

**Aus der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Matis**

und

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt,
Klinikum der Universität München,
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Mutschler
Angefertigt unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. M. Schieker**

**Zellbesiedelte Gewebekonstrukte für den Knochenersatz –
Untersuchung der Knochenregeneration in einem neu etablierten
orthotopen Defektmodell**

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

vorgelegt von

Inga Kristin Drosse
aus Kassel
2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Matis

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Wanke
Priv.-Doz. Dr. André
Priv.-Doz. Dr. Maierl
Univ.-Prof. Dr. Nuss

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

1. Einleitung	1
1.1. Klinische Problematik: Knochendefekte	1
1.1.1. Frakturheilung	1
1.1.1.1. Primäre Knochenheilung.....	1
1.1.1.2. Sekundäre Knochenheilung.....	1
1.1.1.3. Ausbleibende Knochenheilung	2
1.1.2. Knochenneubildung und Regenerationspotential.....	3
1.1.3. Therapieoptionen	4
1.1.4. Regenerative Therapiestrategien	8
1.1.5. Tiermodelle für die präklinische Testung.....	11
1.1.5.1. Fixationssysteme für standardisierte Forschungsmodelle	15
1.1.6. Relevanz für die Veterinärmedizin	16
1.2. Aufgabenstellung	17
1.2.1. Trägermaterialien für den Knochenersatz.....	18
1.2.2. Zellen für den funktionellen Gewebeersatz.....	19
1.2.3. Fixationssysteme	19
1.2.4. Orthotopes Defektmodell	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Trägermaterialien	20
2.1.1. Herstellungsverfahren.....	20
2.1.2. Strukturgenerierung	21
2.1.2.1. Erstellung des Datensatzes	21
2.1.2.2. Granulatherstellung und 3-D-Drucken	21
2.1.2.3. Charakterisierung	22
2.2. Verwendete Zellen	24
2.2.1. <i>In-vitro</i> -Kulturbedingungen.....	24
2.2.2. Besiedlungsstrategie.....	24
2.2.3. Überprüfung der Besiedlungseffizienz	25
2.2.4. Zellvitalitätstest	25
2.2.5. Überprüfung der Zellbesiedelung.....	25
2.2.6. Osteogene Differenzierung.....	26
2.2.6.1. RNA-Isolierung	26

2.2.6.2. cDNA-Synthese	26
2.2.6.3. Quantitative PCR-Analyse	27
2.3. Biologische Implantate	28
2.4. Fixationssysteme	29
2.4.1. Auswahl geeigneter Fixationssysteme	29
2.4.2. Entwicklung eines Fixateur externe	30
2.4.3. Mechanische Testung ausgewählter Systeme	31
2.5. <i>In-vivo</i> -Testung	32
2.5.1. Versuchstiere	32
2.5.2. Gruppeneinteilung	33
2.5.3. Operatives Vorgehen	35
2.6. Auswertemethoden der <i>In-vivo</i> -Versuche	40
2.6.1. Röntgen	40
2.6.2. μ CT <i>in vivo</i>	40
2.6.3. μ CT <i>ex vivo</i>	40
2.6.4. Histologie	41
2.6.4.1. Fixierung	42
2.6.4.2. Schneidetechnik	42
2.6.4.3. Färbung	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Herstellung dreidimensionaler Trägersysteme	43
3.1.1. Feinstruktur und Stabilität	43
3.1.2. Biokompatibilität <i>in vitro</i>	44
3.2. Zelltransplantation für den Knochenersatz	46
3.2.1. Besiedlungsmuster	46
3.2.2. Differenzierungsverhalten	47
3.3. Eignung verschiedener Fixationssysteme	48
3.3.1. Mechanische Stabilität	48
3.3.2. Intraoperative Anwendbarkeit	49
3.4. <i>In-vivo</i> -Anwendung im Rattenmodell	50
3.4.1. Implantation und postoperative Beobachtungszeit	50
3.4.2. Röntgenkontrollen	50
3.4.3. μ CT-Untersuchungen <i>in vivo</i>	54
3.4.4. μ CT-Untersuchungen <i>ex vivo</i>	54

3.4.5. Histologische Auswertung.....	60
4. Diskussion.....	64
4.1. Präklinische Tiermodelle	65
4.2. Materialien für den Knochenersatz.....	70
4.3. Innovative Strategien für den Knochenersatz.....	74
4.4. Ausblick.....	86
5. Zusammenfassung.....	87
6. Summary	90
7. Literaturverzeichnis.....	93
8. Anhang	112
9. Abkürzungsverzeichnis	121
10. Danksagung	122

1. Einleitung

1.1. Klinische Problematik: Knochendefekte

Ausgedehnte Knochendefekte stellen nach wie vor eine große Herausforderung für die rekonstruktive Chirurgie dar. Wenn knöcherne Defekte eine kritische Größe überschreiten, oder die Knochenheilung durch metabolische oder mechanische Faktoren behindert wird, kann es im klinischen Alltag zur Notwendigkeit des Ersatzes von Knochengewebe kommen (Schieker et al. 2006). Dies kann beispielsweise als Folge von Traumata, Tumoren oder der E nukleation von Knochenzysten, aber auch im Rahmen der Korrektur kongenitaler Malformationsdefekte, bei Spondylodesen oder im Falle verzögerter Frakturheilung und Pseudarthrosenbildung der Fall sein.

1.1.1. Frakturheilung

1.1.1.1. Primäre Knochenheilung

Im Zuge der physiologischen Knochenheilung werden zunächst zwei mögliche Abläufe grundsätzlich unterschieden. So spricht man, sofern es unverzüglich und ohne die Bildung eines Granulationsgewebes zu einer Wiederherstellung der Knochenkontinuität kommt, von einer primären oder direkten Knochenheilung (Phillips 2005). Diese kann jedoch nur ablaufen, sofern die Fragmentenden direkten Kontakt miteinander haben und eine hohe Stabilität gewährleistet ist, so dass neues Knochengewebe angelagert werden kann. Diese Situation tritt nach einer korrekten Reposition und adäquater Stabilisierung im Frakturspalt ein.

1.1.1.2. Sekundäre Knochenheilung

In einer Defektzone hingegen, in der es zusätzlich zum Verlust der Knochenkontinuität auch zu einem Substanzverlust gekommen ist, läuft in der Regel eine sekundäre, indirekte Knochenheilung ab (Gaston et al. 2007). Dieser komplexe Vorgang lässt sich in unterschiedliche Phasen gliedern. In der Frühphase bildet sich

als Folge der in der Frakturzone auftretenden Blutung ein Frakturhämatom, woran sich eine entzündliche Phase mit gesteigerter Immigration verschiedener Zelltypen (unter anderem Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten) anschließt. Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine induziert eine gesteigerte Angiogenese im Wundheilungsgebiet und eine verstärkte Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen. Darauf folgt zunächst die Bildung eines Granulationsgewebes, welches im Zeitverlauf durch Binde- beziehungsweise Knorpelgewebe (Kallus) ersetzt wird. Dieses Reparationsgewebe verbindet die Frakturrenden und verleiht eine gewisse Stabilität, ist jedoch mechanisch deutlich weniger belastbar als intaktes Knochengewebe (Einhorn 2005). Im Falle einer physiologischen Knochenheilung kommt es zunächst zu einer Kalzifikation, bevor der knorpelige Kallus durch neugebildeten Knochen ersetzt wird und so eine knöcherne Konsolidierung eintritt (Kramer 2004). Daran schließen sich umfangreiche Remodellierungsprozesse an, wie sie auch jederzeit am intakten Skelett stattfinden, so dass letztlich der Knochen in seinem trajektorialen Aufbau die auftretenden Zug- und Druckbelastungen des entsprechenden Organs widerspiegelt und im Idealfall nicht nur die Knochenkontinuität, sondern auch die Funktionalität vollständig wiederhergestellt ist.

1.1.1.3. Ausbleibende Knochenheilung

Bleibt die Bildung von Knochengewebe der Defektzone hingegen aus, besteht eine Heilungsstörung, die einer zusätzlichen therapeutischen Versorgung bedarf. Die möglichen Ursachen einer Frakturheilungsstörung sind vielfältig und können sowohl biologischer als auch mechanischer Natur sein. Dementsprechend sind die Behandlungsoptionen breit gefächert und müssen sich unbedingt an der Grunderkrankung orientieren. Beispielsweise kann es im Falle offener Frakturen zu Infektionen des Knochen (Ostitis beziehungsweise Osteomyelitis) kommen. Therapeutisch stehen in solchen Fällen in der Regel ein Debridement der Defektzone sowie eine lokale und systemische Antibiotikatherapie im Vordergrund (Neubauer et al. 2006). Darüber hinaus kommt es mitunter vor, dass Frakturrenden in anatomisch inkorrekt Stellung verheilen. Dieser Zustand wird als Fehlheilung („malunion“) bezeichnet und kann unter anderem Ausdruck einer unzulänglichen Reposition oder Stabilisierung sein. Auch ein Versagen des Osteosynthesystems kommt als Ursache in Frage. Bleibt die Frakturheilung ganz aus, bilden sich Pseudarthrosen

(Sen et al. 2007). Diese können ihrerseits in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden. Im Falle hypertropher Pseudarthrosen kommt es zu einer geschwulstartigen Auftreibung der Knochenenden. Hier kann von einer guten Vaskularisation ausgegangen werden, der fehlende Heilungserfolg ist somit Ausdruck einer unzureichenden Stabilisierung. Im Falle schlechter Gefäßversorgung hingegen kann es zu atrophen Pseudarthrosen kommen, bei denen die Bildung von Kallusgewebe gänzlich unterbleibt. Auch Zwischenstufen, sogenannte oligotrophe Pseudarthrosen mit nur wenig Kallusbildung kommen vor. Vor allem im Falle eines avaskulären Umfelds kann ohne große Intervention keine Heilung erreicht werden. Neben korrekter Reposition und ausreichender Immobilisation der Fragmentenden wird die Verwendung von Knochenersatzmaterial notwendig (Jones et al. 2005). Auf die Faktoren, die für eine erfolgreiche Knochenheilung von besonderem Interesse sind sowie auf die verschiedenen Therapieoptionen wird im Folgenden detailliert eingegangen.

1.1.2. Knochenneubildung und Regenerationspotential

Es gilt zu bedenken, dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren entscheidend für den Verlauf der Knochenneubildung ist (Axelrad et al. 2007). So ist es bei der operativen Therapie nicht nur wichtig, ein gut geeignetes Knochenersatzmaterial zu verwenden. Vielmehr muss auch dafür Sorge getragen werden, dass das lokale mechanische Umfeld einen Heilungsprozess zulässt. Ein weiterer zentraler Faktor ist der Patient selbst: Bei metabolischen Knochenkrankungen, zum Beispiel Osteoporose (Giannoudis et al. 2007), renaler Osteodystrophie (Picton et al. 2000) oder Morbus Paget (Walsh 2004) besteht nicht das gleiche regenerative Potential wie bei systemisch gesunden Patienten. Auch Medikamente, zum Beispiel eine dauerhafte Corticoidtherapie, können den Knochenstoffwechsel beeinträchtigen (Waters et al. 2000, Aslan et al. 2005). Ebenso führt regelmäßiger und dauerhafter Alkoholabusus zu einer Verschlechterung der Knochenheilung (Chakkalakal et al. 2005, Trevisiol et al. 2007). Zusätzlich hat die Lokalisation des Defektes auf den Ausgang der Regeneration einen großen Einfluss, man spricht von der „Lagerqualität“ (Schieker et al. 2006). Im ersatzstarken Lager (beispielsweise metaphysäre Defekte) gewährleisten eine gute Vaskularisation und ausreichende Weichteildeckung eine Regeneration der Defektzone. Im ersatzschwachen Lager hingegen (zum Beispiel Tibiaschaftdefekte) ist die

körpereigene Heilungskapazität dadurch beschränkt, dass nur eine unzureichende Gefäßversorgung vorliegt und die Zellen keine ausreichende Syntheseleistung erbringen, um einen großen Defekt knöchern zu überbrücken. Einen Sonderfall stellen die ersatzunfähigen Lager dar, die zu keiner Knochenneubildung fähig sind. Diese Situation tritt beispielsweise im Falle infizierten Knochengewebes auf, oder wenn aufgrund starker Narbenbildung keine ausreichende Blutversorgung gegeben ist. Mitunter schlagen sich schwache Lagerbedingungen in der Bildung atropher Pseudarthrosen nieder, welche die Funktionalität erheblich einschränken. Somit muss die Behandlung ausgedehnter knöcherner Substanzdefekte eine Einzelfallentscheidung bleiben, und es gilt, der behandelnden Chirurgin beziehungsweise dem Chirurgen ein möglichst großes Spektrum an Therapieoptionen zur Verfügung zu stellen.

Bereits seit vielen Jahren ist es Gegenstand der Forschung, geeignete Ersatzmaterialien zu entwickeln (Schieker et al. 2007). Die beständige Suche nach neuen Strategien ist jedoch Ausdruck der noch immer problematischen Versorgung verletzten knöchernen Gewebes. Zunehmend zeichnet sich dabei die Bedeutung der Entwicklung eines „funktionellen Gewebeersatzes“ ab, welcher es ermöglicht, das körpereigene Regenerationspotential zu unterstützen und zu fördern, damit langfristig eine *Restitutio ad integrum* erreicht werden kann. Nur so ist es möglich, die volle Belastbarkeit und physiologische Funktion des betroffenen Gewebeareals zu gewährleisten und gleichzeitig die Belastung durch Sekundäreingriffe zu reduzieren.

1.1.3. Therapieoptionen

Noch immer stellt – sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin – die autogene Knochentransplantation den Standard bei der Behandlung großer segmentaler Knochendefekte dar (Schieker et al. 2006, Kneser et al. 2006b). Hierbei wird über einen zusätzlichen operativen Eingriff Knochenmaterial entnommen, um dann in der Folge in die Defektzone transplantiert zu werden (Jager et al. 2005b). Beim humanen Patienten erfolgt die Entnahme unter anderem aus der Darmbeinschaukel, dem Trochanter major, dem distalen Radiusbereich oder auch der proximalen Tibiametaphyse. Beim Tier werden unter anderem das proximale Femur, die proximale Tibia und der Darmbeinkamm genutzt, die Haupt-

entnahmestelle autologer Spongiosa ist jedoch die proximale Humerusmetaphyse, welche verhältnismäßig leicht zugänglich ist und am meisten Spongiosa liefert. Der große Vorteil dieser Methode ist darin zu sehen, dass sie die drei wesentlichen Aspekte der Knochenregeneration abzudecken vermag: Sie liefert osteogene Progenitorzellen sowie induktive Wachstumsfaktoren und eine osteokonduktive Matrix. Wenngleich diese Methode häufig als „Goldstandard“ der Therapie (Laurencin et al. 2006) bezeichnet wird, birgt sie jedoch erhebliche Schwierigkeiten. Zuallererst ist die Menge des zu gewinnenden Knochens biologisch limitiert. Die Transplantatqualität kann insbesondere bei Rheumatikern oder älteren (osteoporotischen) Patienten reduziert sein. Bei Kindern besteht die Gefahr einer Verletzung der Wachstumsfugen. Zudem verlängern sich die Operations- und somit Narkosezeiten, und im Rahmen des zusätzlichen operativen Eingriffs kann es zu Nerven- und Blutgefäßverletzungen kommen. Nicht selten bedingt die Notwendigkeit eines „Beckenkammspans“ das Umsteigen von einem anästhesiologischen Regionalverfahren auf eine Vollnarkose. Die Hebedefektmorbidität (Zimmermann et al. 2001, Silber et al. 2003) kann sich in weiteren Komplikationen wie Infektionen oder chronischen Schmerzen niederschlagen. Postoperative Schmerzen sind häufig, und zusätzliche Narbenbildungen sind für die Betroffenen nicht zu vermeiden. Mitunter kommt es zu deutlich verlängerten Rehabilitationszeiten. All diese Einwände sind nicht nur im Sinne einer optimalen Patientenversorgung zu bedenken, sondern müssen auch hinsichtlich ökonomischer Aspekte (Material- und Personalaufwand, evtl. verlängerte Krankenhausaufenthalte) berücksichtigt werden.

Alternativ besteht zumindest theoretisch die Möglichkeit der Transplantation allogenen Knochenmaterials (De Long et al. 2007). Grundsätzlich wird in diesem Zusammenhang zwischen den selteneren „frischen“ sowie den prozessierten Transplantaten unterschieden. Dabei geht im Rahmen der Prozessierungsschritte biologische Aktivität verloren. Auch das potentielle Risiko viral oder bakteriell übertragbarer Krankheiten darf nicht vergessen werden (Hing 2004). Die Schwierigkeit dieser Therapieoption ist nicht zuletzt darin zu sehen, dass kostenintensive und in der Betreuung sehr zeitaufwändige Knochenbanken gepflegt werden müssen, um adäquates Material von geeigneten Spendern zur Verfügung zu haben (Tomford 2000, Kirker-Head et al. 2007).

Weitere Therapieverfahren zur Behandlung segmentaler Knochendefekte sind die Kallusdistraction sowie der Segmenttransport (Zhang et al. 2007, Oh et al. 2007). Bei diesen Verfahren wird die Defektüberbrückung dadurch unterstützt, dass kleinere Knochensegmente durch den Defekt gezogen werden (1 mm pro Tag) und die so entstehende mechanische Belastung in Knochenneubildung resultiert. Bei dieser Methode wird genutzt, dass durch Zugbelastung am durchtrennten Knochen eine Situation entsteht, in der prinzipiell die gleichen Vorgänge der Knochenneubildung ablaufen wie im juvenilen Skelett, in dem das Längenwachstum des Knochens von den Wachstumsfugen an den proximalen und distalen Enden der langen Röhrenknochen ausgeht. Für diese aufwändigen Verfahren werden sehr häufig externe Ringfixateure nach Ilizarov verwendet (Kanellopoulos et al. 2006). Wenngleich diese Verfahren gute Ergebnisse liefern, ist die Belastung für den Patienten unter anderem durch die langen Tragzeiten sehr hoch (Garcia-Cimbrelo et al. 2004). Zudem treten mitunter Probleme auf, wie etwa ein Weichteilverzug oder Pin-assoziierte Komplikationen. Derlei Schwierigkeiten können durch zentrale Zugseilsysteme (vollimplantierbare Distraktionsmarknägel) umgangen werden. Deren Verwendung ist jedoch extrem teuer und bleibt nicht zuletzt aufgrund des komplizierten operativen Verfahrens spezialisierten Zentren vorbehalten (Baumgart et al. 2005).

Als vierte Therapieoption steht die Verwendung von Knochenersatzmaterialien zur Verfügung (Hing 2004, Olivier et al. 2004). Die Struktur und Eigenschaften physiologischen Knochens stellen dabei die Zielvorgabe dar, um eine möglichst weitreichende Integration mit körpereigenem Gewebe erreichen zu können. Die anorganische Phase des Knochens besteht zum überwiegenden Teil aus Calcium und Phosphaten, welche in Form kristallinen Hydroxylapatits arrangiert sind (Yoshikawa et al. 2005). Folgerichtig gehören zu den am häufigsten verwendeten Materialgruppen die Keramiken. Vor allem Hydroxylapatit- und Tricalciumphosphatkeramiken befinden sich bereits in der klinischen Anwendung, doch auch siliciumbasierte bioaktive Gläser kommen zum Einsatz. Zusätzlich zu den Keramiken werden sowohl natürliche als auch synthetische Polymere verwendet. Bei den natürlichen Polymeren stehen vor allem Kollagene, Fibrine, Chitosan und Stärke im Vordergrund, während bei den synthetischen Polymeren die Gruppe der Polyester besonders hervorzuheben ist. Diese wiederum gliedern sich in die PLA-(polylactic

acid-), PGA-(polyglycolic acid-) und die Co-Polymere (PLGA, polylactic-co-glycolic acid) (Di Toro et al. 2004). Mit Hilfe dieser Materialien können zwar viele Probleme der autogenen oder allogenen Transplantate umgangen werden. Die Einsetzbarkeit dieser Stoffe ist jedoch trotzdem limitiert. Bedenken erwachsen aus den häufig unzureichend voraussagbaren Resorptions- oder Degradationscharakteristika, strukturellem Versagen oder auch Infektionen. Es bleibt fraglich, ob es möglich ist, ein ideales Material zu finden, das allein den vielfältigen Anforderungen gerecht zu werden vermag. Verlangt werden neben der Fähigkeit, ein Einwachsen umgebenden Knochengewebes zu unterstützen (Osteokonduktion), auch das Potential, die Differenzierung immaturer Progenitorzellen entlang der osteogenen Linie zu fördern (Osteoinduktion), oder gar die Möglichkeit, selbst zu Knochenneubildung zu führen (Osteogenität). Derzeit sind die artifiziellen Knochenersatzmaterialien noch nicht als optimal anzusehen, was sich auch aus der Vielzahl der an sie gestellten Anforderungen ergibt, die ein Material nicht alle in gleichem Maße zu erfüllen vermag (s. Abb. 1). Dennoch bringen sie unbestreitbare Vorteile, wie etwa eine gute Lagerbarkeit, ausreichende Verfügbarkeit und die Vermeidung eines weiteren operativen Eingriffs für den betroffenen Patienten mit sich.

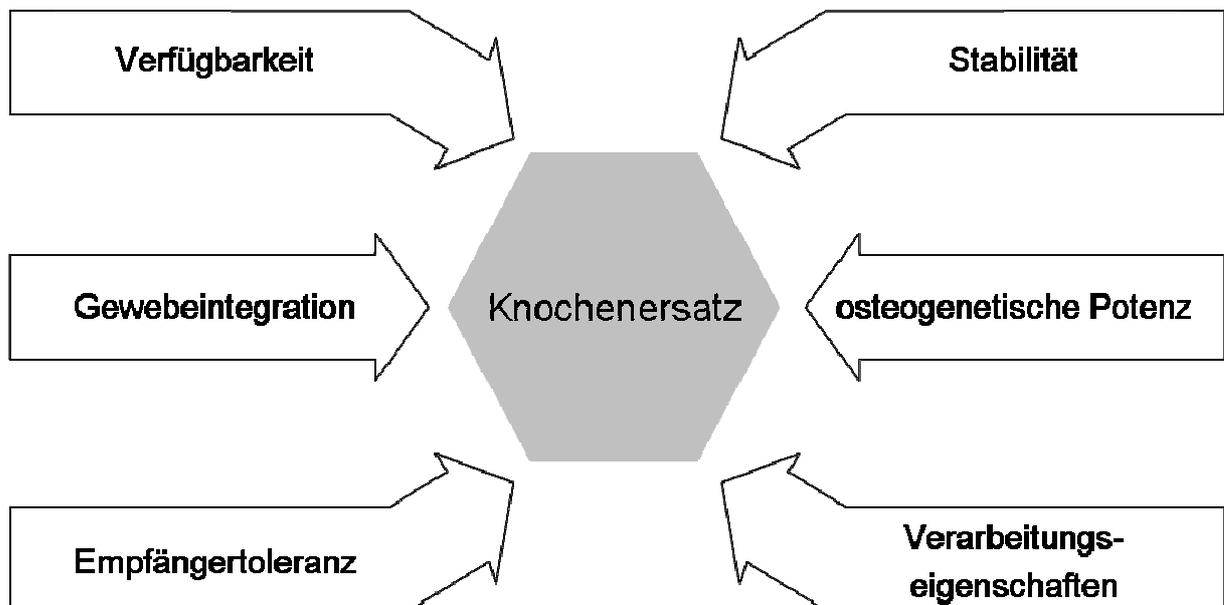


Abb. 1. Anforderungen an Knochenersatzmaterialien.

1.1.4. Regenerative Therapiestrategien

Einige neuartige Therapiestrategien sehen vor, durch Transplantation metabolisch aktiver Zellen, Applikation heilungsfördernder Proteine (zum Beispiel bone morphogenetic protein (BMP), fibroblast growth factor (FGF)), oder im Rahmen genbasierter Therapien Faktoren einzubringen, die sich positiv auf den Heilungsverlauf auswirken (Olivier et al. 2004, Hidaka et al. 2006). Das so genannte *Tissue engineering* weckt in diesem Zusammenhang große Hoffnungen, da es über interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedenster Fachrichtungen Kompetenzen bündelt und so die noch offen stehenden Fragen bezüglich der Entwicklung artifizieller Gewebeersatzmaterialien in absehbarer Zeit zu beantworten versucht (Langer et al. 1993). Das Grundprinzip dieses Verfahrens besteht darin, pluripotente vitale Zellen mit geeigneten Trägermaterialien und Wachstumsfaktoren bereits vor einer Transplantation *in vitro* zusammenzuführen (s. Abb. 2). Das so künstlich generierte Gewebe kann nach einer optionalen Phase der Vorkonditionierung (zum Beispiel Proliferation beziehungsweise Differenzierung der Zellen zu Knochenzellen) implantiert werden. Durch die Kombination von stabilen Trägermaterialien mit metabolisch aktiven Zellen soll einerseits eine suffiziente Stabilität und andererseits eine bessere Integration des Transplantats in das Empfängergewebe erreicht werden. Ein vielversprechender Ansatz der Therapie ist, dem Patienten körpereigene hMSC zu entnehmen, sie *in vitro* zu vermehren und auf Trägermaterialien aufzubringen. Anschließend können die hMSC zu den spezifischen Zellen der jeweiligen Gewebe differenziert und dadurch die Bildung extrazellulärer Matrix induziert werden, so dass schließlich dieses besiedelte Konstrukt als Gewebeersatz implantiert werden kann.

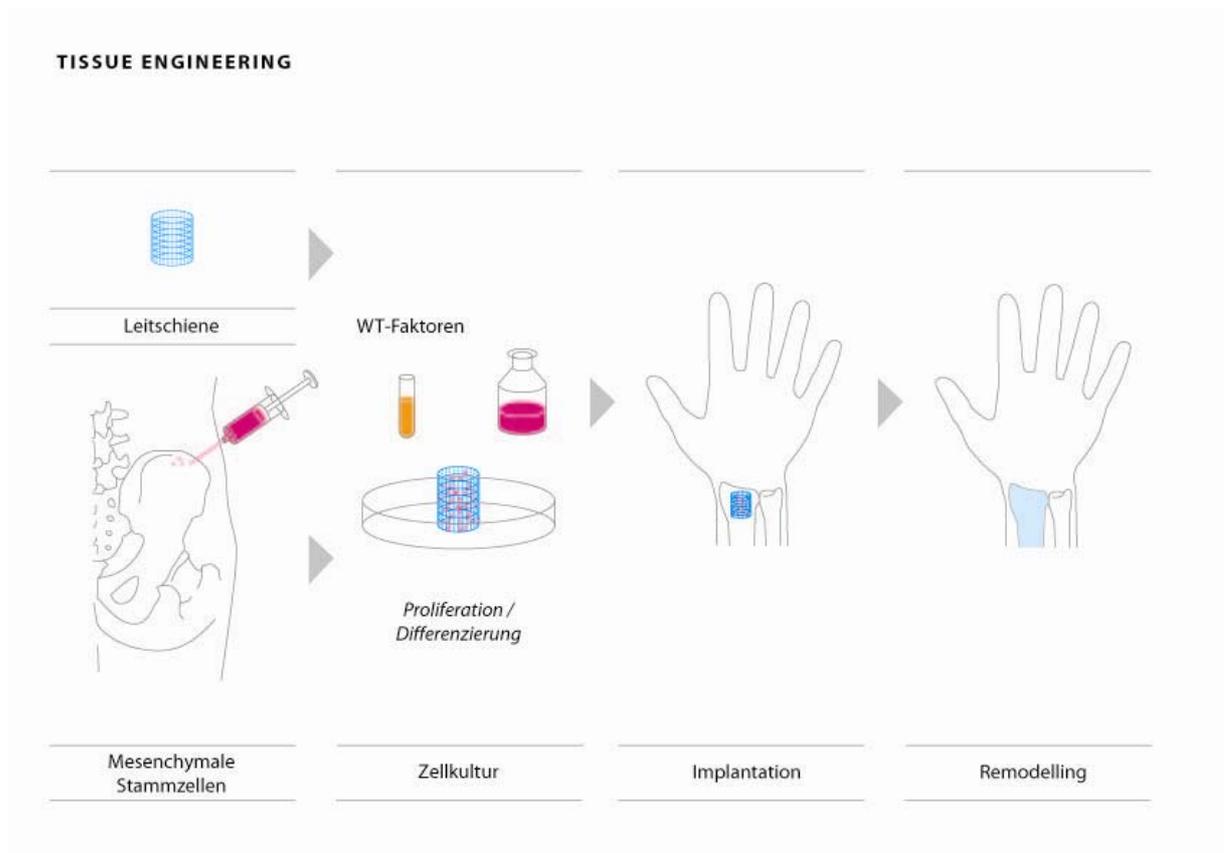


Abb. 2. Prinzip des Tissue engineering. Über die Kombination adäquater Trägermaterialien, metabolisch aktiver Zellen und heilungsfördernder Wachstumsfaktoren wird *in vitro* ein künstliches Gewebe erzeugt. Dieses soll nach Implantation zum einen die Primärstabilität erhöhen und zugleich eine bessere Integration in das Empfängergewebe gewährleisten. Auf diese Art wird *in vivo* der Heilungsprozess unterstützt, so dass es zu einem kompletten Remodelling des Defektbereiches und einer *Restitutio ad integrum* kommt.

Adäquate Zellen für diese Therapiestrategie stellen die adulten humanen mesenchymalen Stammzellen dar. Ebenso wie embryonale Stammzellen besitzen auch adulte Stammzellen zumindest theoretisch die Möglichkeit zur unendlichen Zellvermehrung (Selbstreplikation) sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Gewebearten (Plastizität) (Pittenger et al. 1999, Liechty et al. 2000, Kassem 2006) mit einer festgelegten Richtung (Hierarchie). Der Unterschied besteht jedoch darin, dass aus embryonalen Stammzellen alle Gewebearten entstehen können (Pluripotenz), wohingegen adulten Stammzellen diese Eigenschaft im Verlauf der Differenzierung verloren geht. Letztere sind multipotent, das heißt mehrere, nicht alle Gewebe können aus ihnen entstehen. Ihr großer Vorteil besteht jedoch in der einfachen Gewinnung. Sie werden vielfach aus Knochenmarksaspiraten isoliert (Ciapetti et al. 2006, Beltrami et al. 2007). Doch auch aus verschiedenen anderen Geweben, wie zum Beispiel Fettgewebe (Zuk et al. 2002, Cowan et al. 2004, Lee et

al. 2004, Schaffler et al. 2007), Muskelgewebe (Jiang et al. 2002, Peng et al. 2004) oder peripherem Blut (Kuznetsov et al. 2001) wurden sie erfolgreich gewonnen. Aufgrund des hohen proliferativen Potentials können diese Zellen zudem in nahezu unbegrenzter Menge expandiert werden (s. Abb. 3). Durch Verwendung adulter Zellen wird eine Diskussion der ethischen Aspekte, die sich bei der Kultur von embryonalen Stammzellen ergibt, vermieden.

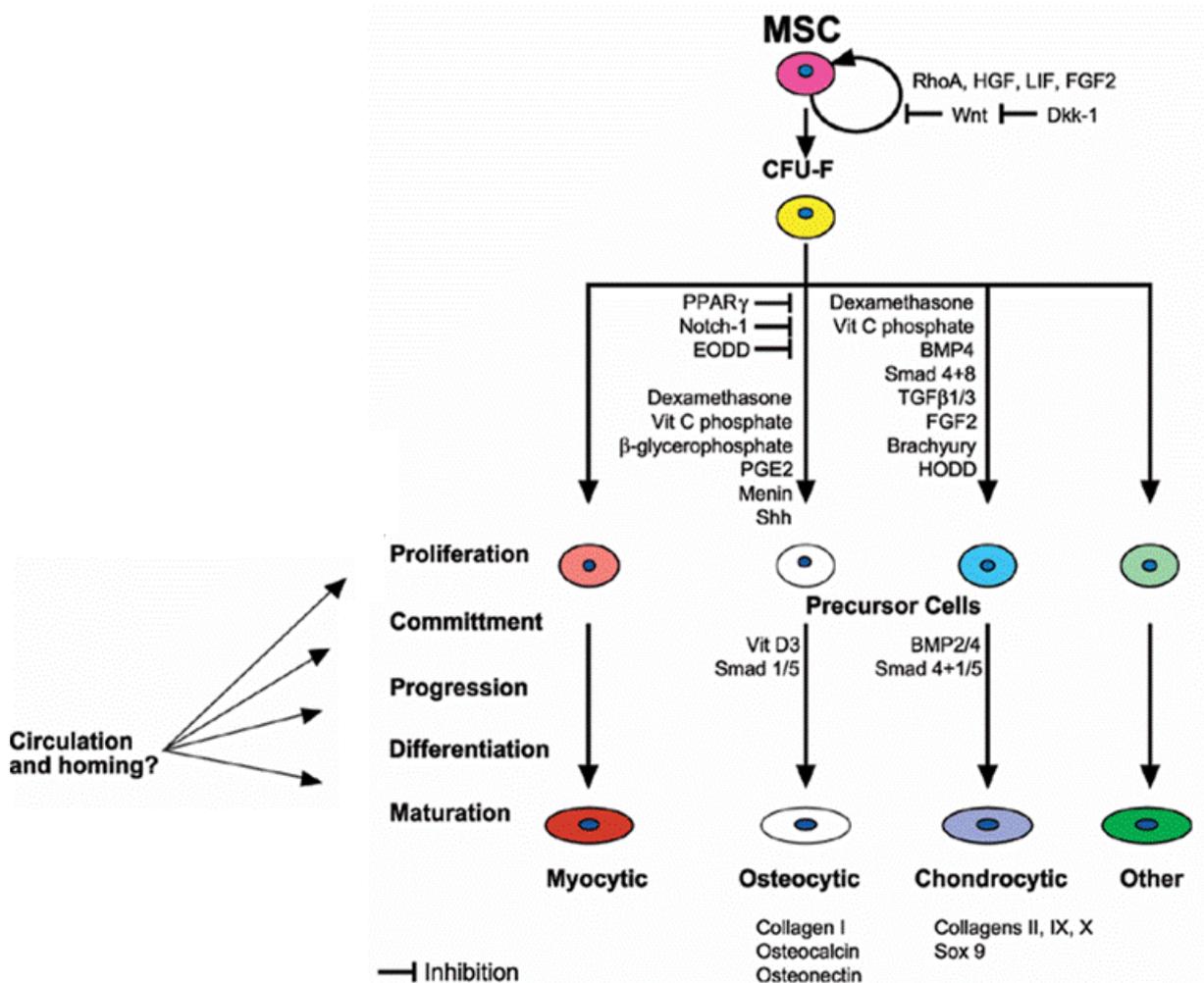


Abb. 3. Merkmale mesenchymaler Stammzellen sind die Fähigkeit zur Selbstreplikation, die Hierarchie im Ablauf der Spezialisierung sowie die Differenzierung in verschiedene Gewebearten (Plastizität), (Otto et al. 2004).

Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist es jedoch bisher noch nicht gelungen, das *Tissue engineering* zu einer breiten klinischen Anwendung zu bringen (Lysaght et al. 2004). Zu viele Fragen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch offen. So ist es noch immer Gegenstand der Diskussion, ob autogene oder allogene Zellen verwendet werden sollen, wie diese möglichst schonend gewonnen werden können, unter welchen Bedingungen eine effektive *In-vitro*-Expansion erfolgen kann, ob eine Kultivierung ohne Verwendung exogener Zusätze möglich ist, welche Wachstumsfaktoren in welchen Konzentrationen die gewünschten Effekte erzielen, oder ob in der Kultivierungsperiode eine Dedifferenzierung eintritt, die womöglich in einem unerwünschten Wachstum und einer Entartung der Zellen mündet (Luyten et al. 2001, Salgado et al. 2006, Zhu et al. 2006b, Kimelman et al. 2007). Gleichmaßen gibt es noch viele offene Fragen hinsichtlich der bisher entwickelten Leitschienenmaterialien, da diese nicht nur die allgemeinen Materialanforderungen an Implantate wie Sterilität, Resorbierbarkeit, fehlende Toxizität oder Kanzerogenität aufweisen müssen, sondern darüber hinaus die Besiedelung und Adhäsion sowie gegebenenfalls die Differenzierung von Zellen im dreidimensionalen System gewährleisten müssen (Hollister 2005, Bonfield 2006).

