

Aus dem  
**Institut für Veterinär-Biochemie**

des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

und dem

**Julius Wolff Institut**

Charité  
Universitätsmedizin Berlin

**Einfluss von autologen mesenchymalen Stammzellen  
auf eine Pseudarthrose unter besonderer Beachtung  
der periostalen Rekonstruktion.  
Eine immunhistologische und histomorphometrische Studie  
im Rattenmodell**

**Inaugural-Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Antonia Ertelt  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2011  
Journal Nr. 3488

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Einspanier  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. N. Duda  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

rats, animal models, bones, healing, fractures, malunited (MeSH), bone marrow cells, mesenchymal stem cells (MeSH)

Tag der Promotion: 28.09.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-046-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

## **Meinen Eltern**



1.	Abkürzungsverzeichnis.....	7
2.	Einleitung.....	8
3.	Stand des Wissens .....	9
3.1.	Makroskopischer Knochenaufbau.....	9
3.2.	Mikroskopischer Knochenaufbau .....	9
3.3.	Osteogenese.....	12
3.4.	Frakturheilung und die Bedeutung des Periost .....	13
3.5.	atrophe Pseudarthrose .....	14
3.6.	Mesenchymale Stammzellen.....	16
3.7.	Tiermodell .....	18
3.8.	Ziele und Hypothesen der Studie .....	18
4.	Material und Methoden.....	19
4.1.	Versuchstiere.....	19
4.2.	Gruppeneinteilung.....	19
4.3.	Stammzellenentnahme .....	19
4.4.	Anzüchtung mesenchymaler Stammzellen .....	20
4.5.	Osteotomie des Os femoris .....	21
4.6.	Wöchentliche Verlaufskontrolle .....	27
4.7.	Euthanasie .....	27
4.8.	Vorbereitung für die Färbungen der Paraffinpräparate .....	27
4.9.	Färbungen der Paraffinpräparate.....	28
4.10.	Vorbereitung für die Safranin-Orange/von Kossa Färbung .....	31
4.11.	Safranin Orange/von Kossa Färbung .....	32
4.12.	Auswertung .....	32
4.12.1.	Röntgenologische Auswertung .....	32
4.12.2.	Quantitative Auswertung.....	33
4.12.3.	Deskriptive Auswertung der histologischen Schnitte .....	33
4.12.4.	Computergestützte Bildanalyse.....	33
4.12.5.	Statistik.....	40
5.	Ergebnisse .....	41
5.1.	Röntgen-Daten .....	41
5.2.	Deskriptive Histologie.....	42
5.3.	Statistische Auswertung .....	47
5.3.1.	Gewichte.....	47
5.3.2.	Temperatur .....	48
5.3.3.	Osteotomiespaltweite .....	48
5.3.4.	Gefäßdichte .....	50
5.3.5.	Dichte der Osteoklasten .....	54
5.3.6.	Histomorphometrische Analyse .....	56
5.3.7.	Prozentualer Anteil Kollagen-II-positiver Flächen .....	61
5.3.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	63

6.	Diskussion .....	65
6.1.	Tiermodell .....	65
6.2.	Diskussion von Material und Methoden .....	65
6.2.1.	Osteotomie .....	65
6.2.2.	Fixateur externe .....	66
6.2.3.	Pseudarthrose Modell .....	66
6.2.4.	Zellen, Zellkultur und Transplantation .....	67
6.2.5.	Histologische Aufarbeitung .....	68
6.2.6.	Auswertung mit Hilfe der Bildanalyse .....	69
6.2.7.	Histologie .....	70
6.2.7.1.	Deskriptive Histologie .....	70
6.2.7.2.	Gefäßzählung .....	71
6.2.7.3.	Osteoklastenzählung .....	71
6.3.	Diskussion der Ergebnisse .....	72
6.3.1.	Operationsverlauf und Tierkontrolle .....	72
6.3.2.	Radiologie .....	72
6.3.3.	Histologie und Histomorphometrie .....	73
6.3.4.	Vergleich mit anderen Studien .....	76
7.	Schlussfolgerung .....	80
8.	Zusammenfassung .....	81
9.	Summary .....	83
10.	Literatur .....	85
	Danksagung .....	94
	Selbständigkeitserklärung .....	95

# 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest	aqua destillata
$\alpha$ -DMEM	alpha-Dulbecco`s Modified Eagle Medium
BMU	basic multicellular units
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CD	Compact Disc
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
d. h.	das heißt
et al.	et alii
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
KGW	Kilogramm Körpergewicht
L	Liter
$\mu$ l	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mio.	Millionen
min	Minuten
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
°	Grad
%	Prozent
&	und
SD	Standard Deviation, Standardabweichung

## 2. Einleitung

Bei 5 bis 20% aller Frakturen wird die Entstehung einer Pseudarthrose beobachtet [1-3]. Schwerwiegende Frakturen mit umfangreichen Defekten der Knochenstruktur, verzögerte Frakturheilung, Pseudarthrosen sowie Infektionen sind trotz Fortschritts in der Medizin bestehende Probleme. Pseudarthrosen und verzögerte Knochenheilungen erfordern häufig eine langwierige und letztendlich nicht immer erfolgreiche Behandlung des Patienten. Verfahrenswechsel in der Therapie und die häufig verwendete Spongiosa-Plastik bergen zusätzliche Risiken. Dadurch entstehen massive Einschränkungen der Lebensqualität des Patienten einerseits und andererseits erhebliche Mehrkosten für das Gesundheitssystem durch zusätzliche Operationen, verlängerte Krankenhausaufenthalte und Nachbehandlungszeiten. Dazu kommt der gesamtwirtschaftliche Schaden durch die zum Teil jahrelange Arbeitsunfähigkeit bis hin zur bleibenden Invalidität des Betroffenen.

Eine neue Therapieform stellen mesenchymale Stammzellen (MSCs) dar. Erstmals wurden mesenchymale Stammzellen 1966 in einer Studie von Friedenstein, welcher sie aus dem Knochenmark von Ratten isolierten, identifiziert [4].

Mesenchymale Stammzellen gewinnen aufgrund ihrer enormen Proliferationsfähigkeit, ihrer leichten Kultivierbarkeit und der Eigenschaft, sich *in vitro* und *in vivo* in Osteozyten zu differenzieren, zunehmend an Bedeutung für die Frakturheilung [5]. MSCs werden erfolgreich in der Behandlung von Knochen und Gelenken eingesetzt, insbesondere bei der Therapie von Knochennekrose und Behandlung von Knorpeldefekten [6-8].

In Studien, die sich mit der Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe beschäftigen, wurden mittels Stammzellen aus dem Knochenmark, welche *in vitro* auf künstliche Trägermaterialien aufgebracht wurden, eine Verbesserung der Heilung gegenüber den nur mit Trägermaterial behandelten oder unbehandelten Defekten erzielt [9]. In der hier durchgeführten Studie sollten die Auswirkungen lokal applizierter autologer mesenchymaler Stammzellen auf die Heilung einer Pseudarthrose, die durch die Osteotomie des Os femoris der Ratte geschaffen wurde, analysiert werden.

Die klinische Relevanz des vorliegenden Versuches liegt darin, eine neue, weniger traumatisierende Behandlung zu entwickeln, die bei einer verzögerten bzw. ausbleibenden knöchernen Heilung im Vergleich zu den bisher etablierten operativen Strategien eingesetzt werden könnte.

Desweiteren sollen neue Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung des Periosts bei der Frakturheilung gewonnen werden, da bisher noch keine Forschungsarbeiten vorliegen, die sich explizit mit dem Verlauf der periostalen Rekonstruktion bei der Heilung eines Knochendefektes beschäftigen. Beim Patienten mit verzögerter oder ausbleibender Knochenheilung könnte das Verfahren eine ergänzende und/oder alternative Methode zum chirurgischen Vorgehen darstellen.



### 3. Stand des Wissens

#### 3.1. Makroskopischer Knochenaufbau

Knochen sind die wichtigsten Bestandteile des Skeletts. Sie gleichen einem System aus Hebeln, die jene Kräfte, welche während einer Muskelkontraktion entstehen, vervielfachen und in körperliche Bewegung umsetzen. Der Knochen gehört zu den härtesten Geweben im Körper. Vergleichbaren Belastungen widerstehen nur noch Zähne und ggf. zu einem gewissen Grade Knorpel.

Makroskopisch können lange, kurze und platte Knochen unterschieden werden. Lange Knochen werden auch als Röhrenknochen bezeichnet. Sie sind typisch für die Extremitäten [10]. Für Röhrenknochen sind ein schlanker Knochenschaft (Diaphyse, Corpus) und gelenkflächenbildende Epiphysen an beiden Enden charakteristisch. Die Gelenkflächen weisen einen stark vergrößerten Querschnitt auf. Dieser dient der besseren Verteilung der auf die Gelenkflächen wirkenden Kräfte [11]. Zwischen Epiphyse und Diaphyse liegt die Metaphyse. Sie stellt während der Knochenentwicklung das Wachstumsreservoir für das Längenwachstum der Knochen dar [12]. Epi-, Meta- und Diaphyse unterscheiden sich in ihrer Knochenstruktur, welche kompakt und dicht sein kann (Substantia compacta) oder aber ein schwammiges Bälkchenwerk (Substantia spongiosa) bildet, in dem sich das blutbildende Knochenmark des Erwachsenen befindet [13]. Die Diaphysen zeichnen sich durch eine sehr dicke, makroskopisch homogen aussehende, oberflächliche Substantia compacta und nur sehr wenige ihr innen anliegende Knochenbälkchen aus. Im Knocheninneren verbleibt eine zusammenhängende Knochenhöhle. In den Epiphysen ist die Substantia compacta dünn und das Innere wird von Knochenbälkchen ausgefüllt [10]. In der Metaphyse ist ein allmählicher Übergang zwischen den beschriebenen Knochensubstanzen zu finden. Da die Substantia spongiosa eine geringere Steifigkeit als die Substantia compacta aufweist, ist sie in der Lage, mehr Energie zu absorbieren, bevor eine plastische Verformung (Knochenbruch) entsteht [11].

Zum Knochen gehören zwei Bindegewebsschichten. Einerseits das Periost, das den größten Teil des Knochens von außen bedeckt, andererseits das Endost, welches dem Knochen von innen anliegt und somit die Markhöhle auskleidet [10]. Das Periost setzt sich zusammen aus einem oberflächlichen Stratum fibrosum, von dem Fibrae perforantes in die Substantia compacta des Knochens einstrahlen, sowie einem tiefen zellreichen Stratum osteogenicum (Cambium), in dem zahlreiche Blutgefäße und Nerven verlaufen [14]. Desweiteren enthält die innere Schicht Cambium-Zellen, bei denen es sich um osteogene Progenitorzellen mesenchymalen Ursprungs handelt. Ihnen wird die Fähigkeit zur Knorpel- und Knochenneubildung zugesprochen [10, 15]. Im Gelenkbereich geht das Periost unter Abhebung von der Knochenunterlage in die Gelenkkapsel über. Das Endost ist wesentlich dünner als das Periost und enthält Vorläuferzellen von Osteoblasten, aber auch ausdifferenzierte Osteoblasten und Osteoklasten [14].

#### 3.2. Mikroskopischer Knochenaufbau

Alle Knochen bestehen aus demselben Baumaterial, nämlich aus den Knochenzellen, der Matrix und dem Osteoid [10]. Das Knochengewebe besteht zu etwa 30% aus organischer Matrix, diese wiederum zu 95% aus Kollagen Typ I [16]. Die restlichen 5% bildet die ungeformte Grundsubstanz in Form von Proteoglykanen und Glukosaminoglykanen.

Mit 70% stellt die anorganische Matrix den Hauptteil des Knochengewebes dar. Sie setzt sich hauptsächlich aus Calcium und Phosphat, welches in Form von in Hydroxylapatit gebundenen ist, sowie aus Karbonaten, Natrium, Magnesium und Eisen zusammen [17].

Die Zellen des Knochens sind vielfältig und treten in unterschiedlichen Formen auf. Man unterscheidet die Osteoprogenitorzellen, die Osteoblasten, die Knochenoberflächenzellen (Bone lining cells), die Osteozyten und die Osteoklasten [18]. Bei Bedarf können darüber hinaus auch Zellen der unspezifischen und spezifischen Abwehr (Makrophagen, Mikrophagen und Lymphozyten) im Knochengewebe auftreten. Die Osteoblasten gehen aus Knochenstammzellen, welche ihrerseits von pluripotenten Mesenchymzellen abstammen, oder stark teilungsfähigen osteogenetischen Zellen hervor. Osteoblasten befinden sich in einem Zustand, in dem sie ihre Teilungsfähigkeit verloren haben, d.h. sie sind nicht mehr zur Mitose fähig. Deshalb müssen sie bei Bedarf immer wieder aus den Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) nachgebildet werden. Beim Menschen durchlaufen die Stammzellen einen Generationszyklus von 36 Stunden. Während dieser Zeit entwickelt sich ein Teil der Stammzellen zu Osteoblasten, welche der Knochenbildung dienen. Die Osteoblasten und die Stammzellen sind direkt auf der Knochenoberfläche lokalisiert, wobei letztere auch im Peri- und Endost (Stratum osteogenicum) zu finden sind [17]. Osteoblasten sind für die Synthese des Osteoids, der unverkalkten Knochensubstanz, welche hauptsächlich aus Kollagen und Proteoglykanen besteht, verantwortlich und wirken bei der Hartschubstanzbildung mit. Gesteuert wird die Aktivität vor allem durch Hormone (z.B. somatotropes Hormon). Osteoblasten haben feine zytoplasmatische Fortsätze, mit denen sie untereinander in Verbindung stehen. Erkennbar werden die Fortsätze vor allem dann, wenn die Osteoblasten beginnen, sich mit Grundsubstanz zu umgeben [10]. Mit Fortschreiten der Mineralisation flachen sich die Osteoblasten ab und werden somit zu Osteozyten. Diese enthalten weniger Zytoplasma, weniger RNA, haben einen dichteren chromatinreichen Kern und einen kleineren Golgi-Apparat. Als Osteozyt wird eine Knochenzelle nur dann bezeichnet, wenn sie ringsum von Matrix umgeben ist. Etwa 10% der Osteoblasten mauern sich in Osteoid ein und differenzieren sich zu Osteozyten. Die anderen 90% bauen weiterhin Knochen auf und sorgen so für Knochenzuwachs [19]. Charakteristisch für Osteozyten sind feine filopodienartige Fortsätze, die sich in feinen Knochenkanälchen befinden. Sie dienen dem Stofftransport und stehen untereinander durch Gap junctions in Verbindung. Funktionell wird zwischen osteoblastischen und osteolytischen Osteozyten unterschieden. Osteoblastische Osteozyten dienen vorrangig der Erhaltung der vorhandenen Knochensubstanz. Die osteolytischen Osteozyten sind in der Lage, Hartschubstanz abzubauen und dadurch Kalzium freizusetzen. Sie befinden sich vor allem in den tiefen Lagen der Matrix [10].

Eine weitere Form knochengewebsspezifischer Zellen sind die Osteoklasten. Sie sind große Zellen (ca.100µm Durchmesser) und enthalten zwischen 5 und 50 Zellkerne mit deutlichen Nucleoli sowie eine entsprechende Anzahl an Zentriolenpaaren. Die Zellkerne haben eine Lebensdauer von nur wenigen Tagen. Neue Zellkerne entstehen durch Amitose [20]. Die Lebensdauer der Osteoklasten beträgt bis zu 6 Wochen. Sie wird definiert als maximale Überlebensdauer ohne erneute Fusion der Zellen mit Vorläuferzellen [18]. Die Osteoklasten resorbieren Knochengewebe im Bereich des aktiven Remodelings. Dieser geordnete Abbau ist essentiell für die normale Entwicklung, die biomechanischen Anpassungsmöglichkeiten und die ständige Erneuerung des Skelettsystems [21]. An Stellen, an denen Knochen abgebaut wird, liegen häufig Teile der Osteoklasten in Einbuchtungen der Grundsubstanz, den Howship-Lakunen („Fraßspur“ der Osteoklasten), vor [10]. Man unterscheidet je nach Struktur der Osteoklasten zwischen ruhenden und aktiven Stadien. Aktive Osteoklasten produzieren proteolytische Enzyme, die die Knochengrundsubstanz zersetzen. Diese Aktivität wird durch Kalzitinin gehemmt, durch 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (Vit.D<sub>3</sub>) und Parathormon hingegen gefördert. Zusätzlich steuern lokale parakrine und autokrine Faktoren

die Knochenresorption (Zytokine, zahlreiche Interleukine, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine, Schilddrüsenhormone) [18].

Histologisch sind zwei Arten von Knochengewebe zu unterscheiden; der Geflecht- oder Faserknochen und der Lamellenknochen. Beide weisen qualitativ die gleiche zelluläre, kollagenfasrige und mineralische Zusammensetzung auf, unterscheiden sich jedoch entscheidend in der Qualität dieser Bestandteile. Die entwicklungsgeschichtlich einfachere Form ist der Geflecht- oder Faserknochen. Er kann im weitesten Sinne als ein verknöchertes Bindegewebe angesehen werden, das überall dort auftritt, wo über einen längeren Zeitraum Zug- und Druckkräfte einwirken. Diese Knochenform tritt im Laufe einer jeden Knochenneubildung auf. Auch während der embryonalen Entwicklung wird er angelegt, in der Folge aber durch weiter differenzierten Lamellenknochen ersetzt. Der Faserknochen ist zellreich, schließt weniger anorganische Substanzen ein und die Verteilung der Osteozyten in der knöchernen Matrix ist ohne erkennbare Ordnung. Die geformte Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht aus fein und grobfibrillären Kollagenfaserbündeln durchzogen, die keine besondere Verlaufsrichtung zeigen [18]. Der Faserknochen entsteht durch die starke Vermehrung und Zusammenballung von Mesenchymzellen, die sich dann zu osteogenetischen Stammzellen und weiter zu Osteoblasten differenzieren. Diese synthetisieren Kollagene, welche sich zu Fibrillen bündeln und sich miteinander verflechten [11]. Gleichzeitig setzt, gefolgt von der Osteoidsynthese und der anschließenden Mineralisation, eine zunehmende Vaskularisierung ein. Diese Form der Knochenneubildung wird als direkte oder desmale Ossifikation bezeichnet [12].

Der Lamellenknochen dagegen entsteht durch die indirekte oder chondrale Ossifikation. Bei dieser Form entsteht zunächst ein Knorpelmodell, das schrittweise zerstört und durch Knochen ersetzt wird [10]. Der Lamellenknochen zeichnet sich durch die streng nach statisch-funktionellen Gesichtspunkten orientierte parallele oder konzentrisch geschichtete Ordnung der Kollagenfasern aus. Die strukturelle Grundlage des Lamellenknochens ist das Osteon (Havers-System). Das Osteon besteht aus 5 bis 20 konzentrischen Knochenlamellen (Havers-Lamellen, Speziallamellen) und dem Zentralkanal (Havers-Kanal). Der Zentralkanal ist mit mesenchymalem Bindegewebe gefüllt und schließt sowohl vegetative Nerven als auch ein kleines Gefäß ein. Gebildet werden diese Lamellen von parallel angeordneten kollagenen Fasern und von der mineralisierten Knochenmatrix. Osteozyten liegen in regelmäßiger Anordnung stets zwischen den konzentrisch geschichteten Lamellen um den Zentralkanal. Von Lamelle zu Lamelle ändert sich regelmäßig die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern. Durch Querverbindungen treten anliegende Lamellensysteme untereinander in Verbindung. Dadurch entsteht ein Konstruktionsprinzip, das den Knochen bei Zug- und Druckkräften stabilisiert. Jede Änderung der statisch mechanischen Belastung des Knochens führt zu einer funktionellen Anpassung der Knocheninnenstruktur. Osteone, die keine Funktion mehr besitzen, werden als Schaltlamelle bezeichnet. Diese permanenten Umbauvorgänge spielen sich besonders schnell in der Substantia spongiosa ab.

An den inneren und äußeren Knochenoberflächen sind die Lamellen plattenartig geschichtet. Man spricht von einer inneren Grundlamelle, die an das Periost angrenzt, und von einer äußeren Grundlamelle, die das Periost von außen anliegt.

Eine Verbindung zur äußeren Knochenhaut besteht durch quer durch die Osteone verlaufende Gefäße (Volkmann-Gefäße). Der Knochen wird durch dieses kommunizierende Netz von Gefäßen zu einem stark vaskularisierten Gewebe.

### 3.3. Osteogenese

Die Entwicklung von Knochengewebe bzw. die Knochenbildung wird als Ossifikation oder als Osteogenese bezeichnet. Man unterscheidet die direkte (desmale) von der indirekten (chondralen) Knochenentwicklung.

Knochengewebe entsteht bei der direkten (desmalen) Ossifikation aus osteogenen, gut durchbluteten Bezirken im Mesenchym bzw. bei der indirekten (chondralen) Ossifikation im Perichondrium [22].

Durch die direkte Ossifikation entsteht ein einfaches, gefäßhaltiges Knochengewebe, der Geflechtknochen. Er bleibt in Form sogenannter Deckknochen am Schädeldach und Angesichtsschädel zeitlebens erhalten. Bei allen anderen Knochen des Säugetierskeletts folgt auf die einleitende direkte Ossifikation, die zum Geflechtknochen führt, die indirekte Ossifikation.

Aus mesenchymalem Bindegewebe entwickelt sich embryonaler, hyaliner Knorpel, welcher in seiner Gestalt bereits dem endgültigen Knochen entspricht.

Während der kontinuierlichen Zubildung von Knorpelgewebe wird gleichzeitig zuvor gebildetes Knorpelgewebe wieder zerstört und mittels Osteoblasten durch Knochengewebe ersetzt.

Die zeitweilige Anlage von Knorpelgewebe erweist sich als zweckdienlich, da sich Knorpel relativ schnell bildet und die fetal noch weitgehend geringfügigen Stützfunktionen voll übernehmen kann.

Dieser Vorteil kann nur vorübergehend genutzt werden, da die Größe des Knorpels, bedingt durch seine Gefäßlosigkeit, begrenzt ist [10, 18, 22].

Die indirekte Ossifikation beginnt am Knorpel zunächst perichondral und setzt sich dann enchondral fort. Die perichondrale Ossifikation setzt an der Diaphyse ein, und zwar mit der Umwandlung von mesenchymalen Zellen aus dem perichondralen Bindegewebe zu Osteoblasten. Das Perichondrium differenziert sich entsprechend zum Periost.

Die entstandenen Osteoblasten bilden Geflechtknochen, welcher die Diaphyse manschettentartig umschließt und epiphysenwärts auswächst. Dadurch wird die Ernährung des Knorpels zunehmend unterbunden und die so vom Stoffwechsel mehr und mehr abgeschnittenen Knorpelzellen beginnen, die sie umgebende Grundsubstanz zu resorbieren. Dadurch vergrößern sich zum einen die Knorpelzellohlen und zum anderen die Knorpelzellen selbst blasenartig.

Durch die Tätigkeit von Osteoklasten entstehen in der Knochenmanschette feine Kanälchen. Über diese Kanälchen dringen vom Periost aus Blutgefäße und mit deren Adventitia mesenchymale Zellen in den Blasenknorpel ein. Damit sind die wesentlichen Voraussetzungen für die enchondrale Ossifikation gegeben. Im Verlauf der enchondralen Ossifikation, welche in der Mitte der Knorpeldiaphyse beginnt und nach beiden Seiten fortschreitet, wird das eingeschlossene Knorpelgewebe kontinuierlich abgeräumt und durch Geflechtknochen ersetzt.

Der auf diese Weise zustande kommende enchondrale Knochen ordnet sich überwiegend bälkchenartig an. Dazwischen entstehen knorpelfreie Räume, welche die primäre Markhöhle, die sich mit Kapillaren und mesenchymalen Zellen anfüllt, bilden.

Aus den eingewanderten mesenchymalen Zellen differenzieren sich nicht nur weitere Osteoblasten und die Zellen des Endosts, sondern auch die Stamm- und Vorläuferzellen für die Blutbildung und damit auch jene für die Entstehung der Osteoklasten.

Die für die Blutbildung verantwortlichen Zellen formieren sich schließlich in der primären Markhöhle zum roten Knochenmark, die damit zur sekundären Markhöhle wird [10, 14, 18, 22].

Lebenslang finden Aufbau,- Abbau- und Umbauprozesse, auch Turnover genannt, statt. Beim Kind verläuft dieser Turnover 200 mal schneller ab, als es beim Erwachsenen der Fall ist [10].

Der Knochenumbau und -aufbau basiert auf den BMU (basic multicellular units), die aus Gruppen von Osteoklasten und Osteoblasten bestehen. An der Spitze der konusförmigen BMU-Knochen kommt es zur Resorption und an den Seiten zum Aufbau von Knochensubstanz [23].

### 3.4. Frakturheilung und die Bedeutung des Periost

Knochen frakturiert, sobald die auf ihn einwirkenden Kräfte seine Festigkeit überfordern. Die anschließende Frakturheilung lässt sich in 3 Phasen unterteilen. Zunächst kommt es zur Entzündung, anschließend beginnen Regenerationsvorgänge und letztendlich setzt das Remodeling ein. In der ersten Phase, der Entzündung, kommt es im Frakturgebiet zu Blutungen aus eröffneten Gefäßen des Knochenmarks, des Knochens, des Periosts und der Umgebung [10, 22, 24]. Es entsteht ein Frakturhämatom. Das Frakturhämatom trägt seinen Teil zur Frakturheilung bei, indem es u. a. Faktoren der Angiogenese enthält und durch seinen sauren pH-Wert, welcher nach 20 Tagen auf 7,5 ansteigt, einen Proliferations- und Differenzierungsreiz darstellt [24, 25]. Im Frakturhämatom befinden sich ebenfalls pluripotente Stammzellen, welche zu Osteoblasten, Fibroblasten und Chondroblasten ausdifferenzieren können. Diese sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung begünstigen. Zu den Wachstumsfaktoren gehören u. a. Insulin-like growth factor, Bone morphogenetic protein, Transforming growth factor, Fibroblast growth factor und der Platelet derived growth factor [26-28]. Die Revaskularisierung ist essentiell für die Frakturheilung, da die Knochenregeneration ein extrem stoffwechselaktiver Vorgang ist [29]. Die Stärke der Blutung hängt vom Schaden des umliegenden Weichteilgewebes ab. Im geschädigten Gewebe kommt es zu einer Infiltration mit Thrombozyten, Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Histiocyten und Makrophagen [17, 30]. Die Entzündungsreaktion hält für ein bis maximal fünf Tage an [31, 32]. Das Frakturhämatom wird in der Entzündungsphase durch Makrophagen phagozytiert.

