

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt,
Klinikum der Universität München,
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Histologische Beurteilung der *in vivo* Knochenneubildung besiedel-
ter Konstrukte nach osteogener Stimulation und Beimpfung mit
vaskulärem endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF) im Mausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
(Dr. med.)
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrich Klemens Lenze
aus Rosenheim

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller
Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Sebastian Seitz
PD Dr. rer. nat. Denitsa Docheva

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2012

„meinen lieben Eltern“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Tissue Engineering.....	7
1.1.1. Geschichte und klinische Notwendigkeit des Tissue Engineerings	8
1.1.2. Stammzellen	9
1.1.3. Leitschienen	13
1.1.4. Osteogene Stimulation und Wachstumsfaktoren	18
1.1.4.1. Wachstumsfaktoren	18
1.1.4.2. Osteogene Stimulation.....	21
1.1.5. Kultivierung	22
1.1.5.1. Statische Kultivierung	23
1.1.5.2. Dynamische Kultivierung.....	23
1.1.6. <i>In vivo</i> Modelle	25
1.1.6.1. Orthotope Implantation	26
1.1.6.2. Ektope Implantation	27
1.1.7. Histologischer Nachweis	28
1.2. Aufgabenstellung.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Zellkultur.....	31
2.1.1. Zellen	31
2.1.2. Medien und Zellexpansion	31
2.2. Inkubation der Leitschienen <i>in vitro</i>	32
2.2.1. Leitschienen	32
2.2.2. Besiedelung der Leitschienen	32
2.2.3. Kultivierung der Leitschienen	33
2.2.3.1. Kultivierung unbesiedelter Leitschienen.....	33
2.2.3.2. Kultivierung besiedelter Leitschienen ohne osteogene Stimulation	33
2.2.3.3. Kultivierung besiedelter Leitschienen mit osteogener Stimulation ..	34
2.2.3.4. Kultivierung besiedelter Leitschienen mit osteogener Stimulation und VEGF	34
2.3. Tierversuche.....	34
2.3.1. Implantation der Leitschienen	36
2.3.1.1. Anästhesie	36

2.3.1.2. Operatives Einbringen der Leitschienen	36
2.3.2. Explantation der Leitschienen und Organentnahme	37
2.4. Histologische Auswertung	39
2.4.1. MMA-Einbettung	39
2.4.1.1. Anfertigung histologischer Schnitte und Erstellen der Objektträger	40
2.4.1.2. Histologische Färbung der Dünnschnitte	41
2.4.2. Herstellung entkalkter Proben	41
2.4.2.1. Knochenentkalkung und Anfertigen von Kryoschnitten	41
2.4.2.2. Histologische Färbung der Kryoschnitte	42
2.4.3. Histologische Auswertung der gefärbten Objekte	42
2.4.4. Molekularbiologische Untersuchung	44
3. Ergebnisse.....	45
3.1. Effizienz der Leitschienenbesiedelung	45
3.2. Versuchstiere	46
3.3. Histologische Auswertung	46
3.3.1. Ergebnisse nach 2-wöchiger Implantationsdauer <i>in vivo</i>	48
3.3.1.1. Leitschienenstroma und Granulationsgewebe nach 2 Wochen	50
3.3.1.2. Blutgefäße nach 2 Wochen.....	51
3.3.1.3. Mehrkernige Riesenzellen nach 2 Wochen.....	53
3.3.1.4. Fettgewebe und Nekrosen nach 2 Wochen	55
3.3.2. Ergebnisse nach 12-wöchiger Implantation <i>in vivo</i>	56
3.3.2.1. Leitschienenstroma und Granulationsgewebe nach 12 Wochen	58
3.3.2.2. Blutgefäße nach 12 Wochen.....	59
3.3.2.3. Mehrkernige Riesenzellen nach 12 Wochen.....	61
3.3.2.4. Fettgewebe und Nekrosen nach 12 Wochen	63
4. Diskussion.....	65
4.1. Methodik.....	65
4.1.1. Verwendung von Stammzellen, Expansion und Zelldifferenzierung.....	65
4.1.2. Freisetzung und Wirkung von VEGF	67
4.1.3. Leitschienenwahl und Einfluss von Beimpfungs- und Kultivierungsform	69
4.1.4. Untersuchung im Tiermodell und Implantationsform	72
4.1.5. Histologische Schnitte und Färbungen.....	73
4.2. Ergebnisse	74

4.3. Schlussfolgerung	83
Zusammenfassung	84
Literaturverzeichnis	86
Abkürzungsverzeichnis	102
Anhang	103
Danksagung	108

1. Einleitung

1.1. Tissue Engineering

Die Behandlung ausgedehnter Knochendefekte infolge von Traumata, Tumoren oder Entzündungen ist ein bislang noch unzureichend gelöstes Problem der orthopädischen und traumatologischen Chirurgie (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Bislang werden vor allem Konzepte mit autologen oder heterologen Knochentransplantaten verfolgt, die jedoch aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit und des teils unzureichenden Integrationsverhaltens gerade bei größeren Knochendefekten oft eine nicht gänzlich zufriedenstellende Lösung darstellen (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Als Standard hat sich bisher die Entnahme autologen spongiösen oder kortikalen Knochens aus dem Beckenkamm etabliert, die wegen der hohen regenerativen Fähigkeiten des gewonnenen Materials als Maßstab für alle anderen Arten von bone-grafting dient (Finkemeier 2002). Neben der Gewinnung autologen Knochenmaterials aus dem Beckenkamm ist vor allem die Verwendung vaskularisierter oder nicht-vaskularisierter Fibulastruts zur langstreckigen Defektdeckung etabliert (Eward et al. 2010, Krieg und Hefti 2007). Die begrenzte Verfügbarkeit und das Risiko für Begleitmorbiditäten am Entnahmeort limitieren jedoch den Einsatz dieser Verfahren.

Neben den Methoden zur Knochentransplantation wurden im Verlauf der letzten Jahrzehnte besonders die Prinzipien der Kallusdistraktion umfangreich erforscht und unterschiedlichste Techniken zu deren Anwendung entwickelt (Hankemeier et al. 2004). Nicht zuletzt aufgrund der Beobachtung, dass durch Kallusdistraktion die Regeneration eines biologisch hochwertigen Knochens mit anatomisch korrekter Morphologie erreicht werden kann, ist dieses Verfahren aus dem klinischen Alltag der Behandlung angeborener oder erworbener Beinverkürzungen sowie langstreckiger Knochendefekte nicht mehr wegzudenken (Hankemeier et al. 2004).

Trotz ermutigender Teilerfolge konnten bis dato viele Fragestellungen hinsichtlich einer anatomisch und funktionell zufriedenstellenden Defektüberbrückung nur unzureichend gelöst werden. Aufgrund ähnlicher Probleme in den unterschiedlichsten Bereichen der Medizin wurde daher auch in anderen Fachrichtungen früh der Ruf nach artifizieller Herstellung von Geweben oder Organen laut.

Übergeordnete Ziele aktueller und zukünftiger Forschungsvorhaben müssen daher die allmähliche Überführung laborevidenter Prozesse in geeignete Behandlungsschemata und die Integration der gewonnenen Erfahrungswerte in den klinischen Alltag sein.

Dem Tissue Engineering von Knochen kommt, in Anbetracht der beschränkten Behandlungsoptionen bei größeren Knochensubstanzdefekten, größte Wichtigkeit zu (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Da in diesem Zusammenhang vor allem die artifizielle Osteogenese bzw. Osteoinduktion von vorrangigem Interesse ist, wurde im vorliegenden Versuch der Einfluss der osteogenen Stimulation und Beimpfung mit Wachstumsfaktoren auf die Knochenneubildung besiedelter, dreidimensionaler Konstrukte untersucht.

1.1.2. Stammzellen

Unter dem Begriff Stammzellen werden Vorläuferzellen subsumiert, die noch keine endgültige Differenzierung durchlaufen haben und somit ein verbliebenes Teilungs- und Entwicklungspotential besitzen. Zur asymmetrischen Zellteilung befähigt, können Stammzellen sowohl Tochterzellen einer nachfolgenden Differenzierungsstufe, gleichzeitig aber auch vorangehender Stufen generieren (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). In Abhängigkeit der Entwicklungsstufe besitzen Stammzellen das Potential, sich in Zellen aller Keimblätter, eines einzelnen Keimblattes, oder eines Organes zu differenzieren. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung besitzen Stammzellen während des 4- bis 8- Zellstadiums totipotente Eigenschaften, das heißt sie können sich in alle anderen im menschlichen Organismus vorkommenden Zelltypen differenzieren. Als pluripotente Zellen können sie in einem darauffolgenden Entwicklungsschritt noch nahezu alle Zelltypen der drei Keimblätter ausbilden. Adulte Stammzellen, mit Vorkommen im ausdifferenzierten Gewebe, sind befähigt, sich in Zellen innerhalb eines Keimblattes zu entwickeln und sind multipotent. Oligopotente Zellen befinden sich bereits auf einer relativ stark ausdifferenzierten Entwicklungsstufe und können nur noch in wenige Zellen eines Gewebes differenzieren. Im Verlauf der osteogenen Differenzierungskaskade erreichen Stammzellen über Vorstufen wie der Osteoprogenitorzelle oder dem Prä-Osteoblasten das Osteoblastenstadium als vorläufige Endstufe (Aubin 1998). An-

schließlich, nach Ausbildung der Knochenmatrix, befinden sich deren Zelleiber als nicht mehr teilungsfähige Osteozyten in den Lakunen (Aubin 1998). (Abb. 2)

Neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung wurden auch Beobachtungen hinsichtlich einer immunmodulatorischen Potenz mesenchymaler Stammzellen geschildert (Aggarwal und Pittenger 2005). So werden den Stammzellen neben der Funktionsbeeinflussung antigen-präsentierender Zellen auch suppressive Effekte gegenüber aktivierten Lymphozyten zugesprochen

Nicht zuletzt aufgrund der medienpräsenten und kontrovers geführten Diskussion hinsichtlich ethischer Vorbehalte gegenüber der „Stammzellforschung“, bedarf der, im allgemeinen Sprachgebrauch unscharf verwendete Begriff „Stammzelle“, einer weiteren Unterteilung:

- Embryonale Stammzellen: Es handelt sich um pluripotente Zellen, die während der embryonalen Entwicklung gewonnen werden. Diese stammen vermutlich aus dem Somitenmesoderm des Achsenskelettes sowie dem lateralen Mesoderm des Extremitätenskelettes (Erlebacher et al. 1995). Als pluripotentes Zellgut ist eine Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter möglich. Die Verwendung und der Einsatz embryonaler Stammzellen sind ethisch besonders umstritten (Hoffmann und Gross 2001).
- Unrestringierte somatische Stammzellen: Die Gewinnung erfolgt aus frühkindlichem Nabelschnurblut. Wegen des niedrigen Differenzierungsgrades (pluripotent) und dem hohen Regenerationspotential werden diese Zellen als „unrestringiert“ bezeichnet (Kogler et al. 2004, Campagnoli et al. 2001). Auch die Nutzung dieser Zellen ist umstritten.
- Adulte mesenchymale Stammzellen (Mesenchymale Stromazellen): Die Gewinnung dieser multipotenten Zellen gelingt aus adultem, ausdifferenziertem Gewebe. Eine Differenzierung in Zellen anderer Keimblätter ist somit nicht mehr möglich. Diese Zellen finden breite Anwendung in der aktuellen Forschung.

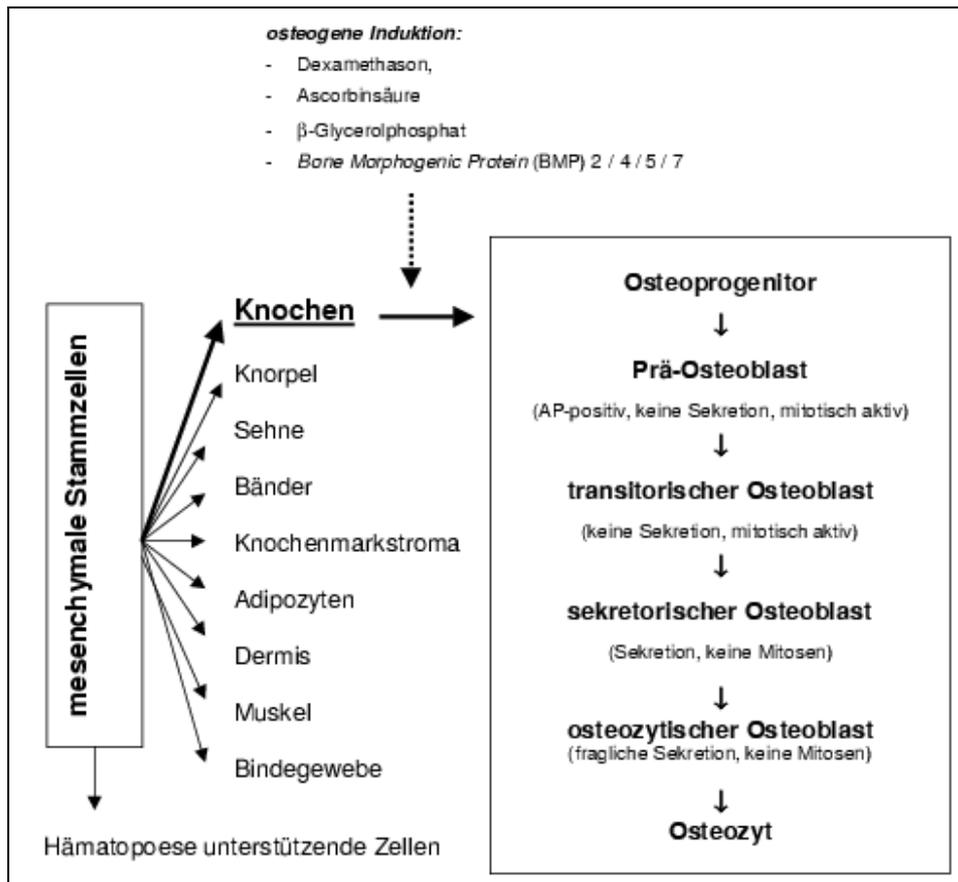


Abb. 2 Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials mesenchymaler Stammzellen am Beispiel der osteogenen Differenzierungskaskade (Jäger et al. 2002).

Zellen unterschiedlichster Herkunft und Differenzierungsstufe werden unter der Vorstellung, zur Knochenneubildung befähigt zu sein, oder sich in knochenbildende Zellen differenzieren zu können, im Rahmen des Tissue Engineering von Knochen eingesetzt. Hierzu zählen neben Osteoblasten (Stangenberg et al. 2005) und periostalen Zellen (Zhang et al. 2008) vor allem auch mesenchymale Stammzellen (Seitz et al. 2007, Schieker et al. 2004). Unter letzteren wird heute eine, aus dem Knochenmark und anderen Geweben, isolierbare Zelllinie verstanden, die multipotente Differenzierungseigenschaften in vitro besitzt und zur Adhärenz an bestimmten Plastikoberflächen befähigt ist (Horwitz et al. 2005).

Die Annahme einer Existenz von Knochenmarks-Stammzellen, die nicht der hämatopoetischen Reihe zuzuordnen sind, reicht bis in die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts zurück (Cohnheim 1867). Friedenstein wies 1961 erstmals die knochenbildende Aktivität von Stamm- bzw. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nach, die später den Namen „mesenchymale Stammzellen“ erhielten (Caplan 1991, Friedenstein 1961). Im weiteren Verlauf konnten mesenchymale Stammzel-

len jedoch auch in vielen weiteren Geweben wie Fett, Skelettmuskel, Haut oder der Lunge nachgewiesen und isoliert werden (Sabatini et al. 2005, Tuan et al. 2003, Young et al. 2001). Ungeachtet dieser Tatsache sowie einiger Nachteile, wie dem relativ geringen Stammzellvorkommen von nur 0,01 bis 0,02% und großen, spenderabhängigen Qualitätsunterschieden, stellt das Knochenmark nach wie vor die Hauptquelle der Stammzellgewinnung dar (Muschler et al. 2004, Fibbe und Noort 2003).

Bei einer gängigen Methode zur Isolation mesenchymaler Stammzellen wird sich deren Eigenschaft, selektiv an Plastikoberflächen wie zum Beispiel Zellkulturflaschen anzuhafte, zunutze gemacht (Friedenstein et al. 1970). Wie zu erwarten, zeigten Untersuchungen, dass im Rahmen eines derartigen Gewinnungsprozesses sehr heterogene Zellpopulationen gewonnen werden, die sich sowohl hinsichtlich ihrer Morphologie, als auch des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens unterscheiden (Colter et al. 2001, Muraglia et al. 2000, Pittenger et al. 1999).

Die phänotypische Charakterisierung stützt sich auf die immunzytochemische Detektion geeigneter Oberflächenmoleküle (FACS = fluorescence-activated cell sorting). Diese Methode wird jedoch vornehmlich durch das Fehlen singulärer, stammzell-spezifischer Marker bzw. Epitope und die damit verbundene Ergebnisunschärfe limitiert. Daher wird in vielen Studien der Nachweis des Stammzellcharakters nach wie vor durch den Nachweis der Differenzierbarkeit der Zellen geführt (Raimondo et al. 2006, Jaiswal et al. 2000). Um eine einheitliche Definition zu gewährleisten und die Vergleichbarkeit internationaler Versuchsergebnisse zu steigern, wurden von der „International Society for Cellular Therapy“ 3 Kriterien zur Definition mesenchymaler Stammzellen festgelegt (Dominici et al. 2006):

- Adhärenz an geeigneten Plastikoberflächen während kultureller Anzucht.
- Die Expression von Antigenen wie CD73, CD90, CD105, das Fehlen hämatopoetischer Antigene (wie CD34 und CD45) sowie monozyten-, makrophagen- oder B-zell-spezifischer Moleküle.
- Die Fähigkeit, sich *in vitro* unter standardisierten Bedingungen zumindest in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren zu können.

Ungeachtet der breiten Akzeptanz dürfen bestehende Defizite dieser Einteilung jedoch nicht außer Acht gelassen werden (Docheva et al. 2007). Da die Vergleichbarkeit der erhobenen Studienergebnisse zudem durch die Gewinnung der Stammzellen aus Spendern unterschiedlicher Spezies eingeschränkt ist, wurden für die vorliegende Arbeit primäre, humane mesenchymale Stammzellen kommerziell erworben. Mit Hilfe der standardisierten Stammzellgewinnung mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarksaspiraten adulter Spender, sollte eine erhöhte Vergleichbarkeit erreicht werden.

1.1.3. Leitschienen

Der Fokus aktueller Strategien im Tissue Engineering von Knochen richtet sich hauptsächlich auf zwei Herangehensweisen:

- Verwendung zellfreier Gerüste, die *in vivo* als dreidimensionale Leitschienen für einwachsende Zellen aus dem Umgebungsgewebe fungieren.
- Verwendung zell-besiedelter Konstrukte, die als Trägersubstanz dienen und modulierende Einflüsse auf die Knochenneubildung *in vitro* oder *in vivo* haben können.

Die Verwendung zellbesiedelter Konstrukte stellte sich dabei gegenüber der Verwendung unbesiedelter Leitschienen als signifikant überlegen heraus (Holy et al. 2003, Petite et al. 2000). Da nach bisherigem Forschungsstand ein gerichtetes Zellwachstum nur in Anwesenheit einer geeigneten Leitschiene möglich ist, ist besonders die Suche nach innovativen Materialien Gegenstand breiter Forschung (Fang et al. 2003, Bianco und Robey 2001). Neu entwickelte Materialien und Gewebe werden hierbei besonders an Eigenschaften wie ihrer Biokompatibilität, Osteokonduktivität, -induktivität und -genität gemessen (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Die *Biokompatibilität* gibt Auskunft über die Verträglichkeit bzw. das Verhalten eines Stoffes in Verbindung mit biologischen Materialien. Unter *Osteokonduktivität* wird die Fähigkeit eines Materials verstanden, als Leitschiene für Zellen oder einwachsendes Gewebe zu fungieren.

Der Begriff *Osteoinduktivität* hingegen beschreibt die Eigenschaft einer Substanz, Zellen zur osteogenen Differenzierung anzuregen oder die Produktion knochenbildender Zellen zu fördern. Die Befähigung einzelner Zellen oder Gewebe eigenständig Knochen zu bilden wird mit *Osteogenität* bezeichnet.

Zur optimalen Eignung einer Leitschiene für das Tissue Engineering werden hierbei besonders hohe Anforderungen an die Osteokonduktivität des Materials gestellt. Die Eigenschaften, das Anhaften zellulärer Strukturen zu erlauben und ferner, osteogenen Zellen den Übertritt aus umgebendem Gewebe zu ermöglichen, stellen die Grundvoraussetzung dar. Zu diesem Zweck weisen die meisten Leitschienen eine interkonnektierende, poröse Struktur auf, die zusätzlich auch das Einwachsen vaskulärer Strukturen begünstigt. Als Kenngröße für den minimalen Porendurchmesser, der zur Einsprossung von Gefäßen erforderlich ist, werden Werte zwischen 300µm und 500µm angegeben (Stiehler et al. 2009, De Long et al. 2007).

Für die klinische Anwendbarkeit spielt vor allem die Biodegradierbarkeit, d.h. die Abbaubarkeit des Materials *in vivo* bei gleichzeitigem Ersatz mit körpereigenem Gewebe, eine große Rolle (Schilling et al. 2004). Das Abbauverhalten eines Materials wird vorrangig durch Materialeigenschaften wie die Form (Monchau et al. 2002), die Porosität (Sun et al. 2002), oder auch (bei Keramiken) die Sinterungstemperatur (Zheng et al. 1998) bestimmt.

Bevor jedoch der Einsatz eines organischen oder synthetischen Biomaterials zur Behandlung knöcherner Defekte in Erwägung gezogen werden kann, müssen weitere Kriterien hinsichtlich der Beschaffenheit des Materials erfüllt sein (Panetta et al. 2009):

- Keine toxische Wirkung gegenüber anhaftenden Zellen. Ideale Leitschienen wirken zudem osteoinduktiv, d.h. sie induzieren die Bildung neuer Knochenmatrix durch Stimulation osteogener Eigenschaften der anhaftenden Zellen und/oder der Zellen des Umgebungsgewebes.
- Biologische Inaktivität bzw. fehlende Antigenität. Hierdurch können Abstoßungsreaktionen vermieden werden.

- Ein geeignetes Gleichgewicht zwischen mechanischer Primärstabilität und biologischer Abbaubarkeit. Dies ist für den klinischen Einsatz von besonderer Wichtigkeit, da auch im direkten postoperativen Verlauf die wiederholte Einwirkung mechanischer Kräfte nicht gänzlich vermieden werden kann. Das Leitschienenmaterial muss daher individuell auf den Einsatzort abgestimmt werden, um den lokal unterschiedlichen Ansprüchen gerecht werden zu können (z.B. Gewichtsbelastung).

Ferner müssen aber auch die Auswirkungen weiterer Einflüsse wie z.B. Gammastrahlung oder Sterilisation, die besonders in der klinischen Anwendung von hoher Relevanz sind, genau evaluiert werden. Auch Faktoren wie freie Verfügbarkeit, Lagerbarkeit und kostengünstige Herstellung gewinnen zunehmend an Gewicht.

Eine Einteilung der Leitschienen kann, entsprechend der zugrundeliegenden Ursprungssubstanz, in organisch, anorganisch und synthetisch vorgenommen werden. Desweiteren werden Leitschienen aus einer einzigen Ursprungssubstanz bzw. einem einzigen Ursprungsgewebe von Verbundleitschienen (Leitschiene aus mehreren Stoffen zusammengesetzt = Composites) unterschieden.

Konstrukte aus natürlichen Materialien können die natürliche Umgebung der Zellen am ehesten nachempfinden, da diese oftmals aus Bestandteilen extrazellulärer Matrix wie Kollagen oder Hydroxylapatit bestehen (Crane et al. 1995). Demgegenüber steht jedoch häufig eine verminderte Belastbarkeit oder erschwerte biologische Abbaubarkeit derartiger Materialien, die den Nutzen bzw. die Einsetzbarkeit dieser Leitschienen für die klinische Anwendung in Frage stellen (Karageorgiou und Kaplan 2005, Crane et al. 1995).

Zur genaueren Klassifizierung werden die zur Verfügung stehenden Leitschienenarten weiter in Natürliche Polymere, Synthetische Polymere, Poröse Keramiken, Natürliche Keramiken und Demineralisierte Knochenmatrix unterteilt:

Natürliche Polymere: Hierunter werden Substanzen wie Agar, Fibrin, Kollagen und Hyaluronsäure verstanden. Diese Stoffgruppe zeichnet sich durch gute osteoinduktive und zytokompatible Eigenschaften aus, lässt jedoch mechanische Belastbarkeit vermissen (Neuss et al. 2008, Crane et al. 1995). Die Herstellung erfolgt durch Gefriertrocknung, Aussalzung oder Vernetzung.

Synthetische Polymere: Substanzen wie Polyethylene, Polyactid oder Polyglykolsäuren sind Vertreter dieser Gruppe. Durch die synthetische Herstellung können Faktoren wie mechanische Belastbarkeit, Biodegradierbarkeit, Elastizitätsmodul und Porosität individuell abgestimmt werden (Nasseri et al. 2001). Von Nachteil sind dagegen zellschädigende bzw. proinflammatorisch wirkende Eigenschaften (Rezwan et al. 2006).

Poröse (meist synthetische) Keramiken: Hierzu zählen vor allem Kalziumphosphat-Keramiken und Bioglas. Beide zeichnen sich durch eine hervorragende Biokompatibilität aus. Kalziumphosphat-Keramiken bestehen aus Hydroxylapatit, β -Trikalziumphosphat oder einer Kombination aus beiden. Der Abbau *in vivo* beruht einerseits auf einer hydrolytischen Degradation durch extrazelluläre Flüssigkeit und andererseits auf dem Abbau durch Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und Osteoklasten (Merten et al. 2000). Hydroxylapatit kann sowohl aus boviner Grundsubstanz gewonnen als auch synthetisch hergestellt werden. Vorteile der Kalziumphosphatkeramiken sind die synthetische Anpassbarkeit von Porengröße und Form, nachteilig hingegen eine verminderte Bruchfestigkeit sowie die verzögerte Abbaubarkeit (Rezwan et al. 2006, Karageorgiou und Kaplan 2005, Yang et al. 2002). Als besonderer Vorteil der Hydroxylapatitkeramiken wird vor allem die stöchiometrische Ähnlichkeit zu anorganischen Knochenbestandteilen gesehen (Leukers et al. 2005).

Natürliche Keramiken: Hauptvertreter ist das Exoskelett ozeanischer Korallen. Eigenschaften wie gute Osteokonduktivität, Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit sind von Vorteil. Die Skelettgröße sowie deren Porosität variieren jedoch innerhalb der unterschiedlichen Gattungen (Wu et al. 2009). In manchen Spezies wurden enge Verwandtschaften zu humanem spongiösem Knochen hinsichtlich Permeabilität und mechanischen Eigenschaften gefunden (Wu et al. 2009).

Knochenmatrizen: Für die Anwendung im Tissue Engineering stehen vor allem demineralisierte, anorganische und lösungsmittelkonservierte Knochenmatrizen zur Verfügung, die sich durch hervorragende osteokonduktive Eigenschaften auszeichnen. Besonders demineralisierte Knochenmatrizen weisen darüber hinaus

auch eine gute Osteoinduktivität *in vivo* auf. Bereits in den 1960er Jahren wurde beobachtet, dass durch ektopische Implantation einer demineralisierten Knochenmatrix eine Knochenneubildung induziert werden kann (Urist 1965). *In vitro* scheint dagegen eher ein hoher Mineralgehalt für die osteogene Differenzierung von Vorteil zu sein (Mauney et al. 2005). Die Demineralisierung erfolgt durch Entfernung anorganischer Knochenbestandteile mittels Säureextraktion (Parikh 2002). Zwar kann hierdurch die Form der Knochenmatrix erhalten werden, der Verlust anorganischer (mineralischer) Bestandteile führt jedoch zu einer stark verminderten mechanischen Widerstandsfähigkeit.

Ein Entzug der organischen Knochenbestandteile, zur Herstellung anorganischer Konstrukte, ist analog zu demineralisierten Matrizes mit einer Abnahme der mechanischen Widerstandsfähigkeit verbunden.

Im Rahmen der aufwendigen Lösungsmittelkonservierung von Knochenmatrizes wird in einer Abfolge mehrerer Prozessierungsschritte das Gewebe zunächst entfettet und anschließend von zellulären Strukturen befreit. Die mechanischen und osteokonduktiven Eigenschaften werden durch diese Verfahren nicht beeinträchtigt (Abb. 3).

Wegen den vielschichtigen Anforderungen, die als Voraussetzung zur Eignung für das Tissue Engineering von Knochen an eine Leitschiene gestellt werden, wurden bereits unterschiedlichste Materialien und Verbundstoffe erprobt. Aufgrund der Anforderungsheterogenität konnte dennoch bislang kein Werkstoff alle geforderten Eigenschaften subsumieren. Einen bedeutenden Fortschritt im Hinblick auf die klinische Anwendung verspricht jedoch die individuelle Fertigung synthetischer Knochenersatzstoffe mittels „rapid prototyping“ bzw. 3D-Drucken. Mithilfe computer-tomographischer- oder magnetresonanztomographischer Datensätze ist hierbei die passgenaue Anfertigung defektspezifischer Matrizen auf Hydroxylapatitbasis möglich. Auch die Besiedelung dieser Hydroxylapatit-Konstrukte mit Mausfibroblasten zeigte erste Erfolge (Leukers et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden lösungsmittelkonservierte und mittels Gammastrahlung sterilisierte, bovine Spongiosawürfel (Tutobone®; Tutogen Medical) verwendet (Abb.3), die bereits Zulassung für den klinischen Gebrauch erhielten. Durch das firmeneigene, schonende Behandlungsverfahren (Tutuplast®) kann die natürliche Stabilität sowie die Knochenstruktur der Leitschienen erhalten werden.

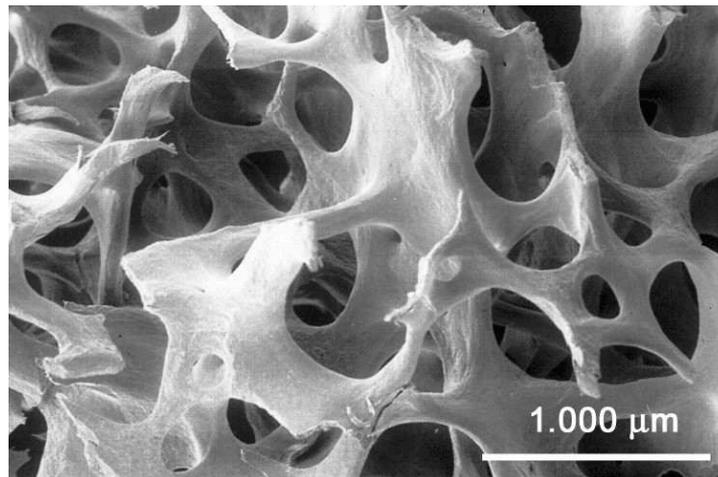


Abb. 3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der lösungsmittelkonservierten Leitschienenstruktur aus boviner Spongiosa. (Bildquelle: Tutobone, Fa. Tutogen Medical)

1.1.4. Osteogene Stimulation und Wachstumsfaktoren

Mesenchymale Stammzellen reagieren auf Stimuli wie extrazelluläre Matrix, lösliche Wachstumsfaktoren, oder mechanische Beanspruchung mit Selbsterneuerung oder Differenzierung entlang einer spezifischen Zellreihe. Das Verständnis regulatorischer Abläufe auf zellulärer Ebene ist somit Grundvoraussetzung erfolgsversprechender Tissue-Engineering Strategien. Nach heutigem Stand sind die beiden bedeutendsten Wege interzellulärer Kommunikation:

- Direkte Kommunikation: Durch Austausch regulatorischer Proteine über Spalt-Verbindungen (gap-junctions).
- Indirekte Kommunikation: Durch Freisetzung löslicher Botenstoffe, die parakrin, autokrin oder endokrin wirken.

