

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med.vet. Roberto Köstlin

Angefertigt in der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik  
des Universitätsklinikums Erlangen

(Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Arkudas)

## Tissue Engineering von axial vaskularisiertem bioartifiziellen Knochen im critical size Femurdefektmodell der Ratte

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

Vorgelegt von  
Amelie Friederike Balzer  
aus Würzburg

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Roberto Köstlin

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Johann Maierl

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Omi

**INHALTSVERZEICHNIS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>                         | <b>IV</b> |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                      | <b>IX</b> |
| <b>I. EINLEITUNG.....</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>                     | <b>2</b>  |
| <b>1. Physiologie und Pathologie des Knochen .....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1 Knochenaufbau .....                                 | 2         |
| 1.1.1 Knochenmatrix .....                               | 4         |
| 1.1.2 Knochenzellen .....                               | 6         |
| 1.2 Knochenbildung.....                                 | 7         |
| 1.2.1 Knochenwachstum.....                              | 7         |
| 1.2.2 Remodellierung.....                               | 8         |
| 1.3 Knochenheilung und Knochendefekte.....              | 8         |
| 1.3.1 Primäre Knochenheilung .....                      | 9         |
| 1.3.2 Sekundäre Knochenheilung .....                    | 9         |
| 1.3.3 Pathologie der Knochenheilung.....                | 10        |
| 1.3.4 Klinische Folgen und Therapieansätze.....         | 11        |
| 1.3.4.1 Knochentransplantation .....                    | 11        |
| 1.3.4.1.1 Autogene Transplantate .....                  | 12        |
| 1.3.4.1.2 Allogene und xenogene Transplantate.....      | 12        |
| 1.3.4.1.3 Vaskularisierte Transplantate .....           | 13        |
| 2. Tissue Engineering .....                             | 13        |
| 2.1 Prinzipien des Tissue Engineering von Knochen ..... | 14        |
| 2.2 Knochenersatzmaterialien.....                       | 15        |
| 2.2.1 Biologische Knochenersatzmaterialien .....        | 16        |
| 2.2.2 Synthetische Knochenersatzmaterialien .....       | 17        |
| 2.2.2.1 Organische Knochenersatzmaterialien .....       | 17        |
| 2.2.2.2 Anorganische Knochenersatzstoffe .....          | 18        |
| 2.2.3 Komposite.....                                    | 19        |
| 2.3 Osteogene Zellen .....                              | 19        |
| 2.4 Osteoinduktive Faktoren.....                        | 22        |

---

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>3.</b>   | <b>Angiogenese im Tissue Engineering.....</b>                 | <b>23</b> |
| 3.1         | Extrinsische Vaskularisation .....                            | 24        |
| 3.2         | Intrinsische Vaskularisation.....                             | 25        |
| 3.2.1       | AV-Loop Modell .....  | 27        |
| <b>4.</b>   | <b>Femurdefektmodell in der Ratte .....</b>                   | <b>28</b> |
| 4.1         | Critical size defect .....                                    | 28        |
| 4.2         | Fixationssysteme.....   | 29        |
| 4.2.1       | Fixateur externe .....  | 29        |
| 4.2.2       | Plattenosteosynthese .....                                    | 30        |
| 4.2.3       | Vergleich der Fixationssysteme.....                           | 31        |
| <b>5.</b>   | <b>Eigene Vorstudien.....</b>                                 | <b>31</b> |
| <b>6.</b>   | <b>Ziel der Studie .....</b>                                  | <b>32</b> |
| <b>7.</b>   | <b>Relevanz für die Tiermedizin .....</b>                     | <b>33</b> |
| <b>III.</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>                             | <b>34</b> |
| <b>1.</b>   | <b>Studiendesign .....</b>                                    | <b>34</b> |
| <b>2.</b>   | <b>Titankammer.....</b>                                       | <b>36</b> |
| <b>3.</b>   | <b>Implantatherstellung .....</b>                             | <b>37</b> |
| 3.1         | Hartmatrix.....   | 37        |
| 3.2         | Fibrin .....  | 38        |
| 3.3         | Bone morphogenic Protein .....                                | 38        |
| <b>4.</b>   | <b>Kultivierung mesenchymaler Stammzellen.....</b>            | <b>39</b> |
| 4.1         | Zellgewinnung .....   | 39        |
| 4.2         | Zellisolation .....   | 39        |
| 4.3         | Zellexpansion und Zellkonservierung .....                     | 40        |
| 4.4         | Osteogene Differenzierung und DiI-Markierung der Zellen ..... | 41        |
| <b>5.</b>   | <b>In-vivo-Versuche.....</b>                                  | <b>42</b> |
| 5.1         | Versuchstiere .....   | 42        |
| 5.2         | Anästhesie und Operationsvorbereitung .....                   | 43        |
| 5.3         | Heterotope Implantation in der Leiste .....                   | 44        |
| 5.3.1       | Implantation der arteriovenösen Gefäßschleife (AVL) .....     | 44        |
| 5.3.2       | Heterotope Implantation ohne arteriovenöse Gefäßschleife..... | 46        |
| 5.4         | Generierung des critical size Femurdefekt .....               | 46        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 5.5        | Postoperative Versorgung und Laufevaluation .....        | 48        |
| 5.5.1      | Medikation post operationem .....                        | 48        |
| 5.5.2      | Laufevaluation .....                                     | 49        |
| 5.6        | Explantation.....  | 49        |
| <b>6.</b>  | <b>Ex-vivo-Auswertung.....</b>                           | <b>49</b> |
| 6.1        | Röntgenkontrolle .....                                   | 50        |
| 6.2        | Probengewinnung .....                                    | 50        |
| 6.3        | Computertomographie .....                                | 51        |
| 6.4        | Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT) .....               | 51        |
| 6.5        | Histologie.....  | 52        |
| 6.5.1      | Aufarbeitung der histologischen Proben .....             | 52        |
| 6.5.2      | Schnitttechnik .....                                     | 54        |
| 6.5.3      | Übersichtsfärbungen.....                                 | 54        |
| 6.5.3.1    | Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....                          | 54        |
| 6.5.3.2    | Masson-Goldner-Trichromfärbung.....                      | 56        |
| 6.5.4      | TUNEL Fluoreszenz Färbung.....                           | 56        |
| 6.5.5      | Immunhistologische Färbungen.....                        | 58        |
| 6.5.5.1    | Lectin .....   | 58        |
| 6.5.5.2    | Alfa-smooth-muscle-actin .....                           | 59        |
| 6.5.5.3    | ED1 .....  | 59        |
| 6.5.6      | Lichtmikroskopie.....                                    | 63        |
| 6.5.7      | Fluoreszenzmikroskopie .....                             | 63        |
| 6.6        | Morphologische Analyse .....                             | 64        |
| 6.7        | Molekularbiologische Analyse .....                       | 65        |
| <b>7.</b>  | <b>Statistische Auswertung .....</b>                     | <b>68</b> |
| <b>IV.</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>                                   | <b>69</b> |
| <b>1.</b>  | <b>Operationsverlauf.....</b>                            | <b>69</b> |
| 1.1        | Gewichtsverlauf .....                                    | 70        |
| 1.2        | Laufevaluation .....                                     | 70        |
| <b>2.</b>  | <b>Röntgenuntersuchung .....</b>                         | <b>71</b> |
| <b>3.</b>  | <b>Makroskopische Begutachtung .....</b>                 | <b>72</b> |
| <b>4.</b>  | <b>Computertomographische Untersuchungen .....</b>       | <b>75</b> |
| 4.1        | Computertomographische Untersuchung der Konstrukte ..... | 75        |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| 4.2          | Mikrocomputertomographische Untersuchung der Konstrukte .....        | 76         |
| <b>5.</b>    | <b>Histologische Analyse .....</b>                                   | <b>78</b>  |
| 5.1          | HE- und Masson-Goldner-Färbung .....                                 | 78         |
| 5.1.1        | Qualitative Gewebedifferenzierung .....                              | 78         |
| 5.1.2        | Quantitative und statistische Auswertung .....                       | 84         |
| 5.2          | Fluoreszenzhistologie .....  | 89         |
| 5.3          | Immunhistologie .....  | 90         |
| <b>6.</b>    | <b>Ergebnisse der molekularbiologischen Auswertung (PCR) .....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>V.</b>    | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>1.</b>    | <b>Beurteilung des Tiermodells .....</b>                             | <b>94</b>  |
| 1.1          | Beurteilung der verwendeten Tiermodelle .....                        | 94         |
| 1.2          | Beurteilung des Tiermodells hinsichtlich der Ergebnisse .....        | 99         |
| <b>2.</b>    | <b>Vaskularisation .....</b>   | <b>100</b> |
| <b>3.</b>    | <b>Mesenchymale Stammzellen .....</b>                                | <b>105</b> |
| <b>4.</b>    | <b>Knochenbildung.....</b>   | <b>107</b> |
| <b>5.</b>    | <b>Defektüberbrückung .....</b>                                      | <b>112</b> |
| <b>6.</b>    | <b>Ausblick .....</b>  | <b>118</b> |
| <b>VI.</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>120</b> |
| <b>VII.</b>  | <b>SUMMARY .....</b>   | <b>122</b> |
| <b>VIII.</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                    | <b>124</b> |
| <b>IX.</b>   | <b>ANHANG.....</b>   | <b>145</b> |
| <b>1.</b>    | <b>Verwendete Materialien und angewandte Methoden .....</b>          | <b>145</b> |
| 1.1          | Protokolle zur Herstellung der Nährmedien .....                      | 145        |
| 1.1.1        | Standardnährmedium .....   | 145        |
| 1.1.2        | Differenzierungsmedium .....   | 145        |
| 1.2          | Protokolle zur Herstellung der verwendeten Puffer .....              | 146        |
| 1.2.1        | Trispuffer .....   | 146        |
| 1.2.2        | Citratpuffer .....   | 146        |
| 1.2.3        | Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (EDTA-Puffer) .....              | 146        |
| 1.3          | Protokoll zur Durchführung der alkalischen Phosphatase Färbung ..... | 147        |

|           |                          |            |
|-----------|--------------------------|------------|
| <b>2.</b> | <b>Tabellen .....</b>    | <b>149</b> |
| <b>3.</b> | <b>Abbildungen .....</b> | <b>150</b> |
| <b>X.</b> | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>151</b> |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                 |   |                |   |
|-----------------|---|----------------|---|
| %               | Prozent   | IE             | Internationale Einheit                              |
| °               | Grad  | IL             | Interleukin   |
| °C              | Grad Celsius  | KGW            | Körpergewicht                                       |
| 3-D             | dreidimensional   | kV             | Kilovolt  |
| A.              | Arteria   | M              | Molar   |
| Abb.            | Abbildung   | M.             | Musculus  |
| ASMA            | alfa-smooth muscle actin  | m <sup>2</sup> | Quadratmeter  |
| AP              | Alkalische Phosphatase  | mAs            | Milliampèresekunde                                  |
| Aqua            | Aqua destillata   | mg             | Milligramm  |
| dest.           |   | ml             | Milliliter  |
| AVL             | arteriovenöse Gefäßschleife   | mm             | Milimeter   |
| BMP-2           | Bone morphogenic Protein 2  | mM             | Milimolar mM  |
| bzw.            | beziehungsweise   | NaCl           | Natrium Chlorid                                     |
| ca.             | circa   | ng             | Nanogramm   |
| CaP             | Calciumphosphat   | nm             | Nanometer   |
| cm <sup>3</sup> | Kubikzentimeter   | O              | Sauerstoff  |
| cDNA            | Desoxyribonukleinsäure  | P              | Phosphor  |
| Cl              | Chlor   | rhBMP          | rekombinantes humanes<br>Bone morphogenic Protein   |
| cm              | Zentimeter  | RT-PCR         | Reverse Transkriptase-<br>Polymerase-Kettenreaktion |
| CSD             | critical size defect  | RUNX2          | „runt-related transcription<br>factor 2“            |
| CSFD            | critical size femur defect  | TBS            | Tris gepufferte<br>Kochsalzlösung                   |
| CT              | Computertomographie   | TCP            | Tricalciumphosphat                                  |
| DiI             | 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-<br>tetramethylindocarbocyanine<br>perchlorate | TE             | Tissue engineering                                  |
| DKM             | demineralisierter Knochen   | TGF-β          | Tumor-Nekrose-Faktor                                |
| DMEM            | Dulbecco´s Modified Eagle<br>Medium                                       | Ti             | Titan   |
| EDTA            | Ethyldiamintetraessigsäure  | Tris           | Tris(hydroxymethyl)-<br>aminomethan                 |
| et al.          | et alii   | USA            | United States of America                            |
| FGF             | Fibroblast Growth Factor  | V.             | Vena  |
| FBS             | Fötales Kälberserum   | z.B.           | zum Beispiel  |
| g               | Gramm   | β-TCP          | Beta-Tri-Calciumphosphat                            |
| HA              | Hydroxylapatit  | μCT            | Mikrocomputertomographie                            |
| HCl             | Salzsäure   | μg             | Mikrogramm  |

## I. EINLEITUNG

Große Knochendefekte, wie sie nach Unfällen mit Defektfrakturen oder Pseudarthrosenbildung sowie nach Tumorexzisionen, Osteomyelitiden oder avaskulären Knochennekrosen auftreten können, stellen die Chirurgen der unterschiedlichsten Fachdisziplinen der Human- wie auch der Tiermedizin vor eine große Herausforderung. Um eine komplette Heilung zu erzielen, reicht eine normale Osteosynthese allein nicht aus, weswegen Implantate den Defektbereich überbrücken müssen.

Die autologen Transplantation eines aus dem eigenen Körper gewonnenen Knochenstücks wird auf Grund immunologischer Unbedenklichkeit und der optimalen knochenbildenden und -leitenden Eigenschaft dabei immer noch als Goldstandard angesehen. Die Notwendigkeit großer Knochentransplantate und die damit verbundene Gefahr der Hebemorbidität setzen dieser Anwendung Grenzen. Alternativ dazu werden prozessierte Knochenstücke aus Kadavern gewonnen, die in ihrer Größe weitgehend unbegrenzt zur Verfügung stehen. Die länger andauernde schlechtere Heilung und das Risiko der Krankheitsübertragung schränken den Einsatz von Allografts jedoch ein, wodurch Biomaterialien für die Rekonstruktion solcher Defekte immer mehr an Bedeutung gewinnen.

Vor allem sehr große, infizierte oder tumorös veränderte Defekte mit schlechter Durchblutung des umliegenden Gewebes verlangen nach einem gut verträglichen Knochenersatz, der im Idealfall knochenbildende wie auch knocheninduzierende Eigenschaften aufweist und eine intakte eigene Blutversorgung besitzt.

Das interdisziplinäre Feld des Tissue Engineering (TE) liefert dabei gute Ansätze um biologische Konstrukte zur Wiederherstellung der Gewebefunktion zu entwickeln. Die Strategie des TE von Knochen ist es, ein dreidimensionales knochenleitendes Ersatzmaterial mit isolierten, expandierten knochenbildenden Zellen zu besiedeln und mit Hilfe von knocheninduzierenden Wachstumsfaktoren die Bildung von neuem Knochen zu induzieren. Eine weitere sehr wichtige Komponente stellt vor allem die initiale Durchblutung des Gewebes dar, von der das Überleben und die Integration eines Implantats, sowie die Heilung des Defektes abhängen. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob und inwieweit eine axiale Vaskularisierung und die Präfabrikation eines Biomaterials Vorteile bei der Überbrückung eines Femurdefekts kritischer Größe bietet.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. *Physiologie und Pathologie des Knochen*

Die Knochen stellen zusammen mit Knorpeln, Bändern und Gelenken als Skelettsystem das stützende Gerüst des Körpers dar. Als stabilisierende Komponente dienen sie z.B. zum Schutz innen liegender Organe. Zusammen mit der Muskulatur fungieren sie als Bewegungsapparat und ermöglichen somit die Lokomotion (KÖNIG & LIEBICH, 2005). Des Weiteren besitzen sie auch eine Stoffwechselfunktion, die vor allem den Mineralstoffhaushalt und die Blutbildung betrifft. So speichert der Knochen unter anderem Calcium und Phosphor, welche durch hormongesteuerten Knochenab- oder -aufbau in das Blut freigesetzt bzw. in den Knochen eingebaut werden können und damit den Calcium- und Phosphatspiegel im Blut regulieren (GREEN, 1994).

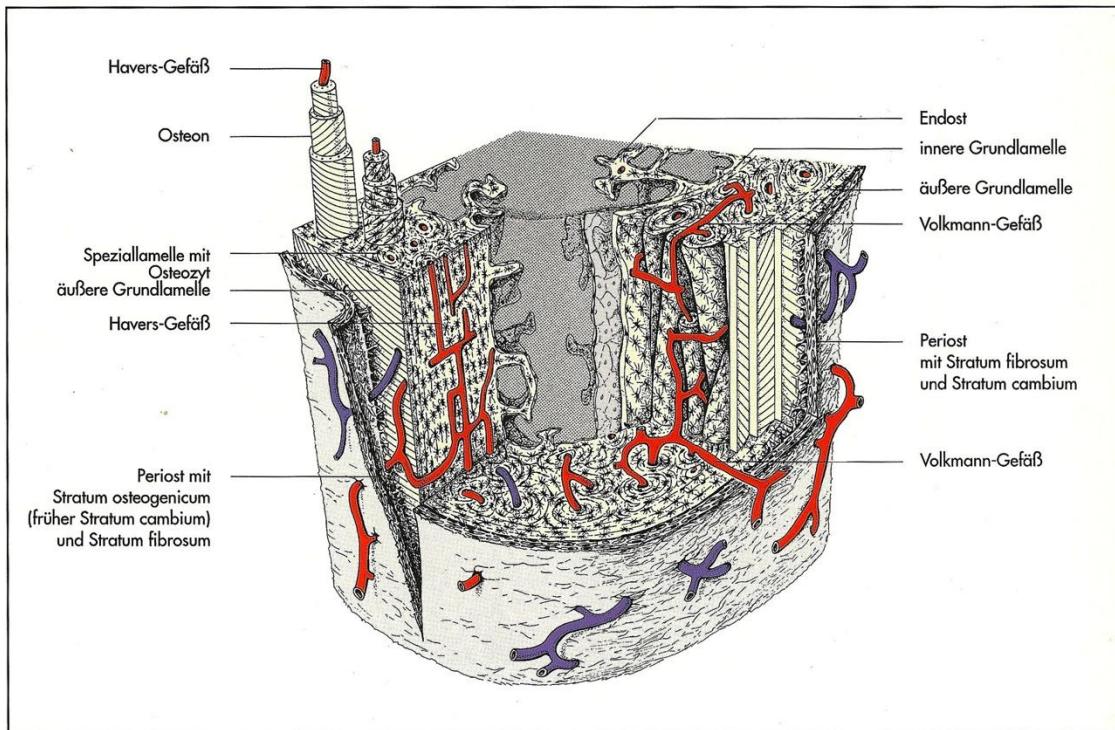
#### 1.1 **Knochenaufbau**

Die Knochensubstanz besteht hauptsächlich aus der äußeren Substantia compacta (Kortikalis), einem dichten Knochenmantel der eine Porosität von unter 10 % aufweist und beim Erwachsenen 80 % des gesamten Knochengewichts ausmacht (ERIKSEN et al., 1994; CLARKE, 2008). Eine schematische Darstellung dazu ist in *Abbildung 1* zu sehen. Am proximalen und distalen Knochenende, den Epiphysen, schließt die Knochenrinde die innere Substantia spongiosa ein. Aufgrund ihres feinen Bälkchenwerks (Knochentrabekel) und der Porosität von 50 bis 90 % gleicht sie einem feinporigen, verknöcherten Schwamm. Die unterschiedliche Dichte, dreidimensionale Struktur und Stoffwechselaktivität der beiden Gewebestrukturen verleiht dem Knochen einerseits Stabilität, andererseits Flexibilität und Wandlungsfähigkeit.

Die Kortikalis ist von einer äußeren Knochenhaut, dem Periost vollständig umhüllt und die Spongiosabälkchen sind zur Markhöhle hin mit der inneren Knochenhaut, dem Endost überzogen (BUCKWALTER et al., 1996b). Das Periost ist aufgrund seiner Durchziehung mit Blutgefäßen, Nervenfasern und enthaltenen Stammzellen von herausragender Bedeutung für die Blutversorgung, das Wachstum, die Regeneration, die Bruchheilung sowie die muskuläre Kraftübertragung. Die langen Röhrenknochen besitzen außerdem eine Markhöhle, in der sich das rote Knochenmark, der wichtigste Ort der Hämatopoese, befindet. Dort findet die Differenzierung von Hämatoblasten zu Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten statt. Außerdem enthält es die für diese Studie relevanten Stammzellen. Findet man bei

Säuglingen noch in allen Knochen rotes Knochenmark, so wird dieses mit zunehmendem Alter in Fettmark (gelbes Knochenmark) umgewandelt (GUREVITCH et al., 2007). Die Substantia spongiosa, die bei Erwachsenen einen Großteil des roten Knochenmarks beherbergt, ist vornehmlich in der Metaphyse langer Röhrenknochen, dem Beckenkamm und in den Wirbelkörpern zu finden (ACKERMAN et al., 1976).

Im Körper existieren zwei Knochenarten: der einfache Faser- oder Geflechtknochen, der in der embryonalen Entwicklung sowie bei jeder Knochenneubildung zuerst angelegt wird und der Lamellenknochen, welcher den Erstigen bis auf wenige Stellen (u.a. Ansatzstellen größerer Sehnen) ständig komplett ersetzt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines Abschnitts aus der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens (Quelle: König HR, Liebich HG. Anatomie der Haussäugetiere. 3. Aufl. Stuttgart: Schattauer 2005; 16)

Der Lamellenknochen ist gekennzeichnet durch seine streng parallel oder konzentrisch geschichteten Kollagenfasern und enthält als strukturelle Grundlage das Osteon (Havers-System) (MARTIN et al., 1998; KÖNIG & LIEBICH, 2005). Im Inneren dieser Einheit befindet sich der Zentralkanal der neben lockerem Bindegewebe das Havers-Gefäß sowie einen vegetativen Nerv führt. Um das Havers-System herum schließen sich die Speziallamellen und die mineralisierte Knochenmatrix an, denen wiederum die

Knochenzellen anliegen. Durch die langen radiär verlaufenden Zytoplasmatafortsätze entsteht ein inniges Kontaktssystem zwischen den Osteozyten. Hierdurch wird der Stofftransport aus dem Havers-Gefäß zur mineralisierten, nicht vaskularisierten Knochenmatrix ermöglicht. Die querverlaufenden Volkmann-Gefäße verbinden das Zentralgefäß mit Periost sowie Endost und versorgen zusammen mit den Arteriae nutriciae, die durch eine Knochenöffnung in die Markhöhle ziehen, den Knochen (KÖNIG & LIEBICH, 2005).

### 1.1.1 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix nimmt 90 % des Knochens ein. Sie besteht aus einer anorganischen oder mineralisierten Komponente (65 % der Knochenmatrix), einer organischen (20 %) Komponente, sowie Lipiden und Wasser (15 %) (CLARKE, 2008).

Die anorganische Komponente besteht in erster Linie aus Hydroxylapatit, einem Calciumphosphat mit der Summenformel  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  (KHURANA et al., 2010). Durch Einlagerungen (z.B. Carbonate, Fluoride, Citrate) liegt das Hydroxylapatit nicht in reiner Kristallform vor und macht durch eine bessere Löslichkeit der Minerale das Calcium für den metabolischen Mineralstoffwechsel verfügbar (MARTIN et al., 1998). Die Anwesenheit von molekularen Kristallisationsinhibitoren wie Pyrophosphate, Matrix- $\gamma$ -Carboxylate, Glutamat-Proteine (Matrix-Gla-Protein) oder Osteocalcin bestimmen zusammen mit dem Verhältnis von Calcium zu Phosphat den Mineralisierungsgrad des Knochengewebes (MURSHED et al., 2005). Diese anorganische Hartsubstanz ist verantwortlich für die Knochenfestigkeit, die Steifigkeit und den Widerstand gegen Druckkräfte.

Die organische Komponente setzt sich aus Kollagenfasern, Proteoglykanen, Glykoproteinen, Phosphoproteinen und Enzymen zusammen. Sie gibt dem Knochen seine Form und leistet Widerstand gegen Zugkräfte. Den Hauptbestandteil davon macht das Typ I Kollagen aus, welches neben dem Knochen auch in der Haut, in den Menisken, Sehnen, Bändern und Gelenkkapseln vorkommt. Zu einem geringeren Prozentsatz kommen daneben auch Typ III, V, XI und XIII Kollagen und nichtkollagene Proteine wie z.B. Wachstumsfaktoren vor. Diese übernehmen wichtige Funktionen bei der Regulation der Mineralisierung, beim Kollagenfaserwachstums und bei Zell-Matrix-Wechselwirkungen (OLDBERG et al., 1988). Entscheidende Faktoren dabei sind das „bone morphogenetic protein“ (BMP), Faktoren der „transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) Familie, Interleukin-1, Interleukin-6 und Sialoproteine.

Regulatorische Funktionen besitzen auch Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin und die alkalische Phosphatase, die bei der molekularbiologischen Analyse als biochemische Marker für die Knochenbildung fungieren und daher im folgenden näher beschrieben werden (MARTIN et al., 1998).

Osteocalcin (OC) ist eines der am häufigsten im Knochen zu findenden nichtkollagenen Proteine. Seine Expression in Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten wird durch das Hormon Calcitriol stimuliert. OC bindet an Hydroxylapatit und Calcium, jedoch konnte seine genaue biologische Funktion bis heute noch nicht definiert werden. Einerseits inhibiert es die Mineralisierung des Knochens, andererseits ist es an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt (CALVO et al., 1996). Da OC nur in aktiven Osteoblasten exprimiert wird, ist es ein guter Parameter mit hoher Spezifität zur Beurteilung der Aktivität der Knochenneubildung (LEE et al., 2000).

Osteopontin gehört zu der Gruppe der Sialoproteine und wird in Zellen vieler Gewebetypen exprimiert. Dazu gehören Osteoblasten, Osteozyten, einige Knochenmarkzellen und Knorpelzellen, aber auch Zellen von nicht mineralisierten Gewebearten wie Gehirn, Niere, Plazenta und Muskulatur (NOMURA et al., 1988). Osteopontin erfüllt eine Reihe wichtiger biologischer Funktionen bei homöostatischen und pathologischen Prozessen. Beim Knochenumbau vermittelt Osteopontin die Verankerung von Knochenzellen an die Knochenmatrix und dient damit als Kristallisationskern für Hydroxylapatit. Durch seine chemotaktische und antiapoptotische Eigenschaft beschleunigt es die Zellrekrutierung in Entzündungsherden (z.B. nach Frakturen) und reguliert durch die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen die zelluläre Immunmodulation und Zellbewegung (DENHARDT et al., 2001).

Osteonectin gehört zu den Glycoproteinen und bindet an Kollagen, Hydroxylapatit und Wachstumsfaktoren. Es stimuliert die Angiogenese, die Bildung von Matrixmetalloproteininasen und reguliert die Zellproliferation (GUNDBERG, 2003).

Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein von Osteoblasten gebildetes Enzym und kommt in der extrazellulären Knochenmatrix als gewebeunspezifische Form (tissue-nonspecific alkaline phosphatase) vor (KHURANA, 2009). ALP kann als therapeutischer Marker für die Heilung von frischen Frakturen herangezogen werden (CALVO et al., 1996). Des Weiteren kann durch eine Anfärbung der Zellkultur die

Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu Osteoblasten nachgewiesen werden.

### 1.1.2 Knochenzellen

Knochenzellen nehmen 10 % des Knochenvolumens ein und entstehen aus zwei Zelllinien. Die Knochenvorläuferzellen, die den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark entsprechen differenzieren zu Osteoblasten und Osteozyten. Die Osteoklasten dagegen sind hämatopoetischen Ursprungs (BUCKWALTER et al., 1996b; CLARKE, 2008).

Die Knochenvorläuferzellen, welche später zu knochenbildenden Zellen werden, liegen undifferenziert in den Havers-Kanälen, im Endost, im Periost und im Knochenmark. Erhalten sie von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und BMPs oder Transkriptionsfaktoren wie „runt-related transcription factor 2“ (RUNX2) das Signal zur Migration und Proliferation, differenzieren sie zu Osteoblasten.

Diese liegen als nicht mehr teilungsfähige Nachfolgerzellen der Präosteoblasten eng miteinander verbunden schichtartig auf der Oberfläche von Knochen und Osteoid. Durch die Synthese der organischen Komponente der Knochenmatrix einschließlich Kollagenfasern Typ I, nicht kollagenen Matrixproteinen und BMPs tragen sie entscheidend zur Knochenbildung bei (COOPER et al., 1966; KHURANA, 2009). Osteoblasten synthetisieren außerdem das Enzym alkalische Phosphatase, welches für die lokale Mineralisierung des Osteoids benötigt wird. Da Osteoblasten nicht mehr teilungsfähig sind, gibt es drei Möglichkeiten der Weiterentwicklung. Sie können entweder Osteoblasten bleiben und an vorliegender Stelle als Knochenauskleidung dienen, sich zu Osteozyten verwandeln oder in ihre Ursprungsform, die Knochenvorläuferzelle, zurückkehren (BUCKWALTER et al., 1996b).

Osteozyten stellen 90 % aller Knochenzellen dar (BUCKWALTER et al., 1996b). Sie entstehen aus Osteoblasten, die sich selbst mit organischer Knochenmatrix ummauert haben und in den so entstandenen Vakuolen, auch Lakunen genannt, bestehen. Osteozyten halten die knöcherne Matrix aufrecht und wirken regulierend auf die Calciumhomöostase. Je mehr sie jedoch von mineralisierter Matrix umgeben werden, desto geringer ist ihre metabolische Aktivität. Um die Stoffwechselvorgänge aufrecht zu erhalten, bilden sie in den Knochenkanälchen lange Zytosplasmafortsätze und bleiben so in Kontakt zu anderen Osteozyten, Osteoblasten und Blutgefäßen (KÖNIG & LIEBICH, 2005).

Osteoklasten sind mehrkernige gewebespezifische Makrophagen und stammen von hämatopoetischen Monozyten- oder Makrophagen-Vorläuferzellen ab. Ihre Hauptaufgabe ist die Resorption von Knochen. Durch Cytokine, Hormone (Calcitriol, Calcitonin, Parathormon) und Faktoren wie „Receptor Aktivator of Nf- $\kappa$ B Ligand“ (RANKL) und „colony-stimulating factor-1“ (CSF-1) wird die Bildung und Aktivität der Osteoklasten geregelt (YASUDA et al., 1998; RAISZ, 1999; BOYLE et al., 2003). Die reifen Osteoklasten liegen dem mineralisierten Knochen bürstensaumartig an und lösen ihn durch Sekretion von Säuren und Enzymen auf (BLAIR & ATHANASOU, 2004). Die entstandenen Abbauprodukte wie Hydroxylapatit werden phagozytiert und intrazytoplasmatisch in Lysosomen abgebaut.

## 1.2 Knochenbildung

Ossifikation ist die Bildung von neuem Knochengewebe. Sie findet sowohl im Wachstum, wie auch nach Frakturen oder bei pathologischen Verknöcherungen statt. Ihr schließt sich die dauerhafte Phase der Knochenremodellierung an.

### 1.2.1 Knochenwachstum

Es werden zwei Formen der embryonalen Knochenbildung unterschieden, welche die zwei Möglichkeiten der adulten Knochenheilung wiederspiegeln: die desmale oder bindegewebige, direkte Ossifikation und die chondrale, indirekte Ossifikation.

Bei der Bildung von flachen Knochen, der primären Knochenheilung und der Distraktionsosteogenese laufen die Prozesse der desmalen Ossifikation ab und es wird direkt neuer Knochen gebildet (DIMITRIOU et al., 2005). Dabei differenzieren mesodermale Bindegewebszellen (undifferenzierte Mesenchymzellen) über Präosteoblasten zu Osteoblasten (OLSEN et al., 2000). Diese produzieren die unverkalkte Knochenmatrix mit dem Hauptbestandteil Kollagen Typ I und bauen somit um sich herum das Osteoid auf. Anschließend erfolgt die Mineralisierung, bei der über die Blutgefäße anorganische Knochenbestandteile wie Calciumphosphat und Calciumcarbonat in das Osteoid eingelagert werden. In Folge dessen entsteht nach acht bis zehn Tagen das verkalkte Ossein, die Grundsubstanz des Knochen (KÖNIG & LIEBICH, 2005).

Die chondrale Ossifikation erfolgt primär durch Umwandlung von hyalinem Knorpel in permanentes Knochengewebe und kann beim Längenwachstum langer Röhrenknochen, an der Wachstumsfuge und als Teil der natürlichen Kaskade der Knochenheilung

beobachtet werden. Dabei laufen zwei Schritte nebeneinander ab. Zum einen differenzieren Osteoprogenitorzellen des Knorpelmantels (Perichondrium) bei der perichondrale Ossifikation zu Osteoblasten. Wie bei der desmalen Ossifikation scheiden diese Osteoid aus, woraus sich durch Mineralisierung der entstandenen Knochenmanschette das Periost entwickelt. Zum anderen proliferieren die Chondrozyten innerhalb der Knochenmanschette in vier ausgeprägten Zonen und bilden als Ausgangsmaterial zur enchondralen Ossifikation die Knorpelmatrix. Durch die Kalzifizierung der Matrix sterben die Chondrozyten ab und es wachsen neue Blutgefäße ein. Über diese gelangen zuerst Chondroblasten in die Eröffnungszone und bauen das Knorpelgewebe ab. Sekundär dringen Osteoblasten ein und bauen den Knochen auf (ORTEGA et al., 2004).

### 1.2.2 Remodellierung

Die Remodellierung ist der stetige Prozess der Reaktion des Knochens auf äußere physiologische Einflüsse oder mechanische Kräfte. Sie umfasst die allmähliche Anpassung des Skeletts auf einwirkende Kräfte und die aktive Teilnahme am Metabolismus. Der Knochen kann dabei in seiner Breite zunehmen oder die Achse ändern, indem an den entsprechenden Flächen durch Osteoklasten Knochen abgebaut und nach Bedarf durch Osteoblasten wieder hinzugefügt wird (CLARKE, 2008).

Dieser lebenslange Vorgang ist essentiell, um den Knochen stabil zu halten, den Calcium- und Phosphathaushalt zu regulieren und physiologisch entstandene Mikroläsionen zu reparieren (HADJIDAKIS & ANDROULAKIS, 2006; RAGGATT & PARTRIDGE, 2010). An der Befehlsgebung beteiligt sind Signalmoleküle einschließlich Zytokine, Wachstumsfaktoren (BMP, TGF- $\beta$ ) und Geschlechtshormone oder Hormone, die den Calciumspiegel regulieren (ALLORI et al., 2008).

## 1.3 Knochenheilung und Knochendefekte

Der Knochen ist ein stark vaskularisiertes Gewebe mit der einzigartigen Eigenschaft, nach Frakturen oder Knochenverlust ohne Narbenbildung zu heilen (BUCKWALTER et al., 1996b, 1996a). Durch den Ablauf dynamischer Vorgänge kann der Knochen in seiner Form und somit auch in seiner Funktion wieder vollständig hergestellt werden (HOLLINGER & WONG, 1996). Je nach Ausgangssituation und chirurgischer Intervention kann eine primäre Knochenheilung mit unverzüglicher Wiederherstellung der Knochenkontinuität von der sekundären Knochenheilung nach Substanzverlust unterschieden werden.

Aufgrund der guten Regenerationsfähigkeit von Knochen heilen die meisten Frakturen unter konservativer oder chirurgischer Standardtherapie gut aus (KOMATSU & WARDEN, 2010). Im Gegensatz dazu stellen ausgedehnte Knochendefekte eine große Herausforderung für die rekonstruktive Chirurgie dar. Diese können aufgrund von Traumata, Tumorexzisionen, Osteomyelitiden, avaskulären Knochennekrosen oder Radionekrosen, Korrekturen kongenitaler Malformationsdefekte, sowie Spondylodesen oder Pseudarthrosenbildung auftreten. Neben der chirurgischen Versorgung durch eine stabile Osteosynthese wird meist auch ein Knochentransplantat oder Knochenersatz und ein biologischer Stimulus zur Reaktivierung des Knochenheilungsprozesses benötigt (MOTOKI & MULLIKEN, 1990; PERRY, 1999).

### **1.3.1 Primäre Knochenheilung**

Die primäre Knochenheilung entspricht der desmalen Ossifikation und ist durch eine Kontakt- oder Spaltheilung der Knochenfragmente ohne Kallusbildung gekennzeichnet. Sie erfolgt, wenn zwischen den knöchernen Frakturkanten nur ein minimaler Spalt vorhanden ist und keine Scher- und Rotationskräfte darauf einwirken (PHILLIPS, 2005). Dazu ist grundsätzlich eine sofortige chirurgische Versorgung nötig, sodass die Knochenenden eng adaptiert und starr fixiert sind.

### **1.3.2 Sekundäre Knochenheilung**

Die sekundäre Knochenheilung läuft ähnlich wie die Wundheilung in ineinander übergehenden Phasen ab und ist durch eine Kombination aus desmaler und enchondraler Ossifikation mit der Bildung von Kallusgewebe charakterisiert.

Am Anfang des Heilungsverlaufs steht die Phase der Hämatombildung, in der Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , BMP und „platelet-derived growth factor“ (PDGF) freigesetzt werden. In der Entzündungsphase wird durch die Einwanderung von Entzündungszellen nekrotischer Knochen abgebaut und das Frakturhämatom durch Granulationsgewebe ersetzt. Über einsprossende Blutgefäße gelangen Vorstufen knochenbildender Zellen in die Frakturzone, proliferieren und bilden einen bindegewebigen Kallus. Durch diese Knorpelbildung wird der Defektspalt stabilisiert. Anschließend wird der Knorpelkallus mineralisiert und in Faserknochen umgewandelt (H. WLODARSKI & GALUS, 2005). Zur Kontur- und Achsenkorrektur wird in der Phase der Remodellierung innerhalb drei Wochen der Faserknochen in Lamellenknochen umgebaut (KOMATSU & WARDEN, 2010). Im Gegensatz zur primären Knochenheilung wirken Mikrobewegungen hier regenerationsfördernd und

eine starre Fixierung hemmt die Heilung (HULTH, 1989).

### 1.3.3 Pathologie der Knochenheilung

Ähnlich wie bei der Wundheilung können metabolische oder mechanische Faktoren die Frakturheilung verzögern. Neben einer schlechten Ausgangslage der Knochenumgebung stellen allgemeine Faktoren wie Alter, Ernährungszustand, die Einnahme antiinflammatorisch oder antikoagulatorisch wirksamer Medikamente oder Steroide sowie Bestrahlung ein zusätzliches Risiko dar.

#### Ausbleibende Knochenheilung

Heilt der Knochen nicht innerhalb der üblichen Regenerationszeit der entsprechenden Fraktur vollständig aus, wird der Zustand auf Grund der verlängerten Frakturheilungszeit als Delayed Union bezeichnet (MEGAS, 2005). Infolge fehlender Stabilität oder unzureichender Blutversorgung der Frakturzone kann es weiterhin zum Ausfall aller reparativen Prozesse kommen und die Knochenheilung bleibt aus.

Dieses permanente Versagen der Kantenheilung über sechs Monate nach dem Knochendefekt wird als Pseudarthrose, oder Nonunion bezeichnet. Die Fehlheilung ist gekennzeichnet durch Abwesenheit knöcherner Überbrückung und Beweglichkeit der Frakturenden gegeneinander. Sie kann röntgenologisch als persistierende Frakturlinie oder Spalt sowie aufgrund sklerosierender faseriger Frakturenden diagnostiziert werden.

Es sind zwei Arten der Nonunion bekannt. Die atrophische Nonunion beruht auf einer unzureichenden oder schlechten Blutversorgung und zieht eine sehr reduzierte oder ausbleibende Kallusbildung nach sich. Im Gegensatz dazu steht die hypertrophe Nonunion, die durch eine unzureichende Immobilisation der Frakturenden ausgelöst wird und meist an der unteren Extremität auftritt. Das Frakturgebiet ist dabei gut vaskularisiert und die Knochenfragmente sind gegeneinander verschiebbar, was zur übermäßigen Kallusbildung mit geschwulstartiger Aufreibung der Knochenenden führt (KHURANA et al., 2010).

Des Weiteren wird eine in anatomischer Länge, Ausrichtung und Rotation abweichende Knochenheilung als Malunion bezeichnet.

#### Critical size defect

Defekte kritischer Größe (critical size defect = CSD) sind als segmentale Defekte definiert, die auf Grund ihrer Größe ohne operativen Eingriff und trotz physiologischer

Umgebungsbedingungen innerhalb der Lebenszeit eines Patienten nicht vollständig ausheilen, d. h. nicht knöchern durchbaut werden (SCHMITZ & HOLLINGER, 1986). In der Forschung dient der CSD, durch ein Implantat überbrückt, zur Beurteilung der Knochenheilung hinsichtlich der eingesetzten Biomaterialien beziehungsweise bei ausschließlicher Abstandsfixierung als Negativkontrolle (PERRY, 1999).

Die unterschiedlichen Ursachen des Heilungsversagen erfordern je nach Ausgangslage eine chirurgische Intervention mit rekonstruktiver Osteosynthese, Debridement, und den Einsatz von Knochentransplantaten, Knochenersatzstoffen, sowie die Verwendung von wachstumsfördernden Zusätzen (MOTOKI & MULLIKEN, 1990). Durch die Forschungsbemühungen CSDs zu heilen, werden Ansätze geliefert aus denen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung großer Knochendefekte bei Mensch und Tier entstehen.

#### **1.3.4 Klinische Folgen und Therapieansätze**

Aufgrund des steigenden Alters der Bevölkerung und der zunehmenden Anzahl von schweren Unfällen müssen immer mehr komplizierte Knochenerkrankungen behandelt werden (COOPER et al., 1992; JADLOWIEC et al., 2003). Problematisch wirken sich dabei die schlechtere Knochenregeneration im Alter sowie die steigende Anzahl von Resistenzen bei Infektionserregern aus. Wegen dieser schlechten Ausgangslage muss häufig mit Komplikationen gerechnet werden. Demgegenüber spornen stetig fortschreitende Forschungserfolge die Chirurgen an, schwere Verletzungen mit dem Ziel der Wiederherstellung der vollen Knochenfunktion zu heilen (HING, 2004).

Nach schweren Traumata, großflächiger Krebsresektion und Frakturen mit langer Defektstrecke entstehen große Defekte, die einzig durch eine normale Osteosynthese behandelt nicht knöchern überbrückt werden können. Daher wird nach immer neuen Wegen gesucht, den Defekt durch Ersatzknochen zu füllen und im Frakturgebiet die bestmögliche Umgebung zur Knochenheilung zu schaffen. Auch in der Tiermedizin wird versucht, schwere Knochenerkrankungen nach besten Möglichkeiten des aktuellen Stands der Wissenschaft zu behandeln (RAGETLY & GRIFFON, 2011).

##### **1.3.4.1 Knochentransplantation**

Reicht die Regenerationsfähigkeit des Knochens nicht aus, um einen Defekt zu heilen, kommen Knochentransplantate zum Einsatz. Es werden Transplantate aus dem eigenen Körper (Autograft) von Spendertransplantaten der gleichen (Allograft) oder einer anderen Spezies (Xenograft) unterschieden (BAUER & MUSCHLER, 2000).

Wichtig bei allen Implantaten ist eine gute Biokompatibilität. Das bedeutet die absolute Gewebeverträglichkeit und das Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen (SCHNURER et al., 2003). Daneben sollten sich die Transplantate vollständig knöchern ein- und umbauen lassen und osteoinduktive, -gene, sowie -konduktive Eigenschaften besitzen. Die Festigkeit, Menge, Größe und Form, Freiheit von Toxinen und mutagenen Nebenwirkungen sowie die Sterilisierbarkeit stellen weitere entscheidende Faktoren dar.

#### **1.3.4.1.1. Autogene Transplantate**

Das autogene Knochentransplantat (Autograft) aus eigener Spongiosa oder Kortikalis des Patienten stellt immer noch den „Goldstandard“ für osteogenen Knochenersatz dar (GAZDAG et al., 1995). Es induziert in der Defektregion durch seine osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften die Bildung von neuem Knochengewebe und verleiht ihr je nach Größe, Form und Qualität eine anfängliche Stabilität. Es können mehrere Zentimeter große Knochentransplantate gewonnen und mit Knochenersatzmaterialien kombiniert werden, um größere Defekte auszufüllen (SASSARD et al., 2000). Aufgrund fest definierter Entnahmestellen und der Gefahr der Hebemorbidität sind Autografts in ihrer Größe limitiert. Ein weiterer Nachteil stellt der Mangel an freier Formbarkeit dar. Mit zunehmender Größe der Transplantate kommt es außerdem zum Anstieg von Komplikationen wie Blutungen, Hämatomen, Infektionen und chronischen Schmerzen an der Entnahmestelle, was die Verwendung von Autografts beschränkt (BANWART et al., 1995; ARRINGTON et al., 1996; EBRAHEIM et al., 2001).

#### **1.3.4.1.2. Allogene und xenogene Transplantate**

Ist der Defekt zu groß, stellt die Reparatur durch allogene oder xenogene, also körperfremde Knochentransplantate eine gute Alternative dar (AHO et al., 1994; GAZDAG et al., 1995). Im Gegensatz zu Autografts besitzen Allografts keine osteogenen Eigenschaften und wachsen langsamer in die gesunde Knochenumgebung ein (GOLDBERG & STEVENSON, 1987). Zur Vermeidung einer immunologischen Abstoßungsreaktion müssen die körperfremden Knochentransplantate vorbehandelt werden. Die osteoinduktiven Faktoren sowie die biomechanische Stabilität und Elastizität bleiben dabei weitgehend erhalten. Die Gefahr von Komplikationen durch Abstoßungsreaktionen oder der Übertragung von Krankheitserregern bleibt jedoch zum Teil weiter bestehen (AHO et al., 1994; LI et al., 2001).

### 1.3.4.1.3. Vaskularisierte Transplantate

Größere Defekte mit ausgedehntem Gewebeverlust, ersatzschwache Lager, oder ein schlecht vaskularisiertes Empfängerbett, wie z.B. nach Bestrahlung, erfordern vaskularisierte Transplantate, um die Perfusion des betroffenen Gebiets wieder herzustellen und die eigene Matrix am Leben zu halten. Für diese Art von Defekten kommen vaskularisierte Transplantate wie z.B. von der Fibula, der Scapula oder vom Beckenkamm zum Einsatz. An geeigneten Lokalisationen können die Transplantate direkt gestielt von der Entnahmestelle in den Defekt geschwenkt werden. Bei größeren Distanzen wird das Transplantat vom Ursprungsort abgetrennt und durch mikrochirurgische Techniken an Blutgefäße des Empfängerbettes angeschlossen. Dadurch ist die Durchblutung des Defektbereichs verbessert, welches sich positiv auf die Knochenheilung einwirkt (SWARTZ et al., 1986; OZAKI et al., 1997; SHEA et al., 1997).

Beschränkende Faktoren sind mangelnde Formbarkeit und die durch die Gefäßachse festgelegte Orientierung (MALIZOS et al., 2004), die begrenzte Größe der Transplantate, sowie die entstehende Hebemorbidität (BABOVIC et al., 2000). Da die Grenzen der kombinierten Knochentransplantate schnell erreicht sind, wird immer mehr nach alternativen Behandlungsmethoden zur Heilung von Knochendefekten gesucht. Gute Ansätze dafür liefert das Verfahren der künstlichen Gewebezüchtung, welches im nächsten Kapitel näher vorgestellt wird.

## 2. *Tissue Engineering*

Tissue Engineering (TE) ist ein Forschungsgebiet mit dem Ziel, biologisch generierte Gewebe zu entwickeln, um Gewebefunktionen wieder herzustellen, zu erhalten oder zu verbessern (SKALAK, 1988; LANGER & VACANTI, 1993). Durch die Zusammenarbeit von Biologen, Physikern, Ingenieuren, Materialwissenschaftlern und Medizinern wird das Fachwissen der unterschiedlichen Sparten mit fundamentalem Wissen der Embryologie, Gewebebildung und -regeneration vereint (KNESER et al., 2006b).

TE basiert auf drei Grundelementen: ein strukturelles Grundgerüst, auch Matrix genannt, Zellisolate und gewebeinduzierende Substanzen. Diese werden zeitlich und räumlich optimal aufeinander abgestimmt kombiniert. Die Matrix wird zusammen mit Zellisolaten und gewebeinduzierenden Substanzen wie Signalmolekülen, z.B. Wachstumsfaktoren entweder zunächst in eine Kultur oder direkt in einen Organismus

ingebracht. Die Gerüste aus natürlichen oder synthetischen Materialien werden entweder mit isolierten, innerhalb mehrerer Monaten *in vitro* expandierten Zellen besiedelt oder die gewonnenen Zellen werden direkt autotransplantiert. Nach Zugabe von Wachstumsfaktoren kann die Biomatrix alleine oder mit speziellen Fixationstechniken in das Empfängerbett eingebracht werden. Durch TE werden neben der künstlichen Knochengenerierung auch die Möglichkeiten zur Züchtung von Knorpel-, Leber-, Muskel- und Hautgewebe erforscht (BOOS et al., 2010).

