vivo* behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 25 (7-8), 1439–1451. doi:10.1016/j. biomaterials.2003.08.073

Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L., and Davino, N. A. (1996). Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 329, 300–309. doi:10.1097/00003086-199608000-00037

Augustin, J., Feichtner, F., Waselau, A. C., Julmi, S., Klose, C., Wriggers, P., et al. (2020). Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on

collaboration project "Additive manufacturing of personalized bone implants for application in human and veterinary medicine based on calcium magnesium phosphates" between the Ludwig-Maximilians-University of Munich and the University of Würzburg. The authors would like to thank for the financial support. We also thank the DFG for funding the Zeiss CB 340 crossbeam scanning electron microscope (INST 105022/58-1 FUGG) within the DFG's FUGG State Major Instrumentation Programme.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022. 998254/full#supplementary-material

degradation and osseointegration behavior in the rabbit model. J. Biomed. Mat. Res. 108 (7), 2776–2788. doi:10.1002/jbm.b.34607

Augustin, J., Feichtner, F., Waselau, A. C., Julmi, S., Klose, C., Wriggers, P., et al. (2022). Effect of pore size on tissue ingrowth and osteoconductivity in biodegradable Mg alloy scaffolds. J. Appl. Biomater. Funct. Mat. 20, 228080002210781. doi:10.1177/22808000221078168

Bohner, M., Santoni, B. L. G., and Döbelin, N. (2020). β-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*. 113, 23–41. doi:10. 1016/j.actbio.2020.06.022

Bohner, M., Theiss, F., Apelt, D., Hirsiger, W., Houriet, R., Rizzoli, G., et al. (2003). Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 24 (20), 3463–3474. doi:10.1016/s0142-9612(03)00234-5

Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D., and Schwartz, Z. (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17 (2), 137–146. doi:10.1016/0142-9612(96)85758-9

Brunello, G., Sivolella, S., Meneghello, R., Ferroni, L., Gardin, C., Piattelli, A., et al. (2016). Powder-based 3D printing for bone tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* 34 (5), 740–753. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.03.009

Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., et al. (2014). Bone substitutes in orthopaedic surgery: From basic science to clinical practice. J. Mat. Sci. Mat. Med. 25 (10), 2445–2461. doi:10.1007/s10856-014-5240-2

Castilho, M., Dias, M., Vorndran, E., Gbureck, U., Fernandes, P., Pires, I., et al. (2014a). Application of a 3D printed customized implant for canine cruciate ligament treatment by tibial tuberosity advancement. *Biofabrication* 6 (2), 025005. doi:10.1088/1758-5082/6/2/025005

Castilho, M., Moseke, C., Ewald, A., Gbureck, U., Groll, J., Pires, I., et al. (2014b). Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. *Biofabrication* 6 (1), 015006. doi:10.1088/1758-5082/6/1/ 015006

Chai, Y. C., Carlier, A., Bolander, J., Roberts, S. J., Geris, L., Schrooten, J., et al. (2012). Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater.* 8 (11), 3876–3887. doi:10. 1016/j.actbio.2012.07.002

Chopra, P. M., Johnson, M., Nagy, T. R., and Lemons, J. E. (2009). Microcomputed tomographic analysis of bone healing subsequent to graft placement. *J. Biomed. Mat. Res.* 88 (2), 611–618. doi:10.1002/jbm.b.31232

Constantz, B. R., Barr, B. M., Ison, I. C., Fulmer, M. T., Baker, J., McKinney, L., et al. (1998). Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J. Biomed. Mat. Res.* 43 (4), 451–461. doi:10.1002/(sici)1097-4636(199824)43:4<451:aid-jbm13>3.0.co;2-q

Donath, K., and Breuner, G. (1982). A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) Technique. *J. Oral Pathol. Med.* 11 (4), 318–326. doi:10.1111/j.1600-0714.1982. tb00172.x

Dorozhkin, S. V. (2008). Calcium orthophosphate cements for biomedical application. J. Mat. Sci. 43 (9), 3028–3057. doi:10.1007/s10853-008-2527-z

Dorozhkin, S. V. (2013). Calcium orthophosphate-based bioceramics. Mater. (Basel) 6 (9), 3840-3942. doi:10.3390/ma6093840

Dorozhkin, S. V., and Epple, M. (2002). Biological and medical significance of calcium phosphates. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 41 (17), 3130–3146. doi:10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130:AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1

Ewald, A., Kreczy, D., Brückner, T., Gbureck, U., Bengel, M., Hoess, A., et al. (2019). Development and bone regeneration capacity of premixed magnesium phosphate cement pastes. *Mater. (Basel)* 12 (13), 2119. doi:10.3390/ma12132119

Fillingham, Y., and Jacobs, J. (2016). Bone grafts and their substitutes. Bone Jt. J. 98-b (1), 6-9. doi:10.1302/0301-620x.98b.36350

Frakenburg, E. P., Goldstein, S. A., Bauer, T. W., Harris, S. A., and Poser, R. D. (1998). Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. J. Bone Jt. Surg. 80 (8), 1112–1124. doi:10.2106/00004623-199808000-00004

Frayssinet, P., Roudier, M., Lerch, A., Ceolin, J. L., Deprès, E., and Rouquet, N. (2000). Tissue reaction against a self-setting calcium phosphate cement set in bone or outside the organism. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 11 (12), 811–815. doi:10.1023/a: 1008909714090

Fuchs, A., Kreczy, D., Brückner, T., Gbureck, U., Stahlhut, P., Bengel, M., et al. (2021). Bone regeneration capacity of newly developed spherical magnesium phosphate cement granules. *Clin. Oral Investig.* 26, 2619–2633. doi:10.1007/s00784-021-04231-w

Gefel, E., Moseke, C., Schmitt, A.-M., Dümmler, N., Stahlhut, P., Ewald, A., et al. (2022). Degradation of 3D-printed magnesium phosphate ceramics *in vitro* and a prognosis on their bone regeneration potential. *Bioact. Mat.* 19, 376–391. doi:10. 1016/j.bioactmat.2022.04.015

Ghanaati, S., Barbeck, M., Orth, C., Willershausen, I., Thimm, B. W., Hoffmann, C., et al. (2010). Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. Acta Biomater. 6 (12), 4476–4487. doi:10.1016/j.actbio. 2010.07.006

Götz, L. M., Holeczek, K., Groll, J., Jüngst, T., and Gbureck, U. (2021). Extrusionbased 3D printing of calcium magnesium phosphate cement pastes for degradable bone implants. *Mater. (Basel)* 14 (18), 5197. doi:10.3390/ma14185197

Gross, K. A., and Berndt, C. C. (2002). Biomedical application of apatites. Rev. Mineral. Geochem. 48 (1), 631-672. doi:10.2138/rmg.2002.48.17

Habibovic, P., Gbureck, U., Doillon, C. J., Bassett, D. C., van Blitterswijk, C. A., and Barralet, J. E. (2008). Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 29 (7), 944–953. doi:10.1016/j. biomaterials.2007.10.023

Hadjidakis, D. J., and Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1092, 385–396. doi:10.1196/annals.1365.035

Haque, M. A., and Chen, B. (2020). *In vitro* and *in vivo* research advancements on the magnesium phosphate cement biomaterials: A review. *Materialia* 13, 100852. doi:10.1016/j.mtla.2020.100852

He, L., Zhang, X., Liu, B., Tian, Y., and Ma, W. (2016). Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49 (7), S0100879X2016000700604. doi:10.1590/1414-431X20165257

Höh, N. v. d., Bormann, D., Lucas, A., Denkena, B., Hackenbroich, C., and Meyer-Lindenberg. A. (2009). Influence of different surface machining treatments of magnesium-based resorbable implants on the degradation behavior in rabbits. *Adv. Eng. Mat.* 11 (5), B47–B54. doi:10.1002/adem.200800273

Horch, H. H., Sader, R., Pautke, C., Neff, A., Deppe, H., and Kolk, A. (2006). Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 35 (8), 708–713. doi:10.1016/j.ijom.2006.03.017

Horowitz, M. C., Berry, R., Holtrup, B., Sebo, Z., Nelson, T., Fretz, J. A., et al. (2017). Bone marrow adipocytes. *Adipocyte* 6 (3), 193–204. doi:10.1080/21623945. 2017.1367881

Huber, F. X., McArthur, N., Heimann, L., Dingeldein, E., Cavey, H., Palazzi, X., et al. (2009). Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste Ostim in comparison to Alpha-BSM - more bone ingrowth inside the implanted material with Ostim compared to Alpha BSM. *BMC Musculoskelet. Disord.* 10, 164. doi:10. 1186/1471-2474-10-164

Huehnerschulte, T. A., Reifenrath, J., von Rechenberg, B., Dziuba, D., Seitz, J. M., Bormann, D., et al. (2012). *In vivo* assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model. *Biomed. Eng. Online* 11 (1), 14. doi:10.1186/1475-925X-11-14

Jia, J., Zhou, H., Wei, J., Jiang, X., Hua, H., Chen, F., et al. (2010). Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. J. R. Soc. Interface 7 (49), 1171–1180. doi:10.1098/rsif.2009.0559

Kaiser, F., Schröter, L., Stein, S., Krüger, B., Weichhold, J., Stahlhut, P., et al. (2022). Accelerated bone regeneration through rational design of magnesium phosphate cements. *Acta Biomater*. 145, 358–371. doi:10.1016/j.actbio.2022.04.019

Kanter, B., Geffers, M., Ignatius, A., and Gbureck, U. (2014). Control of *in vivo* mineral bone cement degradation. *Acta Biomater*. 10 (7), 3279–3287. doi:10.1016/j. actbio.2014.04.020

Kanter, B. (2014). Osseointegration kalthärtender Knochenzemente im Schafmodell. Ludwig-Maximilians-University Munich. dissertation. Munich.

Kanter, B., Vikman, A., Brückner, T., Schamel, M., Gbureck, U., and Ignatius, A. (2018). Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model. *Acta Biomater.* 69, 352–361. doi:10.1016/j.actbio.2018.01.035

Karageorgiou, V., and Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26 (27), 5474–5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005. 02.002

Kasuya, A., Sobajima, S., and Kinoshita, M. (2012). *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.* 30 (7), 1103–1111. doi:10.1002/jor.22044

Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. Eur. J. Cancer Care 26 (6), e12740. doi:10.1111/ecc.12740

Keating, J. F., and McQueen, M. M. (2001). Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. J. Bone Jt. Surg. Br. volume 83 (1), 3–8. doi:10.1302/0301-620x.83b1.0830003

Kheirallah, M., and Almeshaly, H. (2016). Bone graft substitutes for bone defect regeneration. A collective review. *Int. J. Dent. Oral Sci.* 3 (5), 247–255. doi:10.19070/ 2377-8075-1600051

Kim, J.-A., Lim, J., Naren, R., Yun, H.-S., and Park, E. K. (2016). Effect of the biodegradation rate controlled by pore structures in magnesium phosphate ceramic scaffolds on bone tissue regeneration *in vivo. Acta Biomater.* 44, 155–167. doi:10. 1016/j.actbio.2016.08.039

Klammert, U., Ignatius, A., Wolfram, U., Reuther, T., and Gbureck, U. (2011). *In vivo* degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta Biomater.* 7 (9), 3469–3475. doi:10.1016/j.actbio.2011. 05.022

Klammert, U., Reuther, T., Blank, M., Reske, I., Barralet, J. E., Grover, L. M., et al. (2010a). Phase composition, mechanical performance and *in vitro* biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. *Acta Biomater.* 6 (4), 1529–1535. doi:10.1016/j.actbio.2009.10.021

Klammert, U., Vorndran, E., Reuther, T., Müller, F. A., Zorn, K., and Gbureck, U. (2010b). Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing. J. Mat. Sci. Mat. Med. 21 (11), 2947–2953. doi:10.1007/s10856-010-4148-8

Kleer, N., Julmi, S., Gartzke, A.-K., Augustin, J., Feichtner, F., Waselau, A.-C., et al. (2019). Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, *in vivo. Materialia* 8, 100436. doi:10.1016/j. mtla.2019.100436

Kleer-Reiter, N., Julmi, S., Feichtner, F., Waselau, A. C., Klose, C., Wriggers, P., et al. (2021). Biocompatibility and degradation of the open-pored magnesium

scaffolds LAE442 and La2. Biomed. Mat. 16 (3), 035037. doi:10.1088/1748-605X/ abf5c5

Kolk, A., Handschel, J., Drescher, W., Rothamel, D., Kloss, F., Blessmann, M., et al. (2012). Current trends and future perspectives of bone substitute materials-from space holders to innovative biomaterials. J. Cranio-Maxillofacial Surg. 40 (8), 706–718. doi:10.1016/j.jcms.2012.01.002

Kowalewicz, K., Vorndran, E., Feichtner, F., Waselau, A.-C., Brueckner, M., and Meyer-Lindenberg, A. (2021). *In-vivo* degradation behavior and osseointegration of 3D powder-printed calcium magnesium phosphate cement scaffolds. *Mater. (Basel)* 14 (4), 946. doi:10.3390/ma14040946

Kurashina, K., Kurita, H., Kotani, A., Takeuchi, H., and Hirano, M. (1997). *In vivo* study of a calcium phosphate cement consisting of a-tricalcium phosphate/ dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide. *Biomaterials* 18 (2), 147–151. doi:10.1016/s0142-9612(96)00173-1

Laurie, S. W., Kaban, L. B., Mulliken, J. B., and Murray, J. E. (1984). Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plastic Reconstr. Surg.* 73 (6), 933–938. doi:10.1097/00006534-198406000-00014

LeGeros, R. Z. (2008). Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chem. Rev. 108 (11), 4742–4753. doi:10.1021/cr800427g

LeGeros, R. Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 395, 81–98. doi:10.1097/00003086-200202000-00009

Lodoso-Torrecilla, I., van den Beucken, J., and Jansen, J. A. (2021). Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability. *Acta Biomater.* 119, 1–12. doi:10.1016/j.actbio.2020.10.013

Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 28 (1), 36–42. doi:10.1097/moh. 00000000000021

Mestres, G., and Ginebra, M.-P. (2011). Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties. *Acta Biomater*. 7 (4), 1853–1861. doi:10.1016/j.actbio.2010.12.008

Moore, W. R., Graves, S. E., and Bain, G. I. (2001). Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J. Surg.* 71 (6), 354-361. doi:10.1046/j.1440-1622.2001. 02128.x

Nabiyouni, M., Brückner, T., Zhou, H., Gbureck, U., and Bhaduri, S. B. (2018). Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications. *Acta Biomater*. 66, 23–43. doi:10.1016/j.actbio.2017.11.033

Nombela-Arrieta, C., and Manz, M. G. (2017). Quantification and threedimensional microanatomical organization of the bone marrow. *Blood Adv.* 1 (6), 407–416. doi:10.1182/bloodadvances.2016003194

Ostrowski, N., Roy, A., and Kumta, P. N. (2016). Magnesium phosphate cement systems for hard tissue applications: A review. ACS Biomater. Sci. Eng. 2 (7), 1067–1083. doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00056

Peters, F., Groisman, D., Davids, R., Hänel, T., Dürr, H., and Klein, M. (2006). Comparative study of patient individual implants from β -tricalcium phosphate made by different techniques based on CT data. *Materwiss. Werksttech.* 37 (6), 457–461. doi:10.1002/mawe.200600019