1.1.4.1. Wachstumsfaktoren

Eine wichtige Botenstoff-Funktion im Rahmen der indirekten interzellulären Kommunikation kommt den Wachstumsfaktoren zu. Aufgrund intensiver Untersuchungen konnte die Beteiligung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren auch bei Prozessen der Knochenneubildung bzw. Frakturheilung nachgewiesen werden. Der Knochen selbst fungiert hierbei als Reservoir regulatorisch wichtiger Wachstums-

faktoren, die sowohl an der Signalkaskade zur Zellproliferation als auch der Differenzierung osteogener Zellen beteiligt sind (Barnes et al. 1999). Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe zählen:

- Transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF- β)
- Bone Morphogenetic Proteins (BMP)
- Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I und II (IGF I/II)
- Platelet derived growth factor (PDGF)
- Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF)
- Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

Osteogen wirksame Wachstumsfaktoren werden in der Knochenmatrix gespeichert, können aber bei Bedarf auch von Osteoblasten und anderen Zellen gebildet und sezerniert werden (Barnes et al. 1999). Besonders dem BMP wird eine tragende Rolle im Knochenstoffwechsel bzw. der Knochenneubildung zugeschrieben. So werden beispielsweise auch die Beobachtungen von Marshall R. Urist, der die osteoinduktiven Eigenschaften einer ektop implantierten, demineralisierten Knochenmatrix zeigte, heute mit dem natürlichen Vorkommen von BMP in der Knochenmatrix begründet (Harwood und Giannoudis 2005). Diese Annahme wird unter anderem durch Untersuchungen gestützt, bei denen eine BMP-induzierte, osteogene Differenzierung von Muskelvorläuferzellen nachgewiesen werden konnte (Katagiri et al. 1994).

Als Schlüsselfaktor der Angiogenese gilt das VEGF (Ferrara et al. 2003). Hierfür entfaltet es besonders Wirkung auf vaskuläre Endothelzellen (Ferrara et al. 2003). Bereits vor einigen Jahren war die These einer bilateralen Kommunikation von Osteoblasten und Endothelzellen mittels löslicher Signalstoffe wie VEGF geäußert worden (Wang et al. 1997). Nach heutigem Wissensstand tragen Endothelzellen durch Freisetzung regulatorisch wichtiger Wachstumsfaktoren wie BMP-2 und IGF zur Proliferation von Osteoblasten bzw. zur Differenzierung von Osteo-Progenitorzellen bei. Im Gegenzug bewirkt die osteoblastäre Freisetzung großer Mengen an vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor unter anderem die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen (Clarkin et al. 2008, Fiedler et al. 2006, Kaigler et al. 2006).

Zusätzlich sind aber auch Auswirkungen von VEGF auf die osteogene Zelllinie bekannt. Durch Aktivierung spezifischer Rezeptoren wird unter anderem zur Bereitstellung von Osteo-Progenitorzellen beigetragen und die Differenzierung zu Osteoblasten unterstützt (Grellier et al. 2009, Kaigler et al. 2005, Mayr-Wohlfart et al. 2002).

Das Fehlen einer suffizienten Blutversorgung nach Implantation von Zell-Matrix-Konstrukten *in vivo* ist nach wie vor ein großes Problem des Tissue Engineering von Knochen (Santos und Reis 2010). Dies ist vor allem mit Auswirkungen auf die Nährstoffzufuhr und den Stoffwechsel der eingebrachten Zellen verbunden. In limitiertem Ausmaß kann zwar trotz fehlender Gefäßversorgung ein Stoffaustausch über Strecken von 200µm bis 3,5 mm gemäß den Prinzipien der Diffusion erfolgen (Rouwkema et al. 2008, Kruyt et al. 2004), dies ist jedoch, gerade für große besiedelte Leitschienen, zumeist an ein gefäßstarkes Lager gebunden. Da für das Einwachsen vaskulärer Strukturen eine Geschwindigkeit von weniger als einem Millimeter pro Tag angenommen wird, dauert es somit oft mehrere Tage bis energieliefernde Substrate wie Glucose oder Sauerstoff das besiedelte Konstrukt bzw. das Leitschieneninnere erreichen (Nomi et al. 2002, Mikos et al. 1993). Zusätzlich kommt auch der Abtransport entstandener Stoffwechselprodukte (Kohlenstoffdioxid, Laktat etc.) bis zum Anschluss an ein funktionierendes Gefäßsystem weitgehend zum Erliegen (Santos und Reis 2010). Um eine frühzeitige Gefäßversorgung *in vivo* zu gewährleisten wurden bislang unterschiedlichste Strategien entwickelt (Abb. 4). Als viel versprechender Ansatz gilt hierbei auch die Verwendung von Wachstumsfaktoren wie VEGF. So konnte beispielsweise im Defektmodell eine verbesserte Gefäß- und Knochenneubildung durch Verwendung VEGF-beschichteter Leitschienen nachgewiesen werden (Kaigler et al. 2006).

In Anbetracht der Einflüsse von VEGF auf die Neovaskularisierung und Knochenneubildung wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer VEGF-Beimpfung auf die Angiogenese und die Knochenneubildung besiedelter Konstrukte untersucht. Ferner wurden in einer Parallelarbeit (Dissertation von Florian Pohlig) auch die Auswirkungen auf das Zellüberleben analysiert.

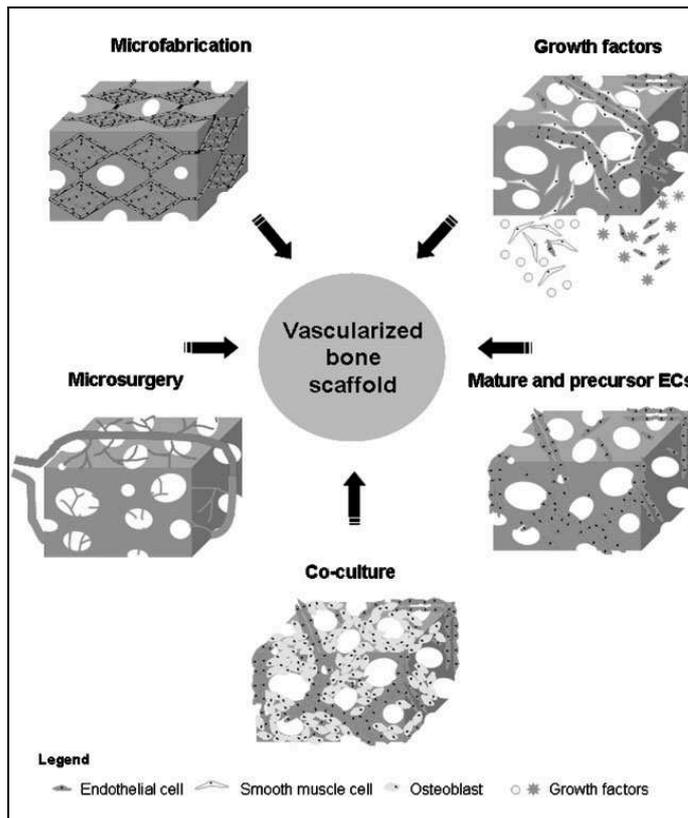


Abb. 4 Schabild experimenteller Strategien zur Sicherstellung einer frühzeitigen Gefäßanbindung von Konstrukten *in vivo* (Santos und Reis 2010): Microfabrication – Entwicklung kleiner Gefäßstrukturen *in vitro*; Growth Factors – Beigabe von Wachstumsfaktoren; Mature and precursor ECs – Besiedelung mit reifen und unreifen Endothelzellen; Co-culture – Gleichzeitige Kultivierung heterogener Zelltypen (z.B. Endothelzellen und Osteoblasten); Microsurgery – microchirurgischer Anschluss an das Gefäßsystem des Wirtorganismus;

1.1.4.2. Osteogene Stimulation

Die komplexen Abläufe der osteogenen Differenzierung sind einer Vielzahl von regulatorisch wirksamen Einflüssen wie zum Beispiel Hormonen oder Vitaminen unterworfen. Ziel der *in vitro* Prädifferenzierung von Stammzellen ist die Steigerung der Knochenneusynthese *in vivo* (Siddappa et al. 2007).

Aufgrund der Beobachtung, dass eine osteogene Differenzierung *in vitro* ohne den Zusatz fötalen Rinderserums (FBS) nicht gelingt, scheint besonders der Zusammensetzung des Nährmediums bzw. dem Gehalt an Serumbestandteilen eine entscheidende Rolle zuzukommen. Da die genaue Zusammensetzung des Serums, sowie das Verhältnis der einzelnen Ingredientien zueinander nicht eindeutig definiert sind, ergeben sich besonders hinsichtlich der Reproduzierbarkeit sowie der Vergleichbarkeit mit anderen Studien gewisse Schwierigkeiten. Fötales Rinderserum allein reicht aber nicht für eine osteogene Differenzierung von Stammzellen

aus. Daher müssen weitere Faktoren mit osteogen stimulierender Wirkung *in vitro* hinzugegeben werden. Die Wirkung dieser Supplemente gründet zumeist auf einer Beeinflussung des Stoffwechsels der Stammzellen, wodurch es zu einer Expression osteogener Stoffwechselprodukte kommt. Besonders die Wirkung von Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure ist in diesem Zusammenhang beschrieben worden (Pereira et al. 2002, Peter et al. 1998, Jaiswal et al. 1997, Choong et al. 1993).

Daneben sind eine Vielzahl weiterer Einflussgrößen wie Bone Morphogenetic Protein (BMP), Insulin-like Growth Factor (IGF), Tumor Necrosis Factor (TNF), Transforming Growth Factor (TGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), aber auch Faktoren wie zytomechanische Kräfte oder interzelluläre Kommunikation mit Endothelzellen als osteogene Stimulantien in der Literatur beschrieben (Hess et al. 2009, Ito et al. 2008, Holtorf et al. 2005, Koch et al. 2005, Harwood und Gianoudis 2005). Das Zusammenspiel all dieser Substanzen *in vivo* ist nur ansatzweise geklärt, wobei sowohl synergistische als auch antagonistische Wechselwirkungen denkbar sind. Im vorliegenden Versuchsansatz wurde als Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet. Als osteogen stimulierende Supplemente wurden Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure 2-Phosphat in Kombination mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) hinzugegeben.

1.1.5. Kultivierung

Die Kultivierung zellbesiedelter Konstrukte stellt eine große Herausforderung im Tissue Engineering von Knochen dar. Hierfür bedarf es neben modernster Labortechnik, wie zum Beispiel Autoklaven und Standardinkubatoren, auch fundiertem Wissen im Umgang mit mesenchymalen Stammzellen. In die Planung des angestrebten Kultivierungsregimes fließt neben Entscheidungsgrößen wie dem Kultivierungsmedium oder differenzierender Zusätze auch die Wahl einer statischen oder dynamischen Kultivierungsform ein.

1.1.5.1. Statische Kultivierung

Die statische Kultivierung ist die einfachste und kostengünstigste Kultivierungsform (Morgan und Yarmush 1999). Hierbei erfolgt die weitere Anzucht der mesenchymalen Stammzellen innerhalb der verwendeten Leitschienen in Zellkulturplatten unter standardisierten Bedingungen in einem Inkubator. Die Anschaffung zusätzlicher Geräte ist nicht erforderlich, der Mediumwechsel wird in regelmäßigen Intervallen vorgenommen. Während statischer Kultur erfolgt die Ernährung diffusionskontrolliert. Das Hauptproblem hierbei stellt die abnehmende Nährstoffversorgung in Richtung Leitschieneninneres dar. Dies birgt zwar Vorteile in der Anzucht von Monoschichten und findet Anwendung bei Kurzzeitkultivierungen, ist jedoch vor allem bei größeren Leitschienen mit höherer Zelldichte von Nachteil (Diederichs et al. 2009). Die unzureichende Ernährung mit Nährstoffen und das fehlende Angebot an Wachstumsfaktoren und anderen Zytokinen sowie der mangelnde Abtransport von Abfallprodukten resultiert in einem limitierten Einwachsen der Zellen und somit einer deutlich reduzierten Zelldichte (Yu et al. 2004). Zusätzlich wird von einer signifikanten Abnahme der Zellzahl statisch besiedelter Konstrukte nach Implantation in vivo berichtet (Seitz et al. 2007).

1.1.5.2. Dynamische Kultivierung

Ziel einer dynamischen Kultivierung ist die Schaffung möglichst realitätsnaher Voraussetzungen zur artifiziellen Neubildung von Knochen. Die Grundlage hierfür ist eine Einbeziehung möglichst vieler Einflussfaktoren der natürlichen Knochenentstehung bzw. Knochenregeneration in das Kulturregime. Hierunter zählen neben mechanischen Stimuli auch Größen wie eine stabile Sauerstoffkonzentration, die Temperatur, der pH-Wert aber auch die Zirkulation am Stoffwechsel beteiligter Produkte.

In vivo wird durch mechanische Krafteinwirkung eine Änderung des hydrostatischen Druckes, eine veränderte zelluläre Belastung und, bedingt durch Flüssigkeitsverschiebungen, die Entstehung von Scherkräften erzeugt (Sikavitsas et al. 2001). Unter bestimmten Bedingungen kann die Anwesenheit derartiger Reize zur Auslösung einer zellulären Antwort führen, was mit dem Begriff der Mechanotransduktion beschrieben wird. In vivo scheint vor allem die mechanisch ausgelöste Verschiebung interstitieller Flüssigkeit hierbei eine wichtige Rolle in der

Signalübertragung zu spielen und unter anderem auch Auswirkungen auf die Proliferation von Osteoblasten zu haben (Sikavitsas et al. 2001, Chambers et al. 1993, Reich et al. 1990).

Um derartige mechanische Stimuli wirkungsvoll nachahmen zu können beinhaltet das Prinzip der dynamischen Kultivierung in Bioreaktoren eine ständige Zirkulation des Kulturmediums. Ferner wird ein stabiles Milieu hinsichtlich der angebotenen Sauerstoffkonzentration, des pH-Wertes und der Temperatur gewährleistet.

Die einfachste Form des Bioreaktors ist ein dynamisierter Kulturbedälter (Spinner flask), in dem die zentriert befestigten Konstrukte von allen Seiten mit Nährmedium umspült werden (Bancroft et al. 2003). Hierdurch kann eine deutlich bessere Nährstoffversorgung der äußeren Zellschichten der Leitschiene erreicht werden, die Versorgung innen liegender Schichten wird jedoch nach wie vor mittels Diffusion bewerkstelligt.

Bei Verwendung von Durchflussreaktoren dagegen wird das Nährmedium direkt durch das interkonnektierende Porengeflecht geleitet um so eine gleichförmige Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aller Leitschienenareale zu gewährleisten. Da so auch ein Abtransport anfallender Stoffwechselmetaboliten sichergestellt werden kann ist in gewissem Ausmaß eine Kontrolle der zellulären Mikroumgebung möglich (Grayson et al. 2008). Ferner stellt der persistierende Flüssigkeitsdurchfluss auch einen mechanischen Stimulus dar. Unter Verzicht auf die Zugabe osteogen wirksamer Supplemente wie Dexamethason konnte die osteoinduktive Wirkung mechanischer Scherkräfte in Durchflussreaktoren gezeigt werden (Holtorf et al. 2005).

Bei „Gradient Containern“ handelt es sich um Bioreaktoren mit mediumgängigen Membranen. Hierbei wird das zu kultivierende Gewebe zunächst zwischen zwei Membranen eingespannt und hierauf fortwährend von Nährlösung durchströmt. Da das Medium nach einmaliger Passage nicht mehr in einen rezirkulierenden Kreislauf eingespeist wird, sondern beständig neues Medium zugeführt wird, kann so eine gleichbleibende Zusammensetzung und Qualität des Nährmediums garantiert werden (Minuth et al. 1998). Unter geeigneten Bedingungen sind so Kultivierungszeiträume von bis zu sechs Wochen möglich (Stengele 2004).

1.1.6. *In vivo* Modelle

Trotz der breitgefächerten und interdisziplinär angelegten Forschung der regenerativen Medizin ist die klinische Anwendbarkeit bislang noch auf wenige Spezialgebiete beschränkt und lässt durchbrechende Ergebnisse weitgehend vermissen. Zwar gelang in der Vergangenheit bereits vereinzelt ein erfolgreicher klinischer Einsatz, dieser stand jedoch meist in keinem Verhältnis zu funktionellem Ergebnis, Aufwand und Belastung für Patient und Arzt (Hentz und Chang 2001, Vacanti und Vacanti 2000). Der Umgang mit pluri- und multipotenten Zellen muß zudem nach wie vor auch kritisch gesehen bzw. klar reglementiert werden. So ist beispielsweise der Einsatz embryonaler Stammzellen, obgleich noch mit komplettem Differenzierungspotential ausgestattet, wegen der Ausbildung von Teratomen und Teratokarzinomen sowohl im undifferenzierten als auch im differenzierten Stadium nicht möglich und zudem ethisch bedenklich (Erdo et al. 2003). Da gerade der experimentelle Charakter des Tissue Engineerings die Erprobung unterschiedlichster und innovativster Ansätze erfordert, muss ein gewisses Stufenschema bis zur klinischen Erprobung eingehalten werden. Dies beinhaltet neben der Testung aufgestellter Hypothesen und Fragestellungen unter Laborbedingungen oftmals als wichtigen Zwischenschritt die weitere Untersuchung im Rahmen von Tiermodellen. Die individuelle Überprüfung des geplanten Studienprotokolls durch die zuständige Ethikkommission stellt hierbei ein wichtiges Instrument zur Sicherung eines ethisch vertretbaren und wissenschaftlichen Umgangs mit Zellen, Geweben und Tieren dar.

Im Rahmen des Tissue Engineerings soll in tierexperimentellen Untersuchungen meist vorrangig Aufschluss über Fragen der Biokompatibilität, der biologischen Aktivität sowie des *in vivo* Verhaltens implantierter Konstrukte gewonnen werden. Hierbei empfiehlt sich besonders der Einsatz von Kleintieren wie Mäusen (Komlev et al. 2010, Seitz et al. 2007, Schieker et al. 2004) oder Ratten (Bahar et al. 2010, Handschel et al. 2010, Drosse et al. 2008), da die Erstellung größerer Versuchsgruppen zur Erhebung multimodaler Daten mit relativ geringem finanziellem und räumlichem Aufwand verbunden ist. Im Allgemeinen ist bei Kleintieren zudem die relativ kurze Lebenserwartung von Vorteil, da so Alterungsprozesse simuliert und deren Auswirkungen beurteilt werden können (Liebschner 2004). Von Nachteil ist das niedrig differenzierte Knochengewebe der Kleinnager, das ohne das Vorliegen von Havers-systemen keine direkte Übertragung von Knochenstudien auf die Hu-

mansituation erlaubt (Nunamaker 1998). Da Tissue Engineering Strategien zu- meist den Einsatz von zellulären Strukturen bzw. antigenen Materialien beinhalten, finden vor allem genmanipulierte (knock-out) oder immunmanipulierte Kleintiere (v.a. Mäuse) breite Anwendung.

In Großtierversuchen können hingegen neben biologischen Fragestellungen auch Auswirkungen mechanischer Beanspruchung oder anatomischer Gegebenheiten besser untersucht werden. In weiterführenden Studien werden Großtierversuche auch als Vorbereitung auf die klinische Erprobung durchgeführt. Hierbei können Implantate oder chirurgische Techniken für den Einsatz am menschlichen Körper erprobt werden. Neben größeren anatomischen Verhältnissen besitzen diese Tiere auch eine dem Menschen ähnlichere Knochenstruktur. Nachteile entstehen bei Großtierversuchen hauptsächlich durch den immensen logistischen und finanziellen Aufwand, der die Bildung großer Untersuchungsgruppen und langer Beobach- tungszeiträume oftmals unmöglich macht.

In Abhängigkeit der zugrundeliegenden Fragestellung ist zudem zwischen einer ektopen und orthotopen Implantationsform zu entscheiden. Hierbei gelten folgen- de Unterscheidungsmerkmale:

- Ektope Implantation: Die Einbringung erfolgt in eine gewebefremde Lokali- sation (z.B. subkutane Implantation eines besiedelten Knochenkonstrukts).
- Orthotope Implantation: Die Einbringung erfolgt in Gewebe gleicher Art (z.B. ossäre Defektfüllung mittels besiedeltem Knochenkonstrukt).

1.1.6.1. Orthotope Implantation

Ein orthotopes Knochenmodell eignet sich besonders zur Untersuchung von Re- generationsprozessen im Rahmen von Frakturen oder Knochendefekten und zur Evaluation der Osteointegration von Implantaten. Prinzipiell können hierfür sowohl Kleintiere (Drosse et al. 2008, Jager et al. 2005) als auch Großtiere (Regauer et al. 2005, Kruyt et al. 2004) herangezogen werden. In Abhängigkeit der biomecha- nischen Gegebenheiten am Untersuchungsort lässt sich eine weitere Unterglieder- ung in mechanisch beanspruchte Fraktur bzw. Defektmodelle und Bohrlochmo- dellern an der Knochenmetaphyse oder Schädelkalotte, die größtenteils frei von

biomechanischen Einflüssen sind, vornehmen. Frakturmodelle lassen besonders die fokussierte Betrachtung der zeitlichen und strukturellen Abläufe von Reparaturprozessen und beeinflussender Faktoren während der Knochenheilung *in vivo* zu. Defektmodelle werden hingegen vielfach genutzt, um die Verwendbarkeit bzw. die biologische Wirksamkeit von Knochenersatzmaterialien zu prüfen und Informationen über die Osteointegration des Materials zu erhalten. Hierfür sind besonders Defekte kritischer Größe von Vorteil. Diese sind durch das Vorliegen einer derart großen Defektausdehnung charakterisiert, dass eine autonome, knöcherne Heilung innerhalb eines Patientenlebens ausgeschlossen ist (Schmitz und Hollinger 1986). Bohrlochdefekte eignen sich besonders, um den Einfluss einer definierten Untersuchungsgröße auf Heilungsprozesse des Knochens zu ermitteln. Da lange Röhrenknochen meist ein ersatzstarkes Lager aufweisen, kann jedoch eine Verschleierung der Versuchsergebnisse durch knocheneigene Mechanismen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine mögliche Alternative bietet daher das relativ ersatzschwache Lager der Schädelkalotte, wobei Ergebnisse wegen des desmalen Ossifikationsmuster am Schädelknochen nur begrenzte Aussagekraft besitzen.

1.1.6.2. Ektope Implantation

Da im Tissue Engineering von Knochen zumeist die osteogene Kapazität einer Leitschiene bzw. eines Zell-Matrix-Konstrukts nachgewiesen oder umschriebene Einflüsse auf die Knochenneubildung getestet werden sollen, ist besonders die ektope Implantation von Vorteil. Nachdem die osteoinduktiven Einflüsse von vitalem Knochengewebe und dessen angrenzender Strukturen im knochenfernen Gewebe größtenteils fehlen, entstehen osteoinduktive Potentiale meist durch das Implantat selbst. Aussagen hinsichtlich der funktionellen Eignung eines Implantats bzw. des biomechanischen Verhaltensmusters *in vivo* können dagegen wegen dem fehlenden Einwirken mechanischer Kräfte an ektoper Stelle nicht getroffen werden.

Wirksamkeit bzw. Auswirkungen der zu untersuchenden Versuchsgrößen können im ektope Lager weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen beurteilt werden. Desweiteren sind zuverlässige Aussagen über die Einsprossung von Gefäßen und das Integrationsverhalten der Leitschiene in das umgebende Gewebe

möglich. Die Ergebnisse der ektopen Implantation sind jedoch, nicht zuletzt aufgrund der kennzeichnenden Unterschiede nicht ohne weiteres auf das orthotope Lager zu überführen (Kruyt et al. 2004).

Die Implantation erfolgt oftmals in die paravertebrale Subkutis, wodurch eine weitreichende iatrogene Begleitmorbidität und die damit verbundenen, beeinträchtigenden Regenerationsprozesse vermieden werden können. Eine große Herausforderung ist jedoch nach wie vor, das Überlebens der transplantierten Zellen *in vivo* zu sichern (Mooney und Mikos 1999). Vor allem die fehlende Blutversorgung und der mangelnde Austausch von Stoffwechselprodukten scheinen hierbei limitierende Faktoren zu sein und können bereits während der ersten Stunden zu einem breiten Zelluntergang führen (Seitz et al. 2007, Muschler et al. 2004).

Zur fokussierten Betrachtung des Einflusses der osteogenen Stimulation und Beimpfung mit VEGF auf die Gefäß- und Knochenneubildung besiedelter Konstrukte wurde in der vorliegenden Arbeit auf ein ektopes Implantationsschema zurückgegriffen.

1.1.7. Histologischer Nachweis

Die histologische Untersuchung stellt eine Standardmethode dar, um den Knochenmetabolismus sowie die Vitalität auf zellulärer Ebene in gewissem Rahmen zu erfassen und qualitativ zu beurteilen. Histologische Schnitte stellen Momentaufnahmen - in unserem Fall des Explantationszeitpunkts - dar, die keine Aussagen über die Dynamik eines Prozesses erlauben. Durch die Gewebsentnahme zu unterschiedlichen, aufeinanderfolgenden Zeitpunkten, können jedoch in beschränktem Umfang auch Rückschlüsse auf zeitliche Entwicklungen *in vivo* gezogen werden.

Für eine Reihe histologischer Standardfärbungen stehen Protokolle sowohl für demineralisierte als auch für unentkalkte Knochenpräparate zur Verfügung.

Die Entkalkung der Knochenproben dient der Vorbereitung auf den Schneidprozess. Durch Zugabe von EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) oder Trichloressigsäure wird der Mineralgehalt und somit auch die mechanische Widerstandskraft des Knochens nach und nach verringert, wodurch ein gutes Schneidverhalten erreicht wird. Die Anfertigung von entkalkten Schnittpräparaten ist im

Vergleich zu unentkalkten Proben weniger aufwendig und zudem technisch einfacher. Nachteile entstehen jedoch durch, während der Entkalkung entstehende, Schrumpfungsartefakte. Unentkalkte Proben werden zunächst in Methylmetacrylat oder ähnlichen Substanzen eingebettet, bevor die Erstellung von Dünnschnittschnitten erfolgen kann. Im Vergleich zu entkalkten Proben, die je nach Größe und Ausmaß nach wenigen Tagen geschnitten werden können, stellt das Einbetten, Konfektionieren und Schneiden unentkalkter Präparate einen relativ langwierigen und technisch anspruchsvollen Prozess dar. Zudem kann die Entstehung von Riss- und Bruchartefakten als Folge des Schneideprozesses nicht gänzlich vermieden werden. Andererseits werden durch den Verzicht auf eine Entkalkung strukturelle und färberische Veränderungen des Gewebes minimiert und zudem der Mineralgehalt als kennzeichnender Knochenbestandteil erhalten.

Neben der Durchführung von Standardfärbungen, wie zum Beispiel der Hämatoxylin-Eosin Färbung, die einen guten Überblick über die verschiedenen Zell- und Gewebetypen ermöglicht und eine Beurteilung der Zellmorphologie erlaubt, ist zur Sicherung der Ergebnisse meist auch der Einsatz von Spezialfärbungen unumgänglich. Mit Hilfe der Masson-Goldner Trichromfärbung können kollagenen Fasern, neugebildetes Osteoid und mineralisierte Knochenstrukturen gut voneinander abgegrenzt werden. So erscheinen kollagene Faser nach Färbung hellgrün, Osteoid rot und mineralisierter Knochen dunkelgrün. Die Toluidin-blau Färbung ist eine Kernfärbung, bei der durch gute Kontrastierung der Zellkerne eine genaue Identifizierung und Unterscheidung der einzelnen Zelltypen gelingt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl demineralisierte als auch unentkalkte Schnittpräparate angefertigt. Diese wurden nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, Masson-Goldner Trichrom und Toluidin-blau einer deskriptiven histologischen Auswertung unterworfen.

1.2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob die osteogene Stimulation und Beimpfung mit vaskulärem endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF) einen Einfluss auf die ektope Knochenneubildung besiedelter Konstrukte *in vivo* besitzt.

Da eine insuffiziente Gefäßversorgung nach Implantation besiedelter Konstrukte *in vivo* als mögliche Ursache für das Fehlschlagen bisheriger Tissue Engineering Ansätze gilt, sollte im Rahmen der vorliegenden Studie geprüft werden, ob durch Zugabe eines angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktors (VEGF) eine frühe Gefäßversorgung *in vivo* sichergestellt und eine *de novo* Synthese von Knochen durch osteogen stimulierte Vorläuferzellen induziert werden kann.

Um den Einfluss der osteogenen Stimulation auf die Knochenneubildung im ektope Lager zu verdeutlichen, wurde ein statischer Kultivierungsansatz unter Zusatz osteogen stimulierender Supplemente gewählt.

Die bislang in unserer Arbeitsgruppe verwendeten zylindrischen Leitschienen (\emptyset 9mm, Höhe 3mm) schienen zudem für die ektope Implantation und einen diffusionsgesteuerten Stoffwechsel in der mäßig vaskularisierten Maussubkutis überproportioniert.

Im vorliegenden Versuchsansatz wurden daher kleinere, quadratische Leitschienen (Kantenlänge 3mm) gewählt.

Der Einfluss einer osteogenen Stimulation und VEGF-Beimpfung wurde nach 2 und 12 Wochen *in vivo* untersucht.

Zur fokussierten Auswertung wurden hierfür vier Untersuchungsgruppen gebildet: unbesiedelte Leitschienen (Kontrollgruppe), besiedelte Leitschienen, besiedelt Leitschienen mit osteogener Stimulation, besiedelt Leitschienen mit osteogener Stimulation und Beimpfung mit VEGF.

Die histologische Auswertung erfolgte anhand von Kryoschnitten und Dünnschnitten nach gewebeschonender Einbettung in Methylmetacrylat. Das Zellüberleben wurde in einer Parallelarbeit (Dissertation von Florian Pohlig) mittels PCR beurteilt und quantifiziert.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellen

Bei den durchgeführten Versuchsreihen kamen ausschließlich humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) der Firma Cambrex (New Jersey, USA) von gesunden Spendern unterschiedlichen Geschlechts und Alters zur Verwendung. Diese wurden durch Auftrennung über Dichtegradienten von Knochenmarksaspiraten gewonnen. Der Nachweis des Stammzellcharakters des gewonnenen Zellguts wurde einerseits durch die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierbarkeit, andererseits durch den Nachweis spezifischer Oberflächenantigene bzw. deren Fehlen in der Durchflusszytometrie geführt (Pittenger et al. 1999).

2.1.2. Medien und Zellexpansion

Die Anzucht der beschriebenen Stammzellen erfolgte gemäß Herstellerempfehlung mit Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM). Zur Stimulation der osteogenen Differenzierung bestimmter Versuchsgruppen erfolgte die weitere Kultivierung der Stammzellen nach Überführung auf Leitschienen in vitro mit D-MEM high glucose (Firma Gibco, Carlsbad, USA) unter Zugabe osteogener Supplemente. Diese sind wie folgt: 10% (w/v) FBS, 100nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat, 50 μ M L-Ascorbinsäure 2-Phosphat, 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin und 4 mM L-Glutamin. Das erstellte osteogene Differenzierungsmedium wurde unter Lagerung bei 4°C bis maximal vier Wochen nach Herstellung verwendet.