Wesentliche Vorteile gegenüber Autografts sind die leichtere Verfügbarkeit auch größerer Implantate, die geringe Hebemorbidität und die bessere Formbarkeit der Transplantate.

## 2.1 Prinzipien des Tissue Engineering von Knochen

Der klinische Einsatz von gezüchtetem Knochen stellt hohe Anforderungen an die verwendeten Materialien. Neben der anfänglichen Aufgabe, Stabilität zu verleihen, soll das Implantat dem neu entstehenden Knochen- und Bindegewebe sowie den aussprießenden Gefäßen als Gerüststruktur die Möglichkeit bieten, darin einzuhören, um letztendlich die Knochenenden zu verbinden. Idealerweise sollten die Knochenersatzmaterialien das Knochenwachstum und die Gefäßbildung nicht nur leiten, sondern auch unterstützend darauf einwirken (HING, 2004). Weitere Anforderungen beinhalten die Eigenschaft *de novo* Knochengewebe zu bilden und die biologische Abbaubarkeit wie Degradation bzw. Resorption.

Die Grundvoraussetzung für die Integration eines Implantates in das umliegende Gewebe ist eine gute Biokompatibilität, welche durch absolute Gewebeverträglichkeit und das Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen gekennzeichnet ist (SCHNURER et al., 2003). Es kann zwischen biotoleranten, bionierten und bioaktiven Materialien unterschieden werden.

Zu den biotoleranten Materialien gehören Knochenzemente, rostfreie Stähle oder Chrom-Kobalt-Legierungen. Sie sind durch eine dünne Bindegewebsschicht vom umliegenden Knochengewebe vollständig getrennt und bilden somit eine Distanzosteogenese.

Als bioniert werden Implantatmaterialien bezeichnet, die mit dem Knochen in einer Kontaktosteogenese in direkten Kontakt gehen. Unter diese Materialien fallen Implantate aus Aluminiumoxid, Zirkonoxid, Kohlenstoffwerkstoffe, Titan sowie

Titanlegierungen. Auf Grund der chemischen Stabilität von Titan, die sich durch eine sehr geringe Löslichkeit bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten auszeichnet, ist es hervorragend für die Herstellung von porösen Keramiken geeignet (WINTERMANTEL et al., 1999).

Materialien mit der Fähigkeit eine Verbundosteogenese einzugehen, also positiv mit dem umliegenden Gewebe zu interagieren und die Adhäsion von Knochen zu ermöglichen, werden allgemein als bioaktiv bezeichnet. Zu den Materialien mit Bioaktivität gehören die Tricalciumphosphat-, Hydroxylapatit- und Glaskeramiken (WINTERMANTEL et al., 1999).

Die Qualität eines bioaktiven Knochentransplantates oder Knochenersatzmaterials kann durch seine osteogenen, osteokonduktiven oder osteoinduktiven Eigenschaften bestimmt werden. Dabei beschreiben osteogene Eigenschaften die Fähigkeit eines Implantats aus eigener Kraft Knochensubstanz zu produzieren (HARRIS & COOPER, 2004). Als osteokonduktiv werden Stoffe bezeichnet, die als Leitschiene für von außen einwachsendes Neoknochengewebe mit beteiligten Zellen dienen und dadurch die Überbrückung bzw. knöcherne Durchwachsung von Knochendefekten ermöglichen (ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001). Die Osteoinduktion bezeichnet die Knochenbildung durch Anlockung von undifferenzierten Stammzellen und die Stimulation dieser, sich in knochenbildende Zelllinien umzuwandeln. Osteoinduktive Eigenschaften werden vor allem Wachstumsfaktoren wie BMPs zugesagt, während osteokonduktive Funktionen eher unter porösen Gerüststoffen wie Hydroxylapatitkeramiken zu finden sind (HING, 2004).

## 2.2 Knochenersatzmaterialien

Jedes Gewebe besteht aus einem dreidimensionalen Gerüst, der Matrix, die Zellen und Gefäße in sich aufnimmt, ihnen eine gewebespezifische Umgebung bietet und als Reservoir für Wasser, Nährstoffe, Zytokine und Wachstumsfaktoren dient (HUANG & INGBER, 1999). Als dreidimensionale Leitstruktur zur Züchtung von Knochengewebe wurden unterschiedliche Knochenersatzstoffe aus organischen und anorganischen Materialien erprobt, welche im Zuge des TE das biologische Gerüst mit all seinen Funktionen ersetzen sollen.

Grundsätzliche Anforderungen an das Gerüst schließen Biokompatibilität, mechanische Stabilität sowie Anwesenheit von osteokonduktiven, osteoinduktiven und idealerweise

auch osteogenen Eigenschaften ein. Des Weiteren soll es einfach in der Anwendbarkeit und Handhabung und kostengünstig sein. Das künstliche Gerüst sollte hinsichtlich der mechanischen und morphologischen Eigenschaften der ursprünglichen Knochenmatrix ähneln (GREEN, 2008) und mit einer Geschwindigkeit abgebaut werden, in der die Ersatzmatrix durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden kann. Die Oberflächenbeschaffenheit, Porosität, und Topographie der Matrix beeinflussen dabei entscheidend die Knochenbildung im Implantat (WINTERMANTEL et al., 1999).

### 2.2.1 Biologische Knochenersatzmaterialien

Autologer, allogener und xenogener Knochen kann wie in Abschnitt 1.3.4.1 beschrieben nicht nur als Knochentransplantat, sondern auch als Knochenersatzmaterial dienen. Um die Gefahr von immunologischen Reaktionen und das Risiko einer Übertragung von Infektionen durch das Spendermaterial zu verhindern, wurden Methoden wie z.B. chemische Verfahren, Bestrahlung und thermische Behandlungen entwickelt, um das gewonnene Spendermaterial aufzubereiten (ZIMMERMANN & MOGHADDAM, 2011). Durch die zum Teil radikalen und langwierigen Vorbehandlungen gehen osteoinduktive und osteogene Faktoren des Knochentransplantats dabei weitgehend verloren, während die osteokonduktiven Faktoren, also die Gerüstfunktion, immer erhalten bleiben.

Demineralisierte Knochenmatrix (DKM) wird durch Dekalzifizierung und Sterilisierung von allogen oder xenogen gewonnenem spongiösen Knochen hergestellt. Durch diesen Auslösungsprozess wird das Risiko einer Infektion durch das Transplantat gesenkt und es bleibt eine trabekuläre Struktur des originalen Gewebes zu erkennen, die mit seiner osteokonduktiven Eigenschaft als biologisches Gerüst dienen kann. Außerdem werden nicht alle Zytokine und Wachstumsfaktoren aus dem Gewebe eliminiert, sodass diese der DKM ein osteoinduktives Potential verleihen und durch die Entfernung der Knochenminerale sogar besser verfügbar sind (ZIMMERMANN & MOGHADDAM, 2011).

Zu den hoch biokompatiblen und degradierbaren natürlichen Biopolymeren zählen z.B. Kollagen, Fibrin, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Alginat, Gelatine und Seide. Sie sind oft tierischer Herkunft, wodurch es zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Immunantwort des Empfängers kommen kann und die Gefahr einer Erregerübertragung besteht. Gelähnliche Matrices wie Fibrin besitzen die Fähigkeit, mit Zellen und löslichen Molekülen zu interagieren, und werden deshalb zur Immobilisierung von

Zellen und Wachstumsfaktoren in Kombination mit anderen Matrices verwendet (WINTERMANTEL et al., 1999; JADLOWIEC et al., 2003; HORCH et al., 2005; ARKUDAS et al., 2009b; SABIR et al., 2009).

## 2.2.2 **Synthetische Knochenersatzmaterialien**

Die synthetischen Knochenersatzmaterialien können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen gibt es organische Materialien, die wiederum synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein können. Denen gegenüber stehen die anorganischen Ersatzmaterialien, welche auch aus biologischen oder synthetischen Ausgangsmaterialien hergestellt werden können.

### 2.2.2.1 **Organische Knochenersatzmaterialien**

Zu den synthetischen, organischen Ersatzmaterialien zählen resorbierbare Polymere wie Poly-L-Laktatsäure (PLLA), Poly-L-Glykolsäure (PLGA), Polycaprolacton (PCL) und deren Copolymere. Sie können in kompakter Form als Nägel, Schrauben oder Platten zur Fixierung verwendet oder als poröse Körper mit osteokonduktiven und zelladhäsiven Eigenschaften eingesetzt werden. Durch Unterschiede in ihrer Herstellung, Porosität, Kristallinität, Molekulargewicht, sowie in Geschwindigkeit und Art der Degradation (hydrolytisch oder enzymatisch) können ihre Gerüsteigenschaft und damit ihre Stabilität den jeweiligen Anwendungsansprüchen angepasst werden.

Im Gegensatz zu den natürlichen Polymeren besteht beim Einsatz synthetischer Polymere keine Gefahr der Infektion (SABIR et al., 2009). Saure Abbauprodukte der hydrolytischen Spaltung senken allerdings den pH-Wert und können zu Immun- und Fremdkörperreaktionen führen (SANTAVIRTA et al., 1990). Zusätzlich wirken die bei der Degradation von PLLA gebildeten Mikrokristallite im Organismus als Entzündungsherde und schränken den Einsatz der synthetischen Polymere somit ein (ROZEMA et al., 1994; SCHNURER et al., 2003).

Nichtresorbierbare Polymere wie Polymethylmethacrylat-Knochenzement (PMMA) und verschiedene Formen von Polyethylen weisen nach ihrer Hydrolyse eine hohe Stabilität auf. Sie können mit Antibiotika beladen werden, jedoch besitzen sie weder osteogene noch osteokonduktive Eigenschaften. Da sie vom Organismus nicht abgebaut werden können und das Implantat somit nicht durch Knochen ersetzt werden kann, finden sie eher in der Endoprothetik als beim regenerativen Knochenersatz Anwendung (KNESER et al., 2006b; WEBB & SPENCER, 2007).

### 2.2.2.2 Anorganische Knochenersatzstoffe

Keramiken aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) und Hydroxylapatit (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) stellen die am häufigsten verwendeten synthetischen Knochentransplantate unter den keramischen Transplantatmaterialien dar (ZIMMERMANN & MOGHADDAM, 2011). Sie können einzeln oder, wie auch in dieser Studie, kombiniert als biphasisches Calciumphosphat (BCP) eingesetzt werden. Die glasartig-amorphen oder kristallinen Verbindungen sind in ihrer elementaren Zusammensetzung dem im menschlichen Knochen zu 60 - 70 % vorkommenden biologischen Apatit sehr ähnlich (SCHNURER et al., 2003).

HA-Keramiken können aus biologischen Materialien, z.B. boviner Spongiosa oder dem Exoskelett von Korallen, oder aus synthetischen Ausgangsmaterialien gewonnen werden, wohingegen TCP-Keramiken immer synthetisch hergestellt werden. Im Gegensatz zu den durch chemische Lösungsprozesse abbaubaren TCP-Keramiken sind HA-Keramiken, wenn überhaupt, nur sehr langsam abbaubar. Dies ermöglicht in der kombinierten Anwendung die Einstellung der Degradationsgeschwindigkeit (SCHNURER et al., 2003). Die Herstellung der Keramiken erfolgt durch Hochtemperatursinterung aus den zuvor von organischen Substanzen befreiten biologischen oder synthetischen pulverförmigen Ausgangsstoffen kristalliner Struktur, wodurch kein Risiko einer Infektion oder Virusübertragung gegeben ist.

Das entstehende poröse Gerüst ist hart und spröde, besitzt osteokonduktive Eigenschaften und ermöglicht somit die Anheftung, Proliferation, Migration und phänotypische Expression der Knochenzellen. Der neu gebildete Knochen liegt dem Biomaterial direkt auf und kann durch die poröse dreidimensionale Struktur darin einwachsen (ZIMMERMANN & MOGHADDAM, 2011). Ansteigende Porosität im Bereich von 75 - 80 % und Porengrößen zwischen 400  $\mu\text{m}$  und 600  $\mu\text{m}$  verbessern das Einwachsen von Knochen und die Osseointegration des Implantates (CORNELL & LANE, 1998), reduzieren jedoch die mechanische Stabilität und schränken somit die Verwendung als lasttragendes Implantat stark ein (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005). Die Porosität sowie die Größe der mikroskopischen ( $<10 \mu\text{m}$ ) und makroskopischen ( $>50 \mu\text{m}$ ) Poren sind somit ein wichtiger Designfaktor, der unter anderem die Nährstoffversorgung von innen liegenden Zellen sichert, sowie Strukturkompatibilität und Angiopolarität induzieren kann (WINTERMANTEL et al., 1999). Die Keramiken besitzen selber keine osteogenen oder osteoinduktiven Eigenschaften. Sie können aber als hervorragende Gerüstsubstanz mit Zellen und

Wachstumsfaktoren beladen werden und somit diese ursprünglich fehlenden Funktionen erlangen.

Weitere anorganische Knochenersatzstoffe sind Calciumphosphatzemente, Calciumsulfate, Biogläser und Metalle. Letztere können zum Beispiel als Titanpulver zur Herstellung von stützenden Cages dienen (ARKUDAS et al., 2012), die nach Vorbild eines Defektes oder Organes geformt werden um dieses später zu imitieren (CASSELL et al., 2002). Cages werden leer als Platzhalter eingesetzt oder dienen mit porösen Biomaterialien beladen initial der Stabilisierung des Defektes und ermöglichen so den Einsatz von porösen Materialien in lasttragenden Knochendefekten.

### 2.2.3 Komposite

Unter Kompositen versteht man Materialien, die aus einer Kombination von zwei oder mehr Einzelkomponenten aufgebaut sind. Häufig werden Keramiken mit natürlichen oder synthetischen Polymeren kombiniert, um die Eigenschaften des natürlichen Knochens besser zu imitieren (DAMIEN & PARSONS, 1991; SABIR et al., 2009). Idealerweise besitzt ein Komposit zugleich osteokonduktive, osteoinduktive und osteogene Aktivität. Dabei stellt beispielsweise ein BCP als Trägermaterial das osteokonduktive Gerüst dar. Durch die Fähigkeit der Polymere, z.B. Fibrin oder Kollagen, eine Carrier-Funktion zu übernehmen, können ihnen Zellen und Wachstumsfaktoren zugesetzt werden, welche dem Komposit seine osteoinduktive und osteogene Eigenschaft verleiht.

## 2.3 Osteogene Zellen

Osteogene Zellen stellen eine wichtige Komponente in der Strategie des TE dar. Ihre Anwendung findet sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin immer mehr Anklang (RICHARDSON et al., 2007). Sie können entweder in Kombination mit den Trägermaterialien direkt in den Defekt implantiert oder indirekt durch osteoinduktive Signale vom Wirtsorganismus selber angelockt werden.

Die Population der osteogenen Zellen weist unterschiedliche Zelltypen wie Mesenchymale Stammzellen (MSC), periostale Zellen, embryonale Stammzellen und Osteoblasten auf. Im adulten Organismus wird die Knochenremodellierung, Knochenregeneration und Frakturheilung durch die zelluläre Knochenkomponente bestritten.

Für eine erfolgreiche Anwendung in der Klinik müssen die eingesetzten osteogenen

Zellen viele Anforderungen erfüllen. Sie sollten sich einfach und kostengünstig isolieren und vermehren lassen, ein stabiles Erscheinungsbild der gebildeten Osteoblasten gewähren, Knochenbildungskapazität aufweisen und auf langer Hinsicht sicher im Einsatz sein (KNESER et al., 2006b).

### Toti- und pluripotente Zellen

Totipotente Zellen („embryonic stem cells“ = ESCs) und pluripotente Zellen wie Nabelschnurblutzellen („unrestricted somatic stem cells“ = USSCs) besitzen die Fähigkeit, sich in alle drei Keimbahnlinien differenzieren zu können. ESCs können zusätzlich einen komplexen Organismus generieren (CZYZ et al., 2003), sind jedoch aufgrund immunogener und tumorinduzierender Eigenschaften sehr umstritten. Zudem sind sie wegen ethischer Bedenken für den klinischen Einsatz undenkbar. USSCs dagegen zeigten in einer Xenotransplantation nur eine geringe Immunogenität und eine lokale osteoblastäre Differenzierung am Transplantationsort. Sie besitzen eine mesenchymale Pluripotenz und scheinen vielversprechend für die Anwendung im TE (JÄGER et al., 2004).

### Unipotente Zellen

Unipotente Zellen sind bereits endgültig determiniert, d. h. sie besitzen nicht die Fähigkeit, sich weiter zu differenzieren. Ein Beispiel sind die von der osteogenen Linie der mesenchymalen Stammzellen abstammenden Osteoblasten. Durch die Ausdifferenzierung zu knochenbildenden Zellen kann einerseits die *de novo* Knochenbildung schnell induziert werden, andererseits weisen sie nur noch eine geringe Teilungsfähigkeit auf (JAYAKUMAR & DI SILVIO, 2010). Der Einsatz von Osteoblasten im TE nach Isolation und in vitro-Differenzierung wurde bereits in vielen Versuchen beschrieben (ARKUDAS et al., 2007a). Jedoch dient als Ausgangsmaterial oft eine Population von mesenchymalen Stammzellen.

### Multipotente Zellen

Bei multipotenten Zellen hat bereits die Differenzierung in eines der drei Keimblätter stattgefunden und so besitzen sie nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotential. Im Rahmen des osteogenen TE finden mesenchymale Progenitorzellen („multipotent mesenchymal stromal cells“ = MSCs) Anwendung, welche dem mittleren Keimblatt, auch Mesoderm genannt, entstammen (CAPLAN, 1991) und unter anderem aus Periost, Knochenmark, Knochen, Fettgewebe oder

synovialen Membranen gewonnen werden können (BRUDER et al., 1997; JANICKI & SCHMIDMAIER, 2011). Sie sind zur asymmetrischen Zellteilung fähig, d.h. sie können beispielsweise innerhalb des für die Knochenbildung zuständigen Mesoderms in die verschiedenen Zelllinien zu Knorpel-, Knochen-, Muskel-, oder Endothelgewebe ausdifferenzieren. Ebenso können sie identische Tochterzellen generieren, welche selbst wiederum Stammzelleigenschaften besitzen (PITTENGER et al., 1999). Im Gegensatz zu den pluripotenten Stammzellen weisen MSCs jedoch ein begrenztes Selbsterneuerungspotential auf, da ihre Zellteilungskapazität limitiert ist (MCCULLOCH et al., 1991).

Am häufigsten werden MSCs zur Expansion aus dem Knochenmark gewonnen, da die Knochenmarkpunktion für den Patienten nur eine geringe Belastung ohne erhebliche Risiken und Folgen darstellt und relativ einfach und günstig durchgeführt werden kann. Als großer Vorteil in der Anwendung der Zellen stellt sich ihre Fähigkeit heraus, selbst nach Expansion und Kryokonservierung das osteogenetische Potenzial weitgehend beizubehalten und so in großen Mengen auch für einen späteren Einsatz zur Verfügung zu stehen (BRUDER et al., 1997; PITTENGER et al., 1999).

Die wichtigste Eigenschaft der MSCs für die Anwendung im TE stellt jedoch die direkte Generierung von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten dar (JONES & YANG, 2011). Diese Differenzierung kann bereits während der *in vitro*-Expansion bei adhärenten MSCs durch Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat zum normalen Medium ausgelöst werden (PITTENGER et al., 1999; KHALED et al., 2011). Neben der Fähigkeit, osteogene Zellen zu bilden, können MSCs auch als Signalzentren fungieren. Diese noch weitgehend unerforschten, als parakrin bezeichneten Effekte schließen die antiapoptotische Wirkung, die immunregulatorische Funktion und die Stimulation der Wirtszellen zur Migration und damit die Anlockung von für die Knochenbildung wichtigen Wirtsgefäßen ein (SCOTTI et al., 2010; TORTELLI et al., 2010; JONES & YANG, 2011).

Da MSCs nicht über eindeutige oder spezifische Oberflächenmoleküle verfügen, müssen sie über minimale Kriterien charakterisiert werden. Neben der Plastikadhärenz und der Fähigkeit, *in vitro* zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zu differenzieren, spricht die Expression und gleichzeitige Abwesenheit einer Vielzahl von Markern (positiv für: CD105, CD73, CD90; negativ für: CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19, HLA-DR) für das Vorhandensein von MSCs (DOMINICI et al., 2006).

Ein potentielles klinisches Anwendungsgebiet von MSCs ist die Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe, sowie die Therapie von Erkrankungen, welche mit einer verminderten osteoblastären Regenerationsfähigkeit einhergehen (JÄGER et al., 2004). Durch die Kombination der MSCs mit BMP2 oder anderen osteoinduktiven Wachstumsfaktoren kann ihre osteogene Wirkung noch verbessert werden (TAO et al., 2010).

## 2.4 Osteoinduktive Faktoren

Die natürliche Knochenbildung, -remodellierung und -heilung wird durch koordinierte Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und durch Freisetzung von Hormonen reguliert (ALLORI et al., 2008). Um die Osteoinduktivität von Gerüstsubstanzen im TE von Knochen zu verbessern, werden biologisch aktive Moleküle wie Wachstumsfaktoren eingesetzt. Die physiologisch in gesunder Knochenmatrix liegenden oder während der Frakturheilung exprimierten Wachstumsfaktoren beeinflussen die Produktion der extrazellulären Matrix, die Angiogenese, sowie Proliferation und Differenzierung von Knochenzellen. Zu diesen Knochen induzierenden und Wachstum beschleunigenden Faktoren zählen TGF- $\beta$ , „fibroblast growth factor“ (FGF), „insulin-like growth factor I/II“ (IGF I/II), „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und die BMPs (LIEBERMAN et al., 2002).

Urist entdeckte im Jahr 1965 die osteoinduktive Wirkung von demineralisiertem Knochen, nachdem er diesen an heterotopische Lokalisationen von Nagetieren implantierte und dort *de novo* Knochenbildung beobachten konnte (URIST, 1965). Dieser Effekt wurde später dem Protein BMP zugeschrieben, das die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten und Chondrozyten hervorruft und der TGF- $\beta$ -Superfamilie angehört. In der Literatur wurden über 20 verschiedene BMPs beschrieben, die über intrazelluläre Signalweiterleitung Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung von implantierten Zellen induzieren und der Anlockung von wirtseigenen Vorläuferzellen zur Konstruktbesiedelung dienen.

Die am häufigsten im TE eingesetzten Faktoren sind BMP2 und 7, die neben einer Steigerung der orthotopen Knochenbildung auch eine heterotope Knochenbildung durch ihr osteoinduktives Potential hervorrufen können. Sie finden klinischen Einsatz in der Behandlung von Knochendefekten und Pseudarthrosen und werden meist mit unterschiedlichen Biomaterialien kombiniert (FRIEDLAENDER et al., 2001). Dabei versuchte Urist erstmals, an Hunden mit einem Schädeldefekt kritischer Größe, durch

den Einsatz von TCP-Keramiken mit BMPs eine Knochenheilung zu erzielen (URIST et al., 1987). Um die Aktivität der Wachstumsfaktoren im zu behandelnden Bereich über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten, müssen die BMPs an ein adäquates Trägersystem gebunden werden. Der Einsatz eines gelartigen Polymers wie Fibrin kann dabei als Drug-Delivery-System dienen und zugleich das Implantat stabilisieren (HONG et al., 2006; JANICKI & SCHMIDMAIER, 2011). Tests einer Dosis-Wirkungsbeziehung zeigten, dass eine effektive Knocheninduktion nur bei einer bestimmten Mindestdosis an applizierten BMPs erreicht werden kann und dass die Menge und Geschwindigkeit der Knochenbildung mit Erhöhung der BMP-Dosis zunimmt (VALENTIN-OPRAN et al., 2002). Valentin-Opran et al. sagten der in ihrer Studie höchsten BMP2-Konzentration von 1,5 mg/ml die effektivste Knochenbildung im Menschen nach. Für Nagetiere wurde die Konzentration von BMPs zur optimalen Knochenbildung im Bereich von 25 – 50 µg/ml definiert, wobei Konzentrationen von 100µg/ml und mehr zu einer unerwünschten exzessiven Knochenbildung führten (VALENTIN-OPRAN et al., 2002).

Kritisch zu sehen ist die initial verstärkte und schnell abnehmende Freisetzung der BMPs, welche einen BMP Einsatz in hohen Dosen erfordert und zu erheblichen Kosten führen kann (HING, 2004). Ansätze zur Lösung dieses Problems präsentieren unter andern Yang et al. in ihrer Untersuchung zur nachhaltigen Bereitstellung von BMPs. Die Studien zeigten, dass der Einsatz von heparinkonjugiertem Fibrin im Gegensatz zu normalem Fibrin eine langsamere, kontinuierliche Freisetzung von BMPs ermöglicht, den osteogenen Effekt von BMPs noch potenziert und eine Verringerung der Dosis ermöglicht (YANG et al., 2010; BRAMONO et al., 2011).

Neben dem direkten Einsatz von rekombinanten Wachstumsfaktoren aus kommerziellen Kits ins Konstrukt besteht die Möglichkeit, durch BMP-überexprimierende Zellen oder BMP-tragende adenovirale Vektoren die Zahl der BMPs im Defektgebiet zu erhöhen.

### **3. Angiogenese im Tissue Engineering**

Trotz enormer Fortschritte des TE in der Züchtung personalisierter, zellbesiedelter Ersatzstoffe mit guter Knochenbildungskapazität *in vitro* ist die Anwendung *in vivo* auf Grund der initial fehlenden Gefäßanbindung nur eingeschränkt möglich. Die dreidimensionale Struktur der konstruierten Implantate erfordert von Anfang an ein mikrovaskuläres Netzwerk, um das Überleben auch zentral liegender Zellen durch die

Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie durch Abtransport von Stoffwechselmetaboliten zu gewährleisten (KNESER et al., 1999). Normalerweise werden die Zellen durch Diffusion versorgt, was aber nur für eine Distanz von 150 - 200  $\mu\text{m}$  zum nächsten Blutgefäß möglich ist und somit vor allem bei großen Konstrukten die zentralen Strukturen nicht erreicht (FOLKMAN & HOCHBERG, 1973).

Bei der Vaskularisierung künstlich generierter Konstrukte können *in vitro* Strategien wie der Einsatz von Endothelzellen oder angiogenen Wachstumsfaktoren zu einer *de novo* Angiogenese führen. Ebenso kann eine Gefäßeinsprössung über extrinsische oder intrinsische Wege stattfinden. Vielversprechende Ergebnisse zur *in vitro* Herstellung von Kapillaren zeigte der Einsatz von osteogenen und endothelialen Progenitorzellen als Kokultur. Die bereits bei Implantation vorhandenen Kapillaren hatten einen positiven Einfluss auf die Angiogenese nach Implantation ins Empfängerbett (WENGER et al., 2004).

Auch angiogenetische Wachstumsfaktoren wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und PDGF wurden in Bezug auf ihr angiogenetisches Potential, auf deren Kombination miteinander, Dosierung, Einbindung in und Freisetzung aus Polymermatrices untersucht (PERETS et al., 2003; ARKUDAS et al., 2007b; ARKUDAS et al., 2009b). Um funktionsfähige Gefäße zu erhalten, müssen diese untersuchten Faktoren auf das zu vaskularisierende Gewebe abgestimmt und perfekt kombiniert werden. Zu hohe Konzentrationen an VEGF führten beispielsweise zu unausgereiften, undichten Gefäßen oder induzierten gar eine Tumorbildung (YANCOPOULOS et al., 2000).

### 3.1 Extrinsische Vaskularisation

Die als extrinsisch bezeichnete Gefäßeinsprössung aus dem umliegenden Gewebe in ein Konstrukt stellt den im TE am häufigsten verwendeten Prozess der Vaskularisierung dar (CASSELL et al., 2002). Diese Vaskularisationsform ist in *Abbildung 2A* schematisch dargestellt und geht mit fibrovaskulärem Gewebeeinwuchs und Narbenbildung einher (POLYKANDRIOTIS et al., 2006a). Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist verantwortlich für das langfristige Überleben von transplantierten Zellen.

Wie auch das Zellüberleben und die Knochenbildung im Allgemeinen ist die extrinsische Neovaskularisierung des Ersatzgerüsts in enormem Ausmaß von endogenen Signalfaktoren und der Qualität des Empfängergewebes abhängig und wird

durch die Entzündungsreaktion und Hypoxie nach Implantation ausgelöst (CASSELL et al., 2002). Deshalb sollte für die Prävaskularisation ein gesundes Gewebe mit hohem Vaskularisierungspotential gewählt werden. In diesem Zusammenhang wurden vor allem von Implantationen unter die Haut, in die Muskulatur oder in die Bauchhöhle berichtet (POLYKANDRIOTIS et al., 2006a).

Bei kleinen Konstrukten mit großer Oberfläche reicht die extrinsische Anschließung aus, um Gewebe in kurzer Zeit vollständig zu vaskularisieren. Soll ein prävaskularisiertes Konstrukt jedoch an eine andere Stelle transplantiert werden, entsteht durch die Hebung eine Abtrennung der eingesprossenen Gefäße und das innenliegende Gefäßnetz ist initial nicht mehr an die Blutversorgung angeschlossen. Doch gerade in Fällen großer Knochendefekte nach Trauma, Osteomyelitis, Infektion oder chronischer Vernarbung werden hohe Anforderungen an die Überlebensfähigkeit des Konstrukts gestellt. Die dafür benötigten großen Implantate können allein durch extrinsische Vaskularisation nicht ausreichend durchblutet werden, weswegen andere Verfahren zur Neovaskularisation dringend notwendig werden, um die Zeit bis zum Einsprießen genügend neuer Gefäße zu überbrücken. Methoden aus dem Bereich der rekonstruktiven Chirurgie können dazu beitragen, das Implantat von innen zu vaskularisieren (POLYKANDRIOTIS et al., 2006a).

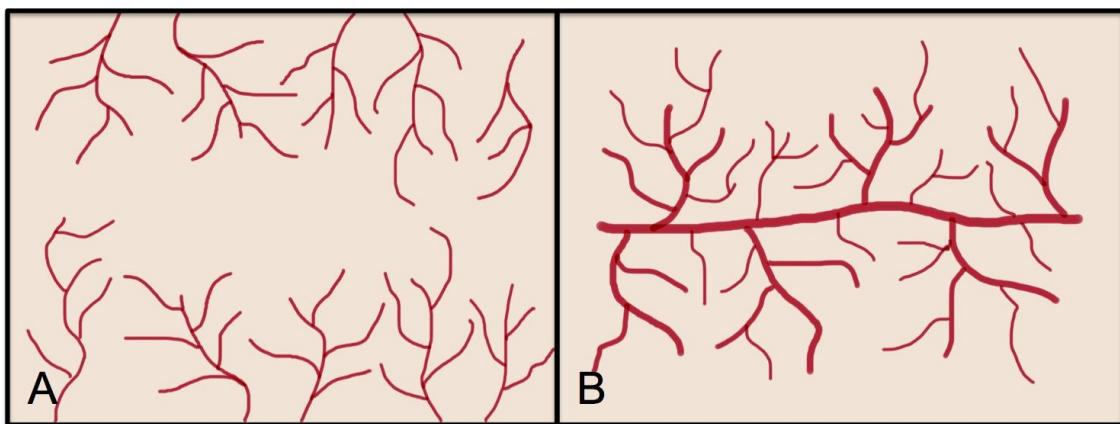
### 3.2 Intrinsische Vaskularisation

Bei der intrinsischen Vaskularisation wird mit Hilfe mikrochirurgischer Techniken eine zentrale Gefäßachse fabriziert, die die Angiogenese induziert und eine Transplantation des gesamten Konstrukts mitsamt des Gefäßnetzwerks anhand des Gefäßstiels ermöglicht (POLYKANDRIOTIS et al., 2006a). Die schematische Darstellung der intrinsischen Vaskularisation ist in *Abbildung 2B* abgebildet. Nach erfolgter Transplantation sowie mikrochirurgischem Anschluss des Gefäßstiels an Blutgefäße im Empfängerbereich sind derartige Konstrukte bereits initial nach Transplantation durchblutet. Es gibt zwei Verfahren zur Generierung der inneren Vaskularisierung.

*In vitro* kann mit Hilfe von Bioreaktoren oder Perfusionskultursystemen die Versorgung von künstlichen Geweben optimal gesteuert oder durch die Einwirkung mechanische Kräfte die Zellen zur Teilung und Ausschüttung von Botenstoffen angeregt werden (VACANTI & LANGER, 1999). In einem gewissen Maß ist es dadurch möglich, *in vitro* ein Mikrogefäßnetz oder einen Gefäßstiel herzustellen. L'Heureux gelang es 1998, unter Verwendung von Methoden aus dem TE aus rein biologischen Materialien *in vitro*

ein Gefäß entstehen zu lassen und dieses in einer Kurzzeitstudie erfolgreich an das Gefäßsystem von Hunden anzuschließen (L'HEUREUX et al., 1998).

Eine zweite Möglichkeit basiert auf einer Gefäßachse, die *in vivo* an das Gefäßsystem oder *in vitro* an eine Bypass-Maschine angeschlossen wird, um um sie herum neues Gewebe zu züchten (CASSELL et al., 2002). Es kann dabei nochmal das Modell einer autolog generierten Gefäßachse von dem der bereits bestehenden Gefäßachse unterschieden werden. Letztere wird standardmäßig in der rekonstruktiven Medizin zur gestielten oder freien Lappenplastik angewandt.



**Abbildung 2:** Vaskularisationsformen im Tissue Engineering (TE): Beim Tissue Engineering kann die Gefäßversorgung eines Konstrukts entweder extrinsisch, von der Peripherie ausgehend (A), oder intrinsisch, von einer definierten Gefäßachse ausgehend (B) erreicht werden. Die Gefäßachse erlaubt dabei eine Transplantation des vaskularisierten Gewebes durch mikrochirurgischen Anschluss des Gefäßstiels an das Blutsystem im Empfängergebiet.

Für die Züchtung von Gewebe aus Biomaterialien wird diese Technik modifiziert. In einem ersten Schritt wird das besiedelte Konstrukt gewünschter Form in ein Gewebe, beispielsweise die Muskulatur, mit bestehender, zur mikrochirurgischer Übertragung geeigneter Gefäßachse implantiert. Nach einer Prävaskularisationszeit ist das Konstrukt an ein vom Körper ausgehendes Gefäßnetzwerk angebunden und kann *en-bloc* mit dem umgebenden Gewebe und dem Gefäßstiel transplantiert werden (KNESER et al., 2006b). An geeigneten Lokalisationen kann die Transplantation gestielt stattfinden (KARCHER & FEICHTINGER, 2011), wobei große Entfernung zwischen Prävaskularisationsort und Defektstelle durch eine freie Lappenplastik mit Anschluss des Gefäßstiels an das Blutgefäßsystem überwunden werden können (ZHOU et al.,

2010).

Ein Nachteil dieser Technik ist der große Hebedefekt mit Verlust des Muskels und die Notwendigkeit von zwei chirurgischen Eingriffen. Dies kann durch die Herstellung einer Gefäßschleife oder eines Gefäßstieles umgangen werden, indem sie direkt in das präfabrizierte Konstrukt implantiert werden und von Anfang an der Blutversorgung dienen.

### 3.2.1 AV-Loop Modell

Erol und Spira schafften es 1979 erstmals, einen vorgefertigten Gewebelappen mit Hilfe solch einer arteriovenösen Gefäßschleife (AV-Loop = AVL) aus einem Arterien- oder Venentransplantat zu fabrizieren, und beobachteten eine reichliche Aussprossung neuer Gefäße aus dem AVL (EROL & SPIRA, 1979). In der Forschung zum TE wird diese Technik am häufigsten bei Experimenten an Ratten angewandt, wobei die rechte Femoralarterie durch Zwischenschaltung eines kontralateralen Venentransplantats mit der Femoralvene verbunden wird und so eine Schleife entsteht.

Dank weiterer, auf den Erkenntnissen von Erol und Spira aufbauenden Versuchen, ist es heute möglich, in einer Isolationskammer platzierte großvolumige Matrizes durch einen AVL vollständig zu vaskularisieren (MIAN et al., 2000; CASSELL et al., 2001; HOFER et al., 2003; KNESER et al., 2006a; ARKUDAS et al., 2007a; BEIER et al., 2010). Bereits acht Wochen nach Generierung konnte beispielsweise eine Vaskularisation des Konstrukts von 90 % verzeichnet werden (KNESER et al., 2006a).

Einen weiteren Fortschritt konnte die Forschungsgruppe um Arkudas et al. durch die Kombination von intrinsischer und extrinsischer Vaskularisierung erzielen, in dem sie das AVL-gestielte Konstrukt anstatt in einer geschlossenen Isolationskammer in einer perforierte Titankammer generierten und so eine deutlich beschleunigte axiale Vaskularisation verzeichneten. Es wurde dabei gezeigt, dass die extrinsisch eingewachsenen Gefäße schnell Anschluss an den AVL und bereits nach zwei Wochen 83 % aller Gefäße sowohl intrinsischen als auch extrinsischen Ursprungs mit dem AVL verbunden waren (ARKUDAS et al., 2012). Dies ermöglicht die in dieser Studie angewandte gestielte Transplantation von vaskularisierten Implantaten, ohne das extrinsisch entstandene Gefäßnetz zu zerstören, was zur Verringerung der Prävaskularisationszeit führt.

Auch eine freie Transplantation an ein entfernt liegendes Empfängergebiet ist durch den

Anschluss über mikrochirurgische Anastomosen möglich und nur mit einer geringen Hebemorbidität verbunden. Beier et al. gelang es, mit dem AVL-Modell im Schaf das erste Mal ein vaskularisiertes Konstrukt in klinisch relevanter Größenordnung zu generieren (BEIER et al., 2009; BEIER et al., 2010).

#### **4. Femurdefektmodell in der Ratte**

Seit Jahrhunderten werden Tierversuche, überwiegend an Nagetieren wie Mäusen und Ratten, für die Aufklärung physiologischer Zusammenhänge und die Entwicklung neuer medizinischer Methoden eingesetzt. Sie tragen somit zur Verbesserung der medizinischen Versorgung, Ernährung und der damit verbundenen gesteigerten Lebenserwartung und verbesserten Lebensqualität bei (EXNER et al., 2004). Auch in der Testung von Biomaterialien für den Knochenersatz hat sich die Ratte als Versuchstier bewährt und es werden unterschiedliche Modelle beschrieben, an denen die Heilung von großsegmentigen Knochendefekten untersucht werden können (JÄGER et al., 2005; VOGELIN et al., 2005; DROSSE et al., 2008; KASPAR et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Im Gegensatz zu Großtieren, bei denen Versuche den menschlichen Dimensionen sehr nahekommen (VIATEAU et al., 2007), bietet die Ratte durch ihre kleinere Körpergröße ergebnisrelevante Vorteile. Durch geringere Kosten und Aufwand in der Anschaffung und Haltung sowie im Einsatz von Medikamenten, Biomaterialien, Implantaten und beim Erwerb von Materialien und Einsatz von Techniken zur Auswertung können dank guter Wirtschaftlichkeit große Versuchsgruppen gebildet werden. Aufgrund der hohen Versuchstierzahlen besitzen Versuche an Nagern eine gute Aussagekraft und Relevanz für den Ersteinsatz neuer Versuchsmodele (HISTING et al., 2011).

Das Femurdefektmodell gehört zu den orthotopen, biomechanisch belasteten Knochenmodellen. Das bedeutet, dass es durch die Defektlokalisation und –größe die Beurteilung der Funktionalität eines Knochenersatzmaterials erlaubt und eine direkte Referenz für die Heilungsprozesse am lasttragenden Röhrenknochen darstellt.

##### **4.1 Critical size defect**

Als critical size defect (CSD) wird in der Forschung der kleinste intraossäre Defekt bezeichnet, der auf Grund seiner kritischen Größe während der Lebenszeit des Versuchstieres nicht spontan heilt, d.h. nicht ohne chirurgische Intervention unter

Verwendung von Implantaten, Ersatzmaterialien oder wachstumsfördernden Zusätzen knöchern durchbaut wird (SCHMITZ & HOLLINGER, 1986). Er dient oft als Negativkontrolle, um das Potential der Knochenregeneration von einem Implantat oder Transplantat zu untersuchen (PERRY, 1999).

Die genaue Größe eines CSD am Rattenfemur (critical size femur defect = CSFD) ist bis heute nicht definiert, denn die Angaben über CSFDs variieren von Studie zu Studie beträchtlich. Jäger et al. bezeichneten bereits einen 4 mm großen Defekt am Femur als CSFD (JÄGER et al., 2005), wobei andere Autoren Größen von 5 mm (KIRKER-HEAD et al., 2007), 6 mm (DROSSE et al., 2008; ZHAO et al., 2009), 7 mm (ZHANG et al., 2010), 8 mm (TOLLI et al., 2011) und schließlich auch 1 cm (VOGELIN et al., 2005) angaben. Dabei sollte aber beachtet werden, dass sich das Regenerationspotential des Femur auch auf Grund des unterschiedlichen Stamms, Alters, Geschlechts und Größe der eingesetzten Ratten unterscheiden kann. Mit zunehmender Größe ist ein CSFD zwar als solcher sicher zu definieren, geht aber meist gleichzeitig mit einem Verlust der Stabilität der Osteosynthese einher.

## 4.2 Fixationssysteme

Abhängig von der Art und Größe eines Defekts können an der Ratte unterschiedliche Fixationssysteme wie Kirschner-Drähte, Verriegelungsnägel, intramedulläre Kompressionsschrauben, Verriegelungsplatten und der Fixateur externe zur Stabilisierung des Knochen angewandt werden (HISTING et al., 2011). Bei Osteotomiedefekten und CSDs, wie sie für die Untersuchung von Biomaterialien verwendet werden, wird auf die vollständige knöcherne Überbrückung des Defekts hingezielt. Deshalb muss auf den Einsatz von Systemen, die im Markraum oder der Defektzone liegen, verzichtet werden. Eine ausreichende Stabilität für solche Defekte bieten Plattensysteme und der Fixateur externe.

### 4.2.1 Fixateur externe

Der Fixateur externe liegt, wie sein Name besagt, zum Teil außerhalb des Gewebes und wurde bereits 1852 das erste Mal von B. von Langenbeck erprobt (BEGER & GANSauge, 2010). Bei dieser Stabilisierungsmethode werden, meist auf einer Achse liegend, sowohl in das proximale wie auch in das distale Knochenfragment mindestens zwei Gewindebohrdrähte (Kirschner-Drähte) eingebracht und bei physiologischer Fragmentausrichtung extrakutan über eine Stahl- oder Kunststoffschiene stabil miteinander verbunden.

Um ein Ausbrechen der defektnah gelegenen Drähte zu verhindern, müssen diese einen ausreichenden, in etwa dem Knochendurchmesser entsprechenden Abstand zu dem Defektbereich aufweisen. Die Steifheit des Fixateurs kann dabei durch Zunahme der Pinstärke, der Schienenlänge oder des Schienenversatzes erhöht werden, um eine durch interfragmentäre Bewegung hervorgerufene übermäßige Kallusbildung zu vermeiden (WILLIE et al., 2009).

Gerade für die Untersuchung von Biomaterialien am Femur der Ratte findet der Fixateur externe häufig Anwendung (MEINEL et al., 2006; KIRKER-HEAD et al., 2007; ZHAO et al., 2009) und weist eine gute biomechanische Eigenschaft auf. Die Anwendung ist jedoch nicht unproblematisch und so kann bereits durch das schiefe Einbringen eines Pins die Ebene verschoben werden, was eine Spannung zwischen den Knochenenden aufkommen lässt und die korrekte Reposition verhindert (DROSSE et al., 2008). Einen großen Nachteil stellen zudem die hohe postoperativ notwendige Pflegebedürftigkeit und die Gefahr der absteigenden Infektion an den Eintrittsstellen der Drähte dar (DROSSE et al., 2008).

#### 4.2.2 Plattenosteosynthese

Die Plattenosteosynthese stellt die Versorgung eines Knochendefekts durch eine innenliegende Platte, die mit Schrauben am Knochen fixiert wird, dar. Genau wie bei dem Fixateur externe sind auch hier mindestens zwei Schrauben auf jeder Fragmentseite nötig, um eine ausreichende Stabilität zu erlangen. Da die Platte für unterschiedlich große Defekte gute Stabilität bieten kann, ist ihr Einsatz an der Ratte zur Knochendefektheilung und Evaluierung von Biomaterialien oft notwendig (VOGELIN et al., 2005; ATESOK et al., 2010; ZHANG et al., 2010). Sie stellt neben dem intramedullären Pin, dessen Verwendung wegen Verlegung des Markraums ausgeschlossen wurde, die meist genutzte Osteosynthesetechnik in Defektmodellen der langen Knochen dar (HORNER et al., 2010).

Vorteile dieser Technik sind der hohe Tragekomfort für die Ratte, die schnellere Wundheilung, sowie das einfachere postoperative Handling. Die meisten Plattenimplantate und Schrauben sind jedoch sehr teuer. Außerdem können bei zu hohen Belastungen die Platten verbiegen oder gar brechen bzw. Schrauben ausreißen (DROSSE et al., 2008).

#### 4.2.3 Vergleich der Fixationssysteme

Trotz häufiger Anwendung und vergleichender Untersuchungen beider Modelle gibt es bis heute kein Standardfixationssystem zur Versorgung segmentaler Defekte des Rattenfemurs. Drosse et al. testeten vergleichend eine Titanplatte und zwei Modelle des Fixateur externe hinsichtlich ihrer Anwendungsfreundlichkeit und biomechanischen Belastbarkeit und beurteilten alle drei Fixierungsvorrichtungen als geeignet, um standardisierte Studien zur Knochenregeneration an CSFDs durchzuführen (DROSSE et al., 2008).

Rein subjektiv erwies sich die Osteosynthese durch eine Platte als einfacher in der chirurgischen Umsetzung, Anwendung und Anpassung sowie der postoperativen Nachsorge und liefert außerdem eine bessere Reproduzierbarkeit (DROSSE et al., 2008).

### 5. *Eigene Vorstudien*

Der Wahl der in dieser Studie verwendeten Matrixzusammensetzung, des CSFDs und des Fixationssystems zur Untersuchung des Knochenheilungspotentials von Biomaterialien gingen mehrere Vorstudien voraus.

In einem Subkutan Modell wurden über zwölf Wochen verschiedene Knochenersatzmaterialien, unterschiedliche Freisetzungssysteme für BMP-2, und verschiedene Konzentrationen von BMP-2 im Hinblick auf die optimale Knochenbildung evaluiert. Die besten Ergebnisse konnten mit der in dieser Studie verwendeten HA/β-TCP-Keramik, einer BMP-2-Konzentration von 60 µg/ml und verdünntem Fibrin als Freisetzungssystem erzielt werden.

Diese Biomaterialzusammensetzung wurde in einer AVL-Studie unter Zugabe von MSCs und/oder BMP-2 auf ihr Knochenbildungspotential geprüft. Nach sechswöchiger Implantationszeit hatte sich bei Kombination aus MSCs und BMP-2 signifikant am meisten Knochen gebildet, weshalb diese Zusammensetzung in dieser Studie verwendet wurde.

In einer weiteren Studie wurde der Einsatz einer Plattenosteosynthese und eines Fixateur externe im CSFD der Ratte evaluiert. Zwischen den beiden Systemen konnten keine signifikanten oder ergebnisrelevanten Unterschiede ermittelt werden. Die Osteosynthese durch eine Platte wurde als einfacher in der chirurgischen Umsetzung,

Anwendung und Anpassung sowie in der postoperativen Nachsorge und Reproduzierbarkeit empfunden. Ohne sichtliche Unterschiede im Verhalten der Ratte unter beiden Versuchsbedingungen ist dennoch anzunehmen, dass die Platte gegenüber dem Fixateur externe auch für das Tier auf Grund ihres geringeren Implantatgewichts und innenliegender Lokalisation vorteilhaft ist. Deshalb fiel in dieser Studie die Wahl auf eine Plattenosteosynthese.

## ***6. Ziel der Studie***

Auf der Suche nach der idealen Zusammensetzung von Biomaterialien, Zellen und Wachstumsfaktoren zur Herstellung von künstlich generiertem Knochen im Tissue Engineering zeigten MSC-besiedelte Kompositmaterialien in Kombination mit BMPs ein großes Potential. Ein entscheidender Faktor für das Einwachsen des Konstrukts in einen Defekt und das Überleben der Zellen ist jedoch die initiale Vaskularisation des Ersatzgewebes, die durch oben genannte Bestandteile alleine nicht gewährleistet werden kann.

Ein Bestandteil der Studie war es deshalb, durch eine arteriovenöse Gefäßschleife zuerst heterotop Knochenersatzmaterial in einer Kammer zu vaskularisieren und diese in einer zweiten Operation gestielt in einen Femurdefekt kritischer Größe der Ratte zu schwenken, um dort eine knöcherne Überbrückung des Defekts zu erlangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Überleben der Zellen zu verschiedenen Explantationszeitpunkten mit und ohne Einsatz des AVL evaluiert. Des Weiteren wurde die Knochenbildung und die Vaskularisation in Konstrukten mit reiner HA/β-TCP-Matrix, HA/β-TCP-Keramik kombiniert mit MSCs und BMP<sub>2</sub> sowie TCP/HP-Keramik kombiniert mit MSCs, BMP<sub>2</sub> und AVL zehn Tage sowie zwölf Wochen nach Einsetzen in den Defekt untersucht. Dabei wurde gesondert auf das Zusammenwachsen des neugebildeten Knochens mit den Femurfragmenten geachtet. Ein Leerdefekt, bei dem nur die Operation der Defektgenerierung erfolgte und eine leere Kammer eingesetzt wurde, diente als Negativkontrolle.