Als nächste schließt sich die Regenerationsphase, die bis zur Bildung des weichen Kallus ca. 3 Wochen in Anspruch nimmt, an [31, 33]. Die Frakturheilung läuft in Abhängigkeit von der Frakturspaltweite entweder direkt oder häufiger indirekt ab.

Bei der direkten Frakturheilung erfolgt eine direkte Verwachsung der Haver'schen Kanäle und Knochenlamellen, wenn die Frakturspaltweite weniger als 0,5 mm, nach Einhorn weniger als 1 mm beträgt [34-37]. Trotz bestehenden direkten Kontakts von Knochen zu Knochen in der Frakturlinie sind schmale Lücken vorhanden. An Stellen des direkten Knochenkontaktes tritt Kontaktheilung und an den schmalen Lücken Spaltheilung auf [38]. Kontaktheilung bedeutet ein direktes Remodeling in der Frakturebene.

Beträgt die Frakturspaltweite mehr als 0,5 mm, kommt es zur indirekten Frakturheilung mit der Abfolge der bekannten Mechanismen von hyaliner Knorpelbildung, sowie der enchondralen und desmalen Ossifikation [34-37]. Sie verläuft in mehreren, ineinander übergehenden Stadien. Das Frakturhämatom wird organisiert und mesenchymale pluripotente Zellen migrieren aus dem Periost, dem Endost, dem Knochenmark und dem umliegenden Gewebe in den Frakturbereich [39]. Nach wenigen Tagen beginnt die Proliferation von Granulationsgewebe, welches sich zu Bindegewebe und Faserknorpel differenziert. Bei guter Blutversorgung entsteht vermehrt Bindegewebe, wohingegen eine geringe Blutzufuhr zur Entstehung von Faserknorpel beiträgt [38, 40]. Fibroblasten und Osteoblasten bilden Kollagene, v. a. Kollagen Typ II [36, 41]. Die Formation eines weichen Kallus um den Knochenschaft eines jeden Fragments bezeichnet man als Primärkallus [42]. Der bindegewebige Kallus wird durch Knorpel ersetzt. Zwischen den Kollagenfibrillen kommt es zur Ablagerung von Mineraldepots [36, 41]. Der Umbau des weichen Kallus zum harten

Kallus erfolgt ähnlich wie bei der enchondralen Ossifikation. [43, 44]. Die Kallusbildung ist ein wesentliches Merkmal der indirekten Frakturheilung [33]. Der harte Kallus dient der Überbrückung des Frakturspaltens und führt somit zu einer Stabilisierung der Fraktur. Der Knochen erreicht durch den harten Kallus zum größten Teil seine mechanischen und physiologischen Funktionen wieder.

Schließlich kommt es letztendlich zum Remodeling des Kallus. Der Geflechtknochen wird durch lamellären Knochen mit entsprechender Gefäßversorgung ersetzt [45]. Das Remodeling nimmt dabei die meiste Zeit in Anspruch und kann bis zu vier Jahre dauern [46].

Dem Periost kommt in der Frakturheilung eine besondere Bedeutung zu. Es umgibt den Knochen wie eine Haut, versorgt und innerviert ihn [47]. Das Periost enthält in seiner inneren Schicht Cambium-Zellen, bei denen es sich um osteogene Progenitorzellen mesenchymalen Ursprungs handelt. Perka konnte in seiner Studie zeigen, dass durch die Anwesenheit von Periostzellen in einem Knochendefekt neuer Knochen gebildet wird [48]. Es ist bekannt, dass bei der Heilung ohne exaktes Anliegen der Fragmente aneinander (indirekte Frakturheilung) der initial gebildete fibrös-knorpelige Kallus von Progenitorzellen aus dem Periost infiltriert und sukzessiv von diesen durch Knochen ersetzt wird [10].

Die allgemeine Relevanz des Periosts für die Knochenregeneration führte in den vergangenen Jahren zu einem Umdenken bei der chirurgischen Versorgung von Knochendefekten. Entgegen dem früher praktizierten weiträumigen Freilegen und Deperiostieren des Knochens zur exakten Reposition und Plattenanpassung, werden heute die Weichteile möglichst wenig beschädigt und das Periost weitgehend geschont.

Bisher liegen trotz des Konsens' bezüglich des Stellenwerts des Periost noch keine Forschungsarbeiten vor, die sich explizit mit dem Verlauf der periostalen Rekonstruktion bei der Heilung eines Knochendefektes beschäftigen. In der frühen Phase der Knochenheilung ist es besonders schwierig Aussagen zu treffen, da sich die Periostzellen ohne die räumliche Zugehörigkeit zum Periostschlauch weder histologisch noch immunhistologisch beweisend darstellen lassen. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass entscheidende Erkenntnisse bezüglich der frühen Phase der Periostrekonstruktion bzw. ihrer Rolle im Verlauf der Frakturheilung fehlen.

In der Studie von Wurzel wurde bewiesen, dass eine künstliche Membran zwischen Knochen und Periost die Heilung eines Knochendefektes verzögert. Dasselbe gilt für eine Trennung des Periost vom umliegenden Weichteilgewebe, welches mit einer Verminderung der Vaskularisation des Periost, also einer verminderten Versorgung gleichzusetzen ist.[49]

Untersuchungen zum Einfluss von Periostzellen als Zusatz auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien zeigten im Heilungsverlauf eine signifikante Überlegenheit gegenüber zellfreien Matrizen [50-52]. Sogar in ektoper Lage (unter die Haut transplantiert) bilden die mit Periostzellen versehenen Konstrukte neuen Knochen [53]. Gleichzeitig zeigten diese Studien die Abhängigkeit der Differenzierung der Zellen vom umgebenden Milieu. So bilden sich vermehrt osteogene Zellen am Rand der Matrize und eher chondrogene Zellen im Inneren [54, 55]. Dies beruht auf dem unterschiedlichen Sauerstoff-Partialdruck, je nach Lokalisation in der Matrize. Selbst die Neubildung von Gefäßen im Kallus scheint, zumindest partiell, vom Periost auszugehen [54, 56].

### 3.5. atrophe Pseudarthrose

Unterbleibt die Neubildung von Knochen im Frakturbereich, kann an der Frakturstelle eine Diskontinuität mit Beweglichkeit der Frakturrenden bestehen bleiben, die man als Pseudarthrose (Falschgelenk) bezeichnet [10, 22]. Eine Unterteilung der Pseudarthrose kann in hypertrophe und atrophe Pseudarthrose vorgenommen werden [57, 58]. Bei 5 bis 20% aller Frakturen wird die Entstehung einer Pseudarthrose beobachtet, abhängig von der Dauer der

unvollständigen Heilung des Knochens [1-3]. Kommt es zu einer schwerwiegenden Fraktur, wird meist der Periostschlauch in seiner Kontinuität unterbrochen, was eine atrophe Pseudarthrose zur Folge haben kann. Eine atrophe Pseudarthrose ist nach Yoo durch fehlendes Periost charakterisiert [39]. Andere Autoren definieren eine atrophe Pseudarthrose durch ein Ausbleiben der Vereinigung der Frakturende über 6 bis 8 Monate oder das Ausbleiben einer Progression der Heilung über einen Zeitraum von 3 Monaten [59, 60]. Bei Patienten mit einer Pseudarthrose entstehen im Frakturbereich von langen Röhrenknochen v.a. knorpelige gelenkartige Strukturen [61, 62]. Die mechanischen und biologischen Einflüsse, die zu solch einer Pseudarthrose führen, sind nicht vollständig bekannt. Es existieren theoretische Modelle, welche sich mit der Entwicklung von Geweben im Frakturbereich beschäftigen, die die Entstehung einer Pseudarthrose erklären könnten [63-65]. In einigen experimentellen Modellen konnte durch mechanische Stimulation oder biologische Faktoren, wie Knochennekrosen, bedingt durch lokale Ischämie oder Devaskularisation, eine Pseudarthrose herbeigeführt werden [66, 67]. In einer Studie von Cullinane konnte durch Zufügung kontrollierter Bewegung in einem non critical sized defekt eine direkte Knorpelformation provoziert werden. Dieser Knorpel zeigte einen ähnlichen Grad der Organisation, wie er im Gelenkknorpel vorzufinden ist [68]. Nicht nur zu viel Bewegung sondern auch eine zu hohe Steifigkeit bewirkt durch mangelnde mechanische Stimulation eine gestörte Frakturheilung [60]. Die Blutversorgung und Anwesenheit von periostalen osteochondralen Progenitorzellen spielt eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung. Das exzessive Abtragen des Periosts im Frakturbereich kann durch die damit verbundene Entnahme von periostalen osteochondralen Progenitorzellen, sowie die Störung der Blutversorgung, zu einer Pseudarthrose führen. Im metaphysären Knochen, welcher reich an spongiösem Knochen mit entsprechend reicher Gefäßversorgung ist und eine hohe Präsenz der Knochenmarkprogenitorzellen aufweist, treten seltener Pseudarthrosen auf als im diaphysären Knochen [39]. Auch im Zusammenhang mit dem Kompartiment Syndrom kann es, bedingt durch einer Minderdurchblutung, zu einer Pseudarthrose kommen [69]. Weiterhin stellen offene und/oder stark dislozierte Frakturen, Frakturen ohne Fragmentkontakt, critical size defect (CSD) ein hohes Risiko für die Entstehung einer Pseudarthrose dar [60, 70, 71]. Park fand in seiner Studie zur Frakturheilung heraus, dass wiederholtes Spülen und Debridement, verbunden mit anhaltender rigider Immobilisation, zu einer Pseudarthrose führen [72].

Pseudarthrosen erfordern häufig eine langwierige und nicht immer erfolgreiche Behandlung des Patienten. Dadurch entstehen massive Einschränkungen der Lebensqualität des Patienten einerseits und andererseits erhebliche Mehrkosten für das Gesundheitssystem durch zusätzliche Operationen, verlängerte Krankenhausaufenthalte und Nachbehandlungszeiten bzw. durch sonstige zusätzlich angewandte Hilfsmittel. Für viele Jahre waren die meist verwendeten Therapien die Spongiosatransplantation mit hoher Entnahmemorbidity [58, 73], die lokale Injektion von Blut [74], die Verwendung allogenen Knochens oder synthetischer Substanzen mit osteoinduktiver oder osteokonduktiver Wirkung, sowie die Behandlung mit Wachstumsfaktoren wie BMP 2 und BMP 7 üblich [75-78].

Autogener Knochen ist zwar durch seine osteoinduktive und osteokonduktive Fähigkeit sehr gut zur Verwendung geeignet, birgt aber durch den traumatischen Eingriff, die damit verbundene erhöhte Blutungs- und Infektionsgefahr und ebenso durch die Entnahmemorbidity ein erhöhtes Risiko für den Patienten [79].

Bei Pseudarthrosen, bei denen die chirurgische Versorgung fehlgeschlagen war, konnte man eine positive Wirkung von induziertem pulsierendem Strom bzw. pulsierenden elektromagnetischen Feldern nachweisen [80, 81]. Eine effektive Therapie der Pseudarthrose stellte die Implantation von autologem Knochenmark perkutan in den Frakturspalt dar. Bei 80% der Patienten mit Pseudarthrosen, bei denen eine Immobilisierung im Cast vorgenommen wurde und bei 100% der Patienten mit intramedullärer Nagelung konnte eine

Ausheilung mithilfe von autologem Knochenmark erzielt werden. Somit ist die Effektivität dieser Therapie vergleichbar mit der der Spongiosatransplantation [82].

Bisher existiert noch keine Studie über die Auswirkung von lokal eingebrachten mesenchymalen Stammzellen in einen Knochendefekt auf die Rekonstruktion des Periosts und über die daraus resultierenden Effekte auf die Knochenheilung.

Die klinische Relevanz der vorliegenden Studie liegt darin, eine neue weniger traumatisierende Behandlung zu entwickeln, die bei einer verzögerten bzw. ausbleibenden knöchernen Überbrückung als Ersatz der bisher etablierten operativen Strategien eingesetzt werden könnte. Die Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen ist mit einem geringen Aufwand durch eine Punktion des Knochenmarks mittels Punktionskanüle durchzuführen und somit im Vergleich zu den bisherigen operativen Strategien mit einer sehr geringen Entnahmemorbidität verbunden. Durch die Anzüchtung der MSC ist man in der Lage, eine hohe Anzahl der für die Heilung notwendigen Zellen zur Verfügung zu stellen.

Da es sich bei den MSC um autologe Zellen handelt, sind autoimmunreaktionen auszuschließen. Durch die Fähigkeit der MSCs, sich in verschiedene Zelltypen, u.a. Osteozyten zu differenzieren, könnten sie von großem Nutzen für die Frakturheilung sein. Mesenchymale Stammzellen gewinnen aufgrund ihrer intensiven Proliferationsfähigkeit, ihrer leichten Kultivierbarkeit, und der Eigenschaft, sich *in vitro* und *in vivo* in Osteozyten und Chondrozyten zu differenzieren, zunehmend an Bedeutung [5].

Es besteht die Möglichkeit, dass es durch die Transplantation von autologen MSC zu einer schnelleren und funktionell effektiveren Regeneration des zuvor verzögert heilenden Knochens kommt.

### 3.6. Mesenchymale Stammzellen

Stammzellen können ihrem Ursprung nach in frühembryonal, spätembryonal/neonatal und adult unterschieden werden. Stammzellen des frühembryonalen Stadiums sind totipotent. Somit können sie zu allen Gewebetypen differenzieren und sind in der Lage, komplette Organismen zu bilden. Diese Fähigkeit bleibt ihnen bis zum 8-Zellstadium erhalten. Der therapeutische Einsatz geht jedoch mit dem Risiko der Tumorgenese einher [83]. Spätembryonale Stammzellen haben ihre Totipotenz verloren und sind in ihrer Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt. Sie sind pluripotent, d.h. sie können sich in jeden Zell- und Gewebetyp eines erwachsenen Organismus differenzieren und theoretisch ganze Organe bilden [83].

Adulte Stammzellen sind multipotent. Sie haben einen Großteil ihres Differenzierungspotentials verloren, sind aber immer noch in der Lage, sich in viele Richtungen zu differenzieren. Eine Einteilung kann nach Lokalisation der Gewinnung erfolgen. Wurden sie aus dem Blut entnommen, bezeichnet man sie als hämatopoetische Stammzellen, aus dem Gehirn als neuronale Stammzellen und aus dem Knochenmark als mesenchymale Stammzellen. Erstmals wurden mesenchymale Stammzellen 1966 in einer Studie von Friedenstein, welcher sie aus dem Knochenmark von Ratten isolierte, identifiziert [4]. Die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks stehen in der Differenzierungskaskade noch über den Progenitorzellen des Periost. Sie können in einem relativ einfachen chirurgischen Eingriff aus dem Knochenmark der langen Röhrenknochen, dem Sternum oder aus dem Beckenknochen gewonnen und anschließend unter Verwendung geeigneter Zellkulturproben angereichert werden [84-86]. Von den Knochenmarkszellen sind nur ca. 0,01 bis 0,03% mesenchymale Stammzellen [87, 88]. Innerhalb von zehn Wochen können sie auf bis zu 20 bis 50 Populationsverdopplungen expandiert werden [89, 90]. Neben der Differenzierung zu Knochen- und Knorpelzellen [84, 91] können sie sich ebenfalls in Zelltypen wie Hepatozyten [92], Endothelzellen [93, 94], Herzmuskelzellen [94],



Skelettmuskelzellen [95], Tendinozyten sowie andere Bindegewebszellen [86] differenzieren. Desweiteren konnte eine Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Astrozyten und Neuronen *in vitro* gezeigt werden [96, 97]. Transplantiert man mesenchymale Stammzellen in das physiologische [98] oder ischämische Gehirn [99-101] differenzieren sie zu Astrozyten.

Es gibt Studien, bei denen Knochenmarkzellen lokal in einen Tibiadefekt [102] oder auch systemisch [87] verabreicht wurden. Histologisch konnte eine Ansammlung der Knochenmarkzellen im neu gebildeten Geflechtknochen bei der systemischen Applikation nachgewiesen werden, ohne dass es dabei zu einer Beschleunigung der Frakturheilung kam. Die lokale Applikation führte in 80 bis 100% der Fälle (je nach Art der Frakturstabilisierung) bei den Patienten mit Pseudarthrosen zur Ausheilung des Defektes.

MSCs werden erfolgreich in der Behandlung von Knochen und Gelenken eingesetzt, insbesondere bei der Knochennekrosetherapie und Behandlung von Knorpeldefekten [6-8].

Studien, die sich mit der Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe beschäftigten, zeigten eine Verbesserung der Heilung mittels Stammzellen aus dem Knochenmark, welche *in vitro* auf künstliche Trägermaterialien aufgebracht wurden, gegenüber den nur mit Trägermaterial behandelten oder unbehandelten Defekten [9]. In einer Studie ohne Kontrollgruppe wurden durch poröse Keramikträgermaterialien, welche mit autologen MSCs besetzt waren, massive Knochendefekte geheilt [103]. Bajada berichtete, dass MSCs, isoliert aus dem Knochenmark, kombiniert mit Kalziumsulfaten eine neun Jahre alte Tibia-Pseudarthrose zur Ausheilung gebracht haben [104]. Gan konnte bei 41 Patienten durch den Einsatz von autologen MSCs und Betatrikalziumphosphaten eine spinale Fusion herbeiführen [105].

Tohma und Mitarbeiter testeten in einem Rattenmodell am devitalisierten Knochen die Auswirkungen mesenchymaler Stammzellen. Sie transplantierten durch Strahlung devitalisierten Knochen zusammen mit kultivierten heterogenen MSCs unter die Haut. Nach vier Wochen konnten sie eine Knochenneubildung im devitalisierten Transplantat nachweisen. Die MSCs waren in der Lage, die osteogene Kapazität des devitalisierten Knochens wieder herzustellen [106].

Nach Nakamura stellt die Transplantation von MSCs ohne die Anwesenheit künstlicher Trägermaterialien eine ideale Behandlung von Frakturen, Pseudarthrosen und Osteonekrosen dar. Nakamura untersuchte heterogene, osteogen prädifferentzierte Zellschicht-Transplantate aus MSCs in einer atrophischen Pseudarthrose [107]. Er beobachtete nach acht Wochen eine Vereinigung der Knochenenden in der Transplantatgruppe.

Neue Verfahren sind in der Lage, durch eine Manipulation der MSCs mit spezifischen Genen eine osteogene Differenzierungsrichtung vorzugeben. Dabei modulieren transkriptionale Faktoren und Koaktivatoren die MSCs und geben eine osteogene oder adipogene Differenzierung vor [108]. In vielen tierexperimentellen Studien zu mesenchymalen Stammzellen wurden xenogene (von einer Art zu einer anderen) oder allogene (von einem Individuum zu einem anderen der gleichen Art) Spenderzellen verwendet. Es traten dadurch teils heftige Immunreaktionen mit Störungen der eingebrachten Zellen auf. Mit der Verwendung körpereigener Knochenmarkzellen umgeht man die Notwendigkeit einer Immunsuppression und es ist eine quantitativ und qualitativ bessere Neubildung von Knochengewebe zu erwarten.

Bisher existiert noch keine Studie über die Auswirkung von lokal eingebrachten autologen mesenchymalen Stammzellen in einen Knochendefekt auf die Rekonstruktion des Periosts und über die daraus resultierenden Effekte auf die Knochenheilung. Welche Entwicklungsstufen die Periost- und/oder Knochenmarkzellen im Rahmen der Heilung durchlaufen, bleibt unklar.

### 3.7. Tiermodell

Für die Erforschung der Frakturheilung wurden verschiedene Versuchstiere u.a. Mäuse, Ratten, Vögel, Scharfe, Schweine und Hunde verwendet. Bei der Auswahl der Tiere muss bedacht werden, dass die einzelnen Spezies unterschiedliche Frakturheilungsmuster aufweisen. Desweiteren zeigen sie eine im Vergleich zum Menschen unterschiedliche Anatomie und einen sehr unterschiedlichen Knochenstoffwechsel. Auch das Alter, Geschlecht und die Größe der Versuchstiere sind von Bedeutung. Jäger untersuchte in einer Studie verschiedene Fixationssysteme und Techniken im Rattenmodell. Er entwickelte einen Fixateur extern, welcher eine stabile Fixierung der knöchernen Fragmente ermöglicht, ein größeres Weichteiltrauma vermeidet, die röntgenologische Verlaufskontrolle des Defektbereichs erlaubt und eine unerwünschte Beeinflussung der Defektzone durch das Fixationssystem verhindert. Er stellte fest, dass sich weder die anterograde noch die retrograde Femurnagelung für eine stabile Fixierung der knöchernen Fragmente am CSD des Rattenfemur eignet [109]. Für Versuche am Knochen stellt die Ratte als Versuchstier aufgrund der limitierenden anatomischen Größenverhältnisse häufig eine kritische untere Grenze unter den Kleintieren dar. Trotzdem werden sie immer häufiger in der medizinischen Forschung verwendet um orthopädische Implantate, Transplantate und Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Im Vergleich zu großen Tieren sind sie leichter zu händeln, billiger in der Haltung und es existieren vergleichbare experimentelle Modelle, welche Vergleiche untereinander erlauben. Durch die geringen Ansprüche an Haltung und Versorgung ist bei Ratten im Gegensatz zu anderen Tierarten eine tierschutzgerechte Unterbringung wesentlich einfacher zu gewährleisten.

### 3.8. Ziele und Hypothesen der Studie

Mit dieser Studie sollen Erkenntnisse über den bisher ungeklärten Verlauf der periostalen Rekonstruktion während der Knochenheilung gewonnen und die Auswirkungen lokal transplanteder autologer mesenchymaler Stammzellen in einem Defekt des langen Röhrenknochens untersucht werden.

Dabei sollen folgende Hypothesen untersucht werden:

1. Die Wiederherstellung der periostalen Integrität ist Voraussetzung für eine physiologisch verlaufende Frakturheilung der Röhrenknochen. Hierbei muss sich das Periost als Leitstruktur zunächst selbst rekonstruieren, um eine anschließende Heilung zu gewährleisten.
2. Der Heilungsverlauf eines Defektes am langen Röhrenknochen, welcher durch Deperiostierung in seinem natürlichen Heilungspotential eingeschränkt wurde, kann durch die Transplantation autologer mesenchymaler Stammzellen beschleunigt werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Versuchstiere

Verwendet wurden 16 bis 20 Wochen alte, männliche, 410 bis 460g schwere Sprague Dawley Ratten (Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland). Die Ratten wurden bei künstlichem Tag/Nacht Rhythmus einzeln in Käfigen gehalten. Futter und Wasser stand ihnen zur freien Verfügung Die Einzelhaltung war nach der Osteotomie notwendig, da das gegenseitige Belecken und Beißen zu massiven Wundheilungsstörungen und Wundinfektionen geführt hätte. Die Genehmigung zur Durchführung der Versuchsreihe wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin unter der Genehmigungsnummer G0036/04 erteilt.

### 4.2. Gruppeneinteilung

Unterschieden wurden zwei Versuchsgruppen, die mesenchymale Stammzellengruppe (MSC-Gruppe) und die Medium-Gruppe. Der MSC-Gruppe wurden autologe mesenchymale Stammzellen und der Medium-Gruppe nur das Medium, in der die Stammzellen inkubiert wurden, verabreicht. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug 16. Beide Gruppen wurden einseitig am linken Hinterbein standardisiert osteotomiert und mit einem Fixateur externe versorgt.

- Gruppe 1 (MSC-Gruppe):** Perkutane Injektion von 2 Millionen autologen mesenchymalen Stammzellen in 150µl Medium 2 Tage post Osteotomie in den Osteotomiespalt
- Gruppe 2 (Medium-Gruppe):** Perkutane Injektion von 150µl Medium ( $\alpha$ -DMEM + 10% fetales Kälberserum + 1% Penicillin-Streptomycin) 2 Tage post Osteotomie in den Osteotomiespalt

### 4.3. Stammzellenentnahme

Zur Gewinnung der Stammzellen wurde den Versuchstieren in Vollnarkose Knochenmark aus der rechten Tibia entnommen.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Isofluran 3,5 Vol. % (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland), Stickoxydul 0,4 l/min und Sauerstoff 0,6 l/min in einem offenen System (Stephan-Respirator ABV F, Stephan GmbH, Gackebach, Deutschland).

Die OP wurde unter einer Injektionsnarkose mit dem Anästhetikum Ketamin (Ketavet® Pharmacia & Upjohn GmbH, Wien, Österreich) und dem Sedativum/Analgetikum Xylazin (Rompun® Bayer, Wien, Österreich) im Verhältnis 4:3, nach vorheriger Hautdesinfektion (Softosept® N B. Braun, Melsungen, Deutschland), intraperitoneal verabreicht.

Für die Analgesie wurde zusätzlich der vollsynthetische Morphinabkömmling Buprenorphin (Temgesic® Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1 ml/kg subkutan verabreicht.

Im Anschluss wurde die rechte Tibia proximal geschoren und mit Braunol (Povidon-Iod, B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

Mit einem Skalpell (Einmal-Skalpellklinge klein No 15 Feather<sup>®</sup>, Tokio, Japan) wurde eine ca. 1 cm lange Inzision proximal an der Tibia gesetzt. Die Tibia wurde in diesem Bereich frei präpariert und die obere Kortikalis mit einem Kugelfräser (1mm Durchmesser, Fa. Proxoon, Niersbach, Deutschland) durchbohrt. Eine 22G Kanüle (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde in das Bohrloch eingeführt. Eine mit Medium gefüllte 1 ml Spritze wurde auf die Kanüle aufgesetzt und ein Unterdruck durch Ziehen des Spritzenkolbens erzeugt. Durch diesen Unterdruck wurde das Knochenmark aus der Tibia in die Spritze aspiriert. Der Inhalt der Spritze wurde in eine 15 ml Falcon-Tube (Falcon Becton Dickinson Labwar, Franklin Lakes, New Jersey, USA) überführt und in das Labor zur Anzucht der mesenchymalen Stammzellen transportiert.