Die Expansion und Kultivierung der Stammzellen erfolgte in T-75 Zellkulturflaschen in einem Standardinkubator unter konstanten Bedingungen mit einer Temperatur von 25°C und 5% CO₂-Gehalt. Alle zur Kultivierung erforderlichen Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank mit kontinuierlichem laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zahl an mesenchymalen Stammzellen pro T-75 Kulturflasche betrug $2,5 \times 10^5$ Zellen (ca. 3333 Zellen pro cm²). Die ausgesäte hMSC-Zellzahl wurde gemäß Standardprotokoll nach Trypanblau-Färbung mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

In Abständen von zwei bis drei Tagen wurde das Stammzell-Kulturmedium steril mittels Vakuumpumpe abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die kultivierten Zellen in die nächste Passage überführt. Hierfür wurden die Zellen nach Entfernung des Kulturmediums unter Zuhilfenahme einer Trypsin/EDTA Lösung vom Boden der Kulturflaschen gelöst und nach Zentrifugation und Resuspension in definierter Menge erneut disseminiert. Nach Vollendung der 4. Passage erfolgte das Umsiedeln der hMSCs auf Leitschienen (Vorgehen: siehe Anhang Protokoll 1).

2.2. Inkubation der Leitschienen *in vitro*

2.2.1. Leitschienen

Bei der vorliegenden Versuchsanordnung kamen ausschließlich Leitschienen (Tutobone) der Firma Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand, Deutschland) zur Anwendung. Die gewählten Konstrukte besaßen eine quadratische Form und zeigten Abmessungen von 3 mm Kantenlänge. Die Gewinnung der Leitschienen erfolgte gänzlich aus boviner Knochenspongiosa. Während des von der Firma Tutogen Medical patentierten Tutoplast[®] Prozesses, durchlaufen die gewonnenen Leitschienen mehrere Fabrikationsschritte. Diese dienen nach Erhalt der quadratischen Form in erster Linie der Inaktivierung von Viren und Prionen, Entfernung antigener Strukturen, sowie der Gammastrahl-Sterilisation.

2.2.2. Besiedelung der Leitschienen

Alle versuchszugehörigen Leitschienen wurden zunächst am Vortag der geplanten Besiedelung für eine Dauer von sechs Stunden in FBS und im Anschluss daran über Nacht mit MSCGM in 48-Well-Schalen (Firma Nunc, USA) vorinkubiert. Mit Hilfe dieses Prozesses sollte vor allem eine bessere Haftung der Stammzellen an der spongiösen Leitschienenstruktur ermöglicht werden. Mit unbesiedelten Kontrollleitschienen wurde analog verfahren. Nach vorangehenden regelmäßigen Kontrollen der Zellkonfluenz wurden die kultivierten Stammzellen am Besiedelungstag passagiert und deren Anzahl mittels oben beschriebenen Verfahren quantifiziert. Die gewählte

Besiedlungszellzahl von $1,1 \times 10^6$ hMSCs je Leitschiene wurde in hochkonzentrierten Zellsuspensionen von je 660 μl aufgebracht. Zur Steigerung der Besiedlungseffizienz wurde die Zellaussaat gemäß eines mehrstündigen Besiedlungsprotokolls vollzogen. Hierfür wurden die Leitschienen zunächst über zwei Stunden im Abstand von 20 Minuten nach vorgegebenem Muster gewendet, die überstehende Zell-Mediumlösung resuspendiert und erneut aufgebracht. Hierauf folgte eine zweimalige Wiederholung des beschriebenen Versuchsschritts mit je einstündigem Inkubationsintervall. Zuletzt, nach weiteren Stunden Inkubation wurden die Zell-Matrix-Konstrukte auf neue 48-Well-Schalen verpflanzt und über Nacht inkubiert. Zur Ermittlung der genauen Besiedlungseffizienz der einzelnen Leitschienen wurde die verbliebenen Zellzahlen der in den Besiedlungswells überstehenden Zellsuspensionen getrennt bestimmt. Somit konnte die prozentuale Beimpfungseffizienz je Leitschienen errechnet werden.

2.2.3. Kultivierung der Leitschienen

2.2.3.1. Kultivierung unbesiedelter Leitschienen

Leitschienen dieser Versuchsgruppe ($n=12$) wurden ohne Stammzellbesiedlung analog der besiedelten Reihe für 2 Wochen in Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) kultiviert. Um einer möglichen Zellaussaat entgegenzuwirken wurde das Medium der unbesiedelten Leitschienen vor dem der besiedelten gewechselt. Zudem wurden bei jedem Mediumwechsel ausschließlich steril verpackte Einmalartikel oder autoklaviertes Instrumentarium verwendet.

2.2.3.2. Kultivierung besiedelter Leitschienen ohne osteogene Stimulation

Die besiedelten Konstrukte ($n=12$) wurden in 48-Well-Schalen unter standardisierten Bedingungen in einem Brutschrank für weitere 14 Tage kultiviert. Als Kulturmedium wurde ausschließlich Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) ohne Zugabe weiterer Supplemente verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

2.2.3.3. Kultivierung besiedelter Leitschienen mit osteogener Stimulation

Zur osteogenen Stimulation der verpflanzten mesenchymalen Stammzellen innerhalb der Leitschienen (n=24) wurde am ersten Tag nach erfolgreicher Besiedelung das mesenchymale Stammzell-Nährmedium durch D-MEM high glucose unter Zugabe osteogen wirksamer Supplemente (siehe oben) ersetzt. Die Kultivierung unter osteogener Stimulation wurde für 2 Wochen bei regelmäßigem Mediumwechsel alle drei Tage weitergeführt.

2.2.3.4. Kultivierung besiedelter Leitschienen mit osteogener Stimulation und VEGF

Einzelne Zell-Matrixkonstrukte (n=12) wurden analog zu obengenannter Gruppe osteogen stimuliert und kurz vor *in vivo* Implantation mit 0,8 µg rekombinantes murines VEGF₁₆₅ (Firma Peprotech, Rocky Hill, USA) vorbehandelt. Hierfür erfolgte zunächst die Auflösung und Verdünnung des VEGF mit 50 µl PBS. Anschließend wurde die Lösung unter mehrmaligem Resuspendieren des Überstandes auf die besiedelten Leitschienen aufgebracht. Zwischen der Zugabe von VEGF und der Implantation *in vivo* wurde ein Zeitintervall von 15 Minuten nicht überschritten.

Ziel der Vorbehandlung mit VEGF war die Stimulation der Angiogenese und somit ein frühzeitiger Anschluss an das Gefäßsystem *in vivo*.

2.3. Tierversuche

Vor Beginn der Tierversuche wurde eine Genehmigung bei der Tierkommission der Regierung von Oberbayern eingeholt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte gemäß den Richtlinien zur Versorgung und Behandlung von Labortieren der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im beschriebenen Versuchsansatz wurden ausschließlich 6 - 8 Wochen alte, athymische Nacktmäuse (nu/nu) der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) mit einem Lebendgewicht von 25 - 30 g eingesetzt. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

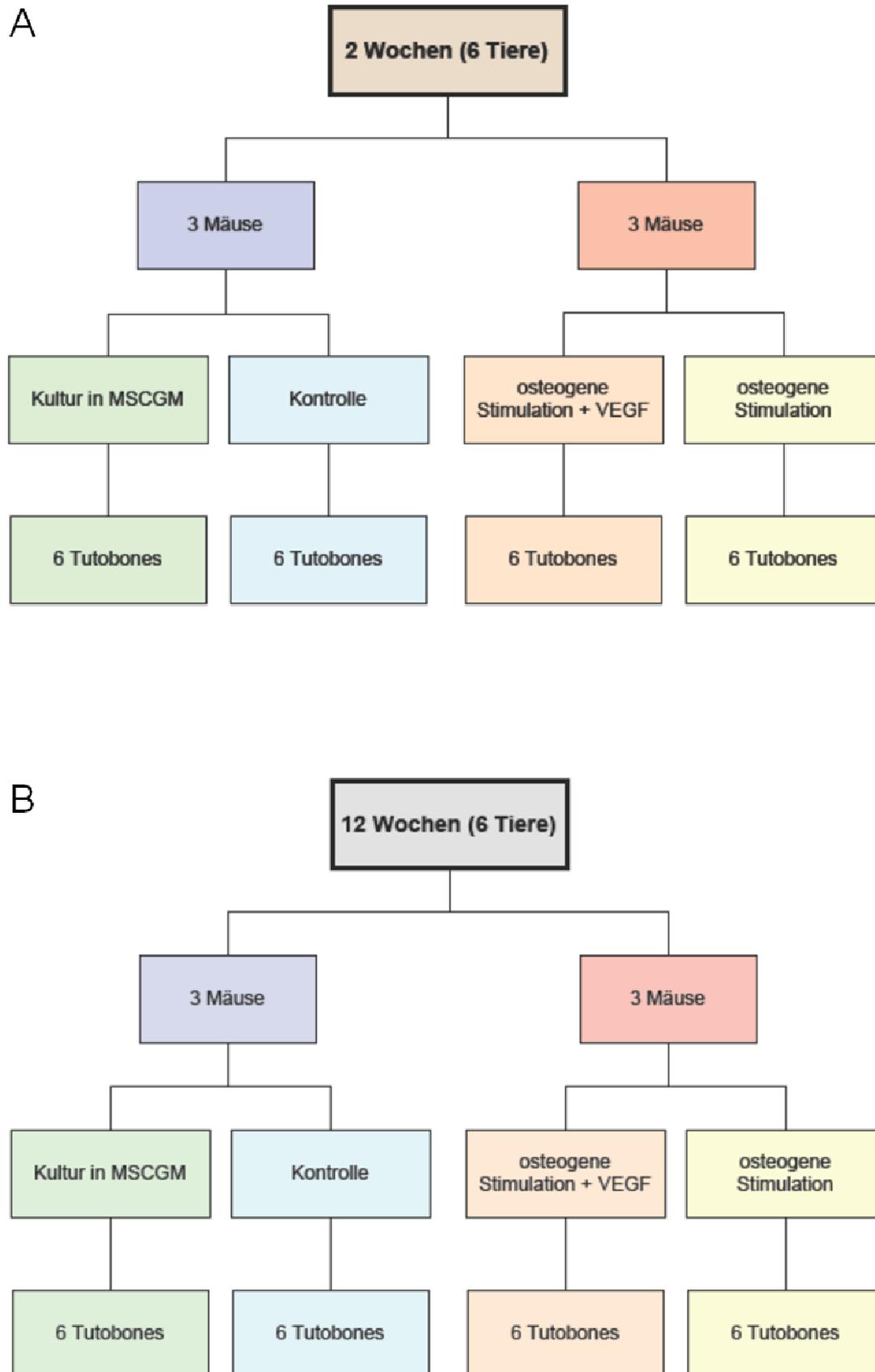


Abb. 5 Schematische Darstellung und Versuchsaufbau der Tierversuche: A – Versuchsaufbau bei 2-wöchigem Implantatverbleib; B - Versuchsaufbau bei 12-wöchigem Implantatverbleib; (MSCGM = Mesenchymal Stem Cell Growth Medium, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor)

2.3.1. Implantation der Leitschienen

2.3.1.1. Anästhesie

Zur Bestimmung der individuellen gewichtsadaptierten Verabreichungsdosis wurden alle Tiere vor Versuchsdurchführung zunächst gewogen. Die erforderliche Menge an Narkoselösung wurde direkt vor Versuchsbeginn hergestellt. Hierfür wurden jeweils 2ml Fetanyl (0,05mg/ml), 2ml Dormicum (5mg/ml) und 1ml Domitor (1mg/ml) zu einem Gemisch vermengt. Der verabreichten Narkoselösung lag eine Endkonzentration von 0,025 mg Fentanyl/ml, 2,5mg Dormicum/ml und 0,05 mg Domitor/ml zu Grunde. Die Applikation von 2,5ml Narkosegemisch pro Kilogramm Körpergewicht erfolgte intramuskulär in den linken Hinterlauf (M. semitendinosus, M. semimembranosus). Um eine exakte Dosierung der kleinen Volumina zu gewährleisten wurden zur Verabreichung Spritzen mit einem Fassungsvermögen von 1ml benutzt. Das erforderliche Antidot wurde aus 5ml Anexate (0,1mg/ml), 3ml Narcanti (0,4 mg/ml) und 0,5 ml Antisedan (5mg/ml) hergestellt.

Die Fixierung der Mäuse in Bauchlage wurde mit Leukosilk-Klebestreifen über allen 4 Extremitäten vorgenommen. Zur Wärmeisolation diente eine zellstoffbezogene Styroporunterlage. Alle Versuchsschritte wurden unter standardisierten Bedingungen unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Während der gesamten Versuchsdauer wurde stets auf eine ausreichende Narkose der Mäuse geachtet.

2.3.1.2. Operatives Einbringen der Leitschienen

Um das Risiko einer hohen Begleitmorbidity niedrig zu halten und eine möglichst komplikationslose Explantation zu gewährleisten wurden alle Konstrukte in präformierte Taschen innerhalb der murinen Subkutis implantiert. Als Zugang wurde ein etwa 4cm langer, dorsocaudaler Schnitt über den Processus spinosi gewählt. Anschließend wurden mittels stumpfer Präparation links und rechts paravertebral je 2 subkutane Taschen geschaffen. Bei Einbringen der Leitschienen wurde darauf geachtet, eine mögliche iatrogene Kontamination der Leitschienen untereinander durch chirurgisches Besteck zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden unbesiedelte bzw. rein osteogen stimulierte Konstrukte ohne Vorbehandlung mit VEGF zuerst implantiert (Abb. 6). Nach Einlage der Leitschienen in die präformierten Taschen wurden diese mit Hilfe einer Subkutannaht verschlossen. Hierdurch sollte eine mögliche geo-

graphische Annäherung bzw. eine Berührung der eingesetzten Tubobones *in vivo* während des Beobachtungszeitraums verhindert werden. Im vorliegenden Versuchsansatz wurden unbesiedelte Konstrukte und rein osteogen stimulierte Leitschienen ohne Vorbehandlung mit VEGF jeweils links paravertebral eingebracht (Abb. 6), während besiedelte bzw. osteogen stimulierte und mit VEGF vorbehandelte Tubobones rechts paravertebral implantiert wurden. Nach erneuter Lagekontrolle erfolgte Wundverschluss und Hautnaht mit Vicryl SH 3/0 in Einzelknopftechnik.

Nach Beendigung der Operation wurde die Narkose mit oben genanntem Antidot in einer Dosierung von 8,5ml pro Kilogramm Körpergewicht antagonisiert. Die Verabreichung erfolgte intramuskulär (M. semitendinosus, M. semimembranosus) je zur Hälfte am linken und rechten Hinterlauf. Zur postoperativen Analgesie wurden 0,05ml Tramadol nuchal injiziert. Die postoperative Aufwachphase wurde überwacht und mit klinischen Tests nach 10 bzw. 15 Minuten kontrolliert. Alle eingebundenen Versuchstiere zeigten direkt postoperativ ein artgerechtes Verhalten und scheinbare Schmerzfreiheit.

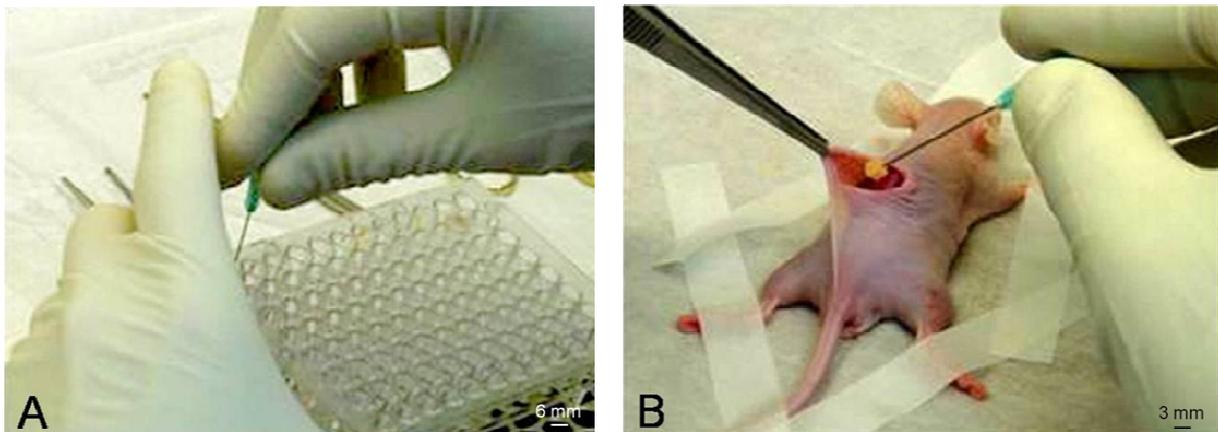


Abb. 6 Implantation der Leitschienen: A - Um einer iatrogenen Zell- bzw. Keimverschleppung vorzubeugen, wurden sterile Einmalartikel verwendet; B – als erstes wurde jeweils die Implantation der „unbesiedelten“ bzw. „nicht VEGF-beimpften“ Konstrukte links paravertebral vorgenommen.

2.3.2. Explantation der Leitschienen und Organentnahme

Die Explantation der Konstrukte sowie die geplante Organentnahme wurden gemäß Studienprotokoll nach 2 bzw. 12 Wochen durchgeführt. Hierfür erfolgte nach individueller Untersuchung und Narkose (siehe Implantation) die Fixierung in Bauchlage mit Leukosilk-Klebestreifen auf einer zellstoffbezogenen Styroporunterlage. Im Bereich des noch gut sichtbaren Zugangsweges der Implantation wurde die Haut mit

einer Pinzette angehoben und anschließend mit einer Schere über den Processus spinosi kranialwärts eröffnet. Um eine mögliche iatrogene Kontamination unbesiedelter Leitschienen zu vermeiden, wurden unbesiedelte Leitschienen stets zuerst entnommen. Zunächst wurden die eingebrachten Subkutannähte entfernt. Anschließend wurden die Leitschienen unter vorsichtiger Präparation dargestellt und unter Mitentnahme von Kutan- und Subkutangewebe (dorsal) bzw. Anteilen des M. latissimus dorsi (ventral) *in toto* explantiert. Durch die gleichzeitige Entnahme angrenzender Strukturen sollte bei der histologischen Auswertung eine Orientierung hinsichtlich der *in vivo* Implantatlage ermöglicht werden.

Nach Entnahme wurde je eine der 2 paravertebral rechts bzw. links gelegenen Leitschienen in einer sterilen Petrischale in 2 Hälften gleicher Größe geteilt. Eine Hälfte, die als unentkalkte Probe zur histologischen Untersuchung bestimmt war, wurde für 24 Stunden in einem Gläschen mit einem Formaldehyd/Methanol-Gemisch fixiert, die andere Hälfte wurde für 24 Stunden in 100% Methanol gelagert und anschließend dem Entkalkungsprozeß zugeführt (Abb. 7).

Das jeweils zweite explantierte Konstrukt gleicher Vorbehandlung wurde einer molekularbiologischen Auswertung unterworfen (Abb. 7; Parallelarbeit von Florian Pohlig) und hierfür zunächst in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Für die molekularbiologische Untersuchung wurden die, am Leitschienen-Präparat anhaftenden Gewebeteile, bestehend aus Haut und Muskelanteilen (siehe oben), mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und ebenfalls bei -196°C schockgefroren.

Nach erfolgreicher Entnahme der Konstrukte wurden die Versuchstiere in Rückenlage gedreht und erneut an allen 4 Extremitäten fixiert.

Euthanasie wurde tierschutzgerecht durch zervikale Dislokation erreicht. Anschließend wurde das Herz der Tiere punktiert und 0,8 bis 1ml Blut mittels einer 1ml Omnifix-Spritze (50 μl EDTA vorgelegt) entnommen. Das Blut wurde hierauf in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Laparotomie durch Längseröffnung der *linea alba* folgte nun die Entnahme von Lunge, Milz, Leber, Niere, Herz, Gehirn und Hoden. Alle entnommenen Organproben wurden in Kryoröhrchen verbracht und bei -196°C schockgefroren. Die weitere Lagerung der gewonnenen Proben bis zur molekularbiologischen Untersuchung erfolgte bei -80°C .

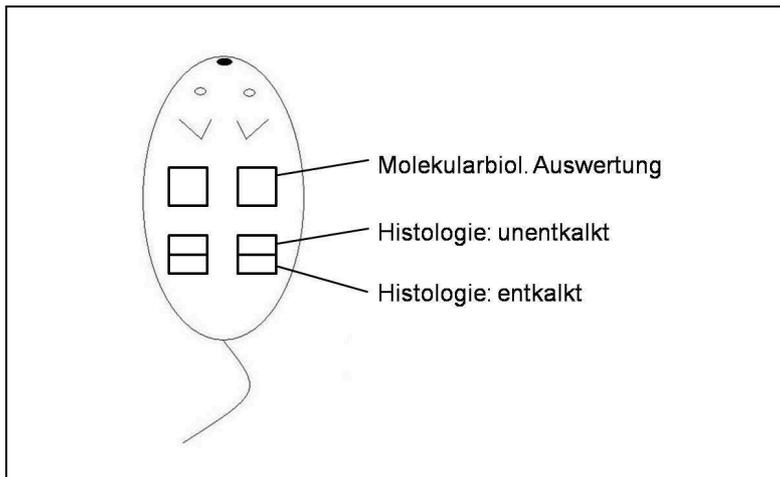


Abb. 7 Schematische Darstellung der Implantatposition *in vivo* und des Auswertungsregimes.

2.4. Histologische Auswertung

2.4.1. MMA-Einbettung

Nach Entnahme und Halbierung der Leitschienen unter sterilen Bedingungen wurden beide Hälften einer histologischen Untersuchung und Auswertung zugeführt. Je eine Hälfte wurde ohne vorhergehende Entkalkung geschnitten und gefärbt, wofür eine Einbettung in Methylmetacrylat (MMA) gewählt wurde. Anders als bei der Anwendung von Kryotechniken ist hierbei keine vorhergehende Entkalkung des Präparates erforderlich, wodurch vorbebehandlungsbedingte Veränderungen der Struktur und des Färbeverhaltens vermindert werden können.

Für die MMA-Einbettung wurden die entsprechenden Leitschienenhälften direkt nach Explantation zunächst in einem Formaldehyd/Methanol-Gemisch für 24 Stunden fixiert. Dieses setzte sich zu 64% aus Methanol absol., zu 33,3% aus 35%igem Formaldehyd und zu 2,76% aus 1%iger Sucrose in PBS (Phosphate-Buffer-Saline) zusammen. Nach Ablauf der 24-stündigen Fixation wurden die Proben in kleinen Glasgefäßen mittels aufsteigender Alkoholreihe (2x70%, 1x80%, 1x90%, 2x100% Ethanol, 2x Aceton) dehydriert. Ein Wechsel des 70%igen Ethanols erfolgte noch am Abend des ersten Tages, die Wechsel der folgenden Dehydrationschritte wurden in einem Rhythmus von einem Tag durchgeführt. Die Aufbewahrung der Proben fand in Kühlschränken bei -4°C statt. Im Anschluss an die Entwässerung wurden die Proben für 48 Stunden in reinem MMA bei 4°C präinfiltriert. Ein Wechsel des vorgelegten

MMA wurde nach 24 Stunden vorgenommen. Nach Präinfiltration der Proben folgte die endgültige Infiltration in kleinen Glasgefäßen mit zuvor angefertigtem MMA-Einbettgemisch. Dieses bestand aus 100ml MMA, 25 ml Plastoid N (Monphenyl-Polyethyl-Glycol-Acetat) und 3,5g Benzoylperoxid. Um eine möglichst hohe Verteilung bei Prä- und Infiltration zu gewährleisten, wurden die Proben im Anschluss an das Einbringen in MMA in einem Exsikkator für 20 Minuten vakuumgelagert. Alle aufgeführten Schritte wurden unter einem Abzug durchgeführt.

Nach Einbettung mit oben genanntem MMA-Gemisch wurden die Proben zur Polymerisation für circa 3 Wochen bei Raumtemperatur in einem Wasserbad gelagert. Der Stand der Aushärtung wurde in regelmäßigen Abständen auf Vollständigkeit geprüft.

2.4.1.1. Anfertigung histologischer Schnitte und Erstellen der Objektträger

Nach vollständiger Polymerisation wurden die ausgehärteten Blöcke durch Zerschlagen der Glashülle von dem umgebenden Einbettgefäß getrennt. Die Konfektionierung der Blöcke in Würfel geeigneter Passform wurde mittels Bandsäge erreicht. Die neu entstandenen Begrenzungsflächen wurden mit einer Bandschleifmaschine angeschliffen. Um eine schrittweise Annäherung an die gewünschte Schnittebene zu erlangen, wurden die konfektionierten MMA-Würfel zunächst auf einen Probenstempel aufgebracht und anschließend mit einer Innenlochsäge und einer Schnittstärke von 100µm bis zum Erreichen der gewünschten Schnittebene zugeschnitten.

Hierauf wurden an einem Hartschnittmikrotom Dünnschnitte der Stärke 4µm erstellt. Als Schneidflüssigkeit diente 30%iges Ethanol. Das ebenmäßige Aufziehen der Schnitte auf Superfrost plus[®]-Glasobjektträger (Firma Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Deutschland) wurde unter Verwendung von 96%igem Ethanol als Streckreagens erreicht. Nach Aufbringen der angefertigten Schnitte wurde die Oberfläche der Glasobjektträger mit einer PVC-Folie abgedeckt und überstehende Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt. Im Anschluss wurden die erstellten Objektträger unter Druck in einer Metallzwinde über Nacht bei 60° C getrocknet.

2.4.1.2. Histologische Färbung der Dünnschnitte

Zur Beurteilung der Zellmorphologie und Nachweis von osteogenem Gewebe wurden die explantierten Leitschienen mit Toluidinblau und Trichrom nach Masson-Goldner gefärbt. Um verbliebene MMA-Bestandteile aus den Präparaten herauszulösen wurden alle Präparate zunächst entpastet. Zu diesem Zweck wurden die Objektträger zweimal je 30 Minuten in Methoxyethylacetat, zweimal je fünf Minuten in Xylol und 100%iges Ethanol, hierauf einmal je zwei Minuten in 96%iges, 89%iges und 70%iges Ethanol eingelegt. Die anschließenden Färbungen erfolgten gemäß Standardprotokollen (Vorgehen: siehe Anhang Protokoll 2).

2.4.2. Herstellung entkalkter Proben

Nach Fixation der explantierten Leitschienenhälften in 100%igem Methanol für 24 Stunden wurde mit der Demineralisierung der Knochenmatrices begonnen. Dies wurde durch Einlegen in 5%ige EDTA-Lösung (100ml aqua destillata, 5g Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA]) bei 4°C über 28 Tage erreicht. Das Demineralisierungsmedium, dessen Volumen jeweils mindestens das Zwanzigfache des Präparatvolumens betrug, wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.4.2.1. Knochenentkalkung und Anfertigen von Kryoschnitten

Vor Bearbeitung der Konstrukte wurden die Proben über Nacht in eine 5%ige Sucroslösung (100ml PBS, 5g Sucrose) eingelegt. Zur Fixation der Präparate auf dem Probenstempel wurden diese mit Hilfe eines Gefriermediums (Tissue Freezing Medium, Firma Jung, Nussloch, Deutschland) bei -80°C festgefroren. Das Anfertigen der Schnitte wurde bei einer Temperatur von -25°C durchgeführt. Hierzu wurden die festgefrorenen Leitschienenpräparate auf dem Probenstempel in den Schneideschlitten eines Mikrotoms eingespannt und zunächst mit einer Schnittdicke von 50µm angeschnitten. Nach Erreichen der gewünschten Ebene wurden je drei Gefrierschnitte mit einer Dicke von 12µm angefertigt und auf Superfrost plus Glasobjektträger (siehe oben) aufgebracht. Alle Präparate wurden nach Erhalt einer ausreichenden Schnittmenge vom Probenstempel entfernt und nach Drehung in eine andere Ebene erneut festgefroren. Das Anfertigen von Schnitten wurde daraufhin analog zu oben genann-

tem Vorgehen durchgeführt. Die anschließende Aufbewahrung der Objektträger bis zur histologischen Färbung erfolgte bei -20°C .

2.4.2.2. Histologische Färbung der Kryoschnitte

Zur Beurteilung der Zellmorphologie und Schaffung eines Überblicks über die verschiedenen Gewebetypen wurden die Kryoschnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zunächst wurden die Proben je fünf Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 96%, 100% Ethanol) und Xylol eingelegt. Nach erneutem fünfminütigem Verbleib in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Färbung der Proben gemäß Standardprotokoll (Vorgehen: siehe Anhang Protokoll 2).

2.4.3. Histologische Auswertung der gefärbten Objekte

Nach Färbung der Schnittproben wurde die lichtmikroskopische Auswertung vorgenommen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu Ergebnissen laborinterner Vorarbeiten zu erreichen, wurde das Auswertungsschema früherer Versuche fortgeführt (Ern 2008). Hierbei wurde zur qualitativen Auswertung der Objekte ein System entwickelt, das zur Beurteilung der Existenz und Ausbreitung verschiedener histologischer Gewebetypen geeignet ist. In diesem Rahmen wurde besonders das Auftreten von Granulations-, Nekrose- und Fettgewebe innerhalb der Leitschienen untersucht. Gewebeanteile im umgebenden Haut-, Subkutan-, oder Muskelgewebe flossen hingegen nicht in die Bewertung ein. Im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit lag zudem besonderes Augenmerk auf dem Nachweis von Blutgefäßen und deren Verteilung. Weiterhin wurde auch das Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen in die Auswertung miteinbezogen. Zur Objektivierung der erhaltenen Ergebnisse wurde die Beurteilung von drei Untersuchern unabhängig voneinander vollzogen. Hierfür wurden stets drei, aus unterschiedlichen Arealen stammende, Schnitte eines Präparats untersucht. Alle Proben wurden unter aufsteigenden Vergrößerungen bewertet und photographisch dokumentiert. Zur statistischen Bewertung wurde neben dem arithmetischen Mittelwert auch die zugehörige Standardabweichung berechnet. Die Analyse und graphische Darstellung der Daten wurde mit Hilfe der Graph Pad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, USA) vorgenommen.

Bewertungsgrundlage zur Punkteverteilung für die Gewebsausdehnung von Granulations-, Nekrose- und Fettgewebe:

Punkte	Gewebsausdehnung in % der Leitschiene
1	1 – 20%
2	21 – 40%
3	41 – 60%
4	61 – 80%
5	81 – 100%

Punkteverteilung für die Verteilung von Gefäßen innerhalb der Leitschiene:

Punkte	Gefäßverteilung innerhalb der Leitschiene
1	Einzelne Kapillaren am Rand
2	Einzelne Kapillaren in ersten zwei Dritteln
3	Kapillaren über die gesamte Fläche verteilt
4	Größere Gefäße am Rand, Kapillaren überall
5	Gesamte Fläche mit Gefäßen durchzogen

Punkteverteilung für das Auftreten und die Verteilung von mehrkernigen Riesenzellen (MRZ):

Punkte	Verteilung von MRZ innerhalb der Leitschiene
1	Einzelne MRZ oder MRZ-Aggregat am Rand
2	2-5 MRZ oder MRZ-Aggregate am Rand
3	6-10 MRZ oder MRZ-Aggregate am Rand
4	6-10 MRZ oder MRZ-Aggregate um das Zentrum
5	>10 MRZ oder MRZ-Aggregate über die LS verteilt

MRZ = Mehrkernige Riesenzelle; LS = Leitschiene

2.4.4. Molekularbiologische Untersuchung

Pro Versuchstier wurde je ein Konstrukt jeder Gruppe sowie alle entnommenen Organe einer molekularbiologischen Untersuchung zugeführt. Nach Explantation wurden die Proben hierfür in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Die weitere Behandlung und Untersuchung wurde im Rahmen einer Parallelarbeit (Dissertation von Florian Pohlig) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Effizienz der Leitschienenbesiedelung

Nach Besiedlung und Inkubation der Leitschienen wurden die Zell-Matrix-Konstrukte in neue 48-Well-Platten überführt. Die individuelle Besiedelungseffizienz der Leitschienen wurde durch die verbliebene Zellzahl der, in den Besiedelungswells überstehenden, Suspensionen einzeln errechnet. Von der ursprünglich ausgesäten Besiedelungszellzahl von $1,1 \times 10^6$ Zellen adhärirten im Mittel $7,1 \times 10^5$ Zellen (median $7,0 \times 10^5$ Zellen, range $4,1 \times 10^5$ Zellen – $9,1 \times 10^5$ Zellen) an der Leitschienenmatrix. Dies entspricht einer durchschnittlichen Besiedelungseffizienz von 64,8% (median 64,1%, range 41,7%–83,3%). Im überstehenden Nährmedium der unbesiedelten Leitschienen wurden keine Zellen nachgewiesen. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede in den Besiedelungseffizienzen der einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 8).