Anhand der Ergebnisse und des Versuchsablaufs wurden Aussagen über die potentielle Eignung der Kombination von AVL und getesteten Materialien im CSFD der Ratte sowie über das eingesetzte Tiermodell getroffen.

## 7. *Relevanz für die Tiermedizin*

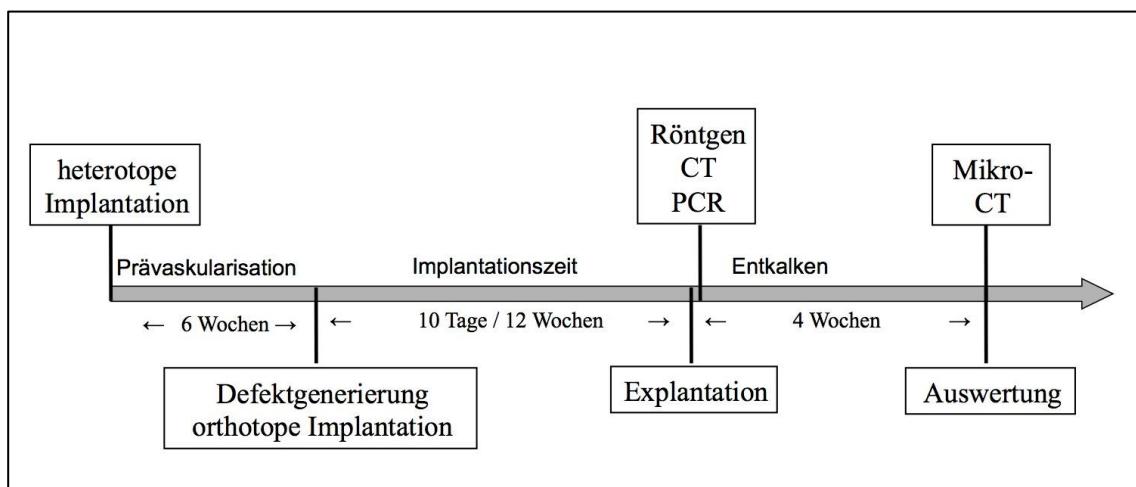
Die Entwicklung neuer Diagnose- und Behandlungsverfahren in der Tiermedizin basiert in hohem Maße auf Ergebnissen aus tierexperimenteller Forschung der Humanmedizin (EXNER et al., 2004). Deshalb sollten die Untersuchungsergebnisse und Erkenntnisse aus der präklinischen Forschung nicht nur auf den Menschen, sondern gleichermaßen auf Tierspezies übertragen werden, um damit zu einer Verbesserung der Therapiestrategien für Tierpatienten beizutragen. Gerade in der Kleintierchirurgie treten durch Unfälle, Infektionen, Tumorexzision, Osteomyelitis oder unzureichende Besitzer-Compliance nach Knochenbrüchen ähnliche Defekte wie in der Humanmedizin auf. Diese bedürfen einer Versorgung auf hohem Niveau und können durch Prinzipien des TE noch besser behandelt werden. Bereits seit einigen Jahren werden Biomaterialien zur Defektheilung bei Kleintieren erfolgreich untersucht und eingesetzt (HAUSCHILD et al., 2005; FRANCH et al., 2006; RAGETLY & GRIFFON, 2011).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Studiendesign

Für die Studie wurden 53 syngene männliche Lewis-Ratten verwendet. Alle Versuche wurden von der Ethikkommission der Universität Erlangen-Nürnberg und der Regierung von Mittelfranken, Deutschland (Az 54-2532. 1-24/09) genehmigt.

Die Tiere wurden auf sechs Gruppen wie in *Tabelle 1* beschrieben aufgeteilt und durchliefen die einzelnen Versuchsschritte aus *Abbildung 3*. Bei 21 Tieren wurde in der linken Leiste eine arteriovenöse Gefäßschleife (arteriovenöser Loop = AVL) aus der *Arteria femoralis* und der *Vena femoralis* des linken Beins und einem Interponat der *Vena femoralis* des rechten Beins konstruiert. Alle Operationen wurden durch die Tierärztin Amelie Balzer durchgeführt. Der AVL wurde anschließend in eine perforierte Titankammer gelegt. Diese enthielt eine Matrix aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Granula und Fibrinkleber, welcher mit MSCs und BMP-2 versetzt war. Um ein Verrutschen zu verhindern, wurde die Kammer auf der Muskelfaszie befestigt (Gruppen A und C). Bei weiteren 19 Tieren erfolgte die Kammerimplantation mit gleicher Zusammensetzung wie oben beschrieben, jedoch ohne AVL (Gruppen B und D). Bei sieben Tieren war die Kammer nur mit  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Granula und Fibrin gefüllt (Gruppe E).



**Abbildung 3:** Zeitlicher Ablauf des Versuchs

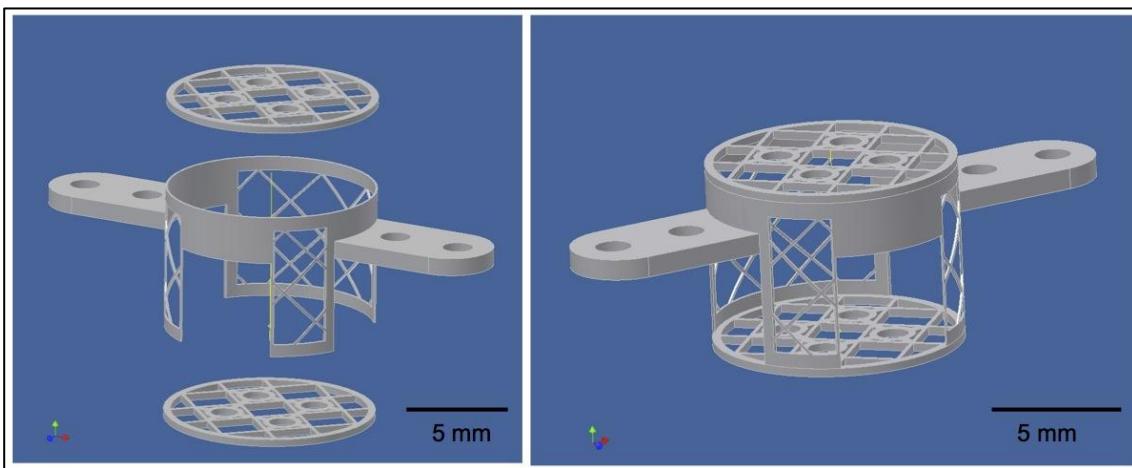
Nach einer Prävaskularisationszeit von sechs Wochen, die das Konstrukt in der Leiste verblieb, folgte die zweite Operation. Am linken Femur wurde ein diaphysärer Defekt von einem Zentimeter heraus gesägt, die Kammerkonstruktion unter Schonung des AVL dazwischen gesetzt und mit Schrauben befestigt. Bei sechs Tieren, die als Kontrollgruppe dienten, wurde der Defekt mit einer leeren Kammer überbrückt (Gruppe F). Nach zehn Tagen (Gruppen A und B) bzw. zwölf Wochen (Gruppen C, D, E und F) wurden die Tiere über die Aorta mit CT-Kontrastmittel (Microfil® MV-122, Flow Tech, Massachusetts, USA) perfundiert und die Konstrukte explantiert. Die Auswertung erfolgte unter dem Einsatz von Röntgenuntersuchungen, Computertomographie, Histologie, Histomorphometrie, Mikrocomputertomographie, Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, sowie molekularbiologischen Methoden.

| Gruppe                                    | A             | B             | C             | D             | E         | F         |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| <b>Vaskularisation</b>                    | AVL           | -             | AVL           | -             | -         | -         |
| <b>Hartmatrix</b>                         | TricOs        | TricOs        | TricOs        | TricOs        | TricOs    | -         |
| <b>Gelmatrix</b>                          | Fibrin        | Fibrin        | Fibrin        | Fibrin        | Fibrin    | -         |
| <b>osteoinduktive Faktoren</b>            | BMP-2<br>MSCs | BMP-2<br>MSCs | BMP-2<br>MSCs | BMP-2<br>MSCs | -         | -         |
| <b>heterotope Prävaskularisationszeit</b> | 6 Wochen      | 6 Wochen      | 6 Wochen      | 6 Wochen      | 6 Wochen  | -         |
| <b>orthotope Implantationszeit</b>        | 10 Tage       | 10 Tage       | 12 Wochen     | 12 Wochen     | 12 Wochen | 12 Wochen |

**Tabelle 1:** Gruppeneinteilung der Versuchstiere: Die 53 Versuchstiere waren auf sechs Gruppen aufgeteilt, wobei jeweils eine Gruppe pro Explantationszeitpunkt axial mit einer arteriovenösen Gefäßschleife (AVL) vaskularisiert war. Als Hartmatrix kam eine  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatitkeramik (TricOs) zum Einsatz und als osteoinduktive Faktoren wurden „bone morphogenic protein 2“ (BMP-2) und mesenchymale Stammzellen (MSCs) verwendet. Gruppe F diente als Negativkontrolle.

## 2. ***Titankammer***

Die Defektkammer wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr.-Ing. habil. Carolin Körner (Lehrstuhl für Werkstoffkunde und Technologie der Metalle der Universität Erlangen-Nürnberg) entwickelt. Sie entstand nach dem Vorbild der aus früheren Versuchen bewährten zylinderförmigen, perforierten Titankammer (ARKUDAS et al., 2012). Die weiterentwickelte Kammer für den Defekt, wie sie in *Abbildung 4* zu sehen ist, bestand aus einer Zylinderfläche mit einer Öffnung (Breite 5 mm, Höhe 4,3 mm) als Eintrittspforte für die Gefäße und einem abnehmbaren Boden und Deckel, welche der Grundfläche entsprachen. Der Innendurchmesser betrug 11 mm und die Höhe 8,5 mm. Das Gerüst war 0,2 mm stark, woraus sich ein Volumen von 1,2 ccm ergab. Um eine Dislokation des AVL zu verhindern, besaß der Boden vier quadratisch angeordnete Löcher mit einem Durchmesser von 0,8 mm. In diese wurden vor der Implantation auf 8 mm gekürzte Mandrins (Mandrin/Stylet Introcan®, B. Braun AG, Deutschland) gesteckt. Jeweils proximal und distal besaß die Defektkammer zwei weitere Öffnungen (Breite 5,3 mm, Höhe 4,4 mm), welche nach oben hin mit einem Flügel (Länge 8,0 mm, Breite 5,6 mm, Höhe 1,8 mm) ausgestattet waren. Der Durchlass überschritt jeweils etwas die Flügelbegrenzung, um die Kammer reibungslos über den Knochenvorsprung (Trochanter tertius) des Femur schieben zu können. Die Flügel, die später als Osteosyntheseplatte dienen sollten, hatten pro Seite in einem Abstand von 4 mm voneinander zwei Gleitlöcher von 1,3 mm Durchmesser zum Befestigen der Kammer am Knochen mittels Schrauben (Centre-Drive®-Schraube, selbstschneidend, 1,2 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Die Herstellung der Kammern erfolgte mit der selektiven Elektronenstrahlschmelztechnik (electron beam melting = EBM) aus Titan-Pulver (Titan Grade 5 ASTM (Ti 6Al 4V), TLS Technik GmbH & Co. Spezialpulver KG, Bitterfeld, Deutschland).



**Abbildung 4:** Titankammer: Technische Zeichnung der verwendeten Defektkammer. Die flügelartigen Verlängerungen fungieren als Platte zur Befestigung der Kammer am Femur.

### 3. **Implantatherstellung**

Die Implantatherstellung erfolgte in mehreren Teilschritten. Zuerst wurde die Defektkammer in einen Teflonständer gesetzt und mit einer granulären Hartmatrix gefüllt. Anschließend wurde der Fibrinkleber, je nach Gruppe mit Zellen und Wachstumsfaktoren versetzt, darüber pipettiert und damit das Präparat durchtränkt. Bei den Gruppen mit AVL (Gruppen A und C) wurde die Titankammer zuerst zur Hälfte mit allen Matrixkomponenten gefüllt. Erst nach Implantation der Gefäßschleife wurde die zweite Hälfte der Matrix eingebracht.

#### 3.1 **Hartmatrix**

Als Knochenersatzmaterial wurde eine Zweiphasenkeramik bestehend aus 60 % Hydroxylapatit (HA) und 40 % Beta-Tri-Calciumphosphat ( $\beta$ -TCP) in granulöser Form verwendet (TricOs®, Baxter Healthcare S.A., Wallisellen, Schweiz).  $\beta$ -TCP ist ein anorganisches, resorbierbares Material, welches schrittweise durch neu gebildetes Knochengewebe ersetzt wird. HA stellt dabei die stabilisierende Komponente dar, wobei  $\beta$ -TCP bioaktive Eigenschaften besitzt. In den Versuchen wurden TricOs-Granula mit einer Partikelgröße von 1 - 2 mm und zwei verschiedenen Arten von Porosität eingesetzt. Die Mikroporen besaßen einen Durchmesser von unter 10  $\mu\text{m}$  und ließen durch die Verteilung von biologischen Flüssigkeiten den Austausch von Ionen zu. Die Makroporosität ermöglichte das Einwachsen von Gefäßen. Der Durchmesser der Makroporen lag dabei zwischen 300 und 600  $\mu\text{m}$  und verlieh der Keramik außerdem Raum zur Besiedlung mit osteogenen Zellen, welche später zu Lasten der Ersatzmatrix

neuen Knochen bilden konnten.

### 3.2 Fibrin

Um die Matrixkomponenten zu verbinden, wurde ein Zweikomponentenkleber (Tisseel VH S/D Kit, Baxter Healthcare S.A., Wallisellen, Schweiz) verwendet. Er dient als Träger von Zellen und Wachstumsfaktoren, welche nach Implantation schrittweise in die Umgebung abgegeben werden. Die beiden Komponenten, Fibrinkleber und Thrombin, wurden vor dem Versuchsdurchlauf unter sterilen Bedingungen angemischt. Um eine Fibrinkonzentration von 10 mg/ml im späteren Clot zu erhalten, wurden das Fibrinkleberlyophilisat in 2 ml zuvor auf 37 °C erwärmten Aprotinin gelöst, auf einem Rührer homogenisiert und mit 7 ml der mitgelieferten Fibrinogen-Puffer-Lösung verdünnt. Das Thrombinlyophilisat wurde mit 2 ml der dazugehörigen erwärmten Calciumchloridlösung vermischt. Durch die Zugabe von 22,32 ml Thrombin-Puffer-Lösung zu 0,18 ml der zuvor hergestellten konzentrierten Lösung wurde diese auf 4 IE/ml verdünnt, sodass eine spätere Konzentration von 2 IE/ml resultierte. Die Fibrinlösung wurden zu 550 µl-Portionen und die Thrombinlösung zu 600 µl-Portionen auf 1,5 ml Eppendorfröhrchen (Safe lock Reaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aufgeteilt und bis zur Implantation bei 2 °C eingelagert. Ein Teil der Thrombinausgangslösung wurde unverdünnt zurückbehalten. Aufgrund ihrer Eigenschaft, nach Mischung mit Fibrin bereits nach wenigen Sekunden in die Gelphase überzugehen, diente das hieraus resultierende Fibrin als Schutzhülle um die freigelegten Gefäße.

### 3.3 Bone morphogenic Protein

Als Wachstumsfaktor kam Dibotermin alfa, ein menschliches rekombinantes Knochen-Morphogeneseprotein-2 (rhBMP-2, folgend nur noch „BMP-2“ benannt) (InductOs®, Wyeth Pharmaceuticals, Havant, Vereinigtes Königreich) zum Einsatz. Zuerst wurde aus phosphatgepufferter Salzlösung („phosphate buffered saline“ = PBS) (Dulbeccos PBS w/o Ca2+, Mg, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und bovinem Serumalbumin („bovine serum albumin = BSA) (Albumin bovine serum protease free, Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland) eine sterile PBS-0,1 % BSA-Lösung hergestellt. Dazu wurden 0,1 g BSA abgewogen, in 100 ml PBS gelöst und durch einen Sterilfilter (Whatmann®, FP 30/0,2 µm, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) in ein steriles Reaktionsgefäß (BD FalconTM 50 ml, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) überführt. Um eine Konzentration von 15 µg/µl Dibotermin alfa zu erhalten, wurden

12 g Lyophilisat in 8 ml PBS-0,1 % BSA-Lösung aufgelöst. Die Lösung wurde zu Portionen von 50 µl in Reaktionsgefäße (Safe lock Reaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aliquotiert und bis zum Einsatz bei -80 °C tiefgefroren. Alle Arbeitsschritte verliefen unter sterilen Bedingungen und auf Eis.

#### **4. *Kultivierung mesenchymaler Stammzellen***

Die Femora von zwei syngenen männlichen Lewis-Ratten stellten die Quelle des Ausgangsmaterials zur Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) dar. Alle Arbeitsschritte der Zellgewinnung, Isolation und Vermehrung erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank.

##### **4.1 Zellgewinnung**

Zur Entnahme der Femora wurden die Tiere zuerst in einer Induktionsbox (Induktionskäfig für Ratten, UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Holland) mit Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) narkotisiert. Die Isoflurankonzentration betrug dabei 5 % in reinem Sauerstoff. Nach etwa fünf Minuten befand sich die Ratte im Narkosestadium III (Toleranzstadium) und wurde mittels Kohlenstoffdioxyd-Asphyxie getötet. Unter sterilen Bedingungen wurden die Femora entnommen und von anhängendem Muskelgewebe befreit. Anschließend wurde jeweils das proximale und distale Ende des Femurs mit einer Schere abgetrennt, sodass das Knochenmark mittels einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle aspiriert werden konnte. Das gewonnene Material wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit Standardnährmedium (500 ml Dulbecco´s MEM/Ham´s F-12 (DMEM/Ham's F-12 Flüssigmedium ohne L-Glutamin, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 100 ml fötales bovines Serum (FBS Superior, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 5 ml Penicillin-Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, flüssig 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 5 ml L-Glutamin (L-Glutamine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)) gegeben.

##### **4.2 Zellisolation**

Zur Isolation der mesenchymalen Stammzellen wurde die Zelllösung auf zwei 150 cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen verteilt und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heracell, Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) inkubiert. Alle Kulturflaschen wurden eindeutig mit Angabe des Datums der Isolierung sowie

Nummer der Passage (hier Passage 0) beschriftet und durchnummeriert. Nach etwa vier Tagen war die erste Kunststoff-Adhäsion der Zellen am Kulturboden zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt wurden durch einen Wechsel des Nährmediums die in der Kultur noch vorhandenen Erythrozyten und hämatopoetischen Zellen sowie nicht adhäsente MSCs entfernt. Dazu wurde das Medium abgezogen, der Kulturboden ausgiebig mit PBS gespült, wieder abgesaugt und frisches Nährmedium in die Flasche gegeben. Nach diesem ersten Mediumwechsel wurde alle drei Tage das Medium komplett ersetzt, sodass nach einigen Tagen nur noch MSCs übrig blieben. Innerhalb weniger Wochen konnte eine starke Proliferation der Primärkulturzellen verzeichnet werden. Mit einem Mikroskop (Leitz Fluovert FU, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden regelmäßig die Proliferation und Zelldichte untersucht und in einer Tabelle festgehalten. Die Zellen zeigten dabei stets die typische Morphologie mesenchymaler Stammzellen.

#### 4.3 Zellexpansion und Zellkonservierung

##### Passagierung

Beim Erreichen einer Konfluenz der Zellkultur von 80 % erfolgte die Passagierung der Zellen. Hierfür wurde nach Entfernen des Nährmediums die Zellkulturflasche zweimal mit je 10 ml PBS gespült und wieder abgezogen. Dadurch wurden tote Zellen, Zelltrümmer und verbrauchtes Medium entfernt. Während einer dreiminütigen Inkubation mit 5 ml Trypsin im Brutschrank wurden die interzellulären Proteinverbindungen gespalten und somit die Zellen vom Boden abgehoben und vereinzelt. Um das Ablösen der Zellen vom Boden zu optimieren, wurden die Kulturflaschen von den Seiten leicht geklopft und das Ergebnis unter dem Mikroskop beurteilt. Das Stoppen der enzymatischen Aktivität des Trypsins erfolgte durch Zugabe der dreifachen Menge des Nährmediums. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Nach Überführung der Zelllösung in ein 50 ml Reaktionsgefäß und zehnminütiger Zentrifugation (1200 U/min, 4 °C) wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die MSCs per Hand ausgezählt und zu Portionen von 1,3 Millionen Zellen auf 225 cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen verteilt. Nach Zugabe von 25 ml Nährmedium wurden die Flaschen wieder in den Inkubator gelegt und durchliefen den nächsten Zyklus aus Mediumwechsel und Passagieren wie oben beschrieben.

### Konservierung

Um zu jedem Implantationszeitpunkt genügend gleichkultivierte MSCs parat zu haben, wurden die Zellen direkt nach dem vierten Passagieren für spätere Versuche eingefroren. Dafür wurde nach der Entfernung des abgestoppten Trypsins das Zellpellet in je 1 ml Nährmedium mit 10 % DMSO (Dimethyl sulfoxid Hybri-Max<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) pro abgelöster Flasche resuspendiert und zu 1 ml-Portionen in Kryokonservierungsröhrchen (Cryoröhrchen, mit Außengewinde, 49 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurden diese Reaktionsgefäße in einen Einfrierbehälter (Mr.Frosty<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) gegeben, der bei Aufbewahrung im Gefrierschrank eigenständig eine zellschonende Temperatursenkung von 1 °C pro Minute gewährleistet und auf -80 °C herunter kühlt. Am nächsten Tag konnten die Röhrchen in eine normale Box im -80 °C Gefrierschrank überführt oder für längere Konservierung bei einer Temperatur von -140 °C eingelagert werden.

## **4.4 Osteogene Differenzierung und DiI-Markierung der Zellen**

### Auftauen der Zellen

Mindestens acht Tage vor Implantationstermin wurde die benötigte Anzahl der kryokonservierten Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde auf sechs Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Kulturmedium aufgeteilt und für drei Tage in den Inkubator gegeben.

### Induktion der osteogenen Differenzierung

Spätestens fünf Tage vor der anstehenden Zellimplantation wurde zur osteogenen Stimulierung der Zellen das Nährmedium durch ein Differenzierungsmedium (siehe Protokoll: IX.1.1.2) ersetzt. Dadurch entwickelten sich die MSCs in eine osteogene Zelllinie, was nach fünf Tagen mikroskopisch anhand ihrer Morphologie kontrolliert und durch die alkalische Phosphatase-Färbung (siehe Protokoll IX.1.3) nachgewiesen werden konnte.

### Fluoreszenzmarkierung der MSCs

Um die Zellen später auf den histologischen Aufnahmen wiedererkennen zu können, wurden ihre Zellmembranen mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiI rot angefärbt. Alle Arbeitsschritte wurden unter Vermeidung von Licht durchgeführt. Die kultivierten Zellen wurden wie bei der Passagierung beschrieben, abgelöst und ausgezählt. Pro

Zellimplantation wurden 5 ml Nährmedium mit 5  $\mu$ g/ml CM-DiI cell tracker (InvitrogenTM, Carlsbad, USA) versetzt und die ausgezählten 5 Millionen Zellen darin aufgenommen und gut suspendiert. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 1200 U/min und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstands wurde das Zellpellet zweimal in jeweils 10 ml PBS (Dulbeccos PBS w/o Ca2+, Mg, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen, zentrifugiert und sofort weiterverarbeitet.

#### Implantationsvorbereitung

Während der letzten Waschung der Zellen wurden pro geplanter Implantation 50  $\mu$ l der vorbereiteten BMP-2-Aliquots (75  $\mu$ g BMP-2) aufgetaut und zwei 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit PBS-0,1% BSA beschichtet. Die eingefärbten Zellen wurden direkt nach dem Zentrifugieren und Abziehen des Überstands in 550  $\mu$ l Fibrin resuspendiert, zu der BPM-2-Lösung pipettiert und nach weiterem Resuspendieren exakt zur Hälfte auf die beiden vorbereiteten Reaktionsgefäße aufgeteilt und bis zum Einsatz dunkel auf Eis gelagert.

## **5. In-vivo-Versuche**

Nachdem ausreichend Zellen der gleichen Linie gezüchtet und alle Matrixkomponenten einsatzbereit bearbeitet waren, wurde mit den *in vivo*-Versuchen begonnen.

### **5.1 Versuchstiere**

Für die Studie wurden insgesamt 53 männliche syngene Lewis-Ratten mit einem Ausgangsgewicht zwischen 300 g und 350 g Körpergewicht (KGW) bzw. zwischen 400 g und 430 g bei Defektgenerierung verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Haltung der Tiere erfolgte in Einzelkäfigen (Eurostandard Typ III) unter standardisierten Bedingungen im Franz-Penzoldt-Zentrum der Universität Erlangen-Nürnberg. Den Ratten stand zu jeder Zeit Wasser und Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum zur Verfügung, welches mindestens zweimal in der Woche zusammen mit den Käfigen ausgewechselt wurde. In dem Tierstall wurde über den gesamten Versuchsverlauf hinweg die Luftfeuchtigkeit bei  $50 \pm 10\%$  und die Temperatur bei  $22 \pm 2$  °C gehalten. Die Tiere waren einem zwölfstündigen Licht/Dunkel-Zyklus ausgesetzt.

## 5.2 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Den Tieren stand direkt bis zur Operation Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Vor jedem Eingriff wurde der Allgemeinzustand der Ratten anhand der Körperhaltung, des Fells und der Kotkonsistenz ermittelt. Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere in eine Induktionsbox (Induktionskäfig für Ratten, UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Holland) gesetzt und mit 5 % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) in reinem Sauerstoff begast. Nach einer Minute wurde der Schlaf erreicht und es wurde eine Gewichtskontrolle bei den Tieren durchgeführt. Anschließend wurden sie auf eine gepolsterte auf 39 °C eingestellte Heizplatte (UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Holland) gelegt und unter Spontanatmung per Nasenmaske mit integriertem Abluftabzug an ein halboffenes Narkosesystem angeschlossen. Anfänglich betrug die Isoflurankonzentration 3,0 Vol.-% und wurde nach zehn Minuten auf 2,0 Vol.-% reduziert. Der Sauerstofffluss stand auf 0,9 ml/min.

Um ein Austrocknen der Kornea zu vermeiden, wurden beide Augen mit Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) versorgt. In die Schwanzvene wurde ein Venenverweilkatheter (Vasofix Safety 0,7 x 19 mm, G 24, gelb, PUR, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) geschoben, über den die Tiere analgetisch abgedeckt wurden. Je nach Operation bekamen die Tiere bei der subkutanen Implantation 5 - 10 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) oder bei Defektgenerierung 20 mg/kg KGW Tramadol (Tramal 50 mg Injektionslösung, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland). Beide Medikamente wurden mit einer NaCl-Lösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf 1 ml verdünnt und körperwarm über einige Minuten in die Vene appliziert. Zur Prophylaxe einer Wundinfektion wurden die Tiere mit einer subkutanen Injektion von 50.000 IE/kg KGW Penicillin kombiniert mit 10 mg/kg KGW Streptomycin (Veracin®-compositum, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) antibiotisch abgedeckt. Bei der Knochendefektoperation bekamen sie stattdessen 20 mg/kg KGW Clindamycin (Clindamycin-hameln 150 mg/ml Injektionslösung, hameln pharma plus gmbh, Hameln, Deutschland) subkutan, auf 1 ml verdünnt.

Nach dem Scheren des Operationsfeldes wurden die Tiere fixiert und es erfolgte die Desinfektion der Haut mit farblosem Hautdesinfektionsmittel (Cutasept® F, Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland). Das Operationsgebiet wurde großzügig mit einem sterilen Tuch abgedeckt und mittels vier Kaltlichtquellen punktuell ausgeleuchtet.

Als Operationsbesteck kamen Standardinstrumente der Chirurgie und Mikrochirurgie sowie ein Universal-Akkumaschinensystem für Traumatologie (Colibri, Synthes GmbH, Oberdorf, Schweiz) zum Einsatz. Das Akkumaschinensystem, die Titankammer und die Schrauben wurden mittels Autoklavierung (Systec DX-45, Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland) sterilisiert. Die übrigen Instrumente und Kirschner-Drähte wurden für 15 Minuten in ein Desinfektionsbad (Bacillol® AF, Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) eingelegt.

### **5.3 Heterotope Implantation in der Leiste**

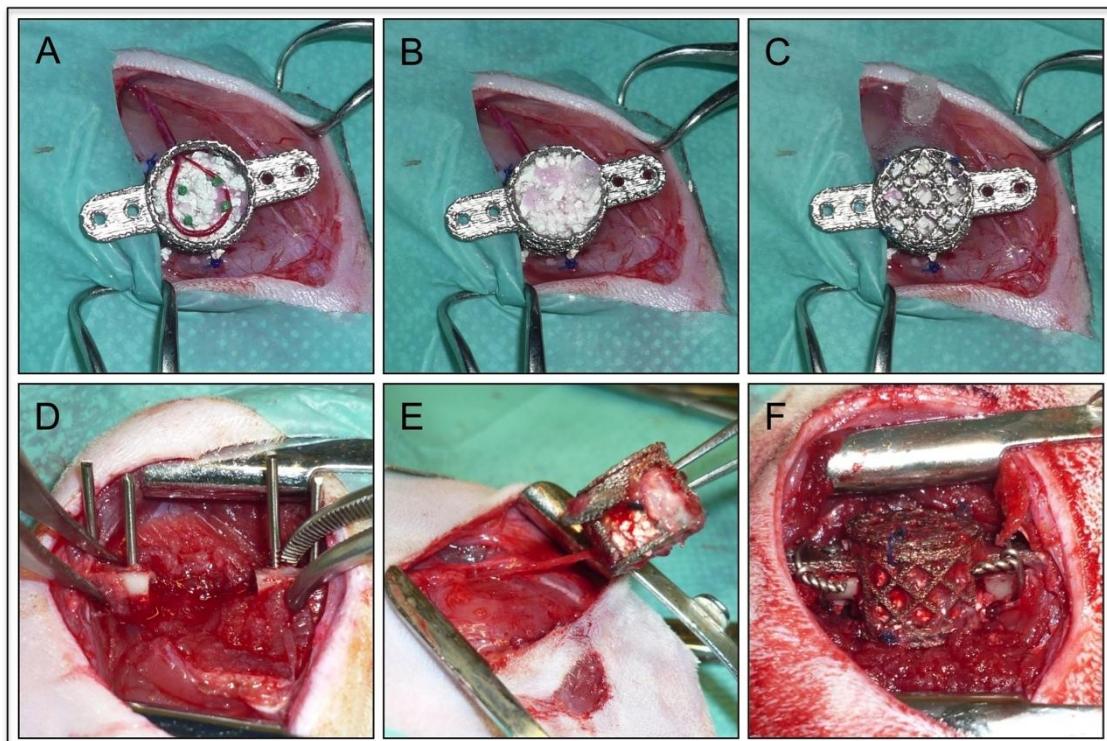
Das zu operierende Tier befand sich in Rückenlage. Die Beine waren leicht nach außen rotiert auf dem Untergrund fixiert. Mit einer Schere wurde die Haut am linken Bein mit einem Schnitt vom Knie bis zur Leiste eröffnet. Bei den Gruppen A und C erfolgte die Implantation einer arteriovenösen Gefäßschleife im Rahmen der subkutanen Implantation, während bei den Gruppen B, D und E die subkutane Implantation ohne AVL erfolgte.

#### **5.3.1 Implantation der arteriovenösen Gefäßschleife (AVL)**

Für die Generierung des AVL wurde die Unterhaut und Faszie schichtweise durchtrennt, bis das femorale Gefäßbündel der linken Seite über eine Länge von 3 cm freigelegt war. Unter Verwendung eines Operationsmikroskopes (OPMI 6-S, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) wurden die Gefäße separiert und an den späteren Anastomosestellen von der Adventitia befreit. Die abgehenden und verbindenden Seitenäste wurden mittels bipolarer Mikrodiathermie koaguliert und durchtrennt. Das Operationsfeld wurde feucht gehalten, während kontralateral die Femoralvene auf identische Weise dargestellt wurde. Die Vene wurde proximal und distal im Abstand von etwa 1,5 cm von der Adventitia befreit und nach Koagulation proximal und distal mit einem geraden Schnitt abgetrennt. Mit einer Heparinlösung (100 IE/ml in NaCl) (Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm/Donautal, Deutschland) wurde das Interponat durchgespült. Die Arterie der linken Seite wurde proximal mit einer Mikrogefäßklemme abgeklemmt, distal koaguliert, abgetrennt und ebenfalls gespült. Nun wurde das Veneninterponat gehoben, in retrograder Richtung an die Arteria femoralis angelegt und die beiden Gefäßlumina mittels Dilatator auf den gleichen Durchmesser erweitert. Mit acht bis zwölf Einzelknopfnähten wurde mit einem 11-0 Nylonfaden (Ethilon, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) das Interponat an die Arterie angenäht. Durch eine zweite distale Anastomose zwischen Interponat und

abgeklemmter Vene entstand ein arteriovenöser Shunt zwischen *A. femoralis* und *V. femoralis*. Nachdem die Gefäßklemmen abgenommen waren, wurde die Durchgängigkeit und Dichtigkeit des AVLs über mindestens 5 Minuten kontrolliert.

Währenddessen wurde die Kammer zusammengebaut. Dabei wurde der Boden mit Mandrinstiften bestückt und mit einem nichtresorbierbarem 6-0 Faden (Prolene®, Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstadt, Deutschland) an drei Stellen an den Platten-Zylinder angenäht.



**Abbildung 5:** Operationsvorgang: In Bild A bis C ist die heterotope, subkutane Implantation mit Generierung der Gefäßschleife (AVL) dargestellt. In Bild D bis F ist die Implantation der Kammer in den Femurdefekt zu sehen. A: Der AVL wird in die zur Hälfte mit Matrix gefüllte Titankammer gelegt und an der Faszie befestigt. B: Die Kammer wird mit der zweiten Hälfte der Ersatzmatrix gefüllt. D: Zum Schluss wird die Kammer durch das Annähen eines Deckels verschlossen. D: Mit einer oszillierenden Säge wird ein Knochenzylinder von 10 mm Länge aus dem Femur gesägt. E: Die in der Leiste prävaskularisierte Kammer wird samt Gefäßstiel mobilisiert (Gruppen A und C). F: Nach dem Durchschieben des gestielten Implantats von medial nach lateral des Oberschenkels wird die Kammer in den Defekt gesetzt und mittels Schrauben am Femur fixiert.

Anschließend wurde diese Konstruktion mit PBS-0,1 % BSA benetzt und zur Hälfte mit

dem Knochenersatzmaterial und MSCs-BMP-2-versetztem Fibrinkleber gefüllt (Herstellung siehe oben). Danach wurde die Kammer auf die Muskelfaszie gelegt und die Gefäßschleife eingebracht (*Abbildung 5A*). Daraufhin wurde die Kammer mit demselben nichtresorbierbaren 6-0 Faden an der Adduktorenfaszie fixiert, mit der zweiten Matrixhälfte gefüllt (*Abbildung 5B*). Abschließend wurde die Kammer mit einem Deckel verschlossen, der wie der Boden an den Platten-Zylinder angenäht wurde. Zur Schonung und zum leichteren Wiederauffinden wurde der Gefäßstiel mit schnell koagulierendem Fibrinkleber übergossen (*Abbildung 5C*). Am Ende erfolgte auf beiden Beinseiten die fortlaufende Wundnaht mit resorbierbarem Polyglactin (Vicryl Plus®, Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstadt, Deutschland) in zwei Schichten. Zur Unterhautnaht diente ein 4-0 Vicryl Plus. Die Haut wurde mit einer Naht nach Reverdin mit 3-0 Vicryl Plus verschlossen.

### 5.3.2 Heterotope Implantation ohne arteriovenöse Gefäßschleife

Bei den Gruppen B, D und E wurde die, wie oben beschrieben, vorbereitete Kammer komplett mit der Knochenersatzmatrix und MSCs-BMP-2-versetztem Fibrinkleber (Gruppen B und D), bzw. mit Knochenersatzmatrix und Fibrinkleber ohne MSCs und BMP-2 (Gruppe E) gefüllt. Nachdem der Deckel angenäht war, wurde die Kammer wie oben beschrieben in der Leiste befestigt und die Wunde verschlossen.

Bei der Gruppe F erfolgte keine heterotope subkutane Implantation.

### 5.4 Generierung des critical size Femurdefekt

Bei den Gruppen A bis E erfolgte in einer zweiten Operation nach der sechswöchigen Prävaskularisationszeit bzw. bei Gruppe F direkt als erste Operation die Defektgenerierung. Das zu operierende Tier wurde in rechte Seitenlage gebracht. Mit einer 5 cm langen Inzision wurde die Haut lateral über dem Femur eröffnet. Mittels stumpfer Präparation zwischen den Muskelbäuchen des *M. vastus lateralis* (cranial) und des *M. biceps femoris* (caudal) wurde ein Zugang zur Femurdiaphyse geschaffen. Unter Schonung des Gewebes wurde das Femur auf einer Länge von 3 cm freipräpariert. Durch Abzwicken des Trochanter tertius mit anhängender Muskulatur wurde das Femur verschmälert, sodass eine leere Kammer aufgesetzt werden konnte. Diese diente zur Lokalisationsbestimmung der jeweils proximal und distal zu bohrenden zwei Löcher. Nachdem die Kammer mit einer Klemme fixiert worden war, erfolgte das Einbohren der vier auf 2,5 cm gekürzten Kirschner-Drähte (Kirschner-Draht, 8 mm Gewinde, D 1,2 mm, L 70 mm, INTERCUS GmbH, Rudolstadt, Deutschland) in der Reihenfolge

3, 4, 1, 2, wobei 1 proximales Loch und 4 distales Loch bedeutete. Im Anschluss wurde die Kammer wieder entfernt und mit Hilfe einer Pinzette, die als Platzhalter diente und an den Drähten 3 bzw. 2 angesetzt wurde, ein 1 cm langer Knochenzylinder heraus gesägt.

In Gruppen A bis E wurde danach medial die Haut über der Kammer etwa 2 cm bis zur Leiste hin eröffnet. Auf Höhe der Gabelung der *Arteria femoralis* wurde cranial des *Nervus femoralis* stumpf unter Schonung des umliegenden Gewebes und der Gefäßlaufbahnen ein Durchgang von 1,5 cm Durchmesser auf das Femur erzeugt. Der Gefäßstiel der Gruppen A und C wurde komplett freipräpariert und mit anhängender Kammer vom Muskel abgelöst und gehoben. Die Knochenflächen unter den Kammerflügeln wurden durch Entfernung von Narbengewebe aufgefrischt. Unter besonderer Rücksicht auf den *Nervus ischiadicus* wurde die gestielte Konstruktion sowie auch die Kammern der Gruppen ohne AVL mit einer Klemme durch den Durchtritt gezogen und sofort über die Drähte gestülpt. Dadurch entstand eine Überbrückung der Femurfragmente in physiologischer Beinstellung. Nacheinander wurden die Drähte (Reihenfolge: Position 3, 4, 1, 2) durch selbstschneidende Schrauben (Centre-Drive®-Schraube, selbstschneidend, 1,2 mm, Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) ersetzt. An Position 1 wurde eine 9 mm lange und an Position 2 bis 4 jeweils eine 7 mm lange Schraube eingedreht. Jeweils proximal und distal zwischen den zwei Schrauben wurde eine 0,6 mm dicke Cerclage zur Verbesserung der Stabilität angebracht.

Bei den Tieren der Gruppe F wurde die leere Kammer nach komplettem Zusammenbauen und nach dem Einbohren der Führungsdrähte direkt in den Defekt gesetzt und mittels der oben erwähnten Schrauben und Cerclagen befestigt.

Der Verschluss der Wunde von lateral erfolgte in vier Schichten. Zuerst wurde die tiefe Muskulatur über dem Femur durch eine fortlaufende Matratzennaht von proximal nach distal zusammengeführt. Durch das anschließende Annähen des anfänglich abgetrennten Trochanters mit anhängendem *Musculus gluteus maximus* an die Kammer erhielt das Tier einen wesentlichen Teil der Bewegungsfunktionalität des Beines zurück. Mit einer zweiten einfach fortlaufenden Naht wurde die oberflächliche Muskulatur von distal nach proximal zusammengezogen. Zuletzt wurden die Hautränder mit Hilfe einer fortlaufenden Unterhautnaht zusammengeführt und die Haut mit einer Naht nach Reverdin verschlossen. Die zwei letzten Nähte wurden auch verwendet um in den Gruppen A bis D medial die Wunde zu verschließen. Zum Schluss wurden beide

Nahtstellen zur Verringerung der Infektionsgefahr mit Silberspray abgedeckt.

## 5.5 Postoperative Versorgung und Laufevaluation

Nach der Operation wurden die Tiere in Bauch-Brustlage gebracht, durch Rotlicht oder eine Heizplatte vor dem Auskühlen geschützt und blieben bis zum Erwachen unter tierärztlicher Aufsicht.

In den ersten drei Tagen post operationem fand täglich, danach in wöchentlichen Abständen, eine Kontrolle des Zustandes der Tiere statt. Ein Ziehen der Fäden war nicht notwendig. Gegebenenfalls wurden jedoch störende Fäden am wachen Tier entfernt.

Das Gewicht der Ratten wurde bei jeder Operation, sowie einen Monat nach Defektsetzung und bei Explantation gemessen um unterstützend das Wohlbefinden der Tiere zu beurteilen.

Im Fall von Wunddehiszenz wurde das Tier in Narkose chirurgisch versorgt und antibiotisch abgedeckt. Trat eine hochgradige Infektion oder Implantatversagen auf, wurde das betroffene Tier bereits vor Ablauf der zwölf Wochen post operationem euthanasiert.

Alle Operationen, erhobenen Befunde bzw. Werte wurden unter Verwendung der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) aufgezeichnet sowie in einem elektronischen Datenbankmanagementsystem Microsoft Access® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) festgehalten.

### 5.5.1 Medikation post operationem

Direkt nach der AVL-Operation erhielt jedes Tier zur Thromboseprophylaxe einmalig 60 IE Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm/Donautal, Deutschland) und je nach Blutverlust eine NaCl-Infusion zum Volumenersatz über den Venenkatheter.

Nach einer Defektsetzung erhielten die Tiere zur antibiotischen Abdeckung weitere drei Tage lang 20 mg/kg KGW Clindamycin (Sobelin® Solubile 600 mg/4ml, Injektionslösung, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) in 1 ml NaCl verdünnt unter die Nackenhaut. Je nach Schmerzlage, aber mindestens über zehn Tage, bekamen die Tiere ein Analgetikum über das Trinkwasser (2,5 mg/100 ml Trinkwasser, Tramal® Tropfen, GRÜNENTHAL GMBH, Aachen, Deutschland).

### 5.5.2 Laufevaluation

Die Implantatkontrolle erfolgte unter anderem über die Beurteilung des Laufstils der Tiere zu fünf Zeitpunkten (Tage nach OP: 1, 7, 14, 28 und Explantationstag). Beurteilt wurde auf einer Skala von 0 – 10, wobei zehn physiologischer Laufstil und null totale Entlastung des Beines bedeutete. Die Evaluation erfolgte stets durch die gleichen zwei Beobachter. Außerdem wurde der Lauf zur späteren Vergleichsmöglichkeit auf Videofilm festgehalten.

### 5.6 Explantation

Nach zehn Tagen (Gruppen A und B) bzw. zwölf Wochen (Gruppen C bis F) wurden die Tiere wie oben beschrieben in Narkose gelegt und es erfolgte die Explantation der Kammerkonstruktion. Dazu wurde die Bauchhöhle über eine mediane Inzision vom *Processus xiphoideus* bis zur *Symphysis pubica* eröffnet und die *Aorta abdominalis*, sowie die *Vena cava caudalis* auf ganzer Länge dargestellt. Eine Ligatur wurde cranial um die Aorta (Katheterligatur) und caudal um Aorta und *Vena cava caudalis* (Gefäßligatur) vorgelegt sowie die *Arteria iliaca externa dexter* ligiert. Mit einem 24 G Venenkatheter (Vasofix Safety 0,7 x 19 mm, G 24, gelb, PUR, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde die Aorta kanüliert, mit der vorgelegten Katheterligatur abgedichtet und die *Vena cava caudalis* cranial der Gefäßligatur perforiert.

Über den Venenkatheter erfolgte die Perfusion der Ratte mit mindestens 100 ml einer auf 39°C erwärmter NaCl-Heparin Lösung (100 IE/ml) (Heparin-natrium-25000-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), bis klare Flüssigkeit aus der *Vena cava caudalis* austrat. Anschließend wurden 20 ml des reinen Kontrastmittels (Microfil® MV-122, Flow Tech, Mass., USA) mit 0,6 ml des zugehörigen Härters vorsichtig gemischt und die Ratte damit infundiert. Um das Auslaufen des Kontrastmittels zu verhindern, wurde nach Abschluss der Perfusion die vorgelegte caudale Gefäßligatur zugezogen und die *A. und V. femoralis* in der Leiste ligiert. Bis zur Aushärtung des Microfils wurde der Rattenkadaver bei 4 °C zwischengelagert.

## 6. Ex-vivo-Auswertung

Die Proben wurden zwischen den Auswertungsschritten kühl und dunkel gelagert. Bei den Arbeitsschritten wurde stets darauf geachtet, dass die Konstrukte mit den DiI-

gefärbten Zellen (Gruppen A, B, C und D) so wenig wie möglich dem Licht ausgesetzt sind.

## 6.1 Röntgenkontrolle

Zur Kontrolle des Kammersitzes wurden von jedem Tier zwei Röntgenaufnahmen angefertigt. Die Aufnahmen entstanden mit Hilfe der digitalen Röntgenapparatur (Multix Compact K, Siemens Aktiengesellschaft, München, Deutschland) und der zugehörigen Software NX Workstation des Franz-Penzoldt-Zentrum der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Die eingesetzten Röntgenkassetten der Größe 18 x 24 cm (CR MD4.0 Allgemeine Kassette, Agfa HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland) lagen bei den Aufnahmen unter dem Tisch. Die Belichtung stand auf 46 kV und 6,3 mAs. Das tote Tier wurde so gelagert, dass eine latero-mediale- und eine anterior-posterior-Aufnahme angefertigt werden konnte. Beurteilt wurden die physiologische Stellung der Femurrekonstruktion, der Sitz der Schrauben und eine eventuelle Kapselbildung, welche durch die kontrastmittelperfundierten Gefäße deutlich sichtbar wurde.

## 6.2 Probengewinnung

### Herausnehmen der Femora

Nach dem Röntgen wurde der linke Oberschenkel der Ratte entnommen. Dafür erfolgte lateral über dem Femur ein langer Hautschnitt mit einem Skalpell. Anschließend wurde das Kniegelenk zwischen Tibiaplateau und Femurkondylen durchtrennt und der Femurkopf nach Eröffnung der Gelenkkapsel exartikuliert. Medial wurde der Schnitt nahe der Leiste proximal der Ligatur der A. und V. *femoralis* weitergeführt. Es folgte die Überführung des abgetrennten Oberschenkels in ein lichtundurchlässiges, mit 4 % Formalin (Roti®-Histofix 4 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gefülltes Reaktionsgefäß (BD FalconTM 50ml, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA). Die Fixierung lief über 24 Stunden bei einer Temperatur von 4 °C.

### Freipräparieren des Konstrukts

Am Folgetag wurde zuerst grob die umliegende Muskulatur entfernt. Bei Konstrukten, die einen Loop enthielten, wurde der Gefäßstiel vorsichtig freipräpariert und direkt am Kammereingang ligiert. Die Kammerfemurkonstruktion wurde sauber freigelegt und einmal von oben (im 90°-Winkel zum Tisch) und einmal schräg (im 45°-Winkel zum Tisch) fotografiert.

Anschließend wurde das komplette Konstrukt mit angewachsenen Femurfragmenten aus der Kammer genommen. Dazu wurden Deckel und Boden der Kammer entfernt, die Schrauben herausgedreht und mit Hilfe eines Skalpells das Konstrukt unter Schonung der Eintrittspforte und der Femurkontakte von der Kammer getrennt und herausgelöst. Zum Schluss wurde auch dieser Schritt durch zwei Fotos dokumentiert und das Konstrukt in vorliegender Stellung in ein geeignetes, mit Pufferlösung gefülltes Gefäß überführt.

### 6.3 Computertomographie

Zur Beurteilung der knöchernen Durchbauung und der Knochenanbindung der Konstrukte aus den Gruppen C bis F wurden diese computertomographisch untersucht. Die Durchführung und Auswertung der Aufnahmen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Stefan Lyer, Sektion für Experimentelle Onkologie und Nanomedizin der Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikum Erlangen (Leiter der Sektion: Prof. Dr. med. C. Alexiou). Das in einem Reaktionsgefäß befindliche Konstrukt lag horizontal in der Flachdetektor 3D-Rotationsangiographieanlage (Artis zee floor-mounted system, Siemens Aktiengesellschaft, München, Deutschland) und die Röhrenspannung betrug zwischen 40 kV und 70 kV. Es wurde jeweils ein 20-Sekunden-run (DYNA Run high resolution) mit 496 Bildern durchgeführt. Zur Sekundär-Rekonstruktion mit dem Softwareprogramm Syngo InSpace (Siemens Aktiengesellschaft, München, Deutschland) wurde ein HU-Kernel verwendet. Die entstandenen Aufnahmen wurden digital gespeichert und nach Rekonstruktion eines mittig gelegenen Sagittal- und Horizontalschnitts von 1 mm Dicke makroskopisch zweidimensional ausgewertet.

