

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg  
Sektion Experimentelle Orthopädie  
Leitung: Prof. rer. biol. hum. W. Richter

Angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. Philip Kasten

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)  
des Instituts für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Einfluss von ovinen Fettstammzellen und plättchenreichem Plasma auf die Knochenheilung beim Schaf**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
von Katharina Fechner  
aus Mühlheim a. D.

München, 2009

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

Dekan: Univ. Prof. Dr. Braun  
Referent: Univ. Prof. Dr. Schmahl  
Koreferent: Univ. Prof. Dr. Aigner

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

## **Widmung**

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, und auf die ich mich in jeder Lebenslage verlassen kann.

# Inhaltsverzeichnis

<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b> <b>SCHRIFTTUM</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1</b> <b>Knochen</b> .....	<b>4</b>
1.1.1   Struktureller Aufbau .....	4
1.1.2   Zusammensetzung von Knochen .....	5
1.1.2.1   Chemische Zusammensetzung.....	5
1.1.2.2   Zelluläre Bestandteile .....	5
1.1.2.3   Arten von Knochengewebe .....	8
<b>1.2</b> <b>Knochenregeneration</b> .....	<b>11</b>
1.2.1   Direkte Knochenheilung .....	12
1.2.2   Indirekte Knochenheilung.....	13
<b>1.3</b> <b>Klinischer Hintergrund</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4</b> <b>Tissue Engineering</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5</b> <b>Trägermaterialien</b> .....	<b>20</b>
<b>1.6</b> <b>Stammzellen</b> .....	<b>24</b>
1.6.1   Stammzellen aus Fettgewebe.....	26
<b>1.7</b> <b>Plättchenreiches Plasma (PRP)</b> .....	<b>30</b>
1.7.1   Inhaltsstoffe von PRP.....	30
1.7.2   Funktionsweise des PRP .....	34
1.7.3   PRP in der Knochenregeneration .....	36
<b>2</b> <b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1</b> <b>Zellisolation und Expansion</b> .....	<b>38</b>
2.1.1   Isolation von ATSC .....	38
2.1.2   Expansion.....	39
2.1.3   Passagierung .....	39
2.1.4   Bestimmung der Populationsverdopplungen .....	41
2.1.5   Einfrieren und Auftauen .....	41
<b>2.2</b> <b>Untersuchung des in vitro Differenzierungspotentiales</b> .....	<b>41</b>

2.2.1	Adipogene Differenzierung.....	42
2.2.1.1	Lipid Ölrot O-Färbung.....	42
2.2.2	Chondrogene Differenzierung.....	42
2.2.2.1	Fixierung und Einbettung der Pellets .....	43
2.2.2.2	Anfertigung von Schnitten .....	43
2.2.2.3	Entparaffinierung .....	44
2.2.2.4	Alzianblau .....	44
2.2.2.5	Kollagen Typ I und Typ II Immunhistologie .....	44
2.2.2.6	Beurteilung der Chondrogenese .....	45
2.2.3	Osteogene Differenzierung .....	46
2.2.3.1	Alizarinfärbung.....	47
2.2.3.2	Herstellung von Zelllysaten .....	48
2.2.3.3	Bestimmung der ALP-Aktivität.....	48
2.2.3.4	Proteinbestimmung.....	49
<b>2.3</b>	<b>Charakterisierung von PRP/FFP .....</b>	<b>50</b>
2.3.1	PDGF-AB ELISA .....	51
2.3.2	TGF- $\beta$ 1 ELISA.....	52
<b>2.4</b>	<b>In vitro Versuche mit PRP .....</b>	<b>53</b>
2.4.1	Untersuchung der Osteogenese und Proliferation unter dem Einfluss von PRP/FFP ...	53
<b>2.5</b>	<b>Tierversuch .....</b>	<b>54</b>
2.5.1	Versuchstiere .....	55
2.5.2	Tierhaltung .....	55
2.5.3	Fettentnahme .....	56
2.5.4	Besiedelung der Konstrukte.....	56
2.5.5	Operationsdurchführung .....	56
2.5.5.1	Narkose und Analgesie .....	56
2.5.5.2	Operationstechnik.....	57
2.5.6	Postoperative Nachbehandlung und Monitoring .....	59
2.5.7	Radiologische Kontrollen .....	60
2.5.8	Polychrome Sequenzmarkierung.....	61
2.5.9	Versuchsabschluss (Euthanasie).....	61
<b>2.6</b>	<b>Auswertung der Röntgenbilder.....</b>	<b>62</b>
<b>2.7</b>	<b>Histologie .....</b>	<b>64</b>
2.7.1	Giemsa-Eosin Färbung .....	65
2.7.2	Auswertung der histologischen Schnitte .....	66
<b>2.8</b>	<b>Mikro-Computertomographie.....</b>	<b>67</b>

<b>2.9</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>69</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellisolation und Expansion.....</b>	<b>70</b>
<b>3.2</b>	<b>In-Vitro Differenzierungspotential .....</b>	<b>72</b>
3.2.1	Adipogene Differenzierung.....	72
3.2.2	Chondrogene Differenzierung.....	72
3.2.3	Osteogene Differenzierung .....	73
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung des verwendeten PRPs.....</b>	<b>78</b>
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von PRP auf Osteogenese und Proliferation.....</b>	<b>79</b>
<b>3.5</b>	<b>Tierversuch .....</b>	<b>82</b>
3.5.1	Röntgenauswertung .....	82
3.5.2	Computertomographie .....	88
3.5.3	Histologie.....	89
3.5.3.1	Qualitative histologische Beobachtungen .....	89
3.5.3.2	(Semi-) Quantitative histologische Auswertung .....	96
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>100</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolation und Expansion der ovinen ASC.....</b>	<b>100</b>
<b>4.2</b>	<b>Differenzierung der ovinen ASC .....</b>	<b>102</b>
<b>4.3</b>	<b>Plättchenreiches Plasma .....</b>	<b>105</b>
4.3.1	Einfluss von PRP auf Osteogenese und Proliferation .....	108
<b>4.4</b>	<b>Einsatz von ATSC mit oder ohne PRP auf mineralisiertem Kollagen in einem Defektmodell kritischer Größe im Schaf.....</b>	<b>110</b>
4.4.1	Tiermodell.....	110
4.4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	114
<b>4.5</b>	<b>Abschliessende Betrachtung und Ausblick .....</b>	<b>124</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY. ....</b>	<b>126</b>

<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>129</b>
<b>7.1</b>	<b>Materialien und Rezepte .....</b>	<b>129</b>
7.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Medikamente .....	129
7.1.2	Puffer .....	131
7.1.3	Lösungen .....	132
7.1.4	Verbrauchsmaterialien .....	133
7.1.5	Kits und ELISAs .....	134
7.1.6	Wachstumsfaktoren .....	134
7.1.7	Kulturmedien .....	134
7.1.8	Enzyme .....	137
7.1.9	Antikörper .....	137
7.1.10	Geräte .....	137
7.1.11	Software für Datenverarbeitung .....	138
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>139</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>163</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>163</b>
<b>11</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>167</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>172</b>

## Einleitung

Die Behandlung großer Knochendefekte stellt nach wie vor eine der großen Herausforderungen der Orthopädie dar. Vor allem im Zusammenhang mit Traumata, kongenitalen oder degenerativen Erkrankungen, oder bei der Entfernung von Tumoren können so große Defekte entstehen, dass auch bei Anwendung optimaler Therapiestrategien unter Umständen keine Heilung mehr stattfinden kann. Um die Stabilität und Form des betroffenen Skelettabschnittes wiederherstellen zu können, ergibt sich bei rund 15% aller Operationen am Skelettsystem die Notwendigkeit zum Einsatz von Knochenersatzstoffen. In Deutschland werden jährlich ca. 50.000 (Diehl 2008) Knochendefekte chirurgisch mit Knochenersatzstoffen versorgt.

Als „Therapiestandard“ gilt heute die Auffüllung des Knochendefekts mit autologer Spongiosa.

Dieses Verfahren weist jedoch Nachteile auf, die vor allem mit dem bei dieser Methode notwendigen Zweiteingriff verbunden sind. Alternativ werden aktuell allogene oder xenogene Knochentransplantate eingesetzt. Aber auch diese Verfahren gelten aufgrund möglicher Immunreaktionen oder Infektionsübertragungen als problematisch. Die Zahl der Knochentransplantationen in den USA pro Jahr liegt bei ca. 450.000 (Service 2000); in Deutschland beträgt sie etwa 71.000 (Jager et al. 2005).

Die bestehenden Probleme der verwendeten Verfahren haben dazu geführt, dass nach Alternativen zur Knochendefektbehandlung gesucht wird.

Ein viel versprechender Ansatz stellt das „Tissue Engineering“, also die Züchtung von Geweben dar. Bei diesem Forschungsfeld werden drei Komponenten, nämlich Trägermaterialien, Wachstumsfaktoren und eine Zellquelle kombiniert und so versucht, die für einen Knochenersatzstoff wichtigen osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften zu vereinen.

Welches die geeigneten Komponenten darstellen, ist Gegenstand aktueller Forschung.

In der Vergangenheit wurden sowohl resorbierbare, als auch nicht resorbierbare Materialien als osteokonduktive Trägermaterialien eingesetzt. Resorbierbare Trägerstoffe stellten dabei aufgrund der besseren biomechanischen Eigenschaften die geeigneteren Materialien dar, da sie sich dem stetigen Umbau des Knochens besser anpassen

konnten. Als resorbierbares Material wurde in dieser Arbeit mineralisiertes Kollagen verwendet. Es besteht aus einer Kombination von Kollagen Typ1 und Hydroxyapatit, also den Hauptkomponenten der extrazellulären Knochenmatrix und stellt somit eine gute Imitation der osteokonduktiven Eigenschaften des autologen Knochens dar.

Als osteogene Komponente kommen prinzipiell verschiedene Zellquellen in Frage. Die Verwendung embryonaler Stammzellen kam aufgrund ethischer Bedenken und erheblicher rechtlicher Einschränkungen für die vorliegende Arbeit nicht in Frage. Ethisch unbedenklich ist jedoch der Einsatz adulter pluripotenter Stammzellen. Diese sind aus verschiedenen Geweben relativ einfach zu isolieren und lassen sich innerhalb kurzer Zeit ohne Entartungsrisiko auf ausreichende Zellzahlen expandieren. Fettgewebe stellt dabei eine attraktive Quelle für die Gewinnung dieser adulten Stammzellen dar, da die Entnahme des Fettgewebes im Vergleich zur Gewinnung von Knochenmark viele Vorteile bietet: Der Entnahmeeingriff ist unkompliziert, weniger invasiv, weitgehend schmerzfrei und kann unter lokaler Betäubung durchgeführt werden.

Als osteoinduktive Komponente stellt Plättchenreiches Plasma (PRP) als körpereigene Quelle von Wachstumsfaktoren eine attraktive Alternative zu teuren, künstlich hergestellten Wachstumsfaktoren dar. Dieses Wachstumsfaktorengemisch enthält eine Reihe von Wachstumsfaktoren der frühen Frakturheilung und wurde deshalb in letzter Zeit auch zunehmend für den Einsatz in der Orthopädie interessant (Kitoh et al. 2007; Gandhi et al. 2006; Sarkar et al. 2006; Rai et al. 2007). Ob der Zusatz von PRP zu Stammzellen und einem Trägermaterial *in vivo* jedoch tatsächlich einen positiven Effekt auf die Knochenbildung ausübt ist noch unklar. Auch *in vitro* wird die Fähigkeit von PRP zur Stimulation der Osteogenese noch kontrovers diskutiert (Kanno et al. 2005; Goto et al. 2006; Arpornmaeklong et al. 2004; Gruber et al. 2004; Gruber et al. 2006). Weitgehende Einigkeit besteht allerdings über die positiven proliferativen und mitogenen Effekte von PRP auf Stammzellen zumindest in der Zellkultur (Weibrich et al. 2002; Gruber et al. 2002; Oprea et al. 2003; Kanno et al. 2005; Kawase et al. 2005; Graziani et al. 2006)

### Konkrete Ziele der vorliegenden Arbeit

Vor der klinischen Anwendung eines Tissue Engineering Konstruktes in der Klinik, muss das Konzept unter orthotopen Bedingungen, also *in vivo* am lasttragenden Defekt im Tiermodell überprüft werden. Dazu wird in dieser Arbeit ein Defektmodell kritischer Größe an der Schafstibia verwendet.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist also die Evaluation der Kombination von mineralisiertem Kollagen und Stammzellen aus ovinen Fettgewebe mit oder ohne PRP bezüglich ihres Einflusses auf die Knochenheilung am Knochendefekt der Schafstibia. Von besonderem Interesse, war dabei die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Ist die Verwendung von Fettstammzellen *in vivo* gleichwertig zum Einsatz von Knochenmarksstammzellen?
- Kann durch den Zusatz von PRP die Heilung von langstreckigen und gewichtstragenden Knochendefekten verbessert werden?

Vor Beantwortung dieser Fragen musste die Isolation von Stammzellen aus ovinen Fettgewebe etabliert werden, und der Stammzellcharakter der so gewonnenen Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde der Einfluss von PRP auf diese Zellen *in vitro* untersucht.

In den nachfolgenden Abschnitten soll nun zunächst auf die Biologie des Knochens und die physiologischen Vorgänge bei der Knochenregeneration und -heilung eingegangen werden. Außerdem soll der klinische Hintergrund dargestellt und das Tissue Engineering im Allgemeinen, sowie die drei Komponenten Trägermaterialien, Stammzellen und Plättchenreiches Plasma im Detail vorgestellt werden.

# 1 Schrifttum

## 1.1 Knochen

Knochen gehört zu den härtesten Geweben, die der Körper hervorzubringen vermag: Er ist fest gegen Zug, Druck, Drehung und Biegung. Er bietet dem Skelett die mechanische Stabilität, die für den Bewegungsablauf, das Tragen des Gewichtes und den Schutz der inneren Organe notwendig ist.

### 1.1.1 Struktureller Aufbau

Nach ihrem Aufbau werden lange, platte und kurze Knochen unterschieden. Lange Knochen, wie auch die Tibia werden als Röhrenknochen bezeichnet und lassen sich in einen schlanken Knochenschaft (Diaphyse) und zwei Knochenenden (Epiphysen) unterteilen (Remedios 1999). Die Epiphysen bilden die Gelenkflächen und sind überknorpelt. Zwischen Diaphyse und Epiphyse liegen die Metaphysen, die als Epiphysenfugenplatten während der Knochenentwicklung das Wachstumsreservoir für das Längenwachstum der Knochen darstellen.

Dia-, Meta- und Epiphyse unterscheiden sich zum einen durch Länge und Durchmesser, aber auch hinsichtlich ihrer Knochenstruktur. Im Bereich der Diaphyse überwiegt eine kompakte Knochensubstanz (Substantia compacta), die Epiphysen hingegen sind von einer vergleichsweise dünnen Kortikalis (Substantia compacta) umgeben und bestehen vor allem aus einem schwammartigen Bälkchenwerk (Substantia spongiosa). In der Metaphyse kommt es zu einem sukzessiven Übergang zwischen den beiden Knochensubstanzen. Die beschriebene Verteilung von kompaktem und spongiösem Knochen ist auf biomechanische Ursachen zurückzuführen: Der spongiöse Knochen ist weniger steif und kann aufgrund seiner schwammartigen Struktur mehr Energie aufnehmen, bevor es zu einem Knochenbruch kommt (Trostle und Markel 1996). Durch die kompakte Struktur des Diaphysenbereichs erhält der lange Röhrenknochen die benötigte Steifigkeit (Radasch 1999).

Das Periost (Beinhaut) ist ein spezialisiertes Bindegewebe, das als fibrovaskuläre Membran die Außenseite eines Knochens umhüllt. Die Innenseite wird von der dünne-

ren Knochenhaut (Endost) ausgekleidet. Das Periost besteht aus zwei Schichten: eine äußere Faserschicht (Stratum fibrosum) und einer inneren, nerven-, gefäß-, und zellreichen Schicht (Stratum osteogenicum, Cambium). Diese Cambiumschicht weist Osteoprogenitorzellen mesenchymalen Ursprungs auf und spielt während der Wachstumsphase des Organismus eine wichtige Rolle bei der Ossifikation. Die Dicke der Zellschicht und damit das Knochenregenerationspotential nehmen mit dem Alter ab (Owen 1970). Bei einer, durch Trauma oder Infektion verursachten mechanischen Stimulation kann das Regenerationspotential des Knochens wieder erhöht werden (Simon et al. 2003). Demzufolge ist die Cambiumschicht in der Lage, die Bildung von knöchernem Kallusgewebe zu induzieren (Simon et al. 2003) und spielt eine wichtige Rolle in der Frakturheilung (Remedios 1999; Saris et al. 1999).

### **1.1.2 Zusammensetzung von Knochen**

#### **1.1.2.1 Chemische Zusammensetzung**

Knochengewebe besteht zu ca. 35 Prozent aus organischer und zu ca. 65 Prozent aus anorganischer Matrix (Schmidmaier und Wildemann 2006). Unter die organische Matrix fällt mit 95 Prozent hauptsächlich Kollagen, das wiederum zu 90 Prozent durch Kollagen Typ I vertreten ist (Wang et al. 2002). Außerdem zählt zur organischen Matrix die ungeformte Grundsubstanz, die aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen besteht. Die anorganische Matrix besteht vor allem aus Calcium und Phosphat in Form von in Hydroxylapatit gebundenen Kristallen, enthält aber auch Karbonate, Natrium, Magnesium und Eisen (Remedios 1999; Webb und Tricker 2007).

#### **1.1.2.2 Zelluläre Bestandteile**

##### **Osteoblasten**

Histologisch betrachtet sind Osteoblasten polygonale, basophile Zellen mit einem gut entwickelten Golgi-Apparat bzw. endoplasmatischen Retikulum. Sie stammen von stark teilungsfähigen Osteoprogenitorzellen ab, die aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen hervorgehen (Owen 1970; Ng et al. 1997; Remedios 1999; Webb und Tricker 2007). Da sie nicht teilungsfähig sind, muss ihr Bestand immer wieder aus diesen Progenitorzellen aufgefüllt werden. Die Osteoprogenitorzellen finden sich vor allem an der Knochenoberfläche, im Periost und Endost (Owen 1970).

Die Osteoblasten synthetisieren die nicht-mineralisierte, organische Knochenmatrix (Osteoid), bestehend aus Kollagenfibrillen und einer Vielzahl von Matrixproteinen, wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin und der alkalische Phosphatase (ALP) (Owen 1970; Frost 1989; Hock et al. 2001). Die membranständige alkalische Phosphatase (ALP) ist ein typischer Marker für die Aktivität von Osteoblasten und ihre Aktivität spiegelt die unterschiedlichen Stufen des Differenzierungsgrades wieder (Wlodarski 1990). Außerdem besitzen Osteoblasten auch Rezeptoren für das Parathormon, Glykokortikoide, Vitamin D, Sexualhormone, sowie für Cytokine, die das Wachstum und die Differenzierung von Osteoblasten beeinflussen können (Pfeilschifter et al. 1993).

Die synthetisierte organische Matrix bildet das Grundgerüst für die Anlagerung von anorganischen Kristallen und führt zur Entstehung von Kristallisationszentren an den Kollagenfibrillen (Remedios 1999). Mit Fortschreiten der Mineralisation mauern sich die Osteoblasten zunehmend ein, wodurch sie sich in ihrer Form verändern und zu abgeplatteten, länglichen Osteozyten werden (Shapiro 1988).

### **Osteozyten**

Etwa 10 Prozent der Osteoblasten mauern sich wie oben beschrieben ein und werden zu so genannten „entombing osteoblasts“, also Osteozyten. Sie stellen den am häufigsten vorkommenden Zelltyp im Knochen dar (Jilka 2003). Diese Zellen weisen aufgrund der geringeren metabolischen Aktivität deutlich weniger Zytoplasma auf als Osteoblasten und besitzen auch weniger Zellorganellen. Sie spielen trotz ihrer verminderten Aktivität eine wichtige Rolle bei der ständigen Erneuerung der organischen Matrix (Banks 1993). Sie besitzen, neben der Fähigkeit Knochensubstanz zu produzieren, auch in begrenztem Umfang das Potential zur Knochenresorption. Diese Knochenresorption der umliegenden Matrix wird durch das Parathormon und Vitamin D reguliert.

Die einzeln in Lakunen liegenden Zellen stehen über Zytoplasmfortsätze miteinander, aber auch mit Osteoblasten und dem Gefäßsystem in direktem Kontakt und Stoffaustausch (Shapiro 1988; Noble und Reeve 2000). Durch die zytoplasmatischen Fortsätze, die in den so genannten Canaliculi ossei verlaufen, erscheinen die Osteozyten als sternförmige Zellen (Nijweide und Mulder 1986). Das Netzwerk aus den vielen Osteozyten, die mit ihren asymmetrisch verzweigten Zellfortsätzen auch mit den an der Knochenoberfläche befindlichen Osteoblasten und bone lining cells in Kontakt stehen,

ist das so genannte „Osteozyten – Bone Lining Cells System“. Dieses System stellt ein funktionelles Synzytium für den Ionenaustausch dar (Rubinacci et al. 2002).

### **Bone Lining Cells**

Diese flachgestreckten Zellen liegen vor allem an der Skelettoberfläche und sind über gap junctions mit benachbarten Osteozyten und Osteoblasten verbunden. Bone Lining Cells kleiden 75-80% der endostalen Oberflächen aus (Miller und Jee 1987). Sie werden als eine Erscheinungsform von Osteoblasten angesehen, die nach dem Knochenaufbau an der Oberfläche persistieren. Sie liegen also an ruhenden, d.h. metabolisch inaktiven Oberflächen (Parfitt 1994). Sie sind dabei nicht direkt am Beginn der mineralisierten Knochenmatrix lokalisiert, sondern auf einem Band nicht mineralisierter Filamente und Kollagenfasern, das dem Osteoid, also der noch nicht mineralisierten Knochenmatrix, gleichzusetzen ist (Bowman und Miller 1986).

Durch die Trennung intraosseärer Flüssigkeiten von der Flüssigkeit im Knochenmarkinterstitium kommt den Zellen eine wichtige Barrierefunktion zu (Canas et al. 1969). Dabei erfüllen sie Aufgaben der Mineralhomöostase. Neben dieser Barrierefunktion, sind ihnen wichtige Funktionen bei der Regulation des Knochenumbaus zugeschrieben (Miller und Jee 1987).

### **Osteoklasten**

Osteoklasten sind 10-100 µm große (Bucher und Wartenberg 1997) mehrkernige bewegliche Zellen. Die Anzahl der Zellkerne schwankt und hängt von der Anzahl der fusionierten Progenitorzellen ab (Bucher und Wartenberg 1997). Sie besitzen außerdem einen ausgeprägten Golgi-Apparat und sind reich an Mitochondrien, Vakuolen, Endosomen und lysosomalen Enzymen, wohingegen ihr endoplasmatisches Retikulum eher schwach ausgeprägt ist. Aktive Osteoklasten haben direkten Kontakt mit der Knochenoberfläche und weisen unterschiedliche Membranzonen auf. Im Bereich der Knochenresorption im Zentrum der Zelle liegt eine vesikelreiche Zone der Plasmamembran, in der die Zellmembran in Form eines Bürstensaums stark gefältelt ist. Diese Zone wird auch „ruffled border“ genannt. In der so genannten „clear zone“ findet die Anheftung an die Knochenoberfläche statt. Dieser, auch Siegelzone genannte, Bereich ist reich an Mikrofilamenten und arm an Zellorganellen. Die Osteoklasten liegen in Nestern (Amling und Dellling 1996) in Ausbuchtungen der Knochenbälkchen, den so genannten Howshipschen Lakunen oder Resorptionslakunen nahe der Knochenober-

fläche. Sie stellen eine kleine Population dar und bedecken etwa ein Prozent der Knochenoberfläche (Amling und Delling 1996). Die Osteoklasten stammen von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Ihre Vorläuferzellen stammen vermutlich von mononukleären, pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab und zirkulieren als Progenitorzellen im Blut (Ng et al. 1997; Remedios 1999) Ihre Lebensdauer beträgt wenige Tage. Die Differenzierung und Funktion der Osteoklasten wird durch Faktoren reguliert, die von Osteoblasten freigesetzt werden (Ng et al. 1997). Sie sind für den geordneten Abbau von Knochen zuständig, der für die Skelettentwicklung, für die biomechanische Anpassung und die ständige Erneuerung des Skelettsystems von großer Bedeutung ist. Sie lösen die mineralische Knochenmatrix auf, indem über Protonenpumpen im extrazellulären Kompartiment ein saures Milieu (pH=3) entsteht. Dadurch werden zum einen Hydroxylapatitkristalle aus der Knochenmatrix herausgelöst und zum anderen lysosomale Enzyme aktiviert (Amling und Delling 1996). Solche Enzyme, wie z. B. die Carboanhydrase II und die saure Phosphatase sorgen dann für den Abbau der organischen Matrix.

### **1.1.2.3 Arten von Knochengewebe**

#### **Geflechtknochen**

Dieser, auch Bindegewebs- oder Faserknochen genannte, Knochen ist die phylogenetische- und ontogenetische ältere Knochenform. Geflechtknochen entsteht während jeder Knochenneubildung (Ng et al. 1997), also sowohl in der Skelettentwicklung, als auch bei der schnellen Rekonstruktion von Knochen z.B.: nach Knochenbrüchen (Noble und Reeve 2000). Er wird aber im weiteren Verlauf der Skelettentwicklung, respektive der Knochenheilung, durch den stabileren Lamellenknochen ersetzt (Liebich 1993). Ausnahmen bilden die platten Schädelknochen, sowie die Alveolen der Zähne und Knochen, an denen größere Sehnen und Bänder einstrahlen (Bucher und Wartenberg 1997).

Diese Knochenform wird durch desmale (direkte) Ossifikation gebildet. Dabei kommt es zu einer starken Vermehrung und Zusammenlagerungen von Mesenchymzellen, die zu osteogenetischen Stammzellen und Osteoblasten differenzieren (Shapiro 1988). Die Osteoblasten synthetisieren wie beschrieben das Osteoid und wandeln sich zum Teil durch das Einmauern mit Osteoid in Osteozyten um. Durch die folgende Mineralisierung entstehen die Knochenbälkchen des Geflechtknochens. Dabei liegen die

Osteozyten ohne erkennbare Ordnung in der Knochenmatrix, die von unregelmäßig angeordneten Kollagenfibrillen durchzogen ist. Diese Knochenform ist zellreicher und durch den geringeren Mineralgehalt flexibler als der Lamellenknochen, aber infolgedessen auch instabiler gegenüber einwirkenden Kräften als dieser (Noble und Reeve 2000; Webb und Tricker 2007).

### **Lamellenknochen**

Diese Knochenform entsteht durch chondrale (indirekte) Ossifikation. Dabei entsteht zuerst Knorpel, der dann abgebaut und durch Knochen ersetzt wird (Ng et al. 1997). Die dabei ablaufenden morphologischen und histochemischen Vorgänge sind überaus komplex (Bucher und Wartenberg 1997; Liebich 1993) und beginnen im Knocheninneren der Diaphyse mit der Vergrößerung der Knorpelzellen (Einhorn 1998). Dabei erhöht sich ihr Gehalt an Glykogen, alkalischer Phosphatase und Phosphorylase. Die Interzellulärsubstanz tritt im Verhältnis zu den hypertrophen Chondrozyten in den Hintergrund. Die Einlagerung von Kalksalzen in die Interzellulärsubstanz führt allmählich zu einer mangelnden Nährstoffversorgung der Chondrozyten, da diese normalerweise über Diffusion erfolgt. Dadurch gehen die Knorpelzellen schließlich zugrunde. Das verkalkte Knorpelgewebe wird von Chondroklasten aufgelöst und durch mesenchymales, gefäßreiches Gewebe ersetzt, welches Osteoblasten und Osteoklasten liefert. Der Abbau des mineralisierten Gewebes erfolgt jedoch nicht regelmäßig; so werden z. B. unverkalkte Quersprosse der Interzellulärsubstanz schneller und gründlicher abgebaut. Die dadurch zurückbleibenden Reste von verkalktem Gewebe bilden die Leitstruktur, an deren Oberfläche sich die Osteoblasten aufreihen, um Osteoid zu synthetisieren und abzulagern.

Die beschriebene Ossifikationsform läuft sowohl bei der prä- und postnatalen Ersetzung des Primordialskeletts als auch bei der Frakturheilung ab (Webb und Tricker 2007). Die Verknöcherung des Skeletts beginnt beim Schaf in der fünften Entwicklungswoche bei einer Scheitel-Steiß-Länge von 39 mm (Rajtova 1973). Zuerst ossifizieren die Diaphysen der langen Röhrenknochen, indem durch desmale Ossifikation ein diaphysärer Knochenmantel entsteht (Rajtova 1973). Die darauf folgende Umwandlung des Skeletts in Lamellenknochen läuft beim Schaf (Nestflüchter) wesentlich schneller ab als beim Mensch und ist je nach Schafrasse mit zwei bis drei Jahren abgeschlossen.

Vom Aufbau her ist der Lamellenknochen charakterisiert durch seine lamelläre Schichtung (Lamellensystem) (Ng et al. 1997; Webb und Tricker 2007) und die immer wiederkehrende Baueinheit, das Osteon bzw. Harversche System. Die Osteone verlaufen parallel zur Längsachse der Röhrenknochen. Schafe verfügen im Gegensatz zum Menschen über eine primäre Osteonstruktur, was bedeutet dass ihre Osteone einen Durchmesser von weniger als 100 µm aufweisen und mindestens zwei zentrale Blutgefäße enthalten. Die Sekundärosteonstruktur des Menschen zeichnet sich durch größere Osteone mit einem Durchmesser von über 100 µm aus, die zentral mehrere Blutgefäße enthalten und die durch eine so genannte Zementlinie von den benachbarten Lamellen abgetrennt sind. Bei beiden Strukturen liegen die im inneren liegenden Gefäße im so genannten Zentralkanal (Haversschen Kanal), der direkt oder indirekt mit der Markhöhle in Verbindung steht und deshalb mit Endost ausgekleidet ist. Über Querverbindungen, die von dem Zentralkanal abgehen, stehen die Harverschen Kanäle untereinander und mit dem Gefäßsystem in Verbindung. Diese, die Osteone durchbrechenden Querverbindungen werden auch Volkmannsche Kanäle genannt. Um den Zentralkanal herum sind Lamellen aus verkalktem Osteoid in mehreren Schichten angeordnet. Diese Lamellenstruktur entsteht durch die Art der Knochenanlagerung, wobei sich die Osteoblasten um den Zentralkanal sammeln und Osteoid synthetisieren. Durch die darauf folgende Mineralisierung des Osteoids werden sie zu Osteozyten. Die nächste Generation Osteoblasten bildet die nächste innen anliegende Speziallamelle (Haversche Lamelle). Die zwischen diesen Lamellen liegenden Osteozyten sind stark spindelförmig abgeflacht und stehen wie beschrieben (siehe Osteozyten) über ihre zytoplasmatischen Fortsätze untereinander und mit den Gefäßen des Zentralkanals in Verbindung. Die Canaliculi ossei, in denen die zytoplasmatischen Fortsätze verlaufen, sind beim Lamellenknochen regelmäßiger und zahlreicher ausgebildet als beim Geflechtknochen. Benachbarte Osteone sind durch eine unverkalkte Zementlinie aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen verbunden, welche eine Schwachstelle im Lamellenknochen darstellt (Troostle und Markel 1996). Zwischen den Osteonen liegen sogenannte Schaltlamellen, die entstehen, wenn Osteone im Rahmen von Umbauvorgängen abgebaut werden und Reste von konzentrischen Lamellen übrig bleiben.

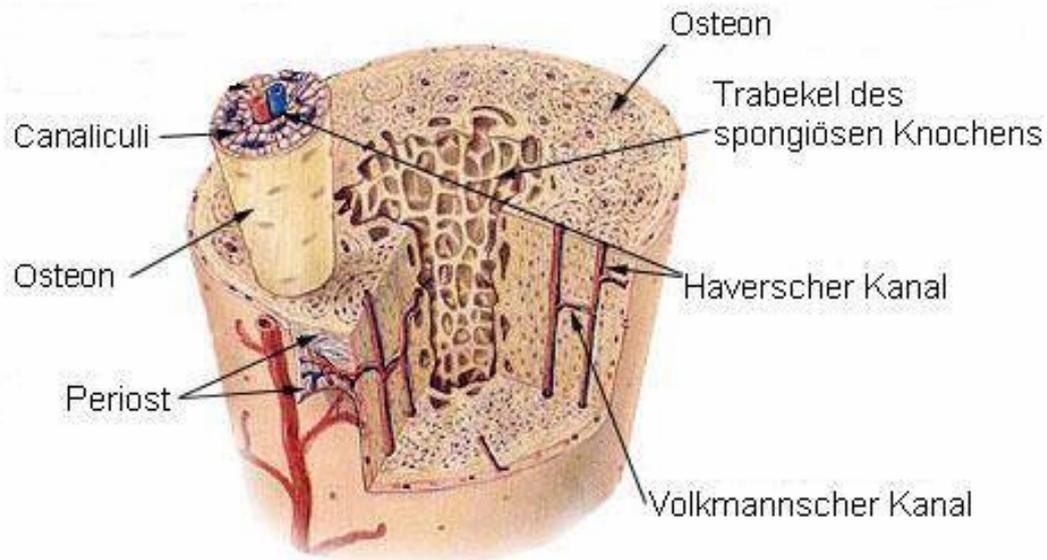


Abb. 1: Aufbau des Lamellenknochens ([www.wikibooks.org/wiki/Histologie](http://www.wikibooks.org/wiki/Histologie))

Peri- und enchondral gibt es beim Röhrenknochen noch eine Besonderheit: die Generallamellen. Dabei unterscheidet man zum einen die innere Generallamelle, die konzentrisch um den Markraum angeordnet ist und zum anderen die äußere Generallamelle, die direkt unter dem Periost verläuft.

Der Faserverlauf der Lamellen richtet sich nach den lokalen funktionellen und mechanischen Ansprüchen. Die in die mineralisierte Matrix eingebetteten Kollagenfasern verlaufen weitgehend parallel zueinander und spiralg zur Längsachse der Osteone (Trostle und Markel 1996).

## 1.2 Knochenregeneration

Da es bei der Knochenregeneration, im Gegensatz zur Reparatur zahlreicher anderer Gewebearten (z.B.: Binde- oder Muskelgewebe), nicht zur Ausbildung einer Narbe kommt, spricht man von Regeneration (Remedios 1999). Dabei werden komplexe Regenerationsmechanismen in Gang gesetzt, deren Ziel es ist, die ursprüngliche Knochenstruktur und -funktion im Laufe der Zeit zu rekonstruieren (Einhorn und Lee 2001; Remedios 1999). Die Knochenheilung folgt dabei dem Wolffschen Gesetz, wonach sich der Knochen den wirkenden Kräften im Laufe der Heilung anpasst (Sturmer

1996). Man unterscheidet die direkte von der indirekten Knochenheilung (Chao et al. 1989;Palmer et al. 1992;Remedios 1999).

### 1.2.1 Direkte Knochenheilung

Die direkte oder primäre Knochenheilung läuft ab, wenn zwei grundlegende Bedingungen erfüllt sind: Als Erstes die ideale anatomische Reposition der Frakturrenden und die daraus folgende Minimalisierung des Frakturspaltes. Zum Zweiten die Aufrechterhaltung dieser korrekten Reposition über die gesamte Dauer der Frakturheilung. Deshalb ist eine hohe interfragmentäre Stabilität, absolute Ruhe und eine rigide Fixation notwendig (Chao et al. 1989;Goodship 1992;Palmer et al. 1992). Eine röntgenologisch sichtbare Kallusbildung findet bei der primären Knochenheilung nicht statt. Unter solch idealen Bedingungen entspricht der Heilungsprozess der Regeneration, da die Ausgangssituation wieder hergestellt wird (*restitutio ad integrum*) (Webb und Tricker 2007).

In den Bereichen, wo kortikaler Knochen aufeinander liegt, findet eine sogenannte Kontaktheilung statt (Palmer et al. 1992). Dabei bilden sich am Rand der fraktur nächsten Osteone zapfenförmige Ausläufer (englisch: „cutting cones“) (Palmer et al. 1992;Webb und Tricker 2007). Am vorderen Rand dieser Ausläufer befindet sich eine Ansammlung von Osteoklasten, die für die Knochenresorption zuständig sind. Hinter der Osteoklastenreihe schließt sich eine Ansammlung von Osteoblasten an, die neuen Knochen aufbauen (Palmer et al. 1992;Perren 1979;Shapiro 1988;Brighton 1984). Durch dieses Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten kommt es zur osteogenen Verzäpfung von 50-80 µm pro Tag (Palmer et al. 1992).

Von einigen Autoren wird diskutiert, ob die Kontaktheilung dem lebenslang physiologisch ablaufenden Remodelling zur Erneuerung und Umbau von nekrotischen oder ermüdeten Bereichen gleichzusetzen ist (Parfitt 2002;Perren 1992;Shapiro 1988).

In den Bereichen der Frakturlinie, in denen kein Knochen-Knochen-Kontakt, sondern kleine Lücken mit 500-1000 µm vorliegen, läuft eine Spaltheilung ab (Perren 1979;Perren 1992;Palmer et al. 1992;Remedios 1999;Chao et al. 1989). Dafür wird der interfragmentäre Spalt mit Blutgefäßen und lockerem Bindegewebe aufgefüllt (Shapiro 1988). Die einsprossenden Gefäße stammen aus Periost und Harverschen Kanälen (Shapiro 1988). Perikapillär liegende mesenchymale Zellen proliferieren und differenzieren zu Osteoblasten. Diese bilden Osteoid und so entsteht im Frakturspalt

Geflechtknochen, der dann in Lamellenknochen umgewandelt wird (Palmer et al. 1992). Dieser Bereich ist jedoch aufgrund des fehlenden Kontakts zu den Fragmentenden mechanisch instabil (Palmer et al. 1992). Nach drei bis vier Wochen findet durch die Verzapfung der neu gebildeten Osteone aus dem Frakturspalt mit den Osteonen der Frakturrenden eine Überbrückung der Frakturzone statt (Palmer et al. 1992;Perren 1979). Die anfangs noch quer zur Längsrichtung des Knochens verlaufenden Lamellen ordnen sich im Rahmen des Remodelling longitudinal an, so dass es zur Wiederherstellung der anatomischen und mechanischen Integrität kommt (Palmer et al. 1992;Perren 1979;Shapiro 1988).

### **1.2.2 Indirekte Knochenheilung**

Die indirekte oder sekundäre Knochenheilung erfolgt bei Frakturspalten von mehr als einem Millimeter. Typisch dafür ist die Bildung von Ersatzgewebe (Perren und Cordey 1977), das sekundär durch Knochengewebe ersetzt wird (Chao et al. 1989;Chao and Inoue 2003;Perren und Cordey 1977). Die Heilungsdauer sowie Qualität und Quantität des gebildeten Ersatzgewebes hängen von der zu überbrückenden Defektstrecke und auch von der Bewegung der Fragmente zueinander ab (Willenegger et al. 1971). Im Verlauf der Heilung kommt es typischerweise zur Ausbildung eines stabilisierenden bindegewebigen oder knorpeligen Kallus. Dieser wird entsprechend seiner Lokalisation als periostaler, endostaler und interfragmentärer Kallus bezeichnet (Perren 1992). Das dreidimensionale Netzwerk des periostalen Kallus kann dabei enorme Ausmaße annehmen. Er befindet sich weit entfernt von der Biegeneutralachse und dient der Stabilisierung (Perren 1992). Der endostale Kallus überbrückt den Bereich der Markhöhle, ist etwas kleiner dimensioniert und wirkt infolgedessen auch weniger stabilisierend. Durch den interfragmentären Kallus, der sich als Letztes bildet, wird die kortikale Einheit wieder hergestellt.

Die indirekte Knochenheilung lässt sich histologisch in vier ineinander übergehende Phasen einteilen:

#### **Entzündungsphase**

Diese erste Phase der Knochenheilung wird durch das Trauma, das die Fraktur verursacht, eingeleitet. Sie dauert ein bis drei (Brighton 1984) oder sogar fünf Tage (Sim-

mons 1985) und endet mit der Entstehung von Bindegewebe oder Knorpel. Klinisch geht diese Phase mit Schmerzen und einer Schwellung im Bereich der Fraktur einher. Bei der Fraktur zerreißen die Gefäße entlang des Frakturspaltes. Durch die zerstörte Blutzufuhr kommt es an den Frakturrenden zur Hypoxie (Webb und Tricker 2007) und zu Nekrosen (McKibbin 1978; Brighton 1984). Die geringe Sauerstoffspannung führt über eine erhöhte Laktatproduktion (anaerober Stoffwechsel) auch zu einem erniedrigten pH-Wert. Dadurch werden Cytokine aus Neutrophilen freigesetzt, die zu einem Proliferations- und Differenzierungsanreiz für die umliegenden Zellen führt und den Heilungsprozess initiieren (Webb und Tricker 2007).

Das Zerreißen der Gefäße führt außerdem zum Einströmen von Blut in den Frakturbereich und die Umgebung. Das dadurch entstandene Frakturhämatom (Brighton 1984) erfüllt mehrere Aufgaben: Es dient einerseits als Quelle für hämatopoetische Zellen, Thrombozyten und Entzündungsmediatoren (Webb und Tricker 2007); sorgt aber auch für eine gewisse Stabilität. Die bei der Gerinnung entstehenden Fibrinfäden verspannen die Frakturrenden und dienen als Leitschiene für die Einsprossung von Kapillaren (Cruess und Dumont 1975). Durch die Degranulation der Thrombozyten werden Wachstumsfaktoren freigesetzt (Webb und Tricker 2007). Diese Wachstumsfaktoren und Cytokine leiten das Einsprossen von Kapillaren entlang der beschriebenen Leitschienen ein. Die so erfolgte Revaskularisierung rekrutiert sich hauptsächlich aus Gefäßen der Markhöhle und des Periosts, aber auch der Muskulatur. Über die Einsprossung der ersten Kapillaren gelangen Makrophagen in den Frakturspalt, die Gewebstrümmer abbauen. 24 bis 48 Stunden nach der Fraktur treffen Mastzellen im Frakturhämatom ein (Brighton 1984). Ihre Funktion ist noch weitgehend unklar, sie scheinen aber für die Anpassung der lokalen Durchblutung und für die Zellmigration wichtig zu sein.

Nach der Fraktur steigt die Zellteilungsrate bereits nach acht Stunden an und erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 24 Stunden. Die erhöhte Zellteilungsrate findet anfänglich vor allem im Periost und im fraktur nahen Bereich statt, später jedoch über die gesamte Länge des Knochens, mit Ausnahme der Frakturrenden. Die dort liegenden Osteozyten sind durch die Fraktur abgestorben und haben nur ihre leeren Lakunen hinterlassen (McKibbin 1978). Aus den zerstörten Osteozyten werden lysosomale Enzyme freigesetzt, die zur Auflösung der umgebenden organischen Matrix führen. Phagozyten und Osteoklasten sorgen für den Abbau von totem Knochen und anderem nekrotischen Material (Brighton 1984; Webb und Tricker 2007).

Das Frakturhämatom ist also insgesamt ein Netzwerk aus Fibrin, Retikulinfasern und Kollagenfasern, das außerdem Erythrozyten, Zellfragmente und –organellen enthält (Brighton 1984). Nach und nach erscheinen Fibroblasten, die mit der Kollagensynthese beginnen (McKibbin 1978) und zu einer Organisation des Frakturhämatoms führen. Das anfangs saure Milieu verändert sich über neutral zu alkalisch (Cruess und Dumont 1975). Dieses ist für den Mineralisationsprozess wichtig, da die Enzyme, die die Mineralisation katalysieren ihr optimales Wirkungsspektrum im alkalischen Bereich haben (Newman et al. 1987). Schon in dieser frühen Phase können Mineralisationsherde nachgewiesen werden (Brighton 1984).

### **Phase des weichen Kallus**

In dieser, auch als Granulationsphase bezeichneten Zeit, wird ein so genannter periostal-fibröser Kallus gebildet (Brighton 1984). Charakteristisch für diesen Zeitraum sind die gute Vaskularisation und die vorherrschende hohe Zelldichte (Brighton 1984). Diese Phase dauert beim Menschen ca. drei Wochen (Braun und Ruter 1996) und endet mit der Überbrückung des Frakturspaltes durch Bindegewebe oder Knorpel. Bindegewebiges Granulationsgewebe entsteht aufgrund der guten Gefäßversorgung über das Periost eher am Rand des Kallus. Durch die begrenzte Blutversorgung und den vorherrschenden Sauerstoffmangel im Kalluszentrum, entsteht in diesem Bereich vorwiegend Knorpel (Owen 1970; Palmer et al. 1992). Knorpel scheint bis zur Verbesserung der Blutversorgung das vorherrschende Material zu sein (McKibbin 1978).

Durch die Einlagerung von Kalksalzen wird der weiche Kallus immer stärker mineralisiert. Die Mineralisation beginnt an den Frakturrenden und dehnt sich immer weiter zum Zentrum der Fraktur hin aus. Die dadurch erhöhte Steifigkeit ermöglicht erst die Knochenbildung und das Überleben von Osteozyten (Palmer et al. 1992). Im Weiteren unterliegt der Knorpel im Kalluszentrum der enchondralen Ossifikation, wohingegen das Bindegewebe über die desmale Ossifikation in Geflechtknochen umgewandelt wird.

### **Phase des harten Kallus**

Diese Phase beginnt mit der Verbindung der beiden Frakturfragmente über einen weichen Kallus und endet mit der kompletten knöchernen Überbrückung. Die erste Knochenbildung beginnt meist subperiostal (Brighton 1984). Dabei wird die Faserschicht des Periosts durch die Knochenneubildung abgehoben und es entsteht ein diaphysä-

rer Knochenmantel, der die Fraktur allmählich fixieren kann (Brighton 1984). Nach und nach wird der weiche Kallus durch Geflechtknochen ersetzt, der mit seiner Stabilität und Steifigkeit für das Wiedererlangen der Knochenfunktion sorgt. Allerdings entspricht die Knochenkontur und die Ausrichtung der Trabekel noch nicht der des restlichen Knochens. Außerdem ist der Geflechtknochen in der Lage die Bewegungen im Frakturspalt auf ein akzeptables Maß herabzusetzen, so dass die Voraussetzungen für die Bildung von Lamellenknochen geschaffen sind (Chao et al. 1989).

### **Remodelling**

Das Ziel dieser abschließenden Phase ist es, die ursprüngliche Knochenkontur und -struktur wiederherzustellen und einen durchgängigen Markraum zu erlangen (Brighton 1984). Nach Brighton (Brighton 1984) beginnt sie sobald der Knochenbruch röntgenologisch und klinisch geheilt ist. Remedios (Remedios 1999) setzt als Beginn die Überbrückung des Frakturspalt mit mineralisiertem Kallus fest. Der Begriff des Remodelling bezeichnet insgesamt Umbauvorgänge, bei denen der Geflechtknochen, der ja mineralisiertes Bindegewebe ersetzt hat, wiederum durch den stabileren Lamellenknochen ausgetauscht wird. Die ursprüngliche Knochenstruktur wird zurückerlangt, indem sich die Osteone wieder longitudinal zum Knochen ausrichten (Brighton 1984;Palmer et al. 1992).

Dies geschieht beim Menschen über ein sekundäres (Haversches) Remodelling, mit der Entstehung großer Osteone. Diese Form des Remodelling findet beim Schaf erst mit zunehmendem Alter statt (Liebschner 2004). Die Zeit des genauen Beginns des sekundären Remodelling variiert je nach Knochentyp, wobei der Femur und die Diaphyse des Radius und Humerus zu den ersten Knochen gehören die diese Remodelling-Form aufweisen (Newman et al. 1995).

Charakteristisch für diese Phase ist die Ausbildung so genannter „Basic Multicellular Units“ (BMUs) (Noble und Reeve 2000;Parfitt 2002). Diese spezielle Formation besteht an der Spitze aus einer Gruppe von Osteoklasten zur Knochenresorption, gefolgt von Osteoblastenreihen, die neuen Knochen aufbauen. Die außerdem dazu gehörenden Blutgefäße ermöglichen das Nachrücken von Progenitorzellen. Die BMUs ermöglichen durch ihre Verbindung von Knochenresorption und Knochenformation einen effizienten Umbau veränderter bzw. zerstörter Knochenbereiche. Den Anstoß für die Bildung von BMUs geben Bone Lining Cells, die sich bei einer Fraktur (auch bei Mikrofrakturen) von der Knochenmatrix abheben und somit die mineralisierte Knochenstruk-

tur freilegen (Parfitt 2002). Die Bone Lining Cells setzen Enzyme frei, die zur Auflösung der endostalen Membran führen. Außerdem kommt es im Verlauf der Entstehung der BMUs zur Neoangiogenese und zum Austreten von Osteoklastenprogenitorzellen und deren Fusion zu Osteoklasten (Parfitt 2002). Da die Osteoklasten nur eine Lebensdauer von ca. 12 Tagen aufweisen, muss das Fortschreiten des Prozesses durch einen ständigen Nachschub an mononukleären Osteoklastenprogenitorzellen aufrechterhalten werden. Mit dem Abbrechen des Nachschubes an Progenitorzellen endet auch die Lebensspanne der BMU.

Interne Remodellingvorgänge laufen während des ganzen Lebens in kleinerem Ausmaß ständig ab und ermöglichen dem Knochen sich zu erneuern und nekrotische Bereiche oder ermüdungsbedingte Mikrofrakturen durch Umbau funktionell wieder herzustellen (McKibbin 1978;Parfitt 2002;Alliston und Derynck 2002;Ng et al. 1997). Dieses physiologische Remodelling entspricht nach Perren (2001) den Vorgängen bei der direkten Knochenbruchheilung.

### **1.3 Klinischer Hintergrund**

Knöcherner Defekte des Skeletts können durch ein Trauma, postinfektiös oder durch die Entfernung gut- oder bösartiger Tumoren entstehen, oder kongenitale Fehlbildungen sein. In der Regel kann der Defekt aufgrund der hervorragenden Regenerations-eigenschaften von Knochengewebe spontan ausheilen. Erreichen diese Defekte aber eine „kritische“ Dimension, ist der Organismus auch bei Anwendung optimaler Therapiestrategien nicht mehr in der Lage, sich hinsichtlich Form und Funktion selbst zu regenerieren (Cancedda et al. 2003). In anderen Fällen bleibt die Defektüberbrückung aus unbekanntem Gründen aus (Einhorn 1999). Für die USA ist bekannt, dass 5 bis 10 Prozent der 5,6 Millionen jährlich behandelten Frakturen nicht primär ausheilt (Praemer et al. 1992). Diese Patienten müssen teilweise mehrere aufwendige Operationen, sowie einen langwierigen Heilungsverlauf mit oft verbleibenden Defiziten tolerieren. In der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg wurden zwischen Januar 1996 und Dezember 2000 306 Operationen wegen nicht heilender Frakturen an langen Röhrenknochen durchgeführt. Das Problem der ausbleibenden Knochenheilung liegt oftmals in einem insuffizienten Knochenlager mit sehr schlechter Gefäßversorgung, wodurch avitale Pseudarthrosen entstehen, die keine Regeneration mehr zeigen (Geiger et al. 2005).