1.1.5. Tiermodelle für die präklinische Testung

Tiermodelle haben in der biomedizinischen Forschung eine lange Tradition, da sie die Basis für angewandte Forschung darstellen. Somit erarbeiten sie das wissenschaftliche Fundament, auf dem neue Therapiekonzepte aufgebaut werden können (Deutsche Forschungsgemeinschaft 2004). Überwiegend werden Tierversuche an Nagetieren, insbesondere Mäusen und Ratten, durchgeführt – dies gilt auch im Rahmen der Biomaterialtestung für den Knochenersatz.

Ganz grundsätzlich unterscheidet man zunächst zwischen Großtier- und Kleintiermodellen. In der Biomaterialtestung für den Knochenersatz werden im Großtierbereich überwiegend Schafe (Petite et al. 2000, Kon et al. 2000, Bensaid et al. 2005, Rechenberg et al. 2006, Nuss et al. 2006, Viateau et al. 2007, Petrizzi et al. 2007), Ziegen (Kruyt et al. 2006, Zhu et al. 2006a), Hunde (Bruder et al. 1998, Yamada et al. 2004, He et al. 2007), sowie Schweine (Zhou et al. 2006) verwendet. Von den Kleintieren kommen in der Hauptsache Mäuse (Schieker et al. 2004, Zhang et al. 2005, Seitz et al. 2007) oder Ratten (Vogelin et al. 2005, Jager et al. 2005a,

Betz et al. 2006, Jager et al. 2007, Drosse et al. 2008) zum Einsatz. Der Vorteil der Großtiermodelle liegt sowohl in der – aufgrund der Größenverhältnisse – leichteren Durchführung chirurgischer Manipulationen, als auch darin, dass die Knochenstruktur sowie die biomechanische Belastung den Verhältnissen im Menschen ähnlicher ist als die der kleinen Labornager. So haben Kleinnager eine primitivere Knochenstruktur ohne ein Havers-System (Nunamaker 1998). Diese geringere Ähnlichkeit des Knochenaufbaus zwischen Nagern und Menschen limitiert die klinische Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse und unterstreicht die Modellhaftigkeit präklinischer Tierversuche. Nichtsdestotrotz stehen einige Argumente gegen eine Verwendung von Großtieren. Hierzu zählen die umfangreichen logistischen Anforderungen hinsichtlich der Haltung sowie die hohen Kosten. Vor allem der immense finanzielle Aufwand führt häufig dazu, dass derlei Studien mit geringen Tierzahlen durchgeführt werden. Dies wiederum erschwert es, ausreichend Ergebnisse zu generieren, um statistisch relevante Aussagen treffen zu können und Forschungsergebnisse damit abzusichern. In dieser Hinsicht bringt die Verwendung von Kleintieren eindeutige Vorteile mit sich. Hinzu kommt, dass vor allem bei Mäusen (aber auch bei Ratten) teilweise genetisch modifizierte Stämme zur Verfügung stehen, die eine Knochenheilungsstudie unter Berücksichtigung spezifischer Fragestellungen ermöglicht. Beispielsweise können bei der Testung zellbesiedelter Gewebekonstrukte humane Zellen im Sinne einer Xenotransplantation verwendet werden, wenn dabei T-Zell-depletierte, athymische Nacktratten eingesetzt werden (Schuurman et al. 1992a).

Bei der Erforschung von Knochenersatzmaterialien gibt es zusätzlich die grundlegende Unterscheidung in ektope und orthotope Modelle. Im ersteren Fall werden in der Regel die zu testenden Materialien subkutan paravertebral implantiert. Dies erlaubt zum einen die Beurteilung der Biokompatibilität eines Materials und zum anderen lässt es Rückschlüsse auf die Osteoinduktivität eines Materials oder Zell-Matrix-Konstruktes zu. Jedoch erlaubt dieses Verfahren letztlich nicht die Beurteilung der Funktionalität eines Knochenersatzmaterials. Dies liegt zum einen darin begründet, dass im Gewebeverband des Zielorgans auf struktureller Ebene sowie auf molekularbiologischer Ebene ganz andere Einflüsse auf das Implantatmaterial einwirken als im relativ gefäßarmen subkutanen Lager. Zum anderen darf gerade im Falle der Knochenregeneration nicht der Einfluss der biomechanischen Belastung

unterschätzt werden, da er auf die im lebendigen Knochen ständig ablaufenden physiologischen Umbauprozesse in ganz entscheidendem Maße Einfluss hat (Schell et al. 2005).

Die orthotopen Knochenmodelle untergliedern sich in die biomechanisch belasteten Fraktur- und Defektmodelle einerseits, und in biomechanisch nicht beanspruchte Bohrlochdefekte in den metaphysären Bereichen (Uusitalo et al. 2001, Rechenberg et al. 2006, Nuss et al. 2006) andererseits. Bohrlochdefekte in der Schädelkalotte (Nyan et al. 2007, Mhawi et al. 2007, Degano et al. 2008) stellen aufgrund der dort ablaufenden desmalen Ossifikation keine direkte Referenz für die Heilungsprozesse am lasttragenden Röhrenknochen dar.

Hinsichtlich Forschungsmodellen in den diaphysären Bereichen von zum Beispiel Radius oder Femur gibt es große Unterschiede zwischen den Arbeitsgruppen. Nicht nur die Wahl der Tierart ist uneinheitlich, sondern auch die Lokalisation des Defektes unterscheidet sich häufig (Cancedda et al. 2007). In der Regel fällt die Wahl aufgrund der Größenverhältnisse auf Ratten (s. Abb. 4) und nicht auf Mäuse. Orientiert an der Fragestellung werden grundsätzlich Fraktur- und Defektmodelle unterschieden. Erstere werden dabei vornehmlich genutzt, um Mechanismen der Frakturheilung zu analysieren, beziehungsweise um den Einfluss verschiedener Faktoren auf den Ablauf des Heilungsprozesses zu bewerten. Letztere hingegen erlauben durch Implantation verschiedener Trägermaterialien die Beurteilung des Einflusses von Knochenersatz auf den Heilungsverlauf. In der Mehrzahl der Defektmodelle wird ein Defekt am Oberschenkelknochen gewählt, wenngleich auch Studien mit Untersuchungen zur Frakturheilung an der Fibula vorliegen (Chakkalakal et al. 1999, Chakkalakal et al. 2001).

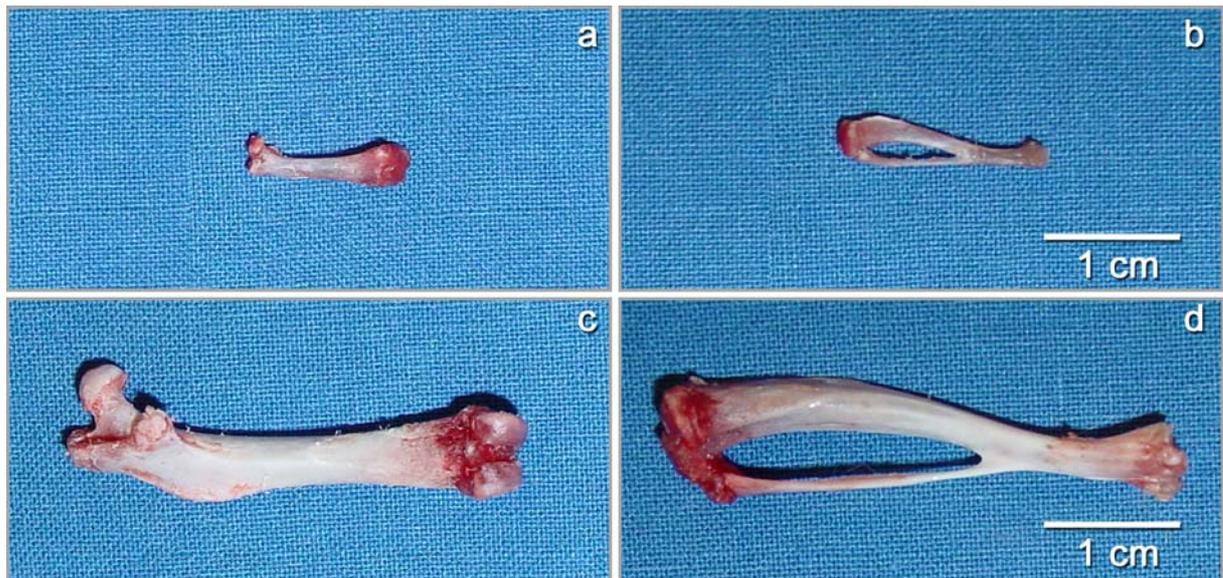


Abb. 4. Größenvergleich der langen Röhrenknochen der Hinterextremität von Labormäusen beziehungsweise Laborratten. a) Mausfemur. b) Maustibia und -fibula. c) Femur einer Ratte. d) Tibia und Fibula einer Ratte.

Häufig werden in Tiermodellen zur Testung von Knochenersatzmaterialien sogenannte Defekte kritischer Größe („critical size defects“, CSD) gewählt. *Per definitionem* handelt es sich bei einem solchen „critical size defect“ um einen segmentalen Defekt, dessen Größe bedingt, dass es innerhalb der Lebenszeit des Patienten nicht zu einer knöchernen Durchbauung kommt. Entscheidend ist, dass die Heilung nicht aufgrund pathologischer Veränderungen ausbleibt, wie dies im Falle von Pseudarthrosen auftritt. Einzig die Ausdehnung des Schadens verhindert eine *Restitutio ad integrum*. In der Forschung werden derartige Defekte für gewöhnlich genutzt, um zu überprüfen, ob das eingesetzte Material in der Lage ist, eine Überbrückung zu erwirken. So kann beurteilt werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Einsatz eines Implantats und einer Heilung besteht. Allerdings variieren die Angaben über das Ausmaß dieser sogenannten „Defekte kritischer Größe“ von Studie zu Studie sehr stark (Tsuchida et al. 2003, Vogelin et al. 2005, Jager et al. 2005a, Chu et al. 2007, Hsu et al. 2007). Eine eindeutige Festlegung, wie groß beispielsweise ein Femurdefekt in der Ratte zu sein hat, um die genannten Kriterien zu erfüllen, steht derzeit noch aus. Zum Teil ist dies sicherlich darauf zurückzuführen, dass nur schwerlich ein absoluter Zahlenwert angegeben werden kann, da auch Faktoren wie Alter, Größe, Geschlecht oder der verwendete Rattenstamm berücksichtigt werden müssen.

1.1.5.1. Fixationssysteme für standardisierte Forschungsmodelle

Einen Kernpunkt bei der Etablierung eines orthotopen Defektmodells stellt die Entwicklung beziehungsweise Auswahl eines geeigneten Fixationssystems zur Stabilisierung großer segmentaler Defekte dar. Es ist für den verlässlichen Verlauf einer Studie unabdingbar, ein System zu verwenden, das reproduzierbare Ergebnisse liefert und eine Nachbeobachtung der Tiere über den geplanten Untersuchungszeitraum hinaus erlaubt. Neben dem intraoperativen Vorgehen muss als zusätzlicher Aspekt auch die postoperative Behandlung berücksichtigt werden, um auch hier ein vorzeitiges Ausscheiden von Versuchstieren aus dem Versuch zu verhindern. Darüber hinaus müssen tierschutzrelevante Argumente – wie etwa der Tragekomfort des ausgewählten Systems – ebenfalls bedacht werden.

Kommt es zu einer Zusammenhangstrennung der Knochenkontinuität, stehen – in Abhängigkeit von der Art und Lokalisation des Bruches – verschiedene Fixationssysteme zur Verfügung, um eine Stabilisierung des betroffenen Knochens zu erreichen. Bei stabilen diaphysären Frakturen, bei denen die Fraktarenden verkeilt sind und keine Verkürzung des Knochens vorliegt, werden entweder intramedulläre Nägel, Platten oder externe Fixateure verwendet. In der Regel wird in solchen Fällen eine Fixierung vorgenommen, um eine Achsenabweichung zu verhindern und um eine Belastung zu ermöglichen. Im Falle instabiler Frakturen muss zunächst die Länge des Knochens wiedererlangt, die physiologische Achse wiederhergestellt, sowie eine Achsenabweichung verhindert werden. Auch eine ausreichende Rotationsstabilität ist von großer Bedeutung für einen erfolgreich verlaufenden Heilungsprozess. In einem solchen Fall sind die Reposition und anschließende Stabilisierung mit einer Platte oder einem Fixateur externe die Regel. Eine ausreichende Stabilisation mit intramedullären Systemen zu erreichen ist nur durch Verwendung von Verriegelungsnägeln möglich. Dies setzt jedoch eine ausreichende Größe des zu behandelnden Tieres voraus, was im Falle von Mäusen beziehungsweise Ratten nicht zutrifft. Segmentale Defekte stellen insofern einen Sonderfall dar, als Knochensegmente in definiertem Umfang entfernt werden, so dass die Defektenden keinen Kontakt mehr haben. Hieraus ergibt sich ein hohes Maß an Instabilität. Um eine ausreichende Fixierung des betroffenen Knochens gewährleisten zu können, kommen dementsprechend nur Systeme in Frage, welche eine ausreichende Stabilität gewährleisten können. Hierzu zählen Plattensysteme zur

internen Fixation sowie externe Fixateure. Im Rahmen einer Frakturversorgung werden bei einer externen Fixation sowohl in das proximale als auch in das distale Knochenfragment jeweils mindestens zwei Gewindebohrdrähte eingesetzt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die defektnah gelegenen Drähte einen ausreichenden Abstand zu den Defektenden aufweisen, um ein Ausbrechen zu verhindern. In der Regel wird hier eine Distanz, die dem Knochendurchmesser entspricht, als ausreichend angesehen. In der Folge werden die Drähte extrakutan durch Stahl- oder Kunststoffschienen stabil miteinander verbunden. Hierbei muss ein ausreichender Abstand zwischen der Querstrebe und der Haut eingehalten werden, damit die Wunden weiterhin zu beurteilen sind und gegebenenfalls versorgt werden können. Von diesem „Grunddesign“ abgesehen gibt es noch zahlreiche Modifikationen (bilaterale Fixationssysteme, Klammerfixateure mit zwei Verbindungsstangen), die für die Frakturversorgung von Patienten von Bedeutung sind, im Rahmen eines Testmodells für den Femurdefekt am Oberschenkelknochen der Ratte jedoch keine Beachtung finden. Analog zu den großen Unterschieden hinsichtlich der Ausdehnung von Knochendefekten kritischer Größe ist es bis heute nicht gelungen, zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen darin überein zu kommen, welches Fixationssystem für segmentale Defekte am Oberschenkelknochen der Ratte am besten geeignet ist. Wengleich externe Fixationssysteme (Mark et al. 2003, Jager et al. 2005a, Meinel et al. 2006) in unterschiedlichen Designs bei Defektgrößen bis 5 mm verwendet wurden, stellt doch die interne Fixation bei den meisten Studien die Methode der Wahl dar. Hierbei gibt es jedoch ein weites Spektrum, welches von Polyethylen-Stangen oder ähnlichen synthetischen Materialien, die direkt auf den Knochen geschraubt werden (Shen et al. 2004, Little et al. 2005), bis zu Stahlimplantaten reichen.

1.1.6. Relevanz für die Veterinärmedizin

Wengleich in vielen Fällen Tiermodelle in der Forschung lediglich als Zwischenschritt zwischen *In-vitro*-Versuchen und klinischen Studien am humanen Patienten betrachtet werden (Murray 2002), darf deren Bedeutung auch für den veterinärmedizinischen Sektor jedoch nicht unterschätzt werden. Insofern gilt es, Untersuchungsergebnisse, die an einer („Versuchstier“-)Spezies erarbeitet wurden auch auf andere Tierspezies sowie den Menschen zu übertragen. Dementsprechend stellen Tiermodelle aus der präklinischen Forschung nicht nur einen wichtigen Schritt

hin zu einer klinischen Studie am humanen Patienten dar, sondern sie verbessern gleichermaßen das Verständnis der Pathogenese verschiedener veterinärmedizinisch relevanter Krankheitsbilder. Folgerichtig können die gewonnenen Erkenntnisse für eine Verbesserung der Therapiestrategien für den Tierpatienten genutzt werden. Gerade im Bereich der Orthopädie wird dies deutlich, da sowohl in der Kleintier- als auch in der Großtiermedizin eine ganze Reihe orthopädischer Erkrankungen bekannt ist und erheblicher Therapiebedarf besteht. Das Spektrum reicht von Frakturen (Harasen 2003a, Harasen 2003b) über osteoarthritische Veränderungen (Renberg 2005, Goodrich et al. 2006) und osteochondrale Läsionen bis hin zu Osteomyelitis (Goodrich 2006) sowie nicht zuletzt auch metabolischen Knochenerkrankungen (Liu 2002). Im Rahmen der hier vorgestellten Studie tritt, wie für den humanmedizinischen Bereich im Kapitel 1.1 dargestellt, das Aufzeigen neuer Behandlungsoptionen für Patienten mit substanziellen Knochendefekten oder eingeschränkter Heilungskapazität in den Vordergrund. Dabei stellt sich die Problematik des Knochenersatzes im Wesentlichen sehr ähnlich dar, wenngleich mit zunehmender Anwendung der sogenannten „biologischen Osteosynthese“ die Notwendigkeit eines Knochenersatzes beim Tierpatienten abgenommen hat (Matis 1998). Dennoch muss auch für betroffene Tiere in gleicher Weise wie für den humanen Patienten die bestmögliche Versorgung mit möglichst geringer Belastung und einem guten funktionellen Ergebnis, das sich letztlich in gesteigerter Lebensqualität niederschlägt, gefordert werden.

1.2. Aufgabenstellung

Gegenstand der vorgestellten Arbeit ist die Etablierung eines orthotopen Defektmodells für die Testung neu entwickelter regenerativer Implantate für den Knochenersatz. Wie einleitend dargestellt, ist das Tiermodell der Wahl hierfür ein segmentaler Knochendefekt kritischer Größe am Rattenfemur. Um humane Zellen untersuchen zu können, wurde die athymische Nacktratte als Versuchstier ausgewählt. Die Arbeit wurde in vier Arbeitsschritte untergliedert:

Zunächst sollten geeignete *Trägerstrukturen* entwickelt werden. Hierbei stellten sowohl die Frage nach dem zu bevorzugenden Material als auch die Möglichkeiten

der Fertigungstechnik zentrale Aspekte dar. Im Anschluss erfolgte die *In-vitro*-Testung durch *Besiedelung der Matrizen* mit humanen mesenchymalen Stammzellen in dreidimensionaler (3-D-)Kultur. Wenngleich bekannt ist, dass es grundsätzlich möglich ist, hMSC im 3-D-System zu kultivieren, muss der Einfluss neu entwickelter Materialien im Einzelfall geprüft werden, um deren Eignung für das *Tissue engineering* zu evaluieren. Drittens musste ein adäquates System für die *Stabilisierung eines Knochendefektes im Versuchstier* gefunden werden, so dass bei der Anwendung am lebenden Tier reproduzierbare Ergebnisse aufgrund standardisierter Vorgehensweisen produziert werden können. Den vierten Punkt stellte die *Übertragung auf die In-vivo-Situation* dar. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Wahl einer angemessenen Defektgröße und somit auf der Entwicklung eines reproduzierbaren Modellsystems für die orthotope Testung von Knochenersatzmaterialien im Kleintier.

1.2.1. Trägermaterialien für den Knochenersatz

Der Forderungskatalog, welcher bei der Entwicklung geeigneter Trägermaterialien zu Grunde gelegt wird, ist umfangreich und begründet sich aus den vielfältigen Aufgaben, die derlei Materialien zu erfüllen haben. Zum einen gilt es, ein Material zu entwickeln, das in der Frühphase des Heilungsprozesses eben jene Stabilität zu vermitteln vermag, die durch den Verlust körpereigenen Gewebes verloren gegangen ist. Darüber hinaus ist die optimale Leitschiene dem zu ersetzenden Gewebe in seiner äußeren sowie inneren Struktur ähnlich und erlaubt sowohl initiale Zelladhäsion als auch spezifische Differenzierung auf dem Trägermaterial (Schieker et al. 2007). Die ausreichende Nährstoffversorgung der am Heilungsprozess beteiligten Zellen kann nur durch ein interkonnektierendes Porensystem gewährleistet werden. Im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit darf die Leitschiene nicht toxisch, muss sterilisierbar sowie im Idealfall resorbierbar sein. Für die Herstellung eignet sich das Rapid prototyping, ein spezielles, aus dem Prototypenbau bekanntes Verfahren, welches verschiedene Prozesse verwendet, um aus komplexen 3-D-Datensätzen Prototypen herzustellen. Das Prinzip ist die schichtweise aufbauende Herstellung von 3-D-Strukturen, in diesem Fall die Herstellung geeigneter Trägermaterialien aus biokompatiblen Keramikwerkstoffen (Hydroxylapatit). Die Methodik wird detailliert im Kapitel 2.1.2 der vorliegenden Arbeit dargestellt. Im Vorfeld der *In-vivo*-Testung im Tierversuch sollten für das gewählte

Modell angepasste Leitschienen hergestellt und hinsichtlich ihrer Besiedelungsfähigkeit und Biokompatibilität *in vitro* getestet und optimiert werden.

1.2.2. Zellen für den funktionellen Gewebeersatz

Da das grundsätzliche Potential humaner mesenchymaler Stammzellen, sich entlang der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Linie *in vitro* zu differenzieren, bekannt und die Differenzierungsprotokolle im Labor der Experimentellen Chirurgie und Regenerativen Medizin etabliert sind, stand im Rahmen der hier vorgestellten Studie hinsichtlich der Regeneration von Knochengewebe die Überprüfung des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens von adulten humanen mesenchymalen Stammzellen auf den entwickelten Trägermaterialien im Vordergrund.

1.2.3. Fixationssysteme

Drei verschiedene Fixationssysteme (interne beziehungsweise externe) wurden für die mögliche Anwendung zur Stabilisierung eines segmentalen Defekts kritischer Größe im Femur der Ratte evaluiert. Dies beinhaltete zunächst die Auswahl beziehungsweise Entwicklung verschiedener externer Fixateure sowie die anschließende mechanische Testung in unterschiedlichen Belastungsmodi im standardisierten System. Ebenso wurde die intraoperative Handhabbarkeit der Implantate vor einer Anwendung *in vivo* evaluiert.

1.2.4. Orthotopes Defektmodell

In einem letzten Schritt sollten die *in vitro* erarbeiteten Ergebnisse auf die Situation *in vivo* übertragen werden. Im Anschluss an die Vorversuchsreihen zur Testung zellbesiedelter Gewebekonstrukte und Fixationssysteme, wurde ein orthotopes Defektmodell für die Testung zellbesiedelter Gewebekonstrukte im Femurdefekt in der Ratte etabliert. *In vivo* wurden hier zellbesiedelte Zell-Matrix-Konstrukte in 6 mm großen Femurdefekten athymer Nacktratten im Hinblick auf das Regenerationspotential getestet und die Heilungserfolge mittels radiologischer und histologischer Methoden beurteilt.

2. Material und Methoden

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde in der Hauptsache in der Experimentellen Chirurgie und Regenerativen Medizin (ExperiMed) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München durchgeführt. Die Entwicklung der Trägermaterialien sowie des neu entworfenen externen Fixateurs erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Wissenschaftszentrum caesar in Bonn. Alle mechanischen Tests sowie die μ CT-Untersuchungen der Knochenproben wurden im Biomechanischen Forschungslabor der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau durchgeführt. In der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden die Fixationssysteme im Hinblick auf ihre intraoperative Anwendbarkeit getestet. Ebenso wurde dort die Operationsmethode für die Durchführung der *In-vivo*-Studie entwickelt und standardisiert. Die Operation und Unterbringung der Tiere erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung der LMU München. Die histologische Aufarbeitung der Präparate fand in den Laboren der Anatomischen Anstalt, Lehrstuhl Anatomie I, LMU München statt.

2.1. Trägermaterialien

Alle Arbeitsschritte sowie die Materialauswahl für die Herstellung artifizierender Knochenersatzmaterialien erfolgten in Anlehnung an beziehungsweise als Fortführung bereits früher durchgeführter Kooperationsprojekte zwischen der ExperiMed und caesar. Unter Berücksichtigung der genannten Aspekte wurden die Arbeiten zur Herstellung geeigneter Trägermaterialien am Wissenschaftszentrum caesar in Bonn von Herrn Professor Hermann Seitz durchgeführt, die biologische Testung in der Zellkultur erfolgte im Labor der ExperiMed in München.

2.1.1. Herstellungsverfahren

Ein schichtweise aufbauendes Verfahren, das sogenannte 3-D-Drucken, wurde für die Herstellung der Trägermaterialien verwendet. Bei diesem Verfahren kann eine genaue Definition der inneren sowie äußeren Strukturen vorgegeben werden. Alle Arbeitsschritte wurden am Forschungszentrum caesar optimiert und verschiedene

Strukturen für die spätere Testung im Defektmodell generiert (zylinderförmige Leitschienen mit einem Außendurchmesser von 3 x 6 mm) Die Modelle wurden *in vitro* verschiedenen Zellbesiedelungsversuchen (s. Kapitel 2.2.2-2.2.5) unterzogen und die dort gewonnenen Erkenntnisse für eine Optimierung der Trägermaterialien genutzt.

2.1.2. Strukturgenerierung

Das 3-D-Druckverfahren erlaubt die Herstellung von Modellen direkt aus Computerdaten. Verfahrenstechnisch sind lediglich materialbedingte Mindestgrößen limitierend, die sich aus der Granulatstruktur der verwendeten Pulver ergeben. Verschiedene Leitschienen mit unterschiedlichen Feinstrukturen wurden von der Stiftung caesar im Vorfeld der *In-vivo*-Studie hergestellt und zellbiologischen Untersuchungen in der ExperiMed zugeführt. Die Auswahl der für den Tierversuch zum Einsatz kommenden Strukturen basierte auf den *in vitro* gewonnenen Ergebnissen mit besonderem Augenmerk auf die Stabilität und Besiedelungseffizienz der Bauteile.

2.1.2.1. Erstellung des Datensatzes

Das Design der Trägermaterialien erfolgte mittels RP-Software Magics (Fa. Materialise). Die Scaffolds waren zylinderförmig, die Höhe betrug 7,92 mm und der Durchmesser 5,06 mm. Nach der Sinterung der Materialien entsprachen die Außenmaße der Zylinder einer Höhe von 6 mm sowie einem Durchmesser von 3 mm (s. Abb. 5). Das Einbringen der Kanalstrukturen erfolgte über ein patentiertes Softwaretool (caesar) (Seitz et al. 2005b). Es wurden Kanaldurchmesser von 0,88 mm und Stegdurchmesser von 0,66 mm gewählt, die Kanäle waren in x-Richtung im 45° Winkel zur Grundfläche angeordnet. Die mit dieser interkonnektierenden Innenstruktur hergestellten Bitmaps wurden vom 3-D-Drucker schichtweise verarbeitet.

2.1.2.2. Granulatherstellung und 3-D-Drucken

Zur Granulatherstellung wurde ein Schlicker aus Hydroxylapatit (Fa. Merck) sprühgetrocknet (Miniglatt-Granulator, Eigenumbau von Batch-Prozess auf

kontinuierlichen Prozess, Fa. Glatt). Der mittlere Partikeldurchmesser betrug $22\ \mu\text{m}$ (Nikon, Düsseldorf beziehungsweise Analysis-Software, Fa. Soft Imaging System GmbH). Zur Herstellung der Scaffolds wurde ein 3-D-Drucker (Voxeljet) verwendet. Die eingestellte Schichtdicke betrug $220\ \mu\text{m}$ und der Tropfenabstand (Punktabstand) in x- und y-Richtung $220\ \mu\text{m}$. Das entspricht einer Druckauflösung von 115,45 dpi. Als Binderkomponente wurde ein Binder auf Polymerbasis verwendet (caesar). Zum 3D-Drucken wurde eine dünne Schicht Granulat auf die Bauplattform aufgetragen. Mittels einer Recoaterklinge wurde das Granulat aufgebracht. Es folgte eine Zerlegung des 3-D-Datensatzes in Bitmaps, welche in der Folge schichtweise gedruckt wurden. Nach jeder gedruckten Schicht wurde die Bauplattform um den Betrag der Schichtdicke ($220\ \mu\text{m}$) abgesenkt und neues Granulat mit der Recoaterklinge aufgebracht, bevor die nächsten Schichten gedruckt wurden. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt, bis alle Bitmaps gedruckt waren. Zum Schluss wurde die Bauplattform nach oben gefahren, nach einer Trocknungszeit von 12 h konnte die Leitschiene entnommen werden. Die Kanalstrukturen wurden mittels leichtem Druckluftstrahl ausgeblasen (1,5 bar). Zur Materialverfestigung folgte ein Sinterschritt, wobei gleichzeitig die Binderkomponenten (Carbolite) entfernt wurden. Die Sintertemperatur betrug $1250\ ^\circ\text{C}$, die Sinterdauer (bei Endtemperatur) 2 h. Der resultierende Sinterschrumpf lag bei ca. 20 – 25 % (18 % in der Höhe, 25,7 % im Durchmesser).

2.1.2.3. Charakterisierung

Zur Charakterisierung der Scaffolds wurde die spezifische Oberfläche mittels BET-Messung durchgeführt (ASAP2010, Micromeritics, Kryptongas, Auftragsanalytik beim IKTS Dresden). Zur Bestimmung des mittleren Porendurchmessers, des Mikroporendurchmessers sowie der Makroporosität und der Mikroporosität wurde eine Untersuchung mittels Quecksilber-Pososimeter durchgeführt (Autopore IV, Micromeritics, Auftragsanalytik beim IKTS Dresden). Die Bestimmung der Kaltdruckfestigkeit erfolgte mittels Universalprüfmaschine mit einer Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min (Zwick).

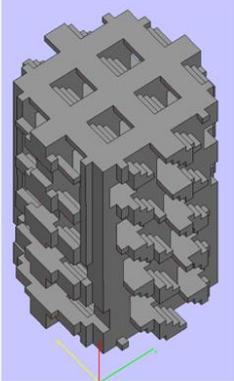
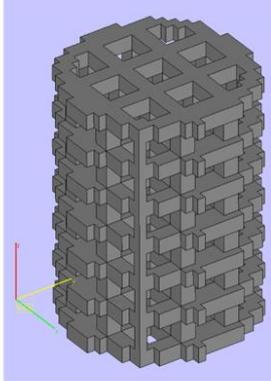
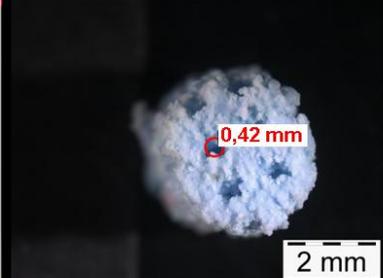
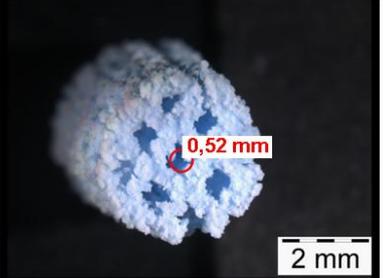
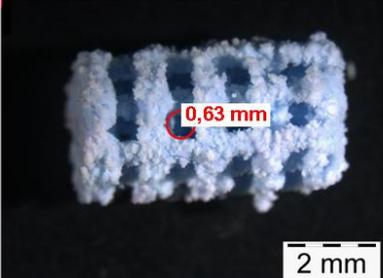
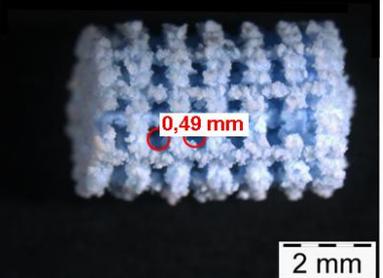
	V23 a	V26a
Version		
Parameter		
Screenshots		
Konstruktionsmaße Stegbreite / Lochdurchmesser	0,66 / 0,88	0,48 / 0,96
Stegbreite / Lochdurchmesser nach Sintern (mm)*	0,51 / 0,58	0,37 / 0,75
3-D-Struktur Aufsicht		
3-D-Struktur Seitenansicht		
Winkel (Loch) in x- Richtung	45	90
Winkel (Loch) in y- Richtung	90	90

Abb. 5. Beispieldatenblatt zur Konstruktgenerierung: Vergleich zweier Leitschienenversionen mit unterschiedlicher Kanalstruktur und Porosität. Beachte vor allem Unterschiede in den Stegbreiten und in der Makroporosität.

Alle nachfolgend beschriebenen Manipulationen an den Zellen wurden auf einer Sterilbank durchgeführt, welche durch einen stetigen laminaren Luftstrom steriles Arbeiten gewährleistet. Ebenso wurden alle verwendeten Materialien, Lösungen und Medien stets steril verwendet.

2.2. Verwendete Zellen

Für die Durchführung der Versuche wurden kommerziell erhältliche humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) von der Firma Cambrex (seit 2007 Lonza) verwendet. Diese wurden unter standardisierten Bedingungen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Knochenmark gesunder Spender isoliert. Durch Überprüfung spezifischer Oberflächenmarker (positiv für CD105, CD166, CD29 und CD44 sowie negativ für CD14, CD34 und CD45) sowie Differenzierbarkeit in adipogene, chondrogene und osteogene Richtung wurde der Stammzellcharakter nachgewiesen (www.lonzabioscience.com). Damit entsprechen diese Zellen den Minimalanforderungen für mesenchymale Stammzellen (Dominici et al. 2006). Für alle Versuchsreihen wurden Zellen des gleichen Spenders (Donor XII) im gleichen Kultivierungsstadium (5. bis 6. Zellkulturpassage) verwendet.

2.2.1. *In-vitro*-Kulturbedingungen

Für alle nachfolgenden Versuche wurden die Zellen zunächst als Monolayer in einem Inkubator bei 37 °C, 5 %iger CO₂-Atmosphäre und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und expandiert. Das Kulturmedium „minimal essential medium alpha“ (α-MEM, Fa. Gibco) mit Glutamax I (Zusätze: Ribonukleotide, Desoxyribonukleotide) wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) sowie 40 IU/ml Penicillin beziehungsweise Streptomycin versetzt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in einer Konzentration von ca. 0.2×10^5 je cm² Grundfläche in 225 cm² großen Kulturflaschen angesetzt. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 60 % wurden die Zellen passagiert (s. Anhang, Protokoll 1).

2.2.2. Besiedelungsstrategie

Die Leitschienen wurden über Nacht (12 h) mit FKS bei +37 °C im Brutschrank inkubiert. Eine Zellsuspension mit $0,5 \times 10^6$ Zellen in 300 µl wurde auf die in 1,5 ml Reagenzgefäße befindlichen Leitschienen pipettiert. Durch mehrfaches Umdrehen der geschlossenen Gefäße wurden sedimentierte Zellen erneut aufgewirbelt und mit der Leitschienenoberfläche wiederholt in Kontakt gebracht. Dieser Vorgang des mehrfachen Umdrehens der Trägermaterialien in den Reagenzgefäßen wurde innerhalb der ersten 2 Stunden jeweils alle 20 Minuten, in der 3. bis 6. Stunde einmal

pro Stunde wiederholt. Nach 6 Stunden konnte die Leitschiene in ein Kulturgefäß unter Zusatz von 10 ml frischem Medium überführt werden. Entsprechend dem Versuchsplan wurden die präparierten Leitschienen am folgenden Tag implantiert, beziehungsweise über einen Zeitraum von drei Wochen unter Zugabe osteogenen Stimulationsmediums (siehe unten) in Kultur gehalten. In diesem Fall erfolgte der Mediumwechsel regelmäßig alle 3 Tage.

2.2.3. Überprüfung der Besiedlungseffizienz

Um festzustellen, wie viele der ursprünglich in Suspension befindlichen Zellen auf der Leitschiene verblieben, wurde dies an je zwei Leitschienen der Strukturen V23 und V26 überprüft. Hierzu wurden die auf den Leitschienen befindlichen Zellen lysiert und der Gehalt an genomischer DNA gemessen (s. Anhang, Protokoll 2). Für diese Versuche wurden die Mauszelllinie MC3T3-E1 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwendet. Durch Korrelation mit einer Eichkurve, die Aufschluss über den DNA-Gehalt des verwendeten Zelltyps gab, konnte anhand der gemessenen Werte auf die Besiedlungseffizienz geschlossen werden.

2.2.4. Zellvitalitätstest

Eine kombinierte Färbung der besiedelten Zellen mit einer Färbelösung aus Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat („live-dead-assay“, s. Anhang, Protokoll 3) erlaubte eine Überprüfung der Vitalität der hMSCs. Im Fluoreszenzmikroskop kann in der Folge eine markante Grünfärbung vitaler Zellen sichtbar gemacht werden, tote Zellen hingegen stellen sich rot dar.