### 6.4 Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT)

Nach Perfusion der Ratten mit dem Kontrastmittel Microfil<sup>®</sup> mit anschließender Explantation und Entkalkung der Konstrukte wurde von jeweils einem Konstrukt jeder Zwölf-Wochen-Gruppe Mikrocomputertomographiemessungen ( $\mu$ CT) durchgeführt.

Die Aufnahmen und Berechnungen entstanden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Johannes Hartmann am Lehrstuhl für Werkstoffwissenschaften II (Werkstoffkunde und Technologie der Metalle) der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg und dienten zur Analyse der Vaskularisation sowie der Gefäßausrichtung und -verteilung.

Das Konstrukt stand beim Scannen senkrecht, mit dem proximalen Femurfragment

unten, in einem auf 8 cm gekürzten Reaktionsgefäß im Mikrocomputertomograph ( $\mu$ CT-40, SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) wobei die Röhrenspannung 40 kV, der Röhrenstrom 180  $\mu$ A und die Integrationszeit 55 ms betrug. Das zugehörige Softwareprogramm  $\mu$ CT Evaluation Program V5.0 (SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) diente zur Bearbeitung und 3D-Evaluierung der Aufnahmen. An Hand einer Durchstrahlübersichtsaufnahme wurden die Grenzen so gewählt, dass das Konstrukt in der Mitte des Auswahlbereichs lag und durchschnittlich 1300 Schichten (entspricht etwa 25 mm) bei einer Voxelgröße von 15  $\mu$ m ausgewählt waren.

Pro Schicht wurden 1000 Projektionen über einen Winkel von 180 Grad aufgenommen, d. h. die Probe wurde bei jeder Projektion um ca. 0,2 Grad gedreht. Zur Auswertung wurde ein „volume of interest“ (VOI) innerhalb des Reaktionsgefäßes ausgewählt, um Artefakte auszuschließen. Mit einem Schwellwert von 400 wurden dreidimensionale Rekonstruktionen der mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße berechnet. Gespeichert wurden die Daten als zweidimensionale Binärbilder, welche makroskopisch ausgewertet wurde.

## 6.5 Histologie

Zwischen der computertomographischen und der mikrocomputertomographischen Untersuchungen wurden die Konstrukte in Rotilabo®-Einbettkassetten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) entkalkt.

### 6.5.1 Aufarbeitung der histologischen Proben

#### Entkalkung

Um die Antigene zur Darstellung bestimmter Gewebsstrukturen für die immunhistochemischen Färbungen zugänglich zu machen und die kontrastmittelgefüllten Gefäße mikrocomputertomographisch vom Knochen unterscheiden zu können, ist es notwendig, die Knochenkonstrukte zu entkalken. Dafür lagerten die Konstrukte zwischen drei und fünf Wochen in einem 20%igen Ethyldiamintetraessigsäure-Puffer (EDTA-Puffer), einem Komplexbildner, der mit Calcium-Ionen eine Verbindung eingeht, so dass sich EDTA-Calcium-Präzipitate bilden. Der verwendete EDTA-Puffer bestand aus 400 g EDTA (EDTA, Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), gelöst in zwei Liter destilliertem Wasser und 65 g Zitronensäure-Monohydrat (Zitronensäure-Monohydrat gepulvert, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland). Dieser wurde auf einen pH-Wert von 7,1

eingestellt. Auf einem Rüttler (VIBRAMAX 100, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) wurden die Proben in Bewegung gehalten, damit der Puffer gleichmäßig das Gewebe umspülte und die Präzipitate ausfallen konnten. Der EDTA-Puffer wurde alle zwei bis drei Tage ausgewechselt.

#### Ebenenverteilung, Entwässerung und Einbettung

Nachdem das Calcium komplett aus dem Konstrukt herausgelöst war konnten die röntgenkontrastmittelgefüllten Gefäße im  $\mu$ CT erfasst werden. Im Anschluss dazu wurden die Konstrukte senkrecht zur Achse des Gefäßstieles, entlang der Schraubenverläufe, in zwei Ebenen geteilt und mit der Schnittfläche nach unten in Einbettkassetten (Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) gelegt. Dadurch entstand ein proximaler Teil (Austritt des Gefäßstiels) und ein distaler Teil (innenliegende Gefäßschleife). Bei Bedarf wurden die Hälften nochmals entkalkt.

| Schritt | Reagenz  | Temperatur | Wiederholungen & Einwirkzeit |
|---------|--|------------|------------------------------|
| 1.      | Formalin, 10 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)        | 35 °C      | 60 min                       |
| 2.      | Ethanol, 70 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)         | 40 °C      | 30 min                       |
| 3.      | Ethanol, 96 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)         | 40 °C      | 60 min                       |
| 4.      | Ethanol, 100 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)        | 40 °C      | 30 min                       |
| 5.      | Ethanol, 100 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)        | 40 °C      | 2 x 60 min                   |
| 6.      | Isopropanol, 100 %,<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)   | 40 °C      | 2 x 60 min                   |
| 7.      | Xylol, 100 %<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)                       | 40 °C      | 45 min                       |
| 8.      | Xylol, 100 %<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)                       | 40 °C      | 60 min                       |
| 9.      | Paraplast<br>(Paraplast®, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) | 62 °C      | 2 x 45 min                   |
| 10.     | Paraplast<br>(Paraplast®, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) | 62 °C      | 60 min                       |

**Tabelle 2:** Einstellungen des Hypercenter zur Dehydratation

Ansonsten erfolgte die Dehydratation der Konstrukte mittels Gewebeinfiltrationsautomat (Leica ASP300S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar,

Deutschland) des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Erlangen in aufsteigender Alkoholreihe nach dem in *Tabelle 2* aufgeführten Schema. Zur Einbettung wurde die in Paraffin zwischengelagerte Konstrukthälfte in möglichst achsengerader Lage und mit der Schnittfläche des Knochens zum Boden in einer metallenen Gussform platziert und an dem Paraffin-Einbettsystems HistoCenter 2® (Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland) mit geschmolzenem 60 °C warmen Paraffin übergossen. Durch das Auflegen der beschrifteten Einbettkassette auf das noch flüssige Paraffin erfolgte die eindeutige Kennzeichnung der Blöcke. Nachdem die Paraffinblöcke auf einer Tiefkühlfläche (TKF 22, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) ausgehärtet waren, konnte die Gussform entfernt werden.

### 6.5.2 Schnitttechnik

Mit einem Mikrotom (HM 355 S, Microm international GmbH, Walldorf, Deutschland) wurden 3 µm dünne Schnitte angefertigt, wobei die Blöcke zwischen den Schneidevorgängen immer wieder gekühlt wurden, um die Schneidfähigkeit des Paraffins zu erhalten. Nach Streckung in einem 45 °C warmen Wasserbad (TFB 45, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger (FLEX IHC Microscope Slides, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgezogen. Zur verbesserten Anhaftung wurden sie zuerst auf einem Objektträger-Streckschrank (OTS 40, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) und dann bei 58 °C in einem Wärmeschrank für eine Stunde getrocknet. Danach konnten die Schnitte gefärbt oder zur späteren Weiterverarbeitung in Präparatekästen eingelagert werden.

### 6.5.3 Übersichtsfärbungen

Für die histologische Auswertung der Knochenbildung und Vaskularisation wurden zur Übersicht von allen Präparaten Hämatoxylin-Eosin (HE)- und Masson-Goldner-Trichrom-(MG) Färbungen durchgeführt.

#### 6.5.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur morphologischen Beurteilung sowie qualitativen und quantitativen Knochen- und Gefäßauswertung der Präparate wurde eine Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung durchgeführt. Hämatoxylin färbt dabei die basophilen Zell- und Gewebebestandteile wie Zellkerne blauviolett und das saure Eosin stellt azidophile Strukturen wie Zytoplasmaproteine und die meisten Intrazellulärsubstanzen rötlich dar. Zur

Entparaffinierung, Rehydratisierung und Färbung wurden die Schnitte im Färbeautomaten (Leica ST5010-CV5030, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Erlangen in *Tabelle 3* aufgeführten Schritten unterzogen.

Danach wurden die Objektträger mit den gefärbten Schnitten mit Hilfe eines automatischen Eideckgeräts (Coveraid®, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) mit Deckgläschen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versehen.

| Schritt                                  | Reagenzien   | Wiederholungen & Einwirkzeit |     |
|--|--|------------------------------|-----|
| <b>Entparaffinierung</b>                 |  |                              |     |
| 1.                                       | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 3 x 40                       | s   |
| 2.                                       | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 60                           | s   |
| 3.                                       | Isopropanol 100 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)   | 60                           | s   |
| 4.                                       | Isopropanol 96 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)  | 60                           | s   |
| 5.                                       | Isopropanol 70 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)  | 60                           | s   |
| <b>Rehydratisierung</b>                  |  |                              |     |
| 6.                                       | Fließwasser  | 15                           | s   |
| <b>Hämatoxylin-Färbung</b>               |  |                              |     |
| 7.                                       | Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III<br>(Hämatoxylin Solution, Gill No. 3, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) | 2 x 75                       | s   |
| <b>Waschen und Bläuen</b>                |  |                              |     |
| 8.                                       | Fließwasser  | 4                            | s   |
| 9.                                       | Aqua dest. + HCl-Alk.  | 4                            | s   |
| 10.                                      | Fließwasser  | 2                            | min |
| <b>Eosin-Färbung</b>                     |  |                              |     |
| 11.                                      | Eosinlösung<br>(Eosin Y solution, alcoholic, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)                                      | 30                           | s   |
| <b>Dehydratation</b>                     |  |                              |     |
| 12.                                      | Isopropanol, 70 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)   | 10                           | s   |
| 13.                                      | Isopropanol, 96 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)   | 45                           | s   |
| 14.                                      | Isopropanol, 100 %<br>(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)  | 2 x 50                       | s   |
| <b>Klärung der dehydrierten Schnitte</b> |  |                              |     |
| 15.                                      | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 3 x 45                       | s   |

**Tabelle 3:** Protokoll des Färbeautomaten für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

### 6.5.3.2 Masson-Goldner-Trichromfärbung

Zur Differenzierung der Bindegewebsstrukturen der Konstrukte wurde eine Masson-Goldner-Färbung angewandt. Bei dieser Trichromfärbung kommen drei Farbstoffe zum Einsatz, wodurch die verschiedenen Gewebebestandteile wie Knochen, Osteoid und Fibrin selektiv dargestellt werden. Die Schnitte wurden nach dem Protokoll aus *Tabelle 4* bearbeitet. Abschließend wurden die Objektträger mit Aquatex® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und Deckgläsern (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

### 6.5.4 TUNEL Fluoreszenz Färbung

An allen Präparaten mit MSCs wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt, um das Apoptoseverhalten der implantierten Zellen zu beurteilen. Durch die Fluoreszenzmarkierung der fragmentierten DNA-Stränge werden in dieser Methode die apoptotischen Zellen mit einem Filter der Wellenlänge von 488 nm mikroskopisch als grün-fluoreszierende Punkte sichtbar gemacht. Dazu wurden ihre Hydroxylgruppen durch das TdT-Enzym nach Protokoll aus *Tabelle 5* mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden gekoppelt. Die Dapi-Markierung der Kerne lebender Zellen lässt vitale Zellen nach Anregung blau fluoreszieren (Wellenlänge: 568360 - 370 nm), wobei die DiI gefärbten implantierten Zellen rot fluoreszieren (Wellenlänge: 530 - 550 nm).

Der eingesetzte TBS-Puffer wurde aus 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland), 140 mM NaCl (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 1 L Aqua bidest. hergestellt und auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Für die Fluoreszenzmarkierung diente das FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit Calbiochem® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), wobei auf Eis pro Schnitt eine TdT Labeling Reaction Mixture aus 3 µl TdT-Enzym und 57 µl Reaction Mix hergestellt wurden.

Alle Objektträger wurden zum Abschluss mit Fluoprep® (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) und Deckgläsern (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

| <b>Schritt</b>                           | <b>Reagenz</b>   | <b>Wiederholungen &amp; Einwirkzeit</b> |
|--|--|---|
| <b>Entparaffinieren</b>                  |  |   |
| 1.                                       | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 2x 15 min                               |
| <b>Rehydrieren</b>                       |  |   |
| 2.                                       | absteigende Alkoholreihe: 99 %, 96 %, 70 % Ethanol<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)   | Je 3 min                                |
| <b>Kernfärbung</b>                       |  |   |
| 3.                                       | Eisenhämatoxylin nach Weigert<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)  |   |
| 4.                                       | Spülen mit Aqua dest.  | 6 min                                   |
| 5.                                       | Spülen mit 1 % HCL-Alkohol<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)   | 30 s                                    |
| 6.                                       | fließendes Leitungswasser  | 15 s                                    |
| <b>Färben und Beizen</b>                 |  |   |
| 7.                                       | Azophloxin-Lösung aus 0,5 g Azophloxin (Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)<br>mit 0,2 ml konzentrierter Essigsäure (MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml Aqua dest. | 5 min                                   |
| 8.                                       | Spülen mit Essigsäure 1 %  | 15 min                                  |
| 9.                                       | Phosphormolybdänsäure-Orange G-Lösung aus 4 g Phoshpormolybdänsäure, 2 g Orange G<br>(beides Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) in 100 ml Aqua dest.                                      | 15 s                                    |
| 10.                                      | Spülen mit Essigsäure 1 %<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 3 min                                   |
| 11.                                      | Lichtgrün-Lösung aus 0,2 g Lichtgrün (MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland), 0,2 ml konzentrierter Essigsäure und 100 ml Aqua dest.  | 15 s                                    |
| 12.                                      | Spülen mit Essigsäure 1 %<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 4 min                                   |
| <b>Dehydrieren</b>                       |  |   |
| 13.                                      | aufsteigende Alkoholreihe, jeweils zweimal in 96 % und 100 % Alkohol<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)   | Je 15 s                                 |
| <b>Klärung der dehydrierten Schnitte</b> |  |   |
| 14.                                      | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 2 min                                   |

**Tabelle 4:** Protokoll für die Masson-Goldner-Trichromfärbung

| Schritt                                     | Reagenz   | Wiederholungen & Einwirkzeit |
|---|---|------------------------------|
| <b>Entparaffinieren</b>                     |   |                              |
| 1.  | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)   | 2 x 15 min                   |
| <b>Rehydrieren</b>                          |   |                              |
| 2.  | absteigende Alkoholreihe: 96 %, 80 %, 70 % Ethanol<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)                                    | Je 3 min                     |
| 3.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH: 8)   | 5 s                          |
| <b>Permeabilisierung und Äquilibrierung</b> |   |                              |
| 4.  | 1 % Proteinase K<br>FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit Calbiochem® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)                           | 10 min                       |
| 5.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH: 8)   | 5 min                        |
| 6.  | TdT Equilibration-Puffer 1:5 in Aqua dest.<br>FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit Calbiochem® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) | 20 min                       |
| 7.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH: 8)   | 5 s                          |
| <b>Markierung</b>                           |   |                              |
| 8.  | 60 µl TdT Labeling Reaction Mixture pro Schnitt, Inkubation bei 37 °C im Wärmeschrank   | 1,5 h                        |
| 9.  | Waschen mit TBS-Puffer (pH: 8)  | 2 x 5 s                      |
| <b>Kernfärbung</b>                          |   |                              |
| 10.   | DAPI<br>(Diamidine-phenylindole-dihydrochloride, Applied Science/Roche, Indianapolis, USA) 1:1000 in Aqua dest.                         | 5 min                        |
| 11.   | Waschen mit Aqua dest.  | 15 s                         |

**Tabelle 5:** Protokoll für die TUNEL Färbung

### 6.5.5 Immunhistologische Färbungen

Zur Beurteilung der Gefäßbildung auf zellulärer Ebene wurde eine Lectin- und eine Alfa-smooth-muscle-actin (ASMA)-Färbung durchgeführt. Mit der ED1-Färbung wurden die Gewebeschnitte hinsichtlich einer Fremdkörperreaktion untersucht.

#### 6.5.5.1 Lectin

Pro Konstrukthälfte wurde ein Paraffinschnitt einer Lectinfärbung unterzogen, um Endothelzellen immunhistochemisch zu detektieren. Bei dieser Färbung werden

terminale  $\alpha$ -D-Galaktosyl-Reste auf der Zellmembran der zu detektierenden Endothelzellen über mehrere Antikörper-Komplexbindungen mikroskopisch sichtbar gemacht. Vor der Färbung wurde 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung, 1:10 verdünnt mit Trispuffer (beides Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und so eine 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung hergestellt (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Eine halbe Stunde vor Gebrauch wurde auch die verwendete Substrat-Chromogen-Lösung Liquid DAB+ aus 1 ml Substratpuffer und 20  $\mu$ l DAB hergestellt (DAB+, Liquid, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland). Alle Arbeitsschritte wurden von Hand nach dem Schema aus *Tabelle 6* ausgeführt. Anschließend wurden die Objektträger mit Aquatex® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und Deckgläschen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

#### **6.5.5.2 Alfa-smooth-muscle-actin**

Bei dieser Färbung wird immunhistochemisch glattmuskuläres Aktin ( $\alpha$ -smooth muscle actin = ASMA) nachgewiesen, wodurch sie zur Lokalisierung und Quantifizierung glatter Gefäßmuskelzellen dient. Zur Markierung des ASMA wurde eine indirekte Polymer-Technik angewandt wobei alle Schritte per Hand mit Hilfe des Enzym-Polymer-Detektionssystems ZyoChem-Plus AP Polymer-Kit® (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) nach Protokoll aus *Tabelle 7* durchgeführt wurden. Die Objektträger wurden zum Schluss mit Aquatex® und Deckgläschen eingedeckt.

#### **6.5.5.3 ED1**

Die ED-Färbung dient zur lichtmikroskopischen Identifizierung von Makrophagen und wurde bei allen Schnitten durchgeführt. Hierbei wird sich zu Nutzen gemacht, dass das Glykoprotein ED1 in erster Linie von Gewebsmakrophagen und nur schwach von Granulozyten des peripheren Blutes exprimiert wird. Die Färbung erfolgt nach der so genannten EnVision-Methode per Hand nach Protokoll aus *Tabelle 8*. Anschließend wurden die Objektträger mit Aquatex® und Deckgläschen eingedeckt.

| Schritt  | Reagenz   | Wiederholungen & Einwirkzeit |
|--|---|------------------------------|
| <b>Entparaffinieren</b>  |   |                              |
| 1.   | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)   | 2 x 15 min                   |
| <b>Rehydrieren</b>   |   |                              |
| 2.   | absteigende Alkoholreihe: 96 %, 80 %, 70 % Ethanol<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)  | je 3 min                     |
| 3.   | Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) im Dampftopf bei 121 °C   | 1 min                        |
| 4.   | Abkühlen  | 20 min                       |
| <b>Inhibierung der endogenen Peroxidase (Peroxidase-Block)</b>                     |   |                              |
| 5.   | 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung   | 10 min                       |
| <b>Absättigung unspezifischer Bindungsstellen</b>                                  |   |                              |
| 6.   | Avidin-Lösung<br>(Avidin/Biotin Blocking Kit®, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)   | 15 min                       |
| 7.   | Biotin-Lösung<br>(Avidin/Biotin Blocking Kit®, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)   | 15 min                       |
| <b>Inhibierung stark geladener Kollagen- und Bindegewebeelemente (Serum-Block)</b> |   |                              |
| 8.   | 10 % Goat-Normalserum<br>(Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)  | 30 min                       |
| 9.   | Abkippen  | 5 s                          |
| <b>Antikörperbindung</b>   |   |                              |
| 10.  | Inkubation mit biotinyliertem Isolectin B4 (BSI-B <sub>4</sub> ) (Lectin from <i>Bandeiraea simplicifolia</i> ( <i>Griffonia simplicifolia</i> ), SIGMA, Saint Louis, USA)<br>1:260 verdünnt mit TBS-Puffer (pH 7,4) bei 4 °C | 14 h                         |
| 11.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4) +<br>0,1 % Tween® 20 (Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)  | 3 x 5 min                    |
| 12.  | StreptABCComplex/HRP-Detektionssystem<br>(StreptABCComplex/HRP, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)  | 30 min                       |
| 13.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)  | 5 min                        |
| 14.  | Substrat-Chromogen-Lösung Liquid DAB+<br>(Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)  | 10 min                       |
| 15.  | Waschen unter Leitungswasser  | 3 min                        |
| <b>Gegenfärben</b>   |   |                              |
| 16.  | Hämalaunlösung<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 35 s                         |
| 17.  | fließendes Leitungswasser   | 10 min                       |

**Tabelle 6:** Protokoll zur Lectinfärbung

| Schritt  | Reagenz  | Wiederholungen & Einwirkzeit |
|--|--|------------------------------|
| <b>Entparaffinieren</b>  |  |                              |
| 1.   | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 2 x 15 min                   |
| <b>Rehydrieren</b>   |  |                              |
| 2.   | absteigende Alkoholreihe: 96 %, 80 %, 70 % Ethanol<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)   | je 3 min                     |
| <b>Antigen-Demaskierung</b>                                      |  |                              |
| 3.   | Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) im Dampftopf bei 121 °C  | 1 min                        |
| 4.   | Abkühlen   | 20 min                       |
| <b>Minimierung unspezifischer Bindungen (Hintergrundfärbung)</b> |  |                              |
| 5.   | BlockingSolution<br>(AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)   | 5 min                        |
| 6.   | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 5 min                        |
| <b>Primärantikörper</b>  |  |                              |
| 7.   | monoclonaler Maus-anti-ASMA-Primärantikörper (Mouse anti-Actin, smooth muscle, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)<br>1:300 verdünnt mit Albumin bei 4 °C<br>(Albumin from bovine serum, Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA) | 14 h                         |
| 8.   | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 3 x 5 min                    |
| <b>Signalverstärkung</b>   |  |                              |
| 9.   | PostBlock<br>(AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)  | 30 min                       |
| 10.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 5 min                        |
| <b>Sekundärantikörper</b>  |  |                              |
| 11.  | AP-Polymer (Anti Mouse / Anti Rabbit Antikörper)<br>(AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)   | 30 min                       |
| 12.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 5 min                        |
| 13.  | Fast Red®<br>(Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA)   | 20 min                       |
| 14.  | Wässern  | 2 min                        |
| <b>Gegenfärben</b>   |  |                              |
| 15.  | Hämalaunlösung<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)   | 35 s                         |
| 16.  | fließendes Leitungswasser  | 10 min                       |

**Tabelle 7:** Protokoll zur *Alfa-smooth-muscle-actin (ASMA) Färbung*

| Schritt  | Reagenz  | Wiederholungen & Einwirkzeit |
|--|--|------------------------------|
| <b>Entparaffinieren</b>  |  |                              |
| 1.   | Xylol<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)  | 2 x 15 min                   |
| <b>Rehydrieren</b>   |  |                              |
| 2.   | absteigende Alkoholreihe: 96 %, 80 %, 70 % Ethanol<br>(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)   | je 3 min                     |
| <b>Antigen-Demaskierung</b>                                      |  |                              |
| 3.   | Kochen im Dampftopf bei 121 °C   | 1 min                        |
| 4.   | Abkühlen   | 20 min                       |
| <b>Minimierung unspezifischer Bindungen (Hintergrundfärbung)</b> |  |                              |
| 5.   | BlockingSolution<br>(AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)   | 5 min                        |
| 6.   | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 5 min                        |
| <b>Primärantikörper</b>  |  |                              |
| 7.   | monoclonaler Maus-anti-Ratte CD 68-Primärantikörper<br>(Mouse anti-Rat CD68, MorphoSys UK Ltd t/a AbD Serotec, Oxford, England) 1:300<br>verdünnt mit Albumin bei 4 °C<br>(Albumin from bovine serum, Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA) | 14 h                         |
| 8.   | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 3 x 5 min                    |
| <b>Signalverstärkung</b>   |  |                              |
| 9.   | PostBlock<br>(AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)  | 30 min                       |
| 10.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 5 min                        |
| <b>Sekundärantikörper</b>  |  |                              |
| 11.  | AP-Polymer (Anti Mouse / Anti Rabbit Antikörper)<br>(AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)   | 30 min                       |
| 12.  | Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)   | 5 min                        |
| 13.  | Fast Red®<br>(Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA)   | 20 min                       |
| 14.  | Wässern  | 2 min                        |
| <b>Gegenfärben</b>   |  |                              |
| 15.  | Hämalaunlösung<br>(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)   | 35 s                         |
| 16.  | fließendes Leitungswasser  | 10 min                       |

**Tabelle 8:** Protokoll zur ED1 Färbung

### 6.5.6 Lichtmikroskopie

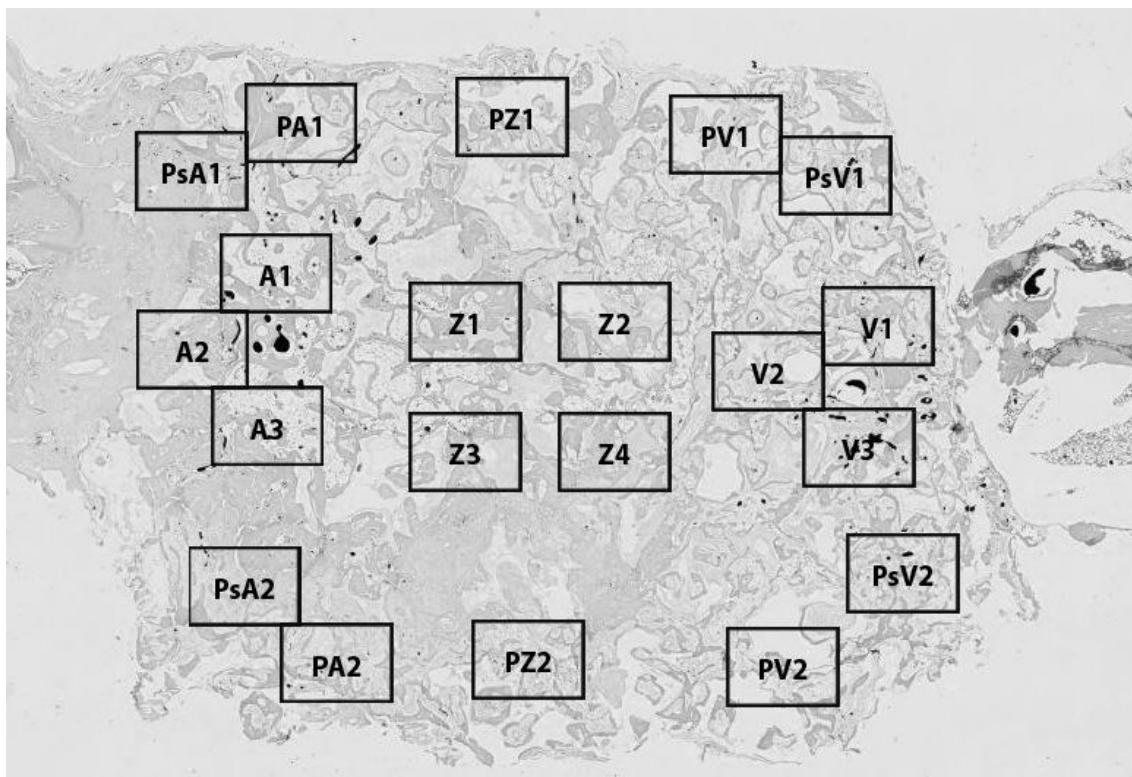
Zur Untersuchung der histologischen Präparate wurde ein Olympus81 Mikroskop, die Kamera Olympus SC30 und das zugehörige Softwareprogramm CellSense Dimension (alles Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die HE-Färbungen aller Präparate wurden mit einer 40fachen Vergrößerung automatisch durchmustert und die Einzelbilder anschließend zu einer Übersichtsaufnahme zusammengesetzt. Das Softwareprogramm Leica Application Suite V3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) diente zur semiautomatischen Auszählung der Knochenfläche. Zusätzlich wurde die Knochen- und Gefäßverteilung anhand von Detailaufnahmen der MG- bzw. HE-gefärbten Schnitte in 100facher Vergrößerung aus verschiedenen Konstruktbereichen beurteilt. Die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte erfolgte unter Betrachtung von 200fach vergrößerten, zentral oder peripher im Konstrukt gelegenen Detailaufnahmen.

### 6.5.7 Fluoreszenzmikroskopie

Alle TUNEL-gefärbten Schnitte der MSC-Gruppen (Gruppen A, B, C und D) wurden mit einem Leitz DRMBE Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Eine Leica DFC420 Kamera und das Softwareprogramm Leica Application Suite V3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) dienten zur Erstellung digitaler Aufnahmen, zur Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen sowie zur semiautomatischen Auswertung. Von jedem Präparat wurden wie in *Abbildung 6* dargestellt jeweils 20 Gesichtsfelder („areas of interest“ = AOI) pro Schnitt in 100facher Vergrößerung digital abgebildet. Pro Feld wurden drei Aufnahmen bei unterschiedlicher Wellenlänge fotografiert.

Dabei wurden bei einer Wellenlänge von 360 - 370 nm die blau leuchtenden Dapi-gefärbten Zellen fotografiert. Bei 530 - 550 nm leuchteten die DiI-gefärbten Zellen rot und bei 470 - 490 nm die TUNEL-gefärbten Zellen grün. Von den gleichgroßen Sektoren befanden sich jeweils drei direkt und vier peripher um die Arterie und Vene. Vier lagen im Zentrum des Konstrukts und weitere zwei peripher ober- und unterhalb davon.

Mit der Software konnten die drei Fluoreszenzaufnahmen als Overlays überlagert und zur späteren Auswertung gespeichert werden.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Einteilung eines histologischen Schnittpräparats in 20 gleichgroße AOI (area of interest). Von jeder AOI wurden jeweils drei Detailaufnahmen in 100facher Vergrößerung mit unterschiedlicher Fluoreszenzanregung aufgenommen. Nach Überlagerung dieser Bilder konnte die Verteilung der zugefügten MSCs im Konstrukt beurteilt werden. A: um die Arterie; PsA: in der seitlichen Peripherie der Arterie; PA: in der oberen/unteren Peripherie der Arterie; Z: zentral; PZ: in der oberen/unteren Peripherie des Zentrums; V: um die Vene; PV: in der oberen/unteren Peripherie der Vene; PsV: in der seitlichen Peripherie der Vene

## 6.6 Morphologische Analyse

Bei dieser Untersuchung wurde die Neubildung und Verteilung von Gefäßen und Knochen in den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen. Außerdem wurden Anzahl und Verteilung der implantierten MSCs zu den unterschiedlichen Explantationszeitpunkten bestimmt. Dazu wurde per Hand die Konstruktfläche ausgewählt und somit die Femurfragmente aus der Bewertung ausgeschlossen.

Mit dem Softwareprogramm Leica Application Suite V3 wurden die Übersichtsbilder der HE-Schnitte im Hinblick auf ihren Knochenanteil ausgewertet. Dazu wurden zuerst die in der HE-Färbung deutlich abgrenzbaren Knochenanteile mit Hilfe einer Binärmaske markiert. Von dieser Auswahl wurden Bereiche, welche nicht deutlich als

Knochen ansprechbar waren, per Hand ausgeschlossen und die Endfläche automatisch ausgewertet.

Bei den Konstrukten, die DiI-markierte MSCs enthielten (Gruppen A, B, C und D), wurden anhand oben beschriebener, fest definierter Bereiche die Verteilung der Zellen analysiert. Auf den Fluoreszenzbildern wurden mit Hilfe des Softwareprogramms ImageJ® (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) die rot-fluoreszierenden DiI gefärbten Zellen ausgezählt. Dazu wurden die Übersichtsaufnahmen in Binärbilder umgewandelt und mit einem standardisierten Threshold die Farbflächen ausgezählt.

Nach demselben Prinzip erfolgte auch die Auswertung der Gefäße, da sich das Kontrastmittel in den Gefäßen bei Durchlichtmikroskopie schwarz darstellt. Somit konnten die Gefäße als schwarze Punkte ausgezählt werden. Aus den berechneten Flächenwerten der Microfil®-gefüllten Gefäßanschnitte konnten außerdem Rückschlüsse auf den durchschnittlichen Durchmesser der Blutgefäße gezogen werden.

## 6.7 Molekularbiologische Analyse

Von jeder Gruppe wurde ein Konstrukt ohne Femuranteile zur molekularbiologischen Untersuchung verwendet. Direkt nach der Explantation wurde das Material dafür in einem Reaktionsgefäß in Flüssigstickstoff konserviert und bis zur Prozessierung bei -80 °C aufbewahrt, um eine Stabilisierung der RNA sicherzustellen.

### RNA Isolierung aus Explantaten

Für die RNA-Isolierung wurde das RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Zuerst erfolgte die Homogenisierung der Proben mittels Mörser unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff. Die Aufreinigung des homogenisierten Materials wurde anschließend nach Herstellerangaben (ab Punkt 5. der Herstellerangaben) durchgeführt. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration diente ein Fluorospektrometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland). Anschließend wurde die RNA auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt und in cDNA umgeschrieben.

### cDNA-Synthese

Mittels Random-Hexamer-Priming (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) wurden 500 ng Gesamt-RNA in die komplementäre cDNA umgeschrieben, um die Genexpression der RNA untersuchen zu können. Die Synthese erfolgte unter Verwendung des Protokolls des Herstellers. Die erhaltene cDNA wurde entweder direkt für die PCR verwendet oder für eine spätere Aufarbeitung bei -80 °C eingefroren.

### Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Pro Reaktion wurden 20 µl Ansätze aus den in *Tabelle 9* dargestellten Komponenten unter der Verwendung der verschiedenen in *Tabelle 10* aufgelisteten Primer hergestellt. Die Polymerasekettenreaktion wurde in Form einer 33-Zyklen-Touchdown-PCR nach Protokoll aus *Tabelle 11* durchgeführt.

| Menge       | Reagenz                      | Firma  |
|-------------|------------------------------|--|
| 1µl (25 ng) | cDNA                         |  |
| 2µl         | PCR-Puffer                   | (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland) |
| je 1,5µl    | Primer (forward und reverse) |  |
| 0,3µl       | dNTPs                        | (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland) |
| 0,3 µl      | Taq-Polymerase S             | (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland) |
| 13,4µl      | Nuclease-freies Wasser       |  |

**Tabelle 9:** Einzelkomponenten zur Erstellung der Reaktionsansätze für die Reverse Transkription

| Gene         | Forward Primer       | Reverse Primer          |
|--------------|----------------------|-------------------------|
| <b>GAPDH</b> | tggcctccaaggagtaagaa | tgtgagggagatgctcagtg    |
| <b>ALP</b>   | gctgatcactccacgttt   | gctgtgaagggcttcttgc     |
| <b>OC</b>    | cataggaccctctctgc    | ttcaccaccttactgccctc    |
| <b>RUNX2</b> | ccaccactcactaccacacg | tatggagtgctgctggctg     |
| <b>VEGF</b>  | aatgatgaagccctggagtg | atgctgcagcaggaagctcatct |

**Tabelle 10:** Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer

| PCR-Programm |                         | Temperatur | Wiederholungen & Zeit       |
|--------------|-------------------------|------------|-----------------------------|
| 1.           | Initiale Denaturierung  | 95 °C      | 3 min                       |
| 2.           | 3-Schritt-Zyklus:       |            | 33 x Zyklen                 |
|              | Denaturierung           | 95 °C      | 30 s                        |
|              | Annealing               | 53 °C      | 30 s                        |
|              | Extension               | 72 °C      | 30 s                        |
| 3.           | Abschließende Extension | 72 °C      | 5 min                       |
| 4.           | Reaktionsstop           | 4 °C       | bis zur weiteren Verwendung |

**Tabelle 11:** Programmierung des Thermocyclers (TProfessional, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) für die RT-PCR

### Gel-Elektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurden die Nukleinsäuren in einer Gelkammer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde ein mit Ethidiumbromid versetztes 3%iges Agarose-Gel (TopVisionTMAgarose, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) in eine Gelform gegossen und die gewonnenen PCR-Reaktionsergebnisse in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente die GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Die entstandenen Banden wurden mittels UV-Licht (Transilluminator, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland) sichtbar gemacht und fotografiert.

### RealTime-PCR

Für die quantitative PCR wurde das SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix-Kit und das CFX96 Real-Time System verwendet. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der zugehörigen CFX Manager Software (alle drei von Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). Die verwendeten Primersequenzen sind in *Tabelle 10* dargestellt. GAPDH und Actin wurden als Referenzwerte für die Normierung verwendet.

Pro Reaktion wurden ein Ansatz aus 10 µl SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix, jeweils 500 nM Vorwärts- und Rückwärtsprimern und 1 µl (25 ng) cDNA-template hergestellt. Die Proben wurden anschließend in die PCR-Platte pipettiert und darin in den Thermocycler eingebracht. Der Thermocycler wurde wie in *Tabelle 12* angegeben programmiert und gestartet.

| PCR-Programm |                        | Temperatur                      | Zeit & Wiederholungen       |
|--------------|------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1.           | Initiale Denaturierung | 95 °C                           | 30 s                        |
| 2.           | 3-Schritt-Zyklus:      |                                 | 40 Zyklen                   |
|              | Denaturierung          | 95 °C                           | 5 s                         |
|              | Annealing              | 60 °C                           | 30 s                        |
|              | Extension              | 72 °C                           | 30 s                        |
| 3.           | Schmelzkurve           | 65 - 95 °C<br>in 5 °C Schritten | 5 s / Schritt               |
| 4.           | Reaktionsstop          | Raumtemperatur                  | bis zur weiteren Verwendung |

**Tabelle 12:** Programmierung des Thermocyclers für die PCR

## 7. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die statistische Datenanalyse der Messergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm Graph pad prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Californien, USA)

Für die statistische Analyse der histologisch bestimmten Knochenflächen, Gefäßanzahlen und -durchmesser sowie der Zellanzahl wurde nach Überprüfung der Normalverteilung die einfaktorielle ANOVA-Varianzanalyse verwendet. Für die Auswertung des Gewichtsverlaufs kam eine zweifaktorielle ANOVA-Varianzanalyse zum Einsatz. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  gesetzt. Es wurden zudem jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Erstellung der abgebildeten Diagramme erfolgte mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

## IV. ERGEBNISSE

### 1. *Operationsverlauf*

Die Implantation der unterschiedlich zusammengesetzten Konstrukte wurde ohne intraoperative Zwischenfälle durchgeführt und die Tiere erwachten gut aus der Narkose. Bei zehn Tieren kam es im Verlauf der ersten sechs Wochen zum Durchbruch der Knoten, mit denen der Deckel an der Kammer fixiert war (fünf Tiere), oder eines Kammerflügels oder -deckels (fünf Tiere). Bei einem Tier wurde daraufhin eine Wundrevision durchgeführt.

Bei der Defektgenerierung kam es bei neun Tieren zu einer leichten Absplitterung des Femur (sieben proximal, zwei distal). Bei 13 Tieren griff eine Schraube nicht, bei weiteren 5 waren es 2 Schrauben. Am häufigsten drehte die proximale Schraube des distalen Schraubenpaares durch (in zehn Fällen), die distale Schraube des proximalen Schraubenpaares war sieben Mal, die distale Schraube des distalen Schraubenpaares war fünf Mal betroffen und die am weitesten proximal gelegene Schraube griff immer gut. Aufgrund einer lockeren Schraube fiel kein Tier aus der Studie heraus.

In einem Fall wurde das Operationsgebiet durch Mängel am Sägekopf verunreinigt und das Tier nach sorgfältiger Spülung des betroffenen Bereichs im Versuch belassen. Ein Tier verstarb auf Grund der Anästhesie und wurde durch ein neues ersetzt. Bei allen anderen traten keine anästhetischen Zwischenfälle auf. Alle Tiere zeigten bereits am ersten postoperativen Tag unter Tramalbehandlung ein weitgehend unbeeinträchtigtes Aktivitätsprofil mit normaler Futter- und Wasseraufnahme.

Auf Grund einer später in der histologischen Untersuchung nachgewiesenen inflammatorischen Reaktion im Konstrukt schieden fünf Tiere aus der Studie aus und gingen nicht in die Auswertung mit ein. In allen Fällen war es vorher zu Komplikationen wie Durchbruch der Kammer oder Nekrosebildung gekommen. Ein weiteres Tier der Gruppe D schied aufgrund einer Lyse des Femurs und Ausbruch der Schrauben frühzeitig aus der Studie aus.

Es gingen zehn Tiere der Gruppe A, acht Tiere der Gruppe B, elf Tiere der Gruppe C, sieben Tiere der Gruppe D, sechs Tiere der Gruppe E und fünf Tiere als Negativkontrolle in die Auswertung ein.

## 1.1 Gewichtsverlauf

Zu Beginn der Studie lag das Gewicht aller Tiere durchschnittlich bei  $344 \text{ g} \pm 23,04 \text{ g}$ . In den sechs Wochen zwischen dem Tag der subkutanen Kammerimplantation (mit oder ohne AVL) und dem Tag der Defektsetzung nahmen alle Tiere signifikant an Gewicht zu. Am Tag der Defektsetzung wogen die Tiere durchschnittlich  $414 \text{ g} \pm 7,76 \text{ g}$ . Zum Explantationszeitpunkt der Gruppen A und B (zehn Tage nach Defektsetzung) hatten die Ratten über 38 % des vorher zugenommenen Gewichtes wieder verloren. Bei den Tiergruppen mit zwölfwöchiger Implantationsphase konnte einen Monat nach der Defektsetzung insgesamt wieder eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme des Körpergewichts, bezogen auf das Gewicht zum Zeitpunkt der Defektsetzung, verzeichnet werden. Dieses stieg bis zur Explantation weiter an, sodass in allen Gruppen mit zwölfwöchiger Implantationszeit das Gewicht bei Explantation signifikant höher war als bei Defektgenerierung.

## 1.2 Laufevaluation

Das Laufverhalten aller Tiere wurde auf einer Skala von 0 bis 10 subjektiv zu verschiedenen Zeitpunkten bewertet, wobei 0 keiner Belastung und 10 einer physiologischen Belastung des operierten Beins entsprach. Die Gruppenergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Am ersten Tag nach Defektsetzung (Tag 0 = Defektsetzung) konnte der größte Unterschied beim Laufverhalten zwischen den Tieren festgestellt werden. Jeweils ein Tier aus den Gruppen D und E belastete das Bein überhaupt nicht. Das Bein wurde hochgezogen oder nachgeschliffen und wurde mit 0 von 10 bewertet. Nach 14 Tagen hatte sich bei ersterem keine wesentliche Besserung gezeigt, das zweite hatte sich im Laufverhalten der Gruppe angepasst. Die Bewertung beider Tiere lag bei Explantation mit 8 und 9 aber wieder nahe dem Mittelwert von  $9,43 \pm 1,08$  aller Tiere der Zwölf-Wochen-Gruppe. Unter den anderen Tieren kamen am ersten Tag Laufbewertungen von 3 bis 9 vor, wobei der Mittelwert  $5,92 \pm 2,15$  betrug.

Nach einer Woche hatten sich alle Tiere bis auf eines (Gruppe E) in ihrem Laufverhalten durchschnittlich um zwei Bewertungspunkte auf  $8,04 \pm 1,86$  verbessert. Eine weitere Verbesserung der Laufleistung konnte nach 14 Tagen mit  $8,90 \pm 2,04$  erreicht werden. Die besten Wertungen wurden nach einem Monat mit  $9,62 \pm 0,62$  aufgezeichnet, wobei der schlechteste Wert bei nur einem Tier bei 7 lag.

Zum Zeitpunkt der Explantation hatte sich bei fünf Tieren aus allen Zwölf-Wochen-Gruppen das Laufverhalten wieder um eine bis vier Skalen verschlechtert, wobei die meisten Tiere eine Fehlstellung des Beines aufwiesen. Bei zwei Tieren war das Bein nach innen rotiert, bei einem nach außen. Bei diesen Ratten waren bei der Explantation nekrotische Veränderungen um die Kammer vorhanden, was jedoch nicht zum Ausschluss dieser Tiere aus der Studie führte, da in der Kammer keine Infektionen nachweisbar waren. Nach 84 Tagen wurde die mittlere Laufskala der Gruppen C bis F mit  $9,34 \pm 1,08$  festgehalten, wobei die schlechteste Wertung 6 (ein Tier) betrug.

Die Laufbewertung der Tiere nach zehntägiger Implantationszeit betrug 9 ( $9,28 \pm 0,89$ ) und unterschied sich damit nur sehr gering von der Langzeitgruppe.

Im direkten Gruppenvergleich waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

## 2. Röntgenuntersuchung

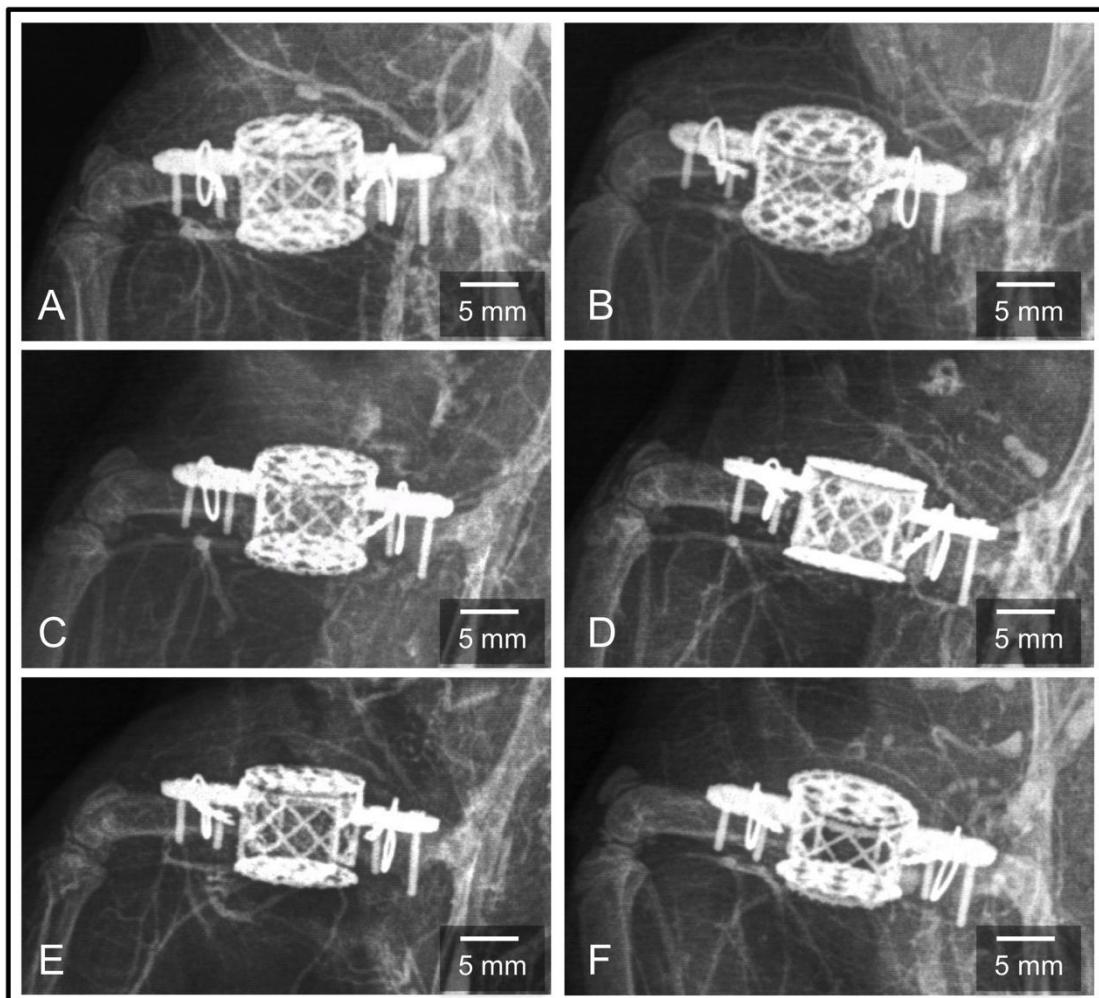
Bei der röntgenologischen Untersuchung wurden die Stellung des Beines sowie pathologische Veränderungen an jeweils einer latero-mediale- und einer Anterior-posterior-Aufnahme beurteilt.

Mit Ausnahme von zwei Tieren, bei denen eine Achsenabweichung des Femurs verzeichnet werden konnte, überbrückte die Kammer bei allen übrigen Ratten, wie operativ eingebracht, den Femurdefekt. Die Kammer-Femur-Konstruktion wies eine physiologische Stellung auf wie in *Abbildung 7* zu sehen ist. Bei drei Tieren konnte ein minimales Heraustreten je einer Schraube verzeichnet werden.

Eine dichte Gefäßnetzbildung in leichtem Abstand zu der Kammer wies bei einem Tier auf eine Nekrose um die Kammer hin, die sich bei Explantation bestätigte. Da innerhalb der Kammer histologisch keine Infektion zu erkennen war, wurde das Tier in der Studie belassen. Der Ausriss einer oder zweier Schrauben vereint mit Osteolyse des distalen Femurfragments wurde bei zwei Tieren (Gruppe C und E) notiert. Dort konnte eine nach medial verschobene Achsenabweichung und Aufreibung des distalen Femurfragments festgestellt werden.