In solchen Fällen ist der Einsatz von Knochenersatzmaterialien indiziert. Das entsprechende Material wird in den Frakturspalt eingebracht und mit Hilfe eines Osteosynthesystems stabilisiert. Nach der Definition von Mutschler und Lane (Muschler 2007) ist ein Knochenersatzmaterial jedes implantierte Material, das alleine oder in Kombination mit anderen Materialien die Knochenheilung fördert. In Anlehnung an den natürlichen Aufbau von Knochen kann dies über osteokonduktive, osteoinduktive oder osteogene Eigenschaften vermittelt werden (Bauer und Muschler 2000). Osteokonduktive Materialien dienen einsprossenden Osteonen als eine Art Leitschiene und fördern den Anbau von Knochen an ihre Oberfläche (Bauer und Muschler 2000). Im natürlichen Knochen wird die Osteokonduktivität durch die trabekuläre Struktur vermittelt. Osteoinduktive Materialien können lokale oder transplantierte Zellen über biologische Stimuli dazu aktivieren, zu Osteoblasten zu differenzieren, was im natürlichen Knochen durch lokale Wachstumsfaktoren geschieht. Osteogene Materialien schließlich enthalten selbst Zellen, die zu Osteoblasten differenzieren können (Bauer und Muschler 2000). Dies entspricht im natürlichen Aufbau des Knochens den Osteoblasten.

Als Goldstandard wird derzeit die autologe Knochentransplantation angesehen (Parikh 2002;Rueger 1996). Deren Vorteile liegen in der guten osteogenetischen Potenz, den osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften, sowie der guten immunologischen Verträglichkeit. Außerdem weist die autologe Knochentransplantation je nach Lokalisation, Größe, Form und Qualität eine brauchbare initiale Stabilität auf (Kneser et al. 2006). Dennoch birgt diese Methode auch nicht zu vernachlässigende Risiken. Dazu gehören die, zum Teil, enormen Beschwerden an der Entnahmestelle, die durch den Zweiteingriff verlängerte Operationsdauer, die Gefahr der Entstehung von Hämatomen, Infektionen und chronischen Schmerzen und nicht zuletzt die limitierte Menge an zur Verfügung stehendem Knochen (Kneser et al. 2006;Niedhart et al. 2003) .

Ist die autologe Knochentransplantation nicht anwendbar, ist die Verwendung von allogenen oder xenogenen Knochentransplantaten möglich. Neben der höheren Versagensrate, die diese Verfahren aufweisen (Kenley et al. 1993), sind sie außerdem mit einer Reihe von zusätzlichen Nachteilen behaftet. So besteht die Gefahr einer Abstoßungsreaktion (Friedlaender und Horowitz 1992) und der Übertragung von Krankheiten (Simonds et al. 1992;Li et al. 2001). Ein Sterilisationsprozess wiederum führt zum Verlust der osteoinduktiven Eigenschaften (Hallfeldt et al. 1995;Voggenreiter et al.

1995). Somit gelten allogene und xenogene Knochentransplantate als vorwiegend osteokonduktive Materialien.

Demineralisierte Knochenmatrix ist eine weitere Option in der Behandlung von Knochendefekten. Diese ist aufgrund der enthaltenen Proteine (Bone morphogenic proteins = BMP) in der Lage sowohl osteokonduktiv, als auch osteoinduktiv zu wirken (Bauer und Muschler 2000). Allerdings muss die von Bostrom und Mitarbeitern (Bostrom et al. 2001) festgestellte mögliche Toxizität dieses Materials in Betracht gezogen werden.

Des Weiteren werden für spezifische Indikationen vaskularisierte Knochentransplantate eingesetzt. Diese erzielen sehr gute Ergebnisse, können aber nur von mikrochirurgisch versierten Operateuren durchgeführt werden und gehen mit einer erheblichen Morbidität an der Entnahmestelle einher (Pollock et al. 2005; Daniels et al. 2005).

Aufgrund der zahlreichen Nachteile, die die bisher genannten Verfahren aufweisen, ist die Wissenschaft seit einiger Zeit auf der Suche nach neuen Wegen um Knochen adäquat zu ersetzen. Schon länger wird an neuen biologischen oder synthetischen, anorganischen und organischen Materialien geforscht, die als Knochenersatz dienen können. Außerdem spielen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise die Bone Morphogenic Proteine BMP-2 und BMP-7 eine große Rolle, wovon einige auch schon für die Anwendung am Menschen zugelassen sind. Dabei müssen jedoch –verglichen mit den physiologisch vorhandenen Konzentrationen- enorme Mengen eingesetzt werden, was wiederum mit großen Kosten verbunden ist. Um dies zu umgehen könnte die Gentherapie ein weiterführendes Forschungsfeld darstellen.

Auch am Einsatz von mesenchymalen Stammzellen wird intensiv geforscht. Diese ermöglichen, in der Kombination mit entsprechenden Biomaterialien, deren ausschließlich osteokonduktive Eigenschaften um die osteogene Aktivität zu erweitern.

### **1.4 Tissue Engineering**

Nach der Definition von Langer und Vacanti (Langer und Vacanti 1993) ist Tissue Engineering „ein interdisziplinäres Forschungsfeld, das die Prinzipien des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften anwendet, um biologische Ersatzmaterialien zu entwickeln, die Gewebefunktionen ersetzen, erhalten oder verbessern“. Es basiert auf dem grundlegenden Verständnis von Gewebeformation und -regeneration, und zielt eher darauf ab ein neues funktionelles Gewebe zu schaffen, anstatt nur neue Ersatz-

teile zu implantieren (Kneser et al. 2002). Durch die gemeinsame Arbeit von Chemikern, Physikern, Ingenieuren, Materialwissenschaftlern, Biologen und Medizinern wird im Tissue Engineering versucht dieses Ziel zu erreichen (Salgado et al. 2004).

In der Orthopädie ist der Ersatz von Knochen (Lieberman et al. 2002), Knorpel (O'Driscoll 1998;Hunziker 2002), Sehnen (Faraj 2002;Boyer et al. 2003), Bändern (Frank und Jackson 1997), Meniskus und Bandscheiben (Guilak et al. 1999;Baer et al. 2001), Fett, Muskel (Lieberman et al. 2003) und Nerven das primäre Ziele (Muschler et al. 2004) des Tissue Engineering.

Im Bereich der Knochendefekte sind die Anforderungen an die Biomaterialien anspruchsvoll. Ziel ist es, die Menge und Qualität des neu gebildeten Knochens positiv zu beeinflussen, die Knochenheilung bzw. -neubildung zu beschleunigen, aber gleichzeitig die mechanische Stabilität zu gewährleisten.

Deshalb wird im Rahmen des Tissue Engineering versucht, die für einen Knochenersatzstoff wichtigen osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften zu vereinen und somit den Goldstandard der autologen Spongiosatransplantation zu imitieren. Dazu werden dreidimensionale Träger (osteokonduktiv) mit einer Zellquelle (osteogen) und z.B. Wachstumsfaktoren (osteoinduktiv) kombiniert. Das aus diesen drei Komponenten entstandene Zell/Matrix-Konstrukt wird anschließend in den zu ersetzenden Gewebedefekt eingebracht. Wie genau diese drei Komponenten aussehen sollen, darüber gibt es momentan noch keinen einheitlichen Konsens. Die Auswahl des geeigneten Trägermaterials, der zu verwendenden Zellpopulation und ihrer Dichte, sowie die Bestimmung der am besten geeigneten osteoinduktiven Komponenten sind Gegenstand aktueller Forschung.

### **1.5 Trägermaterialien**

Die Wahl des geeigneten, dreidimensionalen porösen Trägermaterials spielt eine essentielle Rolle beim Tissue Engineering von Knochen. Die Träger dienen einerseits als Platzhalter, der verhindert, dass das umgebende Gewebe in den Defekt einwächst. Andererseits bieten sie den Stamm- oder Progenitorzellen die Möglichkeit zur Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung. Ihre Poren bieten außerdem einen Leerraum für Vaskularisation, Gewebeneubildung und Remodelling. Zusätzlich stellen sie ein Vehikel dar, um Zellen in den Defekt einzubringen (Muschler et al. 2004).

Für Trägermaterialien gelten einige grundlegende Anforderungen, die bei der Auswahl des geeigneten Materials beachtet werden sollten:

Wichtig ist zuallererst die Verträglichkeit des Materials zum körpereigenen Gewebe, die sogenannte Biokompatibilität. Vor allem bei degradierbaren Materialien ist eine Untersuchung der Verträglichkeit wichtig, da die Degradationsprodukte den pH-Wert ihrer Umgebung ändern, das Gewebe durch ihre Akkumulation schädigen oder selbst toxische Effekte haben können (Ignatius und Claes 1996). Außerdem wird im Rahmen der Analyse der Biokompatibilität auch die Immunogenität und Kanzerogenität untersucht (Gunther et al. 1998). Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Osteokonduktivität. So soll das Ersatzmaterial als „Leitschiene“ für die knöcherne Durchbauung dienen, indem es das Knochengewebe dazu anregt in das Implantat einzuwachsen. Eine zusätzliche osteoinduktive Wirkung wäre wünschenswert, wird jedoch von den meisten zur Verfügung stehenden Trägermaterialien nicht erfüllt (Schnurer et al. 2003). Einige der wenigen Ausnahmen stellt die demineralisierte Knochenmatrix dar. Für sie ist die Osteoinduktivität nachgewiesen (Kasten et al. 2003).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die dreidimensionale Struktur und Porosität des Materials. Die meisten Trägermaterialien besitzen miteinander verbundene Poren. Das dadurch vergrößerte Oberflächen/Volumenverhältnis verbessert die Zelleinsprossung, die Verteilung der Zellen innerhalb des Trägers und die Vaskularisation aus der Umgebung. Dadurch sorgt die Porosität für eine gute Nährstoffversorgung und ermöglicht die Beseitigung von metabolischen Abfallprodukten. Der Grad der Porosität nimmt immer auch auf andere Eigenschaften des Trägers Einfluss: So ist ein höherer Grad an Porosität mit einem Verlust an mechanischer Stabilität verbunden (Salgado et al. 2004). Neben der Anzahl der Poren ist auch die Porengröße von entscheidender Bedeutung für die Osteokonduktivität. Wenn die Poren zu klein sind, verstopfen sie durch einwachsende Zellen. Dies verhindert das weitere Eindringen von Zellen, die extrazelluläre Matrixbildung und die Vaskularisation der inneren Bereiche des Trägers. Es besteht weitgehende Einigkeit darüber, dass für das Tissue Engineering von Knochengewebe, die Porengröße in einem Bereich von 200 bis 900  $\mu\text{m}$  liegen sollte (Burg et al. 2000; Yang et al. 2001). Zu einem anderen Schluss kommen Holly und Mitarbeiter (Holy et al. 2000), die die Meinung vertreten, dass eine Knochenrekonstruktion nur mit einer Matrix erreicht werden kann, die über eine makroporöse Porenstruktur mit Porengrößen von 1,2 bis 2 mm verfügt. Das dadurch vergrößerte Oberflächen/Volumenverhältnis ermöglicht Zellen, Gewebe und Blutgefäßen ein besseres

Einwachsen, geht aber andererseits mit einem Verlust der mechanischen Stabilität einher. Bei den meisten Studien jedoch liegt die Porengröße in einem Bereich zwischen 150 und 500  $\mu\text{m}$ , was gerade groß genug ist um das Einwachsen von vaskulärem Gewebe zu unterstützen (Muschler et al. 2004).

Auch die chemischen und topografischen Oberflächeneigenschaften des Trägermaterials sind von entscheidender Bedeutung. Chemische Eigenschaften können die Adhäsion sowie Proliferation und Migration der Zellen beeinflussen und kontrollieren. Topografische Eigenschaften spielen vor allem im Zusammenhang mit der Osteokonduktivität eine Rolle. Eine rauere Oberfläche beispielsweise vereinfacht die Migration von osteogenen Zellen entlang der Matrixoberfläche (Salgado et al. 2004).

Die Knochenersatzmaterialien lassen sich in resorbierbare und nicht resorbierbare Materialien unterteilen. Da Knochen einem stetigen Umbau unterworfen ist, ist es vor allem aus biomechanischer Sicht sinnvoll, resorbierbare Knochenersatzmittel zu verwenden, da sie sich an veränderte mechanische Belastungen besser anpassen können. Allerdings sollte bei der Auswahl des Materials die Geschwindigkeit des Abbauprozesses berücksichtigt werden, d.h. das Ersatzmittel sollte nicht schneller abgebaut werden als neues Knochengewebe nachwachsen kann (Gunther et al. 1998).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine Vielzahl von Materialien, wie Metalle, Keramiken und Polymere, sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs als mögliche Knochenersatzmittel und Trägermaterialien in Verbindung mit Zellen vorgeschlagen. Da Metalle und die meisten der Keramiken nicht resorbierbar sind, beschränkt sich die Auswahl auf eine begrenzte Anzahl von Keramiken und resorbierbaren Polymeren (Salgado et al. 2004).

Keramiken sind im Bereich der Knochenregeneration weit verbreitet (LeGeros 2002). Sie können natürlichen Ursprungs sein (z.B. Hydroxylapatit (HA) aus Korallen) oder, wie das synthetische HA oder  $\beta$ -Tricalciumphosphat, synthetisch hergestellt werden (LeGeros 2002). Aufgrund ihrer osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften wurden sie für viele Anwendungen im Knochen Tissue Engineering in Betracht gezogen. Eine Vielzahl von Studien (Petite et al. 2000;Quarto et al. 2001;Grynpas et al. 1994;Yoshikawa et al. 2000;Dong et al. 2001) konnten mit der Verwendung von Keramiken mit oder ohne Stamm- oder Progenitorzellen gute Ergebnisse bezüglich Knochenregeneration erzielen. Allerdings sind diese Materialien brüchig und weisen eine geringe mechanische Stabilität auf. Außerdem sind die Resorptionsraten von Keramiken schwer vorherzusagen (Salgado et al. 2004).

Als Alternative stehen resorbierbare Polymere zur Verfügung, die als ideale Materialien in diesem Bereich gelten (Hutmacher 2000; Yang et al. 2001). Sie können in natürliche und synthetische Polymere unterteilt werden (Salgado et al. 2004):

Zu den synthetischen resorbierbaren Polymeren zählen z.B. Polypropylene, Polycarbonate, Polyanhydrate oder Polyaminosäuren. Sie sind ebenfalls weit verbreitet im biomedizinischen Ingenieurwesen.

Natürliche resorbierbare Polymere werden entweder aus tierischen oder pflanzlichen Quellen gewonnen. Dazu gehören unter anderem, Kollagen, Fibrinogen, Chitosan oder Hyaluronsäure. Die Vorteile dieser Stoffe liegen in ihrem geringen immunogenen Potential, ihrem potentiellen bioaktiven Verhalten und der Fähigkeit mit dem Empfängerewebe zu interagieren (Salgado et al. 2004). Dazu zählt auch das mineralisierte Kollagen.

### **Mineralisiertes Kollagen**

Dieses poröse Biomaterial besteht aus den zwei Hauptkomponenten der extrazellulären Knochenmatrix: Kollagen Typ 1 und Hydroxylapatit. Durch diese Kombination werden die osteokonduktiven Eigenschaften des autologen Knochens perfekt imitiert.

Der von uns verwendete mineralisierte Kollagenschwamm (Healos®, Fa. De Puy, USA) ist aus vernetzten bovinen Kollagen Typ 1 Fasern aufgebaut, die mit nichtkeramischem Hydroxyapatit  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  beschichtet sind (Niemeyer et al. 2003; Niemeyer et al. 2004). Dadurch entsteht eine Kombination aus mineralisierten (ca. 30%) und nicht mineralisierten Anteilen, die den Aufbau von natürlichem Knochen nachahmt. Die Porengröße variiert zwischen vier und  $200\mu\text{m}$  und erlaubt somit die direkte Knochenregeneration (Kuboki et al. 2002). Die Gesamtporosität liegt bei 95% und ermöglicht eine exzellente Nährstoffversorgung, Neovaskularisation und Zellverteilung. Das Verhältnis von  $\text{Ca}^{2+}$  zu  $\text{PO}_4$  beträgt 1,67, ist also vergleichbar zu dem von natürlichem Knochen (1,6) und liegt außerdem im biokompatiblen Bereich. Niemeyer et al (Niemeyer et al. 2004) konnten für dieses Trägermaterial eine durchschnittliche Besiedelungseffizienz von 98% zeigen. Die Gruppe um Niemeyer untersuchte auch das Proliferationsverhalten und die Differenzierungsfähigkeit von Zellen auf diesem mineralisierten Kollagen. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass Zellen bis zum Tag acht relativ stark proliferieren, um dann für den Rest des Kultivierungszeitraums auf einem stabilen Plateau zu verharren. Eine mögliche Erklärung für das Stoppen der Proliferation könnte nach Meinung der Autoren die Differenzierung in Richtung osteo-

genen Zelllinie sein. Diese Hypothese wird auch durch die Ergebnisse der quantitative RT-PCR unterstützt, die eine Hochregulation der für die osteogene Differenzierung wichtigen Gene Bone Sialoprotein, BMP, ALP und Osteocalcin zeigte. Die histologischen Ergebnisse dieser Studie zeigen außerdem eine gute Penetration der Zellen in tiefe Schichten der Matrix. Diese gute Zellverteilung innerhalb des Trägers sorgt für ein homogeneres osteogenes Potential des Konstruktes und damit zu einer besseren Heilung des knöchernen Defekts.

Healos® ist in Deutschland und den USA bereits für den klinischen Einsatz zugelassen. Dies stellt eine günstige Voraussetzung für einen zukünftigen kombinierten Einsatz dieses Materials mit geeigneten Zellen und/oder osteoinduktiven Substanzen dar. Als mögliche osteogene Zellquelle könnten Stammzellen dienen.

## 1.6 Stammzellen

In der Literatur existieren zahlreiche unterschiedliche Definitionen von Stammzellen. Insgesamt beinhalten sie alle jedoch drei Hauptprinzipien. Zum Ersten die unbegrenzte Proliferationsfähigkeit, zum Zweiten das Differenzierungspotential der Einzelzelle in mehrere Richtungen und als Letztes die Fähigkeit Gewebe zu regenerieren (Weissman 2000). Diese Fähigkeiten werden unter anderem durch die asymmetrische Zellteilung ermöglicht, bei der zum einen, eine der Ausgangszelle entsprechende Zelle entsteht, die also weiterhin teilungsfähig ist und zum anderen eine zur Differenzierung fähige Tochterzelle, eine so genannte Progenitorzelle.

Die beschriebene Charakterisierung trifft nun auf eine Reihe ganz unterschiedlicher Stammzellen zu, die im Folgenden weiter unterteilt werden sollen.

Auf die embryonale Stammzellen treffen alle oben genannten Charakteristika zu. Sie sind pluripotent, d.h. sie besitzen die Fähigkeit unter verschiedenen Bedingungen in unterschiedliche Richtungen zu differenzieren. Ihr Einsatz ist aber aufgrund mangelnder Verfügbarkeit und der Neigung zur Ausbildung von Teratokarzinomen (Erdo et al. 2003), sowie von nicht spezifischen Gewebetypen begrenzt (Donovan und Gearhart 2001; Sylvester und Longaker 2004). Dazu kommt, dass embryonale Stammzellen bei ihrer Differenzierung zum reifen Gewebe Histokompatibilitäts-Komplexe (HLA) des Spenders entwickeln, die bei Transplantation eine lebenslange und nebenwirkungsreiche Immunsuppression erforderlich machen. Außerdem unterliegt das Arbeiten mit

embryonalen Stammzellen strengen gesetzlichen und ethischen Regelungen, die vor allem für die therapeutische Anwendung gelten.

Vor diesem Hintergrund kommt der Forschung an adulten Stammzellen zunehmend Bedeutung zu. Diese sind gemäß ethischer Grundsätze völlig unbedenklich, aus verschiedenen Geweben relativ einfach zu isolieren und in ausreichender Menge gut zu expandieren. Außerdem sind sie im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen immunkompatibel, so dass sie ohne Immunsuppression transplantiert werden können. Auch auf sie treffen die meisten der aufgeführten Kriterien zu, wenn auch das Maß an Selbsterneuerung und das Differenzierungspotential im Vergleich zu den embryonalen Stammzellen eingeschränkt ist (Verfaillie 2005; Verfaillie 2002). Der Begriff der adulten Stammzelle schließt alle Stammzellen ein, die postnatal von einem Organismus gewonnen werden können und bezeichnet somit undifferenzierte Zellen in einem differenzierten Gewebeverband. Alle adulten Gewebe besitzen Stammzellpopulationen, die im Falle eines Traumas oder einer Krankheit die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen.

Unter den Begriff der adulten Stammzellen fallen also auch die erstmals 1966 von Friedenstein et al. (Friedenstein et al. 1966) identifizierten fibroblastenartigen Zellen des Knochenmarkes. Die von Friedenstein als „Colony-Forming Unit Fibroblasts“ (CFU-F) bezeichneten Zellen blieben bei Kultivierung in vitro undifferenziert, entwickelten aber bei entsprechender Induktion knochen- und knorpelartige Zellformationen (Friedenstein 1976). Diesem grundlegenden Meilenstein in der Erforschung adulter Stammzellen folgten zahlreiche Untersuchungen der multipotenten Zellen aus dem Knochenmark. Dies ist auch der Grund für die Vielzahl von unterschiedlichen Bezeichnungen, die für diese Zellen kursieren: Während Mets und Verdonk 1971 (Mets und Verdonk 1981) noch ganz allgemein von einer „stromal cell“ sprechen, entscheiden sich Owen und Mitarbeiter 1988 (Owen 1988) für den Ausdruck „(marrow) stromal stem cell“, betonen also den Stammzellcharakter der Zelle. Im Laufe der Zeit entstehen weitere Bezeichnungen wie „marrow stromal fibroblast“ (Kuznetsov et al. 1997), „marrow stromal cell“ (Prockop 1997), „bone marrow stromal (stem) cells“ (Gronthos et al. 2003a; Gronthos et al. 2003b) oder „Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC)“ (Reyes und Verfaillie 2001; Verfaillie et al. 2002). Eine relativ weit verbreitete Bezeichnung geht auf Caplan (Caplan 1991) zurück, der seine über einen Dichtegradienten aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen als mesenchymale Stammzellen (MSC) bezeichnete. Die Namensvielfalt spiegelt auch die vielfältigen Isolations- und Kultivie-

rungsmethoden, und die damit verbundene lange Zeit uneinheitlichen Definitionen dieser Zellen wieder. Die „International Society of Cellular Therapy (ISCT)“ gab aber 2006 erstmals minimale Kriterien für die von ihnen als „multipotent mesenchymal stromal cells“ bezeichneten Zellen heraus, die vielleicht in Zukunft als Definitionsgrundlage verwendet werden (Dominici et al. 2006). Als erstes Kriterium stellen sie die Plastikadhärenz unter Standard Kulturbedingungen heraus. Zweitens müssen die Zellen ein bestimmtes Muster an Oberflächenmolekülen exprimieren (Expression von CD105, CD73 und CD90; Fehlen der Expression von CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α, CD19 und HLA-DR). Als Letztes von der ISCT festgelegtes Kriterium müssen die Zellen in vitro in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren (Dominici et al. 2006). Dies erfolgt nach ausreichender Proliferation der Zellen durch eine Umstellung auf spezifische Kulturbedingungen, die eine Entwicklung in eine bestimmte mesenchymale Linie induzieren.

Über diese Kriterien hinaus ist aber mittlerweile bekannt, dass MSC in der Lage sind auch in Gewebe zu differenzieren, welche nicht dem embryonalen Mesoderm entspringen. So gelang z.B. die Differenzierung in neuronales Gewebe (Azizi et al. 1998; Kopen et al. 1999), und Nerven (Woodbury et al. 2000), aber auch zu Epithelgewebe von Leber, Lunge und Darm (Jiang et al. 2002; Reyes et al. 2002).

Zellen die den von der ISCT angeführten Kriterien entsprechen, finden sich nicht nur im Knochenmark, sondern auch in einer Reihe von anderen Geweben, wie z.B. im Periost (Nakahara et al. 1991), in der Synovialmembran (De Bari et al. 2001), im Muskel (Bosch et al. 2000), in der Dermis (Young et al. 2001), im peripheren Blut (Zvaifler et al. 2000), im Nabelschnurblut (Erices et al. 2000), aber auch im Fett (Zuk et al. 2001; Zuk et al. 2002).

### **1.6.1 Stammzellen aus Fettgewebe**

Weißes Fettgewebe hat die Fähigkeit, sich während des gesamten Lebens auszudehnen bzw. zu schrumpfen. Dies wird durch die Anwesenheit von vaskulären und nicht-vaskulären Zellen ermöglicht, die einen Pool an Stamm- und Progenitorzellen mit einzigartigen regenerativen Eigenschaften zur Verfügung stellen (Strem et al. 2005). Wie bei Knochenmarksstammzellen ist die Bezeichnung von Stammzellen aus Fettgewebe uneinheitlich. Gängige Bezeichnungen sind Namen wie „adipose stromal cells“, „adi-

pose progenitor cells“ oder „processed liposuction aspirates“ (De Ugarte et al. 2003;Zuk et al. 2001;Zuk et al. 2002;Halvorsen et al. 2000). Hier soll -wie in der Mehrzahl der Veröffentlichungen (Gronthos et al. 2001;Hattori et al. 2004;Knippenberg et al. 2005;Lin et al. 2006;Strem et al. 2005)- im Folgenden von „Adipose (Tissue) derived Stem Cells“ (ASC) gesprochen werden. Mesenchymale Stammzellen, die aus dem Knochenmark stammen, sollen in dieser Arbeit im Weiteren zur besseren Abgrenzung BMSC (=bone marrow derived stem cells) genannt werden.

Fettgewebe ist eine attraktive Quelle für die Gewinnung von adulten Stammzellen, da die Entnahme des Fettgewebes im Vergleich zur Gewinnung von Knochenmark viele Vorteile bietet. Der Entnahmeeingriff ist unkompliziert, weniger invasiv, weitgehend schmerzfrei und kann unter lokaler Betäubung durchgeführt werden. Außerdem können aus humanem Fettgewebe größere Mengen an Stammzellen gewonnen werden als aus Knochenmark ( $4 \times 10^7$  Zellen/100 ml Fettaspirat versus  $1 \times 10^5$  Zellen aus 30ml Knochenmark (Dragoo et al. 2003), was für den Einsatz im Tissue Engineering von Vorteil ist.

Typisch für ASCs ist ihr, im Vergleich zu BMSC länger anhaltendes Proliferationsvermögen bis zur 13. Passage (Zuk et al. 2001); bzw. bei anderen Autoren bis zur 20. Passage (Lee et al. 2004); außerdem die geringe Sterblichkeitsrate auch in hohen Passagen (Zuk et al. 2001). Phänotypisch unterscheiden sich die Zellen wiederum kaum von BMSCs: Wagner et al., wie auch Lee et al konnten überhaupt keine Unterschiede im Muster der Oberflächenproteine feststellen (Wagner et al. 2005;Lee et al. 2004); Zuk und Mitarbeiter (2002) nur bei 2 von 17 untersuchten Oberflächenmarkern. Auch die Genexpressionsprofile ähnelten sich weitgehend; erhöhte Expression zeigte sich lediglich bei Genen, die für die Proliferation wichtig sind (Lee et al. 2004); was mit dem festgestellten erhöhten Proliferationspotential von ASC in Einklang steht.

Zahlreiche Studien demonstrierten die in vitro Differenzierungsfähigkeit von ASC in die klassischen mesenchymalen Linien (Adipogenese, Chondrogenese, Osteogenese, Myogenese) (Bunnell et al. 2008;Winter et al. 2003;Zuk et al. 2001;Zuk et al. 2002;De Ugarte et al. 2003;Sakaguchi et al. 2005;Dragoo et al. 2003;Halvorsen et al. 2001;Kern et al. 2006;Lee et al. 2004;Wagner et al. 2005;Hattori et al. 2004). Beim direkten Vergleich der Differenzierungsfähigkeiten von ASCs und BMSCs kamen die Mehrzahl der Studien (Kern et al. 2006;Lee et al. 2004;Hattori et al. 2004;De Ugarte et al. 2003;Wagner et al. 2005;Zuk et al. 2002) zu dem Ergebnis, dass nur geringgradige oder keine Unterschiede bestehen (s.u.)

Auch nicht-mesenchymale Differenzierungswege wurden untersucht. Planat-Benard et al. (2004) konnten die Transdifferenzierung in Richtung Endothelzellen, Rangappa et al. (2003) in Richtung Kardiomyozyten und Safford et al. (2004) in die neurogene Richtung nachweisen.

### **Adipogenese**

Angesichts der Herkunft von ASC ist es nicht verwunderlich, dass humane ASC in spezifischen Induktionsmedien zahlreiche Adipocyten-typische Gene, wie unter anderem Lipase, Leptin oder Glutamin 4 exprimieren. Außerdem entwickeln humane ASC genauso wie BMSC die typischen intrazellulären Vakuolen, was als definitiver Marker für Adipogenese gilt (Sen et al. 2001;Zuk et al. 2001;Zuk et al. 2002).

### **Chondrogenese**

Die Chondrogenese wird standardmäßig in Hochdichte-Pelletkulturen (Sphäroiden) durch Zugabe von Wachstumsfaktoren induziert. Dabei wird vor allem der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), aber auch der Insulin-Like Growth Factor (IGF) oder eines der Bone Morphogenic Proteine (BMP) verwendet. Diese Sphäroide produzieren große Mengen extrazellulärer Matrixmoleküle, wie z.B. Proteoglykane, Kollagen II und IV oder Aggrecan. Die Chondrogenese der Sphäroide lässt sich histologisch über eine Alzianblaufärbung (Anfärbung der für die Knorpelmatrix typischen sulfatreichen Proteoglykane bei niedrigem pH) oder immunhistochemisch über eine Kollagenfärbung nachweisen.

Obwohl ein den BMSCs entsprechendes chondrogenes Differenzierungspotential von ASCs von mehreren Autoren bestätigt wurde (Zuk et al. 2001;Zuk et al. 2002;Lee et al. 2004;Wagner et al. 2005;Kern et al. 2006), gibt es auch Studien, die daraufhindeuten, dass Unterschiede in der Chondrogenese von ASC und BMSCs existieren (Winter et al. 2003;Sakaguchi et al. 2005;Estes et al. 2006;Hennig et al. 2007;De Ugarte et al. 2003). So konnte De Ugarte et al (2003) ausschließlich für ASC eine chondrogene Differenzierung nachweisen, nicht aber für BMSC. Andere sprechen wiederum von einem 90% reduzierten chondrogenen Potential von humanen ASCs gegenüber BMSCs bei Induktion mit TGF $\beta$ -3 (Hennig et al. 2007;Winter et al. 2003). Dieses reduzierte Potential konnte aber durch die Kombination von TGF $\beta$ -3 mit BMP-6 ausgeglichen werden, wobei die Verwendung von BMP-6 alleine keine Erfolge erzielte (Hennig et al. 2007). Auch Estes et al. (2006) stellten einen chondrogenen Effekt von BMP-6

auf ASC fest, der im Gegensatz zum osteoinduktiven Effekt von BMP-6 auf BMSC steht, allerdings stellte diese Arbeitsgruppe die besten Ergebnisse für BMP6 alleine fest.

Es gibt auch Hinweise auf das chondrogene Induktionspotential von BMP-2, wie Studien von Mehlhorn et al. (2007) für ASC und Indrawattana et al. (2004) für BMSC zeigen.

### **Osteogenese**

Die Fähigkeit von BMSC zur Osteogenese ist weitgehend bekannt (Owen und Friedenstein 1988;Jaiswal et al. 1997;Bruder et al. 1997;Pittenger et al. 1999). Beobachtungen bei Patienten mit der seltenen Erkrankung „Progressive osseäre Heteroplasie“, bei der sich im subkutanen Fettdepot kalzifizierte Knötchen bilden, unterstützen die Vermutung, dass auch im Fettgewebe Zellen mit den gleichen Fähigkeiten wie BMSC sitzen (Shore et al. 2002;Kaplan und Shore 2000). Zahlreiche Arbeitsgruppen isolierten Zellen aus dem Fettgewebe, die in vitro zu Osteoblasten differenzieren können (Zuk et al. 2001;Halvorsen et al. 2001;Dragoo et al. 2003;Hattori et al. 2004;Ogawa et al. 2004). Dabei wurden hauptsächlich humane ASC verwendet, seltener auch ASC aus Maus, Ratte oder Kaninchen.

Unter osteogenen Bedingungen, die denen für BMSC entsprechen, exprimieren ASC genauso wie BMSC Gene und Proteine, die mit Osteoblasten assoziiert werden. Dazu zählen die ALP, Kollagen Typ 1, Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin oder auch BMPs und ihre Rezeptoren. ASC sind außerdem, ebenso wie BMSC, fähig mineralisierte Matrix zu synthetisieren, was sich z. B. über eine Alizarinfärbung nachweisen lässt.

Auch über die Fähigkeit von ASC zur Knochenbildung in vivo existieren mittlerweile einige Studien. Die Mehrzahl dieser Studien untersuchte die Knochenbildungsfähigkeit an intramuskulären oder subkutanen Implantationsmodellen (Dragoo et al. 2003;Hattori et al. 2006;Kakudo et al. 2007;Lin et al. 2006;Zheng et al. 2006;Lee et al. 2003a). Die Arbeitsgruppen um Kakudo und Hattori kamen in ihren vergleichenden Studien zu dem Schluss, dass die Knochenbildungsfähigkeit von ASC und BMSC sich nicht unterscheidet.

## **1.7 Plättchenreiches Plasma (PRP)**

Als osteoinduktive Komponente des Tissue Engineering stellt Plättchenreiches Plasma als körpereigene Quelle von Wachstumsfaktoren eine attraktive Alternative zu teuren, künstlich hergestellten Wachstumsfaktoren dar.

Der mögliche Nutzen von Thrombozytenkonzentraten bei der Knochenregeneration wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Trotz der uneinheitlichen Ergebnisse dieser Studien wird PRP heute schon - vor allem in der Zahnmedizin - klinisch zur Knochenregeneration eingesetzt. Auch im orthopädischen Bereich existieren einige Studien über den Nutzen dieses autologen Produktes im Bereich der Knochenheilung, wobei eine positive Wirkung nicht immer nachgewiesen werden konnte (Aghaloo et al. 2002;Aghaloo et al. 2005;Gandhi et al. 2006;Kitoh et al. 2007;Wiltfang et al. 2003;Sarkar et al. 2006;Fennis et al. 2005;Froum et al. 2002).

### **1.7.1 Inhaltsstoffe von PRP**

PRP, auch bekannt als PRGF (platelet rich growth factors; (Anitua 1999), kann mithilfe unterschiedlicher Verfahren hergestellt werden. Je nach Verfahren kann sich die erzielte Anreicherung der Thrombozyten und damit der Wachstumsfaktoren erheblich unterscheiden. So schwankt beispielsweise die Anreicherung von TGF $\beta$  zwischen 52 ng/ml und 170 ng/ml ebenso wie die Thrombozytenzahl von  $433 \times 10^3$  bis  $1.086 \times 10^3$  (Marx 2004).

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle während der Wundheilung. Sie sind in ihrer nicht aktivierten Form kleine runde Scheiben mit einem Durchmesser von 1-3  $\mu\text{m}$  und zirkulieren im Blut vorzugsweise in der Nähe des Endothels ohne sich an dieses anzulagern oder untereinander zu aggregieren. Kommt es zur Verletzung des Endothels und damit zum Freilegen des subendothelialen Gewebes, binden die Thrombozyten über Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Glykoproteine) an subendotheliale Strukturen. Durch diese Thrombozytenadhäsion werden die Blutplättchen aktiviert und verändern ihr Aussehen von der Scheibenform zu einer Kugelform mit der Ausbildung von Pseudopodien. Außerdem werden aus den Granula der Thrombozyten verschiedene Inhaltsstoffe freigesetzt, die ihrerseits zu einer Aktivierung weiterer Thrombozyten, aber auch zu einer Gefäßkontraktion führen. Das Endziel des kaskadenartig ablaufenden Gerinnungsprozesses ist die Bildung von Fibrin. Das durch das dichte Fibrinnetz ver-

stärkte Koagel verschließt die verletzte Stelle solange, bis die Wundheilung durch Fibroblasten abgeschlossen ist.

Zusätzlich zu der Funktion der Thrombozyten in Hämostase, Entzündungsgeschehen und Wundheilung, spielen Thrombozyten auch bei der Reparatur von mineralisiertem Gewebe eine Rolle (Barnes et al. 1999;Gentry 1992).

In den Alpha-Granula der Thrombozyten werden zahlreiche Plasmaproteine, die Blutgerinnungsfaktoren V und VII, sowie eine Reihe verschiedener Wachstumsfaktoren gespeichert. Einhergehend mit der Aktivierung und Formveränderung nach Adhäsion kommt es zu einer Stimulation des Stoffwechsels der Thrombozyten und zur Sekretion einer Reihe von bioaktiven Molekülen, wie Wachstumsfaktoren, Chemokine, bioaktive Amine, Arachidonsäure-Metaboliten, extrazelluläre Matrixproteine und kleine Membranfragmente, die als Mikropartikel bezeichnet werden (Gruber et al. 2004;Aukhil 2000;Deodhar und Rana 1997).

Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren, die aus Thrombozyten freigesetzt werden zählen:

- Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ),
- Platelet Derived Growth Factor (PDGF),
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF),
- Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I),
- Epidermal Growth Factor (EGF)
- Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)
- Interleukin-1 (IL-1)

### **Transforming Growth Factor**

Der Transforming Growth Factor ist ein zu den Zytokinen zählendes Signalmolekül. Diese Signalmoleküle können in 2 große Gruppen eingeteilt werden: die TGF- $\alpha$ - und die TGF- $\beta$ -Superfamilie, mit der dazugehörenden Gruppe der Bone Morphogenetic Proteins (BMP).

Bislang wurde bei Säugetieren drei verschiedene Isoformen mit verschiedenen biologischen Effekten auf das Epithel, Endothel und das lymphatische, myeloische und mesenchymale Gewebe, identifiziert (TGF- $\beta$  1 bis 3).

TGF- $\beta$  wird von nahezu allen Zellen synthetisiert und auch die TGF-Rezeptoren sitzen auf allen Zellen. Dementsprechend beeinflusst TGF- $\beta$  fast jeden physiologischen Prozess auf irgendeine Art und Weise.

Er beeinflusst die Proliferation verschiedenster Zellen (zumeist als Suppressor), außerdem die Migration und Differenzierung (Gleizes et al. 1997; Hock und Canalis 1994; Hom et al. 2002).

Lawrence zeigte 1996, dass TGF- $\beta$  die Proliferation endothelialer, epithelialer und hämopoetischer Zellen hemmt, wohingegen Zellen mesenchymalen Ursprungs stimuliert werden (Lawrence 1996). Proliferationsfördernd wirkt TGF- $\beta$  also auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Osteoblasten (Harris et al. 1994).

Außer der mitogenen Wirkung auf Osteoblasten ist TGF- $\beta$  an der Knochenheilung zusätzlich im Rahmen der Regulation von Osteoblasten, Osteoklasten, Chondrozyten und mesenchymalen Zelle beteiligt (Mundy 1996). Während der Knochenresorption wird TGF- $\beta$  in aktiver Form freigesetzt, so dass es direkt seine biologischen Effekte auf die Zielzellen ausüben kann (Pfeilschifter und Mundy 1987). Durch TGF- $\beta$  1 wird die Osteoklastenformation und Knochenresorption inhibiert, sowie die Apoptose von Osteoklasten unterstützt (Pfeilschifter et al. 1988; Harris et al. 1994). Interessant ist außerdem, dass TGF- $\beta$  die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* inhibiert, obwohl es die Proliferation von Osteoblasten stimuliert (Harris et al. 1994).

In der Chondrogenese spielt TGF- $\beta$  eine zentrale Rolle für das Chondrozytenwachstum und bei der Differenzierung (Fukumura et al. 1998).

Rekombinantes TGF- $\beta$ , das in einer latenten Form produziert wird, besitzt *in vivo* eine Halbwertszeit von über 100 Minuten bei der Ratte, wohingegen das aktivierte Molekül innerhalb von 2-3 min von der Leber verstoffwechselt wird (Wakefield et al. 1990; Gleizes et al. 1997).

### **Platelet Derived Growth Factor (PDGF)**

1974 entdeckten Ross und Mitarbeiter (Ross et al. 1974), dass ein Faktor, der von Thrombozyten produziert wird, das Wachstum von glatten Muskelzellen aus Affen sehr effektiv anregt. Dieser Faktor wurde entsprechend seinem Vorkommen „Platelet derived growth factor“ genannt.

Dieser Faktor besteht aus zwei Polypeptidketten (A und B), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Daraus bestehen die seit langem bekannten Isofor-

men PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB.; erst seit kürzerem sind zusätzlich PDGF-C und D bekannt (Bergsten et al. 2001;Li et al. 2000).

Aus den Blutplättchen wird mit 70% hauptsächlich PDGF-AB freigesetzt, gefolgt von 30% PDGF-BB (Hammacher et al. 1988;Kilian et al. 2004).

PDGF initiiert die Bindegewebsheilung, sowie Knochenregeneration und –reparatur. PDGF spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, der Makrophagenaktivierung und als systemischer oder lokaler Regulator des Zellwachstums (Hock und Canalis 1994). So fungiert er als mitogener Faktor für Bindegewebszellen wie z. B. Fibroblasten der Haut (Rutherford und Ross 1976) oder für einige epitheliale und endotheliale Zellen (Brewitt und Clark 1988), aber z.B. auch auf humane Osteoblasten aus spongiösem Knochen oder osteogenen Zelllinien (Tsukamoto et al. 1991).

Neben der stimulierenden Wirkung auf die Replikation von Knochenzellen (Hock und Canalis 1994), steigert PDGF auch die Anlagerung von mineralisierter Matrix und zeigt bei *in vivo* Untersuchungen eine Steigerung der Knochenheilung (Pfeilschifter et al. 1990). Die osteogene Differenzierung von MSC wird durch die Zugabe von PDGF jedoch herabgesetzt (Cassiede et al. 1996).

Zusätzlich zu den mitogenen Eigenschaften, hat PDGF eine chemotaktische Wirkung auf Osteoblasten und Fibroblasten (Lind 1998;Mannaioni et al. 1997;Godwin und Soltoff 1997), aber auch auf mesenchymale Stammzellen, sowie auf glatte Muskelzellen, Neutrophile und mononukleäre Zellen (Tzeng et al. 1985). Außerdem spielt er in allen drei Phasen der Wundheilung eine Rolle, einschließlich der Angiogenese, Reepithelialisierung und der Bildung von fibrösem Gewebe (Hosgood 1993).

### **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Dieses dimere Glykoprotein spielt eine wesentliche Rolle in der Angiogenese, stellt es doch einen endothelspezifischen Wachstums- und Permeabilitätsfaktor dar (Ferrara und Davis-Smyth 1997;Wheeler et al. 1995). Zahlreiche Studien beweisen vor allem die mitogenen Eigenschaften auf Endothelzellen (Ferrara 2000). Er wirkt außerdem chemotaktisch auf Makrophagen und Endothelzellen.

### **Insulin-Like Growth Factor (IGF)**

Die IGFs sind die in der Knochenmatrix am häufigsten vorkommenden Wachstumsfaktoren (Solheim 1998). Sie regulieren Knochenzellen auf autokrine oder parakrine Wei-

se, indem sie die DNA-Synthese, die Osteocalcin-Synthese sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase stimulieren (Canalis und Lian 1988;Hock et al. 1988). In vivo konnten eindrucksvolle Effekte auf die Knochenbildung gezeigt werden (Hock et al. 1988); zum Beispiel die Stimulation des Längenwachstums von Knochen bei Wachstumshormon defizienten Mäusen.

### **Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF)**

Dieser Fibroblastenwachstumsfaktor wurde als endothelmitogener Wachstumsfaktor der Makrophagen identifiziert (Zheng et al. 1997;Cross und Claesson-Welsh 2001). Unter der Wirkung dieses angiogenen Faktors kommt es in Organen zur Proliferation der Gefäßzellen und zum Zellwachstum. Er entfaltet seine Wirkung insbesondere unter hypoxischen Bedingungen. Eine weitere Wirkung dieses Proteins ist die Stimulation von Motilität, Migration und Differenzierung von Epithelzellen.

Es existieren verschiedene Subtypen, die jedoch alle dieselbe biologische Aktivität besitzen.

### **Epidermal Growth Factor (EGF)**

Dieser Faktor stimuliert gleichzeitig die Mitose von Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten und stimuliert somit die Wundheilung (Bennett et al. 2003).

## **1.7.2 Funktionsweise des PRP**

PRP wirkt über die Degranulation der alpha-Granula der Thrombozyten, die, wie beschrieben, verschiedene Wachstumsfaktoren enthalten. Die aktive Sekretion dieser Faktoren wird durch den Gerinnungsprozess des Blutes verursacht und beginnt innerhalb von 10 Minuten nach Koagulation (Marx 2004). Mehr als 95% der vorproduzierten Wachstumsfaktoren werden innerhalb einer Stunde freigesetzt (Kevy und Jacobson 2001). Viele der Wachstumsfaktoren liegen in den Thrombozyten in inaktiver Form vor und werden nach Beginn der Gerinnung über die Zellmembran freigegeben. In diesem Prozess fusionieren die alpha-Granula mit der Zellmembran, wodurch die Wachstumsfaktoren durch z. B. Anlagerung von Histonen oder Carboanhydraten in die bioaktiven Formen umgewandelt werden. Deshalb werden Thrombozyten, die durch den Herstellungsprozess beschädigt wurden, keine bioaktiven Wachstumsfaktoren mehr freisetzen können (Marx 2004). Auch eine Aktivierung der Thrombozyten beim Herstellungs-

prozess des PRP, führt zu einer frühzeitigen Degranulation der alpha-Granula und somit zum Verlust von Wachstumsfaktoren (Eppley et al. 2004).

Die freigesetzten Wachstumsfaktoren binden sofort über transmembrane Rezeptoren an die entsprechenden Zellen der Umgebung. Mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten, Fibroblasten, Endothelzellen sowie Zellen der Epidermis besitzen beispielsweise solche Rezeptoren für die in den Plättchen enthaltenen Wachstumsfaktoren (Marx et al. 1998). Die transmembranen Rezeptoren aktivieren endogene Signalproteine, die wiederum die Expression von Gensequenzen der Zelle verursachen, so dass es zur Zellproliferation, Matrixsynthese, Osteoidproduktion, Kollagensynthese etc. kommt.

Nach dem ersten Ausstoß von Wachstumsfaktoren synthetisieren und sezernieren die Thrombozyten für ihre restliche Lebensdauer von sieben Tagen zusätzliche Wachstumsfaktoren. Nach ihrem Absterben übernehmen Makrophagen, die durch die Thrombozyten angezogen wurden die Regulation der Wundheilung zum Teil über dieselben Wachstumsfaktoren wie Thrombozyten.

Typischerweise wird in experimentellen Arbeiten Thrombin und Calcium verwendet, um die Thrombozytenaggregation und -degranulation, und damit die Ausschüttung der Wachstumsfaktoren auszulösen. Die dadurch entstehende Gelform vereinfacht außerdem die Handhabung. Thrombin spielt eine zentrale Rolle in der Gerinnungskaskade. Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin, führt zur Thrombozytenaggregation und führt somit zur Bildung eines stabilen Koagels. Die Bindung von Thrombin an transmembrane Rezeptoren führt über komplexe Signalübertragungswege zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Die Thrombozytenaktivierung zeigt einen biphasischen Kalziumbedarf: Der initiale Kalziumanstieg stammt aus intrazellulären Speichern; die späteren Phasen der Degranulation können jedoch nur in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium stattfinden (Lasne et al. 1995). Dabei regulieren Kalzium und Thrombin konzentrationsabhängig die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Frechette et al. 2005;Lacoste et al. 2003). Die letztendlich freigesetzten Wachstumsfaktor-Konzentrationen hängen aber nicht nur von den eingesetzten Kalzium und Thrombinmengen ab: Wie zu Anfang erwähnt, unterscheidet sich die Thrombozytenzahl je nach Herstellungsverfahren. Die Thrombozytenkonzentration wiederum korreliert nach Meinung einiger Autoren mit der Konzentration an freigesetzten Wachstumsfaktoren (Babbush et al. 2003;Dugrillon et al. 2002;Zimmermann et al. 2001). Andere

Gruppen konnten eine Korrelation zwischen Wachstumsfaktoren-Konzentrationen und Thrombozytenzahlen nicht bestätigen (Weibrich et al. 2002; Lacoste et al. 2003; Eppley et al. 2004). Sie stellten außerdem große interindividuelle Unterschiede an Wachstumsfaktoren fest (Beispiel TGF- $\beta$ 1: 1,5 bis 366,1 ng/ml).

### **1.7.3 PRP in der Knochenregeneration**

In der Knochenheilung wirken die Wachstumsfaktoren der Thrombozyten vor allem in der Frühphase über die Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Zellen, aber auch über die chemotaktische Wirkung auf Leukozyten und Makrophagen (Quirina 1999; Lawrence 1998; Deodhar und Rana 1997). Auch die für PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF und BFGF nachgewiesene angiogenetische Wirkung ist für die Knochenheilung wichtig (Nwomeh et al. 1998).

Schon 1964 berichtete Schulte et al. über die Verwendung von autologen Blutprodukten zur Unterstützung der Knochenregeneration nach Zystektomien. Doch erst 30 Jahre später griffen Yamato et al. (1996) die Verwendung von autologen Blutprodukten wieder auf, und zwar als Gewebekleber zur Blutstillungen. Die ersten Beschreibungen der Herstellung von PRP stammen von Withmann et al. (1997), der es zur beschleunigten Knochenregeneration in der Kiefer- und Gesichtschirurgie einsetzte und zudem einen positiven Einfluss auf die Weichteilheilung bemerkte.

Die erste klinische Studie mit insgesamt 88 Patienten stammt von Marx et al (1998). Dabei wurde bei Unterkieferrekonstruktionen zusätzlich zu autologen Knochen- transplantaten PRP eingesetzt. Die Gruppe konnte dadurch eine Steigerung der Knochen- dichte von 19% im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielen, die ausschließlich mit dem Knochen- transplantat behandelt wurde. Danach folgten einige Studien, die ebenfalls einen positiven Effekt von PRP auf die Knochenregeneration in verschiedenen Model- len beobachten konnten (Camargo et al. 2002; Gandhi et al. 2006; Kassolis und Rey- nolds 2005; Kitoh et al. 2004; Wiltfang et al. 2003; Kim et al. 2002; Kassolis et al. 2000). Demgegenüber stehen aber auch kritische Publikationen über die Effizienz von PRP in der Knochenheilung (Fennis et al. 2005; Froum et al. 2002).

Auf die große Zahl von in vivo Studien folgten erst in den letzten Jahren auch in vitro Untersuchungen, die die genaueren Mechanismen von PRP in Bezug auf Proliferation,

Migration und Differenzierung der Zellen untersuchten. Die Mehrzahl dieser Studien kommt zu dem Schluss, dass sich PRP oder die Überstände aktivierter Plättchen (platelet released supernatant = PRS) zumindest auf die Proliferation und Migration von mesenchymalen Stammzellen oder Knochenzellen positiv auswirkt (Weibrich et al. 2002;Gruber et al. 2002;Oprea et al. 2003;Kanno et al. 2005;Kawase et al. 2005;Graziani et al. 2006).