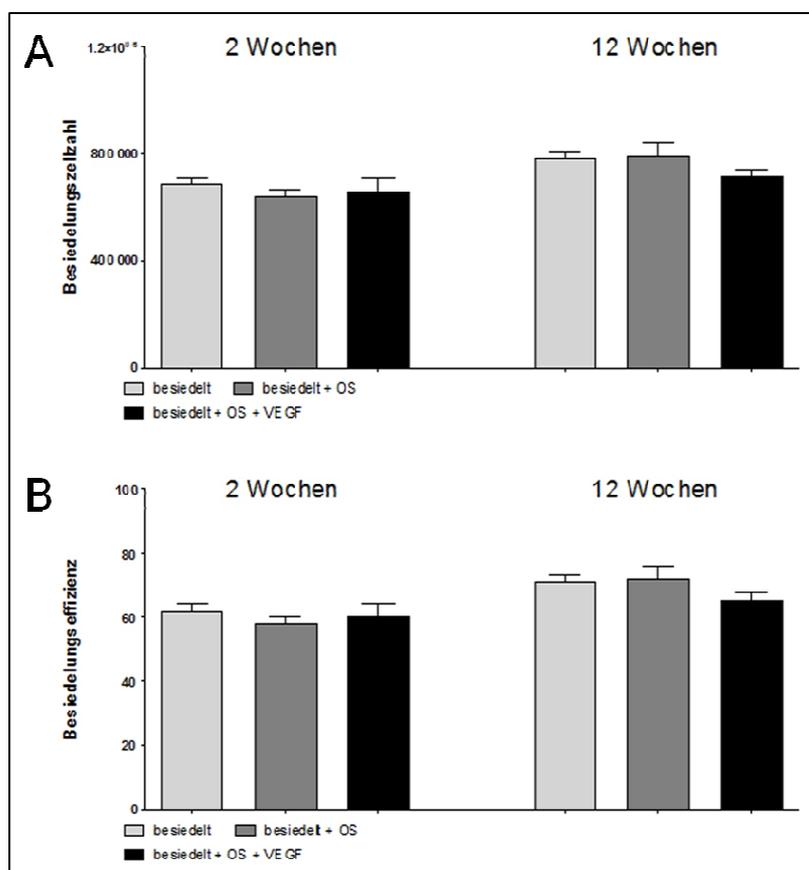


Abb. 8 Besiedelungseffizienz: A – Mittelwert der nach Besiedelung an der Leitschiene adhäririerenden Zellen; B – prozentualer Anteil der adhäririerenden Zellen gemessen am ausgesiedelten Gesamtzellvolumen. Alle Besiedelungsergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$). (OS = osteogen stimuliert)

3.2. Versuchstiere

Insgesamt wurden 12 Versuchstiere für die experimentelle Durchführung verwendet. Bei 6 Tieren betrug der Beobachtungszeitraum 2 Wochen, die verbleibenden 6 Tiere wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen beobachtet. Alle Tiere wiesen zum Explantationszeitpunkt einen guten Allgemeinzustand auf und zeigten reizlose Wundverhältnisse sowie artgerechtes Verhalten. Entzündungszeichen waren nicht festzustellen.

Makroskopisch waren alle Leitschienen mit dem Umgebungsgewebe verwachsen und wiesen untereinander keine Berührungspunkte auf. Nach 2-wöchiger Implantationsdauer schienen die Leitschienen vor allem hautseitig fest mit dem subkutanen Bindegewebe verwachsen zu sein, während die übrigen Leitschienenoberflächen meist nur in loser Verbindung zum Umgebungsgewebe standen. Eine besonders feste Integration war dagegen nach 12 wöchiger Implantationsdauer festzustellen, bei der alle Leitschienenoberflächen fest mit dem umgebenden Bindegewebe verwachsen waren.

3.3. Histologische Auswertung

Nach Anfertigung histologischer Färbungen wurden die Schnitte lichtmikroskopisch ausgewertet. Im Rahmen der qualitativen Auswertung wurde besonderes Augenmerk auf den Nachweis von Blutgefäßen und deren Verteilung innerhalb der Leitschienen gelegt. Ferner wurde das Auftreten von neugebildetem Knochen, mehrkernigen Riesenzellen, Granulations-, Nekrose- und Fettgewebe im Inneren der Leitschienen evaluiert.

Hierfür wurden bei allen Präparaten einer Untergruppe drei, aus unterschiedlichen Arealen stammende, Schnitte unter aufsteigenden Vergrößerungen untersucht und gemäß einem Auswertungsschema bewertet (Schema siehe 2.4.3.). Die Beurteilung wurde von drei Untersuchern unabhängig voneinander vollzogen.

Die Neubildung von Knochengewebe wurde in keiner der ausgewerteten Proben gesehen. Zwischen den Leitschienen aller vier Untergruppen waren histologisch keine Unterschiede in Bezug auf die untersuchten Parameter feststellbar (Abb. 9).

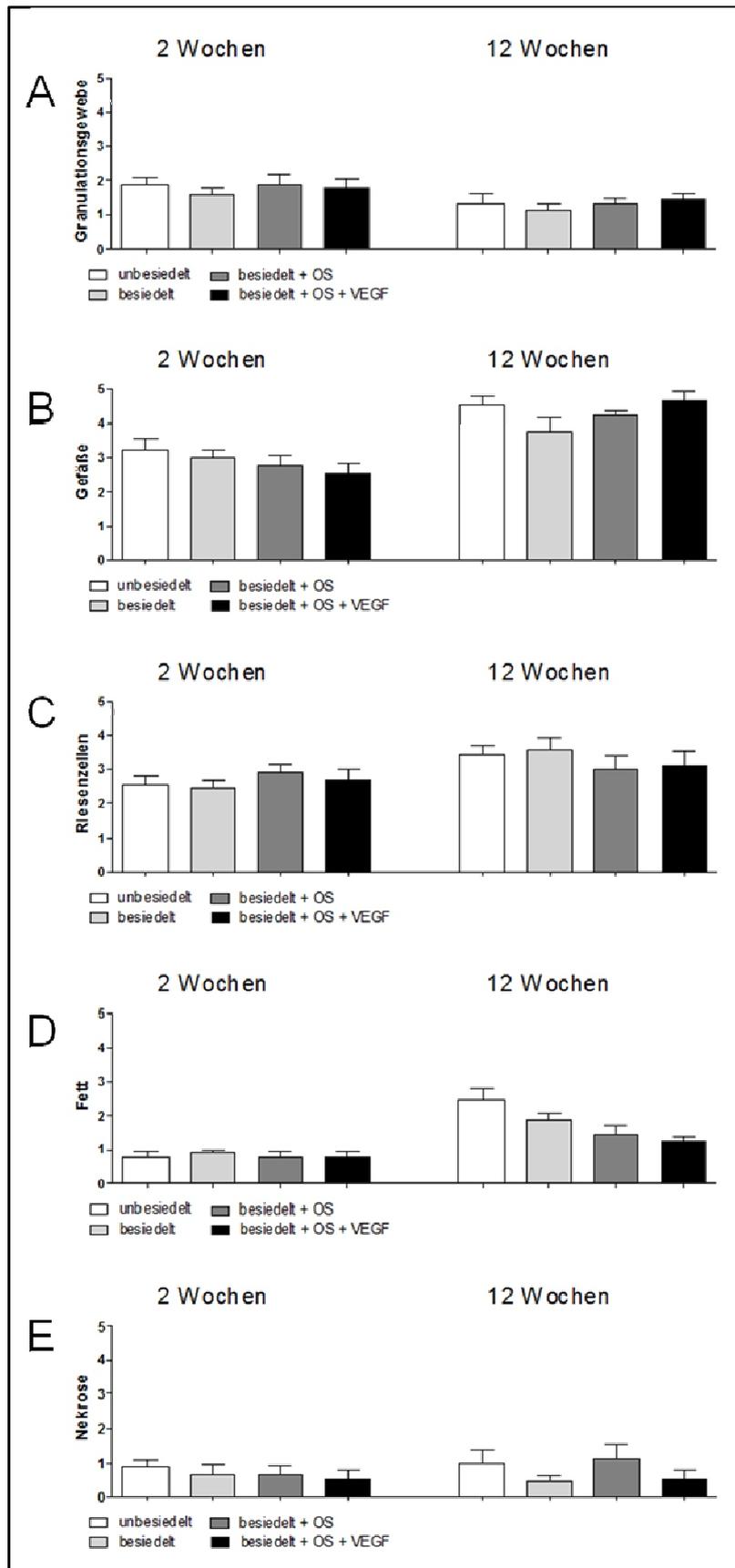


Abb. 9 Auswertung der histologischen Ergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung der Ausdehnung von A – Granulationsgewebe; B – Gefäße; C – mehrkernige Riesenzellen; D – Nekrose; E – Fettgewebe; Die Auswertung erfolgte durch 3 Untersucher unabhängig voneinander (Ordinate = Bewertungspunkte gemäß Schema siehe 2.4.3.); OS = osteogen stimuliert, VEGF =vascular endothelial growth factor

3.3.1. Ergebnisse nach 2-wöchiger Implantationsdauer *in vivo*

Nach 2 Wochen Implantationszeit waren die Konstrukte aller Untersuchungsgruppen mit einer dünnen Schicht aus Faser- und Bindegewebe umschieden, die den Leitschieneninhalt von dem umgebenden Gewebe abgrenzte. An die dünne Begrenzungsschicht schloss sich zumeist ein Implantatbett aus Fettzellen und lockerem Bindegewebe an (Abb. 10).

Die hautseitigen Leitschienenoberflächen standen zumeist in straffer Verbindung mit dem Umgebungsgewebe, das sich vorwiegend aus teils straffem, teils lockerem Bindegewebe und Fettgewebe zusammensetzte. Auch Narbengewebe wurde hier vielfach vorgefunden. Die restlichen Leitschienenoberflächen waren zumeist von einem Bett aus Fettgewebe und stellenweise lockerem Bindegewebe umgeben. Unterschiede innerhalb der 4 Untersuchungsgruppen (1. besiedelt, 2. unbesiedelt, 3. besiedelt und osteogen stimuliert ohne VEGF, 4. besiedelt und osteogen stimuliert mit VEGF) hinsichtlich des Einwachsverhaltens bzw. der Zellzusammensetzung des umgebenden Gewebes bestanden nicht.

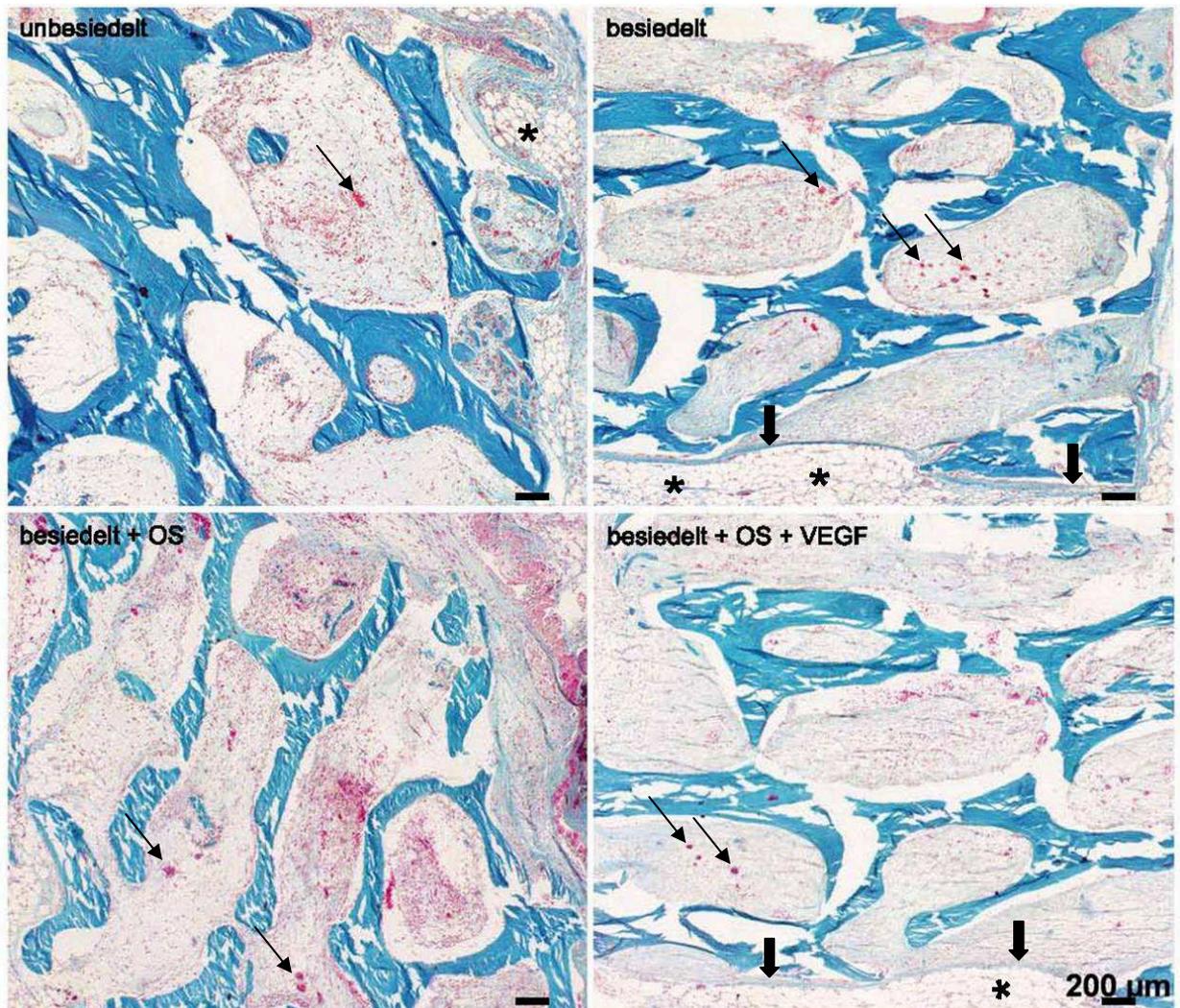


Abb. 9 Konstrukte nach 2 Wochen Implantationsdauer: Die Leitschienen waren durch eine dünne, bindegewebige Abgrenzungsschicht (dicke Pfeile) vom umgebenden subkutanen Fettgewebe (*) abgetrennt. In allen Gruppen fanden sich vereinzelt Kapillaren, die vermehrt in den äußeren 2/3 der Leitschienenfläche anzutreffen waren (dünne Pfeile). Die mineralisierte Leitschiene ist grün angefärbt und zeigt Riss- und Bruchartefakte. (OS = osteogen stimuliert)

Trichromfärbung nach Masson-Goldner, 5-fache Vergrößerung.

3.3.1.1. Leitschienenstroma und Granulationsgewebe nach 2 Wochen

Nach 2 Wochen kam es in allen untersuchten Konstrukten zu einem Einwachsen des umgebenden Bindegewebes. Das Leitschienenbinnengewebe bestand in allen Gruppen vorwiegend aus Binde- bzw. Fasergewebe und Granulationsgewebe (Abb. 11). Letzteres fand sich vorwiegend in der Leitschienenperipherie und setzte sich hauptsächlich aus kollagenen Fasern, neu gebildeten Kapillaren (Abb. 10) und lockerem Bindegewebe mit Fibrozyten und Fibroblasten zusammen. Innerhalb der Leitschiene konnten vereinzelt Entzündungszellen wie Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten nachgewiesen werden. Umschriebene Entzündungsherde waren jedoch nicht abgrenzbar. Zwischen dem Granulationsgewebe und der Leitschienenmatrix bestand vielerorts eine einzellige Schicht aus Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen. Daneben zeigten sich in einigen Leitschienen verstreute Fettzellvorkommen (Abb. 11, 9D), sowie lokal begrenzte Nekroseareale (Abb. 9E). Relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen waren nicht festzustellen (Abb. 9A). Neu gebildetes Osteoid, Knochen- oder Knorpelgewebe konnten in keiner Gruppe nachgewiesen werden.

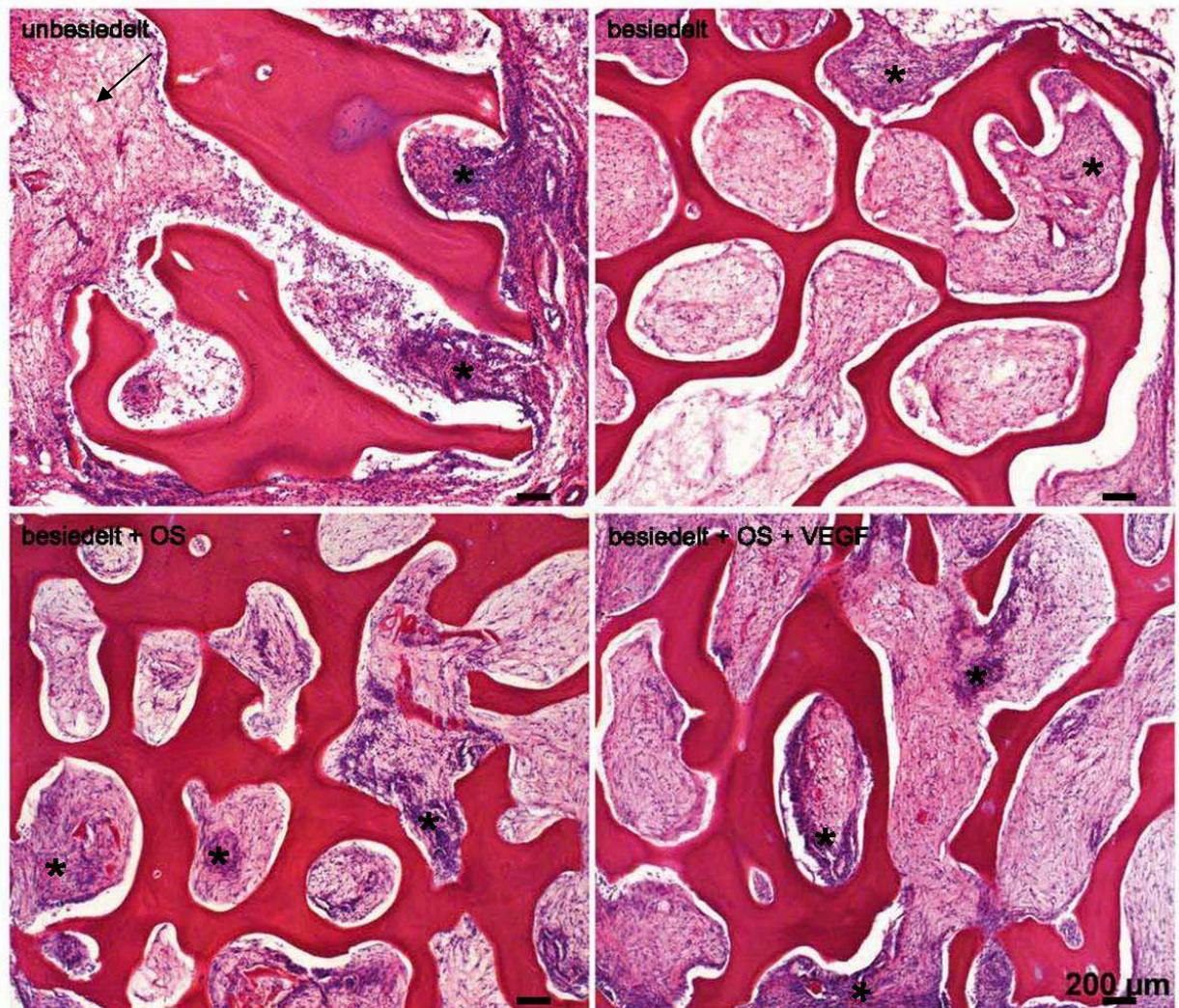


Abb. 10 Konstrukte nach 2 Wochen Implantationsdauer: In allen Gruppen kam es, vor allem in peripheren Leitschienenanteilen, zur Bildung von Granulationsgewebe (*). Das restliche Leitschienenbinnengewebe setzte sich überwiegend aus Faser- und Bindegewebe zusammen. Auch vereinzelte Fettzellvorkommen waren zu beobachten (Pfeil). Die demineralisierte Leitschiene ist rot angefärbt. (OS = osteogen stimuliert) Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 5-fache Vergrößerung.

3.3.1.2. Blutgefäße nach 2 Wochen

Nach 2-wöchiger Implantationsdauer waren in allen Leitschienen kleinere Blutgefäße zu sehen (Abb 10,12). Hierbei handelte es sich vorwiegend um Kapillaren, jedoch auch Arteriolen und Venolen wurde vereinzelt beobachtet. Die Kapillaren verteilten sich hierbei in allen Gruppen zumeist in größerer Zahl und Dichte über die äußeren 2/3 des Leitschienengewebes oder waren über die gesamte Leitschienenfläche verstreut (Abb. 10, 9B). Unabhängig von Besiedelung und Vorbehandlung wurden in allen Gruppen sowohl gefäßreiche als auch spärlich neovaskularisierte Leitschienen gefunden.

Besiedelte (nicht osteogen stimuliert) und unbesiedelte Leitschienen wiesen nach 2-wöchiger Implantationsdauer gleichermaßen ein dichtes Netzwerk kleiner Gefäße innerhalb der äußeren 2/3 des Leitschienengewebes auf, wobei in beiden Gruppen vereinzelt auch größere, randständige Blutgefäße beobachtet wurden. Kennzeichnende Unterschiede hinsichtlich der Neovaskularisierung waren zwischen besiedelten (nicht osteogen stimuliert) und unbesiedelten Leitschienen nicht erkennbar.

Im Vergleich hierzu zeigte die osteogen stimulierte Gruppe nach 2 Wochen tendenziell geringere Vorkommen an größeren Gefäßen (Abb. 9B). Während Kapillaren in unterschiedlicher Häufigkeit am Leitschienenrand der osteogen stimulierten Konstrukte zu sehen waren, wurden größere Gefäße innerhalb der Leitschienenfläche kaum nachgewiesen. VEGF-beimpfte Leitschienen ließen hinsichtlich Anzahl, Verteilungsmuster und Größe ihrer Gefäße keine merklichen Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Konstrukten erkennen. Innerhalb der osteogen stimulierten Gruppe boten somit vorbehandelte (mit VEGF) und nicht-vorbehandelte Leitschienen homogene Resultate.

Nach 2-wöchiger Implantationsdauer wurden, abgesehen von einer tendenziell geringeren Zahl größerer Gefäße innerhalb der osteogen stimulierten Gruppe, vergleichbare Neovaskularisierungsgrade aller Gruppen dokumentiert (Abb. 9B).

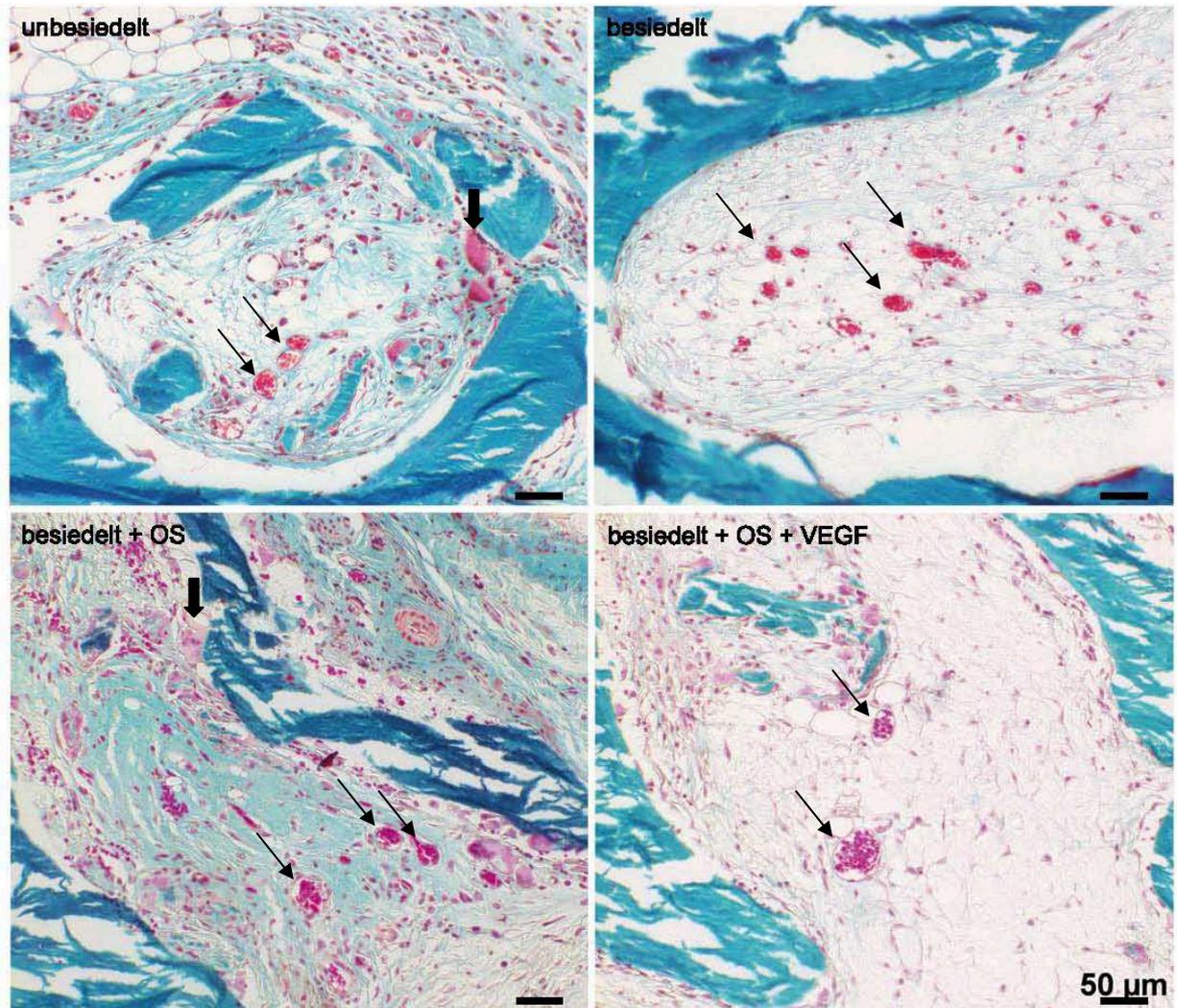


Abb. 12 Blutgefäße: In allen Gruppen fanden sich nach 2 Wochen Implantationszeit vor allem Kapillaren (dünne Pfeile), die überwiegend in der Leitschienenperipherie angesiedelt waren. Die beiden linken Bilder zeigen darüber hinaus einzelne mehrkernige Riesenzellen an der Oberfläche der Leitschienenmatrix (dicke Pfeile). (OS = osteogen stimuliert)

Trichromfärbung nach Masson-Goldner, 20-fache Vergrößerung.

3.3.1.3. Mehrkernige Riesenzellen nach 2 Wochen

Besonders in den peripheren Leitschienenanteilen kam es in allen untersuchten Konstrukten nach 2-wöchiger Implantation zu einem Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen (Abb. 9C). Hierbei war ein Anhaften der Riesenzellen hauptsächlich entlang der Leitschienenoberfläche zu erkennen (Abb. 12,13). Ferner wurde zumeist das Vorkommen kleinerer Gruppierungen, bestehend aus zwei bis sechs aneinandergereihten Zellen beobachtet, jedoch auch isoliert vorliegende Fremdkörperriesenzellen traten auf. Vornehmlich in peripheren Anteilen hafteten die mehrkernigen Riesenzellen gelegentlich auch innerhalb reaktiver Zellanhäufungen der Leitschie-

nenmatrix an. Hierbei handelte es sich um Zellansammlungen bestehend aus Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und vereinzelt Granulozyten. In einzelnen Leitschienen konnten mehrkernige Riesenzellen auch in perizentralen Regionen nachgewiesen werden, in nur einem Fall (besiedelt und osteogen stimuliert mit VEGF) zeigten sich die Riesenzellen in allen Leitschienenarealen. Hinsichtlich der Verteilung sowie des Vorkommens von mehrkernigen Riesenzellen stellten sich somit keine kennzeichnenden Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen dar. (Abb. 9C).

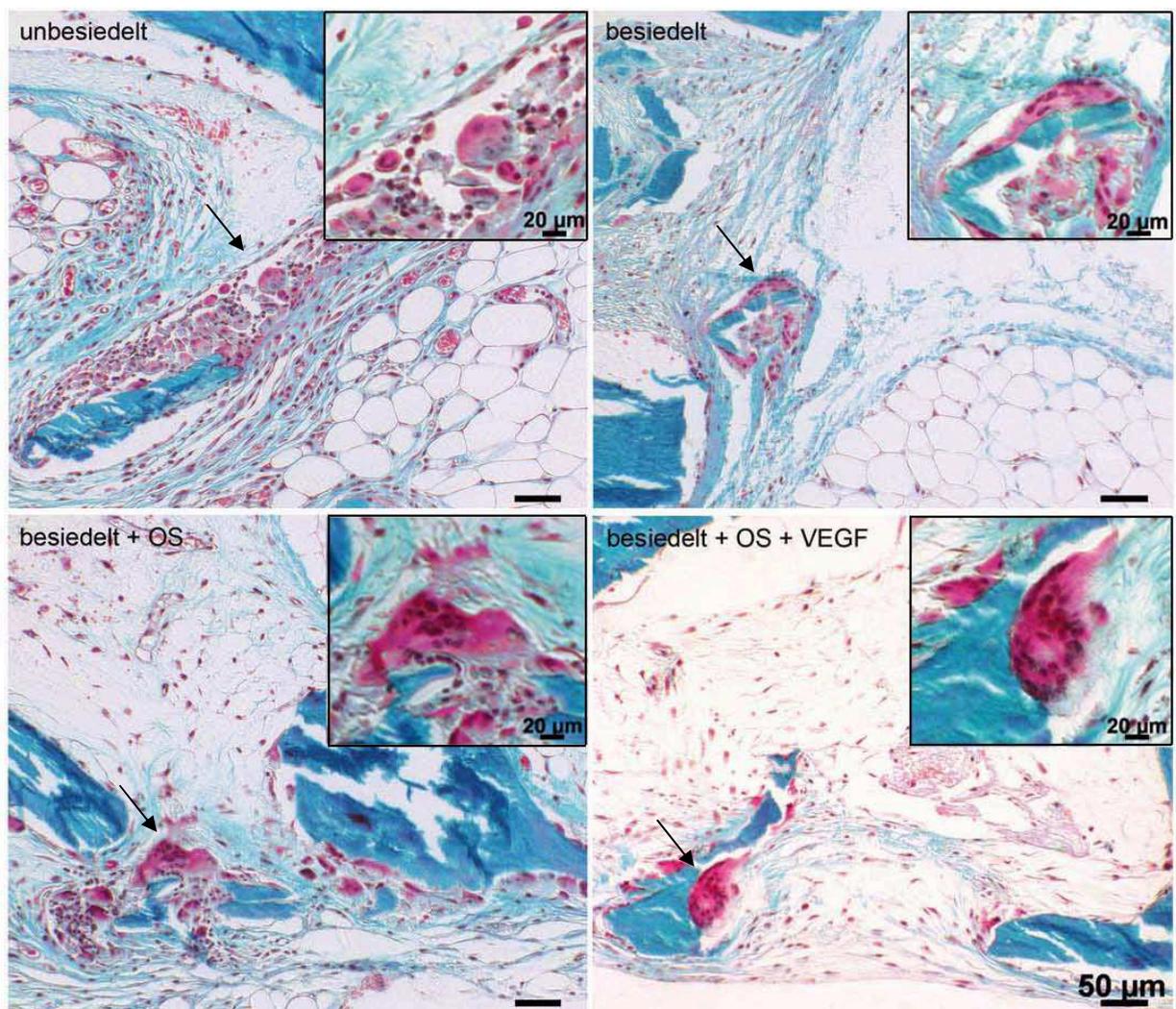


Abb. 13 Mehrkernige Riesenzellen: Sowohl singuläre Riesenzellen als auch kleinere Gruppierungen mehrerer Zellen wurden beobachtet (Pfeile und Inserts). Diese zeigten sich vornehmlich in direktem Kontakt mit der Leitschienenoberfläche. (OS = osteogen stimuliert)
Trichromfärbung nach Masson-Goldner, 20-fache und 40-fache (Insert) Vergrößerung.