Reid, J. W., and Hendry, J. A. (2006). Rapid, accurate phase quantification of multiphase calcium phosphate materials using Rietveld refinement. J. Appl. Cryst. 39 (4), 536–543. doi:10.1107/S0021889806020395

Rentsch, C., Rentsch, B., Scharnweber, D., Zwipp, H., and Rammelt, S. (2012). [Bone substitute. Transplants and replacement materials-an update]. *Knochenersatz. Unfallchirurg* 115 (10), 938–949. doi:10.1007/s00113-012-2238-4

Rietveld, H. M. (1969). A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. J. Appl. Cryst. 2 (2), 65-71. doi:10.1107/S0021889869006558

Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., et al. (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* 78, 1246–1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017

Samavedi, S., Whittington, A. R., and Goldstein, A. S. (2013). Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 9 (9), 8037–8045. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.014

Sarkar, K., Kumar, V., Devi, K. B., Ghosh, D., Nandi, S. K., and Roy, M. (2019). Effects of Sr doping on biodegradation and bone regeneration of magnesium phosphate bioceramics. *Materialia* 5, 100211. doi:10.1016/j.mtla.2019.100211 10.3389/fbioe.2022.998254

Theiss, F., Apelt, D., Brand, B., Kutter, A., Zlinszky, K., Bohner, M., et al. (2005). Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 26 (21), 4383–4394. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.056

Travlos, G. S. (2006). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.* 34 (5), 548–565. doi:10.1080/01926230600939856

von Doernberg, M.-C., von Rechenberg, B., Bohner, M., Grünenfelder, S., van Lenthe, G. H., Müller, R., et al. (2006). *In vivo* behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27 (30), 5186–5198. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.051

Vorndran, E., Ewald, A., Müller, F. A., Zorn, K., Kufner, A., and Gbureck, U. (2011). Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO4 system. J. Mat. Sci. Mat. Med. 22 (3), 429–436. doi:10.1007/s10856-010-4220-4

Vorndran, E., Klarner, M., Klammert, U., Grover, I. M., Patel, S., Barralet, J. E., et al. (2008). 3D powder printing of β-tricalcium phosphate ceramics using different strategies. Adv. Eng. Mat. 10 (12), B67–B71. doi:10.1002/adem.200800179

Walsh, W. R., Vizesi, F., Michael, D., Auld, J., Langdown, A., Oliver, R., et al. (2008). β -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. Biomaterials 29 (3), 266–271. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.035

Wang, L., and Nancollas, G. H. (2008). Calcium orthophosphates: Crystallization and dissolution. *Chem. Rev.* 108 (11), 4628–4669. doi:10.1021/cr0782574

Wang, S., Xu, C., Yu, S., Wu, X., Jie, Z., and Dai, H. (2019). Citric acid enhances the physical properties, cytocompatibility and osteogenesis of magnesium calcium phosphate cement. J. Mech. Behav. Biomed. Mat. 94, 42–50. doi:10.1016/j.jmbbm. 2019.02.026

Wei, J., Jia, J., Wu, F., Wei, S., Zhou, H., Zhang, H., et al. (2010). Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials* 31 (6), 1260–1269. doi:10.1016/j.biomaterials. 2009.11.005

Willbold, E., and Witte, F. (2010). Histology and research at the hard tissue-implant interface using Technovit 9100 New embedding technique. *Acta Biomater.* 6 (11), 4447–4455. doi:10.1016/j.actbio.2010.06.022

Wiltfang, J., Merten, H. A., Schlegel, K. A., Schultze-Mosgau, S., Kloss, F. R., Rupprecht, S., et al. (2002). Degradation characteristics of alpha and beta tricalcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J. Biomed. Mat. Res.* 63 (2), 115–121. doi:10. 1002/jbm.10084

Wu, F., Su, J., Wei, J., Guo, H., and Liu, C. (2008a). Injectable bioactive calcium-magnesium phosphate cement for bone regeneration. *Biomed. Mat.* 3 (4), 044105. doi:10.1088/1748-6041/3/4/044105

Wu, F., Wei, J., Guo, H., Chen, F., Hong, H., and Liu, C. (2008b). Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomater.* 4 (6), 1873–1884. doi:10. 1016/j.actbio.2008.06.020

Wu, L., Feyerabend, F., Schilling, A. F., Willumeit-Römer, R., and Luthringer, B. J. (2015). Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture. *Acta Biomater*. 27, 294–304. doi:10.1016/j.actbio.2015.08.042

Xu, L., Yu, G., Zhang, E., Pan, F., and Yang, K. (2007). *In vivo* corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. *J. Biomed. Mat. Res. A* 83 (3), 703–711. doi:10.1002/jbm.a.31273

Zeng, D., Xia, L., Zhang, W., Huang, H., Wei, B., Huang, Q., et al. (2012). Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone with calciummagnesium phosphate cement and bone marrow stromal cells in rabbits. *Tissue Eng. Part A* 18 (7-8), 870–881. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0379

Zhang, E., Xu, L., Yu, G., Pan, F., and Yang, K. (2009). *In vivo* evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J. Biomed. Mat. Res. A* 90 (3), 882–893. doi:10.1002/jbm.a.32132

Zhang, J., Liu, W., Schnitzler, V., Tancret, F., and Bouler, J. M. (2014). Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater.* 10 (3), 1035–1049. doi:10.1016/j.actbio.2013.11.001

Zhang, L., Yang, G., Johnson, B. N., and Jia, X. (2019). Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater.* 84, 16–33. doi:10.1016/j.actbio.2018.11.039

Zimmermann, G., and Moghaddam, A. (2011). Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 42, 16–21. doi:10.1016/j.injury.2011.06.199

IV. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Biokompatibilität, Degradation und Osseointegration von 3D-pulvergedruckten Scaffolds aus CMPC ohne Nachbehandlung sowie mit unterschiedlichen Nachbehandlungen vergleichend zu beurteilen. Hierfür wurden zylindrische Scaffolds (Länge: 5 mm, Ø: 4 mm) beidseitig in den nicht-gewichtstragenden, spongiösen Teil des Condylus lateralis ossis femoris von Kaninchen implantiert und in zwei aufeinander aufbauenden Studien untersucht. Als Referenz dienten in beiden Studien 3D-pulvergedruckte TCP Scaffolds gleicher Abmessung wie die CMPC Scaffolds. In einer ersten Kurzzeitstudie mit geringer Tierzahl (n = 4) wurden Scaffolds aus dem keramischen Zementpulver Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO₄)₂ ohne Nachbehandlung (Mg225) sowie mit Nachbehandlung mit Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP, (NH₄)₂HPO₄) (Mg225d) über einen Zeitraum von einer bzw. 6 Wochen beurteilt. Basierend auf den Ergebnissen der ersten Kurzzeitstudie wurden anschließend in einer zweiten Langzeitstudie mit größerer Tierzahl (n = 36) über einen Zeitraum von 6, 12 bzw. 24 Wochen Scaffolds, die wie in der ersten Studie aus dem keramischen Zementpulver Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂ hergestellt und anschließend mit DAHP (Mg225d) bzw. Phosphorsäure (PA, H₃PO₄) (Mg225p) nachbehandelt wurden, evaluiert. In beiden Studien erfolgte eine regelmäßige klinische, radiologische und µCT-Untersuchung der Tiere in vivo. Nach Euthanasie der Tiere wurden die Scaffold-Knochen-Komplexe in einem höher auflösenden µCT 100 (Kurzzeitstudie) bzw. µCT 80 (Langzeitstudie) gescannt sowie histologisch untersucht und in der Langzeitstudie zudem mittels REM und EDX analysiert.

Für die vorliegende Arbeit wurde in beiden Studien das Tiermodell Kaninchen gewählt, da diese Tiere für erste In-vivo-Implantationsstudien aufgrund geringer Kosten in Anschaffung und Unterhalt, einfacher Handhabung sowie geringer Größe und kurzer Lebensdauer optimal geeignet sind (Stübinger und Dard 2013). Bereits mit einem Alter von etwa 6 Monaten erreichen sie, früher als größere Tiere, ihre Skelettreife (Stübinger und Dard 2013). Für Studien an Kortikalis- und Spongiosa-Implantaten werden oft die Hintergliedmaßen von Kaninchen verwendet (Wancket 2015). Der Condylus ossis femoris stellt eine leicht zugängliche anatomische Stelle mit ausgeprägtem Anteil an trabekulärem Knochen dar. in dem Knochenersatzstoffe in Defekten von 8 – 10 mm Länge und 3 – 4 mm Durchmesser auf ihre Biokompatibilität und Osteoinduktion in der Spongiosa geprüft werden können (Stübinger und Dard 2013, Wancket 2015). Von der Höh et al. (2006, 2009) untersuchten daher beispielsweise zylindrische Implantate aus Magnesium-Calcium-Legierungen mit verschiedenen Oberflächenbearbeitungen im *Condylus medialis ossis femoris*. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Implantationsstelle des *Condylus lateralis ossis femoris* wurde auch von anderen Autoren zur *In-vivo*-Untersuchung von CMPC Pasten oder CMPC Granulaten gewählt (Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021). Obwohl das Kaninchenmodell für die erste *In-vivo*-Untersuchung zur Beurteilung der Funktionalität und Sicherheit eines Knochenersatzstoffes sehr gut geeignet ist, müssen die unterschiedliche Knochenzusammensetzung und Geschwindigkeit des Knochenumbaus, welche beim Kaninchen deutlich schneller ist als bei größeren Tieren oder dem Menschen, bei der Beurteilung der Knochenheilung berücksichtigt werden (Stübinger und Dard 2013, Wancket 2015).

Um die Biokompatibilität, Degradation und Osseointegration der CMPC Scaffolds vergleichend beurteilen zu können wurden in der vorliegenden Arbeit zylindrische TCP Scaffolds gleicher Abmessung als Referenzmaterial gewählt, welche ebenfalls mit dem 3D-Pulverdruck hergestellt wurden. Bei TCP (Ca₃(PO₄)₂) handelt es sich resorbierbares. osteokonduktives sowie ein osteoinduktives um Knochenersatzmaterial, welches seit Jahrzehnten klinisch erprobt und kommerziell erhältlich ist (Schnürer et al. 2003, Wang und Yeung 2017, Bohner et al. 2020). Aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften wird TCP in der zahnmedizinischen orthopädischen Chirurgie hauptsächlich und zur Behandlung nichtgewichtstragender Knochendefekte durch beispielsweise Traumata oder gutartige Tumore sowie als Beschichtung von Zahnimplantaten und Metallprothesen angewandt (Dorozhkin 2013a, Wang und Yeung 2017).

Da die beiden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien aufeinander aufbauen, werden nachfolgend zuerst die wichtigsten Erkenntnisse der Kurzzeitstudie diskutiert. Aufgrund der Übereinstimmung vieler Methoden und Ergebnisse der Kurzzeitstudie mit der Langzeitstudie werden diese im Anschluss zusammen mit der Langzeitstudie erörtert.

Alle in der Kurzzeitstudie untersuchten Materialien (Mg225, Mg225d, TCP) zeigten eine sehr gute klinische Verträglichkeit, hervorragende Biokompatibilität, rasche und umfassende Osseointegration sowie effektive Osteoneogenese, was in

Einklang steht mit den Ergebnissen von In-Vivo-Studien zu CMPC Pasten oder CMPC Granulaten anderer Autoren (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021). Die Nachbehandlung der Scaffolds mit DAHP führte zur partiellen Phasenumwandlung des Zementrohmaterials Farringtonit zu Struvit, was mit der Erhöhung der Druckfestigkeit und Verringerung der Porosität und Porengröße bei den Mg225d Scaffolds im Vergleich zu den unbehandelten Mg225 Scaffolds einherging. Eine Steigerung der Druckfestigkeit nach Behandlung von MPC Scaffolds mit DAHP konnte von Klammert et al. (2010c) ebenfalls nachgewiesen werden. Die bei der In-vivo-µCT-Untersuchung beurteilte Degradation mit Form- und Strukturverlust, Abnahme des Scaffoldvolumens (SV) sowie verringerter Abgrenzbarkeit vom Knochengewebe war bei Mg225 ausgeprägter und trat schneller auf als bei Mg225d und TCP. Spätestens 4 Wochen nach der Implantation war eine breite Kontaktfläche zwischen jedem Scaffold und dem umgebenden Knochen sichtbar. Bei der histologischen sowie der µCT 100-Untersuchung zeigte sich, dass der Implantationsbereich aller Scaffolds nach 6 Wochen vollständig von einem dichten Netzwerk neugebildeter Knochentrabekel durchzogen war. Nach Implantation von CMPC Pasten in den distalen Femurkondylus des Kaninchens wurde bei ähnlicher Implantatgröße wie in der vorliegenden Arbeit erst nach 3 Monaten eine Knochenneubildung in vielen Bereichen des Defekts beobachtet (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010), was in Bezug auf die Knochenregeneration für bessere Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Materialien spricht. Wie für CMPC Pasten auch in anderen Studien beobachtet (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Ewald et al. 2019) trat in der Kurzzeitstudie dieser Arbeit bei allen Materialien eine zentripetal gerichtete Scaffolddegradation auf, die bei Mg225 am stärksten ausgeprägt war. Während bei Mg225d und TCP nach 6 Wochen die Scaffoldstruktur in Form eines zusammenhängenden Materialgerüstes noch deutlich sichtbar war, trat verbleibendes Material von Mg225 lediglich noch in Form von einzelnen, im Implantationsbereich diffus verteilten, kleinen Partikeln auf. Da die Auflösung einen chemisch-physikalischen Prozess darstellt, wird diese durch die Löslichkeit, die Porosität und die Porengröße der implantierten Biokeramik gesteuert (Dorozhkin 2013a). Die schnellere Degradation der Mg225 Scaffolds ist sowohl auf die höhere Porosität und Porengröße im Vergleich zu Mg225d als auch auf das Fehlen einer Binderphase zum Zusammenhalt der Zementrohmaterialien zurückzuführen. Für die Knochenbildung in Knochenersatzmaterialien sind Poren

notwendig und es ist bekannt, dass große Poren und eine hohe Porosität die Osseointegration und das Einwachsen von Knochen fördern (Karageorgiou und Kaplan 2005). Bei der In-vivo-Untersuchung von MPCs wurde zudem nachgewiesen, dass eine Mikroporosität der Scaffolds die Reifung und den Umbau des neugebildeten Knochens induziert (Kim et al. 2016). Die höhere Porosität und größere Porengröße von Mg225 im Vergleich zu Mg225d förderten in der vorliegenden Arbeit die Osteoneogenese und Osseointegration dieses Materials. Es zeigte sich jedoch, dass Mg225 aufgrund der geringen Druckfestigkeit, welche gemäß der Literatur mit der hohen Porosität und großen Porengröße zusammenhängt (Vorndran et al. 2011a, Zhang et al. 2014, Wang et al. 2019), sowie der sehr schnellen Degradation mit raschem Zerfall in einzelne Materialpartikel nicht für den Einsatz im gewichtstragenden Knochen geeignet ist, weshalb dieses Material in der nachfolgenden Langzeitstudie nicht weiter untersucht wurde. Mg225d hingegen wies durch die Nachbehandlung mit DAHP und die höhere Druckfestigkeit, geringere Porosität und Porengröße sowie langsamere In-vivo-Degradation aufgrund der Ausbildung der Binderphase Struvit vielversprechende Eigenschaften zur Verwendung in gering lasttragenden Defekten auf. Da sich die basische Nachbehandlung in der Kurzzeitstudie der vorliegenden Arbeit als vorteilhaft erwies wurde für die Untersuchung in der Langzeitstudie neben Mg225d ein weiteres Material mit einer anderen Nachbehandlung ausgewählt. Mg225 wurde hierfür einer Nachbehandlung mit Phosphorsäure unterzogen (Mg225p). Durch die Nachbehandlung mit einer sauren Phosphatlösung kommt es zur Ausfällung von Newberyit und Bruschit (Klammert et al. 2010b, Klammert et al. 2011, Gefel et al. 2022). Insgesamt wurden in der Langzeitstudie die drei Materialien Mg225d, Mg225p und TCP untersucht.