#### 4.4. Anzucht mesenchymaler Stammzellen

Die Stammzellen wurden in Kulturflaschen (nunc<sup>™</sup> DK-4000 Roskilde, Denmark) überführt und mit Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Das Medium setzte sich zusammen aus  $\alpha$ -DMEM (4500mg/l Glukose, L-Glutamine, Pyruvat, invitrogen, Cambrex, Walkersville, USA), 10% fetalem bovinem Serum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und einem Antibiotikum (1 % Penicillin-Streptomycin). Desweiteren waren Nährstoffe und Wachstumsfaktoren enthalten, welche die mesenchymalen Stammzellen für die Mitose benötigen. Das Medium war frei von Differenzierungsfaktoren, so dass den Stammzellen keine Differenzierungsrichtung vorgegeben wurde.

Das Antibiotikum sollte vor einer bakteriellen Besiedlung schützen. Jeder Vorgang erfolgte unter sterilen Bedingungen, mit sterilem Instrumentarium. Aus diesem Grund wurden alle Arbeiten unter dem Abzug vorgenommen.

Die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks haben die Eigenschaft, sich am Boden des Gefäßes anzuheften und sich dort zu vermehren. Durch diese Fähigkeit waren sie von anderen Zellen des Knochenmarks zu unterscheiden. Die restlichen, im Medium schwimmenden Zellen konnten so abgesaugt werden. In einem Zeitraum von ca. 14 Tagen wurden die mesenchymalen Stammzellen auf eine Anzahl von ca. 2 Mio. angezüchtet. In der ersten Woche erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. In der darauf folgenden Woche wurde dies auf einen Wechsel pro Woche reduziert.

Die mesenchymalen Stammzellen wurden beim Mediumwechsel unter dem Mikroskop dahingehend untersucht, ob sie den Boden des Gefäßes weitgehend bedeckten. Traf dies zu, erfolgte eine Passagierung in ein größeres Gefäß. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die mesenchymalen Stammzellen zweimal mit PBS (Phosphatpuffer) (Dulbecco's PBS without Ca u. Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gewaschen. Um die mesenchymalen Stammzellen vom Boden des Gefäßes zu lösen, wurden sie für 4 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Die Loslösung wurde nach diesen 4 min mit leichtem Klopfen unterstützt und unter dem Mikroskop kontrolliert. Im Anschluss wurden 4 ml Medium in das Gefäß gegeben und der gesamte Inhalt wurde in ein Falconröhrchen (Falcon Becton Dickinson Labwar, Franklin Lakes, New Jersey, USA) überführt. Um die Anzahl der Zellen zu ermitteln, erfolgte eine automatische Auszählung in einem Casytron Zellzählsystem (Zellzähl- und Analyse System, Model TT, Scharfe system, Casytron, Reutlingen, Deutschland). Anhand der ermittelten Zellzahl wurde die Fläche berechnet, welche die mesenchymalen Stammzellen in ihrem neuen Gefäß benötigten. Als optimal wurde ein Wert von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ cm<sup>2</sup> beurteilt. Das entsprechende Gefäß wurde ausgewählt und die dazu festgelegte Menge an Medium bereitgestellt.

#### 4.5. Osteotomie des Os femoris

Die präoperativen Vorbereitungen entsprachen denen der Knochenmarkbiopsie. Der linke Oberschenkel wurde geschoren und mit Braunol (Povidon-Iod, B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Im Anschluss wurde die Ratte in den sterilen OP- Bereich überführt.

Zunächst erfolgte die Inzision (Einmal-Skalpellklinge, B. Braun, Größe 18, Melsungen, Deutschland) eines ca. 4 cm langen Hautschnittes am Oberschenkel (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Ca. 4 cm langer Hautschnitt am Oberschenkel der Ratte auf Höhe des Knies beginnend. Das Knie befindet sich zwischen dem Daumen und Zeigefinger der linken Hand des Operateurs.

Anschließend wurde das Os femoris freipräpariert (Einmal-Skalpellklinge, groß Feather<sup>R</sup> Größe 11, Tokio, Japan), indem das Bindegewebe zwischen den Extensoren und Flexoren des Oberschenkels durchtrennt wurde. Der Assistent spreizte diese dann mit einem Zweizinken-Haken auseinander, um eine freie Sicht zu gewährleisten und beim anschließenden Bohren Weichteile vom Bohrbereich fernzuhalten. Danach wurde der erste Bohrkanaal distal am Os femoris durch die obenliegende laterale Kortikalis gebohrt (siehe Abb. 2).



Abb. 2: Bohren des 1. Kanales distal am nur wenige Millimeter freipräparierten Os femoris durch die obenliegende laterale Kortikalis

Dabei achteten der Operateur und der Assistent darauf, dass der Bohrer senkrecht zum Os femoris geführt wurde. Das dabei entstandene Knochenmehl wurde mit steriler Kochsalzlösung weggespült. Nicht abgelaufene Kochsalzlösung wurde mit einer sterilen

Kompresse aufgesaugt. Nun wurde der 10 cm lange Kirschner-Draht (Fa. M. Jagel, Bad Blankenburg, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,25 mm, einem 10 mm langen Gewinde mit einer Gewindebreite von 1,2 mm und einer Gewindehöhe von 1 mm, vorsichtig eingeschraubt (siehe Abb. 3).



Abb. 3: Einschrauben des 1. Kirschner-Drahtes distal am Os femoris

Hierbei musste wieder darauf geachtet werden, dass dies senkrecht zum Os femoris geschah. Das Einschrauben in die untere Kortikalis musste sehr behutsam erfolgen, um ein Ausbrechen der oberen Kortikalis zu vermeiden. Manuell wurde der bikortikale Sitz des Drahtes kontrolliert. Das zweite Bohrloch wurde anschließend am proximalen Ende des Femurs gebohrt.



Abb. 4: Einschrauben des 2. Kirschner-Drahtes proximal am Os Femoris

Hierbei wurde sowohl die obere als auch die untere Kortikalis durchbohrt, was aufgrund der anatomischen Beschaffenheit der Kortikalis in diesem Bereich notwendig war. Nachdem auch hier der Kirschner-Draht eingeschraubt worden war, konnte der Fixateur angebracht werden (siehe Abb. 4). Der Fixateur externe bestand aus zwei Stahlplatten der Größe 29 x 5 mm mit einer Dicke von 2,8 mm und 1,8 mm. Mittels zweier Schrauben (M 2,5) wurden die beiden Platten miteinander verbunden. Die dickere der beiden Platten war mit dem Gewinde für die Schrauben versehen, die dünnere hatte die Einbuchtungen für die Schraubenköpfe. Beide Platten wiesen vier Kerben für das Einspannen der Kirschner-Drähte auf. Der Fixateur diente im weiteren Verlauf als Führungsschiene beim Bohren (siehe Abb. 5).



Abb. 5: Fixateur als Führungsschiene beim Bohren des 3. Kanales am Os femoris

Weitere zwei Löcher wurden gebohrt und die Drähte eingeschraubt. Anschließend wurde ein zweiter Fixateur zur Stabilisierung über dem ersten angebracht und beide wurden bis an das obere Drahtende geschoben. Danach wurde in der Mitte zwischen dem zweiten und dritten Draht das Os femoris mit einer Diamantsäge osteotomiert (siehe Abb. 6). Unter Zuhilfenahme von zwei Wundspreizern wurde das Weichteilgewebe aus dem Osteotomiebereich fern gehalten.

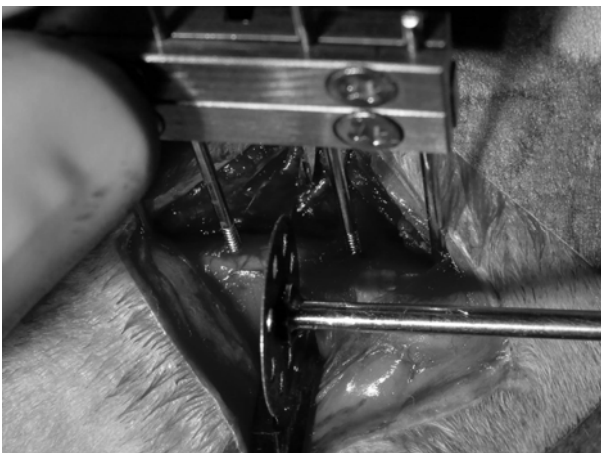


Abb. 6: Osteotomie des Os femoris mittels Diamantsäge zwischen dem zweiten und dritten Kirschner-Draht

Anschließend wurde das Knochenmehl wie nach jedem Bohrvorgang mit Kochsalzlösung weggespült. Für den folgenden Arbeitsschritt wurden die Fixateure wieder abgeschraubt. Um die Voraussetzung für die Entstehung einer atrophischen Pseudarthrose zu schaffen, wurde das Periost auf einer Länge von 2 mm proximal und distal der Osteotomie durch Kauterisierung zerstört (siehe Abb: 7).



Abb. 7: Kauterisierung des Periost auf einer Länge von 2 mm proximal und distal der Osteotomie

Vor dem Kauterisieren wurde das Weichteilgewebe mit einem Periostschaber vom Osteotomiespalt weggeschoben. Es wurde soviel Knochenmark wie möglich mittels einer feinen chirurgischen Pinzette mechanisch aus der Markhöhle entfernt (siehe Abb. 8).



Abb. 8: Entfernung des Knochenmarks aus der Markhöhle mit einer feinen chirurgischen Pinzette

Anschließend wurde wieder mit Kochsalzlösung gespült und der Fixateur in einem Abstand von zwei Fixateurbreiten (1 cm) vom Os femoris angebracht (siehe Abb. 9&10).



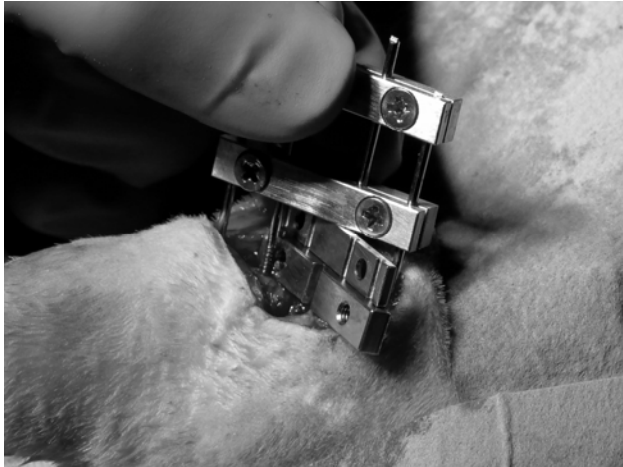


Abb. 9: Anbringen des Fixateurs in einem Abstand von zwei Fixateurbreiten vom Os femoris



Abb. 10: Fixateur nach entgültiger Montage am Os femoris

Die Wunde wurde durch eine Muskel- und eine Hautnaht verschlossen. Für die Muskelnahnt wurde ein resorbierbarer Ethicon Vicryl Faden (0,5 Ph. Eur., violett geflochten Polyglactin 910, Norderstedt, Deutschland) und für die Hautnaht ein nicht resorbierbarer Faden (3-0 Prolene® Eticon, Norderstedt, Deutschland) verwendet.

Abschließend wurden Röntgenbilder bei einer Strahlenhärte von 52 kV und einer Belichtungszeit von 1,80 mAs in drei verschiedenen Aufnahmerichtungen angefertigt (Röntgengerät, Mobilett Plus, Siemens, München, Deutschland), zwei anteroposteriore und eine latero-laterale Aufnahme (siehe Abb. 11 bis 13). Dabei wurde überprüft, ob der Fixateur richtig sitzt und keine zusätzlichen Fissuren oder Frakturen entstanden sind.



Abb.11: Lagerung der Ratte in der 1.AP Aufnahme

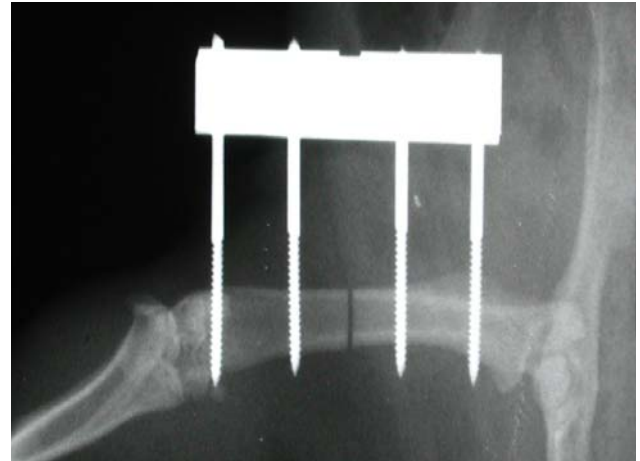


Abb.11.1: 1. AP Aufnahme



Abb.12: Lagerung der Ratte in der latero-lateralen Aufnahme



Abb.12.1: latero-laterale Aufnahme



Abb.13: Lagerung der Ratte in der 2. Ap Aufnahme

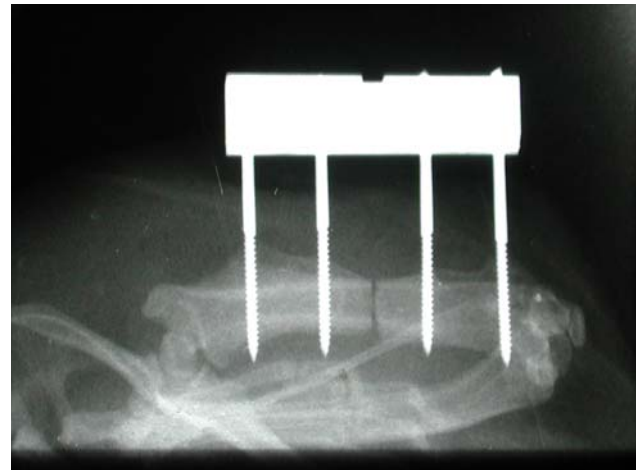


Abb.13.1: 2.Ap Aufnahme

Zwei Tage post Osteotomie erfolgte, je nach Gruppe, die Applikation von mesenchymalen Stammzellen bzw. Medium. Die präoperativen Vorbereitungen entsprachen jenen der Osteotomie. Zunächst erfolgte die Aufbereitung der MSCs. Hierfür wurden die MSCs für 4 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert, um sie vom Boden des Gefäßes zu lösen. Anschließend wurde das Stammzell-Medium-Gemisch für 10 min bei 15.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde bis auf ca. 4 ml verbleibendes Zentrifugat abgesaugt. Danach wurde die verbliebene Zellsuspension ein Zweites mal für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde diesmal bis auf ca. 0,05 ml abgesaugt. Die verbliebene Stammzellsuspension wurde mit einer 1 ml Einmalspritze und einer 24G-Kanüle (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) aspiriert. Danach erfolgte die Punktion des Oberschenkels entlang der Kerbe im Fixateurquerbalken. Mit der Kanülenspitze wurde der Osteotomiespalt aufgesucht und die Zellsuspension mit ca.  $2 \times 10^6$  MSCs/150 $\mu$ l appliziert. In der Medium-Gruppe erfolgte das Ganze mit der gleichen Menge reinen Mediums in der gleichen Weise.

Nach der Applikation wurden die Tiere in einem Zeitraum von acht Wochen unter wöchentlicher Kontrolle einzeln in Käfigen gehalten.

#### 4.6. Wöchentliche Verlaufskontrolle

Die wöchentlichen Kontrollen wurden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (3,5%) und Stickoxydul 0,4 l/min und Sauerstoff 0,6 l/min in einem offenen System durchgeführt, um zu großen Stress für die Tiere zu vermeiden.

Es erfolgten wöchentliche radiologische Verlaufskontrollen analog der postoperativen Röntgenkontrolle.

Hier wurde zum Einen darauf geachtet, ob ein Fortschreiten der Frakturheilung stattfand aber zum Anderen auch ob sich osteolytische Prozesse entwickelten, Drähte ausgebrochen oder gelockert waren oder sich anderweitige pathologische Zustände (Frakturen, Fissuren) zeigten. Der Allgemeinzustand des Tieres wurde beurteilt und die Wundverhältnisse kontrolliert.

Es erfolgte eine Messung der Temperatur und des Gewichtes der Tiere. Die Drähte wurden von Verschmutzungen befreit. Die Fäden wurden nach 10 Tagen gezogen.

Dies diente dem Zweck, ein Infektionsgeschehen frühzeitig erkennen zu können. Eine fortgeschrittene, therapieresistente Infektion mit starken osteolytischen Veränderungen der Knochensubstanz in der Umgebung der Kirschner-Drähte wäre Veranlassung gewesen, die Ratte aus dem Versuch herauszunehmen. Dies war jedoch bei keinem Tier notwendig.

#### 4.7. Euthanasie

Die Ratten wurden acht Wochen post Osteotomie euthanasiert. Es erfolgte zunächst eine Inhalationsnarkose mit Isofluran und Stickoxydul. Dann wurde die Lokalisation des Herzens palpirt, um eine Kanüle (Microlance<sup>TM</sup>, 20 G x 1 ½ - Nr. 1, Becton Dickinson, Fraga, Spanien) intrakardial zu platzieren. Zur Kontrolle wurde Blut aspiriert, um dann ca. 7 ml einer Kaliumchloridlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gewiss ins Herz zu verabreichen. Wurde der Tod durch Herzstillstand festgestellt, begann das Präparieren des Os femoris, dessen umgebender Muskulatur und der Tibia (siehe Abb. 14&15).

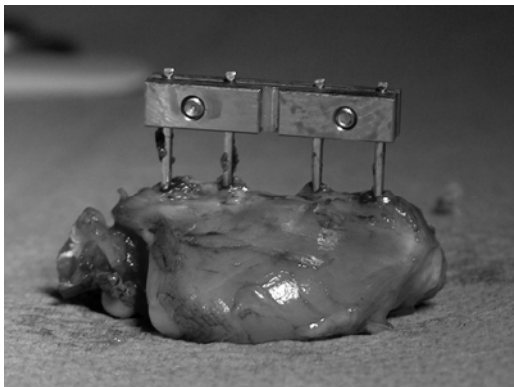


Abb. 14: Os femoris vor der Präparation mit umgebendem Weichteilgewebe

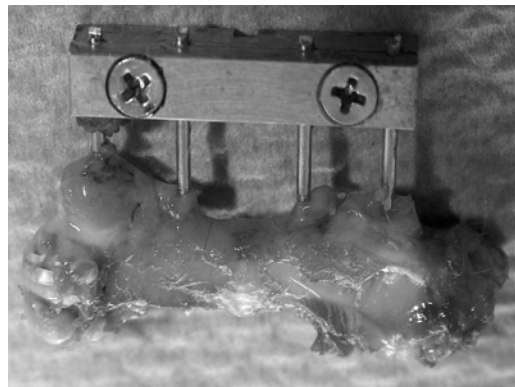


Abb.15: Os femoris nach der Präparation

#### 4.8. Vorbereitung für die Färbungen der Paraffinpräparate

Zunächst erfolgte eine Entkalkung der Präparate mit EDTA (Ethyldiamintetraacetat). EDTA ist ein Komplexbildner, welcher besonders stabile 1:1 Chelatkomplexe mit Kationen mit einer Ladungszahl von mindestens +2 bildet. Im vorliegenden Fall geht EDTA an seinen freien Bindungsstellen eine Verbindung mit Kalzium-Ionen aus dem Knochen ein, so dass sich EDTA-Kalzium-Präzipitate bilden. Dieser Vorgang ist notwendig, um die Antigene zur

Darstellung bestimmter Gewebestrukturen in der immunhistochemischen Färbung zugänglich zu machen.

Die Entkalkung des Knochens vollzog sich innerhalb von drei Wochen, wobei ein wöchentlicher Wechsel der EDTA-Lösung durchgeführt wurde. Nach der Entkalkung fand eine Entwässerung der Proben in aufsteigender Alkoholreihe statt. (siehe Tabelle „Aufsteigende Alkoholreihe“)

<b>Alkohol</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Verweildauer</b>
Ethanol	70 %	1 Tag
Ethanol	80 %	1 Tag
Ethanol	80 %	1 Tag
Ethanol	96 %	1 Tag
Ethanol	96 %	1 Tag
Ethanol	100 %	1 Tag
Ethanol	100 %	1 Tag
Ethanol	100 %	1 Tag

Aufsteigende Alkoholreihe

Die entwässerten Proben wurden anschließend mit flüssigem Paraffin infiltriert.

Ferner stand dafür ein Entwässerungs- und Infiltrationsgerät (Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) zur Verfügung, mit dem die Entwässerung und Infiltrierung innerhalb von drei Tagen durchgeführt wurde. Verwendung fanden beide Methoden.

Im Anschluss wurden die Präparate in Paraffinblöcke eingebettet. Hierfür wurden größenverstellbare Aluminiumschablonen verwendet, die einer Aluminiumplatte auflagen. Die Präparate wurden auf einer Wärmeplatte platziert und mit auf 60°C erwärmtem Paraffin übergossen. (Paraffinbad EG 1120, Leica, Solms, Deutschland). Das Os femoris wurde auf den Boden der Aluminiumschablone gelegt und auf eine Kühlplatte (EG 1130, Leica, Solms, Deutschland) überführt. Hier ließ man das Paraffin aushärten und entfernte die Schablone sowie die Bodenplatte.

Aus den hergestellten Paraffinblöcken wurden mit einem Rotationsmikrotom (RM 2125, Leica, Solms, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden anschließend in einem Wasserbad (21°C) ausgebreitet, etwaige Falten geglättet und die Schnitte auf Objektträger gezogen. Damit sich auch die kleineren Falten glätteten, kamen die Schnitte in ein 45°C warmes Wasserbad (HI 1210, Leica, Solms, Deutschland). Anschließend wurden sie für 48 Stunden in einem Wärmeschrank (Labor Trockenschrank Model UT 6, UT12, UT 20, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 37°C getrocknet.

### 4.9. Färbungen der Paraffinpräparate

Mit Abschluss der Trocknung waren die Schnitte bereit für die Färbungen.

Immunhistologische Färbungen:

- Kollagen-II
- Gefäßfärbung ( $\alpha$  SMA)

Übersichtsfärbungen:

- Alcianblau
- HE
- Movat Pentachrom Färbung

Enzymhistochemische Färbung:

- TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase)

Für die Vorbereitung zur Färbung mussten die Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Entparaffiniert wurden sie zweimal 10 min in Xylol. Die Rehydrierung erfolgte in einer abfallenden Alkoholreihe (siehe Tabelle „Abfallende Alkoholreihe“).

Alkohol	Konzentration	Verweildauer
Ethanol	100%	2 min
Ethanol	100%	2 min
Ethanol	96%	2 min
Ethanol	80%	2 min
Ethanol	70%	2 min

Abfallende Alkoholreihe

Anschließend wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest gespült und dann im PBS Puffer (pH 7,2-7,4) zweimal 5 min inkubiert. Bei jedem Spülvorgang wurde ein frischer Puffer verwendet. Der Puffer setzte sich aus einem Teil Chroma-Phosphatpufferkonzentrat (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland) und neun Teilen Aqua dest. zusammen. Er wurde verwendet, um elektrostatische Aufladungen von Proteinen während der immunhistochemischen Reaktion zu verhindern. Nach dem Spülen wurde, falls erforderlich, das Antigen demaskiert. Bei der Fixierung des Gewebes mit Formalin entstehen Quervernetzungen (Methylbrücken), die die Gewebsantigene maskieren und deren Nachweis mit dem Primärantikörper verhindern. Diese Quervernetzungen werden enzymatisch durch die Hyaluronidase aufgebrochen. Erforderlich war dies nur bei der Kollagen-II Färbung. Dafür wurden die Präparate für vier Stunden bei 37°C mit Hyaluronidase inkubiert. Die Enzymdauung musste sorgfältig kontrolliert werden, um Schädigungen des Gewebes und eine Zerstörung des Antigens zu vermeiden. Eine zu lange Verweildauer der Hyaluronidase auf dem Schnitt hätte zur Verdauung des Zytoplasmas führen können. In Folge wäre es zur Auflösung des Schnittes gekommen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min unter Leitungswasser und dann wieder in PBS-Puffer gespült. Der weitere Verlauf unterschied sich nicht von den anderen Immunfärbungen. Während der PBS-Puffer-Spülung wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet. Danach erfolgte eine Inkubation mit Normalserum. Das Normalserum sollte aus derselben Tierspezies stammen wie der sekundäre Antikörper, um unspezifische Bindungen an Gewebsproteinen abzusättigen. Für die Herstellung des Normalserums wurden 5 ml PBS Spülpuffer mit einem Tropfen Normalserum (Pferd) aus dem Elite ABC Kit (PK 6200 Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 U.S.A.) gemischt. Für die Kollagen-II Färbung und die  $\alpha$  SMA Färbung wurde Normalserum vom Pferd verwendet. Das Normalserum wurde nach der Einwirkzeit abgekippt und die Schnitte wurden 14 Stunden lang bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit DAKO-Diluent (Antibody Diluent with Background Reducing Components) angesetzt. Die Antikörperverdünnung wurde zuvor in einer Verdünnungsreihe ausgetestet. Für die  $\alpha$  SMA Färbung wurde eine 1:100 Verdünnung des Antikörpers angesetzt. Die verwendeten Primärantikörper (Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 U.S.A.) waren monoklonal. Sie wurden in einer Hybridoma (Plasmazelle fusioniert mit einer Myelomazelle) gebildet und waren nur gegen ein Epitop gerichtet.

