In-vivo-Untersuchung von 3D-pulvergedruckten Calcium-Magnesium-Phosphat-basierten Keilen im teilbelasteten Tibiadefektmodell am Kaninchen

von

Elke Hemmerlein

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

In-vivo-Untersuchung von 3D-pulvergedruckten Calcium-Magnesium-Phosphat-basierten Keilen im teilbelasteten Tibiadefektmodell am Kaninchen

von Elke Hemmerlein

aus Forchheim

München 2025

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:	Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer- Lindenberg
Korreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Andreas F. Parzefall
	Priv.-Doz. Dr. Sven Reese
	Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner
	Univ.-Prof. Heidrun Potschka

Tag der Promotion: 26. Juli 2025

Meinen Eltern

„Es erscheint immer unmöglich, bis es vollbracht ist.“

Nelson Mandela

Teilergebnisse der Studie dieser Dissertation wurden als Posterbeitrag oder Vortrag auf folgenden Fachkongressen präsentiert:

- Annual Meeting of the German Society for Biomaterials (DGBM) 2022 in Essen, Germany, 15. – 17. September 2022

Posterbeitrag und Vortrag:

In vivo degradation and osseointegration of 3D powder-printed CMP-based scaffolds in the loaded segmental tibial defect model

Autoren: Elke Hemmerlein, Elke Vorndran, Franziska Feichtner, Anja-Christina Waselau, Andrea Meyer-Lindenberg

- Jahreskongress DVO Osteologie 2022 „Osteologie meets Endokrinologie“ in Baden-Baden, Germany, 18. – 20. September 2022

Posterbeitrag:

In-vivo-Untersuchung von 3D-pulvergedruckten CMP-basierten Scaffolds im belasteten segmentalen Tibia-Defektmodell

Autoren: Elke Hemmerlein, Elke Vorndran, Franziska Feichtner, Anja-Christina Waselau, Andrea Meyer-Lindenberg

DOI:10.1055/s-0042-1755904

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 4

1. Knochen 4

1.1. Knochenarchitektur 4

1.2. Knochenbildung 4

1.3. Knochenumbau 6

1.4. Osteotomie 7

1.5. Frakturheilung 7

1.6. Critical-size-Defekt 8

2. Knochenersatzmaterialien 8

2.1. Eigenschaften 9

2.2. Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphat-Basis 10

2.2.1. Calciumphosphat-Zemente 10

2.2.2. Magnesiumphosphat-Zemente 12

2.2.3. Calcium-Magnesiumphosphat-Zemente 12

3. Applikationsformen von Knochenersatzzementen 14

3.1. Granulate 14

3.2. Pasten 14

3.3. 3D-pulvergedruckte Scaffolds 16

4. Untersuchungsmethoden von Knochenersatzmaterialien 17

4.1. Mikro-Computertomographie 17

4.2. Histologische Untersuchung 18

4.3. Histomorphometrie 19

4.4. REM- und EDX-Analyse 20

III. PUBLIKATION 21

IV. DISKUSSION 47

V. ZUSAMMENFASSUNG 60

VI. SUMMARY 62

VII. LITERATURVERZEICHNIS 64

VIII. DANKSAGUNG 89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	Dreidimensional
3DP	3D-Pulverdruck
µCT	Mikro-Computertomographie
BMU	Bone Multicellular Unit
Ca	Calcium
CAD	Computer Aided Design
CaMgP	Calciummagnesiumphosphat
CaP	Calciumphosphat
CDHA	Calcium-defizitärer Hydoxylapatit
CMPC	Calcium-Magnesiumphosphat-Zement
CMPC225	$Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO_4)_2$ nachbehandelt mit Phosphorsäure
CPC	Calciumphosphat-Zement
CSD	Critical-size-Defekt
CT	Computertomographie
DAHP	Diammoniumhydrogenphosphat
DKHP	Dikaliumhydrogenphosphat
DNaHP	Dinatriumhydrogenphosphat
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
et al.	*et alteri* (lat.: und andere)
HA	Hydroxylapatit
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
KEM	Knochenersatzmaterial
M	mol/L (Stoffmengenkonzentration)
Ma.-%	Massenprozent
MAHP	Monoammoniumhydrogenphosphat
MCPM	Monocalciumphosphat-Monohydrat
Mg	Magnesium
MgO	Magnesiumoxid
MgP	Magnesiumphosphat
MMA	Methylmetacrylat
MPa	Megapascal
MPC	Magnesiumphosphat-Zement

MPC3	$Mg_3(PO_4)_2$ nachbehandelt mit Diammoniumhydrogenphosphat
mRUST	Modified Radiographic Union Score for Tibial fractures
PEEK	Polyetheretherketon
P	Phosphor
PO_4^{3-}	Phosphat
PA	Phosphorsäure
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RP	Rapid Prototyping
SFF	Solid Free-Form Fabrication
SV	Scaffold Volume
TCP	Tricalciumphosphat
Vol.-%	Volumenprozent

I. EINLEITUNG

Die Behandlung segmentaler Knochendefekte infolge von angeborenen Erkrankungen, Traumata, Infektionen oder Tumorresektionen stellt im klinischen Alltag noch immer eine große Herausforderung dar, sodass diese Situation die Verwendung von Knochenersatzmaterialien erforderlich macht (Kheirallah und Almeshaly 2016, Fernandez de Grado et al. 2018).

Das ideale Knochenersatzmaterial (KEM) zeichnet sich durch Biokompatibilität sowie Osteokonduktion (Leitschieneneffekt für einwachsenden Knochen), Osteoinduktion (Stimulation zur Knochenneubildung), Osseointegration (direkter Kontakt zwischen Knochengewebe und KEM) und Osteogenese (Knochenbildung innerhalb des KEM) aus (Albrektsson und Johansson 2001, LeGeros 2002, Kheirallah und Almeshaly 2016). Die optimale Degradationsrate eines KEM stimmt mit der Knochenregenerationsrate überein und erfordert daher eine gewisse mechanische Stabilität, insbesondere in der frühen Phase der Knochenheilung. Idealerweise degradiert das KEM fortschreitend, während es durch neugebildeten Knochen ersetzt wird (Freed et al. 1994, Ignatius et al. 2001, Linhart et al. 2004, Schröter et al. 2020).

Als Goldstandard zählen aktuell die autologen (vom selben Individuum stammend) Knochentransplantate. Sie sind osteokonduktiv, osteoinduktiv, bioresorbierbar und besitzen, u.a. aufgrund enthaltener Wachstumsfaktoren, osteogenes Potenzial (Sen und Miclau 2007). Ein Nachteil dieser Transplantate besteht jedoch, neben begrenzter Verfügbarkeit, in der Notwendigkeit eines zweiten Operationsbereiches, um Knochengewebe (z. B. aus dem Beckenkamm) zu entnehmen. Dies kann mit einer Morbidität, wie Schmerzen oder Infektionen an der Entnahmestelle, verbunden sein (Lieberman und Friedlaender 2005, LeGeros 2008). Alternativen stellen allogene (von der gleichen Spezies stammend) und xenogene (von einer anderen Spezies stammend) Transplantate dar. Sie bergen jedoch das Risiko, Krankheitserreger zu übertragen oder immunologische Reaktionen hervorzurufen, sodass immer häufiger alloplastische, also synthetische KEMs zum Einsatz kommen (Fernandez de Grado et al. 2018, Valtanen et al. 2021). Diese Materialien haben den Vorteil unbegrenzt verfügbar und lange haltbar zu sein, umgehen Komplikationen wie Entnahmemorbidität und Pathogentransfer und können durch

Beeinflussung der Zusammensetzung und der morphologischen bzw. physikalischen Eigenschaften auf individuelle Bedürfnisse angepasst werden (Lieberman und Friedlaender 2005).

Neben Polymeren und Biogläsern werden häufig auch Keramiken, besonders Calciumphosphate (CaP) wie Hydroxylapatit (HA) oder Tricalciumphosphat (TCP), als KEMs verwendet (Roddy et al. 2018). Sie ähneln in ihrer Zusammensetzung der mineralischen Phase von Knochen und zeichnen sich daher durch hervorragende Biokompatibilität, Osseointegration, Osteokonduktivität und zum Teil sogar osteoinduktives Potential aus (LeGeros 2008, Eliaz und Metoki 2017). Calciumphosphat-Zemente (CPCs) werden aufgrund dieser positiven Eigenschaften gerne als KEM verwendet, sind aber wegen ihrer geringen mechanischen Stabilität hauptsächlich für nicht-lasttragende Defekte geeignet (Eliaz und Metoki 2017). Ihre Degradation erfolgt durch zwei Mechanismen: zum einen durch die passive Resorption infolge der chemischen Löslichkeit des Materials und zum anderen durch die aktive Resorption durch Osteoklasten (Kanter et al. 2014, Schröter et al. 2020). Die Degradationsrate eines KEM hängt von verschiedenen Faktoren beispielsweise von der chemischen Zusammensetzung und der Porosität ab. Einige Materialien auf CaP-Basis, wie HA, haben eine sehr geringe *in-vivo*-Löslichkeit, sodass der Abbau fast ausschließlich durch aktive Resorption erfolgt und selbst Jahre nach Implantation noch Reste nachweisbar sind (Marcacci et al. 2007).

Als Alternative zu den CPCs werden immer mehr Magnesiumphosphat-Zemente (MPCs) erforscht. Sie sind ebenfalls biokompatibel und osteokonduktiv, haben eine höhere *in-vivo*-Löslichkeit als CPCs, zeichnen sich durch eine hohe initiale Festigkeit aus und besitzen zum Teil auch antibakterielle Wirkung (Ostrowski et al. 2016). Magnesium (Mg) hat einen positiven Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Ein Mangel an Magnesium kann zu vermindertem Knochenwachstum, Osteoporose und somit zu erhöhter skelettaler Brüchigkeit führen (Rude et al. 2003, Nabiyouni et al. 2018, Bavya Devi et al. 2022). Die positive Wirkung von bei der Degradation freiwerdenden Mg-Ionen auf das Knochenremodeling konnte bereits in einigen *in-vivo*-Studien an Kaninchen und Meerschweinchen an Implantaten unterschiedlicher Mg-Legierungen demonstriert werden (Witte et al. 2005, Witte et al. 2007).

Um die positiven Eigenschaften von CPCs und MPCs zu vereinen, wurden Calcium-Magnesiumphosphat-Zemente (CMPCs) entwickelt und bereits in einigen

in-vitro- und *in-vivo*-Studien am Tiermodell untersucht, in denen eine sehr gute Biokompatibilität, ein günstiges Degradationsverhalten, eine verbesserte Effizienz zur Knochenneubildung und Osteokonduktivität festgestellt wurden (Wu et al. 2008a, Wu et al. 2008b, Zeng et al. 2012, Fuchs et al. 2021, Schaufler et al. 2022). CMPCs wurden bisher in Form von Granulaten, selbsthärtenden Pasten und vorgehärteten oder 3D-pulvergedruckten, zylinderförmigen Implantaten verwendet (Wu et al. 2008b, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021, Kowalewicz et al. 2021).

Ein kostengünstiges und vergleichsweise schnelles Verfahren, um Scaffolds herzustellen, bietet das 3D-Pulverdruckverfahren, welches zu den additiven Fertigungstechniken zählt. Diese Verfahren beruhen auf dem schichtweisen Aufbau computergenerierter Modelle, wobei die Scaffolds mithilfe computertomographischer Patientendaten individuell angefertigt werden können. Die Vorteile des 3D-Pulverdrucks liegen in der Herstellung passgenauer, defektspezifischer Scaffolds unter Einstellung ihrer physikalischen und morphologischen Eigenschaften (Klammert et al. 2010, Vorndran et al. 2015).

Während sich bisherige *in-vivo*-Studien zu CMPCs auf unbelastete Defekte konzentrierten (Wu et al. 2008b, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021, Kowalewicz et al. 2022), erfolgte in der vorliegenden Studie eine Untersuchung unter teilbelasteten Bedingungen. MPCs wurden bereits in Form von Pasten in teilbelasteten Defektmodellen untersucht (Kanter et al. 2018, Kaiser et al. 2022), jedoch wurde bislang noch keine *in-vivo*-Studie zu 3D-pulvergedruckten MPC-Scaffolds unter solchen Belastungsbedingungen durchgeführt.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, CMPC- bzw. MPC-basierte, keilförmige Scaffolds mittels 3D-Pulverdruck anzufertigen und erstmalig in einen teilbelasteten Defekt an der Kaninchentibia zu implantieren, um sie auf Biokompatibilität, Degradationsverhalten, Stabilität und Osseointegration *in vivo* zu untersuchen. Hierbei erfolgte die Implantation der Keile im Rahmen einer aufklappenden Korrekturosteotomie in die proximale Kaninchentibia.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Knochen

Das komplexe Skelettsystem der Wirbeltiere besteht zum Großteil aus Knochen, einem sehr harten Stützgewebe, welches einen wichtigen Teil des passiven Bewegungsapparates darstellt und verschiedene Funktionen erfüllt. Die Knochen dienen u. a. dem Schutz innerer Organe, erfüllen zellspezifische Stoffwechselleistungen und in ihrem Knochenmark findet zudem die Hämatopoese statt. Knochengewebe ist in der Lage, sich zeitlebens an Veränderungen, wie beispielsweise starke mechanische Belastung, anzupassen und ist daher ein dynamisches Gewebe (König und Liebich 2012, Meermann und Gräff 2017).

1.1. Knochenarchitektur

Röhrenknochen bestehen aus einem Mittelstück (Diaphyse), welches von einem dichten Knochenmantel (*Substantia compacta* bzw. Kompakta) umgeben ist und die mit gelbem Fettmark gefüllte Markhöhle (*Cavum medullare*) einschließt, den zwei Halsstücken (Metaphysen) und den beiden Endstücken (Epiphysen), in denen sich ein schwammartiges Gerüst aus Knochenbälkchen und -trabekeln (*Substantia spongiosa* bzw. Spongiosa) befindet und die von der Knochenrinde (*Substantia corticalis* bzw. Kortikalis) überzogen sind (König und Liebich 2012). Zwischen den gefäßlosen Trabekeln befindet sich das rote Knochenmark, in dem die Hämatopoese stattfindet. Die Knochenzellen werden durch Diffusion aus den Knochenmarksgefäßen versorgt. Der strukturelle Aufbau der Spongiosabälkchen, welche sich entlang von Trajektorien (Kraftlinien) anordnen, dient der funktionellen Anpassung an Druck- und Zugspannungen. Die Außenfläche der Kompakta ist, bis auf die Gelenkflächen, von Knochenhaut (Periost) überzogen. Das Knocheninnere ist mit Endost, welches aus osteogenen Zellen besteht, überzogen (König und Liebich 2012, Salomon et al. 2015).

1.2. Knochenbildung

Man unterscheidet zwei Formen der Ossifikation, die desmale bzw. direkte Ossifikation und die chondrale bzw. indirekte Ossifikation. Letztere lässt sich wiederum in die perichondrale und enchondrale Ossifikation unterteilen (König und

Liebich 2012).

Bei der desmalen Ossifikation entwickeln sich undifferenzierte Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten. Während der Knochenbildung produzieren diese zunächst eine unverkalkte Knochenmatrix (Osteoid) und bauen sich selbst in diese ein (König und Liebich 2012). Der auf diese Weise gebildete Knochen wird Bindegewebsknochen genannt (Salomon et al. 2015). Das Osteoid enthält zum Großteil Kollagen Typ I (95%) sowie geringe Anteile an Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Knochenproteinen (König und Liebich 2012). Während der Knochenmineralisierung dient das Typ-I-Kollagen als Kristallisationskern für die Anlagerung von CaP-Verbindungen und innerhalb von 8 bis 10 Tagen wandelt sich das Osteoid in die Knochengrundsubstanz Ossein um. Dabei werden anorganische Bestandteile wie Calciumphosphat, Calciumcarbonat, Magnesiumphosphat und Calciumfluorid über die Blutgefäße ins Osteoid eingelagert (König und Liebich 2012).

Bei der chondralen Ossifikation wird zunächst hyaliner Knorpel gebildet, der als Ausgangsmaterial für das Knochenlängenwachstum dient und nach und nach durch permanentes Knochengewebe ersetzt wird. Hierbei gebildeter Knochen wird daher als Ersatzknochen bezeichnet (König und Liebich 2012). Dieses knorpelig vorgebildete Skelett wird Primordialskelett genannt und entsteht wie Bindegewebsknochen aus dem Mesenchym. Die enchondrale Ossifikation entsteht bei kurzen Stücken von innen heraus und ist durch eine knorpelige Wachstumsplatte (Epiphysenfuge) gekennzeichnet (Lüllmann-Rauch 2009), wohingegen bei der perichondralen Ossifikation bei langen Röhrenknochen zunächst eine diaphysäre Knochenmanschette gebildet wird und die Verknöcherung dann Richtung Epiphysen voranschreitet (Salomon et al. 2015).

Das Ergebnis beider Ossifikationsarten, wie auch bei der Frakturheilung, ist der Geflecht- bzw. Faserknochen, welcher bei jeder Knochenneubildung auftritt und sich anschließend durch mechanische Beanspruchung zu Lamellenknochen umbaut. Während die Kollagenfasern, Blutgefäße und Knochenzellen im Geflechtknochen unregelmäßig angeordnet sind, sind sie im Lamellenknochen streng parallel oder konzentrisch geschichtet (König und Liebich 2012). Dadurch, sowie aufgrund des höheren Mineralisierungsgrades des Lamellenknochens, weist der Geflechtknochen eine verminderte mechanische Festigkeit und eine höhere Plastizität als der Lamellenknochen auf (Salomon et al. 2015).

Die Struktur des Lamellenknochens basiert auf dem Osteon (Havers-System). Dieses besteht im Inneren aus dem Havers-Kanal, welcher lockeres Bindegewebe enthält und durch den ein zentrales Havers-Gefäß sowie vegetative Nerven verlaufen und der von Havers-Lamellen (Speziallamellen) aus Kollagenfasern und mineralisierter Knochenmatrix konzentrisch umgeben ist. Die Osteozyten liegen zwischen den Lamellen und sind durch radiär in Knochenkanälchen verlaufende Zytoplasmafortsätze miteinander verbunden. Durch querverlaufende Volkmann-Gefäße stehen die zentralen Havers-Gefäße mit dem Endost und dem Periost in Verbindung (König und Liebich 2012).

1.3. Knochenumbau

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, dass sich im Laufe des Lebens an verschiedenen Stellen aufgrund von variierender mechanischer Belastung ständig umstrukturiert. Dieser kontinuierliche Umbau wird Remodeling genannt und dient als Vorbeugung gegen Ermüdung des Knochengewebes, zur Reparatur von Mikroschäden, zur Anpassung an mechanische Beanspruchung sowie zur Bereithaltung von schnell verfügbarem Calcium. Beim Remodeling sind Osteoklasten- sowie Osteoblasten als bone multicellular unit (BMU) organisiert, welches räumlich und zeitlich koordiniert den Umbau durchführt (Lüllmann-Rauch 2009). Zunächst resorbieren Osteoklasten gezielt alte Knochensubstanz und schaffen so Platz für die anschließende Neubildung durch Osteoblasten.

In der Kompakta frisst eine Osteoklastengruppe einen Bohrkanal in die Knochenmatrix, gefolgt von einer Gruppe aus Osteoblasten, welche eine Osteoid-Lamelle an der Bohrkanalwand ablegen. Darauf folgt die nächste Osteoblastengruppe, die die zweite Osteoid-Lamelle produziert und somit die ersten Osteoblasten einmauert, welche dadurch zu Osteozyten werden. Dieser Vorgang wird fortgesetzt, bis der Kanal bis auf den Havers-Kanal mit fünf bis 20 Lamellen aufgefüllt ist. Die jüngste Generation an Osteoblasten, welche die innerste Lamelle des Osteons produziert, wird nicht eingemauert. Diese Zellen fallen stattdessen in einen Ruhezustand und bilden gemeinsam mit Vorläuferzellen das Endost. Bei diesem Prozess werden alte Osteone beseitigt, um neue Osteone herzustellen, wodurch es zur Bildung von Schaltlamellen (Osteon-Reste) kommt (Lüllmann-Rauch 2009).

In der Spongiosa fressen die Osteoklasten Buchten, sogenannte Howship-Lakunen

in die Oberfläche, welche anschließend von Osteoblasten mit neuen Osteoid-Lamellen aufgefüllt werden (Lüllmann-Rauch 2009).

1.4. Osteotomie

Osteotomien sind chirurgische Maßnahmen, bei denen der Knochen in zwei Segmente getrennt wird. Mithilfe von Korrekturosteotomien können Achsenabweichungen oder Rotationsfehler, die infolge von Traumata oder Frakturheilungsstörungen entstanden sind, sowie Gelenkinkongruenzen korrigiert oder Knochen verlängert werden (Fossum 2020). Hierbei werden, abhängig von der Indikation, Diaphyse bzw. Metaphyse durchtrennt, neu positioniert und die Knochen anschließend mit Implantaten fixiert. Bei Osteoektomien werden Knochensegmente entfernt. Diese Eingriffe werden beispielsweise bei Junghunden im Wachstum durchgeführt, um bei vorzeitigem Epiphysenfugenschluss ein ungestörtes Wachstum paariger Röhrenknochen zu ermöglichen oder Gelenkinkongruenzen zu behandeln. Korrektive Osteotomien dienen der Wiederherstellung der normalen Funktionalität einer Gliedmaße (Fossum 2020). Ein spezifisches Anwendungsbeispiel für Osteotomien ist die chirurgische Behandlung der medialen tibiofemoralen Osteoarthritis (Gonarthrose). Hierbei wird unter anderem eine aufklappende Keilosteotomie der proximalen Tibia (opening wedge high tibial osteotomy) angewendet, um durch Entlastung des medialen Kompartments Schmerzen zu lindern oder sogar zu beseitigen (Jackson und Waugh 1961, Sarabia-Condes et al. 2007, Brosset et al. 2011).

1.5. Frakturheilung

Nach einem Knochenbruch findet ein länger andauernder komplexer Reparaturvorgang statt, der entweder als primäre oder sekundäre Frakturheilung erfolgen kann (Fossum 2020). Unter der sekundären Frakturheilung wird die natürliche Knochenbruchheilung verstanden, bei der ein Frakturkallus gebildet wird. Sie verläuft ausgehend vom Endost und Periost in vier Phasen. Zunächst wird in der ersten Phase der Entzündung das Frakturhämatom organisiert. Zellen wandern ein und bilden Granulationsgewebe. Dieses Bindegewebe differenziert sich in der zweiten Phase zum weichen Kallus bzw. Knorpelkallus, der die Frakturenden bindegewebig überbrückt. Je instabiler eine Fraktur ist, desto größer wird der gebildete Kallus sein. Er differenziert sich weiter zum harten Kallus (Faserknorpel bzw. Geflechtknochen), welcher in der dritten Phase der

Mineralisation kalzifiziert und somit die Frakturenden knöchern überbrückt. In der vierten Phase findet das Remodeling (Remodellierung) statt. Der Geflechtknochen wird hierbei resorbiert und letztendlich zu Lamellenknochen rückgebaut. Diese Phase kann Monate bis Jahre andauern (Dietz und Litzke 2003, Salomon et al. 2015).

Bei der primären Frakturheilung entsteht kein Kallus. Sie findet nur bei einer minimalen Frakturspaltgröße statt oder wenn durch Osteosynthese eine absolute mechanische Stabilität hergestellt wurde (Salomon et al. 2015). Hierbei schließt sich nach der ersten Phase der Entzündung direkt die Phase der Remodellierung an. Im Gegensatz zur sekundären Frakturheilung mit Kallusbildung dauert die primäre Knochenheilung meist nur vier bis acht Wochen (Dietz und Litzke 2003).

1.6. Critical-size-Defekt

Ein Critical-size-Defekt (CSD) wird beschrieben als ein Defekt, welcher nicht spontan innerhalb der Dauer eines Experiments bzw. der Lebensdauer eines Tieres (Hollinger und Kleinschmidt 1990, Anderson et al. 1999) ausheilt oder welcher ohne medizinische Intervention nicht ausheilen wird (ASTM 2014). Eine weitere Definition eines solchen Defekts ist die segmentale Ausdehnung vom zwei- bis dreifachen Diaphysendurchmesser bzw. bei nichtsegmentalen Defekten der Umfangsverlust von über 50 % des Knochens (Sehmisch 2023). In der Literatur besteht nach wie vor Uneinigkeit über die genaue Definition und Größe eines CSD (Schemitsch 2017). Solche großen Defekte können beispielsweise durch Traumata oder durch die Resektion von Knochen infolge von Infektionen oder Tumoren entstehen (Pilia et al. 2013, Kheirallah und Almeshaly 2016). Häufig kommt es hierbei zum Einwachsen von fibrösem Gewebe, Faserknorpel oder hyalinem Knorpel in den Defekt, was in einer mechanisch instabilen Pseudarthrose resultiert (Panteli et al. 2015).

2. Knochenersatzmaterialien

Größere Knochendefekte können den Einsatz von Knochenersatzmaterialien (KEMs) erforderlich machen (Fossum 2020). Hierbei werden sowohl natürliche (Knochentransplantate), als auch synthetische (alloplastische) Materialien verwendet (Kheirallah und Almeshaly 2016). Da autologe Knochentransplantate aktuell als Goldstandard für die Versorgung von Knochendefekten zählen

(Heinemann et al. 2011, Campana et al. 2014, Scaglione et al. 2014), sind die Anforderungen an alloplastische KEMs hinsichtlich ihrer biologischen, mechanischen und morphologischen Eigenschaften sehr hoch (Kheirallah und Almeshaly 2016, Fernandez de Grado et al. 2018).

2.1. Eigenschaften

Grundsätzlich sollte ein KEM eine gute Biokompatibilität aufweisen. Das bedeutet, dass das Material keine immunogenen oder toxischen Nebenwirkungen hervorruft und somit gewebeverträglich ist (Schnürer et al. 2003).

KEMs sollten für die Regeneration des Knochens vier Eigenschaften erfüllen: Osteokonduktion, Osteoinduktion, Osseointegration und Osteogenese (Kheirallah und Almeshaly 2016). Die Osteokonduktion ermöglicht das Einwachsen von Knochengewebe durch einen Leitschieneneffekt, Osteoinduktion beinhaltet die Stimulation von Osteoprogenitorzellen sich zu Osteoblasten zu differenzieren, Osseointegration bezeichnet die direkte Verbindung zwischen dem KEM und dem umgebenden Knochengewebe und Osteogenese ist die Knochenneubildung innerhalb des Knochenersatzmaterials (Kheirallah und Almeshaly 2016).

Eine weitere wichtige Eigenschaft für ein KEM ist die interkonnektierende Porosität. Die Porengröße beträgt in kortikalem Knochen 10 – 100 µm und in trabekulärem Knochen 200 – 600 µm (LeGeros 2002, LeGeros 2008). Die Porosität von Scaffolds hat großen Einfluss auf die Vaskularisation, die Diffusion von Nährstoffen und Zellen und das Einwachsen von Knochengewebe (LeGeros 2008). Nur bei gewissen Porengrößen bzw. -volumina kann eine Durchdringung des Materials mit neuem Knochengewebe erfolgen. Sind die Poren kleiner, kann neues Knochengewebe nur anwachsen (Schnürer et al. 2003). Für eine gute Osteokonduktion und optimales Knocheneinwachsverhalten wird eine Porengröße zwischen 150 und 500 µm empfohlen (Truumees und Herkowitz 1999, Karageorgiou und Kaplan 2005, Julmi et al. 2019).