Einige Studien belegen, zusätzlich zu den proliferativen Eigenschaften von PRP, auch die Fähigkeit die osteogene Differenzierung zu stimulieren (Kanno et al. 2005;Goto et al. 2006).

Demgegenüber stehen andere *in vitro* Studien, die sogar von einer Hemmung der Osteogenese durch PRP sprechen (Arpornmaeklong et al. 2004;Gruber et al. 2004;Gruber et al. 2006)

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellisolation und Expansion**

Sämtliche zellkulturellen Arbeiten wurden, soweit nicht anders vermerkt unter sterilen Bedingungen an einer Sterilarbeitsbank (HeraSafe, HS18, Heraeus Instruments, Hanau, D) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch 20 min. bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert (Münchner Medizin Mechanik GmbH, Plannegg, D) bzw. alternativ mit Spritzen- bzw. bottle top-Filtern (Porengröße: 0,22 µm, Millipore, Carrigtwohill, Irland) steril filtriert.

#### **2.1.1 Isolation von ASC**

Von insgesamt 12 Schafen wurden Fettgewebeproben (5-7 g) entnommen (siehe 2.5.3). Durch enzymatischen Verdau wurden daraus in Anlehnung an bestehende Protokolle (Hauner et al. 1989; Winter et al. 2003; Knippenberg et al. 2005) ovine mesenchymale Stammzellen gewonnen. Dazu wurde das Fettgewebe zweimal mit PBS mit 20 mg/ml BSA gewaschen. Um das Fett auf ca. 0,5 cm große Stücke zu verkleinern und das fibröse Material und Blutgefäße abzuräubern, wurde das Fett in Petrischalen verbracht. Eine Kollagenase-Lösung (Kollagenase TypB; Roche Diagnostics, Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz; Herkunft: Clostridium hydrolyticum, Spezifische Aktivität: >0,15 U/mg) von 0,6 mg/ml wurde durch Verdünnung in Krebs-Ringer-Puffer mit HEPES hergestellt, und das Fettgewebe mit einem äquivalenten Volumen Kollagenase-Lösung in einem Falcon bei 37 °C für 90 Minuten leicht geschüttelt (Orbitalschüttler, Miometra® WT 12, Göttingen, D).

Über die anschließende Filtration durch eine Polypropylenmembran mit einer Porengröße von 150 µm (NeoLab, Heidelberg, D) wurden unverdaute Gewebeteile und Aggregate von Endothelzellen weitgehend entfernt. Nach Zentrifugation (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, D) der Zellen bei 600g für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Überstand mitsamt der Lipidschicht verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS (Phosphate buffered saline = PBS; 10-fach, Invitrogen, Steinheim, D) gewaschen.

Die im Expansionsmedium resuspendierten Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, D) ausgesät. Ein bis zwei Tage nach der Aussaat wurden die adhären Zellen gründlich mit PBS gewaschen, um nicht-adhären Zellen aus der Kultur zu entfernen.

### **2.1.2 Expansion**

Die Stammzellen wurden in Zellkulturflaschen in Inkubatoren (HeraCell, Hereaus Instruments, Hanau, D) bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. Die Expansion erfolgte in einem Medium nach Reyes und Verfaillie (Reyes und Verfaillie 2001). Dieses Medium besteht aus DMEM high Glucose versetzt mit 40% MCDB 201, 2% FCS, Insulin-Transferrin-Natriumselenit Supplement; 0,02 µM Dexamethason, 0,1 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat und 1% Penicillin/Streptomycin.

Es wurde nach Herstellung steril filtriert und bei –20°C bis zur Verwendung gelagert. Vor Gebrauch wurden 10 ng/ml EGF und 10 ng/ml PDGF beigefügt und das Medium nach Zugabe der Wachstumsfaktoren innerhalb einer Woche verbraucht.

Zellen, die in Monolayerkulturen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder von den Zellen metabolisiert werden, oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfallen. Die Intervalle der Mediumerneuerung und der Subkultivierung variieren abhängig vom Metabolismus und der Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Zellen. In der Regel wurde zweimal pro Woche das Medium gewechselt.

### **2.1.3 Passagierung**

Haben sich die ausgesäten Zellen soweit vermehrt, dass sie die Fläche nahezu vollständig einnehmen, wird der Zellrasen als konfluent bezeichnet.

Die Zellen sollten passagiert, d.h. abgelöst und in ein neues Kulturgefäß überführt werden, bevor die vollständige Konfluenz erreicht wird, da bei 100% Konfluenz des Zellrasens das Wachstum durch Kontaktinhibition beeinträchtigt werden kann. Außerdem wachsen die Zellen in Multilayer und es kann zu einer spontanen osteogenen Differenzierung kommen. Deshalb wurden die Zellen bei ca. 80% Konfluenz passagiert: Die Ablösung der Zellen erfolgte mit einer auf 37°C vorgewärmten Lösung von

0,05%Trypsin und 0,02% EDTA (Biochrom AG, Berlin, D) in PBS. Bevor man aber das Trypsin einwirken lässt, wurden die Zellen mit PBS gespült, um Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen, da diese die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen können. Nach ca. 5 Minuten im Brutschrank löste sich die Zellschicht vom Boden der Zellkulturflasche ab. Der Ablösungsprozess wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Er wurde als abgeschlossen angesehen, wenn die Mehrzahl der Zellen sich von der Unterlage abgehoben hat und abgerundet in der TrypsinierungsLösung schwammen.

Mit mindestens der gleichen Menge FCS-haltigem Medium wurde die Enzymwirkung des Trypsins inaktiviert und auch zum Teil das zytotoxische EDTA gebunden.

Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 200g für 10 Minuten zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert, um die Trypsin-EDTA-Lösung vollständig zu entfernen.

Für die Zellzählung wurde den zu zählenden Zellen ein Aliquot entnommen und mit einer bestimmten Menge Trypanblau (0,4%; Sigma-Aldrich, Steinheim, D) versetzt. Der Farbstoff Trypanblau kann die Membran lebender Zellen nicht passieren, aber das Zytoplasma toter Zellen wird blau gefärbt, auch wenn die Zellen intakt erscheinen. Die Zählkammer wurde vorbereitet indem das Deckglas so auf die Kammer gesetzt wurde, dass sich auf den leicht angefeuchteten Auflageflächen die so genannten Newton'schen Ringe bildeten. Dadurch wurde garantiert, dass die Höhe der Kammer überall gleichmäßig war und das Kammervolumen dem vom Hersteller angegebenen entsprach. Die mit Trypanblau resuspendierte Zellsuspension wurde vorsichtig an den Rand der Kammer aufgetragen, so dass sich die Suspension in die Kammer hineinsaugte und luftblasenfrei die Fläche bedeckte. Die Zählkammer wurde bei 100-facher Gesamtvergrößerung unter Phasenkontrast mikroskopiert. Die Zellzahl der lebenden, also ungefärbten Zellen wurde auf allen 4 Großquadraten bestimmt. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl} = n \cdot V_f \cdot V \cdot 10^4$$

*n: Gesamtzahl lebende Zellen in allen 4 Großquadraten/4 Großquadrate*

*V<sub>f</sub>: Verdünnungsfaktor*

*V: Volumen der Zellsuspension*

*10<sup>4</sup>: Kammerfaktor*

### 2.1.4 Bestimmung der Populationsverdopplungen

Bei jeder Passagierung der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt und die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) rechnerisch nach folgender Formel bestimmt.

$$PD = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

N gibt die Zahl der geernteten Zellen/cm<sup>2</sup> an, N<sub>0</sub> die Zahl der ausgesäten Zellen/cm<sup>2</sup>.

### 2.1.5 Einfrieren und Auftauen

Zur Lagerung der Zellen über mehrere Monate wurden sie bei -80 °C eingefroren.

Von allen Schafen wurden in der frühen Expansionsphase (Passage 2-4) Aliquots der Zellen eingefroren. Jeweils 1-3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Kryovial (Nunc, Wiesbaden, D) wurden in 1 ml Einfriermedium konserviert. Das Einfriermedium bestand aus 5% DMSO (Dimethylsulfoxid, Serva, Heidelberg, D) und 95% FCS (Biochrom AG; Berlin, D). Die beschrifteten Kryo-Röhrchen wurden in ein Einfriergerät (Nalgene<sup>TM</sup> Cryo, Wiesbaden, D) gestellt, welches eine schonende Temperaturniedrigung um 1 °K/min gewährleistet und bei -80 °C gelagert.

Zur Durchführung der Versuche mit PRP wurden eingefrorene ASC verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Kryoröhrchen im Wasserbad angetaut, anschließend in 45 ml DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, D) resuspendiert und bei 200g für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer entsprechenden Menge frischem Medium resuspendiert, in neue Kulturflaschen ausgesät, frisches Medium hinzugegeben und im Brutschrank kultiviert.

## 2.2 Untersuchung des in vitro Differenzierungspotentiales

Das „Tissue Stem Cell Committee“ der „International Society for Cellular Therapy“ legte die minimalen Anforderungen, die zur Charakterisierung einer mesenchymalen Stammzelle dienen fest. Hierzu gehören demnach die Adhärenz an Plastik, die Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen und das multipotente Differenzierungspotential (Dominici et al. 2006). Zum Nachweis des letzteren, wurde hier die Differenzierung der Stammzellen in die adipogene, chondrogene und natürlich osteogene Richtung durch die Verwendung spezifischer Kulturmedien induziert. Dabei galt der Untersuchung der Osteogenese besondere Aufmerksamkeit.

## 2.2.1 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung wurde durch Dexamethason, Insulin, Indomethacin, Isobutylmethylxanthine induziert. Dazu wurden 35.000 Zellen/Well aus Passage 3 in 24-Wellplatten ausgelegt. Die Zellen wurden über 3 Wochen mit adipogenem Medium kultiviert. Mediumwechsel fand zweimal wöchentlich statt. Der Nachweis von Fettvakuolen erfolgte mittels Ölrot O-Färbung.

### 2.2.1.1 Ölrot O-Färbung

Fettvakuolen sind mittels der Ölrot O-Färbung rot darstellbar. Dazu wurde der Zellrasen mit 4% Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend kurz mit Aqua dest. gewaschen. Danach wird der Zellrasen für 5 min mit 60% Isopropanol bedeckt und dann 15 min bei Raumtemperatur mit Ölrot-Gebrauchslösung gefärbt. Für diese Gebrauchslösung werden 6 Teile einer Stammlösung mit 4 Teilen Aqua dest. vermischt und nach 24 Stunden filtriert. Die benötigte Stammlösung enthält 0,5 g Ölrot O (Waldeck, Division Chroma, Münster; D), gelöst in 100 ml 99% Isopropanol. Nach einem Waschgang mit Aqua dest. wurden repräsentative Areale des Zellrasens unter dem Mikroskop fotografiert.

## 2.2.2 Chondrogene Differenzierung

Als chondrogenes Grundmedium diente DMEM high glucose, versetzt mit Insulin-Transferrin-Natriumselenit Supplement, Dexamethason, Ascorbinsäure, Prolin und Bovinem Serum Albumin (BSA).

Zur Induktion der Chondrogenese wurden in Vorversuchen verschiedene Wachstumsfaktoren und deren Kombinationen untersucht.

Ansatz	1	2	3	4
Wachstumsfaktoren	15 ng/ml TGFβ3	15 ng/ml TGFβ3 +10 ng/ml BMP2	15 ng/ml TGFβ3 +10 ng/ml BMP6	Keine

Tab. 1: Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren für Chondrogenese

Nach Auswertung der verschiedenen Wachstumsfaktoren nach den ersten 6 Schafen, wurde die Chondrogenese nur noch mit Medium 2 und 3 induziert.

Die chondrogene Differenzierung erfolgte in der dreidimensionalen Pelletkultur (Pittenger et al. 1999). Hierzu wurden je 500.000 Zellen aller Schafe (n=12) der 3. Passage mit jeweils 500 µl chondrogenem Medium mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren in einem Eppendorf Tube resuspendiert und bei 200 g für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Pellets wurden insgesamt für 6 Wochen kultiviert. Während der ersten 2 Wochen wurde pro Pellet 500 µl Medium verwendet, danach 200µl. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

Nach 6 Wochen wurden die Pellets in Paraffin eingebettet und histologisch ausgewertet. Bei einer positiven Alzianblaufärbung erfolgte außerdem eine immunhistologische Auswertung (Kollagen I und II).

### **2.2.2.1 Fixierung und Einbettung der Pellets**

Für histologische und immunhistologische Untersuchungen wurden die Pellets nach Waschen mit PBS möglichst ohne Flüssigkeitsreste bei -80 °C bis zur Fixierung eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Pellets für 2 h in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entwässerung der Konstrukte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Isopropanol für 2 Stunden oder über Nacht, 96% Isopropanol für 2 h, zweimal 100% Isopropanol für 2 h oder über Nacht) wurden die Präparate abschließend für 2 Stunden in Aceton überführt und nach 2 h bei 60 °C in flüssigem Paraffin in Paraffinblöcke eingebettet. Die Blöcke wurden nach Erhärtung am folgenden Tag in 5 µm dicke Schnitte geschnitten.

### **2.2.2.2 Anfertigung von Schnitten**

Die Paraffinblöcke wurden nach Härtung mit einem Mikrotom (Leica, Jung Histoslid 2000R, Nussloch, D) bei 5 µm Schnittdicke geschnitten. Sie wurden vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette bei 40 °C in einem Wasserbad (Medaxx, Nagel GmbH, Kiel, D) gestreckt und auf einen Objektträger (76 x 26 mm SuperFrost, Menzel Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen. Anschließend wurden sie auf einer Wärmeplatte (Medaxx, Nagel GmbH, Kiel, D) für ca. 20 min bei 40 °C angetrocknet und dann über Nacht in den 40 °C warmen Trockenschrank (Heraeus, Hanau, D) verbracht.

### **2.2.2.3 Entparaffinierung**

Vor den histologischen und immunhistologischen Färbungen wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Dies erfolgte durch viermalige Inkubation für 10 min in Xylolersatzmittel und einer anschließenden Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe von je 5 min in 100%, 96%, 70% und 50% Isopropanol, gefolgt von 5 min in Aqua dest.

### **2.2.2.4 Alzianblau**

Durch die Alzianblaufärbung wird die Knorpelgrundsubstanz, ein saures sulfatreiches Proteoglykan, abhängig vom pH-Wert spezifisch angefärbt. Im Lichtmikroskop erscheint das gefärbte Proteoglykan türkisblau, während die übrigen Zellbestandteile hell erscheinen. Mit einer Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat werden die Zellkerne schwach rot und der Hintergrund schwach rosa angefärbt.

Nach Rehydrierung der Paraffinschnitte wurden diese zunächst 5 min in Aqua dest. mit 3 Tropfen Essigsäure inkubiert und anschließend für 30 min mit 1%iger wässriger Alzianblau-Lösung (Chroma, Köngen, D; angesäuert mit 500 µl/l Essigsäure) gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit angesäuertem Aqua dest. und nochmaligem Waschen mit purem Aqua dest, erfolgte eine Kernfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Chroma, Münster, D) für 5 min. Nach mehrfachem Spülen mit Reinstwasser wurden die Präparate zügig mit 96% und zweimal 100% Isopropanol (Merck, Darmstadt, D) entwässert. Zum Abschluss wurden die Schnitte noch für 4 x 5min in Xylolersatzmittel (Vogel GmbH, Giessen, D) aufgehellt und mit Eukit eingedeckt.

### **2.2.2.5 Kollagen Typ I und Typ II Immunhistologie**

Für die Immunhistochemie müssen die entparaffinierten Schnitte zuerst durch zwei Verdauungsschritte für die Antikörper zugänglich gemacht werden. Dazu werden die Präparate kurz in PBS bewegt und nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C in Hyluronidase (2mg/ml PBS; Merck, Darmstadt, D) mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit Pronase (1mg/ml PBS; Roche Diagnostics, Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) ebenfalls bei 37°C verdaut.

Nach erneutem Waschen wurde zur Blockierung unspezifischer Hintergrundfärbung für 30 min mit 5% BSA/PBS bei Raumtemperatur inkubiert.

Über Nacht fand die Inkubation mit einer 1:1000 Verdünnung des Primär-Antikörpers  $\alpha$ -human Kollagen Typ I (Klon I-8H5) bzw. Typ II (Klon II-4C11) von der Firma MP Biomedicals, Ohio, USA gelöst in 1% BSA/PBS bei 4 °C statt. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgetropft und überschüssiger Primärantikörper durch 3-faches Waschen mit Tris-gepufferter Saline (TBS) entfernt. Danach wurde der Biotin-konjugierte Ziege anti-Maus IgG Antikörper in einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml TBS für 30 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgebracht. Wieder erfolgten 3 fünfminütige Waschschrte mit TBS. Der nun benötigte Streptavidin-Biotin-Komplex wurde jeweils eine halbe Stunde vor Verwendung frisch angesetzt. Dazu wurden 45  $\mu$ l Streptavidin Lösung und 45  $\mu$ l biotinylierte alkalische Phosphatase Lösung zu 5 ml 50 mM Tris-Puffer (pH: 7,6) gegeben und dunkel gestellt. Dieser Komplex wurde nach erneutem 3-maligem Waschen mit TBS auf die Schnitte aufgebracht und für 30 min inkubiert. Abschließend wurde nach dreifachem Waschen mit TBS für 10-20 min unter Lichtausschluss eine Fast-Red-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) aufgebracht, mit Aqua dest. abgestoppt und die Schnitte in Aquatex (Merck, Darmstadt, D) permanent eingedeckt.

### **2.2.2.6 Beurteilung der Chondrogenese**

Die mit Alzianblau gefärbten Schnitte wurden bei 100-facher Vergrößerung untersucht und nach folgendem einfachen semiquantitativen Score von 1-3 eingeteilt: Keine Anfärbung (1), schlechte bis mäßige Färbung (2), und sehr gute Anfärbbarkeit (3) Die Beurteilung der Kollagen Typ II gefärbten Schnitte erfolgte anhand desselben Schemas.

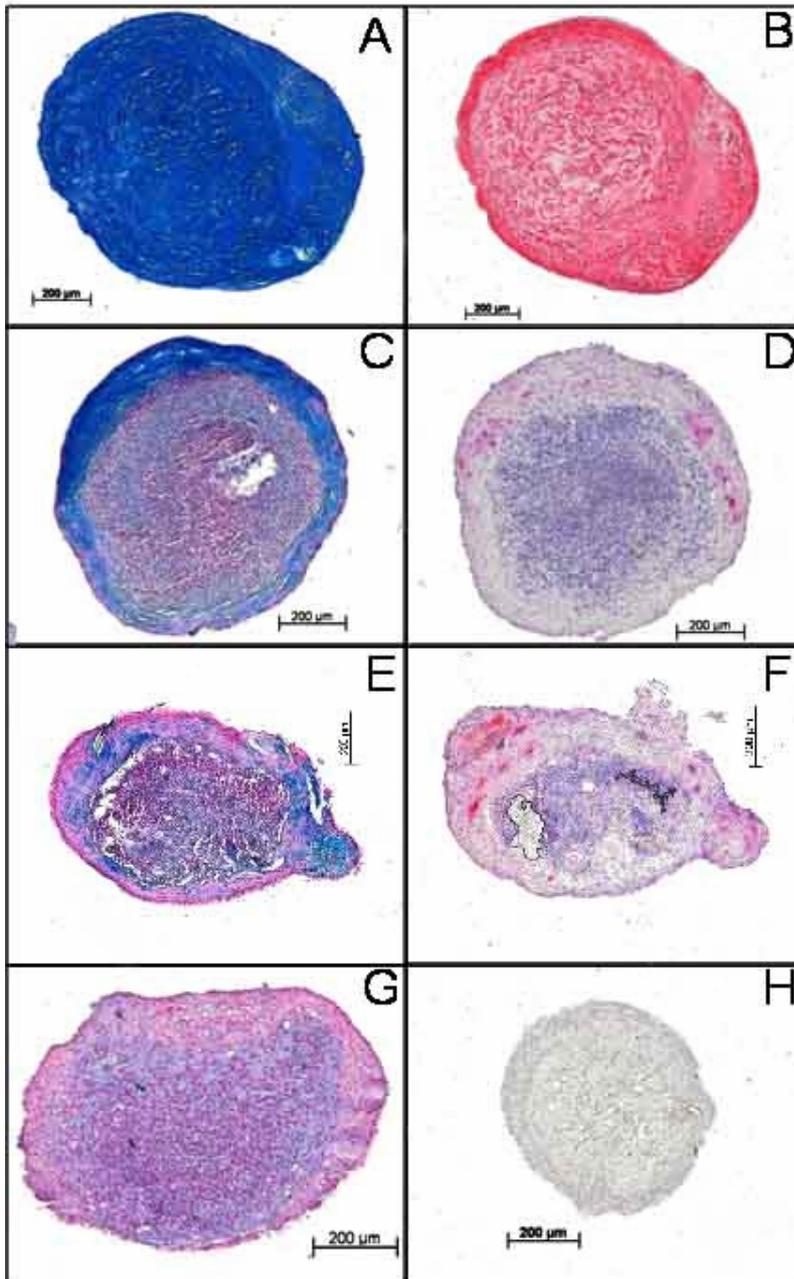


Abb. 2: Einteilung der Alzianblaufärbung (A, C, E und G) und Kollagen Typ I Immunhistochemie (B, D, F und H), in sehr gute (A und B), bzw. mäßig-schlechte Färbung (C und D, E und F. ) und negativ (G und H)

### 2.2.3 Osteogene Differenzierung

Zur Induktion der Osteogenese wurden je 35.000 Zellen/Well in eine 24-Wellplatte unter osteogenen Medieneinflüssen (Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat) für einen Zeitraum von 28 Tagen kultiviert (Pittenger et al. 1999; Pittenger et al. 2000).

Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

Die in vitro Osteogenese wurden mit den Zellen aller Schafe nach P3 durchgeführt (n=12). Als Negativkontrolle diente Verfaillie-Medium (für n=6).

Da die ovinen ASC in ersten Vorversuchen eine verlangsamte osteogene Differenzierung unter den für humane Stammzellen geeigneten Bedingungen zeigten, wurde zur Verbesserung der Osteogenese zusätzlich ein auf 20%FCS aufgestocktes osteogenes Medium verwendet.

Der Nachweis einer effektiven osteogenen Induktion erfolgte zum Einen -analog früherer Arbeiten (Vogel et al. 2006)- histochemisch jeweils im Doppelansatz mit Alizarinrot-S (Fa Waldeck GmbH&Co.KG, Division Chroma; Köngen D). Zum Anderen wurde die ALP Aktivität aus Zelllysaten, ebenfalls im Doppelansatz, bestimmt. Beide Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende Proteinmenge normiert, die aus den entsprechenden Zelllysaten bestimmt wurde.

Beide Auswertungen wurden im Zeitverlauf an Tag 1, 7, 14, 21 und 28 vorgenommen.

### 2.2.3.1 Alizarinfärbung

Die Alizarinfärbung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Stanford (Stanford et al. 1995). Nach vorsichtigem Spülen der differenzierten Monolayer mit PBS, wurden die Zellen mithilfe von 70%igem eiskaltem Ethanol für eine Stunde fixiert. Das durch die osteogene Differenzierung in den Stammzellen abgelagerte Kalzium wird mit 200 µl je well Alizarinrot-S für 10 Minuten angefärbt. Durch das anschließende mehrfache Waschen des Monolayers mit Aqua dest. wird überschüssige Farbe entfernt und nur die vom Kalzium gebundene Menge Farbstoff bleibt zurück. Durch Zugabe von 200 µl je Kavität Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (C-9002, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) für ebenfalls 10 Minuten lösen sich die Zellen ab und es erfolgt ein Farbumschlag in das Violette.

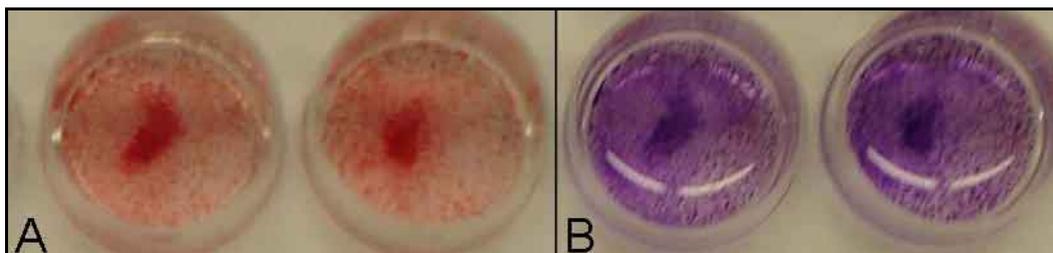


Abb. 3: Alizarinfärbung an Tag 14 (A); Farbumschlag mit Cetylpyridiniumchlorid (B)

Die gebundene Farbstoffmenge, die proportional zur jeweiligen Menge abgelagerten Kalziums ist, wurde dann im ELISA MRX Lesegerät (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 570 nm bestimmt: dazu werden je 20 µl der Farblösung jeder Kavität mit 180µl Cetylpyridiniumchlorid (CPC) in einer 96-well Platte vermischt. Der Standard wird ausgehend von einer Lösung mit 500 µg Alizarinrot/ml durch 1:2 Verdünnungen mit Cetylpyridiniumchlorid-Lösung hergestellt.

Zur Normierung der Ergebnisse werden sie auf einen Wert bezogen, der die im Well vorhandene Zellmenge widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu, der Proteinwert herangezogen, der wie unten beschrieben, aus den Zelllysaten bestimmt wird.

### **2.2.3.2 Herstellung von Zelllysaten**

Parallel zu den zwei wells, die pro Zeitpunkt für die Alizarinfärbung vorgesehen sind, wird für die Herstellung von Zelllysaten die entsprechende Zellzahl in zwei weitere wells ausgelegt.

Zelllysate werden mit Hilfe von 0,01% Triton X 100 (Fluka, Neu-Ulm, D) hergestellt. Triton ist ein nicht-ionisches Detergens, das zur Isolierung von Membranproteinen in ihrer aktiven Form verwendet wird. Nicht-ionische Detergenzien werden als nicht denaturierend betrachtet, da sie eher Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Verbindungen spalten als Protein-Proteinverbindungen.

Zur Herstellung der Lysate wird das Medium entfernt und der Monolayer mit PBS gewaschen. Daraufhin wird der Monolayer für 5-10 min mit 500 µl 0,01% Triton X 100 bedeckt. Der Zellrasen wird dann mit einer Pipettenspitze abgekratzt und die gelösten Zellen in ein Eppendorf tube überführt. Die Zelllysate werden bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

### **2.2.3.3 Bestimmung der ALP-Aktivität**

Die ALP-Aktivität ist ein gängiger Marker für die Differenzierung von Osteoblasten. Da die Alkalische Phosphatase ein membranständiges Protein ist wird sie aus Zelllysaten bestimmt. Das Testprinzip beruht auf dem Umsatz des Substrates para-Nitrophenylphosphat (pNPP) durch die ALP, wodurch es zu einem Farbumschlag (gelb) kommt.

Für die Herstellung der 30 mM Substratlösung wird eine Kapsel p-Nitrophenylphosphat (#104, Phosphatase Substrat, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in 12,67 ml ALP-Puffer (150 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH:10,3) gelöst. Zur Messung der ALP-Aktivität wurden je 100 µl des aufgetauten Lysats in Doppelansätzen mit 100 µl der Substratlösung in einer 96-well Platte für einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach dem Farbumschlag und lag bei den untersuchten Proben bei 3-5 Stunden. Als Leerwert dienten 100 µl 0,01% Triton X 100 mit 100 µl Substratlösung. Der Umsatz des Substrates wurde im ELISA MRX Lesegerät (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 405/490 nm gemessen. Bei jedem Assay wurde eine Standardkurve mit einer p-Nitrophenol Standardlösung von Sigma (#N7660, Sigma-Aldrich, Steinheim, D), mit einer Ausgangskonzentration von 100 µg/ml; hergestellt und die Konzentrationen der Proben durch Interpolation bestimmt. Die ALP-Aktivität wird bezogen auf die Proteinmenge angegeben, die aus demselben Lysat bestimmt wird.

### 2.2.3.4 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration aus den Zelllysaten wurde der Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, Irland) verwendet. Diese Methode beruht auf dem sensitiven kolorimetrischen Nachweis eines Bicinchoninsäure (BCA)/Cu<sup>+</sup>-Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu<sup>2+</sup>-Ionen und anschließende Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht (Smith et al., 1985). Der entstehende violette BCA/Cu<sup>+</sup>-Komplex ist proportional zur Proteinmenge und hat sein Absorptionsmaximum zwischen 540-590 nm. Die Proteinbezugskurve wird mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt (0,5 µg/ml bis 200 µg/ml).

Für den Assay wurden je 150 µl des 1:10 verdünnten Lysates in Doppelansätzen mit je 150 µl des Arbeitsreagenz kurz geschüttelt und dann für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Arbeitsreagenz, das zu Beginn jedes Assay neu hergestellt wurde, bestand aus 25 Teilen Reagenz MA (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat und Natriumtartrat in 0,2 N NaOH), 24 Teilen Reagenz MB (Bicinchoninsäure) und ein Teil Reagenz MC (Kupfersulfat).

Die Proteinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm im ELISA MRX Lesegerät (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) gemessen.

### 2.3 Charakterisierung von PRP/FFP

Sowohl für die *in vitro*, als auch für die *in vivo*-Versuche wurde PRP aus der Blutbank Düsseldorf verwendet. Zur Herstellung des PRP wurden tagesfrische Vollblutkonserven gesunder männlicher und weiblicher Spender unter 45 Jahren genutzt. Zur Aufrechterhaltung des Erythrozytenstoffwechsels und zur Hemmung der Gerinnung wurde das Blut im Verhältnis 1:10 mit dem Acid-Citrat-Dextrose-Stabilisator (ACD-Stabilisator) versetzt. Die Plättchenisolierung erfolgte innerhalb 1 bis 2 Stunden nach der Blutabnahme nach einer modifizierten Form der von Mustard et al. (Mustard et al. 1972) beschriebenen Methode:

Dazu wurde das ACD-Blut 20 min lang bei Raumtemperatur und 150g zentrifugiert. Das aus den Überständen gewonnene plättchenreiche Plasma wurde mit silikonisierten Pasteurpipetten gesammelt und in silikonisierte Röhrchen aus Glas überführt und 15min bei 2200g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die resultierenden Plättchensedimente wurden dreimal mit einer Pufferlösung gewaschen. Die Pufferlösung enthielt unter anderem humanes Albumin, um das synthetische Milieu an physiologische Verhältnisse anzugleichen und Heparin um einer Thrombinbildung vorzubeugen.

Zusätzlich wurde PGE<sub>1</sub> zugesetzt, was über eine Stimulation der Adenylatzyklase einen Anstieg der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration bewirkt und somit die Ruheform der Plättchen stabilisiert und einer eventuellen Plättchenaktivierung bei der Zentrifugation vorbeugt.

Zur Minimierung interindividueller Unterschiede wurde das PRP von 3 Spendern (Spender 1: 34 Jahre, männlich; Spender 2: 21 Jahre, weiblich; Spender 3: 32 Jahre, männlich) gepoolt. Nach dem Poolen wurde das PRP in 50ml Falcons (Nunc, Dänemark) abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Für die *in vitro* Versuche wurde es vorsichtig bei Raumtemperatur aufgetaut und in kleineren Aliquots (1-2ml) erneut eingefroren. Das bedeutet, daß für die *in vivo* Versuche das PRP nur einmal direkt für die Versuche aufgetaut wurde, während es für die *in-vitro* Versuche zweimal aufgetaut werden musste.

Als Kontrolle wurde *in vitro* zusätzlich Fresh Frozen Plasma (FFP) eingesetzt, das ebenso aus der Blutbank Düsseldorf stammte. Sofort nach Gewinnung des Plasmas durch Zentrifugation wurde es tiefgefroren. FFP unterscheidet sich von PRP durch das Fehlen von Thrombozyten und somit auch der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren. Es enthält aber alle anderen Substanzen, die in PRP auch vorliegen, wie beispielswei-

se Gerinnungsfaktoren, Faktoren der Fibrinolyse und des Komplementsystems, Albumine und Globuline. FFP, in anderen Studien auch als plättchenarmes Plasma (engl. Platelet poor plasma =PPP) bezeichnet, dient deshalb als wertvolle Kontrolle, mit der verifiziert werden kann, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf die in den Thrombozyten enthaltenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen sind.

Es wurde ebenfalls gepooltes FFP (3 Spender) verwendet.

Zur besseren Charakterisierung des PRP/FFPs wurde die Thrombozytenzahl, sowie der Gehalt der wichtigen Wachstumsfaktoren PDGF-AB und TGF- $\beta$ 1 bestimmt. Um die Wachstumsfaktoren freizusetzen wurden die Thrombozyten degranuliert, indem das PRP wie von Weibrich et al. 2002 vorgeschlagen eingefroren und wieder aufgetaut wurde (Weibrich et al. 2002).

### **2.3.1 PDGF-AB ELISA**

Für die Bestimmung von PDGF-AB wurde der Quantikine® Human PDGF-AB Immunoassay verwendet (DHD00B; R&D Systems, Minneapolis, USA). Dieser Test beruht auf dem Prinzip des quantitativen Sandwich Enzym Immunoassay.

Nach Zentrifugation der Proben bei 1000g für 15 Minuten wurden 10 $\mu$ l des Überstandes abgenommen und 1:50 mit Calibrator Diluent RD6-11 verdünnt.

Die Platten dieses Testverfahren sind bereits mit einem für PDGF-BB spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l des Verdünnungsmittel RD1X und von je 100  $\mu$ l der zu untersuchenden Proben und Standards, wird während der 3-stündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur alles verfügbare PDGF-AB an den immobilisierten Antikörper gebunden. Nach viermaligem Abwaschen der nicht gebundenen Substanzen mit Waschpuffer, wird die Platte gründlich ausgeklopft um alle Reste des Waschpuffers zu entfernen. Anschließend wird ein für PDGF-AA spezifischer, polyklonaler Antikörper, der mit einem Enzym (Meerrettich-Peroxidase) verbunden ist (200  $\mu$ l PDGF-AB Konjugat) hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abwaschen aller ungebundenen Antikörper-Enzymkomplexe, erfolgte die Zugabe von 200  $\mu$ l Substratlösung und 30-minütiger Inkubation bei Lichtausschluss, die zu einer Farbentwicklung führte, die im direkten Verhältnis zu der anfangs gebundenen PDGF-AB Menge steht. Nach 30 Minuten wird die Enzymreaktion mit 50  $\mu$ l Stopplösung (2 N Schwefelsäure) beendet und die optische Dichte mit dem

ELISA MRX Lesegerät (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 450/570 nm gemessen.

Als Standard wurde das im Kit enthaltene humane PDGF-AB in Konzentrationen von bis 31,2 pg/ml bis 2000 pg/ml verwendet.

### **2.3.2 TGF- $\beta$ 1 ELISA**

Auch für die Bestimmung von TGF- $\beta$ 1 wurde ein quantitativer Enzym Immunoassay der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA (Quantikine® Human TGF- $\beta$ 1 Immunoassay; DB100B) benutzt.

Die Proben wurden dazu ebenfalls für 15 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Um das in latenter Form vorliegende TGF- $\beta$ 1 zu aktivieren, wurden 40  $\mu$ l des Überstandes mit 20  $\mu$ l 1N Salzsäurelösung (HCl) versetzt, resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Probe durch Zugabe von 20  $\mu$ l HepesLösung (1,2 N NaOH/0,5 M Hepes) neutralisiert. Bevor der eigentliche Assay beginnt wird die aktivierte Probe außerdem 1:20 mit dem Calibrator Diluent RD5-26 verdünnt, so dass eine endgültige Verdünnung der Ausgangsmenge um den Faktor 40 vorliegt.

In die, bereits mit Antikörper (spezifisch für TGF- $\beta$ 1) beschichtete Platte werden je 50  $\mu$ l des Verdünnungsmittels RD1-73 und je 50  $\mu$ l der Standardlösungen, bzw. der aktivierten Proben pipettiert. Nach Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur wird die Platte vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend, zur Entfernung aller Waschpufferreste ausgeklopft. Anschließend werden je 100  $\mu$ l des TGF- $\beta$ 1- Konjugats, also des für TGF-  $\beta$ 1 spezifischen, an das Enzym gebundenen Antikörper zugegeben und nochmals für zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem gründlichem Waschen werden 100  $\mu$ l Substratlösung zugesetzt und für 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Stopplösungen, wurde die Platte im ELISA MRX Lesegerät (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 450/570 nm gemessen.

Die Standardreihe wurde mit dem beigefügten humanen TGF- $\beta$ 1 in einer Verdünnungsreihe von 31,2 pg/ml bis 1000 pg/ml hergestellt.

## 2.4 In vitro Versuche mit PRP

Um die Effekte von PRP *in vivo* besser nachvollziehen zu können, wurden die Auswirkungen von PRP *in vitro*, sowohl auf das Proliferationsverhalten, als auch auf die Osteogenese von ovinen ASCs untersucht.

Dazu wurden die kryokonservierten Zellen (P3) der Schafe, bei denen auch *in vivo* zusätzlich PRP eingesetzt wurde, aufgetaut.

### 2.4.1 Untersuchung der Osteogenese und Proliferation unter dem Einfluss von PRP/FFP

Für die Untersuchung des Einflusses von PRP auf die Osteogenese wurde das beschriebene osteogene Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 und 10%) von aktiviertem PRP bzw. FFP versetzt. Die Aktivierung des eingefrorenen PRPs erfolgte zum einen durch eine 30 minütige Inkubation im 37°C warmen Wasserbad, und zum anderen durch eine 10%ige- Kalziumchloridlösung mit Thrombin (aus dem Fibrinkleber-Kit Tissucol Duo S 1ml Immuno von Baxter, Unterschleißheim) in der Konzentration von 20 IE Thrombin/ml CaCl. Die zusätzliche Aktivierung mit der Thrombin-Kalziumlösung erfolgte in Anlehnung an die *in vivo* Bedingungen, da dort die dadurch entstehende zähflüssige Konsistenz die Handhabung erleichterte.

Die unterschiedlich supplementierten Medien wurden jeweils einen Tag vor Gebrauch frisch zubereitet. Dazu wurde die Thrombin-Calciumlösung im Verhältnis 1:8 mit der benötigten Menge PRP vermischt, so dass 2,2 IE pro ml PRP eingesetzt wurden. Nach kurzem Abwarten wurde das schon etwas zäh gewordene Gel dem entsprechenden Medium zugegeben. Durch mehrmaliges Resuspendieren entstand im Medium ein Thrombozytenaggregat, dem nun über Nacht die Möglichkeit gegeben wurde Wachstumsfaktoren an das Medium abzugeben.

Als Positivkontrolle diente osteogenes Medium (10%FCS), als Negativkontrolle Verfallie-Medium inklusive Wachstumsfaktoren.

Die Zellen wurden in 24-well Platten (35.000 Zellen/well) ausgesät und für 21 Tage kultiviert. Zur Beurteilung der Osteogenese wurde an Tag 1,7,14 und 21 jeweils eine Alizarinfärbung durchgeführt und die Gesamtproteinkonzentration aus den Lysaten bestimmt (2.2.3.1; 2.2.3.2; 2.2.3.4).

Die Gesamtproteinkonzentration wurde auch herangezogen um das Proliferationsverhalten der Zellen in den unterschiedlich supplementierten osteogenen Medien zu beurteilen.

Insgesamt wurden also folgende Gruppen untersucht:

Medium	Untersuchungen
Osteogenes Medium	Alizarinfärbung, Bestimmung der Gesamtproteinmenge aus den Lysaten an Tag 1, 7, 14 und 21
Osteogenes Medium + 1%PRP	
Osteogenes Medium + 10%PRP	
Osteogenes Medium + 1%FFP	
Osteogenes Medium + 10%FFP	
Verfallie-Medium (mit PDGF und EGF)	

Tab. 2: Gruppeneinteilung für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens

## 2.5 Tierversuch

Das Tierexperiment fand im AO Forschungsinstitut in Davos statt und wurde durch das Amt für Lebensmittelsicherheit und Tiergesundheit Graubünden, Chur genehmigt (Tierversuchsbewilligungsnummer: GR26/2006).

Ziel des Tierversuchs war es zum Einen herauszufinden, ob der Einsatz von Stammzellen aus Fettgewebe bei der Heilung von langstreckigen, gewichtstragenden Knochendefekten gleichwertig ist zum Einsatz von Knochenmarksstammzellen. Zum Anderen interessierte uns ob der Zusatz von plättchenreichem Plasma die Knochenregeneration verbessern kann.

Für die Beantwortung der genannten Fragestellungen wurde ein Modell des Knochendefektes kritischer Größe an der Schafstibia gewählt.

Entsprechend der unterschiedlichen Defektfüllung wurden 4 Gruppen gebildet. Bei den ersten beiden, in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gruppen A und B wurde zur Füllung des Tibiadefektes mineralisiertes Kollagen mit autologen ASC, mit oder ohne PRP verwendet.

Im Rahmen anderer Doktorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Jana Vohrer und Nina Siebert) wurde mineralisiertes Kollagen mit humanen MSC und mineralisiertes Kollagen alleine (Negativkontrolle) zur Defektfüllung verwendet und konnten für diese Studie als Vergleichsgruppen herangezogen werden.

Die Tab. 3 zeigt die Anzahl der Versuchstiere, deren Histologien, CT- und Röntgenbilder in die Auswertung miteinbezogen werden konnten, da aufgrund von vorzeitigen Tötungen nicht alle Versuchstiere die Standzeit von 6 Monaten erreicht haben.

	Defektfüllung mit:	Anzahl der operierten Tiere:	Anzahl der Tiere mit 6-monatiger Standzeit
Gruppe A	Mineralisiertem Kollagen mit autologen ASC	7	5
Gruppe B	Mineralisiertem Kollagen mit autologen ASC und dem Zusatz von PRP	5	5
Vergleichsgruppe C	Mineralisiertem Kollagen mit autologen BMSC	5	5
Vergleichsgruppe D	Mineralisiertem Kollagen ohne Zellen	5	5

Tab. 3: Gruppeneinteilung

### 2.5.1 Versuchstiere

Es wurden insgesamt 22 weibliche, nicht tragende Schweizer Alpenschafe verwendet. Die Tiere waren ca. 3 Jahre alt, wogen durchschnittlich 65 kg und stammten aus einheitlicher Zucht des Herrn Urban Lanker, Lengmatta, CH-7276 Davos Frauenkirch. Bei der Auswahl der Tiere wurde auf ähnliche Größenverhältnisse der Tibia geachtet. Alle Tiere wurden routinemäßig alle 4 Monate mit 0,2 mg/kg Moxidectin (Cydectin®, Wyeth Pharmaceuticals, Münster, D) p.o. und 0,2 mg/kg Doramectin (Dectomax®, Pfizer, Karlsruhe) s.c. entwurmt. Die Unterbringung der Tiere erfolgte im Tierstall des AO Forschungsinstitutes, Clavadelerstraße 8, CH-7270 Davos Platz.

### 2.5.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden in Einzelboxen mit visuellen, olfaktorischen und akustischen Kontaktmöglichkeiten zu ihren Artgenossen gehalten. Der Zugang zu Wasser war uneingeschränkt möglich. Die Tiere erhielten Stroh ad libitum, Heu, Kraft- und Mineralfutter einmal täglich. Außerdem wurden ihr Allgemeinzustand 2-3-mal täglich von einer erfahrenen Person überprüft.

### 2.5.3 Fettentnahme

Von insgesamt 12 Schafen wurden Fettgewebeproben (5-7g) für die Isolierung mesenchymaler Stammzellen entnommen. Das Fettgewebe wurde bei den Versuchstieren unter Lokalanästhesie (2-5ml Lidocain s.c; Lidocain 2%, Streuli&Co AG, Uznach, Schweiz) und Sedation entnommen. Die Sedation erfolgte mit Ketamin (Ketasol-100® Gräub AG, Bern, Schweiz) in einer Dosierung von 2 mg/kg i.m. und Detomidin (Domo-sedan®, Pfizer, Karlsruhe, D) mit 0,05mg/kg ebenfalls intramuskulär. Zur analgetischen Abdeckung wurde Fentanyl (Sintentyl®, Sintetica, Mendrisio, Schweiz) intravenös als Dauertropfinfusion verabreicht (ca. 5-10 µg/kg i.v.). Die Entnahmestelle für das subkutane Fett befand sich paravertebral auf Höhe der Hungergrube. Der entsprechende Bereich wurde geschoren, chirurgisch gereinigt und steril abgedeckt. Nach einem Hautschnitt von 3-5 cm wurde das subkutane Fett freipräpariert und mit Hilfe von Schere und Skalpell entnommen und direkt in die entsprechend beschrifteten Falcons mit PBS mit 20 mg/ml Bovinem Serum Albumin (BSA) und 1% Penicillin/Streptomycin überführt.

Der Transport nach Heidelberg erfolgte in diesen Falcons gewärmt auf 37°C.

### 2.5.4 Besiedelung der Konstrukte

Der Zellträger aus mineralisiertem Kollagen (Healos®, DePuy, USA) wurde mittels Aufpipettieren auf die trockene Membran mit  $2 \times 10^7$  Zellen besiedelt. Das Gesamtvolumen wurde an die Defektgröße angepasst und betrug  $5,3 \text{ cm}^3$ . Nach Abwarten der Adhärenz wurde das Konstrukt mit Medium bedeckt und über Nacht in den Brutschrank gestellt, und innerhalb der nächsten 2 Tage implantiert.

### 2.5.5 Operationsdurchführung

#### 2.5.5.1 Narkose und Analgesie

Präoperativ wurden die Tiere 24-36 Stunden bei freiem Zugang zu Wasser gefastet. Die Prämedikation erfolgte mit 0,2 mg/kg Diazepam (Valium®, Roche Diagnostics, Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) i.v. und 0,06 mg/kg Butorphanol (Morphasol®, Gräub, Bern, Schweiz).

Die Narkose wurde mit 4-8 mg/kg Thiopenhal (Pentothal®, Abott AG, Baar, Schweiz) i.v. unter Kontrolle der Reflexe eingeleitet, bis die Intubationsfähigkeit erreicht wurde. Das Tier wurde im sedierten Zustand in Rechtsseitenlage auf den Tisch verbracht und endotracheal intubiert. Zur Vermeidung einer Pansentympanie wurde eine Magensonde platziert. Das Beatmungsgerät (Stephan Respirator ABV Universal) wurde auf kontrollierte Atmung mit einem Atemzugsvolumen von 10ml/kg KGW und einer Atemfrequenz von 16 Atemzügen je Minute eingestellt und an den Tubus angeschlossen. Die Narkoseerhaltung erfolgte durch 1,5 - 3% Isofluran (Abott AG, Baar, Schweiz) in Sauerstoff. Zusätzlich wurde eine Spinalanästhesie mit 0,05 mg/kg Xylazin (Xylazin Streuli ad us vet.; Streuli&Co.AG, Uznach, Schweiz) oder alternativ eine kombinierte N. femoralis- und N. ischiadicus-Blockade durchgeführt.

Zur Narkoseüberwachung wurde ein EKG abgeleitet, ein Pulsoxymeter angebracht, der arterielle Blutdruck und die innere Körpertemperatur gemessen und der Kohlenstoffdioxidgehalt der Atemluft mittels Kapnographie bestimmt. Die perioperative intravenöse Volumentherapie erfolgte mit 10 ml/kg/h Ringerlactat (Braun, Melsungen, D).

Vor Zugang zum Operationssaal erfolgte die Schur, chirurgische Reinigung und Desinfektion der rechten Hinterextremität.

Zur Ausleitung der Narkose wurde die Isofluranzufuhr abgestellt und die Tiere von der Beatmung entwöhnt und nach Erlangen der Schutzreflexe extubiert.

Zur postoperativen Analgesie erhielten die Schafe kurz vor Ende der Operation 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, Karlsruhe) i.v., was auch für weitere 5 Tage einmal täglich subkutan appliziert wurde. Außerdem wurde den Tieren zur weiteren analgetischen Abdeckung für 3 Tage dreimal täglich 0,01 mg/kg Buprenorphin (Temgesic®, Essex, München) i.m. verabreicht

### **2.5.5.2 Operationstechnik**

Nach Fixierung der Tiere auf dem Operationstisch, Desinfektion und Abdeckung des Operationsfeldes erfolgte medial ein ca. 10 cm langer Hautschnitt über dem Tibiaschaft. Nach Freipräparieren des Tibiaschaftes wurde medial eine winkelstabile Carbonplatte (Snake-Plate, icotec, Altsstätten, Schweiz) angepasst und anschließend wieder entfernt. 7 cm proximal des Malleolus medialis wurde vorübergehend ein 2,8 cm langer Metallblock mit einer Schraube befestigt.



Abb. 4: Metallblock

Durch eine Osteotomie mit einer oszillierenden Säge an dem proximalen und distalen Ende des Metallblocks, entsteht insgesamt durch den zusätzlich beim Sägen entstandenen Materialverlust eine Defektgröße von 3 cm. Das Periost wurde über die gesamte Defektlänge sorgfältig entfernt und zusätzlich am distalen und proximalen Hauptfragment über die Länge von 1 mm abgeschoben.

Nach Schaffung des Defekts wurde die Carbonplatte in die vorgebohrten Bohrlöcher angebracht. Zur zusätzlichen Stabilisierung des Defektes wurde von anterior eine 4,5 mm LCP (Locking Compression Plate, Synthes, Solothurn, Schweiz) in winkelstabiler Technik angebracht. Der entstandene Defekt wurde je nach Versuchsgruppe unterschiedlich aufgefüllt (Tab. 4). Anschließend erfolgte der schichtweise Wundverschluss und die Anlage eines sterilen Verbandes.



Abb. 5: OP-Ansicht: mit mineralisiertem Kollagen und Zellen gefüllter Defekt

Gruppe A	Mineralisiertes Kollagen, besiedelt mit $2 \times 10^7$ ASC (1-2 Tage vor OP)
Gruppe B	Mineralisiertes Kollagen, besiedelt mit $2 \times 10^7$ ASC (1-2 Tage vor OP) Zugabe von 40 ml PRP, aktiviert mit 5ml der unter 2.4.1 beschriebenen Thrombin-Kalziumlösung
Gruppe C	Mineralisiertes Kollagen, besiedelt mit $2 \times 10^7$ BMSC (1-2 Tage vor OP)
Gruppe D	Mineralisiertes Kollagen

Tab. 4: Defektfüllung entsprechend der Versuchsgruppe

### 2.5.6 Postoperative Nachbehandlung und Monitoring

Nach der Narkoseausleitung wurden die Tiere in Einzelboxen verbracht und in Unterstützungsurte gehängt. Die postoperative Analgesie erfolgte nach dem unter 2.5.5.1 beschriebenen Schema für 5 Tage. Etwa 8 bis 12 Stunden nach der Operation wur-

den die Tiere langsam angefüttert. Die Operationswunde wurde täglich kontrolliert und nach 7 Tagen der Verband entfernt.