Für die Kollagen-II Färbung wurde Anti-Kollagen Typ II verwendet. Das Kollagen-II entstammte dem Rind und führte im Kaninchen zur Antikörperbildung. Für die Gefäßfärbung wurde  $\alpha$  Smooth Muscle Actin Anti Human verwendet, welches ebenfalls in der Maus synthetisiert wurde. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte

wieder zweimal für 5 min mit PBS-Puffer gespült. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Zweitantikörper. Bei der Wahl des Zweitantikörpers war es wichtig, dass dieser „rat absorbed“ und empfindlich für den Primärantikörper war. An ihn war das Biotin gebunden, an welches sich in weiterer Folge das Avidin des Nachweissystems band. Für den Ansatz wurden 5 ml Spülpuffer, zwei Tropfen Normalserum (Pferd) und 2 Tropfen biotinylierter Antikörper (Kollagen II: Biotinylated anti rabbit IgG; Gefäßfärbung: Biotinylated anti mouse IgG, Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA, USA) verwendet. Nach 30 min wurde wieder mit PBS Puffer gespült. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine 50-minütige Inkubation mit dem AB Komplex (hochgereinigtes Avidin und biotinylierte Meerrettichperoxidase). Hierfür wurden 5 ml Spülpuffer mit einem Tropfen Reagenz A und einem Tropfen Reagenz B gemischt. (Reagenz A und B aus dem Standard Kit AK 5000 Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA, USA) Der AB Komplex sollte vor Gebrauch 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen werden und wurde aus diesem Grund zur gleichen Zeit wie der Zweitantikörper angesetzt. Zuerst wurde mit dem PBS Puffer und im Anschluss mit Chromogenpuffer (pH 8,2) für jeweils 2 mal 5 min inkubiert. Anschließend wurde das AP-Substrat (Red Alkaline Phosphatase Substrat, Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA, USA) aufgetragen. Für den AP Ansatz wurden 5 ml Chromogenpuffer mit zwei Tropfen Reagenz I, zwei Tropfen Reagenz II und zwei Tropfen Reagenz III sorgfältig miteinander gemischt. Da das AP-Substrat sehr lichtempfindlich war, sollte es erst kurz vor seiner Anwendung angesetzt und dann vor Lichteinwirkung geschützt werden. Nach dem Auftragen erfolgte eine Sichtkontrolle unter dem Mikroskop (Zeiss, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland). Es wurde auf diese Art geprüft, ob die spezifischen Bereiche gefärbt und die Intensität der Färbung ausreichend waren. Die Einwirkzeit betrug in den meisten Fällen nur wenige Minuten. Wurde sie zu lang gewählt, kam es zu unspezifischen Anfärbungen der anderen Gewebe. War das spezifische Farbergebnis vorzufinden, wurde die Reaktion abgestoppt indem die Schnitte mit PBS Puffer gespült wurden. Vor der Kern-Gegenfärbung mit Hämatoxylin (nach Mayer), wurden die Schnitte mit Aqua dest gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte sechs Mal in Hämatoxylin (nach Mayer) eingetaucht und mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurden sie für 2 min mit Leitungswasser gewässert. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

Zum Abschluss wurden die Schnitte für 5 min in Xylol inkubiert und mit Hilfe von Vitro Clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

Für die Übersichtsfärbungen, die Movat Pentachrom, und die enzymatische Färbung erfuhren die Schnitte, was das Entparaffinieren und die Rehydrierung betraf, die gleiche Vorbehandlung wie für die Immunfärbungen.

Für die Alcianblaufärbung wurden die Schnitte in Aqua dest gewaschen und für 3 min in 3%-ige Essigsäure gegeben und anschließend für 30 min in 1%-ige Alcianlösung inkubiert. Für diese wurde 0,5 g Alcianblau 8 GS (Fa.Chroma, Münster, Deutschland) in 3%-iger Essigsäure gelöst. Der pH-Wert sollte etwa 2,5 betragen. Die Schnitte wurden mit 3%-iger Essigsäure abgespült. Die Essigsäure wurde dann mit Aqua dest abgespült. Im Anschluss wurden die Schnitte in Kernechtrot gefärbt und nach einer Einwirkzeit von 5 min in Aqua dest gewaschen. Zum Abschluss wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe über Xylol entwässert und mit Vitro Clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

Die Alcianblaufärbung färbte saure Mucosubstanzen leuchtend blau, Kerne braun, Bindegewebe rot und Muskulatur gelb. Diese Färbung genauso wie die Movat Pentachrom Färbung diente später der Beschreibung der Schnitte.

Eine weitere Färbung war die Movat Pentachrom Färbung. Bei dieser Färbung erschien mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen leuchtend gelb, mineralisierter Knorpel blaugrün, Knorpelgewebe je nach Fixierung rötlich bis gelb, saure Glukosaminoglykane leuchtend hellblau, Osteoid dunkelrot, elastische Fasern rot, Zellkerne blauschwarz und das Zytoplasma

rötlich. Diese Färbung diente einerseits der deskriptiven Beschreibung, andererseits der Histomorphometrie zur Bestimmung der Knochen- und Knorpelflächen.

Für die Osteoklastendarstellung wurde die TRAP-Färbung verwendet. Hierfür wurden die Schnitte wieder entparaffiniert und rehydriert. Der Rehydrierung schloss sich eine Spülung im Aqua dest an. Bevor die Färbung der Schnitte in der TRAP-Lösung erfolgte, mussten sie zuvor für 10 min in einem TRAP-Puffer inkubiert werden. Dieser Puffer bestand aus 3,28 g Na-Acetat und 46,01 g Na-Tatrat. Die Komponenten wurden in einem Becherglas bei einem pH-Wert von 5,0 bis zur 1 Liter-Eichmarke mit Aqua dest aufgefüllt und unter Zuhilfenahme des Magnetrührers gelöst. Die Schnitte wurden bei 37°C in der TRAP-Färbelösung inkubiert.

Die Zusammensetzung der Färbelösung stellte sich wie folgt dar:

- 40 mg Naphtol AS-MIX Phosphat (Fa. Sigma N 5000)
- 4000 µl N-N-Dimethylformamid (Fa. Sigma D4551)
- 240 mg Fast Red Violett LB Salt (Fa. Sigma F3381)
- 2 ml Triton X
- 200 ml TRAP-Puffer

Nach der Gegenfärbung mit Methyl-Grün (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Schnitte mit Gelatine eingedeckt.

Bei dieser Färbung stellten sich die Osteoklasten pink- bzw. rosafarben mit hellblauen Zellkernen dar.

#### 4.10. Vorbereitung für die Safranin-Orange/von Kossa Färbung

Die Präparate für die Safranin-Orange/von Kossa Färbung mussten in Kunststoff eingebettet werden.

Nach der Fixierung erfolgt auch hier eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe.

Danach wurden die Präparate zur Entfettung für vier Stunden in Xylol

(Xylene®, J.T. Baker, Deventer, Niederlande) eingelegt. Das Xylol verdrängt dabei gleichzeitig den Alkohol aus dem Gewebe.

Anschließend erfolgte die Präinfiltration über drei Tage bei Raumtemperatur. Die Präinfiltration löste gleichzeitig das vorhandene Xylol aus dem Präparat.

Hierfür wurde 1 g Härter I in 200 ml entstabilisierter Basislösung unter Zuhilfenahme des Magnetrührers (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) gelöst. Nach der Präinfiltration erfolgte die Infiltration. Für die Herstellung der Infiltrationslösung wurden in 200 ml entstabilisierter Basislösung 20 g PMMA in Lösung gebracht. War die Lösung geklärt, wurde 1g Härter hinzugegeben und ebenfalls durch ständiges Rühren mit dem Magnetrührer gelöst. Zum Abschluss wurde die Lösung auf 250 ml (Eichmarke) mit entstabilisierter Basislösung aufgefüllt. Die Präparate wurden für sieben Tage bei 4°C im Kühlschrank infiltriert.

Die Einbettung der Knochen erfolgte in Technovit® 9100 NEU. Das Polymerisationsgemisch bestand aus 9 Teilen einer Stammlösung A und 1 Teil einer Stammlösung B. Für die Herstellung der Stammlösung A wurden in einem 500 ml Messkolben 80 g Pulver schrittweise mit ca. 400 ml entstabilisierter Basislösung gemischt. Das Gemisch wurde auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur solange gerührt, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde der Härter I (3 g Pulver) hinzugegeben und ebenfalls mit dem Magnetrührer zur Auflösung gebracht. Anschließend wurde der Messkolben auf 500 ml (Eichmarke) mit der entstabilisierter Basislösung aufgefüllt. Für die Herstellung der Stammlösung B wurden in einem 50 ml Messkolben 4 ml Härter II und 30 ml entstabilisierter Basislösung auf dem Magnetrührer gemischt. Im Anschluss wurden 2 ml Regler hinzugegeben und der Messkolben mit entstabilisierter Basislösung auf 50 ml (Eichmarke)



aufgefüllt. Alle Komponenten wurden auf dem Magnetrührer gut durchgemischt. Zum Mischen der Stammlösung A mit der Stammlösung B wurde ein Becherglas verwendet, das nach dem Befüllen mit einem Plastikhandschuh überzogen wurde. Das Becherglas wurde mehrmals vorsichtig geschwenkt. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Gasblasen bildeten. Das fertige Polymerisationsgemisch wurde in spezielle Plastikbehälter gegossen. In die befüllten Behälter wurden anschließend die infiltrierte Ossa femora positioniert, mit entsprechenden Nummern gekennzeichnet und luftdicht verschlossen. Sie wurden für zwei Tage bei 4°C zum Aushärten im Kühlschrank belassen. Nach dem Aushärten wurden die Technovitblöcke aus ihrer Form gelöst und für weitere zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert, um eine vollständige Aushärtung zu erreichen. Die Blöcke wurden vor dem Schneiden mit einem Mikroschleifsystem (Exakt) zurechtgeschliffen, um anschließend im Hart- und Großschnittmikrotom (Polycut-S, Cambridge Instruments GmbH) eingespannt zu werden. Mit dem Mikrotom wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt, wobei vor jedem Schnitt der Block mit einer Schneidflüssigkeit benetzt wurde. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgetragen, mit Streckflüssigkeit benetzt und mit einer Folie versehen. Sie wurden für zwei Tage bei 37°C unter Druck im Brutschrank getrocknet.

### 4.11. Safranin Orange/von Kossa Färbung

Nach der Trocknung wurden die Schnitte mit Safranin Orange/von Kossa gefärbt. Durch die Färbung wurden mineralisierter Knorpel, Knochengewebe, sowie Mineralisationsfronten schwarz angefärbt. Knorpel und Bindegewebe färbten sich hingegen rot.

Für diese Färbung mussten die Schnitte für je 30 min in Methylmethacrylat (MEA) entplastet werden. Die Schnitte wurden in 1%-iger Ameisensäure angeraut, welche nach einer Minute mit Aqua dest wieder abgespült wurde. Anschließend wurden sie für 40 min in 3%-iger wässriger Silbernitratlösung gefärbt. Diese wurde dann 3 mal mit Aqua dest abgespült, bevor die Schnitte für 2 min in Natrium-Formaldehydlösung reduziert wurden. Die Schnitte wurden nach der Reduzierung für 10 min in Leitungswasser gewässert. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation in 5%-igem Natriumthiosulfat. Im Anschluss wurde erneut für 10 min mit Leitungswasser gewässert. Vor und nach der 8-minütigen Färbung mit Safranin Orange wurden die Schnitte kurz in Aqua dest gespült. Mit der Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe über Xylol und der Eindeckung mit Vitro Clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) war die Färbung abgeschlossen.

### 4.12. Auswertung

#### 4.12.1. Röntgenologische Auswertung

Die Auswertung der Röntgenbilder erfolgte deskriptiv. Zur Auswertung kamen die Röntgenaufnahmen post Osteotomie, sowie die der wöchentlichen Verlaufskontrollen.

Die Röntgenaufnahmen dienten der Kontrolle des Heilungsverlaufs und dem Ausschluss von zusätzlichen Frakturen oder Implantatversagen. Die post mortem Röntgenaufnahmen wurden in Hinblick auf den gebildeten periostalen Kallus, den endostalen Kallus sowie die Mineralisation im Markraum und die Überbrückung des Osteotomiespalts beurteilt.

Desweiteren wurde anhand der Röntgenaufnahmen direkt post Osteotomie und nach 56 Tagen die Weite des Osteotomiespaltes auf der lateralen und medialen Seite ausgemessen und statistisch ausgewertet. Hierfür wurden die Röntgenbilder mit einem Lineal auf einem Lichttisch fotografiert (Digitalkamera, Canon, Krefeld, Deutschland) und im Computer



digitalisiert. Anschließend wurde die Osteotomiespaltweite mit Hilfe des Lineals und dem Bearbeitungsprogramm Photoshop ausgemessen.

#### 4.12.2. Quantitative Auswertung

Die Osteoklasten und die Gefäße wurden quantitativ ausgewertet. Für die Auswertung wurde eine Region of Interest (ROI) festgelegt. Die Basis der ROI wurde mittig quer durch den Osteotomiespalt gelegt. Von dieser Basis ausgehend wurden nach proximal und distal je 3,5 mm abgemessen und so die Höhe der ROI definiert. Die Breite der ROI wurde durch die Gesamtkallusbreite vorgegeben. Die Kortices wurden durchnummeriert: die Kortikalis I lag lateroproximal, die Kortikalis II laterodistal, die Kortikalis III medioproximal und die Kortikalis IV mediodistal des Osteotomiespaltes. Desweiteren wurde eine Unterteilung in einen periostalen und einen endostalen Bereich vorgenommen. Zur weiteren Auswertung wurden Osteoklasten und Gefäße im Bereich des Osteotomiespaltes gezählt.

Bei der Osteoklastenzählung wurden nur Zellen berücksichtigt, die mehr als einen Nukleus beinhalteten, durch die TRAP Färbung gefärbt wurden und Kontakt zum Knochen hatten. Gefäße wurden gezählt, wenn sie angefärbt waren und ein Lumen, das von Endothelzellen ausgekleidet war, aufwies.

#### 4.12.3. Deskriptive Auswertung der histologischen Schnitte

Für die deskriptive Auswertung wurden die gefärbten histologischen Schnitte unter dem Mikroskop (Leica, Solms, Deutschland) betrachtet. Dabei wurde die Kallusform und Kallusausprägung, die Osteolysen der Osteotomieenden, die Osteotomiespaltweite und das sich im Osteotomiespalt befindliche Gewebe detailliert beschrieben. Auch einsetzende Remodelingprozesse der Kortikalis wurden beurteilt.

#### 4.12.4. Computergestützte Bildanalyse

Für die computergestützte Bildanalyse wurden die Schnitte zusammen mit einem Millimetermaß, welches als Skalierung diente, auf einem Leuchttisch mit einer Digitalkamera fotografiert. Zur Auswertung eines jeden Tieres kamen vier Schnitte der Safranin-Orange/von Kossa, zwei Schnitte der Movat Pentachrom und ein Schnitt der Kollagen-II Färbung. Die fotografierten Schnitte wurden auf CD und im Computer gespeichert und anschließend mit dem entsprechenden Makro, ein den Messzwecken angepasstes Computerprogramm, ausgewertet. Mit dem Makro wurden zuerst die Safranin Orange/von Kossa gefärbten Schnitte ausgewertet. Hierfür wurden Schritt für Schritt die Anweisungen des Makros befolgt. Zuerst musste ein vom Makro vorgegebenes Rechteck anhand der Millimeterskala auf 10 mm Kantenlänge eingestellt werden (Abb.1.1.). Als nächstes wurde die ROI definiert. Hierfür wurde der Durchmesser der Kortikalis, des knöchernen Kallus und des Gesamtkallus bestimmt (Abb.1.2-1.5.). Desweiteren wurde die Länge der gekauterten Bereiche aller Kortices markiert (Abb.1.6-1.9.). Mit Hilfe des Durchmessers des Gesamtkallus, welcher mittig in der Querachse des Osteotomiespalts gemessen wurde, erfolgte die Festlegung der Breite der ROI. Die Gesamthöhe der ROI wurde auf 7 mm festgelegt. Von der Basis ausgehend, welche mittig quer durch den Osteotomiespalt gelegt wurde, wurden nach proximal und distal je 3,5 mm abgemessen und so die Gesamthöhe der ROI definiert. Alle Messungen des Makros erfolgten nur innerhalb dieser ROI. Anschließend wurden dem Rechner die Grenzen zwischen medialem und lateralem Bereich in der Mitte des Markraums angegeben und jeweils durch die Mitte der medialen und lateralen Kortikalis die Grenze

zwischen periostalem und endostalem Bereich angegeben (Abb 1.12, 1.13.) Aus diesen Parametern errechnete das Makro sowohl mediale, laterale und periostale, endostale ROI als auch z. B. die endostal-laterale oder auch periostal-mediale ROI. Sobald die ROI definiert war, erfolgte die Gewebedifferenzierung halbautomatisch. Das kalibrierte Computerprogramm errechnete die Flächenanteile des Knochen- und Bindegewebes entsprechend der vorgegebenen Standardfarben für die einzelnen Gewebe (Abb.1.17-1.20.). Der Benutzer dieses Programms konnte diese Einschätzung mittels Farbwertregler nach oben oder unten korrigieren. Auch die Kortices und der Osteotomiespalt wurden durch den Auswertenden markiert. Das Makro berechnete letztendlich aus allen eingegebenen Informationen die Flächenanteile der unterschiedlichen Gewebe bezogen auf die verschiedenen Lokalisationen.

### Schrittfolge der histomorphometrischen Analyse mittels computergestützter Bildanalyse

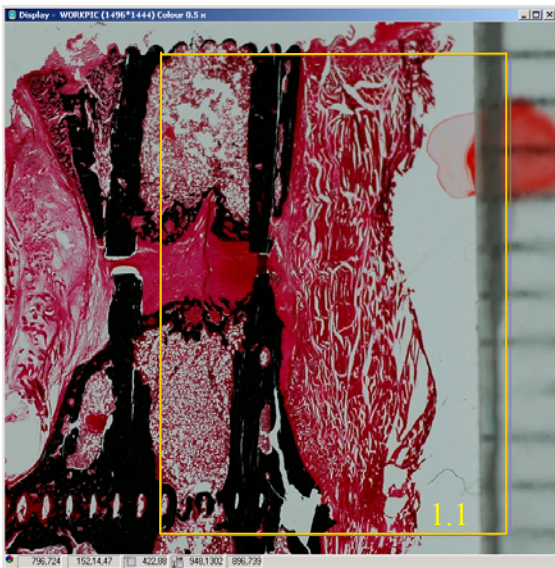


Abb.1.1 Kalibrierung, 10 mm werden anhand des fotografierten Lineals kalibriert

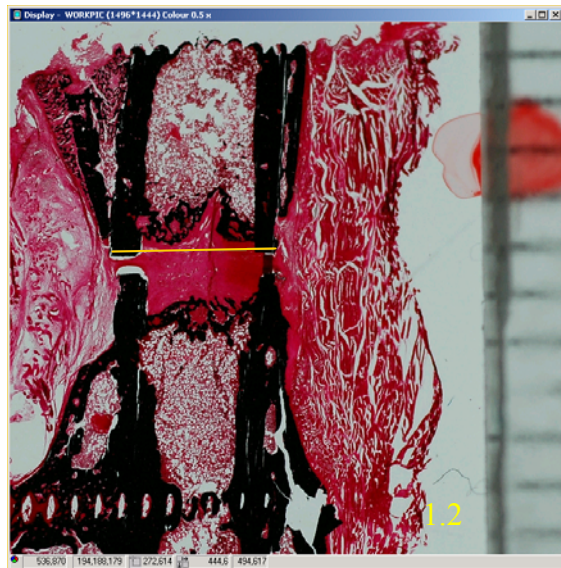


Abb.1.2 Einzeichnen der maximale Kortikalisweite proximal

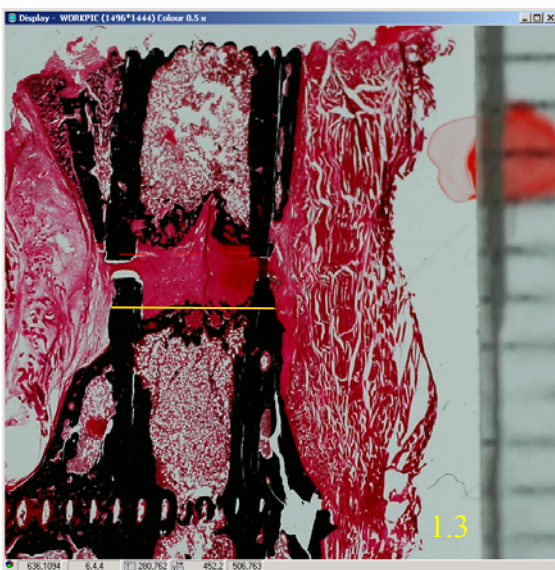


Abb. 1.3 Einzeichnen der maximalen Kortikalisweite distal

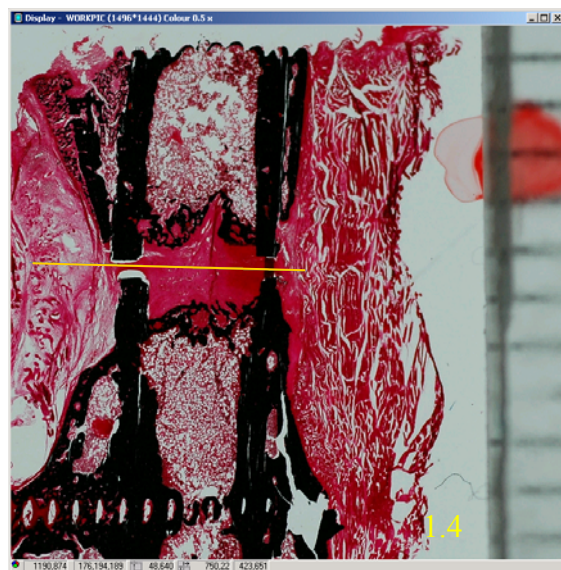


Abb. 1.4 Einzeichnen der Gesamtkallusbreite in Höhe des Osteotomiespalt



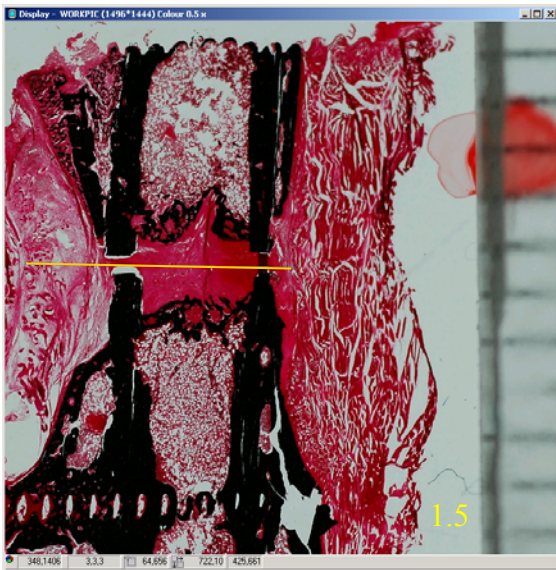


Abb. 1.5 Einzeichnen der knöchernen Kallusbreite in Höhe des Osteotomiespaltes

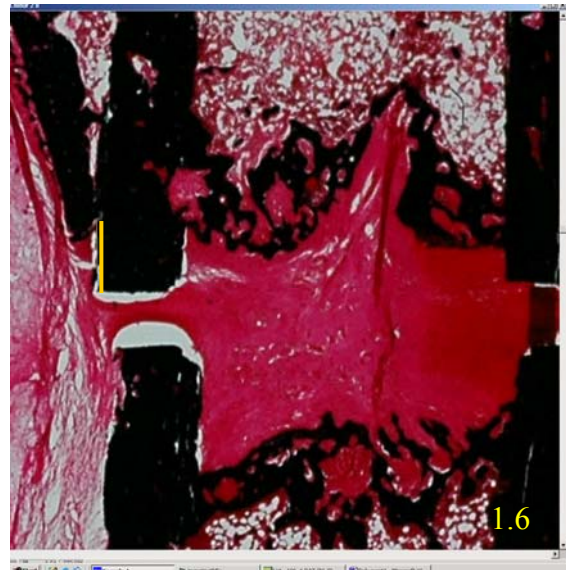


Abb. 1.6 Einzeichnen der maximalen Länge des lateral/proximal gekauterten Kallusbereiches

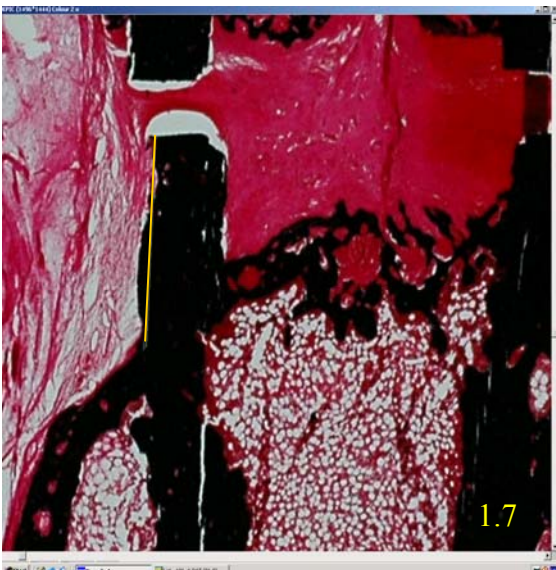


Abb. 1.7 Einzeichnen der maximalen Länge des lateral/distal gekauterten Kallusbereiches

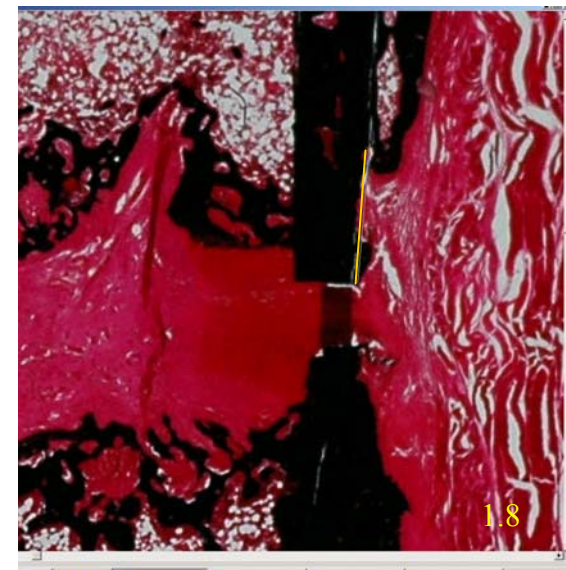


Abb. 1.8 Einzeichnen der maximalen Länge des medial/proximal gekauterten Kallusbereiches