KEMs lassen sich in resorbierbare und nicht resorbierbare Materialien unterteilen (Claes 1992, Bohner 2010). Resorbierbare KEMs haben den Vorteil, dass die Notwendigkeit einer zweiten Operation zur Entfernung des Materials, um allergische oder Fremdkörperreaktionen zu vermeiden bzw. zu behandeln, entfällt (Claes 1992). Der Nachteil liegt darin, dass die Resorptionsgeschwindigkeit nur bedingt von den morphologischen und physikalischen Eigenschaften des Materials

beeinflusst werden kann und von verschiedenen individuellen Faktoren abhängt, wie beispielsweise dem Alter des Patienten, der Lokalisation und der Belastung. Dadurch lässt sie sich nicht genau prognostizieren (Williams 1992, Reindl 2012).

Im Idealfall gewährleistet ein Knochenersatzstoff, abhängig vom Implantationsort, eine gewisse temporäre mechanische Stabilität, während er gleichzeitig durch neu aufgebauten Knochen ersetzt wird (Bohner 2010, Schröter et al. 2020).

2.2. Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphat-Basis

Die häufige Verwendung CaP-basierter Materialien als Knochenersatz liegt an ihrer Ähnlichkeit zur mineralischen Phase von Knochen, da 60-70 % des Trockengewichts der Knochenmineralphase aus CaP bestehen (Linhart et al. 2004). KEMs aus CaP sind je nach Zusammensetzung biokompatibel, abbaubar, bioaktiv und osteokonduktiv (LeGeros 2008). Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften bezüglich der Knochenregeneration werden sie u. a. in Form von Scaffold-Beschichtungen (Surmenev et al. 2014, Witting et al. 2020, Schmidt et al. 2022) verwendet, um die Oberflächenkompatibilität mit umgebendem Knochen zu verbessern, oder sie werden als eigenständige KEMs genutzt (Bohner 2000, LeGeros 2002). CaP-basierte Materialien sind jedoch häufig sehr spröde und weisen daher eine geringe mechanische Stabilität auf, sodass sie sich nur für unbelastete Defekte eignen (Schnürer et al. 2003, Ambard und Mueninghoff 2006).

Keramiken, welche als KEM verwendet werden, ähneln dem Knochen-Apatit und basieren auf den Substanzen Hydroxylapatit ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$, HA) und Tricalciumphosphat ($Ca_3(PO_4)_2$, TCP). Pulverförmige Ausgangsstoffe werden hierbei durch einen Hochtemperatursinterungsprozess (1000 – 1500 °C) keramisiert (Schnürer et al. 2003). HA-Keramiken, welche aus biologischen Materialien gewonnen oder synthetisch hergestellt werden können, werden im Vergleich zu TCP *in vivo* sehr langsam bis gar nicht abgebaut (Bohner 2000, Schnürer et al. 2003, Ambard und Mueninghoff 2006). TCP-Keramiken werden sowohl in ihrer Hochtemperaturphase α-TCP als auch in der Niedrigtemperaturphase β-TCP genutzt (Chow 2001, LeGeros 2001, Johannes et al. 2006). β-TCP ist bei Raumtemperatur die stabilere Phase (Dorozhkin und Epple 2002).

2.2.1. Calciumphosphat-Zemente

Calciumphosphat-Zemente (CPCs) sind anorganische KEMs und werden häufig genutzt, um Defekte aufzufüllen. Die ersten hydraulischen CPCs wurden in den

1980er Jahren von Brown und Chow entwickelt (Brown und Chow 1985). Sie zählen zu den Niedrigtemperaturcalciumphosphaten, wohingegen CaP-Keramiken aufgrund des Sinterprozesses zu den Hochtemperaturcalciumphosphaten gehören (Linhart et al. 2004). Es handelt sich bei CaP-Zementen um Zwei- oder Dreikomponentensysteme, welche aus Pulverkomponenten und einer wässrigen Lösung bestehen. Beim Mischen lösen sich die Calciumphosphate auf und fallen als weniger lösliche CaP-Verbindungen aus, wobei sich die CaP-Kristalle verzahnen und der Zement hierdurch mechanische Festigkeit erhält (Bohner 2000). Somit entstehen applizierbare selbsthärtende Pasten, wobei durch den pH-Wert des Reaktionsgemisches, die Verarbeitungs- und Aushärtungstemperatur, sowie die Partikelgröße der Ausgangsstoffe die Art des Sedimentationsprodukts bestimmt wird (Ferna et al. 1999, Chow 2001, Schnürer et al. 2003). Durch den in der Praxis unvollständigen Umsatz der Ausgangsstoffe, besteht das Fällungsprodukt oft aus einer Mischung des neu gebildeten Sedimentationsproduktes und den Ausgangsstoffen (Schnürer et al. 2003). CPCs können je nach pH-Wert der Paste während des Abbindens in Apatit- und Bruschit-Zemente unterteilt werden. Oberhalb eines pH-Wertes von 4,2 entstehen nanokristalliner HA oder Calcium-defizitärer HA (CDHA), wohingegen darunter Bruschit ($CaHPO_4 \cdot 2\ H_2O$, Dicalciumphosphat-Dihydrat, DCPD) gebildet wird (Bohner 2000, Gbureck et al. 2003, Dorozhkin 2008). Bruschit entsteht durch Vermengen des Zementeduktes β-TCP mit dem sauren Monocalciumphosphat-Monohydrat (MCPM) oder mit Phosphorsäure (H_3PO_4, PA) (Bohner 2000, Dorozhkin 2008, Bengel 2019). HA ist zwar mechanisch stabiler als Bruschit, weist jedoch sehr lange Abbindezeiten auf und ist auch in Bezug auf Resorbierbarkeit Bruschit unterlegen, da dieses im Gegensatz zu Apatit nicht nur durch Osteoklasten resorbiert wird, sondern auch eine physiochemische Löslichkeit aufweist (Tamimi et al. 2012, Sheikh et al. 2015, Ostrowski et al. 2016). *In vivo* wird Bruschit teilweise zu Apatit umgewandelt, was sein Resorptionspotenzial verringert. Diese Umwandlung kann durch Zugabe von Mg-Salzen reduziert werden (Constantz et al. 1998, Penel et al. 1999, Bohner et al. 2003, Bohner et al. 2005). CPCs haben eine geringe mechanische Stabilität. Ihre Zugfestigkeit liegt bei 1-10 MPa, ihre Druckfestigkeit bei 10-100 MPa, wodurch die Verwendung von CPCs nur zusammen mit Metallimplantaten oder in unbelasteten Defekten möglich ist (Bohner 2000).

2.2.2. Magnesiumphosphat-Zemente

Magnesiumphosphate treten in physiologisch oder pathologisch mineralisierten Geweben auf, wie zum Beispiel in Speicheldrüsensteinen, Zahnstein (Whitlockit) oder in Nieren- oder Blasensteinen (Newberyit und Struvit) (Burstein et al. 1979, Miano et al. 2007, Breu und Müller 2022). Im Gegensatz zur *in-vivo*-Korrosion von Mg-Legierungen, bei der Wasserstoffgas und ein alkalisches Milieu entstehen können, kommt es beim Abbau von MgP lediglich zu einer Freisetzung von Mg^{2+}- und Hydrogenphosphat-Ionen, welche biokompatibel sind (Staiger et al. 2006, Walker et al. 2014, Nabiyouni et al. 2018). MgP-Zemente (MPCs) stellen eine Alternative zu CPCs dar und werden seit den 1990er Jahren immer mehr erforscht (Klammert et al. 2010, Tamimi et al. 2011, Ostrowski et al. 2015, Bavya Devi et al. 2022). Sie weisen gegenüber CPCs eine höhere initiale Festigkeit (Mestres und Ginebra 2011) sowie eine schnellere Degradation aufgrund ihrer höheren *in-vivo*-Löslichkeit auf, sind ebenfalls biokompatibel und wirken osteoinduktiv (Bavya Devi et al. 2022). Mg^{2+}-Ionen sind in der Lage, die Osteoblastenproliferation zu fördern sowie die Osteoklastenbildung zu reduzieren, wodurch das Einwachsen von neuem Knochen positiv beeinflusst werden kann (Ostrowski et al. 2015, Wu et al. 2015). Im Vergleich zu Bruschit-Zementen verhindern Mg^{2+}-Ionen eine Rekristallisation in schwerlösliche Mineralphasen wie Apatit (Nabiyouni et al. 2018, Bavya Devi et al. 2022). Ausgangsstoffe für MPCs sind meist Magnesiumoxid (MgO) oder Farringtonit ($Mg_3(PO_4)_2$) und eine Phosphatsalzlösung wie Phosphorsäure (PA), Monoammoniumhydrogenphosphat (MAHP), Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP), Dinatriumhydrogenphosphat (DNaHP) und Dikaliumhydrogenphosphat (DKHP) (Ostrowski et al. 2016). In Verbindung mit Ammoniumionen entsteht Struvit ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) (Ewald et al. 2019), mit Phosphaten bzw. PA wird Newberyit ($MgHPO_4 \cdot 3H_2O$) gebildet (Klammert et al. 2010). Ähnlich wie CPCs sind MPCs, trotz ihrer hohen initialen Festigkeit (bis zu 85 MPa), aufgrund ihrer Sprödigkeit, geringen Zug- und Torsionsfestigkeit und ihrer sehr schnellen Degradation nicht für lasttragende Knochendefekte geeignet (Ostrowski et al. 2016).

2.2.3. Calcium-Magnesiumphosphat-Zemente

Um die Eigenschaften der gut erforschten CPCs mit den verbesserten Eigenschaften von MPCs zu vereinen, wurden Calcium-Magnesiumphosphat-Zemente (CMPCs) entwickelt (Nabiyouni et al. 2018). Zur Herstellung, die erstmals 1994 beschrieben

wurde, können gesinterte, gemahlene Rohpulver aus CPCs und MPCs miteinander vermischt werden (Ginebra et al. 1994, Nabiyouni et al. 2018). Um Entmischungen aufgrund unterschiedlicher Partikelgrößen oder während des Transportes zu vermeiden, wurden Untersuchungen mit einem einheitlichen Ausgangspulver (CaMgP) durchgeführt (Vorndran et al. 2011a). Hierbei wurden CaMgP-Pulver mit der Formel $Ca_xMg_{(3-x)}(PO_4)_2$ mit $0 < x < 1{,}5$ durch Erhitzen bestimmter Ausgangsstoffe synthetisiert und mit DAHP zu einer Paste vermischt. Bei niedrigem Ca-Gehalt bestanden die gesinterten Pulver aus Farringtonit ($Mg_3(PO_4)_2$), mit zunehmendem Ca-Anteil wurde zudem Stanfieldit ($Ca_4Mg_5(PO_4)_6$) gebildet. Die Abbindeprodukte bestanden überwiegend aus Struvit, mit Anteilen von Newberyit (bei hohem Mg-Gehalt) oder Bruschit (bei hohem Ca-Gehalt). Bei Kultivierung von osteoblastenähnlichen Zellen auf den hergestellten Materialien zeigte $Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO_4)_2$ die beste Zellproliferation (Vorndran et al. 2011a). Bisher konnte in verschiedenen Studien die Überlegenheit von CMPCs gegenüber reinen CPCs oder MPCs dargestellt werden. In einer *in-vitro*-Studie von Wu et al. (2008a) wurden injizierbare Pasten aus CPCs, MPCs sowie CMPCs untersucht. Es wurde beobachtet, dass CMPCs eine hohe initiale Druckfestigkeit (47 MPa nach 48 h Aushärtung) aufwiesen und langsamer degradierten als reine MPCs, jedoch schneller als reine CPCs. Zudem wurde *in vitro* beobachtet, dass CMPCs im Vergleich zu reinen CPCs eine kürzere Abbindezeit und höhere Druckfestigkeiten und mit zunehmendem MPC-Anteil eine schnellere Degradationsrate aufwiesen (Wu et al. 2008b). In derselben Studie wurde festgestellt, dass CMPCs die Zellanhaftung und Proliferation von MG-63-Zellen (osteoblastenähnliche Zellen) unterstützten, wobei sie eine signifikant höhere Proliferationsrate als reine CPCs und MPCs zeigten. Wu et al. (2008b) untersuchten CMPCs ebenfalls in einer *in-vivo*-Studie im unbelasteten Defektmodell am Kaninchen, welche zeigte, dass CMPCs biokompatibel sind, verglichen mit reinen CPCs und MPCs eine schnellere und gesteigerte Osteogenese induzierten und schnell degradierten. Auch in einer weiteren *in-vivo*-Studie im nichtlasttragenden Bohrlochdefekt konnte nachgewiesen werden, dass 3D-pulvergedruckte CMPCs eine hervorragende Biokompatibilität zeigten und nach 24 Wochen im Vergleich zu langsam degradierendem TCP fast vollständig abgebaut waren und durch neuen Knochen ersetzt wurden (Kowalewicz et al. 2022).

3. Applikationsformen von Knochenersatzzementen

3.1. Granulate

Granulate werden häufig im Rahmen der Knochenaugmentation (Knochenaufbau) in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie wie z.B. bei einer Sinusbodenelevation (Sinuslift) verwendet (Starch-Jensen und Jensen 2017). Sie sind als Medizinprodukte im Handel verfügbar und basieren meist auf HA, β-TCP oder biphasischen Mischungen aus beiden (Moseke et al. 2012, Fuchs et al. 2021). Die Form und Größe der Granulate sind ein wichtiger Faktor. Bei Herstellungsmethoden wie dem Mahlen von Zementmonolithen sind die einzelnen Granulatpartikel oft scharfkantig. Dies kann entzündungsfördernd und gewebereizend wirken und bei Eingriffen wie einer Sinusbodenelevation das Risiko einer Perforation der Sinusmembran erhöhen (Moseke et al. 2012, Fuchs et al. 2021). In verschiedenen Studien wurden Granulate durch Dispersion einer hydrophilen Zementpaste in einer hydrophoben Flüssigkeit (z. B. Öl) mittels Rühren und Stabilisieren der Dispersion durch Tenside hergestellt, woraus kugelförmige Granulate in einer klinisch relevanten Größe zwischen 200 und 1000 µm entstanden (Moseke et al. 2012, Christel et al. 2014, Fuchs et al. 2021). Der Vorteil besteht in der verbesserten Injektionsfähigkeit und einer beschleunigten Heilung im Körper (Misiek et al. 1984, Oliveira et al. 2008, Christel et al. 2014). Eine weitere Herstellungstechnik basiert auf dem Vermischen von präzipitiertem HA und Chitosan. Hierbei härtet das Granulat nach Beginn des Emulgierprozesses durch Zugabe eines Vernetzungsmittels aus, was ebenfalls zu einer Partikelgröße von 212 bis 1000 µm führt (Paul und Sharma 1999). Zementgranulate eignen sich aufgrund ihrer Morphologie für kompliziertere oder schwer zugängliche Defekte, bieten jedoch nicht genügend mechanische Stabilität für lasttragende Defekte (Peters et al. 2006). Zudem kann bei Granulaten kein vollständiger Kontakt zum umgebenden Knochen gewährleistet werden, welcher essenziell für eine komplette und erfolgreiche Knochenregeneration ist (Peters et al. 2006).

3.2. Pasten

Für die Verwendung von Zementpasten während eines operativen Eingriffes ist es essenziell, dass die Pasten injektionsfähig und kohärent sind (Bohner 2000). Injektionsfähigkeit bezeichnet die Eigenschaft einer Paste, ohne Entmischung durch eine dünne und lange Kanüle extrudiert zu werden. Zu einer Entmischung

kann es kommen, wenn die Mischflüssigkeit im Vergleich zur Partikelgröße zu flüssig ist. Dies hat eine Filterpressung zur Folge, wodurch die Flüssigkeit ohne Partikel herausgedrückt wird (Bohner 2000). Kohäsion bezeichnet die Fähigkeit der Zementpaste in einer Flüssigkeit auszuhärten, ohne zu zerfallen. Dies kann durch eine hohe Viskosität erreicht werden und ist wichtig, da durch den Zerfall des Zements Entzündungsreaktionen hervorgerufen werden können (Miyamoto et al. 1999, Bohner 2000). Zementpasten sind für die Anwendung bei Knochendefekten vorteilhaft, da sie formbar und an den Defekt anpassbar sind. Sie härten aus, indem sich die ausgefallenen Kristalle verzahnen und einen Formkörper bilden (Heinemann et al. 2011). Ein Nachteil herkömmlicher Zementpasten besteht darin, dass die Abbindereaktion direkt nach dem Anmischen der wässrigen und pulverförmigen Phase startet, sodass die dem Chirurgen zur Verfügung stehende Bearbeitungszeit limitiert ist (Bengel 2019). Zudem kann es in Abhängigkeit vom jeweiligen Anwender zu einer inhomogenen Vermischung der Phasen kommen, wodurch Qualitätsschwankungen auftreten können (Ginebra et al. 2010, Heinemann et al. 2013). Daher wurden präfabrizierte Zementpasten entwickelt, welche nicht erst angemischt werden müssen. Sie sollen erst im Defekt aushärten, wodurch sich die Operationsdauer verkürzt (Heinemann et al. 2013, Bengel 2019). Diese präfabrizierten Zementpasten können hergestellt werden, indem die verschiedenen CaP-Reaktanden als getrennte flüssige oder pastöse Komponenten stabilisiert werden. Hierbei muss mindestens eine von ihnen eine wässrige Flüssigkeit enthalten, um die Abbindereaktion nach dem Mischen der Komponenten einzuleiten (LeMaitre et al. 2008). Diese schnelle und reproduzierbare Herstellungsart ermöglicht eine homogene Vermischung durch die Verwendung einer Zweikammerspritze, sodass die Handhabung vereinfacht und das Kontaminationsrisiko gesenkt wird (Heinemann et al. 2013, Vorndran et al. 2013). Eine weitere Herstellungsmethode ist die Verwendung nichtwässriger, aber mit Wasser mischbarer Flüssigkeiten wie beispielsweise Glycerin oder Polypropylenglykol (Takagi et al. 2003, Carey et al. 2005). Hierbei härtet die Paste erst bei Einbringen in den Defekt aus, sobald sie mit Körperflüssigkeit in Kontakt kommt, sodass die Paste bis zur OP aufbewahrt werden und dann direkt ohne vorheriges Mischen genutzt werden kann (Ginebra et al. 2010). Zur Verbesserung der Waschbeständigkeit der Zemente und somit auch der Kohäsion, wurde in mehreren Studien der Zusatz verschiedener Geliermittel wie Natriumalginat, Weinsäure, Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und Chitosanmalat

untersucht, da diese Verbindungen zudem Biopolymere sind und Eigenschaften wie Biokompatibilität, Abbaubarkeit und Osteokonduktivität aufweisen (Takagi et al. 2003, Ginebra et al. 2010).

3.3. 3D-pulvergedruckte Scaffolds

3D-gedruckte Scaffolds ermöglichen die passgenaue Anwendung als individualisierte Scaffolds bei spezifischen Defekten. Sie sollen im Idealfall die Struktur und Funktion des zu ersetzenden Gewebes wiederherstellen bzw. nachahmen, bis neuer Knochen nachgebildet ist (Trombetta et al. 2017, Turnbull et al. 2018). Hierzu dienen additive Fertigungsverfahren, weitgehend auch als 3D-Druck bezeichnet, um Scaffolds nach den gewünschten Eigenschaften herzustellen (Akkineni et al. 2015). Diese Verfahren ermöglichen es zudem, biologische Komponenten wie Zellen, Wachstumsfaktoren oder Arzneimittel zu integrieren, sodass die Scaffolds patientenspezifisch präpariert werden können (Akkineni et al. 2015). Das Prinzip additiver Fertigungsverfahren beruht auf der Freiform-Herstellung (Solid Free-Form Fabrication, SFF) bzw. dem Rapid Prototyping (RP) zur Herstellung von komplexen 3D-Strukturen, welche Schicht für Schicht in einem computergestützten Design- und Fertigungsprozess (Computer Aided Design, CAD) aufgebaut werden (Hutmacher et al. 2004). Ein Vorteil der RP-Verfahren gegenüber herkömmlichen Keramikbearbeitungsmethoden besteht darin, dass sie die Herstellung von patientenspezifischen Scaffolds anhand von Computertomographiedaten ermöglichen. Dies ist besonders bei großen oder geometrisch komplexen Defekten vorteilhaft, da die Scaffolds mit hoher Dimensionsgenauigkeit hergestellt werden können, wodurch eine optimale Scaffoldintegration in den Defekt gewährleistet wird (Vorndran et al. 2008, Castilho et al. 2014). Es gibt direkte und indirekte RP-Verfahren. Eine Form des 3D-Drucks ist der 3D-Pulverdruck (3DP), welcher zu den direkten RP-Verfahren zählt, um Biokeramiken herzustellen (Vorndran et al. 2008). Hierbei wird eine organische oder anorganische Bindemittelflüssigkeit lokal auf dünne Pulverschichten aufgesprüht und bindet die Keramikpartikel durch Adhäsionskräfte oder eine hydraulische Abbindereaktion. Danach wird eine dünne Pulverschicht aufgetragen und der Vorgang wiederholt, sodass schichtweise ein 3D-Scaffold entsteht (Vorndran et al. 2008, Vorndran et al. 2015). 3D-gedruckte Scaffolds zeichnen sich durch eine hohe Mikroporosität (bis zu über 30 Vol.-%) aus, welche aus den Hohlräumen zwischen den Pulverpartikeln resultiert und die

Nährstoffdiffusion, sowie das Zelleinwachsen und die Vaskularisation unterstützt (Karageorgiou und Kaplan 2005, Castilho et al. 2014). Durch die Einstellbarkeit der äußeren Struktur sowie der Makroporosität im Bereich von wenigen 100 µm können die Eigenschaften wie Form, mechanische Stabilität und biologisches Verhalten optimal an das zu ersetzende Gewebe angepasst werden (Castilho et al. 2014). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, Scaffolds bei Raumtemperatur anzufertigen, wodurch organische, biologisch aktive oder hydratisierte Moleküle in das Implantat eingebaut werden können (Klammert et al. 2010, Vorndran et al. 2015). Diese Herstellungsart eignet sich für die Verarbeitung von Knochenersatzstoffen auf Basis von CPCs, MPCs oder CMPCs, welche bisher sowohl *in vitro* (Klammert et al. 2010, Castilho et al. 2014, Meininger et al. 2019, Gefel et al. 2022) als auch *in vivo* (Kowalewicz et al. 2021, Kowalewicz et al. 2022) hervorragende Biokompatibilität, geeignetes Degradationsverhalten sowie Osteokonduktivität und zum Teil sogar Osteoinduktion (Habibovic et al. 2008) zeigten.

4. Untersuchungsmethoden von Knochenersatzmaterialien

4.1. Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographie (µCT) ist eine Weiterentwicklung der herkömmlichen Computertomographie (CT) mit höherer Ortsauflösung, wurde 1989 erstmals von Feldkamp et al. (1989) beschrieben und ist für die Analyse dreidimensionaler Knochenstrukturen geeignet. Die µCT erlaubt detaillierte Untersuchungen der trabekulären Mikroarchitektur von Knochen mit Auflösungen im µm-Bereich (Bag et al. 2010). Mittels µCT können nach vorheriger Festlegung einer Region of Interest (ROI) verschiedene Parameter wie z. B. Knochenvolumen (BV), Knochenmineralgehalt (BMC), Knochenmineraldichte (BMD), Knochenvolumenanteil (BVF), Knochenvolumen/Gewebevolumen (BV/TV), Knochenoberfläche (BS), Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelanzahl (Tb.N) und Trabekelabstand (Tb.Sp) abgeleitet werden (Bouxsein et al. 2010). Da die µCT-Untersuchung nicht-invasiv, nicht-traumatisch und reproduzierbar ist, eignet sie sich hervorragend für *in-vivo*-Verlaufskontrollen von Knochenveränderungen und Degradations- sowie Osseointegrationsstudien verschiedener Implantate bei kleineren Labortieren (Xu et al. 2018, Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020, Kowalewicz et al. 2022, Schmidt et al. 2022). Das µCT wird

zudem auch in anderen präklinischen Bereichen wie z. B. der onkologischen Grundlagenforschung zur Quantifizierung von Knochenmetastasen oder im Rahmen einer angiografischen Untersuchung *in vivo* verwendet (Bag et al. 2010).

4.2. Histologische Untersuchung

Die Biokompatibilität von KEMs kann mithilfe der histologischen Untersuchung evaluiert werden (Jansen et al. 1994, Nuss und von Rechenberg 2008). Hierbei können verschiedene Parameter wie z. B. Degradation, Osseointegration, Vaskularisation, fibröse Kapselbildung, sowie Fremdkörperreaktionen beurteilt werden. Knochengewebe ist durch die Einlagerung von Mineralsalzen sehr hart, was die histologische Aufbereitung früher sehr erschwerte (Schäfer 2011, Romeis 2019). So konnten entweder Schliffpräparate uneingebetteter Hartgewebe unter Verlust von zellulären Details untersucht werden oder Hartgewebe mussten zunächst demineralisiert (entkalkt) werden (Schäfer 2011). Bei der vorherigen Entkalkung wird der Mineralgehalt von Knochenproben durch Zugabe von Säuren reduziert, so dass hierdurch der Schneideprozess erleichtert wird (Lang 2012). Die entkalkten Proben werden schrittweise dehydriert, anschließend mit Paraffin infiltriert und können dann mithilfe von verschiedenen Mikrotomarten zugeschnitten werden (Romeis 2019). Für Analysen von KEMs und der Reaktion des Knochengewebes benötigt man die organischen und anorganischen Komponenten des Knochengewebes, daher verwendet man hierfür unentkalkte Proben (Lang 2012). Um diese herzustellen, gibt es verschiedene Methoden. Eine davon ist die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath, wodurch zunächst 100–150 µm dicke Schnitte hergestellt werden, die anschließend mit einer Schleifmaschine zu Schliffen mit einer Dicke von 5–10 µm verarbeitet werden können. Somit können Knochen mit Metall- bzw. Keramikimplantaten oder Zähne, die ansonsten nicht mit einem Mikrotom schneidbar wären, evaluiert werden (Donath und Breuner 1982). Bei dieser Methode werden die Knochenproben nach der Fixation und Entwässerung in das Kunstharz Methylmetacrylat (MMA) eingebettet, danach wird der Kunstharzblock auf einem Objektträger fixiert, mit einer Diamantbandsäge abgetrennt und geschliffen (Lang 2012). Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie sehr zeitaufwändig ist und ein hoher Materialverlust entsteht (An und Martin 2003, Schäfer 2011). Ausgehärtete Kunstharzblöcke können auch mittels Hartschliff-Mikrotom geschnitten werden, dabei besteht jedoch die Gefahr, dass das KEM aus dem Knochenverbund herausbricht (Willbold und Witte 2010).

Zur histologischen Untersuchung von Knochenpräparaten gibt es verschiedene mögliche Färbungen: Hämatoxylin-Eosin, Masson-Goldner-Trichrom, Giemsa, von-Kossa oder Toluidinblau (Lang 2012). Die Färbung mit Toluidinblau ist unkompliziert und standardisierbar (Lang 2012). Toluidinblau O zählt zu den Thiazinfarbstoffen, welche Zellkerne in einem kräftigen Blau färben (Romeis 2019). Es eignet sich für die Darstellung der Metachromasie in histologischen Schnitten. Metachromasie ist ein Färbeverhalten, das durch eine abweichende Farbgebung als die des verwendeten Farbstoffs gekennzeichnet ist (Lang 2012, Romeis 2019). Dabei färben sich beispielsweise Knorpelmatrix und frühe Wundheilungsareale metachromatisch rotviolett an, wohingegen sich Zellen, Zellkerne, Osteoid, Kollagen und mineralisiertes Hartgewebe orthochromatisch unterschiedlich blau anfärben (Romeis 2019). Durch diese Eigenschaften eignet sich die Toluidinblau-Färbung sehr gut als Übersichtsfärbung und ermöglicht eine Differenzierung von Zellen und Gewebe (Lang 2012). Man unterscheidet bei der histologischen Analyse zwischen deskriptiven Methoden und der quantitativen Histomorphometrie (An und Martin 2003). Die deskriptive Evaluation fokussiert sich auf das Scaffold und dessen Umgebung, sowie den Scaffold-Knochen-Übergangsbereich (Interface). Hierfür werden anhand verschiedener semiquantitativer Scoring-Systeme in diesen Bereichen verschiedene Zell- und Gewebetypen wie Knochenzellen, Entzündungszellen, Blutgefäße, Bindegewebe, Scaffold-Knochen-Kontaktstellen und Fremdkörperreaktionen untersucht (Jansen et al. 1994, An und Martin 2003, Lalk et al. 2013).