Wie für CMPC Pasten oder CMPC Granulate auch von anderen Autoren beschrieben (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021) zeigten die im Rahmen der beiden Studien der vorliegenden Arbeit untersuchten CMPCs Mg225, Mg225d und Mg225p sowie TCP alle eine hervorragende klinische Verträglichkeit. Es wurde stets eine physiologische Wundheilung ohne das Auftreten von Schmerzhaftigkeit oder Lahmheit beobachtet. Vereinzelt vorgefundene geringgradige Rötungen und Schwellungen des Gewebes am Implantationsbereich sind auf das operative Trauma zurückzuführen und waren wenige Tage nach der Operation abgeklungen. Diese Symptome werden gemäß der Literatur als physiologische Ausprägungen der Wundheilungsphase der Hämostase und Entzündung angesehen (Broughton et al. 2006).

Die röntgenologisch kürzere Sichtbarkeit der CMPC Scaffolds im Vergleich zu TCP, welches bis Woche 6 (Kurzzeitstudie) bzw. bis Woche 24 (Langzeitstudie) in beiden beurteilten Röntgenebenen stets vom umgebenden Knochen abgrenzbar war, weist auf eine im Vergleich zu TCP schnellere Degradation der CMPCs hin und wurde von Fuchs et al. (2021) bei der vergleichenden Beurteilung von Granulaten aus CMPCs und HA im Kaninchenmodell ebenfalls beobachtet. Eine schnellere Degradation von CMPC Pasten im Vergleich zu HA Pasten wurde radiologisch durch Abnahme der Röntgenopazität ebenfalls von Ewald et al. (2019) nachgewiesen und auch Klammert et al. (2011) berichteten von radiologisch sichtbaren Veränderungen, die auf eine schnellere Degradation von MPCs im Vergleich zu CDHA hindeuten. Röntgenstrahlung wird jedoch von Elementen hoher Ordnungszahl (z. B. Calcium, Titan oder Eisen) stärker absorbiert als von Elementen niedriger Ordnungszahl (z. B. Magnesium, Sauerstoff oder Kohlenstoff), was eine höhere Röntgenopazität von Elementen hoher Ordnungszahl zur Folge hat (Watts 1987, Mirzaaligoudarzi 2012). Die verglichen mit den CMPCs längere Sichtbarkeit der TCP Scaffolds in den beiden Studien dieser Arbeit lässt sich daher möglicherweise zum Teil auch durch den höheren Gehalt an röntgendichtem Calcium erklären. Die deutlich höhere Röntgenopazität von TCP im Vergleich zu angrenzendem Knochen wurde auch von von Doernberg et al. (2006) berichtet. Da alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten CMPCs eine dem Knochen sehr ähnliche Röntgendichte aufwiesen, was für MPC Pasten in der Literatur ebenfalls beschrieben wurde (Kanter 2014), und die CMPC Scaffolds bereits direkt nach der Implantation nicht immer von diesem abgrenzbar waren, eignet sich die Röntgenuntersuchung nur bedingt zur Beurteilung der Degradation der CMPC Scaffolds.

Bei der μ CT-Untersuchung handelt es sich um eine zerstörungsfreie und wiederholbare Technik, die eine präzise qualitative und quantitative 3D-Analyse des Knochens ermöglicht und mit welcher die Degradation und Osseointegration von Knochenersatzstoffen bereits in zahlreichen Studien beurteilt wurde (von der Höh et al. 2009, He et al. 2017, Kanter et al. 2018, Kleer et al. 2019, Sarkar et al. 2019, Augustin et al. 2020, Golafshan et al. 2020, Vidal et al. 2020). Durch regelmäßige *In-vivo*- μ CT-Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit die

Materials zurückzuführen ist.

Degradation und Osseointegration der CMPC und TCP Scaffolds im Zeitverlauf evaluiert. Über die Untersuchungszeit von 24 Wochen nahm in der Langzeitstudie die Abgrenzbarkeit der CMPC Scaffolds vom umgebenden Knochen kontinuierlich ab und der Formverlust kontinuierlich zu, wobei dies bei Mg225d signifikant schneller stattfand als bei Mg225p. Alle TCP Scaffolds waren stets vollständig vom Knochen abgrenzbar, wiesen bis Woche 24 nahezu immer eine deutliche zylindrische Form auf und unterschieden sich damit signifikant von den CMPCs. Kanter et al. (2018) beobachteten bei der µCT-Untersuchung von Struvit-Zementen im Schafmodell ebenfalls eine kontinuierliche Degradation, während über den Untersuchungszeitraum von 10 Monaten kein Abbau von CDHA-Zementen nachgewiesen werden konnte. In der Langzeitstudie konnte bei Mg225d eine signifikant stärkere Degradation der knochenmarknahen Scaffoldhälfte als bei Mg225p und TCP festgestellt werden. Dieses Phänomen der schnelleren Implantatdegradation in der Nähe des Knochenmarks oder im Knochenmark als in spongiösem oder kompaktem Knochen wurde auch von anderen Autoren bei der Untersuchung von Magnesium-basierten Implantaten beobachtet und ist darauf zurückzuführen, dass knochenmarknah aufgrund der stärkeren Vaskularisation und des schwächer ausgeprägten Trabekelnetzwerks ein schnellerer Abtransport der Abbauprodukte sowie die Verteilung von Materialpartikeln in umliegendes Gewebe erfolgt (Xu et al. 2007, von der Höh et al. 2009, Zhang et al. 2009). Es ist davon auszugehen, dass in der vorliegenden Arbeit die im Vergleich zu Mg225p und TCP signifikant schnellere Degradation der Mg225d Scaffolds an der Kontaktseite zum Knochenmark auf die insgesamt schnellere Degradation dieses

In beiden Studien dieser Arbeit zeigten die untersuchten CMPCs in der quantitativen *In-vivo*-µCT-Untersuchung eine rasche und über die Untersuchungszeit kontinuierlich zunehmende Volumendegradation (Abnahme des SV). In der Kurzzeitstudie degradierte Mg225 deutlich schneller und stärker als Mg225d, in der Langzeitstudie konnte ein stärkerer und signifikant schnellerer Volumenverlust von Mg225d im Vergleich zu Mg225p beobachtet werden. Die unterschiedlich schnelle Degradation der einzelnen Materialien kann durch die verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften der Scaffolds erklärt werden. Während das unbehandelte Mg225 aus den Zementrohmaterialien Stanfieldit und Farringtonit bestand, kam es durch die Nachbehandlung mit der Base DAHP (Mg225d) bzw. mit Phosphorsäure (Mg225p) zur Ausbildung der Binderphasen Struvit (Mg225d), Newberyit und Bruschit (Mg225p), welche maßgeblich für den Zusammenhalt der Zementrohmaterialien verantwortlich sind (Mg225d: 6,9 Ma.-% (Kurzzeitstudie) bzw. 5,9 Ma.-% (Langzeitstudie) Struvit, Mg225p: 53,3 Ma.-% Newberyit, 8,4 Ma.-% Bruschit). Die chemische Löslichkeit der einzelnen Phasen der in dieser Arbeit untersuchten CMPCs nimmt gemäß der Literatur wie folgt zu: Farringtonit < Struvit < Bruschit < Newberyit (Ostrowski et al. 2016). In der zugänglichen Literatur sind keine Daten zur Löslichkeit von Stanfieldit verfügbar. Da es sich bei der Auflösung um einen chemischphysikalischen Prozess handelt, wird diese nicht nur durch die Löslichkeit, sondern auch durch die Porengröße, Porosität und das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen gesteuert (Dorozhkin 2013a). In verschiedenen In-vitro- und In-vivo-Studien zu CMPCs und MPCs konnte eine schnellere Materialdegradation bei Scaffolds mit größerer Porengröße und höherer Porosität beobachtet werden (Wei et al. 2010, Kim et al. 2016). Vor der Implantation wies Mg225 eine Porosität von 58 % und eine mediane Porengröße von 47 µm auf, Mg225d von 29 % und 13 µm (Kurzzeitstudie) bzw. 28 % und 16 µm (Langzeitstudie). Mg225p hatte eine Porosität von 27 % bei einer medianen Porengröße von 3 µm. TCP wies eine Porosität von 37 % und eine mediane Porengröße von 30 µm (Kurzzeitstudie) bzw. 42 % und 49 µm (Langzeitstudie) auf. Durch das Fehlen einer Binderphase bei Mg225 sowie aufgrund der größeren Porengröße und höheren Porosität im Vergleich zu Mg225d ist das unbehandelte CMPC in der Kurzzeitstudie über 6 Wochen deutlich schneller und stärker degradiert als Mg225d. Im Rahmen der Langzeitstudie konnte gezeigt werden, dass für die Geschwindigkeit der Degradation weniger ausschlaggebend ist welche Binderphase sich aufgrund der Nachbehandlung bildet, sondern vielmehr in welchem Umfang die chemische Phasenumwandlung stattfindet, was von Gefel et al. (2022) bei der In-Vitro-Untersuchung von MPCs ebenfalls beschrieben wurde. Trotz eines höheren Anteils des chemisch weniger löslichen Zementrohmaterials und der geringeren Löslichkeit der Binderphase Struvit im Vergleich zu Newberyit wurde eine schnellere und höhere chemische Löslichkeit von Farringtonit/Struvit Scaffolds im Vergleich zu Farringtonit/Newberyit Scaffolds nachgewiesen, da erstere einen geringeren Ma.-% Anteil der Binderphase aufwiesen, welche schneller abgebaut wurde und woraufhin anschließend das Zementrohmaterial schneller degradierte (Gefel et al. 2022). In der vorliegenden Arbeit kann der gleiche Prozess angenommen werden.

Durch den höheren Ma.-% Anteil der Binderphasen Newberyit und Bruschit bei Mg225p nahm deren Degradation trotz der höheren Löslichkeit im Vergleich zu Struvit längere Zeit in Anspruch, weshalb die Zementrohmaterialien länger zusammengehalten wurden und die Scaffolddegradation langsamer voranschritt als bei Mg225d. Bei Mg225d hingegen wurde die Binderphase Struvit aufgrund des geringen Ma.-% Anteils relativ schnell abgebaut. Basierend auf der REM- und EDX-Analyse wird zudem angenommen, dass Struvit in den Mg225d Scaffolds der Langzeitstudie der vorliegenden Arbeit ungleichmäßig verteilt und vor allem im Randbereich der Scaffolds vorhanden war, während im Scaffoldzentrum Bereiche mit unreagiertem Rohpulver auftraten. Nach Auflösung der struvithaltigeren Randbereiche wurde die verbleibende Zementmatrix nicht mehr ausreichend zusammengehalten und es kam zu einer Erhöhung der Porosität und Porengröße, die letztendlich zum Strukturverlust und Zerfall der Mg225d Scaffolds in einzelne Materialpartikel führte. Durch das Einwachsen von Zellen und Knochen wurde dieser Prozess zusätzlich beschleunigt. Kanter et al. (2018) konnten bei der In-Vivo-Untersuchung von MPC Pasten ebenfalls beobachten, dass die Binderphase Struvit schneller aufgelöst wurde als das nicht umgesetzte Zementrohmaterial Farringtonit und dass die Auflösung von Struvit in der frühen Implantationszeit die Porosität der Pasten erhöhte, was das Einwachsen von materialabbauenden Zellen begünstigte. Eine höhere Mikroporosität von CPC und MPC Scaffolds führte in vitro zu einer höheren Gewichtabnahme und bei der In-Vivo-Untersuchung von MPC Scaffolds wurde bei größerer Porengröße eine schnellere Materialdegradation beobachtet (Wei et al. 2010, Kim et al. 2016). Es ist daher zudem anzunehmen, dass die in der vorliegenden Arbeit bei der Messung mit dem Quecksilberporosimeter und der REM-Analyse vor der Implantation nachgewiesene höhere Porosität und größere Porengröße von Mg225d im Vergleich zu Mg225p einen zusätzlich beschleunigenden Einfluss auf die Degradationsgeschwindigkeit hatten. Mit dem Verlust der zusammenhängenden Scaffoldstruktur ging eine mit der In-Vivo-µCT-Untersuchung nachgewiesene Vergrößerung der Scaffoldoberfläche im Verhältnis zum Scaffoldvolumen (SS/SV) einher, welche, wie es für Biokeramiken in der Literatur beschrieben ist (Dorozhkin 2013a), die Auflösung der Scaffolds zusätzlich beschleunigte. Da Mg225d zwischen Woche 6 und 10 eine signifikant größere SS/SV aufwies als Mg225p wurde bestätigt, dass die Mg225d Scaffolds wesentlich schneller als Mg225p in einzelne Materialpartikel zerfallen sind. Aufgrund der relativ geringen Löslichkeit von TCP, wie sie von Wang und Nancollas (2008)

beschrieben wird, fand die Auflösung der TCP Scaffolds in beiden Studien der eigenen Arbeit lediglich in einem geringen Umfang statt. Durch den höheren Ma.-% Anteil an α -TCP in der Kurzzeitstudie verglichen mit der Langzeitstudie, welches gemäß der Literatur löslicher ist als β -TCP (Carrodeguas und De Aza 2011), war der Volumenverlust bis Woche 6 in der Kurzzeitstudie größer als in der Langzeitstudie. Da in der Kurzzeitstudie jedoch eine deutlich geringere Anzahl an Scaffolds untersucht wurde als in der Langzeitstudie kann die Degradation von TCP zwischen den beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien nur eingeschränkt verglichen werden.