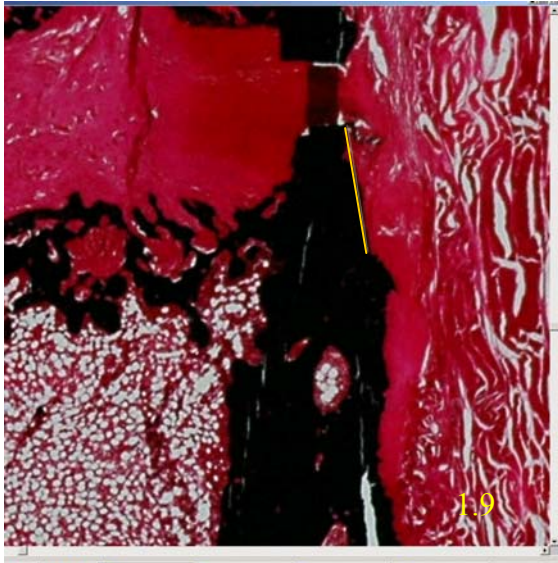


Abb. 1.9 Einzeichnen der maximalen Länge des medial/distal gekauterten Kallusbereiches



Abb. 1.10 Einzeichnen der maximalen Weite des Osteotomiespaltes auf der lateralen Seite

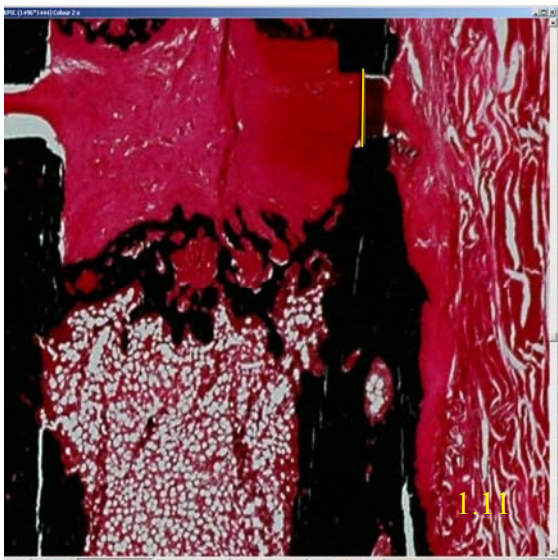


Abb. 1.11 Einzeichnen der maximalen Weite des Osteotomiespaltes auf der medialen Seite



Abb. 1.12 Anklicken des Mittelpunktes im proximalen Markraum (blau), Anklicken der lateroproximal periosteal/endosteal Grenze (gelb), Anklicken der medio-proximal periosteal/endosteal Grenze (grün)





Abb. 1.13 Anklicken des Mittelpunktes im distalen Markraum, Anklicken der laterodistal periosteal/endosteal Grenze (gelb) & Anklicken der mediodistal periosteal/endosteal Grenze (grün)

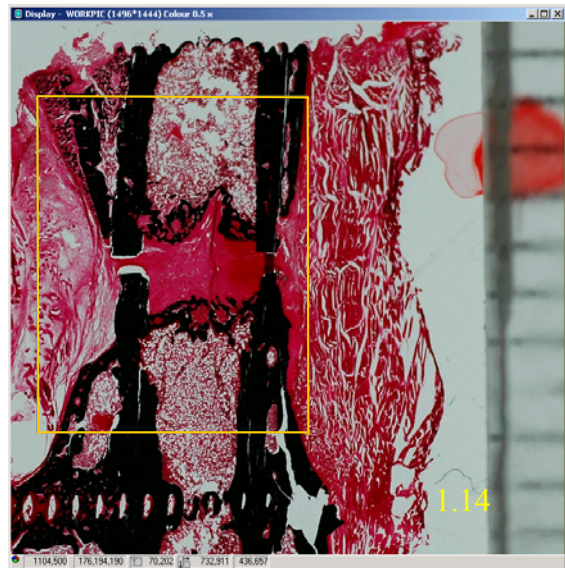


Abb. 1.14 ggf. Verschieben der ROI



Abb. 1.15 Einzeichnen der Kortices

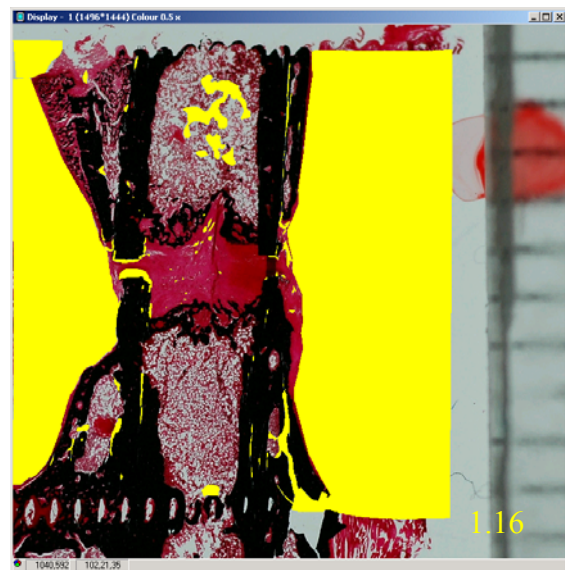


Abb. 1.16 Einzeichnen der gesamten Lehrfläche in der ROI

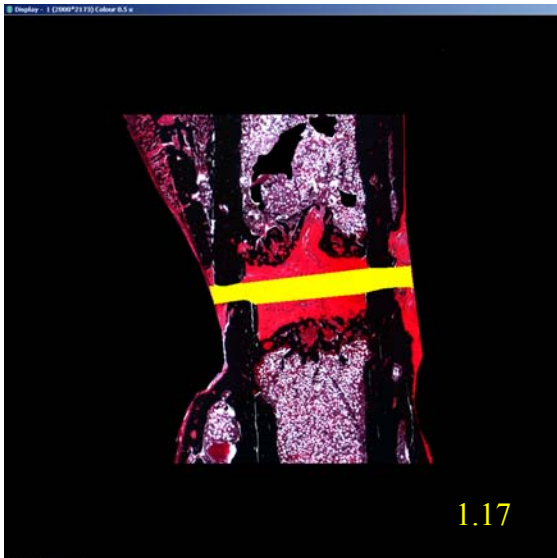


Abb. 1.17 Osteotomiespalt einzeichnen

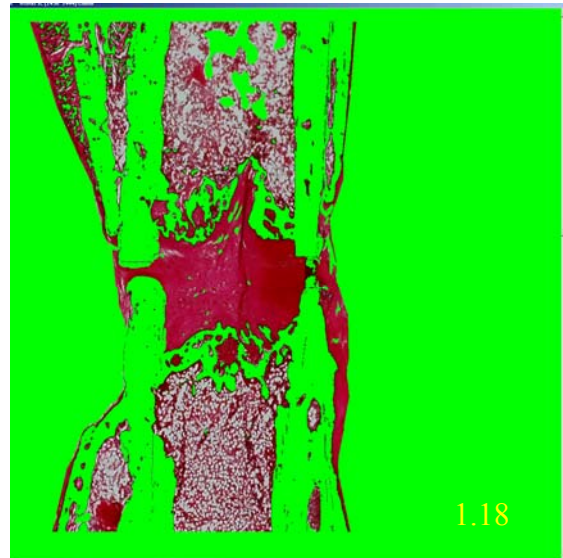


Abb. 1.18 Knochen segmentieren

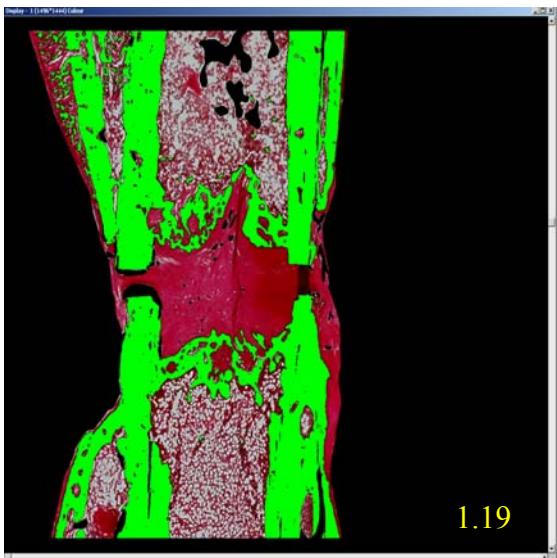


Abb. 1.19 manuelle Korrektur

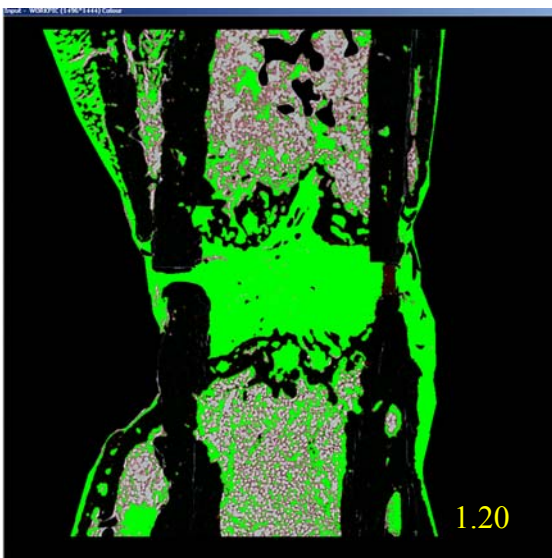


Abb 1.20 Bindegewebe segmentieren

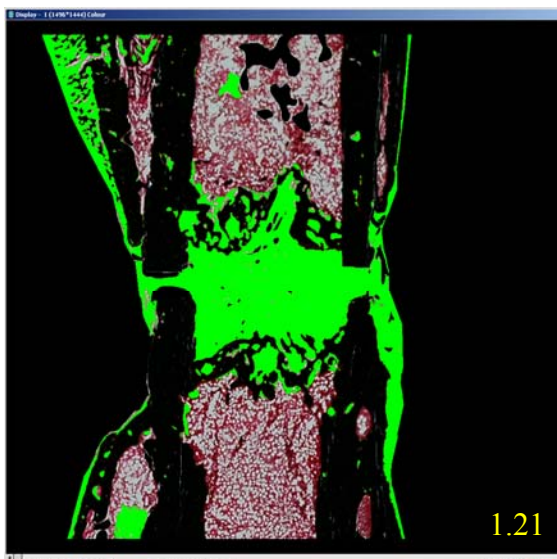


Abb. 1.21 manuelle Korrektur

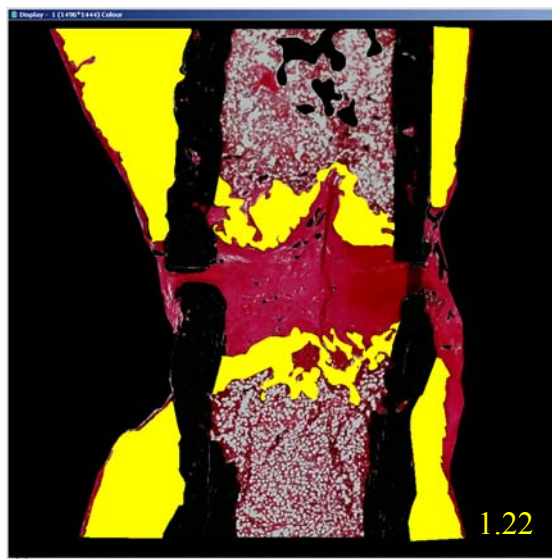


Abb. 1.22 Hartkallus einzeichnen



Die folgenden Parameter wurden mithilfe der computergestützten Bildanalyse erhoben:

- 1. Region of Interest Area [mm<sup>2</sup>]:** Die Untersuchungsfläche ergibt sich aus der festgelegten Höhe von 7 mm multipliziert mit dem Gesamtkallusdurchmesser.
- 2. Cortical Width [mm]:** Die kortikale Weite beschreibt den Durchmesser von der lateralen Kortikalisaußenkante zur medialen Kortikalisaußenkante.
- 3. Callus Width [mm]:** Der Gesamtkallusdurchmesser beschreibt die weiteste Stelle des gesamten Kallus inklusive der weitesten bindegewebigen oder knorpeligen Ausdehnung.
- 4. Callus Bone Width [mm]:** Der knöcherne Kallusdurchmesser beschreibt die weiteste Stelle des knöchernen Kallus.
- 6. Cauterize Width [mm]:** Beschreibt die Länge des gekauterten Bereiches an der Kortikalis. Sie wird lateroproximal, laterodistal, medioproximal und mediodistal an den Kortices bestimmt.
- 7. Fracturegap Width [mm]:** Die Osteotomiespaltweite ergibt sich aus der weitesten Stelle zwischen der proximalen und distalen Kortikalis auf der lateralen und medialen Seite.
- 8. Total Bone Area [mm<sup>2</sup>]:** Die Gesamtknochenfläche besteht nicht ausschließlich aus dem schwarz gefärbten mineralisierten Knochen, sondern umfasst ebenfalls eingeschlossene bindegewebige und knorpelige Anteile, ebenso Blutgefäße, ungefüllte Lakunen usw. Die Gesamtknochenfläche setzt sich zusammen aus der Knochenfläche der Kortices, der Knochenfläche des Kallus und der Knochenfläche des Osteotomiespaltes.
- 9. Cortical Bone Area [mm<sup>2</sup>]:** Veränderungen der kortikalen Knochenfläche lassen auf Resorptionsvorgänge im Knochen schließen. Dies ist möglich, da die Kortikalis in ihrer Ausdehnung bei den einzelnen Ratten im Versuch vergleichbar ist.
- 10. Total Mineralized Bone Area [mm<sup>2</sup>]:** Die Gesamtfläche mineralisierten Knochens berücksichtigt nur die schwarz gefärbten, mineralisierten Anteile des Knochens, welche der mineralisierten Knochenmatrix entsprechen. Keine Berücksichtigung finden dagegen Bindegewebe, Knorpelgewebe, ungefüllte Lakunen, Gefäße usw. Die Gesamtfläche des mineralisierten Knochens setzt sich aus der mineralisierten Knochenfläche der Kortices, der mineralisierten Knochenfläche des Kallus und der mineralisierten Knochenfläche des Osteotomiespaltes zusammen.
- 11. Cortical Mineralized Bone Area [mm<sup>2</sup>]:** Ist die Fläche mineralisierten kortikalen Knochens.
- 12. Total Bone Density [%]:** Die Gesamtknochendichte ergibt sich aus der Total Bone Area dividiert durch die Total Mineralized Bone Area. Die Gesamtknochendichte setzt sich aus der Knochendichte der Kortices, der Knochendichte des Kallus und der Knochendichte des Osteotomiespaltes zusammen.
- 13. Cortical Bone Density [%]:** Die Dichte kortikalen Knochens ergibt sich aus der Cortical Bone Area dividiert durch die Cortical Mineralized Bone Area.
- 14 Total Connective Tissue Area [mm<sup>2</sup>]:** Die Gesamtbindegewebsfläche besteht aus der Bindegewebsfläche der Kortices, der Bindegewebsfläche des Kallus und der Bindegewebsfläche des Osteotomiespaltesspaltes.
- 15. Cortical Connective Tissue Area [mm<sup>2</sup>]:** Die Bindegewebsfläche des kortikalen Knochens ergibt sich aus dem Anteil von Bindegewebe in den Havers'schen und Volkmann'schen Kanälen, die die kompakte Kortikalisstruktur unterbrechen.

Die Parameter 8,10,12,14 wurden getrennt für die mediale und laterale Seite als auch für die periostale und endostale Seite ermittelt.

### 4.12.5. Statistik

Die in die Auswertung eingehenden Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt. Bei der Gruppe 1 wurden mesenchymale Stammzellen in den Osteotomiespalt injiziert, der Gruppe 2 nur das Medium, in der die mesenchymalen Stammzellen inkubiert wurden. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7,0 [110] durchgeführt. Die graphischen Abbildungen wurden mit Microsoft Excel 2000 erstellt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima, und Stichprobenumfänge berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Bei den semiquantitativen Variablen erfolgte die Datenbeschreibung durch die Angabe der Mediane, der Quartile, sowie der kleinsten und größten Beobachtungen mit Darstellung im Box-and-Whisker-Plot. Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Zeiteinflusses auf die Signifikanz wurde bei den angenähert normalverteilten Merkmalen eine einfaktorische bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit mit dem Programm BMDP7D bzw. BMDP2V durchgeführt. Bei den semiquantitativen Merkmalen kam beim Gruppenvergleich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test unter Verwendung des Programms BMDP3S zum Einsatz. Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen mit dem Programm BMNDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten und der Regressionsgraden bzw. mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, d. h. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Bei der statistischen Auswertung der Gewichte und Temperaturen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich des Faktors Zeit durchgeführt. Bei der Auswertung der Osteotomiespaltweiten wurde das gleiche getrennt nach Gruppe, nach lateral und medial durchgeführt. Zur Datenbeschreibung wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima, Stichprobenumfänge und der p-Wert berechnet. Bei der Auswertung der immunhistologischen und histomorphometrischen Daten wurde der T-Test für unabhängige Stichproben bzw. der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Zur Beschreibung der Daten wurden hier ebenfalls arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima, und Stichprobenumfänge berechnet. Es erfolgte desweiteren eine Datenbeschreibung durch die Angabe der Mediane, der Quartile, sowie der kleinsten und größten Beobachtungen mit Darstellung im Box-and-Whisker-Plot.



## 5. Ergebnisse

### 5.1. Röntgen-Daten

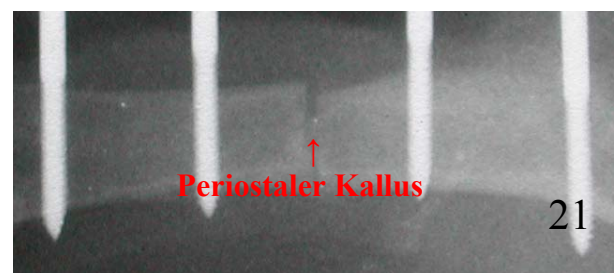
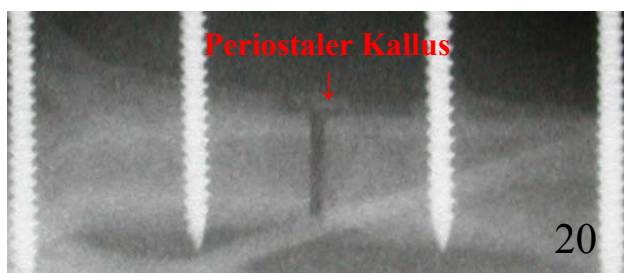
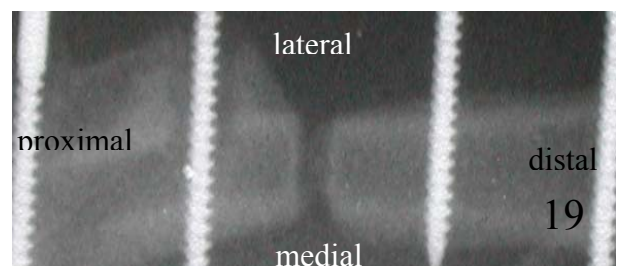
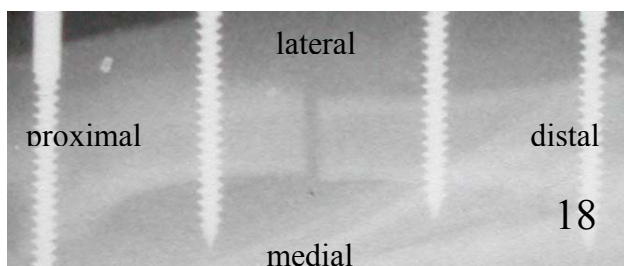
Für die Beurteilung des Heilungsverlaufes zum Achtwochenzeitpunkt wurden die Röntgenaufnahmen in drei Ebenen herangezogen, die vor der Euthanasie der Tiere entstanden waren. Zum Vergleich dienten die Röntgenbilder post Osteotomie.

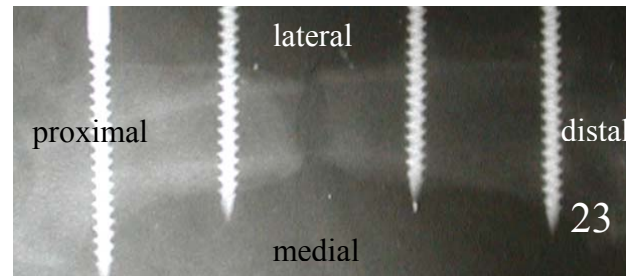
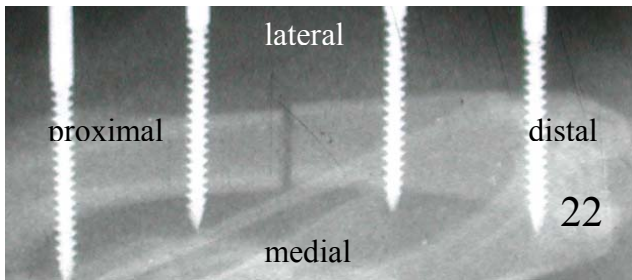
In den Röntgenaufnahmen stellt sich das Os femoris, das am proximalen Ende im Hüftgelenk mit dem Beckenknochen artikuliert und distal mit der Tibia und der Patella das Kniegelenk bildet, dar. Desweiteren stellen sich die vier in den Knochen eingedrehten und in den Fixateur externe eingespannten Kirschner-Drähte als röntgendichte Strukturen dar. Als Aufhellung zwischen den mittleren Kirschner-Drähten ist der Osteotomiespalt zu erkennen. (Siehe Abb. 18-21 )

Es wurde sowohl auf die Osteotomieenden geachtet (Abrundungen, Resorptionsvorgänge), als auch auf das Vordringen des Kallus in den gekauterten Bereich, eine eventuelle Überbrückung des Osteotomiespalt, ein Verschwinden des Osteotomiespalt und einsetzende Remodelingvorgänge.

Die MSC-Gruppe schien in der Röntgenbilderauswertung einen etwas besseren Heilungsverlauf als die Medium-Gruppe aufzuweisen. Der Unterschied zeigte sich vor allem darin, dass die Enden der Kortices der MSC-Gruppe weniger von Resorptionsprozessen betroffen waren. Diese Resorptionsprozesse zeigten sich bei beiden Gruppen im schlechtesten Falle bis über die gesamte Länge des gekauterten Bereichs (Abb. 12&19). Das Vordringen des Kallus in den gekauterten Bereich dagegen ließ sich bei der MSC-Gruppe öfter beobachten als bei der Medium-Gruppe. Die breiteste Ausdehnung des Kallus zeigte sich bei der Mehrzahl der Tiere beider Gruppen im Bereich der Kirschner-Drähte und verzüngte sich dann zum Osteotomiespalt hin.

Eine Überbrückung des Osteotomiespaltesspalt durch den periostalen Kallus zeigte sich nur bei einem Tier der MSC-Gruppe und einem Tier der Medium-Gruppe, dies aber auch nur auf einer Seite (Abb. 20&21). Der Osteotomiespalt war bei allen Tieren beider Gruppen deutlich sichtbar bzw. erweitert.





- Abb. 18 Osteotomiespaltweite zum Zeitpunkt post Osteotomie (MSC-Tier)  
 Abb. 19 Osteotomiespaltweite zum Zeitpunkt 8 Wochen post Osteotomie (MSC-Tier),  
 deutlich sichtbar der erweiterte Osteotomiespalt  
 Abb. 20 MSC-Tier 8 Wochen, periostaler Kallus überbrückt lateral den Osteotomiespalt  
 Abb. 21 Medium-Tier 8 Wochen, periostaler Kallus überbrückt medial den  
 Osteotomiespalt  
 Abb. 22 Osteotomiespalt zum Zeitpunkt post Osteotomie (Medium-Tier)  
 Abb. 23 Osteotomiespalt zum Zeitpunkt 8 Wochen post Osteotomie (Medium-Tier),  
 auch hier deutlich sichtbar der erweiterte Osteotomiespalt

## 5.2. Deskriptive Histologie

Die Schnitte zeigen einen Längsschnitt durch das Os femoris, wodurch sich die Kortikalis als zwei durch den Markraum getrennte Rechtecke darstellt. Die Kontinuität der Kortices ist in der Mitte des Schnittes durch den Osteotomiespalt unterbrochen (siehe Abb 24).

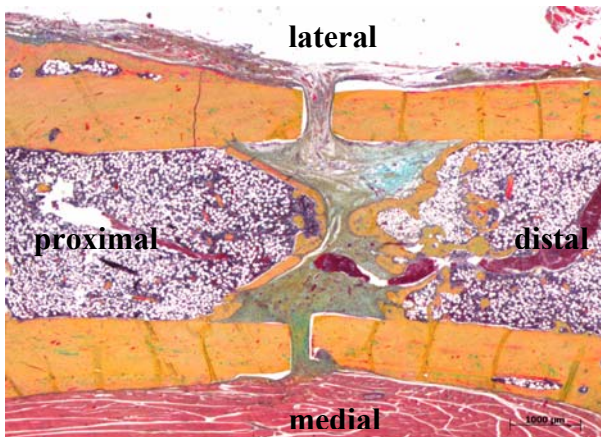


Abb. 24: Längsschnitt durch das Rattenfemur in der Movat Pentachromfärbung  
 Maßstabsbalken 1000 µm

Der periostale Kallus umgibt die gesamte Kortikalis bis hin zum gekauterten Bereich oder weiter und verjüngt sich in seiner Ausprägung zum Osteotomiespalt hin. Eine Besonderheit des periostalen Kallus der Ratte ist der aufgelockerte nicht mineralisierte Bereich innerhalb des Kallusgewebes. Die Struktur und das Zellbild entsprechen dem des Markraums. Dieser „Pseudomarkraum“ ist scharf vom Kallusknochen abgegrenzt und präsentiert sich in einer aufgelockerten, netzartigen Struktur (siehe Abb. 25).