Abb. 6: Schaf in Unterstützungsgurt

Die Tiere standen für 10 Wochen in den genannten Unterstützungsgurt. Dieser lässt zwar die volle Belastung der operierten Gliedmaße zu, verhindert jedoch ein Hinlegen und Aufstehen und die damit einhergehende erhöhte Belastung der Hintergliedmaße und kann so ein vorzeitiges Lockern der Implantate vermeiden.

Eine prophylaktische Gabe von Antibiotika erfolgte nicht.

In den ersten Wochen wurden die Tiere zweimal täglich, danach einmal täglich allgemein untersucht.

### **2.5.7 Radiologische Kontrollen**

Die erste Röntgenaufnahme erfolgte direkt postoperativ zur Kontrolle der korrekten Platzierung der Platten. Die weiteren radiologischen Kontrollen wurden alle 2 Wochen und post mortem durchgeführt. Hierzu wurde ein digitales Röntgengerät vom Typ Philips, Trauma Diagnost benutzt. Die Tiere wurden dazu mit Detomidin (0,03 mg/kg, i.m.; Domosedan®, Pfizer, Karlsruhe, D) sediert und von einer Hilfsperson fixiert. Die Rönt-

genbilder wurden in zwei Ebenen angefertigt: anterior/posterior (48 kV/15mAs) und laterolateral (53 kV/ 32 mAS), wozu sich die Schafe in linker Seitenlage befanden.

### **2.5.8 Polychrome Sequenzmarkierung**

Um Aussagen über den Zeitpunkt der stattgehabten Knochenneubildung treffen zu können wurden bestimmte Fluoreszenzmarker verwendet.

Den Tieren wurde dazu in der achten Woche Calceingrün (10 mg/kg s.c.; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) und in der zehnten Woche Xylenol Orange (90 mg/kg s.c.; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) subkutan injiziert. Die Farbstoffe werden in den, zum Zeitpunkt der Verabreichung, neu gebildeten Knochen eingebaut und können nach Abschluss der Versuche im histologischen Präparat unter Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden. Die zweimalige Injektion führt zu einer Mehrfachmarkierung, wodurch sich der zeitliche Verlauf besser darstellen lässt.

### **2.5.9 Versuchsabschluss (Euthanasie)**

Nach Ablauf von 24 Wochen wurden die Tiere durch eine intravenöse Injektion von 60 mg/kg Pentobarbital (Vetnarcol®, Veterinaria, Zürich, Schweiz) getötet. Anschließend wurden beide Hintergliedmaßen im Kniegelenk exartikuliert und die Tibia präpariert.

## 2.6 Auswertung der Röntgenbilder

Die Evaluation der Röntgenbilder erfolgte anhand einer neuartigen Methode, die sich durch ein geringe Intra- und Interobserver-Varibilität auszeichnet (Schönberger T et al. 2007). Dazu wurde die laterolateralen Aufnahmen mithilfe mit einer frei zugänglichen Computersoftware namens GIMP (GNU General Public Licence) ausgewertet. Mit dieser Software ist erstmals eine objektive Quantifizierung der Knochenneubildung möglich.

Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen (Abb. 7):

1. Rotation des Röntgenbildes, so dass der Defekt genau horizontal ausgerichtet ist
2. Zur Definition der „Region of Interest“ (ROI) wird ein Rechteck mit einer definierten Größe (303 x 303 Pixel) in den Defektbereich gelegt.
3. Definition des Pixelbereichs der dem Bereich der Knochenneubildung (Ossifikationsbereich) entspricht: Mithilfe der Farbpipette werden drei Einzelmessungen von Pixelwerten im bindegewebigen Bereich durchgeführt und daraus einen Durchschnittswert ermittelt. Durch Addition eines Puffers von 10% zu diesem Durchschnittswert erhält man die untere Grenze des Ossifikationsbereichs. Als obere Grenze werden dementsprechend die Pixelwerte der Kortikalis bestimmt. Wichtig dabei ist, dass die Werte der Osteosyntheseplatte außerhalb des definierten Bereichs liegen, so dass keine Artefakte durch die Platte entstehen. Für eine bessere und einfachere Evaluation der Auswertungen wurde der gesamte Ossifikationsbereich in drei gleiche Teile unterteilt und als beginnende, gute und sehr gute Ossifikation bezeichnet.
4. Bestimmung der Pixelwerte der drei Bereiche im Defekt mithilfe der Histogrammfunktion (Abb. 8)

Für die statistische Auswertung wurden die Bereiche der guten und sehr guten Ossifikation zusammengefasst und als prozentualen Anteil des neu gebildeten Knochens am Defektbereich erfasst.

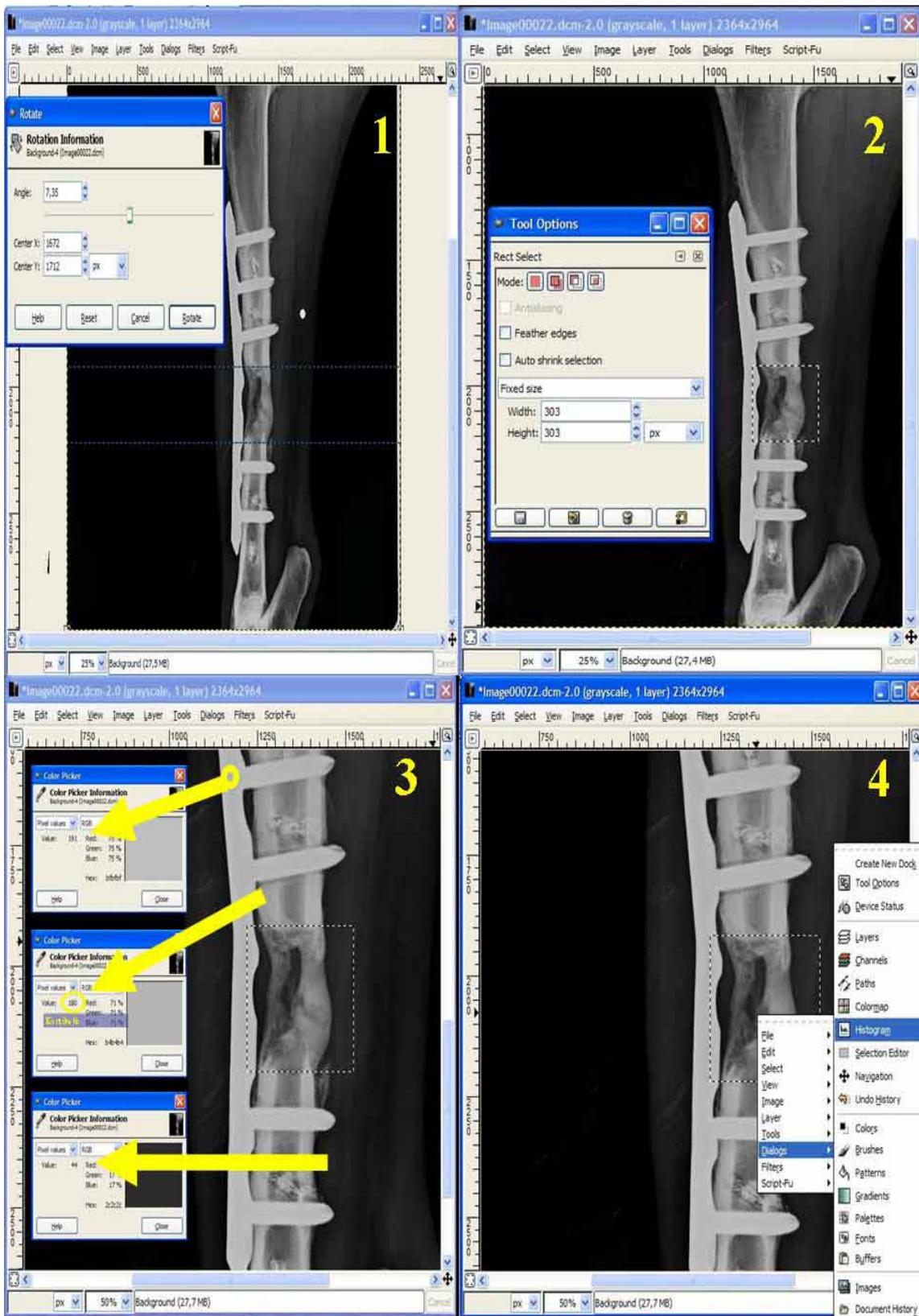


Abb. 7: Schrittweises Vorgehen zur Auswertung der Röntgenbilder

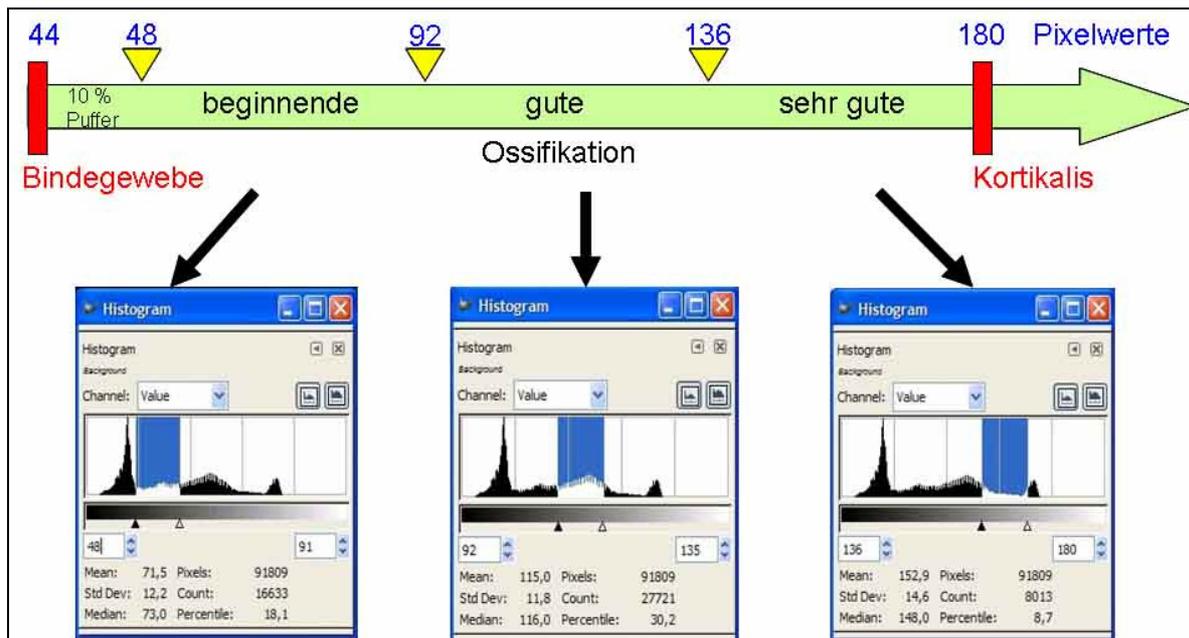


Abb. 8: Definition der Pixelbereiche für beginnende, gute und sehr gute Ossifikation, sowie Darstellung der drei Bereiche im Histogramm

## 2.7 Histologie

Für die histologische Auswertung wurden die Proben in den Kunststoff Methylmethacrylat (MMA; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) eingebettet. Die Einbettung, genauso wie die Giemsa-Eosin-Färbung, wurde im AO Forschungsinstitut in Davos durchgeführt.

Die Fixierung der Proben erfolgte in 70% Methanol. Nach ausreichender Fixierung, in der Regel 2 bis 4 Wochen, wurden die Proben in 70% Ethanol umgesetzt und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) entwässert. Als Intermedium wurde Xylol (Siegfried CMS AG, Zofingen, Schweiz) verwendet. Das Medium für die Einbettung (MMA) wird in drei Stufen mit einem zunehmenden Anteil eines Katalysators (Benzoyl Peroxid, Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz) eingesetzt. Die erste Stufe besteht aus purem MMA und die Inkubation erfolgt für 1-3 Tage. Für die zweite Stufe werden 100 ml MMA mit 2 g Benzoyl Peroxid versetzt und die Proben bei 4°C einige Tage je nach Größe eingebettet. Als letzte Stufe der Einbettung werden 100 ml MMA mit 4 g Benzoyl Peroxid versetzt und zusätzlich 20 ml Weichmacher (Dibutyl Phthalat; Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz) hinzugegeben. Die Probe verbleibt für mehrere Tage bei 4°C in dieser Lösung, wird anschließend zur Polymerisation in ein 20°C warmes Wasserbad überführt und dann zur vollständigen Aushärtung des Kunststoffs in den Ofen verbracht.

Nach Polymerisation des MMA wurden die Proben mit einem Sägemikrotom (Leica SP 1600) longitudinal geschnitten. Proximal und distal des Defektes waren jeweils 2-3cm des ursprünglichen Knochens mit eingeschlossen. Die initiale Schnittdicke betrug 200 µm, bei einem Sägeverlust von 300µm.

Für die Fluoreszenzauswertung und für die Giemsa-Eosin Färbung wurde jeweils ein mittig gelegener Schnitt mit einem Sekundenkleber (Cyanolit, 3M AG, Rüslikon, CH) auf einen Plastikobjektträger geklebt.

Anschließend wurden die aufgeklebten Schnitte mit dem Exakt- Mikroschleifsystem Typ 400 CS (Exakt Vertriebs GMBH, Norderstedt, D) mit Schleifpapieren verschiedener Korngröße auf eine Dicke von ca. 100 µm heruntergeschliffen und poliert.

### **2.7.1 Giemsa-Eosin Färbung**

Diese Färbung gibt einen Überblick für die morphologische Analyse von nicht entkalkifizierten geschliffenen Schnitten. Mit dieser Färbung wird Bindegewebe und Muskel bläulich dargestellt, nichtmineralisierte Knochensubstanz leuchtend blau, Knochen und mineralisierte Strukturen rot und Zellkerne dunkelblau bis schwarz.

Zur Aufrauung der Oberfläche werden die Schnitte 30 Sekunden in einprozentiger Ameisensäure (hergestellt aus 1,2 ml 85% Ameisensäure (Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz) und 98,8 ml Aqua bidest.) geschwenkt, und danach unter fließendem Wasser abgespült. Durch die Ameisensäure werden die Schnitte aufgeraut, wodurch das Eindringen der Färberlösung ermöglicht wird. Vor Durchführung der Giemsa-Färbung werden die Objektträger geblottet, d.h. zwischen zwei Fließpapierlagen getrocknet. Als Färberlösung wurde eine 15%-ige Giemsa-Lösung verwendet. Diese wurde aus 15 ml Giemsa-Stammlösung (Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz) und 85 ml Aqua bidest. hergestellt und nach jedem zweitem Färbegang frisch angesetzt. Um den Färbegang zu beschleunigen wurde die Giemsa-Lösung in der Mikrowelle bei 700 Watt auf 57°C erhitzt. Die Präparate wurden nun für 10 bis 60 Minuten in der Färberlösung belassen. Während des Färbegangs erfolgten mehrere Kontrollen der Färbung unter dem Lichtmikroskop, nach kurzem Spülen und Blotten des Objektträgers. Nach Erreichen einer ausreichenden und gleichmäßigen Färbung folgte die Eosin-Färbung. Dazu wurde für die einprozentige Stammlösung 1g Eosin Yellowish (Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz) in 100 ml Aqua bidest. gelöst. Zur Herstellung der endgültigen Färberlösung wurden zu 100 ml der einprozentigen Eosin-Stammlösung 15 Tropfen konzen-

trierte Essigsäure (Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz) zugegeben. Für die Färbung wurden die Präparate für ein bis fünf Minuten in die Eosin-Lösung getaucht und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe differenziert (kurzes Eintauchen in 70% Ethanol, 10 Sekunden Schwenken in 96% Ethanol und abschließend 2 Minuten in absolutem Ethanol). Mit der anschließenden Trocknung der Präparate war der Färbeprozess beendet.

### 2.7.2 Auswertung der histologischen Schnitte

Die Beurteilung der GE gefärbten und fluoreszenzmarkierten Schnitte erfolgte an einem Axioplan Mikroskop (Imaging 2, Carl Zeiss, Oberkochen, D). Die Digitalisierung der Aufnahmen wurde mit der Digitalkamera Zeiss AxioCam (Carl Zeiss, Oberkochen, D) durchgeführt und in die Software Axiovision, Version 3.1 (Carl Zeiss, Oberkochen, D) eingespielt und kalibriert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden folgende Filterkombinationen angewendet:

	Calceingrün	Xylenolorange
Anregungsfilter	BP 450-490 nm	BP 546 nm
Farbteiler	FT 510 nm	FT 580 nm
Sperrfilter	BP 515-565 nm	LP 590 nm
Zeiss #	10	25

Tab. 5: Filterkombinationen für Fluoreszenzmikroskopie

Zu allererst erfolgte dann eine beschreibende Analyse der Übersichtsscans, bei der vor allem auf die Verknöcherung im Allgemeinen, sowie deren Lokalisation geachtet wurde. Die stärker vergrößerten Schnitte wurden besonders auf Zeichen der Entzündung oder Abstoßungsreaktionen geprüft.

Die quantitative Analyse erfolgte anhand zweier Scoresysteme, die für die Beurteilung experimenteller Knochendefekte etabliert und gängig sind. Außerdem wurde eine Analyse mithilfe der, bereits bei der Auswertung der Röntgenbilder eingesetzten, Bildbearbeitungssoftware GIMP durchgeführt. Dabei wurde die Fläche des neu gebildeten Knochens bestimmt und in Bezug zur Gesamtfläche des Knochendefektes gesetzt.

### **Auswertung modifiziert nach Mosheiff et al. (2003)**

Vor Beginn der eigentlichen Analyse wurde eine Maske erstellt, die über die Bilder gelegt werden kann und die 9 gleichgroße, quadratische Felder (25 mm<sup>2</sup>) umfasst. Die 9 Felder sind so angeordnet, dass sie insgesamt ein großes Quadrat ergeben (d.h. 3 proximal, 3 distal, und 3 mittig)

Zur Auswertung wurde diese Maske so über die eingescannten Histologien gelegt dass das große Quadrat genau im Knochendefekt zu liegen kommt. In jedem der 9 Quadrate wurde nun die Verknöcherung beurteilt und dementsprechend Punkte von 0 (keine Verknöcherung) bis 2 (gute Verknöcherung) vergeben. Diese für jedes Feld einzeln analysierten Werte wurden zu einer repräsentativen Gesamtverknöcherung aufaddiert.

### **Auswertung modifiziert nach Werntz et al. (1996)**

Bei diesem Scoresystem werden 3 verschiedene Rubriken beurteilt. Zum Einen wird die Knochenbildung (bone formation) beurteilt und in eine Punkteskala von 0-5 eingestuft. Die anderen beiden Rubriken sind „Union“ und „Remodelling“, bei denen jeweils 0-4 Punkte verteilt werden. Durch Addition der Punktwerte dieser Rubriken erhält man den Gesamtscore.

## **2.8 Mikro-Computertomographie**

Mit der Mikro-Computertomographie ( $\mu$ -CT) steht ein Verfahren zur Verfügung, das sowohl eine zwei-, als auch dreidimensionale, qualitative und quantitative Strukturanalyse von Knochenproben möglich macht (Feldkamp et al. 1989; Ruegsegger et al. 1996) (Ruegsegger et al. 1996). Die zerstörungsfreie Untersuchung ermöglicht die weitere Verwendung der Proben für zusätzliche Untersuchungen, wie z. B. die Histologie.

Nach Euthanasie wurde die operierte Tibia jedes Tieres exartikuliert und noch am selben Tag computertomographisch erfasst. Verwendet wurde ein CT System der Firma Scanco Medical (X-treme CT, Scanco Medical AG, Bassersdorf, Schweiz). Es enthält eine Mikrofokus-Röntgenröhre mit einer Fokusgröße von 70  $\mu$ m. Die Röntgenröhre dieses Computertomographen arbeitet mit einer Maximalenenergie (Beschleunigungsspannung) von 60 kVp, einer durchschnittlicher Energie von 40keV und einer Stromstärke von 1mA. Der hochauflösende Detektor besitzt 3072 x 255 Detektorelemente

und einen isotropischen Auflösungsbereich zwischen 41 und 246  $\mu\text{m}$  mit einem Sichtfeld von 125 mm. Die 2D Bildmatrix reicht bis zu 3072 x 3072 Pixel.

In dieser Arbeit wurde eine isotropische Auflösung, von 82  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Tibia wurde in eine zylindrische Haltevorrichtung plaziert, so dass die mechanische Achse des zu untersuchenden Knochens senkrecht zu den Röntgenstrahlen und parallel zur Probenhalterung steht. Die zu messende Länge wurde anhand einer Referenzlinie festgelegt. Das zu untersuchende Gebiet wurde folgendermaßen definiert:

- Suchen des letzten Schnittes, bei dem das erste proximal über dem Defekt liegende Schraubenloch zu sehen ist.
- Start der Evaluation 5mm, das heißt 61 Schnitte distal des oben festgelegten Schnittes
- Evaluation von 500 Schnitten, was einer Länge von ca. 40mm entspricht
- Von dem letzten zu evaluierenden Schnitt bis zum Anfang des nächsten distal liegenden Schraubenloch liegen ebenfalls ca. 5mm

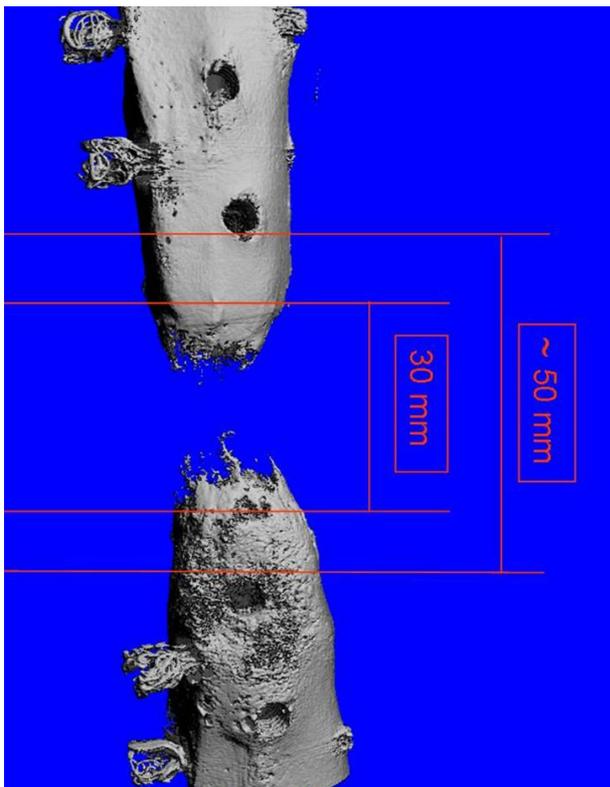


Abb. 9: Festlegung des zu evaluierenden Bereichs

Die Messung jeder Probe dauert ungefähr 60 Minuten.

Die Rohdaten wurden auf der Festplatte des Computers gespeichert und die Rekonstruktion der Schnitte startet automatisch.

Bestimmt wurde der Knochenvolumenanteil, die so genannte Bone Volume Fraction (BV/TV). Das ist das Verhältnis des Volumens des trabekulären Knochens (bone volume = BV) zum gesamten Volumen (total volume = TV), innerhalb der untersuchten Probe. Diese Definition ist von der American Society of Mineral Research anerkannt (Parfitt et al. 1987). Der Knochenvolumenanteil wird in Prozent angegeben.

### **2.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse wurde mit der Software SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Science) durchgeführt. Aufgrund der Probenanzahl wurden Median und Mittelwerte, sowie Standardabweichung bestimmt.

Für die osteogene Auswertung wurde der Wilcoxon Test verwendet, da es sich um verbundene Stichproben handelte.

Aufgrund multipler Testungen wurde bei der osteogenen Auswertung das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,01$  hochgesetzt; Werte von  $p \leq 0,05$  wurden als Tendenz angesehen. Dabei wurde bei sehr kleinen Fallzahlen ( $n=5$ ) die exakte Signifikanz, bei etwas größeren Fallzahlen ( $n=12$ ) die asymptotische Signifikanz betrachtet.

Die Ergebnisse der radiologischen und histologischen Auswertung wurden zur Erkennung von Signifikanzen mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant angesehen. Bei Erreichen des Signifikanzniveaus wurde im Anschluss ein post-Hoc Test nach Tukey durchgeführt, der jeweils zwei Gruppen miteinander verglich. Bei der Analyse der histologischen Auswertung erfolgte dieses Vorgehen streng getrennt für die verschiedenen Auswertungsmethoden. Außerdem wurde bei den Score-Methoden nach Mosheiff und Werntz (Werntz et al. 1996; Mosheiff et al. 2003) sowohl jeder einzelne Parameter als auch die Gesamtsumme getrennt untersucht.

Um den radiologischen Verlauf innerhalb einer Gruppe zu beurteilen wurde zusätzlich für jede Versuchsgruppe getrennt ein gepaarter t-Test berechnet. Dazu wurde zum Einen die Verknöcherung zu einem bestimmten Zeitpunkt x mit der postoperativen „Verknöcherung“ verglichen. Zum Anderen wurde der Zuwachs in den einzelnen 2-Wochen-Intervallen statistisch untersucht, indem jeweils der Zeitpunkt x mit dem Zeitpunkt x + 2 Wochen verglichen wurde. Bei beiden Verlaufsuntersuchungen wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  gesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zellisolation und Expansion

Die Isolation fibroblastenähnlicher Zellen aus ovinem Fettgewebe konnte durch minimale Veränderungen der bestehenden Protokolle erfolgreich etabliert werden.

Bereits ein bis drei Tage nach Isolation und Aussaat waren lichtmikroskopisch vereinzelt fibroblastenähnliche Zellen zu erkennen. Nach etwa 5-10 Tagen haben sich die Zellen an einigen Stellen der Zellkulturflasche zu einem konfluenten Zellrasen verdichtet, so dass sie durch eine Passagierung wieder vereinzelt werden mussten. In anderen Bereichen war der Zellrasen noch weniger dicht. Diese Ungleichverteilung war in den folgenden Passagen nicht mehr zu beobachten, es zeigte sich dann ein gleichmäßig dichter Zellrasen.

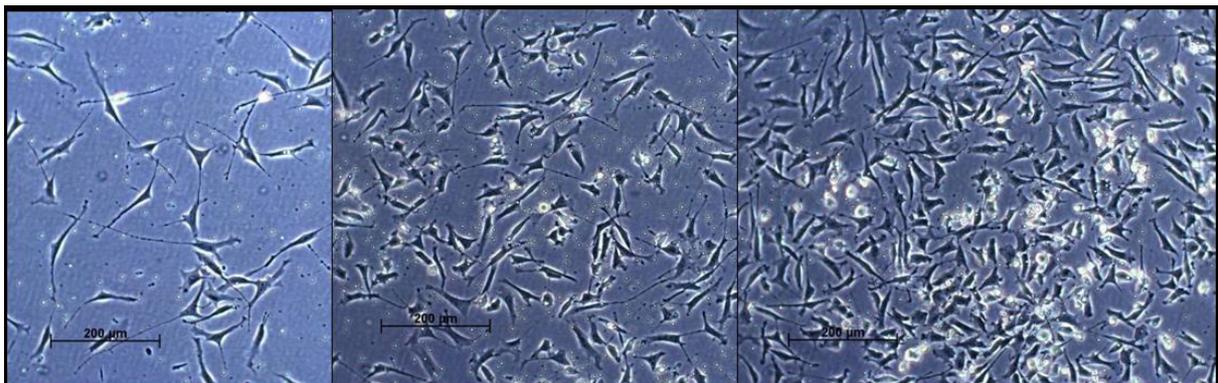


Abb. 10: Tag 6 nach Isolation; verschieden dicht besiedelte Bereiche der Zellkulturflasche

Im Aussehen und im Proliferationsverhalten konnten je nach Spender geringe Unterschiede festgestellt werden. Insgesamt zeigten die Zellen aber ein gutes Proliferationsverhalten. Die schnell wachsenden Zellen wiesen ein kompaktes, spindelförmiges Erscheinungsbild auf (Abb. 10).

Die Populationsverdopplung pro 24 Stunden lag für die untersuchten Spender zwischen 0,57 und 2,55. Im Gesamtdurchschnitt erfolgten 1,23 Populationsverdopplungen/24h. Abb. 11 zeigt die durchschnittlichen Populationsverdopplungen nach den einzelnen Passagen.

## Ergebnisse

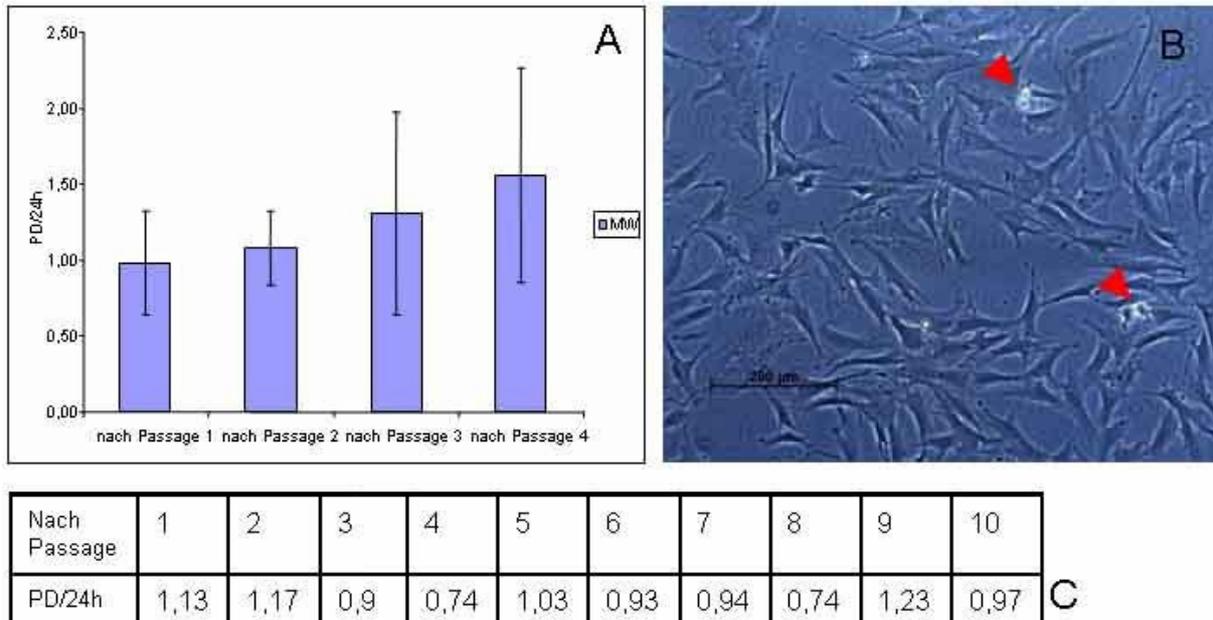


Abb. 11: Mittelwerte der Populationsverdopplungen/24h von Schaf 1-12 nach den Passagen 1-4 (A); mikroskopische Ansicht von Zellen in Passage 22 (B); sowie exemplarische Darstellung der Populationsverdopplungsraten bis zur Passage 10 von Schaf A1 (C)

Exemplarisch konnte für ein Schaf (A1) gezeigt werden, dass die Populationsverdopplungsrate bis zu Passage 10 sich ebenfalls in dem für die ersten vier Passagen ermittelten Bereich befand. In Vorversuchen konnten die Zellen aus dem Fett von Schlachtschafen sogar über 22 Passagen expandiert werden. Ein Teil der Zellen zeigte dann zwar den altersbedingten breiteren, ausgefransten Phänotyp, andererseits waren aber auch noch sich teilende, also proliferierende Zellen sichtbar (roter Pfeil).

## 3.2 In-Vitro Differenzierungspotential

### 3.2.1 Adipogene Differenzierung

Eine Induktion der adipogenen Differenzierung konnte für alle Schafe nachgewiesen werden. Es war jedoch zu beobachten, dass die Ausprägung der Adipogenese in keinem Fall so deutlich ausfiel, wie das für human ASC oder BMSC zu beobachten ist. Zum Teils waren die typischen -durch Ölrot-O rot anfärbaren- Vakuolen nur in einzelnen wenigen Zellen vorhanden. Auffällig war außerdem, dass die Vielzahl kleiner, sich in der Zelle befindlichen Vakuolen sich mit der Zeit zu einer großen Vakuole zusammenschlossen und aus der Zelle sezerniert wurden.

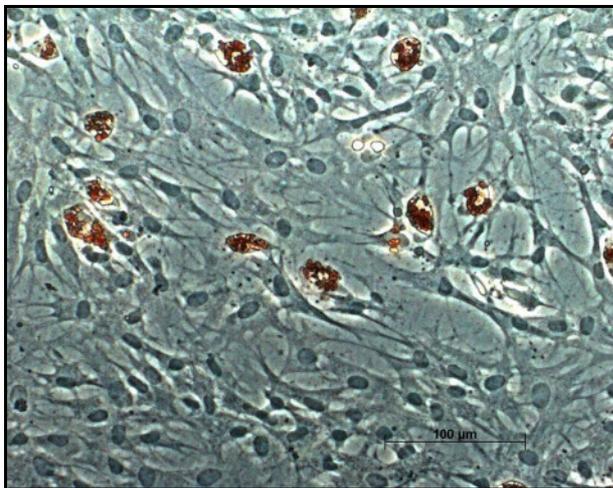


Abb. 12: Adipogene Differenzierung

### 3.2.2 Chondrogene Differenzierung

Nach Auswertung der Chondrogenese der ersten 6 Schafe mit den 4 verschiedenen Medien, stellten wir fest, dass mit TGF- $\beta$ 3 alleine keine ausreichende Induktion stattfand. Die Pellets waren oft sehr klein, so dass sie z.T. schon während der Induktionsphase beim Mediumwechsel oder später bei der Einbettung verloren gingen. Von den übrig gebliebenen, eingebetten und gefärbten 4 Pellets (von 3 Schafen) waren 2 nur sehr schlecht und die anderen 2 überhaupt nicht mit Alzianblau anfärbbar. Die Negativkontrolle ohne Wachstumsfaktoren war für 7 von 11 Pellets Alzian negativ, und für die restlichen 4 nur schwach anfärbbar. Eindeutige Unterschiede zwischen dem Medium 2 und 3 ließen sich zu diesem Zeitpunkt nicht feststellen.

## Ergebnisse

Für die Chondrogenese der ASC von weiteren 6 Schafen, wurde deshalb nur noch das Medium 2 und 3 verwendet.

Alzianblaufärbung	Medium 1 (15 ng/ml TGF-β3)	Medium 2 (15 ng/ml TGF-β3 + 10 ng/ml BMP2)	Medium 3 (15 ng/ml TGF-β3 + 10 ng/ml BMP6)	Medium 4 (ohne Wachstumsfaktoren)
Negativ	2/4			7/11
schlecht - mäßig	2/4	4/28	16/29	4/11
sehr gut		24/28 (85,7%)	13/29 (44,8%)	

Tab. 6: Überblick über die Alzianblaufärbung aller Pellets (n=12 Schafe)

Kollagen Typ II Färbung	Medium 1 (15 ng/ml TGF-β3)	Medium 2 (15 ng/ml TGF-β3 + ng/ml BMP2)	Medium 3 (15 ng/ml TGF-β3 + ng/ml BMP6)	Medium 4 (ohne Wachstumsfaktoren)
Negative	2/2		2/15	3/3
schlecht - mäßig		8/23	6/15	
Gut		15/23 (65,2%)	7/15 (46,7%)	

Tab. 7: Überblick über die Kollagen Typ II Immunhistologie (n=12 Schafe)

Aus Tab. 6 und Tab. 7 wird ersichtlich, dass mit Medium 2 sowohl in der Alzianblaufärbung, als auch in der immunhistologischen Färbung mehr als die Hälfte der Pellets eine gute Anfärbbarkeit aufwies (nämlich 85,7% der Pellets in der Alzianblaufärbung, und 65,2% in der Kollagen Typ II Färbung). Im Vergleich dazu liegen die Prozentwerte für das Medium 3 unter 50% (44,8% für Alzianblau und 46,7% für Kollagen Typ II).

Insgesamt konnte für 11 der 12 Schafe mit Medium 2, also der Kombination von TGF-β3 und BMP2 eine erfolgreiche Induktion der Chondrogenese nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der ovinen ASC erfolgte unter dem Einfluss von β-Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure. Im Verlauf der Differenzierung konnte bei den Zellen aller Schafe die Ablagerung von kalzium- und phosphathaltiger extrazellulärer Matrix beobachtet werden, die durch die Alizarinrot-S Färbung angefärbt werden konnte (Abb. 13) und anschließend quantitativ photometrisch ausgewertet wurde.

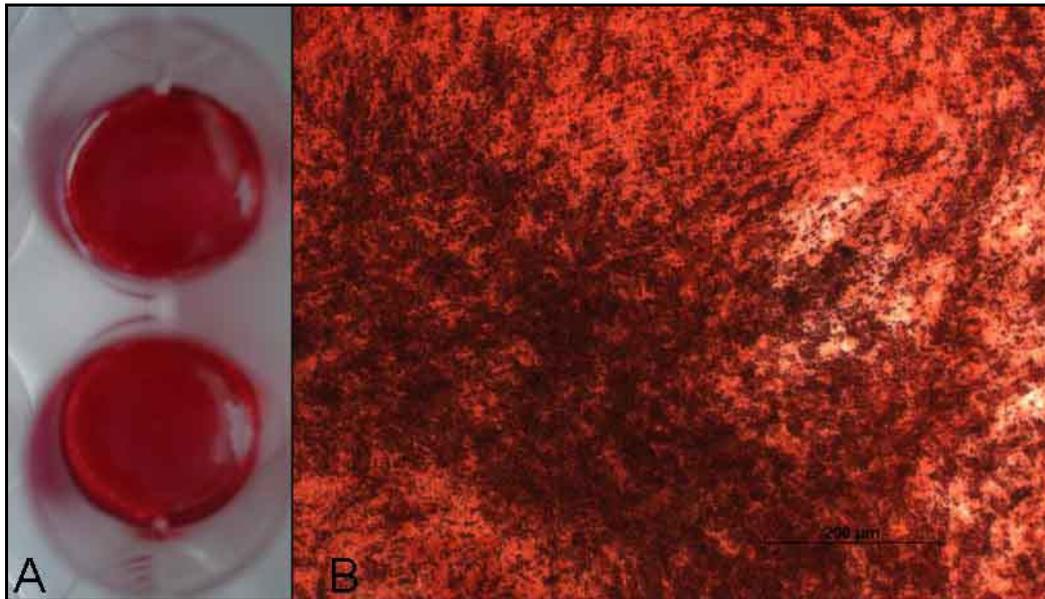


Abb. 13: Alizarinrotfärbung an Tag 21 makroskopisch (A); und mikroskopisch (B)

In Vorversuchen zeigten ovine ASC im Vergleich zu humanen ASCs oder BMSCs eine etwas verzögerte osteogene Differenzierung mit dem für humane BMSC/ASC etablierten osteogenen Medium mit 10%FCS (Pittenger et al. 2000;Jaiswal et al. 2000). Da in Versuchen anderer Arbeitsgruppen eine positive Korrelation des FCS-Gehalts im Medium zur osteogenen Differenzierungsfähigkeit vermutet werden konnte, wurden zusätzlich Versuche mit einem auf 20%FCS-Gehalt erhöhte Kulturmedium durchgeführt. Ein Vergleich dieser zwei verschiedenen Kulturmedien, im Bezug zu der Negativkontrolle in Verfallie-Medium ist in der folgenden Abb. 14 dargestellt. In diesem Diagramm wird der Kalzifizierungsverlauf dargestellt. Das heißt die gemessene Menge an Alizarinrot-S bezogen auf die Proteinmenge, die aus einem parallel ausgesätem, genau gleich behandeltem Well bestimmt wurde. Der Proteinverlauf selbst ist in Abb. 15 gezeigt.

## Ergebnisse

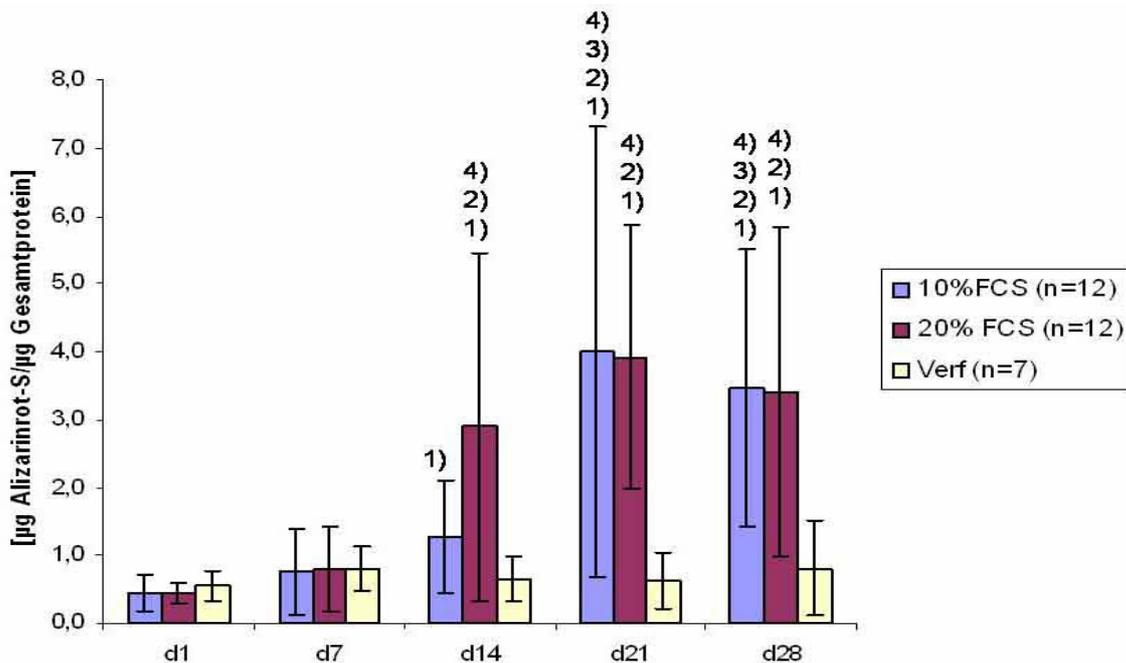


Abb. 14: Kalzifizierungsverlauf (normiert auf Protein) der Zellen aller Schafe (Mittelwerte +/- SD von n=12, bzw n = 7 für Negativkontrolle); 1) statistisch signifikant zu Tag1 des entsprechenden Mediums, 2) statistisch signifikant zu Tag7 des entsprechenden Mediums, 3) statistisch signifikant zu Tag 14 des entsprechenden Mediums, 4) statistisch signifikant zur Negativkontrolle (Verfaillie-Medium) desselben Tages

Bei beiden Medien ist ab Tag 14 ein statistisch signifikanter Anstieg der Kalzifizierung (p-Werte zwischen 0,002 bis 0,005) gegenüber dem Ausgangswert von Tag 1 feststellbar (Abb. 14). Betrachtet man den Anstieg der Kalziumablagerung jeweils von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt, so fällt auf, dass mit dem 10%FCS-haltigen Medium ein statistisch signifikanter Anstieg vom Tag 14 auf den Tag 21 ( $p=0,01$ ) festzustellen ist, während mit dem 20%FCS-haltigen Medium schon eine Woche vorher, nämlich von Tag 7 auf 14 ( $p=0,004$ ) ein statistisch signifikanter Anstieg stattfindet. Dies stimmt überein mit der Beobachtung, dass beim Vergleich mit der Negativkontrolle (Verfaillie-Medium), das Medium mit 10% FCS erst ab dem Tag 21 einen tendenziellen Unterschied zur Negativkontrolle aufzeigt, während dies beim 20%FCS-haltigen Medium schon ab dem Tag 14 der Fall ist. Beim direkten Vergleich der Medien miteinander sind jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

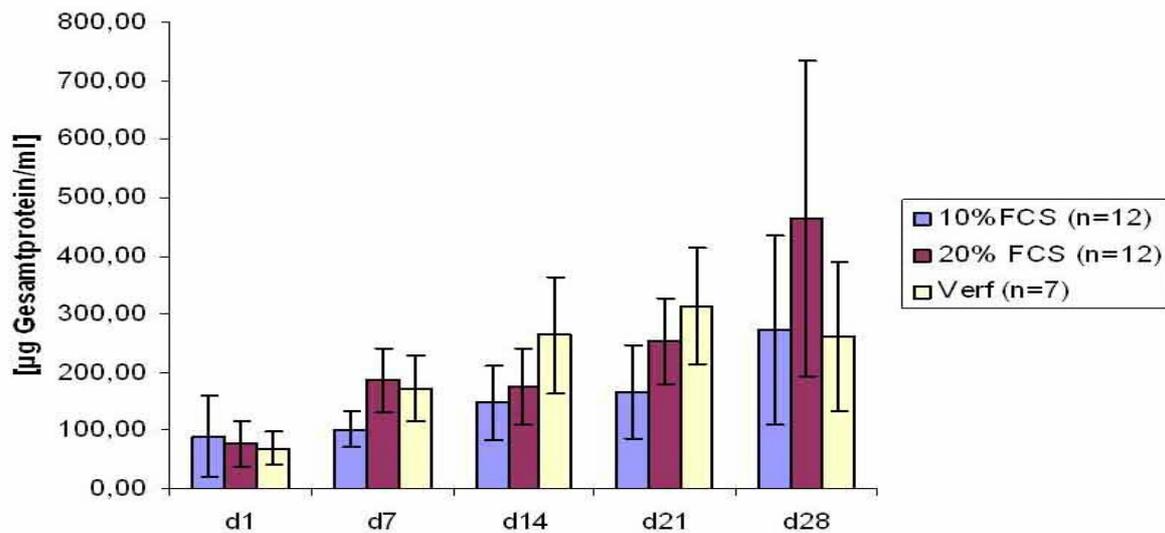


Abb. 15: Proteinverlauf aller Schafe (Mittelwerte +/- SD von n=12, bzw. n=7 bei Negativkontrollen)

Bei Betrachtung der Proteinkonzentration (Abb. 15) zeigt sich, dass die Werte des 20%FCS-haltigen Medium durchgehend über den Werten des Mediums mit 10%FCS liegen; besonders deutlich stellen sich die Unterschiede jedoch an Tag 21 und 28 dar.

Die Bestimmung der Aktivität der ALP aus Zelllysaten, normiert auf die oben aufgeführten Proteinwerte, zeigte bis einschließlich Tag 21 keine eindeutigen Veränderungen (Abb. 16). Erst am Tag 28 ist ein signifikanter Anstieg (3-fach) der Aktivität der Alkalischen Phosphatase gegenüber Tag 1 für das 20%FCS-haltige Medium festzustellen. Auch mit dem 10%FCS haltigen Medium ist anhand des ebenfalls 3 fachen Anstieg der Mittelwerte von Tag 1 zu Tag 28 eine Tendenz erkennbar.

## Ergebnisse

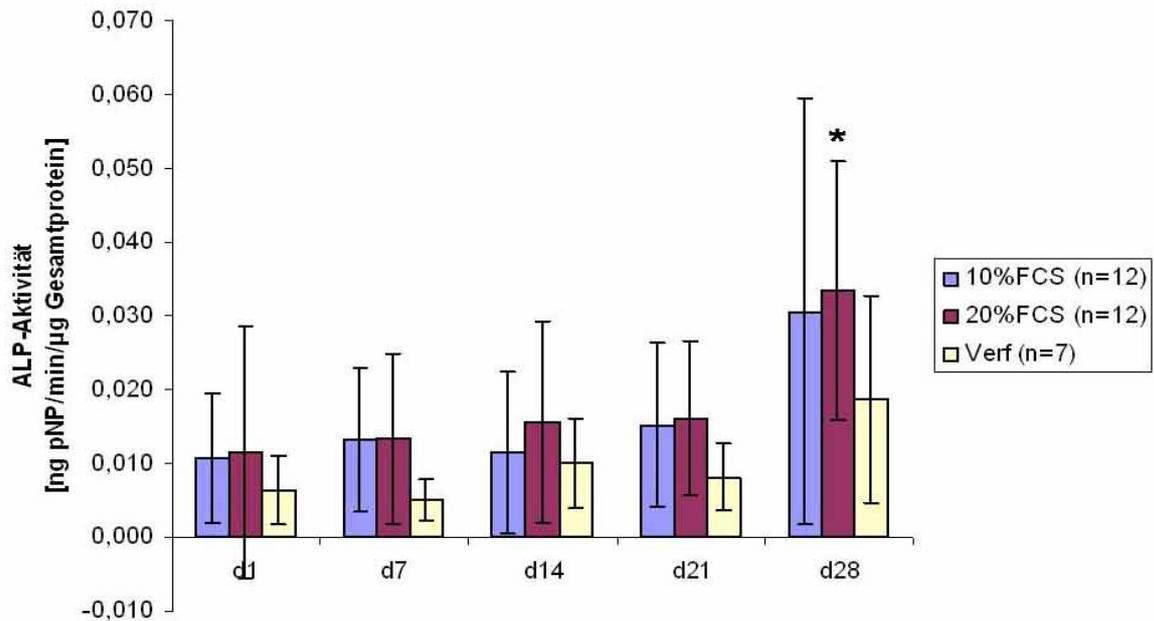


Abb. 16: Verlauf der ALP-Aktivität (Mittelwerte +/- SD von n=12, bzw. n=7 bei Negativkontrollen, \*= p≤0,01)

Auffällig sind die hohen Standardabweichungen. Dies ist auf eine hohe Spendervariabilität zurückzuführen. Betrachtet man die individuellen Unterschiede im Mineralisierungsverlauf, aber auch der Verlauf der ALP-Aktivität so ist zu allen Zeitpunkten eine deutliche Spendervariabilität in der Fähigkeit zur Osteogenese zu erkennen. Abb. 17 zeigt exemplarisch die Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern an Tag 21. Abb. 18 die Unterschiede der ALP-Aktivität an Tag 28.