3.3.1.4. Fettgewebe und Nekrosen nach 2 Wochen

Nach 2 Wochen war in einzelnen Leitschienen aller untersuchten Gruppen das Vorliegen von Fettgewebe bzw. einzelnen Fettgewebszellen und Nekrosen belegbar (Abb. 9D,E). Ebenso fanden sich jedoch auch Leitschienen ohne nachweisbare Fettzellen oder Nekrosen im analysierten Bereich.

Das Verteilungsmuster der Fettzellen innerhalb des Leitschienenstromas zeigte sich sehr heterogen. Während einzelne Leitschienen lediglich singuläre, versprengt liegende Fettzellen aufwiesen, war es in anderen bereits zu einem Einwachsen kleiner Fettgewebsinseln, bestehend aus ca. 30–40 Zellen, gekommen (Abb. 14). Gruppenspezifische Unterschiede wurden nicht gefunden (Abb. 9D). In allen Leitschienen lagen die Fettgewebsvorkommen vorwiegend peripher, wobei die äußeren 2/3 der Leitschienenfläche nicht überschritten wurden. Der Anteil des Fettgewebes am gesamten Binnengewebe überstieg in keiner der untersuchten Leitschienen 20% (= 1 Bewertungspunkt, vgl. Abb. 9D).

Nekrosezonen lagen sowohl zentral inmitten einzelner Poren, als auch am Rand der Konstrukte verteilt. Der Übergang zwischen Nekroseareal und Umgebungsgewebe war hierbei in allen Leitschienen fließend, Demarkationsgrenzen der Übergangsbereiche wurden nicht beobachtet. Zumeist handelte es sich um kleine Nekrosezonen, die nur einen geringen Teil des Leitschienenbinnengewebes ausmachten. Die Nekroseausdehnung überschritt in keiner Leitschiene 40% der Leitschienenfläche (= 2 Bewertungspunkte, vgl. Abb. 9E). Das tendenziell höchste Nekroseaufkommen war bei der unbesiedelten Gruppe zu verzeichnen (Abb. 9E). Die Vorbehandlung mit VEGF erbrachte nach 2-wöchiger Implantationsdauer hinsichtlich der Entstehung von Nekrosen keine Vorteile gegenüber anderen Gruppen. Kennzeichnende Unterschiede bezüglich der Nekroseentstehung/-ausweitung konnten zwischen den einzelnen Gruppen nicht herausgestellt werden.

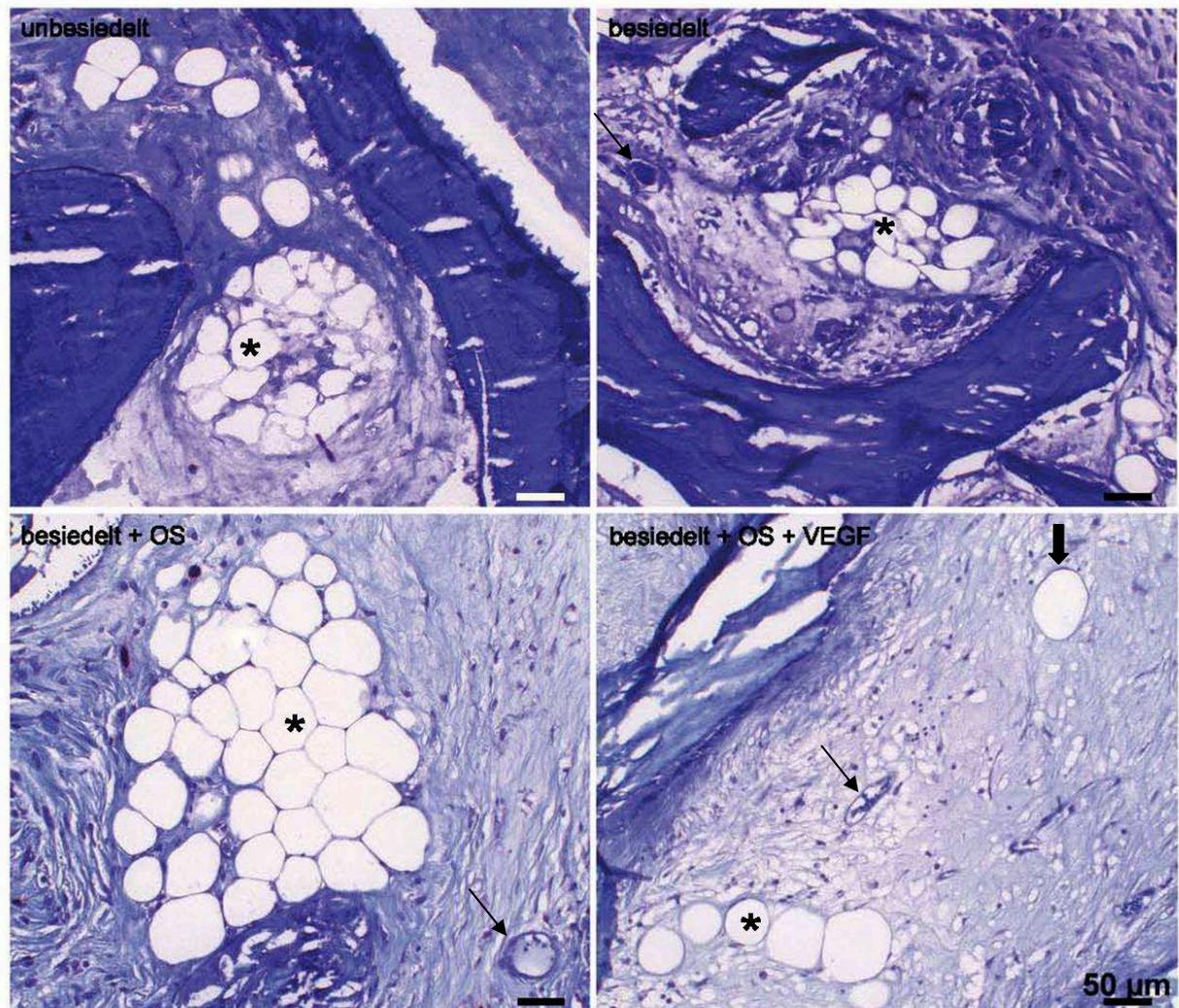


Abb. 14 Fettgewebe: Nach 2 Wochen waren innerhalb des Leitschienenstromas kleinere Fettgewebsinseln (*) oder singuläre Fettzellen (dicker Pfeil) zu beobachten. In der näheren Umgebung der Fettzellen fanden sich häufig kleine Blutgefäße (dünne Pfeile). Die mineralisierte Leitschiene ist dunkelblau angefärbt. (OS = osteogen stimuliert)

Toluidinblau-Färbung, 20-fache Vergrößerung.

3.3.2. Ergebnisse nach 12-wöchiger Implantation *in vivo*

Nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen waren die Konstrukte aller Untersuchungsgruppen mit dem Umgebungsgewebe verwachsen (Abb. 15). Die nach 2 Wochen zumeist noch deutlich sichtbare, fasergewebige Umscheidung der Leitschienen als Abgrenzung zur Umgebungsmatrix, war aufgrund der fortgeschrittenen Gewebsintegration meist nur noch unscharf auszumachen. Das Implantatbett bestand nun bei den meisten Leitschienen vorwiegend aus flächigem und stark vaskularisiertem Fettgewebe sowie aus bindegewebigen Anteilen, die den Leitschienenwürfel allseitig umzogen. Im Vergleich zur 2-wöchigen Implantationsdauer schienen alle Leitschie-

nenoberflächen in das umgebende Implantatbett integriert zu sein, aus dem das Einwachsen größerer Gefäße beobachtet werden konnte (Abb. 15).

Unterschiede bezüglich des Integrationsverhaltens konnten histologisch zwischen den unterschiedlichen Gruppen nach 12 Wochen nicht beobachtet werden.

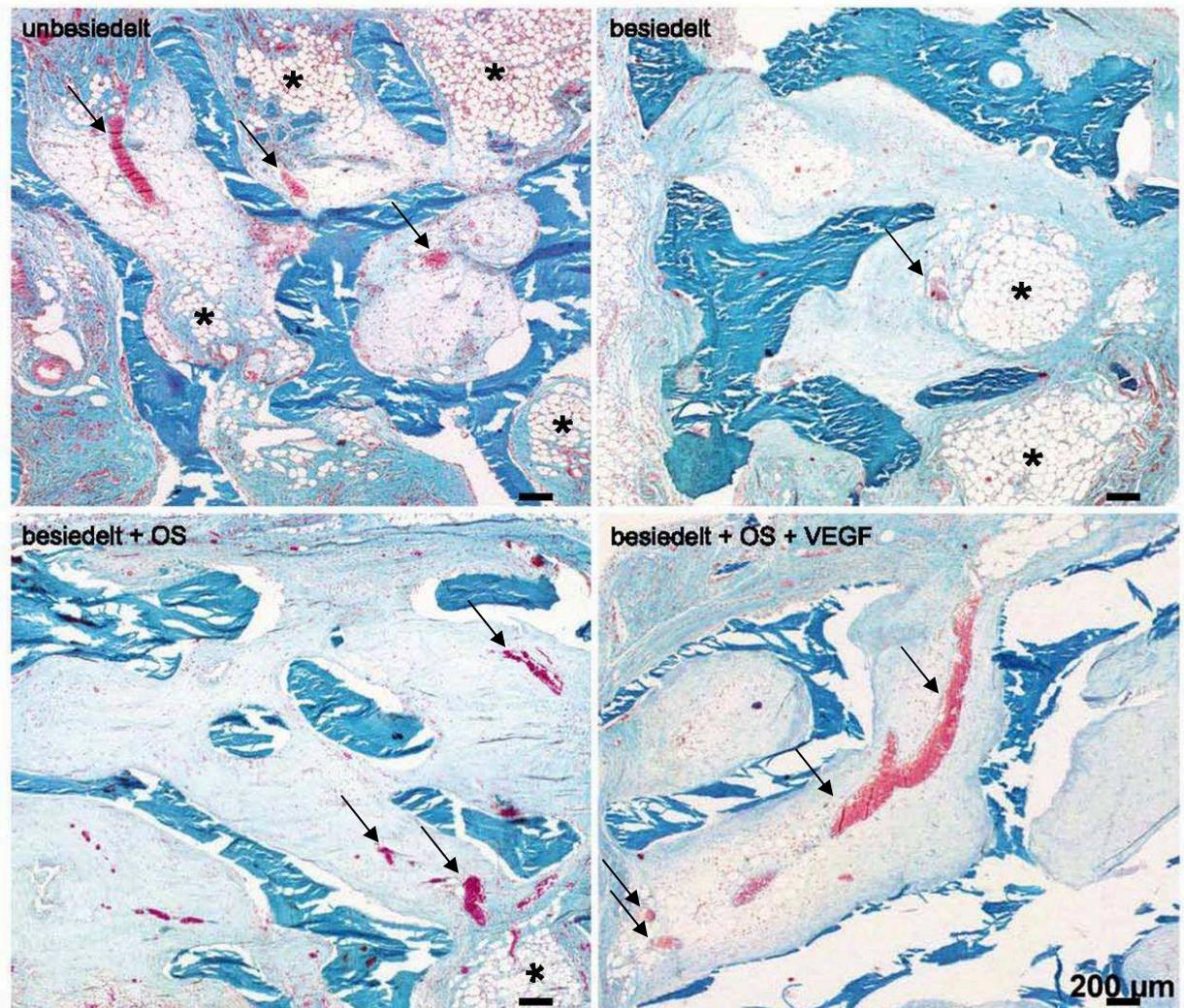


Abb. 15 Konstrukte nach 12 Wochen Implantationsdauer: Alle Gruppen zeigten eine fortgeschrittene Gewebsintegration mit relativ unscharfer Abgrenzung zum Implantatbett. Das Leitschienengewebe aller Gruppen zeichnete sich durch eine gute Vaskularisierung mit deutlich vergrößerten Gefäßdurchmessern aus (Pfeile). Zudem große Fettgewebsvorkommen vor allem in der besiedelten und unbesiedelten Gruppe (*). Die mineralisierte Leitschienenmatrix zeigt schneidebedingte Riss- und Bruchartefakte (vor allem besiedelt + OS + VEGF). (OS = osteogen stimuliert)

Trichromfärbung nach Masson-Goldner, 5-fache Vergrößerung.

3.3.2.1. Leitschienenstroma und Granulationsgewebe nach 12 Wochen

Nach 12-wöchiger Implantationsdauer zeigte sich das Leitschienenbinnengewebe sichtbar verändert. In allen Leitschienenarealen waren vor allem Faser- und Bindegewebe die bestimmenden Gewebearten, die jedoch besonders in der besiedelten und unbesiedelten Gruppe häufig von flächigen Fettgewebsvorkommen durchzogen waren (Abb. 16). Im Vergleich zur 2-wöchigen Implantation konnte zudem ein Rückgang des Granulationsgewebes beobachtet werden (Abb. 9A, 16). Nekroseareale unterschiedlicher Ausdehnung wurden in allen Gruppen nachgewiesen (Abb. 9E). Das Leitschienenstroma wies im Vergleich zur 2-wöchigen Implantationsdauer einen höheren Organisationsgrad auf und lies in allen Gruppen eine gute Gefäßversorgung erkennen (Abb. 15). Der Übergang zwischen Leitschienenmatrix und Stroma wurde vielfach von fibrösem Gewebe gebildet, das sich in peripheren Leitschienenanteilen besonders in der näheren Umgebung von Fremdkörperriesenzellen befand. Kennzeichnende Unterschiede hinsichtlich der Gewebekonfiguration bestanden innerhalb der untersuchten Gruppen nicht.

Neuformiertes Osteoid, Knochen- oder Knorpelgewebe konnte in keinem der untersuchten Leitschienenpräparate nachgewiesen werden.

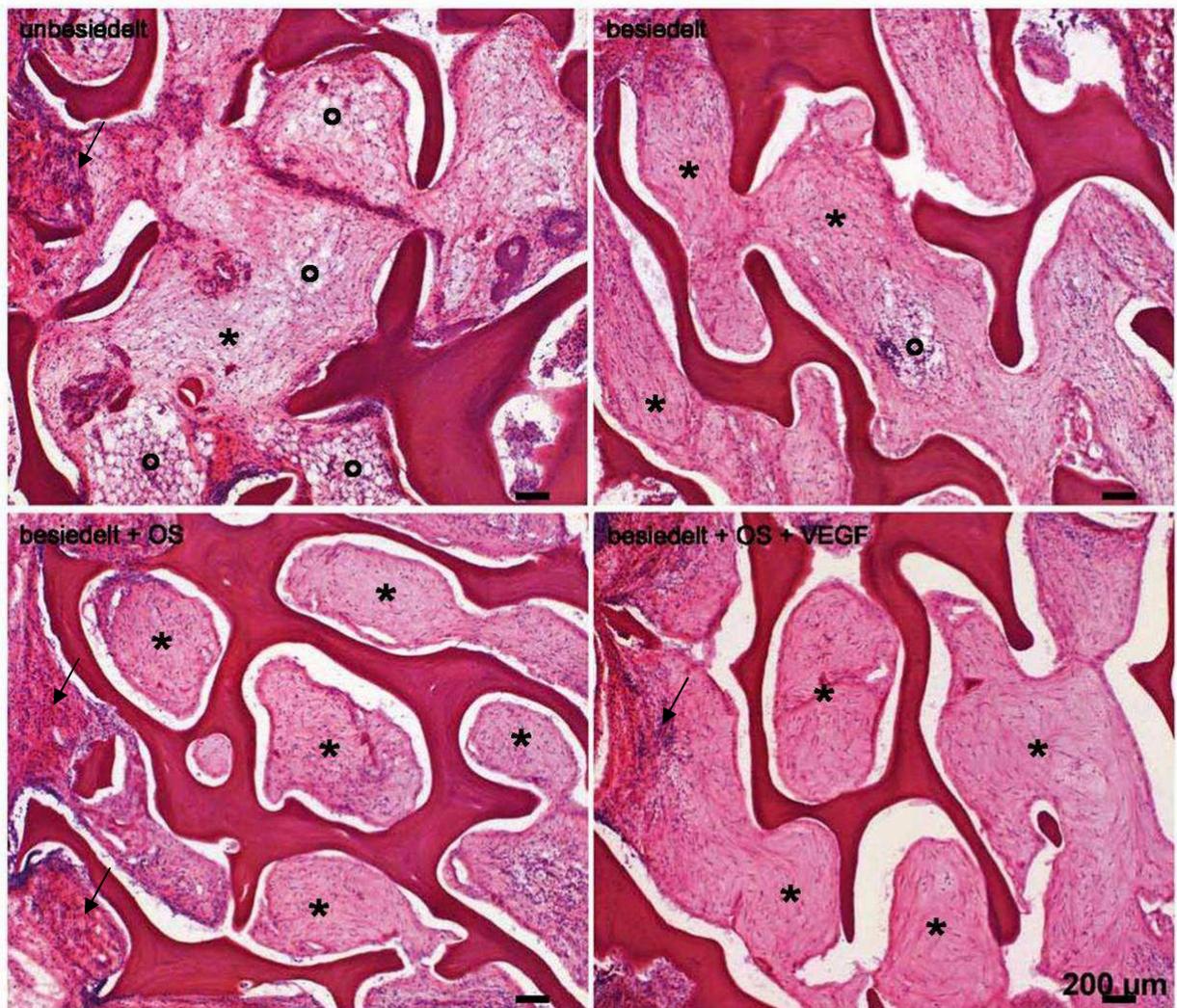


Abb. 16 Konstrukte nach 12 Wochen Implantationsdauer: Als vorherrschendes Gewebe wurden Binde- und Fasergewebe angetroffen (*). Dazwischen zeigten sich vor allem in der besiedelten und unbesiedelten Gruppe immer wieder flächige Fettgewebsvorkommen (°). Im Vergleich zur 2-wöchigen Implantation war ein Rückgang des Granulationsgewebes (Pfeile) ersichtlich. (OS = osteogen stimuliert) Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 5-fache Vergrößerung.

3.3.2.2. Blutgefäße nach 12 Wochen

Nach 12-wöchiger Implantationsdauer zeigte der größte Teil aller Leitschienen eine umfassende Gefäßversorgung. Hierbei wurden in allen Leitschienenarealen Kapillaren, aber auch Arteriolen und Venolen beobachtet (Abb. 15). Verglichen mit 2-wöchiger Implantationsdauer war in allen Gruppen eine deutliche Zunahme größerer Gefäße nachweisbar (Abb. 9B), die sich oftmals bis in das Leitschienenzentrum erstreckten. Arteriolen und Venolen befanden sich häufig in Fettgewebsinseln inner-

halb des Leitschienenstromas bzw. in nächster Umgebung von Fettgewebsansammlungen (Abb 17, 19).

Während nach 2 Wochen auch die Einsprossung von Kapillaren noch weitgehend auf die Peripherie oder die äußeren 2/3 der Leitschienenfläche begrenzt war, konnte diese nun in allen Gruppen über die gesamte Fläche hinweg beobachtet werden.

Unterschiede in der Neovaskularisierung besiedelter Konstrukte im Vergleich zu unbesiedelten Leitschienen ergaben sich nicht (Abb. 9B).

Auch osteogen stimulierte Konstrukte wiesen nach 12 Wochen im Vergleich zu anderen Gruppen (ohne osteogene Stimulation) keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl und Größe von Blutgefäßen auf. Die Beimpfung mit VEGF erbrachte auch nach 12 Wochen keine kennzeichnenden Effekte hinsichtlich der Neovaskularisierung im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Somit wurden bei allen untersuchten Gruppen nach 12-wöchiger Implantationsdauer relativ homogene Ergebnisse dokumentiert, die keine offensichtlichen interindividuellen Unterschiede erkennen ließen (Abb. 9B).

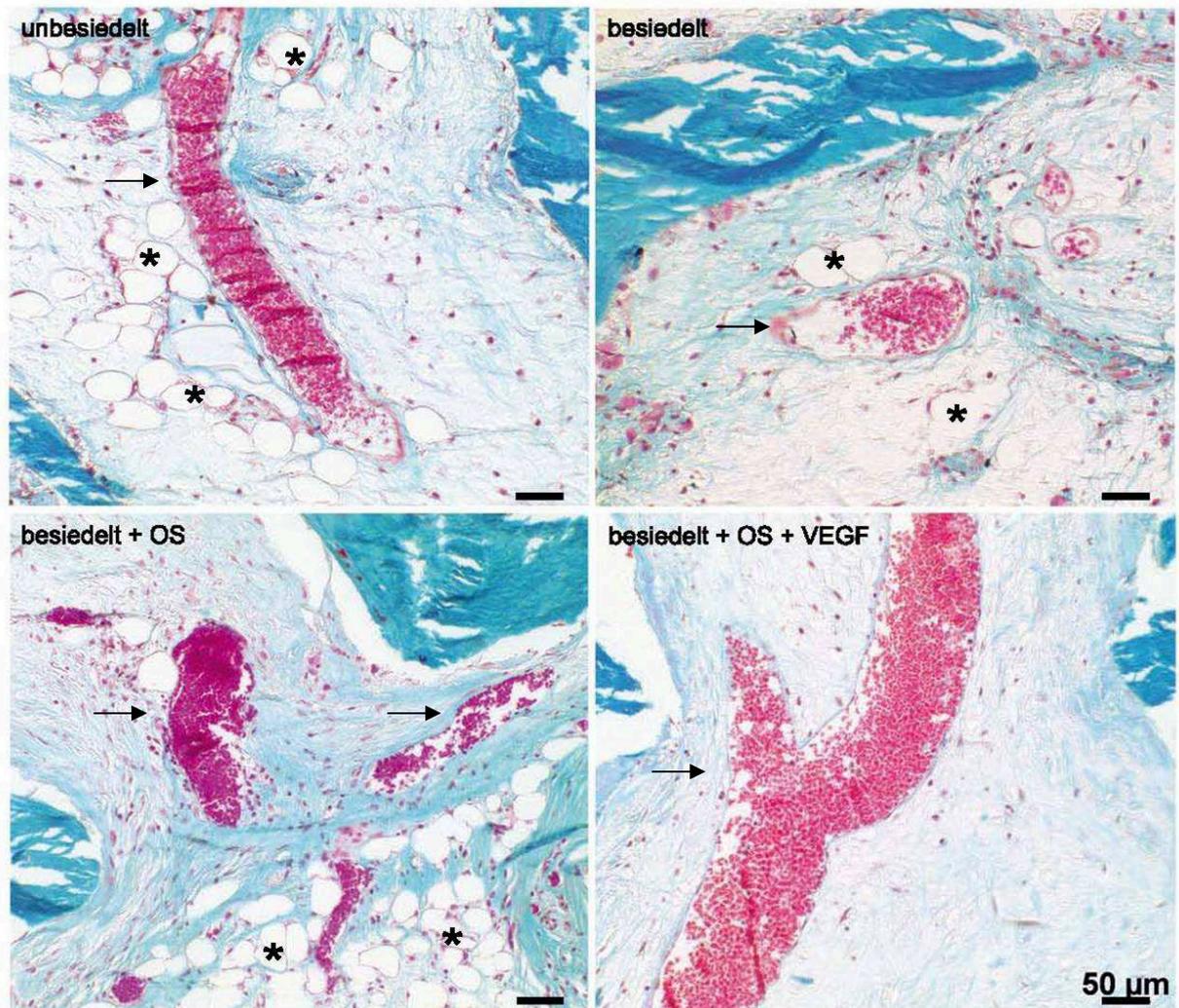


Abb. 17 Blutgefäße: Im Vergleich zur 2-wöchigen Implantation wiesen die Gefäße nach 12 Wochen deutlich vergrößerte Durchmesser auf und waren auch in zentralen Leitschienenanteilen zu sehen (Pfeile). In naher Umgebung zu den Gefäßen fanden sich häufig Fettzellen oder Fettgewebsinseln (*).

(OS = osteogen stimuliert)

Trichromfärbung nach Masson-Goldner, 20-fache Vergrößerung

3.3.2.3. Mehrkernige Riesenzellen nach 12 Wochen

Diese wurden in allen Gruppen sowohl singular als auch gruppiert entlang der Leitschienenmatrix nachgewiesen (Abb. 18). Gruppenunabhängig konnte dabei ein sehr heterogenes Verteilungsmuster beobachtet werden. Während sich in einigen Konstrukten Riesenzellen lediglich in der Peripherie befanden, waren mehrkernige Riesenzellen in anderen Leitschienen, im Gegensatz zur 2-wöchigen Implantation, vermehrt auch in zentralen Anteilen nachweisbar (Abb. 9C). In allen Gruppen hatte-

ten die identifizierten Riesenzellen entlang der Leitschienenmatrix an, innerhalb des Stromas fanden sich meist keine Riesenzellen (Abb. 18).

Lokale Entzündungsreaktionen mit größeren Ansammlungen von Granulozyten waren auch nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen in keiner der untersuchten Leitschienen abgrenzbar. Auch Infiltrationen singulärer Entzündungszellen innerhalb des Leitschienenstromas wurden im Gegensatz zur 2-wöchigen Implantationszeit kaum beobachtet.

Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen hinsichtlich des Auftretens und der Verteilung von mehrkernigen Riesenzellen bestanden nicht (Abb. 9C).

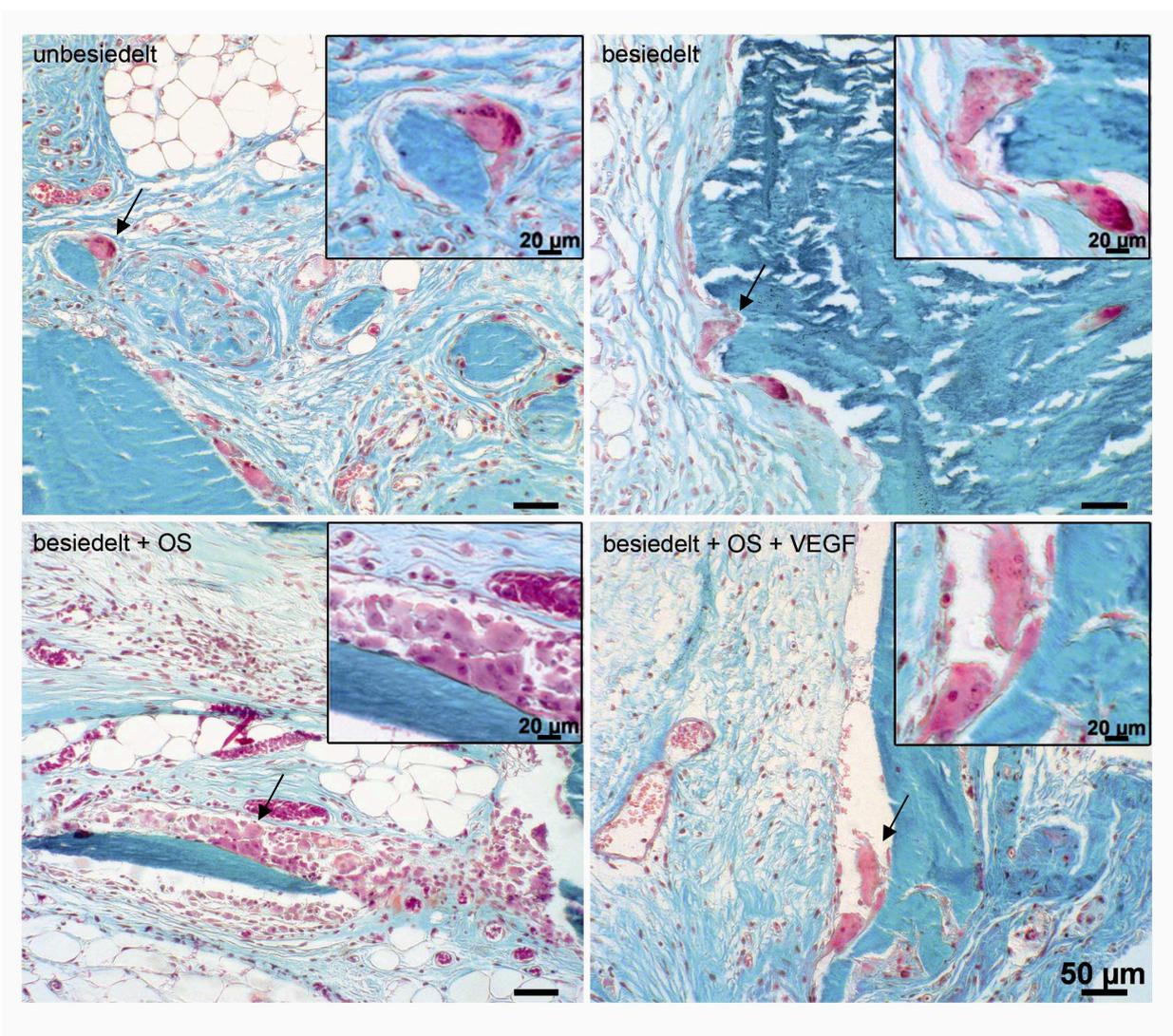


Abb. 18 Mehrkernige Riesenzellen: Nach 12 Wochen waren mehrkernige Riesenzellen sowohl singulär als auch in kleineren Gruppierungen anzutreffen (Pfeile und Insert). Auch nach 12 Wochen hafteten die mehrkernigen Riesenzellen vornehmlich der Leitschienenoberfläche an. (OS = osteogen stimuliert) Trichromfärbung nach Masson-Goldner, 20-fache und 40-fache (Insert) Vergrößerung.

3.3.2.4. Fettgewebe und Nekrosen nach 12 Wochen

Nach 12-wöchiger Implantationsdauer wurden in allen Gruppen Fettgewebsansammlungen und lokale Nekrosen nachgewiesen (Abb. 9D,E).

Besonders die teils großflächigen Fettgewebsvorkommen stellten, gemeinsam mit dem veränderten Gefäßmuster, die augenscheinlichsten Veränderungen im Vergleich zur 2-wöchigen Implantationsdauer dar (Abb.15). Während es nach 2 Wochen in allen Gruppen lediglich zu einem Einwachsen einzelner Fettzellen bzw. kleinerer Fettzellgruppen kam, betrug der Anteil des Fettgewebes am Binnengewebe nach 12 Wochen in einzelnen Leitschienen bis zu 60 Prozent (= 3 Bewertungspunkte, vgl. Abb. 9D). Das stellenweise stark vaskularisierte Fettgewebe (Abb.19) war hierbei oftmals nicht auf periphere Leitschienenanteile beschränkt sondern durchzog mitunter auch das Leitschienenzentrum.

Sowohl bei besiedelten als auch bei unbesiedelten Leitschienen wurden nach 12 Wochen große Fettgewebsvorkommen innerhalb der Leitschienen dokumentiert. Die besiedelten und unbesiedelten Leitschienen zeigten im Vergleich zur 2-wöchigen Implantationsdauer und zu den anderen 12-Wochen Gruppen (osteogen stimuliert mit/ohne VEGF) durchweg den anteilmäßig höchsten Gehalt an Fettgewebe (Abb. 9D).