2.2.5. Überprüfung der Zellbesiedlung

Nach Entnahme aus der Zellkultur mit anschließender Fixierung der Zellen wurden die Zell-Matrix-Konstrukte zur qualitativen Beurteilung der Zellverteilung mit Methyleneblau gefärbt (s. Anhang, Protokoll 4).

2.2.6. Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung von hMSC nach Jaiswal (Jaiswal et al. 1997) erfolgte im 3-D-System nach Adhärenz auf den Leitschienen in differenzierendem Medium: Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Fa. Gibco) mit 4,5 g/l Glucose (high glucose), 10 % FKS, 40 IU/ml Penicillin beziehungsweise Streptomycin, 100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat, 50 μ M L-Ascorbinsäure. Der quantitative Nachweis der mRNA-Expression eines typischen Markers der osteogenen Kaskade (alkalische Phosphatase, ALP) wurde mittels quantitativer RT-PCR im lightcycler (Fa. Roche) geführt. Für diesen Nachweis wurden Leitschienen jeweils mit hMSC besiedelt und mit osteogenen Stimulierungszusätzen bis zu drei Wochen unter statischen Kulturbedingungen kultiviert. Als Kontrollen wurden Leitschienen ohne osteogen stimulierende Zusätze zeitgleich in Kultur gehalten und ebenfalls getestet. Um die erfolgreiche osteogene Stimulation nachzuweisen, erfolgte die Aufarbeitung der Proben in mehreren Arbeitsschritten, die im Einzelnen in der Folge dargestellt werden.

2.2.6.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung und Reinigung von RNA aus den Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit[®] von Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Lyse der adhärennten Zellen fand direkt auf den Trägermaterialien statt. Nach Abpipettieren des Zellkulturmediums und Waschen der Konstrukte mit PBS wurde der Lysepuffer hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Lysat zur Homogenisierung auf eine QiaShredder-Säule pipettiert und Spuren genomischer DNA wurden durch Verdau mit RNase-freien-DNase-Sets (Fa. Qiagen) entfernt. Die Elution erfolgte in 50 μ l RNase-freiem Wasser. Bei nicht direkt im Anschluss erfolgender Weiterverarbeitung der Proben wurde die RNA für kurze Zeit (bis 4 Wochen) bei -20 °C, beziehungsweise bei längeren Aufbewahrungszeiten bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription wurde mit der reversen Transkriptase des aviären Myeloblastosis-Virus (AMV) durchgeführt. Es wurde das Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis Kit[®] von Invitrogen (Fa. Invitrogen) verwendet. In diesem Kit sind Random-Hexamer-Primer bereits enthalten. Den Herstellerangaben folgend wurden

die Reaktionen in einem PCR-Thermocycler durchgeführt (mit 50 minütiger Synthesephase bei 50°C). 1 µg RNA wurde für die Synthese der cDNA eingesetzt. Nicht unmittelbar für die PCR verwendete cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.6.3. Quantitative PCR-Analyse

Bei der quantitativen PCR-Analyse in Echtzeit (*engl.*: real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) handelt es sich um eine Standardmethode zur Quantifizierung von Gen-Expressionsstärken nach der reversen Transkription (RT) von mRNA in komplementäre DNA (cDNA). In dieser Studie wurde eine Methode verwendet, bei der während der PCR der fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green in die entstehenden Produkte eingelagert wird. Die Intensität der Fluoreszenz wird in jedem Zyklus der PCR gemessen und verhält sich proportional zur Menge des gebildeten Produkts. Der Vergleich mit der Standardkurve ermöglicht eine absolute Quantifizierung der ursprünglich in der Probe enthaltenen Kopienanzahl der zu untersuchenden cDNA.

Für die quantitative PCR mittels LightCycler II wurden speziell entwickelte und optimierte Primersets von der Firma Search-LC erworben. Die Primer sind gebrauchsfertig für die Verwendung mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Mix[®]. In dieser Arbeit wurden folgende Primersets verwendet:
Humane Glutaraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH, Fa. Search LC)
Alkalische Phosphatase (ALP, Fa. Search LC)

Die cDNA wurde in einem Verhältnis 1:100 verdünnt und normiert in Bezug auf die eingesetzte RNA-Menge. Optimierte Primersets für die Detektion von GAPDH und ALP mit den zugehörigen Protokollen wurden in Verbindung mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Mix[®] verwendet. Für jedes Primerpaar wurde ein Mastermix hergestellt, welcher 6 µl hochreines PCR-Wasser, 2 µl Primermix und 2 µl SYBR Green Mix pro Reaktion enthielt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl pro LightCycler-Glaskapillare, bestehend aus 10 µl verdünnter cDNA und 10 µl Mastermix. Um adäquate Referenzwerte zu haben, wurde für jeden Primer stets eine Standardkurve generiert, die auf einer 10-fachen Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:1000 des im Primerset enthaltenen Standards basierte.

Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten, wurde die Zielsequenz amplifiziert. Dies erfolgte mit 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 10 Sekunden, Primeranlagerung für 10 Sekunden bei anfänglich 68 °C mit einem Wechsel auf 58 °C in Schritten von 0,5 °C pro Zyklus. Am Ende des Elongationsschrittes (16 Sekunden bei 72°C) erfolgte die Messung der Fluoreszenz. Die Geschwindigkeit des Temperaturwechsels zwischen den Schritten betrug 20°C pro Sekunde.

Die Spezifität des Signals wurde im Anschluss mittels einer Schmelzkurvenanalyse überprüft. Dafür wurden die Proben nach den 45 Zyklen erneut bei 95 °C denaturiert, sofort auf 58 °C für 10 Sekunden abgekühlt und mit einer Geschwindigkeit von 0,1 °C pro Sekunde auf 95 °C aufgeheizt. Die Schmelzkurve wurde durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung während des Aufheizens generiert.

Die ausgegebenen Absolutwerte der Expressionsstärke von ALP jeder Probe wurden mit dem korrespondierenden GAPDH-Gehalt normalisiert und die Werte als Relativwerte gezeigt.

2.3. Biologische Implantate

Als Referenz für die neu zu entwickelnden synthetischen Materialien wurden biologische Tutobone[®]-Leitschienen aus azellularisierter boviner Knochenspongiosa verwendet (Fa. Tutogen). Diese durch Lösungsmittel konservierten und mit γ -Strahlen sterilisierten dreidimensionalen Leitschienen sind klinisch zugelassen. Die Feinstruktur ist allerdings vorgegeben und kann nicht individuell variiert werden. Für den vorliegenden Versuch wurden runde Zylinder mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Höhe von 6 mm hergestellt. Das Wachstumsverhalten humaner mesenchymaler Stammzellen auf diesem Material ist bereits umfassend in der Arbeitsgruppe untersucht worden (Schieker et al. 2004, Seitz et al. 2007). Die Zellbesiedelung erfolgte in gleicher Weise wie für die caesar-Leitschienen beschrieben. Das Differenzierungsverhalten von Zellen auf dem Trägermaterial wurde ebenfalls in einem Verfahren analog zu dem bei den synthetischen Leitschienen beschriebenen überprüft.

2.4. Fixationssysteme

2.4.1. Auswahl geeigneter Fixationssysteme

In die nähere Auswahl der Versuche kamen drei Fixationssysteme (s. Abb. 6). Für die interne Fixation wurden Titanplatten aus dem Handchirurgieset der Firma Stryker ausgewählt. Mit der Auswahl einer 6-Loch-Platte (Länge 23 mm, Dicke 0,5 mm, Breite 3 mm) kamen je zwei Schraubenlöcher proximal beziehungsweise distal eines 6 mm großen Defektes zu liegen. Die Fixierung erfolgte mit vier selbstschneidenden Gewindeschrauben von 1,2 mm Durchmesser (Kerndurchmesser 0,8 mm). Für die externe Fixation wurde ein eigenes Modell entworfen und mit der Forschungstiftung caesar generiert. Zusätzlich wurde ein in der veterinärmedizinischen Praxis übliches Verfahren zur extrakutanen Schienung mit Polymethylmetacrylat (PMMA) getestet. Hierbei werden Kirschner-Drähte extrakorporal durch den Kunststoff verbunden. Im vorliegenden Fall wurden Gewindebohrdrähte mit einem Durchmesser von 1,2 mm verwendet (Fa. Heiland).

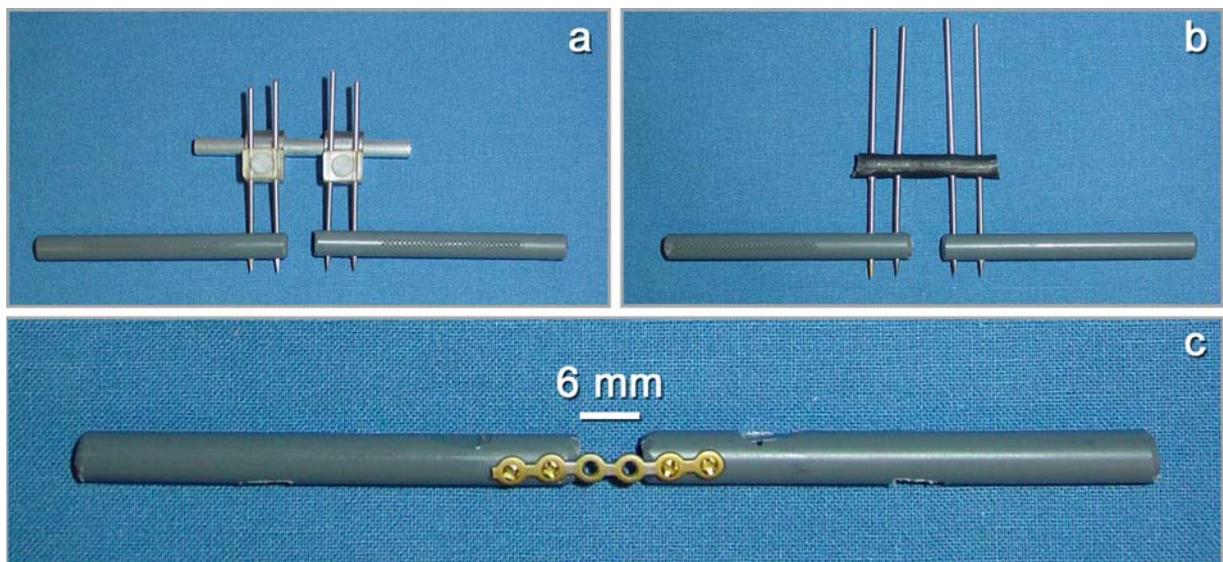


Abb. 6. Drei Fixationssysteme für die interne (Titanplatte) beziehungsweise externe (externe Fixateure) Stabilisierung segmentaler Knochendefekte im Rattenfemur. a) Selbstentwickelter Klammerfixateur, hergestellt mit Stereolithographieverfahren. b) Intraoperativ herzustellender Fixateur externe aus PMMA. c) Titanplatte aus dem Handchirurgieset der Firma Stryker.

2.4.2. Entwicklung eines Fixateur externe

Gemäß den in Kapitel 1.1.3.1 dargestellten Anforderungen an Fixationssysteme zur Fraktur- beziehungsweise Defektversorgung wurde in Anpassung an die Größenverhältnisse der Ratte ein Fixateur externe entworfen (s. Abb. 7) und mittels Stereolithographieverfahren hergestellt. Bei diesem Produktionsverfahren werden die Bauteile durch Aushärtung eines Polymerkunststoffes mittels eines Lasers geformt. Die Struktur basiert dabei auf computerprogrammierten Datensätzen. Hinsichtlich der Auswahl der verwendeten Materialien wurde auf ein möglichst geringes Gewicht der Bauteile geachtet, um die Belastung der Tiere durch Tragen des Fixationssystems so gering wie möglich zu halten. Die Haltebacken wurden dementsprechend aus einem leichten Kunststoffmaterial gefertigt. Die Querstrebe aus Aluminium maß 45 mm in der Länge mit einem Durchmesser von 4 mm. Durch Abflachung der Verbindungsstrebe sowie der Halterungen an einer Seite wurde zusätzliche Rotationsstabilität erreicht. Dies resultiert in einer Verkeilung der Bauteile im Falle von Rotationsbewegungen und verhindert somit eine Achsabweichung.

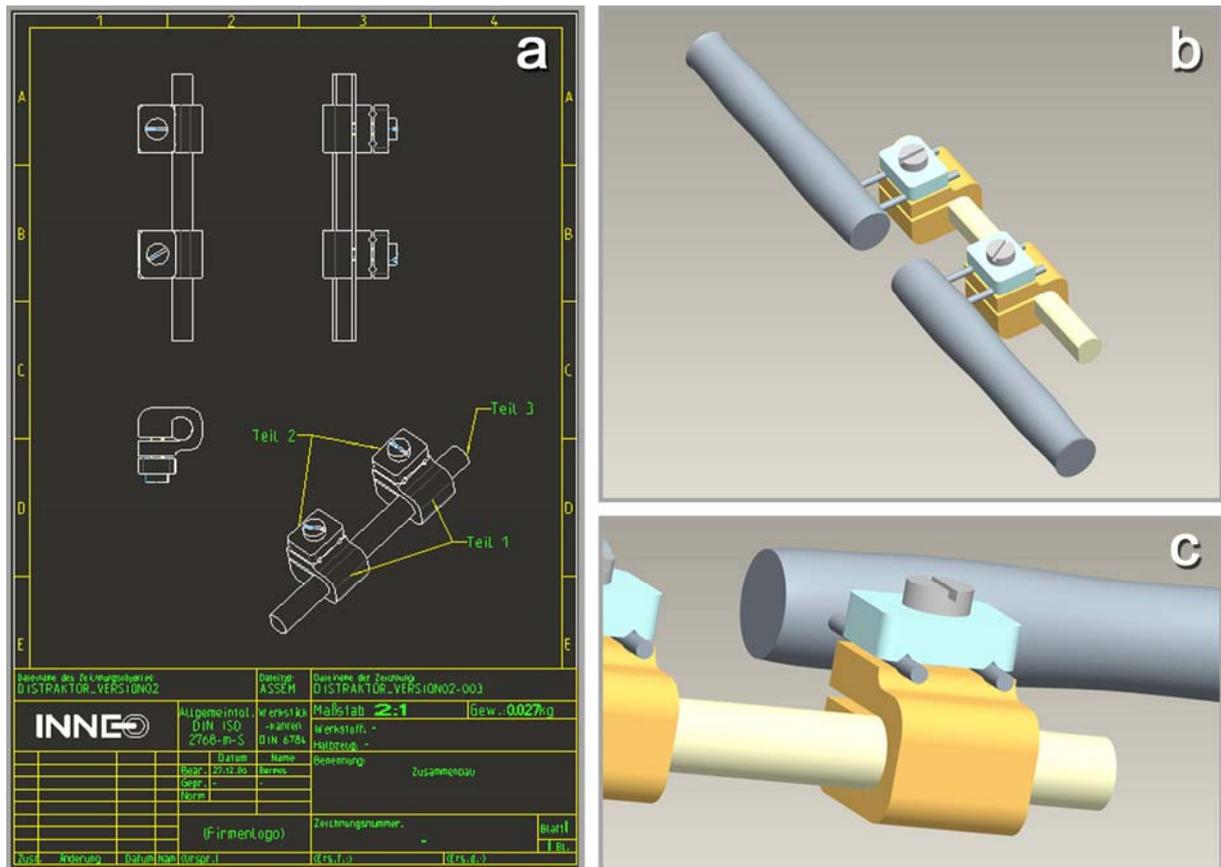


Abb. 7. Konstruktionsdatenblatt zur Herstellung eines externen Fixateurs durch ein Stereolithographieverfahren. a) Technische Zeichnung. b) Computergestützter Strukturentwurf. c) Detailaufnahme der Klammerfixation.

2.4.3. Mechanische Testung ausgewählter Systeme

Mit den mechanischen Tests sollte die Biegesteifigkeit der getesteten Fixationssysteme festgestellt werden. Durchgeführt wurden Torsions-, Zug- und Drucktests sowie Vier-Punkt-Biegeversuche. Um hinsichtlich der Ergebnisse der biomechanischen Testung eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle Fixationssysteme auf PVC-Kunststoffwellen aufgebracht (Durchmesser 5 mm). Zur weiteren Sicherung der Reproduzierbarkeit wurde eine Bohrschablone hergestellt, die Schrauben- beziehungsweise Drahtabstände in immer gleicher Weise gewährleistet. Alle Abstände wurden dabei so gewählt, dass die Situation den Größenverhältnissen *in vivo* möglichst präzise nachempfunden war. Die Distanz von den Defektenden bis zu den defektnahen Drähten beziehungsweise Schrauben maß 3 mm, der Abstand zwischen den Drähten (Schrauben) einer Seite betrug 5 mm. Für die externen Fixationssysteme wurde das „offset“, also der Abstand zwischen der Verbindungsstrebe und der Hautoberfläche, auf 9 mm festgelegt. Die Tests wurden

mit einer Materialprüfmaschine Zwick/Roell Z010 (Fa. Zwick) durchgeführt. Von jedem System wurden je fünf Testkörper für die Kompressions-, Vier-Punkt-, und Torsionstests angefertigt. Die Kompressionstests wurden uniaxial, die Vier-Punkt-Biegeversuche in zwei Ebenen durchgeführt (beide am gleichen Testkörper). Hierbei entsprach für alle Konstrukte die äußere Lastauflage 60 mm und die innere 24 mm. Eine Ausrichtung der Testkörper erfolgte derart, dass in einem ersten Belastungsschritt die Kraft von der dem Fixationssystem gegenüberliegenden Seite ausgeübt wurde (0°). In einem zweiten Test wurden die Testkörper um 90° gedreht, so dass eine Belastung von der Seite erfolgte (90°). Zur Testung der Torsionssteifigkeit wurde eine Kraft im Uhrzeigersinn mit einer Geschwindigkeit von 1° pro Sekunde ausgeübt bis zu einer maximalen Deformation von 60° . Mit Ausnahme des 0° -Biegetests, bei dem eine Linearitätsabweichung der Spannungs- und Dehnungskurve als Abbruchkriterium gewählt wurde, wurden die übrigen Tests bis zu einer Destruktion der Probenkörper durchgeführt.

Für jeden Belastungstypus wurden fünf Testläufe durchgeführt und die durchschnittlichen Steigungen der linearen Abschnitte der Belastungskurven beurteilt. Bei den Biegeversuchen wurde die Steifigkeit der Probenkörper in Nmm^2 ermittelt, bei den Kompressionstests hingegen in N/mm . Die Torsionssteifigkeit wurde in Nm/deg berechnet. Deskriptive statistische Analysen wurden mit SigmaPlot 8,0 durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels student's t-test berechnet und angenommen, wenn $p < 0,05$.

2.5. *In-vivo*-Testung

2.5.1. Versuchstiere

Das Versuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TSchG) der Regierung von Oberbayern zur Genehmigung vorgelegt und bewilligt (amtliches Aktenkennzeichen 02-06). Alle Eingriffe an Tieren wurden unter strikter Berücksichtigung der geltenden Rechtsbestimmungen (TSchG in der Fassung vom 18. Mai 2006) durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden speziell für Versuchszwecke gezüchtet und von einer zugelassenen Firma (Harlan Winkelmann) bezogen. Als

Versuchstiere gingen insgesamt 69 weibliche athyme Nacktratten (rnu/rnu) in einem Alter von 10 – 12 Wochen (Lebendgewicht ca. 240 g) in den Versuch ein.

Die Haltung der Ratten erfolgte in Standardkäfigen aus Makrolon Typ 1500 (Tecniplast, Italien) mit einer Besatzdichte von drei bis vier Tieren je Käfig. Die gesamte Haltung erfolgte in sogenannten IVC-Käfigsystemen (individually ventilated cages) in klimatisierten Räumen (20 – 25 °C Raumtemperatur, relative Luftfeuchte 60 – 70 %, Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden mit Dämmerungsphase). Futter (Alleinfuttermittel „Haltung“ von Fa. sniff) und Wasser wurden ad libitum angeboten. Als Einstreu wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) LIGNOCEL Naturfaser-Compounds (Fa. J. Rettenmaier & Söhne) verwendet. Vor Besatz der Käfige wurden diese, ebenso wie Einstreu, Futter und Wasser autoklaviert. Eine Umsetzung der Tiere erfolgte im Wochenrhythmus. Alle Räume waren speziell für die Tierhaltung (gem. § 11 Abs. 1 Nr. 1 TSchG) zugelassen und die artgerechte Pflege wurde von ausgebildetem Tierpflegepersonal gewährleistet. Neben der täglichen Kontrolle durch die den Versuch durchführenden Personen wurden die Tiere regelmäßig dem Tierschutzbeauftragten der Universität vorgestellt. Für die Nutzung der gesamten Anlage gelten generell eine personenlimitierte Zutrittskontrolle und hohe Hygienestandards, die das Anlegen spezieller Schutzkleidung bei Betreten der Haltungs- und Operationsräume vorschreiben. Zur Überprüfung des Hygienestatus werden im Betrieb vierteljährlich Sentineltiere mikrobiologisch untersucht um sicherzustellen, dass die Tiere nicht an Erkrankungen leiden, die die Versuchsergebnisse beeinflussen könnten. Nach Anlieferung der Tiere für die aktuelle Studie durchliefen diese eine Akklimatisationszeit von zwei Wochen vor Beginn der Versuche.

2.5.2. Gruppeneinteilung

In dem *In-vivo*-Abschnitt der hier vorgestellten Studie wurden die Ergebnisse der Vorversuche auf die Situation im Tier übertragen. Es erfolgte die Etablierung eines geeigneten orthotopen Defektmodells für die intravitale Testung der zuvor entworfenen und getesteten Knochenersatzmaterialien. In einem ersten Studienabschnitt wurden die Tiere in sechs Versuchsgruppen mit jeweils sieben Tieren eingeteilt (Tab. 2). Die Tiere wurden hier über einen postoperativen Zeitraum

von 2 Wochen nachbeobachtet. In einem zweiten Studienabschnitt wurde eine analoge Gruppeneinteilung gewählt, der Nachbeobachtungszeitraum betrug jedoch 12 Wochen (Tab. 2). Diese Untersuchungen erfolgten im Sinne einer Orientierungsstudie, so dass lediglich eine Gruppengröße von drei Tieren gewählt wurde. Zusätzlich und als „proof of principle“ für die gewählte Defektgröße als Defekt kritischer Größe wurden 4 Tiere ohne Implantation eines Knochenersatzmaterials über einen Zeitraum von zwölf Wochen beobachtet.

Tab. 1 Gruppeneinteilung der Tiere für die orthotope Implantation verschiedener Knochenersatzmaterialien mit einem Nachbeobachtungszeitraum von 2 Wochen.

Gruppe	Implantat	Zellen	Tiere	Zeitraum
1	caesar	-	7	2 Wochen
2	caesar	hMSC undiff.	7	2 Wochen
3	caesar	hMSC osteog. stim.	7	2 Wochen
4	Tutobone®	-	7	2 Wochen
5	Tutobone®	hMSC undiff.	7	2 Wochen
6	Tutobone®	hMSC osteog. stim.	7	2 Wochen
7	-	-	5	2 Wochen

Tab. 2 Gruppeneinteilung der Tiere für die orthotope Implantation verschiedener Knochenersatzmaterialien mit einem Nachbeobachtungszeitraum von 12 Wochen.

Gruppe	Implantat	Zellen	Tiere	Zeitraum
8	caesar	-	3	12 Wochen
9	caesar	hMSC undiff.	3	12 Wochen
10	caesar	hMSC osteog. stim.	3	12 Wochen
11	Tutobone [®]	-	3	12 Wochen
12	Tutobone [®]	hMSC undiff.	3	12 Wochen
13	Tutobone [®]	hMSC osteog. stim.	3	12 Wochen
14	-	-	4	12 Wochen

2.5.3. Operatives Vorgehen

Für die Anästhesie kam eine Kombination aus Medetomidin (α -2-Agonist), Midazolam (Benzodiazepin) und Fentanyl (Opioid) zum Einsatz. Die Kombination wurde unverdünnt in einer Mischspritze intramuskulär appliziert (s. Tab. 3).

Zur Antagonisierung der MMF-Kombinationsnarkose wurde eine Mischung aus Atipamezol und Flumazenil subkutan verabreicht (s. Tab. 3).

Tab. 3 Eingesetzte Narkosemischung und Antagonisierung.

	Wirkstoff	Konzentration
Narkose		
	Medetomidin	0,15 mg/kg
	Midazolam	2 mg/kg
	Fentanyl	0,005 mg/kg
Antagonisierung		
	Atipamezol	0,75 mg/kg
	Flumazenil	0,2 mg/kg

Bei allen Versuchsreihen erhielten die Tiere bis unmittelbar vor dem Eingriff freien Zugang zu Futter und Wasser. Um die Stressbelastung so gering wie möglich zu halten, erfolgte die präanästhetische Handhabung ruhig und beschränkte sich auf eine adspektorische Untersuchung zur Feststellung der Narkosetauglichkeit sowie die Gewichtsbestimmung. Die Zuteilung zu den unterschiedlichen Versuchsgruppen gestaltete sich nach einem vorab festgelegten Randomisierungsschema. Nach intramuskulärer Applikation des Narkosegemisches wurden die Tiere bis zum Wirkungseintritt in leere Käfige gesetzt. Die Vorbereitung für die Operation fand nach Verlust der Stellreflexe statt. Durch sofortige Aufbringung von Augensalbe (Bepanthen[®], Fa. Roche) konnte eine Schädigung der Cornea durch Austrocknung verhindert werden. Vom Lendenwirbelbereich kaudal wurden beide Hinterbeine geschoren, gereinigt und mit Hautdesinfektionsmitteln vorbereitet (Octenisept, Kodan, Fa. Schülke & Mayr). Die Lagerung zur Operation erfolgte nach Abschluss der Vorbereitung in linker Seitenlage auf dem Operationstisch auf einer elektrisch beheizbaren Unterlage. Eine Sauerstoffmaske mit einer Durchflussrate von 2,0 l/min gewährleistete während der Narkose eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere. Das gesamte Operationsfeld wurde steril abgedeckt und lediglich die zu operierende (rechte) Hintergliedmaße durch ein Lochtuch zugänglich gemacht.

Der Zugang zum Femurschaft erfolgte so groß, dass es zu einer vollständigen Darstellung des Os femoris mit Sicht auf das Hüft- und Kniegelenk kam. Der Hautschnitt verlief vom Trochanter major entlang der Vorderkante des Os femoris bis zum Kniegelenk. Die oberflächliche Faszie, das interfasziale Fettgewebe und die tiefe Faszie wurden in gleicher Länge am kranialen Rand des M. biceps femoris durchtrennt. Nach Spreizen der Wundränder konnte der M. vastus lateralis vom Knochen gelöst und mit einem Spreizer nach kranial gezogen werden. Eine Stillung der bei diesem Präparationsschritt möglichen Blutung aus den Muskelästen der A. und V. femoralis im distalen Schnittbereich erfolgte durch Koagulation. Das Spreizen der Mm. biceps femoris und vastus lateralis gewährleistete eine gute Übersicht über die laterale Fläche des Femurschaftes. Um eine möglichst weitreichende Weichteilschonung bei Herausfräsen des Defekts sicherzustellen, wurde nach kranial der M. vastus intermedius mobilisiert und das Operationsfeld durch subperiostales Abheben der Mm. adductores erweitert. Als nächster operativer Schritt wurde die Platte durch sukzessives Einbringen der vier Schrauben kranial lateral angebracht. Eine Vorbohrung erfolgte mit einem 0,8 mm Bohrer, dem Kerndurchmesser der selbstschneidenden Gewindeschrauben entsprechend. An die derart sichergestellte physiologische Rekonstruktion des Knochens schloss sich das Herausfräsen eines 6 mm messenden Knochensegments an. Dies wurde mit einer Diamantfräse unter permanenter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Im Anschluss wurde die Platte durch Anziehen der Schrauben endgültig fixiert, und gemäß dem Versuchsplan wurden die entsprechenden Implantate eingesetzt. Diese wurden mit einem resorbierbaren Faden (6-0 Vicryl®) an der Titanplatte fixiert. Im Falle einer für die Leitschienen nicht ausreichenden Defektgröße wurde an den Knochenenden, wiederum unter Kühlung, nachgefräst. An die Platzierung des Ersatzimplantats schloss sich die schichtweise Adaptation der tiefen Wundränder in Einzelknopfnah mit resorbierbarem Nahtmaterial (6-0 Vicryl®) an. Die Haut wurde mit nichtresorbierbarem Material (5-0 Prolene®) ebenfalls in Einzelknopfnah verschlossen. Eine postoperative Bewegungseinschränkung der Tiere war nicht möglich. Die Tiere wurden im Verlauf der ersten postoperativen Woche täglich klinisch untersucht, danach erfolgte eine Visite zweimal wöchentlich. Eine Schmerztherapie wurde mit Meloxicam über vier Tage durchgeführt (0,2 mg/kg KGW s. c.). Jede Ratte blieb für fünf Tage in Einzelhaltung, um gegenseitige Verletzungen oder Manipulationen an der Operationswunde zu vermeiden. Danach wurden die

ursprünglichen Gruppen von drei bis vier Tieren wieder hergestellt. Es wurde darauf geachtet, die gleichen Individuen zusammenzusetzen, die auch schon vor den Operationen Gruppen gebildet hatten.

Da bei den Kontrolltieren mit Leerdefekt die volle Last von den Fixationssystemen übernommen werden musste, erfolgte für diese Tiere die Stabilisation mit zwei übereinandergelegten Titanplatten, um ein Implantatversagen durch Überlastung zu vermeiden. Der übrige Ablauf des operativen Vorgehens entsprach exakt dem der übrigen Tiere.

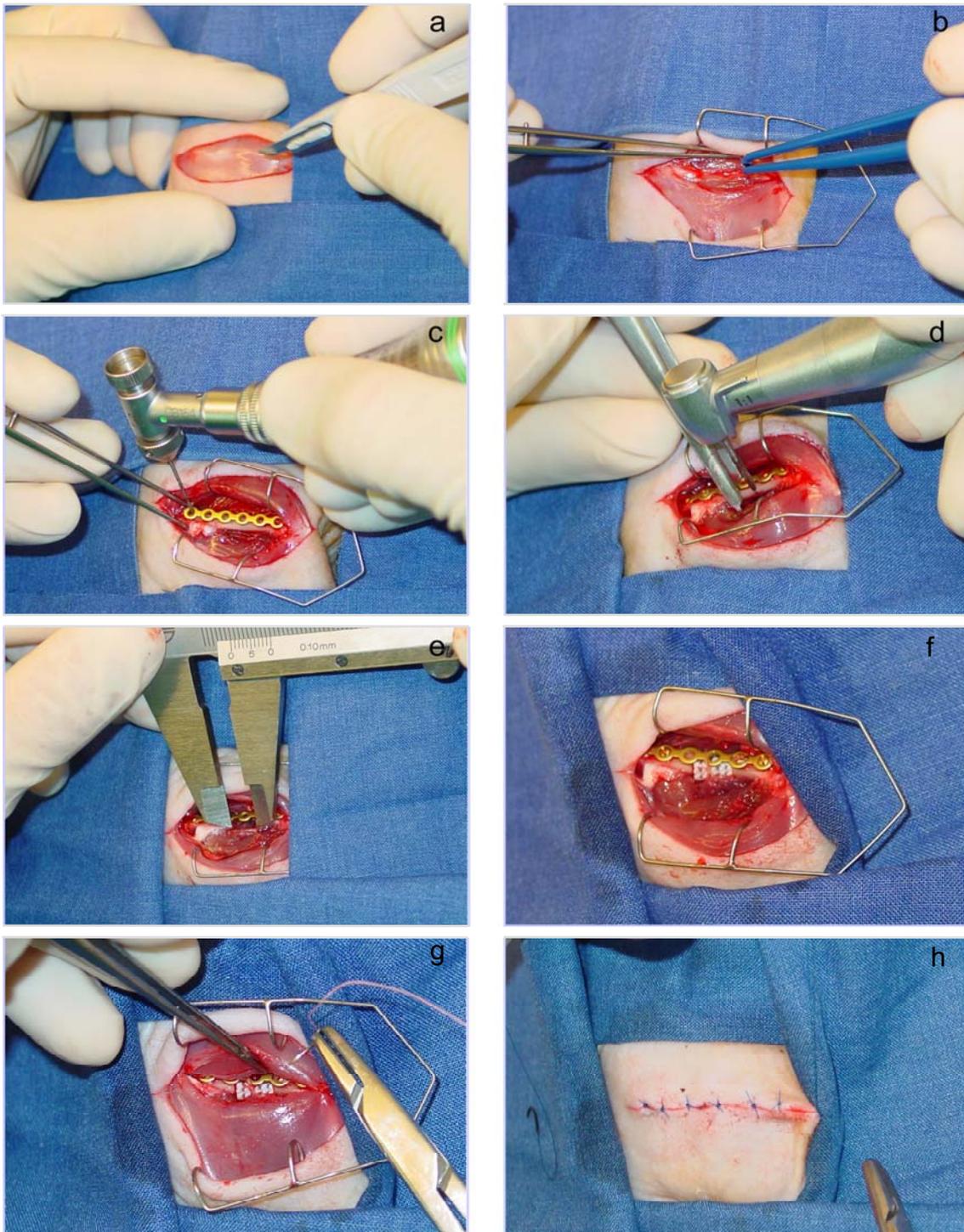


Abb. 8. Operationsablauf zur Generierung eines segmentalen Defektes für die Testung zellbesiedelter Gewebekonstrukte am Oberschenkelknochen der Ratte. Die Stabilisierung erfolgte mit einer Titanplatte. a) Zugang zum Femurschaft zwischen dem M. biceps femoris und dem M. vastus lateralis. b) Verödung größerer Gefäße mit einem Thermokauter. c) Bevor der Defekt gesetzt wurde, wurde eine 6-Loch-Titanplatte mit 1,2 mm selbstschneidenden Gewindeschrauben lose auf den Oberschenkelknochen aufgebracht. d) Der segmentale Defekt wurde unter kontinuierlicher Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung herausgefräst. e) Überprüfung der Defektgröße (6 mm) f) Einbringung der Leitschiene in den Defekt. g) Das Weichteilgewebe wurde mit 6-0 resorbierbarem Nahtmaterial readaptiert. h) Der abschließende Verschluss der Haut erfolgte mit 5-0 nicht resorbierbarem Nahtmaterial in Einzelknopftechnik.

2.6. Auswertemethoden der *In-vivo*-Versuche

2.6.1. Röntgen

Eine Überprüfung des korrekten Sitzes der Fixationssysteme und Implantate wurde direkt postoperativ mittels Röntgenkontrollen in zwei Ebenen durchgeführt. Verwendet wurde ein Röntgenschrank Faxitron (Modell 43855A, Fa. HP). Die Tiere wurden in Narkose gelagert, so dass mediolaterale sowie anterioposteriore Aufnahmen des Femur gemacht werden konnten. Alle Bilder wurden mit 40 kV, 2 mA und 2 Sekunden Belichtungszeit aufgenommen. In entsprechender Weise wurden nach Ablauf des postoperativen Nachbeobachtungszeitraums von zwei Wochen erneut Aufnahmen angefertigt.

Für den zweiten Studienzweig (12 Wochen) wurden zusätzliche Kontrollaufnahmen nach 2, 4, 6, 8 sowie zum Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen angefertigt. Diese erfolgten ebenso wie die Aufnahmen am Operationstag unter Vollnarkose der Tiere.

2.6.2. μ CT *in vivo*

Um eine zusätzliche Verlaufskontrolle zu ermöglichen, wurden bei den Versuchsgruppen 8 bis 13 10 Wochen nach der Implantation der Leitschienen in Vollnarkose μ CT-Aufnahmen mit dem LaTheta™ LCT-100A *In-vivo*-CT-Scanner für Kleintiere (Fa. Zinsser Analytic) angefertigt. Nach topographischen Übersichtsröntgenaufnahmen erfolgte die Bildgebung des Defektbereiches mit einer Schichtauflösung von 0,1 mm. Alle Aufnahmen wurden mit einer Spannung von 50 kV und einer konstanten Stromstärke von 1 mA gemacht.