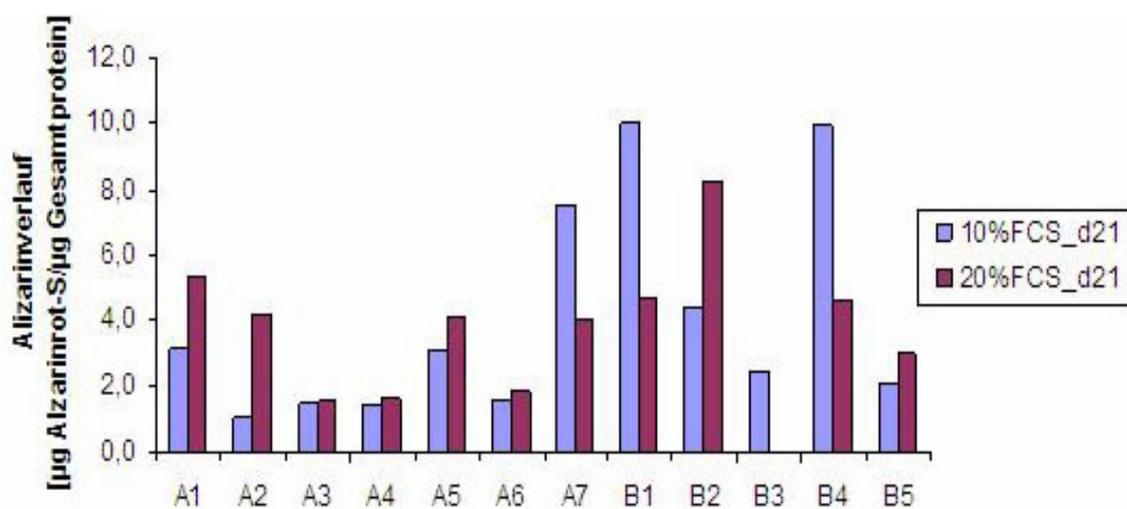


Abb. 17: Spendervariabilität im Mineralisierungsgrad an Tag 21

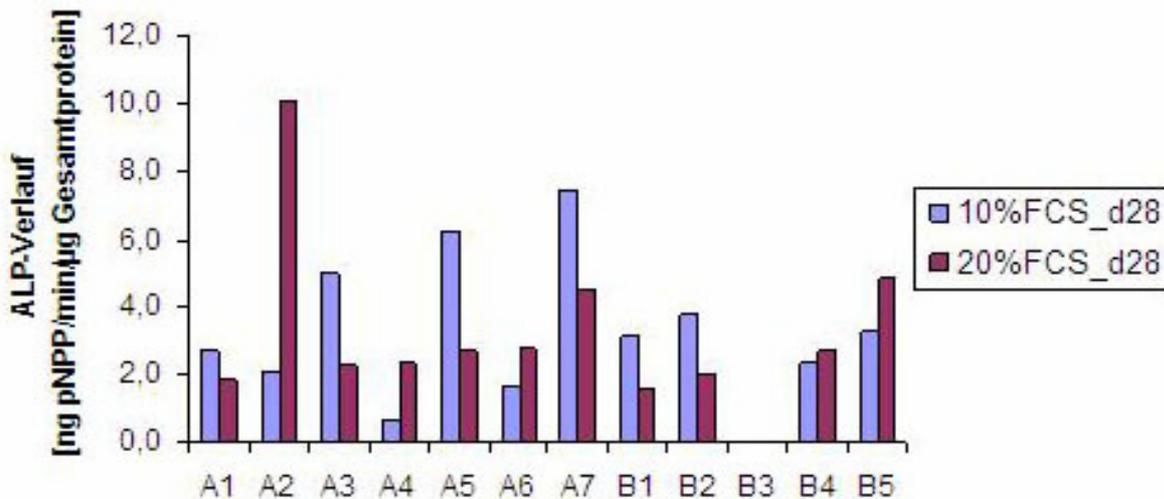


Abb. 18: Spendervariabilität der ALP-Aktivität an Tag 28

### 3.3 Charakterisierung des verwendeten PRPs

Sowohl für die *in vitro*, als auch die *in vivo* Versuche wurde gepooltes PRP und FFP aus der Blutbank Düsseldorf verwendet.

Da sich Plättchenreiches Plasma je nach Herstellungsmethode vor allem hinsichtlich Thrombozytenzahl, sowie Wachstumsfaktorkonzentrationen stark unterscheidet, wurde zur besseren Charakterisierung die Thrombozytenzahl, sowie die Konzentration von PDGF-AB und TGF- $\beta$ 1 im PRP bzw. FFP bestimmt.

Die Thrombozytenzahl lag bei dem gepoolten PRP (1x aufgetaut) bei 1.402.000 Thrombozyten/ $\mu$ l (n=3 Messungen). Beim FFP lag die Konzentration dagegen bei 3.500 Thrombozyten/ $\mu$ l (n=2 Messungen).

Die Konzentration der beiden Wachstumsfaktoren wurde sowohl aus zum ersten Mal aufgetauten (wie beim Tierversuch verwendet), als auch aus zum zweiten Mal aufgetaut Aliquots (verwendet für *in vitro* Versuche) bestimmt. FFP wurde ausschließlich nach einmaligem Auftauen verwendet und wurde infolgedessen auch nur in einmal aufgetauten Aliquots bestimmt. Das Auftauen zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren erfolgte im 37°C warmen Wasserbad, wodurch gleichzeitig eine Aktivierung der Thrombozyten stattfand.

	aktiviert durch	PDGF-AB (ng/ml)	TGF-β1 (ng/ml)
PRP (1x aufgetaut)	Wasserbad bei 37 °C	185,67	97,11
PRP (2x aufgetaut)	Wasserbad bei 37 °C	163,00	107,58
FFP	Wasserbad bei 37 °C	0,87	2,58

Tab. 8: Vergleich der Wachstumsfaktorkonzentrationen

Beim PDGF-AB-ELISA fielen die OD-Werte für die PRP-Proben unerwartet hoch aus (>2). Die in der Tabelle aufgeführten Werte für diese Proben wurden unter der Annahme berechnet, dass die Standardkurve in diesen hohen OD-Bereichen weiter linear verläuft. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Werte um ein Vielfaches höher liegen. Die für die *in vitro* Versuche verwendeten, zweimal aufgetauten Aliquots zeigten, zu den einmal aufgetauten Proben keine drastischen Unterschiede.

Beim Vergleich der Wachstumsfaktorkonzentrationen von FFP und PRP, konnte für PDGF-AB eine ca. 200-fache Konzentration festgestellt werden, und eine ca. 40-fache Anreicherung für TGF-β1.

### 3.4 Einfluss von PRP auf Osteogenese und Proliferation

Um den Einfluss von plättchenreichem Plasma auf die Osteogenese zu untersuchen wurde osteogenes Medium (10%FCS) mit verschiedenen Konzentrationen von PRP bzw. FFP supplementiert und untersucht ob dadurch Veränderungen im Osteogeneseverlauf oder im Proliferationsverhalten entstehen.

Bei einem Vergleich der verschiedenen Kulturmedien waren keine statistisch signifikanten Unterschiede im Kalzifizierungsverlauf feststellbar. Auffällig ist jedoch, dass eine Supplementierung mit 10% PRP eine geringere Kalzifizierung zeigt als das osteogene Medium ohne PRP oder das mit 1%PRP (Abb. 19).

## Ergebnisse

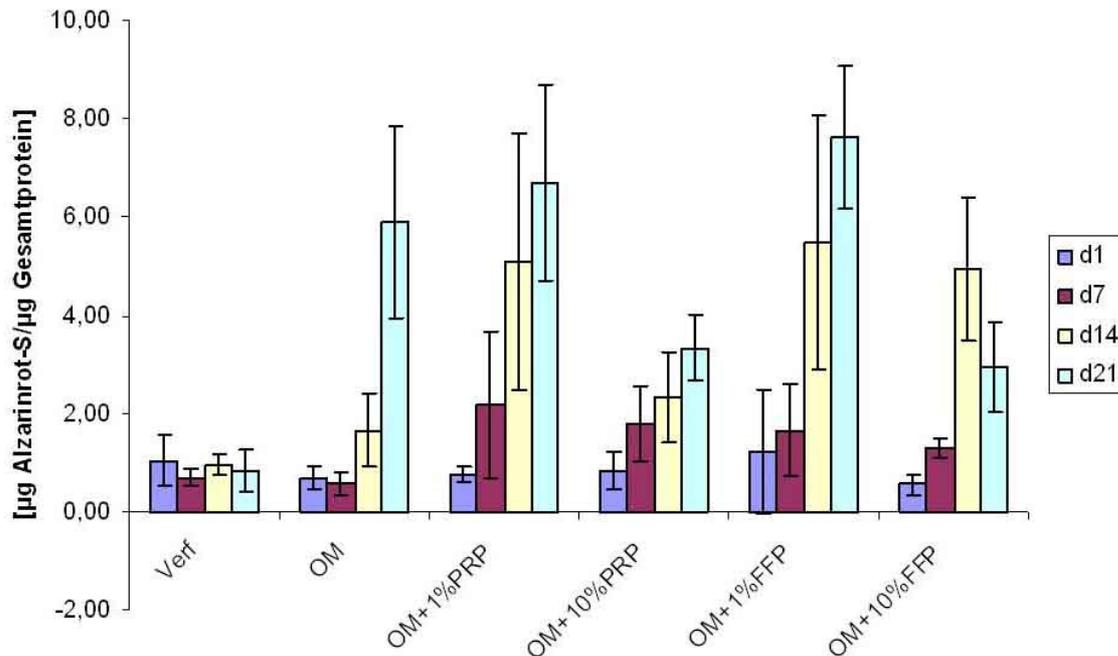


Abb. 19: Kalzifizierungsverlauf von unterschiedlich supplementierten osteogenen Medien (n=5)

Das Proliferationsverhalten wurde über 3 Wochen anhand der Gesamtproteinmenge aus den Lysaten untersucht. Die Mittelwerte der Proteinkonzentrationen; der im mit 10%PRP supplementierten osteogenen Medium kultivierten Zellen; liegen zwar über den Werten, der Zellen, die im osteogenen Medium alleine oder im Expansionsmedium Verfaillie kultiviert wurden, die Unterschiede sind aber statistisch nicht signifikant (Abb. 20). Das Proliferationsverhalten der Zellen in den anderen mit PRP bzw. FFP supplementierten osteogenen Medien liegt zwischen den Zellen in osteogenen Medium (kaum Proliferation) und denen in Verfaillie (gute Proliferation).

## Ergebnisse

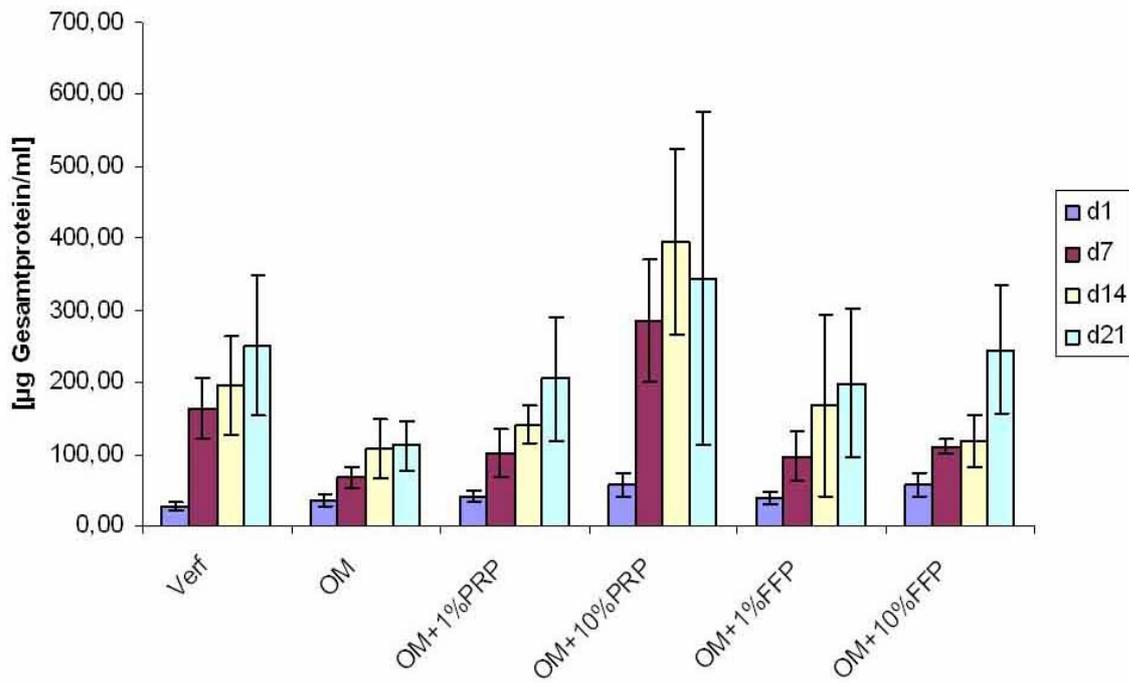


Abb. 20: Proteinverlauf bei unterschiedlich supplementierten osteogenen Medien (n=5)

### **3.5 Tierversuch**

Insgesamt wurden 22 Tiere operiert. Bei einem Tier (A6) aus der Gruppe A versagte jedoch ein Tag post operationem das Ostosynthesesystem, weshalb es euthanasiert werden musste. Ein weiteres Tier (A4) aus dieser Gruppe musste nach 12 Wochen aufgrund einer Plattenbiegung mit Achsabweichung in der Sagitalebene vorzeitig eingeschläfert werden.

Die restlichen Tiere belasteten die Gliedmaße schon einen Tag nach der OP voll, wurden aber in Unterstützungsgurten gehalten, um eine erhöhte Belastung der Gliedmaße durch das Aufstehen und Niederlegen zu verhindern. Nach 10 Wochen wurden die Schlingensysteme entfernt und die Tiere ohne Unterstützung in Einzelboxen gehalten. Insgesamt flossen also die Daten von je 5 Tieren pro Gruppe in die Auswertung ein.

#### **3.5.1 Röntgenauswertung**

Zur Evaluation und Quantifizierung des röntgenologischen Verlaufes wurden mithilfe der Histogrammfunktion eines Grafikprogrammes die Pixelwerte innerhalb des Defektes bestimmt. Um verschiedene Qualitäten der Mineralisation zu spezifizieren, wurde der zuvor anhand von oberen und unteren Pixelgrenzen festgelegte Ossifikationsbereich in drei Teilbereiche unterteilt.

Insgesamt waren starke interindividuelle Unterschiede auch innerhalb einer Versuchsgruppe festzustellen. Abb. 21 und Abb. 22 zeigen die Röntgenbilder aller Schafe der Versuchsgruppen mit ATSC mit oder ohne PRP nach Abschluss des Versuches. Das Schaf B1 in der Gruppe ATSC+PRP zeigte mit relativ großem Abstand die beste Verknöcherung.

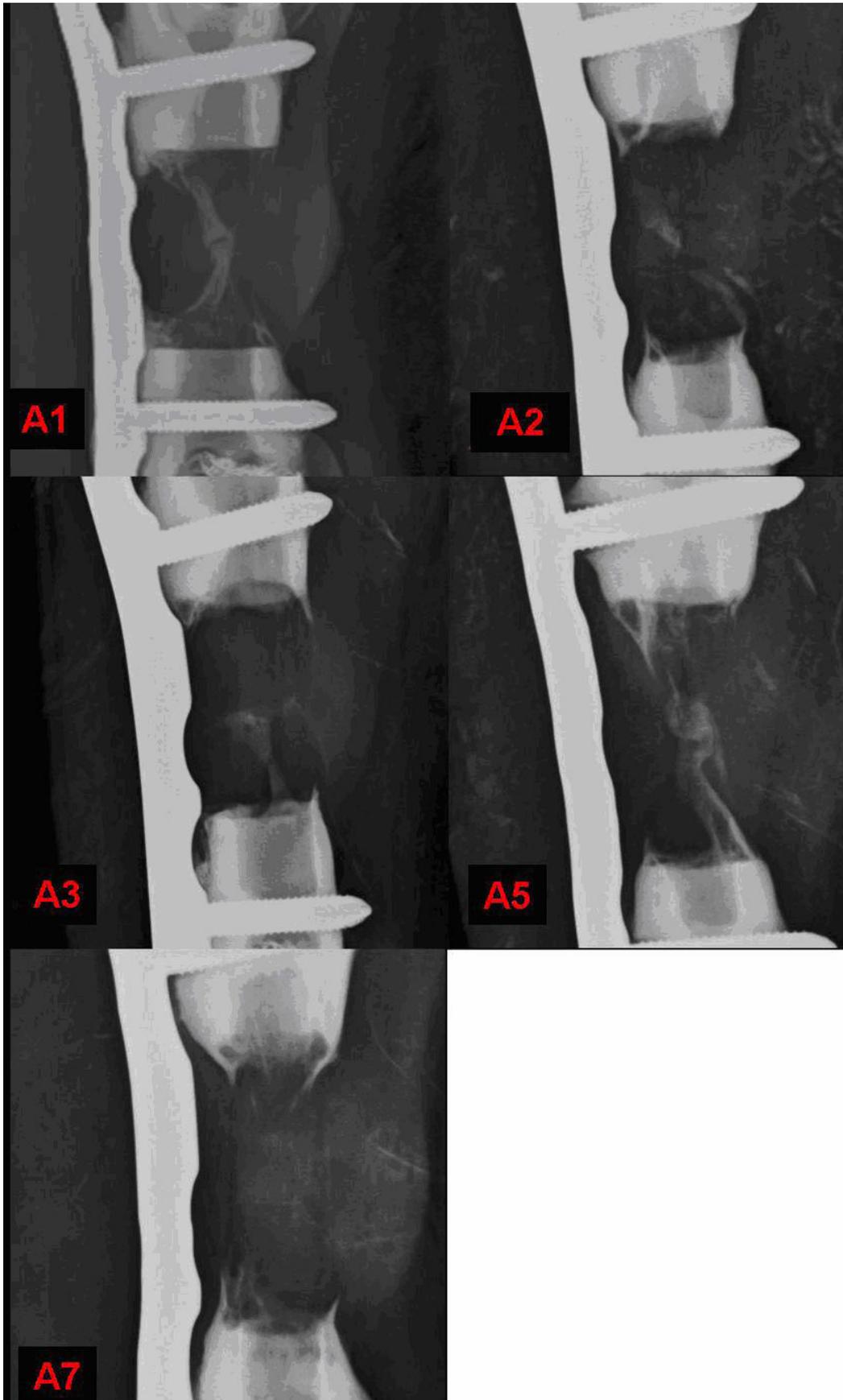


Abb. 21: Röntgenbilder nach Euthanasie der Schafe A1, A2, A3, A5 und A7 der Versuchsgruppe mit ASC

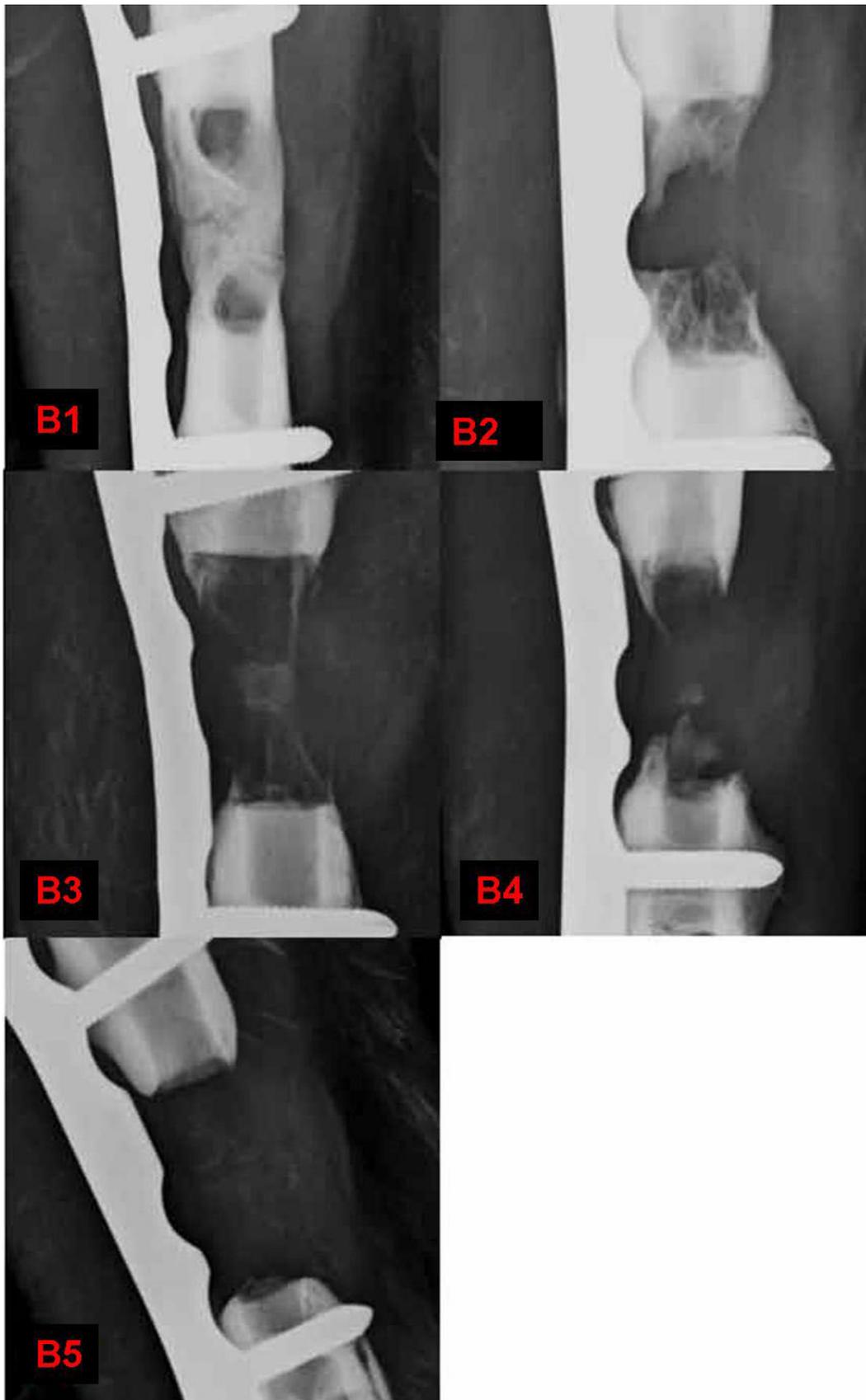


Abb. 22: Röntgenbilder nach Euthanasie der Schafe B1 bis B5 der Gruppe mit ASC+PRP

Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auszumachen wurden die zusammengefassten Werte des guten und sehr guten Verknöcherungsbereichs betrachtet. Dieser Ossifikationsbereich entspricht dem neugebildeten Knochens im Defektbereich und wird als prozentualer Anteil am Defektbereich angegeben. Abb. 23 zeigt eine Übersicht über die Mittelwerte samt Standardabweichungen aller Gruppen.

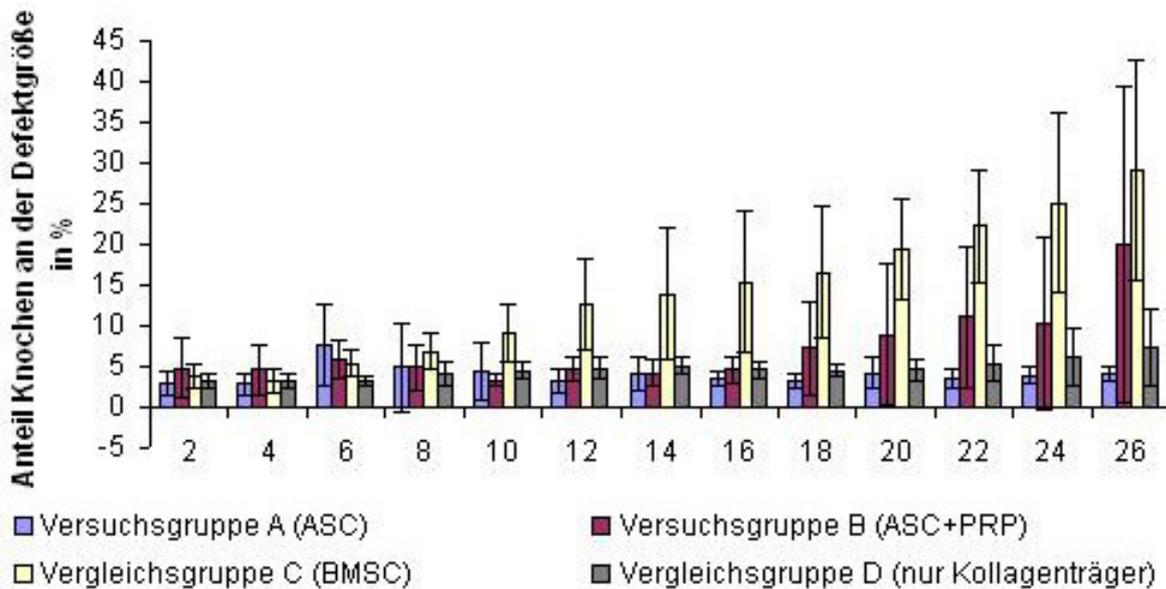


Abb. 23 Vergleich der radiologischen Verknöcherung aller Gruppen ;Mittelwerte +/- SD von n=5

Beim direkten Vergleich der radiologischen Knochenbildung zwischen ASC und BMSC, schneiden die ASC ab der 10. Woche statistisch signifikant schlechter ab als die BMSC (Abb. 24). Das bedeutet, dass die Versuchsgruppe A mit ASC genauso schlecht abschneidet, wie die Versuchsgruppe D bei der der Träger alleine eingesetzt war. Denn diese Vergleichsgruppe schneidet ebenfalls ab der Woche 10 signifikant schlechter ab als die Vergleichsgruppe C (Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man nun die um PRP erweiterte Versuchsgruppe B mit der Vergleichsgruppe C, so schneidet diese zwar ebenfalls ab der Woche 10 signifikant schlechter ab als die Vergleichsgruppe C. Nach 26 Wochen jedoch sind keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr zu sehen (Abb. 25).

## Ergebnisse

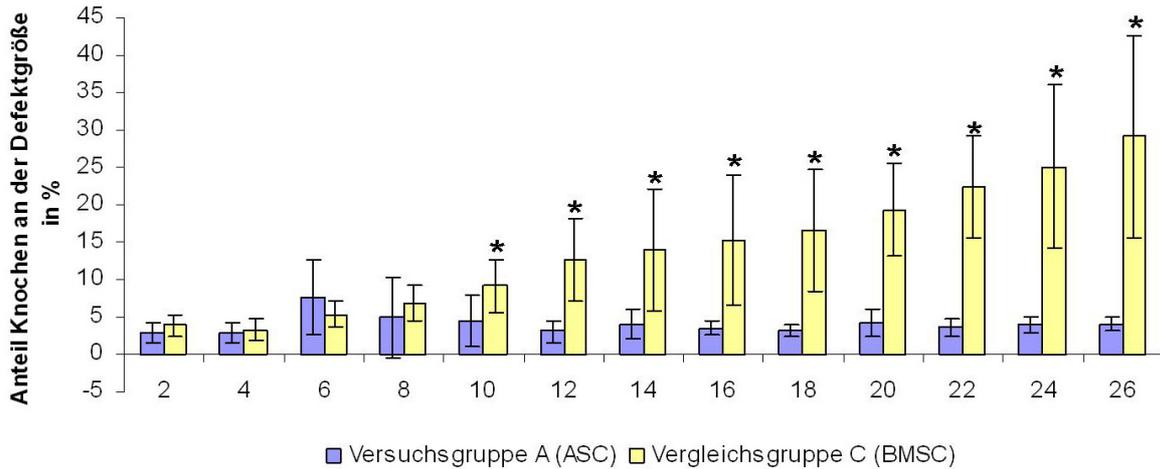


Abb. 24: Direkter Vergleich der Versuchsgruppe A (ASC) mit der Vergleichsgruppe C (BMSC); Mittelwerte +/- SD von n=5, mit folgenden signifikanten Unterschiede: Woche 10: p=0,048; Woche 12 p=0,001; Woche 14: p=0,01; Woche 16: p=0,003; Woche 18: p=0,004; Woche 20: p=0,003; Woche 22: p=0,000; Woche 24:p=0,003; Woche 26: p=0,022)

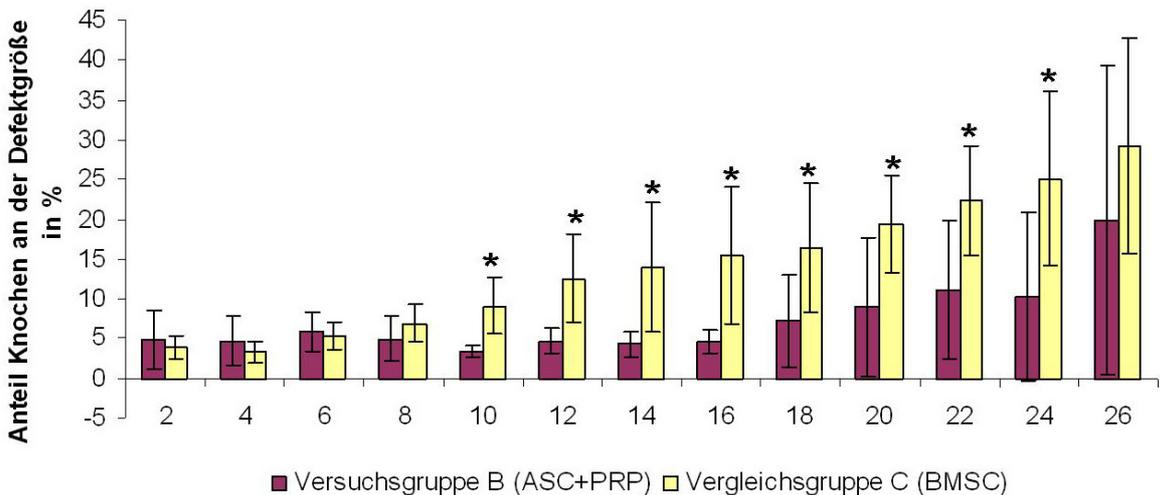


Abb. 25: Vergleich der Versuchsgruppe B (ASC+PRP) mit der Vergleichsgruppe C (BMSC); Mittelwerte +/- SD, mit folgenden signifikanten Unterschieden: Woche 10: p=0,0013; Woche 12: p=0,004; Woche 14: p=0,012; Woche 16: p=0,007; Woche 18: p=0,045; Woche 20: p=0,04; Woche 22: p=0,031; Woche 24: p=0,038)

Beim direkten Vergleich der beiden Versuchsgruppen A und B miteinander waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, auch wenn in der Versuchsgruppe B gegen Ende ein deutlicher Anstieg im prozentualen Anteil des Knochens am Defektbereich zu sehen war (Abb. 26).

## Ergebnisse

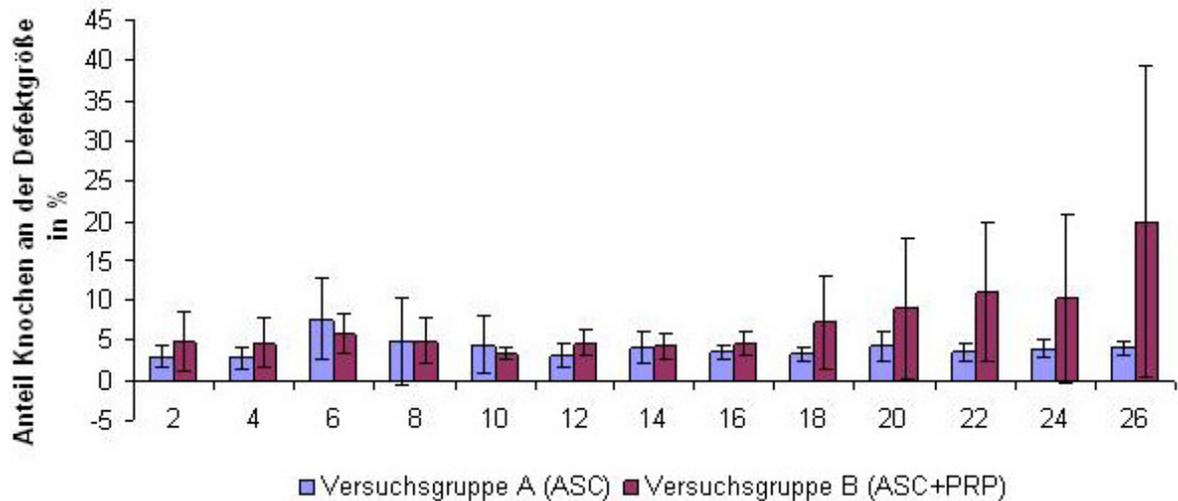


Abb. 26: Vergleich der beiden Versuchsgruppen; Mittelwerte +/- SD für n=5

Bei der statistischen Untersuchung des Verlaufs mithilfe gepaarter T-Tests waren für beide Versuchsgruppen keine signifikanten Anstiege im prozentualen Anteil des Knochens am Defekt festzustellen. Dass die im Diagramm der Mittelwerte zu sehenden deutlichen Anstiege bei der Versuchsgruppe B nicht signifikant waren, ist auf die sehr großen Standardabweichungen zurückzuführen (Abb. 27).

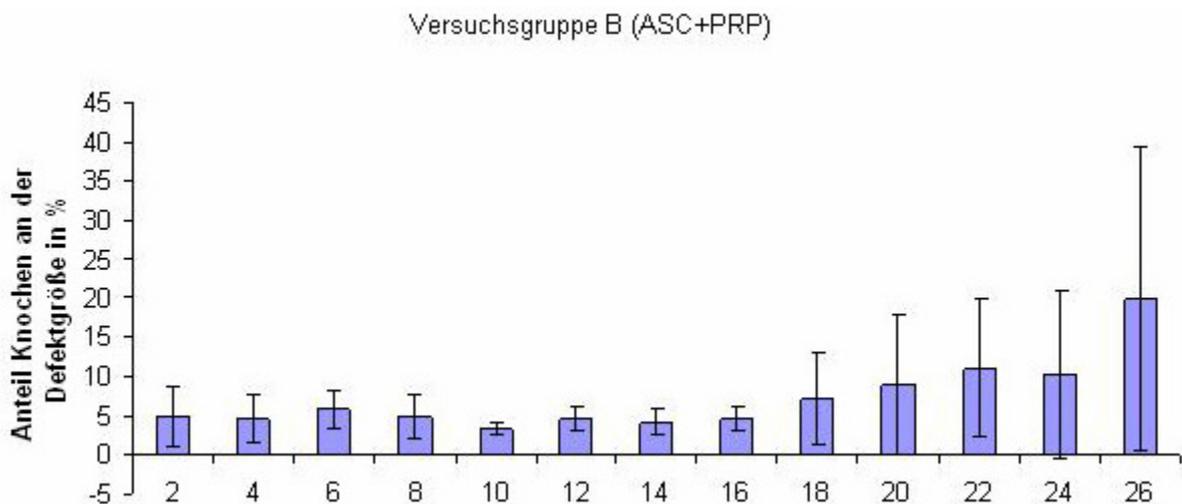


Abb. 27: Verlauf der Verknöcherung der Versuchsgruppe B; Mittelwerte +/- SD von n=5

### 3.5.2 Computertomographie

Bei Betrachtung der 3D-Rekonstruktionen der computertomographischen Auswertungen (Abb. 28) sticht die gute Regeneration von Schaf B1 heraus, während bei allen anderen Schafen keine ausreichende Durchbauung erzielt werden konnte.

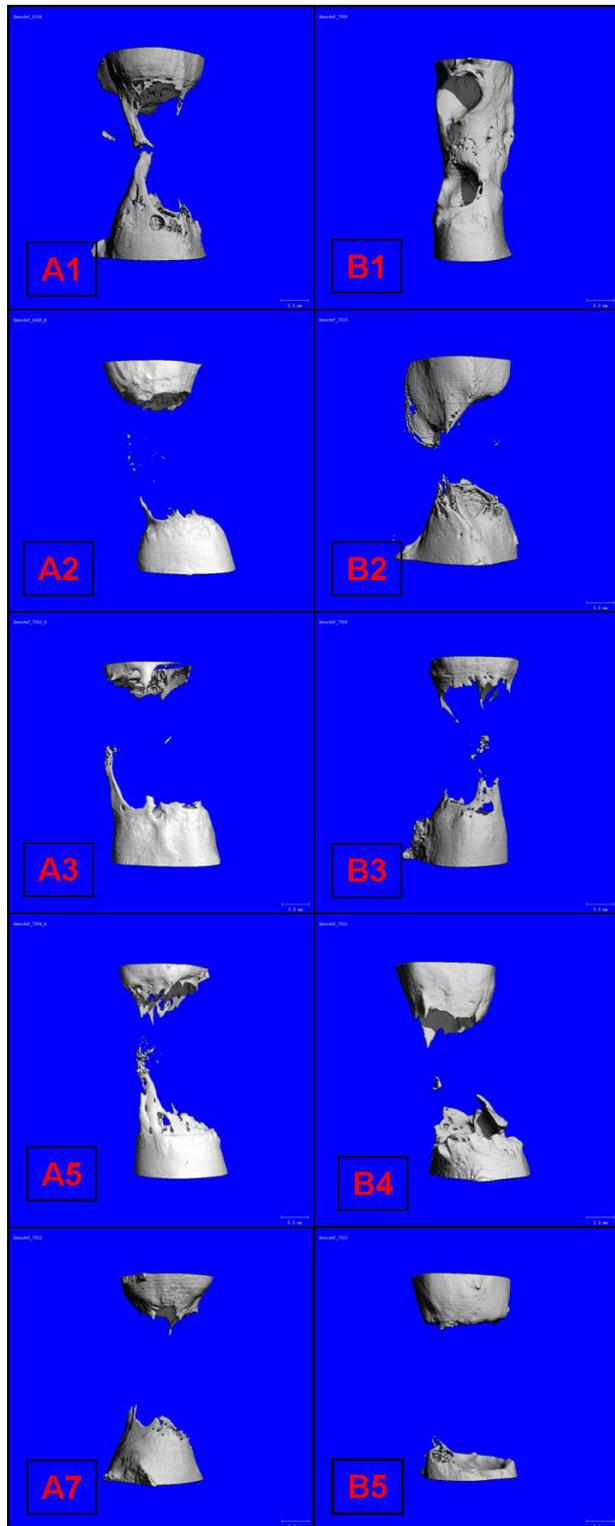


Abb. 28: 3D-CT-Rekonstruktionen der Versuchsgruppe A (ASC) und B (ASC+PRP)

Anhand der CT-Schnitte wurde der Knochenvolumenanteil bestimmt; also der Anteil von Knochen am Gesamtvolumen. Vergleicht man anhand dieses Knochenvolumenanteils die beiden Versuchsgruppen können keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

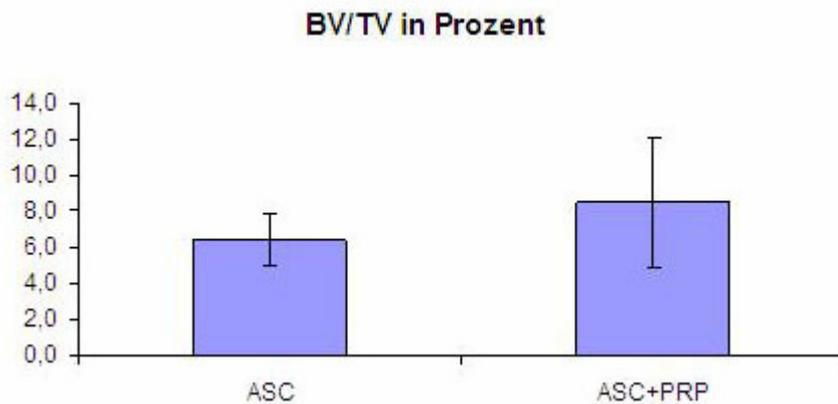


Abb. 29: Vergleich des Knochenvolumenanteils der ASC und ASC+PRP-Gruppen; Mittelwerte und SD von n=5

Für die Kontrollgruppen liegen leider keine ausreichenden Daten für sinnvolle Vergleiche vor.

### 3.5.3 Histologie

#### 3.5.3.1 Qualitative histologische Beobachtungen

Wie bei den Röntgenbildern sind auch bei der histologischen Auswertung starke interindividuelle Unterschiede innerhalb aller Versuchs- und Vergleichsgruppen feststellbar.

#### **Versuchsgruppe A**

Abb. 30 zeigt 3 charakteristische Übersichtsscans der GE-gefärbten Schnitte dieser Versuchsgruppe, bei der der Kollagenträger mit ASC besiedelt wurde. Auffällig ist die starke Vorwölbung des Fettmarks in den Defektbereichs. Eine mehr oder weniger starke Vorwölbung des Fettmarks ist jedoch auch bei allen anderen Gruppen zu sehen, wenn es zu keiner oder nur zu einer geringen Knochenneubildung kommt.

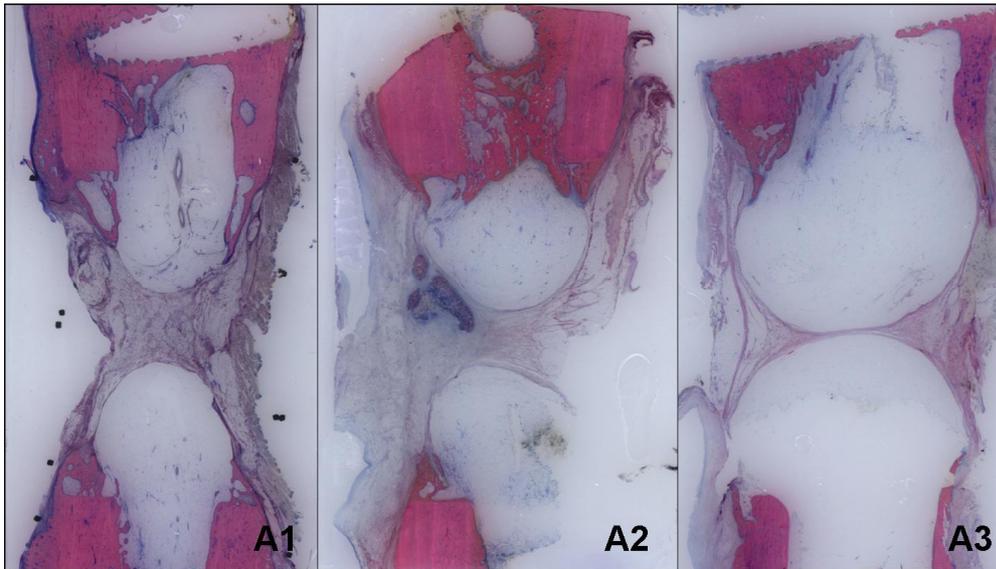


Abb. 30: Übersichtsscans der GE-gefärbten Schnitte der Versuchsgruppe A (mineralisiertes Kollagen+ASC)

Innerhalb des Defekts sind kaum Mineralisationsansätze zu erkennen. Lediglich bei Schaf A2 kommt es mittig im Defekt zur Ausbildung kleinerer Osteoidinseln mit beginnender Mineralisation. Außerdem ist zum Teil an den kortikalen Osteotomiestellen ein knöcherner Anbau (Schaf A1) zu sehen. An den meisten Osteotomiestellen jedoch ist eine Abrundung der Ostomiekanten ohne jegliche Ossifikationsfront zu beobachten (Schaf A3).

Interessanterweise ist bei der Versuchsgruppe A im Gegensatz zu allen anderen Versuchs- und Vergleichsgruppen zwischen den Vorwölbungen des Fettmarks als interfragmentärer Kallus statt Bindegewebe vor allem Fettgewebe anzutreffen, welches von schmalen Streifen Bindegewebe durchzogen ist (Abb. 31). Deutlich zu erkennen sind in dieser Abbildung auch die Vielzahl von Gefäßen (blau) die durch die Bindegewebsstreifen ziehen.

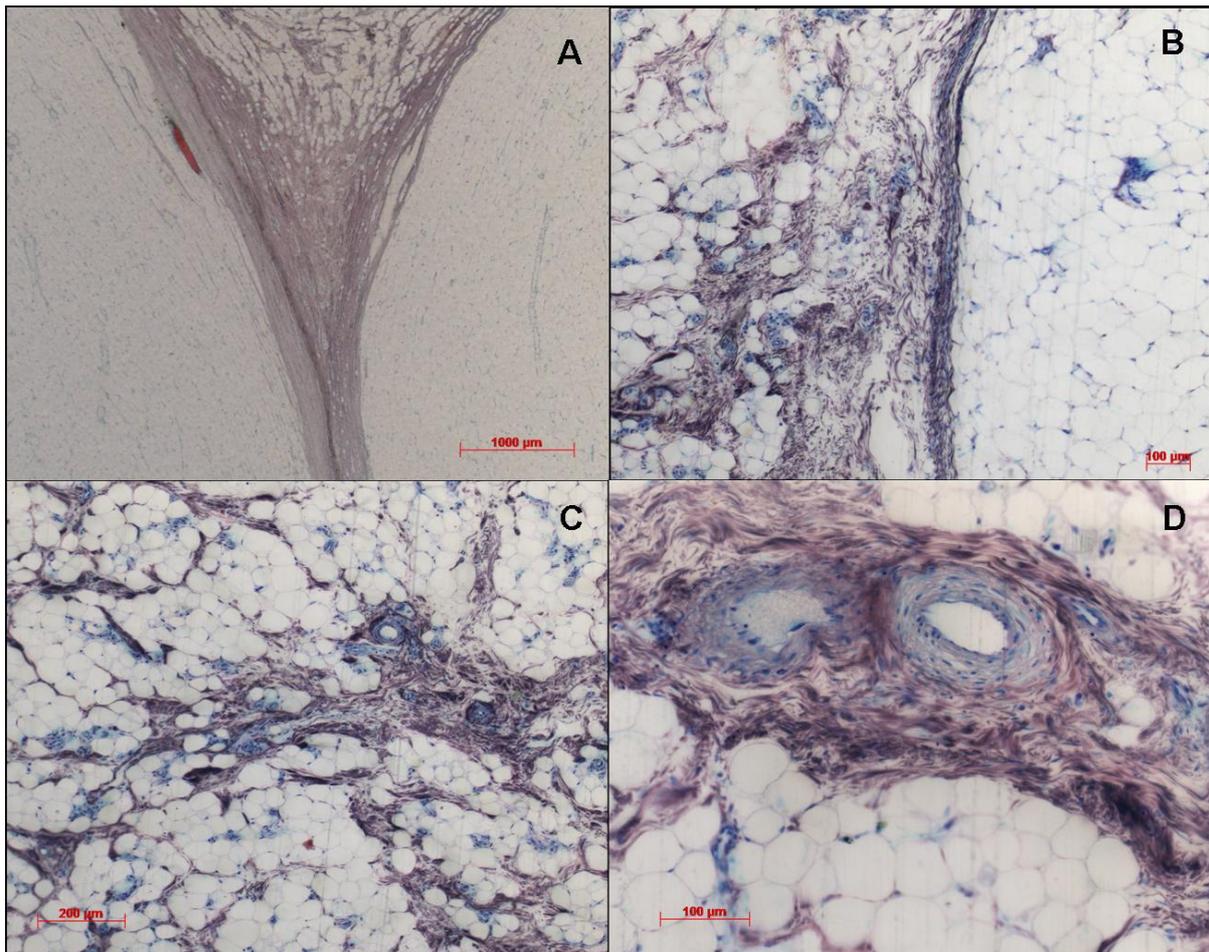


Abb. 31: A) Schaf A3: aneinanderstossende Vorwölbungen des Fettmarks mit dazwischem gebildetem Fett- und Bindegewebe B) Schaf A1: rechts Fettmarkvorwölbung; links Fettgewebe mit Bindegewebsstrukturen C) und D) Schaf A1 herausvergrößerte Stellen des Fettgewebes, mit durchziehenden Bindegewebsstreifen; innerhalb der Bindegewebsstreifen sind mehrere Gefäßquerschnitte zu sehen.

### **Versuchsgruppe B**

In dieser Versuchsgruppe sind die Vorwölbungen des Fettmarks weniger ausgeprägt (

Abb. 32).

Bei allen Präparaten dieser Gruppe besteht der interfragmentäre Kallus aus bindegewebigen Strukturen ohne Fettgewebe, in denen größere (Schaf B4) oder kleinere Ostoidinseln liegen (Abb. 33).

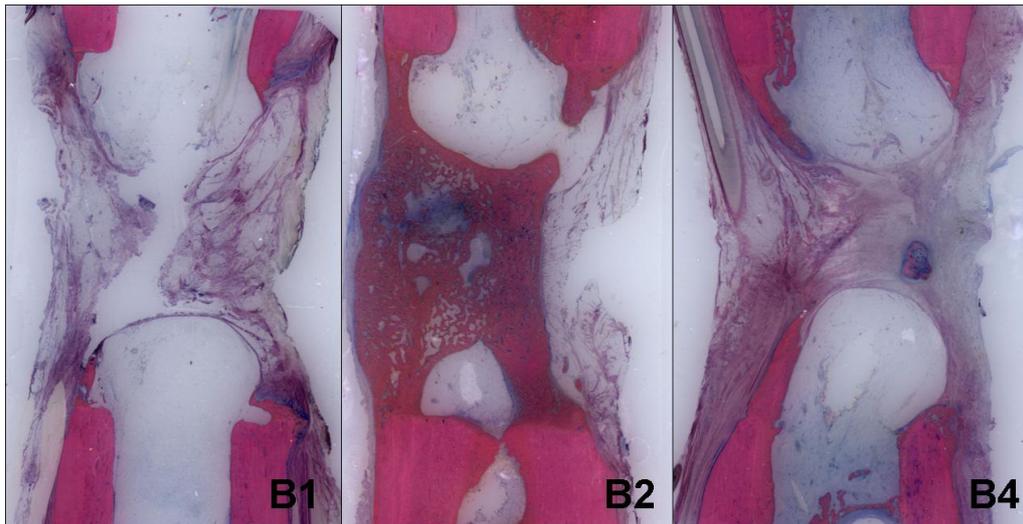


Abb. 32: Übersichtsscans der GE-gefärbten Schnitte der Versuchsgruppe B (mineralisiertes Kollagen+ASC+PRP)

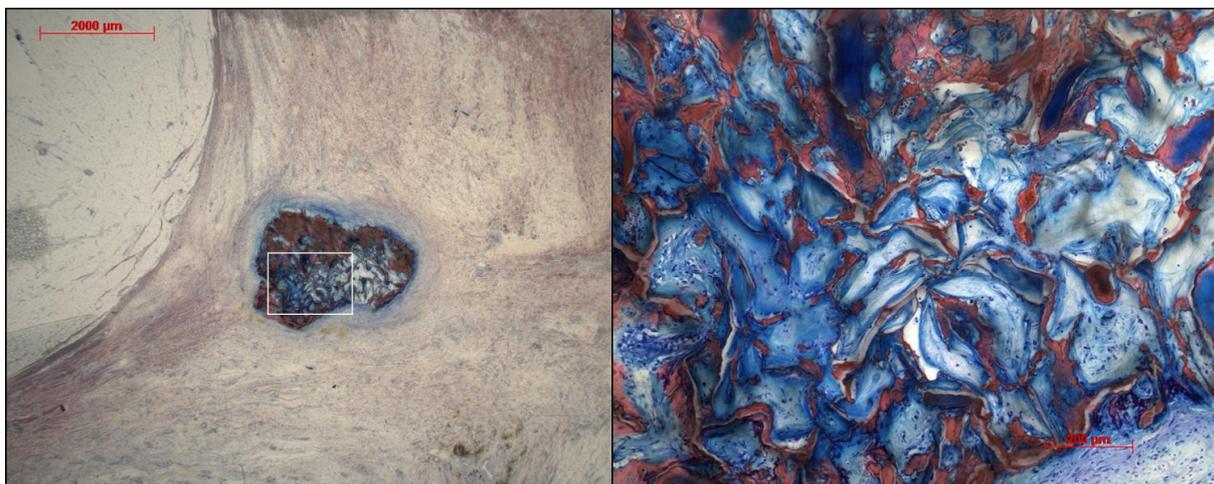


Abb. 33: Schaf B4: zum Teil mineralisierte Osteoidinsel mit Matrixresten; blasslila: Bindegewebe, weiss: Fettmark, blau: Osteoid, rot/pink: Knochen, schwarz/dunkelrot: Matrixreste

Ins Auge sticht die herausragende Verknöcherung und fast vollständige Überbrückung des Defekts bei Schaf B2. Innerhalb dieses Regenerats sind verschiedene Verknöcherungsstufen zu sehen.