4.3. Histomorphometrie

Die Histomorphometrie dient der quantitativen Datenerfassung von bestimmten, nach Parfitt et al. (1987) festgesetzten Parametern. Hierbei können mithilfe von automatischen Bildanalysen und unterschiedlichen Softwaresystemen an zweidimensionalen histologischen Schnitten u. a. Fläche, Länge, Abstand oder Anzahl von bestimmten Komponenten analysiert werden (Parfitt et al. 1987, Schäfer 2011). Materialien und Gewebearten müssen bei dieser Methode anhand ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens eindeutig voneinander differenziert werden können, zudem sollten sie für eine zuverlässige Unterscheidung möglichst artefaktfrei sein (Bockholdt 2005, Bartels 2011, Lang 2012). Mithilfe histomorphometrischer Messungen lassen sich hinsichtlich der Beurteilung von KEMs beispielsweise die prozentualen Flächenanteile von Scaffold, Knochen-

sowie Knorpelgewebe, Gas und Osteoid berechnen, wodurch Scaffolddegradation, Reaktion des umgebenden Gewebes und Osteogenese evaluiert werden können (Kowalewicz et al. 2022, Schmidt et al. 2022).

4.4. REM- und EDX-Analyse

Mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) können Oberflächen sehr scharf dargestellt und untersucht werden. Dabei wird das zu untersuchende Präparat mit einem gebündelten Elektronenstrahl zeilenförmig abgetastet (gerastert) und durch Rückstreuelektronen ein entsprechendes Bild erzeugt (Welsch et al. 2022). Das REM dient zur Analyse natürlicher oder synthetischer Oberflächen von Zellen, Organ- und Gewebeteilen, extrazellulären Fasern, Hartsubstanzen oder ganzen Tieren (Welsch et al. 2022). Es eignet sich ebenfalls zur Untersuchung von Knochenersatzstoffen hinsichtlich ihrer Oberflächenstruktur und der Osseointegration (An und Martin 2003, Kowalewicz et al. 2022, Schmidt et al. 2022).

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) ermöglicht eine Elementanalyse bezüglich der Zusammensetzung einer zu untersuchenden Probe anhand der von ihr emittierten Röntgenstrahlen (Scimeca et al. 2018). Dabei werden Atome der Probe durch Beschuss mit einem Elektronenstrahl angeregt und emittieren daraufhin elementcharakteristische Röntgenstrahlen, die anschließend detektiert werden können. Somit können bestimmte Bereiche der Probe auf ihre dortige Elementzusammensetzung analysiert werden (Scimeca et al. 2018).

Mithilfe von REM- und EDX-Analysen können KEMs hinsichtlich ihrer Materialzusammensetzung, Degradation, Osseointegration und Interaktion mit umliegendem Gewebe näher untersucht werden (Witte et al. 2005, Kowalewicz et al. 2022, Schmidt et al. 2022).

III. PUBLIKATION

Das Paper “In Vivo Investigation of 3D-Printed Calcium Magnesium Phosphate Wedges in Partial Load Defects” von Hemmerlein et al. wurde am 30.04.2024 zur Veröffentlichung im Special Issue „Bone Tissue Engineering Materials: From Preparation to Properties“ des Journals Materials (Basel) akzeptiert und am 02.05.2024 online publiziert.

In Vivo Investigation of 3D-Printed Calcium Magnesium Phosphate Wedges in Partial Load Defects

Elke Hemmerlein, Elke Vorndran, Anna-Maria Schmitt, Franziska Feichtner, Anja-Christina Waselau, Andrea Meyer-Lindenberg

Materials **2024**, *17*(9), 2136

DOI: 10.3390/ma17092136

materials

MDPI

Article

In Vivo Investigation of 3D-Printed Calcium Magnesium Phosphate Wedges in Partial Load Defects

Elke Hemmerlein [1,*], Elke Vorndran [2], Anna-Maria Schmitt [2], Franziska Feichtner [1], Anja-Christina Waselau [1] and Andrea Meyer-Lindenberg [1]

[1] Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig Maximilians University Munich, 80539 Munich, Germany; a.waselau@lmu.de (A.-C.W.); ameylin@lmu.de (A.M.-L.)
[2] Department for Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, 97070 Würzburg, Germany; anna-maria.schmitt@meduniwien.ac.at (A.-M.S.)
* Correspondence: elke.hemmerlein@chir.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract: Bone substitutes are ideally biocompatible, osteoconductive, degradable and defect-specific and provide mechanical stability. Magnesium phosphate cements (MPCs) offer high initial stability and faster degradation compared to the well-researched calcium phosphate cements (CPCs). Calcium magnesium phosphate cements (CMPCs) should combine the properties of both and have so far shown promising results. The present study aimed to investigate and compare the degradation and osseointegration behavior of 3D powder-printed wedges of CMPC and MPC in vivo. The wedges were post-treated with phosphoric acid (CMPC) and diammonium hydrogen phosphate (MPC) and implanted in a partially loaded defect model in the proximal rabbit tibia. The evaluation included clinical, in vivo µ-CT and X-ray examinations, histology, energy dispersive X-ray analysis (EDX) and scanning electron microscopy (SEM) for up to 30 weeks. SEM analysis revealed a zone of unreacted material in the MPC, indicating the need to optimize the manufacturing and post-treatment process. However, all materials showed excellent biocompatibility and mechanical stability. After 24 weeks, they were almost completely degraded. The slower degradation rate of the CMPC corresponded more favorably to the bone growth rate compared to the MPC. Due to the promising results of the CMPC in this study, it should be further investigated, for example in defect models with higher load.

Keywords: biocompatibility; material degradation; bone cements; calcium magnesium phosphate cements; 3D powder printing

check for updates

Citation: Hemmerlein, E.; Vorndran, E.; Schmitt, A.-M.; Feichtner, F.; Waselau, A.-C.; Meyer-Lindenberg, A. In Vivo Investigation of 3D-Printed Calcium Magnesium Phosphate Wedges in Partial Load Defects. *Materials* **2024**, *17*, 2136. https://doi.org/10.3390/ma17092136

Academic Editor: Jakub Szabelski

Received: 3 April 2024
Revised: 26 April 2024
Accepted: 30 April 2024
Published: 2 May 2024

Copyright: © 2024 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/).

1. Introduction

The treatment of larger, complex bone defects with bone substitutes is still a major challenge. Autografts and allografts are considered the gold standard for filling defects. However, these have certain disadvantages. The use of autografts is limited by complications such as donor-site pain or morbidity, prolonged operation time, increased blood loss and scarring. Also, there is only a limited amount that can be harvested [1–3]. Allografts are the most commonly used alternative to autografts, but they carry the risk of transmitting infection, graft fatigue fracture, non-union or immune rejection [2,3]. Synthetic bone graft substitutes have been developed to overcome these limitations. They offer unlimited availability, are inexpensive and can be produced individually and for specific defects due to their adjustable parameters such as shape, porosity or composition [1]. Additionally, they have a long shelf life, and the risk of disease transmission is avoided [1,3].

The ideal bone substitute is biocompatible, osteoconductive and degradable, being replaced by new bone tissue and ensuring mechanical stability at the same time [4]. The optimum degradation time for bone substitutes should coincide with the bone regeneration process. This requires the bone substitute to maintain its mechanical integrity and provide stability, especially during the early stages of bone healing. As bone tissue regenerates, the

bone substitute should gradually degrade to be replaced by newly formed bone [5]. The degradation rate is influenced by factors such as composition, shape and porosity of the bone substitute. Bone regeneration depends on several variables including the age and health of the individual, the implantation site, and the defect size [6–8]. Among the most commonly used clinical bone substitutes are calcium phosphate cements (CPCs), such as hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP), as they resemble the mineral phase of bone and are therefore characterized by excellent biocompatibility [9]. However, depending on the material, they very slowly or even hardly degrade in vivo and have so far only been used for non-load-bearing defects, as they are brittle and have low mechanical stability [10].

Magnesium phosphate cements (MPCs) have been increasingly researched in recent years as a possible alternative to CPCs [11]. These are characterized by a higher initial strength due to the magnesium substitution and degrade faster than pure CPCs due to their higher in vivo solubility. Magnesium (Mg) also has a favorable influence on bone metabolism [12,13]. The positive effect of released Mg ions on bone remodeling results in faster ingrowth of bone tissue, which has already been shown with scaffolds of different Mg alloys [14,15] and is also assumed for Mg-based cements [13,16]. Furthermore, in an in vitro study by Ostrowski et al. [17] in which amorphous (ATMP) and crystalline (CTMP) trimagnesium phosphate pellets were examined, it was described that Mg ions induce the mineralization of an amorphous, HA-like phosphate phase on the scaffold surface of ATMPs, which has a stimulating effect on the proliferation and activity of osteoblasts. However, the differentiation of monocytes into osteoclasts is inhibited, which leads to reduced bone resorption. In another in vitro study by Roy and Bose [18], Mg-doped β-TCP was investigated, and it was found that Mg significantly slows down osteoclastogenesis. MPCs have already been successfully tested in the form of cement pastes (struvite and K-struvite) in partially loaded large animal models [19,20].

Calcium magnesium phosphate cements (CMPCs) appear to have better biological properties than pure CPCs and MPCs due to a more favorable combination of mechanical stability and biocompatibility [11]. The magnesium component increases the chemical solubility, degradation rate, resorption and osteoconductivity [21,22]. So far, however, there is little research on the in vivo investigation of CMPCs. They have already been investigated in smaller, unloaded defect models, in which excellent biocompatibility, rapid degradation behavior and good osseointegration were observed [21,23,24].

CMPCs have been used in previous in vivo studies, including in the form of self-setting pastes [25], granules [16] and 3D powder-printed cylinders [23]. The advantage of 3D printing compared to conventional ceramic processing methods is that patient-specific scaffolds are produced based on computed tomography data, which is particularly beneficial for large and complex defects [26,27]. By adjusting the external structure and porosity, biological and mechanical properties can be adapted to the tissue being replaced [27]. Three-dimensional powder-printed scaffolds can be produced inexpensively and comparatively quickly and can be used immediately without waiting for the scaffold to set [28,29]. In addition, 3D powder-printed scaffolds offer a high microporosity that promotes the ingrowth of vessels, cells and nutrients by facilitating diffusion into the scaffold, which has a positive effect on osteogenesis [27,30]. The production method is suitable for processing bone substitutes based on CPCs, MPCs or CMPCs, which have shown excellent biocompatibility, favorable degradation behavior and osteoconductivity both in vitro [27,29,31] and in vivo [23,24].

CMPCs have so far only been investigated in unloaded defect models and showed excellent results in terms of biocompatibility, degradation and osseointegration. Their behavior in partially loaded bone is not yet known, which is why the aim of the present study was to investigate the degradation and osseointegration behavior and the stability of CMPCs compared to MPCs in a larger defect. For this purpose, wedge-shaped MPC and CMPC scaffolds were fabricated using 3D powder printing techniques and examined for the first time in a partially loaded, segmental defect model of the rabbit tibia in vivo over a period of 24 and 30 weeks.

2. Materials and Methods

2.1. Production and Characterization of the Scaffolds

2.1.1. Production of the Scaffolds

Due to excellent results, the production of the wedges is based on the studies by Kowalewicz et al. [23,24]. The 3D powder printing and post-treatment process followed a procedure similar to that of the study by Schaufler et al. [32]. By sintering (at 1100 °C for 5 h each) mixtures of calcium hydrogen phosphate ($CaHPO_4$, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), calcium carbonate ($CaCO_3$, Merck, Darmstadt, Germany), magnesium hydrogen phosphate ($MgHPO_4 \cdot 3H_2O$, Alfa Aesar, Kandel, Germany) and magnesium hydroxide ($Mg(OH)_2$, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), cement powders of the general chemical composition $Ca_xMg_{3-x}(PO_4)_2$ with x = 0 (MPC) and 0.75 (CMPC) were synthesized in corresponding molar ratios (Table 1).

Table 1. Chemical composition of cement raw powder mixtures in mol.

$Ca_xMg_{3-x}(PO_4)_2$	$CaHPO_4$	$CaCO_3$	$MgHPO_4\ 3H_2O$	$Mg(OH)_2$
x = 0.00	-	-	2.00	1.00
x = 0.75	0.50	0.25	1.50	0.75

The sinter cakes were then crushed using a mortar and pestle. In total, 125 g of each cement fragment was ground in a planetary ball mill (PM400 Retsch, Haan, Germany) in 500 mL zirconia beakers, each with 4 zirconia balls (Ø = 30 mm), at 200 rpm for 10 min. The ground cement powder was then sieved to a particle size <355 µm. For powder printing, the cement powder was homogeneously mixed with 4 wt% hydroxypropyl methylcellulose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 20 min in a plowshare mixer. The cement powders modified with cellulose served as the powder phase for 3D powder printing. Wedge-shaped scaffolds (n = 42) were produced using the 3D powder printer from ZCorp (Z310, Z-Corporation, Burlington, VT, USA). The base area of the wedge was 14.1 × 5.3 mm (l × w), with a height = 10.4 mm (Figure 1A).

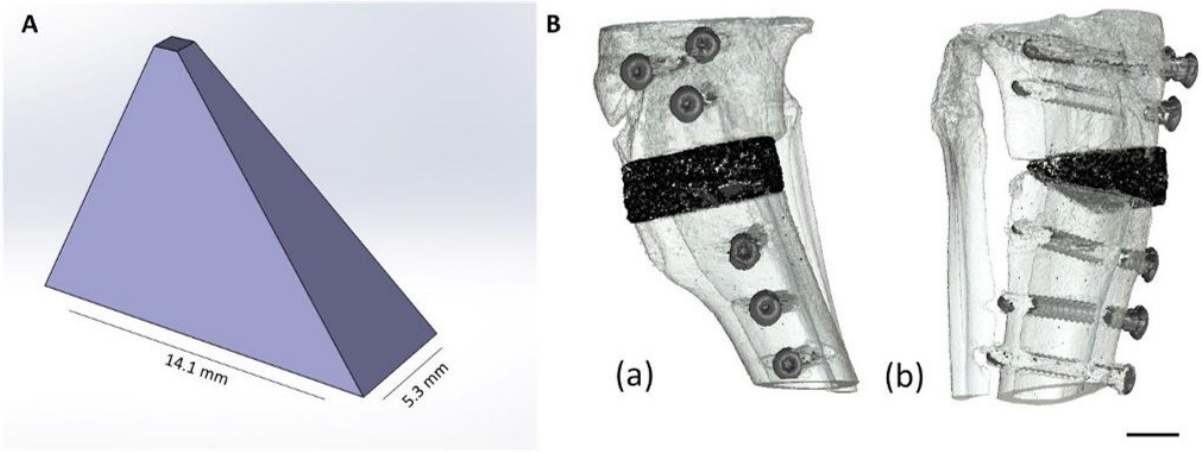

Figure 1. (**A**) A model of the wedge (SolidWorks, Dassault Systèmes SolidWorks Corp., Waltham, MA, USA): oblique view. (**B**) 3D reconstruction of the wedge (black) in the proximal rabbit tibia: (**a**) medial view; (**b**) craniolateral view. Scale bar = 5 mm.

Distilled degassed water was used as the printing solution. A layer thickness of 100 µm and a binder/volume ratio of 0.275 were selected for printing. The scaffolds were removed from the powder bed after a drying time of 1 h (room temperature) and de-dusted using compressed air. The organic phase was removed at 500 °C for 2 h. This was

followed by a further sintering phase of 4 h with a phase-dependent final sintering temperature. In the case of $Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO_4)_2$, sintering in the final phase took place at 1150 °C, while $Mg_3(PO_4)_2$ was sintered at 1200 °C. After the sintering process, scaffolds made of $Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO_4)_2$ were infiltrated four times with a 2 M H_3PO_4 solution (phosphoric acid) (1st infiltration: 150 µL, 2nd infiltration: 90 µL, 3rd infiltration: 65 µL, and 4th infiltration: 40 µL) so that the pore volume was completely filled. After each infiltration, the wedges were dried for 24 h at room temperature (RT). Scaffolds based on $Mg_3(PO_4)_2$ were aged for 24 h in a 3.5 M $(NH_4)_2HPO_4$ (diammonium hydrogen phosphate, DAHP) (Merck, Darmstadt, Germany) solution. The wedges were then air-dried at room temperature. Before implantation, all scaffolds were washed to achieve a neutral pH value. For this purpose, the wedges were placed in a Petri dish with a washing solution (3 mL of water/scaffold for 1 h, then phosphate-buffered saline (PBS; 8.0 g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4, 1.1 g Na_2HPO_4 and 0.2 g KCl in 1 l H_2O) for 15 min) and stored on a rocker table. After drying at room temperature, the scaffolds were individually wrapped and γ-sterilized with >25 kGy radiation (BBF Sterilization Service GmbH, Kernen, Germany).

2.1.2. Chemical Composition

The chemical composition of the scaffolds was determined using X-ray diffractometry and Rietveld analysis. To determine the qualitative phase composition, three wedges of each composition were finely ground and placed in a cuvette of the diffractometer (D8 Advance, Bruker Corporations, Karlsruhe, Germany). The measurements were carried out under the following conditions: Cu-Kα radiation, measurement angle 2θ = 10–40°, measurement speed of 0.5 s/step and rotation of the cuvette of 15 rpm.

The phase composition was determined using DIFFRAC.EVA V.5.1.0.5. (Bruker Corporations, Billerica, MA, USA) based on ICDD reference patterns: $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$ (newberyite; PDF Ref. 00-020-0153), $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (brushite; PDF Ref. 00-009-0077), $NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$ (struvite; PDF Ref. 00-015-0762), $Mg_3(PO_4)_2$ (farringtonite; PDF Ref. 00-033-0876), $Ca_4Mg_5(PO_4)_6$ (stanfieldite; PDF Ref. 00-011-0231) and MgO (magnesium oxide/periclase; PDF Ref. 00-004-0829). A quantitative phase analysis was carried out using the Rietveld method. The TOPAS V6 software (Bruker Corporations, Billerica, MA, USA) was used for this purpose.

2.1.3. Determination of Compressive Strength

The compressive strength was determined on 10 rectangular specimens (l = 6 mm, w = 6 mm, h = 12 mm), which were previously aged for 24 h at 37 °C in PBS. A testing machine (Z010, Zwick GmbH, Ulm, Germany) with a 10 kN load cell, a preload of 1 N and a test speed of 1 mm min^{-1} were used for the measurement. Compressive strength testing was performed according to ISO 13175-3 2012 [33].

2.1.4. Porosity

For the porosity measurements, the wedges were broken into two parts and placed in the measuring cuvette of the porosimeter (Pascal 140/440, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) to record the complete porosity of a scaffold. The measurements were carried out on three wedges for each material variant in a pressure range of 0.01 kPa–400 MPa. The SOLID software (SOLver of Intrusion Data Ver. 1.6.5, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) was used to analyze the data.

2.1.5. Energy Dispersive X-ray Analysis (EDX) and Scanning Electron Microscopy (SEM) before Implantation

The scaffold wedges were fixed in 4% formalin solution and then dehydrated in an ascending alcohol series. After degreasing in xylene (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), they were embedded in a plastic embedding system based on methyl methacrylate (Technovit® 9100, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany). Using the cutting–grinding technique according to Donath [34], 50–80 µm thick sections were produced with

a diamond band saw and a grinding machine (Cut-Grinder and Lap-Grinder, Messner GmbH, Oststeinbek, Germany). One unstained thick section per material and time group was examined using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and scanning electron microscopy (SEM). Before they could be examined by means of field emission electron microscopy (Crossbeam CB 340, Zeiss, Oberkochen, Germany), the thick sections were coated with platinum (4 nm thickness) using a sputter coater (Leica EM ACE600, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Germany). EDX images were obtained using a system with a silicon drift detector (INCA Energy 350 AzTec Advanced system with silicon drift detector) from Oxford Instruments (Abingdon, UK). The scaffold center was analyzed with an accelerating voltage of 10 keV at a magnification of 28× and 500×. The scaffolds were assessed in the SEM based on the surface structure and pore composition. EDX was used to examine the phase distribution based on the presence of magnesium (Mg), calcium (Ca) and phosphate (P) ions.

2.2. Animal Model

The animal experiment was approved by the Government of Upper Bavaria according to paragraph 8 of the German Animal Welfare Act (approval number Az. ROB 55.2-2532.Vet_02-19-64). For the present study, 42 adult female Zimmermann rabbits (ZiKa rabbits, Asamhof Kissing, Germany) with an age of 6 months and with an average weight of 4.5 kg were used. The animals were divided into four time groups (6, 12, 24 and 30 weeks post-operation). Six rabbits per time group were implanted with the materials CMPC and MPC (Figure 1B). In the 30-week group (plate removal group, PR), six rabbits had CMPC wedges implanted, and the PEEK plate used for fixation was removed after 24 weeks. The animals were kept in conventional cages (Scanbur A/S, Karlslunde, Denmark) and received daily rationed pellet feed (Kanin Kombi, Rieder Asamhof GmbH, Kissing, Germany) as well as hay and water ad libitum.

2.2.1. Implantation of the Wedges

The surgical method was analogous to the study by Schmidt et al. [35] and was based on a high tibial open-wedge osteotomy [36].

Before surgery, the analgesic meloxicam (0.3 mg/kg, Meloxoral® 1.5 mg/mL, Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf, Germany) and the antibiotic enrofloxacin (10 mg/kg, Orniflox® 25 mg/mL, Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf, Germany) were administered orally. Ketamine (15 mg/kg, Anesketin® 100 mg/mL, Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf, Germany) and medetomidine (0.25 mg/kg, Dorbene vet® 1 mg/mL, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany) were then injected intramuscularly to induce anesthesia. After securing the airway by means of endotracheal intubation, anesthesia was maintained using isoflurane (1.5–2.0 vol%) with a simultaneous supply of oxygen (1 L/min). For analgesic coverage, the animals also received fentanyl 1 µg/kg/h (Fentadon® 50 µg/mL, Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf, Germany) as a continuous drip infusion. After aseptic preparation of the surgical field on the right hind limb, access was made with an approximately 3 cm long skin incision on the medial side of the proximal tibia. The surrounding muscles and periosteum were then dissected using a raspatory. Using a saw (Colibri II, DePuy Synthes®, Synthes GmbH, Oberdorf, Switzerland), a wedge-shaped defect corresponding to the size of the scaffold was created in the proximal tibia while protecting the fibula. The scaffold wedge was inserted into the defect to fit precisely against the cortical bone. The scaffold was then fixed using a T-plate (PEEK, RISystem AG, Landquart, Switzerland) made of non-resorbable plastic and three titanium screws (Cortex Screw Stardrive Ø 1.5 mm, DePuy Synthes®, Synthes GmbH, Oberdorf, Switzerland) proximal and distal to the defect. Subsequently, after adaptation of the fascia, the subcutis was closed using continuous sutures (Monosyn violet 4/0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and the skin was closed using single-button sutures (Optilene blue 4/0 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Following the operation, X-rays in two planes and

µCT examinations of the surgical area were performed. Atipamezole (25 mg/kg, Atipam®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) was then injected intramuscularly to antagonize medetomidine. As post-operative analgesia, the rabbits received 20 µg/kg buprenorphine (Buprenovet® Multidose, 0.3 mg/mL, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany) up to three times daily for four days and 0.3 mg/kg/day meloxicam until the fifth day after surgery. For antibiotic coverage, the animals were also administered 10 mg/kg/day enrofloxacin until post-operative day 5. If necessary, the animals were also given the analgesic metamizole at 40 mg/kg (Novaminsulfon—1A Pharma®, 500 mg/mL, 1A Pharma GmbH, Oberhaching, Germany) two to three times a day. The rabbits were clinically examined daily for pain, lameness and wound control until day 14 post-surgery.

2.2.2. Plate Removal

To investigate bone remodeling after defect healing, the PEEK plate used for fixation was removed from six animals in the CMPC group (30-week group) at 24 weeks post-operation, after prior verification of cortical bone healing using X-ray examinations. Preparation of the surgical field, anesthesia, analgesia and post-operative care were performed in the same way as for the implantation surgery. Subsequently, X-ray and µ-CT examinations were also performed at 26, 28 and 30 weeks post-plate removal surgery.

2.3. Radiological Examination and Semi-Quantitative Evaluation

The rabbits were X-rayed to examine the operated proximal tibia at fixed time points (post-surgery and at weeks 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 and 24; additionally in PR animals at weeks 26, 28 and 30). They were sedated with medetomidine (0.25 mg/kg) and ketamine (15 mg/kg) through intramuscular injection. At the end of the examinations, medetomidine was antagonized with atipamezole (25 mg/kg, intramuscular). Images were acquired at 54.9 kV and 4.5 mAs (Multix Select DR, Siemens GmbH, Erlangen, Germany) in two planes (craniocaudal and mediolateral) (Figure 2). The images were analyzed by three observers using dicomPACS® MobileView software (version 4.0.0.19; Oehm und Rehbein GmbH, Rostock, Germany).

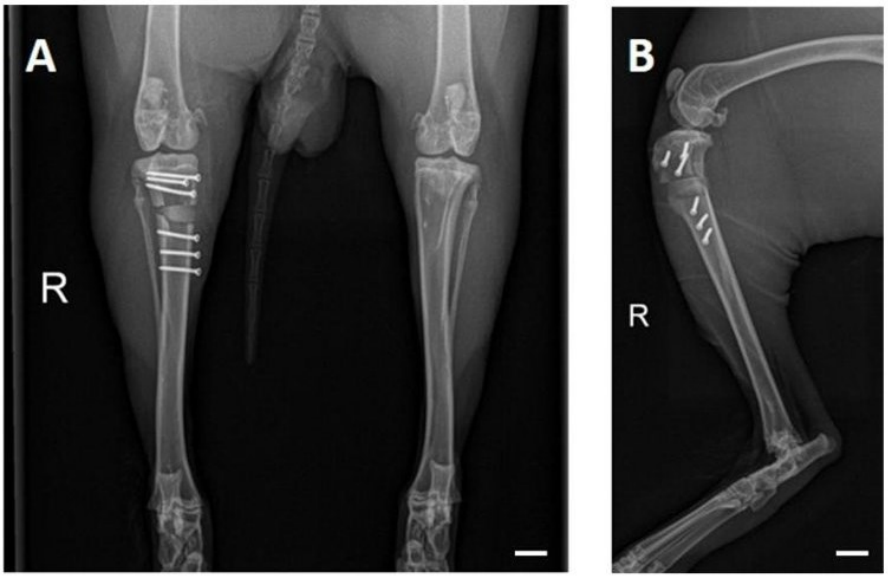

Figure 2. Post-surgery radiographs: (**A**) craniocaudal and (**B**) mediolateral beam path. The non-radiopaque PEEK plate allows for assessment of scaffold and cortices. Scale bar = 10 mm.