2.6.3. μ CT *ex vivo*

Eine morphometrische Analyse der explantierten Femora wurde mit Hilfe von Computertomographie-Aufnahmen durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte die Entnahme der operierten Gliedmaßen unmittelbar nach Tötung der Tiere. Die Femora wurden vom umgebenden Weichteilgewebe freipräpariert und in mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte Gaze eingeschlagen. Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Für die Analysen wurden die

Proben einzeln bei Raumtemperatur aufgetaut (ca. 45 min). Die Messungen erfolgten mit einem μ CT-Scanner Scanco μ CT 20 (Fa. Scanco). Gemessen wurde ein 10,4 mm messender Bereich mit insgesamt 260 Schnitten. Im Folgenden wurde eine 3-D-Rekonstruktion des analysierten Bereichs durchgeführt. Die ausgewählte Zone schloss neben dem Defektbereich auch das distale und proximale Knochenende sicher mit ein. Für eine vergleichende Analyse wurden von jedem Präparat fünf Schnittebenen ausgewählt und auf Knochenneubildung überprüft (s. Abb. 9).

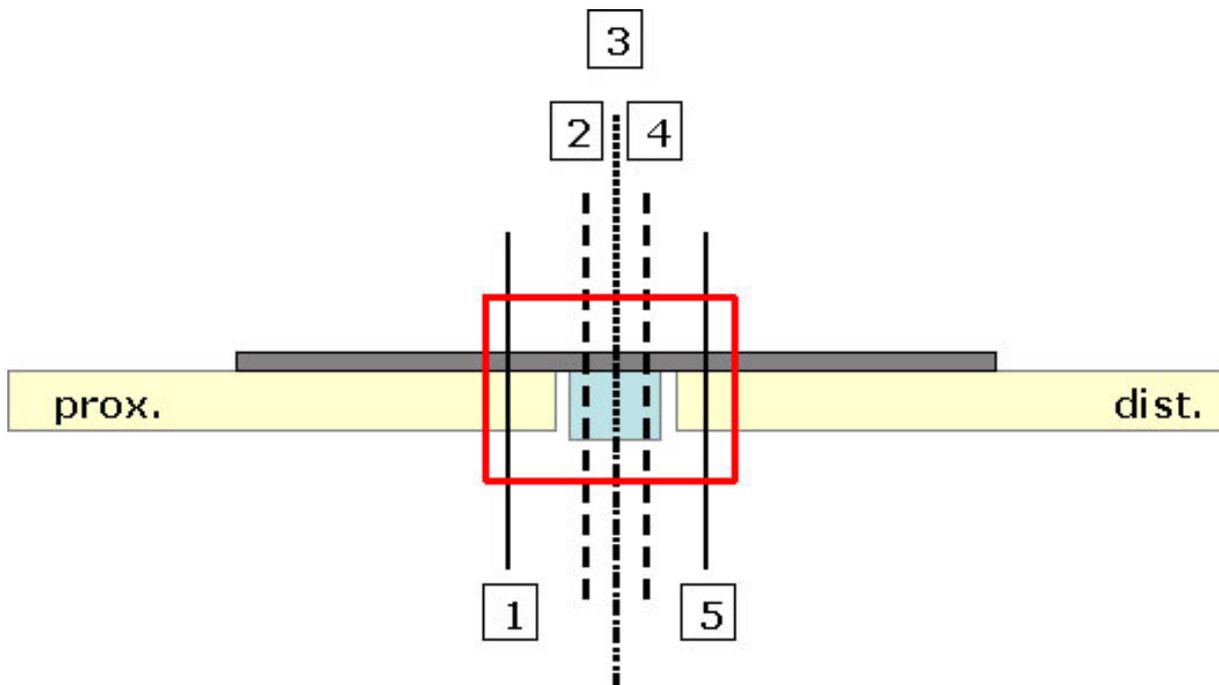


Abb. 9. Schnittschema für die Analyse der μ CT-Aufnahmen, 1– 5 entsprechen den gewählten Schnittbildern für die vergleichende Analyse der Ergebnisse. Das proximale und distale Bild wurden dabei jeweils so gewählt, dass die Kortikalis vollständig im Anschnitt war, in den mittleren Schnittebenen wurde eine vollständige Abbildung der Leitschiene gewährleistet.

2.6.4. Histologie

Alle Proben wurden für die Histologie in Methylmetacrylat (MMA) eingebettet (s. Anhang, Protokoll 5). Dies ermöglichte unter Zuhilfenahme geeigneter Färbetechniken (siehe unten) eine realistische Beurteilung der Zellmorphologie, vor allem der Übergangszonen zwischen Implantat und körpereigenem Gewebe. Schrumpfungs- und Zerreißungsartefakte, die als Folge einer Entkalkung der explantierten Knochen und Implantate auftreten können, wurden so vermieden.

2.6.4.1. Fixierung

Vor der Einbettung in Methylmetacrylat (MMA) wurden die Proben für 24 Stunden in einem Formaldehyd-Methanol-Gemisch fixiert und anschließend nach beigefügtem Schema dehydriert und infiltriert (Protokoll s. Anhang). Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur.

2.6.4.2. Schneidetechnik

Nach der vollständigen Aushärtung des Kunststoffgemisches wurden die polymerisierten Kunststoffblöcke auf die Dimensionen der eingebetteten Proben mit einer Bandsäge zugetrimmt. Mit einer Innenlochsäge wurden die Präparate auf die gewünschte Schnittebene zugeschnitten und 100 µm dünne Schnitte hergestellt. Im Anschluss wurden die Proben auf Kunststoffobjektträger aufgeklebt. Mit einem Mikro-Schleifsystem (Fa. EXAKT-Apparatebau) wurden die Präparate auf eine Präparatdicke von 18 – 22 µm heruntergeschliffen. Im Schleifsystem wurde hierzu ein Schleifpapier der Körnung 800 (Fa. Hermes) verwendet. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Politur der angeschliffenen Oberfläche mit einem feinporigen Schleifpapier (Körnung 2000). Die Messungen der Objektdicken wurden mit Hilfe einer Mikrometerschraube mit Digitalanzeige (Fa. EXAKT-Apparatebau) durchgeführt.

2.6.4.3. Färbung

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung erfolgte die Färbung der Schliffpräparate mit einer Toluidinblaufärbung (s. Anhang, Protokoll 6 und Protokoll 7).

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung dreidimensionaler Trägersysteme

Um die Eignung eines dreidimensionalen Trägermaterials (s. Abb. 10) für den Knochenersatz zu gewährleisten, müssen zahlreiche Anforderungen bezüglich der Makro- und Mikrostruktur, sowie hinsichtlich der Biokompatibilität erfüllt sein. Grundsätzlich müssen die Materialzusammensetzung sowie die Feinstruktur der Bauteile die Adhärenz und das Überleben der Zellen über einen längeren Zeitraum sicherstellen. Darüber hinaus muss die Materialzusammensetzung auch eine ausreichende Stabilität bieten, um sowohl den Manipulationen im Rahmen der Zellbesiedelung, als auch in der Folge der biomechanischen Belastung nach Implantation in den orthotopen Defekt *in vivo* standzuhalten.

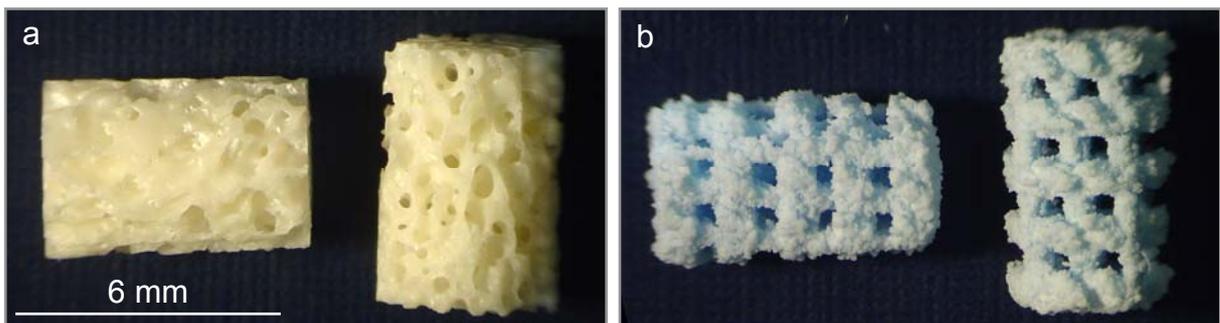


Abb. 10. Implantatmaterialien für den Knochenersatz. a) Tutobone®-Leitschienen aus boviner Knochenspongiosa. b) 3-D-gedrucktes caesar-Implantat aus Hydroxylapatit.

3.1.1. Feinstruktur und Stabilität

Die spezifische Oberfläche der letztlich im Tierversuch verwendeten caesar-Leitschienen betrug $0,052 \pm 0,00019 \text{ m}^2/\text{g}$. Der Median des Mikroporendurchmessers (bei dem lediglich Mikroporen $< 360 \text{ }\mu\text{m}$ erfasst werden) entsprach $0,3 \text{ }\mu\text{m}$, die Porosität der dreidimensionalen Konstrukte lag bei $26,9 \%$. Eine Kaltdruckfestigkeit von $3,77 \pm 1,07 \text{ N}$ ($n = 5$) wurde ermittelt. Diese neuen Implantate (V23, s. Datenblatt Abb. 5) konnten problemlos in der Zellkultur manipuliert werden, ohne dass die Konstrukte dabei beschädigt wurden. Auch dreiwöchiges Aufbewahren im Medium stellte kein Problem für die Festigkeit der Zell-Matrix-Konstrukte dar. Die zur *In-vitro*-Testung zur Verfügung stehenden Testkörper unterschieden sich lediglich in der

Struktur der Bauteile hinsichtlich Porengröße, Stegbreite und Anordnung der Stege. Die Granulatzusammensetzung verschiedener Probenkörper einer Versuchsreihe war stets gleich.

3.1.2. Biokompatibilität *in vitro*

Der Nachweis der Zellverträglichkeit der Testkörper wurde mittels Live-dead-assay erbracht. Sowohl nach einem Kultivierungszeitraum von einem Tag als auch nach einer Kultivierungszeit von einer Woche sowie einer Differenzierungsperiode von drei Wochen unter den oben beschriebenen *In-vitro*-Bedingungen, war die Mehrheit der Zellen vital. Dies gilt gleichermaßen für Zellen an der Oberfläche der Leitschienen, als auch für solche, die sich im Inneren der dreidimensionalen Strukturen anheften (s. Abb. 11).

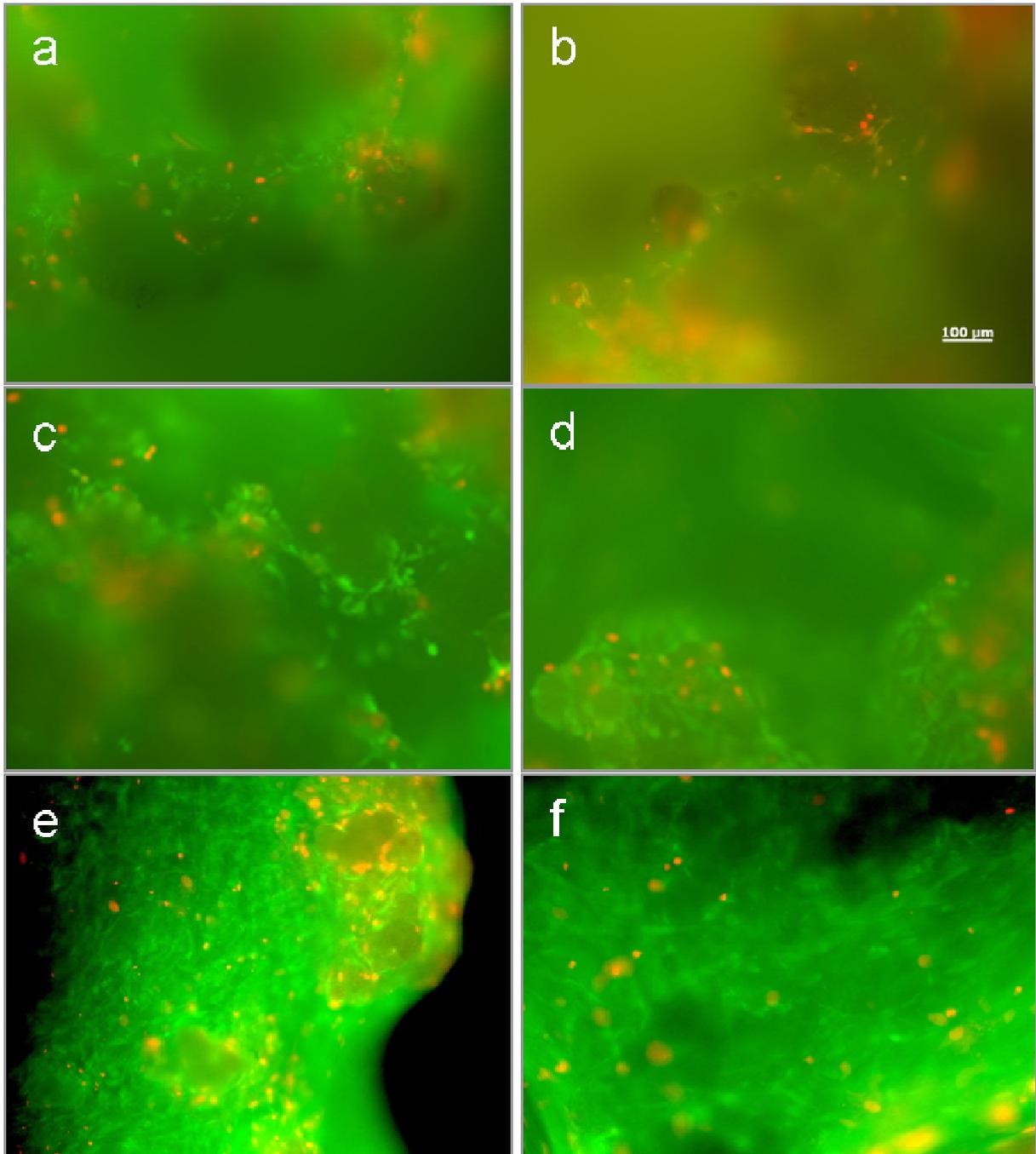


Abb. 11. Live-dead-assay auf caesar-Leitschienen. Vitale Zellen stellen sich grün dar, avitale Zellen rot. Zellen auf der Oberfläche der Trägermaterialien (linke Spalte) und Zellen im Inneren der besiedelten Konstrukte (rechte Spalte) zeigten das gleiche Verhältnis zwischen vitalen und abgestorbenen Zellen. Die Vitalität wurde nach einem Tag in Kultur (a, b), beziehungsweise einer Woche (c, d) und einer Differenzierungsperiode von drei Wochen (e, f) überprüft.

3.2. Zelltransplantation für den Knochenersatz

Die erfolgreiche Kultivierung sowie die Differenzierung von Zellen auf dreidimensionalen Trägersystemen stellten Kernpunkte bei der Verwendung zellbesiedelter Gewebekonstrukte dar. Zellbesiedlungsstrategien auf synthetischen 3-D-Leitschienen wurden in vorangegangenen Versuchen der ExperiMed optimiert, so dass das hier verwendete Protokoll in Anlehnung an die bekannten Schemata verwendet werden konnte.

3.2.1. Besiedlungsmuster

Das Besiedlungsmuster der verwendeten Leitschienen wurde im Hinblick auf die Besiedlungseffizienz der verwendeten Trägermaterialien, sowie bezüglich des Verteilungsmusters der applizierten Zellen überprüft.

Um das für die *In-vivo*-Studie am besten geeignete Strukturmodell herauszufinden, wurden die Teststrukturen „V23“ sowie „V26“ nach dem gleichen Schema besiedelt. Zur Bestimmung der Effizienz (also des Anteils der Zellen, die nach dem Besiedlungsvorgang tatsächlich auf der Leitschiene anheften), wurden die Zellen auf den Trägermaterialien lysiert und der DNA-Gehalt des Lysates bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass bei Teststruktur V23 eine Besiedlungseffizienz von 60 % erreicht wurde, wohingegen mit V26 eine deutlich niedrigere Zelldichte (33 %) zu erreichen war. Vor diesem Hintergrund wurde die Struktur V23 für alle weiteren Versuche ausgewählt.

Eine auflichtmikroskopische Betrachtung der dreidimensionalen Trägersysteme nach Zellfärbung mit Methylenblau zeigte eine homogene, dichte Verteilung der aufgebracht Zellen im gesamten Oberflächenbereich. Auch im Inneren der Leitschiene konnten Zellen auf die gleiche Art nachgewiesen werden (s. Abb. 12).

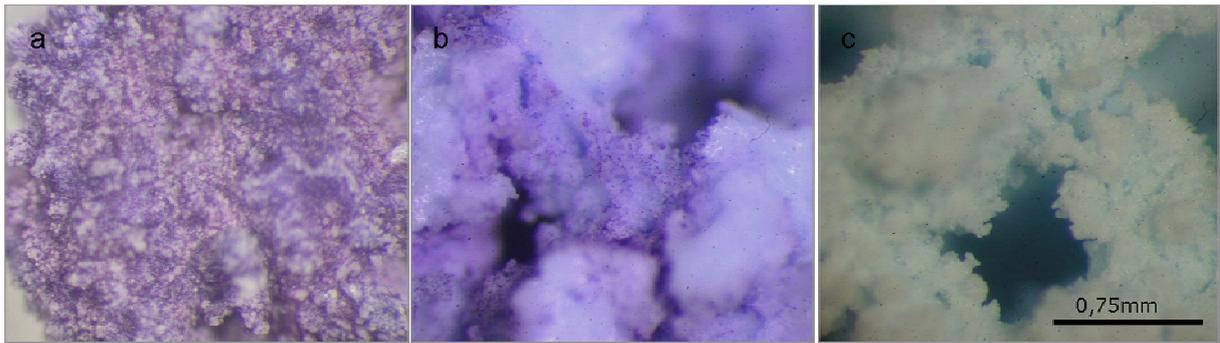


Abb. 12. Überprüfung der Zellbesiedelung von caesar-Leitschienen, die Zellen stellen sich als blaue Punkte dar, da deren Zytoplasma mit Methylenblau angefärbt wurde. a) Ansicht der Leitschiene von außen. b) Ansicht der Leitschiene von innen, glatte hellblaue Flächen sind die Bruchkanten der Stege. c) Kontrollleitschiene ohne Zellen.

3.2.2. Differenzierungsverhalten

Bei der osteogenen Differenzierung auf den entwickelten Trägermaterialien wurde die Expression der alkalischen Phosphatase, eines typischen Markers der osteogenen Kaskade im Zeitverlauf, überprüft und mittels qRT-PCR quantifiziert. Nach einer Kultivierungsperiode von drei Wochen zeigte sich bei Zellen, die im dreidimensionalen System osteogen stimuliert worden waren für beide Leitschientypen eine mehr als zehnfache Expressionssteigerung gegenüber den unstimulierten Kontrollleitschienen (s. Abb. 13). Der Nachweis wurde für beide Studienabschnitte des *In-vivo*-Versuches (zwei beziehungsweise zwölf Wochen Implantationszeit) separat geführt und erwies sich als zuverlässig reproduzierbar. In jedem Fall war der Unterschied zwischen den stimulierten und den unstimulierten zellbesiedelten Trägern als statistisch signifikant ($p < 0,05$) einzustufen.

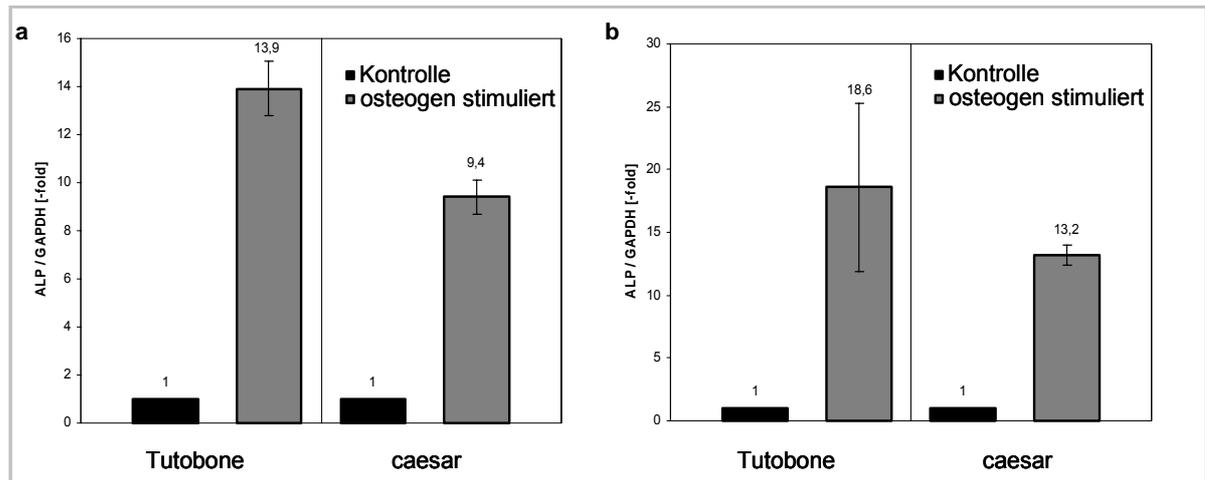


Abb. 13. Überprüfung der Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) nach dreiwöchiger Stimulation humaner mesenchymaler Stammzellen auf Tutobone®- beziehungsweise caesar-Leitschienen. Der ALP-Gehalt in unstimuliert kultivierten Zellen wurde als Wert „1“ gesetzt, Darstellung der Hochregulation durch Multiplikation des Messwertes. a) Testleitschienen aus Versuchsabschnitt 1 (zwei Wochen Implantationsdauer). b) Testleitschienen aus dem zweiten Versuchsabschnitt (Implantationsdauer zwölf Wochen).

3.3. Eignung verschiedener Fixationssysteme

3.3.1. Mechanische Stabilität

Die biomechanischen Charakteristika dreier unterschiedlicher Fixationssysteme wurden beurteilt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 zusammengefasst.

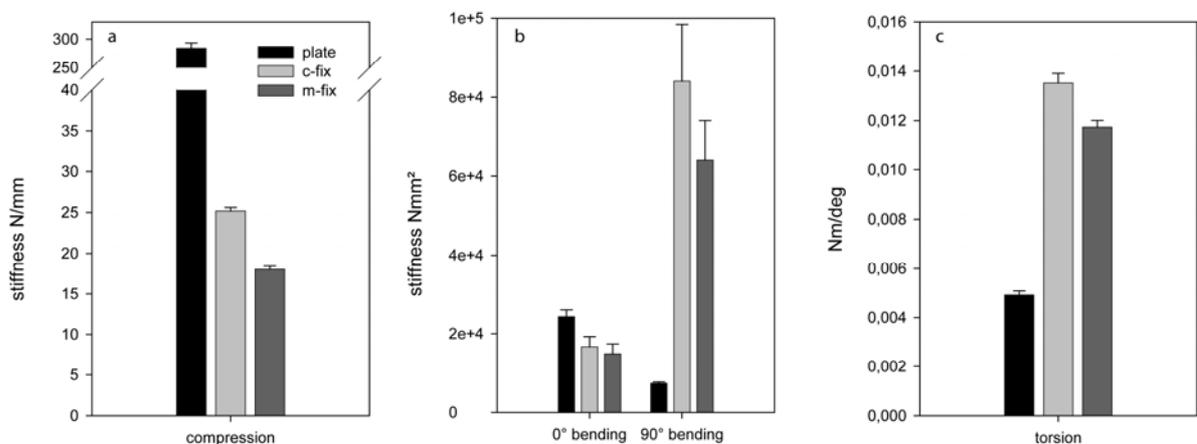


Abb. 14. Ergebnisse der biomechanischen Testung. Vergleich der Steifigkeiten dreier Fixationssysteme unter a) Kompression. b) Vier-Punkt-Biegung. c) Torsion. Alle Tests wurden jeweils mit fünf standardisierten Testkörpern durchgeführt.

Kompression

In reiner Kompression, die als der vorherrschende Belastungsmodus im lasttragenden Knochen *in vivo* angesehen wird, erwies sich die Platte als etwa doppelt so steif wie die externen Fixationssysteme ($p < 0,001$).

Vier-Punkt-Biegung

In den Vier-Punkt-Biegeversuchen zeigten beide externen Fixationssysteme im Vergleich zur Platte höhere Werte, sofern sie von der Seite belastet wurden. Die Platte hingegen zeigte eine höhere Steifigkeit, wenn die Kraft von der dem Fixationssystem gegenüberliegenden Seite (0°) ausgeübt wurde.

Torsion

Die beiden externen Fixationssysteme zeigten ähnliche Tendenzen hinsichtlich ihrer Torsionsfestigkeit, wobei der Klammerfixateur in allen Testdurchläufen geringfügig höhere Werte lieferte. Die Ergebnisse der beiden externen Fixateure ähnelten einander mit bemerkenswert niedrigen Standardabweichungen und lagen markant über den Ergebnissen der Titanplatten ($p < 0,001$).

3.3.2. Intraoperative Anwendbarkeit

Im Rahmen von Vorversuchen waren die verschiedenen zur Verfügung stehenden Fixationssysteme auf ihre operative Anwendbarkeit zunächst an toten Ratten getestet worden. Es zeigte sich, dass es für die korrekte Einbringung der beiden externen Fixateure eines beträchtlich höheren Maßes an manueller Geschicklichkeit bedarf als bei der Verwendung eines internen Fixationssystems, um iatrogene, ungewollte Schäden (beispielsweise Eröffnung der angrenzenden Gelenke) zu vermeiden. Besonders bei Verwendung des starren externen Fixateurs der Stiftung caesar stellte es sich als problematisch dar, die Kirschner-Drähte in exakt einer Ebene einzuführen, ohne Spannung auf die Defektenden aufzubringen. Auch die Verwendung einer Bohrlehre konnte diese Schwierigkeiten nicht überwinden. Die grundsätzliche Präparation des Operationsfeldes unterschied sich zwischen den Fixationssystemen nicht. Es musste stets die Oberschenkelmuskulatur auf der ganzen Schaftlänge (mit Ausnahme von Ursprung und Ansatz der Muskeln) abpräpariert werden, um ein Herausfräsen des gewünschten Defektes zu ermöglichen. Aufgrund der erhöhten Komplikationsgefahr bei Verwendung der

externen Fixationssysteme wurde die Titanplatte für die Anwendung *in vivo* ausgewählt.

3.4. *In-vivo*-Anwendung im Rattenmodell

3.4.1. Implantation und postoperative Beobachtungszeit

Die Defektgenerierung sowie die Implantation der zellbesiedelten Gewebekonstrukte wurde ohne intraoperative Zwischenfälle durchgeführt. Es gab keine anästhesiebedingten Ausfälle. Ebenso wenig mussten Tiere wegen unvorhergesehener operativer Zwischenfälle wie Splintern des Oberschenkelknochens, Gelenkverletzungen oder ähnliches euthanasiert werden. Alle Ratten erwachten ohne Zwischenfall aus der Narkose. Direkt nach der Operation wurden die Tiere in Einzelkäfige verbracht. Ein Tier verstarb am ersten Tag nach der Operation aus ungeklärten Gründen. Alle übrigen Ratten wiesen bereits am ersten postoperativen Tag ein weitgehend unbeeinträchtigtes Aktivitätsprofil mit regelmäßiger Futter- und Wasseraufnahme auf. Nach ca. drei Tagen wurde auf die operierten Gliedmaßen wieder volle Last aufgenommen und das Gangmuster zeigte keine Unterschiede gegenüber dem Gangmuster gesunder Tiere. Nach einer Woche wurden die Tiere wieder in die ursprünglichen Gruppengrößen von drei bis vier Tieren je Käfig verbracht. Hierbei zeigten sie keinerlei Beeinträchtigung des Sozialverhaltens. Die Tiere nahmen ebenso wie vor der Operation ihr Spiel- und Komfortverhalten wieder auf.

3.4.2. Röntgenkontrollen

Bei den unmittelbar postoperativen Röntgenkontrollen in zwei Ebenen (s. Abb. 15 a – f). bestätigte sich die Einschätzung, dass die Eingriffe hinsichtlich der Einbringung der Fixationssysteme sowie der Platzierung der Zell-Matrix-Konstrukte zufriedenstellend verlaufen waren. In keinem Fall penetrierte eine der Schrauben das Knie- oder Hüftgelenk. Ungewünschte Frakturen durch Einbringen der Schrauben waren nicht nachzuweisen. Unabhängig von der Art des Implantats konnte gleichfalls dargestellt werden, dass die Leitschienen mit Kontakt zu den Defektenden im Bereich der Femurdiaphyse unter der Titanplatte platziert waren.

Nach Ablauf des Nachbeobachtungszeitraums von zwei Wochen ließ sich feststellen, wie der Sitz der Fixationssysteme sowie der Zell-Matrix-Konstrukte im Vergleich zur Ausgangssituation war. Es zeigte sich, dass bei der ersten Versuchsgruppe (Implantationszeitraum zwei Wochen) in allen Fällen sowohl die Titanplatten und -schrauben als auch die Leitschienen noch in der Ausgangsposition waren. Keines der Implantate war unter der Belastung gebrochen oder disloziert. Diese Beobachtung galt gleichermaßen für die caesar- und für die Tutobone[®]-Implantate. Eine knöcherne Durchbauung der Defektzone konnte bei keiner der Gruppen nachgewiesen werden, lediglich an den Übergangszonen von den Defektenden auf die Trägermaterialien war Kallusbildung im Sinne einer Verschattung der Röntgenaufnahmen festzustellen.

Bei den Kontrollen der Tiere aus dem zweiten Versuchsabschnitt zeigte sich zum Kontrollzeitpunkt nach zwei Wochen bei vier Ratten eine Dislokation der Schrauben (zwei Tiere Gruppe 10, caesar drei Wochen differenziert; ein Tier Gruppe 13, Tutobone[®] drei Wochen differenziert; ein Tier Gruppe 8, caesar ohne hMSC). Diese Ratten wurden erneut in Vollnarkose gelegt und es wurde eine Revision der Fixationssysteme vorgenommen.

Nach vier Wochen trat bei zwei Tieren ein Bruch der Platte auf (ein Tier Gruppe 9, caesar ein Tag besiedelt; ein Tier Gruppe 11, Tutobone[®] ohne Zellbesiedelung). Diese Ratten wurden euthanasiert und schieden somit aus dem Versuch aus.

Am Explantationstag nach zwölf Wochen waren bei 4 Tieren die Titanplatten gebrochen (ein Tier Gruppe 8, caesar drei Wochen differenziert; zwei Tiere Gruppe 12, Tutobone[®] ein Tag besiedelt; ein Tier Gruppe 8, caesar ohne Zellbesiedelung). Bei vier Tieren ließen Verschattungen der Röntgenbilder nach zwölf Wochen vermuten, dass es zu einer teilweisen knöchernen Konsolidierung der Defekte gekommen war. Zwei dieser Ratten hatten caesar-Leitschienen mit vordifferenzierten hMSC bekommen (Gruppe 10), einem Probanden war eine caesar-Leitschiene ohne Zellen implantiert worden (Gruppe 8). Ein weiteres Tier hatte eine caesar-Leitschiene nach eintägiger Zellbesiedelung implantiert bekommen (Gruppe 9). Bei der Betrachtung der Röntgenbilder der Kontrolltiere mit Leerdefekt nach zwölf Wochen Beobachtungszeit zeigte sich in keinem Fall eine knöcherne Konsolidierung des

segmentalen Defekts im Schaftbereich (s. Abb. 15 g – l). Jedoch verengte von den Defektenden radiär einwachsender Knochen die Defektzone.



Abb. 15. Beispielhafte Röntgenbildaufnahmen verschiedener Implantate in lateromedialer beziehungsweise anteroposteriorer Ebene. a – f) Initiale postoperative Aufnahmen zur Überprüfung des Implantatsitzes. g – l) Korrespondierende Aufnahmen am Explantationszeitpunkt nach 12 Wochen. Linke Spalte: 3-D-gedruckte Leitschiene der Stiftung caesar. Mitte: Tutobone®-Implantat. Rechte Spalte: Darstellung des Kontrolltieres mit Leerdefekt (die Defekstatbilisierung erfolgte in diesem Fall mit Doppelplatte).

3.4.3. μ CT-Untersuchungen *in vivo*

Die intravitale μ CT-Aufnahmen ermöglichen eine dreidimensionale Darstellung der Defektzone und bestätigten die Ergebnisse aus den vorangegangenen Röntgenaufnahmen (s. Abb 16). Bei keinem der Tiere war die Defektzone durchgehend knöchern konsolidiert. Im Leerdefekt fand sich die Defektzone ausgehend von den Knochenenden zu etwa 20 % verengt, eine Konsolidierung hatte jedoch auch hier nicht stattgefunden.

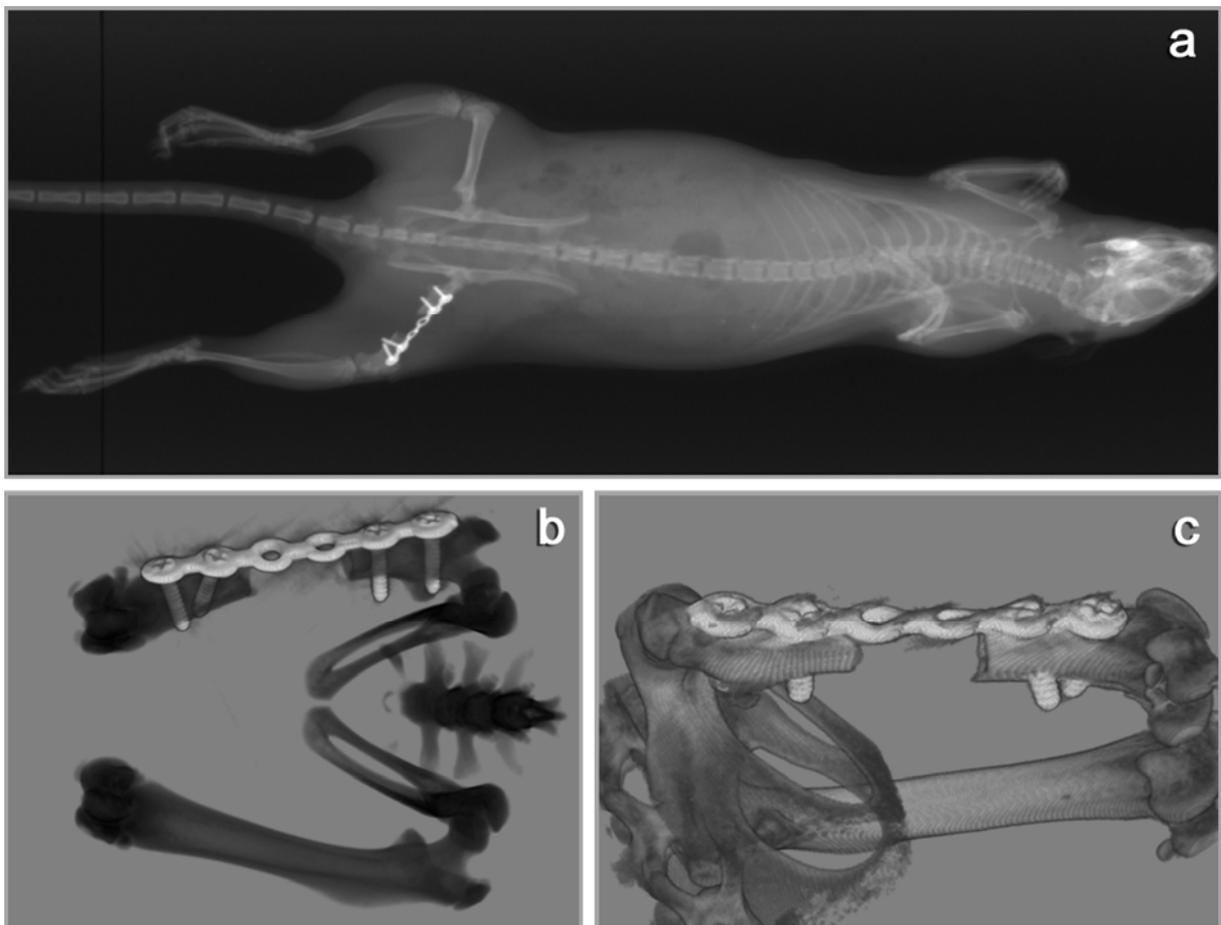


Abb. 16. Intravitale μ CT-Aufnahme einer Ratte mit 6 mm segmentalem Leerdefekt am Femur. Die Stabilisierung der Defektzone erfolgte mit einer 6-Loch-Titanplatte. Exemplarische postoperative Darstellung eines Leerdefektes. a) Topographische Übersichtsaufnahme. b – c) Dreidimensionale Rekonstruktion der Defektzone.