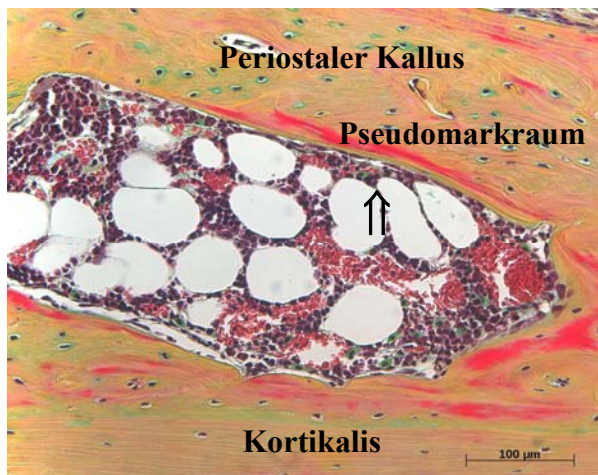


Abb. 25: Pseudomarkraum eines MSC-Tieres in der Movat Pentachromfärbung  
Maßstabsbalken 100 µm

Der periostale Kallus endete bei der Mehrzahl der Tiere im gekauterten Bereich teils spitz zulaufend, teils mit aufgetriebenen abgerundeten Enden. Nur bei einem Tier der Medium-Gruppe überbrückte der periostale Kallus auf der medialen Seite den Osteotomiespalt (siehe Abb. 26). Bei einem Tier der MSC-Gruppe überbrückte der periostale Kallus nur von einer Kortikalis ausgehend auf der lateralen Seite den Osteotomiespalt ohne Verbindung zum gegenüberliegenden periostalen Kallus oder der gegenüberliegenden Kortikalis zu erlangen (siehe Abb. 27).

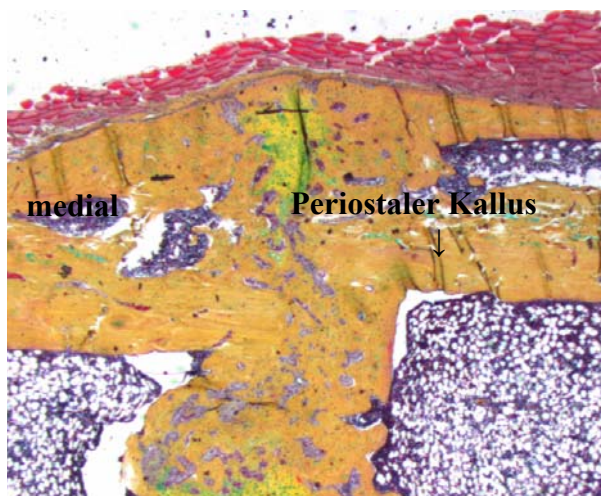


Abb. 26: Überbrückender periostaler Kallus eines Medium-Tieres in der Movat Pentachrom Färbung, Maßstabsbalken 500 µm

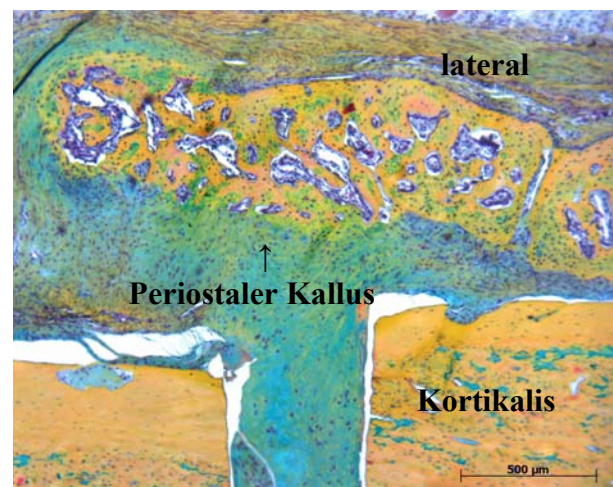


Abb. 27: Periostaler Kallus eines MSC-Tieres in der Movat Pentachrom Färbung, Maßstabsbalken 500 µm

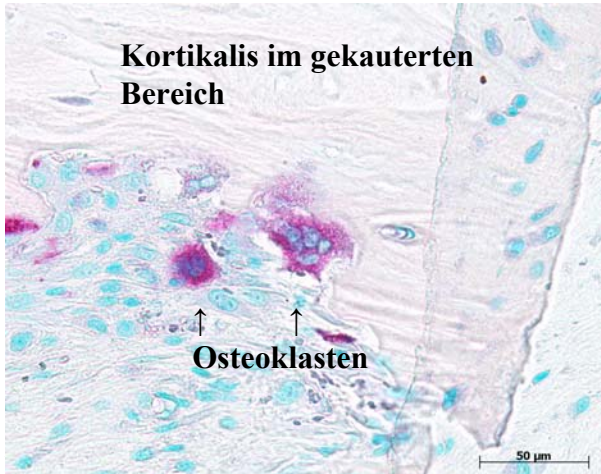
Bei vier Tieren der MSC-Gruppe und fünf Tieren der Medium-Gruppe bildete sich der periostale Kallus im gekauterten Bereich aus. Dies war bei beiden Gruppen jedoch oft nur an einer der vier Kortices zu beobachten. Wenn sich der periostale Kallus ausbildete, dann überwiegend auf der lateralen Seite. Bei keinem MSC-Tier bildete sich der Kallus an mehr als einer Kortikalis aus. Bei zwei Tieren der Medium-Gruppe bildete sich der periostale Kallus an zwei Kortices aus. Bei einem Tier an den Kortices auf der lateralen Seite und beim anderen Tier sowohl auf der lateralen und medialen Seite.

Bei beiden Gruppen erstreckte sich über dem knöchernen periostalen Kallus eine zellreiche Schicht dicker Bindegewebsfasern. Diese Fasern drangen bis in den deperiostierten Bereich vor und zogen als deutlich sichtbare Faserbündel über den Osteotomiespalt in den



deperiostierten Bereich der gegenüberliegenden Kortikales. Darunter erkannte man bei sechs Tieren der MSC-Gruppe und allen Tieren der Medium-Gruppen, zum teil auch nur auf einer Seite, eine Schicht mehrreihiger Zellen. Diese mehrreihige Zellschicht war nur in Bereichen aufzufinden in denen sich mineralisiertes Gewebe gebildet hatte.

Die periostalen Kortikalisränder zeigten im gekauterten Bereich bei beiden Gruppen starke Resorptionsprozesse (siehe Abb. 28). Bei Vergrößerung zeigten sich vielkernige Zellen auf der Oberfläche der Kortices im gekauterten Bereich, bei denen es sich um Osteoklasten handelte (siehe Abb. 29).



Bereich der Kortikalis in der TRAP Färbung, Maßstabsbalken 50 µm



der Kortikalis im gekauterten Bereich (MSC-Tier), TRAP Färbung, Maßstabsbalken 20 µm

Auch auf der endostalen Seite der Kortices zeigten sich Resorptionsprozesse, jedoch in einer etwas geringeren Ausprägung. Die Medium-Gruppe war geringradig weniger von diesen Resorptionsprozessen der Kortikalisenden betroffen als die MSC-Gruppe.

Die nicht gekauterten Kortikalisränder stellten sich zu einem großen Teil v. a. in der MSC - Gruppe glatt dar. Bei vier Präparaten der Medium-Gruppe stellte sich eine Inkontinuität der periostalen Kortikalisoberflächen in Form von Resorptionen und Knochenumbau dar. Die Kortikalis war teilweise völlig resorbiert und durch periostalen Kallus ersetzt worden (siehe Abb. 30).

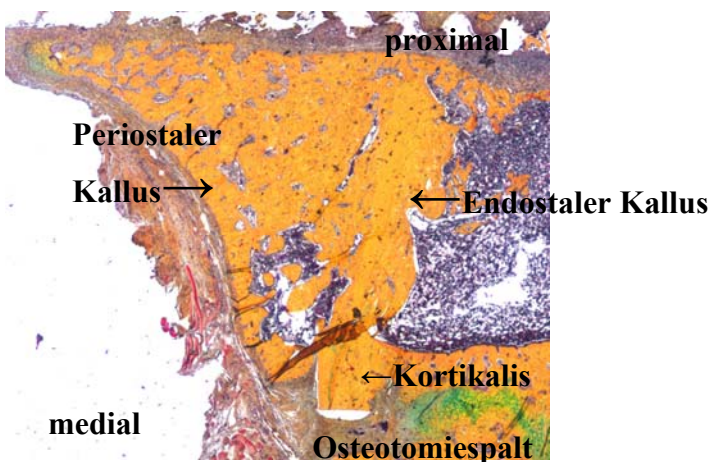


Abb. 30: Proximomediale Kortikalis mit periostalem und endostalem Kallus in der Movat Pentachrom Färbung, Maßstabsbalken 100 µm

Die endostale Kortikalisoberfläche zeigte bei den meisten Tieren der MSC-Gruppe eine wellenförmige bis ackerfurchenartige Gestalt. In der Medium-Gruppe zeigte sich bei vier Tieren ein ähnliches Bild wie auf der periostalen Kortikalisoberfläche. Die Kortikalis zeigte auch hier stellenweise starke Resorptionsvorgänge bis hin zu Kontinuitätsunterbrechungen und Ersatz durch Kallusgewebe (siehe Abb. 30&31). Das Kallusgewebe bestand aus Geflechtknochen, welcher im Gegensatz zur Kortikalis unstrukturiert erschien. Die Kontinuität des Kallusgewebes ist oft durch amorph erscheinende Areale unterbrochen. Desweiteren findet man Areale, die mit Knochenmark ausgefüllt sind.

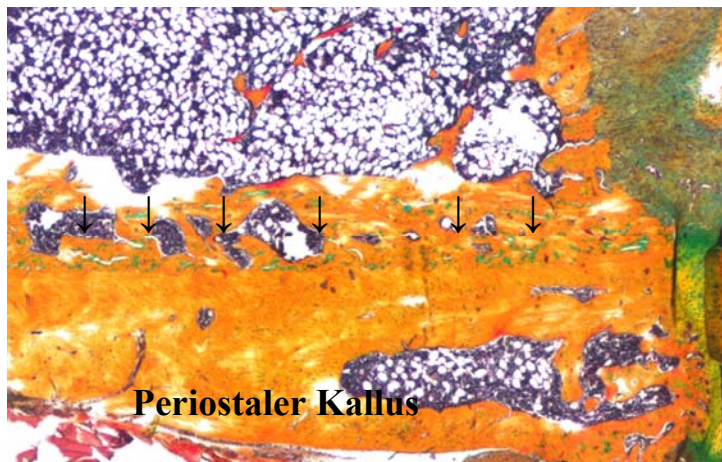


Abb.31: Starke Resorptionsvorgänge an der Kortikalis bis hin zu Kontinuitätsunterbrechungen und Ersatz durch Kallusgewebe (siehe Pfeile), Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$

Die Kortikalis beider Gruppen bestand zu einem großen Teil aus einem dichten, kompakt erscheinenden Knochengewebe mit Ausnahme von vier Tieren der Medium-Gruppe, bei denen v.a. die proximomediale Kortikalis von Resorptionsprozessen betroffen war. Die kortikale Kontinuität wurde durch amorph erscheinende Areale, die sich in der Movat Pentachrom-Färbung meist grün und in der Alcian Blau-Färbung leuchtend blau darstellten, unterbrochen (siehe Abb. 32&33). In der Kollagen-II Färbung färbten sich diese Bereiche positiv.

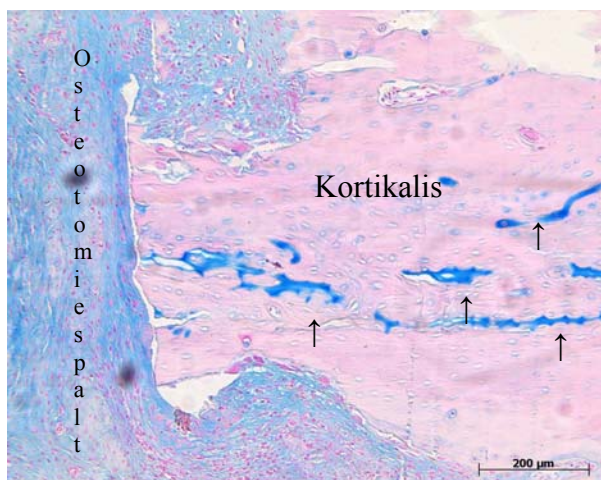


Abb. 32: Leuchtend blaue Bereiche in der Kortikalis in der Alcian Blau-Färbung Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$



Abb. 33: Amorph erscheinende Areale in der Kortikalis bei der Kollagen-II Färbung Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$



Häufigkeit und Verteilung dieser Bereiche waren in beiden Gruppen ähnlich. Sie traten jedoch wesentlich seltener im periostalen und endostalen Kallus auf als in der Kortikalis. Der kortikale Knochen um diese amorphen Bereiche erschien unstrukturierter und glich eher Geflechtknochen als dem üblich vorkommenden plexiformen Knochen. In und um diese Bereiche konnten selten Zellen ermittelt werden. Kamen doch welche vor, so hatten diese meist eine osteoblasten- bzw. eine osteozytenähnliche Erscheinung. Selten wurden in unmittelbarer Umgebung Gefäße oder Osteoklasten gesehen.

Der Osteotomiespalt erschien bei drei Tieren der Medium-Gruppe und einem Tier der MSC-Gruppe durch sich bildenden endostalen bzw. periostalen Kallus verkleinert. Durch Resorptionsprozesse an den Kortikalisenden erschien der Osteotomiespalt bei drei Tieren der Medium-Gruppe und zwei Tieren der MSC-Gruppe vergrößert. Die restlichen Tiere zeigten keine Veränderungen bezüglich der Osteotomiespaltweite. Der Osteotomiespalt war je nach Tier entweder nur mit Bindegewebe und Knorpel oder auch in Kombination mit Geflechtknochen gefüllt. Auch eine beginnende Vaskularisation ließ sich in beiden Gruppen erkennen. Bei zwei Tieren der Medium-Gruppe und einem Tier der MSC-Gruppe kam es zu einer Überbrückung des Osteotomiespalts durch den endostalen Kallus (siehe Abb. 34&35). Bei weiteren drei Tieren der Medium-Gruppe und zwei Tieren der MSC-Gruppe befand sich endostaler Kallus im Osteotomiespalt, jedoch ohne diesen zu überbrücken.

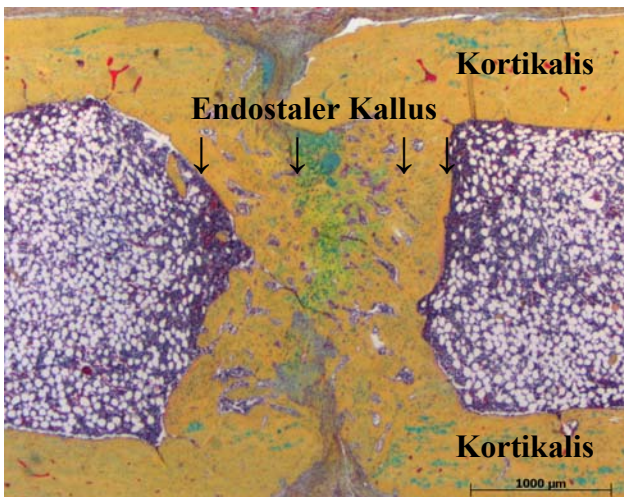


Abb. 34: Von endostal überbrückender Kallus MSC-Tier, Maßstabsbalken 1000 µm

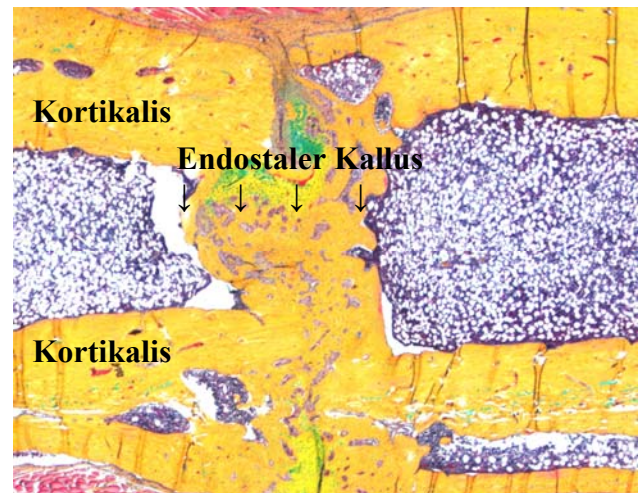


Abb. 35: Von endostal überbrückender Kallus Medium-Tier, Maßstabsbalken 1000 µm

## 5.3. Statistische Auswertung

### 5.3.1. Gewichte

Das Gewicht der MSC-Tiere betrug zum Zeitpunkt der ersten Operation, d. h. zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration aus der Tibia, im Durchschnitt 415g (SD=10,3). Die Medium-Tiere waren statistisch signifikant ( $p=0,039$ ) schwerer und gingen mit einem Durchschnittsgewicht von 423g (SD=16,8) in den Versuch ein (siehe Abb. I). Beide Gruppen zeigten im Versuchszeitraum eine signifikante Gewichtszunahme ( $p<0,0001$ ). In der zweifaktoriellen Varianzanalyse, bei der die Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe betrachtet wurde, konnte in den Verläufen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,668$ ).

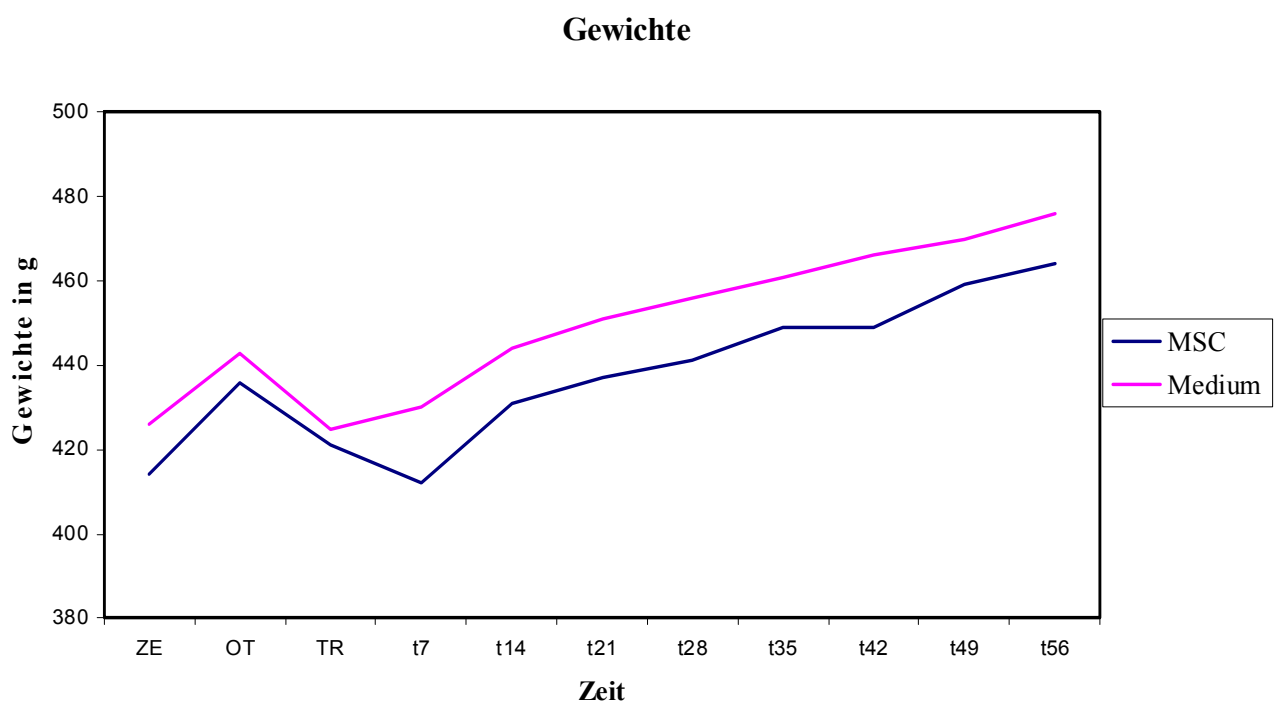


Abb. I: Darstellung der Gewichtsveränderung der Tiere beider Gruppen ab dem Zeitpunkt der Gewinnung der MSCs bis 56 Tage nach der Osteotomie.

ZE: Zeitpunkt der Entnahme der MSCs aus der Tibia.

OT: Zeitpunkt der Operation bei dem die Osteotomie des Os femoris der Ratte erfolgte.

TR: Zeitpunkt der Transplantation der MSCs in den Osteotomiespalt zwei Tage nach der Osteotomie.

t7,14,21,28,35,42,49,56: Zeitpunkte in Tagen nach der durchgeführten Osteotomie des Os femoris: 7,14,21,28,35,42,49,56 Tage post Osteotomie

### 5.3.2. Temperatur

Die Durchschnittstemperatur der Versuchstiere lag bei 36,2°C. Die MSC-Gruppe zeigte im Schnitt eine 0,3°C höhere Rektaltemperatur (36,4°C) als die Medium-Gruppe (36,1°C). In der zweifaktoriellen Varianzanalyse, bei der die Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe betrachtet wurde, konnte in den Verläufen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,335$ ). Zum Zeitpunkt der Zellentnahme und zwei Tage nach der OP zeigten die Tiere eine im Vergleich zum Durchschnitt höhere Temperatur (siehe Abb. II).

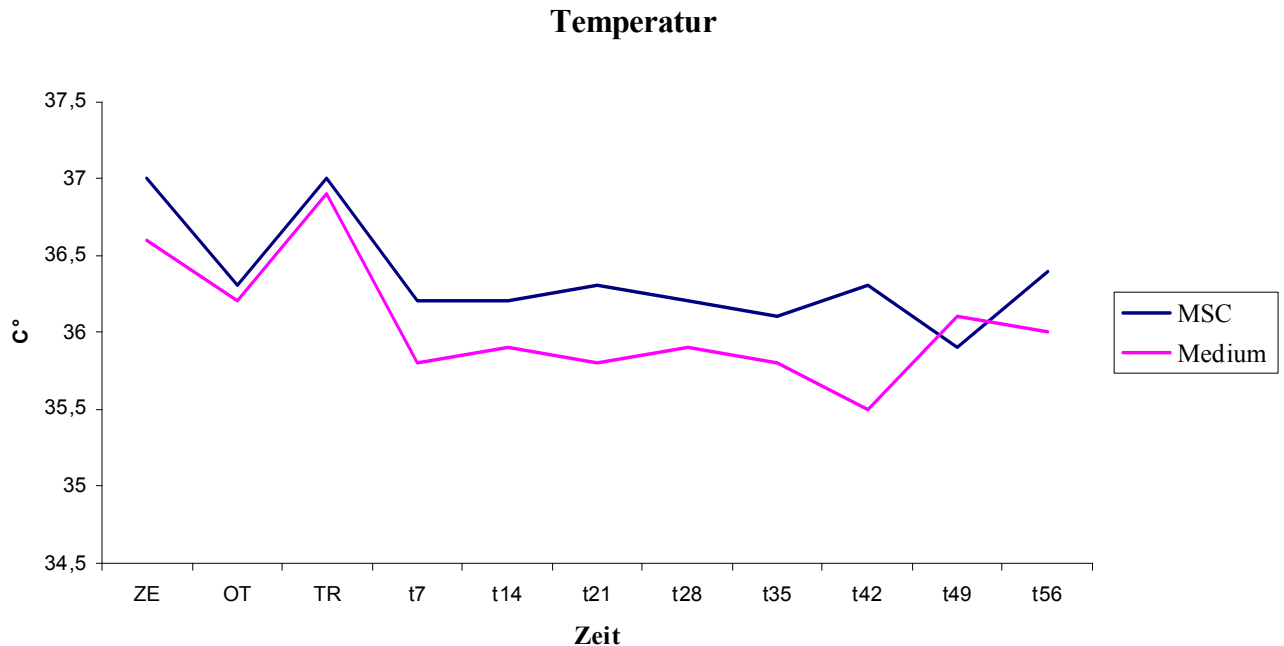


Abb.II: Darstellung der Temperaturen der Tiere beider Gruppen ab dem Zeitpunkt der Gewinnung der MSCs bis 56 Tage nach der Osteotomie.

ZE: Zeitpunkt der Entnahme der MSCs aus der Tibia.

OT: Zeitpunkt der Operation bei dem die Osteotomie des Os femoris der Ratte erfolgte.

TR: Zeitpunkt der Transplantation der MSCs in den Osteotomiespalt zwei Tage nach der Osteotomie.

t7,14,21,28,35,42,49,56: Zeitpunkte in Tagen nach der durchgeführten Osteotomie des Os femoris: 7,14,21,28,35,42,49,56 Tage post Osteotomie

### 5.3.3. Osteotomiespaltweite

Anhand der angefertigten Röntgenaufnahmen wurde post Osteotomie und nach 56 Tagen die Weite des Osteotomiespalt auf der lateralen und medialen Seite ausgemessen. Hierfür wurden die Röntgenbilder mit einem Lineal auf einem Lichttisch photographiert und im Computer digitalisiert. Anschließend wurde die Osteotomiespaltweite mit Hilfe des Lineals und dem Bearbeitungsprogramm Photoshop ausgemessen.

Zum Zeitpunkt der Osteotomie war der Osteotomiespalt bei den MSC-Tieren auf der lateralen Seite im Durchschnitt 0,41 cm (SD=0,18) und auf der medialen Seite 0,39 cm (SD=0,2) weit. Bei den Medium-Tieren war er im Durchschnitt auf der lateralen Seite 0,39 cm (SD=0,13) und auf der medialen Seite 0,28 cm (SD=0,13) weit.