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Materialien zeigten in der In-vivo-µCT-Untersuchung eine rasche und umfassende Osseointegration sowie das Einwachsen zahlreicher neugebildeter Knochentrabekel in das Scaffoldvolumen. Bereits nach einer (Kurzzeitstudie) bzw. zwei Wochen (Langzeitstudie) konnte das Anwachsen von Trabekeln an den Scaffoldrand beobachtet werden, nach 4 Wochen war bei nahezu allen Scaffolds (Langzeitstudie) und nach 4 (Kurzzeitstudie) bzw. 8 Wochen (Langzeitstudie) bei allen untersuchten Scaffolds eine breite Kontaktfläche zwischen Scaffold und umgebendem Knochen sichtbar. Dies deutet auf eine hervorragende Biokompatibilität sowie sehr gut geeignete Oberflächen- und Struktureigenschaften der Scaffolds hin. Andere Autoren beobachteten bei der In-Vivo-Untersuchung von CMPC Pasten oder Granulaten im Kaninchenmodell ebenfalls eine gute Osseointegration (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021). Da die Osseointegration in diesen Studien jedoch erstmalig nach Euthanasie der Tiere einen Monat bzw. 6 Wochen nach der Implantation beurteilt wurde kann die Geschwindigkeit der Integration der Pasten in den umgebenden Knochen mit der Osseointegration der Scaffolds der eigenen Studie nur eingeschränkt verglichen werden. Es ist jedoch bekannt, dass Poren die Proliferation und Migration von mesenchymalen Zellen und Osteoblasten ermöglichen und daher für die Knochenbildung notwendig sind (Karageorgiou und Kaplan 2005). Knochenersatzmaterialien mit einem interkonnektierenden Porensystem können von Blutgefäßen durchdrungen werden, was durch die hohe Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr die direkte Osteogenese begünstigt (Karageorgiou und Kaplan 2005, Klenke et al. 2008). Der positive Einfluss insbesondere von Mikroporen auf das Anwachsen von Zellen auf der Materialoberfläche sowie auf deren Proliferation
94

und Aktivität konnte bei der *In-vitro*-Untersuchung von CMPC und MPC Scaffolds gezeigt werden (Wei et al. 2010). Im Vergleich zu Zementpasten und Granulaten wiesen die in dieser Arbeit untersuchten 3D-pulvergedruckten CMPC Scaffolds eine hohe Mikroporosität mit interkonnektierenden Poren und großer Oberfläche auf, was sich wahrscheinlich positiv auf die Osseointegration ausgewirkt hat. Es ist zudem bekannt, dass durch eine poröse Oberfläche die Verzahnung zwischen dem Knochenersatzstoff und umgebenden Knochen verbessert und die mechanische Stabilität an dieser bedeutenden Schnittstelle erhöht wird (Karageorgiou und Kaplan 2005), was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht wurde.

In beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien konnte bei der In-vivo-µCT-Untersuchung bei allen Materialien in der hohlzylindrischen ROI in der direkten Scaffoldumgebung eine bzw. zwei Wochen nach der Scaffoldimplantation ein starker (Kurzzeitstudie) bzw. signifikanter (Langzeitstudie) Anstieg des Knochenvolumens (BV) beobachtet werden, auf den stets ein Abfall des BV und eine Annäherung an das Volumen physiologischer Spongiosa folgte. Dies lässt auf osteokonduktive und möglicherweise osteoinduktive Eigenschaften der Materialien schließen. Eine osteokonduktive Wirkung sowie die Stimulation der Knochenbildung und -regeneration durch CPCs, MPCs und CMPCs wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Samavedi et al. 2013, Kim et al. 2016, Nabiyouni et al. 2018, Bohner et al. 2020, Fuchs et al. 2021, Kaiser et al. 2022). Die Freisetzung von Ionen aus einem degradierenden Implantat hat mitunter einen starken Einfluss auf die Knochenneubildung um das Implantat (Ostrowski et al. 2016). Ein lokaler Anstieg an freien Ca²⁺- und PO₄³⁻-Ionen auf ein supra-physiologisches Niveau wirkt sich positiv auf die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten sowie die anschließende Knochenneubildung aus (Chai et al. 2012). Es ist daher möglich, dass in dieser Arbeit die Freisetzung von Ca2+- und PO43-Ionen während der Scaffolddegradation bereits kurz nach der Implantation zu einem lokalen Anstieg der Ionenkonzentration in der Scaffoldumgebung führte, was potentiell die Knochenbildung stimulierte. Die Korrelation zwischen höherem Ca²⁺-Gehalt und höherem BV in der Umgebung der TCP Scaffolds im Vergleich zu den CMPC Scaffolds über die Dauer der beiden Studien dieser Arbeit unterstützt diese Vermutung. Auch eine hohe Mg2+-Konzentration fördert die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und steigert deren Aktivität (Wu et al. 2015, He et al. 2016), was in mehreren Studien vermutlich zu einem verstärkten Knochenwachstum in der Implantatumgebung führte (Ostrowski et al. 2016, Kanter et al. 2018) und möglicherweise in der vorliegenden Arbeit für das größere Knochenvolumen in der Umgebung der CMPCs ebenfalls von Bedeutung gewesen sein könnte. Da allerdings auch angenommen wird, dass bereits ein Trauma des Knochengewebes, z. B. bei der Frakturheilung oder dem Einsetzen eines Implantates, eine osteoinduktive Wirkung hat (Albrektsson und Johansson 2001), ist es ebenfalls möglich, dass in dieser Arbeit bereits das Trauma der Bohrung bei allen Materialien zur Osteoinduktion und Erhöhung des BV in der Defektumgebung führte. Weil jedoch keine vergleichende Leerbohrung durchgeführt wurde, konnte der BV-Anstieg im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend erklärt werden. Eine osteokonduktive und sogar geringgradig osteoinduktive Wirkung der untersuchten Materialien ist dennoch anzunehmen, da das BV in der direkten Scaffoldumgebung der CMPCs sowie von TCP stets geringgradig höher war bzw. im oberen Referenzbereich von physiologischem Knochen an dieser Lokalisation lag.

Über die Untersuchungszeit der beiden Studien der vorliegenden Arbeit wurden deutliche Veränderungen der trabekulären Strukturparameter beobachtet. In der Kurzzeitstudie nahm über die Studiendauer von 6 Wochen in der direkten Scaffoldumgebung die Tb.Th bei allen Materialien zu, die Tb.N war bei Mg225 und TCP nach 6 Wochen höher, bei Mg225d niedriger als direkt nach der Operation. In der Langzeitstudie kam es über die Studiendauer von 24 Wochen zu einer Abnahme der Tb.N sowie einer Zunahme der Tb.Th und der Tb.Sp, welche sowohl bei allen Materialien im In-vivo-µCT in der direkten Scaffoldumgebung als auch bei den CMPCs im µCT 80 innerhalb des ursprünglichen Scaffoldvolumens festgestellt wurde. Diese Veränderungen der trabekulären Stukturparameter (Anstieg der Tb.Th und Tb.Sp, Abnahme der Tb.N) wurden von Kanter et al. (2018) bei der Untersuchung von Struvit-Zementen ebenfalls beobachtet und zeigen, dass sich der neugebildete Knochen kontinuierlich umgebaut hat, gereift ist und sich an die physiologische Situation angepasst hat. Während in der eigenen Arbeit signifikante Veränderungen der Tb.N, Tb.Th und Tb.Sp innerhalb der Defekte der CMPCs vorwiegend zwischen Woche 6 und 12 beobachtet wurden und der neugebildete Knochen innerhalb der Mg225p Scaffolds bereits nach 24 Wochen nahezu die gleichen Struktureigenschaften wie physiologischer Knochen an dieser Lokalisation aufwies, wurden diese knöchernen Umbauprozesse von Kanter et al.

(2018) im Schafmodell beim Vergleich von Monat 4 mit Monat 10 nach der Implantation festgestellt. Die zeitlich verschobene Beobachtung der osseären Reifung und Adaption ist gemäß der Literatur auf die höhere Geschwindigkeit des Knochenumbaus bei Kaninchen als bei größeren Tieren zurückzuführen (Stübinger und Dard 2013). Kleine Wiederkäuer hingegen sind in Körpergewicht, Knochengröße und Knochenheilungspotenzial mit dem Menschen vergleichbar (Wancket 2015). Da jedoch von Kanter et al. (2018) die trabekulären Strukturparameter in einer hohlzylindrischen ROI zwischen dem verbleibenden Zementmaterial und dem Rand des Bohrlochdefekts gemessen wurden, die zylindrische ROI in der eigenen Arbeit jedoch den gesamten Scaffolddurchmesser umfasste und sich auch die Größe der untersuchten Implantate bzw. Knochendefekte unterschied, sind die Veränderungen der trabekulären Strukturparameter nicht uneingeschränkt vergleichbar. Gemäß der Literatur ist jedoch zur Beurteilung der Eignung der in dieser Arbeit untersuchten Scaffolds für den Knochenersatz auch in einem größeren Tiermodell eine Demonstration der effektiven Osteoneogenese nötig (Wancket 2015). Bei TCP konnte in der Langzeitstudie der vorliegenden Arbeit innerhalb des ursprünglichen Scaffoldvolumens keine derartige Veränderung der trabekulären Strukturparameter beobachtet werden, da die große Menge an verbleibendem Material die Knochenreifung wahrscheinlich räumlich einschränkte und daher verzögerte.

Bei der µCT 80-Untersuchung der isolierten Scaffold-Knochen-Komplexe in der Langzeitstudie zeigte sich, dass nach 12 und 24 Wochen Trabekel im Querschnitt von Mg225p und TCP stets bis in das Zentrum des Scaffoldradius zogen, während dies bei Mg225d signifikant seltener der Fall war. Im Längsschnitt befanden sich in Woche 12 und 24 die neugebildeten Trabekel bei Mg225d vorrangig im cortexnahen Implantationsbereich, während diese bei Mg225p und TCP signifikant (Woche 12) bzw. deutlich (Woche 24) gleichmäßiger verteilt waren. Diese Unterschiede können durch die verschiedenen Degradationsgeschwindigkeiten der Materialien erklärt werden. Aufgrund der insgesamt rascheren Degradation von Mg225d, sowie vor allem aufgrund der knochenmarknah signifikant stärkeren Degradation von Mg225d im Vergleich zu Mg225p und TCP, konnte die Knochenneubildung der Abbaugeschwindigkeit der Scaffolds nicht folgen, sodass kein gleichmäßiges Trabekelnetzwerk ausgebildet werden konnte. Ewald et al. (2019) beobachteten, vermutlich ebenfalls aufgrund einer zu schnellen Degradation, bei der *In-vivo*-Untersuchung von CMPC Pasten bei dem schneller degradierenden Material eine Abnahme des Knochen-Implantat-Kontakts beim Vergleich von 6 mit 12 Wochen nach der Implantation. Aufgrund der langsameren Degradation von Mg225p dienten in der Langzeitstudie der vorliegenden Arbeit die Scaffolds dem Knochen länger als Leitschiene und ermöglichten das direkte Anwachsen von neugebildeten Trabekeln an die Materialpartikel. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass TCP, von dem zu jedem Zeitpunkt noch eine große Menge an Scaffoldmaterial vorhanden war, stets Trabekel bis ins Zentrum des Scaffoldradius mit gleichmäßiger Verteilung im Längsschnitt aufwies.

Trotz der Vorteile der zerstörungsfreien und damit wiederholbaren, dreidimensionalen Technik der In-vivo-µCT-Untersuchung weist dieses Verfahren zur Beurteilung der Volumendegradation der CMPCs bzw. von TCP Limitationen auf. Es ist davon auszugehen, dass in der vorliegenden Arbeit aufgrund der sehr ähnlichen Röntgendichte nicht immer eindeutig zwischen in den Implantationsbereich eingewachsenem Knochen und verbleibendem Scaffoldmaterial unterschieden werden konnte und daher zum Teil fälschlicherweise neugebildeter Knochen zum Scaffoldvolumen gerechnet wurde. Andere Autoren berichteten ebenfalls von Schwierigkeiten bei der Differenzierung von Biomaterialien aus CaP bzw. MgP und umgebendem Knochen bei µCT-Untersuchungen (Chopra et al. 2009, Huber et al. 2009, Kasuya et al. 2012, Kanter 2014). Es ist zudem bekannt, dass die Genauigkeit der Messung trabekulärer Mikrostrukturparameter im µCT von der Voxelgröße abhängt (Issever et al. 2010, Tjong et al. 2012, Ibrahim et al. 2014). Bei der Untersuchung im μ CT 100 ließ sich in der Kurzzeitstudie aufgrund der kleineren isotropen Voxelgröße (µCT 100: 8 μm, *In-vivo*-μCT: 30,3 μm) neugebildeter Knochen besser vom Scaffoldmaterial abgrenzen und Trabekel in der Scaffoldumgebung wurden genauer einzeln detektiert. Die Messungen im µCT 100 oder µCT 80 können aufgrund des kleinen Scanbereichs und der langen Scandauer jedoch lediglich zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Euthanasie der Tiere an den isolierten Scaffold-Knochen-Komplexen durchgeführt werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse der In-vivoµCT-Untersuchung wurden in der Langzeitstudie histomorphometrische Untersuchungen durchgeführt. Diese Methode wurde auch von anderen Autoren zur Beurteilung der Degradation von CPCs und der Knochenneubildung nach Implantation von CPCs oder CMPCs genutzt (Apelt et al. 2004, Theiss et al. 2005, Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010). Hierbei konnte der verbleibende Scaffoldanteil eindeutig bestimmt werden und es wurde die nahezu vollständige Degradation der CMPC Scaffolds nach 24 Wochen nachgewiesen. Eine histomorphometrische Untersuchung ist jedoch ebenfalls nur einmalig nach Euthanasie der Tiere möglich und erlaubt lediglich eine Beurteilung im zweidimensionalen Raum, weshalb die *In-vivo*-µCT-Untersuchung dennoch unverzichtbar ist für die dreidimensionale Beurteilung der Degradation und Osseointegration der Scaffolds im Zeitverlauf.