For this purpose, the parameters of scaffold visibility and intactness of the fibula were evaluated descriptively on the radiographs of both levels, and an adapted, modified

radiographic union scale for tibial fractures (mRUST) score (Table 2) was used to semi-quantitatively examine the four cortices (cranial, caudal, medial and lateral) of the operated tibia and to assess bone healing after osteotomy [37–39]. These scores were then added together to form a total score.

Table 2. Scoresheet for X-ray examination.

mRUST Score	Osteotomy Line	Callus
1	Visible	Missing
2	Visible	Available
3	Visible	Bridged
4	Not visible	Completely bridged or remodeled

2.4. In Vivo µCT Examination

In vivo µCT images (XtremeCT II, Scanco Medical, Zurich, Switzerland) were taken in accordance with the examination interval of the radiological examinations. Sedation and antagonization were performed as for X-rays. In addition, anesthesia was maintained via a laryngeal mask airway (v-gel® rabbit, Docsinnovent Ltd., London, UK) with isoflurane (0.8–1.5 vol% plus oxygen 1.5–2 L/min). The animals were restrained in the supine position with the knee joints extended. The area of the proximal tibia including the implanted wedges, PEEK plate and screws was scanned with the following settings: tube voltage of 68 kV, current of 1470 µA, 1000 projections/180°, integration time of 250 ms and isotropic voxel size of 30.3 µm.

2.4.1. Semi-Quantitative Evaluation of the In Vivo µCT Examination

A scoring system was used for the semi-quantitative evaluation of the µCT scans (Table 3).

Table 3. Scoresheet for semi-quantitative µ-CT examinations.

Parameters	Score 0	Score 1	Score 2
Scaffold visibility	Not visible	Partially visible	Fully visible
Loss of shape	Wedge shape no longer recognizable	Wedge shape partially recognizable	Wedge shape clearly recognizable
Closure of osteotomy gap by callus tissue	Scaffold completely covered by callus	Partial callus formation	No callus formation
Scaffold integration	Continuous visible contact surface between scaffold and bone	Contact surface between scaffold and bone partially interrupted	No visible scaffold–bone contact
Resorption zone	No resorption zone	Scaffold partially surrounded by resorption zone	Scaffold completely surrounded by resorption zone
Delimitable zone within scaffold	No zone delimitable	Zone indistinctly delimitable	Zone clearly delimitable
Scaffold fit (on day of surgery)	Scaffold is attached to the cortices	Scaffold does not lie medially or laterally against cortical bone	Scaffold is neither medial nor lateral to cortical bone
Bridging of medial osteotomy gap (cis-cortex)	Complete bridging	Partial bridging	No bridging
Endosteal callus formation proximal to scaffold	None	Minor	Medium to high
Endosteal callus formation distal to scaffold	None	Minor	Medium to high
Periosteal callus formation (trans-cortex)	None	Minor	Medium to high
Remodeling trans-cortex	Even and narrow = physiological	Loosened and cancellous	Heavily curved

The following parameters were examined in the original scan (scaffold and tibia in cross-section) (Figure 3A,B): scaffold visibility, loss of shape and closure of the osteotomy gap by callus tissue. In addition, the scan was reoriented by 90° using the µCT Evaluation Program V6.6 software (Scanco Medical, Zurich, Switzerland) to evaluate the scaffold in the longitudinal section of the tibia. On the reoriented scan (Figure 3C), the parameters of scaffold integration, the resorption zone (the area around the scaffold that is not radiopaque), the delimitable zone within the scaffold, scaffold fit (on the day of surgery), bridging of the medial osteotomy gap (cis-cortex) and the endosteal and periosteal callus formation from proximal and distal positions were examined. Once the scaffold was no longer visible, the remodeling of the trans-cortex was assessed based on its structure.

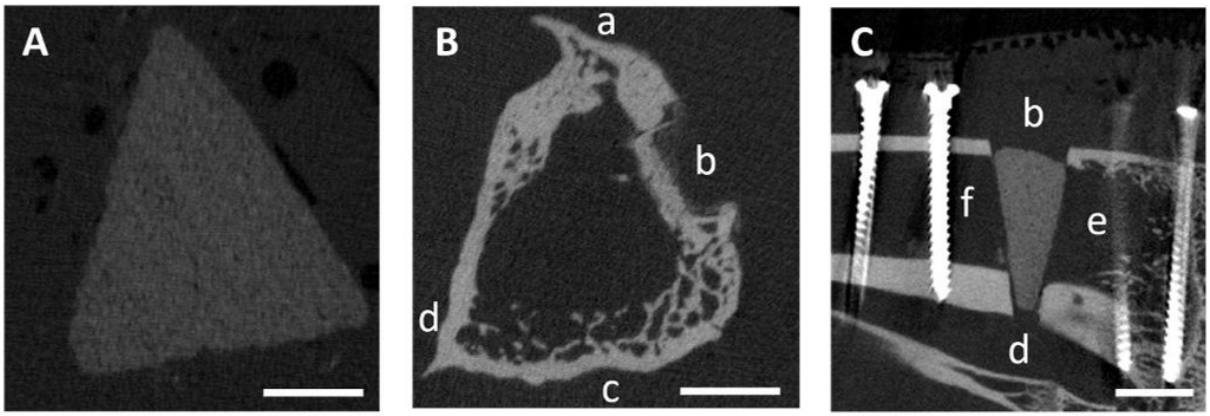

Figure 3. Exemplary (**A**) original µCT scan with scaffold (immediately post-surgery) and (**B**) original µCT scan after 26 weeks (scaffold already degraded); (**C**) reoriented µCT scan (immediately post-surgery). Orientation: (a) cranial, (b) medial (position of the PEEK plate), (c) caudal, (d) lateral, (e) proximal and (f) distal. Scale bar = 5 mm.

2.4.2. Quantitative Evaluation of the In Vivo µCT Examination

For quantitative analysis of the scaffolds, volume (scaffold volume, SV) and density (scaffold density, SD) measurements were performed using previously determined material-specific thresholds (Th). Using different gray values of the scaffolds assessed at the time of surgery, the following thresholds were determined independently by three assessors: CMPC Th = 150 and MPC Th = 108. µCT Evaluation Program V6.6 software (Scanco medical, Zurich, Switzerland) was used for the analyses.

2.5. Histological Examination and Semi-Quantitative Evaluation

At the end of the respective observation periods, the animals were euthanized after sedation in accordance with animal welfare regulations. For this purpose, propofol (2–4 mg/kg, Narcofol®, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) and pentobarbital (200–800 mg/kg, Narkodorm®, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) were administered intravenously. The implanted tibiae were then removed and the soft tissue was dissected. The bone–implant composite including the PEEK plate was explanted using a diamond band saw (Cut-grinder, Messner GmbH, Oststeinbek, Germany); for this purpose, the PEEK plate was sawn through above and below the two screws adjacent to the scaffold. The preparation was then carried out as described in Section 2.1.5. Using the cutting–grinding technique according to Donath [34], thick sections (50–80 µm) were prepared by cutting a longitudinal section through the center of the PEEK plate in the mediolateral direction. Subsequently, the most central section from the center of the scaffold was stained with toluidine blue (0.1% toluidine blue O (Waldeck, Münster, Germany)) and then assessed semi-quantitatively with a microscope (Axio Imager Z.2, Carl Zeiss Microscopy GmbH,

Oberkochen, Germany) using a scoring system by three people independently of each other (Table 4).

Table 4. Scoresheet for semi-quantitative histology.

Parameters	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Cis-cortex bridging	76–100%	51–75%	26–50%	1–25%	Not bridged
Trans-cortex bridging	76–100%	51–75%	26–50%	1–25%	Not bridged
Cis-cortex remodeling (bone maturation)	Mainly lamellar bone	Woven bone with no to little lamellar bone	Woven bone with cartilage	Cartilage tissue	No remodeling
Trans-cortex remodeling (bone maturation)	Mainly lamellar bone	Woven bone with no to little lamellar bone	Woven bone with cartilage	Cartilage tissue	No remodeling
Proximal endosteal callus	76–100%	51–75%	26–50%	1–25%	No callus
Distal endosteal callus	76–100%	51–75%	26–50%	1–25%	No callus
Scaffold degradation	76–100%	51–75%	26–50%	1–25%	No degradation
Scaffold integration	76–100%	51–75%	26–50%	1–25%	No integration
Resorption zone	Measured at level of scaffold center in mm				
Proportion of dark-colored material	Estimated percentage of scaffold				
Thickness of the trans-cortex in mm	Measured including periosteal callus				

The bridging of cis- and trans-cortex, remodeling of cis- and trans-cortex (bone maturity), endosteal callus formation proximal and distal to the scaffold, thickness of the trans-cortex (trans-cortex plus periosteal callus), scaffold degradation and integration, and the mean width of the resorption zone (measured at the level of the center of the scaffold) were evaluated at 2.5x magnification. Scaffold areas with different color shades were observed in both materials after 6 weeks (Figure 4). A lighter central area of material was surrounded by dark-colored material. This dark portion was also estimated as a percentage. In addition, the bone–implant composite was examined at the cellular level (occurrence and localization of osteoclasts, osteoblasts, osteoprogenitor cells, adipocytes, bone marrow precursor cells, fibroblasts, fibrocytes, macrophages, foreign body giant cells, lymphocytes, blood vessels (vascularization) and cartilage tissue (magnifications 20x and 40x)). The occurrence of the cell types was analyzed semi-quantitatively in the different localizations of scaffold center, edge, resorption zone and periphery (cis- and trans-cortex; areas proximal and distal to the scaffold). As soon as scaffold degradation was too far advanced, the center (former implantation site based on the screw positions) and trans- and cis-cortex localizations were examined.

Histomorphometric Examination

The section was photographed at 2.5x magnification under the microscope using the Zeiss Axio Cam Mrc digital camera and Zeiss ZEN 3.0 software and then analyzed using Zeiss Intellesis software. The percentage area of light and dark scaffold material, woven bone, lamellar bone and cartilage tissue within a defined rectangular measuring frame in the implantation area was measured (Figure 4).

2.6. Energy Dispersive X-ray Analysis (EDX) and Scanning Electron Microscopy (SEM) of the Implanted Wedges

Two unstained thick sections (50–80 µm) per material and time group were examined using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and scanning electron microscopy (SEM) and prepared analogously to Section 2.1.5. The scaffolds were assessed in the SEM regarding osseointegration based on the surface structure of the thick sections and the contact surface to the surrounding bone. EDX was used to determine the presence of material particles

based on the presence of magnesium (Mg) ions or an increased concentration of calcium (Ca) and phosphate (P) ions compared to the surrounding bone.

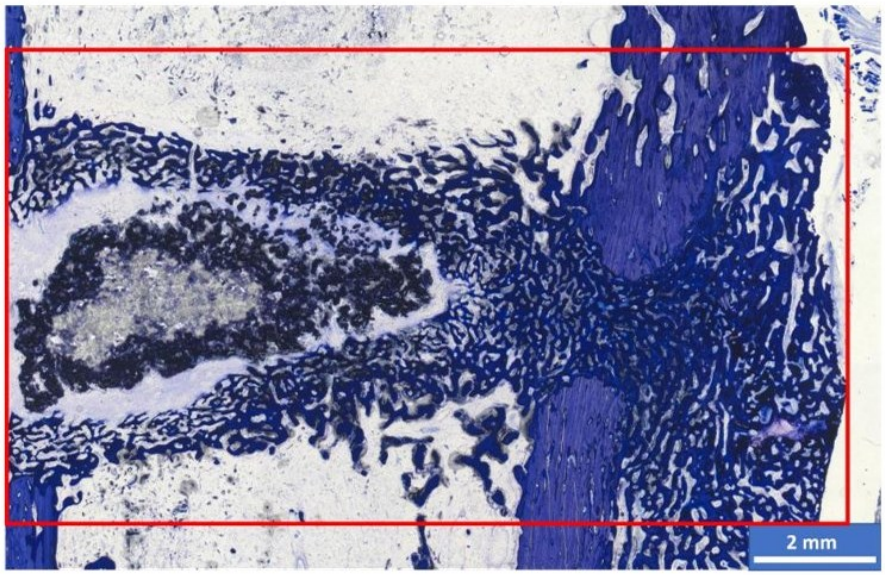

Figure 4. CMPC 6 weeks after surgery: the measuring frame (red rectangle) of the histomorphometric measurements, 3500 × 2000 pixels. Different coloration of the scaffold is visible: in the center of the wedge is a light-colored material area surrounded by a dark-colored scaffold, and a resorption zone is between the wedge and the woven bone.

2.7. Statistics

The statistical analysis of the data on the production and characterization of the wedges before surgery was performed using one-way ANOVA analysis and the Tukey test (Origin 7G, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Values with $p < 0.05$ were classified as statistically significant. All values are expressed as mean ± standard deviation. The experimental data are based on the following sample numbers: chemical composition ($n = 3$), strength measurements ($n = 10$), porosity measurements ($n = 3$) and SEM/EDX ($n = 2$).

The remaining data collected were analyzed using SPSS Statistics 26.0 (IBM, Armonk, USA) and Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Quantitative data were checked for normal distribution using the Shapiro–Wilk test and, in the case of normal distribution, analyzed using the Levene test and then the Welch test or *t*-test. Semi-quantitative data and non-normally distributed data were analyzed using the Mann–Whitney U test. The significance level was set at $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Chemical and Mechanical Properties of the Scaffolds

Post-treatment of the scaffolds with DAHP or phosphoric acid resulted in chemical reactions, which led to the partial conversion of farringtonite to struvite (MPC) (Equation (1)) [40] or of farringtonite and stanfieldite to newberyite (Equations (2) and (3)) and brushite (CMPC) (Equation (3)) [41] (Table 5).

$$2\,Mg_3(PO_4)_2 + 3\,(NH_4)_2HPO_4 + 36\,H_20 \rightarrow 6\,MgNH_4PO_4 \cdot 6\,H_20 + H_3PO_4 \quad (1)$$

$$Mg_3(PO_4)_2 + H_3PO_4 + 9\,H_20 \rightarrow 3\,MgHPO_4 \cdot 3\,H_20 \quad (2)$$

$$Ca_4Mg_5(PO_4)_6 + 3\,H_3PO_4 + 23\,H_20 \rightarrow 4\,CaHPO_4 \cdot 2\,H_20 + 5\,MgHPO_4 \cdot 3\,H_20 \quad (3)$$

Table 5. Chemical composition of scaffolds in wt%.

	Brushite	Stanfieldite	Farringtonite	Struvite	Newberyite	Periclase
MPC	-	-	81.0 ± 3.2	19.0 ± 3.2	-	-
CMPC	10.9 ± 2.4	20.1 ± 4.9	10.3 ± 1.4	-	58.1 ± 3.9	0.6 ± 0.1

The compressive strengths of the scaffolds before implantation differed significantly ($p < 0.001$). They amounted to 21.5 ± 2.8 MPa for the MPC and 15.6 ± 3.4 MPa for the CMPC.

The open porosity also differed significantly between the two groups ($p = 0.048$). For the MPC, it was 9.1 ± 3.6%, while for the CMPC, it was 15.9 ± 2.1%.

3.2. SEM/EDX Analyses before Implantation

Compared to the MPC, the CMPC had a more homogeneous structure and consisted mainly of the phases stanfieldite, newberyite and farringtonite (Figure 5A). In the EDX analysis, red parts were visible in the CMPC, which can be assigned to the brushite phase (Figure 5C). The MPC wedge consisted of the two phases farringtonite (coarse-grained) and struvite (smooth and dense). Struvite was predominantly detected in the edge area of the scaffold, whereas farringtonite was visible in the center of the scaffold (Figure 5B,D).

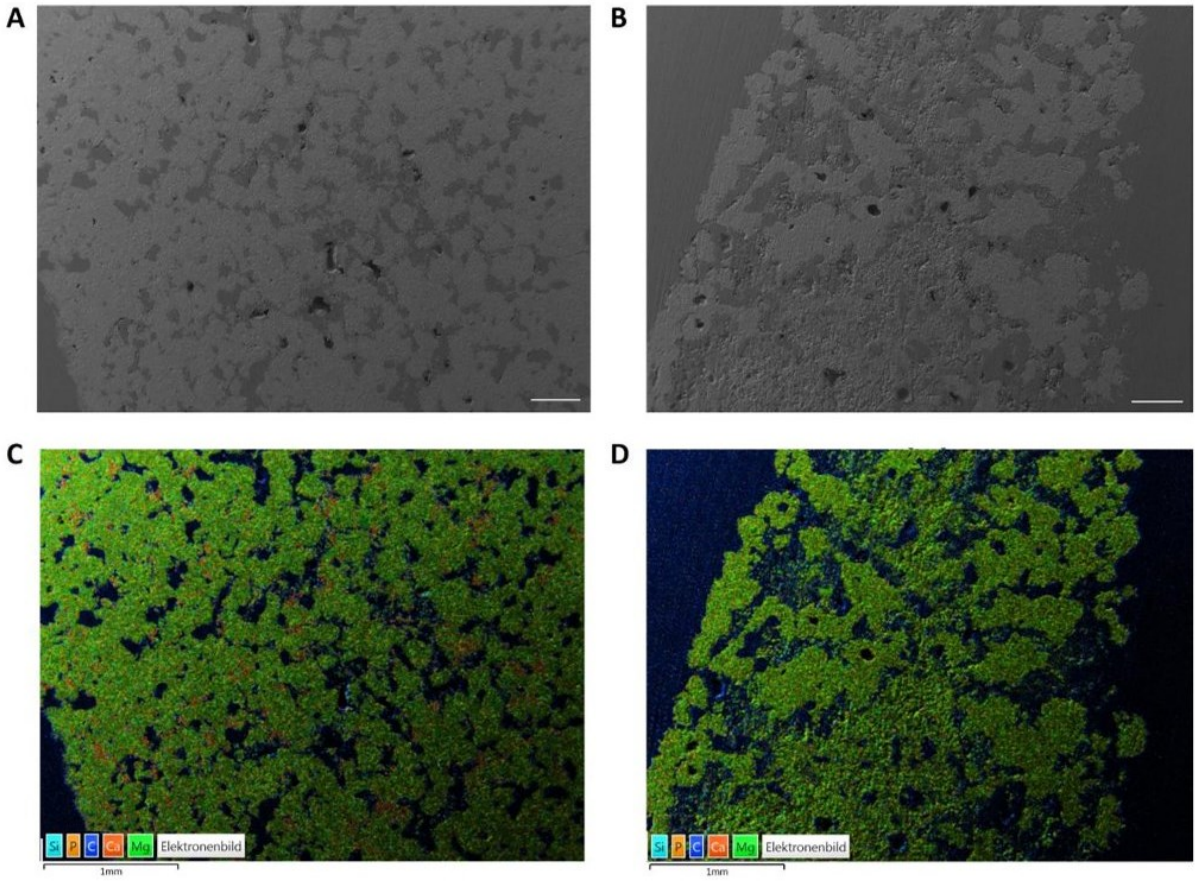

Figure 5. Analyses of the native wedges before implantation. SEM analyses of (**A**) the CMPC and (**B**) the MPC, scale bar = 400 µm. EDX analyses of (**C**) the CMPC and (**D**) the MPC, scale bar = 1 mm.

3.3. OP and Clinical Examination

The scaffolds could be inserted and fixed almost precisely. All animals showed physiological wound healing and mild to moderate lameness post-operation, which lasted until day 9 in most animals and until day 16 at most in 2/42 animals. In 3/42 animals, due to intermittent lameness, a radiographic examination was performed one week after surgery, which revealed a fibula fracture that did not require treatment. The animals from the PR group showed no lameness after plate explantation and physiological wound healing.

3.4. X-ray Examinations

Defect healing was similarly fast in both groups. All scaffolds were visible in the radiological examinations from the time of surgery until week 6. The CMPC was no longer visible until week 10 (1/18) at the earliest and week 20 at the latest. The MPC was no longer visible at week 8 (1/12) at the earliest and week 16 at the latest. From week 20 onwards, no implant was radiologically distinguishable from the surrounding bone. In a total of six animals (CMPC, n = 5; MPC, n = 1), a fracture of the fibula was detected from week 2 onwards, which was covered by callus in the following weeks and ossified after 6 weeks at the latest. The mRUST sum score values were higher with the CMPC than with the MPC from weeks 2 to 8; from weeks 10 to 20, the values of the MPC were higher than those of the CMPC, and in week 24, the values no longer differed (Figure 6). The maximum sum score of 16, which describes radiologically complete osteotomy healing, was reached with both materials at week 10 at the earliest (CMPC, 3/18; MPC, 2/12). From week 16 onwards, the majority of the MPC (5/6) and, from week 20 onwards, the majority of CMPC (8/12) showed complete radiologic osteotomy healing. The mRUST scores of the individual cortices (cranial, caudal, medial and lateral) did not differ significantly between the two materials.

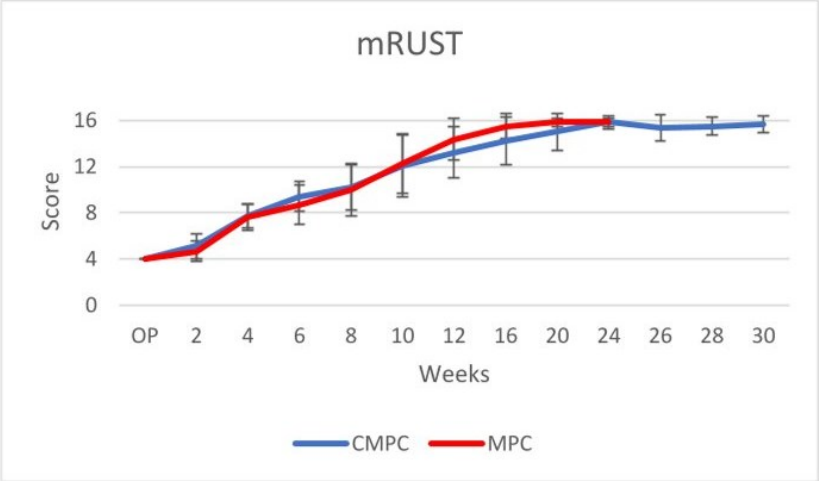

Figure 6. mRUST sum scores of CMPC and MPC from time of surgery to week 30. Plate removal in CMPC at week 24.

3.5. In Vivo µCT Examinations

3.5.1. Semi-Quantitative Evaluation of the Scans

Both materials showed continuous degradation (Figure 7A) and lost shape and visibility from week 2 onwards, with the lateral wedge tip being the first to fragment. From week 8, the wedge shape of all scaffolds was no longer recognizable. At week 20, scaffold remnants could only be seen in one tibia of each group. The presence of a ring-shaped marginal zone within the scaffold, delimited by a line, was only observed in the MPC. This was visible from weeks 2 to 8 and widened over time (Figure 7B). Significantly less scaffold integration was observed with the MPC than with the CMPC in weeks 4, 6 and

8 ($p \leq 0.001$). From week 2 onwards, a radiolucent zone around the scaffold was noticeable in both materials, which is referred to below as the resorption zone (Figure 7B). In weeks 4, 6 and 8, this zone was significantly more pronounced in the MPC than in the CMPC ($p \leq 0.002$) and completely surrounded the scaffold. The parameters of scaffold integration and resorption zone could no longer be assessed from week 12 due to the advanced degradation of most of the scaffolds. The formation of endosteal callus was observed in both groups from week 2 onwards. This formed from the tibial endosteum and was confluent in the center of the medullary cavity. In the CMPC, it was most pronounced between weeks 4 and 6, in the MPC, it was from weeks 4 to 8 and was degraded again after 10 weeks at the earliest and 30 weeks at the latest. In weeks 10 and 12, this growth differed significantly between the MPC and the CMPC ($p = 0.005$). At week 10, the CMPC showed an interconnected callus in 10/18 animals (connecting the medial and lateral endosteum) and the MPC showed a non-connected callus in 7/12 animals. At week 12, the endosteal callus was still visible in 14/18 CMPC scaffolds, which was already degraded in the majority of animals with the MPC. The callus formations assessed proximal and distal to the scaffold were symmetrical in most animals, with three tibiae (MPC, $n = 2$; CMPC, $n = 1$) showing more callus distally than proximally. Periosteal callus at the trans-cortex was observed in all scaffolds from week 2 until the end of the observation period. It was most pronounced in the CMPC from weeks 4 to 8 and in the MPC in week 6 and became flatter again over time. The original shape of the tibia had not been restored by the end of the observation periods. After restoration of the bone marrow cavity, the trans-cortex showed a widened, cancellous and loosened structure in all animals compared to the original cortex (Figure 7C).

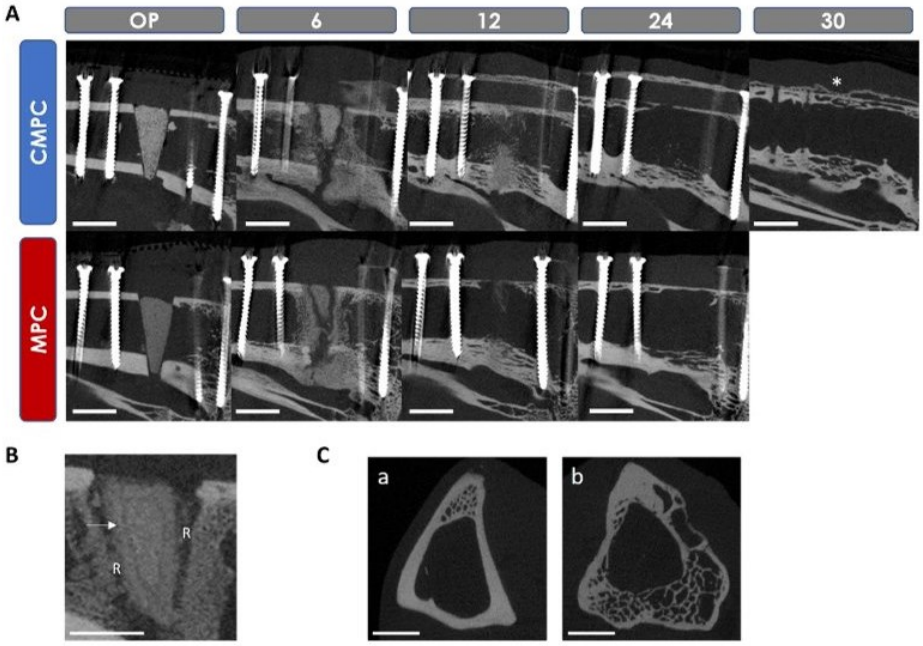

Figure 7. Scaffold degradation of CMPC and MPC after 6, 12 and 24 weeks and of CMPC after 30 weeks in (**A**) reoriented scan. (*) Scan 6 weeks after plate extraction (30 weeks post-operation). (**B**) Arrow: delimitable zone within MPC scaffolds; (R) resorption zone. (**C**) Original scan of (**a**) native compared to (**b**) operated tibia after 30 weeks. Scale bar = 5 mm.

3.5.2. Quantitative Evaluation of the Scans

The volume and density measurements could only be carried out up to week 16 at the latest, as most of the scaffolds were no longer visible in the in vivo µCT or could no longer be clearly distinguished from the bone. A continuous decrease in volume was observed for both materials. The scaffolds showed a volume decrease of 70.84% (CMPC)

and 72.44% (MPC) after 6 weeks and a loss of 97.63% (CMPC) and 99.87% (MPC) after 16 weeks. The density of both materials decreased slightly over the observation period. The decrease in density after 16 weeks was 1.83% for the CMPC and 19.61% for the MPC.

3.6. Histological Examination

3.6.1. Semi-Quantitative Assessment

The CMPC showed complete bridging of the cis-cortex (the medial side under the PEEK plate) earlier compared to the MPC. After 6 weeks, the cis-cortex was 1–25% bridged in 3/6 scaffolds of both groups. One scaffold of the CMPC group already showed an almost complete bridging of 76–100%. One scaffold from each group showed no bridging of the cis-cortex at this time. After 12 weeks, the cis-cortex was completely bridged in all CMPC scaffolds and in the majority of MPC scaffolds (66.7%). One MPC scaffold showed no bridging at this time. After 24 weeks, complete bridging of the cis-cortex was observed in all scaffolds.