Nach 56 Tagen zeigte sich bei beiden Gruppen eine signifikante Zunahme der Osteotomiespaltweite sowohl auf der lateralen Seite ( $p=0,013$ ) als auch auf der medialen Seite ( $p<0,001$ ). So erweiterte sich der Osteotomiespalt bei den MSC-Tieren im Durchschnitt auf der lateralen Seite um 0,07 cm und auf der medialen Seite um 0,22 cm. Bei den Medium-Tieren erweiterte er sich durchschnittlich auf der lateralen Seite um 0,1 cm und auf der medialen Seite um 0,23 cm. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Zunahme der Weite des Osteotomiespaltes liegt jedoch nicht vor (laterale Seite  $p=0,805$ ; mediale Seite  $p=0,125$ ) (siehe Abb. III). In der zweifaktoriellen Varianzanalyse, bei der die Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe betrachtet wurde, konnte in den Verläufen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (lat: $p=0,629$ , med: $p=0,861$ ).

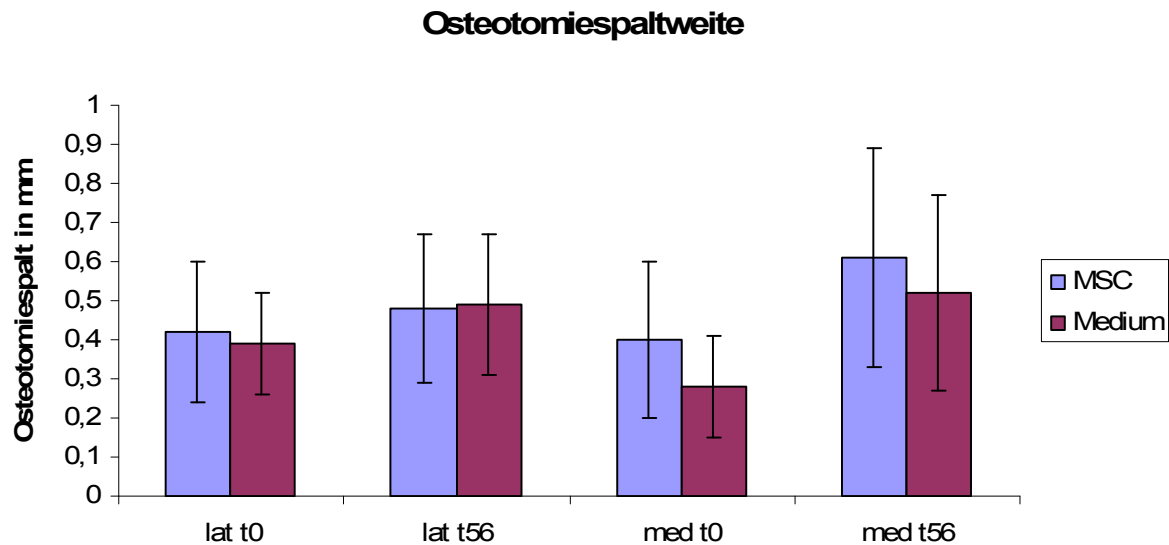


Abb.III: In diesem Säulendiagramm mit eingezeichneter Standardabweichung wird die Veränderung der Osteotomiespaltweite während des achtwöchigen Heilungsverlaufes dargestellt.

Die MSC-Gruppe (lila) ist die Gruppe die eine perkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  MSCs/150 $\mu$ l zwei Tage post Osteotomie in den Osteotomiespalt erhielt. Die Medium-Gruppe (bordeaux) ist die Gruppe die eine perkutane Injektion von 150 $\mu$ l Medium ( $\alpha$ -DMEM + 10%fetales Kälberserum + 1% Penicillin-Streptomycin) 2 Tage post Osteotomie in den Osteotomiespalt erhielt.

- lat t0: Ist der Zeitpunkt der Weite des Osteotomiespaltes auf der lateralen Seite am Tag der Osteotomie.
- lat t56: Ist der Zeitpunkt der Weite des Osteotomiespaltes auf der lateralen Seite 56 Tage post Osteotomie.
- med t0: Ist der Zeitpunkt der Weite des Osteotomiespaltes auf der medialen Seite am Tag der Osteotomie
- med t56: Ist der Zeitpunkt der Weite des Osteotomiespaltes auf der medialen Seite 56 Tage post Osteotomie

### 5.3.4. Gefäßdichte

Sowohl in der MSC-Gruppe als auch in der Medium-Gruppe fiel eine deutliche Streuung der Werte mit entsprechend hoher Standardabweichung auf.

Die Tiere der Medium-Gruppe zeigten eine signifikant größere Anzahl an Gefäßen ( $p=0,03$ ) als auch eine größere Dichte der Gefäße pro Quadratmillimeter Bindegewebsfläche ( $p=0,005$ ) als die Tiere der MSC-Gruppe.

Das Gleiche traf auch auf den Seitenvergleich zu. Sowohl auf der medialen (Anzahl  $p=0,004$ ; Dichte  $p=0,003$ ) als auch auf der lateralen Seite (Anzahl  $p=0,02$ ; Dichte  $p=0,003$ ) waren die Gefäße in der Medium-Gruppe in einer signifikant größeren Anzahl als auch Dichte vorhanden als bei der MSC-Gruppe.

Auf der endostalen Seite zeigten die Medium-Tiere eine größere Gefäßanzahl als auch Gefäßdichte verglichen mit den MSC-Tieren, jedoch war nur die Gefäßdichte signifikant größer (Anzahl  $p=0,21$ ; Dichte  $p=0,035$ ). Auch auf der periostalen Seite wiesen die Medium-Tiere sowohl eine größere Anzahl von Gefäßen als auch eine größere Gefäßdichte als die MSC-Tiere auf. Im Gegensatz zur endostalen Seite war der Unterschied sowohl bei der Gefäßanzahl als auch der Gefäßdichte signifikant (Anzahl  $p=0,003$ ; Dichte  $p=0,002$ ) (siehe Tab.1, Abb. 1.1.).

Im Osteotomiespalt war sowohl die Anzahl als auch die Dichte der Gefäße in der Medium-Gruppe größer als in der MSC-Gruppe, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Anzahl  $p=0,40$ ; Dichte  $p=0,09$ ) (siehe Tab. 1, Abb. 1.1).

Die Unterteilung der Gesamtgefäßdichte in kleine ( $< 40\mu$ ) und große ( $> 40\mu$ ) Gefäße machte deutlich, dass zum Achtwochenzeitpunkt in allen untersuchten Bereichen die Dichte kleiner Gefäße über dem der großen Gefäße lag. Die Anzahl kleiner Gefäße war wie die Gesamtgefäßzahl bei den Medium-Tieren signifikant größer als bei den MSC-Tieren ( $p=0,013$ ). Auch die Gefäßdichte der kleinen Gefäße war bei den Medium-Tieren signifikant größer ( $p=0,005$ ) (siehe Tab.1, Abb 1.3). Auch die großen Gefäße waren bei den Medium-Tieren sowohl in der Anzahl als auch in ihrer Dichte stärker vertreten, jedoch nicht signifikant (Anzahl  $p=0,40$ ; Dichte  $p=0,53$ ).

Eine signifikant höhere Gefäßdichte bestand auf der lateralen endostalen Seite ( $p=0,046$ ) der Medium-Tiere verglichen mit der der MSC-Tiere (siehe Tab. 1, Abb.1.2).

Parameter	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert [n/mm <sup>2</sup> ]
	Min-Max [n/mm <sup>2</sup> ]	Median [n/mm <sup>2</sup> ]	Min-Max [n/mm <sup>2</sup> ]	Median [n/mm <sup>2</sup> ]	
Gefäße gesamt /BGFL [n/mm <sup>2</sup> ]	23,4-114,8	51,8	4,7-30,7	29,1	0,005
Gefäße ges./peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	24,7-108,6	75,3	6,8-37,8	23,0	0,002
-Gefäße ges./lat.peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	25,3-192	86,1	7,6-42,8	26,5	0,003
-Gefäße ges./med.per. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	23,5-103	54,9	3,7-41,5	17,7	0,002
Kl. Gefäße/peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	22,6-104,3	68,7	6,1-35,6	21,3	0,002
-kl. Gefäße/lat.peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	23,7-184,1	77,9	6,7-39,3	23,3	0,003
-kl. Gefäße/med.peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	20,4-103,0	49,8	3,7-40,6	15,6	0,002
Große Gefäße/peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	0,5-9	2,9	0,7-3,5	1,4	0,06
-gr. Gefäße/lat.peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	0,8-13,0	2,9	0,7-5,7	1,6	0,25
-gr. Gefäße/med.peri. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	0-8	1,6	0-4,3	0	0,15
Gefäße ges./end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	20,7-128,6	41,9	0-33,6	24,3	0,04
-Gefäße ges./lat.end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	21-132,9	48,3	0-44,3	28,5	0,05
-Gefäße ges./med.end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	6,8-192,9	28,4	0-30,6	19,3	0,25
Kl. Gefäße/end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	17,9-128,6	36,9	0-28,4	19,5	0,01
-kl. Gefäße/lat.end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	15,8-127,9	41,3	0-35,6	22,1	0,02
-kl. Gefäße/med.end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	6,8-192,9	24,4	0-26	17,1	0,11
Große Gefäße/end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	0-6,8	3,2	0-11,3	3,3	0,83
-große Gefäße/lat.end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	0-9,6	4,1	0-17	3,1	0,96
-gr. Gefäße/med.end. BGFL. [n/mm <sup>2</sup> ]	0-10	3,2	0-8,3	2,6	0,91
Gefäße ges./BGFL. O-Spalt [n/mm <sup>2</sup> ]	11-88,9	36,6	3,5-42,1	17,9	0,09
-kl. Gefäße/BGFL. O-Spalt [n/mm <sup>2</sup> ]	8-88,9	32,4	3,1-38,1	14	0,11
-gr. Gefäße/BGFL. O-Spalt [n/mm <sup>2</sup> ]	0-6	3,2	0-10,1	0,6	0,34

Tab.1: Darstellung der Gefäßdichte [n/mm<sup>2</sup>] getrennt nach Lokalisation (periostaler und endostaler Kallus, Osteotomiespalt sowie lateral und medial) und nach Dichte der Gesamtzahl der Gefäße, der kleinen sowie großen Gefäße.

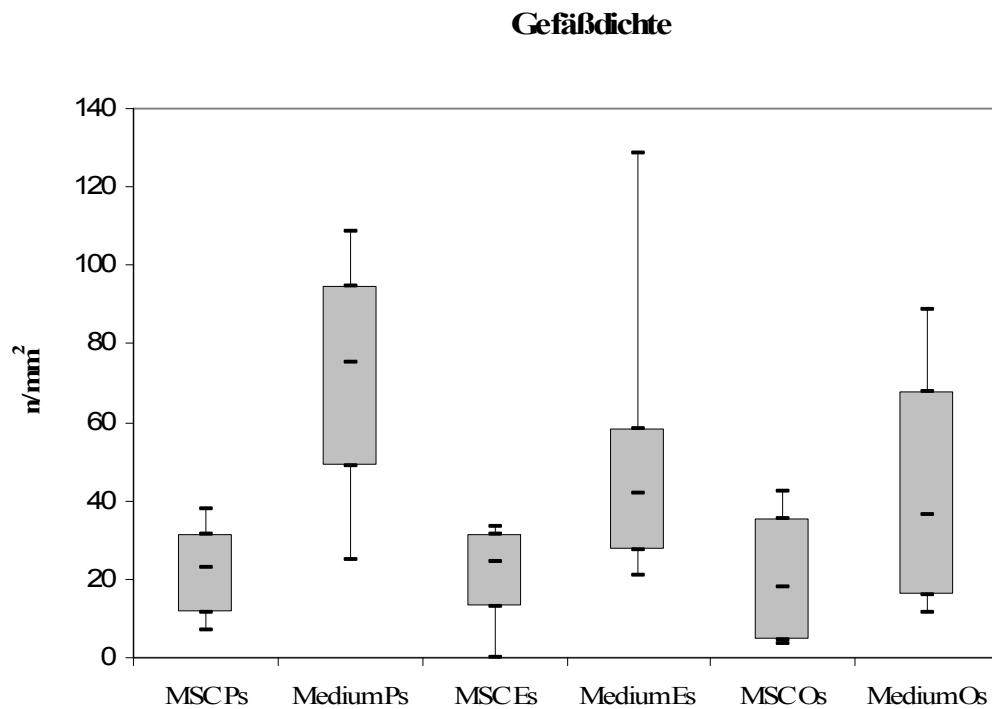


Abb.1.1: Darstellung der Gefäßdichte (kleine und große Gefäße)/mm<sup>2</sup> Bindegewebsfläche im periostalen (Ps) und endostalen (Es) Kallus sowie im Osteotomiespalt (Os) unterschieden nach Gruppe (MSC/Medium).

**MSC** Tiergruppe, die eine perkutane Injektion von 2 Millionen autologer mesenchymaler Stammzellen in 150µl Medium 2 Tage post Osteotomie in den Osteotomiespalt erhielt

**Medium** Tiergruppe, die eine perkutane Injektion von 150µl Medium (α-DMEM + 10% fetales Kälberserum + 1% Penicillin-Streptomycin) 2 Tage post Osteotomie in den Osteotomiespalt erhielt

### Gefäßdichte

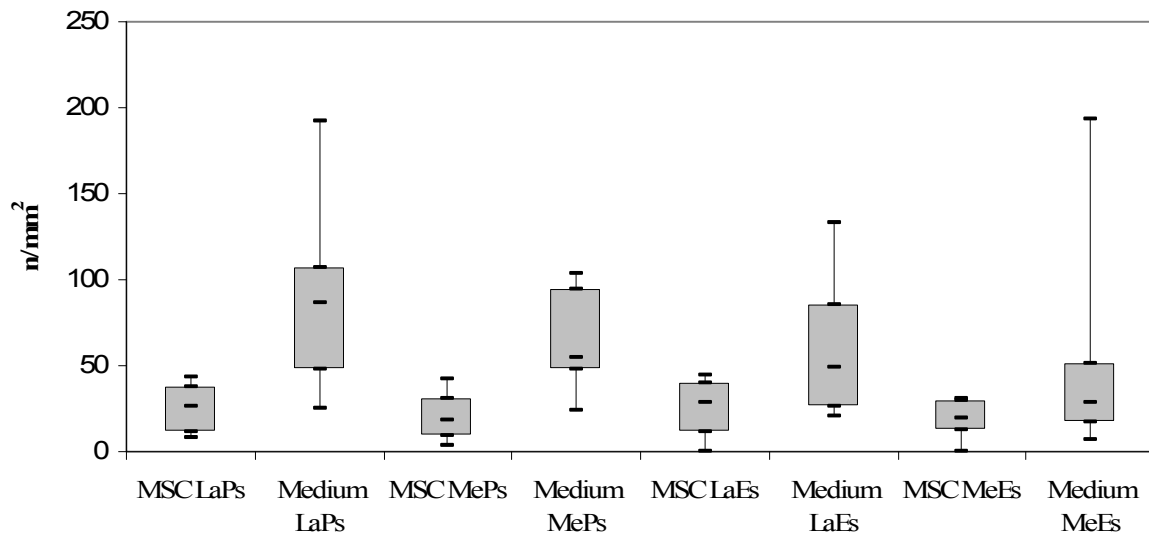


Abb.1.2: Darstellung der Gefäßdichte (kleine und große Gefäße)/mm<sup>2</sup> im lateralen periostalen (LaPs), medialen periostalen (MePs), lateralen endostalen (LaEs) und medialen endostalen (MeEs) Kallus unterschieden nach Gruppe.

### Dichte der kleinen Gefäße

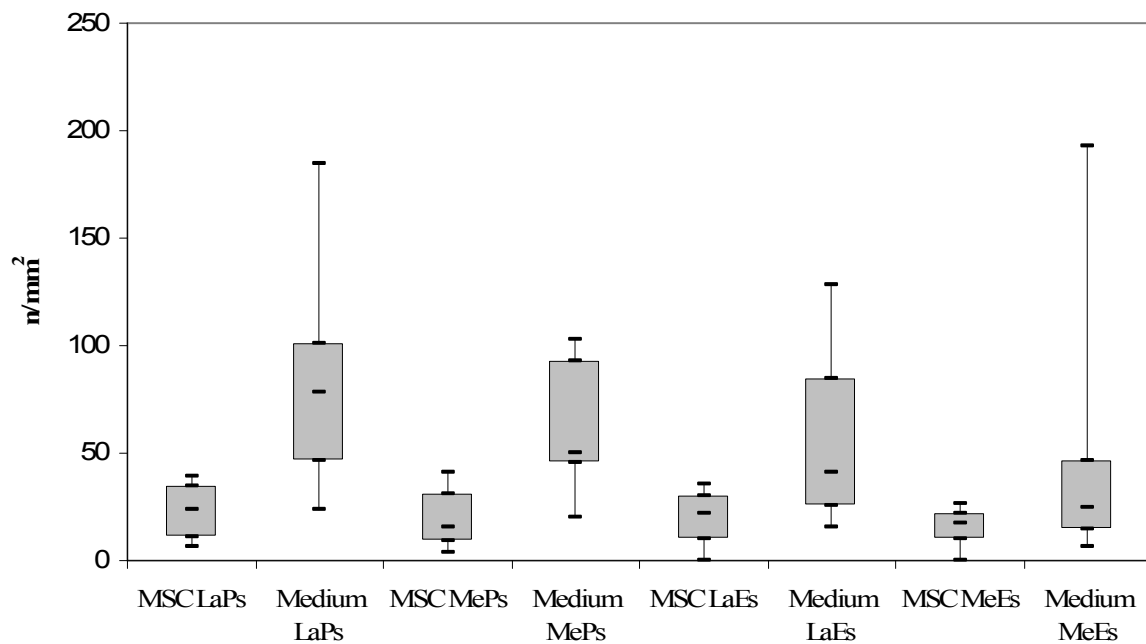


Abb.1.3: Darstellung der Dichte [n/mm<sup>2</sup>] kleiner Gefäße nach Lokalisation lateraler periostaler (LaPs), medialer periostaler (MePs), lateraler endostaler (LaEs) und medialer endostaler (MeEs) Kallus im Gruppenvergleich.

## 5.3.5. Dichte der Osteoklasten

Nach einer Heilungszeit von acht Wochen konnten in der histologischen Untersuchung in beiden Gruppen viele Osteoklasten im Kallusgewebe gezählt werden. Die Tiere der Medium-Gruppe wiesen eine ähnliche Anzahl an Osteoklasten pro Quadratmillimeter auf wie die Tiere der MSC-Gruppe. Signifikante Unterschiede ließen sich weder im periostalen ( $p=0,17$ ) und endostalen ( $p=0,21$ ) Kallus noch in der lateralen ( $p=0,42$ ) und medialen ( $p=0,42$ ) Kortikalis im Gruppenvergleich feststellen. Auch bei der Dichte der Osteoklasten zeigte sich das gleiche Bild (siehe Tab. 2, Abb. 2, Abb. 2.1). Auch bei den Osteoklasten fiel auf, dass sowohl in der MSC-Gruppe als auch in der Medium-Gruppe eine deutliche Streuung der Werte mit entsprechend hoher Standardabweichung vorlag (siehe Tab.2.1).

Parameter	Medium-Gruppe			MSC-Gruppe			p [OC/mm <sup>2</sup> ]	p [n]
	$\xi$ [n]	$x_{\text{Min}}-x_{\text{Max}}$ [n]	Median [OC/mm <sup>2</sup> ]	$\xi$ [n]	$x_{\text{Min}}-x_{\text{Max}}$ [n]	Median [OC/mm <sup>2</sup> ]		
Periostaler Kallus	20,0	4,7-46,7	3,6	14,1	1-38,3	3,4	0,75	0,17
-lat. peri. Kallus	11,6	3-38,7	3,7	9,8	1-31,3	4,1	1,0	0,75
-med. peri. Kallus	8,5	0-16,3	4,3	4,4	0-12	2,3	0,23	0,15
Endostaler Kallus	16,2	1-38	8,2	8,8	0-24,7	4,0	0,14	0,21
-lat. end. Kallus	7,9	0-16,7	6,7	4,3	0-12	4,0	0,10	0,15
-med. end. Kallus.	8,3	0,4-1,72	6,1	4,4	0,3-1,4	4,8	0,4	0,4
Laterale Kortikalis	3	0-7	0,7	1,8	0-5	0,5	0,63	0,42
Mediale Kortikalis	2,3	0-6	0,4	1,3	0-5	0,0	0,3	0,42
Osteotomiespalt	2,3	0-7,7	8,1	8	0-31	48,4	0,45	0,26

Tab.2: Osteoklastenzahl [n] und –dichte [OC/mm<sup>2</sup>] im periostalen und endostalen Kallus sowie in der Kortikalis. In keiner dieser Lokalisationen bestanden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Parameter	MSC	Medium
	STD DEV [OC/mm <sup>2</sup> ]	STD DEV [OC/mm <sup>2</sup> ]
Periostaler Kallus	5,2	4,4
-lat. peri. Kallus	9,4	5,9
-med. peri. Kallus	2,8	2,9
Endostaler Kallus	3,2	5,6
-lat. end. Kallus	2,9	4,9
-med. end. Kallus.	5,0	12,5
Laterale Kortikalis	0,5	1,3
Mediale Kortikalis	0,5	0,8
Osteotomiespalt	65,8	35,0

Tab.2.1: Standard Deviation (STD DEV) der Osteoklastendichte

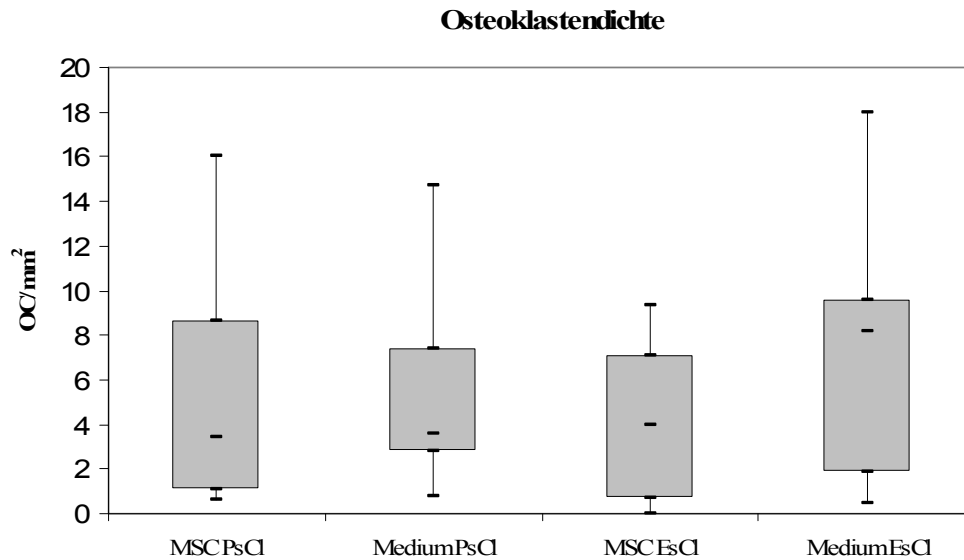


Abb.2: Osteoklastendichte im periostalen und endostalen Kallus.  
 PsCl: periostaler Kallus  
 EsCl: endostaler Kallus

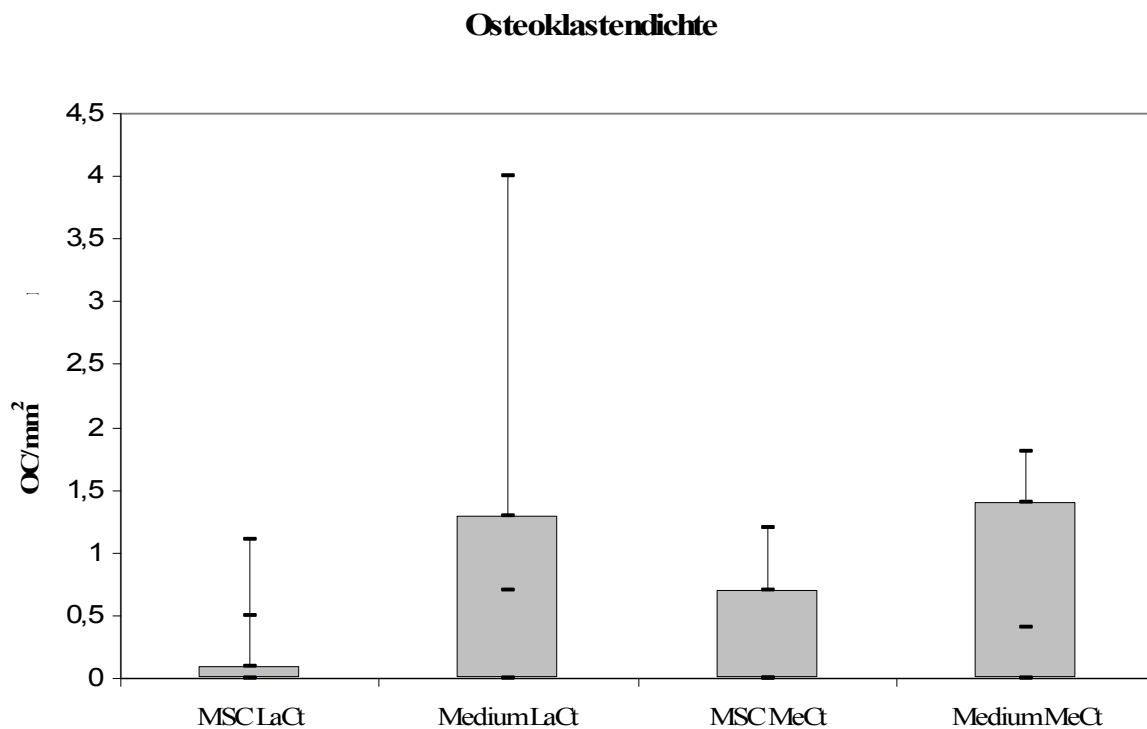


Abb.2.1: Osteoklastendichte in der lateralen und medialen Kortikalis unterschieden nach Gruppe.  
 LaCt: laterale Kortikalis  
 MeCt: mediale Kortikalis

### 5.3.6. Histomorphometrische Analyse

Die ROI und somit die Gesamtuntersuchungsfläche betrug bei der MSC-Gruppe im Durchschnitt  $27,1 \text{ mm}^2$  und bei der Medium-Gruppe  $31,0 \text{ mm}^2$ . Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der prozentualen Anteile mineralisierten Knochens ( $p=0,058$ ) und Knorpels ( $p=0,83$ ) in dieser ROI festgestellt werden, wobei die Tiere der MSC-Gruppe einen geringgradig größeren Anteil mineralisierten Knochens und Knorpel aufwiesen als die der Medium-Gruppe ( $p=0,06/p=0,83$ ). Der Anteil von Bindegewebe war bei den Tieren der MSC-Gruppe signifikant kleiner ( $p=0,03$ ) als bei der Medium-Gruppe (siehe Tab. 3, Abb. 3).