Die knöcherne Durchbauung konnte anhand der Röntgenbilder wegen Überlagerung anderer röntgendichter Strukturen wie Titankammer, HA/ $\beta$ -TCP-Matrix und kontrastmittelgefüllten Gefäße nicht beurteilt werden. Einzig bei den Leerdefekten

(Negativkontrolle) konnte die Anwesenheit von Knochen in der Kammer ausgeschlossen werden.



**Abbildung 7:** Röntgenaufnahmen des Oberschenkels mit latero-medialem Strahlengang zum Zeitpunkt der Explantation: Auf Röntgenbildern der Gruppen A bis F kann eine physiologische achsgerechte Stellung des Femurs, sowie der korrekte Sitz der Schrauben, Cerclagen und der Kammer verzeichnet werden (A: Gruppe A; B: Gruppe B; C: Gruppe C; D: Gruppe D; E: Gruppe E; F: Gruppe F).

### 3. Makroskopische Begutachtung

Die makroskopische Betrachtung wurde nach Fixierung der Konstrukte jeweils mit und ohne Kammer durchgeführt. Besonders wurde dabei auf die Knochen-Konstrukt-Verbindung geachtet.

Besonders wurde dabei auf die Knochen-Konstrukt-Verbindung und das extrinsische Einwachsen kontrastmittelgefüllter neuer Gefäße durch die Perforationen in die Kammer geachtet.

Jeweils zwei Tiere der Gruppen A und B hatten an Stellen um die Kammer kleine nekrotische Veränderungen. Bei keinem Konstrukt dieser Gruppen konnte proximal oder distal eine Verbindung zum Femur verzeichnet werden.

In den Explantationsgruppen nach zwölf Wochen traten bei vier Tieren nekrotische Veränderungen auf, wobei eine nur den proximalen Bereich, zwei den distalen Bereich und eine den kompletten, meist lateralnen Bereich um das Konstrukt betrafen. Zwei dieser Infektionen ereigneten sich in Gruppe D und jeweils eine in Gruppen C und E. Die auftretenden Komplikationen sind in *Tabelle 13* dargestellt.

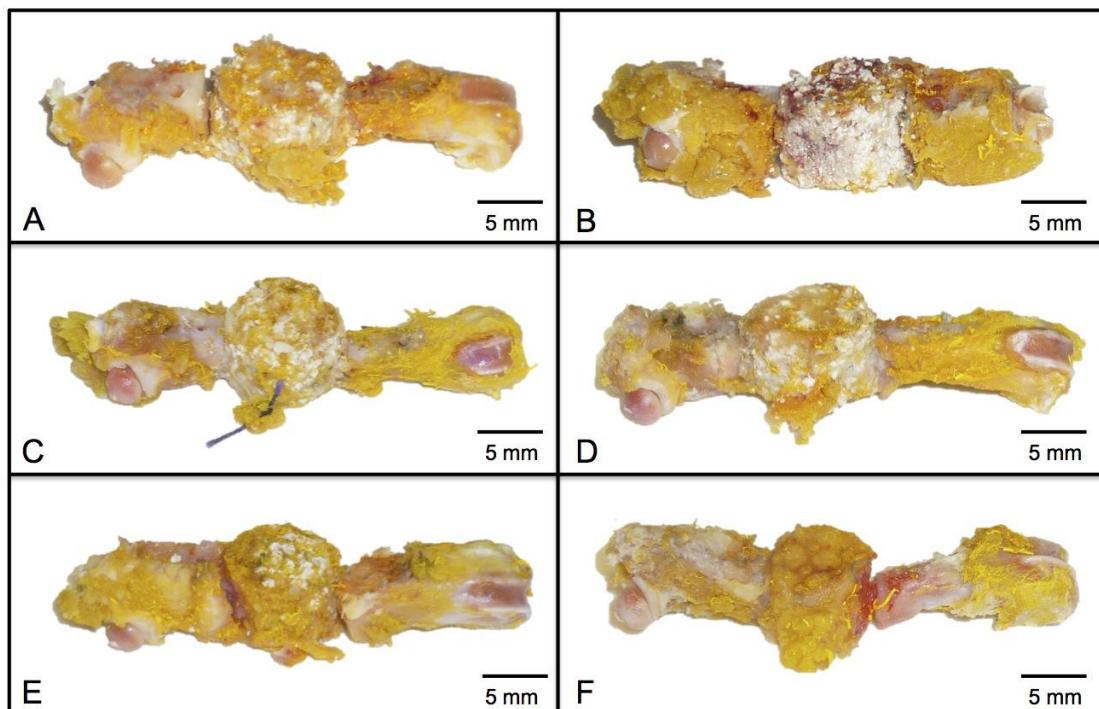
Ergebnisse aus Lafevaluation und röntgenologischer Untersuchung konnten hier bestätigt werden. So lag bei zwei dieser Tiere eine Achsenabweichung um 35° - 50° nach medial rotiert und eine Aufreibung der unteren Extremität (hypertrophe Pseudarthrose) vor.

| Komplikation der Gruppe   | A     | B     | C     | D     | E     | F |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| Ausschluss wegen Infektion in Kammer<br>(davon sichtbare Nekrose um Kammer herum) | 0     | 1     | 0     | 3 (1) | 1     | 1 |
| Durchbruch Kammer<br>(davon Nekrose bei Explantation)                             | 4 (2) | 4 (2) | 1 (0) | 1 (1) | 0 (0) | / |
| Nekrose bei Explantation  | 2     | 2     | 1     | 2     | 1     | 0 |

**Tabelle 13:** Komplikationen während des Versuchs: Die Tabelle zeigt sowohl die Anzahl der ausgeschlossenen Tiere, wie auch die aufgetretenen Komplikationen der übrigen Tiere während des Implantationszeitraums und dessen Folgen nach der Explantation. Die in der ersten Zeile aufgezählten Tiere wurden komplett aus der Studie ausgeschlossen und gingen somit nicht in die Ergebnisse der darunterliegenden Zeilen ein.

In allen Konstrukten der Gruppen A bis D konnte aufgrund deren Härte auf eine gute Knochenbildung geschlossen werden. Im Gegensatz dazu konnte von einer geringen Knochenbildung in den Kontrollgruppen (Gruppen E und F) ausgegangen werden, bei denen die Konstrukte porös oder weich waren.

Das Knochengewebe drang dabei durch die Maschen und verband das Konstrukt fest mit der Kammer. Bei einigen Tieren trat zusätzlich eine von den Femurfragmenten ausgehende Kallusbildung sowohl proximal wie auch distal außerhalb der Kammer auf. Das Kallusgewebe umschloss dabei von ventral aus kleine Teile der Kammerflügel oder die Kammer selbst. Der Knochen trat dabei in Form einer Kontaktosteogenese in direkte Verbindung mit der Kammer. Er musste zum Abnehmen der Kammer zerstört werden bzw. die Kammer in kleinen Stücken entfernt werden.



*Abbildung 8: Makroskopische Darstellung der Konstrukte der Gruppen A bis F nach Abnahme der Kammer. Bei den Zehn-Tage-Gruppen (A und B) ist durch den Spalt zwischen Femur und Konstrukt deutlich das Fehlen einer Verbindung der beiden Komponenten nachzuweisen. Die Gelbfärbung der Gefäße durch die Perfusion mit Microfil® lässt in den Gruppen A, C, D, E und F einen Gefäßanschluss erkennen, wohingegen in Gruppe B kaum Gefäße in das Konstrukt einziehen.*

Nach Entfernung der Kammer wurden die Explantate makroskopisch, wie in *Abbildung 8* zu sehen ist, im Hinblick auf die Verbindung zwischen Femur und Konstrukt begutachtet. In Gruppe A und B waren proximal und distal keine Verbindungen zu erkennen. In der Gruppe C konnten mit acht festen oder flächigen, knochenartigen Verbindungen am proximalen Übergang und zwei guten bindegewebigen Verbindungen am distalen Femurstumpf die besten Ergebnisse bezüglich des Zusammenwachsens

erzielt werden. Demgegenüber waren nur drei knochenartige Verbindungen in Gruppe D proximal zu verzeichnen. In der Gruppe F konnten vier gute und in der Gruppe E zwei gute, jedoch rein bindegewebige Verbindungen am proximalen Übergang verzeichnet werden. Distal waren nur 4 gute bindegewebige Verbindungen (2 in Gruppe C und jeweils eine in Gruppe E und F), 12 mäßige (Gruppe C: 5; Gruppe D: 3; Gruppe E und F: jeweils 2) und 14 (restliche Konstrukte) nicht vorhandene Verbindungen zu verzeichnen.

Auch eine erste Beurteilung der Vaskularisation konnte durch das Einziehen der durch Microfil® gelb-perfundierten Gefäße abgegeben werden. Während bei den Konstrukten der Gruppen A und C bis F gelbe Bereiche an der Oberfläche zu sehen waren, die auf das Einziehen intakter Gefäße zurückzuführen sind, blieb bei der Gruppe B eine solche Gelbfärbung der Konstruktoberfläche aus.

Von den insgesamt 47 Tieren wurde von hier an jeweils ein Konstrukt pro Gruppe mit zwölfwöchiger Implantationszeit ausschließlich für die molekularbiologische Untersuchung verwendet.

## 4. *Computertomographische Untersuchungen*

### 4.1 **Computertomographische Untersuchung der Konstrukte**

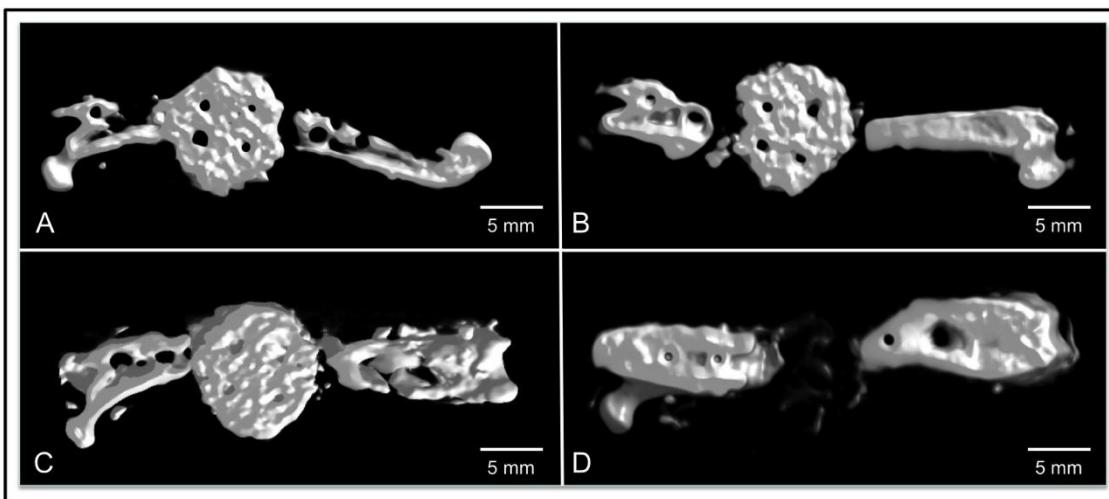
Die von den Konstrukten der Gruppen C bis F gewonnenen computertomographische Aufnahmen sollten zur Beurteilung der Knochenüberbrückung zwischen Femur und Konstrukt dienen. Die Bewertung fand an einem Sagittalschnitt und einem Horizontalschnitt (*Abbildung 9*) von 1 mm Dicke statt.

Auf Grund der knochenähnlichen Dichte von HA/β-TCP konnte keine Aussage über den vorhandenen Knochenanteil in den Konstrukten getroffen werden. Mit Ausnahme der Gruppe F wurden in jeder Gruppe sowohl proximal wie auch distal Verbindungen zwischen den Femurstümpfen und dem Konstrukt nachgewiesen. Es kam jedoch zu erheblichen Störsignalen ausgehend von dem Transportgefäß und den Befestigungsschwämmen. In der Gruppe ohne HA/β-TCP-Matrix (F) war weder eine Überbrückung noch die Bildung von Knochen zu verzeichnen.

#### 4.2 Mikrocomputertomographische Untersuchung der Konstrukte

Mit dem hochsensiblen Bildgebungsverfahren des  $\mu$ CTs können kleinste Gefäße aufgezeichnet und nach Bearbeitung der gewonnenen Daten die berechneten Modelle visuell dargestellt werden. Die dreidimensionalen Rekonstruktionen wurden als zweidimensionale Binärbilder (Abbildung 10) makroskopisch qualitativ ausgewertet.

In der Gruppe C waren der AVL und die Gefäßaussprössung aus diesem deutlich zu erkennen. Hier konnten von allen Gruppen am meisten Gefäße im Konstrukt beobachtet werden. Die Verteilung der Neogefäße war direkt um den Loop am dichtesten, aber auch die Mitte des Konstrukt konnte erschlossen werden. Außerdem zogen Gefäße vom proximalen Femurfragment in das Konstrukt ein und fanden Anschluss an den Loop.

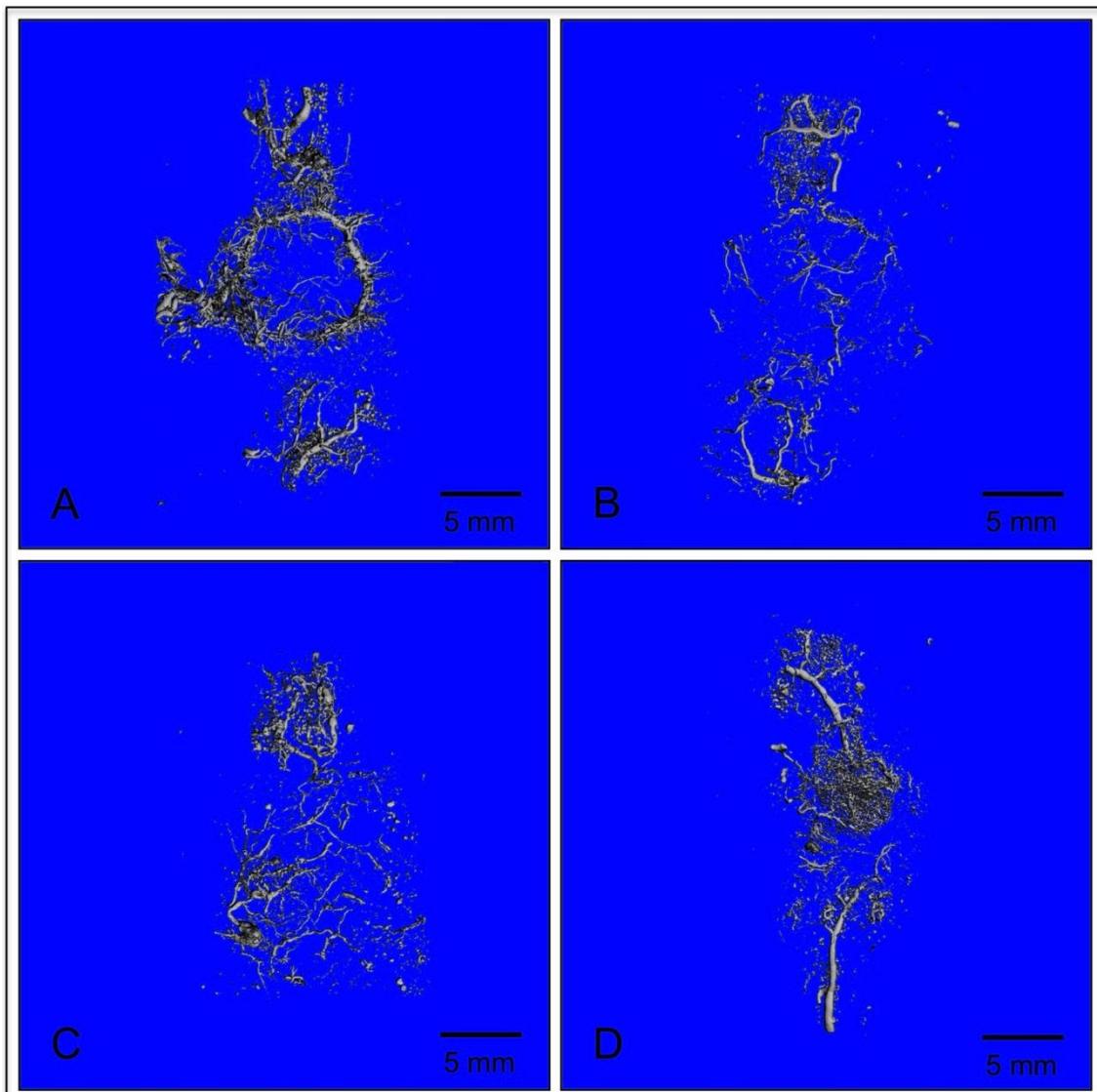


**Abbildung 9:** Computertomographische Rekonstruktionen: Horizontale Schnittebene von 1 mm Dicke der Zwölf-Wochen-Gruppen. Auf Feld A kann eine knöcherne Verbindung zwischen proximalem Femurfragment (links) und dem Konstrukt der Gruppe C vermutet werden. In den Gruppen D und E (Felder B und C) sprachen die Aufnahmen waren keine derartige Verbindungen nachweisbar. In der Gruppe F, die als Negativkontrolle diente, konnte die Abwesenheit von Knochen nachgewiesen werden (Feld D).

In Gruppe D lagen die Gefäße vermehrt in den äußeren Bereichen, konnten aber die Mitte des Konstrukt auch erreichen. Auch hier kam es zur Einsprössung von Gefäßen aus dem Femur in das Konstrukt.

Ein sehr ähnliches Bild war in Gruppe E zu beobachten, die nur minimal weniger Gefäß einsprössung aufwies.

In der Gruppe der Leerdefekte konnte vom proximalen Femurfragment ausgehend ein dichtes Gefäßnetz verzeichnet werden. Auch von distal traten vereinzelt Gefäße aus der Umgebung in das Konstrukt ein.



**Abbildung 10:** Mikrocomputertomographische Darstellung der Zwölf-Wochen-Gruppen. In allen Gruppen können vom proximalen Femurfragment (in den Bildern oben liegend) ausgehend tendenziell mehr Gefäße verzeichnet werden die in das Konstrukt einziehen. In Gruppe C (Feld A) spritzen aus der Gefäßschleife neue Gefäße aus und verbinden sich mit denen des proximalen Femurfragments. In den Gruppen D und E (Feld B und C) wachsen ausschließlich von außen Gefäße ins Konstrukt ein. Sie spritzen einerseits aus dem umliegenden Gewebe in das Konstrukt ein, andererseits wachsen sie vereinzelt aus dem proximalen Femurfragment heraus. In Gruppe F (Feld D) zieht zusätzlich zu den extrinsischen Neogefäßen vom proximalen Femurfragment ein dichtes Gefäßnetz in die Kammer ein.

## 5. *Histologische Analyse*

Die histologischen Schnitte erlaubten einen Überblick über die gesamte Defektzone einschließlich der Knochenfragmente sowie des Knochenersatzmaterials, bzw. im Falle der Negativkontrolle, des Leerdefekts.

### 5.1 **HE- und Masson-Goldner-Färbung**

Die deskriptive Auswertung der Knochenbildung und der Vaskularisation erfolgte an Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Goldner-gefärbten Schnitten.

#### 5.1.1 **Qualitative Gewebedifferenzierung**

Bei der qualitativen Auswertung wurde besonders auf die Verteilung des Knochens und die Kontaktzone zwischen Femurfragmenten und Knochenkonstrukt geachtet. Nach Kontrolle aller histologischen Präparate wurden wie bereits oben erwähnt fünf Tiere auf Grund einer Infektion im Konstrukt aus der Studie ausgeschlossen.

In allen Konstrukten der Gruppen A bis D zeigte sich eine signifikante Knochenbildung. Das Knochengewebe lag der HA/β-TCP-Matrix meist direkt als Spangen auf. Osteoblasten bauten dabei ausgehend von der HA/β-TCP-Matrix Osteoid auf. Neben den anliegenden Knochenspangen waren zum Explantationszeitpunkt von zwölf Wochen auch größere Knochenteile im Konstrukt zu finden. Während nach zehn Tagen sehr junger, unreifer Knochen das Konstrukt geflechtknochenartig durchzog, konnte nach zwölf Wochen an manchen Stellen auch eine lamellenartige Anordnung des Knochengewebes gesehen werden. In den nicht knöchernen Bereichen lagen Anteile der noch nicht vollständig degradierten HA/β-TCP-Matrix vor (Gruppen A bis F) und waren von vaskularisiertem Bindegewebe umgeben (Gruppe A und B) oder durchwachsen (Gruppe C bis E). In Gruppe F bestand das Explantat komplett aus Bindegewebe. In den ausgewerteten Gruppen waren keine Zellansammlungen zu sehen, die auf eine Fremdkörperreaktion hinweisen würden.

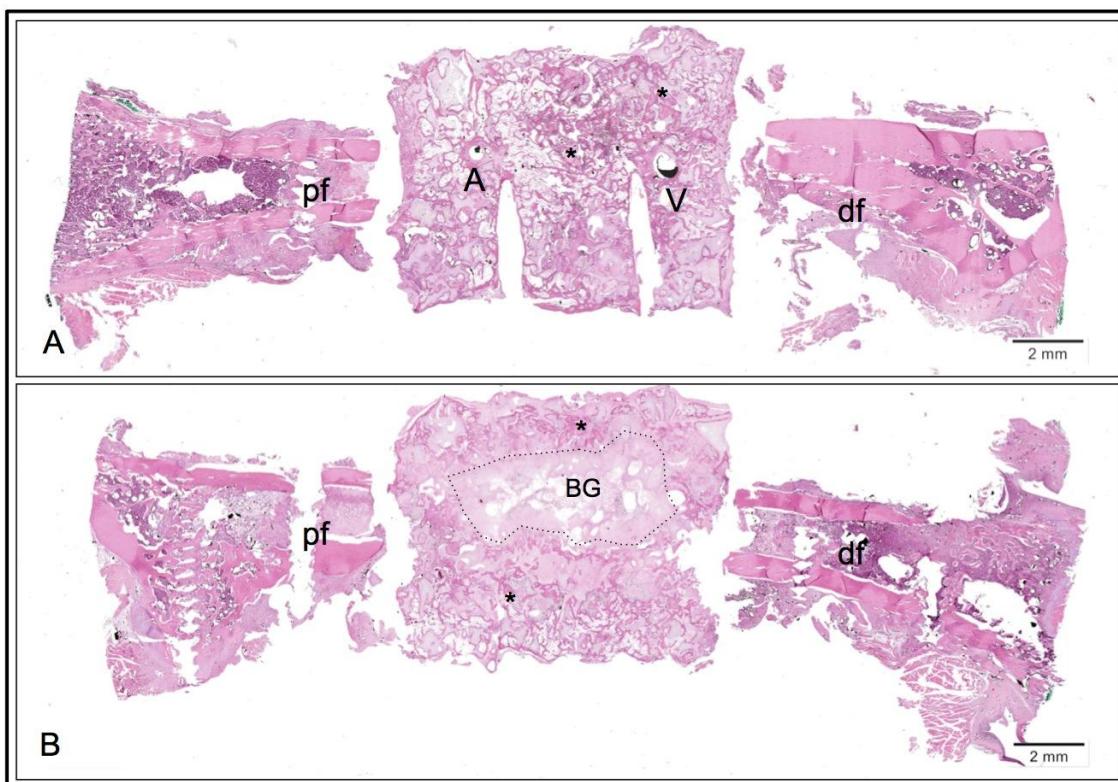
#### Knochenverteilung

Im Gegensatz zu den Gruppen mit AVL, bei denen gleichmäßig im ganzen Konstrukt Knochen gebildet wurde (*Abbildung 11A* und *Abbildung 12A*), lagen die knöchernen Bereiche in den Gruppen ohne AVL nur in der Peripherie der Konstrukte wie in den *Abbildung 11B* und *Abbildung 12B* dargestellt ist. Gruppe E wies nur in direkter Umgebung der Femurkontaktstellen vereinzelt Knocheninseln auf. Bei den Leerdefekten zeigte sich vom proximalen Femurfragment ausgehend eine dünne

Knochenspange, welche in den Defekt einspross (Abbildung 14F; Abbildung 15B). Der Restbereich war durch bindegewebiges Narbengewebe überbrückt.

#### Knochenüberbrückung

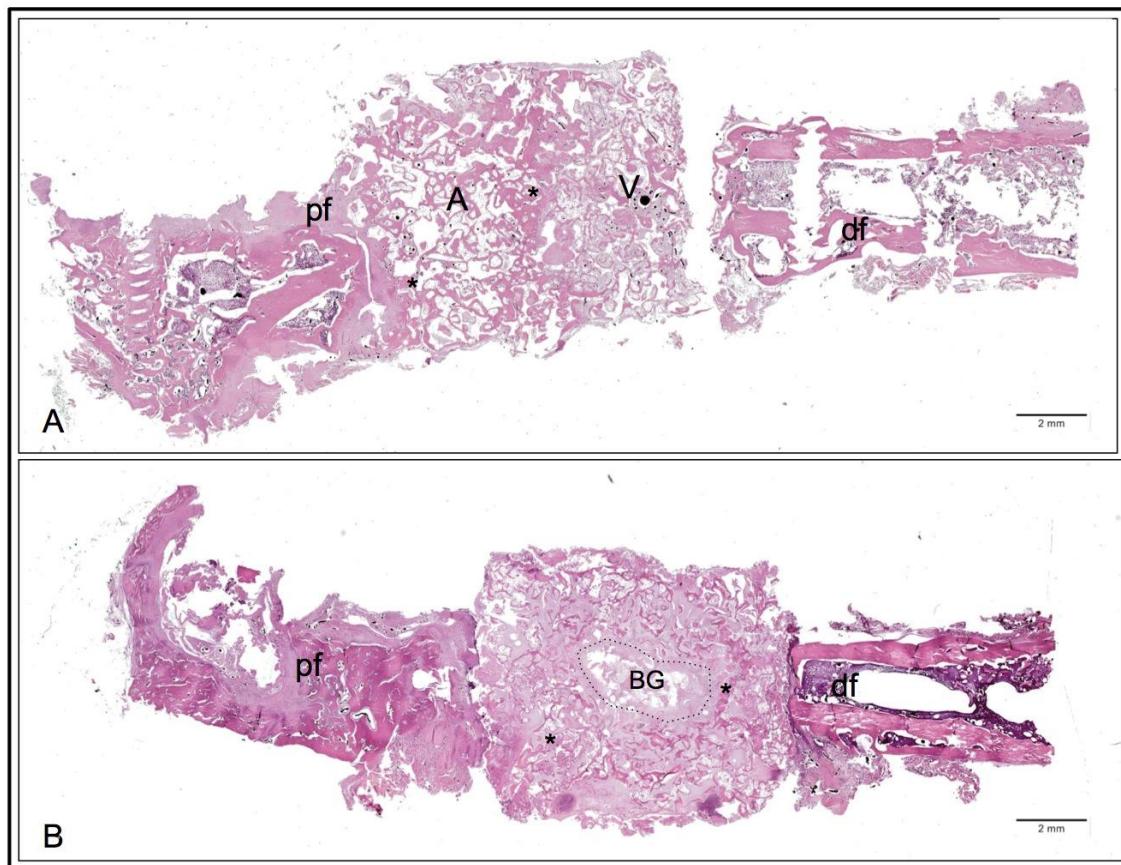
Zehn Tage nach Defektgenerierung (Gruppen A und B) zeigte sich bei keinem der Tiere eine bindegewebige oder eine knöcherne Überbrückung zwischen neu gebildetem Knochen und den Femurfragmenten.



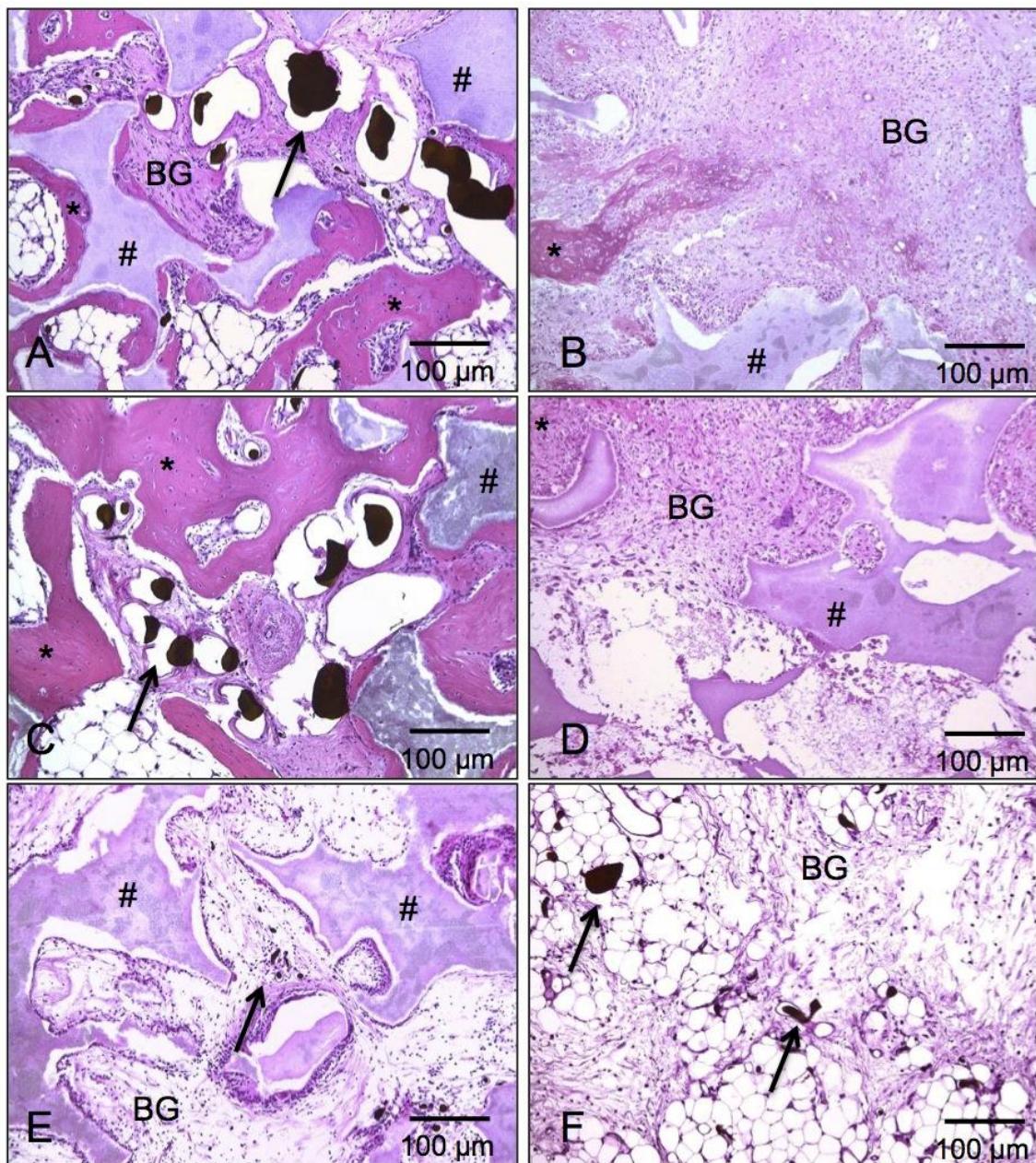
**Abbildung 11:** Übersichtsschnitte in 40facher Vergrößerung (HE-Färbung) der Zehn-Tages-Gruppen. In Gruppe A (Feld A) konnte eine homogene Knochenverteilung beobachtet werden, wohingegen in Gruppe B (Feld B) im zentralen Konstruktbereich (Fläche innerhalb der gepunkteten Linie) kein Knochen gebildet wurde. Markierungen: pf = proximales Femurfragment, df = distales Femurfragment, BG = Bindegewebe, \* = Knochenspangen

In Gruppe C war bei acht von elf Konstrukten der gebildete Knochen in direkte Verbindung mit dem proximalen Femurfragment getreten (Abbildung 12 und Abbildung 14C) im Vergleich zu drei von sieben Konstrukten in Gruppe D. Partielle knöcherne Überbrückungen waren bei je zwei weiteren Tieren der Gruppen C und D zu

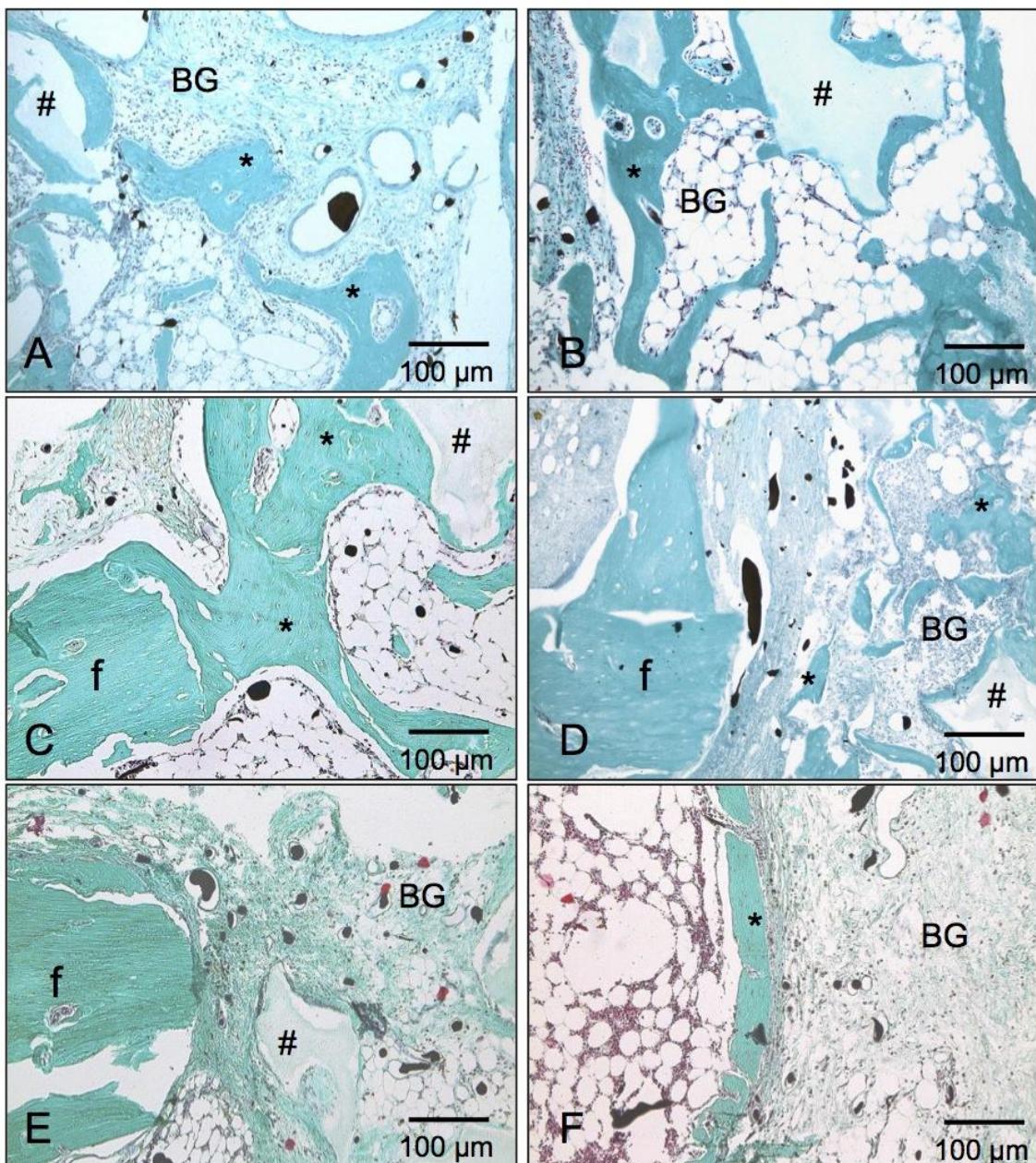
beobachten. Bindegewebige Verbindungen zwischen proximalem Femurfragment und Konstrukt waren in den Gruppen wie folgt zu finden: zweimal (Gruppe D) (Abbildung 14D), fünfmal (Gruppen E und F). In keiner Gruppe konnte das distale Femurfragment knöchern zum Konstrukt überbrückt werden.



**Abbildung 12:** Übersichtsschnitte in 40facher Vergrößerung (HE-Färbung) der Zwölf-Wochen-Gruppen C und D. In Gruppe C (Feld A) konnte eine dichte homogene Verteilung des neu gebildeten Knochens beobachtet werden, welcher im proximalen Bereich mit dem Femur in knöcherne Verbindung trat. In Gruppe D (Feld B) konnte meist nur eine bindegewebige Verbindung zwischen Konstrukt und proximalem Femurfragment beobachtet werden, die knochenfreie zentrale Konstruktfläche (Fläche innerhalb der gepunkteten Linie) nahm im Vergleich zur Zehn-Tage-Gruppe jedoch in ihrer Größe ab. Markierungen: pf = proximales Femurfragment, df = distales Femurfragment, BG = Bindegewebe, \* = Knochenspangen



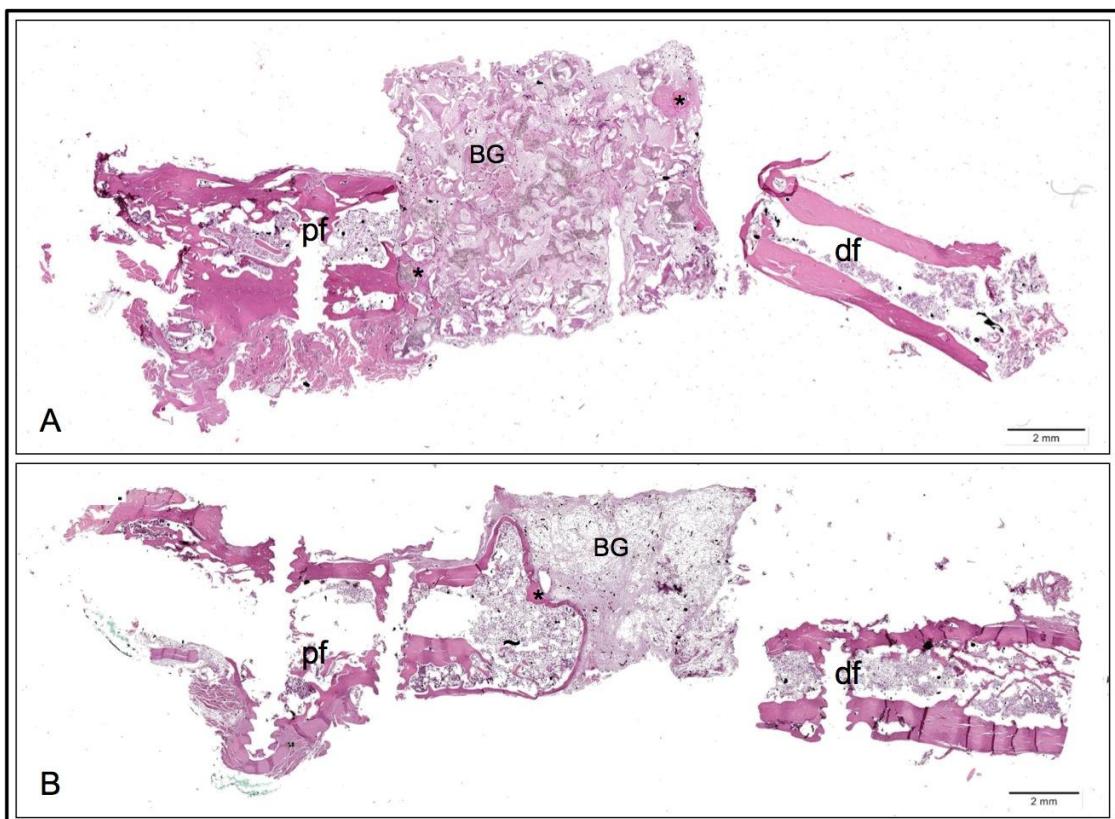
**Abbildung 13:** Aufnahmen zentraler Anteile der HE-gefärbten Schnitte in 100facher Vergrößerung der Gruppen A bis F (Felder A bis F). Bei den Gruppen mit Gefäßschleife (A und C) sind in den dargestellten Bereichen sowohl Gefäße wie auch Knochenspangen zu finden, die in Fläche und Anzahl mit der Zeit zunahmen. Demgegenüber sind die zentralen Zwischenräume der Gruppen B und D zum größten Teil mit kaum vaskularisiertem Bindegewebe aufgefüllt und es können nur sehr vereinzelt Knochenflächen aufgefunden werden. In den Gruppen E und F ist in den zentralen Konstruktbereichen gut vaskularisiertes Bindegewebe zu finden. Markierungen: BG = Bindegewebe, \* = Knochenspangen, # = Knochenersatzmaterial, schwarze Pfeile = Gefäße



**Abbildung 14:** Masson-Goldner-gefärbte Schnitte in 100facher Vergrößerung der Übergangsbereiche zwischen proximalem Femurknochen und Konstrukt der Gruppen A bis F. In den Randbereichen der Gruppen A und B (Feld A und B) sind zahlreiche Knochenspangen und Gefäße zu sehen, eine Überbrückung zum Femur blieb jedoch immer aus. In Gruppe C (Feld C) kann eine knöcherne und in Gruppe D (Feld D) eine bindegewebige Verbindung zwischen proximalem Femur (f) und neu gebildetem Knochen (\*) gefunden werden. In Gruppe E (Feld E) liegt reines Bindegewebe dem Femurfragment an und in Gruppe F (Feld F) ist eine Knochenspange, die vom proximalen Femurfragment blasenartig in die Kammer einwächst, zu sehen. Markierung: \* = Knochenspangen, , # = Knochenersatzmaterial, f = proximales Femurfragment

### Vaskularisation der Konstrukte

Da sich das Kontrastmittel, mit dem die Gefäße perfundiert wurden, im Durchlicht schwarz darstellt, konnte an Hand ihrer Farbe an den Schnitten die Gefäßverteilung beurteilt werden. In den Gruppen A und C war eindeutig der Anschnitt des AVL zu erkennen. Alle AVLs konnten als durchgängig beurteilt werden. Vermehrt um diese herum, aber auch im ganzen Konstrukt verteilt, konnten kleinere Gefäße dargestellt werden, die bis in die Mitte des Konstrukts verteilt vorlagen.



**Abbildung 15:** Übersichtsschnitte in HE-Färbung der Zwölf-Wochen-Gruppen E und F. In Gruppe E (Feld A) wurde nur in nächster Nähe zu den Femurfragmenten vereinzelt Knochen gebildet. . Die restliche Konstruktfläche war mit Bindegewebe und Matrix durchsetzt. In Gruppe F (Feld B) zog blasenartig ein spangenartiger Knochen in die Kammer ein. Der Hohlraum wurde vollständig mit stark vaskularisiertem Bindegewebe aufgefüllt.

Markierungen: BG = Bindegewebe, pf = proximales Femurfragment, df = distales Femurfragment, \* = Knocheninseln/spangen, ~ = blasenartiges Einwachsen des dichten Gefäßnetzes

Im Gegensatz dazu waren vor allem in der Gruppe B und teilweise in den Gruppen D und E die Gefäße in den peripheren Konstruktbereichen lokalisiert.

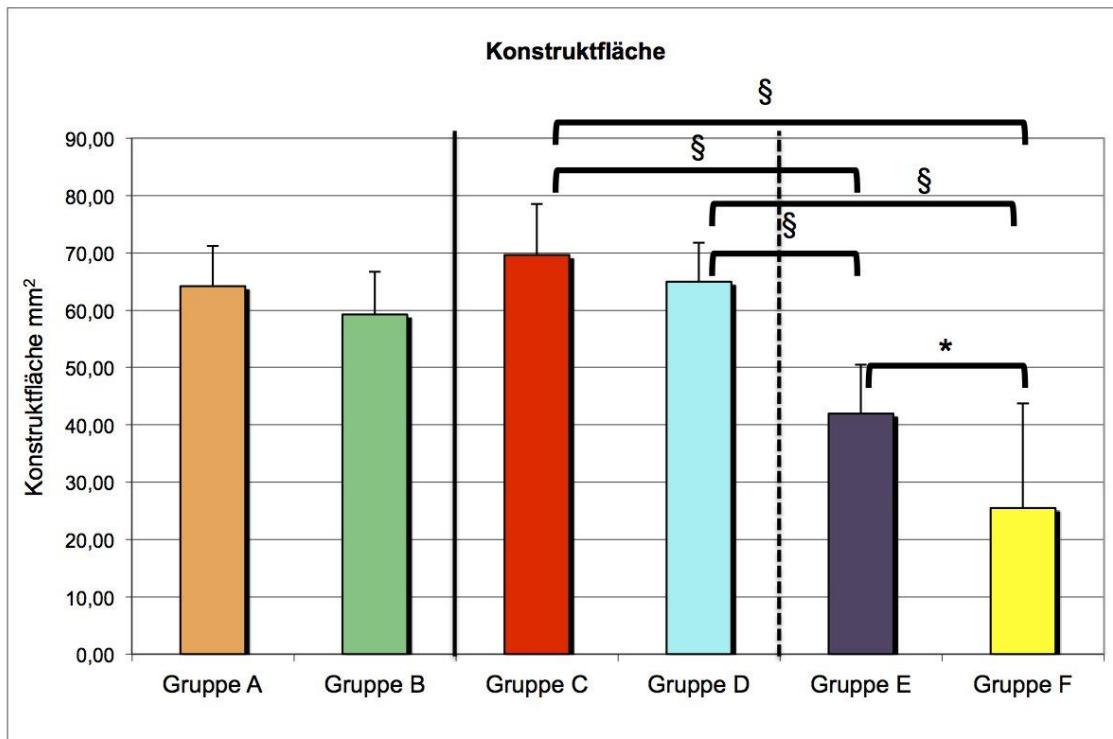
In Anlehnung an die Ergebnisse aus den  $\mu$ CT-Untersuchungen konnte in Gruppe F auch hier, ausgehend vom proximalen Femurstumpf, ein dichtes Gefäßnetz gefunden werden, welches sich über ein Drittel des Clots ausbreitete.

### 5.1.2 Quantitative und statistische Auswertung

#### Clotfläche

Durch semiautomatisches Umfahren der sichtbaren Konstruktfläche wurde die gebildete Gewebefläche ohne die Femuranteile computergestützt ausgezählt. Sie diente später zur Bestimmung der prozentualen Knochenfläche sowie zur Auswertung der Gefäßdichte.

Wie in *Abbildung 16* zu sehen ist, war in den Gruppen die osteoinduktive Faktoren enthielten (Gruppe A:  $64,19 \pm 7,07 \text{ mm}^2$ ; Gruppe B  $59,26 \pm 7,49 \text{ mm}^2$ ; Gruppe C  $69,64 \pm 8,92 \text{ mm}^2$  und Gruppe D:  $64,97 \pm 6,85 \text{ mm}^2$ ) die Clotfläche größer (bei Gruppe C und D signifikant) als in den zwei übrigen Gruppen (Gruppe E:  $41,97 \pm 8,52 \text{ mm}^2$  und Gruppe F:  $25,49 \pm 18,26 \text{ mm}^2$ ). Untereinander verglichen, konnte in den Gruppen mit AVL (Gruppen A und C) eine nicht signifikant größere Gewebefläche nachgewiesen werden als in den Gruppen ohne AVL (Gruppen B und D). Genauso verhielt sich auch die Gruppe mit der Matrix ohne MSCs und BMP2 (Gruppe E) zur Negativkontrolle (Gruppe F). Des Weiteren konnte keine signifikante Zunahme der Clotgröße in den Gruppen mit und ohne AVL zwischen den 10 Tagen und 12 Wochen Explantationszeiträumen beobachtet werden.



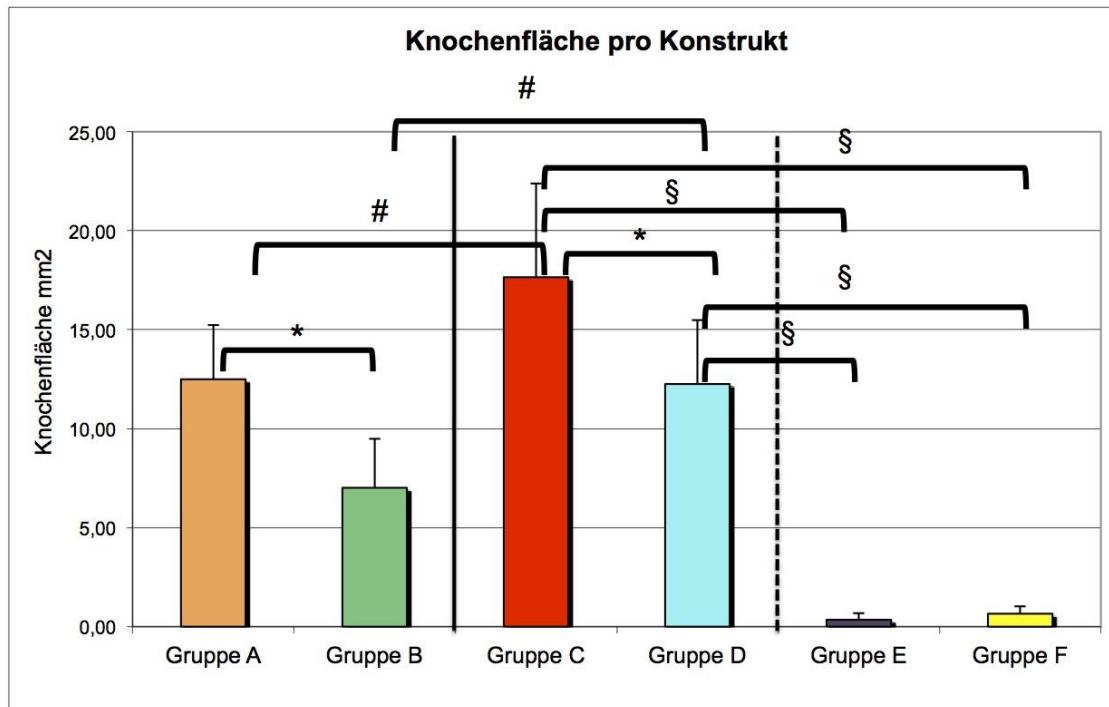
**Abbildung 16:** Durchschnittliche Konstruktfläche der Explantate (ohne Femuranteile): Die Konstruktflächen der Gruppen C und D sind jeweils signifikant größer (§), als die Flächen der Gruppen E und F. Auch in Gruppe E ist gegenüber Gruppe F die Konstruktfläche signifikant größer.