Die osteogen stimulierten Zell-Matrix-Konstrukte wiesen im Vergleich zu Leitschienen mit 2-wöchigem Verbleib *in vivo* zwar tendenziell höhere und umfangreichere Fettgewebsvorkommen auf, diese nahmen jedoch in der Regel nicht mehr als höchstens 20%-40% (= 2 Bewertungspunkt, vgl. Abb. 9D) der Leitschienenfläche ein.

Nach 12-wöchiger Implantation enthielten somit alle Gruppen tendenziell mehr Fettgewebe als nach 2 Wochen, die anteilmäßig größten Vorkommen waren dabei in besiedelten und unbesiedelten Leitschienen zu sehen (Abb. 9D).

Ähnlich wie nach 2 Wochen *in vivo* traten auch nach 12 Wochen in Leitschienen aller Gruppen lokale Nekrosezonen auf. Gruppenunabhängig verteilten sich die Nekroseareale sowohl in peripheren als auch in zentralen Leitschienenregionen, wobei sie zumeist in unmittelbarer Nähe zu Fettgewebe zu finden waren bzw. dieses flankierten (Abb. 19). Tendenziell waren die Nekrosen nach 12 Wochen eindeutiger vom umgebenden Gewebe abgrenzbar, umschriebene Demarkationsgrenzen fehlten jedoch weiterhin. In der unbesiedelten Gruppe sowie in der osteogen stimulierten Gruppe ohne VEGF fand sich in je einer Leitschiene eine großflächigere Nekrose,

die anderen Gruppen wiesen ausschließlich kleine Nekroseareale mit weniger als 20% der Leitschienenfläche auf (= 1 Bewertungspunkt, vgl. Abb. 9E).

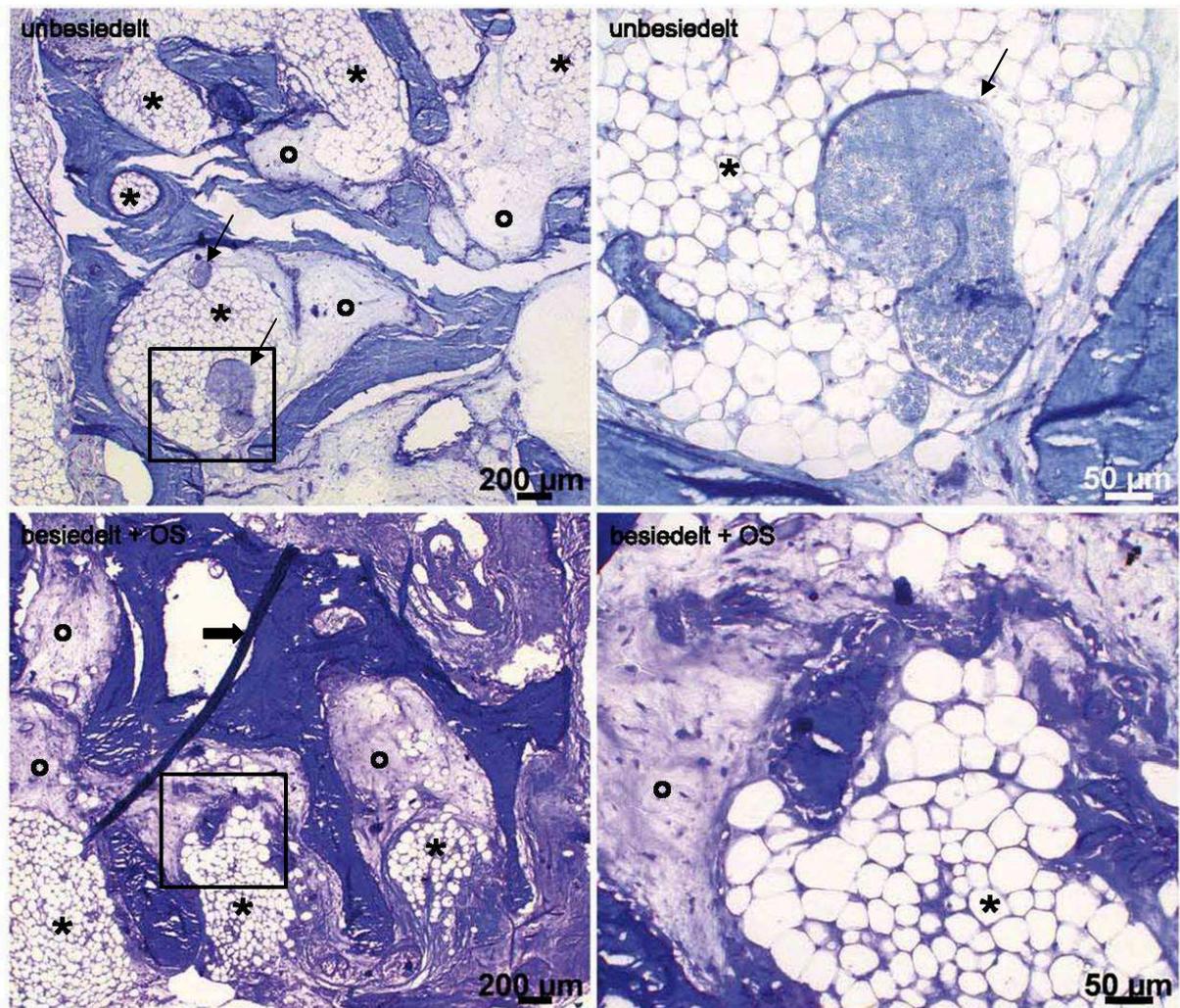


Abb. 19 Fettgewebe: Nach 12 Wochen Implantationsdauer fanden sich in allen Gruppen, zum Teil großflächige, Fettgewebsansammlungen (*), die bis zu 60% der Leitschienenfläche einnahmen. Stellenweise wies das Fettgewebe auch eine starke Vaskularisierung auf (Pfeile). Ebenfalls in größerem Umfang konnte das Auftreten von Nekrosen beobachtet werden, die zumeist größere Fettgewebsansammlungen flankierten (°). Der dicke Pfeil weist auf ein färbungsbedingtes Artefakt. Die rechten Bilder zeigen jeweils den vergrößerten Bildausschnitt der Übersichtsaufnahme (Kasten im linken Bild). (OS = osteogen stimuliert)
Toluidinblau-Färbung, 20-fache (links) und 40-fache (rechts) Vergrößerung.

4. Diskussion

4.1. Methodik

4.1.1. Verwendung von Stammzellen, Expansion und Zelldifferenzierung

Die Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen stellt bis heute ein unzureichend gelöstes Problem des Tissue Engineerings dar. Obgleich jüngste Untersuchungen zeigen, dass beispielsweise MCAM/CD146-positive Knochenmarkszellen typische mesenchymale Stammzeleigenschaften wie Plastikadhärenz besitzen, konnte bislang noch kein spezifisches Oberflächenepitop zum Nachweis mesenchymaler Stammzellen identifiziert werden (Bianco et al. 2008). Die von Friedenstein 1970 erstmals beobachtete Fähigkeit einiger Knochenmarkszellen, selektiv an Plastikoberflächen zu adhären (Friedenstein et al. 1970), wird daher nach wie vor häufig als Grundlage für den Nachweis eines mesenchymalen Stammzellcharakters genutzt. Auf diese Weise gewonnene Zellpopulationen sind jedoch sehr heterogen und unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Morphologie als auch ihres Differenzierungsverhaltens *in vitro* (Muraglia et al. 2000, Kuznetsov et al. 1997). Obgleich internationale Standards zur Klassifikation mesenchymaler Stammzellen bereits vorliegen (Dominici et al. 2006), konnte noch kein einheitliches Verfahren zur Isolation homogener Stammzellpopulationen etabliert werden. Besonders dieser Umstand wirkt sich nachteilig auf die Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse unterschiedlicher Forschungsgruppen aus.

Homogenere Zellgruppen können durch die Identifizierung bestimmter Oberflächenantigene erlangt werden (Pittenger et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden daher Zellen kommerziell erworben, die nach einem standardisierten Protokoll mittels durchflusszytometrischem Nachweises bestimmter Oberflächenmoleküle gewonnen wurden. Der hohe Anteil an mesenchymalen Stammzellen innerhalb solcher Zellpopulationen ist evident (Docheva et al. 2007, Schieker et al. 2007, Stengele 2004, Pittenger et al. 1999).

Die Vielschichtigkeit modulierender Einflüsse im Tissue Engineering wird auch bei näherer Betrachtung des Nährmediums und seiner Supplemente als Einflussgröße deutlich. Besonders durch seine Zusammensetzung kommt dem Nährmedium eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums zu. Obgleich die Zusammenset-

zung des tierischen Serums nicht exakt definiert ist, werden ihm, neben den Auswirkungen durch den Gehalt an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren, auch antioxidante sowie kolonialisierende Wirkungen zugesprochen (Montzka et al. 2010, Meuleman et al. 2006). Demgegenüber steht aufgrund der tierischen Herkunft jedoch vor allem in Hinblick auf den klinischen Einsatz ein potentiell Krankheitsübertragungsrisiko. In Serumersatzstoffen, welche positive Auswirkungen auf die Zellproliferation zeigten (Meuleman et al. 2006), wurden später ebenfalls kleinere Mengen tierischen Serums nachgewiesen (Korhonen 2007).

Autologe, humane serumbasierte Medien sind insbesondere wegen dem Verbrauch großer Serummengen und Unklarheit über Auswirkungen therapierelevanter Einflüsse (z.B. Chemotherapie) für den klinischen Einsatz noch weitgehend ungeeignet (Stute et al. 2004). Nichtsdestotrotz können aufgrund jüngster Forschungsergebnisse humane Seren als vielversprechende Alternative zu tierischen Produkten gesehen werden (Felka et al. 2010).

Neben der *ex vivo* Expansion mesenchymaler Stammzellen (Kuznetsov et al. 2000) stellt fötales bovines Serum in besonderem Maße auch ein effektives Agens zur osteogenen Differenzierung und Neubildung von Knochengewebe dar (Ichikawa 2010, Beresford et al. 1993). So differenzierten beispielsweise Knochenmarks-Stromazellen aus Ratten entlang der adipogenen Zelllinie, wenn sie mit serumfreiem Medium unter Zusatz osteogener Supplemente kultiviert wurden (Ichikawa 2010).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die osteogene Stimulation der hMSCs durch 2-wöchige Vorinkubation der besiedelten Leitschienen in MSCGM unter Zugabe von Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (Jaiswal et al. 1997).

Vor allem der Zusatz von Dexamethason erscheint aufgrund der klinischen Erfahrungen mit dieser Substanz auf den ersten Blick nicht schlüssig. So wird beispielsweise neben der Auslösung von Proteolyse besonders die dosisabhängige Verminderung osteoblastärer Vorläuferzellen als möglicher Schlüsselmechanismus in der Entstehung der glukokortikoid-induzierten Osteoporose vermutet (Walsh et al. 2001, Simmons et al. 1984). Ferner ist der klinische Einsatz von Glukokortikoiden sogar zur Verhinderung ektopen Knochenwachstums in speziellen Fällen beschrieben (Brantus und Meunier 1998). Obgleich die modulierenden Einflüsse von Dexamethason auf die Differenzierungsaktivität bestimmter Zellen belegt wurden (Shalhoub et al. 2004, Cheng et al. 1994), herrscht häufig Uneinigkeit über die genauen Wirkmechanismen.

Auch eine eher dedifferenzierende Wirkung innerhalb der osteoblastären Kaskade ist beschrieben (Pereira et al. 2002). Da ein Ausbleiben nachteiliger Dexamethasonwirkungen auf die Zellreplikation unter Kokultivierung mit β -Glycerophosphat beobachtet wurde, wird dieser Substanz überwiegend eine modulierende Funktion zugeschrieben (Pereira et al. 2001). Die Aufgabe von β -Glycerophosphat als Phosphatdonor für die Alkalische Phosphatase (Peter et al. 1998) kann hingegen auch durch Ascorbinsäurephosphat übernommen werden (Beresford et al. 1993). Ascorbinsäure erfüllt den Zweck eines Radikalfängers und trägt als Redoxsystem zur Hydroxylierung von Kollagen und Kollagen-I bei und schafft somit die Grundlage für eine spätere Mineralisierung (Bellows et al. 1986). Nach neueren Erkenntnissen scheint jedoch vor allem die Dauer der *in vitro* Inkubation mit Dexamethason eine wichtige Rolle zu spielen. Da Stammzellen, die weniger als 3 Wochen mit Dexamethason osteogen stimuliert wurden, geringere Differenzierungsgrade als Gruppen mit längerer Stimulationsdauer zeigten, wurde die Hypothese geäußert, dass eine kontinuierliche Dexamethasonstimulation von mindestens 3 Wochen erforderlich sei, um eine vollständige Induktion der Differenzierung von Stammzellen entlang der osteogenen Kaskade zu erreichen (Song et al. 2009). In zukünftigen Untersuchungen könnte somit durch die verlängerte Präinkubation mit osteogenen Supplementen möglicherweise ein verbesserter Differenzierungsgrad erreicht werden.

4.1.2. Freisetzung und Wirkung von VEGF

Eine der größten Schwierigkeiten im Tissue Engineering ist, das Überleben großer Zellpopulationen nach Implantation *in vivo* zu sichern (Mooney und Mikos 1999). Nach dem Transfer besiedelter Konstrukte scheint vor allem die fehlende Blutversorgung und somit der fehlende Austausch von Stoffwechselprodukten ein entscheidendes Kriterium zu sein, das maßgeblich am Scheitern vieler Ansätze beteiligt ist (Muschler et al. 2004). Es wird daher angenommen, dass das Fehlen einer geeigneten Gefäßversorgung bereits in den ersten Stunden nach Implantation besiedelter Konstrukte zu einem Absterben großer Zellgruppen führt und dient als Erklärung für die Verminderung der nachweisbaren Zellzahlen *in vivo* (Seitz et al. 2007).

Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Einbeziehung angiogenetisch wirksamer Faktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), der eine Schlüsselposition im komplexen Ablauf der Angiogenese einzunehmen scheint (Santos und Reis 2010). Die Schwierigkeit dieses Ansatzes verdeutlichen jedoch Beobachtungen, nach denen es zu einer proteolytischen Spaltung des VEGFs bereits nach 10–20 Minuten *in vivo* kommt, wodurch auch mitogene Eigenschaften nachhaltig beeinflusst werden (Ferrara et al. 2003, Ferrara 2002a, Jain 2002). Die Entwicklung sogenannter „Auslieferungssysteme“ wirkt diesen Prozessen entgegen. Durch Vorbehandlung der Leitschienen oder Entwicklung neuartiger Zusammensetzungen wird hierbei versucht, eine möglichst kontinuierliche Freisetzung von VEGF unter Beibehaltung der biologischen Aktivität zu erreichen (Chen et al. 2010, Chen et al. 2007). Alternative Ansätze machen sich Strategien der Genforschung zunutze, indem die fortwährende Bereitstellung von VEGF durch Erstellung geeigneter Vektoren erreicht wird (Li et al. 2009).

Auch die Menge an VEGF und deren Bereitstellungsdauer sind wichtige Einflussgrößen. So führen zu hohe Mengen an VEGF ebenso wie zu lange Verabreichungszeiträume zu fehlgebildeten und undichten Gefäßen (Zisch et al. 2003, Dor et al. 2002). Eine mittlere Tagesdosis von 150ng VEGF pro Tag erbrachte über einen Zeitraum von 6 Wochen bessere Vaskularisierungsgrade als Dosen von 15ng und 1500ng. Eine kurzzeitige Verabreichung hoher VEGF-Dosen schien jedoch gerade in der Anfangsphase der Neovaskularisierung positive Auswirkungen zu haben (Davies et al. 2008). Da VEGF möglicherweise auch negative Rückkopplungsmechanismen zur Expression von BMP-2 unterhält, könnte sich die Freisetzung hoher VEGF-Spiegel jedoch kontraproduktiv auf die Knochenneubildung *in vivo* auswirken (Schonmeyer et al. 2010). Aufgrund der klinischen Erfahrung mit Malignomen und Retinopathien darf auch die nachweislich pathologische Auswirkung eines VEGF-induzierten, unkontrollierten Gefäßwachstums nicht außer Acht gelassen werden (Ferrara 2002b).

Jüngste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wiesen in einem ähnlichen Versuchsansatz unter Verzicht auf Wachstumsfaktoren einen rapiden Zelluntergang hauptsächlich während der ersten zwei Wochen *in vivo* nach (Seitz et al. 2007). Da diese Beobachtungen nach unserer Meinung hauptsächlich in Zusammenhang mit der fehlenden Gefäßversorgung der Konstrukte sowie dem mäßigen Vaskularisierungsgrad der Subcutis stehen, wurden im vorliegenden Versuchsansatz die Auswirkungen einer Beimpfung besiedelter Konstrukte mit VEGF geprüft.

4.1.3. Leitschienenwahl und Einfluss von Beimpfungs- und Kultivierungsform

Gerichtetes Zellwachstum ist an das Vorhandensein einer Leitschiene gebunden (Bianco und Robey 2001). Diese müssen als „ideale Leitschiene“ unterschiedlichste Anforderungen, wie beispielsweise fehlende Antigenität, geeignete mechanische Primärstabilität oder gute Biokompatibilität erfüllen. Auch die Anpassung und Weiterentwicklung des Leitschienenendesigns gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. In diesem Zusammenhang stehen vor allem die Konfiguration des interkonnektierenden Porennetzwerks sowie der Porendurchmesser im Vordergrund (Karageorgiou und Kaplan 2005). Da die Auswahl eines geeigneten Leitschienenmaterials mit zweckmäßigem Design von übergeordneter Wichtigkeit ist, sollten diese während der frühen Studienplanung individuell an die Fragestellung angepasst werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden lösungsmittelkonservierte bovine Spongiosawürfel (Tutobone, Fa. Tutogen Medical) als Leitschienen verwendet die bereits Zulassung für den klinischen Gebrauch erhielten. Diese bieten neben einer guten Verfügbarkeit im kommerziellen Vertrieb auch eine Reihe weiterer Vorteile. Durch das firmeneigene, schonende Behandlungsverfahren (Tutuplast®) können einerseits die natürliche Stabilität und Knochenstruktur der Leitschienen erhalten werden, andererseits wird durch eine Reihe inaktivierender Schritte auch ein größtmöglicher Schutz vor Übertragung bakterieller, viraler oder prionaler Erkrankungen erreicht. Ferner wird durch Auswaschung osmotisch zerstörter zellulärer Strukturen auch die Entfernung antigener Bestandteile erreicht. Im Gegensatz zu demineralisierten Matrices subsumieren lösungsmittelkonservierte Tutobone-Leitschienen neben zytokompatiblen Eigenschaften auch eine unveränderte mechanische Beanspruchbarkeit. Zudem ist die Konfiguration von Porengröße und innerer Trabekelstruktur für das Einwachsen und Anhaften zellulärer Strukturen gut geeignet (Trentz et al. 2003) und bietet ausreichende Primärstabilität.

Da die Grundsubstanz in unterschiedlichen geometrischen Formen und Größen sowie als Granulat erhältlich ist, kann eine individuelle Anpassung an anatomische oder defektassoziierte Gegebenheiten im klinischen Gebrauch leicht erfolgen. In klinischer Testung zeigten Untersuchungen im Bohrlochmodell am Kaninchen einen komplikationslosen Verlauf und beinahe vollständiges Remodelling nach 26 Wochen (Günther et al. 1996). Auch erste Berichte über erfolgreichen Einsatz von Tutobone in operativen Verfahren am Menschen existieren (Meyer et al. 2008). Die vielversprechenden Ergebnisse des Tiermodells hinsichtlich einer beschleunigten und vollständigen Re-

sorption des Leitschienenmaterials konnten hierbei zwar nach 12-monatigem Beobachtungszeitraum nicht bestätigt werden, eine gute Osteointegration ließ sich dennoch beobachten.

Die effiziente Beimpfung dreidimensionaler Leitschienen mit expandierten Zellpopulationen ist nach wie vor schwierig. Die ausgesäte Zellzahl spielt hierbei ebenso wie das Verteilungsmuster innerhalb der Leitschiene eine wichtige Rolle. So scheint beispielsweise eine Zelldichte über ein optimales Maß hinaus keine weiteren Verbesserungen hinsichtlich der Knochenneubildung zu erbringen (Kruyt et al. 2008, Lode et al. 2008, Holy et al. 2000). Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass durch ein homogenes Zellverteilungsmuster dem langwierigen Einwachsen von Zellen der Randbereiche vorgegriffen werden kann und somit eine beschleunigte Knochenneubildung auch im Leitschienenzentrum möglich ist (Godbey et al. 2004). Eine Besiedelung der peripheren Leitschienenanteile scheint sich jedoch im Gegensatz zu einem homogenen Verteilungsmuster vorteilhaft auf das Einwachsverhalten kapillärer Strukturen *in vivo auszuwirken* (Checa und Prendergast 2010, Bensaïd et al. 2005).

Die Besiedelungstechnik sowie die Dauer des Besiedelungsvorganges wurden als wichtige Einflussgrößen der Besiedelungseffizienz ausgemacht. Neben Vorbeschichtungen des Leitschienenmaterials oder Besiedelung in Unterdruckkammern ist auch die Zugabe adhäsionsfördernder Supplemente beschrieben (Zhu et al. 2010, Anselme 2000). So wurden signifikante Verbesserungen in Bezug auf die Besiedelungseffizienz, das Verteilungsmusters und das Zellüberleben beispielsweise durch Zugabe von Fibrin während der Zellaussaat beobachtet (Zhu et al. 2010). Hinsichtlich der Besiedelungsdauer werden nach einstündiger Besiedelung in der Literatur Besiedelungseffizienzen von lediglich ca. 25% angegeben (Holy et al. 2000). In Vorarbeiten unserer eigenen Forschungsgruppe dagegen wurden nach einer Besiedelungszeit von zwei Stunden Effizienzen von 40–60 % nachgewiesen (Horvath 2008), nach sechs Stunden wurde eine mittlere Effizienz von 93% erreicht (Seitz et al. 2007). Im vorliegenden Versuchsansatz wurde daher ein Besiedelungszeitraum von 6 Stunden gewählt. Zur Steigerung der Zelladhärenz wurde eine sechsstündige Vorinkubation der Leitschienen in FBS, das durch Bestandteile wie Fibronectin unterstützend auf die Zelladhäsion wirkt (Montzka et al. 2010), vorgenommen. Hierdurch wurde eine durchschnittliche Besiedelungseffizienz von 64,8% erreicht. Dieses Ergebnis liegt deutlich unter der Besiedelungseffizienz der Vorarbeit unserer eigenen

Forschungsgruppe nach sechststündiger Besiedelungsdauer (Seitz et al. 2007). Da in der vorliegenden Studie jedoch einerseits kleinere Leitschienen verwendet und andererseits höhere Zellzahlen ausgesiedelt wurden, ergibt sich unter Rücksicht auf das Volumen der unterschiedlichen Leitschienen eine maßgeblich höhere Zahl an Zellen pro Kubikmillimeter Leitschienenenvolumen. Da vielen Autoren die Ermittlung der Besiedelungseffizienz gänzlich vernachlässigen oder lediglich die Anzahl der ausgesiedelten Zellen angeben (Bensaid et al. 2005, Mizuno et al. 1997), ist jedoch eine wissenschaftliche Einordnung dieser Ergebnisse schwierig.

Die Kultivierung besiedelter Konstrukte kann *in vitro* unter statischen oder dynamischen Bedingungen erfolgen. Bei der statischen Kultivierung handelt es sich um die einfachste und kostengünstigste Art der Kultivierung. Nachteile ergeben sich jedoch durch den mangelnden Stoffwechsel und das reduzierte Angebot an Nährstoffen. Hierdurch wird möglicherweise das Einwachsen von Zellen limitiert und somit die Zelldichte innerhalb der Leitschiene reduziert (Yu et al. 2004). Durch statische Kultivierung osteogen stimulierter Zell-Matrixkonstrukte wurde im Vergleich zur dynamischen Kultur ferner eine verminderte Bildung extrazellulärer Matrix *in vitro* nachgewiesen (Wang et al. 2003).

Die Vorteile einer dynamischen Kultur, wie gleichmäßige Nährstoffversorgung, Abtransport von Stoffwechselprodukten oder Auslösung mechanischer Scherkräfte, sind umfassend in der Literatur beschrieben (Diederichs et al. 2009, Grayson et al. 2008, Holtorf et al. 2005, Bancroft et al. 2003, Minuth et al. 1998).

Aus einer Untersuchung mit mesenchymalen Stammzellen von Ratten ging hervor, dass mechanische Scherkräfte als Stimulus während dynamischer Kultivierung ausreichen, um eine osteogene Zelldifferenzierung auch ohne Zusatz stimulierender Substanzen hervorzurufen (Holtorf et al. 2005). In einer jüngeren Untersuchung unserer eigenen Forschungsgruppe war die dynamische Kultivierung unstimulierter humaner mesenchymalen Stammzellen dagegen nicht ausreichend, um eine suffiziente osteogene Zelldifferenzierung zur Knochenneubildung besiedelter Konstrukte im ektopen Lager zu erreichen (Seitz et al. 2007). Desweiteren konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ektopen Knochenneubildung zwischen einem dynamischen und statischen Kulturregime aufgezeigt werden. Um den Einfluss der osteogenen Stimulation auf die Knochenneubildung besiedelter Konstrukte im ektopen Mausmodell zu verdeutlichen, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie

ein statischer Kultivierungsansatz unter Zusatz osteogen stimulierender Supplemente gewählt.

4.1.4. Untersuchung im Tiermodell und Implantationsform

Besonders bei der Entwicklung regenerativen Knochengewebes sind *in vivo* Studien ein unverzichtbares Instrument um Entwicklungsabläufe real zu simulieren bzw. deren Physiologie besser zu verstehen. Um eine größtmögliche Zahl gewinnbringender Erkenntnisse zu erhalten ist die genaue Auswahl der Versuchstiere (Spezies, Alter, Geschlecht, Eigenschaften, etc.) ebenso wie die Bestimmung des Implantationsortes (heterotop, orthotop) individuell auf die Fragestellung auszurichten. Von ebensolcher Wichtigkeit ist eine artgerechte und möglichst stressfreie Haltung der Tiere, da Faktoren wie beispielsweise eine stressbedingte Kortisolserhöhung auch Auswirkungen auf die Regenerationsfähigkeit von Knochen haben könnten (Forni 2007).

Wegen der Größenverhältnisse und der somit relativ einfachen Bildung größerer Versuchsgruppen wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse als Versuchstiere gewählt. Hierfür eigneten sich besonders athyme Nacktmäuse, da bei dem gewählten Stamm (nu/nu) aufgrund der charakteristischen Thymusaplasie T-Zell-vermittelte Immunantworten weitgehend fehlen (Pelleitier und Montplaisir 1975). In einer vergleichenden Studie zur Beurteilung der Immunantwort immunkompetenter und immuninkompetenter Ratten auf die Transplantation humaner mesenchymaler Stammzellen wiesen immuninkompetente Tiere im Vergleich zu immunkompetenten keine Abstoßungsreaktionen auf (Grinnemo et al. 2004). Da in vielen vergleichbaren Studien ebenfalls athyme Nacktmäuse zum Einsatz kommen, ist die verbesserte Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse als weiteres Kriterium in Betracht zu ziehen. Die schonende Haltung und Pflege der Tiere erfolgte unter veterinärmedizinischer Aufsicht und gemäß den Richtlinien der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Eine orthotope Implantation oder ein Defektmodell eignen sich besonders zur Untersuchung spezifischer Abläufe im Rahmen der Frakturheilung. Der positive Einfluss mechanischer Kräfte auf die Knochenneubildung wurde hierbei sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet und ist evident (Baas et al. 2010, Roshan-Ghias et al. 2010). Eine heterotope Implantationsform erlaubt hingegen eine zielgerichtete und relativ unabhängige Beobachtung bestimmter Faktoren auf das Verhalten einzelner Zellpo-

pulationen. Eine direkte Überführung heterotop gewonnener Erkenntnisse in die orthotope Anwendung ist jedoch nicht möglich (Kruyt et al. 2004).

Vergleichende Studien ergaben eine eher randständige Knochenneubildung bei orthotoper Implantation, während im ektopen Model eine gleichmäßige Knochenneubildung innerhalb der Leitschiene festzustellen war (Kruyt et al. 2007, Kruyt et al. 2004). Signifikante Unterschiede zwischen besiedelten und unbesiedelten Leitschienen hinsichtlich der Knochenneubildung konnten im orthotopen Lager nicht ausgemacht werden, wohingegen nach ektoper Implantation nur besiedelte Konstrukte Knochenformationen aufwiesen (Kruyt et al. 2007, Kruyt et al. 2004). Eine Einflussnahme auf die Knochenneubildung wird im heterotopen Lager vor allem der Einsprossung von Gefäßen sowie der Osteoinduktivität der verwendeten Leitschiene zugesprochen, was im Einzelnen gut untersucht werden kann (Schantz et al. 2002). Neben einer Implantation in die Subkutis, sind auch andere Gewebe wie zum Beispiel Muskeln oder das Peritoneum als heterotope Implantatlager denkbar (Ishaug-Riley et al. 1997). Die Subkutis birgt jedoch den Vorteil einer relativ leichten Erreichbarkeit und somit vergleichsweise niedriger Begleitmorbidität, lässt jedoch eine gute Gefäßversorgung weitgehend vermissen.

Für den Nachweis der osteogenen Differenzierbarkeit mesenchymaler Stammzellen und deren Fähigkeit in dreidimensionalen Leitschienen Knochen zu bilden ist das Fehlen mechanischer, defektassoziiertes, parakriner oder periostaler Einflüsse von besonderer Wichtigkeit (Kruyt et al. 2003, Caplan und Bruder 2001).

Da in der vorliegenden Untersuchung zusätzlich zielgerichtet der Einfluss einer osteogenen Stimulation und Beimpfung mit VEGF auf die Knochenneubildung besiedelter Konstrukte untersucht werden sollte, wurde eine heterotope Implantationsform gewählt.

4.1.5. Histologische Schnitte und Färbungen

Die Anfertigung von Schnitt- oder Schliffpräparaten ist der Standard zur Herstellung histologischer Präparate. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass zur optimalen Auswertung und Vergleichbarkeit alle Schnitte eine ähnliche und möglichst hochwertige Qualität aufweisen sollten. In der Vorliegenden Arbeit wurden Schnittpräparate entkalkter sowie unentkalkter Zell-Matrix-Konstrukte angefertigt. Bereits durch die Verfahren zur Fixierung bzw. Einbettung der Proben ergeben sich hierbei Schwierig-

keiten, die auch unter Anwendung höchster Sorgfalt nicht gänzlich umgangen werden können.

Die Fixation mit Formalin beispielsweise kann zu einer Gewebsschrumpfung führen. Weiterhin ist die Stauchung der Schnittprobe im Rahmen des Schneidevorganges von Nachteil, was durch die anschließende Streckung während des Auftragens auf den Objektträger kompensiert werden soll. Auch die Hand eines Experten kann hierbei Risse und Falten nicht gänzlich verhindern. In unserem Fall wurde zudem häufig ein Abschwimmen der Schnittpräparate vom Objektträger während des Färbevorganges unentkalkter Leitschienen beobachtet, was zu einem deutlich erhöhten materiellen und zeitlichen Aufwand führte.

Bei der Entkalkung von Knochenmatritzen kommt es zu einer vermehrten Gewebsschrumpfung. Dies kann sich besonders auf die Beurteilung und Charakterisierung eingewachsener Gewebeanteile ungünstig auswirken.

Bei den verwendeten Färbungen handelt es sich um Standardfärbungen, die gemäß weitverbreiteten Färbungsprotokollen durchgeführt wurden.