3.4.4. μ CT-Untersuchungen *ex vivo*

Die operierten Hinterextremitäten von vier Tieren je Gruppe aus der ersten Versuchsserie wurden im Hinblick auf die Neubildung kalzifizierten Gewebes im Defektbereich untersucht. Dabei bestätigte sich der durch Betrachtung der

Röntgenbilder gewonnene Eindruck, dass zu diesem Zeitpunkt bei keinem der Tiere – unabhängig vom Implantattyp – eine knöcherne Durchbauung der Defektzone stattgefunden hatte (s. Abb. 17). Im Bereich der Knochenenden war jedoch beginnende Kallusbildung zu erkennen. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden, der mit dem verwendeten Implantatmaterial in Verbindung gebracht werden könnte.

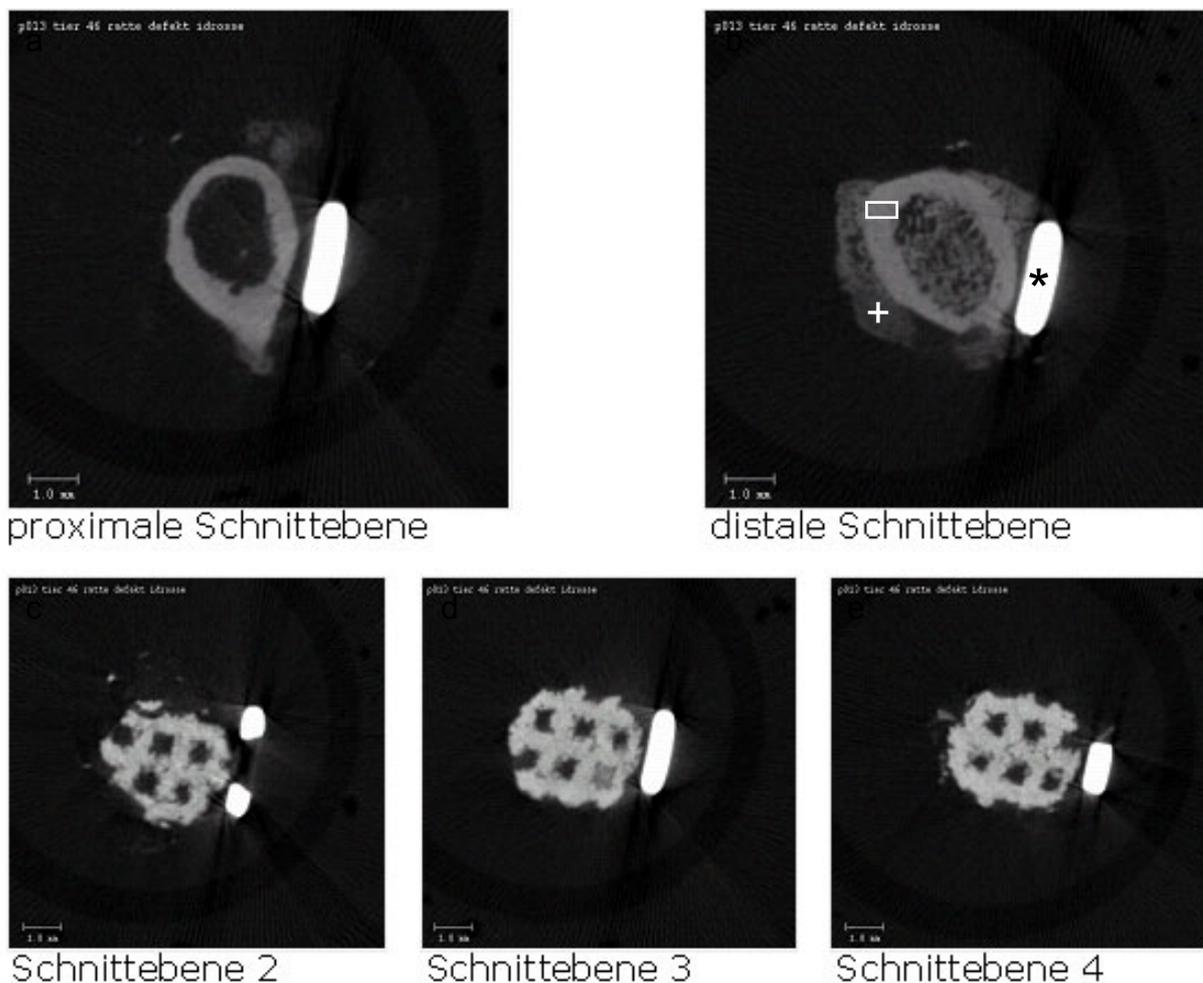


Abb. 17. Beispielhafte μ CT-Bilder der caesar-(Hydroxylapatit-)Implantate, Ansichten gemäß Schnittschema Abb. 9. Aufnahmen wurden *ex vivo* nach zweiwöchiger Implantation angefertigt. a – b) Proximales beziehungsweise distales Bild mit Anschnitt der Kortikalis. c – e) Sequentielle Schnittfolge der caesar-Leitschiene. \square = Kortikalis; * = Titanplatte; + = Kallus.

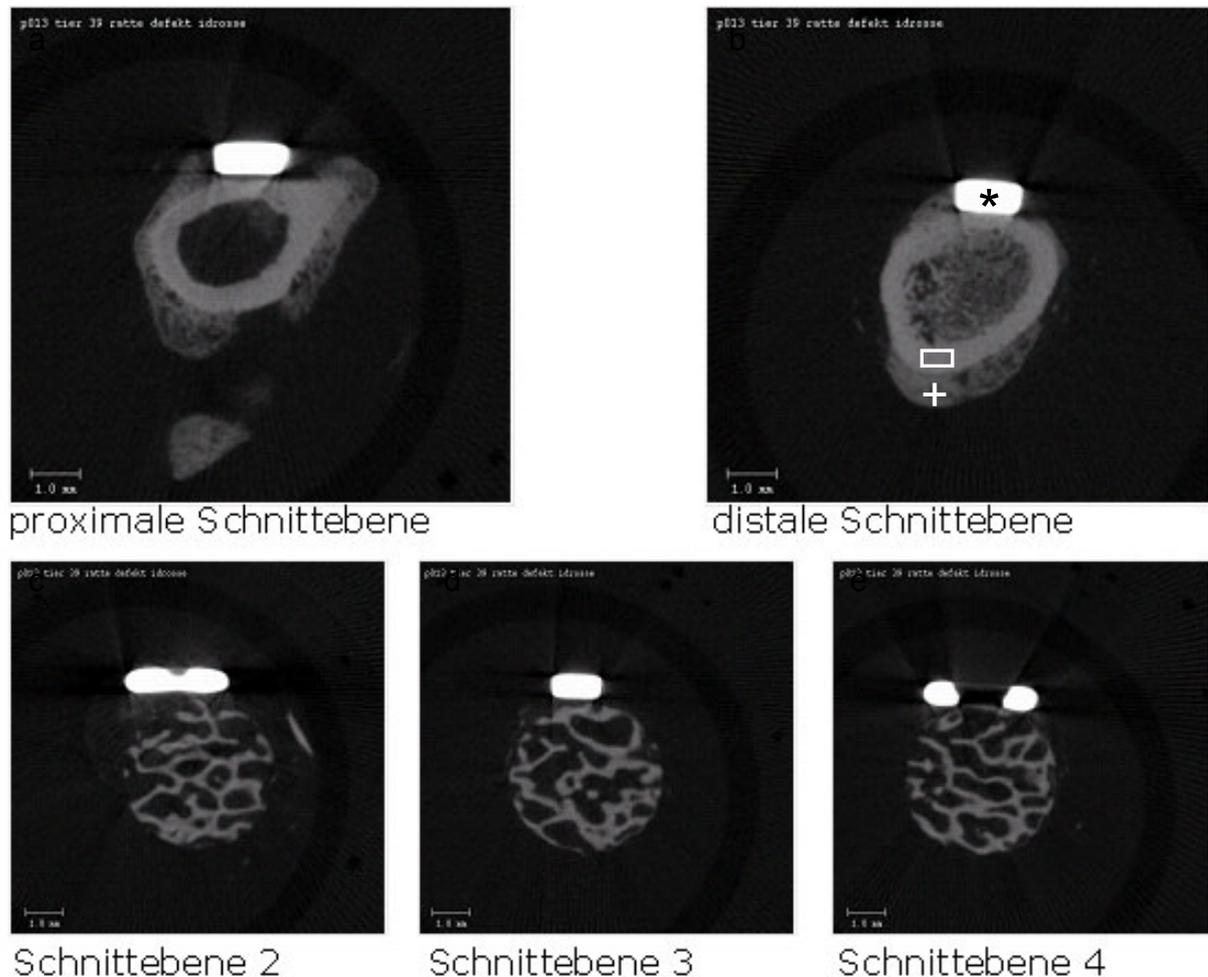


Abb. 18. Beispielhafte μ CT-Bilder der Tutobone[®]-Implantate (bovine Knochenspongiosa), Ansichten gemäß Schnittschema Abb. 9. Aufnahmen wurden *ex vivo* nach zweiwöchiger Implantation angefertigt. a – b) Proximales beziehungsweise distales Bild mit Anschnitt der Kortikalis. c – e) Sequentielle Schnittfolge der Tutobone[®]-Leitschiene. □ = Kortikalis; * = Titanplatte; + = Kallus

Bezüglich der Stabilität der Probenkörper war festzustellen, dass es in keinem Fall zu einem vollständigen Versagen des Materials gekommen war. Alle Tutobone[®]-Leitschienen hatten der Belastung ohne erkennbare Ermüdungserscheinungen standgehalten. Lediglich in den proximalen beziehungsweise distalen Endbereichen konnten in den caesar-Konstrukten vereinzelt Haarrisse im Implantat nachgewiesen werden, die sich jedoch nicht auf das Gesamtkonstrukt ausbreiteten, wie aus den dreidimensionalen Rekonstruktionen der Scansequenzen ersichtlich war (s. Abb 19). Bei den unbesiedelten Implantaten (Gruppe 8) war eines im proximalen und distalen Bereich beschädigt, ein weiteres wies Brüche der Querstege nur im distalen Abschnitt auf; ein entsprechendes Bild zeigte sich bei den Leitschienen, die mit undifferenzierten hMSC besiedelt worden waren (Gruppe 9). In der Gruppe mit

osteogen vorstimulierten Zellen (Gruppe 10) war bei einem weiteren Tier im proximalen Bereich die Leitschiene defekt.

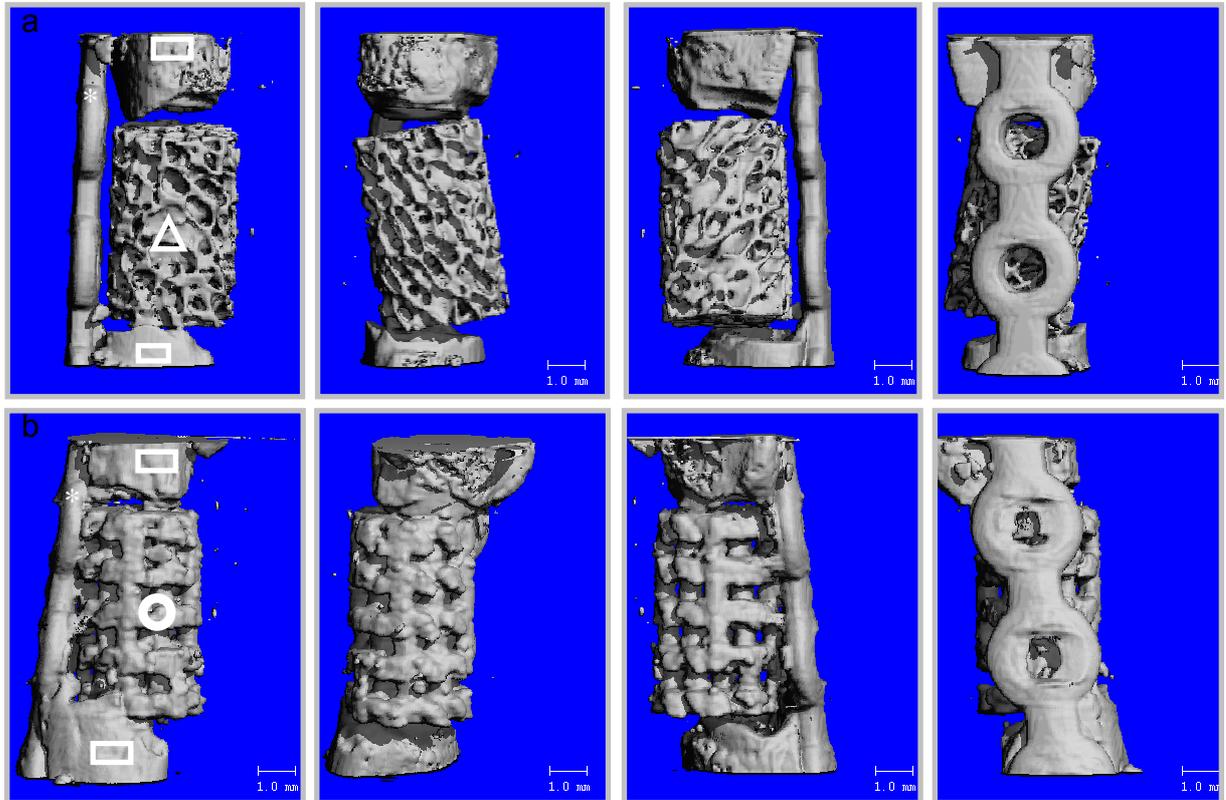


Abb. 19. Beispielhafte 3-D-Rekonstruktion der μ CT-Scans verschiedener Knochenersatzmaterialien nach zwei Wochen. Tutobone[®] = bovine Knochenspongiosa. caesar = Hydroxylapatit. Reihe a) Darstellung einer Tutobone[®]-Leitschiene in vier verschiedenen Ansichten, jeweils nach Drehung um 90°. Reihe b) Vier Ansichten eines caesar-Implantats. □ = Femurdiaphyse (Defektende); * = Titanplatte in Seitenansicht; Δ = Tutobone[®]; ○ = caesar-Implantat.

Bei den μ CT-Untersuchungen nach zwölf Wochen zeigte sich, dass auch hier die strukturelle Integrität der Tutobone[®]-Implantate vollständig erhalten geblieben war. In keinem Fall war es zu einem Verlust der äußeren Form der Leitschienen gekommen. Eine markante Zubildung von Knochengewebe konnte bei zwei Tieren der Gruppe 13 (Tutobone[®], differenzierte Zellen) nachgewiesen werden. In Gruppe 12 (Tutobone[®], undifferenzierte Zellen) war bei einem Tier eine geringgradige Zubildung knöchernen Gewebes zu sehen. Zwei Tiere der Gruppe 11 (unbesiedelte Tutobone[®]-Implantate) zeigten ebenfalls geringgradige Knochenneubildung. Für die caesar-Implantate konnte festgestellt werden, dass die Stabilität der Probenkörper nicht in jedem Fall

ausreichend war, um der Belastung über zwölf Wochen standzuhalten. Bei vier von zehn Tieren war die Leitschiene noch intakt, wohingegen sechs Leitschienen strukturell versagt hatten. Deutliche Knochenspangen, die als hochgradige Zubildungen gewertet werden konnten, waren bei einem Tier aus Gruppe 10 (caesar, osteogen stimulierte Zellen) nachweisbar, ein weiteres Tier dieser Gruppe zeigte mittelgradige Knochenneubildung. Ein entsprechendes Bild fand sich bei Tieren aus Gruppe 8 (unbesiedelte caesar-Leitschiene). Ein Tier aus Gruppe 9 (caesar, native hMSC) hatte ebenfalls eine hochgradige Zubildung knöchernen Gewebes (Tab. 4).

Tab. 4 Darstellung der Knochenneubildung nach 12 Wochen in Abhängigkeit von den verwendeten Implantaten.

Implantat	Zellen	Knochenneubildung		
		geringgradig	mittelgradig	hochgradig
Tutobone®	-	2		
Tutobone®	hMSC undiff.	1		
Tutobone®	hMSC osteog. stim.			2
caesar	-		1	1
caesar	hMSC undiff.			1
caesar	hMSC osteog. stim.		1	1

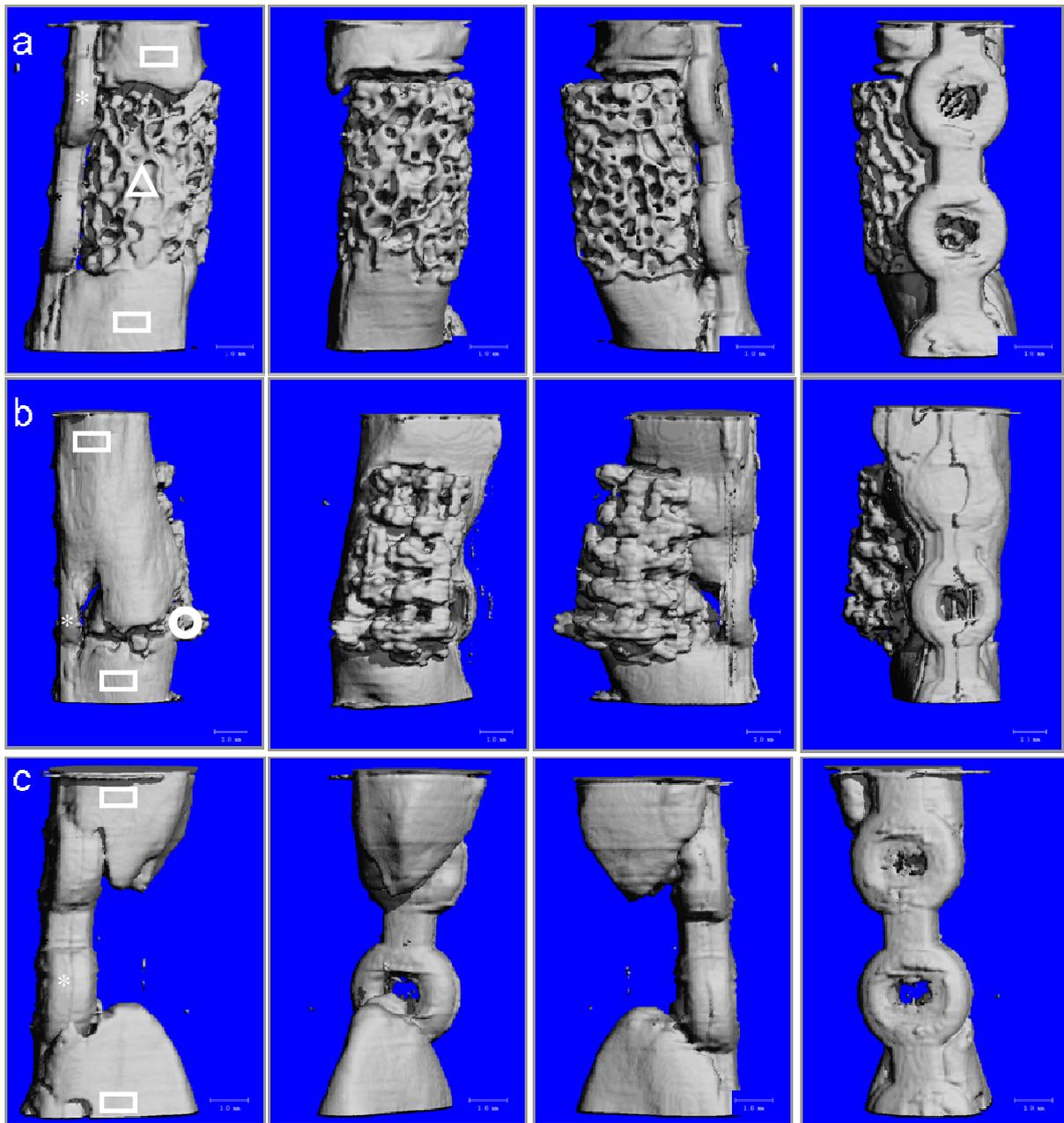


Abb. 20. Beispielhafte 3-D-Rekonstruktion der μ CT-Scans der Defektzonen nach 12 Wochen. Reihe a) Darstellung einer Tutobone[®]-Leitschiene (bovine Knochenspongiosa) in vier verschiedenen Ansichten, jeweils nach Drehung um 90°. Reihe b) Vier Ansichten eines caesar-Implantats (Hydroxylapatit). Reihe c) Kontrolltier mit Leerdefekt und Titan-Doppelplatte. □ = Femurdiaphyse (Defektende); * = Titanplatte in Seitenansicht; Δ = Tutobone[®]; ○ = caesar-Implantat.

3.4.5. Histologische Auswertung

Von den MMA-Schnitten wurden zunächst 100 µm dicke Schnitte in sequentieller Folge angefertigt. Die Darstellung in fünffacher Vergrößerung (s. Abb. 21 – 23) erlaubte einen Überblick über die gesamte Defektzone mit Einschluss der Knochenenden sowie des Knochenersatzmaterials, beziehungsweise im Falle der Kontrolltiere des Leerdefekts.

Nach zwei Wochen zeigte sich bei den Kontrollen, wie erwartet, keinerlei knöcherner Durchbau des Defektbereiches. Jedoch füllte bindegewebiges Narbengewebe den Bereich gleichmäßig aus. Vereinzelt konnten abgelöste Knochensplitter, die durch das Fräsen entstanden und in der Folge im Operationsfeld geblieben waren, im Narbengewebe nachgewiesen werden. Dort lagen sie jedoch reaktionslos und wurden von der Matrix der kernhaltigen fibrozytären Zellen umschlossen.

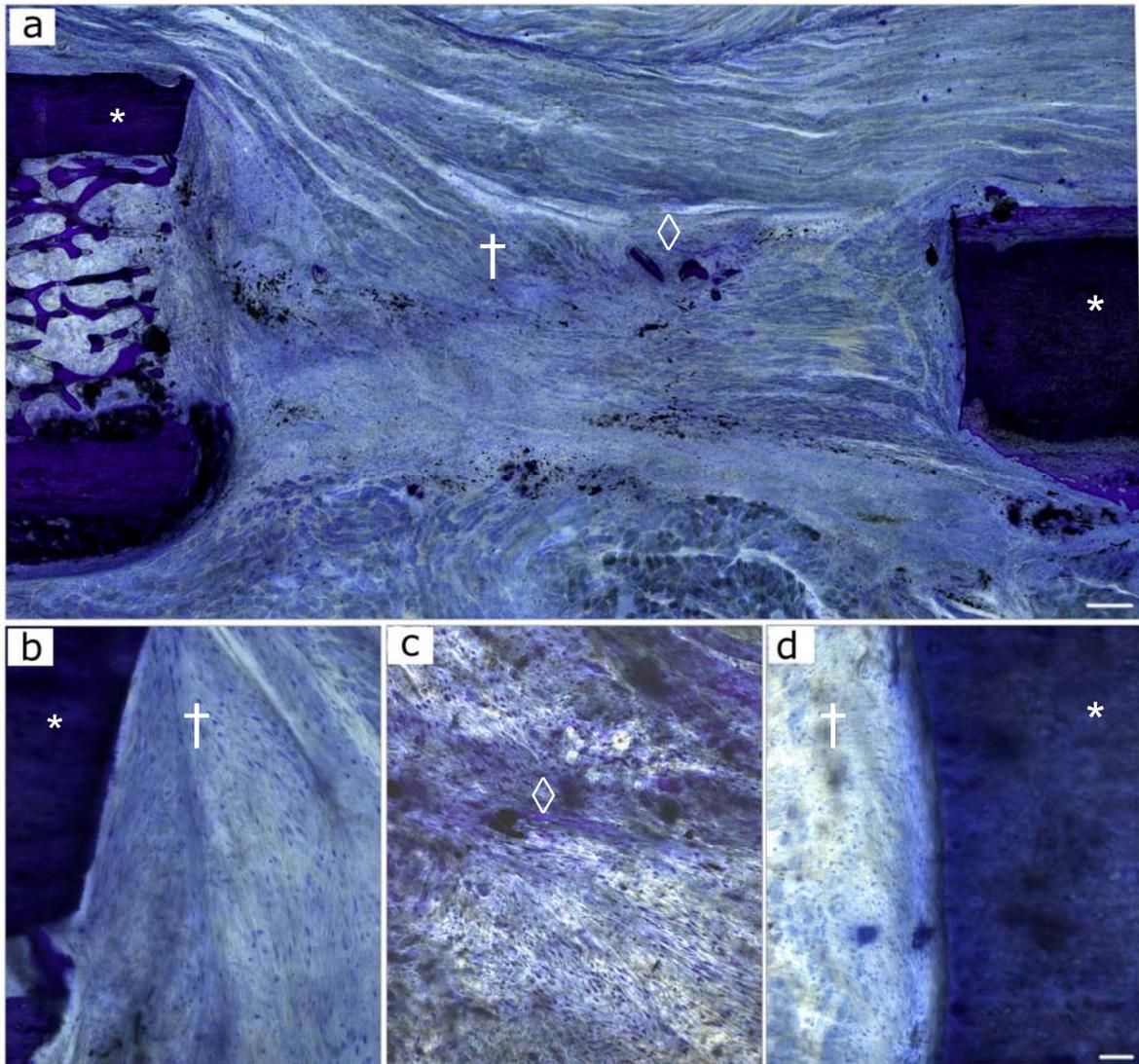


Abb. 21. Histologische Bilddarstellung nach Toluidinblaufärbung eines 6-mm-Femurdefekts in der Ratte ohne Knochenersatzmaterial 2 Wochen postoperativ. a) Übersichtsaufnahme (5-fache Vergrößerung, Maßstab $\cong 200\mu\text{m}$) eines 100- μm -Schnittpräparates. b – d) Detailaufnahmen des gleichen Präparates (20 μm Schnittdicke, 10-fache Vergrößerung, Maßstab $\cong 50\mu\text{m}$). † = gleichmäßige Verteilung fibrozytären Bindegewebes im gesamten Defektbereich; * = Kortikalis des körpereigenen Knochens; ◇ = Vereinzelte Knochensplitter in der Defektzone stellen sich schwarz dar.

Bei den Tieren, denen Knochenersatzmaterialien eingesetzt worden waren, wurde insbesondere der Bereich der Kontaktzone zwischen Knochen und Leitschiene sowie Gewebe im Inneren des Trägermaterials beurteilt. Ein Vergleich der unterschiedlich vorbehandelten Trägermaterialien (ohne Zellen, mit hMSC, mit vordifferenzierten Zellen) ergab keinen Unterschied hinsichtlich der Gewebereaktion im histologischen Bild. Insgesamt fiel eine homogene Verteilung von Bindegewebe – sowohl innerhalb der Leitschienen als auch in den Rand- und Übergangszonen – auf. Das neugebildete Gewebe umschloss die Implantatmaterialien gleichmäßig. Dabei war

keine Fremdkörperreaktion ersichtlich. Weder Fremdkörperriesenzellen noch Makrophagen konnten verstärkt nachgewiesen werden. Es gab keine Hinweise auf Resorption durch Osteoklasten oder Degradation der Keramiken als Ausdruck chemischer Auflösungsprozesse. Ebenso wenig zeigte sich eine entzündliche Reaktion auf die verschiedenen Materialien. An den Defektenden war – ebenfalls unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit – reaktives Kallusgewebe nachweisbar.

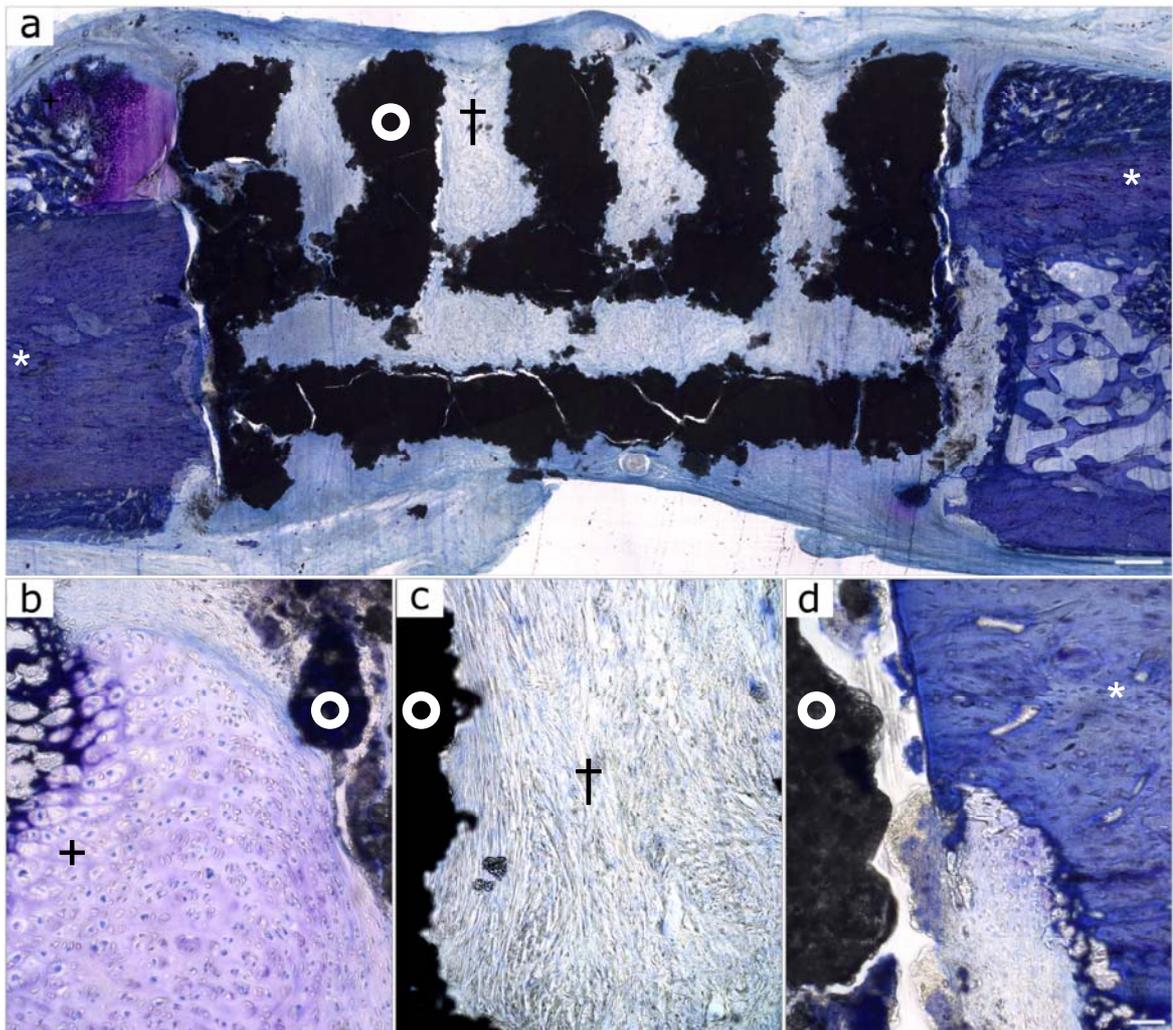


Abb. 22. Histologische Bilddarstellung nach Toluidinblaufärbung eines 6-mm-Femurdefekts in der Ratte mit caesar-Leitschiene 2 Wochen postoperativ. a) Übersichtsdarstellung der Defektzone (5-fache Vergrößerung; Maßstab $\cong 200\mu\text{m}$). b – d) Detailvergrößerungen (20 μm Schnittdicke) des gleichen Präparates (10-fache Vergrößerung, Maßstab $\cong 50\mu\text{m}$). Beachte vor allem: + = reaktives Knorpelgewebe im Grenzflächenbereich zwischen Knochen und Implantat; † = gleichmäßige Verteilung fibrozytären Bindegewebes im Inneren der Leitschiene; * = Kortikalis des Femurs; o = caesar-Leitschiene.

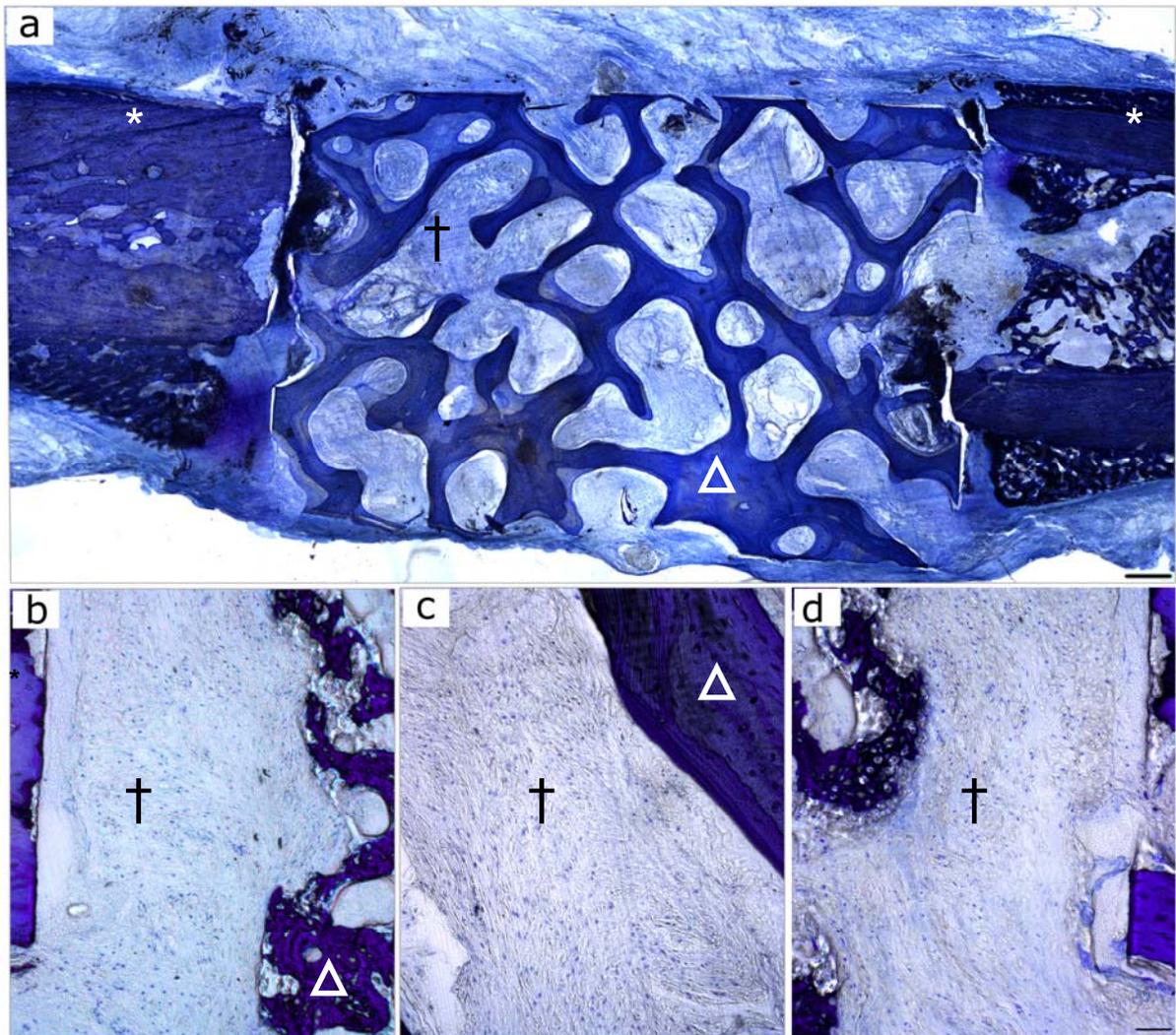


Abb. 23. Histologische Bilddarstellung nach Toluidinblaufärbung eines 6-mm-Femurdefekts in der Ratte mit Tutobone®-Leitschiene 2 Wochen postoperativ. a) Übersichtsdarstellung der Defektzone (5-fache Vergrößerung; Maßstab $\cong 200\mu\text{m}$). b – d) Detailvergrößerungen (20 μm Schnittdicke) des gleichen Präparates (10-fache Vergrößerung, Maßstab $\cong 50\mu\text{m}$). Beachte vor allem: † = gleichmäßige Verteilung von Bindegewebe in allen Bereichen der Leitschiene; * = Knochenkortikalis; Δ = Tutobone®-Leitschiene.