Abb. 34 zeigt unter A einen Bereich mit einer unreifen Knochenstruktur, in der die noch nicht mineralisierte Knochensubstanz, also das Osteoid (blau) dominiert, und welches sich ungeordnet um die Matrixreste (dunkelrot) verteilt. Rechts im Bild sind schon mineralisierte Strukturen mit eingeschlossenen Osteozyten zu sehen. Zwischen mineralisierter Matrix und Osteoid sind aktive Osteoblasten zu erkennen. In Teilbild B ist ein Abschnitt zu sehen, in dem sich der Knochen gerade im Umbau befindet. Die Knochensubstanz ist bereits mineralisiert (rot) und es ist eine beginnende Fettmark-

entstehung erkennbar. Diese Art Knochengewebe kann bereits als Geflechtknochen bezeichnet werden.

Abb. 35 zeigt einen typischen Bereich eines schon relativ weit ausgereiften Geflechtknochen, wie er in großen Teilen des Regenerats vorherrscht. Die noch eher ungeordnete Anordnung der knöchernen Strukturen ist von mehreren Fettmarkähnlichen Hohlräumen durchsetzt. In der 3. Vergrößerung sind die Bone Lining cells deutlich zu erkennen. Zwischen diesen Zellen und der mineralisierten Knochenmatrix (rot) ist ein breiter Osteoidsaum zu sehen. Innerhalb der mineralisierten Knochensubstanz sind die Zellkerne (schwarz) der Osteozyten zu erkennen.

In Abb. 36 ist die Osteomiekante zu sehen, an der die unterschiedlichen Strukturen der verschiedenen Knochengewebe deutlich werden. Rechts die geordneten lamellären Strukturen des alten Knochens (bzw. der Kortikalis) und links die unregelmäßige Anordnungen des neu gebildeten Geflechtknochen.

Vor allem in den Bereichen mit ausgereiftem, schon mineralisiertem Knochen sind häufig Matrixreste zu sehen (Abb. 37). Interessant ist der vergrößerte Ausschnitt aus Abb. 37, in dem deutlich Zellen zu erkennen sind, die innerhalb der Matrixreste, aber auch im Umfeld liegen. Ob es sich dabei um die in den Defekt eingebrachten ovinen ASCs handelt bleibt spekulativ.

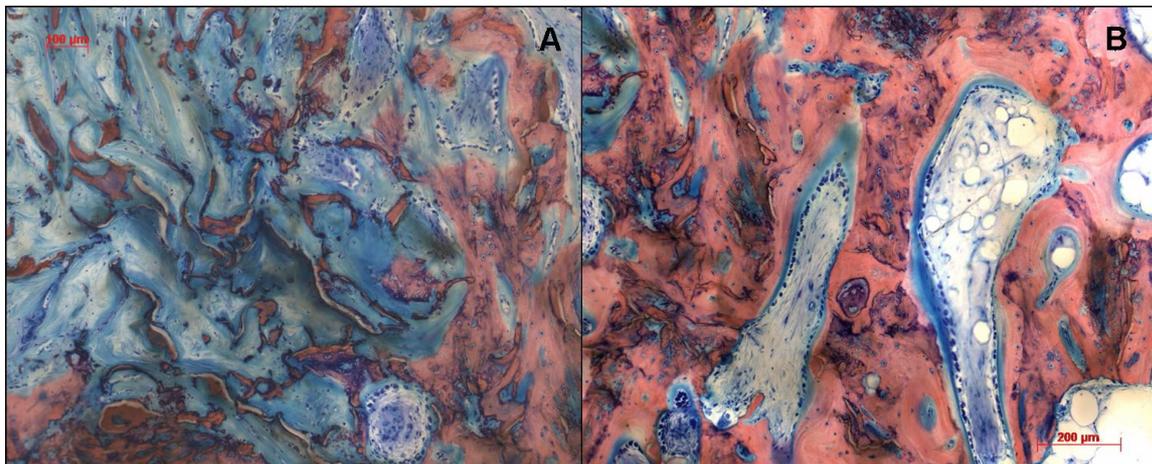


Abb. 34: Schaf B2; A) große Anteile Ostoid (blau); rechts im Bild mineralisierte Matrix; B) Geflechtknochen mit mineralisierter Knochensubstanz (rot), mit Matrixresten (dunkelrot/schwarz) und beginnender Fettmarkbildung (weisse Vakuolen)

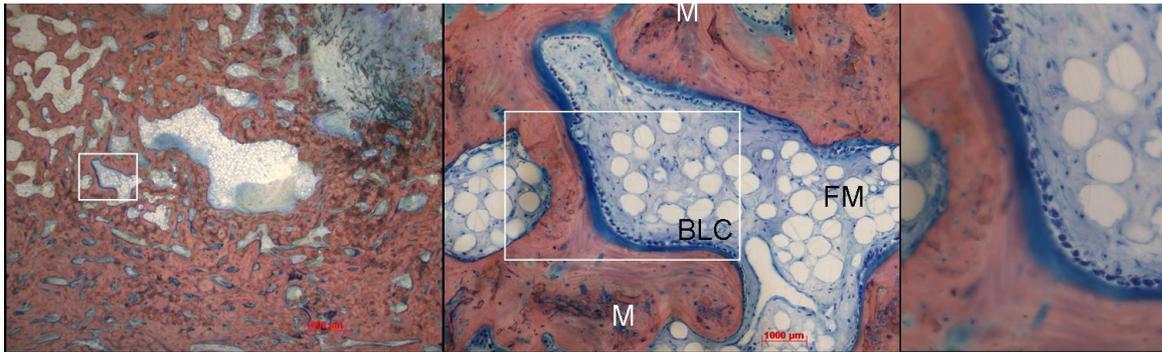


Abb. 35: Schaf B2; Bereich eines sehr ausgereiften Geflechtknochens mit Fettmark (FM); am äußeren Rand des Fettmarks befindet sich eine pallisadenartig Anordnung von Osteoblasten, den sogenannten Bone Lining Cells (BLC; zwischen diesen Zellen und der mineralisierten Knochensubstanz ist ein breiter Osteoidsaum zu sehen; innerhalb der mineralisierten Knochensubstanz sind Matrixreste zu sehen (M)

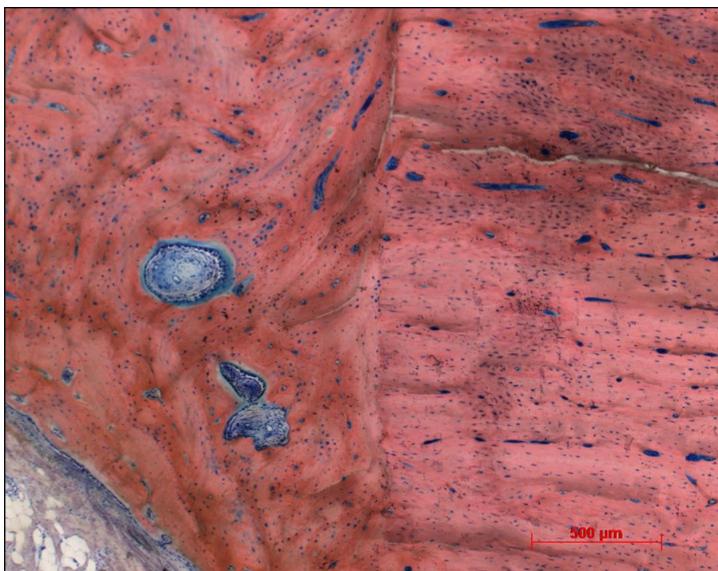


Abb. 36: Schaf B2: Osteotomiekannte, mit den geordneten Strukturen des ursprünglichen Lamellenknochens der Kortikalis rechts und den ungeordneten Strukturen des neu gebildeten Geflechtknochens links

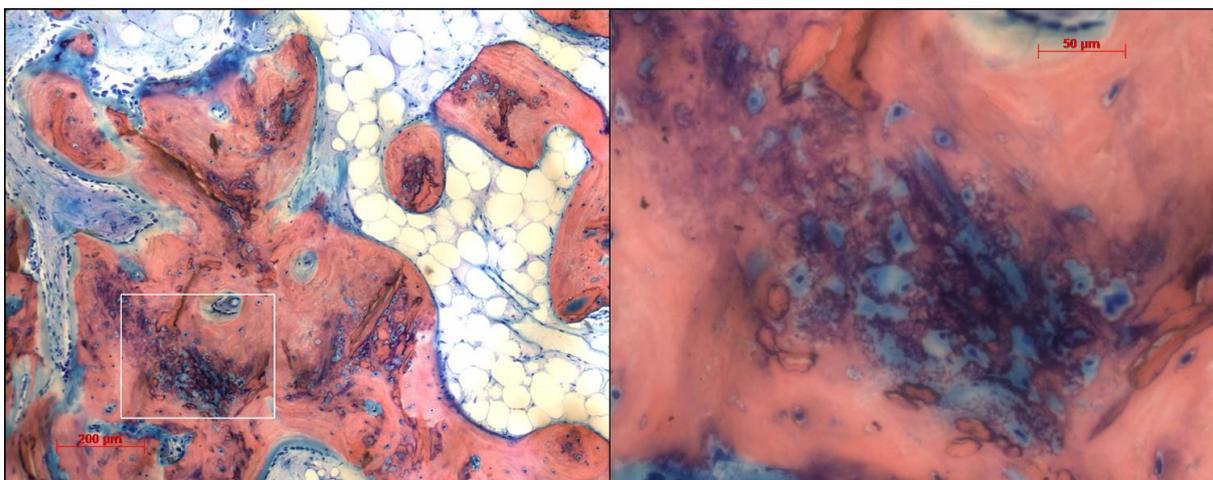


Abb. 37: Schaf B2: reife Knochensubstanz mit Matrixresten, innerhalb derer mehrere Zellen zu erkennen sind

Mithilfe der Fluoreszenzaufnahmen lässt sich der zeitliche Ablauf der Verknöcherung besser beurteilen. Durch die Verabreichung der Farbstoffe Calceingrün in der achten Woche und Xylenolorange in der zehnten Woche, stellt sich der zur achten Woche, also früher gebildete Knochen grün dar, der später gebildete Knochen rot.

Während es bei dem Schaf B2 der Versuchsgruppe B zu einer frühen Überbrückung des Defekt kommt (Abb. 38), ist bei allen Schafen der Gruppe mit BMSC zu diesem Zeitpunkt noch keine Überbrückung sichtbar (Abb. 39). Erst zum späteren Zeitpunkt der Fluoreszenzmarkierung erfolgt die knöcherne Überbrückung des Defekts.

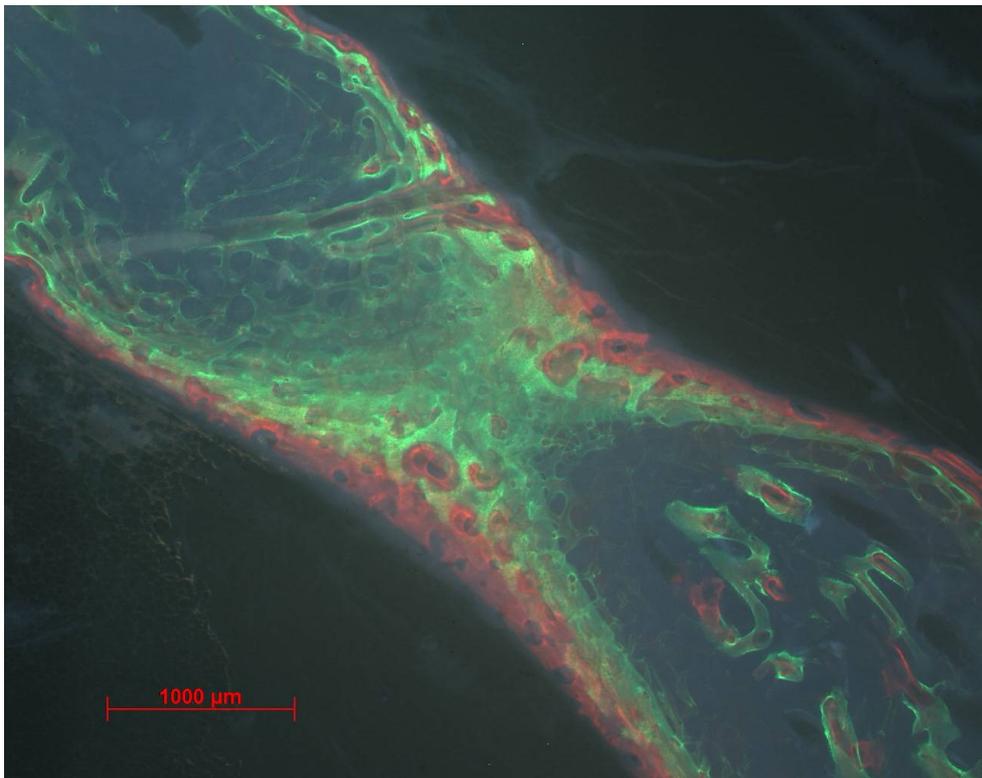


Abb. 38: Fluoreszenzaufnahme von B2; vollständige Überbrückung des Defekts mit 8. Wochen (grün), Anbau von Knochen in der 10. Woche rot

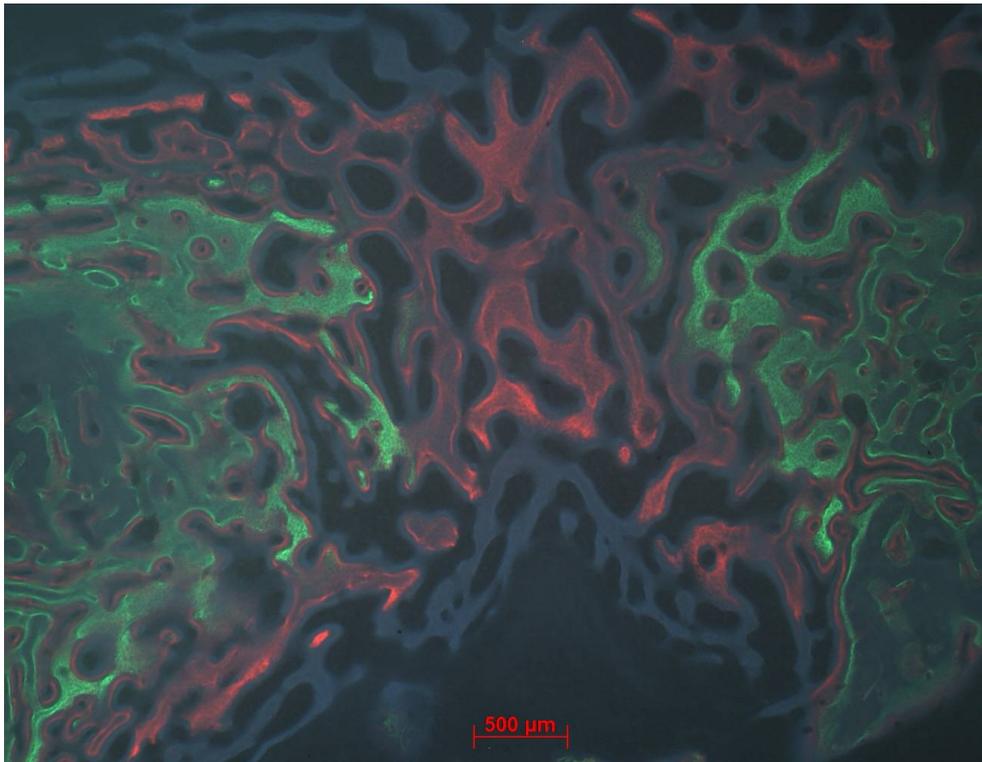


Abb. 39: Fluoreszenzaufnahme von Schaf C2, keine Überbrückung zum frühen Zeitpunkt (8 Wochen), erst nach der zweiten Fluoreszenzmarkierung, also nach 10 Wochen erfolgt die knöcherne Überbrückung des Defekts (rot)

### 3.5.3.2 (Semi-) Quantitative histologische Auswertung

Bei der statistischen Analyse der histologischen Auswertung erfolgte die einfaktorielle Varianzanalyse streng getrennt für die verschiedenen Auswertungsmethoden. Bei den Auswertungsmethoden nach Mosheiff und Wertz (Wertz et al. 1996; Mosheiff et al. 2003) wurde sowohl jeder einzelne Parameter als auch der Gesamtscore mittels Varianzanalyse auf Signifikanzen untersucht.

Das Signifikanzniveau wurde bei folgenden Teilrubriken erreicht, so dass sie anschließend mit dem post-Hoc Test nach Tukey analysiert werden konnten:

- Bestimmung des Knochenanteils in Prozent mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms GIMP
- alle 3 Rubriken, sowie der Gesamtscore bei der Methode nach Wertz
- 3 der 9 Felder, sowie der Gesamtscore bei der Methode nach Mosheiff

- **Knochenanteil in Prozent, bestimmt mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP**

Abb. 40 zeigt, dass wie zu erwarten bei der Leergruppe (Vergleichsgruppe D) signifikant weniger Knochenanteil festzustellen ist als bei der Vergleichsgruppe C (BMSC). Aber auch bei der Versuchsgruppe A (ASC) fiel der prozentuale Knochenanteil signifikant geringer aus als bei der Vergleichsgruppe C mit BMSC.

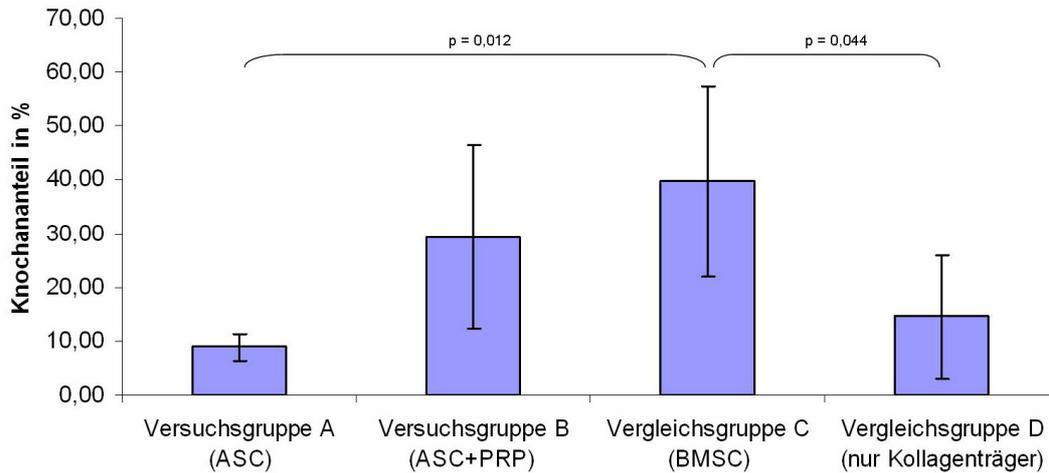


Abb. 40: Knochenanteil in Prozent der Versuchs- und Vergleichsgruppen, bestimmt mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms GIMP

**Histologische Auswertung modifiziert nach Werntz**

In allen Rubriken dieser Auswertungsmethode, sowie beim Gesamtscore (Abb. 41) schneidet die Versuchsgruppe A (ASC) signifikant schlechter ab, als die Vergleichsgruppe C (BMSC).

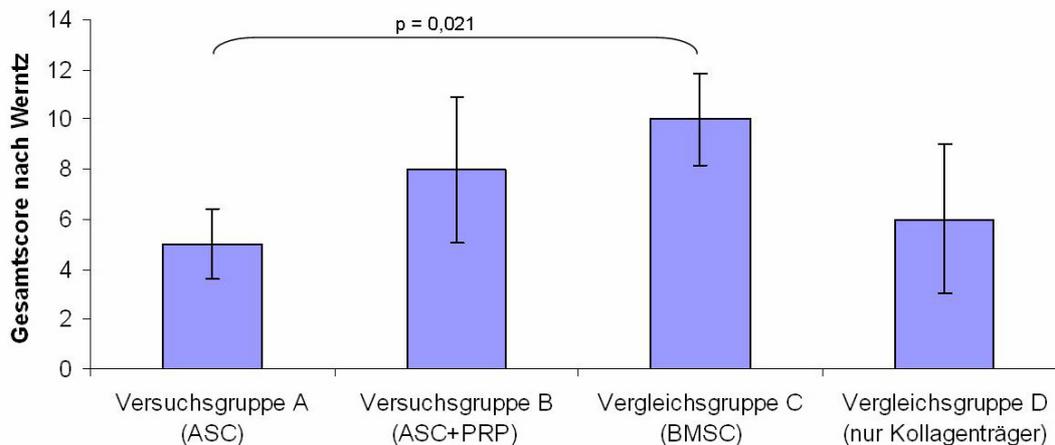


Abb. 41: Gesamtscore nach Werntz: Vergleich der Mittelwerte der Versuchs- und Vergleichsgruppen mit Standardabweichung

In der Rubrik „Remodeling“, sowie im Gesamtscore sind keine weiteren signifikanten Unterschiede zu sehen.

In der Rubrik der Verknöcherung (bone formation) schneidet nicht nur die Versuchsgruppe A (ASC), sondern hier auch die Vergleichsgruppe D (nur Kollagenträger) signifikant schlechter ab, als die Vergleichsgruppe C (BMSC). Die um PRP ergänzte Versuchsgruppe B (ASC+PRP) ist hier der Versuchsgruppe A (ASC) knapp signifikant überlegen (Abb. 42).

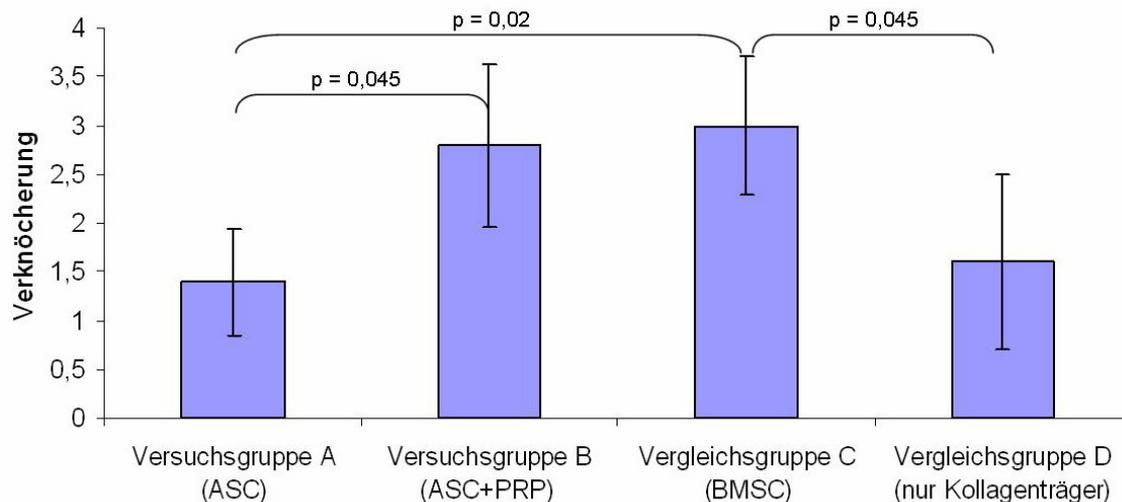


Abb. 42: Verknöcherung bei der Auswertungsmethode nach Wentz

In der Rubrik „Union“, die die Überbrückung beurteilt, schneidet die Vergleichsgruppe C ebenfalls signifikant besser ab als die Vergleichsgruppe D ( $p=0,022$ ) und die Versuchsgruppe A ( $p=0,011$ ).

### **Histologische Auswertung modifiziert nach Mosheiff**

Wie beim Gesamtscore nach Wertz zeigt sich auch beim Gesamtscore nach Mosheiff die signifikante Überlegenheit der Vergleichsgruppe C gegenüber der Versuchsgruppe A (Abb. 43). Auch in einem der drei Einzelfelder (Feld 4), bei denen das Signifikanzniveau erreicht wurde treten zwischen diesen Gruppen signifikante Unterschiede auf ( $p=0,028$ ).

## Ergebnisse

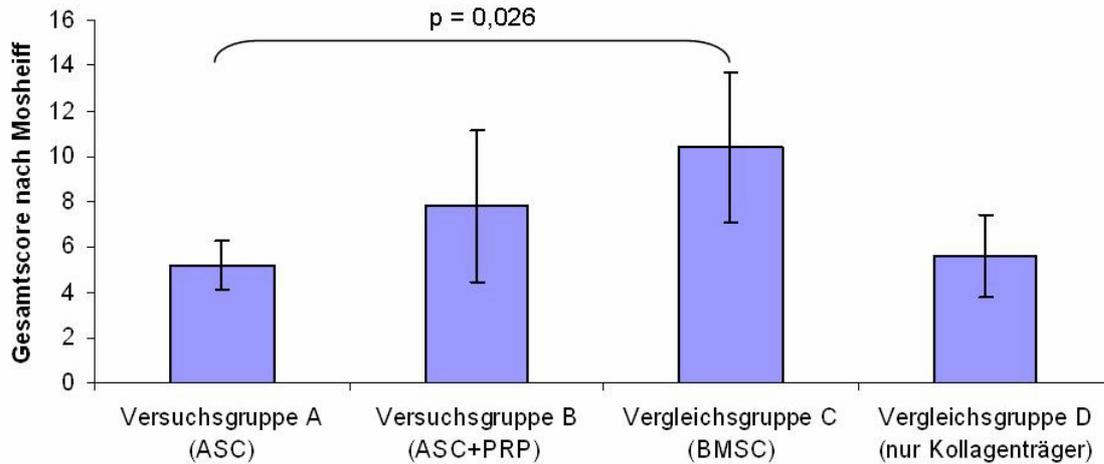


Abb. 43: Gesamtscore bei der Auswertungsmethode nach Mosheiff

Bei den anderen zwei Einzelfeldern (Feld 1 und 9) jedoch treten die signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppe C und D auf ( $p=0,004$ ;  $p=0,008$ ). Bei Feld 9 ist zusätzlich die PRP-Gruppe (Versuchsguppe B) signifikant besser als die Leergruppe (Vergleichsgruppe D) ( $p=0,028$ ).

## 4 Diskussion

Die Herstellung von Knochengewebe mit Hilfe des Tissue Engineering ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet, um Knochendefekte verschiedenster Ursachen zu beheben. Das Prinzip des Tissue Engineering basiert dabei auf der Kombination von osteokonduktiven, osteoinduktiven, sowie osteogenen Komponenten.

Inhalt dieser Studie war es zum Einen *in vitro* die Isolation von ovinen ASC, als osteogener Komponente zu etablieren und den Stammzellcharakter der isolierten Zellen zu bestätigen. Auch die verwendete osteoinduktive Komponente, das PRP wurde vor dem *in vivo-Einsatz*, *in vitro* hinsichtlich der Auswirkungen auf ASC untersucht.

Zum Anderen wurde eine *in vivo*-Studie durchgeführt, um die Fähigkeit von ovinen ASC zur Knochenregeneration im langstreckigen Knochendefekt zu untersuchen und mit dem Einsatz von ovinen BMSC zu vergleichen. Außerdem wurde der Einfluss von PRP als osteoinduktiver Zusatz zu den ASC untersucht.

### 4.1 Isolation und Expansion der ovinen ASC

Besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf die verwendete osteogene Komponente, nämlich auf die ovinen Fettstammzellen gelegt.

Die Verwendung von Fettstammzellen im Rahmen des Tissue Engineering hat mehrere Vorteile. Zum einen ist die Verwendung dieser adulten Stammzellen im Gegensatz zu den kontrovers diskutierten embryonalen Stammzellen ethisch unbedenklich. Der Vorteil von Fettstammzellen liegt außerdem in der komplikationsloseren, weniger invasiven und damit auch weniger schmerzhaften Entnahme von Fettgewebe, verglichen mit der Punktion von Knochenmark, das ja als gängige Quelle für adulte Stammzellen gilt.

Während humane und murine Fettstammzellen hinreichend beschrieben wurden, ist eine Charakterisierung und Differenzierung in die drei mesenchymalen Linien von ovinen ASC in der Literatur bisher nicht zu finden. Auch die ovinen BMSC sind eher unzureichend untersucht. Lediglich die Charakterisierung von Stammzellen aus ovinen Nabelschnurblut (Jager et al. 2006), sowie von bovinen BMSC (Bosnakovski et al. 2005) konnte nach ausführlicher Recherche entdeckt werden.

Die Isolation der Zellen aus dem ovinen Fettgewebe konnte durch Kombination der Protokolle nach Winter/Hauner (Winter et al. 2003;Hauner et al. 1989) und Knippenberg/Zuk (Knippenberg et al. 2005;Zuk et al. 2001) erfolgreich etabliert werden.

Über einen Kollagenase-Verdau wurden die Zellen enzymatisch aus dem Fettgewebe herausgelöst und über Zentrifugation von den Adipozyten getrennt. Die isolierten plastikadhärenten Zellen zeigten einen fibroblastenähnlichen Phänotyp.

Die weitere Kultivierung von Stammzellen kann in Standardmedien (DMEM mit bis zu 20% Kälberserum) erfolgen (Sekiya et al. 2002). Wie bei BMSC hat sich jedoch auch bei ASC ein Expansionsmedium mit nur 2% Kälberserum unter dem Zusatz der Wachstumsfaktoren Platelet-Derived Growth Factor BB (PDGF-BB) und Epidermal Growth Factor (EGF) als günstiger für die Stammzellproliferation erwiesen (Reyes et al. 2001;Winter et al. 2003). Ebenso wie für BMSC wirkt sich auch bei ASC eine Kultivierung unter subkonfluenten Bedingungen positiv auf die Zellproliferation aus.

Insgesamt zeigten die ovinen ASC mit durchschnittlich 1,23 PD/24h ein außergewöhnlich hohe Proliferationsrate. Das stimmt mit den Beobachtungen von Cowan et al. (2004) überein, die den ASC ebenfalls ein überdurchschnittlich gutes Proliferationsverhalten verglichen mit BMSC bescheinigten. Da ASC in Kultur also augenscheinlich intensiv proliferieren, können die enorm hohen Zellzahlen, die für klinische Applikationen notwendig sind, schnell erreicht werden, was einen weiteren Vorteil dieser Zellquelle ausmacht.

Dieses gute Proliferationsverhalten ließ auch bei längerdauernder Expansion über 10 Passagen nicht nach, wie exemplarisch gezeigt werden konnte. Auch nach 22 Passagen waren in Vorversuchen noch sich teilende Zellen zu erkennen, was die von Lee beschriebenen hohen Passagezahlen von bis zu 20 bestätigen (Lee et al. 2004).

Durch die beschriebene Plastikadhärenz, gemeinsam mit dem fibroblastenähnlichen Aussehen ist bereits eines der Kriterien des „Tissue Stem Cell Committee“ für mesenchymale Stammzellen erfüllt. Der außerdem geforderte Nachweis der spezifischen Oberflächenmarker ist für das Schaf nicht ohne weiteres möglich, da hier in der Breite keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung stehen. Zum weiteren Beweis des Stammzellcharakters wurde deshalb, der Differenzierungsnachweis in alle drei Richtungen erbracht.

## 4.2 Differenzierung der ovinen ASC

Dafür erfolgte nach ausreichender Proliferation der Zellen eine Umstellung auf Kulturbedingungen, die eine Entwicklung in eine spezifische mesenchymale Linie induzieren.

Wie bereits eine Vielzahl von Studien für ASC verschiedener Spezies demonstrierten (Winter et al. 2003;Zuk et al. 2001;Zuk et al. 2002;De Ugarte et al. 2003;Sakaguchi et al. 2005;Dragoo et al. 2003;Erickson et al. 2002;Halvorsen et al. 2001;Kern et al. 2006;Lee et al. 2004;Wagner et al. 2005;Hattori et al. 2004;Wickham et al. 2003), konnte auch für ovine ASC die Differenzierungsfähigkeit in die drei mesenchymalen Richtungen in dieser Studie nachgewiesen werden.

Überraschenderweise war die Adipogenese der untersuchten ovinen ASC jedoch in keinem der Fälle so überzeugend, wie dies bei humanen ASCs oder BMSCs zu sehen ist. Möglicherweise stellt das verwendete Induktionsmedium mit Indomethacin, Isobutylxanthin, Insulin und Dexamethason keine geeignete Mediumkomposition für ovine ASC dar. Anders als Jäger 2006 et al. (2006) und Bosnakovski et al. (2005), die die Adipogenese bei ovinen bzw. bovinen MSC ebenfalls mit den genannten Komponenten induzieren, konnten in dieser Arbeit damit keine flächendeckende adipogene Differenzierung im Monolayer erzielt werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Broad und Ham (1983) überein, die keine positive Beeinflussung der Adipogenese von „präadipozytären Fibroblasten“ aus dem Fettgewebe und der Haut durch Dexamethason oder Isobutylxanthin feststellen konnten. Auch hohe Insulinkonzentrationen scheinen den Prozess der adipogenen Differenzierung nicht zu beeinflussen (Broad and Ham 1983).

Auch ein chondrogenes Differenzierungspotential konnte für die untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Mit TGF- $\beta$ 3 alleine war jedoch keine ausreichende Chondrogenese möglich, was mit den Ergebnissen der Arbeit von Winter et al. (2003) übereinstimmt. Ähnlich der Ergebnissen von Henning et al. (2006) und Estes et al. (2006) konnten mit TGF- $\beta$ 3 und BMP-6 bei einem Großteil der Pellets positive Ergebniss der Chondrogenese erzielt werden (44,8% in der Alzianblaufärbung und 46,7% für Kollagen Typ II).

Diese Ergebnisse wurden aber durch die Kombination von TGF- $\beta$ 3 und BMP-2 übertroffen, wobei 85,7% der Pellets in der Alzianblaufärbung, und 65,2% in der Kollagen Typ II Färbung eine sehr gute Anfärbbarkeit zeigten.

BMP-2 induziert bei embryonalen Stammzellen, Progenitorzellen aus dem Periosteum und der myogenen Zelllinie C2C12 einen ausschließlich osteogenen Phänotyp (Iwasaki et al. 1994; Lee et al. 2003; Kawaguchi et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurde bei Stammzellen aus dem Knochenmark ein osteo- und chondroinduktives Potential von BMP-2 beobachtet (Sekiya et al. 2005). Schmitt et al. induzierte mit 50 ng/ml rekombinantem BMP-2 einen ausschließlich chondrogenen Phänotyp bei BMSC. Die Zugabe von TGF- $\beta$ 1 verstärkt bei diesen Zellen zusätzlich die knorpeltypische extrazelluläre Matrixsynthese (Indrawattana et al. 2004).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, zeigte auch bei Mehlhorn und Kollegen (2007) die Kombination von BMP-2 (allerdings 50ng/ml) und TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) die besten Ergebnisse in der Chondrogenese; sie postulierten synergistische Effekte der beiden Faktoren bezüglich der Chondroitinsulfatsynthese.

Der Untersuchung der Osteogenese galt in dieser Studie besondere Aufmerksamkeit, da wir uns durch sie Hinweise auf die in vivo Knochenbildung erhofften. Bei beiden verwendeten Medien (mit 10 bzw. 20% FCS) konnte eine Mineralisierung anhand der quantitativen Alizarinrot-S Färbung eindeutig nachgewiesen werden. Die Alizarinrot-S Färbung wird bereits seit Jahrzehnten verwendet um die Ablagerung von kalziumreicher Matrix von Zellen nachzuweisen (Gregory et al. 2004) und ist weit verbreitet um die mit der osteogenen Differenzierung von Stammzellen verbundenen Mineralisierung nachzuweisen (de Girolamo et al. 2007; Lee et al. 2004).

Wie auch in dieser Studie, konnte für ASC bereits in einer Vielzahl von Studien die Fähigkeit zur Mineralisierung nachgewiesen werden (Zuk et al. 2001; Halvorsen et al. 2001; Dragoo et al. 2003; Hattori et al. 2004; Ogawa et al. 2004). In diesen Studien wurden jedoch hauptsächlich humane ASC verwendet, zum Teil auch ASC aus der Maus, der Ratte oder dem Kaninchen. Nur Knippenberg et al. (2005) verwendeten wie in der vorliegenden Studie ovine ASC. Auch für BMSC ovinen Ursprungs sind in der Literatur nur vereinzelt Nachweise der Fähigkeit zur Mineralsierung vorhanden: Jäger et al (2006) beschrieben zwar nach etwa 16 bis 20 Tagen der Differenzierung die Formation von sogenannten Knochenknötchen, zeigten aber als Nachweis der osteogenen Differenzierung nur die positive Antikörperreaktion gegenüber Osteopontin.

Beim Vergleich der beiden Medien zeigten sich nach 21 sowie 28 Tagen keine signifikanten Unterschiede im Mineralsierungsgrad. Es zeigte sich aber, dass durch die erhöhte FCS-Konzentration eine Mineralisierung schon früher einsetzte, sodass beim Medium mit 20% FCS signifikante Anstiege zwischen zwei Messzeitpunkten schon von Tag 7 auf Tag 14 zu sehen waren, während beim 10%FCS-haltigen Medium erst von der 2. auf die 3. Woche solche Unterschiede festzustellen waren.

Der Nachweis eines Anstieges der ALP Aktivität ist ein weiterer gängiger Beweis für die osteogene Differenzierung, da bekannt ist, dass dieser Marker während der Osteogenese hochreguliert wird. Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen ALP als Marker der frühen Osteogenese (zwischen Tag 7 und 10) beschrieben wird (Jaiswal et al. 1997;Kasten et al. 2004;Bruder et al. 1998;Siddappa et al. 2007) konnte in dieser Arbeit erst nach 28 Tagen ein 3-facher Anstieg der ALP-Aktivität festgestellt werden. Übereinstimmend mit diesen relativ niedrigen Anstiegen der ALP-Aktivität, stellten auch Kon E. und Kollegen (2000) fest, daß ovine BMSC im Gegensatz zu humanen MSC auf die osteogene Induktion mit Dexamethason keinen Anstieg in der ALP-Aktivität aufwiesen. Auch in der Arbeit von Kruyt et al. (2004) konnte bei BMSC aus Ziegen durch Dexamethason und Glycerophosphat nach 6 Tagen keine eindeutigen Unterschiede in der ALP-Aktivität erreicht werden. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Knippenberg et al. (2005) die bei ASC aus Ziegen eine 8-fache Steigerung der ALP-Aktivität nach 3 Wochen beobachteten. Zur osteogenen Induktion verwendeten sie allerdings Vitamin D<sub>3</sub>, anstatt Dexamethason. Laut Zuk et al. (2002) reagieren humane ASC und BMSC bei der osteogenen Differenzierung genau gegensätzlich auf die Verwendung von Dexamethason: Während BMSC auf die Induktion mit Dexamethason mit einer gesteigerten ALP-Aktivität reagieren, weisen ASC signifikant geringere ALP-Aktivitäten auf. Genau gegenteilig ist die Reaktion auf die Induktion mit Vitamin D, hier reagieren ASC mit erhöhten ALP-Konzentrationen, während BMSC kaum ansprechen. Möglicherweise sprechen sowohl ovine ASC, wie auch ovine BMSC besser auf eine Induktion mit Vitamin D an, womit auch die Ergebnisse von Kruyt und Kon erklärbar wären, da beide Dexamethason zu Induktion verwendet haben.

Eine weitere mögliche Ursache für die geringen Unterschiede wäre die unzureichende Sensitivität des Testverfahrens. Es wird aber für humane BMSC erfolgreich in unserer und auch in anderen Arbeitsgruppen eingesetzt.

Auch eine unzureichende Sensitivität ausschließlich gegenüber oviner ALP-Aktivität ist unwahrscheinlich, da Knippenberg et al. (2005) mit derselben Methode bei der Ziege einen 8-fachen Anstieg feststellen konnten, und auch Collignon (1997) dieselbe Methode bei Schafzellen verwendete.

Die beschriebene Spendervariabilität ist ein bekanntes Phänomen bei der Expansion und Differenzierung von MSC. Siddappa et al. (2007) beschrieben dies für die Expression von ALP und stellten keine statistisch signifikante Korrelationen mit Alter, Geschlecht oder Isolationsquelle fest.

### **4.3 Plättchenreiches Plasma**

Als osteokonduktive Komponente wurde in dieser Studie PRP als Quelle von Wachstumsfaktoren verwendet, da es eine attraktive Alternative zu teuren, künstlich hergestellten Wachstumsfaktoren darstellt.

Trotz uneinheitlicher Ergebnisse bisheriger Studien wird PRP heute schon - vor allem in der Zahnmedizin - klinisch zur Knochenregeneration eingesetzt. Auch im orthopädischen Bereich existieren einige kontroverse Studien über den Nutzen dieses autologen Produktes im Bereich der Knochenheilung. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien sind zum Teil darauf zurückzuführen, dass es bei der Verwendung von PRP keine einheitlichen Richtlinien für die Herstellung und Aktivierung gibt, sowie außerdem bisher kein Konsens über die einzusetzenden Konzentrationen besteht. Das bedeutet, dass je nach Herstellungs bzw. Aktivierungsmethoden schlussendlich unterschiedliche Konzentrationen an Thrombozyten und somit auch Wachstumsfaktoren eingesetzt werden, die möglicherweise die kontroversen Ergebnisse verschiedener Studien erklären.

	Thrombozyten (pro $\mu$ l)	PDGF-AB (ng/ml)	TGF- $\beta$ 1 (ng/ml)
Weibrich et al. 2002	$1,4 \times 10^6$ (+/- 320.000)	117,5 (+/-63)	169 (+/-84)
Marx 2004	$0,34 \times 10^6$ - $1.08 \times 10^6$ (je nach Herstellungsverfahren)	26-133 (je nach Herstellungsverfahren)	35-170 (je nach Herstellungsverfahren)
Kawase et al. 2005		166	126
Vogel et al. 2006	$1,5 \times 10^6$	120,9	239,8
Kasten et al. 2006	$0,8 \times 10^6$ - $1.3 \times 10^6$	79,7 (+/-58,3)	156,1 (+/-118,2)

Tab. 9: Angaben aus der Literatur bezüglich der Konzentration von Thrombozyten und Wachstumsfaktoren

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde in dieser Arbeit deshalb die Thrombozytenkonzentration, sowie die TGF- $\beta$ 1- und PDGF-AB Konzentration bestimmt.

Die Thrombozytenkonzentration lag in den gepoolten PRP-Proben nach einmaligem Auftauen bei  $1.4 \times 10^6$  Plättchen/ $\mu$ l. Wenn man also von einer durchschnittlichen Thrombozytenkonzentration im Blut von  $20 \times 10^4$  +/-  $7.5 \times 10^4$  (Marx 2004) ausgeht, konnte eine mehr als 5-fache Anreicherung der Thrombozyten erzielt werden. Die von Marx (2004) geforderten Richtwerte für ein „therapeutische PRP“ konnten somit erreicht werden.

Der Gehalt an PDGF-AB liegt mit 185,67ng/ml eher im oberen Bereich der in der Literatur angegebenen Werte. Die umfassende Studie von Weibrich et al. (2002) mit 115 Spender ergab interindividuelle Unterschiede im Bereich von 12,9 ng/ml bis zu 293 ng/ml, mit einem Durchschnitt bei 117,5 ng/ml. Marx (2004) stellte je nach Herstellungsverfahren Werte von 26 ng/ml bis zu 133 ng/ml fest.

Der Wert der TGF- $\beta$ 1-Konzentration lag mit 97,11 ng/ml innerhalb der in der Literatur angegebenen Bereiche, wenn auch eher im unteren Bereich. Interessant ist auch hier die Studie von Weibrich, die auch für TGF- $\beta$ 1 enorme interindividuelle Schwankungen zeigt, wobei die Werte zwischen 1,5 ng/ml und 366,1 ng/ml liegen (Weibrich et al. 2002).

Diese großen Schwankungen korrelieren dabei weder mit dem Alter der Patienten, noch dem Geschlecht oder der Thrombozytenzahl im Blut (Weibrich et al. 2002).

Durch die Verwendung von gepoolten PRP-Proben konnte die Einflüsse einzelner Individuen minimiert und insgesamt durchschnittliche Wachstumsfaktorkonzentrationen erzielt werden. Im Vergleich mit den Konzentrationen im FFP konnte für PDGF-AB eine ca. 200-fache Anreicherung festgestellt werden, und eine ca. 40-fache Anreicherung für TGF- $\beta$ 1.

Da die zweimal aufgetauten, für die *in vitro* Versuche verwendeten Aliquots keine offensichtlichen Unterschiede zu den einmal aufgetauten Proben zeigten, ist eine Vergleichbarkeit zu den *in vivo* Versuchen dahingehend gewährleistet.

Für die *in vivo* Experimente war eine Aktivierung durch Kalzium und Thrombin sinnvoll, denn die dadurch entstehende Gelformation erleichterte den Einsatz des PRPs im OP-Saal. Es ermöglichte das Aufbringen des PRP-Gels direkt auf den schon im Defekt befindlichen Träger und verhinderte durch die schnelle Verfestigung einen Verlust von Plättchen in die Umgebung (Frechette et al. 2005).

Kalzium und Thrombin regulieren außerdem konzentrationsabhängig die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Frechette et al. 2005; Lacoste et al. 2003). Die Arbeitsgruppe um Frechette untersuchte, die Aktivierung von PRP mit verschiedenen Konzentrationen von Kalzium und Thrombin (142,8 IE Thrombin/ml und 14,3mg/ml CaCl<sub>2</sub>, sowie eine 5-fache und 25-fache Verdünnung davon). Sie zeigten, dass die Effekte von Kalzium und Thrombin, sich je nach Wachstumsfaktor unterscheiden: höchste EGF-Konzentrationen wurden durch die hohen Konzentrationen von Kalzium und Thrombin erzielt, während die höchsten Angiotensin-2-Werte durch die 25-fache Verdünnung erreicht werden konnten. Die IGF-Konzentrationen waren bei allen 3 Konditionen gleich hoch. Nicht untersucht wurden die Auswirkungen auf TGF- $\beta$ 1 und PDGF-A. Die Studie zeigt aber, genauso wie die Arbeit von Lacoste et al., dass je nach Wachstumsfaktor, unterschiedliche Kalzium und Thrombinkonzentrationen vorteilhaft sein können (Lacoste et al. 2003; Frechette et al. 2005).

Die verwendete Thrombinkonzentration von 2,5 IE pro ml PRP liegt innerhalb des von Maloney festgestellten Bereiches von 0,5 bis 4 IU/ml, in dem eine maximale Plättchenaggregation erfolgt (Maloney et al. 1998).

Die typischerweise verwendeten Thrombinkonzentrationen, die bei klinischen Anwendungen verwendet werden liegen zwischen 100 und 200 IU/ml (Marx et al. 1998). In unserer Studie wurde allerdings versucht, die Thrombinkonzentrationen möglichst ge-

ring zu halten, da einige Arbeitsgruppen einen positiven z.T. dosisabhängigen Effekt auf die Proliferation von Osteoblasten postulieren (Tatakis et al. 1991), und in dieser Arbeit isoliert der Effekt von PRP untersucht werden sollte (Tatakis et al. 1989;Tatakis 1992;Tatsuyama et al. 2000). Mit der Verwendung von 2,2 IE/ml PRP, war bei den 1%igen Mediumansätzen nur 0,02 IE Thrombin/ml, und bei den 10%igen Ansätzen 0,22 IU Thrombin pro ml Medium vorhanden.

#### **4.3.1 Einfluss von PRP auf Osteogenese und Proliferation**

In der vorliegenden Arbeit konnte ein positiver Einfluss von PRP auf die Osteogenese *in vitro*, wie von Goto und Kollegen (2006) und der Arbeitsgruppe um Kanno (2005) beschrieben, nicht bestätigt werden. Bei Betrachtung der Mittelwerte fiel vor allem bei der hohen PRP-Konzentration vielmehr eine tendenziell schlechtere Osteogenese auf, wobei die Unterschiede statistisch nicht signifikant waren. Auch Apornmaeklong et al. (2004) und Gruber et al. (2006) sprechen von einer Hemmung der Osteogenese durch PRP: Gruber et al. (2006) verwendeten für ihre Studie PRS (Platelet-released supernatant= aus Thrombozyten freigesetzter Überstand), das auch in zahlreichen anderen Studien verwendet wird. Durch diesen Überstand konnte er die durch Bone Morphogenic Proteins induzierte osteogene Differenzierung von Zelllinie unterdrücken. Apornmaeklong et al. (2004) untersuchten in einem dreidimensionalen Zellkultursystem auf porösen Kollagenträgern den Effekt von PRP in verschiedenen Konzentrationen, PPP und von rhBMP-2. Dabei zeigte sich, dass durch PRP zwar eine dosisabhängige Stimulation der Proliferation erzielt werden konnte, die ALP-Aktivität und Kalziumablagerung jedoch reduziert wurden. BMP-2 wiederum führte zu genau gegensätzlichen Zellreaktionen.

Die von Apornmaeklong et al. (2004) gezeigte dosisabhängige Stimulation der Proliferation konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden. Durch eine Supplementierung mit 10%PRP war eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Steigerung der Proliferation anhand der Gesamtproteinkonzentrationen erkennbar. Deshalb kann von einer proliferationsfördernden Wirkung von PRP ausgegangen wird.

Diese Annahme wird unterstützt, da die Mehrzahl der Studien zu dem Schluss kommt, dass sich PRP oder PRS positiv auf die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen oder Knochenzellen auswirkt (Weibrich et al. 2002;Gruber et al. 2002;Oprea et al.

2003;Kanno et al. 2005;Kawase et al. 2005;Graziani et al. 2006). Dabei wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Proliferation bis zu einem Plateau festgestellt (Graziani et al. 2006;Weibrich et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte eine hochgradige proliferationsfördernde Wirkung mit einer Konzentration von 10% PRP festgestellt werden. Vorversuche mit 20% PRP führten zu einer frühzeitigen Ablösung der Zellen, so dass eine weitere Auswertung nicht möglich war und diese Konzentration somit für weitere Versuche nicht mehr in Frage kam.

Für die Stimulierung der Proliferation machten Gruber et al. (2002) neben Wachstumsfaktoren wie PDGF die ebenfalls bei Aktivierung der Plättchen freigesetzten Mikropartikel (Membranvesikel an der Thrombozytenoberfläche) sowie die Zellmembran verantwortlich.

Die Versuchsgruppen mit FFP stellen eine wichtige Kontrolle für die Wirksamkeit, der in PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren dar.

Bei Betrachtung des Proteinverlaufs dieser Kontrollgruppe fällt auf, dass auch mit hohen FFP-Konzentrationen eine tendenzielle Proliferationsteigerung auftritt, wenn auch deutlich schwächer, als dies mit PRP der Fall ist. Auch Arpornmaeklong et al. (2004) stellte fest, dass Plasma selbst einen Cocktail von Wachstumsfaktoren enthält, der die Proliferation von BMSC fördern kann.

Analog zu den Ergebnissen mit PRP, fällt auch bei hohen FFP-Konzentrationen die Osteogenese deutlich schlechter aus als bei niedrig konzentriertem FFP. In Einklang mit der Studie von Gruber et al. (2002), liegt die Vermutung nahe, dass die proliferationsfördernden und in hohen Konzentrationen osteogenesehemmenden Effekte nicht ausschließlich auf die in den Thrombozyten enthaltenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen sind.

#### **4.4 Einsatz von ATSC mit oder ohne PRP auf mineralisiertem Kollagen in einem Defektmodell kritischer Größe im Schaf**

Zur Beurteilung der Eignung von ASC im klinischen Einsatz sollen die ASC *in vivo* im Tiermodell mit den bereits gut untersuchten BMSC verglichen werden. Zusätzlich wird der Zusatz der potentiell osteoinduktiven Komponente PRP evaluiert.