Da alle Biomaterialien nach der In-vivo-Implantation Zell- und Gewebereaktionen auslösen, welche Entzündungs-, Wundheilungs- und Fremdkörperreaktionen umfassen, ist zur Beurteilung ihrer Biokompatibilität eine histologische Untersuchung unerlässlich (Sheikh et al. 2015a). Nach Euthanasie der Tiere zu den festgelegten Zeitpunkten wurden die Scaffold-Knochen-Komplexe histologischen Beurteilung aufbereitet. Die histologischen Schliffe wurden mit der Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath hergestellt, da dieses Verfahren die Beurteilung von unentkalkten Knochenproben ermöglicht (Donath und Breuner 1982). Wie auch in verschiedenen anderen Studien zu CPCs (Apelt et al. 2004, Theiss et al. 2005, von Doernberg et al. 2006) wurde in der vorliegenden Arbeit die Toluidinblaufärbung angewandt. Diese Färbung ermöglicht eine Unterscheidung zwischen unmineralisiertem und mineralisiertem Knochen und wird häufig für histomorphometrische Messungen verwendet (Ma et al. 2020). In beiden Studien dieser Arbeit wurde, wie auch von anderen Autoren für CMPC Pasten beschrieben (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Ewald et al. 2019), bei allen Materialien eine kontinuierlich zunehmende, zentripetal gerichtete Scaffolddegradation beobachtet, deren Geschwindigkeit und Umfang sich zwischen den Materialien deutlich unterschied. Von den CMPCs war in der Langzeitstudie zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant weniger Material vorhanden als von TCP. Diese waren nach 24 Wochen fast vollständig degradiert, während zum Studienende von TCP noch zahlreiche Materialpartikel vorhanden waren. Der Abbau von Biomaterialien auf CPC-Basis erfolgt durch passive chemischphysikalische Degradation sowie durch aktive zellvermittelte Resorption, wobei Makrophagen und FBGCs hauptsächlich am Resorptionsprozess schnell resorbierbare Zemente wie Bruschit beteiligt sind, während langsam resorbierbare Zementen wie Apatit vorrangig von Osteoklasten abgebaut werden (Apelt et al. 2004, Theiss et al. 2005, Dorozhkin 2008, Dorozhkin 2013a). Für die In-vivoBiodegradation von CMPCs werden ebenfalls ein chemisch-physikalischer sowie zellulärer Abbau angenommen, wobei die passive Auflösung in der frühen Implantationszeit bereits zu einer Veränderung der Mikrostruktur und Oberflächenvergrößerung führt und die zellvermittelte Resorption erleichtert (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010). Auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten CMPC Scaffolds wird dieser zweistufige Abbaumechanismus angenommen. Für MPCs wurde in der Literatur eine Auflösung in Magnesium- und Phosphat-Ionen beschrieben (Klammert et al. 2011, Kim et al. 2016). Während bei In-vitro-Studien keine oder nur eine geringe Beteiligung von Osteoklasten am Materialabbau festgestellt wurde (Großardt et al. 2010, Gefel et al. 2022), konnten in verschiedenen In-vivo-Studien am Implantationsort von MPCs Osteoklasten beobachtet werden (Zeng et al. 2012a, Kim et al. 2016, Kanter et al. 2018, Kaiser et al. 2022), sodass eine aktive zelluläre Resorption ebenfalls denkbar ist. In der Langzeitstudie dieser Arbeit wurden im Implantationsbereich aller Materialien zahlreiche Makrophagen sowie am Rand der Scaffoldpartikel mehrkernige Zellen beobachtet. Es wird angenommen, dass Makrophagen maßgeblich am Abbau der CMPCs beteiligt waren, da ihre Menge mit der noch verbleibendem Menge an Scaffoldmaterial korrelierte und über den Studienverlauf bei fortschreitender Scaffolddegradation stark abnahm. Da FBGCs bei den CMPCs vor allem zu den frühen Untersuchungszeitpunkten der Langzeitstudie auftraten, ist ihre Beteiligung an der zellvermittelten Resorption ebenfalls zu vermuten. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass FBGCs in Woche 6 und 12 bei Mg225p signifikant häufiger auftraten als bei Mg225d, was mit der bei Mg225p zu diesen Zeitpunkten noch größeren Menge an Scaffoldmaterial einherging. Es wird zudem vermutet, dass auch Osteoklasten am Materialabbau der MPC Phasen beteiligt waren, da bei den CMPCs in Woche 6 etwas, in Woche 12 signifikant mehr Osteoklasten beobachtet wurden als bei TCP. Da Osteoklasten jedoch auch wesentlich am physiologischen Knochenumbau beteiligt sind (Hadjidakis und Androulakis 2006), der bei den CMPCs deutlich stärker ausgeprägt war als bei TCP, könnte ihr vermehrtes Auftreten auch darauf zurückzuführen sein. Bei TCP waren zu jedem Untersuchungszeitpunkt der Langzeitstudie zahlreiche Makrophagen und einige FBGCs vorhanden, deren Anzahl sich in Woche 24 signifikant von den CMPCs unterschied, sodass angenommen wird, dass diese Zelltypen wesentlich am Materialabbau von TCP beteiligt waren. Da es sich bei TCP um ein vollständig, allerdings langsamer resorbierbares Material handelt (Moore et al. 2001, Kolk et al.

2012, Bohner et al. 2020), war die Degradation von TCP zum Studienende noch nicht abgeschlossen. Es ist möglich, dass der zelluläre Abbau jedoch dadurch gehemmt wurde, dass ein sehr großer Anteil der zahlreichen TCP-Fragmente nach 24 Wochen in neugebildete Knochentrabekel eingelagert und daher vorerst nicht für den weiteren Abbau zugänglich war, wie dies in der Literatur für Granulate aus α - und β -TCP ebenfalls beschrieben wurde (Wiltfang et al. 2002). Die Umsatzrate des neugebildeten Knochens steuert daher die sukzessive Materialfreilegung und Degradation der in die Trabekel integrierten Partikel (Wiltfang et al. 2002).

Wie auch von anderen Autoren für CMPCs beschrieben (Wu et al. 2008b, Wei et al. 2010, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021) konnte in beiden Studien der vorliegenden Arbeit histologisch bei allen Scaffolds eine kontinuierlich zunehmende Osseointegration sowie der Ersatz des Scaffoldmaterials durch neugebildeten trabekulären Knochen beobachtet werden. Dies spricht für eine hervorragende Biokompatibilität und Osteokonduktivität der untersuchten Materialien. Wie für die physiologische Knochenreifung beschrieben (Raina 1972, Hadjidakis und Androulakis 2006, Katsimbri 2017) nahm mit zunehmender Untersuchungsdauer der Langzeitstudie im Implantationsbereich aller Materialien die Anzahl der Osteoblasten und die Menge an Osteoid und unreifem Knochen ab, während die Menge an reifem, umgebauten Knochen stetig zunahm. Über die Untersuchungszeit von 24 Wochen hat sich das in den Implantationsbereich der CMPCs eingewachsene Weichteilgewebe von blutgefäß- und zellreichem Granulationsgewebe zu reifem Knochenmark umgewandelt, wie dieses auch in der Literatur beschrieben wird (Travlos 2006, Horowitz et al. 2017, Nombela-Arrieta und Manz 2017, Lucas 2021). Bei TCP fand diese Umwandlung signifikant langsamer statt. Insbesondere 12 Wochen nach der Implantation wurde im Knochenmark innerhalb der Defekte aller Materialien eine große Menge an Vorläuferzellen beobachtet. Wie auch Kanter et al. (2018) für das Auftreten eines zellreichen Knochenmarks bei MPCs vermuten, wird davon ausgegangen, dass dies einen aktiven Zustand darstellt, in dem sich die Zellen organisieren, um in zentripetaler Ausrichtung trabekulären Knochen auszubilden. Da TCP nach 12 Wochen noch signifikant mehr unreifen Knochen und nach 24 Wochen noch signifikant mehr Osteoid als die CMPCs aufwies, fand die Knochenreifung bei diesem Material deutlich langsamer statt und war wahrscheinlich zum Studienende noch nicht abgeschlossen.

101

CMPCs in der Langzeitstudie bei der In-vivo-µCT-Untersuchung zwischen Woche 2 und Woche 8 beobachtet wurde, als fibrovaskuläres, makrophagenreiches Stroma zwischen einem Materialkern und einwachsenden Knochentrabekeln, die im Randbereich der Scaffolds bereits an die zahlreichen Materialpartikel angewachsen waren, identifiziert werden. Andere Autoren haben bis zu 2 Monate nach Implantation von Bruschit- oder K-Struvit-Zementen ebenfalls eine zellreiche Zone oder Inseln fibrovaskulären Gewebes zwischen dem knöchernen Defektrand und dem noch vorhandenen Materialkern beobachtet, die zahlreiche Blutgefäße und Makrophagen aufwies(en) (Constantz et al. 1998, Frayssinet et al. 2000, Apelt et al. 2004, Theiss et al. 2005, Kaiser et al. 2022). Da in der vorliegenden Arbeit eine Resorptionszone beim schneller degradierenden Material Mg225d signifikant häufiger auftrat als bei Mg225p, ist davon auszugehen, dass ihre Ausprägung mit der Abbaugeschwindigkeit des Biomaterials zusammenhängt. Kaiser et al. (2022) fanden bei der In-Vivo-Untersuchung von MPC Pasten eine Resorptionszone lediglich bei dem signifikant schneller degradierenden Material vor, weshalb sie deren Auftreten in einem für die Knochenbildungsrate zu schnellen Materialabbau begründet liegen sehen. In der eigenen Arbeit schritt die Volumendegradation von Mg225d, teilweise auch von Mg225p, in der frühen Implantationszeit für ein direktes Anwachsen der neugebildeten Knochentrabekel häufig zu rasch voran, weshalb sich zur Defektüberbrückung eine fibrovaskuläre, makrophagenreiche Resorptionszone ausbildete. Da diese Zone im Laufe der Untersuchungszeit von Trabekeln, die an die Materialpartikel herangewachsen sind, durchbaut und von Knochengewebe ersetzt wurde, ist nicht davon auszugehen, dass ihre Ausprägung sich negativ auf die Materialdegradation und -osseointegration ausgewirkt hat, die zelluläre Reaktion vielmehr die Scaffolddegradation sondern und Knochenregeration unterstützt hat, wie es auch in anderen Studien angenommen wurde (Apelt et al. 2004, Kaiser et al. 2022). Die Resorptionszone könnte jedoch eine mechanische und strukturelle Schwachstelle an der kritischen Schnittstelle zwischen Scaffold und umgebendem Gewebe darstellen.

In der Langzeitstudie wurde mit REM- und EDX-Analysen die Oberflächenstruktur histologischer Dünnschnitte der Scaffold-Knochen-Komplexe sowie das Auftreten von Magnesium-Ionen innerhalb des Implantationsbereichs beurteilt. Andere Autoren nutzten zur Beurteilung der Materialdegradation ebenfalls die EDX-

Analyse. Kanter et al. (2018) und Kaiser et al. (2022) untersuchten den Ionengehalt (Mg, Ca und P) des neugebildeten Knochens nach Implantation von MPC Pasten und Fuchs et al. (2021) stellten anhand des Nachweises von Mg, Ca und P eine im Zeitverlauf zunehmende Degradation von CMPC Granulaten sowie deren Ersatz durch Knochengewebe fest. Aufgrund der limitierten Geräteeigenschaften in Bezug auf die kleinstmögliche Vergrößerung konnte in der vorliegenden Arbeit der Implantationsbereich nur punktuell untersucht werden, weshalb nur begrenzt quantitative Aussagen zur Materialdegradation getroffen werden konnten. Durch den eindeutigen Nachweis kleinster Scaffoldpartikel bis Woche 24 mit hervorragender Osseointegration und Osteoneogenese im ursprünglichen Implantationsbereich wurden die Ergebnisse der histologischen Untersuchung mit der REM- und EDX-Analyse bestätigt.

Zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von Knochenersatzstoffen wird häufig ihre Druckfestigkeit bestimmt. Die Druckfestigkeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Scaffolds wurde vor der Implantation gemessen und nahm wie folgt zu: Mg225 < TCP < Mg225d (Kurzzeitstudie), TCP < Mg225d < Mg225p (Langzeitstudie). Eine In-vivo-Beurteilung der mechanischen Eigenschaften der Scaffolds war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich die Druckfestigkeit der Scaffolds nach der Implantation zunächst verringert hat, da sich die Porosität und Porengröße durch die Degradation vergrößert haben. Es ist bekannt, dass diese Prozesse die strukturelle Gerüstintegrität beeinträchtigen und die mechanischen Eigenschaften verringern, da die Porosität/Porengröße und die Druckfestigkeit negativ korrelieren (Karageorgiou und Kaplan 2005, Vorndran et al. 2011a, Zhang et al. 2014, Wang et al. 2019). Orr et al. (2001) konnten jedoch bei der Untersuchung von HA im Kaninchenmodell beim Vergleich von Woche 6 mit Woche 26 nach der Implantation einen signifikanten Anstieg der Druckfestigkeit des Defekts beobachten, was sie auf den Anstieg der Knochendichte innerhalb des Defekts zurückführten. Es ist daher anzunehmen, dass sich auch in der vorliegenden Arbeit die Druckfestigkeit der Scaffolds bzw. Defekte durch die einwachsenden Knochentrabekel über die Untersuchungszeit stark erhöht hat. Zur Bestätigung dieser Vermutung sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Für die in dieser Arbeit untersuchten 3D-pulvergedruckten CMPC Scaffolds wurde das keramische Zementpulver Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO₄)₂ als Ausgangsmaterial gewählt, da

Pulver mit diesem Ca²⁺- und Mg²⁺-Gehalt in vorherigen *In-vitro*-Studien die besten mechanischen Eigenschaften sowie die beste Zellproliferation aufwiesen (Vorndran et al. 2011a). Auch in In-vivo-Studien anderer Autoren wiesen Zementpasten oder Granulate aus diesem Ausgangsmaterial eine gute Biokompatibilität und Osseointegration sowie eine kontinuierliche Degradation mit Ersatz durch neugebildeten Knochen auf (Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021). In diesen Studien wurden zudem CMPCs aus dem keramischen Zementpulver Ca_{0.25}Mg_{2.75}(PO₄)₂ untersucht, die auch gute Eigenschaften als Knochenersatzstoff aufwiesen und im Vergleich zu Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂ schneller (Zementpaste) bzw. langsamer (Granulat) degradierten. Da ein niedriger Ca²⁺-Gehalt zu geringeren mechanischen Druckfestigkeiten führt, ein hoher Mg²⁺-Gehalt die Löslichkeit und damit die Degradationsgeschwindigkeit von CMPCs steigert (Wu et al. 2008b, Vorndran et al. 2011a, Ewald et al. 2019) und zudem bekannt ist, dass bei höherem Ca²⁺-Gehalt *in vitro* eine höhere Gesamtresorption (aktive und passive Resorption) erfolgt (Blum et al. 2017), wäre die In-vivo-Untersuchung von 3Dpulvergedruckten CMPC Scaffolds mit einem anderen Ca²⁺- und Mg²⁺-Gehalt in zukünftigen Arbeiten denkbar. Die Veränderung der Scaffoldproduktion stellt eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung ihrer Eigenschaften dar. Durch Ausbildung der Binderphase Struvit aufgrund der Nachbehandlung mit DAHP wiesen die Mg225d Scaffolds dieser Arbeit eine höhere Druckfestigkeit sowie geringere Porosität und Porengröße auf und degradierten in vivo langsamer als die unbehandelten Mg225 Scaffolds. Gelli et al. (2019) konnten feststellen, dass bei höherer DAHP-Konzentration der Ma.-% Anteil von Struvit und die Druckfestigkeit von MPC Pasten steigen, während die Porosität sinkt. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Nachbehandlung der Mg225d Scaffolds jedoch bereits die höchstmögliche DAHP-Konzentration (3,5 M) gewählt. Eine höhere Umsatzrate der Zementrohmaterialien zu Struvit könnte allerdings erreicht werden, indem das gesinterte CMPC Rohpulver vor dem 3D-Pulverdruck mit Magnesiumoxid (MgO)-Pulver vermischt wird. Diese Pulvermischung wird anschließend anstatt mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bindermittel Hydroxypropylmethylzellulose (HPMC) mit reaktiver DAHP-Lösung als flüssiger Phase gedruckt, wie es für MPCs von Vorndran (2011) beschrieben wurde. Da MgO als Abbindebeschleuniger wirkt und während des Drucks mit DAHP bereits zu Struvit umgesetzt wird (Vorndran 2011), könnte durch den 3D-Pulverdruck mit reaktiver Lösung analog zu den Ergebnissen von Vorndran (2011) möglichweise eine höhere Druckfestigkeit, geringere Porosität und langsamere In-Vivo-Degradation der Scaffolds erreicht werden, was Gegenstand nachfolgender Arbeiten sein könnte. Während mit DAHP nachbehandelte CMPCs auch von anderen Autoren in vivo untersucht wurden (Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021) ist keine zugängliche Literatur zu mit PA nachbehandelten CMPCs verfügbar. Die Untersuchung von MPC Scaffolds zeigte, dass mit PA nachbehandelte Scaffolds durch Ausbildung der Binderphase Newberyit eine im Vergleich zu nicht nachbehandelten Scaffolds etwas niedrigere Porosität und Porengröße aufwiesen (Gefel et al. 2022). In Untersuchungen zur Herstellung von CMPCs, welche der vorliegenden Arbeit vorausgingen, stellte sich heraus, dass durch Erhöhung der Anzahl der Infiltration in PA der Newberyit-Anteil der Scaffolds auf bis zu 70 Ma.-% gesteigert werden kann. Da Newberyit eine höhere Löslichkeit aufweist als das Rohmaterial Farringtonit (Ostrowski et al. 2016), die In-vivo-Degradation stark vom Ma.-% Anteil der Binderphase, der Porosität auch aber und der Porengröße abhängt (Gefel et al. 2022), könnte der Einfluss des Newberyit-Gehaltes auf das In-vivo-Verhalten von CMPCs ebenfalls Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in zwei aufeinander aufbauenden Studien die Biokompatibilität, Osseointegration und das In-vivo-Degradationsverhalten von 3D-pulvergedruckten CMPC Scaffolds ohne Nachbehandlung sowie mit unterschiedlichen Nachbehandlungen (DAHP, PA) vergleichend zu untersuchen. Es sollte ermittelt werden, durch welche Nachbehandlung sich Knochenersatzstoffe mit geeigneteren chemischen und physikalischen Eigenschaften herstellen lassen, die eine möglichst gut auf die Geschwindigkeit der Osteoneogenese abgestimmte Degradationsgeschwindigkeit aufweisen, zu einem Restitutio ad integrum des Knochengewebes führen und für weitere Untersuchungen im gewichtstragenden Knochen geeignet sind. Mittels des 3D-Pulverdrucks wurden aus dem keramischen Zementpulver Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO₄)₂ zylindrische Scaffolds (Länge: 5 mm, Ø: 4 mm) hergestellt, die beidseitig in den nicht-gewichtstragenden, spongiösen Teil des Condylus lateralis ossis femoris von Kaninchen (Kurzzeitstudie: n = 4, Langzeitstudie: n = 36) implantiert wurden. 3D-pulvergedruckte Scaffolds des etablierten Knochenersatzstoffes TCP gleicher Abmessung dienten in beiden Studien als Referenzmaterial. Die Kaninchen wurden in verschiedene Zeitgruppen eingeteilt (Kurzzeitstudie: 1 und 6 Wochen, Langzeitstudie: 6, 12 und 24 Wochen). Während der jeweiligen Studiendauer wurden regelmäßige klinische, radiologische und In-vivo-µCT-Untersuchungen der Tiere durchgeführt. Nach Euthanasie zu den festgelegten Zeitpunkten wurden die Scaffold-Knochen-Komplexe entnommen und weiteren Untersuchungen unterzogen. Während in der Kurzzeitstudie höher auflösende µCT 100 Scans sowie histologische Untersuchungen durchgeführt wurden, erfolgte in der Langzeitstudie die Untersuchung mittels eines höher auflösenden µCT 80, Histologie, Histomorphometrie sowie mittels REM und EDX.