### Knochenbildung

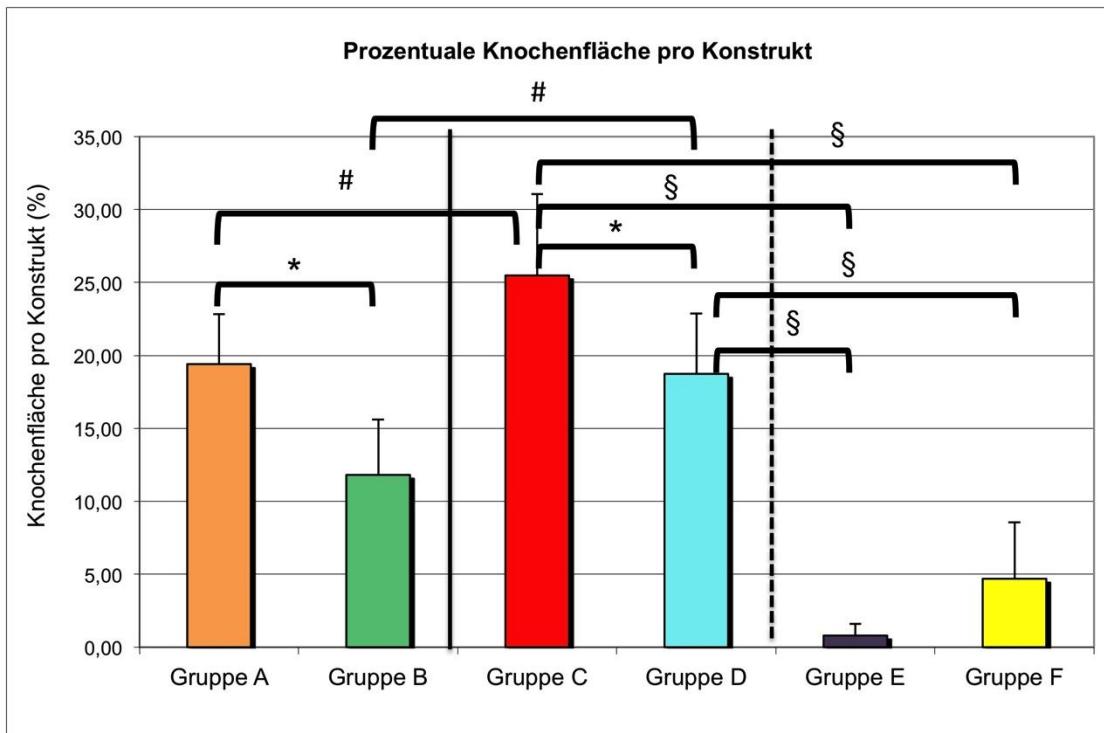
Zur quantitativen Bestimmung der gebildeten Knochenfläche wurde auf den Übersichtsaufnahmen jedes HE-gefärbten sagittalen Schnitts der gebildete Knochen computergestützt/semiautomatisch zweidimensional markiert und berechnet.

Die ausgezählte Fläche wurde im Verhältnis zu der gesamten Clotfläche und als Absolutwert verglichen. Die absoluten Knochenflächen pro Gruppe sind in *Abbildung 17* dargestellt, der prozentuale Anteil in *Abbildung 18*. Es zeigte sich, dass sowohl zehn Tage post operationem wie auch zwölf Wochen post operationem in den Gruppen mit AVL signifikant mehr Knochen gebildet wurde als in dem Pendant ohne AVL (Gr. A:  $12,50 \pm 2,75 \text{ mm}^2$ ; Gr. B:  $7,02 \pm 2,46 \text{ mm}^2$ ) (Gr. C:  $17,65 \pm 4,74 \text{ mm}^2$ ; Gr. D:  $12,26 \pm 3,22 \text{ mm}^2$ ). Die gleiche Verteilung zeigte sich auch bei den prozentualen Knochenflächen (Gr. A:  $19,41 \pm 3,43 \%$  Knochenfläche; Gr. B:  $11,81 \pm 3,78 \%$  Knochenfläche) (Gr. C:  $25,48 \pm 5,57 \%$  Knochenfläche; Gr. D:  $18,74 \pm 4,12 \%$  Knochenfläche) (Abb. 19). Im Hinblick auf den Explantationszeitpunkt war nach zwölf

Wochen signifikant mehr absolute und prozentuale Knochenfläche gebildet worden als in der vergleichbaren Gruppe nach zehn Tagen. In allen Gruppen mit MSCs und BMP-2 (Gruppen A bis D) konnte signifikant mehr Knochen nachgewiesen werden als in den Gruppen E und F, welche sich wiederum untereinander nicht signifikant unterschieden (Gr. E:  $0,35 \pm 0,34 \text{ mm}^2$ ; Gr. F:  $0,65 \pm 0,36 \text{ mm}^2$ ). Die prozentuale Knochenfläche in der Gruppe der Negativkontrolle lag jedoch deutlich, wenn auch nicht signifikant, über der der Gruppe E (Gr. E:  $0,80 \pm 0,78 \%$  Knochenfläche; Gr. F:  $4,70 \pm 3,85 \%$  Knochenfläche).



**Abbildung 17:** Durchschnittliche Knochenfläche pro Konstrukt. Sowohl zwischen den Gruppen mit bzw. ohne Gefäßschleife untereinander (Gruppen A gegen B; C gegen D) (\*), als auch zu den unterschiedlichen Explantationszeitpunkten (Gruppe A gegen C; B gegen D) (#) ist ein signifikanter Unterschied der gebildeten absoluten Knochenflächen zu verzeichnen. Auch bei den Gruppen C und D sind jeweils signifikante Knochenflächenunterschiede zu den Gruppen E und F vorhanden (§).

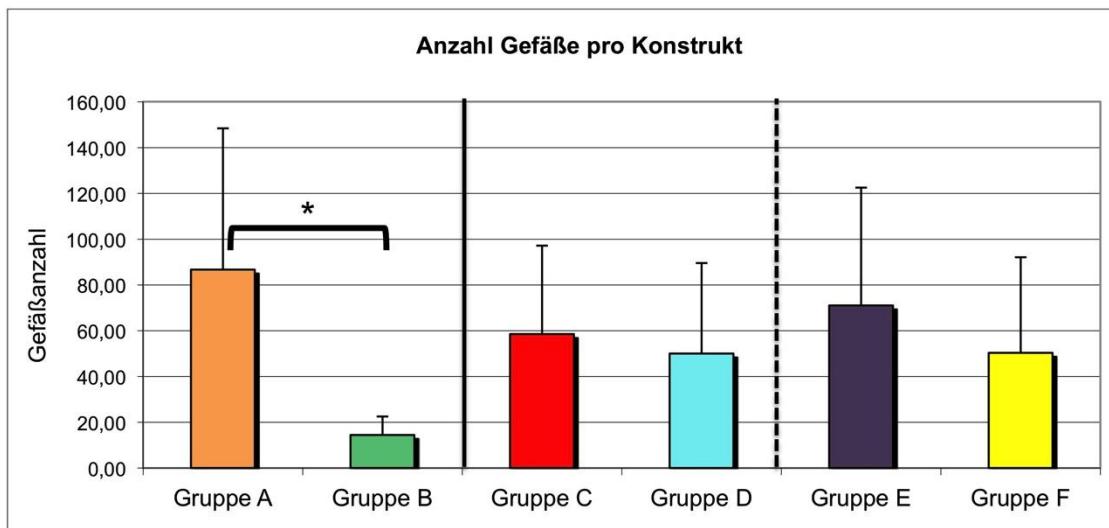


**Abbildung 18:** Prozentualer Anteil der Knochenfläche an der Konstruktfläche: Sowohl zwischen den Gruppen mit bzw. ohne Gefäßschleife (Gruppen A gegen B; C gegen D) untereinander (\*), als auch zu den unterschiedlichen Explantationszeitpunkten (#) (Gruppe A gegen C; B gegen D) ist ein signifikanter Unterschied der prozentualen Knochenflächen zu verzeichnen. Auch bei den Gruppen C und D sind jeweils signifikante Knochenflächenunterschiede zu den Gruppen E und F vorhanden (§).

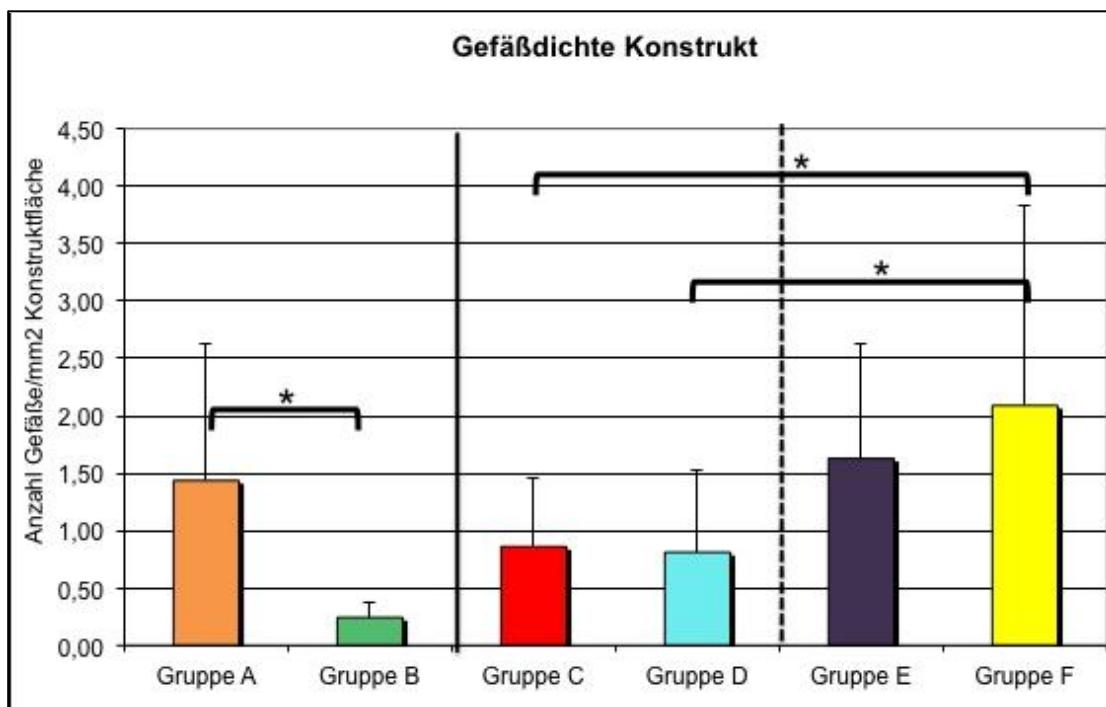
### Vaskularisation

Zehn Tage nach Defektgenerierung konnten in der Gruppe mit AVL signifikant mehr Gefäße nachgewiesen werden als in der Gruppe mit rein extrinsischer Vaskularisation (Gr. A:  $86,65 \pm 61,76$  Gefäße/Konstrukt; Gr. B:  $14,44 \pm 8,02$  Gefäße/Konstrukt) (Abbildung 20). Auch die Gefäßdichte der beiden Gruppen unterschied sich signifikant (Gr. A:  $1,44 \pm 1,19$  Gefäße/ $\text{mm}^2$ ; Gr. B:  $0,24 \pm 0,13$  Gefäße/ $\text{mm}^2$ ) (Abb. 21).

Nach zwölfwöchiger Implantationszeit im Defekt war dieser Unterschied sowohl bezüglich der absoluten Gefäßbildung (Gr. C:  $58,5 \pm 38,73$  Gefäße/Konstrukt; Gr. D:  $50,00 \pm 39,40$  Gefäße/Konstrukt), wie auch bei der Gefäßdichte (Gr. C:  $0,86 \pm 0,61$  Gefäße/ $\text{mm}^2$ ; Gr. D:  $0,81 \pm 0,71$  Gefäße/ $\text{mm}^2$ ) nicht mehr signifikant. Während sich die absolute Gefäßzahl der Gruppen ohne osteogene Faktoren nicht signifikant von den Werten der übrigen Zwölf-Wochen-Gruppen unterschieden (Gr. E:  $71,00 \pm 51,42$



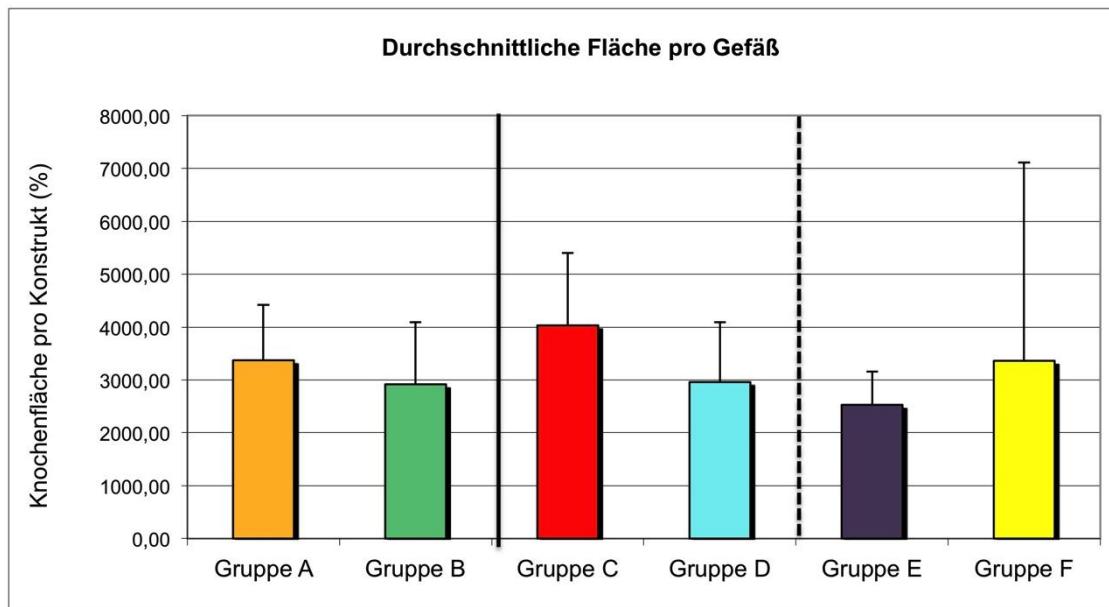
**Abbildung 19:** Absolute Anzahl der Gefäße pro Konstrukt. Unter den Zehn-Tage-Gruppen wurden in der Gruppe mit Gefäßschleife (Gruppe A) signifikant mehr Gefäße gebildet als in der Gruppe ohne Gefäßschleife (B). Nach zwölfwöchiger Implantationszeit sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.



**Abbildung 20:** Prozentuale Gefäßanzahl in Abhängigkeit zu der Konstruktfläche. Unter den Zehn-Tage-Gruppen wurden in der Gruppe mit Gefäßschleife (Gruppe A) prozentual signifikant mehr Gefäße gebildet als in der Gruppe ohne Gefäßschleife (Gruppe B). Die dichteste Gefäßverteilung ist in Gruppe F zu finden, in der im Vergleich zu den Gruppen C und D prozentual signifikant mehr Gefäße gebildet wurden.

Gefäße/Konstrukt; Gr. F:  $50,30 \pm 41,72$  Gefäße/Konstrukt) lag die Gefäßdichte bei Gruppe E nur deutlich, bei Gruppe F auch signifikant über den Werten der Vergleichsgruppen C und D (Gr. E:  $1,63 \pm 1,00$  Gefäße/mm<sup>2</sup>; Gr. F:  $2,09 \pm 1,74$  Gefäße/mm<sup>2</sup>).

Die Größe der Gefäße unterschied sich zwischen allen Gruppen nicht signifikant (*Abbildung 21*). In den Gruppen mit AVL wurden jedoch größere Gefäße beobachtet als in den Gruppen ohne AVL sowohl zum zehntägigen, als auch zum zwölfwöchigen Explantationszeitpunkt. (Gr. A:  $3372,15 \pm 1046,94$  µm<sup>2</sup>; Gr. B:  $2917,31 \pm 1173,25$  µm<sup>2</sup>; Gr. C:  $4031,90 \pm 1370,35$  µm<sup>2</sup>; Gr. D:  $2960,08 \pm 1136,54$  µm<sup>2</sup>). Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe F und der Gruppe E beobachtet werden (Gr. E:  $2529,10 \pm 629,59$  µm<sup>2</sup>; Gr. F:  $3361,90 \pm 3746,64$  µm<sup>2</sup>).



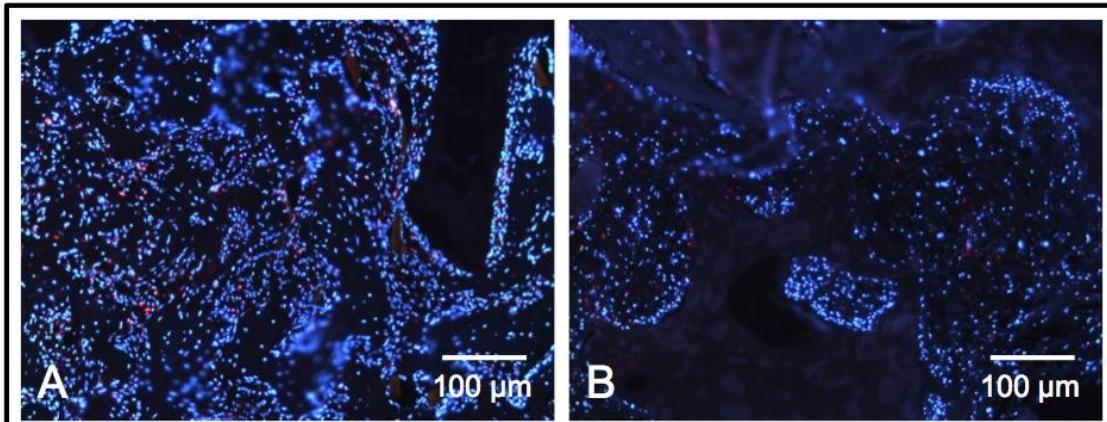
**Abbildung 21:** Durchschnittliche Fläche eines Gefäßanschnitts. Tendenziell sind die Gefäße in den Gruppen mit Gefäßschleife größer als in den Gruppen ohne Gefäßschleife, jedoch ohne statistische Signifikanz. Insgesamt sind jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gefäßfläche zwischen allen Gruppen nachweisbar.

## 5.2 Fluoreszenzhistologie

Sowohl zehn Tage als auch zwölf Wochen nach Defektgenerierung waren, wie in *Abbildung 22* zu sehen, die DiI-markierten MSCs im Konstrukt als rot fluoreszierende Zellen nachweisbar. Die Verteilung der MSCs war in allen Gruppen homogen.

Objektiv konnten nach zehn Tagen in der Konstruktmitte der Gruppe A mehr vitale Zellen beobachtet werden, als in denselben Bereichen der Gruppe B. In der Peripherie war in beiden Gruppen vitale Zellen nachweisbar.

Nach zwölf Wochen konnte weder peripher noch zentral ein Unterschied des Zellüberlebens festgestellt werden.



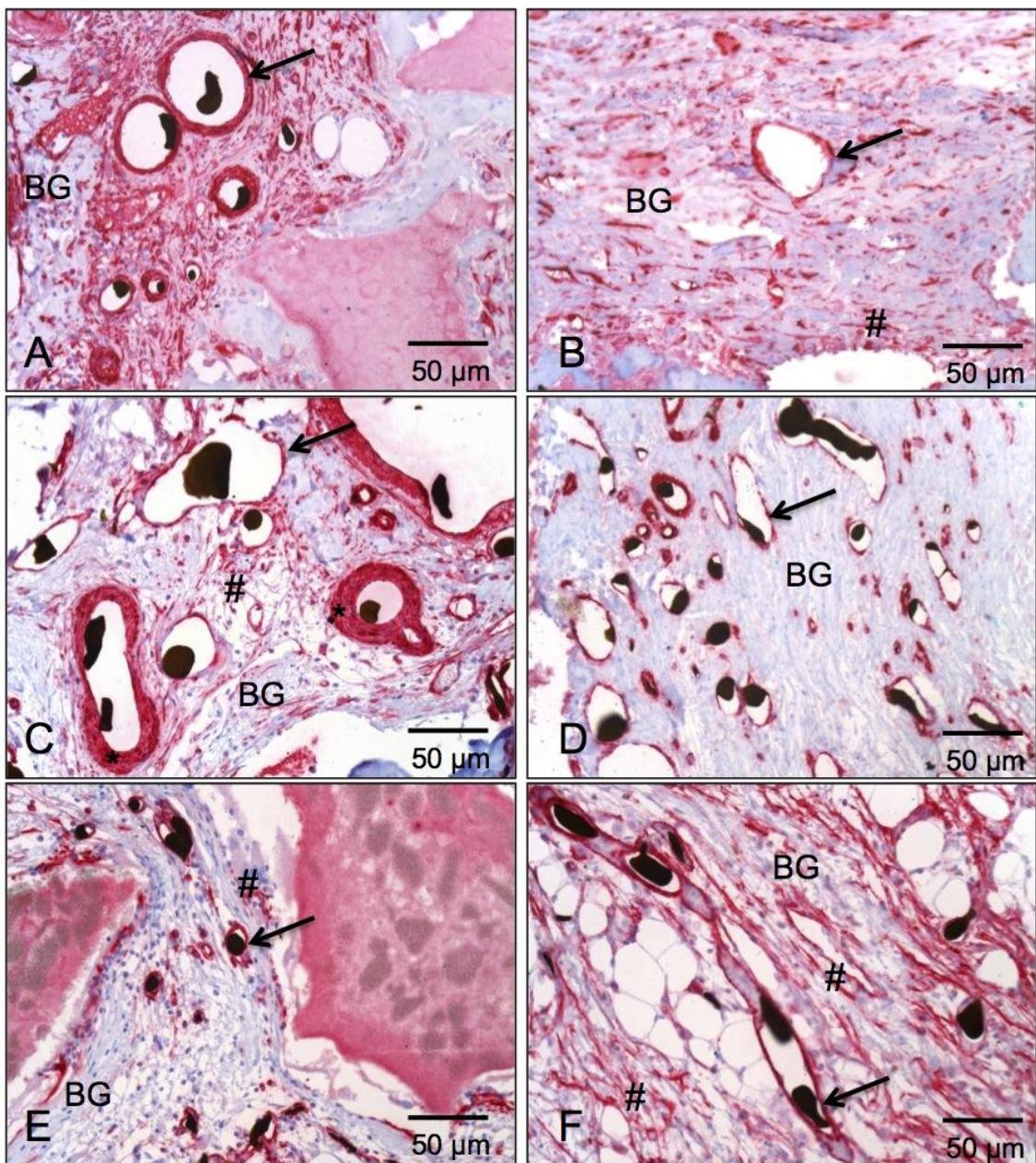
**Abbildung 22:** Fluoreszenzfärbung: Nachweis der markierten mesenchymalen Stammzellen und deren Verteilungsmuster zum Explantationszeitpunkt von zehn Tagen: Mit DiI markierte mesenchymale Stammzellen (MSCs) (rot), Kernfärbung mit DAPI (blau), schwarze Bereiche entsprechen der  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatitkeramik. Feld A zeigt ein hohes Zellaufkommen wie auch vitale MSCs der Gruppe A (mit Gefäßschleife) auch in den zentralen Anteilen der Konstrukte. In Gruppe B (ohne Gefäßschleife; Feld B) sind insgesamt weniger vitale Zellen im zentralen Bereich der Konstrukte nachweisbar.

### 5.3 Immunhistologie

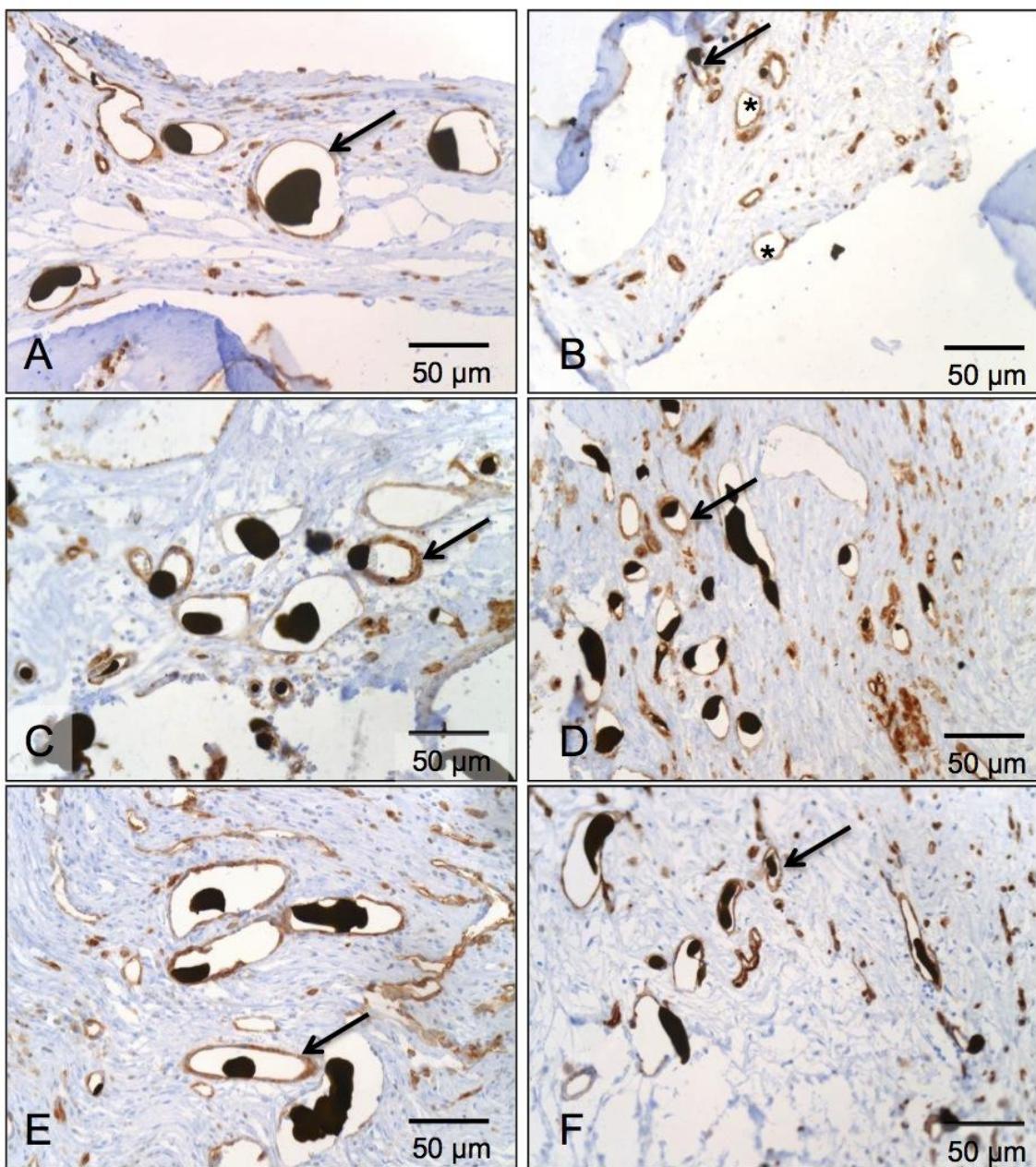
Mit Hilfe der ASMA-Färbung konnten bei allen Gruppen glatte Muskelzellen in den Gefäßwänden nachgewiesen werden (Abbildung 23). Dabei traten in Gruppe C teilweise unterschiedlich dicke Muskelanteile der Gefäßwände auf (Abbildung 23C). Des Weiteren waren bei allen Gruppen, aber vor allem in Gruppe F im vaskularisierten Bindegewebe glatte Muskelzellen zu sehen (Abbildung 23F).

Mit der Lectin-Färbung können die Endothelzellen in den Gefäßen braun dargestellt werden (Abbildung 24). Hier war in Gruppe B deutlich zu erkennen, dass peripher Gefäße vorhanden sind, die jedoch nicht mit Microfil gefüllt waren (Abbildung 24B).

Die ED1-Färbung diente zum Nachweis von Makrophagen. In allen Gruppen konnten keine Riesenzellen sowie keine Fremdkörperreaktion gefunden werden.



**Abbildung 23:** ASMA-Färbung: Detailaufnahmen in 200facher Vergrößerung. Felder A bis F entsprechen den Gruppen A bis F. In den Gruppen mit Gefäßschleife (Gr. A und C) sind mehr reife Gefäße zu sehen, die zum Explantationszeitpunkt von zwölf Wochen auch eine dickere Gefäßwand aufweisen. In den anderen Gruppen, aber vor allem in den Gruppen B und F liegen im Bindegewebe einige unreife Gefäße. Markierungen: schwarzer Pfeil = glatte Muskelzelle im Gefäß, # = glatte Muskelzellen im Bindegewebe, BG = Bindegewebe, \* = dicke Gefäßwand.

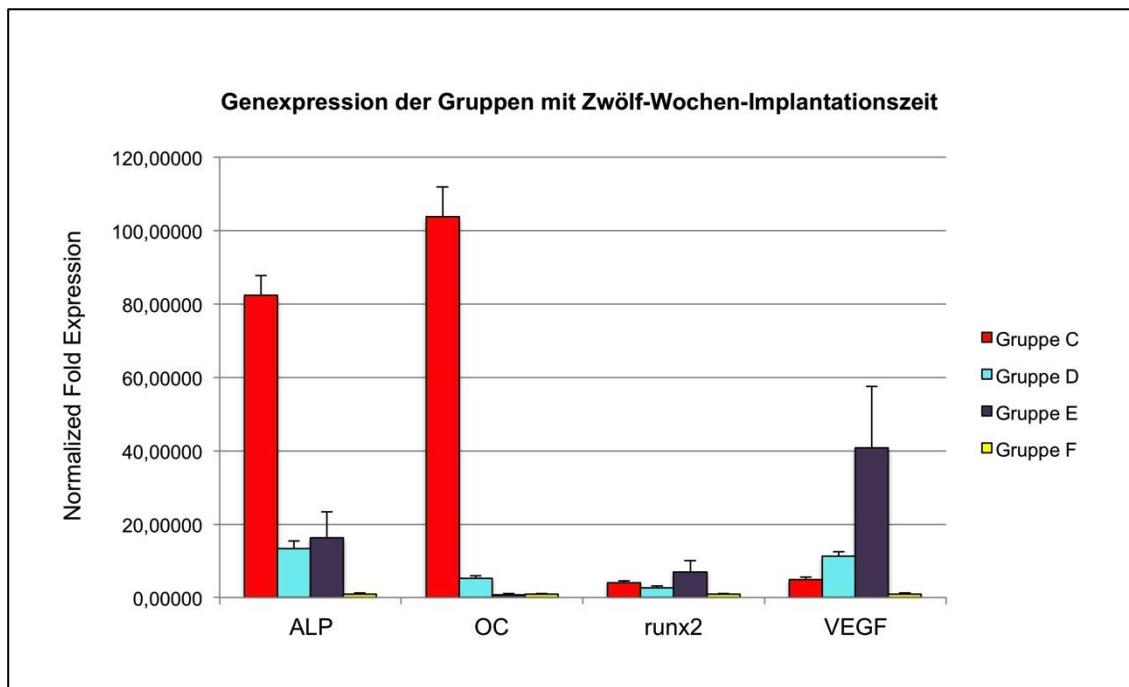


**Abbildung 24:** Lectin-Färbung: Darstellung der Endothelzellen auf Detailaufnahmen in 200facher Vergrößerung. Felder A bis F entsprechen den Gruppen A bis F. In allen Gruppen waren die Gefäße mit Endothelzellen ausgekleidet. Vor allem in Gruppe B (ohne Gefäßschleife nach zehntägiger Implantationszeit) sind einige Gefäße zu sehen, die nicht mit Microfil gefüllt sind (\*). Markierungen: schwarzer Pfeil = Endothelzellen, \* = Gefäße die nicht mit Microfil perfundiert wurden.

## 6. Ergebnisse der molekularbiologischen Auswertung (PCR)

Für die Quantifizierung der Ergebnisse aus der PCR-Analyse wurde mit Hilfe der delta delta CT-Methode die unterschiedliche Expression als n-fache Expression der Kontrollgruppe (Gruppe F, Negativkontrolle) von alkalischer Phosphatase (ALK), Osteocalcin (OC), Osteopontin (OP), „runt-related transcription factor 2“ (RUNX2) und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) berechnet. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 25* dargestellt.

Die Werte der Gruppen C und D lagen bei der Expression von Knochenmarker ALP, OC und RUNX2 über den in der PCR nachgewiesenen Werten der Kontrollgruppe (F). Gruppe C (mit AVL) exprimierte deutlich mehr ALP und OC als Gruppe D (ohne AVL). VEGF wurde dahingegen mehr in Gruppe D nachgewiesen.



**Abbildung 25:** Darstellung der Genexpression nach zwölf Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe (F). Sowohl die Gruppe C (mit Gefäßschleife) als auch die Gruppe D (ohne Gefäßschleife) zeigen ein deutlich erhöhtes Knochengenexpressionsmuster. Die VEGF-Expression ist in Gruppe E am höchsten.

## V. DISKUSSION

Das Potential zur Defektüberbrückung eines künstlich generierten Gewebes aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatitkeramik (HA/ $\beta$ -TCP), dem Wachstumsfaktor „bone morphogenetic protein 2“ (BMP-2) und mesenchymalen Stammzellen („mesenchymal stem cells“ = MSCs) sollte in Abhängigkeit seiner Vaskularisation mit und ohne AVL untersucht werden. Zur Prävaskularisation wurden dazu die Konstrukte entweder mit oder ohne AVL heterotop unter die Haut in der Leiste der Ratte implantiert. Nach sechs Wochen konnte das prävaskularisierte Konstrukt (in der Gruppe mit AVL (A und C) gestielt) in einen Femurdefekt kritischer Größe eingebracht und befestigt werden. Die knöcherne Überbrückung sowie die Gefäßanbindung des Konstrukts an das bestehende Knochengewebe wurde bei zwei Gruppen zehn Tage und bei vier Gruppen zwölf Wochen nach Defektgenerierung an Hand histologischer Präparate und bildgebender Methoden evaluiert.

### 1. Beurteilung des Tiermodells

In dieser Studie wurden zwei bereits bei der Ratte etablierte Modelle, das AV-Loop-Modell und ein Femurdefektmodell, kombiniert und in leicht abgewandelter Form an männlichen Lewis-Ratten eingesetzt. Damit sollte das Potential eines prävaskularisierten, künstlich generierten Gewebes zur Defektüberbrückung erprobt werden.

#### 1.1 Beurteilung der verwendeten Tiermodelle

Die Lewis-Ratte wurde in den frühen 1950er Jahren von Dr. Lewis aus dem Wistar-Rattenstamm gezüchtet und wird auch auf Grund ihres gutmütigen Verhaltens gerne in der Forschung eingesetzt. Männliche Ratten haben für das Modell im Wesentlichen drei Vorteile: Sie unterliegen im Vergleich zu weiblichen Tieren keinen zyklischen Schwankungen, zeigen eine schnellere Knochenheilung, und erreichen ein höheres Gewicht, was letztendlich der entscheidende Faktor ist (MEHTA et al., 2010). Dieser Vorzug zeichnet sich im Defektmodell durch die Möglichkeit der leichteren Generierung größerer Defekte, das einfachere Handling sowie die Verfügbarkeit der Fixierungssysteme aus. Generell bieten größere Tiere auch längere und voluminösere Gefäße für die Konstruktion der Gefäßschleife. Sie haben darüber hinaus mehr Platz um große Konstrukte unter der Haut zu züchten. Um die Frakturheilung bei erwachsenen Menschen besser imitieren zu können, sollten nur Tiere in einem Alter verwendet

werden, bei denen das Knochenwachstum bereits abgeschlossenen ist (HISTING et al., 2011). Deshalb wurde darauf geachtet, dass bei Defektgenerierung alle Ratten ein Gewicht über 400 g aufweisen konnten. Auch hinsichtlich der Art der Knochenheilung unterscheiden sich die Kleinnager von Menschen, da sie eine primitivere Knochenstruktur ohne Havers-System besitzen. Die bei Ratten beobachtete Knochenremodellierung über Resorptionshöhlen ist jedoch vergleichbar mit dem Haversschen Knochenremodelling bei Großtieren (NUNAMAKER, 1998). Auf Grund dieser Besonderheit sollten Ratten deshalb zwar nicht von Experimenten zur Frakturheilung ausgeschlossen werden, dennoch ist die klinische Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf den Menschen limitiert.

Das AVL-Modell bei dem aus Femoralarterie und -vene durch Zwischenschaltung der Femoralvene der Gegenseite eine Gefäßschleife konstruiert wird, ist bei Ratten bereits bestens etabliert. Durch Kollateralen kann die untere Extremität ausreichend durchblutet werden und das Shuntvolumen hat keine negativen Einflüsse auf das Herzkreislaufsystem. Dieses Modell bietet eine sehr gute Möglichkeit künstlich generierte Gewebekonstrukte von vornherein auch im Inneren ausreichend zu vaskularisieren. Es stellt allerdings hohe Anforderungen an die mikrochirurgischen Fähigkeiten des Operateurs. Ein einfacherer Gefäßanschluss stellt das Gefäßbündel dar, bei dem Femoralarterie und -vene als Einheit freipräpariert und dargestellt werden. Nach Ligatur und Abtrennung der distalen Enden kann der Bündel in das Konstrukt eingelegt werden, erzielt jedoch eine weniger gute Vaskularisierung als der AVL (TANAKA et al., 2003). Die Entscheidung fiel daher zugunsten des AVL, zumal die vorliegende Studie mitunter auf Ergebnissen über Vaskularisation und Knochenbildung aus einem AVL-Modell aufbaut (ARKUDAS et al., 2012). Der AVL wurde zusammen mit einer mit MSCs besiedelten Matrix aus HA/β-TCP und BMP-2 beladenem Fibrin in eine perforierte Kammer gegeben und in einer ersten Operation subkutan in die linke Leiste der Ratte implantiert. Durch die Möglichkeit der Interaktion des Kammerinhaltes mit dem umgebenden Gewebe ist dieses Modell nicht für Untersuchungen hinsichtlich der rein intrinsischen Angiogenese, der Dosisfindung verschiedener Wachstumsfaktoren oder des Zellüberlebens in kontrollierter Umgebung geeignet. In den meisten Untersuchungen werden durch eine Isolationskammer standardisierte Verhältnisse innerhalb des Konstruktts geschaffen werden (TANAKA et al., 2003; ARKUDAS et al., 2007a; ARKUDAS et al., 2007b; ARKUDAS et al., 2009b; DOLDERER et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie bewusst der Vorteil der zusätzlichen

vaskulären Versorgung von außerhalb des Konstrukts genutzt, worauf später näher eingegangen werden soll. Dank der direkten Lokalisation des AVL über dem Femur ist es bei der Ratte möglich, das Konstrukt gestielt in den generierten Femurdefekt zu schwenken. Eine zeitaufwändige zweite mikrochirurgische Gefäßanbindung, wie sie bei einer freien Transplantation unerlässlich wäre, war somit nicht nötig. Die Gefahr einer Thrombosierung durch die weitere Anastomose wurde zwar vermieden, ist hier aber andererseits durch das mögliche Abknicken (Kinking) des Stiels weiter existent. Im Großtiermodell, wie auch später im klinischen Einsatz, ist es jedoch oft nicht möglich eine Gefäßschleife in direkter Nähe zu dem Defektbereich zu generieren. Nicht sinnvoll wäre eine solche Lokalisierung der Gefäßschleife auch aufgrund einer Infektion oder Bestrahlung des Empfängerbetts. Dies zeigt die Modellhaftigkeit dieses Versuches und erfordert auch bei der Ratte eine freie Transplantation des Gewebeimplantats in den Defekt.

Der critical size defect (CSD) eignet sich besonders gut um die Knochenheilung zu untersuchen. Er ist als Defekt kritischer Größe definiert, der ohne operative Intervention innerhalb der durchschnittlichen Lebenszeit eines Patienten nicht von alleine heilt (SCHMITZ & HOLLINGER, 1986). Dadurch kann eine natürliche Knochenheilung in diesem Modell ausgeschlossen werden. Problematisch dabei ist jedoch die Standardisierung der Größe für einen Defekt am Femur der Ratte. Unterschiedliche Arbeitsgruppen sprechen bei einer Länge von 5 mm bis 10 mm von einem CSD (VOGELIN et al., 2005; MEINEL et al., 2006; KIRKER-HEAD et al., 2007; DROSSE et al., 2008; ZHAO et al., 2009; ZHANG et al., 2010) und konnten sich bis jetzt über eine einheitliche Defektstrecke nicht einig werden. Der hier gewählte Defekt von 10 mm Länge stellt bei der Ratte mit einer Femurlänge von etwa 37 mm (RUPP et al., 2007) 27 % des Knochens dar. Dies entspricht einer Defektgröße von über 12 cm an einem menschlichen Femur und beschreibt damit einen realistischen Defekt nach Tumorresektion. Für die Übertragbarkeit in die klinische Anwendung wäre es auch denkbar, noch größere Defekte am Rattenfemur zu untersuchen, da auch beim Menschen Defekte über 12 cm auftreten. Allerdings sind mit der Wahl von 10 mm die Möglichkeiten, den Defekt durch eine innere Fixierung stabil zu überbrücken, bei der Lewis-Ratte weitgehend ausgeschöpft. Demgegenüber konnten andere Arbeitsgruppen bei geringeren Defektstrecken durch das Ausbleiben der Heilung Charakteristika eines CSD nachweisen, wobei Ratten unterschiedlichen Alters und Geschlechts sowie verschiedene Stämme eingesetzt wurden. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der

Studien und fordert die individuelle Definition eines CSD für jede Studie. Es muss außerdem bedacht werden, dass das präzise Herausfräsen eines Knochensegments in Form und Ausdehnung meist nicht den entstandenen Defekt einer klinischen Situation wiederspiegelt. Dies unterstreicht die Modellhaftigkeit dieser Versuche, erfüllt aber zugleich die obligatorische Forderung der Standardisierbarkeit von Tierstudien (HISTING et al., 2011).

Auch für die Fixierung der Femurdefekte wurden viele unterschiedliche Techniken an der Ratte beschrieben und gegeneinander getestet (JÄGER et al., 2005; VOGELIN et al., 2005; MEINEL et al., 2006; KIRKER-HEAD et al., 2007; DROSSE et al., 2008; ZHAO et al., 2009; ATESOK et al., 2010; ZHANG et al., 2010). Die Auswahl der beschriebenen Fixationssysteme ermöglicht es letztendlich, die Wahl des Systems individuell an die gegebene Fragestellung anzupassen. Ein Vergleich der Ergebnisse zwischen den unterschiedlich angewandten Methoden ist jedoch nur schwer bis unmöglich zu ziehen. Auch in dieser Studie wurde das System den Anforderungen angepasst. So war es nötig, einen Defekt von 10 mm zu stabilisieren und gleichzeitig eine granulöse Matrix mit einziehendem AVL erst zu mobilisieren und nach dem Einsetzen in den Defekt dem Knochenersatzmaterial Halt zu geben. Die Vorteile der minimalinvasiven Vorgehensweise, wie sie bei der Frakturversorgung mit einem externen Fixateur zu finden sind, konnten auf Grund des Operationsvorganges nicht ausgenutzt werden. Dadurch verlor dieses Modell an Attraktivität. Deshalb wurde eine eigens konstruierte Kombination aus einer Titankammer und einer Osteosyntheseplatte verwendet. Sie beinhaltete das für die heterotope Knochenbildung etablierte Cagemode (ARKUDAS et al., 2012) und bekam als Plattenpendant zwei Flügel zur Befestigung mittels Schrauben am Femur. Für den späteren klinischen Einsatz gibt solch ein System nicht nur die Möglichkeit, das Implantat individuell dem fehlenden, zu überbrückenden Knochenteil anzupassen und das darin enthaltene Knochenersatzmaterialien zu mobilisieren (CASSELL et al., 2002). Es kann auch durch computertomographische Erfassung der erhaltenen Knochenstrukturen diesen individuell als Platte oder Hülle anliegend in Kombination mit Schrauben als Fixationssystem dienen, wie es bereits im Affenmodell Einsatz gefunden hat (ZHOU et al., 2010). Dort wurde das Knochenersatzmaterial jedoch nicht in einem Cage, sondern zwischen zwei, den Mandibularrändern angepassten und 3-D-generierten Platten befestigt. Nachdem diese Konstruktion im *M. latissimus dorsi* prävaskularisiert war, wurde sie in einen Mandibulardefekt gesetzt und mit Schrauben direkt an der

Mandibular befestigt. Trotz der sehr guten Biokompatibilität von Titan ist seine dauerhafte Existenz, bedingt durch die niedrige Abbaurate, mit Risiken der Toxizität durch Akkumulation von Metallionen durch Korrosion verbunden (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005). Eine nötige zweite Operation, um das Implantat zu entfernen gehört zu den größten Nachteilen des eingesetzten Titankäfigs und kann durch Einwachsen des Knochens in diesen zu Komplikationen bei der Entfernung führen. Durch die feste Verbindung des neu gebildeten Knochens mit den Kammermaschen, wie es hier der Fall war, musste das Konstrukt mit Hammer und Meißel aus der Kammer geschlagen, bzw. die Kammer Stück für Stück mit einem Seitenschneider von diesem abgelöst werden. Die dabei auf das Konstrukt einwirkenden Stoß- und Scherkräfte könnten sowohl die Femurkonstruktverbindung, wie auch allgemein die Knochenstruktur in Mitleidenschaft ziehen. Eine Explantation des Titankäfigs am lebenden Tier ist in diesem Fall unmöglich. Das in dieser Studie verwendete Fixationssystem wurde bisher nicht auf seine biomechanische Stabilität getestet. Dieser Sachverhalt erschwert es, die Ergebnisse zu deuten und mit anderen Studien, in denen wiederum eigene Modelle eingesetzt wurden, zu vergleichen. Da es im Studienverlauf jedoch durch die normale Belastung im Tier in keinem Fall zu einem Bruch der Plattenkammerkonstruktion kam, kann angenommen werden, dass diese an sich mechanisch stabil ist. Erschwert wird die biomechanische Untersuchung des gebildeten Femurknochens, da die Plattenkammerkonstruktion am lebenden Tier nicht entfernt und somit die mechanische Stabilität des Knochens nicht untersucht werden kann. Die biomechanische Analyse des neu gebildeten Femurs gelingt also nur nach Explantation und Entfernung der Kammer. Besonders im Hinblick auf den Einsatz im Großtiermodell, wo erheblich größere Kräfte auf die Konstruktion einwirken, sollte deshalb versucht werden, mehr über die biomechanischen Eigenschaften dieses Systems herauszufinden.

Trotz einiger Nachteile stellt die Ratte ein gutes Versuchstier für die präklinische Forschung und die Etablierung von Versuchsmodellen dar. Durch die relativ kleine Größe können die Kosten in Anschaffung, Haltung und Materialeinsatz gering gehalten werden. Dennoch ist es möglich, große Versuchsgruppen zu bilden, um ein statistisch relevantes Ergebnis zu erhalten. Im Gegensatz zu einigen Großtiermodellen, bei denen die Methoden zur Auswertung erst neu etabliert werden müssen, sind für die Ratte viele Auswertungsmethoden wie z.B. immunhistologische Färbemethoden standardisiert und die benötigten Materialien (z.B. Antikörper) leicht verfügbar. Beschränkend ist die

Größe der Ratte jedoch, wenn Konstrukte in einer klinisch relevanten Größe gezüchtet werden sollen. Dies fordert die Übertragung der Versuche auf ein Großtiermodell, bevor relevante Aussagen zum Einsatz am Menschen getroffen werden können.

## 1.2 Beurteilung des Tiermodells hinsichtlich der Ergebnisse

Der erste *in vivo*-Schritt des Versuchs war die subkutane Implantation der unterschiedlichen Konstrukte. Dabei wurde die Implantationskammer bei den ersten Tieren mit einem nichtresorbierbarem 3-0 Faden an der Adduktorenfaszie fixiert und mit demselben Faden der Deckel daran angenäht. Während der sechswöchigen Prävaskularisationszeit wurde bei zwölf Tieren ein Durchbruch eines Deckelfixierungsknoten oder eines Kammerstücks beobachtet. Die ständige Reibung des Fadens oder des Kammerrands während der Bewegungen der Ratte kann zu einer Ausdünnung der Haut über dem Implantat führen. Zu hoher Reibungsdruck oder mechanische Belastung behindern die Blutversorgung des beanspruchten Gebiets, sodass die Hautzellen auf Grund von Sauerstoffmangel absterben und die Haut auseinander weicht. Verstärkend wirken dabei die Größe sowie die Rauigkeit des Implantats und die Lokalisation an dünnen, physiologisch stark beanspruchten Hautstellen. Um diese Nekrosereaktion einzudämmen und einer möglichen Infektion von außen vorzubeugen, wurde im weiteren Versuchsverlauf die Kammer näher in der Leistenregion befestigt, ein dünnerer 6-0 Faden verwendet und bei der Unterhautnaht mehr Gewebe über die Kammer gezogen. Durch diese Hautverstärkung über der Kammer konnten solche Komplikationen erfolgreich verhindert werden.