##### **4.4.1 Tiermodell**

Bei der Entwicklung neuer Therapieverfahren ist zunächst eine *in vitro* Überprüfung der Methode vorgesehen und notwendig. Anschließend kann die Fragestellung außerdem an einem möglichst einfachen Tiermodell überprüft werden (Buma et al. 2004). Vor einem möglichen klinischen Einsatz eines neuen Therapieverfahrens beim Menschen ist die Überprüfung an einem, dem humanen System möglichst ähnlichen Modell erforderlich. In der Unfallchirurgie und Orthopädie stellten sich Großtiermodelle dafür als am besten geeignet heraus. Dies liegt unter anderem daran, dass die Knochenheilungsgeschwindigkeit mit der Position der Spezies in der phylogenetischen Reihenfolge korreliert (den Boer et al. 1999).

Für diese Studie wurde das Schaf als Versuchstier gewählt, da es bereits bei einer Vielzahl von Studien zur Knochenheilung erfolgreich eingesetzt wurde (Lanyon et al. 1975;Claes et al. 1997;Finlay et al. 1995) und damit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist.

Der wichtigste Grund für die Versuchstierwahl stellte aber die gute Übertragbarkeit der erzielten Versuchsergebnisse auf den Menschen dar. Die ist nach Angaben von Metak bei Schafen am besten gewährleistet (Metak et al. 1998). Dies liegt zum Einen daran, dass die Schafstibia als englumiger Röhrenknochen exakt in der Tragachse steht und somit mit der Tibia des Menschen biomechanisch vergleichbar ist, da beide die Körperlast tragen. Zum Anderen ähneln sich die Schafstibia und die Tibia des Menschen in Form und Struktur, wodurch sich nach dem Wolffschen Gesetz auf eine ähnliche Belastungsfunktion schließen lässt (Wolff 1892). Außerdem stellten Lanyon et al. (1975) fest, dass in der normalen Laufphase von Schaf und Mensch ähnliche Maximalbelastungen vorherrschen.

Wichtig ist auch, dass beim Schaf, durch die ausführlichen Untersuchungen der Knochenheilung und des Remodelling (Nunamaker 1998), die Physiologie der Knochenregeneration gut bekannt ist und somit Abweichungen einfacher festgestellt werden

können. Wissing et al. (1990) zeigte außerdem, dass sich Schafsknochen für vergleichende Untersuchungen bezüglich der Knochenheilungsprozesse gut eignet. Unterschiede bestehen jedoch in der Knochenfeinstruktur, der Gefäßversorgung und der Stoffwechselaktivität. Während Schafsknochen vorwiegend aus primären Osteonen aufgebaut sind, bestehen humane Knochen vor allem aus sekundären Osteonen. Eitel et al. (1991) weisen deshalb darauf hin, dass die Struktur der Schafsosteone nur eingeschränkt mit der des menschlichen Knochens vergleichbar ist. Das Remodelling geschieht jedoch bei beiden Spezies über Sekundärosteone (Wissing H. et al. 1990). Den Boer et al (1999) sprechen deshalb davon, dass das Schaf ein geeignetes Modell für die Knochenregeneration und Remodelling-Aktivität des Menschen ist. Ein weiterer Vorteil in der Nutzung von Schafen als Versuchstiere ist, dass die knöchernen Dimensionen an den Hintergliedmaßen des Schafes denen des Menschen ähnlich sind (Finlay et al. 1995;Claes et al. 1997), und somit beim Schaf dieselben Instrumente und Implantate eingesetzt werden können, wie sie in der Klinik beim Menschen verwendet werden (Martini et al. 2001). Außerdem entspricht auch ihr Körpergewicht in etwa dem des Menschen.

Schafe eignen sich auch aufgrund ihrer guten Handhabbarkeit, sowie der relativ geringen Anschaffungskosten für die Nutzung als Versuchstiere (Nunamaker 1998).

Der Hund, der ebenfalls als geeignetes Tiermodell genannt wird (Eitel et al. 1981) , sowie die aufgrund der großen knöchernen Übereinstimmung attraktiven Primaten, wurden aus ethischen aber auch aus finanziellen Gründen nicht in Erwägung gezogen. Das Schwein und das Kaninchen sind häufig verwendete Tiermodelle, die jedoch aufgrund der unterschiedlichen Dynamik der Knochendefektheilung hier als weniger geeignet erschienen (Metak et al. 1998). Speziell das Kaninchen kam aufgrund sehr schnellen Knochendefektheilung nicht in Frage, da dadurch ein Vergleich mit der Frakturheilungszeit des Menschen unmöglich ist (Sturmer und Schuchardt 1980;Metak et al. 1998). Pferd und Rind zeigen zwar dem Menschen sehr ähnliche Heilungszeiten (Roach et al. 1989), wurden aber aus finanziellen und praktischen Gründen nicht in Betracht gezogen.

Um die Knochenneubildung beurteilen zu können musste ein System gewählt werden, in dem es unter physiologischen Bedingungen ohne Therapie zu keiner Ausheilung kommt. Diese sogenannten „Critical Size Defekte“ werden definiert als kleinste Knochendefekte in einem bestimmten Knochen einer speziellen Tierart, der während der

gesamten Lebenszeit des Tieres nicht spontan zur Ausheilung kommt (Gugala und Gogolewski 1999; Schmitz und Hollinger 1986). Die Größe dieses Defekts ist von verschiedenen Faktoren wie Tierart, Alter des Tieres, Art des Knochens, Osteosyntheseverfahren und Fixation abhängig.

Die Defektgrößen, die als kritisch angesehen werden liegen bei der Mehrzahl der Studien zwischen 3 und 4 cm bei Tibiadeфекten beim Schaf (Bloemers et al. 2003; Chistolini et al. 1999; den Boer et al. 1999; den Boer et al. 2003; Gugala und Gogolewski 1999; Wippermann et al. 1999). Das stimmt überein mit den Angaben von Yuehwei HA und Friedman JR (1999), die als Richtlinie für die Länge eines "Critical size defect" das Zweifache des Durchmessers der Diaphyse definierten. Der durchschnittliche Durchmesser der mittleren Diaphyse der Tibia des Schafes beträgt in etwa 1,5 cm. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie eine Defektgröße von 3 cm verwendet. Außerdem konnte im Rahmen einer vorausgegangenen Dissertation gezeigt werden, dass bei den Pilottieren, bei denen der Defekt leer belassen wurde, auch bei einer verlängerten Standzeit von 12 Monaten es zu keiner Ausheilung des Knochendefektes kommt (Vohrer 2007). Histologisch zeigte sich in den Pilottieren eine straffe Pseudarthrose, während röntgenologisch nur ansatzweise eine von den Osteotomiestellen ausgehende Regeneration zu beobachten war. Der Nachweis, dass es sich bei dem vorliegenden Modell um ein Defektmodell kritischer Defektgröße handelt, konnte somit erbracht werden.

Neben der Verwendung eines Tibiadeфекts, sind in der Literatur außerdem Modelle an verschiedenen anderen langen Röhrenknochen wie Femur oder Metatarsus beschrieben. Der Zugang zum Femur ist aufgrund der großen Muskeln, die ihn bedecken, schwierig, außerdem ist seine dünnere Kortikalis problematisch. Am Metatarsus ist die Blutzufuhr aufgrund der geringen Muskulatur sehr limitiert, weshalb die beschriebenen sehr kleinen kritischen Defektgrößen von nur 0,6cm nicht verwundern. Die Vorteile der Tibia liegen demnach einerseits in dem einfachen chirurgischen Zugang und andererseits in der extrem guten Blutversorgung, da 2/3 der Tibia mit Muskulatur bedeckt sind.

Als Osteosynthesystem kommen prinzipiell 3 verschiedene Systeme in Frage. Der Einsatz eines intramedullären Nagels ist ein weitverbreiteter Ansatz (den Boer et al. 2003; den Boer et al. 1999; Wippermann et al. 1999; Hertel et al. 1994; Regauer et al. 2005; Sarkar et al. 2006), da die Komplikationsraten niedrig zu sein scheinen. Aller-

dings ist die Kombination mit einem Träger und Zellen schwierig, da das zu untersuchende Material nur in begrenzten Mengen eingebracht werden kann, weil der Nagel den Großteil des Defekts ausfüllt. Außerdem kann der Nagel mit dem eingebrachten Material interferieren und eine Beurteilung der Regeneration im spongösen Inneren der Röhrenknochen ist nicht möglich. Andere Gruppen verwenden erfolgreich externe Fixationsmethoden (Chistolini et al. 1999; Gugala und Gogolewski 1999; Marcacci et al. 1999; Moxham et al. 1996). Diese sind jedoch bei längeren Standzeiten mit Nachteilen behaftet, da Infektionen entlang des Pins und/oder Lockerung desselben entstehen können. Als dritte Möglichkeit kommt die Fixation mit Platten in Frage. Bei der Verwendung von nur einer Platte wurden inakzeptabel hohe Verluste durch Versagen des Fixationssystems festgestellt (Wefer et al. 2000), so dass einem System mit 2 Platten der Vorzug gegeben wurde. Der Nachteil der 2-Platten-Systeme ist die eingeschränkte Evaluierung des radiologischen Heilungsverlaufs aufgrund der röntgendichten Platten. Dieses Problem wurde hier durch die Verwendung einer neuartigen röntgendurchlässigen Carbonfaserplatte (Snakeplate) umgangen, wodurch das bildgebende Monitoring während der Standzeit jederzeit möglich ist. Im Unterschied zur Verwendung der intramedullären Stabilisierung kann mit diesem Doppelplattenmodell sowohl die kortikale Regeneration, als auch die Regeneration im spongiösen Bereich des Röhrenknochens untersucht werden. Der verwendete Träger war, im Gegensatz zu anderen häufig verwendeten Scaffolds wie TCP ebenfalls röntgendurchlässig. Dies führte dazu, dass ausschließlich die Neubildung von Knochen und Kallus evaluiert werden konnte, nicht aber die Integration des Scaffolds.

Die Auswertung der Röntgenbilder erfolgte wie beschrieben durch eine neuartige Methode mithilfe einer frei verfügbaren Computer Software (GIMP). Beim Vergleich dieser Methode mit den semiquantitativen Auswertungsmethoden nach Mosheiff et al. (2003) und Wernitz et al. (1996) konnten Schönberger et al. (2007) an zwei verschiedenen Tiermodellen eine signifikant bessere Objektivität nachweisen. Ähnliche Ergebnisse konnten bezüglich der Reliabilität festgestellt werden.

Die in dieser Studie verwendeten Schafe waren hinsichtlich Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht einheitlich. Dadurch und durch die randomisierten Gruppeneinteilung, sowie Haltung unter gleichen Umweltbedingungen wurden mögliche Beeinflussungen

durch externe Einwirkungen minimiert. Die verwendeten Hängematten halfen außerdem unterschiedliche Spitzenbelastung auf die Hintergliedmaße zu reduzieren.

Die Versuchsdauer wurde nach Vorversuchen mit einer Standzeit von 3 Monaten auf 6 Monate erhöht, da nach 3 Monaten erst eine beginnende Knochenbildung, jedoch noch keine knöchernen Durchbauung beobachtet werden konnte.

Die Komplikationsraten in Defektmodellen kritischer Größe liegt zwischen 2,5% (den Boer et al. 1999) und 22% (Wefer et al. 2000). In dieser Studie musste ein Tier der Versuchsgruppe aufgrund eines chirurgischen Fehlers, der zur Fraktur der distalen Kortex führte ein Tag nach der Operation eingeschläfert werden. Bei einem weiteren Tier führte ein Versagen der zwei distalen Schrauben zu einer Plattenbiegung, so dass es ebenfalls aus dem Versuch ausgeschlossen und euthanasiert werden musste. Bei Betrachtung der für diese Arbeit verwendeten Schafe liegt die Komplikationsrate deshalb bei 9%. Betrachtet man aber die insgesamt mit dieser Technik operierten Tiere (37), bei denen keine weiteren zum Ausschluss führenden Komplikationen auftraten, kann für dieses Defektmodell eine Komplikationsrate von 5,4% errechnet werden.

### **4.4.2 Diskussion der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit konnte durch ASC kombiniert mit einem Kollagenträger keine ausreichende Knochenbildung im Defektmodell kritischer Größe (CSD) erzielt werden. ASC konnten die in sie gesetzten Hoffnungen sowohl röntgenologisch, als auch histologisch nicht bestätigen. Sie zeigte ganz im Gegenteil signifikant schlechtere Heilungstendenzen, als die mit BMSC besiedelten Kollagenträger der Vergleichsgruppe C. Außerdem waren weder röntgenologisch, noch histologisch signifikante Unterschiede zum Einsatz des Kollagenträgers ohne Zellen festzustellen. Das schlechtere Abschneiden dieser Zellquelle konnte jedoch zum Teil durch den Zusatz des osteoinduktiven PRP ausgeglichen werden.

Dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark über osteogenes Regenerationspotential verfügen ist hinreichend untersucht und bekannt (Bruder et al. 1994; Bruder et al. 1998b; Kadiyala et al. 1997).

Auch die Verwendung von BMSC am Defektmodell kritischer Größe ist bereits von einigen Arbeitsgruppen an verschiedenen Tiermodellen untersucht worden. Die Arbeitsgruppe um Bruder und Kadiyala setzte als eine der ersten MSC in einem „critical-size defect“ (CSD) ein. Zuerst 1997 am Femur der Ratte (Kadiyala et al. 1997), ein Jahr

später auch am kaninen Femur (Bruder et al. 1998b). In einem 21 mm großen kortikalen Defekt im kaninen Femur untersuchten sie das Knochenregenerationspotential von BMSC auf einem Keramikträger, im Vergleich zum Träger alleine. Seine histologischen und morphometrischen Untersuchungen zeigten einen signifikant höheren Knochenanteil in den Poren der Träger, die mit BMSC besiedelt waren. Sowohl Lamellenknochen, als auch Geflechtknochen war in den Poren dieser Träger zu finden. Beim Einsatz der Träger ohne MSC traten außerdem zahlreiche Frakturen auf.

An einem ähnlichen Tiermodell wie in der vorliegenden Studie zeigte eine Gruppe aus Italien die Vorteile einer Kombination von Scaffold und BMSC in einer Pilotstudie (Kon et al. 2000). In einen 3,5 cm großen Tibiadeфекt implantierten sie einen Hydroxylapatit-Träger einmal mit BMSC (n=2) und einmal ohne Zellen (n=2), stabilisiert durch einen Fixateur externe. Die Gruppe konnte zeigen, dass der Zusatz von BMSC zum Träger zu einer stärkeren Kallusbildung und einer ausgeprägteren Knochenbildung insgesamt führte. Außerdem konnte in den zellbeladenen Konstrukten neugebildeter Knochen auch innerhalb der Makroporen des Trägermaterials nachgewiesen werden, während die Knochenformation in den zellfreien Proben sich ausschließlich auf die Oberfläche des Trägers beschränkte.

Einen anderen Ansatz wählten Shang et al., die einen nicht lasttragenden Defekt kritischer Größe (bilaterale 20mm große Defekte im Os parietale) als Modell verwendeten. Anders als in den bisherigen Studien verwendeten sie außerdem osteogen induzierte BMSC. Auch hier konnte durch den Zusatz von BMSC zu einem Scaffold (Kalzium-Alginat) die Defektfüllung mit neugebildetem Knochengewebe erzielt werden, während in den Kontrollgruppen nur fibröses Gewebe den Defekt ausfüllte (Shang et al. 2001).

Sogar allogene BMSC sind nach einer Studie von Arinze et al. (2003), dazu geeignet die Knochenheilung zu fördern. In einem CSD im Femur des Hundes erzielten die allogenen Zellen ähnlich gute Effekte, wie autologe BMSC.

Während die bisher genannten Studien hauptsächlich langsam abbaubare Trägermaterialien in den lasttragenden Defekten kritischer Größe einsetzen, zeigt eine neuere Studie, dass BMSC auch in Kombination mit einem schnell degradierbaren Scaffold (Koralle) zur Knochenbildung führen (Zhu et al. 2006). Mit dieser Kombination war nach 4 Monaten radiologisch eine Überbrückung des Defekts zu erkennen, und nach 8 Monaten konnte geformter Knochen mit Kortex nachgewiesen werden. Der Scaffold alleine führte erwartungsgemäß zu keinem Knochen und war innerhalb von 2 Monaten abgebaut.

Einen Vergleich mit dem derzeitigen Goldstandard, der autologen Knochentransplantation, wagte die Studie von Hou in einem Defekt im Kranium des Kaninchen (Hou et al. 2007). Die Arbeitsgruppe konnte durch die Kombination eines rekombinanten Wachstumsfaktors (rhBMP 2) mit einem schnell degradierbaren Scaffold (Koralle) und BMSC ähnlich gute radiologische Ergebnisse wie durch einen Knochentransplantat aus dem Beckenkamm erzielen.

Einige Gruppen haben sich mittlerweile auch mit der Knochenbildung von ASC in vivo beschäftigt. Dabei kamen vor allem Modelle der ektopen Knochenbildung zum Einsatz. Die Arbeitsgruppen von Dragoo (2003), Lin (2006) und Zheng (2006) verwendeten intramuskuläre Implantationsmodelle mit BMP2 bzw. BMP4 transfizierten Zellen für 4, 8 bzw. 24 Wochen und bestätigten eine Knochenbildung in vivo. Lee et al. (2003) untersuchten die Knochenbildung in vivo anhand eines subkutanen Implantationsmodell. Dabei konnten sie ausschließlich bei Implantation von in osteogenem Induktionsmedium vorkultivierten Zellen (auf einem Polyglykolsäureträger) nach 8 Wochen eine Knochenbildung beobachten, nicht jedoch bei nicht vordifferenzierten Zellen. Auch Hattori et al. (2006) untersuchten mithilfe dieses Modells die Unterschiede zwischen BMSC und ASC, jeweils ebenfalls vorkultiviert, allerdings auf einer  $\beta$ -Tricalciumsphosphat Matrix. Sie bestätigten eine den BMSC entsprechende Knochenbildung. Kakudo et al. (2007) machte dieselben Beobachtungen auf einem Kollagen-träger.

Auffällig an den bisher genannten Studien ist, dass ausschliesslich osteogen induzierte oder transfizierte Zellen zu einer Knochenbildung von ASC führten.

Ein Vorteil der osteogene Differenzierung der Zellen vor Transplantation ist, dass die Stammzellen in die gewünschte Richtung vordifferenziert sind und somit eventuell schneller Knochen bilden können. Wir verwendeten jedoch nicht differenzierte Zellen, aufgrund der Annahme, dass diese „unreifer“ und in Folge dessen proliferationsfreudiger sind. Eine Studie von Kasten et al. (Kasten et al. 2005) zeigte außerdem, dass bei BMSC durch eine statische *in vitro* „Vor“-Differenzierung keine Verbesserung der ektopen Knochenbildung im Vergleich zu undifferenzierten MSC zu erzielen war.

Die erste Studie mit nicht vorkultivierten, nicht transfizierten ASC in einem Defekt kritischer Größe stammt von Cowan et al. (2004). Sie setzten verschiedene Zellarten, unter anderem auch ASC und BMSC, auf einem Apatit-benetzen Polymer in einen 4mm

großen Defekt im Schädeldach von Mäusen ein. Diese Konstrukte zeigten sowohl mit BMSC, als auch mit ASC schon nach 2 Wochen eine signifikante desmale Knochenbildung und nach 12 Wochen konnte eine komplette Überbrückung in der röntgenologischen Überwachung und Histologie festgestellt werden. Anders als in der vorliegenden Studie am lasttragenden Defekt kritischer Größe, konnte Cowan in seinem nicht lasttragenden Modell also keine Unterschiede zwischen BMSC und ASC hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Knochenneubildung ausmachen. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass in diesem nicht lasttragenden Defekt im platten Knochen des Schädeldachs möglicherweise andere Faktoren für die Bildung von Geflechtknochen wichtig sind, als in einem gewichtstragenden Modell an einem Röhrenknochen, bei dem viel komplexere Vorgänge bis zum Umbau zum Lammellenknochen notwendig sind. Außerdem ist die Defektgröße von 4 mm möglicherweise zu gering, auch wenn die Autoren die kritische Größe des Defekts, anhand der fehlenden Defektüberbrückung ohne Therapie nach 12 Wochen zeigen.

An einem etwas größeren Defekt (8 mm) am Schädeldach der Ratte untersuchten Yoon et al. (2007) die Unterschiede zwischen dem Einsatz von osteogen differenzierten gegenüber nicht differenzierten ASC. Sie zeigten, dass differenzierten ASC radiologisch zu einem signifikant stärkeren Knochenwachstum und histologisch zu einer robusteren Knochenregeneration führten, als nicht differenzierte Zellen.

Desgleichen konnte Cui et al. am Schädeldach des Hundes zeigen, dass vorher osteogen induzierte ASC 84 % (+/-6,45 %) des Defektvolumens knöchern reparierten, während der Scaffold (Koralle) alleine nur zu einer Defektfüllung von 25% (+/-18,82%) führte (Cui et al. 2007).

Peterson et al. (2005) benutzten erstmals ein wirklich lasttragendes Defektmodell kritischer Größe, und zwar in Form eines 6mm großen Defektes im Femur der Ratte. Dabei konnte in der Gruppe mit BMP 2 transfizierten ASC, aber auch mit Zugabe des Wachstumsfaktors alleine, nach 8 Wochen eine Heilung beobachtet werden. Keine Heilung fand erwartungsgemäß in der Kontrollgruppe (nur Kollagen-Keramik Träger) statt. Interessanterweise konnte auch hier, durch nicht transfizierten ASC in Kombination mit dem Scaffold keine Heilung beobachtet werden. Peterson kommt in seiner Studie zu dem Schluss, dass ASCs, die nicht genetisch manipuliert wurden um BMP 2 überzuexprimieren nicht in der Lage sind einen Defekt kritischer Größe zu heilen. Dies konnte anhand der vorliegenden Studie bestätigt werden. Auch MSC aus Muskelge-

webe waren nach einer Studie von Wright et al. (2002) nicht dazu in der Lage einen Defekt kritischer Größe zu schliessen. Mehrere Studien belegen jedoch, dass Stammzellen aus dem Knochenmark sehr wohl in der Lage sind einen CSD zu heilen. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Stammzellen aus verschiedenen Ursprungsgeweben ein unterschiedlich ausgeprägtes natives osteogenes Potential besitzen (Peterson et al. 2005)

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Peterson, aber auch der anderen genannten Studien ist der Schluss zulässig, dass BMSC gemäß ihres Ursprungsgewebes ein stärker ausgeprägtes osteogenes Potential besitzen. Bei ASC hingegen scheint das osteoinduktive Potential weniger stark ausgeprägt zu sein. Bis auf die Studie von Cowan am Schädeldach der Ratte, konnte keine der Studien mit nicht vorbehandelten ASC ähnlich gute Ergebnisse wie mit BMSC erzielen. Erst durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren, die Verwendung vordifferenzierter oder transfizierter Zellen konnte Ergebnisse erzielt werden, die den Ergebnissen mit BMSC ebenbürtig waren. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Defektfüllung mit ASC zur Ausbildung eines fettgewebshaltigen Kallus führte, der bei keiner der anderen Gruppen anzutreffen war. Dies legt die Vermutung nahe, das ASC gemäß ihrem Ursprungsgewebe ein stärker ausgeprägtes adipogenes Potential besitzen. Möglicherweise besinnen sich Zellen in einem Umfeld das keine osteoinduktive Reize ausübt sozusagen auf ihr „Ursprungsgewebe“ und differenzieren in diese Richtung. In diesem Critical Size Defekt werden demnach wohl zuwenig osteoinduktive Reize ausgeübt, so dass sich die ASC entsprechend ihres Ursprungsgewebes in Richtung Adipozyten differenzieren.

Das geringere osteoinduktive Potential von ASC *in vivo* konnte zum Großteil durch den Zusatz der osteoinduktiven Komponente PRP ausgeglichen werden. Radiologisch konnte auch der Zusatz von PRP zu den ASC zu keiner deutlichen Verbesserung oder Beschleunigung der Knochenheilungsrate führen. Erst am Ende des Versuchs erreichte die ASC+PRP-Gruppe ein den BMSC ebenbürtiges Niveau. Histologisch sind durch den Zusatz von PRP keine signifikanten Unterschiede mehr zur Vergleichsgruppe mit BMSC zu sehen. Außer in der Rubrik der Verknöcherung (bone formation) nach Werntz gibt es zwischen der Versuchsgruppe A (ASC) und der Versuchsgruppe B (ASC+PRP) in der histologischen Auswertung keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der Rubrik Verknöcherung hingegen ist die Versuchsgruppe B (ASC+PRP) der Versuchsgruppe A, die nur ASC verwendete, signifikant überlegen.

Bereits mehrere Studien konnten in der Vergangenheit positive Effekte von PRP auf die Knochenregeneration aufzeigen.

Schon 1964 berichtete Schulte et al. über die Verwendung von autologen Blutprodukten zur Unterstützung der Knochenregeneration nach Zystektomien. Doch erst 30 Jahre später griffen Yamato et al. die Verwendung von autologen Blutprodukten wieder auf, und zwar als Gewebekleber bei Blutstillungen. Die ersten Beschreibungen der Herstellung von PRP stammen von Withmann et al. (1997), der es zur beschleunigten Knochenregeneration in der Kiefer- und Gesichtschirurgie einsetzte und zudem einen positiven Einfluss auf die Weichteilheilung bemerkte.

Wie die allermeisten Studien, die sich mit PRP beschäftigen stammt auch die erste klinische Studie mit insgesamt 88 Patienten aus dem Bereich der Kieferchirurgie (Marx et al. 1998). Marx setzte PRP zusätzlich zu autologen Knochentransplantaten in Unterkieferrekonstruktionen ein. Durch den Zusatz von PRP konnte er die Knochendichte im Vergleich zur Kontrolle um 19% verbessern.

Ebenfalls aus der Kieferchirurgie berichteten Kassolis et al. (2000) über positive Effekte anhand von 15 klinischen Fallberichten, bei denen jedoch ein Vergleich mit anderen Therapiemethoden fehlt. Dies lieferte Kassolis dann 2005 in einer Studie mit 10 Patienten, bei der er allogene gefriergetrocknete Knochentransplantate (= FDBA = engl. freeze-dried bone allografts) entweder mit PRP oder aber mit einer resorbierbaren Membran kombinierte und diese Konstrukte im Rahmen einer bilateralen Sinusaugmentation einsetzte. Er stellte in der PRP-Gruppe einen signifikant höheren Prozentsatz an vitalem Gewebe fest, auch der Prozentsatz der Knochenformation war erhöht, jedoch nicht signifikant.

Im Bereich der Implantatforschung weisen auch Studien am Minischwein und Hund auf einen positiven Effekt von PRP auf die Implantatverankerung hin (Kim et al. 2002; Zechner et al. 2003). Kim et al. (2002) konnten durch den Zusatz von PRP zu einem demineralisierten Knochenpulver, einen höheren Prozentsatz an Kontakt zwischen Implantat und Knochen erzielen. Auch in einer Studie am Minischwein konnten Zechner et al. (2003) durch den Einsatz von PRP den Prozentsatz an Knochen-Implantat-Kontakten fast verdoppeln. Da die Arbeitsgruppe diese signifikanten Unterschiede jedoch nur nach 6, nicht aber nach 12 Wochen feststellen konnte, schlussfolgerten sie, dass PRP sich vor allem in der frühen Heilungsphase positiv auswirkt.

Demgegenüber steht die Studie von Choi et al. (2004), die durch den Zusatz von PRP zu Zahnimplantaten beim Hund gegenüber der Kontrollgruppe eine geringere Knochenformation und ein verspätetes Remodelling feststellten. Auch bei der Implantation von Zahnimplantaten in die Tibia von 6 Hunden, konnte You et al. (2007) signifikant weniger Knochen-Implantat-Kontakte für die Gruppe feststellen, bei der zusätzlich zu spongiösen Granula (BioOss®) PRP eingesetzt wurde. Ebenso konnten Jensen et al. (2005) in seiner Implantatstudie an 8 Hunden keine zusätzlichen positiven Effekte von PRP feststellen. Er setzte mit Hydroxylapatit (HA) beschichtete Titanimplantate bilateral in Femurkondylen ein und füllte die Lücke um die Implantate entweder mit unbehandeltem Knochen, oder allogenen, entfetten, bestrahlten und gefriergetrockneten Knochentransplantaten. Zusätzlich untersuchten sie die Kombination dieser beiden Knochentransplantate mit PRP, konnten dadurch jedoch keine Verbesserung der Implantatfixation oder der Knochenbildung feststellen. Da die Aktivität, bzw. die Konzentration der Wachstumsfaktoren des PRP nicht analysiert wurde, können die Autoren nach eigenen Angaben ein Fehler im Herstellungsprozess des PRP nicht ausschließen. Als anderen möglichen Grund nennen Jensen et al. die Tatsache, dass aufgrund der Beschichtung des Implantates mit HA und des relativ kleinen Defekts schon durch die Knochentransplantate eine optimale Heilung stattfindet, die durch PRP nicht weiter verbessert werden kann.

Beim Zusatz von PRP zu laminaren Titanimplantaten wiederum, die in die Tibia von 15 Ratten implantiert wurden, konnten jedoch signifikant höhere Prozentsätze an neu geformtem Knochen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (Fontana et al. 2004).

Auch außerhalb der Kieferchirurgie und Implantatforschung existieren mittlerweile kontroverse Studien, die die Effekte von PRP in verschiedenen Modellen untersuchen.

In einem ektopen Knochenbildungsmodell an der Nacktmaus konnten Ranly und Kollegen keine positiven Effekte von PRP nach intramuskulärer Implantation von demineralisierter Knochenmatrix und PRP feststellen. Diese Studie deutet sogar auf eher inhibitorische Effekte des PRPs hin, da durch den Zusatz von PRP die Knochenfläche und die Ossikelgröße abnahmen (Ranly et al. 2007). Der Zusatz von PRP zu  $\beta$ -TCP hatte auch bei der von Li et al. (2004) untersuchten Spinalfusion bei Schweinen keinerlei positive Effekte. Während die Transplantation von autologem Knochen zu einer

computertomographisch erfassten Fusionsrate von 50% führte, waren sowohl mit  $\beta$ -TCP alleine, als auch in Kombination mit PRP nur partielle Fusionen zu erkennen.

Keinen positiven Effekt postuliert auch die Gruppe um Froum et al. (2002). Dieser Artikel ist jedoch nur ein Fallbericht mit 3 Patienten, bei denen außerdem jeweils unterschiedliche Trägermaterialien verwendet wurden.

Die Studie von Aghaloo et al. (2002) die oft als PRP kritische Studie angeführt wird, zeigt lediglich, dass die Verwendung von PRP alleine in einem Kraniaumdefekt bei Kaninchen zu keiner signifikanten Steigerung der histomorphmetrischen Knochenfläche oder der radiologischen Knochendichte führte. Die Kombination von PRP mit autologen Knochen jedoch zeigte einen deutlichen, jedoch nicht signifikanten positiven Effekt im Vergleich zu autologem Knochen alleine.

Etwas außergewöhnlich ist die Studie von Gandhi und Kollegen, die den Effekt von PRP bei der Heilung von Femurfrakturen bei diabetischen Ratten untersuchten. Es ist bekannt, dass Diabetes mellitus den Frakturheilungsprozess verschlechtert. Dies geschieht unter anderem durch die reduzierte Expression von für die Knochenheilung wichtigen Faktoren. In der Studie von Gandhi et al. (2006) konnten bei den diabetischen Ratten signifikant niedrigere PDGF, TGF- $\beta$ 1, IGF-1 und VEGF Expressionen festgestellt werden. Die dadurch verschlechterte Zellproliferation und Chondrogenese in der frühen Heilungsphase und die schlechtere biomechanischen Eigenschaften des späten Frakturkallus konnten durch die perkutane Injektion von PRP in den Fraktuspalt weitestgehend ausgeglichen werden.

Interessant ist auch eine aktuelle Studie von Kitoh et al. (2007) in der er bei 17 Patienten im Rahmen einer Distractionsosteogenese zusätzlich osteogen differenzierte BMSC und PRP einsetzte. Durch die Zugabe von BMSC und PRP konnte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit 29 Patienten die Komplikationsrate von 23% auf 6 % gesenkt werden. Außerdem war festzustellen, dass bei keinem der 17 Patienten eine verspätete Konsolidierung auftrat, während dies in der Kontrollgruppe zu 45% der Fall war.

Wichtiger für den Vergleich mit der vorliegenden Studie sind jedoch Studien an Defekten kritischer Größe.

Dallari et al. (2006) verglich in seiner Studie den Einsatz von allogenen gefriergetrockneten Knochentransplantaten (FDBA), BMSC und PRP jeweils alleine oder in allen

erdenklichen Kombinationen in einem „critical size defect“ am Kaninchenfemur. Als spongiösen Defekt setzte er zylindrische Bohrlöcher, bilateral in die distalen Femurkondylen. Die besten Heilungsraten, berechnet anhand der verbleibenden Defektfläche, konnte durch die Kombination aller drei Komponenten erzielt werden, die schon nach 2 Wochen signifikant über dem alleinigen Einsatz von BMSC oder PRP lag. Verglichen mit Femurkondylen gesunder Kochen zeigten die Gruppen mit dem alleinigen Einsatz von FDBA, BMSC oder PRP signifikante Unterschiede im Knochenvolumen, der Trabekeldicke und -separation, während die kombinierten Gruppen im Bereich der gesunden Knochen lagen. Ein Defekt kritische Größe an der Stirn von 24 Minischweinen verwendeten Wiltfang et al. (2003). Sie setzten verschiedene xenogene Trägermaterialien und autologen Knochen alleine und in der Kombination mit zwei unterschiedlich hergestellten PRPs ein und wertete die Defekte nach 2, 4 und 12 Wochen immunhistochemisch und radiologisch aus. Einen positiven Effekt für PRP konnte die Arbeitsgruppe nur in der frühen Heilungsphase nach 2 Wochen und nur in Kombination mit autologem Knochen feststellen.

Wirklich lasttragende Defekte kritischer Größe verwendeten nur Sarkar, Rai und Kasten (Sarkar et al. 2006; Rai et al. 2007; Kasten et al. 2008). Während Sarkar et al. (2006) im „critical size defect“ in der Tibia des Schafes nach 12 Wochen keine Unterschiede zwischen der Kombination eines Kollagenträgers mit PRP und der Kontrollgruppe mit dem Kollagenträger alleine feststellen konnte, beobachteten Rai et al. (2007) in ihrer Studie am 8mm-großen Defekt am Femur der Ratte positive Auswirkungen von PRP. Sie stellten fest, dass der Zusatz von PRP zu dem Knochenersatzstoff Polylacton-TCP nach 3 Wochen zu einer besseren Vaskularisierung, und nach 12 Wochen zu einer signifikant höheren Rate vollständig geheilter Femura, sowie zu einer verbesserten Torsionssteifigkeit führte. Auch Kasten et al. (2008) bestätigten in ihrer aktuellen Studie am Kaninchenradius die die Knochenheilung fördernden Eigenschaften von PRP. Sowohl durch den Zusatz von PRP, als auch von BMSC zu dem verwendeten Träger (calcium-deficient hydroxyapatite=CDHA), konnte die Knochenneubildung im Vergleich zum Einsatz des Trägers alleine signifikant verbessert werden. Eine Kombination von BMSC und PRP auf dem Träger führte zu keiner weiteren Steigerung der Knochenheilungsrate.

Diese kontroversen Ergebnisse können möglicherweise auf die uneinheitlichen Protokolle zur Herstellung und Verwendung von PRP zurückgeführt werden. Ein möglicherweise wichtiger Punkt dabei ist die Zahl der eingesetzten Thrombozyten. Wie bereits

beschrieben, kann die Thrombozytenkonzentration in unterschiedlich hergestellten PRP-Produkten erheblich schwanken. Haynesworth et al. (2002) zeigten, dass die Höhe der Thrombozytenkonzentration direkt mit der Proliferation und Differenzierung von adulten mesenchymalen Stammzellen korreliert. Einen Vergleich der vorliegenden Literatur über den Effekt von PRP auf die Knochenheilung in klinischen Studien, ist deshalb aufgrund der unterschiedlichen, oder zum Teil nicht angegebenen Thrombozytenkonzentration nur schwer möglich. Eine ausreichende zelluläre Antwort kann jedoch nur mit Konzentraten erreicht werden, bei denen die Thrombozytenzahl über dem vier- bis fünffachen der Ausgangszahl liegt. Demzufolge legte Marx (2004) eine Konzentration von 1 Mio/ $\mu$ l als Grenzwert für „therapeutisches PRP“ fest. Eine andere mögliche Ursache für eine unzureichende Wirkung von PRP kann eine Beschädigung oder vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten darstellen, die zum Verlust von Wachstumsfaktoren führt. Auch die relativ kurzen Halbwertszeiten (100 min bei TGF- $\beta$ ; (Gleizes et al. 1997; Wakefield et al. 1990) der enthaltenen Wachstumsfaktoren müssen beachtet werden, um ein funktionsfähiges PRP einzusetzen. Für eine zukünftige bessere Vergleichbarkeit ist deshalb eine Bestimmung der Wachstumsfaktorkonzentrationen in dem verwendeten PRP empfehlenswert.

Andere mögliche Ursachen für einen fehlenden positiven Effekt von PRP in klinischen Studien können Ausgangssituationen darstellen, die so optimal gewählt sind, dass durch PRP keine Verbesserung möglich ist (Jensen et al. 2005). Auch zu spät gewählte Untersuchungszeitpunkte führen dazu, dass der positive Effekt von PRP in der frühen Phase der Knochenregeneration nicht festgestellt werden kann (Gerard et al. 2007). Als andere mögliche Ursache für einen fehlenden positiven Effekt nennt Marx außerdem die Verwendung von nicht autologen PRP (Marx 2001).

#### 4.5 Abschliessende Betrachtung und Ausblick

Entgegen der in die Fettstammzellen gesetzten Hoffnungen, konnten in der vorliegenden Arbeit die ASC im Defektmodell kritischer Größe nicht mit den Ergebnissen der BMSC mithalten. Sowohl histologisch als auch radiologisch schnitt die Kombination von ASC mit mineralisiertem Kollagen im Schaf signifikant schlechter ab als der Einsatz von BMSC auf mineralisiertem Kollagen.

Obwohl *in vitro* die Mehrzahl der Studien kaum Unterschiede zwischen ASC und BMSC feststellten, scheinen ASC *in vivo* im Schaf ein geringeres osteogenes Potential zu besitzen als BMSC. Auch in der vorliegenden Studie konnten *in vitro* keinerlei Hinweis auf ein reduziertes osteogenes Potential gefunden werden.

ASC eignen sich demnach nicht ideal für den Einsatz im Tissue Engineering von Knochen, jedenfalls nicht ohne eine vorherige Differenzierung oder Transfektion oder der Zugabe eines osteoinduktiven Faktors. Durch die Zugabe des osteoinduktiven PRP konnte die Knochenheilung in dieser Studie zwar deutlich verbessert werden, erreichte aber das Niveau der BMSC nicht. Ein vielversprechender Ansatz könnte möglicherweise aber die Kombination von PRP und BMSC sein. Ob jedoch der Zusatz von PRP zu BMSC in diesem Defektmodell zu einer weiteren Steigerung oder Beschleunigung der Knochenheilung führen würde, muss in zukünftigen Studien überprüft werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die Untersuchung von PRP alleine, ohne jegliche osteogene Komponente. Wichtig für den weiteren Einsatz von PRP wäre auch eine genaue Analyse der Wirkmechanismen der einzelnen Komponenten des Wachstumsfaktorgemisches.

Ebenso könnte die Erforschung der lokalen zellulären Mechanismen und molekularbiologischen Prozesse hilfreich sein, um das geringere osteogene Potential von ASC erklären.

## 5 Zusammenfassung

Die Entwicklung eines vitalen Knochenersatzmaterials durch die Kombination von Zellen mit einem biokompatiblen Trägerstoff ist Ziel des hier vorgestellten „Tissue Engineering“. Als Zellquelle stellen Fettstammzellen (ASC) eine gut zugängliche Alternative zu den bekannten und weit verbreiteten Knochenmarkstammzellen (BMSC) dar, die nur in einer schmerzhaften Punktion gewonnen werden können. ASC zeichnen sich *in vitro* durch eine exzellente Proliferationsfähigkeit und eine mit BMSC vergleichbare Differenzierungsfähigkeit aus. *In vivo* Studien zum Einsatz dieser Zellquelle in langstreckigen, gewichtstragenden Knochendefekten am Großtiermodell existieren bisher nicht.

Hauptziel dieser Untersuchungen war es deshalb, die Kombination von ovinen ASC mit einem bewährten Trägermaterial, dem mineralisierten Kollagen, im „Critical Size Defect“ am Schaf zu evaluieren und mit BMSC zu vergleichen. Zur Optimierung solcher Konstrukte werden vielfach als osteoinduktive Komponente Wachstumsfaktoren eingesetzt. Plättchenreiches Plasma (PRP) enthält eine Vielzahl von den Wachstumsfaktoren, die bei der Knochenbruchheilung eine Rolle spielen und stellt somit eine aussichtsreiche Alternative zu teuren rekombinanten Wachstumsfaktoren dar. Deshalb untersuchten wir, ob der zusätzliche Einsatz von PRP die Knochenheilung beschleunigt oder verbessert.

Vor Beginn der Tierversuche wurde die Isolation von ovinen ASC erfolgreich etabliert und die Differenzierung in alle drei mesenchymalen Richtungen für alle verwendeten Zellen nachgewiesen. Die Untersuchung des Einflusses von PRP auf die ovinen ASC *in vitro* zeigte zwar einen proliferationsfördernden Effekt, jedoch keine positive Auswirkungen auf die osteogenen Differenzierung.

Als Defekt kritischer Größe wurde ein 3,5 cm großer Defekt in der Schafstibia gewählt. Zur Defektfüllung wurde mineralisiertes Kollagen in Kombination mit ASC (A), ASC+PRP (B), BMSC (C) oder ohne Zellen (D) verwendet. Zur Beurteilung des zeitlichen Ablaufs der Knochenneubildung wurde in der 8. und 10. Woche eine Fluoreszenzmarkierung durchgeführt. Außerdem wurde der Heilungsverlauf alle 2 Wochen durch radiologische Kontrollen dokumentiert und mithilfe eines frei zu-

gänglichen Bildbearbeitungsprogramm (*GIMP*, GNU General Public Licence) quantitativ ausgewertet. Die Kombination von ASC mit dem mineralisierten Kollagen zeigte dabei von der 10. Woche an bis zum Versuchsabschluss einen signifikant geringeren prozentualen Anteil von Knochen im Defektbereich als die Kombination mit BMSC. Auch mit dem Zusatz von PRP besteht ab der 10. Woche ein signifikanter Vorteil für die Vergleichsgruppe C. Nach 26 Wochen jedoch sind keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen festzustellen.

Nach 6-monatiger Standzeit wurden die Tier euthanasiert, der Knochen explantiert und histologisch analysiert. Die Beurteilung der mit Giemsa-Eosin gefärbten Schnitte erfolgte nach drei verschiedenen (semi-) quantitativen Auswertungsmethoden. Mit allen drei Auswertungssystemen wurden für die Versuchsgruppe A (ASC) signifikant schlechtere Heilungsergebnisse festgestellt als für die Vergleichsgruppe (BMSC). Durch den Zusatz von PRP sind histologisch keine signifikanten Unterschiede mehr zur Vergleichsgruppe mit BMSC zu sehen. In der Rubrik der Verknöcherung (bone formation) nach Werntz ist die Versuchsgruppe B (ASC+PRP) der Versuchsgruppe A (ASC) sogar signifikant überlegen.

ASC eignen sich demnach im Schafmodell nur eingeschränkt für den Einsatz im Tissue Engineering, jedenfalls nicht ohne eine vorherige Differenzierung oder Transfektion oder der Zugabe eines osteoinduktiven Faktors. Durch die Zugabe des osteoinduktiven PRP konnte die histologische Knochenneubildung in dieser Studie zwar deutlich verbessert werden, in den radiologischen Verlaufskontrollen jedoch konnte das Niveau der BMSC nicht erreicht werden.

## 6 Summary

The development of a vital bone graft substitute using a combination of an osteogenic cell source with a biocompatible, osteoconductive scaffold is the goal of the here presented "tissue engineering". As a source of cells, stem cells (ASC) derived from adipose tissue represent an easily accessible alternative to the common and widely-used bone marrow derived stem cells (BMSC) which can only be harvested through a painful bone marrow aspiration. ASC are characterized by an excellent proliferation capacity along with a differentiation capacity which is comparable to

that of BMSC. *In vivo* studies which evaluate the use of this new cell source in a weight-bearing long bone defect in large animals do not yet exist.

The intention of this work therefore was to evaluate the use of a combination of ovine ASC with an established scaffold such as mineralized collagen in a critical size bone defect in sheep and to compare the results to a group using BMSC. For the optimization of such a construct, many studies use growth factors as osteoinductive components. Platelet rich plasma (PRP) contains many of the growth factors which play a role in the healing of bone fractures and therefore is a promising alternative to expensive recombinant growth factors. Thus, the additional use of PRP was investigated to see if it will accelerate or improve the healing rate of the bone defect.

Before starting the animal experiment, the isolation of ovine ASC had been successfully established and the differentiation in all three mesenchymal lineages could be demonstrated for all cells used in the study. The evaluation of the influence of PRP on ovine ASC *in vitro* did show an increase in proliferation, however there was no positive impact on the osteogenic differentiation.

As a critical size defect, a 3.5 cm tibia defect was chosen. To bridge the defect, mineralized collagen was used in combination with ASC (A), ASC+PRP (B), BMSC (C) or without cells (D). To estimate the chronological course of bone formation, fluorescence labelling was performed in weeks eight and ten. Additionally, the healing process was documented every two weeks using X-rays and a quantitative analysis was done using an open source digital imaging software program (*GIMP*, GNU General Public Licence). From ten weeks through the end of the trial, the combination of ASC with a mineralized collagen scaffold showed a significantly lower percentage of bone formation in proportion to the dimension of the defect than the combination with BMSC. Even with the addition of PRP to ASC there was still a significant advantage for the group using BMSC from week 10. However after week 26 no significant differences were observed between the two groups.

After six months the animals were sacrificed, the bone was explanted and analyzed histologically. Evaluation of the Giemsa Eosin stained slices was done using three different (semi-) quantitative methods of analysis. Regarding the results of all

three methods, experimental group A (ASC) showed significantly inferior results when compared to group C (BMSC).

The group in which the addition of PRP to ASC was used, showed no significant histological differences, when compared to the group C (BMSC). In the category of bone formation the Werntz analysis even showed significantly better results for the experimental group B (ASC+PRP) when compared to group A (ASC).

The results of this study indicate that ASC are only partly suitable for the application of Tissue Engineering of bone especially not without prior differentiation or transfection of the cells or the addition of an osteoinductive factor. With the addition of the osteoinductive factor PRP the histological bone formation could clearly be enhanced, but regarding the X-ray monitoring the level of BMSC could not be reached.

## 7 Anhang

### 7.1 Materialien und Rezepte

#### 7.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Medikamente

Aceton	Merck, Darmstadt
Alizarinrot S	Chroma, Köngen
Alcianblau	Chroma, Köngen
Ameisensäure	Fluka Chemie Ag, Buch, Schweiz
Aquatex	Merck, Darmstadt
Benzoyl Peroxid	Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Buprenorphin (Temgesic®)	Essex, München
Butorphanol (Morphasol®)	Morphasol, Gräub, Bern Schweiz
Carprophen (Rimadyl®)	Pfizer, Karlsruhe
CaCl	Merck, Darmstadt
Cetylpyridiniumchlorid (C-9002)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Detomidin (Domosedan®)	Pfizer, Karlsruhe
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diazepam (Valium®)	Roche Diagnostics, Pharma AG, Grenzach Wyhlen, Schweiz
Dibutyl Phthalat	Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz
DMEM high glucose	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Serva, Heidelberg
Doramectin (Dectomax®)	Pfizer Karlsruhe
Eosin Yellowish	Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz
Essigsäure	Roth, Karlsruhe Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz
Ethanol	Merck, Darmstadt
FastRed-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

FCS	Biochrom, Berlin
Fentanyl (Sintetyl®)	Sintetica, Mendrisio, Schweiz
Fibrinkleber (Fibrin/Thrombin)	Tissucol DuoS, Baxter GmbH
Giemsa-Lösung	Fluka Chemie AG, Buch, Schweiz
Hämalaun	Chroma, Münster
HCl	Merck, Darmstadt
Insulin-Transferrin-Selenit (ITS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	Abott AG, Baar, Schweiz
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Chroma, Münster
Ketamin (Ketasol-100®)	Graeub AG, Bern, Schweiz
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lidocain (Lidocain 2%®)	Streuli & Co Ag, Uznach, Schweiz
MCDB 201	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylmethacrylat (MMA)	Fluka Chemie Ag, Buchs, Schweiz
Moxidectin (Cydectin®)	Wyeth Pharmaceuticals, Münster
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pentobarbital (Vetnarcol®)	Veterinaria, Zürich, Schweiz
PFA	Merck, Darmstadt
Phosphatase Substrat #104	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ringer Lactat	Braun, Melsungen
Streptavidin-Biotin-Komplex	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Thiopental (Pentothal®)	Abott AG, Baar, Schweiz
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm
Tris	Merck, Darmstadt
Trypan Blau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin EDTA	Biochrom, Berlin
XEM	Vogel GmbH, Giessen
Xylazin (Xylazin Streuli ®)	Streuli und Co.AG, Uznach, Schweiz
Xylol	Siegfried CMS AG, Zofingen, Schweiz
Xylolersatz XEM-200	Vogel GmbH, Giessen

## 7.1.2 Puffer

## 1xPBS pH 7,4

	<i>Firma</i>	<i>Menge (g /l)</i>
<b>NaCl</b>	Roth	8
<b>KCl</b>	Roth	0,2
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Merck	1,44
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck	0,24

## Krebs-Ringer-Puffer

	<i>Firma</i>	<i>Menge (g / l)</i>
<b>MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich, Mannheim, D	0,1
<b>KCl</b>	Roth, Karlsruhe, D	0,34
<b>NaCl</b>	Roth, Karlsruhe, D	7,0
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O</b>	Merck, Darmstadt, D	0,24
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	Merck; Darmstadt, D	0,204
<b>D-Glucose</b>	Sigma-Aldrich, Mannheim, D	1,8
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Merck, Darmstadt, D	1,26
<b>Hepes</b>	Invitrogen, Karlsruhe, D	5,95
<b>BSA</b>	Sigma-Aldrich, Mannheim, D	20

### 1xTBS pH7,6

	<i>Firma</i>	<i>Menge (g /l)</i>
<b>NaCl</b>	Roth	8,765
<b>Tris</b>	Merck	6,07

### 10mM Tris HCl-Puffer pH7,4

	<i>Firma</i>	<i>Menge (g /l)</i>
<b>Tris</b>	Merck	1,21

## 7.1.3 Lösungen

### 4 mM HCl/0,1% BSA

Die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 3, PDGF und BMP6 wurden in 4 ml/l HCl und 1 g/l BSA gelöst.

### 4% PFA

40 g/l PFA wurden in PBS in der Mikrowelle durch Erwärmen bis kurz vor den Siedepunkt gelöst. Nach unmittelbarer Abkühlung auf Eis wurde das PFA unter einem Abzug aliquotiert und bei -20 °C weggefroren.