Alle im Rahmen der beiden Studien der vorliegenden Arbeit untersuchten Materialien (Mg225, Mg225d, Mg225p, TCP) zeigten eine hervorragende klinische Verträglichkeit, exzellente Biokompatibilität und Osseointegration sowie effektive Osteoneogenese. In der Kurzzeitstudie zeigte sich, dass Mg225 (ohne Nachbehandlung) im Vergleich zu Mg225d (Mg225 nachbehandelt mit DAHP) deutlich schneller degradierte und rasch in einzelne Materialpartikel zerfiel. Die höhere Porosität und Porengröße förderten zwar die Osteoneogenese und Osseointegration von Mg225, welches aufgrund der geringen Druckfestigkeit und

sehr schnellen *In-vivo*-Degradation jedoch nicht für gewichtstragende Knochendefekte geeignet ist. Da in der Kurzzeitstudie gezeigt werden konnte, dass eine Nachbehandlung der Scaffolds durch Ausbildung einer Binderphase die Druckfestigkeit erhöht, Porosität und Porengröße verringert und die *In-vivo*-Degradation verlangsamt, wurden in der nachfolgenden Langzeitstudie neben Mg225d mit Phosphorsäure nachbehandelte Scaffolds (Mg225p) untersucht.

In der Langzeitstudie zeigten die untersuchten CMPCs Mg225d und Mg225p eine im Zeitverlauf kontinuierlich zunehmende, nahezu vollständige Degradation mit gleichzeitigem Ersatz der Scaffolds durch neugebildete Knochentrabekel, welche über die Untersuchungszeit zu reifem, spongiösem Knochen umgebaut wurden. TCP degradierte signifikant langsamer als die CMPCs und zeigte eine signifikant langsamere Reifung des einwachsenden Knochen- und Weichteilgewebes. Es stellte sich heraus, dass Mg225d, welches eine signifikant schnellere Degradation als Mg225p aufwies, für die Ausbildung eines gleichmäßigen Trabekelnetzwerks innerhalb des gesamten Defektes jedoch zu schnell und zu ungleichmäßig degradiert, da sich die Trabekel bei Mg225d meist vorrangig im cortexnahen Implantationsbereich befanden. Die fibrovaskuläre, zellreiche Resorptionszone, die in der frühen Implantationszeit vermutlich infolge der raschen Degradation bei Mg225d signifikant häufiger auftrat als bei Mg225p, stellt möglicherweise eine zusätzliche mechanische Schwachstelle dar. Aufgrund dessen, sowie der geringen Druckfestigkeit von Mg225d vor der Implantation, eignet sich dieses Material ebenfalls nicht für den Einsatz in gewichtstragendem Knochen. Da Mg225 und Mg225d dennoch einen positiven Einfluss auf die Osteoneogenese haben, ist die Verwendung dieser Materialien als Knochenersatzstoff für unbelasteten spongiösen Knochen, beispielweise für einen Sinuslift, denkbar. Das mit PA nachbehandelte Mg225p hingegen wies eine für die Knochenneubildung sehr gut geeignete Degradationsgeschwindigkeit sowie im gesamten Scaffoldvolumen hervorragende Osteoneogenese auf. Der im Implantationsbereich neugebildete Knochen wies nach 24 Wochen nahezu die gleichen Struktureigenschaften wie physiologischer Knochen an dieser Stelle auf. Aufgrund dessen, sowie der höheren Druckfestigkeit vor der Implantation, weist das 3D-pulvergedruckte Mg225p vielversprechende Eigenschaften als resorbierbarer Knochenersatzstoff auf, der zusammen mit einer stabilisierenden Osteosynthese während der frühen Implantationszeit im Rahmen nachfolgender Arbeiten im gewichtstragendem Knochen untersucht werden sollte.

VI. SUMMARY

The aim of this thesis was to comparatively examine the biocompatibility, osseointegration and *in-vivo* degradation behavior of 3D powder-printed CMPC scaffolds without post-treatment as well as with different post-treatments (DAHP, PA) in two consecutive studies. The present thesis investigated by which post-treatment bone substitutes with more suitable chemical and physical properties can be produced that show a rate of degradation as well aligned as possible to the rate of osteoneogenesis, leading to a restitutio ad integrum of the bone tissue and being suitable for further investigation in weight-bearing bone. Using 3D powder printing, cylindrical scaffolds (length: 5 mm, Ø: 4 mm) were fabricated from the ceramic cement powder Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO₄)₂ and implanted bilaterally in the nonweight-bearing cancellous part of the lateral femoral condyle of rabbits (short-term study: n = 4, long-term study: n = 36). 3D powder-printed scaffolds of the established bone substitute TCP with the same dimension served as reference material in both studies. The rabbits were divided into different time groups (shortterm study: 1 and 6 weeks, long-term study: 6, 12 and 24 weeks). Regular clinical, radiological, and *in-vivo* µCT examinations of the animals were performed during the respective study periods. After euthanasia at the designated time points, the scaffold-bone-complexes were extracted and subjected to further examinations. While higher resolution μ CT 100 scans as well as histological examinations were performed in the short-term study, the examination in the long-term study was conducted by means of a higher resolution μ CT 80, histology, histomorphometry as well as by SEM and EDX analysis.

All materials investigated in the two studies of the present thesis (Mg225, Mg225d, Mg225p, TCP) showed an excellent clinical tolerability, biocompatibility, and osseointegration, as well as an effective osteoneogenesis. The short-term study revealed that Mg225 (without post-treatment) degraded markedly faster than Mg225d (Mg225 post-treated with DAHP) and disintegrated rapidly into individual material particles. Although the higher porosity and larger pore size compared to Mg225d promoted the osteoneogenesis and osseointegration of Mg225, this material is not suitable for weight-bearing bone defects due to its low compressive strength and very rapid *in-vivo* degradation. As it could be shown in the short-term study that a post-treatment of the scaffolds increases compressive strength,

decreases porosity and pore size, and slows down the *in-vivo* degradation by formation of a binder phase, scaffolds post-treated with phosphoric acid (Mg225p) were investigated in addition to Mg225d in the subsequent long-term study.

In the long-term study, the investigated CMPCs Mg225d and Mg225p showed an over time continuously increasing and nearly complete degradation with simultaneous replacement of the scaffolds by newly formed bone trabeculae, which remodeled into mature cancellous bone over the study period. TCP degraded significantly slower than the CMPCs and showed significantly slower maturation of the ingrowing bone and soft tissue. However, Mg225d, which showed significantly faster degradation than Mg225p, was found to degrade too rapidly and too irregularly for a uniform trabecular network to form within the entire defect, as the trabeculae with Mg225d were mostly located in the implantation area close to the cortex. The fibrovascular cell-rich resorption zone, which occurred significantly more frequent with Mg225d than with Mg225p in the early implantation period, presumably as a result of the rapid degradation of the Mg225d scaffolds, may represent an additional mechanical weakness. Due to this, as well as the low compressive strength of Mg225d prior to implantation, this material is also not suitable for use in weight-bearing bone. Since Mg225 and Mg225d nevertheless have a positive influence on osteoneogenesis, the use of these materials as bone substitutes for unloaded cancellous bone, for example for a sinus lift, is conceivable. Mg225p post-treated with PA instead exhibited a degradation rate very well suited for new bone formation as well as an excellent osteoneogenesis throughout the entire scaffold volume. After 24 weeks, the newly formed bone at the implant site exhibited almost the same structural properties as physiological bone at this site. Based on this, as well as the higher compressive strength prior to implantation, 3D powder-printed Mg225p shows promising properties as a resorbable bone substitute, which should be investigated in weight-bearing bone along with a stabilizing osteosynthesis during the early implantation period as part of subsequent work.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abd Mutalib M, Rahman MA, Othman MHD, Ismail AF, Jaafar J

Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy.

In Hilal N, Ismail AF, Matsuura T and Oatley-Radcliffe D: Membrane Characterization, Amsterdam, Elsevier Verlag, 2017

Agarwal R, García AJ

Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair.

Advanced Drug Delivery Reviews. 2015; 94: 53-62

Albee FH

Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. Annals of Surgery. 1920; 71(1): 32

Albrektsson T, Johansson C

Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. European Spine Journal. 2001; 10(2): 96-101

Ambard AJ, Mueninghoff L

Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties. Journal of Prosthodontics. 2006; 15(5): 321-328

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT

Foreign body reaction to biomaterials. Seminars in Immunology. 2008; 20(2): 86-100

Angrisani N, Reifenrath J, Zimmermann F, Eifler R, Meyer-Lindenberg A, Vano-Herrera K, Vogt C

Biocompatibility and degradation of LAE442-based magnesium alloys after implantation of up to 3.5 years in a rabbit model. Acta Biomaterialia. 2016; 44: 355-365

Apelt D, Theiss F, El-Warrak A, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, Matter S, Auer J, von Rechenberg B

In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. Biomaterials. 2004; 25(7-8): 1439-1451

Augustin J, Feichtner F, Waselau AC, Julmi S, Klose C, Wriggers P, Maier HJ, Meyer-Lindenberg A

Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2020; 108(7): 2776-2788

Bag S, Schambach S, Boll H, Schilling L, Groden C, Brockmann M

Aktueller Stand der Mikro-CT in der experimentellen Kleintierbildgebung.

Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren. 2010; 182(05): 390-403

Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF, Bonucci E

Tartrate-Resistant Acid Phosphate Activity as Osteoclastic Marker: Sensitivity of Cytochemical Assessment and Serum Assay in Comparison with Standardized Osteoclast Histomorphometry.

Osteoporosis International. 1997; 7(1): 39-43

Bauer TW, Muschler GF

Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2000(371): 10-27

Bengel M

In vitro Testung neuer Anwendungsformen kalthärtender Knochenzemente aus resorbierbaren Orthophosphaten.

Dissertationsschrift, Würzburg, Universität Würzburg, 2019

Bernards C, Chapman J, Mirza S

Lethality of embolized Norian bone cement varies with the time between mixing and embolization.

50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, United States of America, 2004

Blum C, Brückner T, Ewald A, Ignatius A, Gbureck U

Mg:Ca ratio as regulating factor for osteoclastic in vitro resorption of struvite biocements.

Materials Science and Engineering Part C: Materials for biological applications. 2017; 73: 111-119

Bodde EW, Cammaert CT, Wolke JG, Spauwen PH, Jansen JA

Investigation as to the Osteoinductivity of Macroporous Calcium Phosphate Cement in Goats.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2007; 83(1): 161-168

Bohndorf K, Imhof H, Fischer W

Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG, 2006

Bohner M

Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements.

Injury. 2000; 31: 37-47

Bohner M, Gbureck U, Barralet JE

Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment.

Biomaterials. 2005; 26(33): 6423-6429

Bohner M, Santoni BLG, Döbelin N

β-Tricalcium Phosphate for Bone Substitution: Synthesis and Properties. Acta Biomaterialia. 2020; 113: 23-41

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R

Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. Journal of Bone and Mineral Research. 2010; 25(7): 1468-1486

Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z

Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials. 1996; 17(2): 137-146

Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE

Wound Healing: An Overview. Plastic and Reconstructive Surgery. 2006; 117(7 Suppl): 1e-S-32e-S

Brown WE, Chow LC

Dental restorative cement pastes. U.S. Patent No. 4518430. 1985

Brunello G, Sivolella S, Meneghello R, Ferroni L, Gardin C, Piattelli A, Zavan B, Bressan E

Powder-based 3D printing for bone tissue engineering. Biotechnoly Advances. 2016; 34(5): 740-753

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. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2014; 25(10): 2445-2461

Carrodeguas RG, De Aza S

 α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. Acta Biomaterialia. 2011; 7(10): 3536-3546

Castilho M, Dias M, Vorndran E, Gbureck U, Fernandes P, Pires I, Gouveia B, Armes H, Pires E, Rodrigues J

Application of a 3D printed customized implant for canine cruciate ligament treatment by tibial tuberosity advancement. Biofabrication. 2014a; 6(2): 025005

Castilho M, Moseke C, Ewald A, Gbureck U, Groll J, Pires I, Tessmar J, Vorndran E

Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects.

Biofabrication. 2014b; 6(1): 015006

Chai YC, Carlier A, Bolander J, Roberts SJ, Geris L, Schrooten J, Van **Oosterwyck H, Luyten FP**

Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies.

Acta Biomaterialia. 2012; 8(11): 3876-3887

Chopra PM, Johnson M, Nagy TR, Lemons JE

Micro-Computed Tomographic Analysis of Bone Healing Subsequent to Graft Placement.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2009; 88(2): 611-618

Christel T, Geffers M, Klammert U, Nies B, Höß A, Groll J, Kübler AC, **Gbureck** U

Fabrication and cytocompatibility of spherical magnesium ammonium phosphate granules.