The trans-cortex (the lateral side at the tip of the wedge) was 76–100% bridged in most animals for both materials (CMPC, n = 5; MPC, n = 4) after 6 weeks. After 12 weeks, the trans-cortex was bridged in all animals.

In the majority of scaffolds in both groups (CMPC, n = 5; MPC, n = 4), remodeled woven bone with no to little lamellar bone was observed at the cis-cortex after 6 weeks. In one MPC implant, woven bone with cartilage tissue was observed at the cis-cortex. No remodeling was observed in one animal of each group at this time. After 12 weeks, most scaffolds (5/6 each) showed woven bone with little to no lamellar bone. The cis-cortex of one CMPC animal was almost completely remodeled into lamellar bone. In one implant of the MPC group, there was no remodeling at this time. After 24 weeks, the cis-cortices of all scaffolds were almost completely remodeled into lamellar bone.

After 6 weeks, the trans-cortex of 50% of the CMPC group was remodeled into woven bone with little to no lamellar bone. The trans-cortices of the other 50% (CMPC) and all MPC animals consisted of woven bone with cartilage tissue. After 12 weeks, the trans-cortex of two CMPC scaffolds and one MPC implant consisted mainly of lamellar bone. The majority of the MPC scaffolds and two CMPC scaffolds showed woven and lamellar bone and two other animals (CMPC) showed woven bone with cartilage tissue. After 24 weeks, all trans-cortices were almost completely remodeled into lamellar bone.

An endosteal callus (woven bone) was observed in both groups, which was built up or decreased again over time (Figure 8). This process took place somewhat faster in the MPC group than in the CMPC group. After 6 weeks, the endosteal callus was 76–100% continuous (confluent from the medial and lateral tibial endosteum) in almost all but 2/6 (MPC) animals. In these two animals, a more distal than proximal endosteal callus was observed. After 12 weeks, half of the CMPC group still had a continuous callus, whereas in the majority of the MPC group, it had already regressed. In both materials, the callus was no longer visible after 12 weeks in a small number of animals (CMPC, n = 2; MPC, n = 1). After 24 weeks, the endosteal callus was completely decreased in all tibiae.

The mean thickness of the trans-cortex (measured including the periosteal callus) decreased continuously over time in both groups (6 weeks: CMPC: 3.97 mm and MPC: 4.00 mm; 12 weeks: CMPC: 3.23 mm and MPC: 3.77 mm; 24 weeks: CMPC: 3.13 mm and MPC: 2.53 mm; 30 weeks: CMPC after plate removal: 3.07 mm).

All scaffolds showed continuous scaffold degradation from the outside in, with CMPC scaffolds degrading slightly earlier than MPC ones. After 6 weeks, almost all scaffolds of the MPC group (4/6) and half of the CMPC group were degraded to 26–50% and two scaffolds each were degraded to 51–75%. After 12 weeks, all scaffolds made of CMPC and the majority of the MPC group (4/6) were degraded to 76–100%, as well as 2/6 MPC scaffolds being degraded to 51–75%. After 24 weeks, almost complete degradation was observed in all scaffolds.

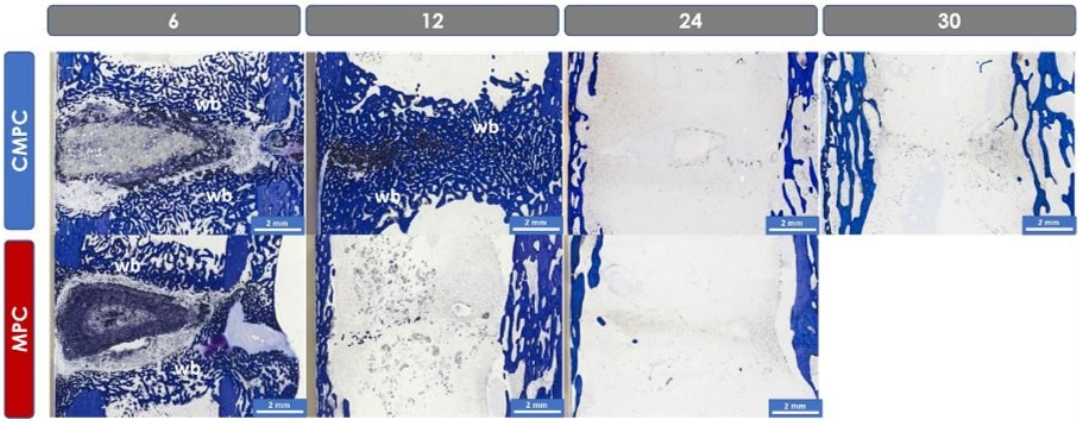

Figure 8. Histological thick sections (toluidine blue; magnification ×2.5/0.085) of the CMPC and the MPC after 6, 12 and 24 weeks and of the CMPC after 30 weeks. Blue: bone tissue. After 6 weeks, all scaffolds show a lighter-colored central area with an adjacent darker-colored zone. A cell-rich resorption zone is visible around the scaffolds. (wb) Woven bone is visible after 6 weeks in both materials, and after 12 weeks, it has already regressed in the MPC group.

CMPC scaffolds showed slightly better scaffold integration. Most scaffolds in both groups (CMPC, $n = 5$; MPC, $n = 4$) were 1–25% integrated into new bone tissue after 6 weeks. After 12 weeks, half of the CMPC scaffolds showed 76–100% scaffold integration, whereas 4/6 of the MPC scaffolds showed no integration. After 24 weeks, scaffold degradation was so advanced that only isolated material particles could be detected, which were completely embedded in bone tissue.

In all scaffolds, a cell-rich resorption zone was observed around the scaffold after 6 weeks. This zone contained osteoprogenitor cells, fibroblasts, fibrocytes, macrophages, foreign body giant cells, lymphocytes and blood vessels. The zone became narrower over time as new bone tissue was formed from the periphery toward the scaffold and it was no longer present after 24 weeks at the latest. The MPC showed a wider resorption zone compared to the CMPC at all time points (6 weeks: CMPC: 1.12 mm and MPC: 1.3 mm; 12 weeks: CMPC: 0.35 mm and MPC: 1.05 mm).

A different coloration of the scaffold material was observed over time. At week 6, all scaffolds consisted of a central, light gray-to-purple portion and an outer, dark purple-to-black portion (Figures 4 and 8). The groups showed a different proportion of dark material in the outer edge area after 6 weeks. It amounted to 27% in the CMPC group and 62% in the MPC group. After 12 weeks, only diffusely distributed dark material particles could be observed in the former scaffold area.

Multinucleated osteoclast-like cells were observed in both groups at all time points, mainly in the periphery of new bone tissue and, in the CMPC, also occasionally on the surface of the marginal cement particles when new bone was formed on them (Figure 9A).

Woven bone, which grew from the periphery toward the scaffold, showed osteoid seams with osteoblasts in both groups in the vicinity of the scaffold. After 12 weeks, osteoblasts were also found on the scaffold material with direct bone contacts (Figure 9B). These scaffold–bone contact sites were observed more frequently in the CMPC group than in the MPC group.

Osteoprogenitor cells were only seen up to week 12. These cells were observed sporadically at the scaffold edges, but mainly in large quantities within the resorption zone.

In weeks 6 and 12, many fibroblasts and fibrocytes were seen in the resorption zone. In the MPC, they were also observed at the edge of the material in week 6, and from week 12 onwards, they were also in the marginal areas of the CMPC.

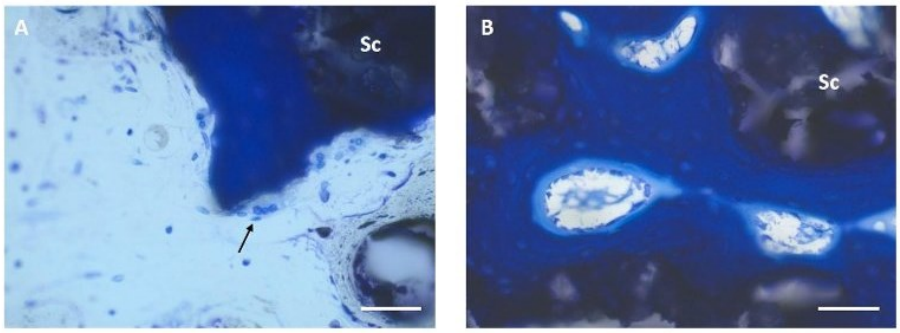

Figure 9. Histologic thick sections of the CMPC after 12 weeks (toluidine blue; ×40/0.75). (**A**) Osteoclast-like cells (arrow) on woven bone (dark blue), which is directly adjacent to the scaffold (Sc). (**B**) Osteoid margin with osteoblasts. Scale bar = 50 µm.

Adipocytes and bone marrow precursor cells were only detected after 12 weeks. After 24 weeks, the medullary cavity was filled with physiological bone marrow in all animals.

Macrophages were observed in all examined areas except in the scaffold center. They were present at weeks 6 and 12 mainly on and between the marginal material particles and in the resorption zone and were still detectable on material residues after 24 weeks in the MPC group and after 30 weeks in the CMPC group.

Foreign body giant cells were observed in weeks 6 and 12 in both groups directly on the scaffold material and in the resorption zone.

Lymphocytes were mainly present in the resorption zone and between the marginal particles at weeks 6 and 12, and at week 12, they were observed sporadically only in the MPC group.

Blood vessels were present in both materials at every observation point. They could be seen between the cement particles, especially at the transition from the scaffold center to the edge (CMPC), in the resorption zone and in the periphery between the bone trabeculae, but not within the scaffold center. After 6 weeks, more blood vessels were detected within the CMPC scaffolds than in the MPC ones.

Cartilage tissue was formed in both groups, especially at the trans-cortex, and was seen more frequently in MPC animals after 6 weeks. At this point, cartilage tissue was seen in all MPC animals and in three CMPC scaffolds at the trans-cortex. After 12 weeks, it was seen only sporadically at the cortex in both groups.

3.6.2. Histomorphometric Examinations

The proportion of scaffold material was dark or light and decreased continuously within the measurement frame for both groups. After 6 weeks, the CMPC scaffolds had a higher proportion (3.2%) of light-colored material than the MPC ones (1.9%). The proportion of dark material was always higher in the MPC scaffolds than in the CMPC ones. In both materials, the formation of woven bone was observed, which was continuously remodeled into lamellar bone. More woven bone was always formed in the CMPC than in the MPC. After 6 weeks, the CMPC had a significantly higher proportion of woven bone (31.5%) compared to the MPC (21.3%) ($p = 0.004$). New woven bone was also observed in the CMPC after 30 weeks, which formed on the cis-cortex as a result of the plate removal. Similar amounts of cartilage tissue could be measured in both groups, which decreased over time. There was a greater difference after 6 weeks where the MPC showed a higher proportion of cartilage tissue (1.4%) compared to the CMPC (0.5%).

3.7. SEM/EDX Analyses after Implantation

Continuous scaffold degradation was observed in both groups.

After 6 weeks, most of the scaffolds were still present. In the marginal area of the CMPC, woven bone was growing onto and into the scaffold (Figure 10A). In the MPC, the

scaffolds were clearly separated from the woven bone by a resorption zone, which meant that no bone had grown onto the scaffold. However, scaffold particles (Mg) were present in this zone. In the middle of the MPC scaffolds was an area consisting of farringtonite that had not been reacted with DAHP (Figure 10B).

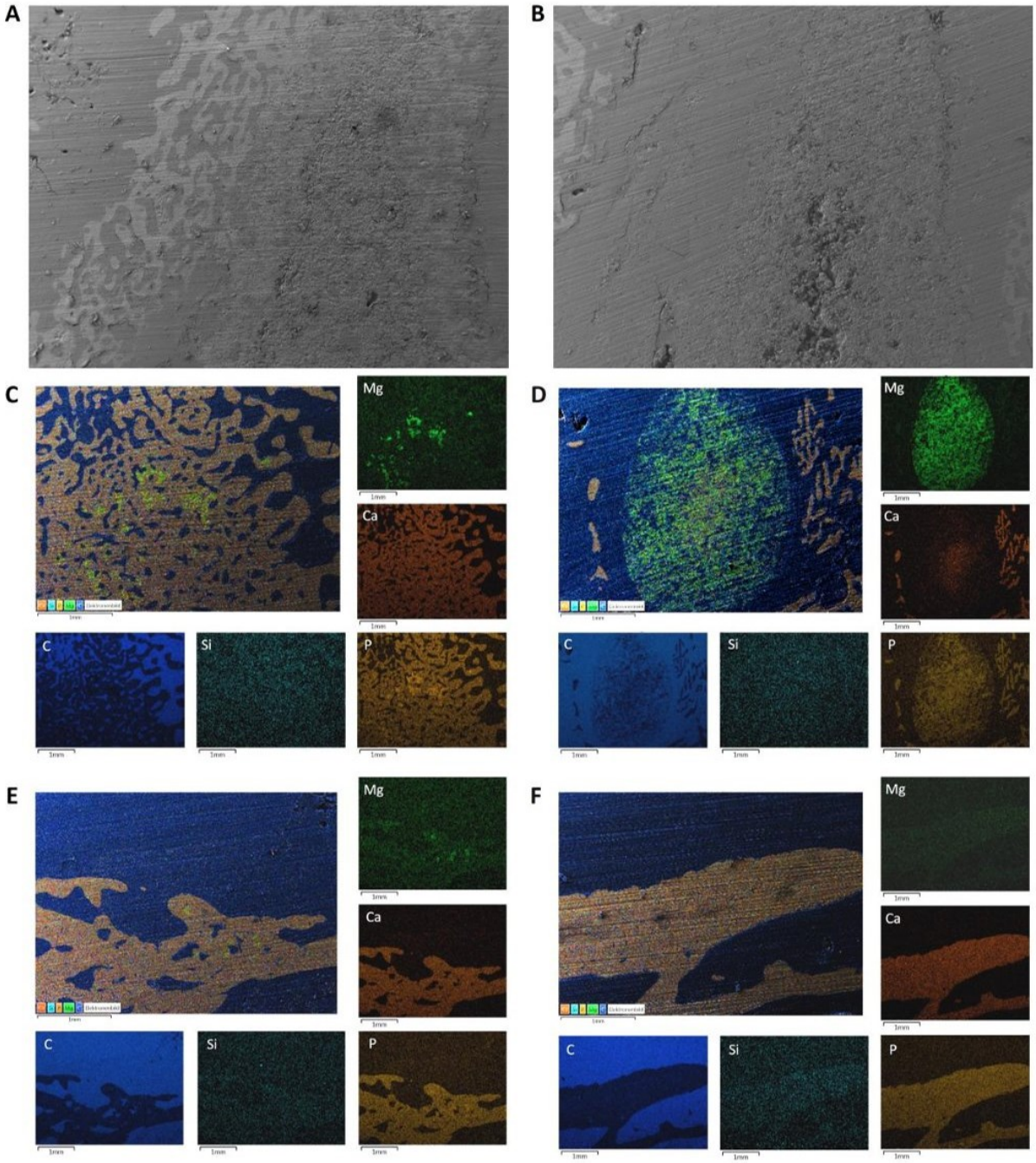

Figure 10. SEM and EDX analyses of the histological thick sections. SEM analyses of (**A**) the CMPC after 6 weeks and (**B**) the MPC after 6 weeks. EDX analyses of (**C**) the CMPC after 12 weeks, (**D**) the MPC after 12 weeks, (**E**) the CMPC after 30 weeks and (**F**) the MPC after 24 weeks. Scale bar = 1 mm.

After 12 weeks, CMPC remnants (roughened areas) were still visible and well integrated into the trabecular structure (Figure 10C). Multiple new bone trabeculae had formed in the scaffold area. MPC scaffolds were also further degraded but still surrounded by a resorption zone. The Ca distribution in the EDX measurements shows that new bone or precipitated hydroxyapatite formed in the implant (Figure 10D).

After 24 weeks, only a very small area of scaffold material was still present in a CMPC specimen. This was seen in the bone marrow not embedded in a trabecular structure. New bone had formed at the edge of the implant. The other CMPC sample had no residual material and new trabeculae had formed, filling the implantation area. No more material was visible in the MPC group. A narrow strip of bone was present at the edges of the former scaffold area and the center of the area was filled with bone marrow (Figure 10F).

In one of the CMPC samples, a few scaffold particles were still present in the newly formed trabeculae after 30 weeks. At the edge of the scaffold area, there was new bone with material remnants (Figure 10E). In addition, a large area of bone marrow was present in the center. In the other specimen of this group, no more material was detectable. No bone trabeculae were visible in the implantation area. A thin bone seam was visible at the implantation margin.

Measured silicon comes from the glass substrate and is therefore negligible.

4. Discussion

CMPCs and MPCs are superior to CPCs due to their improved mechanical properties and higher in vivo solubility [11,42–44]. Therefore, they are becoming increasingly important for their use as bone substitutes and have already been successfully tested in unloaded defect models [13,23,24,43]. In the present study, wedge-shaped MPC- and CMPC-based scaffolds were examined for the first time in the partially loaded, segmental defect model in the rabbit tibia. The scaffolds were 3D powder-printed, as this method is well suited to produce dimensionally stable, defect-specific bone substitutes with a customizable macrostructure [29,45–47]. Therefore, they are particularly suitable for larger or more complex defects. Another characteristic of powder-printed materials is the bone-like, interconnecting microporosity of up to 70%, which promotes nutrient diffusion, vascularization and thus osteogenesis [27,30,48]. The materials used were post-treated with DAHP (MPC) and phosphoric acid (CMPC) to increase the final strength [28] and were examined with regard to their in vivo degradation and osseointegration behavior. The animal model and the surgical method used have already been established, and the present study was adapted from a study by Schmidt et al. [35].

In terms of compressive strength and open porosity, the two materials used in the present study differed significantly from each other. The MPC exhibited both a higher compressive strength and a lower open porosity compared to the CMPC before implantation. This inverse correlation of porosity and compressive strength has already been established in other publications [49,50]. It is assumed that the strength development (cement hydration) takes place in two stages. First, the maximum pore size determines the strength (pore size-controlled stage). If this pore size falls below a critical defect size, the porosity determines the modulus of elasticity and thus the strength of the cement (porosity-controlled stage) [51].

In the present study, minimal dislocation of the wedge was observed over time in 3/42 animals (MPC, $n = 2$; CMPC, $n = 1$), as an asymmetric callus distribution (distal > proximal) was seen in both the µCT and histologic examinations. Since no other abnormalities were observed in these animals, it is assumed that loosening of the defect fixation occurred as a result of post-operative stress and that the scaffolds therefore slipped out of place.

As in previous in vivo studies with MPCs and CMPCs, all animals had physiological wound healing [20,24] and showed lameness, as expected for an invasive surgical method such as the one used here.

The visibility of the scaffolds in the radiologic analyses was similar in both groups and decreased over time, indicating progressive degradation. CMPC scaffolds were vis-

ible longer than MPC scaffolds, indicating faster degradation of the MPC. However, the prolonged visibility could also be attributed to the calcium (Ca) contained in the CMPC. Past studies have already shown that CPCs exhibit stronger and longer X-ray visibility compared to MPCs and CMPCs due to their increased Ca content and slower degradation rate [16,24,52]. Since none of the scaffolds could be distinguished from the surrounding bone on the X-ray images in the present study after 20 weeks, it can be assumed that the scaffolds were already largely degraded at this time. This was also confirmed in the in vivo μCT measurements, as at this time, only one animal of each group could be found with material remains.

Fibula fractures, which were detected radiographically in 6/42 animals in the first two weeks after surgery, had occurred in both material types because of surgical drilling of the fibula and therefore were considered independent of the material. No effects on subsequent scaffold degradation and bone healing of the defects could be determined.

Both materials showed a similar osteotomy healing process over the observation period. Radiologically complete defect healing, which is achieved with a maximum mRUST sum score (no osteotomy line visible on all four cortices and the osteotomy gap completely bridged with the callus or remodeled), occurred in both groups from week 16 onwards. The assessment of defect healing using radiographs by evaluating callus formation and the visibility of a fracture line at the four cortices (RUST or mRUST score) has already been successfully applied to tibial and femoral shaft fractures in humans and in animal models [37–39,53,54].

In the present study, a radiolucent resorption zone around the scaffold was noticeable from week 2 in the X-ray and μ-CT analyses for both materials. This zone was more pronounced in the MPC than in the CMPC at weeks 4, 6 and 8 and correlated with the simultaneously lower scaffold integration, i.e., fewer visible scaffold–bone contact points, of the MPC compared to the CMPC. The better scaffold integration of the CMPC compared to the MPC observed in the μCT examination could also be verified histologically. While both groups showed similar scaffold integration behavior at week 6, they differed significantly at week 12, at which time half of the CMPC group showed almost complete scaffold integration into new bone tissue, whereas almost all MPC scaffolds were still not integrated into the bone due to complete degradation or the presence of a resorption zone. This lack of scaffold–bone contact probably results from the faster degradation of the MPC compared to the CMPC, as although woven bone was formed around the implant, the bone growth rate did not match the scaffold degradation rate. The resorption zone could no longer be clearly assessed by in vivo μCT from week 12 onwards, as scaffold degradation had progressed too far. Histological examinations verified this zone as a cell-rich resorption zone, which contained fibrovascular cells and macrophages. Resorption zones are already known in the literature and correlate with an accelerated degradation rate [20,24]. Defect fixation was stable over the observation period despite the occurrence of a resorption zone.

In the present study, a faster degradation rate of the MPC was observed compared to the CMPC. A possible explanation for this is provided by Kowalewicz et al., who investigated cylindrical scaffolds made of CMPC in vivo and discussed in their study, among other things, the relationship between the chemical solubility and the influence of the wt% proportion of the binder phases farringtonite, struvite, brushite and newberyite on the degradation rate of the scaffolds. The chemical solubility of newberyite is the highest, followed by brushite and then struvite [11,24]. In the study by Kowalewicz et al., the CMPC scaffolds were post-treated with DAHP or phosphoric acid in a manner equivalent to the present study, resulting in the same binder phases (post-treatment and resulting binder phase: DAHP -> struvite; phosphoric acid -> newberyite and brushite) [19,47,52]. These rapidly soluble binder phases hold the poorly soluble phases farringtonite and stanfieldite together. In the present study, a low proportion of rapidly soluble struvite (19 wt%) was present in the MPC compared to the high proportion of newberyite (58 wt%) in the CMPC. This could therefore have resulted in a faster degradation of the MPC, as the low proportion of the binder phase struvite was possibly dissolved more quickly and the scaffolds were

therefore no longer sufficiently held together. The dissolution of the even more rapidly soluble binder phases newberyite and brushite took longer due to their higher content and degradation was correspondingly slower. A similar observation was also described in an in vitro study by Gefel et al. [47].

In the present study, the degradation of both materials had already progressed so far after 24 weeks that histologically, only isolated scaffold particles could be detected, which were completely integrated into bone tissue. Kowalewicz et al. [24] also observed in their in vivo study on CMPCs that they were almost completely degraded after 24 weeks.

In both groups, the formation of the endosteal and periosteal callus (trans-cortex) was observed from week 2 onwards, which built up and decreased over time. Schmidt et al. [35] used the same defect model in rabbits as in the present study, but with a scaffold made of a magnesium alloy, and also observed these callus formations, which occur physiologically as part of secondary fracture healing [55,56]. The scaffold fixation system used in the present study (the PEEK plate and screws) may have enabled interfragmentary movements that stimulated callus growth and thus bone healing, as has already been described in the literature for similar systems [55]. At weeks 10 and 12, CMPCs showed more pronounced endosteal callus formation compared to MPCs, which could be due to the high efficiency of CMPCs to form new bone. This was also confirmed in a study by Wu et al. [21] in which cylindrical CMPC and CPC scaffolds were implanted into drilled hole defects in rabbits. More newly formed bone was measured in the defect localization with CMPCs compared to CPCs. Zeng et al. [42] investigated granules of MPCs, CPCs and CMPCs and their effects on the cell proliferation and osteogenic cell differentiation of mesenchymal stem cells and on in vivo osteogenesis during maxillary sinus floor surgery in rabbits. It was found that CMPCs showed enhanced cell proliferation and differentiation compared to MPCs and induced increased bone growth in vivo compared to pure CPCs and MPCs.

The reduction in the endosteal callus, the flattening of the periosteal callus, the decrease in the mean thickness of the trans-cortex over time and the restoration of the bone marrow cavity observed in the present study occurred in the context of physiological bone remodeling, as also described in the literature [55].

The quantitative evaluation of the volume and density of both materials using µCT measurements could only be carried out up to week 16, as almost all scaffolds were no longer visible after this time or could no longer be clearly distinguished from the surrounding bone due to a similar radiographic density. A similar problem has already been identified in other studies [24,57]. In the present study, both materials showed a continuous decrease in volume, which resulted from a continuous scaffold degradation of both groups. The MPC showed a slightly greater loss of volume and density compared to the CMPC. This observation confirms the hypothesis that MPCs exhibit faster degradation than CMPCs, as already suggested by the results from the semi-quantitative µCT studies. The faster bridging on the medial side (under the PEEK plate) in CMPC scaffolds compared to MPCs may have occurred due to the potentially higher osteogenic efficiency of CMPCs compared to MPCs and due to the narrower resorption zone in CMPCs, as described above. The earlier bridging of the trans-cortex (lateral) compared to the cis-cortex is due, on the one hand, to the greater distance between the defect ends at the cis-cortex, and, on the other hand, to the fact that the formation of new bone directly under the plate was mechanically disturbed or could not be stimulated by interfragmentary movements [55,58]. The plate fixation partially relieved the cortical bone at this point, reducing the mechanical stimulus for new bone formation. This phenomenon is referred to as "stress shielding" and ultimately leads to a local decrease in bone tissue [59].

In general, the formation of cartilage tissue can be considered physiological, as it occurs during secondary fracture healing as part of endochondral ossification [55,60]. However, the higher and more frequent cartilage content in MPCs compared to CMPCs after 6 weeks, which could also be confirmed histomorphometrically, could also be related to the faster degradation of MPCs. Due to the rapid degradation of MPC scaffolds, the defect loses a certain degree of mechanical stability, which can lead to an increase in minimal

movement, and this leads to the bone trying to stabilize the defect through excessive callus formation [60,61].

Biomechanical stress has a major influence on defect healing. The stimulation of the cells in the callus determines the quality of the callus tissue formed. Too little stimulation results in non-union, whereas too much stimulation leads to pure fibrocartilage formation (pseudarthrosis). With ideal defect mobility and an appropriate gap width, suitable cartilage is formed, which can then be remodeled [58,62]. In the present study, it was observed that the callus formed in both groups was remodeled into bone tissue over time and always ensured mechanical stability. Histologically, a continuous, centripetal scaffold degradation was also observed in all scaffolds, whereby a slightly faster degradation rate of the CMPCs compared to the MPCs was observed in these examinations up to week 12.

The delimitable marginal zone of MPCs observed in the µ-CT, histological and SEM examinations was probably struvite, which was formed as a result of the reaction of farringtonite with DAHP during the production and post-treatment of the wedges. Using SEM, the present study showed that there was a zone in the middle of the MPC scaffold that consisted of farringtonite which had not reacted with DAHP. As no struvite was formed there, it can be assumed that a lower compressive strength was present at this site than in the rest of the scaffold. Non-reacted cement powder in the scaffold center of the CMPC cylinders post-treated with DAHP was also observed by Kowalewicz et al. [24]. The increase in compressive strength of MCPs due to post-treatment with DAHP has also been reported by other research groups [31,63].