4. Diskussion

Derzeit wird in der chirurgischen Praxis für die Behandlung großer Knochendefekte mit Substanzverlust eine Kombination aus autogenen, allogenen oder prothetischen Materialien verwendet. Die Möglichkeiten autogener Transplantate, die derzeit den Goldstandard der Therapie darstellen, sind jedoch aufgrund begrenzter Verfügbarkeit, Hebedefektmorbidität und mitunter mangelhafter Qualität des Transplantatmaterials eingeschränkt. Verschiedene therapeutische Ansätze wurden bereits entwickelt, um die benannten Probleme zu umgehen. Doch auch die Verwendung allogener Transplantate konnte aufgrund der assoziierten Schwierigkeiten, wie der steten Gefahr der Infektionsübertragung, keine vollwertige Alternative liefern. Aufwändige chirurgische Verfahren, wozu die Kallusdistraktion und der Segmenttransport zählen, bereiten vor allem aufgrund ihrer Langwierigkeit und Kostenintensität Probleme. Vor diesem Hintergrund werden in der „Regenerativen Medizin“ innovative Strategien gesucht, die es über die Kombination mehrerer Maßnahmen erlauben, große Gewebedefekte erfolgreich zu behandeln. Ein möglicher Ansatz ist das sogenannte *Tissue engineering*, dessen Kernthema die Entwicklung zellbesiedelter Gewebekonstrukte darstellt. Ein unverzichtbarer Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines neuen Knochenersatzimplantats ist das präklinische Tiermodell, in dem Ersatzmaterialien orthotop getestet werden können. Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Etablierung eines Defektmodells zur orthotopen Testung zellbesiedelter Konstrukte für den Gewebeersatz.

Zunächst wurde ein neuartiger Zellträger entworfen und unter standardisierten Zellkulturbedingungen geprüft, um ein geeignetes Testmaterial für die nachfolgenden *In-vivo*-Versuche zu entwickeln. Zusätzlich wurden verschiedene Osteosynthesysteme für die Stabilisierung segmentaler Defekte am Rattenfemur ausgewählt und biomechanischen Belastungstests unterzogen. Die Wahl eines geeigneten Fixationssystems wurde auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen basierend getroffen. Es folgte die Implantation der ausgewählten Leitschienen in einen Defekt kritischer Größe im Rattenfemur. Der Einfluss unterschiedlich vorbereiteter Leitschienenmaterialien auf den Knochenheilungsprozess wurde nach zwei beziehungsweise zwölf Wochen radiologisch und histologisch beurteilt.

Das langfristige Ziel dieser Forschungsbemühungen besteht darin, die am besten geeigneten osteogenen Zellen sowie adäquate Trägermaterialien zu finden, um praktikable Lösungen für die klinische Anwendung zu entwickeln (Hutmacher et al. 2007). Insgesamt handelt es sich bei der Regenerativen Medizin um einen Bereich, in dem über interdisziplinäre Zusammenarbeit Kompetenzen verschiedener Fachrichtungen gebündelt werden müssen, um das Wissen aus den Bereichen der Human- und Veterinärmedizin, der Biologie und Chemie sowie den Materialwissenschaften und dem Ingenieurwesen für die Entwicklung eines klinisch anwendbaren Knochenersatzes nutzbar zu machen (Schieker et al. 2006, Atala 2007). Damit ein iterativer Optimierungsprozess für dieses Forschungsfeld möglichst effizient gestaltet werden kann, bedarf es außerdem einer engen Zusammenarbeit und des dauernden Austauschs von Grundlagenforschern und Klinikern. Nur über eine ständige Rückkopplung können Forschungsergebnisse aus dem Labor schnellstmöglich in die klinische Prüfung transportiert und umgekehrt klinische Testergebnisse für Weiterentwicklungen im Labor genutzt werden. Insgesamt ist jedoch zu bemerken, dass es trotz intensiver Forschungsbemühungen noch nicht gelungen ist, ein Material zu entwickeln, das dem autogenen Transplantat gleichkommt. Insofern gilt es, Strategien aufzuzeigen, die es ermöglichen, die den Materialien inhärenten Schwächen auszugleichen.

Neben der Etablierung des Defektmodells selbst waren die Leitschienenentwicklung und -testung sowie der Entwurf und die Überprüfung verschiedener Fixationssysteme im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit im Tiermodell Bestandteil der vorliegenden Studie, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

4.1. Präklinische Tiermodelle

Gerade bei der Entwicklung eines klinisch verwendbaren Knochenersatzes oder im Rahmen der Entwicklung anderer regenerativer Implantate, stellen Tiermodelle einen unverzichtbaren Bestandteil der Wissenschaft dar, da sie den Brückenkopf zwischen Labor und Klinik bilden. Um der ethischen Verantwortung bei Verwendung lebender Tiere gerecht zu werden, müssen *In-vivo*-Versuche aber mit viel Bedacht geplant und durchgeführt werden (Zamir 2006, Auer et al. 2007).

So muss bei der Durchführung eines Tierversuchs zunächst abgewogen werden, welche Tierart beziehungsweise welcher Stamm und welches Modell für die jeweilige Fragestellung in Betracht kommt (Forni 2007). Im Bereich der Zell- und Organtransplantationen werden in der präklinischen Forschung vielfach athyme Nackmäuse oder -ratten als Versuchstiere eingesetzt. Aufgrund der Größenverhältnisse und aufgrund der Tatsache, dass in unserem Versuchsaufbau humane mesenchymale Stammzellen transplantiert werden sollten, haben auch wir uns für den entsprechenden Rattenstamm (rnu/rnu) entschieden. Haarlose Ratten wurden erstmals in den fünfziger Jahren am Rowett Research Institute (Schottland) beschrieben (Schuurman et al. 1992b). Zwei Jahrzehnte später erfolgte dann eine gezielte Selektion von Tieren mit dieser Mutation (Festing et al. 1978). Morphologisch fallen vor allem ihre weitgehende Haarlosigkeit und das gegenüber heterozygoten Tieren um 20 % verringerte Körpergewicht auf (Schuurman et al. 1992a). Für die biomedizinische Forschung ist dieser Stamm in erster Linie dadurch interessant, dass zusätzlich eine Aplasie des Thymus vorliegt. Das Organ ist nur rudimentär angelegt und eine physiologische Lymphozytenpopulation fehlt weitgehend. Somit ist die spezifische Immunantwort defizitär. Problematisch für die Verwendung dieses Stammes ist die geringe Lebenserwartung der Tiere. Durch eine weitreichende Abschirmung der Tiere kann die zu erwartende Lebensspanne von 9 Monaten unter konventionellen Haltungsbedingungen auf eineinhalb bis zwei Jahre ausgedehnt werden. Beim Einsatz homozygoter Nackratten im Rahmen der Testung allogener Transplantate konnte gezeigt werden, dass eine spezifische, T-Zell-vermittelte Immunantwort sowie eine sogenannte „graft-versus-host“-Reaktion bei diesen Tieren sehr gering ausfällt beziehungsweise ganz ausbleibt (Schuurman et al. 1992a). Im Speziellen konnten Grinnemo et al. in einer Vergleichsstudie mit athymen und voll immunkompetenten Tieren feststellen, dass es bei ersteren nicht zu einer Abstoßungsreaktion humaner mesenchymaler Stammzelltransplantate kam (Grinnemo et al. 2004). Insofern lag es nahe, den homozygoten rnu/rnu-Rattenstamm für die hier vorgestellte Studie zur Testung zellbesiedelter Gewebekonstrukte unter Verwendung humaner mesenchymaler Stammzellen auszuwählen.

Untersuchungen zur Knochenregeneration können besonders gut an Defekten kritischer Größe (critical size defect, CSD) durchgeführt werden. Problematisch ist

jedoch, dass zwar Einigkeit darüber besteht, dass als Hauptcharakteristikum es beim CSD ohne unterstützende Maßnahmen nicht zu einem knöchernen Durchbau kommt. Über die tatsächliche Ausdehnung eines solchen Defekts gibt es jedoch keinen Konsens. So reichen die Angaben in der Literatur hinsichtlich Rattenmodellen von 3 – 10 mm (Harrison et al. 2003, Vogelín et al. 2005). Bei der Beurteilung eines Modells müssen ferner der verwendete Rattenstamm sowie das Alter der Tiere berücksichtigt werden, da auch diese Faktoren einen Einfluss auf den Effekt einer Behandlung haben (Shaw et al. 2002). Der von uns gewählte Vollschaffdefekt mit einer Ausdehnung von 6 mm entspricht etwa 18 % der Oberschenkellänge der athymen Nacktratten. Auf die Situation beim Menschen übertragen würde dies einem ca. 9 cm langen Knochendefekt entsprechen. In unserem Modell kam es bei den Tieren ohne Defektauffüllung während einer Beobachtungszeit von zwölf Wochen nicht zu einem knöchernen Durchbau der Defektzone, wie die radiologischen und histologischen Befunde bestätigen. Somit muss ein Defekt kritischer Größe bei der Nacktratte in keinem Fall eine Ausdehnung von 6 mm überschreiten. Zu bemerken ist, dass mit dem präzisen standardisierten Herausfräsen eines Knochensegments eine Situation geschaffen wird, wie sie in der klinischen Situation nur höchst selten anzutreffen sein wird, da hier eine deutliche Variation der Defekte in Ausdehnung und Form die Regel ist (Bhandari et al. 2004, Forster et al. 2006, Fredericson et al. 2006, Kumar et al. 2007). Folglich müssen Defektmodelle in gewisser Hinsicht als realitätsfern eingestuft werden. Im Gegenzug sind sie jedoch gut zu standardisieren und erfüllen damit eine in der Grundlagenforschung unabdingbare Forderung (Howard 2002). Nur so kann eine interindividuelle Vergleichbarkeit von Ergebnissen erreicht werden. Die Grundvoraussetzungen für das Ablaufen des Heilungsprozesses müssen gleich bleiben, um bei der Auswertung die Ergebnisse beurteilen zu können. Dementsprechend bleibt die Definierbarkeit des Versuchsaufbaus von zentraler Bedeutung für die Durchführung artifizierter segmentaler Defektmodelle.

Ausschlaggebend bei der Testung von Knochenersatzmaterialien ist ferner eine ausreichende Stabilisierung der Defektzone. Doch bis heute ist es nicht gelungen, ein allgemein anerkanntes Modell zu entwickeln, das es ermöglichen würde, die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zu vergleichen. Als wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung verschiedener Fixationssysteme für die

Anwendung am Femurdefekt bei der Ratte überprüft. Zunächst wurde ein in seinen Größendimensionen an die Ratte angepasster unilateraler Fixateur externe entwickelt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Verwendung möglichst leichter Materialien, um den Tragekomfort für das Tier so hoch wie möglich zu gestalten und es in seinem Verhalten so wenig wie möglich einzuschränken. Um dies zu erreichen, wurden Stereolithographieverfahren für die Strukturgenerierung verwendet. Der Vorteil dieser Fertigungstechnik ist in der Verwendung sehr leichter Kunststoffmaterialien zu sehen, die binnen kürzester Zeit – basierend auf komplexen dreidimensionalen Datensätzen – verarbeitet werden können (Winder et al. 2005). Verglichen wurden ein selbstentworfener externer Klammerfixateur mit einem weiteren externen Fixationssystem aus PMMA sowie ein internes Fixationssystem (Titanplatte). Hierzu wurden biomechanische Prüfungen an den drei Osteosynthesystemen vorgenommen. Bewusst wurde darauf verzichtet, interne Fixationssysteme bestehend aus Polyethylenstangen, wie sie mitunter in anderen tierexperimentellen Studien mit analoger Fragestellung verwendet werden (Tsuchida et al. 2003, Shen et al. 2004, Little et al. 2005, Hsu et al. 2007, Rai et al. 2007), ebenfalls zu testen, da wir eine an der klinischen Praxis orientierte Osteosynthese anstrebten. Wenngleich in den unterschiedlichen Belastungsmodi die Testkörper sich in ihren Steifigkeiten deutlich unterschieden, stellten sich alle drei getesteten Systeme als für die geplante Verwendung ausreichend stabil heraus. In einer Ganganalyse an Ratten konnte gezeigt werden, dass vertikale Kräfte, die in der Hintergliedmaße auftreten, in etwa der Hälfte des absoluten Körpergewichts entsprechen (Clarke 1995). Bei den von uns verwendeten Nacktratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 240 g (2,4 N) entspräche dies einer ungefähren Belastung der operierten Gliedmaßen von ca. 1 N. Alle von uns getesteten Systeme hielten in axialer Belastung mindestens 17 N/mm vor Implantatversagen stand. Dementsprechend konnte die Auswahl eines geeigneten Fixationssystems anhand weiterer Aspekte getroffen werden. Vor diesem Hintergrund haben wir zusätzliche Gesichtspunkte beurteilt, wie etwa die intraoperative Handhabung, den Tragekomfort für das Einzeltier und die Nachsorge operierter Ratten. Dabei zeigte sich die Platte hinsichtlich der Operationsmethode als überlegen. Da bei der Herstellung eines großen segmentalen Defekts der Femurschaft gänzlich freigelegt werden muss, um bei der Defektgenerierung den Schaden am umliegenden Muskel- und Weichteilgewebe so gering wie möglich zu halten, ist eine minimalinvasive

Vorgehensweise, wie sie bei der Frakturversorgung im eigentlichen Sinne mit einem externen Fixateur praktiziert wird, nicht möglich. Daher zeichnet sich dieses System im Tiermodell nicht durch ein geringeres Trauma während der Einbringung aus. Zudem erfordert ein exaktes Einbringen in dem sehr kleinen Operationsfeld erhebliches manuelles Geschick. Die Platzierung der Pins und des stabilisierenden Verbindungselements in exakt einer Ebene ist jedoch ein entscheidender Erfolgsfaktor, da anderenfalls Spannung zwischen den Knochenenden aufkommt, die eine korrekte Reposition verhindert. Dieses Problem trat bei den Osteosyntheseplatten nicht auf, da hier eine passgenaue Anmodellierung an den Knochen möglich ist. Das letztlich ausschlaggebende Argument für die Verwendung einer internen Fixation stellt jedoch die deutlich leichtere postoperative Handhabung der Tiere dar. Durch eine komplette Hautdeckung des Defektbereiches wird verhindert, dass das Tier selbst an dem Fixationssystem manipulieren kann, was sich mitunter in einem Implantatversagen und/oder einer starken entzündlichen Reaktion niederschlägt. Zusätzlich muss im Falle der Gruppenhaltung von Tieren damit gerechnet werden, dass nicht nur das operierte Tier selbst, sondern darüber hinaus auch die übrigen Tiere an einem externen Fixationssystem manipulieren würden. Dementsprechend müssten operierte Ratten in Einzelhaltung verbracht werden, was dem natürlichen Verhalten von Ratten, die in der Regel sehr soziale Tiere sind, zuwider laufen, zudem höhere Kosten verursachen und deutlich mehr Kapazitäten einer Tierhaltung in Anspruch nehmen würde. Während andere Studien von hohen Ausfallraten durch intra- oder postoperative Komplikationen im Zuge der Verwendung externer Fixateure berichten, traten bei der Verwendung der Plattenosteosynthese in unserem Modell derlei Probleme nicht auf (Jäger et al. 2005a, Meinel et al. 2006).

Im Zuge der Modelletablierung zeigte sich, dass eine mangelhafte knöcherne Konsolidierung zu einem Implantatversagen nach 6 Wochen führte. Wenngleich dies einen Kritikpunkt darstellt, kann daraus nicht eine Ablehnung des internen Fixationssystems gefolgert werden. Über einen begrenzten Zeitraum erlauben die Materialeigenschaften der Platte, eine volle Belastung zu tolerieren. Zudem übernehmen initial die Knochenersatzmaterialien einen gewissen Teil der Last. Bleibt über einen längeren Zeitraum jedoch die Konsolidierung aus, versagen die Osteosynthesematerialien (Chu et al. 2007). Dennoch wird die Platte durch diese

Feststellung nicht von der Stabilisierung eines CSD disqualifiziert. Es ist weithin bekannt, dass Platten nur einer begrenzten Zahl an Belastungszyklen standhalten können. Ein Versagen als Ausdruck der Metaller müdung ist zugleich Indikator für eine verlangsamte oder ausbleibende Knochenheilung (Linkow et al. 1992, Morgan et al. 1993). Da jedoch die Belastbarkeit nicht zuletzt von dem verwendeten Material abhängt, sollte bei der Auswahl eines Fixationssystems für die Defektstabilisierung stets dafür Sorge getragen werden, dass es optimal an die spezifischen Anforderungen angepasst ist (Zahn et al. 2008). Durch die Verwendung von Platten mit höherer Rigidität als Titan, beispielsweise Stahl, könnte somit ein Versagen der Implantate unter Umständen vermieden werden. Eine in diesem Sinne verbesserte Stabilisierung der Defektzone könnte den Heilungsprozess begünstigen. Das hier vorgestellte Modell eines Defekts kritischer Größe am Rattenfemur stellt somit ein gut geeignetes System dar, um die Wirkung verschiedener Knochenersatzmaterialien auf den Heilungsverlauf zu evaluieren.

4.2. Materialien für den Knochenersatz

Einen wichtigen Kernpunkt beim erfolgreichen Einsatz regenerativer Implantate für den Knochenersatz stellt die Wahl eines geeigneten Materials dar. Leitschienen sind zunächst eine formgebende Komponente. Zusätzlich sollten diese durch eine entsprechende Materialzusammensetzung und eine adäquate innere und äußere Struktur sowohl die Adhäsion als auch das Wachstum und die Differenzierung von Zellen unterstützen (Kneser et al. 2006b). Da das angestrebte Ziel die Anwendung am Patienten ist, muss der allgemeine Anforderungskatalog an Implantatmaterialien erfüllt werden: Weder können lokale oder systemische Toxizität, noch Kanzerogenität, Mutagenität oder Antigenität toleriert werden. Hinsichtlich einer praktikablen klinischen Anwendung müssen außerdem freie Verfügbarkeit, Lagerbarkeit sowie Sterilisierbarkeit der verwendeten Materialien eingefordert werden. Im Hinblick auf die Langzeitstabilität sollte das Material außerdem im Zuge der Regeneration durch körpereigenes Material ersetzt werden. Vor allem in der Frühphase des Heilungsprozesses sind Knochenersatzmaterialien von Bedeutung. Unterstützend zu den stabilisierenden Osteosynthesystemen gewähren sie in der Defektzone initial eine gewisse Primärstabilität. Im Zeitverlauf sollte das Material jedoch in dem Maße, in dem körpereigenes Knochengewebe nachgebildet wird,

resorbiert oder degradiert werden (Schilling et al. 2004). In diesem Zusammenhang spricht man von einer Platzhalterfunktion der Knochenersatzmaterialien, deren Aufgabe darin zu sehen ist, das Einwachsen minderwertigen Bindegewebes, welches sich in der Bildung von Pseudarthrosen niederschlägt, zu verhindern. Zudem sollten ein strukturelles Implantatversagen durch Materialermüdung sowie Fremdkörperreaktionen vermieden werden.

Einen weiteren zentralen Aspekt für den erfolgreichen Knochenersatz stellt neben der Materialzusammensetzung die Geometrie der Implantate dar (Bruder et al. 1999). Bevorzugt wird die Verwendung eines in seinen Größendimensionen möglichst genau an den Defekt angepassten Implantats, um das Einwachsen neugebildeten Regeneratgewebes zu erleichtern. Darüber hinaus ist auch der inneren Geometrie der Probenkörper besondere Beachtung zu schenken, da dieser Aspekt einen großen Einfluss auf die Integration der Leitschiene hat. Von großer Bedeutung bei der Kultivierung von Zellen auf derlei Knochenersatzmaterialien ist schließlich eine ausreichende Interkonnektivität des Porensystems, die eine optimale Nährstoffversorgung sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten im Inneren gewährleistet. In der Regel wird für diesen Zweck eine minimale Porengröße von mindestens 150 µm gefordert (Flautre et al. 2001, Sharma et al. 2004, Meinel et al. 2004). Neben dieser Makroporosität wird auch eine Mikroporosität mit einer Porengröße von 10 µm verlangt. Übertragen auf die Situation *in vivo* ist diese Feinstruktur von Bedeutung, um ein Einsprossen von Gefäßen als unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Gewebeintegration zu ermöglichen (Olivier et al. 2004, Salgado et al. 2004, Zyman et al. 2007).

Hydroxylapatitkeramiken eignen sich als Knochenersatzmaterialien vor allem aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität. Eine lokale Integration sowie appositionelles Knochenwachstum findet problemlos statt, langfristig stellt jedoch die mangelhafte Abbaubarkeit dieses Materials ein Problem dar (Mastrogiacomo et al. 2005). In einem Zeitraum von zwölf Wochen, wie er in der vorliegenden Studie gewählt wurde, kommt es nicht zu einer Degradation des Materials. Zudem sind Keramiken sehr spröde und vor allem gegenüber Scherkräften sehr intolerant. Gerade bei Substanzdefekten des Knochenschaftes muss jedoch von einem Implantat erwartet werden, dass es nicht nur eine Platzhalterfunktion einnimmt, sondern auch –

zumindest für eine gewisse Zeit – Last übernimmt. Aufgrund der Anisotropie der Keramiken kann Hydroxylapatit jedoch vor allem den an der Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat auftretenden Kompressions- und Scherkräften kaum standhalten. Wenn über diese mangelhafte Stabilität hinaus das implantierte Material zusätzlich keine Substitution durch neuen Knochen zulässt, addieren sich die Probleme und eine effektive Knochenheilung bleibt aus. Trotz dieser Kritikpunkte ist es sinnvoll, Hydroxylapatitkeramiken experimentell einzusetzen und zu optimieren, da sie in der Zusammensetzung dem natürlichen Hydroxylapatit sehr ähnlich sind. Bei den im Rahmen der hier vorgestellten Studie entworfenen Leitschienen der Stiftung caesar wurde ein Material gewählt, das biokompatibel ist. Insbesondere ist hervorzuheben, dass es durch die gewählten Fertigungstechniken möglich wird, die Anforderungen an ein dreidimensionales Knochenersatzmaterial hinsichtlich der komplexen geometrischen Besonderheiten gänzlich zu erfüllen (Irsen et al. 2006). Mit einer Porengröße von 420 – 630 µm und vollständiger Interkonnektivität sind die Anforderungen an die Makroporosität erfüllt. Durch die Verwendung von Granulatmaterialien, deren Struktur auch nach dem Sinterungsprozess bestehen bleibt, ist gewährleistet, dass ferner eine ausreichende Mikroporosität vorliegt. Diese Charakteristika spiegeln sich in einem guten Verteilungsmuster und der Vitalität der Zellen auf dem Trägermaterial wider. Für die präklinische Tierstudie wurden im Zuge einer möglichst weitreichenden Vereinheitlichung der Versuchsbedingungen standardisierte Probenkörper in Zylinderform gewählt. Ein entscheidender Vorteil der ausgesuchten Materialien bestand im Herstellungsprozess. Mit Rapid-Prototyping-Techniken, insbesondere mit dem auch von uns verwendeten 3-D-Drucken, wird es grundsätzlich möglich, patientenindividuelle Strukturen zu generieren (Leukers et al. 2005, Seitz et al. 2005a). Somit kann im Einzelfall optimal an den Defekt angepasster Knochenersatz hergestellt werden. Außerdem ermöglicht ein solches schichtaufbauendes dreidimensionales Verfahren die Herstellung extrem fein strukturierter Formkörper, die den geometrischen Anforderungen an die innere und äußere Struktur gerecht werden können, was Vorteile gegenüber zahlreichen anderen Materialien und Fertigungstechniken bietet (Stevens et al. 2007).

Neben den dreidimensional gedruckten Hydroxylapatitleitschienen wurden in dieser Studie auch lösungsmittelkonservierte Zylinder zellfreier boviner Knochenspongiosa verwendet (Tutobone®). Diese bereits für die klinische Anwendung zugelassenen

Leitschienen wurden ausgewählt, um als Vergleich zu synthetischen Trägermatrizen biologische Keramiken zur Verfügung zu haben. Vor allem hinsichtlich der Beurteilung der Feinstruktur besteht der große Vorteil der Rinderspongiosa darin, dass verschiedene Probleme anderer Knochenersatzmaterialien, wie zum Beispiel angemessene Stegbreiten, adäquate Porengrößen und eine ausreichende Interkonnektivität ideal gelöst sind, da das Material letztlich strukturell noch immer dem physiologischen Knochengewebe entspricht. Für die Verwendung als Knochenersatzmaterial stellt sich jedoch das Problem dar, dass auch für prozessiertes Gewebe keine völlige Proteinfreiheit gewährleistet werden kann, so dass ein Restrisiko zur Krankheitsübertragung bestehen bleibt. Die Tutobone[®]-Leitschienen brachten im Vergleich zu den synthetischen Keramiken in dem hier vorgestellten Tierversuch keine besseren Ergebnisse. Zwar zeigte sich vor allem im histologischen Bild nach zwei Wochen eine deutliche Reaktivität des Gewebes mit beginnender Knorpelbildung, die auf eine sekundäre Knochenheilung hinwies, jedoch setzte sich dieser Prozess nicht im Sinne einer knöchernen Konsolidierung fort. Nach Ablauf der zwölfwöchigen Nachbeobachtungsphase wurde hingegen lediglich bei Tieren, die mit synthetischen Implantaten versorgt worden waren, eine beginnende knöcherne Durchbauung anhand der Röntgenbilder vermutet. Dieses Knochenneubildungspotential bestätigte sich auch in den μ CT-Untersuchungen. Dort konnte anhand der 3-D-Rekonstruktionen nachgewiesen werden, dass es zu einer teilweisen Überbrückung der Defektzonen im Sinne von Knochenbrücken gekommen war. Auch für dieses Material konnten jedoch keine osteokonduktiven Eigenschaften nachgewiesen werden. Eine besondere Schwierigkeit, die bei Verwendung eines Knochenersatzes *in vivo* berücksichtigt werden muss, besteht darin, dass eine erfolgreiche Defektüberbrückung nur in einem mechanisch stabilen Milieu ablaufen kann (Bauer et al. 2000). Mikrobewegungen, vor allem Scherkräfte, behindern den Heilungsprozess nachhaltig (Epari et al. 2006). Im Falle mangelhaft eingepasster Leitschienen treten Kräfte auf, die die Knochenneubildung verhindern können. Im Schädeldefektmodell kritischer Größe bei Ratten konnte hingegen ein knochenheilungsfördernder Einfluss prozessierter boviner Matrix gezeigt werden (Kneser et al. 2006c). Zu Bedenken ist jedoch, dass es sich dabei um Regenerationsprozesse in einem nicht-lasttragenden Bereich handelte, was mit der Situation im Femurschaft nur bedingt zu vergleichen ist. So könnte in der vorliegenden Studie eine mangelhafte Einpassung der Leitschienen in den Defekt ein

Faktor gewesen sein, warum eine Einheilung durch das Auftreten von Mikrobewegungen verhindert wurde. Auch die sofortige starke mechanische Beanspruchung könnte die knöcherne Integration verhindert haben, entsprechende Beobachtungen sind für analoge Materialien aus klinischen Studien bekannt (Gierse et al. 1999).

4.3. Innovative Strategien für den Knochenersatz

Einen wichtigen Ansatzpunkt zur Verbesserung des funktionellen Ergebnisses nach Implantation einer Leitschiene stellt die Besiedelung der verwendeten Materialien mit matrixproduzierenden Zellen dar. Die Kombination aus Trägermaterialien und vitalen Zellen führt dazu, Implantate zu erhalten, welche die physiologisch ablaufenden Heilungsprozesse dadurch entscheidend positiv beeinflussen können, dass diese metabolisch aktiven Zellen die Knochenneubildung übernehmen. Darüber hinaus kann durch die Vorkultivierung zellbesiedelter Gewebekonstrukte erreicht werden, dass die Zellen bereits *in vitro* eine Matrix ausbilden, die in der Folge die Einheilung erleichtert. Ein ähnlicher Ansatz wird bereits in der klinischen Praxis angewandt: Vielfach wird körpereigener Knochen von einem nicht beeinträchtigten Gewebeareal (Beckenkamm) gewonnen und in die Defektzone verbracht (Schieker et al. 2006). Als Zellquelle wird zum Teil Knochenmark verwendet, welches auf den transplantierten Knochenspan aufgeträufelt wird. Diese Strategie bringt jedoch verschiedene Probleme mit sich: Zum einen ist bereits die Entnahme des autogenen Transplantats mit negativen Effekten (Hebedefektmorbidität, mangelnde Verfügbarkeit, minderwertiges Knochenmaterial bei systemischer Erkrankung) behaftet, und zum anderen ist fraglich, ob die transplantierten Zellen durch einfaches Bespritzen des Knochenspanns am Ort des Defektes verbleiben und die gewünschten Effekte erzielen können, zumal *in vitro* nur durch komplizierte mehrphasige Besiedelungsschritte das tatsächliche Anheften der Zellen am Trägermaterial gewährleistet werden kann. Die Strategie der Vitalisierung von Implantaten durch den Einsatz metabolisch aktiver Zellen stellt einen der zentralen Aspekte im Feld der Regenerativen Medizin dar. Verschiedene Studien bewiesen eine positive Beeinflussung der Knochenheilung durch Verwendung zellbesiedelter Ersatzmaterialien (Petite et al. 2000). Bemerkenswert dabei ist, dass es nicht einen definitiven osteogenen Zelltyp gibt. Mehrfach wurde bereits das Potential

mesenchymaler Stammzellen untersucht. Doch auch Knochenmarkszellen, periostale Zellen und Osteoblasten kamen zum Einsatz, und all diese Zelltypen wurden mit Knochenneubildung in Zusammenhang gebracht (Kuznetsov et al. 1997, Vacanti et al. 2001, Groger et al. 2003, Stangenberg et al. 2005). Wenngleich die Vitalisierung von Knochenersatzwerkstoffen einen sehr vielversprechenden Ansatz für die Regenerative Medizin darstellt, bleibt ein kritischer Punkt, den es bei der *In-vitro*-Expansion von Zellen mit nachfolgender Transplantation zusätzlich zu bedenken gilt, die Notwendigkeit der Verwendung fetalen Kälberserums während der Kulturperiode. Bei nahezu allen Studien, in denen hMSC *in vitro* expandiert wurden, war das Kultivierungsmedium mit fetalem Kälberserum supplementiert. Dies gilt sogar für klinische Studien, die von der FDA, der U.S. Food and Drug Administration, zugelassen wurden (Horwitz et al. 1999). Auch wenn das Risiko für die Übertragung von Zoonosen oder Prionenkrankheiten gemeinhin als relativ gering eingestuft wird (Doerr et al. 2003), gilt es dennoch zu bedenken, dass durch die Verwendung bovinen Serums eine immunologische Abwehrreaktion aufgrund der Übertragung xenogener Proteine induziert werden kann (Shahdadfar et al. 2005). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass als Folge einer Übertragung autologer Stammzellen, die unter Zusatz von fetalem Kälberserum kultiviert worden waren, eine humorale Immunantwort auf xenogene Proteine stattfindet (Spees et al. 2004). Um diese unerwünschten Effekte zu umgehen, gab es bereits Bemühungen, das Verhalten humaner Zellen unter Kultivierung mit autologem Serum näher zu analysieren (Stute et al. 2004, Shahdadfar et al. 2005). Dabei zeigte sich, dass die Zellen zwar schneller proliferierten, die Differenzierung jedoch langsamer ablief als bei hMSCs, welche unter Zugabe fetalen Kälberserums expandiert wurden (Shahdadfar et al. 2005). Insofern besteht auch in diesem Bereich noch Forschungsbedarf, um die vorhandenen Probleme zu überwinden und offene Fragen bezüglich der bestmöglichen Kulturbedingungen für die *Ex-vivo*-Proliferation humaner Stammzellen zu beantworten.