Materials Science and Engineering Part C: Materials for biological applications. 2014; 42: 130-136

Constantz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, Goodman SB, Gunasekaren S, Delaney DC, Ross J, Poser RD

Histological, Chemical, and Crystallographic Analysis of Four Calcium Phosphate Cements in Different Rabbit Osseous Sites.

Journal of Biomedical Materials Research. 1998; 43(4): 451-461

Donath K, Breuner G

A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues: The Säge-Schliff (sawing and grinding) Technique.

Journal of Oral Pathology. 1982; 11(4): 318-326

Dorozhkin SV

Calcium orthophosphate cements for biomedical application. Journal of Materials Science. 2008; 43(9): 3028-3057

Dorozhkin SV

Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. Materials (Basel). 2013a; 6(9): 3840-3942

Dorozhkin SV

Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations. Journal of Functional Biomaterials. 2013b; 4(4): 209-311

Egan KP, Brennan TA, Pignolo RJ

Bone histomorphometry using free and commonly available software. Histopathology. 2012; 61(6): 1168-1173

Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W

Mikro-CT: Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. Der Radiologe. 1999; 39(3): 203-212

Ettl A, Schmid E, Daxer A

Das Rasterkraftmikroskop in der biomedizinischen Foschung: Übersicht und ophthalmologische Anwendungen.

Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck. 1996; 83: 317-324

Ewald A, Kreczy D, Brückner T, Gbureck U, Bengel M, Hoess A, Nies B, Bator J, Klammert U, Fuchs A

Development and Bone Regeneration Capacity of Premixed Magnesium Phosphate Cement Pastes.

Materials (Basel). 2019; 12(13): 2119

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M

The Direct Examination of Three-Dimensional Bone Architecture In Vitro by Computed Tomography.

Journal of Bone and Mineral Research. 1989; 4(1): 3-11

Fillingham Y, Jacobs J

Bone grafts and their substitutes. The Bone & Joint Journal. 2016; 98-b(1 Suppl A): 6-9

Frayssinet P, Roudier M, Lerch A, Ceolin JL, Deprès E, Rouquet N

Tissue reaction against a self-setting calcium phosphate cement set in bone or outside the organism.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2000; 11(12): 811-815

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; 26(3): 2619-2633

Gbureck U, Hölzel T, Klammert U, Würzler K, Müller FA, Barralet JE

Resorbable Dicalcium Phosphate Bone Substitutes Prepared by 3D Powder Printing.

Advanced Functional Materials. 2007; 17(18): 3940-3945

Gefel E, Moseke C, Schmitt A-M, Dümmler N, Stahlhut P, Ewald A, Meyer-Lindenberg A, Vorndran E

Degradation of 3D-printed magnesium phosphate ceramics in vitro and a prognosis on their bone regeneration potential.

Bioactive Materials. 2022; 19: 376-391

Gelli R, Mati L, Ridi F, Baglioni P

Tuning the properties of magnesium phosphate-based bone cements: Effect of powder to liquid ratio and aqueous solution concentration.

Materials Science and Engineering Part C: Materials for biological applications. 2019; 95: 248-255

Gerhardt LC, Boccaccini AR

Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Materials (Basel). 2010; 3(7): 3867-3910

Ginebra M, Boltong M, Driessens F, Bermudez O, Fernández E, Planell J

Preparation and properties of some magnesium-containing calcium phosphate cements.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1994; 5(2): 103-107

Gogolewski S

Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. Injury. 2000; 31 Suppl 4: 28-32

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

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 Engineering Part A. 2010; 16(12): 3687-3695

Gruber HE

Adaptations of Goldner's Masson Trichrome Stain for the Study of Undecalcified Plastic Embedded Bone.

Biotechnic & Histochemistry. 1992; 67(1): 30-34

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(7): 944-953

Hadjidakis DJ, Androulakis, II

Bone Remodeling. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006; 1092: 385-396

Haffner-Luntzer M, Ignatius A

Biologische Einflussfaktoren auf die Knochenbruchheilung. OP-JOURNAL. 2019; 35(01): 5-10

Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V

Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. Injury. 2014; 45 Suppl 2: S3-7

Hampp C, Angrisani N, Reifenrath J, Bormann D, Seitz JM, Meyer-Lindenberg A

Evaluation of the biocompatibility of two magnesium alloys as degradable implant materials in comparison to titanium as non-resorbable material in the rabbit.

Materials Science and Engineering Part C: Materials for biological applications. 2013; 33(1): 317-326

Haque MA, Chen B

In vitro and in vivo research advancements on the magnesium phosphate cement biomaterials: A review.

Materialia. 2020; 13: 100852

He L, Zhang X, Liu B, Tian Y, Ma W

Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2016; 49(7): e5257

He T, Cao C, Xu Z, Li G, Cao H, Liu X, Zhang C, Dong Y

A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model. Scientific Reports. 2017; 7(1): 1-11

Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T

Resorbierbare Knochenersatzmaterialien: Eine Übersicht kommerziell verfügbarer Werkstoffe und neuer Forschungsansätze auf dem Gebiet der Komposite. Der Orthopäde. 2011; 40(9): 761-773

Hench LL, Splinter R, Allen W, Greenlee T

Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. Journal of Biomedical Materials Research. 1971; 5(6): 117-141

Hollinger JO, Kleinschmidt JC

The Critical Size Defect As An Experimental Model To Test Bone Repair Materials.

Journal of Craniofacial Surgery. 1990; 1(1): 60-68

Horowitz MC, Berry R, Holtrup B, Sebo Z, Nelson T, Fretz JA, Lindskog D, Kaplan JL, Ables G, Rodeheffer MS, Rosen CJ

Bone marrow adipocytes. Adipocyte. 2017; 6(3): 193-204

Hu Y-c, Zhong J-p

Osteostimulation of bioglass. Chinese Medical Journal. 2009; 122(19): 2386-2389

Huber FX, McArthur N, Heimann L, Dingeldein E, Cavey H, Palazzi X, Clermont G, Boutrand JP

Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste Ostim® in comparison to Alpha-BSM® - more bone ingrowth inside the implanted material with Ostim® compared to Alpha BSM®.

BMC Musculoskeletal Disorders. 2009; 10: 164

Ibrahim N, Parsa A, Hassan B, van der Stelt P, Aartman IH, Wismeijer D

Accuracy of trabecular bone microstructural measurement at planned dental implant sites using cone-beam CT datasets.

Clinical Oral Implants Research. 2014; 25(8): 941-945

Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, Kelly JP, Graeve OA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA

3D Printing of Composite Calcium Phosphate and Collagen Scaffolds for Bone Regeneration.

Biomaterials. 2014; 35(13): 4026-4034

Issever AS, Link TM, Kentenich M, Rogalla P, Burghardt AJ, Kazakia GJ, Majumdar S, Diederichs G

Assessment of trabecular bone structure using MDCT: comparison of 64-and 320slice CT using HR-pQCT as the reference standard. European Radiology. 2010; 20(2): 458-468

Jansen J, Dhert W, Van Der Waerden J, Von Recum A

Semi-Quantitative and Qualitative Histologic Analysis Method for the Evaluation of Implant Biocompatibility. Journal of Investigative Surgery. 1994; 7(2): 123-134

Jarcho M

Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1981; 157: 259-278

Jia J, Zhou H, Wei J, Jiang X, Hua H, Chen F, Wei S, Shin J-W, Liu C

Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. Journal of the Royal Society Interface. 2010; 7(49): 1171-1180

Kaiser F, Schröter L, Stein S, Krüger B, Weichhold J, Stahlhut P, Ignatius A, Gbureck U

Accelerated bone regeneration through rational design of magnesium phosphate cements.

Acta Biomaterialia. 2022; 145: 358-371

Kanter B

Osseointegration kalthärtender Knochenzemente im Schafmodell. Dissertationsschrift, München, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014

Kanter B, Geffers M, Ignatius A, Gbureck U

Control of in vivo mineral bone cement degradation. Acta Biomaterialia. 2014; 10(7): 3279-3287

Kanter B, Vikman A, Brückner T, Schamel M, Gbureck U, Ignatius A

Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model.

Acta Biomaterialia. 2018; 69: 352-361

Karageorgiou V, Kaplan D

Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials. 2005; 26(27): 5474-5491

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.

Journal of Orthopaedic Research. 2012; 30(7): 1103-1111

Katsimbri P

The biology of normal bone remodelling. European Journal of Cancer Care. 2017; 26(6)

Kheirallah M, Almeshaly H

Bone Graft Substitutes for Bone Defect Regeneration. A Collective Review. International Journal of Dentistry and Oral Science. 2016; 3(5): 247-257

Kim J-A, Lim J, Naren R, Yun H-S, Park EK

Effect of the biodegradation rate controlled by pore structures in magnesium phosphate ceramic scaffolds on bone tissue regeneration in vivo. Acta Biomaterialia. 2016; 44: 155-167

Klammert U, Böhm H, Schweitzer T, Würzler K, Gbureck U, Reuther J, Kübler A

Multi-directional Le Fort III midfacial distraction using an individual prefabricated device.

Journal of Craniofacial Surgery. 2009; 37(4): 210-215

Klammert U, Gbureck U, Vorndran E, Rodiger J, Meyer-Marcotty P, Kubler AC

3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects.

Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2010a; 38(8): 565-570

Klammert U, Ignatius A, Wolfram U, Reuther T, Gbureck U

In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model.

Acta Biomaterialia. 2011; 7(9): 3469-3475

Klammert U, Reuther T, Blank M, Reske I, Barralet JE, Grover LM, Kubler AC, Gbureck U

Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. Acta Biomaterialia. 2010b; 6(4): 1529-1535

Klammert U, Vorndran E, Reuther T, Müller FA, Zorn K, Gbureck U

Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2010c; 21(11): 2947-2953

Kleer N, Julmi S, Gartzke A-K, Augustin J, Feichtner F, Waselau A-C, Klose C, Maier H, Wriggers P, Meyer-Lindenberg A

Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, in vivo.

Materialia. 2019; 8: 100436

Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W

Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo.

Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2008; 85(3): 777-786

Klopfleisch R, Jung F

The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2017; 105(3): 927-940

Koehler A, Galanski M

Frakturheilung.

In: Kompendium der traumatologischen Röntgendiagnostik, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, 1999

Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff K-D, Smeets R

Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials.

Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2012; 40(8): 706-718

Komlev VS, Barinov SM, Koplik EV

A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for timecontrolled drug release.

Biomaterials. 2002; 23(16): 3449-3454

König HE, Liebich H-G

Anatomie der Haustiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Stuttgart, Schattauer Verlag, 2012

Krebs J, Aebli N, Goss BG, Sugiyama S, Bardyn T, Boecken I, Leamy PJ, Ferguson SJ

Cardiovascular Changes After Pulmonary Embolism From Injecting Calcium Phosphate Cement.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2007; 82(2): 526-532

Kulak CA, Dempster DW

Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. 2010; 54(2): 87-98

Lang G

Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Wien, Springer Verlag, 2012

LeGeros RZ

Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2002; 395: 81-98

LeGeros RZ

Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. Chemical Reviews. 2008; 108(11): 4742-4753

Lindner C, Proehl A, Abels M, LÖffler T, Batinic M, Jung O, Barbeck M

Specialized Histological and Histomorphometrical Analytical Methods for Biocompatibility Testing of Biomaterials for Maxillofacial Surgery in (Pre-) Clinical Studies.

In Vivo. 2020; 34(6): 3137-3152

Lodoso-Torrecilla I, van den Beucken J, Jansen JA

Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability. Acta Biomaterialia. 2021; 119: 1-12

Lucas D

Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. Current Opinion in Hematology. 2021; 28(1): 36-42

Lüllmann-Rauch R, Asan E

Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG, 2015

Lüthkehermölle W, Behrens P, Burch S, Horst M

Biomaterialien für die Knochenregeneration. In: Medizintechnik: Life Science Engineering, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, 2008

Ma YL, Burr DB, Erben RG

Bone histomorphometry in rodents. In: Principles of Bone Biology, Amsterdam, Elsevier Verlag, 2020

Malhan D, Muelke M, Rosch S, Schaefer AB, Merboth F, Weisweiler D, Heiss C, Arganda-Carreras I, El Khassawna T

An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry. Frontiers in Endocrinology. 2018; 9: 666

Marsh D

Concepts of Fracture Union, Delayed Union, and Nonunion. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1998(355 Suppl): S22-30

Mayer M

Rutherford Backscattering Spectrometry (RBS).

Workshop on Nuclear Data for Science and Technology: Materials Analysis, Trieste, Italy, 2003

Meininger S, Moseke C, Spatz K, Marz E, Blum C, Ewald A, Vorndran E

Effect of strontium substitution on the material properties and osteogenic potential of 3D powder printed magnesium phosphate scaffolds.

Materials Science and Engineering Part C: Materials for biological applications. 2019; 98: 1145-1158

Mestres G, Ginebra M-P

Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties.

Acta Biomaterialia. 2011; 7(4): 1853-1861

Migliorini AS, Bailo P, Boracchi M, Crudele GDL, Gentile G, Zoja R

Forensic - Pathological SEM/EDX analysis in prosecution of medical malpractice. Legal Medicine. 2019; 40: 43-46

Mirzaaligoudarzi M

Radioopazität von unzementierten und zementierten faserverstärkten Kunststoffstiften im Wurzelkanal. Dissertationsschrift, Hamburg, Universität Hamburg, 2012

Moore WR, Graves SE, Bain GI

Synthetic bone graft substitutes. ANZ Journal of Surgery. 2001; 71(6): 354-361

Moseke C, Bayer C, Vorndran E, Barralet JE, Groll J, Gbureck U

Low temperature fabrication of spherical brushite granules by cement paste emulsion.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2012; 23(11): 2631-2637

Mulisch M, Welsch U

Romeis - Mikroskopische Technik. Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum Verlag, 2015

Nabiyouni M, Brückner T, Zhou H, Gbureck U, Bhaduri SB

Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications. Acta Biomaterialia. 2018; 66: 23-43

Naegele E

Mikrocomputertomographische Analyse der trabekulären Architektur des menschlichen Femurs.

Dissertationsschrift, München, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005

Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D

Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. The Indian Journal of Medical Research. 2010; 132: 15-30

Nickel R, Schummer A, Seiferle E

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I: Bewegungsapparat. Stuttgart, Parey Verlag, 2003

Nombela-Arrieta C, Manz MG

Quantification and three-dimensional microanatomical organization of the bone marrow.

Blood Advances. 2017; 1(6): 407-416

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 Biomaterialia. 2017; 50: 1-19

Oliveira SM, Barrias CC, Almeida IF, Costa PC, Ferreira MR, Bahia MF, Barbosa MA

Injectability of a Bone Filler System Based on Hydroxyapatite Microspheres and a Vehicle With in situ Gel-Forming Ability.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied biomaterials. 2008; 87(1): 49-58

Orr TE, Villars PA, Mitchell SL, Hsu HP, Spector M

Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. Biomaterials. 2001; 22(14): 1953-1959

Ostrowski N, Roy A, Kumta PN

Magnesium Phosphate Cement Systems for Hard Tissue Applications: A Review. ACS Biomaterials Science & Engineering. 2016; 2(7): 1067-1083

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR

Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. Journal of Bone and Mineral Research. 1987; 2(6): 595-610

Paul W, Sharma CP

Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1999; 10(7): 383-388

Pawelec K, Planell JA

Bone Repair Biomaterials: Regeneration and Clinical Applications. Amsterdam, Elsevier Verlag, 2018

Penel G, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaître J, Leroy G

Raman Microspectrometry Studies of Brushite Cement: In Vivo Evolution in a Sheep Model.