### ALP-Substratpuffer

Bestehend aus 0,1 M Glyzin, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM ZnCl<sub>2</sub>.

### Alcianblau Lösung

10 g/l Alcianblau wurden in Aqua dest. gelöst und die Farblösung durch Zugabe von 500  $\mu$ l/l Essigsäure angesäuert.

### Alizarinrot Lösung

5 g/l Alizarinrot S wurden in Aqua dest. gelöst.

### **CPC-Lösung (10%w/v)**

5g CPC werden in 50ml einer 10mM NaPO<sub>4</sub>-Lösung gelöst und der pH auf 7 eingestellt.

### **Fast Red Lösung**

1 Tablette Fast Red wird in 2ml Tris/HCl-Puffer mit pH 8,2 gelöst. Die fertige Lösung wird bis zur Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

### **Ölrot O Stammlösungen**

0,5g Ölrot O (Ölrot O, Waldeck, Division Chroma, Münster; D), gelöst in 100ml 99% Isopropanol

### **Ölrot O Gebrauchslösungen**

6 Teile der Stammlösung werden mit 4 Teilen Aqua dest. vermischt und nach 24 Stunden filtriert

### **7.1.4 Verbrauchsmaterialien**

Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalspritzen	Greiner, Frickenhausen
Einweg-Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Einweg-Skalpelle	PFM, Köln
Filter 40µm Nylon	Becton Dickinson, Heidelberg
Filter Siebgewebe 250µm	NeoLab, Heidelberg
Kanüle Microlance™ 3	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryovials	Nunc, Wiesbaden
Locking Compression Plate	Synthes, Solothurn, Schweiz
Multiwellplatten	Greiner, Frickenhausen Nunc, Wiesbaden
Objektträger Super-Frost	Menzel-Gläser, Braunschweig
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
Snake-Plate	Icotec, Altstätten, Schweiz

Sterilfilter Steritop 0,22µm	Millipore, Carrigtwohill, Irland
Zellkulturflaschen T175, T75, T25	Nunc, Wiesbaden

### 7.1.5 Kits und ELISAs

Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, Irland
Quantikine® Human PDGF-AB Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis; USA; DHD00B
Quantikine® Human TGF-β1 Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA, DB100B

### 7.1.6 Wachstumsfaktoren

BMP2	MedTronic/Wyeth
BMP6	R&D Systems, Minneapolis, USA
EGF (rh EGF)	Strathmann Biotech, Hamburg
PDGF (rh PDGF-BB)	Active Bioscience, Hamburg
TGF-β3	R&D Systems, Minneapolis, USA

Die Wachstumsfaktoren TGF-β3, PDGF und BMP6 wurden in sterilem 4 mM HCl/0,1% BSA gelöst, während EGF und BMP2 in sterilem Wasser mit 0,1% BSA gelöst wurde. TGF-β3 wurde in einer Konzentration von 15ng/ml Medium eingesetzt, alle anderen Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von 10ng/ml.

### 7.1.7 Kulturmedien

#### Expansionsmedium

<i>Bestandteil</i>	<i>Firma</i>	<i>Endkonzentration</i>
<b>DMEM (4,5 g/l Glukose)</b>	Invitrogen, Karlsruhe, D	54,75% (v/v)
<b>MCDB 201</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	40% (v/v)
<b>FCS</b>	Biochrom KG,	2% (v/v)

## Anhang

	Berlin, D	
<b>Insulin-Transferrin-Natriumselenit Supplement</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	Insulin 10 µg/ml Transferrin 10 µg/ml Natriumselenit 10 ng/ml
<b>Penicillin / Streptomycin</b>	Biochrom KG, Berlin, D	1% (v/v)
<b>Dexamethason</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	0,02 µM
<b>Ascorbinsäure-2-phosphat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	0,1 µM
<b>Wachstumsfaktoren:</b>		
<b>rh EGF</b>	Strathmann Biotech, Hamburg, D	10 ng/ml
<b>rh PDGF-BB</b>	Active Bioscience, Hamburg, D	10 ng/ml

### Adipogenes Differenzierungsmedium

	<i>Firma</i>	<i>Endkonzentration</i>
<b>DMEM (4,5 g/l Glukose)</b>	Invitrogen, Karlsruhe, D	87% (v/v)
<b>FKS</b>	Biochrom KG, Berlin, D	10% (v/v)
<b>Penicillin / Streptomycin</b>	Biochrom KG, Berlin, D	1% (v/v)
<b>Dexamethason</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	1 µM
<b>Insulin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	0,01 mg/ml
<b>Indomethacin</b>	Sigma-Aldrich,	0,2 mM

## Anhang

	Steinheim, D	
<b>Isobutylmethylxanthine</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	0,5 mM

### Chondrogenes Differenzierungsmedium

	<i>Firma</i>	<i>Endkonzentration</i>
<b>DMEM (4,5 g/l Glukose)</b>	Invitrogen, Karlsruhe, D	95% (v/v)
<b>Insulin-Transferrin- Natriumselenit Supplement</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	Insulin 5 µg/ml Transferrin 5 µg/ml Natriumselenit 5 ng/ml
<b>Dexamethason</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	0,1 µM
<b>Ascorbinsäure-2-phosphat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	0,17 mM
<b>Natriumpyruvat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	1 mM
<b>Prolin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	0,35 mM
<b>BSA</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	1,25 mg/mL

### Verwendete osteogene Differenzierungsmedien

		<b><i>Osteogenes Medium mit 10%FCS</i></b>	<b><i>Osteogenes Medium mit 20%FCS</i></b>
	<i>Firma</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>
<b>DMEM (4,5 g/l Glukose)</b>	Gibco Life Technologies	87% (v/v)	77% (v/v)
<b>FCS</b>	Biochrom KG	10% (v/v)	20%

<b>Dexamethason</b>	Sigma	0,1 µM	0,1 µM
<b>Ascorbinsäure-2-phosphat</b>	Sigma	0,05 µM	0,05 µM
<b>β-Glycerophosphat</b>	Sigma	10 mM	10 mM

### 7.1.8 Enzyme

Kollagenase [15mg/ml]	Roche Diagnostics, Pharma AG, Grenzach Wyhlen, Schweiz
Hylaronidase [1mg/ml]	Serva, Heidelberg
Pepsin [100mg/ml] (P6887)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pronase [1mg/ml]	Roche Diagnostics, Pharma AG, Grenzach Wyhlen, Schweiz
Protease XXVI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

### 7.1.9 Antikörper

α-human Kollagen Typ I (Klon I-8H5)	MP Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
α-human Kollagen Typ II (Klon II-4C11)	MP Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
mAK Ziege α-Maus IgG, Biotin konjugiert	Dianova, Hamburg

### 7.1.10 Geräte

Autoklav	Münchener Medizin Mechanik GmbH, Planegg
Beatmungsgerät	Stephan Respirator ABV Universal
Computertomograph	X-treme CT, Scanco Medical AG, Basserdorf, Schweiz
Cryo Freezing Container	Nalgene
Feinwaage	Sartorius, Göttingen

Heizblock	UniEquip, Martinsried
Mikroskop	Axioplan Imaging 2; Zeiss, Oberkochen
Mikrozentrifuge Biofuge	Thermo Electron, Waltham, MA, USA
Orbitalschüttler WT12	Miometra, Göttingen
pH Meter	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipettierhilfe	Integra Bioscience, Chur, Schweiz
Mikrotom	Jung Histoslide, Leica, Nussloch
Sägemikrotom	SP 1600, Leica, Nussloch
Tischzentrifuge	Kisker, Steinfurt
Trockenschrank	Hereaus Instruments, Hanau
ELISA MRX Lesegerät	Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, US
Sterilbank, HeraSafe, HS18	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer REAX top	Heidolph, Schwabach
Wärmeplatte	Medaxx, Nagel GmbH, Kiel
Wasserbad	Medaxx, Nagel GmbH, Kiel
Zellzähler	Sysmex SF-3000
Zellkulturinkubator HeraCell	Hereaus Instruments, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Hereaus Instruments, Hanau

### 7.1.11 Software für Datenverarbeitung

Betriebssystem	Windows XP / Microsoft
Textverarbeitung	Word Office 2003 / Microsoft
Bildbearbeitung	Photoshop 7.0.1 / Adobe Systems GIMP (GNU General Public Licence) PowerPoint 2003 / Microsoft
Statistik	SPSS 15.0
Sonstige	AxioVision 3.1 / Zeiss Excel 2003 / Microsoft Reference Manager 9.5N Thompson Isi Researchsoft

## 8 Literaturverzeichnis

**Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG.** Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 1176-81.

**Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG.** Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 250-7.

**Alliston T, Derynck R.** Medicine: interfering with bone remodelling. *Nature* 2002 416: 686-7.

**Amling M, Delling G.** Zellbiologie des Osteoklasten und molekulare Mechanismen der Knochenresorption. *Pathologe* 1996; 17: 358-67.

**Anitua E.** Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 529-35.

**Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K et al.** Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 1927-35.

**Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK.** Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 60-70.

**Aukhil I.** Biology of wound healing. *Periodontol* 2000; 22: 44-50.

**Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ.** Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3908-13.

**Babbush CA, Kevy SV, Jacobson MS.** An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent* 2003; 12: 24-34.

**Baer AE, Wang JY, Kraus VB, Setton LA.** Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures. *J Orthop Res* 2001; 19: 2-10.

**Banks WJ.** Applied Veterinary Histology. 3 rd ED. *Mosby Year Book* 1993; 107-26.

**Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA.** Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1805-15.

**Bauer TW, Muschler GF.** Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 10-27.

**Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL.** Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg* 2003; 90: 133-46.

**Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH et al.** PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 512-6.

**Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJ.** Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003; 66: 526-31.

**Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC et al.** Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 2000; 18: 933-44.

**Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T.** Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 243-53.

**Bostrom MP, Yang X, Kennan M, Sandhu H, Dicarolo E, Lane JM.** An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine* 2001; 26: 1425-8.

**Bowman BM, Miller SC.** The proliferation and differentiation of the bone-lining cell in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* 1986; 7: 351-7.

**Boyer MI, Strickland JW, Engles D, Sachar K, Leversedge FJ.** Flexor tendon repair and rehabilitation: state of the art in 2002. *Instr Course Lect* 2003; 52: 137-61.

**Braun W, Ruter A.** Frakturheilung. Morphologische und physiologische Gesichtspunkte. *Unfallchirurg* 1996; 99: 59-67.

**Brewitt B, Clark JI.** Growth and transparency in the lens, an epithelial tissue, stimulated by pulses of PDGF. *Science* 1988; 242: 777-9.

**Brighton CT.** The biology of fracture repair. *Instr Course Lect* 1984; 33: 60-82.

**Broad TE, Ham RG.** Growth and adipose differentiation of sheep preadipocyte fibroblasts in serum-free medium. *Eur J Biochem* 1983; 135: 33-9.

**Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI.** Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; 56: 283-94.

**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. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-94.

**Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S.** Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355: 247-56.

**Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S.** Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998; 16: 155-62.

**Bucher O, Wartenberg H.** *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* Bern, Verlag Hans Huber; 1997.

**Buma P, Schreurs W, Verdonchot N.** Skeletal tissue engineering-from in vitro studies to large animal models. *Biomaterials* 2004; 25: 1487-95.

**Bunnell BA, Flaot M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C.** Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008; 45: 115-20.

**Burg KJ, Porter S, Kellam JF.** Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2347-59.

**Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB.** Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res* 2002; 37: 300-6.

**Canalis E, Lian JB.** Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *Bone* 1988; 9: 243-6.

**Canas F, Terepka AR, Neuman WF.** Potassium and milieu interieur of bone. *Am J Physiol* 1969; 217: 117-20.

**Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R.** Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003; 22: 81-91.

**Caplan AI.** Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-50.

**Cassiede P, Dennis JE, Ma F, Caplan AI.** Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1264-73.

**Chao EY, Aro HT, Lewallen DG, Kelly PJ.** The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 24-35.

**Chao EY, Inoue N.** Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater* 2003; 6: 72-84.

**Chistolini P, Ruspantini I, Bianco P, Corsi A, Cancedda R, Quarto R.** Biomechanical evaluation of cell-loaded and cell-free hydroxyapatite implants for the reconstruction of segmental bone defects. *J Mater Sci Mater Med* 1999; 10: 739-42.

**Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH.** Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 56-9.

**Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ.** Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 1997; 15: 577-84.

**Collignon H, Davicco MJ, Barlet JP.** Isolation of cells from ovine fetal long bone and characterization of their osteoblastic activities during in vitro mineralization. *Arch Physiol Biochem* 1997; 105: 158-66.

**Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R et al.** Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 560-7.

**Cross MJ, Claesson-Welsh L.** FGF and VEGF function in angiogenesis: signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 201-7.

**Cruess RL, Dumont J.** Fracture healing. *Can J Surg* 1975; 18: 403-13.

**Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J et al.** Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* 2007; 28: 5477-86.

**Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli AN, Giavaresi G et al.** In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res* 2006; 24: 877-88.

**Daniels TR, Thomas R, Bell TH, Neligan PC.** Functional outcome of the foot and ankle after free fibular graft. *Foot Ankle Int* 2005; 26: 597-601.

**De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1928-42.

**De Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W, Brini AT.** Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 154-7.

**De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M et al.** Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174: 101-9.

**den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, van Lingen A, Vink GQ et al.** New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res* 1999; 17: 654-60.

**den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ.** Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res* 2003; 21: 521-8.

**Deodhar AK, Rana RE.** Surgical physiology of wound healing: a review. *J Postgrad Med* 1997; 43: 52-6.

**Diehl P.** Beschreibung des Zellkulturlabors der Klinik u. Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie.[http://www.mrio.de/main02\\_2.php](http://www.mrio.de/main02_2.php); Klinik u. Poliklinik für Orthopädie u. Sportorthopädie am Klinikum Rechts der Isar der TU München

**Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The Inter-

national Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-7.

**Dong J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J.** In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 2001; 57: 208-16.

**Donovan PJ, Gearhart J.** The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-7.

**Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J et al.** Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 2003; 21: 622-9.

**Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H.** Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 615-9.

**Einhorn TA.** The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 7-21.

**Einhorn TA.** Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 59-S67.

**Einhorn TA, Lee CA.** Bone regeneration: new findings and potential clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9: 157-65.

**Eitel F, Seiler H, Schweiberer L.** Untersuchungen zur Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozess des menschlichen Röhrenknochens. I. Untersuchungsmethoden. *Unfallheilkunde* 1981; 84: 250-4.

**Eppley BL, Woodell JE, Higgins J.** Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502-8.

**Erdo F, Buhrlé C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B et al.** Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 780-5.

**Erices A, Conget P, Minguell JJ.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-42.

**Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F.** Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 763-9.

**Estes BT, Wu AW, Guilak F.** Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1222-32.

**Faraj AA.** Soft-tissue injury in total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 1084-5.

**Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M.** The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 3-11.

**Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA.** Reconstruction of the mandible with an autogenous irradiated cortical scaffold, autogenous corticocancellous bone-graft and autogenous platelet-rich-plasma: an animal experiment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 158-66.

**Ferrara N.** VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 617-24.

**Ferrara N, Davis-Smyth T.** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.

**Finlay JB, Hurtig MB, Hardie WR, Liggins AB, Batte SW.** Geometrical properties of the ovine tibia: a suitable animal model to study the pin-bone interface in fracture fixation? *Proc Inst Mech Eng [H]* 1995; 209: 37-50.

**Fontana S, Olmedo DG, Linares JA, Guglielmotti MB, Crosa ME.** Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent* 2004 Mar;13(1):73-8 2004; 13: 73-8.

**Frank CB, Jackson DW.** The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79: 1556-76.

**Frechette JP, Martineau I, Gagnon G.** Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* 2005; 84: 434-9.

**Friedenstein AJ.** Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976; 47: 327-59.

**Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV.** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-90.

**Friedlaender GE, Horowitz MC.** Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics* 1992; 15: 1171-5.

**Frost HM.** The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 283-93.

**Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC.** Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22: 45-53.

**Fukumura K, Matsunaga S, Yamamoto T, Nagamine T, Ishidou Y, Sakou T.** Immunolocalization of transforming growth factor-beta s and type I and type II receptors in rat articular cartilage. *Anticancer Res* 1998; 18: 4189-93.

**Gandhi A, Doumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS.** The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2006; 38: 540-6.

**Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C et al.** Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 2028-35.

**Gentry PA.** The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair. *J Comp Pathol* 1992; 107: 243-70.

**Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M.** Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 721-7.

**Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazzieri R, Noguera I et al.** TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* 1997; 15: 190-7.

**Godwin SL, Soltoff SP.** Extracellular calcium and platelet-derived growth factor promote receptor-mediated chemotaxis in osteoblasts through different signaling pathways. *J Biol Chem* 1997; 272: 11307-12.

**Goodship AE.** Mechanical stimulus to bone. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 4-6.

**Goto H, Matsuyama T, Miyamoto M, Yonamine Y, Izumi Y.** Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation. *J Periodontal Res* 2006; 41: 455-62.

**Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M.** The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 212-9.

**Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ.** An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004; 329: 77-84.

**Gronthos S, Chen S, Wang CY, Robey PG, Shi S.** Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 716-22.

**Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM.** Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 54-63.

**Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A et al.** Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116: 1827-35.

**Gruber R, Kandler B, Fischer MB, Watzek G.** Osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic proteins can be suppressed by platelet-released supernatant in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 188-93.

**Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB et al.** Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteo-

genic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 2004; 15: 29-35.

**Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G.** Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13: 529-35.

**Grynpas MD, Gahunia HK, Yuan J, Pritzker KP, Hartmann D, Tupy JH.** Analysis of collagens solubilized from cartilage of normal and spontaneously osteoarthritic rhesus monkeys. *Osteoarthritis Cartilage* 1994; 2: 227-34.

**Gugala Z, Gogolewski S.** Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *J Orthop Trauma* 1999; 13: 187-95.

**Guilak F, Ting-Beall HP, Baer AE, Trickey WR, Erickson GR, Setton LA.** Viscoelastic properties of intervertebral disc cells. Identification of two biomechanically distinct cell populations. *Spine* 1999; 24: 2475-83.

**Gunther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W.** Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen. Tierexperimentelle Untersuchung. *Orthopäde* 1998; 27: 105-17.

**Hallfeldt KK, Stutzle H, Puhmann M, Kessler S, Schweiberer L.** Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties. *J Surg Res* 1995; 59: 614-20.

**Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM.** Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4: 41-44.

**Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL et al.** Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2001; 7: 729-41.

**Hammacher A, Hellman U, Johnsson A, Ostman A, Gunnarsson K, Westermarck B et al.** A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *J Biol Chem* 1988; 263: 16493-8.

**Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ et al.** Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 855-63.

**Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B et al.** Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76: 230-9.

**Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T et al.** Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 2-12.

**Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R et al.** Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989; 84: 1663-70.

**Haynesworth SE, Kadiyala S, Liang LN.** Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet release suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates. *48<sup>th</sup> Meeting of the Orthopedic Research Society* 2002, Boston, MA.

**Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F et al.** Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol* 2007; 211: 682-91.

**Hertel R, Gerber A, Schlegel U, Cordey J, Ruegsegger P, Rahn BA.** Cancellous bone graft for skeletal reconstruction. Muscular versus periosteal bed--preliminary report. *Injury* 1994; 25 Suppl 1: A59-A70.

**Hock JM, Canalis E.** Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* 1994; 134: 1423-8.

**Hock JM, Centrella M, Canalis E.** Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988; 122: 254-60.

**Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D.** Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 975-84.

**Holy CE, Shoichet MS, Davies JE.** Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 376-82.

**Hom DB, Thatcher G, Tibesar R.** Growth factor therapy to improve soft tissue healing. *Facial Plast Surg* 2002; 18: 41-52.

**Hosgood G.** Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg* 1993; 22: 490-5.

**Hou R, Chen F, Yang Y, Cheng X, Gao Z, Yang HO et al.** Comparative study between coral-mesenchymal stem cells-rhBMP-2 composite and auto-bone-graft in rabbit critical-sized cranial defect model. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80: 85-93.

**Hunziker EB.** Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 432-63.

**Hutmacher DW.** Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21: 2529-43.

**Ignatius AA, Claes LE.** In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 1996; 17: 831-9.

**Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T et al.** Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 914-9.

**Iwasaki M, Nakahara H, Nakase T, Kimura T, Takaoka K, Caplan AI et al.** Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteogenesis but does not affect chondrogenesis in osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1195-204.

**Jager M, Bachmann R, Scharfstadt A, Krauspe R.** Ovine cord blood accommodates multipotent mesenchymal progenitor cells. *In Vivo* 2006; 20: 205-14.

**Jager M, Westhoff B, Wild A, Krauspe R.** Knochenspanentnahme am Becken. Techniken und Probleme. *Orthopäde* 2005; 34: 976-90.

**Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP.** Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64: 295-312.

**Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF.** Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275: 9645-52.

**Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K.** No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int Orthop* 2005; 29: 67-72.

**Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-9.

**Jilka RL.** Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41: 182-5.

**Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP.** Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-34.

**Kakudo N, Shimotsuma A, Miyake S, Kushida S, Kusumoto K.** Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2007; 84(1):191-7

**Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T.** Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 362-9.

**Kaplan FS, Shore EM.** Progressive osseous heteroplasia. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2084-94.

**Kassolis JD, Reynolds MA.** Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J Craniofac Surg* 2005; 16: 280-7.

**Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA.** Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000; 71: 1654-61.

**Kasten P, Luginbuhl R, Van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner M et al.** Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials* 2003; 24: 2593-603.

**Kasten P, Luginbuhl R, Vogel J, Niemeyer P, Weiss S, Van Griensven M et al.** Induktion von Knochengewebe auf unterschiedlichen Matrices: Eine In-vitro- und In-vivo-Pilotstudie in der SCID Maus. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2004; 142: 467-75.

**Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K.** The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 2008; 29: 3983-92

**Kasten P, Vogel J, Luginbuhl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H et al.** Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials* 2005; 26: 5879-89.

**Kasten P, Vogel J, Luginbuhl R, Niemeyer P, Weiss S, Schneider S et al.** Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. *Cells Tissues Organs* 2006; 183: 68-79.

**Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG.** Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 2005; 36: 758-69.

**Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H.** In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor-beta or platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 2005; 76: 760-7.

**Kenley RA, Yim K, Abrams J, Ron E, Turek T, Marden LJ et al.** Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharm Res* 1993; 10: 1393-401.

**Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K.** Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-301.

**Kevy SV, Jacobson MS.** Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel. *Proceedings of the 27th Annual Meeting of Service Biomaterials*. 2001.

**Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R et al.** Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res* 2004; 9: 337-44.

**Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC.** Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 86-94.

**Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N.** Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* 2007; 40: 522-8.

**Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M et al.** Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone* 2004; 35: 892-8.

**Kneser U., Schaefer D.J., Munder B., Klemm C., Andree C., Stark G.B.** Tissue Engineering of bone. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* 2002; 11: 107-16.

**Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE.** Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 7-19.

**Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, Semeins CM, Wuisman PI, Klein-Nulend J.** Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng* 2005; 11: 1780-8.

**Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I et al.** Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 328-37.

**Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG.** Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10711-6.

**Kruyt MC, Dhert WJ, Oner C, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD.** Optimization of bone-tissue engineering in goats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 69: 113-20.

**Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H.** Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res* 2002; 43: 529-34.

**Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D et al.** Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1335-47.

**Lacoste E, Martineau I, Gagnon G.** Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol* 2003; 74: 1498-507.

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

**Lanyon LE, Hampson WG, Goodship AE, Shah JS.** Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthop Scand* 1975; 46: 256-68.

**Lasne D, Donato J, Falet H, Rendu F.** Different abilities of thrombin receptor activating peptide and thrombin to induce platelet calcium rise and full release reaction. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1323-8.

**Lawrence DA.** Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7: 363-74.

**Lawrence WT.** Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998; 25: 321-40.

**Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ et al.** Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 2003; 50: 610-7.

**Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM et al.** BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 34387-94.

**Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K et al.** Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14: 311-24.

**LeGeros RZ.** Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 81-98.

**Li CM, Ho YR, Liu YC.** Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report. *J Formos Med Assoc* 2001; 100: 350-1.

**Li H, Zou X, Xue Q, Egund N, Lind M, Büniger C.** Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs. *Eur Spine J* 2004; 13(4): 354-8

**Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M et al.** PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 302-9.

**Lieberman JR, Berry DJ, Mont MA, Aaron RK, Callaghan JJ, Rajadhyaksha AD et al.** Osteonecrosis of the hip: management in the 21st century. *Instr Course Lect* 2003; 52: 337-55.

**Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA.** The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 1032-44.

**Liebich H-G.** Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. *Stuttgart, Schattauer Verlagsgesellschaft; 1993.*

- Liebschner MA.** Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 2004; 25: 1697-714.
- Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W et al.** Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein. *Mol Cell Biochem* 2006; 291: 1-10.
- Lind M.** Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998; 283: 2-37.
- Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF.** In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998; 275: H1054-61.
- Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E.** Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res* 1997; 46: 4-18.
- Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Giardino R, Rocca M, Corsi A et al.** Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 83-90.
- Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R.** Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 2001; 51: 292-9.
- Marx RE.** Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10: 225-8.
- Marx RE.** Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 489-96.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR.** Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-46.
- McKibbin B.** The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60-B: 150-62.
- Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, Muller L, Finkenzeller G, Hartl D et al.** Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Prolif* 2007; 40: 809-23.
- Metak G, Gomoll A, Wolter W, Barth G, Ascherl R.** Interspeziesvergleich zur Heilung standardisierter Knochendefekte mit und ohne autogene Knochentransplantation. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998; 115: 25-30.
- Mets T, Verdonk G.** Variations in the stromal cell population of human bone marrow during aging. *Mech Ageing Dev* 1981; 15: 41-9.
- Miller SC, Jee WS.** The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int* 1987; 41: 1-5.

- Mosheiff R, Friedman A, Friedman M, Liebergall M.** Quantification of guided regeneration of weight-bearing bones. *Orthopedics* 2003; 26: 789-94.
- Moxham JP, Kibblewhite DJ, Dvorak M, Perey B, Tencer AF, Bruce AG et al.** TGF-beta 1 forms functionally normal bone in a segmental sheep tibial diaphyseal defect. *J Otolaryngol* 1996; 25: 388-92.
- Mundy GR.** Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 24-8.
- Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG.** Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A: 1541-58.
- Muschler GF, Lane JM.** Orthopedic Surgery. In: Habbal MB, Reddi A.H (eds.) *Bone Grafts and Bone Substitutes*. Philadelphia: WB Saunders Co; 2007: 375-407.
- Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Jenkins CS, Packham MA.** Modification of platelet function. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 201: 343-59.
- Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI.** Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 1991; 9: 465-76.
- Newman E, Turner AS, Wark JD.** The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995; 16: 277S-84S.
- Newman RJ, Francis MJ, Duthie RB.** Nuclear magnetic resonance studies of experimentally induced delayed fracture union. *Clin Orthop Relat Res* 1987; 253-61.
- Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM.** Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1997; 11: 1-22.
- Niedhart C, Pingsmann A, Jurgens C, Marr A, Blatt R, Niethard FU.** Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm - eine prospektive, kontrollierte Studie. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2003; 141: 481-6.
- Niemeyer P, Krause U, Fellenberg J, Kasten P, Seckinger A, Ho AD et al.** Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2004; 177: 68-78.
- Niemeyer P, Krause U, Punzel M, Fellenberg J, Simank HG.** Mesenchymale Stammzellen zum Tissue Engineering von Knochen: Dreidimensionale osteogene Differenzierung auf mineralisiertem Kollagen. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2003; 141: 712-7.
- Nijweide PJ, Mulder RJ.** Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes. *Histochemistry* 1986; 84: 342-7.

- Noble BS, Reeve J.** Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159: 7-13.
- Nunamaker DM.** Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998; S56-65.
- Nwomeh BC, Yager DR, Cohen IK.** Physiology of the chronic wound. *Clin Plast Surg* 1998; 25: 341-56.
- O'Driscoll SW.** The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 1795-812.
- Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H.** Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 871-7.
- Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE.** Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J Craniofac Surg* 2003; 14: 292-300.
- Owen M.** The origin of bone cells. *Int Rev Cytol* 1970; 28: 213-38.
- Owen M.** Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10: 63-76.
- Owen M, Friedenstein AJ.** Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988; 136: 42-60.
- Palmer RH, Hulse DA, Hyman WA, Palmer DR.** Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1992; 22: 45-68.
- Parfitt AM.** Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994; 55: 273-86.
- Parfitt AM.** Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002; 30: 5-7.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al.** Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2: 595-610.
- Parikh SN.** Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 2002; 48: 142-8.
- Perren SM.** Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop Relat Res* 1979; 175-96.
- Perren SM.** Biomechanische Grundlagen der Frakturbehandlung. *Orthopäde* 1992; 21: 3-10.
- Perren SM.** Evolution and rationale of locked internal fixator technology. Introductory remarks. *Injury* 2001; 32 Suppl 2: B3-9.

**Perren SM, Cordey J.** Die Gewebsdifferenzierung in der Frakturheilung. *Unfallheilkunde* 1977; 80: 161-4.

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

**Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M et al.** Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 959-63.

**Pfeilschifter J, Diel I, Pilz U, Brunotte K, Naumann A, Ziegler R.** Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 707-17.

**Pfeilschifter J, Mundy GR.** Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 2024-8.

**Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RG, Minne HW, Ziegler R.** Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. *Endocrinology* 1990; 127: 69-75.

**Pfeilschifter J, Seyedin SM, Mundy GR.** Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* 1988; 82: 680-5.

**Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.

**Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR.** Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251: 3-11.

**Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R et al.** Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656-63.

**Pollock R, Stalley P, Lee K, Pennington D.** Free vascularized fibula grafts in limb-salvage surgery. *J Reconstr Microsurg* 2005; 21: 79-84.

**Praemer, A, Furner, S, and Rice, D.** Musculoskeletal Condition in the United States. *Am Acad Orthop Surg* 1992; Park Ridge, IL

**Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A et al.** Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001; 344: 385-6.

**Quirinia A.** Skin wound healing and ischaemia. Studies on possible interventions. *Dan Med Bull* 1999; 46: 85-105.

- Radasch RM.** Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29: 1045-vi.
- Rai B, Oest ME, Dupont KM, Ho KH, Teoh SH, Guldberg RE.** Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81: 888-99.
- Rajtova V.** [Development of the skeleton in sheep and goat. II. Osteogenesis of hindlimbs]. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 1973; 119: 76-85.
- Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK.** Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 775-9.
- Ranly DM, Lohmann CH, Andreacchio D, Boyan BD, Schwartz Z.** Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89: 139-47.
- Regauer M, Jurgens I, Kotsianos D, Stutzle H, Mutschler W, Schieker M.** [New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep]. *Zentralbl Chir* 2005; 130: 338-45.
- Remedios A.** Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29: 1029-44, v.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM.** Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-46.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM.** Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-25.
- Reyes M, Verfaillie CM.** Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 231-3.
- Roach HI, Shearer JR, Archer C.** The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg Br* 1989; 71: 549-53.
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L.** A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci SA* 1974; 71: 1207-10.
- Rubinacci A, Covini M, Bisogni C, Villa I, Galli M, Palumbo C et al.** Bone as an ion exchange system: evidence for a link between mechanotransduction and metabolic needs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E851-64.
- Rueger JM.** Knochenersatzmittel. State of the art und: Wohin gehen wir? *Unfallchirurg* 1996; 99: 228-36.
- Ruegsegger P, Koller B, Muller R.** A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 24-9.

**Rutherford RB, Ross R.** Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J Cell Biol* 1976; 69: 196-203.

**Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE.** Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol* 2004; 187: 319-28.

**Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T.** Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2521-9.

**Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL.** Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4: 743-65.

**Saris DB, Sanyal A, An KN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW.** Periosteum responds to dynamic fluid pressure by proliferating in vitro. *J Orthop Res* 1999; 17: 668-77.

**Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L et al.** Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* 2006; 27: 1817-23.

**Schmidmaier G, Wildemann B.** Biologische und physikalische Grundlagen. In: Gollwitzer H, Gradinger H, (Hrsg) *Ossäre Integration*. Springer; 2006: 24-9.

**Schmitz JP, Hollinger JO.** A simple instrument for achieving accurate alignment and pre-insertion stability with mandibular bone plates. *Plast Reconstr Surg* 1986; 78: 822-3.

**Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ.** Knochenersatzwerkstoffe. *Orthopäde* 2003; 32: 2-10.

**Schönberger T, Hahn J, Kasten, P, Südkamp NP, Fechner K, and Pearce S.** A novel-software-based evaluation method for objective quantification of bone regeneration in experimental bone defects. *European Cells and Materials* 14 (Suppl.1), 92. 2007.

**Schulte W.** Die Retraktion des Blutgerinnsels und ihre Bedeutung für die primäre Knochenheilung von Kieferknochen. München, Carl Hans Verlag; 1964.

**Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ.** Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cells* 2002; 20: 530-41.

**Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ.** Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005; 320: 269-76.

**Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD et al.** Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* 2001; 81: 312-9.

- Service RF.** Tissue engineers build new bone. *Science* 2000; 289: 1498-500.
- Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y.** Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg* 2001; 12: 586-95.
- Shapiro F.** Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am* 1988; 70: 1067-81.
- Shore EM, Ahn J, Jan dB, Li M, Xu M, Gardner RJ et al.** Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *N Engl J Med* 2002; 346: 99-106.
- Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, de Boer J.** Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Orthop Res* 2007; 25: 1029-41.
- Simmons DJ.** Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res* 1985; 100-13.
- Simon TM, Van Sickle DC, Kunishima DH, Jackson DW.** Cambium cell stimulation from surgical release of the periosteum. *J Orthop Res* 2003; 21: 470-80.
- Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ et al.** Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992; 326: 726-32.
- Solheim E.** Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998; 22: 410-6.
- Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ.** Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem* 1995; 270: 9420-8.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE et al.** Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54: 132-41.
- Sturmer KM.** Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. *Orthopäde* 1996; 25: 386-93.
- Sturmer KM, Schuchardt W.** [New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullar nailing]. *Unfallheilkunde* 1980; 83: 341-5.
- Sylvester KG, Longaker MT.** Stem cells: review and update. *Arch Surg* 2004; 139: 93-9.
- Tatakis DN.** Blood coagulation factors in periodontal pathophysiology: a review with emphasis on the role of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18: 28-33.

**Tatakis DN, Dolce C, Dziak R.** Thrombin's effects on osteoblastic cells. I. Cytosolic calcium and phosphoinositides. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 119-27.

**Tatakis DN, Dolce C, Dziak R, Fenton JW.** Thrombin effects on osteoblastic cells. II. Structure-function relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 181-8.

**Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H, Imamura Y, Fukuda M.** Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *Eur J Histochem* 2000; 44: 269-78.

**Trostle SS, Markel MD.** Fracture biology, biomechanics, and internal fixation. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996; 12: 19-46.

**Tsukamoto T, Matsui T, Fukase M, Fujita T.** Platelet-derived growth factor B chain homodimer enhances chemotaxis and DNA synthesis in normal osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 745-51.

**Tzeng DY, Deuel TF, Huang JS, Baehner RL.** Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation. *Blood* 1985; 66: 179-83.

**Verfaillie C.** Stem cell plasticity. *Hematology* 2005; 10 Suppl 1: 293-6.

**Verfaillie CM.** Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 502-8.

**Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM.** Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 369-91.

**Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P.** Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets* 2006; 17: 462-9.

**Voggenreiter G, Ascherl R, Fruh HJ, Blumel G, Schmit-Neuerburg KP.** Konservierung und Sterilisation von Kortikalis--biomechanische Untersuchungen an der Ratte. *Unfallchirurg* 1995; 98: 53-8.

**Vohrer, J.** HLA-unabhängige Transplantation humaner mesenchymaler Stammzellen auf mineralisiertem Kollagen zur Knochenregeneration im „Critical-Size“ Defektmodell am Schaf. Dissertation 2007

**Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U et al.** Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33: 1402-16.

**Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD, Sporn MB.** Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J Clin Invest* 1990; 86: 1976-84.

**Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM.** Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 2002; 31: 1-7.

**Webb JCJ, Tricker J.** Bone biology A review of fracture healing. *Curr Orthopaedics* 2007; 2000: 457-63.

**Wefer J, Wefer A, Schrott HE, Thermann H, Wippermann BW.** [Healing of autologous cancellous bone transplants and hydroxylapatite ceramics in tibial segment defects. Value of ultrasonic follow up]. *Unfallchirurg* 2000; 103: 452-61.

**Weibrich G, Kleis W, Hafner G, Hitzler WE.** Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex and platelet count. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2002; 97-102.

**Weissman IL.** Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-6.

**Wertz JR, Lane JM, Burstein AH, Justin R, Klein R, Tomin E.** Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res* 1996; 14: 85-93.

**Wheeler T, Elcock CL, Anthony FW.** Angiogenesis and the placental environment. *Placenta* 1995; 16: 289-96.

**Whitman DH, Berry RL, Green DM.** Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294-9.

**Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F.** Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2003; 196-212.

**Willenegger H, Perren SM, Schenk R.** Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung. *Chirurg* 1971; 42: 241-52.

**Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P.** Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res* 2003; 14: 213-8.

**Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H et al.** Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 418-29.

**Wippermann B, Donow C, Schrott HE, den Boer FC, Blokhuis T, Patka P.** The influence of hydroxyapatite granules on the healing of a segmental defect filled with autologous bone marrow. *Ann Chir Gynaecol* 1999; 88: 194-7.

**Wissing H., Stürmer KM, Breidenstein G.** Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde* 1990; 212: 479-88.

**Wlodarski KH.** Alkaline and acid phosphatase activity in murine femoral bone marrow following X-irradiation, or X-irradiation and repopulation with syngenic or allogeneic bone marrow or marrow stroma cells. *Folia Biol (Krakow)* 1990; 38: 49-56.

**Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB.** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-70.

**Wright V, Peng H, Usas A, Young B, Gearhart B, Cummins J et al.** BMP4-expressing muscle-derived stem cells differentiate into osteogenic lineage and improve bone healing in immunocompetent mice. *Mol Ther* 2002; 6: 169-78.

**Yamamoto K, Hayashi J, Miyamura H, Eguchi S.** A comparative study of the effect of autologous platelet-rich plasma and fresh autologous whole blood on haemostasis after cardiac surgery. *Cardiovasc Surg* 1996; 4: 9-14.

**Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK.** The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001; 7: 679-89.

**Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR.** In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 2007; 13: 619-27.

**Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S et al.** In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 2000; 69: 128-34.

**You TM, Choi BH, Li J, Jung JH, Lee HJ, Lee SH et al.** The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: e8-12.

**Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K et al.** Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001; 264: 51-62.

**Yuehuei HA, Friedman JR.** Animal models in orthopaedic research. *Crc Pr Inc* 1998.

**Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R et al.** Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 15-22.

**Zheng B, Cao B, Li G, Huard J.** Mouse adipose-derived stem cells undergo multi-lineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng* 2006; 12: 1891-901.

**Zheng J, Vagnoni KE, Bird IM, Magness RR.** Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II type-1 receptors in

the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 1997; 56: 1189-97.

**Zhu L, Liu W, Cui L, Cao Y.** Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 423-33.

**Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J et al.** Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001; 41: 1217-24.

**Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-95.

**Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-28.

**Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA et al.** Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-88

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren für Chondrogenese ..	42
Tab. 2: Gruppeneinteilung für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens.....	54
Tab. 3: Gruppeneinteilung .....	55
Tab. 4: Defektfüllung entsprechend der Versuchsgruppe.....	59
Tab. 5: Filterkombinationen für Fluoreszenzmikroskopie .....	66
Tab. 6: Überblick über die Alzianblaufärbung aller Pellets (n=12 Schafe).....	73
Tab. 7: Überblick über die Kollagen Typ II Immunhistologie (n=12 Schafe) .....	73
Tab. 8: Vergleich der Wachstumsfaktorkonzentrationen .....	79
Tab. 9: Angaben aus der Literatur bezüglich der Konzentration von Thrombozyten und Wachstumsfaktoren.....	106

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des Lamellenknochens ( <a href="http://www.wikibooks.org/wiki/Histologie">www.wikibooks.org/wiki/Histologie</a> ).....	11
Abb. 2: Einteilung der Alzianblaufärbung (A, C, E und G) und Kollagen Typ I Immunhistochemie (B, D, F und H), in sehr gute (A und B), bzw. mäßig-schlechte Färbung (C und D, E und F. ) und negativ (G und H) .....	46
Abb. 3: Alizarinfärbung an Tag 14 (A); Farbumschlag mit Cetylpyridiniumchlorid (B).....	47
Abb. 4: Metallblock .....	58
Abb. 5: OP-Ansicht: mit mineralisiertem Kollagen und Zellen gefüllter Defekt .....	59
Abb. 6: Schaf in Unterstützungsgurt .....	60
Abb. 7: Schrittweises Vorgehen zur Auswertung der Röntgenbilder .....	63
Abb. 8: Definition der Pixelbereiche für beginnende, gute und sehr gute Ossifikation, sowie Darstellung der drei Bereiche im Histogramm.....	64
Abb. 9: Festlegung des zu evaluierenden Bereichs.....	68
Abb. 10: Tag 6 nach Isolation; verschieden dicht besiedelte Bereiche der Zellkulturflasche.....	70
Abb. 11: Mittelwerte der Populationsverdopplungen/24h von Schaf 1-12 nach den Passagen 1-4 (A); mikroskopische Ansicht von Zellen in Passage 22 (B); sowie	

exemplarische Darstellung der Populationsverdopplungsraten bis zur Passage 10 von Schaf A1 (C) .....	71
Abb. 12: Adipogene Differenzierung.....	72
Abb. 13: Alizarinrotfärbung an Tag 21 makroskopisch (A); und mikroskopisch (B) .....	74
Abb. 14: Kalzifizierungsverlauf (normiert auf Protein) der Zellen aller Schafe (Mittelwerte +/- SD von =12, bzw n = 7 für Negativkontrolle); 1) statistisch signifikant zu Tag1 des entsprechenden Mediums, 2) statistisch signifikant zu Tag7 des entsprechenden Mediums, 3) statistisch signifikant zu Tag 14 des entsprechenden Mediums, 4) statistisch signifikant zur Negativkontrolle (Verfaillie-Medium) desselben Tages .....	75
Abb. 15: Proteinverlauf aller Schafe (Mittelwerte +/- SD von n=12, bzw. n=7 bei Negativkontrollen).....	76
Abb. 16: Verlauf der ALP-Aktivität (Mittelwerte +/- SD von n=12, bzw. n=7 bei Negativkontrollen, * = $p \leq 0,01$ ) .....	77
Abb. 17: Spendervaribilität im Mineralisierungsgrad an Tag 21.....	77
Abb. 18: Spendervaribilität der ALP-Aktivität an Tag 28.....	78
Abb. 19: Kalzifizierungsverlauf von unterschiedlich supplementierten osteogenen Medien (n=5) .....	80
Abb. 20: Proteinverlauf bei unterschiedlich supplementierten osteogenen Medien (n=5) .....	81
Abb. 21: Röntgenbilder nach Euthanasie der Schafe A1, A2, A3, A5 und A7 der Versuchsgruppe mit ASC .....	83
Abb. 22: Röntgenbilder nach Euthanasie der Schafe B1 bis B5 der Gruppe mit ATSC+PRP .....	84
Abb. 23: Vergleich der radiologischen Verknöcherung aller Gruppen ;Mittelwerte +/- SD von n=5.....	85
Abb. 24: Direkter Vergleich der Versuchsgruppe A( ASC) mit der Vergleichsgruppe C (BMSC) ; Mittelwerte +/- SD von n=5, mit folgenden signifikanten Unterschiede: Woche 10: $p=0,048$ ; Woche 12 $p=0,001$ ; Woche 14: $p=0,01$ ; Woche 16: $p=0,003$ ; Woche 18: $p=0,004$ ; Woche 20: $p=0,003$ ; Woche 22: $p=0,000$ ; Woche 24: $p=0,003$ ; Woche 26: $p=0,022$ ) .....	86
Abb. 25: Vergleich der Versuchsgruppe B (ASC+PRP) mit der Vergleichsgruppe C (BMSC); Mittlewerte +/- SD, mit folgenden signifikanten Unterschieden: Woche 10:	

p=0,0013; Woche 12: p=0,004; Woche 14: p=0,012; Woche 16: p=0,007; Woche 18: p=0,045; Woche 20: p=0,04; Woche 22: p=0,031; Woche 24: p=0,038) .....	86
Abb. 26: Vergleich der beiden Versuchsgruppen, Mittelwerte +/- SD für n=5.....	87
Abb. 27: Verlauf der Verknöcherung der Versuchsgruppe B;Mittelwerte +/- SD von n=5 .....	87
Abb. 28: 3D-CT-Rekonstruktionen der Versuchsgruppe A (ASC) und B (ASC+PRP) .....	88
Abb. 29: Vergleich des Knochenvolumenanteils der ASC und ASC+PRP-Gruppen; Mittelwerte und SD von n=5 .....	89
Abb. 30: Übersichtsscans der GE-gefärbten Schnitte der Versuchsgruppe A (mineralisiertes Kollagen+ASC).....	90
Abb. 31: A) Schaf A3:aneinanderstossende Vorwölbungen des Fettmarks mit dazwischen gebildetem Fett- und Bindegewebe B) Schaf A1: rechts Fettmarkvorwölbung; links Fettgewebe mit Bindegewebsstrukturen C) und D) Schaf A1 herausvergrößerte Stellen des Fettgewebes, mit durchziehenden Bindegewebsstreifen; innerhalb der Bindegewebsstreifen sind mehrere Gefäßquerschnitte zu sehen.....	91
Abb. 32: Übersichtsscans der GE-gefärbten Schnitte der Versuchsgruppe B (mineralisiertes Kollagen+ASC+PRP) .....	92
Abb. 33: Schaf B4: zum Teil mineralisierte Osteoidinsel mit Matrixresten; blasslila: Bindegewebe, weiss: Fettmark, blau: Osteoid, rot/pink: Knochen, schwarz/dunkelrot: Matrixreste .....	92
Abb. 34: Schaf B2; A) große Anteile Ostoid (blau); rechts im Bild mineralisierte Matrix; B) Geflechtknochen mit mineralisierter Knochensubstanz (rot), mit Matrixresten (dunkelrot/schwarz) und beginnender Fettmarkbildung (weisse Vakuolen) .....	93
Abb. 35: Schaf B2; Bereich eines sehr ausgereiften Geflechtknochens mit Fettmark (FM); am äußeren Rand des Fettmarks befindet sich eine pallisadenartig Anordnung von Osteoblasten, den sogenannten Bone Lining Cells (BLC;zwischen diesen Zellen und der mineralisierten Knochensubstanz ist ein breiter Osteoidsaum zu sehen; innerhalb der mineralisierten Knochensubstanz sind Matrixreste zu sehen (M) .....	94

Abb. 36: Schaf B2: Osteotomiekannte, mit den geordneten Strukturen des ursprünglichen Lamellenknochen der Kortikalis rechts und den ungeordneten Strukturen des neu gebildeten Geflechtknochen links.....	94
Abb. 37:Schaf B2: reife Knochensubstanz mit Matrixresten, innerhalb derer mehrere Zellen zu erkennen sind .....	94
Abb. 38: Fluoreszenzaufnahme von B2; vollständige Überbrückung des Defekts mit 8. Wochen (grün), Anbau von Knochen in der 10.Woche rot.....	95
Abb. 39: Fluoreszenzaufnahme von Schaf C2, keine Überbrückung zum frühen Zeitpunkt (8 Wochen), erst nach der zweiten Fluoreszenzmarkierung, also nach 10 Wochen erfolgt die knöcherner Überbrückung des Defekts (rot) .....	96
Abb. 40: Knochenteil in Prozent der Versuchs- und Vergleichsgruppen, bestimmt mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms GIMP.....	97
Abb. 41: Gesamtscore nach Werntz: Vergleich der Mittelwerte der Versuchs- und Vergleichsgruppen mit Standardabweichung .....	97
Abb. 42: Verknöcherung bei der Auswertungsmethode nach Wentz.....	98
Abb. 43: Gesamtscore bei der Auswertungsmethode nach Mosheiff .....	99

## 11 Abkürzungsverzeichnis

A	alpha
B	Beta
°	Grad
μ	Mikro-
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ALP	Alkalische Phosphatase
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ASC	Adipose tissue derived stem cells = Fettstammzelle
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	Bone Morphogenic Proteins
BMSC	Bone Marrow derived Stem Cells = Stammzellen aus Knochenmark
BSA	Bovines Serum Albumin
BV	bone volume Knochenvolumen
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
ca.	circa
CaCl	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CDHA	Calcium deficient hydroxyapatit
CFU-f	Colony-forming unit fibroblasts

## Abkürzungsverzeichnis

---

CH	Schweiz
Cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CSD	„critical sized defect“ Defekt kritischer Größe
CT	Computertomographie
D	Tag
D	Deutschland
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTI	Dauertropfinfusion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
FCS	Fetal Calf Serum Fötales Kälberserum
FFP	Fresh Frozen Plasma
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramm
G	Zentrifugalbeschleunigung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HA	Hydroxyapatit
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
H <sub>2</sub> O	Wasser
IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin like growth factor

## Abkürzungsverzeichnis

---

IL	Interleukin
i.m.	intra muskulär
i.v.	intra venös
ISCT	International Society of Cellular Therapy
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
kVp	Kilovolt Potential
keV	Kilo-Elektronenvolt
l	Liter
LCP	Locking Compression Plate
Lsg.	Lösung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	Stoffmengenkonzentration
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMA	Methylmethacrylat
min	Minuten
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natrium-dihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

## Abkürzungsverzeichnis

---

OP	Operation
P	Passage
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PD	Populationsverdopplungen
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin
PO <sub>4</sub>	Phosphat
PBS	Phosphat buffered Saline = Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
pNPP	para-Nitrophenyl Phosphat
PPP	Platelet poor plasma Plättchenarmes Plasma
PRP	Platelet rich plasma Plättchenreiches Plasma
PRGF	Platelet rich in growth factors
PRS	Platelet released supernatant
Rpm	Rounds per minute Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered Saline Tris gepufferte Salzlösung
TGF	Transforming growth factor
TV	Total volume
U	Unit = Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## Abkürzungsverzeichnis

---

v/v	volume/volume
XEM	Xylolersatzmittel
z.B.	zum Beispiel

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med.vet.habil. W. Schmahl danke ich herzlich für die Ermöglichung und die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Prof. rer. biol. hum. Wiltrud Richter, Vorsitzende der Abteilung Experimentelle Orthopädie, der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg, möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeit und die zur Verfügung gestellten technischen Mittel bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Philip Kasten für die nette und kompetente Betreuung meiner Arbeit und die sorgfältige und schnelle Korrektur der Manuskripte. Außerdem danke ich Dr. Philip Niemeyer für die Vermittlung dieses interessanten Themas, der Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen und konstruktiven Hilfe bei Problemen.

Allen Kollegen und Kolleginnen der Forschungsabteilung Experimentelle Orthopädie Heidelberg, besonders aber Frau Katharina Haug, Dipl. Biol. Patricia Janicki und Herrn Ingo Beyen, möchte ich für den besonders guten Zusammenhalt und die hervorragende Teamarbeit danken.

Bei der Arbeitsgruppe um Dr. Philip Niemeyer in Freiburg, mit Thomas Schönberger und Nina Siebert möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Auswertung der tierexperimentellen Ergebnisse bedanken.

Ich danke außerdem dem Team des AO Forschungsinstitut in Davos: Insbesondere Simon Pearce, Stefan Milz, Vittoria Brighenti, Nora Goudsouzian, Tanja Witte und dem Tierpflegerteam. Vor allem aber Joachim Hahn für die gute Zusammenarbeit in Davos und die hervorragende Versorgung und Betreuung der Versuchschafe.

Mein allerherzlichster Dank gilt nicht zuletzt Jörg Schrödinger, für seine Geduld und mentale Unterstützung, besonders während der letzten Monate.