In fünf Fällen, bei denen die Kammer oder der Faden durchgebrochen waren, konnte bei Explantation eine nekrotische Veränderung um die Kammer verzeichnet werden. Durch den Kontakt der Kammer mit dem Fell der Ratte oder der Einstreu des Käfigs könnte es zur Besiedelung mit Bakterien gekommen sein, die nach Vermehrung im Defektbereich eine Infektionsreaktion mit nekrotischem Zelluntergang hervorgerufen hat. Bei elf Tieren mit intakter Haut kam es jedoch auch zu nekrotisch-lytischen Veränderungen der Muskulatur über der Kammer. Ein möglicher Grund dafür wäre eine zu feste Naht der Muskulatur, sodass der Zelluntergang auf einer verminderten Sauerstoffzufuhr wegen mangelnder Durchblutung der Muskelbereiche beruht. Nur bei zwei Tieren mit Hautdurchbruch konnte im Konstrukt histologisch eine Infektion nachgewiesen werden. Dadurch muss die Theorie der Infektion von außen angezweifelt werden. Im Allgemeinen kam es jedoch bei keinem Tier der Gruppen mit AVL zu einer histologisch

sichtbaren Infektion des Konstrukts. Dies könnte der schnelleren Immunantwort auf Grund der verbesserten Vaskularisation zugeschrieben werden.

## 2. *Vaskularisation*

Die Vaskularisation stellt eine unabdingbare Voraussetzung für das Überleben von Gewebe dar. Dabei entscheidet die adäquate Durchblutung eines künstlich generierten Konstrukts über dessen Funktionalität und dessen Potential, in einem Empfängergewebe integriert zu werden. Für das Überleben und Einwachsen großer dreidimensionaler Implantate ist sowohl ein mikrovaskuläres Netzwerk wie auch eine makroskopische Zirkulation erforderlich, um eine komplette Vaskularisation des Gewebes gewährleisten zu können.

Eine solche makroskopische axiale Gefäßkonfiguration stellt der AVL dar, wie er auch in diesem Versuch verwendete wurde. In zahlreichen Studien konnte dem AVL durch Induktion eines neuen Gefäßnetzwerks eine gesicherte Neovaskularisation dreidimensionaler Konstrukte nachgewiesen werden (EROL & SPIRA, 1979; MIAN et al., 2000; KNESER et al., 2006a; POLYKANDRIOTIS et al., 2006b; ARKUDAS et al., 2007a). Eine 9 mm x 5 mm große spongiöse Knochenmatrix allein durch einen AVL komplett zu vaskularisieren dauerte acht Wochen (KNESER et al., 2006a). Auch Arkudas et al. konnten durch  $\mu$ CT-Aufnahmen die vollständige Vaskularisation einer 1 cm<sup>3</sup>-großen HA/ $\beta$ -TCP-Matrix, wie sie in dieser Studie verwendet wurde, sowohl mit, als auch ohne angiogene Wachstumsfaktoren erst nach achtwöchiger Implantationszeit nachweisen (ARKUDAS et al., 2010). Limitierende Faktoren bei der Anwendung des AVL stellen dadurch die Vaskularisation größerer Matrixvolumina und die möglichst kurze Prävaskularisationsphase dar. Diese werden im Hinblick auf den Einsatz in der Klinik angestrebt. Eine weitere Möglichkeit ist die axiale Vaskularisation von Konstrukten über ein eingelegtes Gefäßbündel. Sowohl Tanaka et al. wie auch Polykandriotis et al. zeigten jedoch, dass unter den axialen Gefäßträgern der AVL dem Gefäßbündel bezüglich Gewebebildung und Vaskularisierung überlegen ist (TANAKA et al., 2003; POLYKANDRIOTIS et al., 2006b). Derzeit wird bei den meisten Tiermodellen im TE das gezüchtete Gewebe durch eine extrinsische Angiogenese vaskularisiert. Hierbei werden die eingewachsenen Gefäße bei einer möglichen späteren Transplantation jedoch wieder durchtrennt, so dass sie vom umliegenden Gewebe erst wieder neu gebildet werden müssten, so dass eine Transplantation dieser Konstrukte

unter Erhaltung des Neogefäßnetzwerks nicht möglich ist. Durch die Kombination des AVL (intrinsische Vaskularisierung) mit der im TE am häufigsten verwendeten Vaskularisationsform, dem extrinsischen Einsprossen neuer Gefäße, kann eine schnellere und verbesserte Durchblutung des künstlich generierten Gewebes erzielt werden (HOFER et al., 2003; DOLDERER et al., 2010; ARKUDAS et al., 2012). Arkudas et al. konnten in einem Konstrukt, das die gleiche Dimension hatte wie das in dieser Studie verwendete, bereits nach zwei Wochen einen Gefäßanschluss an den AVL von über 83 % verzeichnen. Dieser stieg bis in die achte Woche nach Implantation auf 97 % an (ARKUDAS et al., 2012). Durch die in dieser Studie eingesetzte perforierte Kammer konnte von dem schnellen Anschluss der peripher einsprossenden Gefäße an den AVL profitiert werden. Dadurch ist eine Transplantation des Konstrukts ohne Verlust der neu eingewachsenen Gefäße möglich. Um die Präfabrikationszeit möglichst gering zu halten, aber dennoch eine adäquate Durchblutung der Matrix zu gewährleisten, wurde hier eine Prävaskularisationszeit von sechs Wochen gewählt. Erst danach folgte die gestielte Transplantation des präfabrizierten Konstrukts in den generierten Femurdefekt.

Die Validierung der Neovaskularisation der Konstrukte erfolgte mittels histomorphometrischer Auswertung, mikrocomputertomographischer Aufnahmen der röntgenkontrastmittelgefüllten Gefäße sowie molekularbiologischer Analyse.

Zur quantitativen Beurteilung der Vaskularisation wurden die HE-gefärbten zweidimensionalen Schnitte histomorphometrisch mit Hilfe des Softwareprogramms ImageJ® (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) wie schon in früheren Studien beschrieben, ausgewertet (ARKUDAS et al., 2009a).

Unter den Konstrukten mit BMPs und MSCs (Gruppe A bis D), wiesen die beiden Gruppen mit AVL (Gruppe A und C) zu beiden Explantationszeitpunkten sowohl eine höhere Anzahl an Gefäßen auf als die Gruppen ohne AVL wie auch eine homogener Verteilung dieser im kompletten Konstrukt. Dieses erhöhte Gefäßauftreten ist einerseits zurückzuführen auf die rege angiogenetische Antwort des AVL und dessen Fähigkeit, in einer Matrix ein dichtes Gefäßnetzwerk zu generieren. Andererseits ist davon auszugehen, dass die während der sechswöchigen Prävaskularisierungsphase extrinsisch eingewachsenen Gefäße bereits Anschluss an den AVL gefunden haben und daher nach Transplantation für die Vaskularisierung erhalten bleiben.

Die Angiogenese im AVL-Modell beruht vermutlich auf der Einwirkung von erhöhtem

Scher-Stress auf die Wände der Gefäßschleife sowie der Hypoxie in der umliegenden Matrix. Diese Faktoren stimulieren die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF und bFGF. Polykandriotis et al. zeigte, dass dadurch die Aussprossung neuer Gefäßäste vorwiegend aus den venösen Bereichen des AVL induziert wird (POLYKANDRIOTIS et al., 2007). Gleichzeitig führt das chirurgische Trauma der Implantation zu lokalen, entzündlichen Prozessen mit Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen, welche wiederum die VEGF-Expression und somit die Angiogenese steigern (POLYKANDRIOTIS et al., 2007).

Die absolute Anzahl der Gefäße der AVL-Gruppen nahm zwischen den Explantationszeitpunkten von zehn Tagen bis hin zu zwölf Wochen um ein Drittel ab, während der Durchmesser der entstandenen Gefäße zugenommen hatte. Eine mögliche Erklärung dafür ist der Prozess der Angiogenese. Dabei kommt es nach einiger Zeit durch Remodellierung des neu entstandenen Kapillarnetzwerks zu einer Reifung und Anpassung der Gefäße an die Umgebung. Die Phase der Flussoptimierung ist geprägt von der Persistenz und Regression der gebildeten Gefäße. Diese organisieren sich letztendlich zu einer Hierarchie und nehmen somit in ihrer Anzahl ab, in ihrem Durchmesser jedoch zu (POLYKANDRIOTIS et al., 2007). Auch in der ASMA-Färbung konnte die Reifung der Gefäße in Gruppe C durch die Zunahme der Gefäßwandstärke nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnte bei den Gruppen ohne AVL eine Zunahme der Gefäßanzahl zwischen den Explantationszeitpunkten von zehn Tagen bis zu zwölf Wochen nachgewiesen werden. Waren nach zehn Tagen die Gefäße nur vereinzelt in den peripheren Bereichen zu finden, so erreichten sie nach zwölf Wochen auch weiter innen liegende Gebiete. Im Vergleich zu der AVL-Gruppe zeigten sich jedoch sehr dünne unreife Gefäße. Auch hier setzt direkt nach Implantation die Angiogenese durch Hypoxie im Konstrukt und die inflammatorische Reaktion des Gewebes auf das Operationstrauma ein (CASSELL et al., 2002). Da die Neovaskularisation in diesen Gruppen rein extrinsischer Natur ist, müssen die Gefäße von außerhalb der Kammer nach innen einwachsen. Zwar konnten während der Prävaskularisationsphase von außerhalb vermutlich gleichviele Gefäße einwachsen wie in den AVL-Gruppen, sie fanden jedoch keinen Anschluss an eine intrinsisch bestehende Gefäßachse. Deshalb wurden die Neogefäße bei der Transplantation aus der Leiste in den CSD von der Blutversorgung getrennt und konnten bis zehn Tage nach Defektgenerierung keinen neuen Anschluss an das Gefäßsystem finden, was zu der geringen Gefäßzahl in der

Auswertung der Gruppe B führte. Diese Theorie wird auch durch die Ergebnisse der Immunhistologie gestützt. In der Lectin-Färbung konnten in den peripheren Konstruktbereiche der Gruppe B Gefäße nachgewiesen werden, die nichtmehr an das Gefäßsystem angeschlossen waren und daher nicht mit Microfil perfundiert wurden. Nachdem der Vorgang der extrinsischen Vaskularisierung sehr langsam abläuft, ist zu vermuten, dass selbst nach zwölf Wochen noch nicht alle Bereiche erschlossen sind. Im Vergleich zu den bereits gut vaskularisierten Konstrukten der AVL-Gruppen wird in den angesprochenen Konstrukten deshalb weiter das mikrovaskuläre Gefäßnetz aufgebaut und die Organisation zu einer Hierarchie findet erst nach Erschließung aller Bereiche statt. Diese Aussage kann durch die molekularbiologische Auswertung verstärkt werden, in der im Vergleich zur Gruppe C eine höhere Expression von VEGF in der Gruppe D nachgewiesen wurde. Die Stimulation dieser Hochregulation kann den hypoxischen, schlecht vaskularisierten Stellen der Konstrukte zugeschrieben werden.

In den Explantaten ohne relevante Knochenbildung der Gruppen E und F konnte eine ähnlich hohe Gefäßanzahl beobachtet werden, die im Bezug auf die gesamte Clotfläche in Gruppe E deutlich und in Gruppe F auch signifikant über der Anzahl der in den Gruppen C und D gebildeten Gefäßen lag. Die meisten Gefäße pro Fläche wies die Gruppe ohne Kammerfüllung auf, wobei am proximalen Rand vom Femurstumpf ausgehend meist ein sehr dichtes Gefäßgeflecht in das neu gebildete Gewebe einzog. Eine Erklärung für dieses Phänomen liefert die Proliferation von Bindegewebe als Funktion der normalen Wundheilung. Dieses wächst induziert durch das chirurgische Trauma in den Defektbereich oder die Zwischenräume der Matrix ein und geht mit der regen Einsprossung neuer Kapillare einher. Zusätzlich könnte von im Markraum liegenden Gefäßen des Femurs, die nach Durchtrennung direkt an das Kamervolumen angrenzen, eine vermehrte Neovaskularisation ausgehen. Die hohe Anzahl der Gefäße in Konstrukten der Gruppe F beruht also auf dessen Zusammensetzung aus reinem, von Natur aus gut vaskularisiertem Bindegewebe. Auch in den Konstrukten der Gruppe E (Konstrukte aus HA/β-TCP und Fibrin) konnten mehr Gefäße nachgewiesen werden als in den Konstrukten der Gruppe C und D zum Explantationszeitpunkt von zwölf Wochen. Entsprechend der oben beschriebenen Wundheilung in Leerdefekten laufen hier vermutlich ähnliche Prozesse ab, wobei physiologisch betrachtet das Fibrin, welches sonst als Produkt der Gerinnungskaskade gebildet wird, aufgelöst und durch gut vaskularisiertes Bindegewebe ersetzt wird.

Werden die Gruppen D und E verglichen, die beide rein auf die extrinsische

Vaskularisierung angewiesen sind, kann in Gruppe E eine deutlich höhere Gefäßdichte verzeichnet werden. Es kann vermutet werden, dass der während der Prävaskularisationszeit entstandene Knochen in Gruppe D nach Transplantation dem Einwachsen von neuem Bindegewebe und somit dem Gefäßwachstum in gewissen Maßen Grenzen setzt, im Gegensatz zur Gruppe E, in der zu diesem Zeitpunkt sicherlich ausschließlich Bindegewebe gebildet wurde. Unklar ist dabei die Ursache für die erhöhte Expression von VEGF in Gruppe E, welche auf eine angeregte Gefäßbildung hindeutet. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre die Tatsache, dass im Vergleich zu Gruppe D die Knochenbildung hier erst nach Defektgenerierung durch das osteogene Potential der Femurfragmente eingesetzt hat. Da während dieser Aufbauphase besonders viele Gefäße an Ort und Stelle benötigt werden, könnte die Ausschüttung von VEGF hoch reguliert worden sein.

Neben der histomorphometrischen Auswertung, die auf eine zweidimensionale Ebene limitiert ist, stellt die dreidimensionale  $\mu$ CT-Technik für diese Studie eine sehr gute Möglichkeit dar, um die Vaskularisation der 3-D-Matrix zu untersuchen. Durch dieses Verfahren ist es im weiteren Verlauf weiterhin möglich, am selben Konstrukt histologisch auch die Neubildung von Knochengewebe zu evaluieren. Mit dem Einsatz von Microfil® als Kontrastmittel stellt diese Analyse eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung von Gefäßen dar und hat sich in früheren Studien bewährt (ARKUDAS et al., 2010). Nyangoga et al. untersuchten mit dieser Technik die Gefäßarchitektur von Rattenfemora. Sie konnten an gesunden Knochen im zentralen Markraum der Femurdiaphyse den longitudinalen Verlauf mindestens einer nutritiven Arterie nachweisen. Vor Eintritt in die Metaphyse teilt sich diese in zwei oder drei Zweige, bevor sie als sinusoide Kapillare die Spongiosa durchzieht (NYANGOGA et al., 2011).

Bei der Betrachtung der Mikrocomputertomographieaufnahmen zeigten sich ein oder zwei große Gefäße, die vorwiegend aus dem proximalen Femurfragment in das Konstrukt einzogen. Sie traten mit dem mikrovaskulären Geflecht in Verbindung bzw. vaskularisierten die Matrix von extrinsischer Seite. In der Gruppen C konnten reichlich, vom AVL nach innen und außen aussprießende Gefäße nachgewiesen werden. Sowohl extrinsisch aus dem umliegenden Gewebe, als auch aus dem proximalen Femurstumpf eingewachsene Gefäße fanden dabei Anschluss an den AVL. Dem hingegen zogen die Gefäße bei den Konstrukten der Gruppen D und E rein von extrinsisch nach innen ein und fanden vermutlich vereinzelt Anschluss an das proximale nutritive Gefäß des Femurs. Entsprechend des histologischen Bildes in Gruppe F zeigte auch die  $\mu$ CT-

Aufnahme ein dichtes von proximal in das Kammerlumen einziehende Gefäßgeflecht. Ursache für dieses einseitige Einziehen von Gefäßen ist möglicherweise die Durchtrennung der nutritiven Arterie im Markraum bei der Defektgenerierung. Der proximale Anteil der Arterie bleibt weiterhin an das Gefäßsystem angeschlossen und ruft eine vermehrte Neovaskularisation im angrenzenden Gewebe vor. Im Gegensatz dazu wird der distale Gefäßstumpf vermutlich teilweise oder ganz von der Blutversorgung abgetrennt, wodurch sein Potential zur Bildung neuer Gefäße stark vermindert ist.

### 3. *Mesenchymale Stammzellen*

Es ist bereits bekannt, dass die ausreichende Vaskularisierung ein Grunderfordernis für das Überleben von Zellen ist (KNESER et al., 1999). Im Rahmen dieser Studie sollte der positive Einfluss des AVL auf die Entwicklung mesenchymaler Stammzellen (MSCs) im Femurdefektmodell sowie deren Verteilung in Biomaterialien und ihr Potential, kombiniert mit BMP-2 Knochen zu bilden, untersucht werden.

MSCs stellen in der Strategie des TE von Knochengewebe eine wichtige Komponente dar, da sie gute osteogene Eigenschaften besitzen und im Gegensatz zu Osteoblasten zur asymmetrischen Zellteilung fähig sind. Sie können also entweder direkt zu Knochenzellen ausdifferenzieren und Knochen bilden oder identische Tochterzellen generieren, welche selbst wiederum Stammzelleigenschaften besitzen (PITTENGER et al., 1999). Dadurch sind sie einfach zu expandieren, was auf Grund der benötigten hohen Anzahl an Zellen für ihren Einsatz bei Knochendefekten langer Strecke von entscheidender Bedeutung ist. Der positive Effekt von MSCs auf die Knochenheilung wurde in vielen Studien sowohl im Kleintier- (MELNIKOVA et al., 2010; AGACAYAK et al., 2012) als auch im Großtiermodell (BOOS et al., 2012; CAO et al., 2012) nachgewiesen und fand Anklang im klinischen Einsatz (QUARTO et al., 2001).

In dieser Studie kamen aus dem Knochenmark der Ratte gewonnene MSCs („bone marrow-derived mesenchymal stem cells“ = BMSCs) zum Einsatz, welche zuvor auf ihr osteogenes Potential untersucht wurden. In einer Studie unserer Forschungsgruppe wurde eine HA/β-TCP-Fibrin-Matrix allein mit BMSCs oder BMP-2 und in Kombination beider Komponenten in einem heterotopen AVL-Modell gegeneinander getestet. Es konnte in allen Konstrukten Knochenbildung nachgewiesen werden. Die Knochenflächen in der Gruppe mit nur BMSCs waren primär um die Loopgefäß angeordnet und in der Gruppe mit nur BMP-2 oder BMP-2 in Kombination mit BMSCs

lagen sie generalisiert im ganzen Konstrukt verteilt. Sowohl nach sechs als auch nach zwölf Wochen konnte mit BMP-2 signifikant mehr Knochen gebildet werden als mit BMSCs allein. Da bei Kombination von BMSCs und BMP-2 fünfmal mehr Knochen gebildet wurde als mit BMP-2 alleine und das Konstrukt nahezu vollständig verknöchert war, entschieden wir uns in dieser Studie für die Kombination von fünf Millionen BMSCs mit 60 µg/ml BMP-2.

Unterschiedliche Methoden der Gewinnung von MSCs aus einem Knochenmarkaspirat und deren Kultivierung sind bereits etabliert (POLISETTI et al., 2010). Die meisten Gruppen verwenden jedoch humane MSCs und isolieren diese durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Ein weiteres, einfacheres Verfahren zur Isolation, wie es auch hier verwendet wurde, gelingt auf Grund der plastikadhärenten Eigenschaft der MSCs.

Für den klinischen Einsatz sind Stammzellen ohne erhebliche Risiken und Folgen durch Punktions des Knochenmarks zu gewinnen. Daneben stellt die Isolation von adipogenen Stammzellen (ASC) aus dem reichlich vorhandenen und leicht erreichbaren Fettgewebe eine interessante Alternative dar. So können allein unter örtlicher Betäubung mit minimalen Unannehmlichkeiten für den Patienten große Mengen an Fettaspiraten gewonnen werden. Ein weiterer Vorteil zeigt sich in der höheren Anzahl von Vorläuferzellen und dem geringeren Anteil an Kontaminationszellen pro Gramm Fettgewebe im Vergleich zu BMSCs (ZUK et al., 2001; SZPALSKI et al., 2012). ASCs können selbst bei geringen Mengen an Glukose, Glutamin und Sauerstoff zu Osteoblasten differenzieren, was vor allem in der initialen avaskulären Phase von enormem Nutzen sein kann (SZPALSKI et al., 2012). Ihr osteogenes Potential ist jedoch um einiges geringer als das der BMSCs. Peterson et al. konnten z.B. mit BMP-2-tragendem Adenovirus infizierten ASCs einen CSFD der Ratte heilen, während dies mit puren ASCs nicht gelang (PETERSON et al., 2005).

Eine geeignete Trägermatrix zur Verteilung der Zellen in dreidimensionalen Biomaterialien stellt das hier eingesetzte Fibrin dar. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle eingebrachten Zellen gleichmäßig in den Konstrukten verteilt vorlagen. Sowohl zum Explantationszeitpunkt von zehn Tagen als auch von zwölf Wochen konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung zwischen zentralen oder peripheren Bereiche sowie zwischen Konstrukten mit oder ohne AVL gefunden werden. Die Kombination einer dreidimensionalen HA/β-TCP-Matrix mit Fibrin als Freisetzungssystem zeigt also eine gleichmäßige Verteilung der exogen zugegebenen

Zellen. Dies ist für die homogene Knochenbildung in Konstrukten in zellarmer Umgebung von entscheidender Wichtigkeit.

Bei genauerer Betrachtung der Tunel-Dapi-gefärbten Histologiepräparate konnten nach zehn Tagen in den zentralen Konstruktgebieten der Gruppe A (mit AVL) tendenziell mehr überlebende Zellen als in der Gruppe B (ohne AVL) gesehen werden. Dieses vermehrte Zellüberleben ist wahrscheinlich auf die initial bessere Vaskularisierung aufgrund der konstruierten Gefäßschleife zurückzuführen.

Durch die Implantation von Zellen in bereits prävaskularisierte Biomaterialien kann das Zellüberleben verbessert und somit optimale Bedingungen für die Knochenentstehung geschaffen werden (ARKUDAS et al., 2007a). Während im Rahmen dieser Studie die Zellen gleichzeitig mit dem AVL zu einem Konstrukt generiert und eine ausreichende initiale Vaskularisierung durch die axiale Gefäßanbindung erhofft wurde, sollen die Vorteile eines zweizeitigen Implantationsvorgangs nicht vergessen werden. Dadurch könnte das Überleben in der initialen Phase durch bereits entstandene Neogefäße aus dem AVL noch weiter verbessert werden. Von Nachteil ist dabei jedoch das Problem der Einbringung der Zellen. Werden sogenannte Platzhalter eingesetzt, kann einerseits die Zellsuspension nur in die frei gehaltenen Hohlräume eingebracht werden und somit nicht mehr homogen im Konstrukt verteilt werden. Andererseits besteht die Gefahr, dass es um die Platzhalter herum zur Narbenbildung kommen kann. Dadurch wären die Zellen somit initial wieder von der Blutversorgung abgetrennt und könnten absterben.

#### **4. Knochenbildung**

Neben der Vaskularisation und dem Einsatz von knochenbildenden Zellen spielen weitere Faktoren eine entscheidende Rolle in dem Prozess der Knochenbildung. Unter Verwendung einer HA/β-TCP-Keramik mit 60 µg/ml BMP-2 und fünf Millionen vordifferenzierter MSCs in Fibrinkleber wurde die Induktion der Knochenbildung in Abhängigkeit einer axialen Gefäßschleife in einem Femurdefektmodell untersucht.

Die Grundmatrix wies ein Verhältnis von 60 % / 40 % HA/β-TCP und eine optimale Mischung aus Mikroporen (< 10 µm) und Makroporen (300 µm - 600 µm) auf. Das dreidimensionale Gerüst der HA/β-TCP-Matrix dient dabei mit seinen osteokonduktiven Eigenschaften dem entstehenden Knochen als Leitschiene und liefert MSCs eine optimale Umgebung zur Adhäsion. Durch seine Struktur induziert es die

Proliferation von MSCs in die osteogene Richtung, ermöglicht gleichzeitig deren Migration und startet somit initiale Vorgänge der Knochenheilung. Da das HA der Matrix in seiner elementaren Zusammensetzung dem HA des menschlichen Knochen gleicht (SCHNURER et al., 2003), ist es hervorragend für die künstliche Generierung von neuem Knochengewebe geeignet. Durch die Kombination des spröden, schlecht auflösbarer HA mit dem gut abbaubaren  $\beta$ -TCP kann die Degradationsgeschwindigkeit den Ansprüchen des Modells angepasst werden (SCHNURER et al., 2003). Durch den Einsatz von TricOs in granulöser Form entstehen größere Lücken zwischen den Granula, durch die neue Gefäße das ganze Konstrukt durchziehen können. Sowohl Gefäße als auch der neu gebildete Knochen können sich dadurch von allen Seiten direkt um ein Granulum legen und somit ein homogenes Gefäßnetz bzw. Knochengerüst im ganzen Konstrukt aufbauen. Die Interkonnektivität des Porensystems gewährleistet außerdem durch seine unter 10  $\mu\text{m}$  großen Mikroporen eine optimale Nährstoffversorgung sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten im Inneren der Konstrukte. Aufgrund der porösen und granulösen Eigenschaft der Matrix kann diese gut mit Fibrin kombiniert werden und wird gerne mit osteoinduktiven Zellen beladen. HA/ $\beta$ -TCP wurde in dieser Kombination bereits erfolgreich zur Heilung von kleinen Femurdefekten an der Ratte eingesetzt (ZHAO et al., 2009). Gegenüber organischen Knochentransplantaten haben die synthetischen biphasischen Keramiken außerdem den enormen Vorteil, dass sie, ohne eine Hebemorbidität hervorzurufen, in Größe oder Menge frei verfügbar sind und kein Risiko einer Infektion oder Virusübertragung besteht. Auf Grund ihrer hochporösen Eigenschaft eignen sich HA/ $\beta$ -TCP-Keramiken allein nicht zum Einsatz in lasttragenden Knochendefektmodellen. Besser geeignet wäre dafür z.B. ein primär stabiler Block anstatt der Granula, welcher aber das Durchwachsen mit Gefäßen sehr erschwert. Um dennoch die stimulierende Wirkung der Mikro- und Makroporen auf das Einwachsen von Knochen und die Osseointegration (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005) auszunutzen, wurde dieses Problem durch die Kombination der instabilen Matrix mit einer umschließenden, sehr stabilen Titankammer umgangen.

Eine beliebte Technik, um das Knochenwachstum zu steigern stellt der Einsatz von Knochenwachstumsfaktoren dar. Die osteoinduktive Eigenschaft des hier verwendeten BMP-2 wurde bereits in vielen Studien, unter anderen auch im „critical size femur defekt“ (CSFD) der Ratte, nachgewiesen (URIST et al., 1987; VOGELIN et al., 2005; ANGLE et al., 2012; QI et al., 2012; YANG et al., 2012). Dabei beschleunigt BMP-2

den Heilungsprozess des Knochens durch die Initiierung von Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung von implantierten Zellen sowie der Anlockung von wirtseigenen Knochenvorläuferzellen. Angle et al. gelang durch den Einsatz von rhBMP-2 nach vier Wochen die knöcherne Überbrückung eines 5 mm großen CSFD. Sie untersuchten erstmals die Knochenheilung in einem CSFD der Ratte im Bezug auf unterschiedliche Konzentrationen von BMP-2. Dabei beobachteten sie eine biphasische, dosisabhängige Heilungsreaktion und berechneten die optimalen Dosis von 12 µg rhBMP-2 (entspricht ca. 96 µg/ml), oberhalb und unterhalb derer eine schlechtere Knochenheilung zu verzeichnen war (ANGLE et al., 2012). Weitere Untersuchungen zu BMP-2-Konzentrationen im Kleinnager von Valentin-Opran oder der eigenen Forschungsgruppe lieferten optimale Werte bei Konzentrationen im Bereich von 25 – 50 µg/ml (VALENTIN-OPRAN et al., 2002) bzw. 60 µg/ml (eigene Erfahrungen). Da der genaue Mechanismus der dosisabhängigen Reaktion nicht bekannt ist und die optimale Konzentration in Abhängigkeit der untersuchten Spezies, des Implantationsortes und der Trägermatrix variiert, sollte vor jeder neuen Modellstudie der Einsatz von Wachstumsfaktoren in dem gewählten Modell mit möglichst wenigen anderen Variablen untersucht werden. Die hier gewählte Konzentration von rhBMP-2 betrug 60 µg/ml und bezog sich auf Ergebnisse aus früheren eigenen Untersuchungen der heterotopen Knochenbildung an Ratten. In dieser Studie ging der Knochenbildung im CSFD selber eine Präfabrikationsphase im heterotopen Bereich voran. Dies ermöglichte in den ersten sechs Wochen eine BMP-2-induzierte Knochenbildung ohne den Einfluss von vorhandenem Knochengewebe, wie es im CSFD selber der Fall ist.

Auch die Wahl des Freisetzungssystems wirkt sich letztendlich auf die Potenz des BMP-2 aus, indem sie die Freisetzungsgeschwindigkeit beeinflusst. Ein Nachteil des hier gewählten Fibrins ist die initial verstärkte und schnell abnehmende Freisetzung des BMP-2 (YANG et al., 2010). Eine Potenzierung des osteogenen Effekts und die Verringerung der Dosis kann durch den Einsatz eines heparinkonjugierten Fibrins erreicht werden, indem es eine langsamere kontinuierliche Freisetzung der BMPs ermöglicht (YANG et al., 2010; BRAMONO et al., 2011). Da der Einsatz von heparinkonjugiertem Fibrin in einer eigens durchgeführten Vorstudie keinen positiven Effekt auf die Knochenbildung der untersuchten Matrices hatte, wurde hier unkonjugiertes Fibrin verwendet. Um die Konzentration von BMPs in einem Konstrukt konstant hoch zu halten, besteht des Weiteren die Möglichkeit, die Matrix mit BMP-überexprimierenden Zellen oder BMP-tragende adenovirale Vektoren zu beladen.

Die Knochenbildung wurde histologisch sowohl qualitativ wie auch quantitativ an HE-färbten zweidimensionalen Schnitten der Sagittalebene des Femurs untersucht. Zur quantitativen Beurteilung des gebildeten Knochens wurden per Hand Konstruktflächen ohne Femurfragmente ausgewählt und die Knochenflächen semiautomatisch durch Farbkodierung ausgezählt. Manuell erfolgte die Abwahl der nicht als Knochen ansprechbaren Flächen, wodurch diese Methode eine zuverlässige Auswertung der Knochenflächen ermöglicht. Die molekularbiologische Untersuchung auf die Knochenmarker alkalische Phosphatase (ALP), Osteokalzin (OC) und „runt-related transcription factor 2“ (RUNX2) erfolgte an einem einzigen Konstrukt pro Gruppe, wodurch die Ergebnisse nur als Richtwert gesehen werden dürfen. Um auch bei dieser Methode ein umgreifenderes Ergebnis zu bekommen, könnten mehrere 10 µm dicke Schnitte jeder Konstrukthälfte als Ausgangsmaterial herangezogen werden. Somit wären die Konstrukte sowohl zur molekularbiologischen Auswertung wie auch zur histologischen Auswertung verfügbar. Da die Ergebnisse bei der Auswertung einzelner Schnitte nach erfolgter Entkalkung jedoch meist ungenauer sind wurde hier ein nicht entkalktes, komplettes Konstrukt für die molekularbiologische Untersuchung eingesetzt. Sowohl die Röntgenuntersuchung als auch die computertomographische Untersuchung eigneten sich nicht zur Evaluierung der Knochenbildung. Bei den CT-Aufnahmen mangelte es an Sensitivität und auf den Röntgenbildern überlagerten sich andere röntgendichte Strukturen wie Kammer und kontrastmittelgefüllte Gefäße mit dem Konstrukt.

In allen Konstrukten war histologisch eine Knochenbildung zu verzeichnen, wobei ein erheblicher Unterschied in der gebildeten Knochenfläche zwischen den Gruppen A - D und E - F bestand und der Knochen überall in einer sehr jungen unreifen Form vorlag.

Sowohl zehn Tage wie auch zwölf Wochen nach Defektgenerierung hatte sich in den Gruppen mit AVL (A und C) signifikant mehr Knochen gebildet als in den Gruppen ohne AVL (B und D). Dieses Phänomen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der oben beschriebenen besseren Vaskularisation zuzuschreiben. Durch den AVL kommt es zur schnelleren vaskulären Erschließung des Konstrukts, wodurch auch der Transport von Stoffwechselprodukten, Nährstoffen, Signalmolekülen, Zellen, Wachstumsfaktoren, Hormonen und anderen die Knochenbildung betreffende Faktoren bis in die inneren Gebiete gewährleistet ist. Dies spiegelt sich auch in der Verteilung der gebildeten Knochenflächen wieder, die in Gruppe A und C wie auch die Gefäße homogen im Konstrukt verteilt lagen. In den Gruppen B und D waren die Knochenflächen jedoch

vermehrt in der Peripherie aufzufinden, was auf die rein extrinsische Vaskularisierung zurückgeführt werden kann. Da innerhalb der zehn Tage nach Defektgenerierung wahrscheinlich nur sehr wenige der durchtrennten präformierten Gefäße wieder Anschluss an das Gefäßsystem gefunden haben, ist davon auszugehen, dass sich in Gruppe B primär in der Prävaskularisationsphase Knochen gebildet hat. In Gruppe D hingegen erfolgte innerhalb der zwölf Wochen nach Transplantation eine langsame neue extrinsische Gefäßanschließung, wodurch auch die präformierten Gefäße wieder angebunden werden konnten und mit der Zeit weiter ins Zentrum wachsen konnten. Wie erwartet war nach zwölf Wochen der innere Konstruktbereich ohne Knochenbildung der Gruppe D kleiner als in Gruppe B. Die in die Mitte vorgedrungen extrinsischen Gefäße stimulierten durch ihre Transportfunktion das Knochenwachstum. Auch bei den AVL-Gruppen war sowohl die Gesamtfläche als auch die einzelnen Areale des gebildeten Knochens nach zwölf Wochen größer als nach zehn Tagen, was auf die längere Implantationszeit zurückzuführen ist. Die molekularbiologischen Ergebnisse bestätigten mit einer signifikant höheren Expression der Knochenmarker ALP und OC eindeutig, dass in Gruppe D am meisten Knochen gebildet werden konnte.

Obwohl HA/β-TCP eine rein osteokonduktive Eigenschaft nachgesagt wird, konnte auch in den Kammern, die allein mit HA/β-TCP und Fibrin gefüllt waren (Gruppe E), in den Randbereichen der Defektzone vereinzelt Knocheninseln nachgewiesen werden. Arkudas et al. konnten dagegen in einem heterotopen Modell selbst mit der Kombination von HA/β-TCP, Fibrin und AVL nach acht Wochen keine Knochenbildung feststellen (ARKUDAS et al., 2012). Es ist anzunehmen, dass die orthotope Lage der Konstrukte mit direktem Kontakt zu Markraum und Periost durch deren positiven Einfluss auf die Knochenbildung (VOGELIN et al., 2000) die Ursache der hier zu findenden Knochenbildung darstellt. Dabei können aus dem Periost oder Knochenmark Knochenvorläuferzellen in nahe Gebiete des Konstrukts einwandern, proliferieren und von der Matrix induziert sich in Osteoblasten differenzieren. Zum anderen ist das umgebende Muskelgewebe deutlich besser durchblutet als das gefäßarme subkutane Gewebe an heterotopen Stellen. Obwohl nur sehr wenig Knochen gebildet wurde, zeigten die molekularbiologischen Ergebnisse neben einem geringen OC-Wert eine hohe Expression von ALP (höher als in Gruppe D). Das vermehrte Auftreten von ALP könnte mit der HA/β-TCP-Matrix, die hier nur mit Fibrin benetzt vorliegt, in Verbindung gebracht werden. Tsukamoto et al. kultivierten aus der menschlichen Pulpa gewonnene Fibroblasten und ergänzten das Medium mit einem

Implantat aus Hydroxylapatit. Sie konnten nachweisen, dass diese Fibroblasten Cytokine freisetzen, die wiederum andere Fibroblasten stimulieren, eine erhöhte Menge an ALP auszuschütten (TSUKAMOTO et al., 1992). Das vermehrte Auftreten von Bindegewebe statt Knochengewebe in dieser Gruppe könnte zu der beschriebenen Interaktion der vorhandenen Fibroblasten geführt haben. Auch in der Kontrollgruppe ohne Kammerfüllung (Gruppe F) zeigten sich histologisch vor allem in den Randbereichen an den Femurfragmenten aktive Prozesse. Ausgehend von den proximalen Femurkortikalen war das Einwachsen einer Knochenspange in den Defektbereich zu erkennen, was das Potential zur Knochenbildung des vorhandenen Knochenstumpfes hervorhebt.

## 5. *Defektüberbrückung*

Nachdem in den Gruppen C und D reichlich Knochen gebildet wurde, galt besonders ihnen das Interesse in der Untersuchung der Defektüberbrückung. Neben der quantitativen Knochenmenge beeinflussen mechanische Faktoren wie Stabilität, Mikrobewegungen, Belastung und die Durchblutung das Potential der Überbrückbarkeit. Ein ausschlaggebender Punkt auch in der allgemeinen Untersuchung von Knochenersatzmaterialien ist die obligate Standardisierung und die ausreichende Stabilisierung der Defektzone, da für eine erfolgreiche Defektüberbrückung ein mechanisch stabiles Milieu benötigt wird (MEGAS, 2005). Um das Platten-Cage-System bestmöglich zu befestigen, wurde zusätzlich pro Seite zwischen die zwei Schrauben eine Cerclage um Kammer und Femur gelegt. Da es sowohl in dieser Studie, als auch in den Vorstudien zu keiner Verbiegung oder gar Bruch der Kammerkonstruktion kam, wird angenommen, dass diese in sich mechanisch stabil ist. Clarke zeigte in einer Ganganalyse an Ratten, dass etwa die Hälfte des absoluten Körpergewichts als vertikale Kraft auf die Hintergliedmaße einwirkt (CLARKE, 1995). Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 420 g (4 N) entspricht dies einer Belastung der operierten Gliedmaße von 2 N.

In die detaillierte Auswertung der Defektüberbrückung gingen nur Tiere der Gruppen mit einer zwölfwöchigen Implantationsphase ein, da nach zehn Tagen in keinem Konstrukt eine knöcherne Verbindung zu sehen war. Dabei war es nötig, die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsmethoden im Kontext zu betrachten. So konnte bei der makroskopischen Begutachtung eine knöcherne Überbrückung schon auf Grund des

Auseinandergleitens der Femurrekonstruktion bei den meisten Konstrukte ausgeschlossen werden. Bei allen makroskopisch festen Verbindungen wurde in der histologischen Untersuchung auch knöcherne Überbrückung nachgewiesen. Diese Ergebnisse korrelierten jedoch oft nicht mit den Ergebnissen der computertomographischen Untersuchungen. Einerseits ist dies auf die geringe Auflösung bzw. fehlende Sensitivität des CTs, andererseits auf die kaum veränderbare Art der Reposition der Konstrukte zurückzuführen. Dabei konnte die Signalstärke so verändert werden bzw. schaben die Fragmente so aneinander, dass eine Überbrückung darzustellen war. Mit einem hochauflösenden  $\mu$ CT-Gerät könnte wahrscheinlich sowohl die Durchbauung, als auch die Überbrückung besser dargestellt werden. Um jedoch eine realistische Lage des Konstrukts zu gewährleisten, müsste die stabilisierende Kammer am Konstrukt belassen werden. Aufgrund ihrer hohen Röntgendichte würde dies wiederum zu Überlagerungen und starken Störsignalen führen. Auf den Aufnahmen konnte eine Durchbauung weder sicher nachgewiesen noch sicher ausgeschlossen werden. Deshalb konnte diese Nachweismethode keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern. Einzig in der Kontrollgruppe konnte die Abwesenheit einer knöchernen Überbrückung sicher diagnostiziert werden, wenngleich dieser Nachweis bedingt durch die knochenähnliche Dichte der HA/ $\beta$ -TCP-Matrix in der Gruppe E nicht gelang.

Histologisch konnte bei acht Tieren der Gruppe C eine deutlich knöcherne, bei weiteren zwei Tieren eine fraglich knöcherne Überbrückung, aber auf jeden Fall eine bindegewebige Verbindung zwischen proximalem Femurstumpf und Konstrukt verzeichnet werden. Demgegenüber wurden in der Vergleichsgruppe ohne Loop nur drei knöcherne Verbindungen nachgewiesen. In den anderen Gruppen wurde keine knöcherne Überbrückung erlangt. Auch hier muss bedacht werden, dass die Präparate nur eine zweidimensionale deskriptive Auswertung der Konstrukte ermöglichen. Eine knöcherne Verbindung ist vor allem in Bereichen der kortikalen Ansatzstellen, wie es sich im Knochenbildungsverhalten der Leer-Konstrukte niederschlug, zu vermuten. Einen möglichen Grund für die höheren Erfolge der Defektüberbrückung in der Gruppe C liefert die dichtere Knochenstruktur in diesen Konstrukten. Obgleich die Vaskularisation an den Ansatzbereichen in beiden Gruppen nach zwölf Wochen gegeben ist, könnte auch das Vorhandensein des reiferen organisierten Gefäßnetzes in der AVL-Gruppe die Vereinigung der Knochenstrukturen fördern. Entscheidend ist jedoch höchstwahrscheinlich die Tatsache, dass in der Gruppe mit AVL bereits direkt nach Transplantation an den Übergangsstellen eine gute Durchblutung der vorhandenen

Gefäße herrscht und somit die knöcherne Überbrückung direkt einsetzen kann. In der Gruppe ohne AVL müssen die vorhandenen Gefäße erst wieder an das Gefäßsystem angeschlossen werden. Es ist also davon auszugehen, dass sich dort die weitere Knochenbildung vom Konstrukt aus und damit auch die knöcherne Überbrückung bis zur Wiederherstellung der Durchblutung der präformierten oder neu gebildeten Gefäße verzögert.

Es konnten proximal zwar noch weitere bindegewebige Verbindungen in den Gruppen D bis F gefunden werden, eine ähnliche Anheilungstendenz blieb an den distalen Übergängen jedoch aus.

Durch die Wahl einer 10 mm langen Defektstrecke wird eine maximale Herausforderung an die Heilungskapazität von Knochen gestellt. Es kann also damit ausgeschlossen werden, dass es allein durch körpereigene Reparationsvorgänge zu einer Heilung kommen kann. Demgegenüber untersuchten andere Gruppen, bei denen eine Überbrückung gelang, meist kleinere Defekte von 5 mm bis 7 mm (PETERSON et al., 2005; MEINEL et al., 2006; ZHAO et al., 2009; ATESOK et al., 2010; ZHANG et al., 2010). Ein möglicher Grund für das Ausbleibens der Überbrückung könnte die Größe des Defekts und somit das entstehende sehr kurze distale Femurfragment darstellen. Es kann vermutet werden, dass die Heilungsdysbalance also auf Grund des unterschiedlichen Potentials der Knochenbildung der beiden Femurfragmente zustande kommt. Wie in den Ergebnissen zur Gefäßbildung und Knochenbildung bereits beschrieben, konnte in dieser Studie dem proximalen Femurstumpf eine größere Knochenbildungsfähigkeit zugeschrieben werden. Diese könnte auf den besseren Gefäßanschluss des proximalen Femurfragments an den Körper beruhen. Dem distalen Anteil fehlt aufgrund der Abtrennung knapp über dem Kniegelenk diese Anbindung, die für die Entstehung von neuem Knochen enorm wichtig ist. Dennoch konnte bei manchen Tieren ein Gefäßwachstum vom distalen Femurfragment ausgehend beobachtet werden. So kommt die Frage auf, ob bei einer längeren Implantationszeit auch die distalen Bereiche überbrückt würden.

Ein weiterer Grund, der bisher noch unbeachtet blieb, stellt die mögliche distale Instabilität der Plattenosteosynthese dar. Während Mikrobewegungen und die Gewichtsbelastung die Knochenheilung steigern, führt eine unzureichende Stabilisierung zu einer Nonunion (MARSELL & EINHORN, 2011). Es kann angenommen werden, dass am distalen Kammerflügel auf Grund der größeren Hebelwirkung höhere Kräfte einwirken als proximal. Eine zu hohe Belastung könnte zu

interfragmentären Bewegungen zwischen Femur und Konstrukt bzw. zu lokalem Stress zwischen Schrauben und Knochen führen. Diese Kräfte bewirken zwischen Konstrukt und Femur eine fortwährende Zerstörung der neu gebildeten Knochentrabekel. Darüber hinaus kann es zu einer lokalen Osteolyse um die Schrauben mit anschließender Instabilität oder Dislokation des Implantats führen. Es wäre also möglich, dass das verwendete Platten-Kammer-System am distalen Übergang keine ausreichend steife Fixierung ermöglicht und die Knochenheilung somit verhindert wird. Für diese Theorie spricht die mediale Dislokation der Kammer nach osteolytischen Veränderungen mit anschließender Bildung einer hypertrophen Nonunion, die bei zwei Tieren beobachtet werden konnte.

Eine andere Gruppe zeigte bei der Kombination unterschiedlicher Ersatzmatrices und osteoinduktiven Faktoren nach maximal zwölf Wochen die knöcherne Durchbauung von 10 mm großen Defekte, jedoch wurde das Implantat nie heterotop präfabriziert (VOGELIN et al., 2000; PETERSON et al., 2005; VOGELIN et al., 2005; ZHAO et al., 2009; ATESOK et al., 2010; ANGLE et al., 2012). Der Grund, warum sich in dieser Studie keine komplette Überbrückung bilden konnte, ist ungewiss. Ein möglicher Ansatz zur Aufklärung könnte in der Tatsache gefunden werden, dass die Konstrukte in dieser Studie nicht frisch implantiert, sondern prävaskularisiert wurden, wodurch ursprünglich eine bessere Einheilung erhofft wurde. Durch diese Vorlaufzeit von sechs Wochen ist die Matrix bereits mit Knochen- und Bindegewebe durchwachsen und das Potential der exogen zugegebenen Knochenwachstumsfaktoren mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschöpft (YANG et al., 2010). Dazu kommt, dass auch die osteokonduktive Wirkung der Matrix durch diese Besiedelung verloren gegangen sein könnte. Die Annahme, dass das Aufeinandertreffen der Femurfragmente mit einem präfabrizierten Knochenkonstrukt eine bessere Anheilung als eine unbehandelte Matrix zeigt, konnte hier nicht bestätigt werden. Um diese Aussage zu überprüfen, müsste ein Konstrukt mit gleicher Zusammensetzung wie hier direkt ohne heterotope Präfabrikation in einen Defekt implantiert werden, um einen Fehler im Fixationssystem auszuschließen.

Im vollkommenen Gegensatz zu der Möglichkeit der Instabilität des Systems stellt die anhaltende zu hohe Steifigkeit des Systems einen möglichen konträren Mangel der Konstruktion dar. Dieser könnte auf die hohe Kompressionsfestigkeit der Plattenosteosynthese zurückgeführt werden (DROSSE et al., 2008). Da die Platten-Kammer-Konstruktion in diesem Modell einen großen Teil der auf das Bein

einwirkenden Kraft aufnimmt, wäre zu befürchten, dass die Femurrekonstruktion zu wenig belastet wird, um die für die Knochenheilung und Knochenremodellierung wichtigen Impulse zu setzen. Die Gewährleistung dieses Stimulus könnte durch die Entfernung der Kammer nach einiger Zeit erreicht werden, was auf Grund der hier fehlende Durchbauung jedoch zu einer Refraktur führen würde. Daneben erlaubt die Defektfixierung mittels Fixateur externe diese gewissen Mikrobewegungen des Femurs, welche zudem durch die Variation der Halteschienen dem Heilungsprozess angepasst werden können (WILLIE et al., 2009; ZHAO et al., 2009). Claes et al. konnten durch die Reduzierung der Steifigkeit eines Fixateur externe eine Woche nach Defektgenerierung zwar keine verbesserte Knochenheilung im Vergleich zu steifen oder dynamischen Modellen nachweisen, schließen jedoch den positiven Effekt der Mikrobewegungen zu einem späteren Zeitpunkt nicht aus (CLAES et al., 2012).