Bone. 1999; 25(2 Suppl): 81s-84s

Peters F, Groisman D, Davids R, Hänel T, Dürr H, Klein M

Comparative study of patient individual implants from β -tricalcium phosphate made by different techniques based on CT data.

Materialwissenschaft und Werkstofftechnik: Entwicklung, Fertigung, Prüfung, Eigenschaften und Anwendungen technischer Werkstoffe. 2006; 37(6): 457-461

Raina V

Normal osteoid tissue. Journal of Clinical Pathology. 1972; 25(3): 229-232

Raschke MJ, Gasch A

Verzögerte Frakturheilung. Trauma und Berufskrankheit. 2012; 14(1): 85-89

Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S

Knochenersatz. Der Unfallchirurg. 2012; 115(10): 938-949

Ribas RG, Schatkoski VM, Montanheiro TLdA, de Menezes BRC, Stegemann C, Leite DMG, Thim GP

Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review.

Ceramics International. 2019; 45(17, Part A): 21051-21061

Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ

Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives.

European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology. 2018; 28(3): 351-362

Roller BL, Kuroki K, Bozynski CC, Pfeiffer FM, Cook JL

Use of a Novel Magnesium-Based Resorbable Bone Cement for Augmenting Anchor and Tendon Fixation.

The American Journal of Orthopedics. 2018; 47(2)

Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B

Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. Materials Science and Engineering Part C: Materials for biological applications. 2017; 78: 1246-1262

Rüegsegger P, Koller B, Müller R

A Microtomographic System for the Nondestructive Evaluation of Bone Architecture.

Calcified Tissue International. 1996; 58(1): 24-29

Salomon F-V, Geyer H, Gille U

Anatomie für die Tiermedizin. Stuttgart, Enke Verlag, 2008

Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS

Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior.

Acta Biomaterialia. 2013; 9(9): 8037-8045

Sarkar K, Kumar V, Devi KB, Ghosh D, Nandi SK, Roy M

Effects of Sr doping on biodegradation and bone regeneration of magnesium phosphate bioceramics.

Materialia. 2019; 5: 100211

Schäfer M

Vergleichende histologische Untersuchungen von intramedullären Implantaten auf Magnesiumbasis im Kaninchenmodell.

Dissertationsschrift, Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2011

Schemitsch EH

Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! Journal of Orthopaedic Trauma. 2017; 31 Suppl 5: S20-s22

Schenk RK, Olah AJ, Herrmann W

Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Methods of Calcified Tissue Preparation, Amsterdam, Elsevier, 1984

Schieker M, Heiss C, Mutschler W

Knochenersatzmaterialien. Der Unfallchirurg. 2008; 111(8): 613-620

Schieker M, Mutschler W

Die Überbrückung von posttraumatischen Knochendefekten. Der Unfallchirurg. 2006; 109(9): 715-732

Schmitt M, Popp J

Raman-Spektroskopie. Biomedizinische Diagnostik. Chemie in unserer Zeit. 2011; 45(1): 14-23

Schmitz JP, Hollinger JO

The Critical Size Defect As An Experimental Model For Craniomaxillofacial Nonunions.

Clinical Orthopaedics and Related Research. 1986; (205): 299-308

Schneider MR

Von Kossa and his staining technique. Histochemistry and Cell Biology. 2021; 156(6): 523-526

Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ

Knochenersatzwerkstoffe. Der Orthopäde. 2003; 32(1): 2-10

Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E

Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. European Journal of Histochemistry. 2018; 62(1): 2841

Scimeca M, Orlandi A, Terrenato I, Bischetti S, Bonanno E

Assessment of metal contaminants in non-small cell lung cancer by EDX microanalysis.

European Journal of Histochemistry. 2014; 58(3): 2403

Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N, Glogauer M

Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials.

Materials (Basel). 2015a; 8(9): 5671-5701

Sheikh Z, Zhang YL, Grover L, Merle GE, Tamimi F, Barralet J

In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts.

Acta Biomaterialia. 2015b; 26: 338-346

Sinowatz F, Hees H

Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Hofstetten, Prof. Dr. Fred Sinowatz, 2012

Soldner E, Herr G

Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien. Trauma und Berufskrankheit. 2001; 3(4): 256-269

Strecker H, Persch G

Scanning tunneling microscopy and technical applications. Applied Surface Science. 1990; 46(1): 441-445

Stübinger S, Dard M

The Rabbit as Experimental Model for Research in Implant Dentistry and Related Tissue Regeneration. Journal of Investigative Surgery. 2013; 26(5): 266-282

Tas AC

Preparation of porous apatite granules from calcium phosphate cement. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2008; 19(5): 2231-2239

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(21): 4383-4394

Tjong W, Kazakia GJ, Burghardt AJ, Majumdar S

The effect of voxel size on high-resolution peripheral computed tomography measurements of trabecular and cortical bone microstructure. Medical Physics. 2012; 39(4): 1893-1903

Travlos GS

Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. Toxicologic Pathology. 2006; 34(5): 548-565

van 't Hof RJ, Rose L, Bassonga E, Daroszewska A

Open source software for semi-automated histomorphometry of bone resorption and formation parameters. Bone. 2017; 99: 69-79

Vickerman JC, Gilmore IS

Surface Analysis: The Principal Techniques. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc., 2011

Vidal BC, Mello MLS

Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. Acta Histochemica. 2019; 121(2): 101-112

Vidal L, Kampleitner C, Krissian S, Brennan M, Hoffmann O, Raymond Y, Maazouz Y, Ginebra MP, Rosset P, Layrolle P

Regeneration of segmental defects in metatarsus of sheep with vascularized and customized 3D-printed calcium phosphate scaffolds. Scientific Reports. 2020; 10(1): 7068

Voggenreiter G

Knochenheilung. Perioperative Medizin. 2009; 1(2): 86-95

von der Höh N, Bormann D, Lucas A, Denkena B, Hackenbroich C, Meyer-Lindenberg A

Influence of Different Surface Machining Treatments of Magnesium-based Resorbable Implants on the Degradation Behavior in Rabbits.

Advanced Engineering Materials. 2009; 11(5): B47-B54

von der Höh N, Krause A, Hackenbroich C, Bormann D, Lucas A, Meyer-Lindenberg A

Einfluss der Oberflächenbearbeitung von resorbierbaren Implantaten aus verschiedenen Magnesium-Calciumlegierungen auf die Resorption. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 2006; 113(12): 439-446

von Doernberg M-C, von Rechenberg B, Bohner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G, Auer J

In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. Biomaterials. 2006; 27(30): 5186-5198

von Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G

Physiologie der Haustiere. Stuttgart, Enke Verlag, 2015

Vorndran E

Rapid-PrototypinghydraulischhärtenderCalcium-undMagnesiumphosphatzemente mit lokaler Wirkstoffmodifikation.Dissertationsschrift, Würzburg, Universität Würzburg, 2011Dissertationsschrift, Würzburg, 2011

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.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2011a; 22(3): 429-436

Vorndran E, Klarner M, Klammert U, Grover LM, Patel S, Barralet JE, Gbureck U

3D Powder Printing of β -Tricalcium Phosphate Ceramics Using Different Strategies.

Advanced Engineering Materials. 2008; 10(12): B67-B71

Vorndran E, Moseke C, Gbureck U

3D printing of ceramic implants. Materials Research Society Bulletin. 2015; 40(2): 127-136

Vorndran E, Wunder K, Moseke C, Biermann I, Müller FA, Zorn K, Gbureck U

Hydraulic setting Mg₃(PO₄)₂ powders for 3D printing technology. Advances in Applied Ceramics. 2011b; 110(8): 476-481

Wancket LM

Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. Veterinary Pathology. 2015; 52(5): 842-850

Wang L, Nancollas GH

Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. Chemical Reviews. 2008; 108(11): 4628-4669

Wang S, Xu C, Yu S, Wu X, Jie Z, Dai H

Citric acid enhances the physical properties, cytocompatibility and osteogenesis of magnesium calcium phosphate cement.

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2019; 94: 42-50

Wang W, Yeung KWK

Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. Bioactive Materials. 2017; 2(4): 224-247

Watts DC

Radiopacity vs. composition of some barium and strontium glass composites. Journal of Dentistry. 1987; 15(1): 38-43

Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, Shin J-W, Liu C

Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium–calcium phosphate for bone tissue regeneration. Biomaterials. 2010; 31(6): 1260-1269

Weibrich G, Götz H, Gnoth S, Trettin R, Duschner H, Wagner W

Charakterisierung der Oberflächenmorphologie von Knochenersatzmaterialien mittels REM.

Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie. 2000; 16: 151-159

Wen Y, Xun S, Haoye M, Baichuan S, Peng C, Xuejian L, Kaihong Z, Xuan Y, Jiang P, Shibi L

3D Printing Porous Ceramic Scaffold for Bone Tissue Engineering: A Review. Biomaterials Science. 2017; 5(9): 1690-1698

Wetzig K

Rasterelektronenmikroskopie. In: Analytiker-Taschenbuch, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, 2000

Wildemann B

Untersuchung zellulärer Prozesse während der durch Wachstumsfaktoren beeinflussten und unbeeinflussten Frakturheilung.

Habilitationsschrift, Berlin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, 2005

Willbold E, Witte F

Histology and research at the hard tissue-implant interface using Technovit 9100 New embedding technique.

Acta Biomaterialia. 2010; 6(11): 4447-4455

Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P

Degradation Characteristics of α and β Tri-Calcium-Phosphate (TCP) in Minipigs. Journal of Biomedical Materials Research. 2002; 63(2): 115-121

Wu F, Su J, Wei J, Guo H, Liu C

Injectable bioactive calcium–magnesium phosphate cement for bone regeneration. Biomedical Materials. 2008a; 3(4): 044105

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 Biomaterialia. 2008b; 4(6): 1873-1884

Wu L, Feyerabend F, Schilling AF, Willumeit-Römer R, Luthringer BJ

Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture. Acta Biomaterialia. 2015; 27: 294-304

Xia Z, Triffitt JT

A review on macrophage responses to biomaterials. Biomedical Materials. 2006; 1(1): R1-9

Xu L, Yu G, Zhang E, Pan F, Yang K

In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2007; 83(3): 703-711

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 and Surfaces B: Biointerfaces. 2010; 76(2): 496-504

Zeng D, Xia L, Zhang W, Huang H, Wei B, Huang Q, Wei J, Liu C, Jiang X

Maxillary Sinus Floor Elevation Using a Tissue-Engineered Bone with Calcium-Magnesium Phosphate Cement and Bone Marrow Stromal Cells in Rabbits. Tissue Engineering Part A. 2012a; 18(7-8): 870-881

Zeng D, Xia L, Zhang W, Huang H, Wei B, Huang Q, Wei J, Liu C, Jiang X

Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone with calciummagnesium phosphate cement and bone marrow stromal cells in rabbits. Tissue Engineering Part A. 2012b; 18(7-8): 870-881

Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F, Yang K

In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation.

Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2009; 90(3): 882-893
Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler JM

Calcium Phosphate Cements (CPCs) for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties.

Acta Biomaterialia. 2014; 10(3): 1035-1049

Zhang L, Chang M, Beck CA, Schwarz EM, Boyce BF

Analysis of new bone, cartilage, and fibrosis tissue in healing murine allografts using whole slide imaging and a new automated histomorphometric algorithm. Bone Research. 2016; 4: 15037

Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X

Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. Acta Biomaterialia. 2019; 84: 16-33

Zwingenberger S, Nich C, Valladares RD, Yao Z, Stiehler M, Goodman SB

Recommendations and Considerations for the Use of Biologics in Orthopedic Surgery.

BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy. 2012; 26(4): 245-256

VIII. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg für die Möglichkeit der Promotion an der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und die persönliche und fachliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ein riesiges Dankeschön geht zudem an Dr. Anja-Christina Waselau für die gute Organisation und Betreuung dieses Projekts, die Hilfe bei der Datenauswertung und die vielen sinnvollen Korrekturen meiner Publikationen sowie dieser Arbeit. Franziska Feichtner, PhD danke ich ebenfalls ganz herzlich für ihre Unterstützung bei der Datenauswertung und die zahlreichen hilfreichen Verbesserungsvorschläge meiner Manuskripte. Danke, dass ihr immer erreichbar wart und mich während dieser Arbeit wunderbar betreut habt. Julia Augustin, Laura Witting, Marlene Schmidt, Sophia Hiepe und Elke Hemmerlein danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders danken möchte ich meiner Mitdoktorandin Sophia Hiepe für die vielen, vielen lustigen Stunden im Büro, im Kaninchenstall, vor dem µCT und dem Mikroskop. Ohne dich hätte dieses Projekt längst nicht so viel Spaß gemacht. Bei Beatrix Limmer und Cristiane Meneghelli Rudolph möchte ich mich für die stets hervorragende technische Unterstützung bei der µCT-Untersuchung sowie der histologischen Untersuchung bedanken. Lisa Wurm danke ich ebenfalls für die sehr gute technische Unterstützung sowie die Korrektur meiner ersten Publikation. Liebe Laborhäschen, ohne eure tatkräftige Mithilfe wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen! Ich danke euch allen für die schöne gemeinsame Zeit.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei allen beteiligten Mitarbeitern des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg und insbesondere bei unserer Projektpartnerin Frau Dr. Elke Vorndran für die Herstellung und die Untersuchung der Scaffolds vor der Implantation sowie die Anfertigung der REM- und EDX-Analysen. Frau Dr. Elke Vorndran danke ich zudem ganz besonders für ihre stets nette, schnelle und fachlich hervorragende Unterstützung, die Literaturanregungen und die konstruktiven Korrekturvorschläge meiner Publikationen sowie dieser Arbeit. Bei Frau Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg möchte ich mich für die Unterstützung bei der histologischen Auswertung bedanken.

Meinen Studienfreunden Anna, Kathi, Ines und Janina danke ich für ihre jahrelange Freundschaft und die schönen und lustigen gemeinsamen Stunden, die mir den nötigen Ausgleich gaben.

Ein riesengroßer Dank gilt auch meinem Partner Maximilian Tharr für die liebevolle Unterstützung, die häufige Rücksichtname und den aufbauenden Zuspruch während dieser oftmals stressigen Zeit sowie die Hilfe bei Computerproblemen. Danke Max, dass du mir stets verständnisvoll zur Seite stehst, mich aufmunterst und mir Rückhalt gibst.

Mein größter Dank gebührt meiner Familie. Meinen Eltern Gertrud und Roland danke ich sehr für ihre finanzielle und emotionale Unterstützung. Meinem Bruder Johannes möchte ich für die motivierenden Worte, die Hilfe mit dem Programm OriginLab und die sinnvollen Verbesserungen meiner zweiten Publikation sowie dieser Arbeit danken. Ich danke euch für eure Ermutigungen, dass ich mich immer auf euch verlassen kann, ihr in wirklich jeder Lebenslage für mich da seid, mich beim Erreichen meiner Ziele unterstützt und an mich glaubt!