Dennoch ist der Ansatz, Zellen zur Unterstützung des Heilungsprozesses in Defektzonen zu transplantieren, von hoher Relevanz und stellt die Kernfrage der vorliegenden Arbeit dar. In dieser wurde auf die Verwendung potentiell heilungsfördernder Agenzien (zum Beispiel Wachstumsfaktoren o. ä.) verzichtet. Stattdessen stand ein Vergleich der Wirkung unbesiedelter und zelltragender

Knochenersatzmaterialien im Vordergrund. Dies begründet sich darin, dass letztlich stets Zellen für Umbau-, Regenerations- und Defektheilungsprozesse im Knochen verantwortlich sind – seien es körpereigene, welche durch die Wirkung chemoattraktiver Substanzen in das Wundheilungsgebiet gelockt werden oder auch transplantierte Zellen. Besonders mesenchymale Stammzellen sind ein gut geeigneter Zelltyp. Da sie aus dem Knochenmark autolog gewonnen werden können, stellen sie eine leicht zugängliche Quelle für extrem proliferationsaktive Zellen dar, die für die Anwendung im Rahmen der Herstellung regenerativer Implantate genutzt werden kann. Wenngleich die Zahl der Stammzellen im Knochenmark mit 0,003 % – 0,015 % (Wexler et al. 2003, Mageed et al. 2007) relativ gering erscheint, ist es möglich, durch *In-vitro*-Expansion hohe Zellzahlen zu erreichen, ohne dass der Stammzellcharakter dieser Zellen verloren geht (Pittenger et al. 1999). Der positive Effekt von Knochenmarksstammzellen auf die Heilung tibialer Pseudarthrosen (Hernigou et al. 2005) und avaskulärer Hüftnekrosen (Hernigou et al. 2002) konnte bereits in klinischen Studien nachgewiesen werden. Durch Knochenmarkspunktion wird somit auf relativ einfache Weise eine große Anzahl an Zellen zugänglich, die im Sinne einer autogenen Transplantation eingesetzt werden können. Dies ist positiv, da Probleme, die mit möglicher Infektionsübertragung oder mit immunologischen Abstoßungsreaktionen, die mit allogenen oder gar xenogenen Transplantaten einhergehen, auf diese Weise vermieden werden. Zudem besteht die Möglichkeit, durch spezifische Medienzusätze mesenchymale Stammzellen *in vitro* entlang der osteogenen Kaskade zu differenzieren (Reddi 1995, Jaiswal et al. 1997). Um erfolgreich mit humanen mesenchymalen Stammzellen arbeiten zu können, ist es unabdingbar, bei der *In-vitro*-Kultivierung einigen Aspekten besondere Beachtung zu schenken (Sotiropoulou et al. 2006). Auf diese Art wird gewährleistet, dass die kultivierten Zellen ihre typischen Expressionsprofile und damit ihren Stammzellcharakter nicht verlieren. In der hier vorliegenden Studie wurde im Besonderen darauf geachtet, die Zellen stets nur bis zu einer Konfluenz von ca. 60 % in Kultur zu halten, da sich bei einer dichteren Kultivierung mit Kontaktaufnahme der Zellen deren spezifische Eigenschaften ändern (McBeath et al. 2004). Ebenso wurde besonderer Wert darauf gelegt, vor allem für die Tierversuche frühe Passagestadien (6.Passage) zu verwenden, da hMSC in der Regel – ungeachtet ihrer theoretisch unbegrenzten Proliferationskapazität – unter Standard-Kulturbedingungen nach etwa 25 sogenannten „population doubling times“ in ein

seneszenten Stadium verfallen, in dem kein weiteres Wachstum erfolgt und auch die Differenzierungsfähigkeit verloren geht (Bruder et al. 1997, Banfi et al. 2000, Shibata et al. 2007). Im Rahmen der Anwendung regenerativer Implantate ist es jedoch ein Kernpunkt, metabolisch aktive, proliferierende Zellen einzusetzen, da sie es sind, die über die Bildung einer extrazellulären Matrix die Defektheilung unterstützen sollen. Die Entscheidung, welche Zellcharge für die hier vorgestellte Studie verwendet werden sollte, wurde anhand früherer in der Arbeitsgruppe durchgeführter Studien getroffen. Im Rahmen der dort durchgeführten Versuche waren die Proliferationsaktivität und das Differenzierungspotential der zum Einsatz kommenden Zellen in 2-D-Zellkultur entlang der osteogenen, chondrogenen, sowie adipogenen Linie grundsätzlich nachgewiesen worden (Wierer 2006). Im Zuge der Implantatvorbereitung für die intravitale Testung wurde die Differenzierungsfähigkeit der verwendeten hMSC hier auch im 3-D-Aufbau überprüft. Wenngleich es *in vitro* nicht zur Bildung von Knochengewebe im eigentlichen Sinne kommt, kann die Differenzierung von Zellen innerhalb der osteogenen Kaskade (ausgehend von mesenchymalen Stammzellen) durch die Zugabe spezifischer Faktoren unterstützt werden. Der Erfolg der osteogenen Differenzierung wird dabei am Grad der Mineralisierung oder anhand der Expression knochenspezifischer Marker (zum Beispiel alkalische Phosphatase) gemessen (Marom et al. 2005). Im vorliegenden Versuch wurde das Differenzierungspotential von hMSC im dreidimensionalen System sowohl auf biologischen Leitschienenmaterialien (Tutobone[®]) als auch auf synthetischen Hydroxylapatitkeramiken (caesar) anhand des Nachweises der Hochregulation der alkalischen Phosphatase überprüft. In jedem Fall konnte die Hochregulation der mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase als typischem osteogenen Marker mit Hilfe der quantitativen Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) im Vergleich zu unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. So wurde sichergestellt, dass für die Anwendung im orthotopen Femurdefekt bei der Ratte deutliche Unterschiede in den zellbesiedelten Gewebekonstrukten zwischen den Gruppen vorlagen. Dies ermöglichte eine Beurteilung, inwiefern das Differenzierungsstadium transplanteder Zellen auf den Knochenersatzimplantaten einen Einfluss auf den Heilungsverlauf haben kann. Jedoch konnten in der hier vorgelegten Studie keine signifikanten Unterschiede im Heilungserfolg zwischen den unterschiedlichen Gruppen festgestellt werden. Dies ist auch auf die geringen Tierzahlen zurückzuführen, da vor allem die Langzeituntersuchungen im Sinne einer

Pilotstudie durchgeführt wurden. Somit zeigten sich zwar Tendenzen, dass eine osteogene Stimulation den Verlauf der Heilung positiv beeinflusst, da in 50 % der Fälle, in denen eine zumindest teilweise knöcherne Konsolidierung vermutet wurde, differenzierte Zellen übertragen worden waren. Es ist insgesamt denkbar, dass es *post implantationem* zu einem raschen Absterben der Zellen gekommen ist, zumal die Umgebungsbedingungen im Vergleich zu den Standardkulturbedingungen *ad hoc* geändert werden. Zwar basiert auch in der Zellkultur die Oxygenierung und Nährstoffversorgung allein auf Diffusionsprozessen, die in ihrem Radius deutlich limitiert sind, in der *in vivo* Situation kommt jedoch erschwerend hinzu, dass es als Ergebnis der chirurgischen Manipulation zu einer Entzündungsreaktion mit einer verstärkten Absonderung von Exsudat und Fibrin kommt, was die Diffusionsprozesse zusätzlich beeinträchtigen kann. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu anderen Studien, die eine deutliche positive Beeinflussung der Knochenregeneration durch die Übertragung mesenchymaler Stammzellen und zusätzlich eine Verbesserung des Effektes durch osteogene Vordifferenzierung nachweisen. Meinel et al. (Meinel et al. 2005, Meinel et al. 2006) gelang sowohl im Schädeldefekt als auch im Femurdefekt der Nachweis, dass die Knochenregeneration bei Transplantation von Zell-Matrix-Konstrukten deutlich besser ausfiel als im Falle einer alleinigen Implantation des Trägermaterials. Zusätzlich zeigten Versuchsgruppen mit osteogen vordifferenzierten hMSCs im Gegensatz zu unvorbehandelten Zellen deutlich bessere Ergebnisse, was jedoch im Vergleich zu unserem Versuchsaufbau auch auf die deutlich höhere Zahl transplanteder Zellen zurückzuführen sein könnte. Jager et al. testeten ebenfalls den Einfluss humaner Stammzellen (aus dem Nabelschnurblut) im Femurdefektmodell in der Ratte (Jager et al. 2007). Nach einer Nachbeobachtungszeit von 10 Wochen zeigten 4 von 10 Tieren, denen zellbesiedelte Trägermaterialien implantiert worden waren, eine knöcherne Konsolidierung der Defektzone. Im Gegensatz hierzu blieb bei Tieren, die mit unbesiedelten Biomaterialien behandelt worden waren, ein Durchbau aus. Allerdings konnten humane Zellen mittels immunhistochemischer Färbemethoden lediglich bis vier Wochen nach Implantation nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass weniger die Syntheseleistung der transplantierten Zellen für den positiven Einfluss verantwortlich ist. Vielmehr gibt es Grund zu der Annahme, dass sie initial eine Signalkaskade in Gang setzen und Wachstumsfaktoren freisetzen, die eine zusätzliche Rekrutierung und Stimulation von Wirtszellen bedingen. Insofern wäre ein dauerhaftes Überleben transplanteder Zellen nicht

unbedingt für den Heilungserfolg entscheidend. Gleiches gilt letztlich auch bei der Verwendung autologer Spongiosatransplantate. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Untersuchung nicht ähnliche Effekte beobachtet werden konnten, kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen wurde von Jager in etwa die sechsfache Zellmenge transplantiert, so dass bei Übertragung einer deutlich geringeren Zellzahl eventuell die Signalintensität für die körpereigenen Zellen nicht ausreichend ist. Zusätzlich war der gewählte Defekt mit 4 mm über 30 % kleiner als in dem von uns gewählten Modell. Dies schlägt sich in einer höheren Stabilität mit entsprechend positiver Auswirkung nieder. Allerdings wird auf diese Weise das implantierte Material weniger herausgefordert, so dass die Frage bleibt, inwieweit die Heilung tatsächlich Ausdruck des positiven Einflusses eines Implantats ist und nicht das erhebliche körpereigene Regenerationspotential widerspiegelt. Denkbar ist, dass das verwendete Kompositmaterial, ein Kollagen-Keramik-Träger, ein besser geeignetes Material darstellt, da es leichter abgebaut wird. Eine ähnliche Leitschiene wurde von Peterson et al. ebenfalls in einem orthotopen Defektmodell verwendet (Peterson et al. 2005). Dort konnte unter Verwendung BMP-2-überexprimierender Progenitorzellen ein knöcherner Durchbau erreicht werden. Allerdings gelang auch in diesem 6 mm messenden Defektmodell keine Heilung durch die alleinige Verwendung nicht transduzierter Zellen auf einer Leitschiene, wohingegen rekombinantes BMP auf dem Trägermaterial wiederum einen positiven Effekt hatte. Das hohe osteoinduktive Potential der BMPs wird auch aus verschiedenen anderen Studien im Rattenmodell ersichtlich. Betz et al. konnten eine Überbrückung eines 5 mm großen Defekts durch direkte perkutane Applikation eines BMP-2 tragenden Adenovirus bewirken (Betz et al. 2006) und Vögelin et al. gelang es, einen 1 cm großen Femurdefekt mit BMP-2 adsorbierter Polylactid-Hyaluronsäurematrix zu überbrücken, während das Knochenersatzmaterial allein keine knöcherne Konsolidierung bewirken konnte (Vogelin et al. 2005). Dies deckt sich auch mit Ergebnissen anderer Arbeiten (Kirker-Head et al. 2007), die bestätigen, dass die Applikation rekombinanten humanen BMPs zu mehr Knochenneubildung führt als die Verwendung (differenzierter) humaner Stammzellen. Diese Option stellt jedoch einen völlig anderen therapeutischen Ansatz als die von uns gewählte Strategie der Zellübertragung dar, deren zentraler Aspekt nicht zuletzt die verhältnismäßig einfache Verfahrensweise ist. Im Gegensatz dazu erfordert die Verwendung rekombinanter Wachstumsfaktoren einen erheblich höheren Arbeitsaufwand für die

Herstellung der Substanzen. Dementsprechend liegt die finanzielle Belastung ebenfalls deutlich über der bei Verwendung autologer Zellen aus dem Knochenmark zu erwartenden. Unter Umständen ist in der hier vorgestellten Studie – vor allem bei den verwendeten Hydroxylapatitkeramiken – das bessere Ergebnis zum Teil auch dadurch beeinträchtigt worden, dass das verwendete Material durch mangelhafte Stabilität den Heilungsprozess behindert hat. Nachdem der wichtige Einfluss mechanischer Belastung auf die Knochenheilung unbestritten ist, könnten sich Scherbewegungen, wie sie durch Absplitterungen kleiner Fragmente des Implantatmaterials auftreten, hinderlich für den Heilungsprozess erweisen (Augat et al. 2003). Für die Zellen des muskuloskelettalen Systems ist insgesamt eine ausgeprägte Mechanosensitivität bekannt, was sich darin äußert, dass Reifung und Differenzierung dieser Zellen als Resultat mechanischer Kräfte auftreten, wobei gleichzeitig neuer Knochen nur gebildet werden kann, wenn im Grenzflächenbereich günstige mechanische Bedingungen herrschen (Augat et al. 2005). Dieser Tatsache wurde dahingehend Rechnung getragen, dass besonderes Augenmerk auf die Auswahl eines geeigneten Fixationssystems für die Stabilisierung eines segmentalen Defektes am Rattenfemur gelegt wurde. Grundsätzlich erwies sich die Plattenosteosynthese für das gewählte Modell geeignet, wenngleich die Verwendung von Stabilisationssystemen mit einer höheren Belastbarkeit (beispielsweise Stahlplatten) sinnvoll erscheint. Vor allem in den histologischen Präparaten nach zwei Wochen konnte reaktives Kallusgewebe an den Knochenenden nachgewiesen werden. Dies ist Ausdruck des im Falle der indirekten Knochenheilung ablaufenden phasischen Regenerationsprozesses.

Zu bedenken bleibt, dass es sich bei Defekten der Femurdiaphyse um ein verhältnismäßig ersatzschwaches Lager handelt, was den Heilungsprozess zusätzlich erschwert. Im Kaninchenmodell erfolgte innerhalb von 6 Wochen ein Einwachsen ausgereiften Knochengewebes überall in 6 mm im Durchmesser messenden Hydroxylapatitleitschienen. Jedoch wurden in diesen Studien die Materialien in Bohrlochdefekten der Femurkondylen getestet, die zum einen ein deutlich ersatzstärkeres Lager darstellen, das zum anderen mechanisch nicht belastet wird (Tamai et al. 2002). Erschwerend kommt hinzu, dass durch Entfernen eines knöchernen Segments und Ersatz durch ein Knochenersatzimplantat auch der heilungsfördernde Einfluss des umgebenden Periosts, das für die vaskuläre

Versorgung des Knochens und als Quelle osteogener Zellen ein wichtiger Faktor ist, entfällt. Die Bedeutung der Knochenhaut für den Verlauf der Knochenheilung wurde jedoch nachgewiesen (Utvag et al. 1996, Zhang et al. 2005). Somit muss der osteoinduktive beziehungsweise osteogene Stimulus von dem verwendeten Implantat ausgehen, eine Osteokonduktivität allein ist für die Defektüberbrückung nicht ausreichend. Dennoch zeigte sich bei unseren Kontrolltieren mit Leerdefekt durch Knochenneubildung in den Randbereichen der Defektzone, dass athyme Nacktratten ein deutliches Regenerationspotential besitzen. Dies bestätigte sich auch im Falle der mit verschiedenen Implantaten versorgten Tiere. Wenngleich radiologisch unabhängig vom Implantat nach zwei Wochen noch keine Durchbauung der Defektzone zu sehen war, zeigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen jedoch deutlich die aktiven Prozesse vor allem in den Randbereichen an den Fragmentenden. Hier konnte reaktives Kallusgewebe nachgewiesen werden, wie es im Rahmen der sekundären Frakturheilung regelhaft auftritt. Bei der Untersuchung nach längeren Zeiträumen trat das Knochenneubildungspotential noch weiter in den Vordergrund. Besonders eklatant war dies im Falle der Leerdefekte, da in der Defektzone kein weiteres röntgendichtes Material, wie bei Einbringung einer Leitschiene, vorhanden ist. Insofern können Verschattungen deutlich leichter als Kallus beziehungsweise neugebildeter Knochen interpretiert werden. So zeigten die *In-vivo*- μ CT-Untersuchungen nach 10 Wochen eine ca. 20 %ige Verengung des Defektbereiches. Dieses Bild bestätigte sich auch im konventionellen Röntgen nach 12 Wochen. Somit wurde der Nachweis erbracht, dass es sich bei der gewählten Defektgröße zuverlässig um einen Defekt kritischer Größe handelt, das Knochenbildungspotential indes von der chirurgischen Manipulation grundsätzlich unberührt bleibt. Zudem war bei weiteren vier Tieren anhand der Röntgenaufnahmen eine zumindest teilweise knöcherne Konsolidierung zu sehen. Allen vier Tieren waren Hydroxylapatitleitschienen implantiert worden. Als Tendenz deutete sich an, dass die Transplantation mesenchymaler Stammzellen einen positiven Einfluss auf die Knochenneubildung hat (zwei der Implantate waren mit vordifferenzierten, eines mit nativen Stammzellen besiedelt worden). Wenngleich also aufgrund der geringen Tierzahlen noch keine statistisch abzusichernde Aussage getroffen werden kann, ist der Ansatz, Stammzellen zur Unterstützung eines Heilungsprozesses zu übertragen, vielversprechend. Der offenkundige Vorteil des vorgestellten Tiermodells ist darin zu sehen, dass es aufgrund der großen

Ausdehnung des Defektbereiches die Heilungskapazität maximal herausfordert. Nur in einem derartigen experimentellen Aufbau lässt sich das Potential eines neuartigen Knochenersatzmaterials tatsächlich beurteilen, da sicher ausgeschlossen werden kann, dass es allein aufgrund körpereigener Reparationsvorgänge zu einer Heilung kommen kann.

Wie bereits angedeutet, stellt eine vielversprechende Möglichkeit, den Erfolg artifiziellen Knochenersatzes zu verbessern, der Einsatz osteoinduktiver Substanzen dar. Verschiedene Faktoren und Proteine im Knochen regulieren die zelluläre Aktivität. Vermittelt durch spezifische Rezeptoren können sie intrazelluläre Signalkaskaden induzieren, die in einem veränderten Aktivitätsprofil der Zellen resultieren. Zu diesen Faktoren zählen der „*transforming growth factor β* “ (TGF- β), „*insuline-like growth factor*“ (IGF), „*platelet-derived growth factor*“ (PDGF), „*fibroblast growth factor*“ (FGF) und die „*bone morphogenetic proteins*“ (BMPs). Sie können über eine Beschleunigung des Regenerationsprozesses dazu führen, dass körpereigenes Gewebe schneller wieder eine Stützfunktion übernehmen kann (Gautschi et al. 2007). Das implantierte Knochenersatzmaterial wird dementsprechend entlastet. Dabei sind zwei mögliche Angriffspunkte denkbar: Zum einen setzt die Wirkung – im Falle zellbesiedelter Gewebekonstrukte – durch eine gesteigerte Syntheseleistung der transplantierten Zellen ein, zum anderen werden aber auch körpereigene Zellen vermehrt stimuliert. Einige dieser Wachstumsfaktoren wurden bereits in aufgereinigter Form klinisch zum Einsatz gebracht. Das bekannteste Beispiel sind die „*bone morphogenetic proteins*“. Diese sind Vertreter der „*transforming growth factor β* “-Familie und stellen hochpotente osteoinduktive Faktoren dar. Klinisch wurden sowohl BMP-2 als auch BMP-7 eingesetzt bei Patienten, bei denen eine Frakturheilung nach konservativen Behandlungsbemühungen fehlgeschlagen war (Govender et al. 2002, Dimitriou et al. 2005).

Neben aufgereinigten Faktoren gibt es auch verschiedentlich Ansätze, ein Gemisch unterschiedlicher Wachstumsfaktoren zu verwenden. Zum Einsatz kommt beispielsweise das sogenannte „*platelet rich plasma*“ (PRP), welches abhängig von der Aufbereitung neben dem „*platelet derived growth factor*“ (PDGF) eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren enthält (Sammartino et al. 2005, Thorwarth et al. 2006).

Es wurde gezeigt, dass die Knochenneubildung damit sowohl in experimentellen Aufbauten als auch in der klinischen Anwendung verbessert werden kann. Ebenso wurde aufgrund seines Gehalts an Wachstumsfaktoren und osteoinduktiven Potentials verschiedentlich demineralisierte Knochenmatrix (DBM) für den Knochenersatz verwendet. Allerdings stellte sich heraus, dass der Aufbereitungsprozess einen deutlichen Einfluss auf das tatsächliche osteoinduktive Potential hat, wie eine Studie nachwies, die drei unterschiedliche kommerziell erhältliche Formulierungen testete und abweichende Ergebnisse fand (Peterson et al. 2004). Trotz vielversprechender erster Resultate der Anwendung osteoinduktiver Faktoren sind jedoch insgesamt noch viele Fragen offen. Zum einen stehen Langzeitnachuntersuchungen behandelter Patienten noch aus und zum anderen ist derzeit nicht abschließend geklärt, wie die Pharmakokinetik solcher Substanzen sowie deren Applikationsmodus zu optimieren ist, um eine größtmögliche Sicherheit für den Patienten zu gewährleisten. Zudem sind derzeit alle Verfahren zur Gewinnung oder Herstellung der Wachstumsfaktoren noch extrem aufwändig und entsprechend teuer, was sie für die breite klinische Anwendung unattraktiv macht.

Um den Erfolg artifizieller Gewebe zu erhöhen wären Ansätze, welche die Möglichkeiten der Gentherapie nutzen, ebenso denkbar und für mögliche Folgeprojekte der hier präsentierten Studie von Interesse. Um einen therapeutischen Nutzen durch die Expression und Wirkung bestimmter Gene zu erhalten, werden hierbei Gene in Zellen oder Gewebe verbracht. Um dies zu erreichen wird ein gentragender Vektor benötigt, welcher den Transport des interessierenden Transgens vermittelt. Dabei gibt es methodisch unterschiedliche Möglichkeiten. Virale Vektoren bieten eine hohe initiale Effektivität und können sogar eine stabile Transfektion behandelter Zellen erwirken. Ernsthafte Bedenken erwachsen jedoch aus deren Immunogenität, dem Hervorrufen einer akuten Immunantwort und nicht steuerbarer Insertionsmutagenese (Bleiziffer et al. 2007). Nichtvirale Techniken gliedern sich in physikalische oder chemische Methoden, deren Effizienz jedoch gemeinhin sehr gering ist (Gao et al. 2007). Im Zusammenhang mit der Knochenheilung ist eine stabile Transfektion osteogener Zellen vorstellbar, um eine Überexpression heilungsfördernder Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren zu erreichen (Jiang et al. 2006, Tu et al. 2007). Die Gentherapie birgt ein beträchtliches medizinisches Potential und ist ein vielversprechendes Forschungsfeld. Gleichwohl

muss das Risikoprofil therapeutisch einzusetzender Gene und Vektoren noch detaillierter untersucht werden, um eventuell auftretende Nebenwirkungen für den Patienten besser abschätzen zu können.

Ergänzend zu den bisher dargestellten Ansätzen zur Verbesserung des Erfolges von Knochenersatzmaterialien stellt für die Neubildung qualitativ hochwertigen Knochengewebes eine angemessene Vaskularisation der Defektzone einen zentralen Aspekt dar. Dies gilt in besonderem Maße, wenn zellbesiedelte Gewebekonstrukte implantiert werden. Initial wird eine Versorgung der übertragenen Zellen gemeinhin lediglich durch Diffusion möglich, was die Größe der Matrizen deutlich limitiert, da Diffusionsstrecken von mehr als 150 – 200 µm kaum übertroffen werden und das Überleben der Zellen im Inneren größerer Konstrukte somit fraglich macht (Goldstein et al. 2001, Cassell et al. 2002). Dies wird bestätigt durch Arbeiten, die in der Frühphase sowohl nach subkutaner Implantation (Seitz et al. 2007) als auch nach orthotoper Implantation (Kneser et al. 2006c) über ein Absterben transplanteder Zellen berichten. Nur wenn initial ein Überleben der übertragenen Zellen durch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet wird, ist es diesen möglich, eine Matrix zu produzieren und so die Defektüberbrückung voranzutreiben. Kritisch hinterfragt werden muss, ob die Versorgungslage bei orthotoper Transplantation besser ist als im heterotopen Lager. Zum einen ist das umgebende Muskelgewebe deutlich besser durchblutet als das gefäßarme subkutane Gewebe und zum anderen besteht direkter Kontakt zum Markraum des Knochens, was die Versorgung mit Nährstoffen beziehungsweise Sauerstoff aufgrund der guten Durchblutung zusätzlich verbessert. Wenngleich in diesem Versuchsaufbau kein direkter Nachweis der humanen Zellen erfolgte, ist bezüglich der Ergebnisse der histologischen Untersuchung zu sagen, dass gegenüber dem subkutanen Lager, bezogen auf die Vitalität des Regeneratgewebes, eine deutliche Verbesserung zu verzeichnen war. Während bei der ektopen Implantation im Inneren der Leitschiene vermehrt nekrotische Bezirke nachgewiesen wurden (Seitz et al. 2007), traf dies im Falle der hier durchgeführten orthotopen Implantation nicht zu. Vielmehr war unabhängig vom Implantatmaterial fibrozytäres Bindegewebe gleichmäßig in allen Ebenen verteilt. Diese Befunde ergaben sich sowohl nach einer zwei- als auch nach einer zwölfwöchigen Implantationszeit und legen den Schluss nahe, dass das orthotope Lager tatsächlich eine deutlich bessere

Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet. Dennoch ist fraglich, ob bereits initial ausreichend günstige Verhältnisse bestehen, um das Überleben transplantierte Zellen sicherzustellen. Die Einheitlichkeit der Beobachtungen zwischen den Studiengruppen mit unterschiedlich vorbehandelten Implantaten sowohl im histologischen Bild als auch in der radiologischen Auswertung lassen vermuten, dass es zu einem relativ frühen Absterben der Zellen gekommen ist. Diese These basiert wohlgerne auf der Annahme, dass metabolisch aktive Zellen *in vivo* die Geweberegeneration im Sinne einer Knochenneubildung deutlich positiv beeinflussen würden (Bruder et al. 1998, Petite et al. 2000, Kon et al. 2000, Mastrogiacomo et al. 2005, Bensaid et al. 2005, Kruyt et al. 2006), was durch entsprechende Ergebnisse anderer Studien unterstützt wird. Vor diesem Hintergrund stellt ein Anschluss an das Gefäßsystem den nächsten logischen Schritt dar, um die Ernährung der implantierten Zellen sicherzustellen (Kannan et al. 2005, Kneser et al. 2006a). Nur so kann die Anlieferung von Sauerstoff und Nährstoffen, sowie der Abtransport von Stoffwechselendprodukten gewährleistet werden. Erreicht werden kann diese Anbindung beispielsweise durch eine chirurgische Intervention, bei der im Zuge der Implantation eine Gefäßversorgung für das Implantat realisiert wird. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass Gefäßneubildung in implantierten Konstrukten unter anderem durch axiale Perfusion, das heißt durch direkten Kontakt einer Leitschiene mit einem arteriovenösen Gefäßbündel positiv beeinflusst werden kann (Tanaka et al. 2003, Tanaka et al. 2006, Kneser et al. 2006a). Ebenfalls vorstellbar sind Ansätze, bei denen die Gefäßneubildung innerhalb dreidimensionaler Zellträger etwa durch Applikation angiogenetisch wirksamer Wachstumsfaktoren gefördert wird (Elcin et al. 2001, Tabata 2003). Um das funktionelle Ergebnis regenerativer Implantate zu verbessern, befindet sich aufbauend auf den Erkenntnissen des hier vorgestellten Versuchs bereits eine Studie in Vorbereitung, die diesen Ansatz umsetzt. Ziel der Untersuchungen wird sein, eine Methode zu entwickeln, eine Prävascularisation von Knochenersatzmaterialien durch axiale Perfusion zu bewirken und diese in der Folge *in vivo* mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zu besiedeln. Mittelfristig ist dann denkbar, derart vorbehandelte Implantate in einen signifikanten Knochendefekt einzuschwenken. Das hier etablierte orthotope Femurdefektmodell an der Ratte stellt dabei das Modell der Wahl dar.

4.4. Ausblick

Insgesamt betrachtet wird sich nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft aller Voraussicht nach keiner der dargestellten Ansätze zur Verbesserung des Ersatzes knöchernen Gewebes alleine durchsetzen können. Das Feld der Regenerativen Medizin weckt jedoch sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin große Hoffnungen. Durch die synergistische Nutzung der Kompetenzen verschiedener Fachrichtungen scheint es erreichbar, die effektivsten Therapiestrategien für die Behandlung ausgedehnter Knochendefekte durch Kombination unterschiedlicher Ansätze zu identifizieren. Das übergeordnete Ziel bleibt dabei die Behandlung von Knochendefekten mit Ergebnissen, die der Verwendung autogener Transplantate gleichkommen. Wenngleich vor einem klinischen Einsatz noch erheblicher Entwicklungsbedarf besteht, können basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit neue Maßnahmen ergriffen werden, um patientenindividuelle vitalisierte Knochenersatzmaterialien weiterzuentwickeln und in präklinischen Tiermodellen zu testen, beziehungsweise um zunächst im Rahmen individueller Heilversuche Knochenersatzmaterialien für die Therapie ausgedehnter Knochendefekte zu nutzen. Auf diese Weise kann neuen Materialien und Behandlungsmethoden für den Knochenersatz der Weg in die klinische Anwendung geebnet werden.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung und Fragestellung:

Die Regenerative Medizin weckt mit der Entwicklung vitalisierter Ersatzmaterialien große Hoffnung für künftige Behandlungsmethoden ausgedehnter Knochendefekte. Im Vorfeld der Übertragung auf die Klinik gilt es jedoch, Materialien eingehend zu testen, um das Risikoprofil neuartiger Implantate besser abschätzen zu können. Dies besitzt für die Human- und Veterinärmedizin gleichermaßen Gültigkeit. Vor diesem Hintergrund war es Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit, ein Defektmodell in der Ratte für die orthotope Testung zellbesiedelter Gewebekonstrukte zu etablieren. Selbstentworfenen Leitschienen für den Knochenersatz wurden zunächst *in vitro* getestet und optimiert, um im Anschluss in einer Pilotstudie *in vivo* auf ihr heilungsförderndes Potential getestet zu werden.

Material und Methoden:

Die Studie wurde in konsequente Abschnitte gegliedert. Die *Implantatentwicklung* umfasste die Strukturgenerierung dreidimensional mittels Rapid-Prototyping-Verfahren hergestellter Hydroxylapatitkeramiken. *In vitro* wurde das Verhalten humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) auf diesen Leitschienen hinsichtlich Zellverteilung, -vitalität und Differenzierbarkeit überprüft. Für die *Etablierung des orthotopen Defektmodells* wurden Osteosynthesysteme entworfen und auf ihre mechanische Belastbarkeit sowie auf ihre Anwendbarkeit am Tier getestet. In einer dritten Stufe wurde der Einfluss der entwickelten Knochenersatzmaterialien auf die Knochenheilung sowohl in Kombination mit hMSC als auch ohne Zellen im *präklinischen Tiermodell* getestet. Die Auswertung erfolgte mit radiologischen und histologischen Techniken über zwei beziehungsweise zwölf Wochen.

Ergebnisse:

Keramikleitschienen aus Hydroxylapatit konnten mit Rapid-Prototyping-Verfahren in einer an die Defektgröße angepassten Dimension (3 x 6 mm) hergestellt werden. Die allgemeinen Anforderungen für Knochenersatzmaterialien hinsichtlich Stegbreiten, Porengrößen und Interkonnektivität des Porensystems wurden gänzlich erfüllt. Anhand von Zellkulturversuchen wurde die am besten geeignete Teststruktur für die *In-vivo*-Versuche ausgewählt. Kriterien waren ein gleichmäßiges Verteilungsmuster,

hohe Vitalität sowie Differenzierbarkeit humaner mesenchymaler Stammzellen auf den Materialien.

Für die Etablierung eines Defektmodells am Rattenfemur wurde zunächst ein geeignetes Fixationssystem für die Osteosynthese ausgewählt. Ein externer Fixateur wurde eigens entworfen und nach einem Stereolithographieverfahren aus leichten Polymerkunststoffen gebaut. In der mechanischen Testung verschiedener Osteosynthesesysteme (zwei externe Fixateure, eine Titanplatte für die interne Fixation) zeigte sich eine ausreichende Stabilität aller ausgewählten Testobjekte. Aufgrund der besten intraoperativen Anwendbarkeit und dem höchsten Tragekomfort für das Tier wurde die Platte für die Anwendung *in vivo* ausgewählt.

In einem 6 mm großen Vollschaffdefekt der Femurdiaphyse wurden die zuvor entwickelten Implantate getestet. Als Kontrollen dienten biologische Keramiken. Weder die radiologischen noch die histologischen Ergebnisse ließen substantielle Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erkennen. Eine knöcherne Konsolidierung der Defektzone wurde auch nach einer zwölfwöchigen Nachbeobachtungszeit nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten sich weitgehend unabhängig von der Art der Leitschienenbehandlungen (ohne, beziehungsweise mit Zellbesiedelung). Jedoch wurden Tendenzen ersichtlich, dass eine Zellbehandlung der Implantate die Knochenneubildung begünstigt.

Schlussfolgerungen:

1. Rapid-Prototyping-Verfahren stellen eine gut geeignete Methode für die Herstellung feinstrukturierter biokompatibler Knochenersatzmaterialien dar.
2. Reine Hydroxylapatitkeramiken können die Knochenregeneration eines Vollschaffdefektes nicht ausreichend unterstützen. Eine Vitalisierung der Implantate resultiert nicht in einer vollständigen Heilung nach einem Nachbeobachtungszeitraum von 12 Wochen, eine Tendenz zu einer weiter reichenden Knochenneubildung liegt jedoch vor.

3. Auch biologische Keramiken (zellfreie bovine Knochenmatrix) können keine Defektheilung bewirken. Dies gilt ebenso für unbesiedelte Implantate wie für Zellträger.

4. Ein 6 mm Vollschaftdefekt der Femurdiaphyse stellt einen Defekt kritischer Größe dar. Dabei bleibt das Regenerationspotential grundsätzlich unberührt. Der Einfluss unterschiedlicher Implantate auf den Heilungsprozess kann somit bewertet werden. Mit histologischen und radiologischen Methoden kann der Effekt verschiedener Implantate auf die Knochenheilung adäquat abgebildet werden.

Ausblick:

In dem hier vorgestellten Projekt wurden Ergebnisse generiert, die einige Schwächen der bisher verwendeten Implantate aufdecken konnten. Zum einen scheint das osteogenetische Potential der transplantierten Zellen für eine Defektüberbrückung nicht ausreichend zu sein und zum anderen steht deren Vitalität nach erfolgter Übertragung in Frage. Um zu einem besseren funktionellen Ergebnis zu gelangen werden derzeit zwei Studienansätze verfolgt. So sollen mit Methoden des lentiviralen Gentransfers humane mesenchymale Stammzellen modifiziert werden. Durch stabile Überexpression von BMP-2 können diese Zellen die Therapie ausgedehnter Knochendefekte ermöglichen. Ein weiterer Ansatz versucht, die Probleme des mangelhaften Zellüberlebens zu lösen. Dies soll *in vivo* durch eine axiale Perfusion der Zellträger, die eine Gefäßneubildung innerhalb der Konstrukte bewirkt, erreicht werden. Nachfolgend wird eine Testung der modifizierten Zellen beziehungsweise der prävascularisierten Leitschienen im Hinblick auf deren Potential, die Geweberegeneration zu unterstützen, in dem hier etablierten orthotopen Femurdefektmodell an der Ratte erfolgen.

6. Summary

Aims and goals of the project:

The field of regenerative medicine raises hopes and expectations concerning future therapeutic strategies for the treatment of large bone defects by the development of vitalized graft materials. Prior to clinical application, it is imperative that materials be exhaustively tested in order to better assess their specific risk profiles. The same holds true equally in both human and veterinary medicine. Against this background it was the goal of this study to establish a defect model in the rat for the orthotopic testing of cell-seeded tissue constructs. Self-designed scaffolds for bone grafting were first tested and optimized *in vitro*. Subsequent to this a pilot study was performed to test their potential in promoting the healing process.

Material and methods:

The study was arranged in consecutive stages. *Implant development* included the generation of three-dimensional constructs using rapid prototyping techniques. The performance of human mesenchymal stem cells (hMSC) on these scaffolds concerning their distribution, vitality and capacity to differentiate was evaluated *in vitro*. For the *establishment of an orthotopic defect model* systems were designed to achieve osteosynthetic stabilization. These systems' mechanical stability and their usability for the *in vivo* test were evaluated. In a third step the influence of the newly developed bone graft substitutes on bone healing were tested in a *preclinical animal model* with and without the use of hMSC. Evaluation was done with radiologic and histologic techniques after two and twelve weeks respectively.

Results:

Ceramic scaffolds made of hydroxyapatite were created using rapid prototyping techniques. Implants were tailored to the dimensions of the defect. General requirements of bone graft substitutes concerning ridge width, pore sizes and interconnectivity of the pore system were met entirely. Cell culture experiments were referred to in order to choose the most suitable design for the *in vivo* experiments. Equal distribution, high vitality and the ability of human mesenchymal stem cells to differentiate were the criteria.

In order to be able to establish a defect model on a rat femur, it was necessary to choose a suitable fixation system, first. An external fixator made of light polymeric synthetic materials was specially designed and generated using stereolithography. During mechanical testing of various systems for osteosynthetic stabilization (two external fixators, one titanium plate for internal fixation) all chosen specimens proved to be sufficiently stable. Based on the best surgical usability and highest comfort for the animal, plates were chosen for the in vivo experiments.

The developed implants were tested in a 6 mm full-thickness-defect of the femoral diaphysis. Biologic ceramics served as controls. Neither radiologic nor histologic results showed substantial differences between experimental groups. Even after twelve weeks no bony consolidation could be shown. Results were mostly similar regardless of the treatment of the scaffolds (without, respectively with cell seeding). Yet tendencies occurred showing that cell-treatment supports bone healing.

Conclusions:

Rapid prototyping techniques are well-suited methods to produce delicate biocompatible bone substitute materials.

Plain hydroxyapatite ceramics cannot sufficiently support bone regeneration of a full-thickness defect. A vitalisation of the implants does not result in complete healing after an evaluation period of 12 weeks. However, a tendency of additional formation of new bone tissue does exist.

Biologic ceramics (acellularized bovine bone matrix) as well, do not result in healing of the defect. The same holds true for unseeded implants as well as for cell-carriers.

A 6 mm full-thickness-defect of the femoral diaphysis does represent a critical size defect. The regenerative potential remains unaffected. Therefore, the influence of various implants on the healing process can be evaluated. Using histologic and radiologic methods the effect of different implants on bone healing can be assessed.

Outlook:

The project presented here generated results revealing weaknesses of implants that had been used so far. For one thing, the osteogenic potential of transplanted cells does not suffice to bridge defects. Beyond that, their vitality upon transplantation is questionable. In order to achieve a better functional result two approaches are currently being investigated. One is to genetically modify human mesenchymal stem cells using lentiviral gene transfer techniques. These cells can allow the therapy of sizeable bone defects by stably overexpressing BMP-2. The other approach attempts to overcome the problems of insufficient cell survival. In vivo, an axial perfusion of cell carriers, resulting in neovascularisation within the constructs, is thought to achieve this. Following this, modified cells and prevascularized scaffolds, respectively, can be tested regarding their potential to support tissue regeneration in the orthotopic femoral defect model in the rat established here.