Des Weiteren darf nicht unterschätzt werden, dass durch die Präfabrikation ein Konstrukt wächst, das auf Grund seiner individuellen Form eventuell nicht direkt an den Femurfragmenten angelegt werden kann. So wurden, um eine bessere Anheilungsreaktion zu induzieren, nach der Prävaskularisationsphase die zukünftigen Femurkontaktstellen des Konstrukts aufgefrischt, sodass keine bindegewebige Schicht zwischen den Knochenflächen bestehen bleibt. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieser direkte Kontakt, der ein unabdingbares Kriterium für die Garantie einer standardisierten Knochenüberbrückung darstellt, in diesem Modell nur schwer umzusetzen war. Zum einen führte der Einsatz der granulösen Matrix zu keiner einheitlichen Konstruktform. Andererseits kam es mit der angewandten Sägetechnik vereinzelt zu leichten Absplitterungen, schiefen Schnittebenen und damit zu unterschiedlichen Ansatzflächen. Das Modell erlaubte es auf Grund des Fixierungsvorganges und der kleinen Strukturen nicht immer, diese Divergenzen soweit auszugleichen, dass ein direkter Femur-Konstrukt-Kontakt erreicht werden konnte. Die Gefahr der unzulänglichen Revision der Femurfragmente mit Entstehung eines Spalts ist wohl das größte Manko dieses Modells. Tritt dieser Fall ein, könnte dies zu einer verlängerten Frakturheilungszeit führen und damit die Ursache für das Ausbleiben der Defektüberbrückung in der vorgegebenen Zeit erklären.

In der einzige auffindbaren Studie zu einem CSFD der Ratte in der eine Präfabrikationszeit beschrieben wurde, gelang jedoch die Überbrückung. Žic et al. prävaskularisierten mittels eines epigastrischen Lappens ein hochdosiert BMP-7 beladenes Implantat aus demineralisiertem Knochen. Nach der sechswöchigen

Präfabrikationsphase wurde das Konstrukt in einen 8 mm großen Defekt gesetzt, mit einem Marknagel befestigt und nach weiteren sechs Wochen die Heilung beurteilt. Sie konnten sowohl röntgenologisch wie auch histologisch in der Gruppe mit 120 mg BMP-7 eine Überbrückung der Femurfragmente nachweisen, jedoch nicht in der Gruppe mit nur 30 mg BMP-7 (ŽIC et al., 2003). Eine vorteilhafte Wirkung auf die knöcherne Überbrückung durch die Verwendung einer demineralisierten Knochenmatrix wurde dabei als unwahrscheinlich erachtet. Viel mehr könnte es an der Osteosynthesetechnik liegen. Es ist zu vermuten, dass bei der Marknagelung die Femurfragmente longitudinal aufeinander rutschen, da sich ein unfixierter Marknagel weiter in den Markraum schieben kann. Das in der Mitte liegende präfabrizierte Konstrukt würde dabei von den Femurstümpfen eingeklemmt. Dies gewährleistet einen sicheren direkten Kontakt der Knochenflächen und gibt zusätzlich durch die Gewichtsbelastung einen Stimulus zur Knochenremodellierung.

Weshalb die Defektüberbrückung in unserem Modell, trotz Implantation eines knöchern durchbauten Konstrukts nicht gelang, bleibt ungeklärt. Da das Konstrukt selber jedoch die perfekten Eigenschaften eines Implantates mitbringt, also Vaskularisation, knöcherne Durchbauung und osteogene Zellen, kann angenommen werden, dass nicht das Implantat, sondern vielmehr das System an der nicht vorhandenen Überbrückung Schuld ist. Diese Tatsache erfordert es, das eingeführte Modell weiter auf seine denkbaren Schwachstellen zu testen und alle Möglichkeiten der Verbesserung auszunutzen.

Ein potentieller Ansatz wäre es, das Konstrukt ohne eine prävaskularisierende Vorlaufphase in den Defekt zu setzen. Dadurch könnte es in seiner Gestalt dem gesetzten Defekt optimal angepasst werden, um eine direkte Verbindung zwischen Femur und Konstrukt sicher zu stellen. Allgemein ist dieselbe gute Knochenbildung wie in dieser Studie beschrieben zu vermuten. Die initiale Durchblutung allein durch den AVL wäre zwar schlechter, sie kann jedoch durch die extrinsisch einspriesenden nutritiven Gefäße des Femurs oder Gefäße aus der gut durchbluteten Muskulatur, enorm aufgewertet werden. Hinzu kommt das vom Periost ausgehende Potential der Knochenbildung, sodass der vorhandene Knochen direkt in die Leitschiene (Matrix) einwachsen kann. Auch die eingesetzten MSCs oder BMP-2 stimulieren nicht nur die Neoknochenbildung, sondern auch das Einwachsen des Femurs, wodurch ähnliche Ergebnisse wie in anderen Studien erwartet werden könnten. Dieser vielversprechende Ansatz setzt ein gesundes und gut vaskularisiertes Empfängerbett voraus. In dieser

Studie, wie auch in den meisten anderen, wird jedoch das Ziel verfolgt, große Defektstrecken mit einem schlechten Lager ohne eigenes Regenerationspotential zu heilen. Deswegen kann die direkte Implantation in den Defekt nur bedingt eingesetzt werden. So sollte weiter an dem Modell mit einer Präfabrikationsphase festgehalten werden.

## 6. Ausblick

Durch Tissue Engineering von Knochen ist es heute längst möglich, in Tiermodellen kleine Knochendefekte, die ohne Intervention nicht vollständig regenerieren würden, alleine durch den Einsatz künstlich generierter Gewebe zu heilen. Trotz ausgiebiger Untersuchung verschiedener Matrices, kultivierter Zellen, Wachstumsfaktoren und andere, osteoinduktiver oder osteogener Komponenten konnte bisher nicht die ideale Zusammensetzung für die universale Heilung von Knochendefekten gefunden werden. Relevante Ergebnisse für die Heilung humaner Defekte großer Strecke können nur durch Untersuchungen an Defekten kritischer Größe, optimalerweise an langen Röhrenknochen, erzielt werden. Neben Modellstudien an Ratten (ŽIC et al., 2003; VOGELIN et al., 2005; ATESOK et al., 2010; ANGLE et al., 2012) oder Kaninchen (ROOHANI-ESFAHANI et al., 2012) konnten die gewonnenen Erkenntnisse bereits erfolgreich auf das Großtiermodell, z.B. Ziege (NAIR et al., 2009) oder Affe (ZHOU et al., 2010), übertragen werden. Vereinzelt fanden sie sogar im klinischen Bereich Einsatz (WARNKE et al., 2004).

Während in den Modellen meist ein gesunder Knochen mit gutem Selbstheilungspotential vorliegt und ein standardisierter Defekt erzeugt wird, gehen in der Klinik große Defekte meist mit einem schlecht vaskularisierten Empfängerbett, einer Infektion oder einem schlechten Regenerationspotential des Knochens nach Tumorbestrahlung einher. Die Hürde der ungenügenden Durchblutung konnte inzwischen mit der axialen Vaskularisierung eines Konstrukts mittels AVL oder Gefäßbündel sowohl in der Ratte (POLYKANDRIOTIS et al., 2006b; ARKUDAS et al., 2007a; POLYKANDRIOTIS et al., 2007; DOLDERER et al., 2010; ARKUDAS et al., 2012) als auch im Schaf (BEIER et al., 2009; BEIER et al., 2010; BEIER et al., 2011; BOOS et al., 2012) überschritten werden.

In Studien an Ratten wurden bisher ein epigastrischer (ŽIC et al., 2003) oder periostaler Lappen (VOGELIN et al., 2005) zur vaskulären Unterstützung von CSFD eingesetzt. In dieser Studie konnte erstmals ein künstlich generiertes axial prävaskularisiertes

Knochentransplantat gestielt in einen CSFD gesetzt werden. Durch die Vaskularisation, die knöcherne Durchbauung und das Vorhandensein von Osteoblasten bringt dieses Konstrukt die idealen Eigenschaften für eine erfolgreiche Knochenheilung mit. Auch wenn hier die erhoffte knöcherne Überbrückung ausblieb, zeigt diese Studie vielversprechende Ansätze für die Heilung von Knochendefekten mit schlechter Ausgangslage. Nach Behebung eventuell vorhandener Mängel sollte das System für die freie Transplantation weiterentwickelt werden.

Der nächste Untersuchungsschritt der eigenen Forschungsgruppe stellt die Beurteilung der osteoinduktiven Potenz des Konstrukts in einem ersatzschwachen Lager dar. Diese Vorgehensweise stellt höchste Ansprüche an das implantierte Knochenkonstrukt und eignet sich daher gut, um die Heilungskapazität von Knochenersatzgewebe unter realitätsnahen Bedingungen zu testen (LEROUXEL et al., 2009).

Nach erfolgreicher Standardisierung des erweiterten Modells sollte die Übertragung ins Großtiermodell angegangen werden. Ein großer Fortschritt in diese Richtung gelang der eigenen Forschungsgruppe durch die erfolgreiche axiale Vaskularisation von künstlich generiertem Knochengewebe in klinisch relevanter Größe am Schaf (BOOS et al., 2012). Mit der erfolgreichen Vaskularisation wurde der Grundstein der Überlebensfähigkeit großer Konstrukte gelegt, sodass auch im Großtiermodell künftig Knochenersatzmaterialien in ersatzschwachen Lagern getestet werden können, bevor die Methode in den klinischen Alltag aufgenommen werden kann.

Trotz des weiten Wegs von der Grundlagenforschung über klinische Studien bis zur Anwendung in der Klinik zeigt die Studie innovative Ansätze, die immer noch als Goldstandard bezeichnete autologe Transplantation abzulösen und die damit verbundenen Risiken der Hebemorbidität (u.a. Infektionen, Frakturen, Schmerzen) zu eliminieren (REICHERT et al., 2012).

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

### ***Tissue Engineering von axial vaskularisiertem bioartifiziellen Knochen im critical size Femurdefektmodell der Ratte***

Knochendefekte nach Traumata, Infektionen oder Knochennekrosen, die ohne das Einbringen von autologen Knochenersatzgeweben nicht zu heilen sind, bedürfen einer erweiterten Therapie. Gute Ansätze liefert dabei die Technik des Tissue Engineerings, welches die künstliche Züchtung von Knochenersatzgewebe ermöglicht. Da eine vollständige Vaskularisation für das Einheilen und Überleben von künstlich gezüchteten Geweben unabdingbar ist, wird außerdem durch verschiedene Strategien versucht, eine Blutgefäßversorgung solcher Knochenersatzgewebe zu erzielen. Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Potentials zur Knochenbildung und knöchernen Überbrückung eines heterotop generierten, axial vaskularisierten Knochenersatzgewebes im Femurdefektmodell der Ratte.

Dazu wurde aus den Femoralgefäßen der Ratte eine arteriovenöse Gefäßschleife (AVL) konstruiert. Diese wurde zusammen mit einer  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit (HA/ $\beta$ -TCP) Matrix, mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und dem Knochenwachstumsfaktor „bone morphogenetic protein 2“ (BMP-2) in eine eigens entwickelte perforierte Plattenkammerkonstruktion aus Titan in die linke Leiste der Tiere implantiert. Das prävaskularisierte Knochenersatzmaterial wurde nach sechs Wochen in einer zweiten Operation an der Gefäßschleife gestielt in einen 10 mm großen diaphysären Femurdefekt geschwenkt und dort mittels Schrauben befestigt (Gruppen A und C). Als Kontrollgruppe dienten dieselben Konstrukte ohne AVL, aber ebenfalls mit der HA/ $\beta$ -TCP Matrix, MSCs und BMP-2 (Gruppen B und D). Die Explantationszeitpunkte betrugen 10 Tage nach Defektgenerierung zur Evaluation der initialen Gefäßversorgung nach Transplantation der Konstrukte sowie zur Beurteilung des Zellüberlebens (Gruppen A und C) sowie 12 Wochen nach Konstrukttransplantation zur Beurteilung der Knochenbildung und Defektüberbrückung sowie Gefäßversorgung der Konstrukte (Gruppen B und D). Zudem wurden 2 weitere Kontrollgruppen 12 Wochen nach Defektgenerierung explantiert. Eine dieser Gruppen hatte nur die HA/ $\beta$ -TCP Matrix ohne MSCs und BMP-2 (Gruppe E) implantiert. Die letzte Gruppe besaß einen Leerdefekt als Kontrolle des critical size Defekts (Gruppe F).

Die Implantatstellung wurde röntgenologisch untersucht sowie die Konstrukte nach Explantation histologisch ausgewertet. Bei den Gruppen mit einer Implantationsdauer von zwölf Wochen wurden zusätzlich computertomographische, mikrocomputertomographische und molekularbiologische Methoden zur Auswertung herangezogen.

10 Tage nach Defektgenerierung konnte in der Gruppe A mit dem AVL eine signifikant erhöhte Gefäßanzahl und -dichte sowie Knochenbildung im Vergleich zu der Gruppe B ohne AVL nachgewiesen werden. Nach 12 Wochen zeigte sich die Gefäßanzahl zwischen allen Gruppen ausgeglichen. Lediglich in der Leerdefektgruppe F konnte aufgrund der Auffüllung des Leerdefektes mit vaskularisiertem Bindegewebe eine erhöhte Gefäßanzahl und -dichte gezeigt werden. Bezuglich der Knochenbildung konnte auch nach 12 Wochen eine signifikant erhöhte Knochenbildung in der AVL Gruppe C im Vergleich zur selben Gruppe ohne AVL (Gruppe D) nachgewiesen werden. Auch zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme der Knochenbildung zwischen den 10 Tagen und 12 Wochen Explantationszeitpunkten. In den Kontrollgruppen ohne MSCs und BMP2 (Gruppen E und F) konnte nur eine sehr geringe Knochenbildung nachgewiesen werden. In Gruppe C mit AVL zeigte sich in der Mehrzahl der Konstrukte nach 12 Wochen eine knöcherne Durchbauung am proximalen Femurstumpf, während in Gruppe D ohne AVL bei nur 3 Tieren und in den Gruppen E und F bei keinem Tier in diesem Bereich eine Durchbauung gezeigt werden konnte. Im distalen Bereich konnte in keiner Gruppe eine knöcherne Durchbauung nachgewiesen werden.

In dieser Studie wurde erstmals ein axial prävaskularisiertes Knochenersatzgewebe zur Knochenheilung eines critical size Femurdefekts der Ratte eingesetzt. Durch den Einsatz der erhaltenen axialen Vaskularisation durch die arteriovenöse Gefäßschleife der mittels Tissue Engineering Verfahren gezüchteten Knochengewebe konnte eine verbesserte Vaskularisation sowie Knochenbildung und Defektüberbrückung nachgewiesen werden. Dies stellt die Weiche für den Einsatz im Großtiermodell bzw. den späteren Transfer in die Klinik. Der Defekt von 10 mm Länge stellt dabei höchste Ansprüche an die Knochenheilungskapazität und eignet sich daher gut zur Evaluation neuer Ansätze für den späteren klinischen Einsatz. Der Einsatz eines vaskularisierten, durch Tissue Engineering Verfahren gezüchteten Ersatzgewebes zeigt in dieser Studie erfolgsversprechende Ansätze für die Heilung großer Defekte in ersatzschwachen Lagern.

## VII. SUMMARY

### ***Tissue Engineering of axially vascularized bioartificial bone in a critical sized defect model of the rat***

Extended bone defects, as they can occur after trauma, infections, and bone necrosis, may not heal without bone graft substitutes and thus require expanded therapy. A promising approach in this context is the use of Tissue Engineering concepts. This technique enables the artificial generation of bone tissue. As a complete vascularization of the substitute tissue is essential for its ingrowth and viability, various strategies are applied to successfully generate a bloodvessel system within the tissue-engineered constructs. The objective of this thesis was to evaluate the potential of heterotopically generated bone tissue with axial vascularization for bone formation and bony bridging in a femur defect rat model.

One key step was the formation of an arteriovenous loop (AVL) from the femoral vessels of the rat. Using a customized titanium chamber, the AVL was implanted in combination with a beta-tricalcium phosphate/hydroxylapatite (HA/β-TCP) scaffold, mesenchymal stem cells (MSCs), and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), respectively. In a second surgical procedure after six weeks, the prevascularized scaffolds were pedicled transferred into a femur defect with a size of 10 mm and fixated via screws (groups A and C). Another two groups received a similar construct but without the AVL (groups B and D). The explantation time points were 10 days after defect operation in groups A and C and 12 weeks in groups B and D. The implant for control group E was prepared solely with HA/β-TCP and was removed again after twelve weeks. For these five groups, the period of prevascularization was six weeks prior to the generation of the defect. The remaining group received an empty construct, serving as a control group for the critical size femur defect. For this group, the construct remained in the defect for twelve weeks as well, however without any prevascularization.

The position of the implants was evaluated radiographically, and the constructs were analyzed histologically after explantation. For the groups with an implantation period of twelve weeks, computed and micro-computed tomographic images and molecular-biological techniques were used in addition for a more complete analysis.

At 10 days explantation time point bone formation and vascularisation was significantly

increased in the AVL group A in comparison to group B without AVL. After 12 weeks no significant differences regarding the degree of vascularization could be detected between groups C, D and E. Only in group F a significantly increased vascular density was observed due to the generation of well vascularised connective tissue. Bone formation occurred in all 12 weeks groups. However, the bone areas in the groups without MSCs and BMP-2 (groups E and F) were negligible. Bone formation was significantly increased in group C compared to group D without AVL at 12 weeks. Furthermore, there was an increase of bone generation between the 10 days and 12 weeks groups over time detectable. At 12 weeks group C showed the most pronounced potential for bridging the femur defect. In this group of ten animals, eight proximal bony connections between femur and construct were detected. Besides three proximal bridges in the group D no further connections were found in the other groups.

In this study, axially prevascularized bone tissue was generated for the first time to heal a critical size femur defect in a rat. The excellent degree of vascularization and the homogeneous distribution of newly formed bone tissue in the groups with AVL, MSCs and BMP-2 bear promise for the upscaling into a large animal model and, at a later stage, for clinical applications. So far, healing of the defect could only be observed on the proximal side, representing an incomplete bridging of the defect. Further studies using the same defect model may provide an explanation for this behavior. A defect with a size of 10 mm is highly demanding with respect to the capacity for bone healing and thus is well-suited for evaluating new approaches for future clinical applications. This study demonstrates for the first time a combination of an axially vascularised tissue engineered bone construct with a femur defect model which is highly promising for healing of extended defects in regions with limited vascularization.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Ackerman LV, Spjut HJ, Abell MR (1976) Bones and Joints. Williams & Wilkins, Baltimore. XI, 349 p

Agacayak S, Gulsun B, Ucan MC, Karaoz E, Nergiz Y. Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. European review for medical and pharmacological sciences 2012; 16: 679-86.

Aho AJ, Ekfors T, Dean PB, Aro HT, Ahonen A, Nikkanen V. Incorporation and clinical results of large allografts of the extremities and pelvis. Clinical orthopaedics and related research 1994; 200-13.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society 2001; 10 Suppl 2: S96-101.

Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. Tissue engineering. Part B, Reviews 2008; 14: 259-73.

Angle SR, Sena K, Sumner DR, Virkus WW, Virdi AS. Healing of rat femoral segmental defect with bone morphogenetic protein-2: A dose response study. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions 2012; 12: 28-37.

Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srour S, Sturzl M, Horch RE, Kneser U. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. Tissue engineering 2007a; 13: 1549-60.

Arkudas A, Tjiawi J, Bleiziffer O, Grabinger L, Polykandriotis E, Beier JP, Sturzl M, Horch RE, Kneser U. Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model. Mol Med 2007b; 13: 480-7.

Arkudas A, Tjiawi J, Saumweber A, Beier JP, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Horch RE, Kneser U. Evaluation of blood vessel ingrowth in fibrin gel subject to type and concentration of growth factors. *J Cell Mol Med* 2009a; 13: 2864-74.

Arkudas A, Pryymachuk G, Hoereth T, Beier JP, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Horch RE, Kneser U. Dose-finding study of fibrin gel-immobilized vascular endothelial growth factor 165 and basic fibroblast growth factor in the arteriovenous loop rat model. *Tissue engineering. Part A* 2009b; 15: 2501-11.

Arkudas A, Beier JP, Pryymachuk G, Hoereth T, Bleiziffer O, Polykandriotis E, Hess A, Gulle H, Horch RE, Kneser U. Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue engineering. Part C, Methods* 2010; 16: 1503-14.

Arkudas A, Pryymachuk G, Beier JP, Weigel L, Korner C, Singer RF, Bleiziffer O, Polykandriotis E, Horch RE, Kneser U. Combination of extrinsic and intrinsic pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plastic and reconstructive surgery* 2012; 129: 55e-65e.

Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research* 1996; 300-9.

Atesok K, Li R, Stewart DJ, Schemitsch EH. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res* 2010;

Babovic S, Johnson CH, Finical SJ. Free fibula donor-site morbidity: the Mayo experience with 100 consecutive harvests. *Journal of reconstructive microsurgery* 2000; 16: 107-10.

Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 1995; 20: 1055-60.

Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. Clinical orthopaedics and related research 2000; 10-27.

Beger HG, Gansauge F. Master of surgery in Archiv fur Klinische Chirurgie. Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie 2010; 395 Suppl 1: 17-21.

Beier JP, Horch RE, Arkudas A, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Adamek E, Hess A, Kneser U. De novo generation of axially vascularized tissue in a large animal model. Microsurgery 2009; 29: 42-51.

Beier JP, Horch RE, Hess A, Arkudas A, Heinrich J, Loew J, Gulle H, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Kneser U. Axial vascularization of a large volume calcium phosphate ceramic bone substitute in the sheep AV loop model. Journal of tissue engineering and regenerative medicine 2010; 4: 216-23.

Beier JP, Hess A, Loew J, Heinrich J, Boos AM, Arkudas A, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Horch RE, Kneser U. De novo generation of an axially vascularized processed bovine cancellous-bone substitute in the sheep arteriovenous-loop model. European surgical research. Europaische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes 2011; 46: 148-55.

Blair HC, Athanasou NA. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. Histology and histopathology 2004; 19: 189-99.

Boos AM, Arkudas A, Kneser U, Horch RE, Beier JP. [Bone tissue engineering for bone defect therapy]. Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft fur Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft fur Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefasse : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen 2010; 42: 360-8.

Boos AM, Loew JS, Weigand A, Deschler G, Klumpp D, Arkudas A, Bleiziffer O, Gulle H, Kneser U, Horch RE, Beier JP. Engineering axially vascularized bone in the sheep arteriovenous-loop model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2012;

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-42.

Bramono DS, Murali S, Rai B, Ling L, Poh WT, Lim ZX, Stein GS, Nurcombe V, van Wijnen AJ, Cool SM. Bone marrow-derived heparan sulfate potentiates the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Bone* 2011;

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry* 1997; 64: 278-94.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instructional course lectures* 1996a; 45: 387-99.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures* 1996b; 45: 371-86.

Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine reviews* 1996; 17: 333-68.

Cao L, Liu G, Gan Y, Fan Q, Yang F, Zhang X, Tang T, Dai K. The use of autologous enriched bone marrow MSCs to enhance osteoporotic bone defect repair in long-term estrogen deficient goats. *Biomaterials* 2012; 33: 5076-84.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research* : official publication of the Orthopaedic Research Society 1991; 9: 641-50.

Cassell OC, Morrison WA, Messina A, Penington AJ, Thompson EW, Stevens GW, Perera JM, Kleinman HK, Hurley JV, Romeo R, Knight KR. The influence of extracellular matrix on the generation of vascularized, engineered, transplantable tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; 944: 429-42.

Cassell OC, Hofer SO, Morrison WA, Knight KR. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *British journal of plastic surgery* 2002; 55: 603-10.

Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature reviews. Rheumatology* 2012; 8: 133-43.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* : CJASN 2008; 3 Suppl 3: S131-9.

Clarke KA. Differential fore- and hindpaw force transmission in the walking rat. *Physiology & behavior* 1995; 58: 415-9.

Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 1992; 2: 285-9.

Cooper RR, Milgram JW, Robinson RA. Morphology of the osteon. An electron microscopic study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 1966; 48: 1239-71.

Cornell CN, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clinical orthopaedics and related research* 1998: S267-73.

Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszzuk P, Cross M, Wobus AM. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biological chemistry* 2003; 384: 1391-409.

Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials* 1991; 2: 187-208.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *The Journal of clinical investigation* 2001; 107: 1055-61.

Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005; 36: 1392-404.

Dolderer JH, Kehrer A, Schiller SM, Schroder UH, Kohler K, Schaller HE, Siegel-Axel D. [De-novo generation of vascularized tissue using different configurations of vascular pedicles in perforated and closed chambers]. *Wiener medizinische Wochenschrift* 2010; 160: 139-46.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-7.

Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M. 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* 2008; 14: 79-88.

Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2001; 9: 210-8.

Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F (1994) Bone histomorphometry. Raven Press, New York. xi, 74 p

Erol OO, Spira M. New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Surgical forum* 1979; 30: 530-1.

Exner C, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Deutsche Forschungsgemeinschaft Kommission f\*<sup>r</sup> Tierexperimentelle Forschung. *Tierversuche in der Forschung*. Bonn: Lemmens 2004: 378645099. <http://www.gbv.de/dms/ilmenau/toc/378645099.PDF>.

Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal of experimental medicine* 1973; 138: 745-53.

Franch J, Diaz-Bertrana C, Lafuente P, Fontecha P, Durall I. Beta-tricalcium phosphate as a synthetic cancellous bone graft in veterinary orthopaedics: a retrospective study of 13 clinical cases. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 2006; 19: 196-204.

Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2001; 83-A Suppl 1: S151-8.

Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1995; 3: 1-8.

Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clinical orthopaedics and related research* 1987: 7-16.

Green DW. Tissue bionics: examples in biomimetic tissue engineering. *Biomedical materials* 2008; 3: 034010.

Green J. The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. *Mineral and electrolyte metabolism* 1994; 20: 7-15.

Gundberg CM. Matrix proteins. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2003; 14 Suppl 5: S37-40; discussion S-2.

Gurevitch O, Slavin S, Feldman AG. Conversion of red bone marrow into yellow - Cause and mechanisms. *Medical hypotheses* 2007; 69: 531-6.

H. Włodarski K, Galus R. Histological aspects of bone fracture healing. *Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja* 2005; 7: 351-60.

Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1092: 385-96.

Harris CT, Cooper LF. Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *Journal of biomedical materials research. Part A* 2004; 68: 747-55.

Hauschild G, Merten HA, Bader A, Uhr G, Deivick A, MeyeLindenberg A, Fehr M. Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of beta-tricalciumphosphate and platelet rich plasma--a case report. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 2005; 18: 52-4.

Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 2004; 362: 2821-50.

Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011; 49: 591-9.

Hofer SO, Knight KM, Cooper-White JJ, O'Connor AJ, Perera JM, Romeo-Meeuw R, Penington AJ, Knight KR, Morrison WA, Messina A. Increasing the volume of vascularized tissue formation in engineered constructs: an experimental study in rats. *Plastic and reconstructive surgery* 2003; 111: 1186-92; discussion 93-4.

Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1996; 82: 594-606.

Hong SJ, Kim CS, Han DK, Cho IH, Jung UW, Choi SH, Kim CK, Cho KS. The effect of a fibrin-fibronectin/beta-tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials* 2006; 27: 3810-6.

Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal of cellular and molecular medicine* 2005; 9: 592-608.

Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, Yang XB. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 2010; 16: 263-71.

Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nature cell biology* 1999; 1: E131-8.

Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research* 1989; 265-84.

Jadlowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert opinion on biological therapy* 2003; 3: 409-23.

Jäger M, Sager M, Knipper A, Degistirici Ö, Fischer J, Kögler G, Wernet P, Krauspe R. In-vitro- und In-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. *Der Orthopade* 2004; 33: 1361-72.

Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. 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)* 2005; 50: 137-42.

Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S77-81.

Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* 2010; 224: 1415-40.

Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury* 2011; 42: 562-8.

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26: 5474-91.

Karcher H, Feichtinger M. Transformation of a vascularised iliac crest or scapula bone to a pedicled osteomuscular transplant for reconstruction of distant defects in the head and neck region: A new method of transforming two island flaps to one longer island flap. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2011;

Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Senturk U, Dormann S, Bail HJ, Duda GN. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2008; 26: 1649-55.

Khaled EG, Saleh M, Hindocha S, Griffin M, Khan WS. Tissue engineering for bone production- stem cells, gene therapy and scaffolds. *The open orthopaedics journal* 2011; 5 Suppl 2: 289-95.

Khurana JS (2009) *Bone pathology*, 2. edn. Humana Press, New York, NY

Khurana JS, McCarthy EF, Zhang PJ (2010) *Essentials in Bone and Soft-Tissue Pathology*. Springer Science+Business Media, Boston, MA

Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle HP, Hilbe M, von Rechenberg B, McCool J, Abrahamsen L, Nazarian A, Cory E, Curtis M, Kaplan D, Meinel L. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone* 2007; 41: 247-55.

Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X. Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *Journal of biomedical materials research* 1999; 47: 494-503.

Kneser U, Polykandriotis E, Ohnholz J, Heidner K, Grabinger L, Euler S, Amann KU, Hess A, Brune K, Greil P, Sturzl M, Horch RE. Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue engineering* 2006a; 12: 1721-31.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of cellular and molecular medicine* 2006b; 10: 7-19.

Komatsu DE, Warden SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *Journal of cellular biochemistry* 2010; 109: 302-11.

König HE, Liebich H-G (2005) Anatomie der Haussäugetiere : Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; Ausgabe in einem Band, 3., überarb. und erw. Aufl edn. Schattauer, Stuttgart [u.a.]. XVIII, 765 S

L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1998; 12: 47-56.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-6.

Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Annals of clinical biochemistry* 2000; 37 ( Pt 4): 432-46.

Lerouxel E, Moreau A, Bouler JM, Giumelli B, Daculsi G, Weiss P, Malard O. Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 2009; 47: 602-7.

Li CM, Ho YR, Liu YC. Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 2001; 100: 350-1.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2002; 84-A: 1032-44.

Malizos KN, Zalavras CG, Soucacos PN, Beris AE, Urbaniak JR. Free vascularized fibular grafts for reconstruction of skeletal defects. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2004; 12: 360-9.

Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42: 551-5.

Martin RB, Burr DB, Sharkey NA (1998) *Skeletal tissue mechanics*. Springer, New York [u.a.]. XIV, 392 S

McCulloch CA, Strugurescu M, Hughes F, Melcher AH, Aubin JE. Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. *Blood* 1991; 77: 1906-11.

Megas P. Classification of non-union. *Injury* 2005; 36 Suppl 4: S30-7.

Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, Duda GN. Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 2010; 47: 219-28.

Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, Hilbe M, McCool J, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Merkle HP, Rechenberg B, Kaplan DL, Kirker-Head C. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone* 2006; 39: 922-31.

Melnikova AV, Khasanov AG, Sendik AI, Sibiryak SV. Experimental evaluation of rat cord blood as a source of stem cells stimulating regeneration of the bone tissue. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2010; 149: 502-4.

Mian R, Morrison WA, Hurley JV, Penington AJ, Romeo R, Tanaka Y, Knight KR. Formation of new tissue from an arteriovenous loop in the absence of added extracellular matrix. *Tissue engineering* 2000; 6: 595-603.

Motoki DS, Mulliken JB. The healing of bone and cartilage. *Clinics in plastic surgery* 1990; 17: 527-44.

Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & development* 2005; 19: 1093-104.

Nair MB, Varma HK, Menon KV, Shenoy SJ, John A. Tissue regeneration and repair of goat segmental femur defect with bioactive triphasic ceramic-coated hydroxyapatite scaffold. *Journal of biomedical materials research. Part A* 2009; 91: 855-65.

Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BL. Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *The Journal of cell biology* 1988; 106: 441-50.

Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research* 1998; S56-65.

Nyangoga H, Mercier P, Libouban H, Basle MF, Chappard D. Three-dimensional characterization of the vascular bed in bone metastasis of the rat by microcomputed tomography (MicroCT). *PLoS one* 2011; 6: e17336.

Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *The Journal of biological chemistry* 1988; 263: 19430-2.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annual review of cell and developmental biology* 2000; 16: 191-220.

Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology* 2004; 14: 86-93.

Ozaki T, Hillmann A, Wuisman P, Winkelmann W. Reconstruction of tibia by ipsilateral vascularized fibula and allograft. 12 cases with malignant bone tumors. *Acta orthopaedica Scandinavica* 1997; 68: 298-301.

Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *Journal of biomedical materials research. Part A* 2003; 65: 489-97.

Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clinical orthopaedics and related research* 1999; 71-86.

Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman JR. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* 2005; 11: 120-9.

Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005; 36 Suppl 3: S5-7.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.

Polisetti N, Chaitanya VG, Babu PP, Vemuganti GK. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurology India* 2010; 58: 201-8.

Polykandriotis E, Horch RE, Arkudas A, Labanaris A, Brune K, Greil P, Bach AD, Kopp J, Hess A, Kneser U. Intrinsic versus extrinsic vascularization in tissue engineering. *Adv Exp Med Biol* 2006a; 585: 311-26.

Polykandriotis E, Arkudas A, Euler S, Beier JP, Horch RE, Kneser U. [Prevascularisation strategies in tissue engineering]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen* 2006b; 38: 217-23.

Polykandriotis E, Arkudas A, Horch RE, Sturzl M, Kneser U. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007; 11: 6-20.

Qi Y, Wang Y, Yan W, Li H, Shi Z, Pan Z. Combined mesenchymal stem cell sheets and rhBMP-2-releasing calcium-sulfate-rhBMP-2 scaffolds for segmental bone tissue engineering. *Cell transplantation* 2012;

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England journal of medicine* 2001; 344: 385-6.

Ragethly GR, Griffon DJ. The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 2011; 24: 1-8.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285: 25103-8.

Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical chemistry* 1999; 45: 1353-8.

Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, Saifzadeh S, Krishnakant P, Berner A, Woodruff MA, Schell H, Mehta M, Schuetz MA, Duda GN, Hutmacher DW. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Science translational medicine* 2012; 4: 141ra93.

Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology* 2007; 25: 409-16.

Roohani-Esfahani SI, Dunstan CR, Davies B, Pearce S, Williams R, Zreiqat H. Repairing a critical-sized bone defect with highly porous modified and unmodified baghdadite scaffolds. *Acta biomaterialia* 2012;

Rozema FR, Bergsma JE, Bos RRM, Boering G, Nijenhuis AJ, Pennings AJ, Bruijn WC. Late degradation simulation of poly(I-Lactide). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1994; 5: 575-81.

Rupp A, Schmahl W, Lederer W, Matiasek K. Strain differences in the branching of the sciatic nerve in rats. *Anatomia, histologia, embryologia* 2007; 36: 202-8.

Sabir MI, Xu X, Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2009; 44: 5713-24.

Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Gronblad M, Partio E, Kemppinen P, Rokkanen P. Immune response to polyglycolic acid implants. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 1990; 72: 597-600.

Sassard WR, Eidman DK, Gray PM, Block JE, Russo R, Russell JL, Taboada EM. Augmenting local bone with Grafton demineralized bone matrix for posterolateral lumbar spine fusion: avoiding second site autologous bone harvest. *Orthopedics* 2000; 23: 1059-64; discussion 64-5.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research* 1986; 299-308.

Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. [Bone substitutes]. *Der Orthopade* 2003; 32: 2-10.

Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, Lopez-Rios J, Zeller R, Barbero A, Martin I. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 7251-6.

Shea KG, Coleman DA, Scott SM, Coleman SS, Christianson M. Microvascularized free fibular grafts for reconstruction of skeletal defects after tumor resection. *Journal of pediatric orthopedics* 1997; 17: 424-32.

Skalak R (1988) *Tissue engineering : proceedings of a workshop*. Liss, New York. XXI,343 S

Swartz WM, Banis JC, Newton ED, Ramasastry SS, Jones NF, Acland R. The osteocutaneous scapular flap for mandibular and maxillary reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery* 1986; 77: 530-45.

Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques-Part II: Cell Types. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 2012; 18: 258-69.

Tanaka Y, Sung KC, Tsutsumi A, Ohba S, Ueda K, Morrison WA. Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plastic and reconstructive surgery* 2003; 112: 1636-44.

Tao J, Sun Y, Wang QG, Liu CW. Induced endothelial cells enhance osteogenesis and vascularization of mesenchymal stem cells. *Cells, tissues, organs* 2010; 191: 430.

Tolli H, Kujala S, Jamsa T, Jalovaara P. Reindeer bone extract can heal the critical-size rat femur defect. *International orthopaedics* 2011; 35: 615-22.

Tortelli F, Tasso R, Loiacono F, Cancedda R. The development of tissue-engineered bone of different origin through endochondral and intramembranous ossification following the implantation of mesenchymal stem cells and osteoblasts in a murine model. *Biomaterials* 2010; 31: 242-9.

Tsukamoto Y, Fukutani S, Mori M. Hydroxyapatite-induced alkaline phosphatase activity of human pulp fibroblasts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1992; 3: 180-3.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-9.

Urist MR, Nilsson O, Rasmussen J, Hirota W, Lovell T, Schmalzreid T, Finerman GA. Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clinical orthopaedics and related research* 1987: 295-304.

Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999; 354 Suppl 1: SI32-4.

Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical orthopaedics and related research* 2002: 110-20.

Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2007; 25: 741-9.

Vogelin E, Brekke JH, Jones NF. [Heterotopic and orthotopic bone formation with a vascularized periosteal flap, a matrix and rh-BMP-2 (bone morphogenetic protein) in the rat model]. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 2000; 4 Suppl 2: S454-8.

Vogelin E, Jones NF, Huang JI, Brekke JH, Lieberman JR. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2005; 87: 1323-31.

Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004; 364: 766-70.

Webb JC, Spencer RF. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 2007; 89: 851-7.

Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin HG, Stark GB, Kneser U. Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue engineering* 2004; 10: 1536-47.

Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L. Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 2009; 27: 687-93.

Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert KL. [Biomaterials, human tolerance and integration]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen* 1999; 70: 847-57.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8.

Yang HS, La WG, Bhang SH, Jeon JY, Lee JH, Kim BS. Heparin-conjugated fibrin as an injectable system for sustained delivery of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 1225-33.

Yang JH, Kim HJ, Kim SE, Yun YP, Bae JH, Kim SJ, Choi KH, Song HR. The effect of bone morphogenic protein-2-coated tri-calcium phosphate/hydroxyapatite on new bone formation in a rat model of femoral distraction osteogenesis. *Cytotherapy* 2012; 14: 315-26.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95: 3597-602.

Zhang Z-Y, Teoh S-H, Chong MSK, Lee ESM, Tan L-G, Mattar CN, Fisk NM, Choolani M, Chan J. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials* 2010; 31: 608-20.

Zhao Z, Yang D, Ma X, Zhao H, Nie C, Si Z. Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. *Tohoku J Exp Med* 2009; 219: 115-20.

Zhou M, Peng X, Mao C, Xu F, Hu M, Yu GY. Primate mandibular reconstruction with prefabricated, vascularized tissue-engineered bone flaps and recombinant human bone morphogenetic protein-2 implanted in situ. *Biomaterials* 2010; 31: 4935-43.

Žic R, Martinović S, Kušec V, Stanec S, Stanec Z, Vukičević S (2003) Reconstruction of Long Bone Defects in Rats Using Vascularised Bone Created by Epigastric Flap Prefabrication with Bone Morphogenetic Protein 7. In: Fourteenth Annual Meeting of EURAPS, Vienna, Austria

Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S16-21.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 2001; 7: 211-28.

## IX. ANHANG

### 1. *Verwendete Materialien und angewandte Methoden*

#### 1.1 **Protokolle zur Herstellung der Nährmedien**

##### 1.1.1 **Standardnährmedium**

500 ml Dulbecco´s MEM/Ham´s F-12 (DMEM/Ham's F-12 Flüssigmedium ohne L-Glutamin, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 100 ml fötales bovines Serum (FBS Superior, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 5 ml Penicillin-Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, flüssig 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 5 ml L-Glutamin (L-Glutamine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

Lagerung bei +4 °C. Vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C aufwärmen

##### 1.1.2 **Differenzierungsmedium**

610 ml Nährmedium (siehe oben)

50 µM L-Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure-2-phosphat)

10 mM β-Glycerophosphat

100 nM Dexamethason

(alle Zusätze von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

Lagerung bei +4 °C. Vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C aufwärmen

**1.2 Protokolle zur Herstellung der verwendeten Puffer****1.2.1 Trispuffer**

30,25 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland)

45 g NaCl (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

5 l Aqua dest.

Einstellung des pH-Werts mit 2 N HCl (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf 7,4

Für den TUNEL-Assay pH-Wert auf 8,0 einstellen

**1.2.2 Citratpuffer**

10,5 g Zitronensäure-Monohydrat (Zitronensäure-Monohydrat gepulvert, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland) lösen in

4,5 L Aqua dest.

Einstellung des pH-Werts mit 2 N NaOH (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf 6

Danach mit Aqua dest. auf 5 L auffüllen

**1.2.3 Ethyldiamintetraessigsäure-Puffer (EDTA-Puffer)**

400 g EDTA (EDTA, Fluka Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

65 g Zitronensäure-Monohydrat (Zitronensäure-Monohydrat gepulvert, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland)

2 L Aqua dest.

Der Puffer wurde mit 2 N HCl (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,1 eingestellt

### 1.3 Protokoll zur Durchführung der alkalischen Phosphatase Färbung

#### Verwendete Reagenzien:

Sodium Nitrit Solution, 0,1 mol/l

FRV-Alkaline Solution

Naphtol AS-BI Alkaline Solution

Citrate Solution

Hämatoxylin Solution Gill No. 3

(alle Reagenzien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

#### Herstellung der Lösungen

##### 1. Fixierungs-Lösung

- 13 ml Aceton
- 1,6 ml Formaldehyd
- 5 ml Citrat
- (alle Komponenten von Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

##### 2. Färbe-Lösung

- 18 ml Aqua dest.
- 400µl Sodium Nitrat + 400 µl Alkaline Solution zusammengeben und 2 min warten
- 18 ml Aqua dest. dazugeben und mischen
- 400 µl Naphtol dazugeben

##### 3. Hämatoxylin-Lösung

- Hämatoxylin Solution Gill No. 3 1:4 mit Aqua dest. verdünnen

#### AP-Färbung:

##### Färbung

- Differenzierungsmedium aus der Kulturflasche abpipettieren
- Flaschenboden 2x gründlich mit Milipoor-Wasser spülen und wieder abpipettieren
- Fixierlösung in die Flasche geben, für 3 Sekunden über den Boden laufen lassen und wieder abpipettieren

- 2x mit Milipoor-Wasser spülen
- Färbelösung hinzugeben und dunkel stellen (Inkubation)

#### Gegenfärbung

- Färbelösung abpipettieren und Flaschenboden mit Milipoor-Wasser spülen
- Hämatoxylin-Lösung in die Flasche geben, kurz schwenken und wieder abpipettieren
- Flaschenboden mit Aqua dest. spülen und an der Luft trocknen lassen

#### Mikroskopische Kontrolle:

- Differenzierte Osteoblasten stellen sich im Unterlichtmikroskop auf Grund ihrer ALP-Aktivität als blau angefärbte Zellen dar, während rote Zellen für diesen Marker negativ sind (keine Osteoblasten).

**2. *Tabellen***

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere .....                           | 35 |
| Tabelle 2: Einstellungen des Hypercenter zur Dehydratation .....               | 53 |
| Tabelle 3: Protokoll des Färbeautomaten für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... | 55 |
| Tabelle 4: Protokoll für die Masson-Goldner-Trichromfärbung.....               | 57 |
| Tabelle 5: Protokoll für die TUNEL Färbung .....                               | 58 |
| Tabelle 6: Protokoll zur Lektinfärbung .....                                   | 60 |
| Tabelle 7: Protokoll zur Alfa-smooth-muscle-actin (ASMA) Färbung .....         | 61 |
| Tabelle 8: Protokoll zur ED1 Färbung .....                                     | 62 |
| Tabelle 9: Reaktionsansätze für die Reverse Transkription .....                | 66 |
| Tabelle 10: Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer .....                 | 66 |
| Tabelle 11: Programmierung des Thermocyclers.....                              | 67 |
| Tabelle 12: Programmierung des Thermocyclers für die PCR.....                  | 68 |
| Tabelle 13: Komplikationen während des Versuchs .....                          | 73 |

### 3. Abbildungen

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Darstellung eines Abschnitts aus der Substantia compacta.....  | 3  |
| Abbildung 2: Vaskularisationsformen im Tissue Engineering.....  | 26 |
| Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf des Versuchs .....   | 34 |
| Abbildung 4: Technische Zeichnung der verwendeten Defektkammer .....  | 37 |
| Abbildung 5: Operationsvorgang .....  | 45 |
| Abbildung 6: Darstellung der Einteilung eines histologischen Schnittpräparats .....   | 64 |
| Abbildung 7: Röntgenaufnahmen des Oberschenkels.....  | 72 |
| Abbildung 8: Makroskopische Darstellung der Konstrukte der Gruppen A bis F .....  | 74 |
| Abbildung 9: Computertomographische Rekonstruktionen.....   | 76 |
| Abbildung 10: Mikrocomputertomographische Darstellung der 12-Wochen-Gruppen. ....   | 77 |
| Abbildung 11: Übersichtsschnitte in 40facher Vergrößerung (HE-Färbung) der Zehn-Tages-Gruppen .....   | 79 |
| Abbildung 12: Übersichtsschnitte in 40facher Vergrößerung (HE-Färbung) der Zwölf-Wochen-Gruppen C und D .....   | 80 |
| Abbildung 13: Aufnahmen zentraler Anteile der HE-gefärbten Schnitte in 100facher Vergrößerung der Gruppen A bis F .....   | 81 |
| Abbildung 14: Masson-Goldner-gefärbte Schnitte in 100facher Vergrößerung der Übergangsbereiche zwischen proximalem Femurknochen und Konstrukt der Gruppen A bis F ..... | 82 |
| Abbildung 15: Übersichtsschnitte in HE-Färbung der 12-Wochen-Gruppen E und F... ..  | 83 |
| Abbildung 16 Durchschnittliche Konstruktfläche der Explantate.....  | 85 |
| Abbildung 17: Durchschnittliche Knochenfläche pro Konstrukt .....   | 86 |
| Abbildung 18: Prozentualer Anteil der Knochenfläche an der Konstruktfläche.....   | 87 |
| Abbildung 19: Absolute Anzahl der Gefäße pro Konstrukt.....   | 88 |
| Abbildung 20: Prozentuale Gefäßanzahl in Abhängigkeit zu der Konstruktfläche .....  | 88 |
| Abbildung 21: Durchschnittliche Fläche eines Gefäßanschnitts .....  | 89 |
| Abbildung 22: Fluoreszenzfärbung. ....  | 90 |
| Abbildung 23: ASMA-Färbung.....   | 91 |
| Abbildung 24: Lectin-Färbung. ....  | 92 |
| Abbildung 25: Darstellung der Genexpression nach zwölf Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe (F).....  | 93 |

## X. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. R. Köstlin danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Doktorarbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Raymund E. Horch für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die Ermöglichung dieser Arbeit an der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen. Die freundliche Aufnahme in sein Team und seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht bereicherten meine Zeit in Erlangen wesentlich.

Herrn PD. Dr. A. Arkudas danke ich ganz herzlich für das einzigartige Studiendesign und seine guten Ratschläge, sowie die immer wieder neuen Ideen für die Umsetzung der Versuche. Besonders für seine unermüdliche Unterstützung und Hilfe in der heißen Endphase der Arbeit gilt ihm mein größter Dank.

Danke auch an alle Kolleginnen und Kollegen aus dem Universitätsklinikum Erlangen, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und für Fragen ein offenes Ohr hatten. Vor allem die gute Zusammenarbeit und das hohe Engagement in der AG Arkudas ermöglichen die erfolgreiche Bearbeitung eines so komplexen und zeitintensiven Themas.

Danke Gregor, dass Du zu jeder Tages- und Nachtzeit als meine rechte Hand bei jeglicher anfallenden Arbeit geholfen hast und die Stimmung mit deiner informativ-witzigen Art immer hoch gehalten hast.

Danke Isa, Diana, Stefan, Ilse und Marina für Eure Unterstützung bei der histologischen Auswertung sowie die positive Antwort auf all meine Fragen und Bitten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr.-Ing. habil. C. Körner und Herrn Jörg Komma für die Planung, Konstruktion und Herstellung der Titankammern.

Für die Durchführung und Auswertung der Micro-CT-Messungen danke ich Herrn Dipl.-Ing. Johannes Hartmann und Team, sowie für die CT-Messungen Herrn Dr. rer. nat. Stefan Lyer und seinem Team. Herrn Dr. Andreas Brandl bin ich sehr dankbar, für die Übernahme der molekularbiologischen Aufarbeitung und Auswertung.

Ich danke auch allen Mitarbeitern des FPZ für die Versorgung der Ratten.

Für die professionelle Unterstützung in Aufbau, Form und Sprache danke ich außerdem Dr. Markus König.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich von ganzem Herzen für Ihr Verständnis, dass ich während des Schreibens keine Zeit für sie und andere Dinge hatte, sowie für die Aufheiterung und Motivation.

Danke Mama, danke Papa, dass Ihr immer für mich da seid und ich mich auf Eure Hilfe verlassen kann. Ohne Eure großartige Unterstützung in den letzten Jahrzehnten, die mir überhaupt erst diesen Berufsweg ermöglichten, wäre ich nicht so weit gekommen.

Mein größter Dank geht an Armin, für seine unendliche Motivation, Zuversicht, Tipps und Erklärungen, die Korrektur dieser Arbeit und die Übernahme aller ablenkenden Arbeiten, die seelische und materielle Versorgung und das gesamte Happinessmanagement. Danke mein Schatz für Alles!