In the histological analysis, the detected cells were mainly seen at and between the marginal particles of the scaffolds and the growing bone tissue, and in the resorption zone. The cell types that appeared are considered a physiological response [20,24,64]. During centripetal scaffold degradation, marginal cement particles were presumably the first to detach, thus allowing cells to penetrate.

The PEEK plate was removed to investigate the further remodeling of the bone after defect healing and scaffold degradation. The CMPC showed a slightly slower degradation rate in the early weeks after surgery, as well as better scaffold integration compared to the MPC. To reduce the number of test animals used, only CMPC implants were therefore used for the plate extraction part of the study. After explantation of the PEEK plates, all tibiae were stable and bone remodeling progressed. This could be verified histologically, as the newly formed woven bone was remodeled into lamellar bone in all animals as part of endochondral ossification and the medullary cavity was filled with physiological bone marrow again after 24 weeks at the latest. The diameters of the trans-cortices decreased over time and also after the removal of the plate and approached the initial tibial shape. In the µ-CT examinations, it was observed that the original shape of the tibia had not yet been restored after 30 weeks, as the cortices still showed a widened, loosened structure. According to the literature, this course of fracture healing is considered physiological [55,61].

5. Conclusions

The 3D powder-printed, wedge-shaped scaffolds made of CMPC and MPC used in the partially loaded defect model in the present study showed excellent biocompatibility, osteoconductivity and continuous scaffold degradation. After 24 weeks at the latest, both scaffolds were almost completely degraded, resulting in a restoration of the medullary cavity. The cortices were largely remodeled into lamellar bone so that a removal of the PEEK plate was possible. Even after plate removal, there were no complications and the bone continued to remodel. In all tibiae of both groups, the defect remained mechanically stable. However, especially in the early weeks, the CMPC showed a somewhat slower degradation rate which corresponded more to the growth rate of the bone compared to the MPC. The fact that a central, presumably more unstable zone of unreacted farringtonite was detected in MPC scaffolds in the SEM measurements indicates that the manufacturing and post-treatment process should be revised and optimized further to ensure the production of scaffolds that are as uniform as possible. CMPC scaffolds showed promising

results in the present study and should be further analyzed, for example in defect models with higher loads or in defects of larger dimensions, also with a stronger focus on biomechanical properties.

Author Contributions: Conceptualization and methodology, E.V. and A.M.-L.; formal analysis, E.V.; funding acquisition, E.V. and A.M.-L.; investigation, E.H., A.-C.W., F.F., A.-M.S., E.V. and A.M.-L.; resources, A.-C.W., E.V. and A.M.-L.; writing—original draft preparation, E.H.; writing—review and editing, A.-C.W., F.F., E.V. and A.M.-L.; visualization, E.H. and E.V.; supervision, A.-C.W., F.F., E.V. and A.M.-L.; project administration, A.-C.W., E.V. and A.M.-L.; funding acquisition, 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 part of the 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 Munich and the University of Würzburg. The authors would like to thank the DFG for the financial support.

Institutional Review Board Statement: This animal study was conducted according to paragraph 8 of the German Animal Welfare Act, and was reviewed and approved by the Regional Government of Upper Bavaria, Munich, Germany (approval number: ROB 55.2-2532.Vet_02-19-64).

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, Rebekka Göldl and Lisa Wurm for their excellent technical support, and Brigitte von Rechenberg for her assistance with the histological evaluation.

Conflicts 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.

Abbreviations

µ-CT	µ-computed tomography
ATMP	Amorphous trimagnesium phosphate
Ca	Calcium
CMPC	$Ca_{0.75}Mg_{2.25}(PO_4)_2$ post-treated with phosphoric acid
CMPCs	Calcium magnesium phosphate cements
CPCs	Calcium phosphate cements
CTMP	Crystalline trimagnesium phosphate
DAHP	Diammonium hydrogen phosphate
EDX	Energy dispersive X-ray analysis
HA	Hydroxyapatite
Mg	Magnesium
MPC	$Mg_3(PO_4)_2$ post-treated with diammonium hydrogen phosphate
MPCs	Magnesium phosphate cements
mRUST	Modified radiographic union scale for tibial fractures
P	Phosphate
PA	Phosphoric acid, H_3PO_4
PEEK	Polyetheretherketone
PR	Plate removal
RT	Room temperature
SD	Scaffold density
SEM	Scanning electron microscopy
SV	Scaffold volume
TCP	Tricalcium phosphate
Th	Threshold

References

1. Zimmermann, G.; Moghaddam, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* **2011**, *42*, S16–S21. [CrossRef] [PubMed]
2. Valtanen, R.S.; Yang, Y.P.; Gurtner, G.C.; Maloney, W.J.; Lowenberg, D.W. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future? *Injury* **2021**, *52* (Suppl. S2), S72–S77. [CrossRef]
3. Kheirallah, M.; Almeshaly, H. Bone graft substitutes for bone defect regeneration. A collective review. *Int. J. Dent. Oral. Sci.* **2016**, *3*, 247–257.
4. Brunello, G.; Panda, S.; Schiavon, L.; Sivolella, S.; Biasetto, L.; Del Fabbro, M. The Impact of Bioceramic Scaffolds on Bone Regeneration in Preclinical In Vivo Studies: A Systematic Review. *Materials* **2020**, *13*, 1500. [CrossRef]
5. Linhart, W.; Briem, D.; Peters, A.; Lehmann, W.; Windolf, J.; Rueger, J. Resorbierbare Kalziumphosphatzemente. *Trauma Berufskrankh.* **2004**, *6*, 277–284. [CrossRef]
6. Bohner, M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Mater. Today* **2010**, *13*, 24–30. [CrossRef]
7. Battafarano, G.; Rossi, M.; De Martino, V.; Marampon, F.; Borro, L.; Secinaro, A.; Del Fattore, A. Strategies for bone regeneration: From graft to tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1128. [CrossRef]
8. Simon, M.H.; Grünwald, L.; Schenke, M.; Dickschas, J.; Strecker, W. Corrective osteotomies of femur and tibia: Which factors influence bone healing? *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* **2020**, *140*, 303–311. [CrossRef]
9. Fernandez de Grado, G.; Keller, L.; Idoux-Gillet, Y.; Wagner, Q.; Musset, A.M.; Benkirane-Jessel, N.; Bornert, F.; Offner, D. Bone substitutes: A review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J. Tissue Eng.* **2018**, *9*, 2041731418776819. [CrossRef]
10. Schröter, L.; Kaiser, F.; Stein, S.; Gbureck, U.; Ignatius, A. Biological and mechanical performance and degradation characteristics of calcium phosphate cements in large animals and humans. *Acta Biomater.* **2020**, *117*, 1–20. [CrossRef]
11. 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]
12. Pina, S.; Ferreira, J.M. Brushite-forming Mg-, Zn-and Sr-substituted bone cements for clinical applications. *Materials* **2010**, *3*, 519–535. [CrossRef]
13. 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]
14. Witte, F.; Kaese, V.; Haferkamp, H.; Switzer, E.; Meyer-Lindenberg, A.; Wirth, C.J.; Windhagen, H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3557–3563. [CrossRef] [PubMed]
15. Witte, F.; Ulrich, H.; Palm, C.; Willbold, E. Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone remodeling. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *81*, 757–765. [CrossRef]
16. Fuchs, A.; Kreczy, D.; Brückner, T.; Gbureck, U.; Stahlhut, P.; Bengel, M.; Hoess, A.; Nies, B.; Bator, J.; Klammert, U.; et al. Bone regeneration capacity of newly developed spherical magnesium phosphate cement granules. *Clin. Oral. Investig.* **2021**, *26*, 2619–2633. [CrossRef]
17. Ostrowski, N.; Lee, B.; Hong, D.; Enick, P.N.; Roy, A.; Kumta, P.N. Synthesis, Osteoblast, and Osteoclast Viability of Amorphous and Crystalline Tri-Magnesium Phosphate. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 52–63. [CrossRef] [PubMed]
18. Roy, M.; Bose, S. Osteoclastogenesis and osteoclastic resorption of tricalcium phosphate: Effect of strontium and magnesium doping. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100*, 2450–2461. [CrossRef]
19. Kanter, B.; Vikman, A.; Bruckner, T.; Schamel, M.; Gbureck, U.; Ignatius, A. Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model. *Acta Biomater.* **2018**, *69*, 352–361. [CrossRef]
20. 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 Biomater.* **2022**, *145*, 358–371. [CrossRef]
21. 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]
22. 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]
23. 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. [CrossRef]
24. Kowalewicz, K.; Waselau, A.C.; Feichtner, F.; Schmitt, A.M.; Brückner, M.; Vorndran, E.; Meyer-Lindenberg, A. Comparison of degradation behavior and osseointegration of 3D powder-printed calcium magnesium phosphate cement scaffolds with alkaline or acid post-treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 998254. [CrossRef]
25. Ewald, A.; Kreczy, D.; Bruckner, 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]
26. Vorndran, E.; Klarner, M.; Klammert, U.; Grover, L.M.; Patel, S.; Barralet, J.E.; Gbureck, U. 3D powder printing of β-tricalcium phosphate ceramics using different strategies. *Adv. Eng. Mater.* **2008**, *10*, B67–B71. [CrossRef]
27. 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] [PubMed]
28. Vorndran, E.; Wunder, K.; Moseke, C.; Biermann, I.; Müller, F.A.; Zorn, K.; Gbureck, U. Hydraulic setting $Mg_3(PO_4)_2$ powders for 3D printing technology. *Adv. Appl. Ceram.* **2011**, *110*, 476–481. [CrossRef]

29. 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. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2019**, *98*, 1145–1158. [CrossRef]
30. Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474–5491. [CrossRef]
31. 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] [PubMed]
32. Schaufler, C.; Schmitt, A.M.; Moseke, C.; Stahlhut, P.; Geroneit, I.; Brückner, M.; Meyer-Lindenberg, A.; Vorndran, E. Physico-chemical degradation of calcium magnesium phosphate (stanfieldite) based bone replacement materials and the effect on their cytocompatibility. *Biomed. Mater.* **2022**, *18*, 015022. [CrossRef] [PubMed]
33. *ISO 13175-3:2012*; Implants for Surgery—Calcium Phosphates—Part 3: Hydroxyapatite and Beta-Tricalcium Phosphate Bone Substitutes. ISO: Geneva, Switzerland, 2012.
34. 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]
35. Schmidt, M.; Waselau, A.C.; Feichtner, F.; Julmi, S.; Klose, C.; Maier, H.J.; Wriggers, P.; Meyer-Lindenberg, A. In vivo investigation of open-pored magnesium scaffolds LAE442 with different coatings in an open wedge defect. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2022**, *20*, 22808000221142679. [CrossRef] [PubMed]
36. Brosset, T.; Pasquier, G.; Migaud, H.; Gougeon, F. Opening wedge high tibial osteotomy performed without filling the defect but with locking plate fixation (TomoFix™) and early weight-bearing: Prospective evaluation of bone union, precision and maintenance of correction in 51 cases. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **2011**, *97*, 705–711. [CrossRef] [PubMed]
37. Whelan, D.B.; Bhandari, M.; Stephen, D.; Kreder, H.; McKee, M.D.; Zdero, R.; Schemitsch, E.H. Development of the radiographic union score for tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation. *J. Trauma* **2010**, *68*, 629–632. [CrossRef] [PubMed]
38. Litrenta, J.; Tornetta, P., 3rd; Mehta, S.; Jones, C.; O'Toole, R.V.; Bhandari, M.; Kottmeier, S.; Ostrum, R.; Egol, K.; Ricci, W.; et al. Determination of Radiographic Healing: An Assessment of Consistency Using RUST and Modified RUST in Metadiaphyseal Fractures. *J. Orthop. Trauma* **2015**, *29*, 516–520. [CrossRef]
39. Leow, J.M.; Clement, N.D.; Tawonsawatruk, T.; Simpson, C.J.; Simpson, A.H. The radiographic union scale in tibial (RUST) fractures: Reliability of the outcome measure at an independent centre. *Bone Joint Res.* **2016**, *5*, 116–121. [CrossRef]
40. Stengele, A. Systematische Analyse der Abbindereaktion von Magnesiumphosphat mit Polyacrylsäure im Vergleich zu Klassischen Wässrigen Zementsystemen. Ph.D. Thesis, Universität Würzburg, Würzburg, Germany, 2017.
41. Gefel, E. Zelluläre Resorption 3D-Gedruckter Knochenimplantate auf Basis von Calciummagnesiumphosphaten. Ph.D. Thesis, Universität Würzburg, Würzburg, Germany, 2023.
42. 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 Eng. Part A* **2012**, *18*, 870–881. [CrossRef]
43. Klammert, U.; Reuther, T.; Blank, M.; Reske, I.; Barralet, J.E.; Grover, L.M.; Kübler, A.C.; Gbureck, U. Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1529–1535. [CrossRef]
44. Bavya Devi, K.; Lalzawmliana, V.; Saidivya, M.; Kumar, V.; Roy, M.; Kumar Nandi, S. Magnesium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Engineering. *Chem. Rec.* **2022**, *22*, e202200136. [CrossRef] [PubMed]
45. 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] [PubMed]
46. Castilho, M.; Rodrigues, J.; Vorndran, E.; Gbureck, U.; Quental, C.; Folgado, J.; Fernandes, P.R. Computational design and fabrication of a novel bioresorbable cage for tibial tuberosity advancement application. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *65*, 344–355. [CrossRef] [PubMed]
47. 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. *Bioact. Mater.* **2023**, *19*, 376–391. [CrossRef] [PubMed]
48. Castilho, M.; Dias, M.; Vorndran, E.; Gbureck, U.; Fernandes, P.; Pires, I.; Gouveia, B.; Armés, H.; Pires, E.; Rodrigues, J. Application of a 3D printed customized implant for canine cruciate ligament treatment by tibial tuberosity advancement. *Biofabrication* **2014**, *6*, 025005. [CrossRef] [PubMed]
49. Vorndran, E.; Ewald, A.; Müller, F.A.; Zorn, K.; Kufner, A.; Gbureck, U. Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO4 system. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 429–436. [CrossRef] [PubMed]
50. 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. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *94*, 42–50. [CrossRef] [PubMed]
51. Takahashi, T.; Yamamoto, M.; Ioku, K.; Goto, S. Relationship between compressive strength and pore structure of hardened cement pastes. *Adv. Cem. Res.* **1997**, *9*, 25–30. [CrossRef]
52. 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]

53. Fiset, S.; Godbout, C.; Crookshank, M.C.; Zdero, R.; Nauth, A.; Schemitsch, E.H. Experimental Validation of the Radiographic Union Score for Tibial Fractures (RUST) Using Micro-Computed Tomography Scanning and Biomechanical Testing in an in-Vivo Rat Model. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2018**, *100*, 1871–1878. [CrossRef]
54. Mısır, A.; Yıldız, K.İ.; Kızkapan, T.B.; Uzun, E.; Özçamdallı, M.; Oğuzkaya, S. Reliability of rust and modified rust scores for evaluation of union in pediatric and adult femoral shaft fractures. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* **2021**, *55*, 127–133. [CrossRef] [PubMed]
55. Claes, L.; Recknagel, S.; Ignatius, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 133–143. [CrossRef] [PubMed]
56. Féron, J.M.; Mauprivez, R. Fracture repair: General aspects and influence of osteoporosis and anti-osteoporosis treatment. *Injury* **2016**, *47* (Suppl. S1), S10–S14. [CrossRef] [PubMed]
57. Kanter, B. Osseointegration Kalthärtender Knochenzemente im Schafmodell. Ph.D. Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany, 2014.
58. Planzer, K. Variable Fixation Locking Screw (VFLS): Investigation of Bone healing with a Device Intended to Optimize Strain and Micromotion for Each Phase of Fracture Healing. Ph.D. Thesis, University of Zurich, Zurich, Switzerland, 2019.
59. Naghavi, S.A.; Tamaddon, M.; Garcia-Souto, P.; Moazen, M.; Taylor, S.; Hua, J.; Liu, C. A novel hybrid design and modelling of a customised graded Ti-6Al-4V porous hip implant to reduce stress-shielding: An experimental and numerical analysis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1092361. [CrossRef] [PubMed]
60. Claes, L.; Eckert-Hübner, K.; Augat, P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J. Orthop. Res.* **2002**, *20*, 1099–1105. [CrossRef] [PubMed]
61. Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11*, 45–54. [CrossRef] [PubMed]
62. Perren, S.; Fernandez, A.; Regazzoni, P. Understanding fracture healing biomechanics based on the "strain" concept and its clinical applications. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* **2015**, *82*, 253–260. [CrossRef] [PubMed]
63. 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]
64. Nuss, K.M.; von Rechenberg, B. Biocompatibility issues with modern implants in bone—A review for clinical orthopedics. *Open Orthop. J.* **2008**, *2*, 66–78. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IV. DISKUSSION

Die medizinische Versorgung komplexer, großer Knochendefekte stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Autologe und allogene Transplantate, die bisher häufig zur Versorgung von Knochendefekten verwendeten wurden, weisen einige Nachteile auf, darunter begrenzte Verfügbarkeit, Morbidität der Entnahmestelle, verlängerte Operationsdauer, potenzielle Infektionsübertragung oder Abstoßungsreaktionen (Sen und Miclau 2007). Daher wurden synthetische Knochenersatzmaterialien entwickelt, um diese Limitationen zu überwinden, da diese unbegrenzt verfügbar sowie in Form und Zusammensetzung anpassbar sind und das Risiko der Krankheitsübertragung umgangen wird (Zimmermann und Moghaddam 2011, Kheirallah und Almeshaly 2016, Valtanen et al. 2021). Ein ideales Knochenersatzmaterial sollte biokompatibel, osteokonduktiv und mechanisch stabil sein sowie hinsichtlich seiner Degradationsrate mit der Knochenregenerationsrate korrelieren, um eine optimale Integration des Scaffolds in den Knochen zu gewährleisten (Brunello et al. 2020).

Bisherige Studien haben gezeigt, dass MPCs den bereits etablierten CPCs überlegen sind (Ostrowski et al. 2016). MPCs wurden bisher sowohl in unbelasteten (Yu et al. 2010, Kanter et al. 2014, Golafshan et al. 2020) als auch in Form von Pasten in teilbelasteten (Kanter et al. 2018, Kaiser et al. 2022) Tiermodellen untersucht und zeigten neben einer exzellenten Biokompatibilität und einem positiven Einfluss auf die Knochenregeneration auch verbesserte Degradationsraten aufgrund ihrer höheren *in-vivo*-Löslichkeit sowie eine höhere Primärstabilität im Vergleich zu CPCs (Ostrowski et al. 2016, Gelli und Ridi 2023).

CMPCs zeigten in bisherigen Studien hervorragende und gegenüber reinen CPCs und MPCs teils überlegene Ergebnisse bezüglich ihrer Biokompatibilität sowie ihres Degradations- und Osseointegrationsverhaltens (Ostrowski et al. 2016). Bisher wurden sie jedoch nur in unbelasteten Defekten untersucht (Wu et al. 2008b, Ewald et al. 2019, Fuchs et al. 2021, Kowalewicz et al. 2022). In der *in-vivo*-Studie von Kowalewicz et al. (2022) wurde das Material Mg225p in einem unbelasteten Bohrlochdefektmodell untersucht, wobei es hervorragende Ergebnisse hinsichtlich Osseointegration, Degradation und Osteogenese zeigte. Im teilbelasteten Knochen wurde dieses vielversprechende Material bislang noch nicht in der zugänglichen Literatur untersucht. Daher sollte es in der vorliegenden Studie weiter erforscht

werden (Hemmerlein et al. 2024). Es wird in der vorliegenden Arbeit als CMPC225 bezeichnet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, 3D-pulvergedruckte, keilförmige Scaffolds auf CMPC- bzw. MPC-Basis zum ersten Mal in einem segmentalen, teilbelasteten Defektmodell am Kaninchen hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, Stabilität und ihres Degradations- und Osseointegrationsverhaltens *in vivo* zu untersuchen.

Für die Evaluation von Knochenimplantaten können verschiedene Tierarten eingesetzt werden, darunter Mäuse, Ratten, Kaninchen, Schweine und kleine Wiederkäuer (Wancket 2015). Für die vorliegende Arbeit wurden Kaninchen verwendet (Hemmerlein et al. 2024), da dieses Tiermodell in der orthopädischen Forschung bereits gut etabliert ist. Zudem sind Kaninchen vergleichsweise einfach in der Handhabung. Ihre skelettale Reife wird im Vergleich zu Großtieren bereits früh nach etwa 6 Monaten erreicht (Wancket 2015). Kaninchenhintergliedmaßen werden häufig für kortikale und spongiöse KEM-Studien genutzt, da die Tibia aufgrund des geringen Weichteilanteils gut zugänglich ist und der Femur ausreichend Markraum für Studien zur internen Fixierung bietet (Wancket 2015). Nachteile sind jedoch, dass der Knochenstoffwechsel von Kaninchen im Vergleich zu dem des Menschen schneller abläuft. Daher sind die Studien weniger repräsentativ für die Knochenheilung von Erwachsenen und eignen sich eher für eine erste Evaluation der Funktionalität eines Knochenersatzstoffes (Wancket 2015).

Segmentale Defektmodelle an langen Röhrenknochen dienen u. a. zur Untersuchung der mechanischen Stabilität und wurden bisher bereits an einigen Tierarten angewendet, wie zum Beispiel an Schafen, Ziegen oder Schweinen. Sie sind häufig an der proximalen Tibia, dem Femurhals oder dem Metatarsus lokalisiert (Reichert et al. 2009, McGovern et al. 2018). Das keilförmige Defektmodell an der proximalen Kaninchentibia, das einer aufklappenden Korrekturosteotomie ähnelt (Brosset et al. 2011), wurde zur Untersuchung teilbelasteter KEMs bereits in der Studie von Schmidt et al. (2022) eingesetzt und eignete sich daher auch für die Anwendung in der vorliegenden Studie (Hemmerlein et al. 2024).

Für die Versorgung komplexerer Defekte ist das 3D-Pulverdruckverfahren

hervorragend geeignet, da es die Herstellung dimensionsgenauer, patientenspezifischer Knochenimplantate mit anpassbarer Makrostruktur und somit eine optimale Scaffoldintegration ermöglicht (Castilho et al. 2014, Castilho et al. 2017, Wen et al. 2017). Auch in der eigenen Studie konnten passgenaue, 3D-pulvergedruckte Scaffolds hergestellt werden (Hemmerlein et al. 2024).

In einigen bisherigen Studien wurde TCP aufgrund seiner hervorragenden Biokompatibilität und guten Osseointegration als Referenzmaterial verwendet (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Kowalewicz et al. 2022). In der vorliegenden Studie wurde jedoch auf eine Kontrollgruppe mit TCP verzichtet, da aus der Literatur ebenfalls bekannt ist, dass es aufgrund seiner Sprödigkeit über eine geringe mechanische Festigkeit verfügt und somit nicht für teil- bzw. vollbelastete Defekte geeignet ist (Bohner 2000, Ambard und Mueninghoff 2006, Eliaz und Metoki 2017). Dies wurde auch berücksichtigt, um die Versuchstierzahl aus ethischen Gründen zu reduzieren.

Die vor der Implantation gemessenen Druckfestigkeiten und offenen Porositäten von CMPC225 und MPC3 unterschieden sich in der vorliegenden Studie signifikant voneinander. MPC3 wies sowohl eine höhere Druckfestigkeit als auch eine niedrigere offene Porosität als CMPC225 auf (Hemmerlein et al. 2024). Diese inverse Korrelation ist bereits aus der Literatur bekannt (Karageorgiou und Kaplan 2005, Vorndran et al. 2011a, Wang et al. 2019). Trotz der niedrigeren offenen Porosität von MPC3 im Vergleich zu CMPC225 degradierte MPC3 schneller (Hemmerlein et al. 2024). Orr et al. (2001) stellten zwischen der 6. und 26. Woche nach der Implantation von HA-Partikeln in Bohrlochdefekte bei Kaninchen eine steigende Druckfestigkeit fest. Sie führten diese Entwicklung auf die erhöhte Knochendichte zurück, die durch die allmähliche Durchbauung des Defekts mit neu gebildetem Knochengewebe bedingt sein könnte. Auch in der vorliegenden Studie kann angenommen werden, dass es infolge des einwachsenden Knochens in den Implantationsbereich zu einer Erhöhung der Druckfestigkeit der Defekte gekommen ist. Da die Druckfestigkeiten der Scaffolds bzw. Defekte in der vorliegenden Studie über den zeitlichen Verlauf *in vivo* jedoch nicht näher untersucht wurden, sollte dieser Aspekt in zukünftigen Studien weiter analysiert werden.

Die Nachbehandlung beider Materialien mittels Säure oder Base zur Erhöhung der finalen Festigkeit hatte in der vorliegenden Studie eine partielle

Phasenumwandlung zur Folge (Hemmerlein et al. 2024). Bei der Nachbehandlung von MPC3 mit DAHP (basische Nachbehandlung) wurde Farringtonit, wie auch in der Literatur beschrieben (Stengele 2017), teilweise zu Struvit umgewandelt. Die Nachbehandlung von CMPC225 mit PA (saure Nachbehandlung) führte zu einer partiellen Umwandlung von Farringtonit und Stanfieldit zu Newberyit und Bruschit, wie ebenfalls bereits aus der Literatur bekannt (Gefel 2023). Eine Steigerung der Druckfestigkeit von Farringtonit durch Nachbehandlung mit PA oder DAHP unter Entstehung von Struvit bzw. Newberyit wurde in der Literatur bereits beschrieben (Vorndran et al. 2011b). In der Studie von Vorndran et al. (2011b) konnte mithilfe der Nachhärtung durch hydraulische Reaktion zwischen dem Zementpulver und den Binderflüssigkeiten die Umwandlungsrate gesteigert und infolgedessen die Druckfestigkeiten der gedruckten Proben von 1,3–2,8 MPa auf 10 MPa bei Struvit und auf bis zu 36 MPa bei Newberyit erhöht werden. Das in den Studien von Kowalewicz et al. (2021, 2022) untersuchte und mit DAHP nachbehandelte Mg225d zeigte im Vergleich zum unbehandelten Mg225 ebenfalls eine höhere Druckfestigkeit sowie eine Verringerung der Porosität und degradierte schneller als das sauer nachbehandelte Mg225p. Kowalewicz et al. (2022) gingen davon aus, dass die tatsächliche Porosität und Porengröße von Mg225d viel größer waren als bei Mg225p, da die REM- und EDX-Analysen der Scaffolds vor der Implantation zeigten, dass Mg225d große, interkonnektierende Poren aufwies, welche bei der Quecksilberporosimetrie nicht erfasst wurden, weil sie entweder verschlossen waren oder außerhalb des Messbereichs lagen. Die höhere Porosität und Porengröße beschleunigten den Degradationsprozess von Mg225d zusätzlich (Kowalewicz et al. 2022). Ein vergleichbarer Einfluss auf die Degradation wird auch für das in dieser Arbeit untersuchte MPC3 angenommen, da auch hier in den REM- und EDX-Analysen größere Poren im Vergleich zu CMPC225 gesehen werden konnten (Hemmerlein et al. 2024).