7. Literaturverzeichnis

1. Aslan M, Simsek G, Yildirim U (2005); Effects of short-term treatment with systemic prednisone on bone healing: an experimental study in rats; *Dent Traumatol* 21(4):222-225
2. Atala A (2007); Engineering tissues, organs and cells; *J Tissue Eng Regen Med* 1(2):83-96
3. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L et al. (2007); Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use; *BMC Musculoskelet Disord* 8:72
4. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L (2003); Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model; *J Orthop Res* 21(6):1011-1017
5. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005); Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone; *Osteoporos Int* 16 Suppl 2:S36-S43
6. Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA (2007); New technologies for the enhancement of skeletal repair; *Injury* 38 Suppl 1:S49-S62
7. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R (2000); Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy; *Exp Hematol* 28(6):707-715
8. Bauer TW, Muschler GF (2000); Bone graft materials. An overview of the basic science; *Clin Orthop Relat Res*(371):10-27
9. Baumgart R, Hinterwimmer S, Kettler M, Krammer M, Mutschler W (2005); [Central bone transport system optimizes reconstruction of bone defects. Results of 40 treatments]; *Unfallchirurg* 108(12):1011-8, 1020

10. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E et al. (2007); Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver and bone marrow); *Blood*
11. Bensaid W, Oudina K, Viateau V, Potier E, Bousson V, Blanchat C et al. (2005); De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model; *Tissue Eng* 11(5-6):814-824
12. Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Pilapil CG, Vrahas MS, Bouxsein ML et al. (2006); Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects; *J Bone Joint Surg Am* 88(2):355-365
13. Bhandari M, Schemitsch EH (2004); Fractures of the shaft of the ulna; *J Orthop Trauma* 18(7):473-475
14. Bleiziffer O, Eriksson E, Yao F, Horch RE, Kneser U (2007); Gene transfer strategies in tissue engineering; *J Cell Mol Med* 11(2):206-223
15. Bonfield W (2006); Designing porous scaffolds for tissue engineering; *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 364(1838):227-232
16. Bruder SP, Fox BS (1999); Tissue engineering of bone. Cell based strategies; *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl):S68-S83
17. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997); Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation; *J Cell Biochem* 64(2):278-294
18. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998); The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects; *J Bone Joint Surg Am* 80(7):985-996
19. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M (2007); A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice; *Biomaterials* 28(29):4240-4250

20. Cassell OC, Hofer SO, Morrison WA, Knight KR (2002); Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states; *Br J Plast Surg* 55(8):603-610
21. Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Garvin KL et al. (2005); Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption; *Alcohol* 36(3):201-214
22. Chakkalakal DA, Strates BS, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ et al. (2001); Demineralized bone matrix as a biological scaffold for bone repair; *Tissue Eng* 7(2):161-177
23. Chakkalakal DA, Strates BS, Mashoof AA, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED et al. (1999); Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing; *Bone* 25(3):321-332
24. Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL (2007); Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2; *Biomaterials* 28(3):459-467
25. Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A (2006); Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering; *Biomaterials* 27(36):6150-6160
26. Clarke KA (1995); Differential fore- and hindpaw force transmission in the walking rat; *Physiol Behav* 58(3):415-419
27. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R et al. (2004); Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects; *Nat Biotechnol* 22(5):560-567
28. De Long WJr, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R et al. (2007); Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis; *J Bone Joint Surg Am* 89(3):649-658
29. Degano IR, Vilalta M, Bago JR, Matthies AM, Hubbell JA, Dimitriou H et al. (2008); Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow

- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; *Biomaterials* 29(4):427-437
30. Deutsche Forschungsgemeinschaft (2004); *Tierversuche in der Forschung*; ISBN 3-932306-53-8
 31. Di Toro R, Betti V, Spampinato S (2004); Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers; *Eur J Pharm Sci* 21(2-3):161-169
 32. Dimitriou R, Dahabreh Z, Katsoulis E, Matthews SJ, Branfoot T, Giannoudis PV (2005); Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions; *Injury* 36 Suppl 4:S51-S59
 33. Doerr HW, Cinatl J, Sturmer M, Rabenau HF (2003); Prions and orthopedic surgery; *Infection* 31(3):163-171
 34. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006); Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 8(4):315-317
 35. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K et al. (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
 36. Einhorn TA (2005); The science of fracture healing; *J Orthop Trauma* 19(10 Suppl):4-6
 37. Elcin YM, Dixit V, Gitnick G (2001); Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing; *Artif Organs* 25(7):558-565
 38. Epari DR, Taylor WR, Heller MO, Duda GN (2006); Mechanical conditions in the initial phase of bone healing; *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 21(6):646-655

39. Festing MF, May D, Connors TA, Lovell D, Sparrow S (1978); An athymic nude mutation in the rat; *Nature* 274(5669):365-366
40. Flautre B, Descamps M, Delecourt C, Blary MC, Hardouin P (2001); Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections – experimental study in the rabbit; *J Mater Sci Mater Med* 12(8):679-682
41. Forni M (2007); Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science; *Vet Res Commun* 31 Suppl 1:43-47
42. Forster MC, Komarsamy B, Davison JN (2006); Distal femoral fractures: a review of fixation methods; *Injury* 37(2):97-108
43. Fredericson M, Jennings F, Beaulieu C, Matheson GO (2006); Stress fractures in athletes; *Top Magn Reson Imaging* 17(5):309-325
44. Gao X, Kim KS, Liu D (2007); Nonviral gene delivery: what we know and what is next; *AAPS J* 9(1):E92-104
45. Garcia-Cimbrelo E, Marti-Gonzalez JC (2004); Circular external fixation in tibial nonunions; *Clin Orthop Relat Res*(419):65-70
46. Gaston MS, Simpson AH (2007); Inhibition of fracture healing; *J Bone Joint Surg Br* 89(12):1553-1560
47. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R (2007); Bone morphogenetic proteins in clinical applications; *ANZ J Surg* 77(8):626-631
48. Giannoudis P, Tzioupis C, Almalki T, Buckley R (2007); Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective; *Injury* 38 Suppl 1:S90-S99
49. Gierse H, Donath K (1999); Reactions and complications after the implantation of Endobon including morphological examination of explants; *Arch Orthop Trauma Surg* 119(5-6):349-355
50. Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG (2001); Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds; *Biomaterials* 22(11):1279-1288

51. Goodrich LR (2006); Osteomyelitis in horses; *Vet Clin North Am Equine Pract* 22(2):389-3ix
52. Goodrich LR, Nixon AJ (2006); Medical treatment of osteoarthritis in the horse – a review; *Vet J* 171(1):51-69
53. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R et al. (2002); Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients; *J Bone Joint Surg Am* 84-A(12):2123-2134
54. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V et al. (2004); Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium; *J Thorac Cardiovasc Surg* 127(5):1293-1300
55. Groger A, Klaring S, Merten HA, Holste J, Kaps C, Sittinger M (2003); Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: preliminary study; *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 37(3):129-133
56. Harasen G (2003a); Common long bone fracture in small animal practice – part 2; *Can Vet J* 44(6):503-504
57. Harasen G (2003b); Common long bone fractures in small animal practice – part 1; *Can Vet J* 44(4):333-334
58. Harrison LJ, Cunningham JL, Stromberg L, Goodship AE (2003); Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model; *J Orthop Trauma* 17(1):11-21
59. He Y, Zhang ZY, Zhu HG, Qiu W, Jiang X, Guo W (2007); Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate; *J Craniofac Surg* 18(4):800-805
60. Hernigou P, Beaujean F (2002); Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting; *Clin Orthop Relat Res* 405(13):14-23

61. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H (2005); Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells; *J Bone Joint Surg Am* 87(7):1430-1437
62. Hidaka C, Cunningham ME, Rodeo SA, Maher SA, Zhu W (2006); Modern biologics used in orthopaedic surgery; *Curr Opin Rheumatol* 18(1):74-79
63. Hing KA (2004); Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?; *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 362(1825):2821-2850
64. Hollister SJ (2005); Porous scaffold design for tissue engineering; *Nat Mater* 4(7):518-524
65. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M et al. (1999); Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta; *Nat Med* 5(3):309-313
66. Howard BR (2002); Control of variability; *ILAR J* 43(4):194-201
67. Hsu WK, Sugiyama O, Park SH, Conduah A, Feeley BT, Liu NQ et al. (2007); Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats; *Bone* 40(4):931-938
68. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC (2007); State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective; *J Tissue Eng Regen Med* 1(4):245-260
69. Irsen S, Leukers B, Höckling B, Tille C, Seitz H (2006); Bioceramic Granulates for use in 3D Printing: Process Engineering Aspects; *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 37(6):533-537
70. Jager M, Degistirici O, Knipper A, Fischer J, Sager M, Krauspe R (2007); Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation; *J Bone Miner Res* 22(8):1224-1233
71. Jager M, Sager M, Lensing-Hohn S, Krauspe R (2005a); 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

72. Jager M, Westhoff B, Wild A, Krauspe R (2005b); [Bone harvesting from the iliac crest]; *Orthopade* 34(10):976-90, 992
73. 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
74. Jiang X, Gittens SA, Chang Q, Zhang X, Chen C, Zhang Z (2006); The use of tissue-engineered bone with human bone morphogenetic protein-4-modified bone-marrow stromal cells in repairing mandibular defects in rabbits; *Int J Oral Maxillofac Surg* 35(12):1133-1139
75. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002); Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain; *Exp Hematol* 30(8):896-904
76. Jones CB, Mayo KA (2005); Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques; *J Orthop Trauma* 19(10 Suppl):S11-S13
77. Kanellopoulos AD, Soucacos PN (2006); Management of nonunion with distraction osteogenesis; *Injury* 37 Suppl 1:S51-S55
78. Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM (2005); The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review; *Biomaterials* 26(14):1857-1875
79. Kassem M (2006); Stem cells: potential therapy for age-related diseases; *Ann N Y Acad Sci* 1067:436-442
80. Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D (2007); Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair; *Tissue Eng* 13(6):1135-1150
81. Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle HP et al. (2007); BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects; *Bone* 41(2):247-255
82. Kneser U, Polykandriotis E, Ohnolz J, Heidner K, Grabinger L, Euler S et al. (2006a); Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of

- axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop; *Tissue Eng* 12(7):1721-1731
83. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE (2006b); Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view; *J Cell Mol Med* 10(1):7-19
84. Kneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, Buettner O, Stern-Straeter J, Mobest D et al. (2006c); Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model; *J Cell Mol Med* 10(3):695-707
85. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I et al. (2000); Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones; *J Biomed Mater Res* 49(3):328-337
86. Kramer M (2004); Frakturheilung; in: *Kompendium der Allgemeinen Veterinärchirurgie* ISBN 3-87706-743-3:280-281
87. Kruyt MC, Wilson CE, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Oner CF, Verbout AJ et al. (2006); The effect of cell-based bone tissue engineering in a goat transverse process model; *Biomaterials* 27(29):5099-5106
88. Kumar K, Mogha IV, Aithal HP, Kinjavdekar P, Singh GR, Pawde AM et al. (2007); Occurrence and pattern of long bone fractures in growing dogs with normal and osteopenic bones; *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54(9):484-490
89. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D et al. (1997); Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo; *J Bone Miner Res* 12(9):1335-1347
90. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG (2001); Circulating skeletal stem cells; *J Cell Biol* 153(5):1133-1140
91. Langer R, Vacanti JP (1993); Tissue engineering; *Science* 260(5110):920-926

92. Laurencin C, Khan Y, El Amin SF (2006); Bone graft substitutes; *Expert Rev Med Devices* 3(1):49-57
93. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K et al. (2004); Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue; *Cell Physiol Biochem* 14(4-6):311-324
94. Leukers B, Gulkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M et al. (2005); Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing; *J Mater Sci Mater Med* 16(12):1121-1124
95. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R et al. (2000); Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep; *Nat Med* 6(11):1282-1286
96. Linkow LI, Donath K, Lemons JE (1992); Retrieval analyses of a blade implant after 231 months of clinical function; *Implant Dent* 1(1):37-43
97. Little DG, McDonald M, Bransford R, Godfrey CB, Amanat N (2005); Manipulation of the anabolic and catabolic responses with OP-1 and zoledronic acid in a rat critical defect model; *J Bone Miner Res* 20(11):2044-2052
98. Liu SK (2002); Metabolic disease in animals; *Semin Musculoskelet Radiol* 6(4):341-346
99. Luyten FP, Dell'Accio F, De Bari C (2001); Skeletal tissue engineering: opportunities and challenges; *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15(5):759-769
100. Lysaght MJ, Hazlehurst AL (2004); Tissue engineering: the end of the beginning; *Tissue Eng* 10(1-2):309-320
101. Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, West RA (2007); Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells; *Transplantation* 83(8):1019-1026

102. Mark H, Bergholm J, Nilsson A, Rydevik B, Stromberg L (2003); An external fixation method and device to study fracture healing in rats; *Acta Orthop Scand* 74(4):476-482
103. Marom R, Shur I, Solomon R, Benayahu D (2005); Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells; *J Cell Physiol* 202(1):41-48
104. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A et al. (2005); Tissue engineering of bone: search for a better scaffold; *Orthod Craniofac Res* 8(4):277-284
105. Matis U. Biologische Osteosynthese. In: Bonath,K; Prieur,WD. *Kleintierkrankheiten Band 3: Orthopädische Chirurgie und Traumatologie.* Stuttgart: Ulmer, 1998: 230-238.
106. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS (2004); Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment; *Dev Cell* 6(4):483-495
107. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E et al. (2006); Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects; *Bone* 39(4):922-931
108. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B et al. (2005); Silk implants for the healing of critical size bone defects; *Bone* 37(5):688-698
109. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D et al. (2004); Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds; *Biotechnol Bioeng* 88(3):379-391
110. Mhawi AA, Peel SA, Fok TC, Clokie CM (2007); Bone regeneration in athymic calvarial defects with Accell DBM100; *J Craniofac Surg* 18(3):497-503
111. Morgan MJ, James DF, Pilliar RM (1993); Fractures of the fixture component of an osseointegrated implant; *Int J Oral Maxillofac Implants* 8(4):409-414
112. Murray R (2002); Animal models for orthopaedic disease – who benefits?; *Vet J* 163(3):230-231

113. Neubauer T, Bayer GS, Wagner M (2006); Open fractures and infection; *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 73(5):301-312
114. Nunamaker DM (1998); Experimental models of fracture repair; *Clin Orthop Relat Res* 355(Suppl):S56-S65
115. Nuss KM, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B (2006); An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones; *BMC Musculoskelet Disord* 7:67
116. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T et al. (2007); Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect; *J Pharmacol Sci* 104(4):384-386
117. Oh CW, Song HR, Roh JY, Oh JK, Min WK, Kyung HS et al. (2007); Bone transport over an intramedullary nail for reconstruction of long bone defects in tibia; *Arch Orthop Trauma Surg* epub ahead of print
118. Olivier V, Faucheux N, Hardouin P (2004); Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery; *Drug Discov Today* 9(18):803-811
119. Otto WR, Rao J (2004); Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage; *Cell Prolif* 37(1):97-110
120. Peng H, Huard J (2004); Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair; *Transpl Immunol* 12(3-4):311-319
121. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR (2004); Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model; *J Bone Joint Surg Am* 86-A(10):2243-2250
122. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P et al. (2005); Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue; *Tissue Eng* 11(1-2):120-129

123. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M et al. (2000); Tissue-engineered bone regeneration; *Nat Biotechnol* 18(9):959-963
124. Petrizzi L, Mariscoli M, Valbonetti L, Varasano V, Langhoff JD, von Rechenberg B (2007); Preliminary study on the effect of parenteral naloxone, alone and in association with calcium gluconate, on bone healing in an ovine "drill hole" model system; *BMC Musculoskelet Disord* 8:43
125. Phillips AM (2005); Overview of the fracture healing cascade; *Injury* 36 Suppl 3:S5-S7
126. Picton ML, Moore PR, Mawer EB, Houghton D, Freemont AJ, Hutchison AJ et al. (2000); Down-regulation of human osteoblast PTH/PTHrP receptor mRNA in end-stage renal failure; *Kidney Int* 58(4):1440-1449
127. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. (1999); Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; *Science* 284(5411):143-147
128. Rai B, Oest ME, Dupont KM, Ho KH, Teoh SH, Guldberg RE (2007); Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair; *J Biomed Mater Res A* 81(4):888-899
129. Rechenberg B von, Akens MK, Nadler D, Bittmann P, Zlinszky K, Kastner SB et al. (2006); Mosaicplasty with photooxidized, mushroom shaped, bovine, osteochondral xenografts in experimental sheep; *Vet Comp Orthop Traumatol* 19(3):147-156
130. Reddi AH (1995); Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Maureen Owen revisited; *Clin Orthop Relat Res* 313:115-119
131. Renberg WC (2005); Pathophysiology and management of arthritis; *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 35(5):1073-91, v
132. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004); Bone tissue engineering: state of the art and future trends; *Macromol Biosci* 4(8):743-765

133. Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, Reis RL (2006); Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering; *Curr Stem Cell Res Ther* 1(3):345-364
134. Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP (2005); Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars; *J Oral Maxillofac Surg* 63(6):766-770
135. Schaffler A, Buchler C (2007); Concise review: adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies; *Stem Cells* 25(4):818-827
136. Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN (2005); The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability; *J Orthop Res* 23(5):1022-1028
137. Schieker M, Mutschler W (2006); Die Überbrückung von posttraumatischen Knochendefekten; *Unfallchirurg* 109(9):715-732
138. Schieker M, Seitz H, Seitz S, Drosse I, Mutschler W (2007); Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering; *European Journal of Trauma* 32:114-124
139. Schieker M, Seitz S, Gulkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M et al. (2004); Tissue Engineering von Knochen. Integration und Migration von humanen mesenchymalen Stammzellen in besiedelten Konstrukten im Mausmodell; *Orthopade* 33(12):1354-1360
140. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM et al. (2004); Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts; *Biomaterials* 25(18):3963-3972
141. Schuurman HJ, Bell EB, Gartner K, Hedrich HJ, Hansen AK, Kruijt BC et al. (1992a); Comparative evaluation of the immune status of congenitally athymic and euthymic rat strains bred and maintained at different institutes: 2. Athymic rats; *J Exp Anim Sci* 35(1):33-48

142. Schuurman HJ, Hougen HP, VanLoveren H (1992b); The rnu (Rowett Nude) and rnuN (nznu, New Zealand Nude) rat: An update.; *ILAR J* 34:1-13
143. Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C (2005a); Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering; *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74(2):782-788
144. Seitz H, Rieder W, Tille C (2005b); Verfahren zum schichtweisen Aufbau von Objekten mit Kanalstruktur; Patent DE 10 2005 013 722 A1
145. Seitz S, Ern K, Lamper G, Docheva D, Drosse I, Milz S et al. (2007); Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation; *Tissue Eng* 13(5):1059-1067
146. Sen MK, Miclau T (2007); Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?; *Injury* 38 Suppl 1:S75-S80
147. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE (2005); In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability; *Stem Cells* 23(9):1357-1366
148. Sharma B, Elisseff JH (2004); Engineering structurally organized cartilage and bone tissues; *Ann Biomed Eng* 32(1):148-159
149. Shaw R, Festing MF, Peers I, Furlong L (2002); Use of factorial designs to optimize animal experiments and reduce animal use; *ILAR J* 43(4):223-232
150. Shen HC, Peng H, Usas A, Gearhart B, Fu FH, Huard J (2004); Structural and functional healing of critical-size segmental bone defects by transduced muscle-derived cells expressing BMP4; *J Gene Med* 6(9):984-991
151. Shibata K, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M et al. (2007); Expression of The p16^{INK4A} Gene Is Associated Closely with Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells, and Potentially Silenced by DNA Methylation During In Vitro Expansion; *Stem Cells* epub ahead of print

152. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS et al. (2003); Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion; *Spine* 28(2):134-139
153. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M (2006); Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells; *Stem Cells* 24(2):462-471
154. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ et al. (2004); Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy; *Mol Ther* 9(5):747-756
155. Stangenberg L, Schaefer DJ, Buettner O, Ohnolz J, Mobest D, Horch RE et al. (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
156. Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT (2007); A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues; *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*
157. 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
158. Tabata Y (2003); Tissue regeneration based on growth factor release; *Tissue Eng* 9 Suppl 1:S5-15
159. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T et al. (2002); Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo; *J Biomed Mater Res* 59(1):110-117
160. Tanaka Y, Sung KC, Fumimoto M, Tsutsumi A, Kondo S, Hinohara Y et al. (2006); Prefabricated engineered skin flap using an arteriovenous vascular bundle as a vascular carrier in rabbits; *Plast Reconstr Surg* 117(6):1860-1875

161. Tanaka Y, Sung KC, Tsutsumi A, Ohba S, Ueda K, Morrison WA (2003); Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation?; *Plast Reconstr Surg* 112(6):1636-1644
162. Thorwarth M, Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Schlegel KA (2006); PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation; *Bone* 38(1):30-40
163. Tomford WW (2000); Bone allografts: past, present and future; *Cell Tissue Bank* 1(2):105-109
164. Trevisiol CH, Turner RT, Pfaff JE, Hunter JC, Menagh PJ, Hardin K et al. (2007); Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse; *Bone* 41(2):175-180
165. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J (2003); Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats; *J Orthop Res* 21(1):44-53
166. Tu Q, Valverde P, Li S, Zhang J, Yang P, Chen J (2007); Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone; *Tissue Eng* 13(10):2431-2440
167. Utvag SE, Grundnes O, Reikeraos O (1996); Effects of periosteal stripping on healing of segmental fractures in rats; *J Orthop Trauma* 10(4):279-284
168. Uusitalo H, Rantakokko J, Ahonen M, Jamsa T, Tuukkanen J, KaHari V et al. (2001); A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing; *Bone* 28(4):423-429
169. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J (2001); Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone; *N Engl J Med* 344(20):1511-1514
170. Viateau V, Guillemain G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L et al. (2007); Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep; *J Orthop Res* 25(6):741-749

171. Vogelín E, Jones NF, Huang JI, Brekke JH, Lieberman JR (2005); Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein; *J Bone Joint Surg Am* 87(6):1323-1331
172. Walsh JP (2004); Paget's disease of bone; *Med J Aust* 181(5):262-265
173. Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E et al. (2000); Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model; *Acta Orthop Scand* 71(3):316-321
174. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM (2003); Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not; *Br J Haematol* 121(2):368-374
175. Wierer M (2006); Differenzierung von sich schnell teilenden, humanen mesenchymalen Stammzellen (RS-Zellen); Promotionsarbeit, Medizinische Fakultät der LMU München in Vorbereitung
176. Winder J, Bibb R (2005); Medical rapid prototyping technologies: state of the art and current limitations for application in oral and maxillofacial surgery; *J Oral Maxillofac Surg* 63(7):1006-1015
177. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T (2004); Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants; *Clin Oral Implants Res* 15(5):589-597
178. Yoshikawa H, Myoui A (2005); Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics; *J Artif Organs* 8(3):131-136
179. Zahn K, Frei R, Wunderle D, Linke B, Schwieger K, Guerguiev B et al. (2008); Mechanical Properties of 18 Different AO Bone Plates and the Clamp-Rod Internal Fixation System tested on a Gap Model Construct; *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* in press
180. Zamir T (2006); Killing for knowledge; *J Appl Philos* 23(1):17-40

181. Zhang X, Liu T, Li Z, Peng W (2007); Reconstruction with callus distraction for nonunion with bone loss and leg shortening caused by suppurative osteomyelitis of the femur; *J Bone Joint Surg Br* 89-B(11):1509-1514
182. Zhang X, Xie C, Lin AS, Ito H, Awad H, Lieberman JR et al. (2005); Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering; *J Bone Miner Res* 20(12):2124-2137
183. Zhou G, Liu W, Cui L, Wang X, Liu T, Cao Y (2006); Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells; *Tissue Eng* 12(11):3209-3221
184. Zhu L, Liu W, Cui L, Cao Y (2006a); Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells; *Tissue Eng* 12(3):423-433
185. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J et al. (2006b); Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo; *Exp Mol Pathol* 80(3):267-274
186. Zimmermann CE, Borner BI, Hasse A, Sieg P (2001); Donor site morbidity after microvascular fibula transfer; *Clin Oral Investig* 5(4):214-219
187. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al. (2002); Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells; *Mol Biol Cell* 13(12):4279-4295
188. Zyman Z, Glushko V, Dedukh N, Malyskina S, Ashukina N (2008); Porous calcium phosphate ceramic granules and their behaviour in differently loaded areas of skeleton; *J Mater Sci Mater Med* 19(5): 2197-2205

8. Anhang

Übersicht über angewendete Arbeitsmethoden

Protokoll 1 Passageschema für hMSC.

Absaugen des Medienüberstandes

Spülen mit sterilem PBS

5 min Inkubation mit Trypsin-/EDTA-Lösung (1 ml je 25 cm²)

(Licht-)Mikroskopische Kontrolle des Ablösevorgangs

Inaktivierung der Trypsinwirkung durch Medienzugabe (2 ml je 25 cm²)

Abzentrifugieren (5 min, 300 g)

Resuspension in Medium

Die Ablösung der Zellen wurde durch Zugabe von einer Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (PAA) erreicht. Diese Serinprotease spaltet Eiweißmoleküle und wird genutzt um adhärenente Zellen von den Kulturschalen abzulösen. Bei einer Einwirkzeit von ca. 5 min werden lediglich die extrazellulären Proteine gespalten und die Zellen bleiben unbeschädigt.

Protokoll 2 Isolation genomischer DNA.

Lysepuffer	12 h, 55 °C auf Schüttler mit 100 rpm inkubieren
Phenol-Chloroform	zum Lysat hinzugeben, zentrifugieren (12000 rpm, 5 min)
Überstand	übernehmen
Chloroform	im Verhältnis 1:1 hinzugeben, zentrifugieren (12000 rpm, 5 min)
Überstand	übernehmen
Isopropanol	im Verhältnis 1:1 hinzugeben, zentrifugieren (12000 rpm, 5 min)
Ethanol 70 %	waschen
Probe	trocknen
Eluierungspuffer	mit 100 µl Puffer resuspendieren
Messen der DNA-Konzentration im Spektrophotometer	

Material: Lysepuffer (1 l): 100 mM Tris-HCl pH 8,5
5mM EDTA
0,2 % SDS
200 mM NaCl
100 µg/ml proteinase K

Phenol-Chloroform: Mischung im Verhältnis 1:1

Eluierungspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,5

Protokoll 3 Live-dead-assay zur Überprüfung der Zellvitalität.

4 µl Fda-Stammlösung (5 mg Fluoresceindiacetat in 1 ml Aceton (100 %))

1 ml Propidiumiodid

998 µl PBS

2 ml Gesamtmenge Färbelösung

Absaugen des Mediums

Spülen mit PBS

Aufbringen der Färbelösung (500 µl je Leitschiene)

Inkubation für 60 Sekunden

Spülen mit PBS

Prinzip dieser Methode ist, dass Fluoresceindiacetat passiv durch die Zellmembranen diffundiert und durch unspezifische Esterasen zu einem unpolaren, grün fluoreszierenden Farbstoff hydrolysiert wird. Avitale Zellen hingegen zeigen keine Hydrolyseaktivität mehr und werden lediglich von Propidiumjodid gefärbt, welches durch defekte Zellmembranen in das Zellinnere eindringt und sich in die helikale Struktur der DNA einlagert.

Protokoll 4 Methylenblaufärbung adhärenter Zellen.

Absaugen des Medienüberstandes

10 min Fixierung der Zellen durch Überschichten mit 100 % Ethanol (-20°C)

10 min Färbung mit Methylenblau durch Überschichten

Herausspülen überflüssiger Färbelösung mit handwarmem Leitungswasser

Protokoll 5 Anfertigung der MMA-Einbettung für die Histologie.

Manipulation	Lagerung	Dauer
Formaldehyd- Methanolgemisch	Raumtemperatur	1 Tag
50 % Ethanol		1 Tag
80 % Ethanol		1 Tag
90 % Ethanol		1 Tag
100 % Ethanol	Raumtemperatur	2 Tage
100 % Ethanol		2 Tage
Aceton		2 Tage
Aceton		2 Tage
Präinfiltration		1 Tag
Infiltration I *	Exsikkator,	1 Tag
Infiltration II *	Raumtemperatur	1 Tag
Polymerisation	Kühlschrank	1 Tag
Polymerisation	Wärmeschrank, 22°C	14 Tage

Formaldehyd-Methanolgemisch: 64 % Methanol, 33 % fünfunddreißigprozentiges Formaldehyd und 1% einprozentiger Succrose in PBS

MMA-Einbettgemisch: 100 ml MMA, 25 ml Plastoid N (Nonylphenyl-Polyethyl-Glycol-Acetat) und 3,5 g Benzoylperoxid

Protokoll 6 Anätzen der Schliffpräparate für die Toluidinblaufärbung.

100% Ethanol	Schnitte abwischen
0,1% Ameisensäure	Lösung auftropfen, 5 min inkubieren
Aqua dest.	spülen
40% Methanol	120 min
Aqua dest.	spülen

Protokoll 7 Färbung mit Toluidinblau.

1 % Toluidinblau	Lösung auftropfen, 5 min inkubieren
Aqua dest.	2 x spülen
1 Tag Schnitte pressen	
Eindecken mit Eukitt	

Herstellung der Färbelösung: 1 g Toluidinblau
1 g Di-Natriumtetraborat
in 100 ml Aqua dest. Lösen
vor Gebrauch zweimal filtrieren

Übersicht über verwendete Materialien

Tab. 5 Verwendete Laborgeräte.

Analysenwaage, Typ Kern 770-12	Kern, Balingen
Autoklav, Typ Varioklav 300	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Axiocam MR	Carl Zeiss, Berlin
Brutschrank (+ 37 °C, 5 % CO ₂) IG 150	Jouan, Frankreich
Digitalkamera, Typ DSC-S75	Sony, Berlin
Duran-Glasware (Flaschen, Bechergläser,...)	Schott, Mainz
Exsikkator	Schott, Mainz
Flüssigkeitsabsaugsystem	Roth, Karlsruhe
Kühl-Gefrier-Kombination, Typ 561284	Liebherr, Ochsenhausen
Kryostat, Typ Vacutome HM 200 OM	Microm, Walldorf
LightCycler II	Roche, Grenzach-Wyhlen
LightCycler-Zentrifugenadapter	Roche, Grenzach-Wyhlen
Mikroskop, Typ Axiovert S100	Carl Zeiss, Berlin
Mikroskop, Typ Axiophot	Carl Zeiss, Berlin
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Werkbank, Typ Captair Bio	Erlab, Köln
Pipette, Typ Pipetman 2, 10, 20, 200, 1000 µl	Gilson, USA
Pipettierhilfe, Typ Pipettus akku	Hirschmann, Eberstadt
pH-Meter, Typ pH 525	WTW, Weilheim
Scanco µCT 80	Scanco Medical, CH
Sicherheitswerkbank, steril	Heraeus, Hanau
Stickstoffaufbewahrungstank, Typ Thermolyne	Barnstead Int., USA
Locator JR	
Stickstoffvorratstank, Typ XL-120	Taylor-Wharton Harsco, Mildstedt
Tiefkühlschrank (- 80 °C), Typ 6485	GFL, Burgwedel
Trockenschrank	Jouan, Frankreich
Vollschutzgerät-Röntgenschrank, Typ Faxitron 43855 A	Faxitron, USA
Vakuumkonzentrator, Typ RC 10-10 mit Vakuum- pumpe, Typ AEPF63BL-4-SO	ATMA, Schwarzenbach/ Saale
Vakuumpumpe für die Zellkultur, Typ VDE0530	Neuberger, Freiburg
Wasserbad, Typ 1012	GFL, Burgwedel
Wärmeschrank 37 °C	Jouan, Frankreich
Zentrifuge, Typ Univ. 16R, Rotor 1624	Hettlich, Tuttlingen

Tab. 6 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Alufolie, Typ Universal 30	VWR, Darmstadt
Deckgläser 24 x 50 mm	Menzel, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Nalgene, USA
Einmal-Handschuhe, Typ sempercare edition	Semperit, Techn. Prod., Wien
Einmal-Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Einmal-Skalpelle	Feather, Japan
Einmal-Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Glasobjektträger, Typ Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Kanülen, Typ BD Microlane 3	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Roche, Grenzach-Wyhlen
Lightcycler-Kapillaren, 20 µl	Roche, Grenzach-Wyhlen
Pasteur-Pipetten (230 mm)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plastikspritzen, 2, 5, 10, 20 ml	Becton Dickinson Heidelberg
Safe-seal-Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Nalgene, USA
Skalpelle, Fig. 15	Feather Safety Razor, Japan
Wägeschälchen	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen, 75, 225 cm ²	Nunc, Wiesbaden

Tab. 7 Verwendete Substanzen und Nährmedien.

Aceton	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Benzoylperoxid	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason, water soluble	Sigma, Deisenhofen
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, USA
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, A
Essigsäure, Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 % in Aqua dest.	Klinikapotheke
Fetales Kälber Serum (FKS)	Sigma, Deisenhofen
Fluoresceindiacetat	Fluka, CH
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LightCycler FastStart DNAMaster SYBR Green I	Roche, Grenzach-Wyhlen

Methanol	Merck, Darmstadt
Methylmetacrylat (MMA)	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100 x)	PAA, A
Plastoid N	Fluka, CH
Propidiumiodid	Fluka, CH
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Toluidinblau	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Gibco, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	PAA, Pasching, A
β -Glycerolphosphat	Sigma, Deisenhofen
Xylol 100 %	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedium (AlphaMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturmedium (DMEM, high glucose)	PAA, A

Tab. 8 Verwendetes Chirurgisches Instrumentarium.

Bipolare Pinzette	KLS Martin, D
Chirurgie-Implantologiegerät Implantmed SI-923	W&H, Buermoos
Chirurgische Pinzetten (1:2 Zähne)	Aesculap, Melsungen
Chirurgisches Winkelstück 1:1	W&H, Buermoos
Einmalskalpelle (Fig.15)	Feather, Japan
Gewindeschrauben, selbstschneidend 1,2 mm	Stryker, Duisburg
HF-Gerät für die Elektrochirurgie ME 102	KLS Martin, Tuttlingen
Handgriff mit Schnellspannfutter	Stryker, Duisburg
Lidhalter, Modell Barraquer	Heiland, Hamburg
Micro Winkelstück	Aesculap, Melsungen
Nadelhalter	Aesculap, Melsungen
Nadelhalter für die Mikrochirurgie	Aesculap, Melsungen
Narkosegerät	Eickemeyer, Tuttlingen
Präparierschere	Aesculap, Melsungen
Prolene (5-0), nichtresorbierbares Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Schere	Aesculap, Melsungen
Spannzange	Stryker, Duisburg
Spannhülse	Stryker, Duisburg
Spickdrahtkopf	Aesculap, Melsungen
Titan Platten	Stryker, Duisburg
Vicryl (5-0), resorbierbares Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Wundspreizer nach Gelpi	Heiland, Hamburg

Tab. 9 Verwendete Medikamente.

Domitor [®] , (Medetomidin)	Pfizer GmbH, D
Dormicum [®] , (Midazolam)	Hoffmann LaRoche, D
Fentanyl-Janssen [®] , (Fentanyl)	Janssen GmbH, D
Antisedan [®] , (Atipamezol)	Pfizer GmbH, D
Anexate [®] , (Flumazenil)	Hoffmann LaRoche, D
Metacam [®] , (Meloxicam)	Boehringer Ingelheim, D
Kodan [®] , Tinktur forte	Schülke & Mayr, D
Octenisept [®]	Schülke & Mayr, D
Baytril [®]	Bayer, D

Tab. 10 Verwendete Tiere.

Athyme Nacktratten (rnu/rnu)	Harlan, D
------------------------------	-----------

Tab. 11 Verwendete Zellen.

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	Cambrex, USA
--	--------------

9. Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
CSD	Critical size defect, Defekt kritischer Größe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle
i. m.	intramuskulär
kV	Kilovolt
mAmp	Milliampere
MEM	modified eagle medium
MMA	Methylmetacrylat
mRNA	Messenger ribo nucleic acid, Messenger-Ribonukleinsäure
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PMMA	Polymethylmetacrylat
PVC	Polyvinylchlorid
RT-PCR	Reverse transkriptase polymerase chain reaction, polymerase Kettenreaktion
s. c.	subkutan
TE	Tissue engineering
TSchG	Tierschutzgesetz
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung
μCT	Micro-Computertomographie
3-D	dreidimensional

10. Danksagung

Frau Prof. Dr. Ulrike Matis danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ihre Kooperationsbereitschaft und Ihr Interesse haben mir die Promotion ermöglicht. Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler gilt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas und für die freundliche Aufnahme an der Klinik.

Bei Herrn PD Dr. Matthias Schieker bedanke ich mich für die wegweisenden Ratschläge und seine umfangreiche Förderung, die weit über die Betreuung einer Doktorarbeit hinausging und noch immer geht. Herrn Dr. Elias Volkmer gilt mein Dank für sein unermüdliches Engagement während der Entstehung dieser Arbeit, für die freundschaftlichen, stets aufmunternden Worte und seine beständige Unterstützung.

Für wertvolle Hilfe möchte ich ebenso Herrn Prof. Dr. Peter Augat sowie Herrn Dipl.-Ing. Rainer Penzkofer Dank sagen. Gleichmaßen haben Herr Prof. Dr. Hermann Seitz und Frau Dr. Barbara Leukers zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch Herrn Dr. Klaus Zahn bin ich für seine freundliche Hilfestellung und fachliche Unterstützung zu Dank verpflichtet. Für den reibungslosen Ablauf in der Tierhaltung danke ich stellvertretend Herrn Dr. Peter Scheuber, der mir zudem die Versuchstierkunde als spannendes tierärztliches Berufsfeld nahegebracht hat.

Insgesamt wäre ohne die weitreichende Unterstützung meiner Kollegen in der Experimentellen Chirurgie diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. Denitsa Docheva und Frau Martina Burggraf, sowie Frau Claudia Harbauer und Frau Sophia Poppe, die mich sehr unterstützt haben.

Nicht zuletzt geht ein herzlicher Dank an meine Freunde und Familie, die mir mit großer Geduld und Selbstverständlichkeit stets einen Ausgleich und eine Ergänzung zum „Laborleben“ geschaffen haben. Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung waren und sind für mich unverzichtbar.