Der Nachweis neugebildeten Osteoids sollte in unentkalkten Proben mittels Masson-Goldner Trichrom-Färbung geführt werden. Obgleich diese Färbung eine etablierte Methode zur Untersuchung verschiedener Prozesse innerhalb von Knochenpräparaten ist, war besonders die zum Teil ungenügende Kontrastierung gelegentlich von Nachteil. Die Färbung mit Toluidinblau wurde daher aufgrund der guten Kontrastierung einzelner Zellen vorwiegend zur näheren Untersuchung und Charakterisierung von Zellen und Zellgruppen verwendet.

Entkalkte Präparate wurden für die Anfertigung von Übersichtsfärbungen mittels Hämatoxylin-Eosin hergestellt.

4.2. Ergebnisse

Die Auswirkungen osteogener Supplemente wie Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure auf die osteogene Differenzierung und Knochenneubildung besiedelter Konstrukte sind nach wie vor Gegenstand breiter Forschung (Matsushima et al. 2009, Jager et al. 2008). Da die Erkenntnis, dass die Sicherstellung einer adäquaten Gefäßversorgung, als Grundlage für erfolgreiches Tissue Engineering von Knochen gilt (Santos und Reis 2010), stehen auch zunehmend angiogenetisch wirksame Wachstumsfaktoren wie VEGF im Fokus der experimentellen Forschung (Chen

et al. 2010, Davies et al. 2008, Huang et al. 2005). Im Hinblick auf frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen einerseits keine Knochenneubildung nachgewiesen werden konnte und andererseits ein Zusammenhang zwischen dem rapiden Zelluntergang innerhalb der ersten 2 Wochen *in vivo* und dem Fehlen einer frühen Blutversorgung angenommen wurde (Seitz et al. 2007), sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der osteogenen Stimulation und Beimpfung mit VEGF auf die Knochenneubildung besiedelter Konstrukte geprüft werden. In einer Parallelarbeit (Dissertation F. Pohlig) wurden zudem die Auswirkungen auf das Zellüberleben untersucht.

Obgleich für unseren Versuch neben osteogener Stimulation und Zugabe eines vasculären Wachstumsfaktors auch Leitschienen mit relativ geringen Abmessungen herangezogen wurden, konnte zu keinem Beobachtungszeitpunkt eine Synthese von Knochen oder Knorpel *in vivo* gezeigt werden. Dies bestätigt zwar Ergebnisse aus ähnlichen Untersuchungen unserer eigenen Forschungsgruppe, lässt jedoch die Frage nach der Ursache weiterhin offen.

Der hohe Gehalt an mesenchymalen Stammzellen innerhalb der von uns gewählten, kommerziell erhältlichen Zellen, die nach einem standardisierten Verfahren gewonnen werden, ist belegt (Docheva et al. 2007, Schieker et al. 2007, Stengele 2004, Pittenger et al. 1999). In Berichten über erfolgreiche *de novo* Synthese von Knochen ist dagegen vielfach der Einsatz humaner Stromazellen aus Knochenmarksaspiraten dokumentiert, die einen höheren Gehalt an bereits differenzierten Vorläuferzellen der osteoblastären Differenzierungskaskade besitzen (Mauney et al. 2005, Bareille et al. 2000). Solche vitalen Vorläuferzellen sind für die ektopische Knochenneubildung erforderlich (Kruyt et al. 2003) und können *in vitro* durch osteogene Stimulation zahlenmäßig expandiert werden (Matsushima et al. 2009, Maegawa et al. 2007). In diesem Zusammenhang ist daher auch die zusätzliche Beigabe von BMP-2 und FGF-2 in Erwägung zu ziehen, wodurch eine vermehrte Stimulation der osteoblastischen Differenzierung *in vitro* erreicht werden könnte (Maegawa et al. 2007). Auch die Verwendung weitgehend differenzierter Zelltypen könnte ein möglicher Ansatz sein (Cancedda et al. 2003).

Eine weitere Erklärung für die ausbleibende Knochenneubildung trotz osteogener Stimulation könnte in der Wahl des Kulturregimes liegen. Da gerade während der Kultivierungsphase eine optimale Versorgung der Zellen mit Medium zur Initialisierung und Aufrechterhaltung von Differenzierungsprozessen von übergeordneter

Wichtigkeit ist, birgt eine dynamische Kultivierung gewisse Vorteile. In osteogen stimulierten Zellen verstärkt die dynamische Kultivierung im Vergleich zu einem statischen Kulturregime die Ausbildung einer extrazellulären Matrix *in vitro* und fördert somit eine Knochenneubildung *in vivo* (Wang et al. 2003). Zusätzlich wird die Differenzierung osteogen stimulierter Zellen entlang der osteoblastären Kaskade durch die Einwirkung zytomechanischer Kräfte in dynamischen Kulturbedältern positiv beeinflusst (Zilkens et al. 2010). Jüngere Untersuchungen zeigten zudem bei statischer Kultivierung nach 5 Tagen eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration in Richtung Leitschienezentrum bis auf 0%, während bei dynamischer Kultivierung eine Konzentration von 4% nicht unterschritten und somit das Zellüberleben gesichert wurde (Volkmer et al. 2008). Somit könnte es bei statischer Kultivierung durch einen abfallenden Sauerstoffgradienten bereits *in vitro* zu einem Zelluntergang im Leitschienezentrum kommen.

Abgesehen von Hindernissen während der *in vitro* Kultivierung könnte das Fehlschlagen der ektopen Synthese von Knochen auch der mangelnden Nährstoffversorgung *in vivo*, aufgrund der primär fehlenden Gefäßversorgung zugeschrieben werden (Seitz et al. 2007, Muschler et al. 2004). Zur Stimulation einer raschen Gefäßanbindung auf molekularer Ebene verwendeten wir daher in je einer Gruppe den angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktor VEGF. Die physikalischen Voraussetzungen in Bezug auf eine, in der Literatur beschriebene, maximale Diffusionsstrecke von 200µm - 3,5 mm (Rouwkema et al. 2008, Krut et al. 2004) wurden durch den Einsatz kleiner, quadratischer Leitschienen mit einer Kantenlänge von 3mm optimiert. Analog zu Ergebnissen aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen jedoch neben dem Verzicht auf Wachstumsfaktoren auch größere Leitschienen eingesetzt wurden (Seitz et al. 2007, Schieker et al. 2004) ergab die molekularbiologische Auswertung (Dissertation F. Pohlig) in allen Gruppen einen signifikanten Abfall (>80%) der nachweisbaren Zellzahlen nach einem Implantationszeitraum von 2 Wochen. Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen war jedoch trotz statischer Kultivierung kein weiterer signifikanter Abfall der Zellzahlen nach 12 Wochen zu verzeichnen. Als histologisches Korrelat fanden sich, aus dem Implantatbett einwachsendes Faser- und Bindegewebe, sowie vereinzelte Nekrosen. Der Vaskularisierungsgrad nach 2 Wochen *in vivo* beschränkte sich in allen Gruppen gleichsam auf eine peripher betonte Kapillarisation.

In der Literatur wurde unter hypoxischen Bedingungen und gleichzeitigem Entzug des Nährmediums ein Absterben aller Zellen nach maximal 5 Tagen *in vitro* beschrieben (Potier et al. 2007). Ebenso wurde jedoch auch eine verbesserte Proliferationsfähigkeit von humanen mesenchymalen Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen *in vitro* beobachtet (Volkmer et al. 2010). In Anbetracht des Vaskularisierungsgrades der Leitschienen nach 2 Wochen und dem nur relativ schwach vaskularisierten Subkutangewebe (Gosain et al. 1990, Mathes et al. 1982) muss dennoch das Absterben, zumindest zentral gelegener und auch mittels Diffusion vermutlich nur schwer zu erreichender Zellen innerhalb der ersten zwei Wochen angenommen werden.

Die Hypothese, dass Knochenneubildung in ektopem Gewebe nur in Anwesenheit vitaler Vorläuferzellen möglich ist (Kruyt et al. 2003), lässt auch Rückschlüsse auf das Implantatbett zu. Die augenscheinlich fehlende Induktion einer ektopen Knochenneubildung durch Mausosteoblasten in den unbesiedelten Leitschienen könnte somit einerseits für die geringe Menge an Vorläuferzellen innerhalb des Mausgewebes sprechen, andererseits jedoch auch auf ungenügende osteoinduktive Eigenschaften des Leitschienenmaterials hindeuten. Mangelnde Adhäsionseigenschaften der verwendeten Leitschienen wurden in der vorliegenden Arbeit durch Ermittlung der Besiedelungseffizienz ausgeschlossen. Die Differenzierungsfähigkeit der kommerziell erhältlichen Zellpopulation wurde bereits im Rahmen einer früheren Untersuchung (unveröffentlichte Daten) durch den Nachweis einer extrazellulären Matrixsynthese nach Besiedelung nachgewiesen. Eine Verminderung der transplantierten Zellzahl in Folge immunologischer Prozesse erscheint aufgrund der Verwendung athymer Nacktmäuse zwar unwahrscheinlich, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Seitz et al. 2007, McBride et al. 2003). Besonders die Beeinflussung der Zellvitalität im Rahmen von Fremdkörperreaktionen (siehe unten) ist hierbei denkbar. Der Umstand, dass auch in der Gruppe mit VEGF-Stimulation offensichtlich keine ausreichende Gefäßversorgung initiiert und kein vermehrtes Zellüberleben gesichert wurde, könnte am ehesten mit der biologischen Instabilität von VEGF *in vivo* und der kurzen Stimulationsdauer zu erklären sein (Davies et al. 2008, Ferrara et al. 2003, Ferrara 2002b). Der Umstand signifikant verminderter Zellen trotz deutlich verbesserten Vaskularisierungsgrades aller Gruppen nach 12 Wochen unterstützt die Hypothese eines frühen Zelltodes nach Implantation. Das Fehlen einer weiteren Abnahme der Zellzahlen zwischen der zweiten und zwölften Woche in allen Gruppen lässt je-

doch die Suffizienz der neugebildeten Gefäßversorgung für die, nach 2 Wochen verbliebenen, Zellen vermuten. Ebenso wurde die Bildung einer protektiven extrazellulären Matrix in Erwägung gezogen (Seitz et al. 2007). Eine signifikante Erhöhung der Zellzahlen nach 12 Wochen, die möglicherweise auf eine Zellvermehrung *in vivo* hindeuten würde, war nicht nachzuweisen.

Verbesserungen könnten in zukünftigen Versuchen sowohl durch eine kontinuierliche und kontrollierte VEGF-Freisetzung als auch durch ein gefäßreiches Implantatbett erzielt werden. Besonders das gut vaskularisierte Muskelgewebe könnte hierfür geeignet sein (Van Gaalen et al. 2009, Khouri et al. 1996). Hinsichtlich einer fortdauernden VEGF-Stimulation sind ermutigende Ergebnisse beispielsweise durch Vorbehandlung von demineralisierter Knochenmatrix mit Heparin beschrieben, wodurch neben einer vermehrten Bindung von VEGF *in vitro* auch eine fortdauernde Freisetzung *in vivo* ermöglicht wird (Chen et al. 2010). In Anbetracht der dosisabhängigen Wirkweise von VEGF (Davies et al. 2008), sowie des komplexen Zusammenspiels mehrerer Wachstumsfaktoren im Verlauf der Angiogenese, könnten auch mehrschichtige Composite-Leitschienen positive Ergebnisse erbringen. Die relativ gute Kontrollierbarkeit der zeitlichen und mengenmäßigen Freisetzung mehrerer Wachstumsfaktoren aus derartigen Leitschienen wurde gezeigt (Chen et al. 2007).

Am vielversprechendsten erscheint jedoch die Entwicklung prävaskularisierter Zell-Matrixkonstrukte, wodurch eine adäquate Gefäßversorgung bereits in einer frühen Phase nach Implantation sichergestellt werden könnte (Steffens et al. 2009, Arkudas et al. 2007). So führte die sofortige Anbindung an einen funktionierenden Stoffwechselkreislauf im Vergleich zu einer nicht-prävaskularisierten Kontrollgruppe zu einer höheren Überlebensrate transplanteder Osteoblasten *in vivo* (Arkudas et al. 2007).

Die Auslösung entzündlicher Prozesse durch Implantation biologischer oder synthetischer Materialien ist bekannt (Barbosa et al. 2009, Yanagida et al. 2009, Seitz et al. 2007). Bereits die Interaktion von Implantatoberfläche und Empfängerblut während der frühen Implantationsphase führt hierbei zur Initiierung einer Fremdkörperreaktion, an deren Beginn eine akute Entzündungsantwort steht (Anderson et al. 2008). Entscheidende Einflussgrößen hinsichtlich Art und Ausprägung der biologischen Reaktion stellen die Materialart und –beschaffenheit des implantierten Fremdkörpers dar (Anderson et al. 2008). In Leitschienen mit interkonnektierenden Poren könnte es hierbei durch die stark vergrößerte Oberfläche sogar zu einer vermehrten Invasion

reaktiver Zellen kommen (Zambuzzi et al. 2006). Entsprechend der Beobachtung, dass normale Fremdkörperreaktionen auch in immundefizienten, athymen Mäusen hervorgerufen werden können (Rodriguez et al. 2009), wurden auch in der vorliegenden Arbeit entzündliche Fremdkörperprozesse dokumentiert. Im Gegensatz zu früheren Resultaten (Seitz et al. 2007), ergaben sich jedoch in der aktuellen Studie nach 2 Wochen kaum noch Anzeichen einer akuten Entzündung, da diese bereits der Bildung von Granulationsgewebe gewichen zu sein schien. Ferner zeigte sich bereits stellenweise, wie in der Literatur beschrieben, eine monozelluläre Trennschicht zwischen Leitschienenmatrix und Granulationsgewebe, bestehend aus Makrophagen und vereinzelt multinukleären Riesenzellen (Anderson et al. 2008). Diese Zellen sind Teil der Fremdkörperreaktion und tragen unter anderem zum Abbau biodegradierbarer Leitschienen bei (Xia et al. 1994). Ob es im Verlauf einer Fremdkörperreaktion auch zur Phagozytose humaner Zellen durch Mausmakrophagen kommen kann, ist nicht abschließend geklärt (Xia et al. 2004, Cabilly und Gallily 1981), obgleich in der vorliegenden Arbeit auch nach 12-wöchiger Implantationszeit das Überleben vitaler mesenchymaler Stammzellen nachgewiesen werden konnte (Dissertation von Florian Pohlig). Generell sind Auswirkungen auf die transplantierten Zellen besonders in der näheren Umgebung von Fremdkörperreaktionen zu befürchten, da es durch Abfallen des pH-Wertes und Freisetzung von Abbauenzymen zu Veränderungen der Homöostase kommen kann (Anderson et al. 2008). Auch Entzündungsmediatoren und Signalmoleküle könnten Zellfunktionen wie die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit *in vivo* beeinflussen (Anderson et al. 2008).

In Konkordanz mit anderen Studien wurden in der vorliegenden Arbeit multinukleäre Riesenzellen nach 2-wöchiger Implantation noch in überwiegend peripheren Leitschienenanteilen und geringerer Zahl gesehen, während zu einem späteren Zeitpunkt auch zentrale Regionen besiedelt waren (Seitz et al. 2007, Zambuzzi et al. 2006, Xia et al. 2004). Obgleich das vermehrte Vorkommen von Riesenzellen in unbesiedelten Konstrukten berichtet wurde, ergaben unsere Untersuchungen keine gruppenspezifischen Unterschiede (Bareille et al. 2000, Bruder und Fox 1999). Die gute Gewebeverträglichkeit des verwendeten Leitschienenmaterials wurde bereits in klinischen Studien bestätigt und lässt sich in unserer Studie an einer relativen milden Fremdkörperreaktion und dem Fehlen von makroskopischen Entzündungszeichen ablesen (Meyer et al. 2008).

Im Allgemeinen herrscht oftmals Unklarheit über die genaue Entität der vielfach dokumentierten multinukleären Riesenzellen. Da sogenannte „clear zones“ beobachtet wurden, die ein charakteristisches histologisches Korrelat für Organisationsprozesse des Zytoskeletts adhätierender Osteoklasten darstellen, wurde auch eine osteoklastäre Herkunft in Erwägung gezogen (Vaananen und Horton 1995, Glowacki und Cox 1986). Andere Autoren dagegen berichten gegenteiliges (Kelly und Schneider 2005). In unserer Studie lagen mehrkernige Riesenzellen sowohl singulär oder gruppiert, knochenständig oder frei innerhalb des Leitschienenstromas vor, wodurch ebenso wie durch die morphologische Heterogenität der Riesenzellen die Hypothese von einem Vorkommen beider Zellentitäten (Fremdkörperriesenzellen und Osteoklasten) gestützt würde (Bagi und Miller 1989). Eine eindeutige Charakterisierung der Riesenzellen wäre mit Hilfe einer immunhistologischen Färbung gegen spezifische osteoklastäre Oberflächenepitope, wie beispielsweise dem Calcitoninrezeptor möglich (Brodbeck und Anderson 2009, Anderson 2000, Bareille et al. 2000).

Bereits nach 2-wöchiger Implantationsdauer war in allen Untersuchungsgruppen die Bildung von Granulationsgewebe zu verzeichnen. Die Erklärung hierfür ist nach unserer Meinung in der chronologischen Gewebsabfolge der beobachteten Fremdkörperreaktionen zu sehen (Anderson et al. 2008). Durch die Produktion gewebswirksamer Faktoren wie zum Beispiel TNF α oder EGF sind vor allem die Makrophagen an der Initialisierung von Gefäßeinsprossungen und der Proliferation von Fibroblasten beteiligt (Kaigler et al. 2006). Hieraus resultiert ein Granulationsgewebe, das im Verlauf der darauffolgenden Wochen weiteren Umstrukturierungen unterzogen und schließlich durch persistierendes Gewebe ersetzt wird. In Konkordanz mit ähnlichen Beschreibungen war das Leitschienengewebe aller Gruppen nach 12 Wochen *in vivo* durch einen Rückgang des Granulationsgewebes und große Bindegewebsvorkommen gekennzeichnet (Seitz et al. 2007, Kessler et al. 2004). Auch der Umstand homogener Ergebnisse aller Untersuchungsgruppen in Bezug auf Größe, Verteilungsmuster und zeitliche Dynamik des Granulationsgewebes, lassen auf eine Entstehung im Rahmen der ubiquitär registrierten Fremdkörperreaktionen hindeuten. Ferner schien die Besiedelung der Leitschienen mit mesenchymalen Stammzellen keinen Einfluss auf die Entstehung von Fremdkörperreaktionen bzw. die Ausbildung von Granulationsgewebe zu haben.

Nekrosen kleinerer Ausdehnung fanden sich nach 2- und 12-wöchigem Verbleib *in vivo*. Diese waren histologisch vor allem als strukturloses, überwiegend zellfreies Gewebe zu erkennen, das sich besonders nach 12 Wochen erkennbar von seiner Umgebung abgrenzte. Demarkationsgrenzen, als Ausdruck spezifischer Umbauprozesse, wie in einer früheren Arbeit beobachtet, wurden nicht gesehen (Dissertation von Christina Ern). Dies könnte, wie in der Literatur beschrieben, mit der Bildung eines Exsudats im Inneren der Leitschienen erklärt werden, dessen histologisches Korrelat ein nekroseähnliches Erscheinungsbild widerspiegelt (Taylor und Gibbons 1983). Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Nekrosen und dem verwendeten Leitschienenmaterial, beispielsweise in Folge des Tutoplast-prozesses, erscheint aufgrund des Fehlens von ähnlichen Beobachtungen in der Literatur als unwahrscheinlich (Meyer et al. 2008, Kessler et al. 2004, Trentz et al. 2003, Kessler et al. 2001). Zur Sicherung des histologischen Befundes kann ein spezifischer Nekrosenachweis beispielsweise durch DNA-Fragmentierung mittels Polymerase Kettenreaktion erbracht werden (Stadelmann und Lassmann 2000).

In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde in allen untersuchten Gruppen neben dem bloßen Nachweis von Fettzellen auch ein ähnliches zeitliches und räumliches Verteilungsmuster des Fettgewebes dokumentiert (Seitz et al. 2007, Schieker et al. 2004). Während die Fettzellen nach zwei Wochen noch überwiegend singulär oder in kleineren Anhäufungen vorlagen, kam es in allen Gruppen nach 12 Wochen zu einer deutlichen Zunahme mit teils flächigen Fettgewebsinfiltraten. Da in einer Vorarbeit auf die osteogene Stimulation *in vitro* verzichtet wurde, führte die signifikante Zunahme der Fettzellen zu der Hypothese, die transplantierten mesenchymalen Stammzellen könnten sich *in vivo* entlang der adipogenen Zelllinie differenziert haben (Seitz et al. 2007). Der Umstand, dass in der vorliegenden Arbeit nach 12-wöchiger Implantationszeit tendenziell weniger Fettgewebe in den osteogen stimulierten Gruppen zu sehen war, könnte diese Behauptung stützen. Einen Widerspruch hingegen stellen die teils massiven Fettgewebsinfiltrate innerhalb der unbesiedelten Gruppe nach 12 Wochen dar. Da eine iatrogene Zellverschleppung ebenso wie eine *in vivo* Migration von Stammzellen im Rahmen der molekularbiologischen Auswertung aller unbesiedelten Leitschienen ausgeschlossen wurde (Dissertation von Florian Pohlig) könnten die Beobachtungen auch auf ein vermehrtes Einwachsen umgebenden Fettgewebes oder eine Fettzellvermehrung im

Rahmen der allgemeinen Gewebsumstrukturierung zurückzuführen sein. Obgleich Berichte über Fettgewebsinfiltrate auch in vergleichbaren Studien existieren, wird auf eine nähere Betrachtung zumeist verzichtet (Kuznetsov et al. 1997, Mizuno et al. 1997).

4.3. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die osteogene Stimulation und Beimpfung mit vaskulärem endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF) unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Gefäßversorgung und die Knochenneubildung besiedelter Konstrukte im ektopen Mausmodell hat.

Die Beimpfung mit einem angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktor *in vitro* erweist sich als unzureichender Stimulus für eine beschleunigte oder verstärkte Gefäßneubildung *in vivo* und erbringt keine Verbesserungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Die osteogene Stimulation humaner mesenchymaler Stammzellen mit Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure während statischer Kultivierung *in vitro* reicht nicht aus, um eine Knochenneubildung im ektopen Lager *in vivo* zu induzieren.

Die verwendeten Leitschienen ermöglichen eine gute Gewebsintegration.

In Zusammenschau mit der molekularbiologischen Auswertung (Dissertation von Florian Pohlig), die eine signifikante Abnahme der Zellzahlen nach 2 Wochen *in vivo* in allen Gruppen nachwies, scheint die osteogene Stimulation und Beimpfung mit VEGF unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf das Überleben der implantierten Zellen zu haben.

Vor allem Hypoxie und Nährstoffunterversorgung während der ersten Tage *in vivo* führen vermutlich zu einem breiten Zelluntergang und erschweren so eine *de novo* Synthese von Knochen durch osteogen stimulierte, mesenchymale Stammzellen.

Zusammenfassung

Zielsetzung und Fragestellung:

Das Tissue Engineering von Knochen gilt als vielversprechender alternativer Lösungsansatz zur Behandlung ausgedehnter Knochendefekte.

Ein großes Problem bisheriger Tissue Engineering Strategien stellt vor allem die fehlende Blutversorgung besiedelter Konstrukte nach Implantation *in vivo* dar. In der vorliegenden Arbeit wurden quadratische Leitschienen (3x3x3mm) mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) besiedelt und nach osteogener Stimulation und Beimpfung mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ektop in die Subkutis von Mäusen implantiert. Ziel der Arbeit war, mittels histologischer Untersuchungen zu prüfen, ob durch die osteogene Stimulation und Beimpfung mit VEGF eine *de novo* Synthese von Knochen induziert werden könne.

Material und Methoden:

Die Expansion der hMSCs (Fa. Poietics) erfolgte mit Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM). Die quadratischen Leitschienen (Tutobone, Fa. Tutogen; Kantenlänge 3mm) wurden bis auf die Kontrollgruppe (unbesiedelt) mit jeweils $1,6 \times 10^6$ Zellen besiedelt. Vier Untersuchungsgruppen wurden gebildet. Die besiedelte und die unbesiedelte Gruppe wurden in MSGGM kultiviert. Die beiden anderen Gruppen wurden zur osteogenen Stimulation für 2 Wochen mit DMEM high glucose (Dubeccos Modified Eagle Serum) unter Zugabe von FBS (Fetale bovine Serum), L-Glutamin, Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure 2-Phosphat kultiviert, wobei eine Gruppe kurz vor Implantation zusätzlich mit rekombinantem VEGF (Fa. Preprotech) beimpft wurde. Alle Gruppen wurden nach 2-wöchiger Kultur paravertebral subkutan in athyme Nacktmäuse (Fa. Harlan-Winkelmann) implantiert. Die histologische Auswertung wurde nach 2 und 12 Wochen *in vivo* vorgenommen.

Ergebnisse:

Die Neubildung von Knochengewebe wurde in keiner Gruppe und zu keinem Zeitpunkt gesehen. Die Beimpfung mit VEGF brachte keinen Vorteil hinsichtlich der Vaskularisierung im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

In allen Gruppen kam es nach 2 Wochen zu einem Einwachsen des umgebenden Gewebes. Hierbei kam es vor allem in peripheren Leitschienenanteilen zur Ausbil-

dung von Granulationsgewebe. Ferner wurden multinukleäre Riesenzellen, Fettzellen und eine gute periphere Kapillarisation beobachtet. Nach 12 Wochen war in allen Gruppen eine deutliche Vermehrung des Faser- und Bindegewebes, sowie eine Zunahme der Vaskularisation, der Fettzellen und der multinukleären Riesenzellen festzustellen. Flächige Fettzellvorkommen zeigten sich vor allem in der besiedelten und unbesiedelten Gruppe nach 12-wöchiger Implantation.

Schlussfolgerungen:

1. Die osteogene Stimulation und Beimpfung mit VEGF hat unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Gefäßversorgung und die Knochenneubildung *in vivo*.
2. Die Beimpfung mit einem angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktor erweist sich als unzureichender Stimulus für eine beschleunigte bzw. vermehrte Gefäßneubildung *in vivo* und erbringt im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine wesentlichen Unterschiede.
3. Die Zugabe osteogen wirksamer Supplemente während statischer Kultivierung reicht nicht aus, um eine Knochenneubildung im ektopen Lager *in vivo* zu induzieren.
4. Mit den verwendeten Leitschienen lässt sich eine gute Gewebsintegration erzielen.
5. In Zusammenschau mit der molekularbiologischen Auswertung (Dissertation F. Pohlig) scheint die osteogene Stimulation und Beimpfung mit VEGF unter den gewählten Bedingungen ferner keinen Einfluss auf das Überleben von transplantierten Zellen im ektopen Lager zu haben.

Literaturverzeichnis

1. Aggarwal S, Pittenger MF (2005); Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses; *Blood* 105(4):1815-1822
2. Anderson JM (2000); Multinucleated giant cells; *Curr Opin Hematol* 7(1):40-47
3. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008); Foreign body reaction to biomaterials; *Semin Immunol* 20(2):86-100
4. Anselme K (2000); Osteoblast adhesion on biomaterials; *Biomaterials* 21(7):667-681
5. Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srour S, Sturzl M, Horch RE, Kneser U (2007); Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts; *Tissue Eng* 13(7):1549-1560
6. Aubin JE (1998); Bone stem cells; *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82
7. Baas E, Kuiper JH, Yang Y, Wood MA, El Haj AJ (2010); In vitro bone growth responds to local mechanical strain in three-dimensional polymer scaffolds; *J Biomech* 43(4):733-739
8. Bagi CM, Miller SC (1989); Osteoclast features of cells that resorb demineralized and mineral-containing bone implants in rats; *Scanning Microsc* 3(3):963-970
9. Bahar H, Yaffe A, Boskey A, Binderman I (2010); Influence of bone-derived matrices on generation of bone in an ectopic rat model; *J Orthop Res* 28(5):664-670
10. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG (2003); Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications; *Tissue Eng* 9(3):549-554
11. Barbosa JN, Amaral IF, Aguas AP, Barbosa MA (2009); Evaluation of the effect of the degree of acetylation on the inflammatory response to 3D porous chitosan scaffolds; *J Biomed Mater Res A* 93(1):20-28
12. Bareille R, Lafage-Proust MH, Fauchoux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amedee J (2000); Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site; *Biomaterials* 21(13):1345-1352
13. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (1999); Growth factor regulation of fracture repair; *J Bone Miner Res* 14(11):1805-1815
14. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME (1986); Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations; *Calcif Tissue Int* 38(3):143-154

15. Bensaid W, Oudina K, Viateau V, Potier E, Bousson V, Blanchat C, Sedel L, Guillemin G, Petite H (2005); De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model; *Tissue Eng* 11(5-6):814-824
16. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA (1993); Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *Am J Med Genet* 45(2):163-178
17. Bernstein P, Bornhauser M, Gunther KP, Stiehler M (2009); Bone tissue engineering in clinical application: assessment of the current situation.; *Orthopade* 38(11):1029-1037
18. Bianco P, Robey PG (2001); Stem cells in tissue engineering; *Nature* 414(6859):118-121
19. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ (2008); Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays; *Cell Stem Cell* 2(4):313-319
20. Brantus JF, Meunier PJ (1998); Effects of intravenous etidronate and oral corticosteroids in fibrodysplasia ossificans progressiva; *Clin Orthop Relat Res*(346):117-120
21. Brodbeck WG, Anderson JM (2009); Giant cell formation and function; *Curr Opin Hematol* 16(1):53-57
22. Bruder SP, Fox BS (1999); Tissue engineering of bone. Cell based strategies; *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl):S68-83
23. Cabilly S, Gallily R (1981); Non-immunological recognition and killing of xenogeneic cells by macrophages. II. Mechanism of killing; *Immunology* 44(2):357-365
24. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM (2001); Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow; *Blood* 98(8):2396-2402
25. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R (2003); Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone; *Matrix Biol* 22(1):81-91
26. Caplan AI (1991); Mesenchymal stem cells; *J Orthop Res* 9(5):641-650
27. Caplan AI, Bruder SP (2001); Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century; *Trends Mol Med* 7(6):259-264
28. Chambers TJ, Evans M, Gardner TN, Turner-Smith A, Chow JW (1993); Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading; *Bone Miner* 20(2):167-178
29. Checa S, Prendergast PJ (2010); Effect of cell seeding and mechanical loading on vascularization and tissue formation inside a scaffold: a mechano-biological model using a lattice approach to simulate cell activity; *J Biomech* 43(5):961-968

30. Chen L, He Z, Chen B, Yang M, Zhao Y, Sun W, Xiao Z, Zhang J, Dai J (2010); Loading of VEGF to the heparin cross-linked demineralized bone matrix improves vascularization of the scaffold; *J Mater Sci Mater Med* 21(1):309-317
31. Chen RR, Silva EA, Yuen WW, Mooney DJ (2007); Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation; *Pharm Res* 24(2):258-264
32. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV (1994); Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone; *Endocrinology* 134(1):277-286
33. Choong PF, Martin TJ, Ng KW (1993); Effects of ascorbic acid, calcitriol, and retinoic acid on the differentiation of preosteoblasts; *J Orthop Res* 11(5):638-647
34. Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP (2008); Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells; *J Cell Physiol* 214(2):537-544
35. Cohnheim J (1867); Ueber Entzündung und Eiterung.; *Path Anat Physiol Klin Med* 40:1-79
36. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001); Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells; *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):7841-7845
37. Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG (1995); Bone tissue engineering; *Nat Med* 1(12):1322-1324
38. Davies N, Dobner S, Bezuidenhout D, Schmidt C, Beck M, Zisch AH, Zilla P (2008); The dosage dependence of VEGF stimulation on scaffold neovascularisation; *Biomaterials* 29(26):3531-3538
39. De Long WG, Jr., Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T (2007); Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis; *J Bone Joint Surg Am* 89(3):649-658
40. Diederichs S, Roker S, Marten D, Peterbauer A, Scheper T, van Griensven M, Kasper C (2009); Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z RP platform; *Biotechnol Prog* 25(6):1762-1771
41. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M (2007); Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system; *J Cell Mol Med* 11(1):21-38
42. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006); Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal

- cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 8(4):315-317
43. Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G, Keshet E (2002); Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy; *Embo J* 21(8):1939-1947
44. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M (2008); Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective; *Tissue Eng Part C Methods* 14(1):79-88
45. Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T (2003); Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke; *J Cereb Blood Flow Metab* 23(7):780-785
46. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R (1995); Toward a molecular understanding of skeletal development; *Cell* 80(3):371-378
47. Ern C (2008): Experimentelle Untersuchung zum Nachweis von Knochenzellwachstum in besiedelten Konstrukten im Mausmodell; Dissertation, Universität München, Medizinische Fakultät
48. Eward WC, Kontogeorgakos V, Levin LS, Brigman BE (2010); Free vascularized fibular graft reconstruction of large skeletal defects after tumor resection; *Clin Orthop Relat Res* 468(2):590-598
49. Fang L, Weng W, Shen G, Han G, Santos JD, Du P (2003); Bone tissue engineering scaffolds; *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 20(1):148-152
50. Felka T, Schafer R, De Zwart P, Aicher WK (2010); Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells; *Cytotherapy* 12(2):143-153
51. Ferrara N (2002a); Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications; *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16):10-14
52. Ferrara N (2002b); VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors; *Nat Rev Cancer* 2(10):795-803
53. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003); The biology of VEGF and its receptors; *Nat Med* 9(6):669-676
54. Fibbe WE, Noort WA (2003); Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation; *Ann N Y Acad Sci* 996:235-244

55. Fiedler J, Brill C, Blum WF, Brenner RE (2006); IGF-I and IGF-II stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells; *Biochem Biophys Res Commun* 345(3):1177-1183
56. Finkemeier C (2002); Bone-grafting and bone-graft substitutes; *J Bone Joint Surg Am* 84-A(3):454-464
57. Forni M (2007); Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science; *Vet Res Commun* 31 Suppl 1:43-47
58. Friedenstein AJ (1961); Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium; *Acta Anat (Basel)* 45:31-59
59. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970); The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells; *Cell Tissue Kinet* 3(4):393-403
60. Glowacki J, Cox KA (1986); Osteoclastic features of cells that resorb bone implants in rats; *Calcif Tissue Int* 39(2):97-103
61. Godbey WT, Hindy SB, Sherman ME, Atala A (2004); A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds; *Biomaterials* 25(14):2799-2805
62. Gosain A, Chang N, Mathes S, Hunt TK, Vasconez L (1990); A study of the relationship between blood flow and bacterial inoculation in musculocutaneous and fasciocutaneous flaps; *Plast Reconstr Surg* 86(6):1152-1163
63. Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PH, Lennon DP, Caplan AI, Vunjak-Novakovic G (2008); Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone; *Tissue Eng Part A* 14(11):1809-1820
64. Grellier M, Granja PL, Fricain JC, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, Bourget C, Amedee J, Barbosa MA (2009); The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect; *Biomaterials* 30(19):3271-3278
65. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylven C, Le Blanc K (2004); Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium; *J Thorac Cardiovasc Surg* 127(5):1293-1300
66. Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W (1996); Osteointegration of solvent preserved bone transplants in an animal model; *Osteologie* 5(1):4-12

67. Handschel J, Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich R, Ommerborn M, Kubler N, Brinkmann M, Kogler G, Meyer U (2010); Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells in vivo; *Tissue Eng Part A* 16(8):2475-2483
68. Hankemeier S, Bastian L, Gosling T, Krettek C (2004); Principles of callus distraction; *Unfallchirurg* 107(10):945-958; quiz 959
69. Harwood PJ, Giannoudis PV (2005); Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects; *Expert Opin Drug Saf* 4(1):75-89
70. Hentz VR, Chang J (2001); Tissue engineering for reconstruction of the thumb; *N Engl J Med* 344(20):1547-1548
71. Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, Brenner RE, Wirth T (2009); TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- κ B signaling pathway; *Bone* 45(2):367-376
72. Hoffmann A, Gross G (2001); BMP signaling pathways in cartilage and bone formation; *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 11(1-3):23-46
73. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG (2005); Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone; *J Biomed Mater Res A* 72(3):326-334
74. Holy CE, Fialkov JA, Davies JE, Shoichet MS (2003); Use of a biomimetic strategy to engineer bone; *J Biomed Mater Res A* 65(4):447-453
75. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2000); Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period; *J Biomed Mater Res* 51(3):376-382
76. Horvath G (2008): Nachweis von Knochenwachstum in besiedelten Konstrukten in vivo – Molekularbiologische Untersuchungen; Dissertation, Universität München, Medizinische Fakultät
77. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005); Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 7(5):393-395
78. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ (2005); Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration; *J Bone Miner Res* 20(5):848-857
79. Ichikawa J (2010); Serum-free medium with osteogenic supplements induces adipogenesis in rat bone marrow stromal cells; *Cell Biol Int* 34(6):615-620

80. Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG (1997); Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery; *J Biomed Mater Res* 36(1):1-8
81. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Tsuchiya T (2008); FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling; *Cytotechnology* 56(1):1-7
82. Jager M, Fischer J, Dohrn W, Li X, Ayers DC, Czibere A, Prall WC, Lensing-Hohn S, Krauspe R (2008); Dexamethasone modulates BMP-2 effects on mesenchymal stem cells in vitro; *J Orthop Res* 26(11):1440-1448
83. Jager M, Sager M, Lensing-Hohn S, Krauspe R (2005); The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur; *Biomed Tech (Berl)* 50(5):137-142
84. Jäger M, Wild A, Krauspe R (2002); Pluripotente mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (I): Grundlagen; *Osteologie* 11(2):55-66
85. Jain RK (2002); Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor; *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16):3-9
86. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997); Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro; *J Cell Biochem* 64(2):295-312
87. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF (2000); Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase; *J Biol Chem* 275(13):9645-9652
88. Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ (2005); Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential; *Faseb J* 19(6):665-667
89. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH (2006); VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects; *J Bone Miner Res* 21(5):735-744
90. Karageorgiou V, Kaplan D (2005); Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis; *Biomaterials* 26(27):5474-5491
91. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T (1994); Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage; *J Cell Biol* 127(6 Pt 1):1755-1766

92. Kelly JD, Schneider GB (2005); Morphological and histochemical comparison of the cells elicited by ectopic bone implants and tibial osteoclasts; *American Journal of Anatomy* 192(1):45-54
93. Kessler S, Koepp HE, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Claes L, Puhl W, Gunther KP (2004); Bone morphogenetic protein 2 accelerates osteointegration and remodelling of solvent-dehydrated bone substitutes; *Arch Orthop Trauma Surg* 124(6):410-414
94. Kessler S, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Puhl W, Claes L, Gunther KP (2001); Solvent dehydrated bone transplants to bridge segmental bone defects: histomorphological and biomechanical investigations in an animal model; *Arch Orthop Trauma Surg* 121(8):472-475
95. Khouri RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, Reddi AH (1996); Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues; *Plast Reconstr Surg* 98(1):103-109
96. Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG (2005); Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells; *Stem Cells Dev* 14(6):621-631
97. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004); A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential; *J Exp Med* 200(2):123-135
98. Komlev VS, Mastrogiacomo M, Pereira RC, Peyrin F, Rustichelli F, Cancedda R (2010); Biodegradation of porous calcium phosphate scaffolds in an ectopic bone formation model studied by X-ray computed microtomograph; *Eur Cell Mater* 19:136-146
99. Korhonen M (2007); Culture of human mesenchymal stem cells in serum-free conditions: no breakthroughs yet; *Eur J Haematol* 78(2):167-168
100. Krieg AH, Hefti F (2007); Reconstruction with non-vascularised fibular grafts after resection of bone tumours; *J Bone Joint Surg Br* 89(2):215-221
101. Kruyt M, De Bruijn J, Rouwkema J, Van Blitterswijk C, Oner C, Verbout A, Dhert W (2008); Analysis of the dynamics of bone formation, effect of cell seeding density, and potential of allogeneic cells in cell-based bone tissue engineering in goats; *Tissue Eng Part A* 14(6):1081-1088
102. Kruyt MC, de Bruijn JD, Wilson CE, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJ (2003); Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats; *Tissue Eng* 9(2):327-336

103. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2007); Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats; *Biomaterials* 28(10):1798-1805
104. Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2004); Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat; *J Orthop Res* 22(3):544-551
105. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG (1997); Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo; *J Bone Miner Res* 12(9):1335-1347
106. Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG (2000); Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation; *Transplantation* 70(12):1780-1787
107. Leukers B, Gulkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M, Seitz H (2005); Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing; *J Mater Sci Mater Med* 16(12):1121-1124
108. Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH (2009); Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect; *J Orthop Res* 27(1):8-14
109. Liebschner MA (2004); Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone; *Biomaterials* 25(9):1697-1714
110. Lode A, Bernhardt A, Gelinsky M (2008); Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation; *J Tissue Eng Regen Med* 2(7):400-407
111. Maegawa N, Kawamura K, Hirose M, Yajima H, Takakura Y, Ohgushi H (2007); Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2); *J Tissue Eng Regen Med* 1(4):306-313
112. Mathes SJ, Alpert BS, Chang N (1982); Use of the muscle flap in chronic osteomyelitis: experimental and clinical correlation; *Plast Reconstr Surg* 69(5):815-829
113. Matsushima A, Kotobuki N, Tadokoro M, Kawate K, Yajima H, Takakura Y, Ohgushi H (2009); In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate; *Artif Organs* 33(6):474-481
114. Mauney JR, Jaquiere C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL (2005); In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering; *Biomaterials* 26(16):3173-3185

115. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE (2002); Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts; *Bone* 30(3):472-477
116. McBride C, Gaupp D, Phinney DG (2003); Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR; *Cytotherapy* 5(1):7-18
117. Merten HA, Wiltfang J, Hönig JF, Funke M, Luhr HG (2000); Intra-individual comparison of alpha-and beta-TCP ceramics in an animal experiment; *Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie: MKG* 4(Suppl 2):509-515
118. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, Bron D, Lagneaux L (2006); Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium; *Eur J Haematol* 76(4):309-316
119. Meyer S, Floerkemeier T, Windhagen H (2008); Histological osseointegration of Tutobone: first results in human; *Arch Orthop Trauma Surg* 128(6):539-544
120. Mikos AG, Sarakinos G, Lyman MD, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R (1993); Prevascularization of porous biodegradable polymers; *Biotechnol Bioeng* 42(6):716-723
121. Minuth WW, Sittinger M, Kloth S (1998); Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications; *Cell Tissue Res* 291(1):1-11
122. Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y (1997); Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo; *Bone* 20(2):101-107
123. Monchau F, Lefevre A, Descamps M, Belquin-myrdycz A, Laffargue P, Hildebrand HF (2002); In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate; *Biomol Eng* 19(2-6):143-152
124. Montzka K, Fuhrmann T, Woltje M, Brook GA (2010); Expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: serum-reduced medium is better than conventional medium; *Cytotherapy* 12(5):587-592
125. Mooney DJ, Mikos AG (1999); Growing new organs; *Sci Am* 280(4):60-65
126. Morgan JR, Yarmush ML. Tissue engineering methods and protocols; Humana Pr Inc, 1999.
127. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000); Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model; *J Cell Sci* 113 (Pt 7):1161-1166

128. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004); Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering; *J Bone Joint Surg Am* 86-A(7):1541-1558
129. Nasser BA, Ogawa K, Vacanti JP (2001); Tissue engineering: an evolving 21st-century science to provide biologic replacement for reconstruction and transplantation; *Surgery* 130(5):781-784
130. Neuss S, Stainforth R, Salber J, Schenck P, Bovi M, Knuchel R, Perez-Bouza A (2008); Long-term survival and bipotent terminal differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in combination with a commercially available three-dimensional collagen scaffold; *Cell Transplant* 17(8):977-986
131. Nomi M, Atala A, Coppi PD, Soker S (2002); Principals of neovascularization for tissue engineering; *Mol Aspects Med* 23(6):463-483
132. Nunamaker DM (1998); Experimental models of fracture repair; *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl):S56-65
133. Panetta NJ, Gupta DM, Longaker MT (2009); Bone tissue engineering scaffolds of today and tomorrow; *J Craniofac Surg* 20(5):1531-1532
134. Parikh SN (2002); Bone graft substitutes: past, present, future; *J Postgrad Med* 48(2):142-148
135. Pelleitier M, Montplaisir S (1975); The nude mouse: a model of deficient T-cell function; *Methods Achiev Exp Pathol* 7:149-166
136. Pereira RC, Delany AM, Canalis E (2002); Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression; *Bone* 30(5):685-691
137. Pereira RM, Delany AM, Canalis E (2001); Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture; *Bone* 28(5):484-490
138. Peter SJ, Liang CR, Kim DJ, Widmer MS, Mikos AG (1998); Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid; *J Cell Biochem* 71(1):55-62
139. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G (2000); Tissue-engineered bone regeneration; *Nat Biotechnol* 18(9):959-963
140. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999); Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; *Science* 284(5411):143-147

141. Potier E, Ferreira E, Meunier A, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H (2007); Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death; *Tissue Eng* 13(6):1325-1331
142. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S (2006); Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells; *J Anat* 208(1):3-12
143. Regauer M, Jürgens I, Kotsianos D, Stützle H, Mutschler W, Schieker M (2005); New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep; *Zentralblatt für Chirurgie* 130(4):338
144. Reich KM, Gay CV, Frangos JA (1990); Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production; *J Cell Physiol* 143(1):100-104
145. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006); Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering; *Biomaterials* 27(18):3413-3431
146. Rodriguez A, Macewan SR, Meyerson H, Kirk JT, Anderson JM (2009); The foreign body reaction in T-cell-deficient mice; *J Biomed Mater Res A* 90(1):106-113
147. Roshan-Ghias A, Terrier A, Bourban PE, Pioletti DP (2010); In vivo cyclic loading as a potent stimulatory signal for bone formation inside tissue engineering scaffold; *Eur Cell Mater* 19:41-49
148. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA (2008); Vascularization in tissue engineering; *Trends Biotechnol* 26(8):434-441
149. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D (2005); Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities; *Lab Invest* 85(8):962-971
150. Santos MI, Reis RL (2010); Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges; *Macromol Biosci* 10(1):12-27
151. Schantz JT, Huttmacher DW, Chim H, Ng KW, Lim TC, Teoh SH (2002); Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology; *Cell Transplant* 11(2):125-138
152. Schieker M, Mutschler W (2006); Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods; *Unfallchirurg* 109(9):715-732
153. Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Bocker W, Guelkan H, Neth P, Jochum M, Mutschler W (2007); Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence; *J Anat* 210(5):592-599

154. Schieker M, Seitz S, Gulkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, Milz S, Mutschler W (2004); Tissue engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model; *Orthopade* 33(12):1354-1360
155. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M (2004); Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts; *Biomaterials* 25(18):3963-3972
156. Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC (2009); Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications; *Unfallchirurg* 112(9):785-794
157. Schmitz JP, Hollinger JO (1986); The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions; *Clinical orthopaedics and related research* 205:299
158. Schonmeyr BH, Soares M, Avraham T, Clavin NW, Gewalli F, Mehrara BJ (2010); VEGF inhibits BMP2 expression in Rat Mesenchymal Stem Cells; *Tissue Eng Part A* 16(2):653-662
159. Seitz S, Ern K, Lamper G, Docheva D, Drosse I, Milz S, Mutschler W, Schieker M (2007); Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation; *Tissue Eng* 13(5):1059-1067
160. Shalhoub V, Conlon D, Stein GS, Lian JB, Tassinari M, Quinn C, Partridge N (2004); Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes; *Journal of cellular biochemistry* 50(4):425-440
161. Siddappa R, Fernandes H, Liu J, van Blitterswijk C, de Boer J (2007); The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering; *Curr Stem Cell Res Ther* 2(3):209-220
162. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG (2001); Biomaterials and bone mechanotransduction; *Biomaterials* 22(19):2581-2593
163. Simmons PS, Miles JM, Gerich JE, Haymond MW (1984); Increased proteolysis. An effect of increases in plasma cortisol within the physiologic range; *J Clin Invest* 73(2):412-420
164. Skalak R, Fox C (1988); NSF workshop, UCLA symposia on molecular and cellular biology; New York, Alan R Liss.
165. Song IH, Caplan AI, Dennis JE (2009); In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo; *J Orthop Res* 27(7):916-921
166. Stadelmann C, Lassmann H (2000); Detection of apoptosis in tissue sections; *Cell Tissue Res* 301(1):19-31

167. Stangenberg L, Schaefer DJ, Buettner O, Ohnolz J, Mobest D, Horch RE, Stark GB, Kneser U (2005); Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; *Tissue Eng* 11(5-6):855-864
168. Steffens L, Wenger A, Stark GB, Finkenzeller G (2009); In vivo engineering of a human vasculature for bone tissue engineering applications; *J Cell Mol Med* 13(9B):3380-3386
169. Stengele M (2004): Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellkultursystem; Dissertation, Universität München, Medizinische Fakultät
170. Stiehler M, Bunger C, Baatrup A, Lind M, Kassem M, Mygind T (2009); Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells; *J Biomed Mater Res A* 89(1):96-107
171. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR (2004); Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use; *Exp Hematol* 32(12):1212-1225
172. Sun L, Berndt CC, Khor KA, Cheang HN, Gross KA (2002); Surface characteristics and dissolution behavior of plasma-sprayed hydroxyapatite coating; *J Biomed Mater Res* 62(2):228-236
173. Taylor SR, Gibbons DF (1983); Effect of surface texture on the soft tissue response to polymer implants; *J Biomed Mater Res* 17(2):205-227
174. Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL (2003); Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro; *Biomaterials* 24(20):3417-3426
175. Tuan RS, Boland G, Tuli R (2003); Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering; *Arthritis Res Ther* 5(1):32-45
176. Urist MR (1965); Bone: formation by autoinduction; *Science* 150(698):893-899
177. Vaananen HK, Horton M (1995); The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure; *J Cell Sci* 108 (Pt 8):2729-2732
178. Vacanti CA, Bonassar LJ (1999); An overview of tissue engineered bone; *Clinical orthopaedics and related research* 367:S375
179. Vacanti CA, Vacanti JP (2000); The science of tissue engineering; *Orthop Clin North Am* 31(3):351-356

180. van Gaalen SM, Dhert WJA, Kruyt MC, Yuan H, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2009); Goat Bone Tissue Engineering: Comparing an Intramuscular with a Posterolateral Lumbar Spine Location; *Tissue Engineering Part A* 16(2):685-693
181. Volkmer E, Drosse I, Otto S, Stangelmayer A, Stengele M, Kallukalam BC, Mutschler W, Schieker M (2008); Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone; *Tissue Eng Part A* 14(8):1331-1340
182. Volkmer E, Kallukalam BC, Maertz J, Otto S, Drosse I, Polzer H, Bocker W, Stengele M, Docheva D, Mutschler W, Schieker M (2010); Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation; *Tissue Eng Part A* 16(1):153-164
183. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN (2001); High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis; *Rheumatology (Oxford)* 40(1):74-83
184. Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K (1997); Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells; *Endocrinology* 138(7):2953-2962
185. Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T (2003); Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials; *Tissue Eng* 9(6):1205-1214
186. Wu YC, Lee TM, Chiu KH, Shaw SY, Yang CY (2009); A comparative study of the physical and mechanical properties of three natural corals based on the criteria for bone-tissue engineering scaffolds; *J Mater Sci Mater Med* 20(6):1273-1280
187. Xia Z, Ye H, Choong C, Ferguson DJ, Platt N, Cui Z, Triffitt JT (2004); Macrophagic response to human mesenchymal stem cell and poly(epsilon-caprolactone) implantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice; *J Biomed Mater Res A* 71(3):538-548
188. Xia ZD, Zhu TB, Du JY, Zheng QX, Wang L, Li SP, Chang CY, Fang SY (1994); Macrophages in degradation of collagen/hydroxylapatite(CHA), beta-tricalcium phosphate ceramics (TCP) artificial bone graft. An in vivo study; *Chin Med J (Engl)* 107(11):845-849
189. Yanagida H, Okada M, Masuda M, Ueki M, Narama I, Kitao S, Koyama Y, Furuzono T, Takakuda K (2009); Cell adhesion and tissue response to hydroxyapatite nanocrystal-coated poly(L-lactic acid) fabric; *J Biosci Bioeng* 108(3):235-243
190. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK (2002); The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques; *Tissue Eng* 8(1):1-11

191. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC, Jr. (2001); Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors; *Anat Rec* 264(1):51-62
192. Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT (2004); Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization; *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31):11203-11208
193. Zambuzzi WF, Oliveira RC, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM (2006); Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft; *Braz Dent J* 17(4):274-278
194. Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldborg RE, Schwarz EM (2008); A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing; *Clin Orthop Relat Res* 466(8):1777-1787
195. Zheng Q, Du J, Xia Z, Zeng H, Li S, Yan Y, Chen F (1998); Biodegradation of tricalcium phosphate ceramics by osteoclasts; *J Tongji Med Univ* 18(4):257-261
196. Zhu H, Schulz J, Schliephake H (2010); Human bone marrow stroma stem cell distribution in calcium carbonate scaffolds using two different seeding methods; *Clin Oral Implants Res* 21(2):182-188
197. Zilkens C, Logters T, Bittersohl B, Krauspe R, Lensing-Hohn S, Jager M (2010); Spinning around or stagnation - what do osteoblasts and chondroblasts really like? *Eur J Med Res* 15(1):35-43
198. Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA (2003); Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors; *Cardiovasc Pathol* 12(6):295-310

Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone Morphogenetic Protein
D-MEM	Dubecco`s Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
IGF I/II	Insulin-like Growth Factor I und II
MMA	Methylmethacrylat
MSCGM	Mesenchymal Stem Cells Growth Medium
OP-1	Osteogenic Protein 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Anhang

Materialien, Substanzen und Geräte

D-MEM	Gibco / Invitrogen, USA
MSCGM	Cambrex, USA
D-PBS	Gibco / Invitrogen, USA
FBS	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco / Invitrogen, USA
Sodiumpyruvat	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd 4% gepuffert	Microcos GmbH, Deutschland
Methanol pro analysi	Merck, Deutschland
70 % Ethanol	Klinikapotheke
Trypanblau	Gibco / Invitrogen, USA
Trypsin/EDTA (10X)	Gibco / Invitrogen, USA
Tissue Freezing Medium	Jung, Deutschland
Äthyldiamintetraacetat	Merck, Deutschland
Ethanol pro analysi	Merck, Deutschland
Succrose	Merck, Deutschland
Wasserstoffperoxyd	Merck, Deutschland
Xylol	Merck, Deutschland
Mayer's Hämalaun	Merck, Deutschland
Aceton	Merck, Deutschland
Benzoylperoxyd	Merck, Deutschland
Methylmetacrylat	Merck, Deutschland
Plastoid N	Fluka, Schweiz
Toluidinblau	Sigma, Deutschland
Basisches Fuchsin	Chroma, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	Braun, Deutschland
Eisenhämatoxylin	Sigma, Deutschland
Ponceau de Xylidine	Merck, Deutschland
Eisessig	Merck, Deutschland
Phosphorwolframsäure	Merck, Deutschland

OrangeG	Merck, Deutschland
Lichtgrün	Merck, Deutschland
Eosin	Merck, Deutschland

Tab 1. Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers

Autoklav, Zirbus LTA400	Apparate und Maschinenbau GmbH, Deutschland
Bildanalysesystem, KS 400 Version 3.0	Zeiss, Deutschland
Brutschrank IG 150	Jouan, Frankreich
Digitalkamera	Zeiss, Deutschland
Laborwaage Typ 770	Kern, Deutschland
Mikrobiologische Werkbank	Biohit Antares, Deutschland
Mikroskop Axiovert S 100	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Deutschland
Pipettierhilfe Pipettus akku	Hirschmann, Deutschland
Schüttler Typ VM4	CAT, Deutschland
Zentrifuge CT 422	Jouan, Frankreich
Neubauer-Zählkammer	Brand, Deutschland
Schlauchpumpe IPC 8	Ismatec, Deutschland
Gradient-Container	Minucells, Deutschland
Schlauch-Kit	Minucells, Deutschland
Schlauchklemme	Novodirect, Deutschland
Schraubkappen	Minucells, Deutschland
Sterilfilter	Nalgene, USA
Exsikator	Schott, Deutschland
Polycut	Reichert-Jung, Deutschland
Innenlochsäge SP 1600	Leica, Deutschland
Kryostat Vacutome HM 200 OM	Microm, Deutschland
Datenverarbeitungsprogramm Graph Pad Prism	Graph Pad Software, USA

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Geräte mit Typenbezeichnung und Herstellerangabe

Kulturflasche T-75	Nunc, USA
Multischale 48-Well	Nunc, USA
Serologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Deutschland
Pasteurpipetten	Wagner und Kunz, Deutschland
Superfrost®-Glasobjektträger	Menzel-Gläser, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen D10, D200, D1000	Gilson, USA
Eindeckmedium DPX	Sigma-Aldrich, USA
Reagenzröhren 50ml, 15ml	Sarstedt, Deutschland
Kryostatklingen R35	Feather, Japan
Scheren klein, groß	Aeskulap, Deutschland
Pinzetten anatomische, chirurgische	Aeskulap, Deutschland
Nadelhalter	Aeskulap, Deutschland
Vicryl 3/0 SH	Ethicon Nahtmaterial, Deutschland
Sterican Microlance 0,55*25 Nr.17	Braun, Deutschland
Omnifix 1ml Spritzen	Braun, Deutschland
QuadriPerm®-Schallen	Greiner BioOne, Deutschland
Leukosilk	BSN medical GmbH, Deutschland

Tab. 3 Übersicht über verwendete Materialien mit Angabe des Herstellers

Tramundin®100 Injektionslösung	Mundipharma, Deutschland
Domitor (1mg/ml)	Orion Corporation, Finland
Dormicum (5mg/ml)	Roche, Schweiz
Naloxon Inresa 0,4mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland
Antisedan 5mg/ml	Pfizer, Deutschland
Anexate 0,5mg/5ml	Roche, Schweiz
Fentanyl 0,5mg/5ml	Jansen GmbH, Deutschland

Tab. 4 Übersicht über verwendete Pharmaka mit Angabe des Herstellers

Protokoll 1: Passagieren von Zellen

Medium entfernen, Zellen mit 3ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) waschen;

Zugabe von 2ml Trypsin/EDTA;

5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden ablösen;

Kontrolle unter dem Mikroskop, bei ungenügender Ablösung erneute Inkubation für weitere 3 Minuten; Eine Inkubationszeit von 15 Minuten wurde nicht überschritten.

Zugabe von 4 ml Kulturmedium zur Neutralisation der Trypsinlösung;

Zentrifugation der Zellsuspension (600g für 5min) und Absaugen des Überstandes zur Entfernung verbliebenen Trypsins.

Resuspension in Kulturmedium und Zellzahlbestimmung

Protokoll 2: Histologische Färbungen

Toluidinblau – Färbung

- Spülen mit aqua destillata
- 30 Minuten in Toluidinblau 1%; Ansatz: 1g Toluidinblau O, 100ml aqua destilata mit 0,1% NaOH; Einstellug auf pH 4,5
- Spülen mit aqua destillata
- Spülen mit 50% Ethanol
- Je 2 Minuten Einstellen in 70%, 80%, 96% Ethanol
- 5 Minuten Einstellen und anschließendes Spülen in 100% Ethanol
- Einstellen je 5 Minuten in Xylol I, II, III
- Ausspülen der überschüssigen Färbelösung in aqua destillata
- Absaugen des Wasserüberstandes mit Filterpapier und Eindecken mit DPX

Masson - Goldner – Trichromfärbung

- Spülen mit aqua destillata
- 15 Minuten in Eisenhämatoxylin;
- 10 Minuten fließend wässern

- 45 Minuten in Ponceau de Xylidine Lösung; Ansatz: 2,5g Ponceau de Xylidine, 1,25g Säurefuchsin, 0,5ml Eisessig, 150ml aqua destillata
- Je 5 Sekunden Einstellen in 1% Essigsäure und aqua destillata
- 7 Minuten in Phosphorwolfram-OrangeG; Ansatz: 2,5g Phosphorwolfram, 1,25g OrangeG, 150ml aqua destillata
- 5 Sekunden Einstellen in 1% Essigsäure und aqua destillata
- 15 Minuten in Lichtgrün Lösung; Ansatz: 0,5g Lichtgrün, 0,5ml Eisessig, 250ml aqua destillata
- Spülen mit 50% Ethanol
- Je 2 Minuten Einstellen in 70%, 80%, 96% Ethanol
- 5 Minuten Einstellen und anschließendes Spülen in 100% Ethanol
- Einstellen je 5 Minuten in Xylol I, II, III
- Ausspülen der überschüssigen Färbelösung in aqua destillata
- Absaugen des Wasserüberstandes mit Filterpapier und Eindecken mit DPX

Hämatoxylin – Eosin – Färbung für Kryoschnitte

- Je 5 Minuten Einstellen in 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol
- Zweimal 5 Minuten Einstellen in Xylol
- Je 5 Minuten Einstellen in 100%, 96%, 90%, 70% Ethanol
- 5 Minuten Einstellen in aqua destillata
- 5 Minuten in Mayer`s Hämalaun; muss vor Gebrauch filtriert werden.
- 15 Minuten fließend wässern
- 5 Minuten in 0,1% Eosin; Stammlösung (1%) muss 1:10 mit aqua destillata verdünnt werden, anschließend vor Gebrauch filtrieren;
- Spülen mit aqua destillata
- Kurz mit 70% und 80% Ethanol spülen.
- Je 5 Minuten Einstellen in 90% und 96% Ethanol.
- Zweimal 5 Minuten in 100% Ethanol
- Zweimal 5 Minuten in Xylol
- Ausspülen der überschüssigen Färbelösung in aqua destillata
- Absaugen des Wasserüberstandes mit Filterpapier und Eindecken mit DPX

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin (ExperiMed) der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München.

Für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in den Laboratorien der Chirurgischen Klinik Innenstadt durchführen zu dürfen danke ich Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler sehr herzlich.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Schiecker sowohl für die Überlassung des Themas als auch für seinen stetigen und kompetenten Einsatz der maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Zu großem Dank bin ich ferner Herrn PD Dr. Sebastian Seitz für die hervorragende Betreuung und die wissenschaftliche Ausbildung verpflichtet. Ebenso gilt Frau PD Dr. Denitsa Docheva für die kompetente und tatkräftige Unterstützung größter Dank.

Zu besonderem Dank bin ich Frau Brigitte Hackl und Frau Claudia Harbauer verpflichtet. Beide standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hatten stets zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Herrn Dr. Michael Stengele danke ich für die geduldige und fachkundige Hilfe in allen EDV-Fragen. Außerdem danke ich Frau Gisela Lippelt und Frau Elisabeth Meyer für die versierte Unterstützung in der Anatomie.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der ExperiMed und der Anatomischen Anstalt, die ungezählte Hilfestellungen beim Erlernen und der Durchführung labortechnischer Arbeiten geleistet haben.

In besonderem Maße möchte ich schließlich meiner Freundin Sandra danken die mich mit ihrem Verständnis stets aufzubauen wusste und mir in allen Belangen den Rücken gestärkt hat.

Widmen möchte ich die vorliegende Arbeit meinen lieben Eltern - meiner verstorbenen Mutter Friederike und meinem Vater Dr. Walter Lenze - ohne deren Unterstützung weder das Studium der Humanmedizin noch die Vollendung einer wissenschaftlichen Arbeit denkbar gewesen wäre.