Wie bereits in vorangegangenen Studien beschrieben (Wu et al. 2008b, Ewald et al. 2019, Kaiser et al. 2022, Kowalewicz et al. 2022), zeigten beide Materialien auch in der vorliegenden Studie insgesamt eine gute klinische Verträglichkeit (Hemmerlein et al. 2024). Alle Tiere zeigten eine physiologische Wundheilung. Postoperativ konnten bei allen Tieren Lahmheiten beobachtet werden, welche auf die Invasivität des Eingriffs zurückzuführen sind und ebenfalls bei der von Schmidt et al. (2022) verwendeten Operationsmethode bei Kaninchen beschrieben worden

sind. Bei drei Tieren wurde in der vorliegenden Studie eine asymmetrische endostale Kallusverteilung in den µCT- und histologischen Untersuchungen beobachtet (Hemmerlein et al. 2024). Dabei wurde vermehrt Kallusgewebe distal der Scaffolds gebildet. Schmidt et al. (2022) stellten in ihrer Studie ebenfalls fest, dass etwas mehr Kallusgewebe distal der Scaffolds als proximal davon gebildet wurde. Sie nahmen an, dass dies auf die Wasserstoffgasbildung beim Abbau von Mg in der untersuchten Mg-Legierung LAE442 zurückzuführen ist, da das Gas vermutlich nach proximal aufgestiegen ist und somit die proximale Kallusbildung beeinträchtigte (Schmidt 2023). Eine solche Gasbildung ist jedoch nur bei der Korrosion von Mg-Legierungen und nicht beim Abbau von Magnesiumphosphaten beschrieben, da es hier lediglich zu einer Freisetzung von biokompatiblen Mg^{2+}- und Hydrogenphosphat-Ionen kommt (Staiger et al. 2006, Nabiyouni et al. 2018). Da die asymmetrische Kallusverteilung in der vorliegenden Studie nur bei vereinzelten Tieren auftrat, die sich klinisch zudem nicht von den übrigen Versuchstieren unterschieden, wurde vermutet, dass diese asymmetrische Kallusbildung auf geringgradige Defektlockerungen zurückzuführen ist, die durch postoperative Belastungen verursacht wurden. Bei sechs Tieren wurden röntgenologisch Fibulafrakturen innerhalb der ersten beiden Wochen nach der Implantation festgestellt (Hemmerlein et al. 2024). Sie traten materialunabhängig auf und sind vermutlich auf das Bohren beim Anbringen der PEEK-Platte zurückzuführen. In einer Studie von Shefelbine et al. (2005) wurde der Einfluss einer intakten Fibula auf den Heilungsprozess einer osteotomierten Tibia bei Ratten untersucht. Ihre Ergebnisse zeigten, dass Tiere mit einer zusätzlichen Fibulafraktur eine verzögerte Heilung im Vergleich zu Tieren mit intakter Fibula aufwiesen. In der vorliegenden Studie zeigten die betroffenen Tiere jedoch keine abweichenden Symptome oder Auffälligkeiten hinsichtlich der weiteren Scaffolddegradation und Wund- bzw. Knochenheilung. Dies könnte auf Unterschiede in der mechanischen Belastung der operierten Tibiae zwischen Ratten und Kaninchen oder auf die Operationsmethode zurückzuführen sein. Zur weiteren Optimierung der Operationsmethode und Standardisierung der Defekte könnte zukünftig der Einsatz einer Bohr- und Sägeführung in Betracht gezogen werden. Dies würde eine exakte Platzierung der Bohrlöcher ermöglichen, das Risiko unbeabsichtigter Verletzungen umliegender Strukturen reduzieren und die Reproduzierbarkeit der Defekte verbessern, wie es auch von Poser et al. (2014) vorgeschlagen wurde.

Die Scaffoldsichtbarkeit, welche in der vorliegenden Studie anhand von Röntgenaufnahmen evaluiert wurde, nahm bei beiden untersuchten Materialien über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich ab, was eine progressive Degradation indiziert (Hemmerlein et al. 2024). In einer Studie von Fuchs et al. (2021) konnte bei der Untersuchung von CMPC-Granulaten ebenfalls über den Beobachtungszeitraum von 12 Wochen ein zunehmender Verlust der Radioopazität festgestellt werden. CMPC225 war in der vorliegenden Arbeit länger röntgenologisch sichtbar als MPC3 (Hemmerlein et al. 2024). Dies lässt auf eine schnellere Degradation von MPC3 schließen, könnte jedoch auch auf den Gehalt von röntgendichtem Calcium in CMPC225 zurückzuführen sein. Die deutlichere und verlängerte Sichtbarkeit von CPCs gegenüber MPCs und CMPCs in Röntgenaufnahmen ist aus der Literatur bekannt (Klammert et al. 2011, Fuchs et al. 2021, Kowalewicz et al. 2022). Nach 20 Wochen waren in der vorliegenden Studie im Röntgen keine Scaffoldreste mehr sichtbar, im µCT konnten nur noch vereinzelt Materialreste beobachtet werden, wodurch eine fast vollständige Degradation angenommen werden kann (Hemmerlein et al. 2024).

In der vorliegenden Arbeit wurde ab der zweiten Woche nach der Implantation eine radioluzente Resorptionszone um das Scaffold herum beobachtet, deren Ausprägung materialabhängig variierte und bei MPC3 stärker ausgeprägt war als bei CMPC225 (Hemmerlein et al. 2024). Solche Zonen sind bereits aus der Literatur bekannt und werden mit einer beschleunigten Degradation in Verbindung gebracht (Apelt et al. 2004, Kaiser et al. 2022). Zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Breite der Resorptionszone und der Scaffoldintegration: Eine größere Ausprägung dieser Zone war mit einem reduzierten Scaffold-Knochenkontakt assoziiert, was darauf hindeutet, dass eine übermäßige Degradation die direkte Integration des Materials in das umliegende Knochengewebe beeinträchtigen könnte (Hemmerlein et al. 2024). Ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Osseointegration ist das Zusammenspiel zwischen Scaffolddegradation und Knochenregeneration (Freed et al. 1994, Kheirallah und Almeshaly 2016). Während in der vorliegenden Studie CMPC225 eine nahezu vollständige Integration in das neugebildete Knochengewebe zeigte, war bei MPC3 zu diesem Zeitpunkt entweder ein weitgehender Abbau der Scaffolds oder das Vorhandensein einer ausgeprägten Resorptionszone erkennbar. Obwohl auch bei dem hier untersuchten MPC3 neues

Knochengewebe um das Scaffold herum gebildet wurde, stimmte hierbei jedoch die Degradationsrate nicht mit der Knochenregenerationsrate überein (Hemmerlein et al. 2024). Da das Scaffold während der Knochenheilung als temporäre mechanische Stütze dient, ist ein abgestimmtes Verhältnis zwischen Degradationsgeschwindigkeit und Knochenregeneration essenziell, damit die Last schrittweise vom Scaffold auf den regenerierenden Knochen übertragen werden kann (Bohner 2010, Sheikh et al. 2015, Li et al. 2016, Brunello et al. 2020). Eine zu schnelle Degradation kann zu einem frühzeitigen Stabilitätsverlust führen, da sich vermehrt fibröses Gewebe um das Scaffold bildet (Nuss und von Rechenberg 2008, Kaiser et al. 2022). Ein zu langes Verbleiben eines Implantats kann Fremdkörperreaktionen oder chronische Entzündungen hervorrufen (Li et al. 2021). In der vorliegenden Studie gab es jedoch keine Hinweise darauf, dass CMPC225 zu langsam degradierte. Vielmehr konnte in allen durchgeführten Untersuchungen eine fortschreitende Degradation des Materials in Verbindung mit einer gleichzeitig zunehmenden Scaffoldintegration beobachtet werden (Hemmerlein et al. 2024). Die unterschiedlichen Degradationsverläufe der untersuchten Materialien verdeutlichen, dass eine präzise Steuerung der Scaffoldabbaugeschwindigkeit essenziell ist, um die Knochenregeneration optimal zu unterstützen (Freed et al. 1994). Künftige Studien sollten daher gezielt untersuchen, in welchem Umfang die Degradationskinetik weiter angepasst werden kann, um eine optimale Osseointegration zu gewährleisten.

Beide Materialien zeigten in der vorliegenden Studie einen ähnlichen Verlauf der Osteoektomieheilung. Diese Knochenheilung wurde mithilfe eines angepassten modifizierten RUST (mRUST, modified Radiographic Union Score for Tibial fractures)-Summen-Scores evaluiert (Hemmerlein et al. 2024). Dieser stellt ein klinisches Bewertungssystem dar, welches verwendet wird, um den Heilungsprozess von tibialen Frakturen anhand von Röntgenbildern zu beurteilen, indem die Kallusbildung und Kontinuität einer Fraktur an den vier Kortizes (medial, lateral, cranial, caudal) analysiert werden. Diese Methode wurde bereits zur Beurteilung von Tibia- und Femurschaftfrakturen bei Menschen und Tiermodellen (Ratten, Mäuse, Schafe) verwendet (Whelan et al. 2010, Litrenta et al. 2015, Leow et al. 2016, Field und Ruthenbeck 2018, Fiset et al. 2018). Eine radiologisch vollständige Osteoektomieheilung, d. h. keine sichtbare Osteotomielinie an allen vier Kortizes und ein mit Kallus verschlossener bzw.

remodelierter Osteoektomiespalt, wurde bei beiden Materialien ab Woche 16 beobachtet (Hemmerlein et al. 2024). Diese Ergebnisse stimmen mit den µ-CT-Analysen überein. In der Studie von Schmidt et al. (2022), in welcher ein vergleichbares Defektmodell mit derselben Operationsmethode verwendet wurde, konnte ein vollständiger Schluss des Osteoektomiespaltes erst nach 28 Wochen in Gruppe 1 (LAE442-Scaffold mit MgF_2-Beschichtung) und nach 32 Wochen in Gruppe 2 (LAE442-Scaffold mit MgF_2/CaP-Beschichtung) radiologisch beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die in der vorliegenden Studie verwendeten Materialien potenziell positive Auswirkungen auf die Osteoektomieheilung haben. In den histologischen Analysen der vorliegenden Arbeit wurde der vollständige Schluss der Trans-Kortizes (lateral) nach 12 Wochen bei allen Tibiae beobachtet. Die Cis-Kortizes (medial, unter der PEEK-Platte) waren nach 12 Wochen bei allen CMPC-Tieren und bei der Mehrheit der MPC-Tibiae geschlossen (Hemmerlein et al. 2024). Die schnellere Überbrückung der medialen Seite bei CMPC225 im Vergleich zu MPC3 könnte auf die möglicherweise höhere osteogene Effizienz von CMPCs gegenüber MPCs sowie auf die schmalere Resorptionszone bei CMPC225 zurückzuführen sein. Zeng et al. (2012) analysierten die Wirkung von Granulaten aus MPCs, CPCs und CMPCs auf die Zellproliferation und die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen sowie auf die Knochenneubildung *in vivo* im Rahmen einer Sinuselevation bei Kaninchen. Ihre Ergebnisse zeigten, dass CMPCs im Vergleich zu MPCs eine erhöhte Zellproliferation und -differenzierung förderten und zudem im Gegensatz zu reinen CPCs und MPCs ein verstärktes Knochenwachstum *in vivo* begünstigten. Die Überbrückung des Trans-Kortex erfolgte in der vorliegenden Studie früher als die des Cis-Kortex (Hemmerlein et al. 2024), was einerseits durch den größeren Abstand zwischen den Defektenden am Cis-Kortex bedingt ist und andererseits darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Knochenneubildung unter der Platte mechanisch beeinträchtigt wurde und keine interfragmentären Bewegungen zur Stimulation des Heilungsprozesses beitragen konnten, wie sie von Claes et al. (2012) und Planzer (2019) beschrieben wurden. In der vorliegenden Studie wurde die Kortikalis durch die Plattenfixierung in diesem Bereich teilweise entlastet, wodurch der mechanische Reiz für die Knochenregeneration reduziert wurde (Hemmerlein et al. 2024). Dieses als „Stress Shielding“ bekannte Phänomen kann gemäß dem Wolffschen Gesetz zu einer lokalen Verringerung der Knochendichte führen (Mi et al. 2007, Naghavi et al. 2023).

Beide Gruppen zeigten in der vorliegenden Studie quantitativ eine kontinuierliche Volumenabnahme der Scaffolds aufgrund der voranschreitenden Degradation (Hemmerlein et al. 2024). Hierbei war der Volumen- und Dichteverlust bei MPC3 jedoch etwas ausgeprägter als bei CMPC225. Volumen- und Dichtemessungen konnten nur bis Woche 16 durchgeführt werden, da fast alle Scaffolds ab diesem Zeitpunkt nicht mehr sichtbar bzw. aufgrund einer knochenähnlichen Röntgendichte nicht mehr eindeutig vom umliegenden Knochen abgrenzbar waren. Diese Beobachtung ist für MgP-Pasten und auch andere CaP-Implantate bereits aus der Literatur bekannt (Huber et al. 2009, Kanter 2014). µCT- und Röntgenuntersuchungen eignen sich gut, um röntgendichte Strukturen abzubilden und den Verlauf der Degradation bzw. der Knochenheilung in den frühen Wochen nach der Implantation *in vivo* zu evaluieren. Aufgrund der dem Knochen ähnlichen Röntgendichte der hier untersuchten Materialien sind diese Methoden jedoch eher ungeeignet, um das Degradations- und Osseointegrationsverhalten zu späteren Beobachtungszeitpunkten zu untersuchen.

Eine mögliche Ursache für die beschleunigte Degradation des untersuchten MPC3 im Vergleich zu CMPC225 liefert die *in-vivo*-Studie von Kowalewicz et al. (2022). Hierbei wurde unter anderem der Zusammenhang zwischen der chemischen Löslichkeit und dem Einfluss des Massenanteils der Bindemittelphasen Farringtonit, Struvit, Bruschit und Newberyit auf die Abbaugeschwindigkeit der Scaffolds diskutiert. Da aus der Literatur bekannt ist, dass Newberyit die höchste chemische Löslichkeit aufweist, gefolgt von Bruschit und anschließend Struvit (Ostrowski et al. 2016), könnte angenommen werden, dass Newberyit-bildende Scaffolds schneller degradieren als Struvit-bildende Scaffolds. In der Studie von Kowalewicz et al. (2022) kam es durch die alkalische bzw. saure Nachbehandlung der Zemente, wie auch in der vorliegenden Arbeit, zu einer Phasenumwandlung zu Struvit bzw. Newberyit und Bruschit (Hemmerlein et al. 2024). Dies wurde auch in der Literatur von anderen Autoren beschrieben (Klammert et al. 2011, Kanter et al. 2018, Gefel et al. 2022). Die schnelllöslichen Binderphasen halten die schwerlöslichen Phasen Farringtonit und Standfieldit zusammen. Kowalewicz et al. (2022) stellten fest, dass die Degradationsgeschwindigkeit nicht abhängig davon ist, welche Binderphase sich gebildet hat, sondern vom Masseanteil der jeweiligen Binderphase beeinflusst wird. Eine mögliche Erklärung für die schnellere Degradation von MPC3 in der vorliegenden Studie könnte daher sein, dass sich der

relativ geringe, schnelllösliche Struvitanteil (19 Ma.-%) möglicherweise schneller aufgelöst hat, so dass das Zementrohmaterial nicht mehr ausreichend zusammengehalten wurde und MPC3 dadurch schneller an Integrität verlor. Aufgrund des bei CMPC225 höheren Massenanteils an schnelllöslichen Binderphasen dauerte die Auflösung von Newberyit (58 Ma.-%) und Bruschit (10,9 Ma.-%) länger, was die Scaffolddegradation im Vergleich zu MPC3 möglicherweise verlangsamte (Hemmerlein et al. 2024). Ostrowski et al. (2016) stellten die Hypothese auf, dass die chemische Degradation bei CMPC vom CaP-zu-MgP-Verhältnis abhängig ist, wobei die Degradation zunimmt, je höher der MgP-Gehalt ist. Ewald et al. (2019) konnten in ihrer Studie jedoch feststellen, dass ein höherer MgP-Gehalt der untersuchten Zemente nicht mit einer höheren Auflösung einhergeht. Eine ähnliche Beobachtung machten Gefel et al. (2022) in einer *in-vitro*-Studie. Sie untersuchten unter anderem die Korrelation zwischen der Auflösungsgeschwindigkeit anhand der damit verbundenen Ionenfreisetzung magnesiumhaltiger Zemente und dem Anteil an schnelllöslichen Phasen (Struvit, Newberyit). Hierbei wurden 3D-pulvergedruckte Magnesiumphosphatkeramiken mit unterschiedlichen Phasen durch alkalische (TMP-D → 24 Ma.-% Struvit) bzw. saure (TMP-P → 43 Ma.-% Newberyit) Nachbehandlung hergestellt und analysiert. Ein Zusammenhang zwischen einem höheren Struvit- oder Newberyit-Anteil und einer höheren Ionenfreisetzung konnte nicht beobachtet werden. Gefel et al. (2022) stellten fest, dass Struvit-bildende Zemente trotz des geringeren Massenanteils und der geringeren Löslichkeit insgesamt eine höhere chemische Degradation als die Newberyit-bildenden Zemente zeigten. Somit decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Erkenntnissen aus der bisherigen Literatur.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei MPC3 in den µCT- und REM-Analysen, sowie histologisch eine abgrenzbare Randzone innerhalb der Scaffolds beobachtet, bei der es sich vermutlich um Struvit handelte. In den REM-Untersuchungen konnte zudem festgestellt werden, dass sich in der Mitte der MPC3-Scaffolds ein Bereich aus nicht umgesetztem Farringtonit befand (Hemmerlein et al. 2024). Eine ähnliche Beobachtung machten auch Kowalewicz et al. (2022) im Scaffoldzentrum von mit DAHP nachbehandelten CMPC-Zylindern. Somit ist davon auszugehen, dass die Bildung von Struvit in den mit DAHP nachbehandelten Scaffolds ungleichmäßig stattfand und vor allem im Randbereich auftrat. Dieser löste sich schneller auf, und das restliche verbleibende Zementrohmaterial wurde nicht mehr

zusammengehalten und degradierte (Hemmerlein et al. 2024). Auch in der *in-vivo*-Studie von Kanter et al. (2018) konnte eine zentripetale Degradation mit initialem Zerfall der Implantatrandbereiche von Struvit-bildenden MPC-Pasten beobachtet werden. Hierbei konnte nach 4 Monaten ebenfalls noch nicht umgesetzter Zementrohstoff Farringtonit nachgewiesen werden.

In beiden Gruppen der vorliegenden Studie bildete sich ab der 2. Woche ein endostaler und periostaler Kallus, der sich im Laufe der Zeit aufbaute und wieder zurückbildete. Dieser Kallus wurde auch bei Schmidt et al. (2022) beobachtet, die in ihrer Studie ein ähnliches Defektmodell am Kaninchen verwendeten. Diese Kallusbildung wird auch von anderen Autoren in der bisherigen Literatur im Rahmen der sekundären Frakturheilung als physiologisch betrachtet (Claes et al. 2012, Féron und Mauprivez 2016). Im Vergleich zu CMPC225 zeigte MPC3 nach sechs Wochen eine ausgeprägtere Kallusbildung, die durch histomorphometrische Messungen bestätigt wurde (Hemmerlein et al. 2024). Dies weist ebenfalls auf eine beschleunigte Degradation von MPC3 hin, die möglicherweise zu einem teilweisen Verlust der mechanischen Stabilität führte. Infolgedessen könnte der Knochen durch verstärkte Kallusbildung versucht haben, den Defekt zu stabilisieren, wie es auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Claes et al. 2002, Einhorn und Gerstenfeld 2015). Es ist bekannt, dass biomechanische Belastung einen wesentlichen Einfluss auf die Defektheilung hat, da sie die Zellstimulation im Kallus und damit die Qualität des neu gebildeten Gewebes bestimmt (Perren et al. 2015). Während eine zu geringe Stimulation zu einer verzögerten Heilung oder Nonunion führen kann, begünstigt eine übermäßige Belastung die Bildung von Faserknorpel, was das Risiko einer Pseudarthrose erhöht. Bei einer angemessenen Beweglichkeit des Defekts und einer optimalen Spaltbreite bildet sich Knorpel von geeigneter Qualität, der im weiteren Verlauf remodelliert werden kann (Perren et al. 2015, Planzer 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde das Kallusgewebe in beiden Gruppen im Laufe der Zeit in Knochengewebe umgewandelt und alle operierten Tibiae waren bis zum Ende des Beobachtungszeitraums stabil und frakturfrei, trotz des beschleunigten Abbaus von MPC3 im Vergleich zu CMPC225 (Hemmerlein et al. 2024).

Implantierte Biomaterialien werden vom Körper immer in gewisser Weise als Fremdkörper betrachtet und rufen daher gewisse Zellreaktionen hervor (Nuss und von Rechenberg 2008). Deswegen wurde zur weiteren Evaluation der

Biokompatibilität in der vorliegenden Studie eine histologische Untersuchung durchgeführt (Hemmerlein et al. 2024). Bei der histologischen Untersuchung konnten einige Zellen beobachtet werden, welche sich vor allem in den Randbereichen des Scaffolds, auf dem anwachsenden Knochengewebe sowie innerhalb der Resorptionszone befanden. Im Verlauf der zentripetalen Degradation lösten sich die Zementpartikel zunächst im Randbereich und ermöglichten so ein weiteres Einwandern der Zellen, was insbesondere bei MPC3 die Degradation weiter beschleunigte. Die zellreiche Resorptionszone enthielt Osteoprogenitorzellen, Fibroblasten, Fibrozyten, Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, sowie Lymphozyten und Blutgefäße (Hemmerlein et al. 2024). Das Vorkommen dieser Zelltypen in Resorptionszonen ist aus der Literatur bekannt (Apelt et al. 2004, Kaiser et al. 2022, Kowalewicz et al. 2022). Die *in-vivo*-Degradation von CaP-basierten Materialien erfolgt sowohl durch eine passive chemisch-physikalische Auflösung der Zementmatrix als auch durch eine aktive, zellvermittelte Resorption, an der u. a. Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen beteiligt sind (Lodoso-Torrecilla et al. 2021). Dieser Prozess wird auch für CMPC-Scaffolds angenommen (Wei et al. 2010). In der *in-vivo*-Studie von Wu et al. (2008b) wurde die Degradation von zylindrischen CMPC-Scaffolds über 6 Monate nach Implantation in Bohrlochdefekte am Kaninchen beobachtet. Es bildete sich neues Knochengewebe, das allmählich in die Scaffolds einwuchs, während sich die Scaffolds auflösten. Es wurde vermutet, dass die chemische Auflösung der CMPC-Scaffolds in der Anfangsphase nach der Implantation stattfand und zu einer Vergrößerung der Mikrostruktur führte, was die spätere aktive Resorption erleichterte. *In-vitro*-Studien vermuteten, dass der Abbau von MgP-Keramiken hauptsächlich durch passive Auflösung erfolgt und Osteoklasten kaum daran beteiligt sind (Großardt et al. 2010, Gefel et al. 2022). *In-vivo*-Studien haben jedoch die Anwesenheit von Osteoklasten im Implantationsbereich gezeigt, was auf ihre aktive Beteiligung am Abbau von MPCs hindeutet (Kim et al. 2016, Kanter et al. 2018, Kaiser et al. 2022). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden bei den untersuchten Materialien Makrophagen sowie mehrkernige Zellen vor allem an den Scaffoldrandbereichen und an einzelnen Partikeln beobachtet, sodass eine aktive Resorption durch diese Zellen vermutet wird (Hemmerlein et al. 2024). Auch in der Studie von Kowalewicz et al. (2022) wird aufgrund der Anwesenheit dieser Zelltypen von einem zellvermittelten Abbau der CMPC-Scaffolds ausgegangen.

Um auch das weitere Knochenremodeling und die Scaffolddegradation nach der Defektheilung beurteilen zu können, wurde in der vorliegenden Studie die PEEK-Platte, die den Defekt bis dahin teilweise stabilisiert hatte, entfernt (Hemmerlein et al. 2024). Da CMPC225 in den ersten Wochen nach der Implantation im Vergleich zu MPC3 eine langsamere, homogenere Degradation und eine bessere Scaffoldintegration zeigte, wurde die Plattenentfernung ausschließlich bei CMPC225 durchgeführt, um die Anzahl der Versuchstiere aus ethischen Gründen zu minimieren (Hemmerlein et al. 2024). Die vollständige Defektheilung der Kortikalis wurde vor der Plattenentfernung mittels µCT und Röntgen kontrolliert. Nach der Plattenentfernung waren alle Tibiae stabil und der Umbau des Knochengewebes schritt weiter voran. Histologisch konnte beobachtet werden, wie sich der Geflechtknochen allmählich in Lamellenknochen umwandelte. Nach 24 Wochen war dieser Prozess bei allen Tieren abgeschlossen. Der Durchmesser der Transcortizes wurde im Laufe der Zeit immer schmaler und näherte sich wieder dem Ausgangszustand an, die ursprüngliche Form der Tibia wurde jedoch auch nach 30 Wochen noch nicht wieder erreicht. Die operierten Kortizes blieben verbreitert und spongiös aufgelockert. Die Knochenmarkhöhle war bei allen Tieren spätestens nach 24 Wochen wieder mit physiologischem Knochenmark gefüllt (Hemmerlein et al. 2024). Dieser Verlauf der Frakturheilung ist nach bisheriger Literatur als physiologisch anzusehen (Claes et al. 2012, Einhorn und Gerstenfeld 2015). In nachfolgenden Studien könnte ein längerer Beobachtungszeitraum verwendet werden, um den weiteren Knochenumbau zu untersuchen.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Zone nicht abreagierten Farringtonits innerhalb von MPC3 sollte der Herstellungs- und Nachbehandlungsprozess weiter überarbeitet werden, um die Fertigung homogener Scaffolds zu gewährleisten. Da CMPC225 vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat (Hemmerlein et al. 2024), könnte dieses Material in weiteren Studien in größeren und voll belasteten Defektmodellen insbesondere hinsichtlich seiner biomechanischen Eigenschaften untersucht werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war es, erstmals 3D-pulvergedruckte Scaffolds auf Basis von CMPC und MPC hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, Stabilität sowie ihres *in-vivo*-Degradations- und Osseointegrationsverhaltens in einem segmentalen, teilbelasteten Kaninchendefektmodell vergleichend zu evaluieren.

Auf Grundlage interner Vorstudien wurden dabei die vielversprechendsten Nachbehandlungsverfahren – PA für CMPC225 und DAHP für MPC3 – ausgewählt und ihr Einfluss auf die genannten Parameter eingehend untersucht. Ziel war es, ein geeignetes Knochenersatzmaterial zu identifizieren, dessen Degradationsrate mit der Knochenregenerationsrate übereinstimmt, im teilbelasteten Defekt mechanische Stabilität gewährleistet und das sich somit für weiterführende Untersuchungen an größeren, vollbelasteten Defekten eignet.

Die 3D-pulvergedruckten, keilförmigen Scaffolds (5,3 × 14,1 × 10,4 mm) basierten auf einer Rohpulverzementmischung aus $Ca_xMg_{3-x}(PO_4)_2$ mit x = 0 (MPC3) bzw. x = 0,75 (CMPC225). Zur Steigerung der finalen Festigkeit wurden sie nachbehandelt – CMPC225 mit PA und MPC3 mit DAHP. Anschließend implantierte man sie in die rechte proximale Tibia von Kaninchen (n = 42), fixierte sie mittels einer PEEK-Platte und untersuchte sie vergleichend über einen Zeitraum von bis zu 30 Wochen. Die PEEK-Platte wurde nach 24 Wochen entfernt, woraufhin die Tibiae weitere sechs Wochen (bis Woche 30 post Implantation) hinsichtlich mechanischer Stabilität, fortschreitender Scaffolddegradation und Knochenremodeling analysiert wurden. Um die Versuchstierzahl aus ethischen Gründen zu reduzieren und aufgrund der nachgewiesenen frühzeitig besseren Scaffoldintegration sowie der homogeneren Degradation von CMPC225 im Vergleich zu MPC3 wurde die Plattenentfernung nur bei sechs Tieren der CMPC-Gruppe durchgeführt. Alle Kaninchen wurden regelmäßig klinisch sowie mittels *in-vivo*-µCT- und Röntgenanalysen untersucht. Nach der Euthanasie erfolgte eine Untersuchung der entnommenen Scaffold-Knochen-Verbunde durch histologische Analysen, REM und EDX.

Beide Materialien zeigten neben einer ausgezeichneten Biokompatibilität ein gutes Osseointegrations- sowie ein kontinuierliches Degradationsverhalten. Nach 24 Wochen waren beide Materialien nahezu vollständig abgebaut, während neu gebildeter Geflechtknochen in Lamellenknochen umgewandelt wurde und die

Knochenmarkshöhle sich regenerierte. CMPC225 wies dabei leicht überlegene Eigenschaften hinsichtlich der Scaffoldintegration auf, wobei seine Degradationsrate besser mit der natürlichen Knochenregeneration korrelierte. Auch nach der Plattenentfernung schritten die Scaffolddegradation sowie das Knochenremodeling bei CMPC225 bis zum Ende des Beobachtungszeitraums weiter voran, wobei die Tibia weiterhin stabil blieb. MPC3 degradierte schneller als CMPC225, was zu einer ausgeprägteren Resorptionszone und einem reduzierten Scaffold-Knochenkontakt führte. Diese Resorptionszone könnte eine potenzielle mechanische Schwachstelle darstellen, jedoch blieben alle untersuchten Scaffolds über den gesamten Studienzeitraum stabil, und auch das fortschreitende Knochenremodeling wurde nicht negativ beeinflusst.

Auf Grundlage der Ergebnisse erweist sich CMPC225 als vielversprechendes Material für weiterführende Untersuchungen. Insbesondere sollte dessen biomechanisches Verhalten in einem vollbelasteten Defektmodell weiter erforscht werden.

VI. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate for the first time 3D powder-printed scaffolds based on CMPC and MPC regarding their biocompatibility, stability and their *in vivo* degradation and osseointegration behavior in a segmental, partially loaded rabbit defect model. Based on internal preliminary studies, the most promising post-treatment procedures - PA for CMPC225 and DAHP for MPC3 - were selected and their impact on the aforementioned parameters was thoroughly analysed. The aim was to identify a suitable bone substitute material whose degradation rate would match the rate of bone regeneration, provide mechanical stability in the partially loaded defect and is therefore suitable for further investigation in larger, fully loaded defects.

The 3D powder-printed, wedge-shaped scaffolds (5.3 × 14.1 × 10.4 mm) were based on a raw powder cement mixture of $Ca_xMg_{3-x}(PO_4)_2$ with x = 0 (MPC3) or x = 0.75 (CMPC225). To increase the final strength, they were post-treated - CMPC225 with PA and MPC3 with DAHP. They were then implanted in the right proximal tibia of rabbits (n = 42), fixed using a PEEK plate and examined comparatively over a period of up to 30 weeks. The PEEK plate was removed after 24 weeks, after which the tibiae were analyzed for a further six weeks (up to week 30 post-implantation) regarding mechanical stability, progressive scaffold degradation and bone remodeling. To reduce the number of test animals for ethical reasons and due to the proven better scaffold integration at an early stage and the more homogeneous degradation of CMPC225 compared to MPC3, plate removal was only performed in six animals of the CMPC group. All rabbits were regularly examined clinically and by *in vivo* µCT and X-ray analysis. After euthanasia, the removed scaffold bone composites were examined by histological analysis, SEM and EDX.

Both materials showed good osseointegration and continuous degradation behavior in addition to excellent biocompatibility. After 24 weeks, both materials were almost completely degraded, with newly formed cancellous bone transforming to lamellar bone and the bone marrow cavity regenerating. CMPC225 showed slightly superior properties in terms of scaffold integration, with its degradation rate correlating better with natural bone regeneration. Even after plate removal, scaffold degradation and bone remodeling continued in CMPC225 until the end of the

observation period, with the tibia remaining stable. MPC3 degraded faster than CMPC225, resulting in a more pronounced resorption zone and reduced scaffold-bone contact. This resorption zone could represent a potential mechanical weakness, however, all scaffolds tested remained stable throughout the study period and progressive bone remodeling was not adversely affected.

Based on these results, CMPC225 appears to be a promising material for further investigation. Its biomechanical behavior should be further investigated in a fully loaded defect model.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Akkineni AR, Luo Y, Schumacher M, Nies B, Lode A, Gelinsky M

3D plotting of growth factor loaded calcium phosphate cement scaffolds.

Acta Biomaterialia. 2015; 27: 264-274

Albrektsson T, Johansson C

Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.

European Spine Journal. 2001; 10 Suppl 2(Suppl 2): S96-101

Ambard AJ, Mueninghoff L

Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties.

Journal of Prosthodontics. 2006; 15(5): 321-328

An YH, Martin KL

Handbook of histology methods for bone and cartilage. Springer, 2003

Anderson ML, Dhert WJ, de Bruijn JD, Dalmeijer RA, Leenders H, van Blitterswijk CA, Verbout AJ

Critical size defect in the goat's os ilium: A model to evaluate bone grafts and substitutes.

Clinical Orthopaedics and Related Research. 1999; 364: 231-239

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

In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements.

Biomaterials. 2004; 25(7-8): 1439-1451

ASTM

ASTM Standard F2721-09 Standard guide for pre-clinical in vivo evaluation in critical size segmental bone defects.

West Conshohocken, PA, USA, ASTM International, 2014

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.

RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart· New York 2010

Bartels F

Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenstruktur am ovarektomierten Göttinger Minischwein zur Etablierung eines Großtiermodells zur Simulation der postmenopausalen Osteoporose.

Dissertationsschrift, Göttingen, Universität Göttingen, 2011

Bavya Devi K, Lalzawmliana V, Saidivya M, Kumar V, Roy M, Kumar Nandi S

Magnesium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Engineering.

The Chemical Record. 2022; 22: e202200136

Bengel M

In vitro Testung neuer Anwendungsformen kalthärtender Knochenzemente aus resorbierbaren Orthophosphaten.

Dissertationsschrift, Würzburg, Universität Würzburg, 2019

Bockholdt B

Morphologische und histomorphometrische Untersuchungen der Aortenwand in einem Vergleichskollektiv und in Todesfällen durch spontane (nicht traumatische und nicht arteriosklerotische) Aortenruptur unter Berücksichtigung forensisch relevanter Fragestellungen.

Dissertationsschrift, Berlin, Freie Universität Berlin, 2005

Bohner M

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

Injury. 2000; 31: D37-D47

Bohner M

Resorbable biomaterials as bone graft substitutes.

Materials Today. 2010; 13(1-2): 24-30

Bohner M, Gbureck U, Barralet J

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

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

Bohner M, Theiss F, Apelt D, Hirsiger W, Houriet R, Rizzoli G, Gnos E, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B

Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep.

Biomaterials. 2003; 24(20): 3463-3474

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

Breu D, Müller E

Harnsteinbefunde bei Katzen aus Deutschland in den Jahren 2016–2020.

Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere. 2022; 50(02): 102-111

Brosset T, Pasquier G, Migaud H, Gougeon F

Opening wedge high tibial osteotomy performed without filling the defect but with locking plate fixation (TomoFix™) and early weight-bearing: prospective evaluation of bone union, precision and maintenance of correction in 51 cases.

Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research. 2011; 97(7): 705-711

Brown WE, Chow LC

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

Brunello G, Panda S, Schiavon L, Sivolella S, Biasetto L, Del Fabbro M

The Impact of Bioceramic Scaffolds on Bone Regeneration in Preclinical In Vivo Studies: A Systematic Review.

Materials (Basel). 2020; 13(7)

Burstein LS, Boskey AL, Tannenbaum PJ, Posner AS, Mandel ID

The crystal chemistry of submandibular and parotid salivary gland stones.

Journal of Oral Pathology & Medicine. 1979; 8(5): 284-291

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: 2445-2461

Carey LE, Xu HH, Simon Jr CG, Takagi S, Chow LC

Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair.

Biomaterials. 2005; 26(24): 5002-5014

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(1): 015006

Castilho M, Rodrigues J, Vorndran E, Gbureck U, Quental C, Folgado J, Fernandes PR

Computational design and fabrication of a novel bioresorbable cage for tibial tuberosity advancement application.

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2017; 65: 344-355

Chow LC

Calcium-Phosphat-Zemente: Eigenschaften und Verwendungen.

BioNanoMaterials. 2001; 2(1): 11-18

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: C. 2014; 42: 130-136

Claes L

Mechanical characterization of biodegradable implants.

Clinical Materials. 1992; 10(1-2): 41-46

Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P

The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing.

Journal of Orthopaedic Research. 2002; 20(5): 1099-1105

Claes L, Recknagel S, Ignatius A

Fracture healing under healthy and inflammatory conditions.

Nature Reviews Rheumatology. 2012; 8(3): 133-143

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 Part A. 1998; 43(4): 451-461

Dietz O, Litzke L-F

Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner. Enke Verlag, 2003

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 & Medicine. 1982; 11(4): 318-326

Dorozhkin SV

Calcium orthophosphate cements for biomedical application.

Journal of Materials Science. 2008; 43(9): 3028-3057

Dorozhkin SV, Epple M

Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten.

Angewandte Chemie. 2002; 114(17): 3260-3277

Einhorn TA, Gerstenfeld LC

Fracture healing: mechanisms and interventions.

Nature Reviews Rheumatology. 2015; 11(1): 45-54

Eliaz N, Metoki N

Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications.

Materials (Basel). 2017; 10(4): 334

Ewald A, Kreczy D, Bruckner 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)

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt MA, 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

Ferna E, Gil F, Ginebra M, Driessens M, Planell J, Best S

Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPOv4-[alpha]-Ca3 (PO4) 2 system: pH, workability and setting times.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1999; 10(4): 223

Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Bornert F, Offner D

Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management.

Journal of Tissue Engineering. 2018; 9: 2041731418776819

Féron JM, Mauprivez R

Fracture repair: general aspects and influence of osteoporosis and anti-osteoporosis treatment.

Injury. 2016; 47 Suppl 1: 10-14

Field JR, Ruthenbeck GR

Qualitative and Quantitative Radiological Measures of Fracture Healing.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology. 2018; 31(1): 1-9

Fiset S, Godbout C, Crookshank MC, Zdero R, Nauth A, Schemitsch EH

Experimental Validation of the Radiographic Union Score for Tibial Fractures (RUST) Using Micro-Computed Tomography Scanning and Biomechanical Testing in an in-Vivo Rat Model.

Journal of Bone And Joint Surgery. 2018; 100(21): 1871-1878

Fossum TW

Chirurgie der Kleintiere.

München, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2020: 985-1197

Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R

Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering.

Nature Biotechnology. 1994; 12(7): 689-693

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: 2619–2633

Gbureck U, Grolms O, Barralet J, Grover L, Thull R

Mechanical activation and cement formation of β-tricalcium phosphate.

Biomaterials. 2003; 24(23): 4123-4131

Gefel E

Zelluläre Resorption 3D-gedruckter Knochenimplantate auf Basis von Calciummagnesiumphosphaten.

Dissertationsschrift, Würzburg, Universität Würzburg, 2023

Gefel E, Moseke C, Schmitt AM, 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, Ridi F

An Overview of Magnesium-Phosphate-Based Cements as Bone Repair Materials.

Journal of Functional Biomaterials. 2023; 14(8)

Ginebra M-P, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G

New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine.

Acta Biomaterialia. 2010; 6(8): 2863-2873

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: 103-107

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

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

Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T

Resorbable bone substitution materials: An overview of commercially available materials and new approaches in the field of composites.

Der Orthopäde. 2011; 40: 761-773

Heinemann S, Rössler S, Lemm M, Ruhnow M, Nies B

Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid.

Acta Biomaterialia. 2013; 9(4): 6199-6207

Hemmerlein E, Vorndran E, Schmitt A-M, Feichtner F, Waselau A-C, Meyer-Lindenberg A

In Vivo Investigation of 3D-Printed Calcium Magnesium Phosphate Wedges in Partial Load Defects.

Materials (Basel). 2024; 17(9): 2136

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

Huber F-X, McArthur N, Heimann L, Dingeldein E, Cavey H, Palazzi X, Clermont G, Boutrand J-P

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: 1-11

Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV

Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems.

Trends in Biotechnology. 2004; 22(7): 354-362

Ignatius AA, Betz O, Augat P, Claes LE

In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly (lactide) used as bone graft substitutes.

Journal of Biomedical Materials Research. 2001; 58(6): 701-709

Jackson J, Waugh W

Tibial osteotomy for osteoarthritis of the knee.

The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume. 1961; 43(4): 746-751

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

Johannes H, Rueger M, Rücker A, Schilling A, Briem D

Kalziumphosphatverbindungen zum Knochenersatz.

OP-Journal. 2006; 22(02): 84-89

Julmi S, Krüger AK, Waselau AC, Meyer-Lindenberg A, Wriggers P, Klose C, Maier HJ

Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants.

Materials Science and Engineering: C. 2019; 98: 1073-1086

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, Bruckner 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

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 JA, Lim J, Naren R, Yun HS, Park EK

Effect of the biodegradation rate controlled by pore structures in magnesium phosphate ceramic scaffolds on bone tissue regeneration in vivo.

Acta Biomaterialia. 2016; 44: 155-167

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, Kübler AC, Gbureck U

Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement.

Acta Biomaterialia. 2010; 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. 2010; 21(11): 2947-2953

Kleer N, Julmi S, Gartzke A-K, Augustin J, Feichtner F, Waselau A-C, Klose C, Maier HJ, 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

König HE, Liebich H-G

Anatomie der Haussäugetiere. Schattauer, 2012

Kowalewicz K, Vorndran E, Feichtner F, Waselau AC, Brueckner M, Meyer-Lindenberg A

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

Materials (Basel). 2021; 14(4): 946

Kowalewicz K, Waselau AC, Feichtner F, Schmitt AM, Brückner M, Vorndran E, Meyer-Lindenberg A

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

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2022; 10: 998254

Lalk M, Reifenrath J, Angrisani N, Bondarenko A, Seitz JM, Mueller PP, Meyer-Lindenberg A

Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magnesium alloy AX30 as bone grafts: a comparative study in rabbits.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2013; 24(2): 417-436

Lang G

Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. Springer-Verlag, 2012

LeGeros RZ

Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification.

Zeitschrift für Kardiologie. 2001; 90: 116-124

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

LeMaitre J, Pittet C, Brendlen D

Pasty or liquid multiple constituent compositions for injectable calcium phosphate cements.

Patent, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne EPFL, 2008

Leow JM, Clement ND, Tawonsawatruk T, Simpson CJ, Simpson AH

The radiographic union scale in tibial (RUST) fractures: Reliability of the outcome measure at an independent centre.

Bone & Joint Research. 2016; 5(4): 116-121

Li S, Li H, Lv G, Duan H, Jiang D, Yan Y

Influences of degradability, bioactivity, and biocompatibility of the calcium sulfate content on a calcium sulfate/poly (amino acid) biocomposite for orthopedic reconstruction.

Polymer Composites. 2016; 37(6): 1886-1894

Li W, Qiao W, Liu X, Bian D, Shen D, Zheng Y, Wu J, Kwan KY, Wong TM, Cheung KM

Biomimicking bone–implant interface facilitates the bioadaption of a new degradable magnesium alloy to the bone tissue microenvironment.

Advanced Science. 2021; 8(23): 2102035

Lieberman JR, Friedlaender GE

Bone regeneration and repair: biology and clinical applications. Springer, 2005: 133-156

Linhart W, Briem D, Peters A, Lehmann W, Windolf J, Rueger J

Resorbierbare Kalziumphosphatzemente.

Trauma und Berufskrankheit. 2004; 6(4): 277-284

Litrenta J, Tornetta P, 3rd, Mehta S, Jones C, O'Toole RV, Bhandari M, Kottmeier S, Ostrum R, Egol K, Ricci W, Schemitsch E, Horwitz D

Determination of Radiographic Healing: An Assessment of Consistency Using RUST and Modified RUST in Metadiaphyseal Fractures.

Journal of Orthopaedic Trauma. 2015; 29(11): 516-520

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

Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability.

Acta Biomaterialia. 2021; 119: 1-12

Lüllmann-Rauch R

Taschenlehrbuch Histologie. Thieme Verlag, 2009

Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R

Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6-to 7-year outcome of a pilot clinical study.

Tissue Engineering. 2007; 13(5): 947-955

McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW

Animal models for bone tissue engineering and modelling disease.

Disease Models & Mechanisms. 2018; 11(4)

Meermann S, Gräff C

Sportphysiotherapie für Hunde: Sporthunde erfolgreich betreuen und therapieren. Georg Thieme Verlag, 2017

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: C. 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

Mi ZR, Shuib S, Hassan A, Shorki A, Ibrahim M

Problem of stress shielding and improvement to the hip Implat designs: A review.

Journal of Medical Science. 2007; 7(3): 460-467

Miano R, Germani S, Vespasiani G

Stones and urinary tract infections.

Urologia internationalis. 2007; 79(Suppl. 1): 32-36

Misiek DJ, Kent JN, Carr RF

Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 1984; 42(3): 150-160

Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yuasa T, Nagayama M, Suzuki K

Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing.

Journal of Biomedical Materials Research. 1999; 48(1): 36-42

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: 2631-2637

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

Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications.

Acta Biomaterialia. 2018; 66: 23-43

Naghavi SA, Tamaddon M, Garcia-Souto P, Moazen M, Taylor S, Hua J, Liu C

A novel hybrid design and modelling of a customised graded Ti-6Al-4V porous hip implant to reduce stress-shielding: An experimental and numerical analysis.

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2023; 11: 1092361

Nuss KM, von Rechenberg B

Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics.

The Open Orthopaedics Journal. 2008; 2: 66-78

Oliveira SM, Barrias CC, Almeida IF, Costa PC, Ferreira MRP, 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 T, Villars P, Mitchell S, Hsu H-P, 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, Lee B, Hong D, Enick PN, Roy A, Kumta PN

Synthesis, Osteoblast, and Osteoclast Viability of Amorphous and Crystalline Tri-Magnesium Phosphate.

ACS Biomaterials Science & Engineering. 2015; 1(1): 52-63

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

Panteli M, Pountos I, Jones E, Giannoudis PV

Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights.

Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2015; 19(4): 685-713

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 C

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

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

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

Perren S, Fernandez A, Regazzoni P

Understanding fracture healing biomechanics based on the “strain” concept and its clinical applications.

Acta chirurgiae orthopaedicae

et traumatologiae Čechoslovaca. 2015; 82(4): 253-260

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

Pilia M, Guda T, Appleford M

Development of composite scaffolds for load-bearing segmental bone defects.

BioMed Research International. 2013; 2013: 458253

Planzer K

Variable fixation locking screw (VFLS): investigation of bone healing with a device intended to optimize strain and micromotion for each phase of fracture healing.

Dissertationsschrift, Zürich, Universität Zürich, 2019

Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S

A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs.

BioMed Research International. 2014; 2014: 348635

Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW

The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research.

Biomaterials. 2009; 30(12): 2149-2163

Reindl SA

Zelluläre Antwort auf die Implantation degradierbarer Knochenersatzmaterialien.

Dissertationsschrift, Zürich, Universität Zürich, 2012

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

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

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

Romeis B

Mikroskopische Technik. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2019

Rude R, Gruber H, Wei L, Frausto A, Mills B

Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse.

Calcified Tissue International. 2003; 72: 32-41

Salomon F-V, Geyer H, Gille U

Anatomie für die Tiermedizin. Enke, 2015

Sarabia-Condes J, Villaescusa-Marín S, Hernández-García C, Martín-Ferrero M

Opening-wedge High Tibial Osteotomy with a Tricalcium Phosphate Wedge.

Revista española de cirugía ortopédica y traumatología (English edition). 2007; 51(4): 182-187

Scaglione M, Fabbri L, Dell'Omo D, Gambini F, Guido G

Long bone nonunions treated with autologous concentrated bone marrow-derived cells combined with dried bone allograft.

Musculoskeletal Surgery. 2014; 98: 101-106

Schäfer M

Vergleichende histologische Untersuchungen von intramedullären Implantaten auf Magnesiumbasis im Kaninchenmodell.

Dissertationsschrift, Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2011

Schaufler C, Schmitt AM, Moseke C, Stahlhut P, Geroneit I, Brückner M, Meyer-Lindenberg A, Vorndran E

Physicochemical degradation of calcium magnesium phosphate (stanfieldite) based bone replacement materials and the effect on their cytocompatibility.

Biomedical Materials. 2022; 18(1)

Schemitsch EH

Size matters: defining critical in bone defect size!

Journal of Orthopaedic Trauma. 2017; 31: S20-S22

Schmidt M

In-vivo-Untersuchung zu offenporigen Magnesium-Scaffolds der Legierung LAE442 in der Kaninchentibia.

Dissertationsschrift, München, Ludwig-Maximilians-Universität, 2023

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

In vivo investigation of open-pored magnesium scaffolds LAE442 with different coatings in an open wedge defect.

Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials. 2022; 20: 22808000221142679

Schnürer S, Gopp U, Kühn K-D, Breusch S

Bone substitutes.

Der Orthopäde. 2003; 32: 2-10

Schröter L, Kaiser F, Stein S, Gbureck U, Ignatius A

Biological and mechanical performance and degradation characteristics of calcium phosphate cements in large animals and humans.

Acta Biomaterialia. 2020; 117: 1-20

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)

Sehmisch S

Treatment of critical-size bone defects.

Unfallchirurgie. 2023; 126(3): 173-174

Sen M, Miclau T

Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?

Injury. 2007; 38(1): S75-S80

Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A

Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model.

Journal of Orthopaedic Research. 2005; 23(2): 489-493

Sheikh Z, Abdallah MN, Hanafi AA, Misbahuddin S, Rashid H, Glogauer M

Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials.

Materials (Basel). 2015; 8(11): 7913-7925

Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G

Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review.

Biomaterials. 2006; 27(9): 1728-1734

Starch-Jensen T, Jensen JD

Maxillary sinus floor augmentation: a review of selected treatment modalities.

Journal of Oral & Maxillofacial Research. 2017; 8(3)

Stengele A

Systematische Analyse der Abbindereaktion von Magnesiumphosphat mit Polyacrylsäure im Vergleich zu klassischen wässrigen Zementsystemen.

Dissertationsschrift, Würzburg, Universität Würzburg, 2017

Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA

Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis–a review.

Acta Biomaterialia. 2014; 10(2): 557-579

Takagi S, Chow LC, Hirayama S, Sugawara A

Premixed calcium–phosphate cement pastes.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2003; 67(2): 689-696

Tamimi F, Le Nihouannen D, Bassett DC, Ibasco S, Gbureck U, Knowles J, Wright A, Flynn A, Komarova SV, Barralet JE

Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions.

Acta Biomaterialia. 2011; 7(6): 2678-2685

Tamimi F, Sheikh Z, Barralet J

Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite.

Acta biomaterialia. 2012; 8(2): 474-487

Trombetta R, Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA

3D printing of calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering and drug delivery.

Annals of Biomedical Engineering. 2017; 45: 23-44

Truumees E, Herkowitz HN

Alternatives to autologous bone harvest in spine surgery.

The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal. 1999; 12: 77-88

Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, Li B, Shu W

3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering.

Bioactive Materials. 2018; 3(3): 278-314

Valtanen RS, Yang YP, Gurtner GC, Maloney WJ, Lowenberg DW

Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future?

Injury. 2021; 52 Suppl 2: S72-s77

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, Geffers M, Ewald A, Lemm M, Nies B, Gbureck U

Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier.

Acta Biomaterialia. 2013; 9(12): 9558-9567

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.

MRS 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

Walker J, Shadanbaz S, Woodfield TB, Staiger MP, Dias GJ

Magnesium biomaterials for orthopedic application: a review from a biological perspective.

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2014; 102(6): 1316-1331

Wancket L

Animal models for evaluation of bone implants and devices: comparative bone structure and common model uses.

Veterinary Pathology. 2015; 52(5): 842-850

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

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

Welsch U, Kummer W, Deller T

Histologie - Das Lehrbuch: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. Elsevier Health Sciences, 2022

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.

Biomaterials Science. 2017; 5(9): 1690-1698

Whelan DB, Bhandari M, Stephen D, Kreder H, McKee MD, Zdero R, Schemitsch EH

Development of the radiographic union score for tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation.

The Journal of Trauma and Acute Care Surgery. 2010; 68(3): 629-632

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

Williams D

Mechanisms of biodegradation of implantable polymers.

Clinical Materials. 1992; 10(1-2): 9-12

Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H

In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response.

Biomaterials. 2005; 26(17): 3557-3563

Witte F, Ulrich H, Palm C, Willbold E

Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling.

Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2007; 81(3): 757-765

Witting L, Waselau A-C, Feichtner F, Wurm L, Julmi S, Klose C, Gartzke A-K, Maier H, Wriggers P, Meyer-Lindenberg A

Influence of coatings on degradation and osseointegration of open porous Mg scaffolds in vivo.

Materialia. 2020; 14: 100949

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

Xu Y, Meng H, Yin H, Sun Z, Peng J, Xu X, Guo Q, Xu W, Yu X, Yuan Z, Xiao B, Wang C, Wang Y, Liu S, Lu S, Wang Z, Wang A

Quantifying the degradation of degradable implants and bone formation in the femoral condyle using micro-CT 3D reconstruction.

Experimental and Therapeutic Medicine. 2018; 15(1): 93-102

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. 2012; 18(7-8): 870-881

Zimmermann G, Moghaddam A

Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes.

Injury. 2011; 42: S16-S21

VIII. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg, für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas sowie für die stets sehr nette Betreuung und ihre fachliche wie auch konstruktive Unterstützung bei der Anfertigung der Publikation und dieser Arbeit bedanken.

Besonders danke ich auch Dr. Anja-Christina Waselau und Franziska Feichtner Ph.D. für die Planung und Organisation, die zahlreichen Korrekturen, ihre ständige Erreichbarkeit und fachliche sowie persönliche Unterstützung auch nach dem Ende der Forschungsgruppe.

Ich bedanke mich herzlich bei Beatrix Limmer, Rebekka Göldl und Lisa Wurm für die hervorragende technische Unterstützung im Labor und am µCT.

Ich möchte mich zudem bei meinen Mitdoktorandinnen Sophia Hiepe, Katharina Kowalewicz und Marlene Schmidt für die schöne gemeinsame Zeit im Büro und im Stall bedanken. Der fachliche Austausch, die gegenseitige Unterstützung und die vielen lustigen Momente haben diese Zeit für mich besonders gemacht. Besonders Sophia danke ich für die unzähligen Zoom-Meetings, Krisensitzungen, aufbauenden Worte, den gemeinsamen Kongressbesuch - und vor allem für diese wunderbare Freundschaft.

Ich danke auch unseren Tierpflegern Angie, Jan, Marion und Petra für die liebevolle Betreuung unserer Kaninchen und die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich zudem bei allen beteiligten Mitarbeitern des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg und besonders bei unserer Projektpartnerin Frau Dr. Elke Vorndran für die Herstellung der Scaffolds, deren Analysen vor den Operationen sowie die Erstellung der REM- und EDX-Analysen. Zudem danke ich ihr für ihre stets sehr nette, fachliche und konstruktive Unterstützung bei der Anfertigung meiner Publikation.

Frau Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg danke ich für die kompetente und freundliche Unterstützung bei der histologischen Auswertung.

Meinen Eltern Walter und Maryflor gilt mein größter Dank. Ich danke euch für die fortwährende Unterstützung in jeder Lebenslage und dass ihr immer an mich glaubt.

Ihr seid meine größte Stütze und ohne euch wäre die Anfertigung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.

Nicht zuletzt danke ich auch meinen treuen Begleitern Ray Donovan und Goethe, die mich geduldig durch lange Schreibnächte begleitet und mit ihrem Schnurren stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.