Parameter	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Gesamt-miner.Knochenfläche [%]	45,1	32,9-52,8	53,7	44-66,6	0,06
Gesamtbindegewebsfläche [%]	54,2	42,3-64,6	38,8	32,1-55,7	0,03
Gesamtknorpelfläche [%]	0,9	0,1-4,9	1,2	0,1-13,9	0,83

Tab.3: Darstellung des mineralisierten Knochens, des Binde- und Knorpelgewebes als prozentuale Anteile an der Gesamtfläche.

#### Darstellung der pozentualen Gewebeanteile

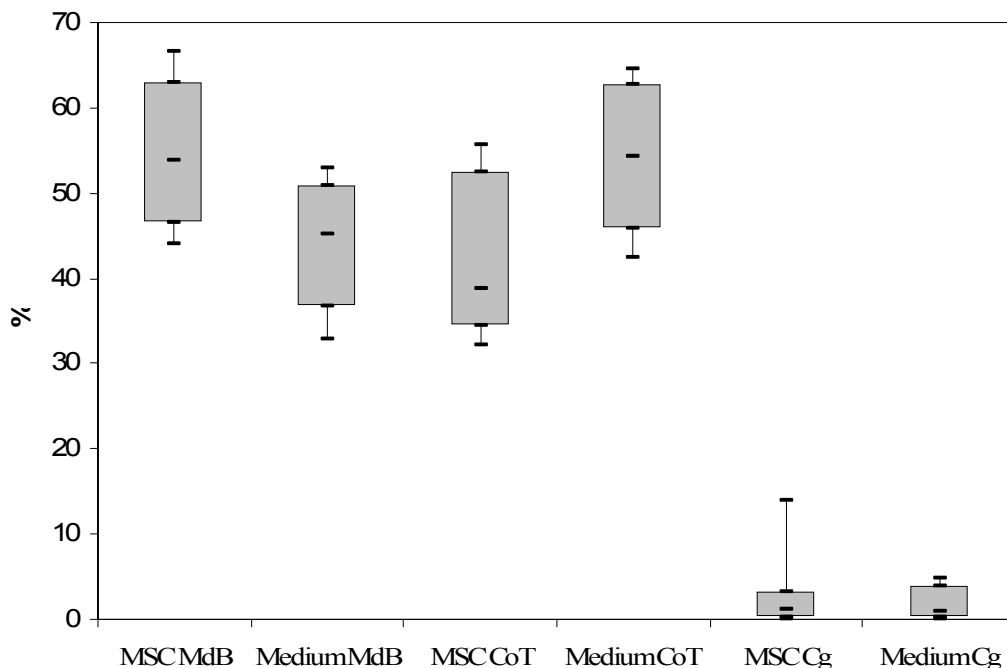


Abb.3: Darstellung des mineralisierten Knochens (MdB), des Binde- (CoT) und Knorpelgewebes (Cg) als prozentuale Anteile an der Gesamtfläche.

Der periostale Kallus war in der MSC-Gruppe etwas stärker ausgeprägt, der endostale Kallus zeigte dagegen eine etwas geringere Ausprägung als in der Medium-Gruppe. In beiden Fällen war der Unterschied nicht signifikant (siehe Tab. 3.1, Abb. 3.1).



Parameter	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Periostale Kallusfläche [%]	23,0	13,7-33,1	28,8	21,02-35,21	0,14
Endostale Kallusfläche [%]	41,23	30,6-56,3	26,3	16,2-50,6	0,09

Tab.3.1: Darstellung der prozentualen Fläche des periostalen und endostalen Kallus an der Gesamtfläche.

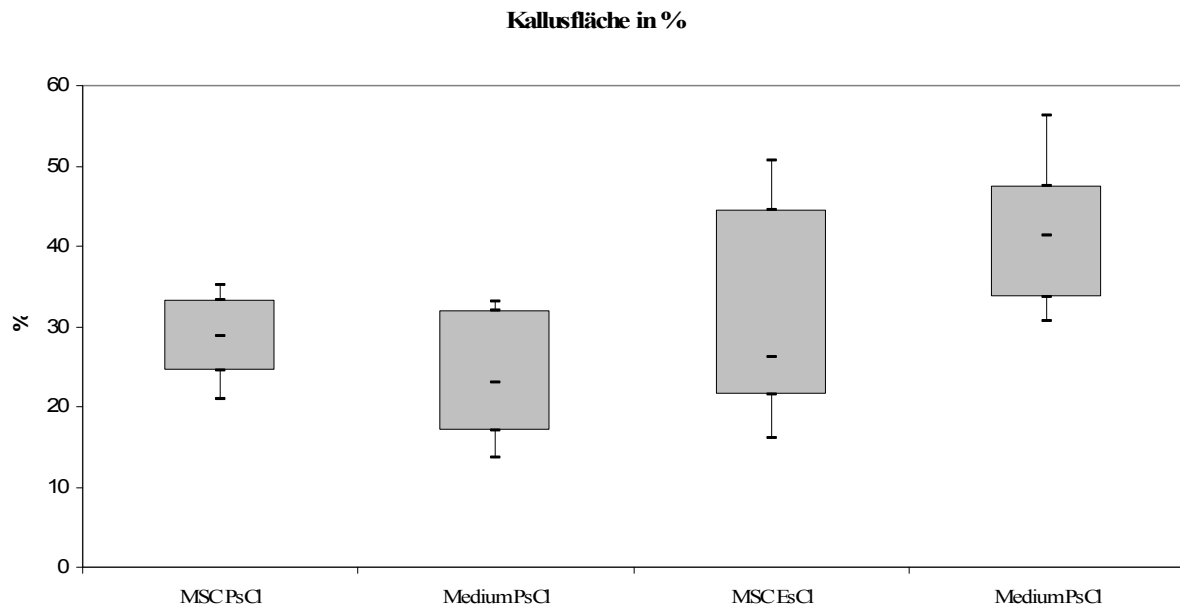


Abb.3.1: Darstellung der prozentualen Fläche des periostalen (PsCl) und endostalen (EsCl) Kallus an der Gesamtfläche.

Im Kallus zeigte die Medium-Gruppe ebenfalls einen größeren Anteil an Bindegewebe ( $p=0,09$ ) und einen geringeren Anteil an mineralisiertem Knochen ( $p=0,12$ ) und Knorpel ( $p=0,75$ ) als die MSC-Gruppe, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

Auch in der Aufteilung des Kallus in endostal und periostal und eine weitere in lateral und medial zeigten die gleichen Verteilungen (siehe Tab. 4&5, Abb. 4&5). Die MSC-Tiere zeigten eine größere prozentuale Knorpel- und Knochenfläche als die Medium-Tiere. Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch auch hier nicht, mit Ausnahme der Knorpelfläche im medialen periostalen Kallus ( $p=0,04$ ), die bei der MSC-Gruppe größer war.

Parameter in [%]	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Mineralisierte Knochenfläche	52,7	29,6-58,9	57,1	49,5-66,1	0,07
-lat. per. mineral. Knochenfläche	58,9	26,3-64,9	62,1	44-69,8	0,32
-med. per. mineral. Knochenfläche	43,5	34,6-56,8	43,4	17,3-61,6	0,6
Bindegewebsfläche	46,6	38,7-70,3	40,6	32,4-50	0,06
-lat. per. Bindegewebsfläche	39,3	33,6-73,7	35,6	29,3-55,3	0,34
-med. per. Bindegewebsfläche	55,8	38,8-65,4	44,9	35,7-811,7	0,25
Knorpelfläche	0,32	0-4,6	1,3	0,2-6,3	0,09
-lat. per. Knorpelfläche	0,6	0-3	0,9	0-2,74	0,83
-med. per. Knorpelfläche	0,2	0-7,2	1,9	0,3-21,9	0,04

Tab.4: Anteile des periostalen Kallus an der Gesamtfläche als relative Werte [%]. Unterschieden wird auch zwischen lateralem und medialem periostalen Kallus.

**Darstellung des periostalen Kallus in %**

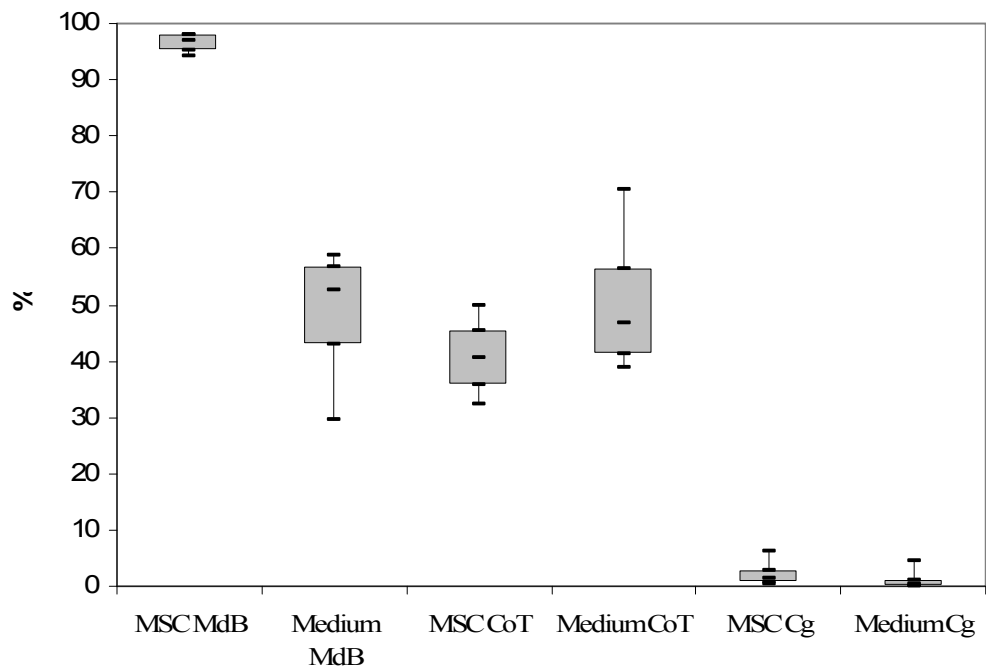


Abb.4: Anteile des periostalen Kallus als relative Werte [%] an der Gesamtfläche.

Parameter in [%]	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Mineralisierte Knochenfläche	21,7	10-41,1	29,0	16,4-35	0,21
-lat. end. mineral. Knochenfläche	19,2	10,3-50	28,4	12,2-37,2	0,34
-med. end. mineral. Knochenfläche	21,9	9,8-32	27,9	14,4-32,9	0,17
Bindegewebsfläche	77,1	57,9-85	67,8	54,5-81	0,25
-lat. end. Bindegewebsfläche	77,3	48,6-89,6	67,3	48,2-87,6	0,25
-med. end. Bindegewebsfläche	75,6	63,5-84,9	68,3	54,1-79,6	0,29
Knorpelfläche	1,7	0-10,2	4,0	0-23,9	0,64
-lat. end. Knorpelfläche	1,6	0-5,3	4,6	0-29,2	0,23
-med. end. Knorpelfläche	0,4	0-13,7	3,1	0-20,7	0,49

Tab.5: Anteile des endostalen Kallus als relative Werte [%] an der Gesamtfläche. Unterschieden wird auch zwischen lateralem und medialem endostalen Kallus.

### Darstellung des endostalen Kallus in %

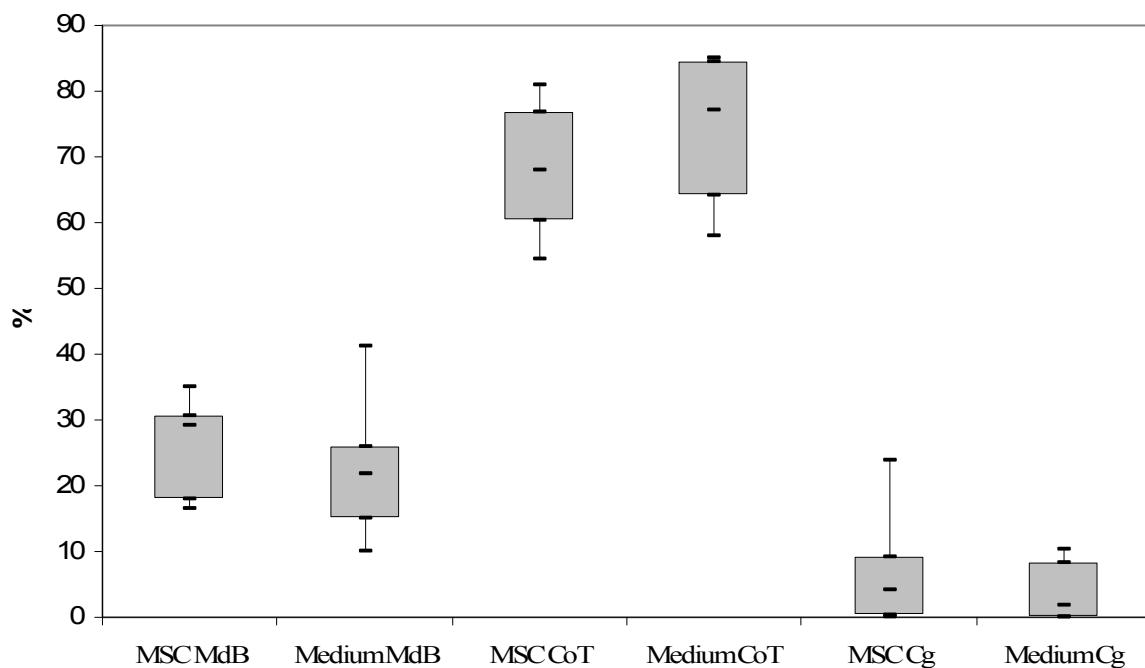


Abb.5: Anteile des endostalen Kallus als relative Werte [%] an der Gesamtfläche.

In der Kortikalis ist der Anteil mineralisierten Knochens bei den MSC-Tieren größer als bei den Medium-Tieren. Dieser Unterschied stellte sich aber als nicht signifikant heraus ( $p=0,14$ ). Beim Anteil des Knorpels und Bindegewebes in der Kortikalis zeigten dagegen die Medium-Tiere einen größeren Anteil als die Tiere der MSC-Gruppe, mit Ausnahme vom Knorpelanteil der lateralen Kortikalis, der bei beiden Gruppen gleich groß war.

Bei der Betrachtung von medialer und lateraler Kortikalis zeigte sich das gleiche Bild, allerdings war der Knorpelanteil in der medialen Kortikalis der Medium-Gruppe signifikant höher ( $p=0,03$ ) (siehe Tab.6, Abb. 6).

Parameter in [%]	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Mineralisierte Knochenfläche	95,0	91-98,3	96,8	94,1-98	0,14
-laterale mineral. Knochenfläche	96,3	89,4-98,2	97,0	93,0-98,3	0,53
-mediale mineral. Knochenfläche	94,0	91,9-98,4	97,3	94,8-98,2	0,06
Bindegewebsfläche	2,0	0,6-3,2	1,5	0,8-2,4	0,29
-laterale Bindegewebsfläche	1,9	0,6-3,6	1,4	0,5-3	0,29
-mediale Bindegewebsfläche	1,8	0,6-3,1	1,6	1-2,5	0,52
Knorpelfläche	2,8	1,1-5,9	1,7	0,9-3,5	0,17
-laterale Knorpelfläche	1,7	1,2-7	1,8	1-4,4	0,67
-mediale Knorpelfläche	3,4	0,9-6,9	1,4	0,7-3,1	0,03

Tab.6: Anteile der Kortikalis als relative Werte [%] an der Gesamtfläche. Unterschieden wird auch zwischen lateraler und medialer Kortikalis.

### Darstellung der Kortikalisanteile in %

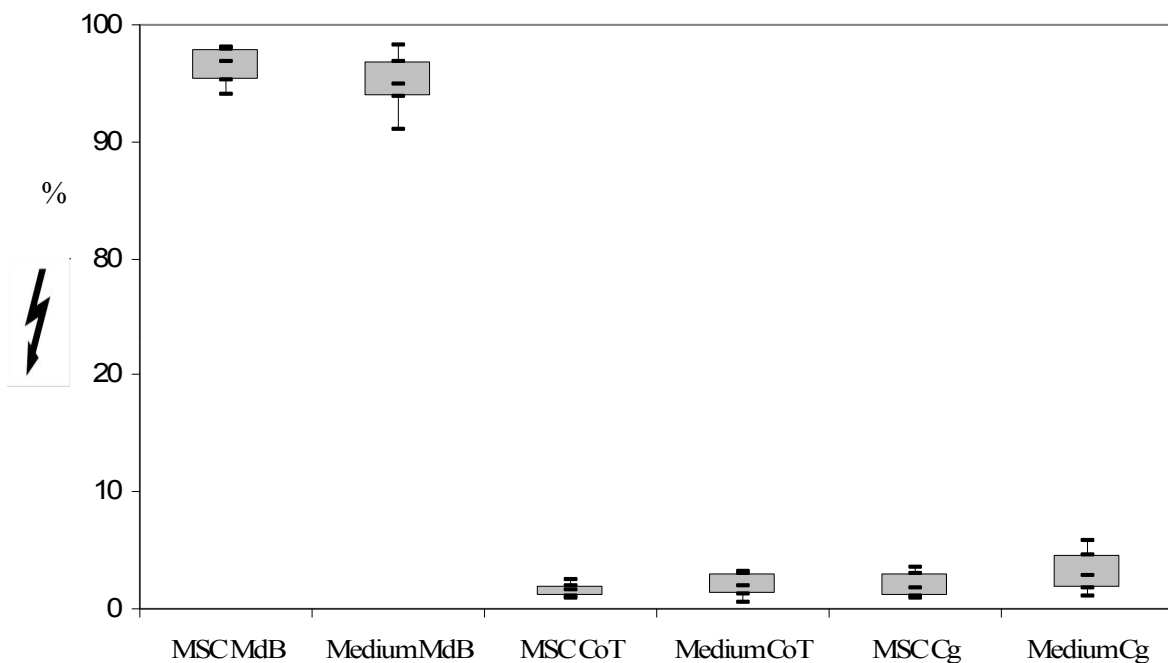


Abb.6: Anteile der Kortikalis als relative Werte [%] an der Gesamtfläche im Box and Whisker Plot.

Im Osteotomiespalte zeigten die Tiere beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Durchschnittlich zeigten die Tiere der Medium-Gruppe einen größeren Anteil Knorpel und mineralisierten Knochen und einen geringeren Anteil Bindegewebe als die Tiere der MSC-Gruppe, jedoch nicht signifikant. Im Seitenvergleich medial und lateral ergaben sich auf der lateralen Seite die gleichen Ergebnisse. Die Tiere der Medium-Gruppe zeigten auch hier einen größeren Anteil Knorpel und mineralisierten Knochen und einen geringeren Anteil Bindegewebe als die Tiere der MSC-Gruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Auf der medialen Seite zeigten die Tiere der Medium-Gruppe einen geringgradig höheren Anteil mineralisierten Knochen und Knorpel als die Tiere der MSC-Gruppe. Im Bezug auf die

Bindegewebsfläche bestand kein Unterschied zur lateralen Seite. Auch hier zeigten die Tiere der MSC-Gruppe einen größeren Bindegewebsanteil (siehe Tab.7, Abb. 7).

Parameter in [%]	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Mineralisierte Knochenfläche	4,0	0-36,6	6,1	3,1-19,9	0,6
-laterale mineral. Knochenfläche	1,5	0-42,8	5,3	2,6-16,0	0,34
-mediale mineral. Knochenfläche	6,5	0-38,3	5,6	2,4-23,9	0,92
Bindegewebsfläche	63,5	47,4-97,8	80,9	14-92,2	0,6
-laterale Bindegewebsfläche	73,4	56,8-99	89,8	19,8-95,6	0,4
-mediale Bindegewebsfläche	65,2	11,5-100	79,8	7,9-93,8	1
Knorpelfläche	9,9	0,1-43,9	7,3	0,4-82,8	0,92
-laterale Knorpelfläche	11,8	0-34,6	5,6	0-76,3	0,96
-mediale Knorpelfläche	1,7	0-83,7	7,4	0,5-89,7	0,34

Tab.7: Anteile der mineralisierten Knochenfläche, der Bindegewebs- und Knorpelfläche am Osteotomiespalt als relative Werte [%].

#### Darstellung der Gewebeanteile am Osteotomiespalt in %

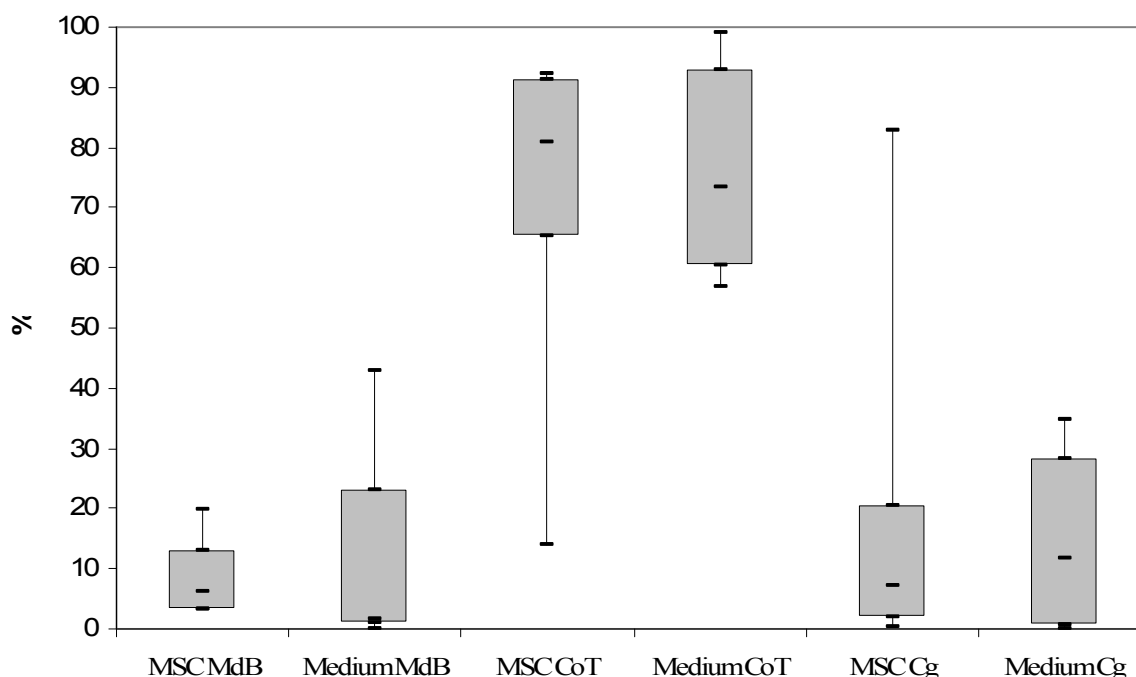


Abb.7: Anteile der mineralisierten Knochenfläche, der Bindegewebs- und Knorpelfläche am Osteotomiespalt als relative Werte [%].

#### 5.3.7. Prozentualer Anteil Kollagen-II-positiver Flächen

Kollagen Typ II ist ein Strukturprotein, das vornehmlich im Knorpel vorkommt und mit Hilfe der Immunhistochemie angefärbt werden kann.

Der Anteil der Kollagen-II-positiv gefärbten Fläche war in beiden Gruppen gleich. Auch bezogen auf den endostalen und periostalen Kallus zeigten die Flächenanteile von Kollagen-

II-positiven Arealen keinen Unterschied. Den größeren Anteil an Kollagen-II-positiv gefärbter Fläche wies in beiden Gruppen der endostale Kallus auf. So zeigte die Medium-Gruppe einen Anteil von 0,8 % und die MSC-Gruppe einen Anteil von 1,5 % Kollagen-II an der endostalen Kallusfläche, während in der periostalen Kallusfläche nur 0,6 % (Medium-Gruppe) bzw. 0,3 % (MSC-Gruppe) Kollagen-II-positiv waren (siehe Tab. 8, Abb. 8.1, 8.2). Im Osteotomiespalt war der Anteil Kollagen-II-positiver Areale am größten. So brachte es die Medium-Gruppe im Median auf einen Anteil von 7,2 %, die MSC-Gruppe im Median auf einen Anteil von 8,2 % Kollagen-II im Osteotomiespalt (siehe Tab. 8, Abb. 8.3). Im Gruppenvergleich zeigte sich kaum ein Unterschied am Anteil Kollagen-II-positiver Areale im periostalen Kallus ( $p=0,49$ ) als auch im endostalen Kallus ( $p=0,75$ ).

Parameter in [%]	Medium-Gruppe		MSC-Gruppe		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Periostaler Kallus	0,6	0,1-3,9	0,3	0-7,5	0,49
medialer periostaler Kallus	1,1	0-8,2	0,6	0-7,3	0,53
lateraler periostaler Kallus	0,2	0-1,8	0,2	0-9,5	0,59
Endostaler Kallus	0,8	0-8,8	1,5	0-7,6	0,75
medialer endostaler Kallus	1,1	0-15,5	1,2	0-8,2	0,83
lateraler endostaler Kallus	0,3	0-3,1	1,6	0-11,8	0,21
Osteotomiespalt	7,2	0,3-55,2	8,2	0-39,1	0,92

Tab.8: Anteil Kollagen-II-positiver Flächen im periostalen Kallus, endostalen Kallus und im Osteotomiespalt.

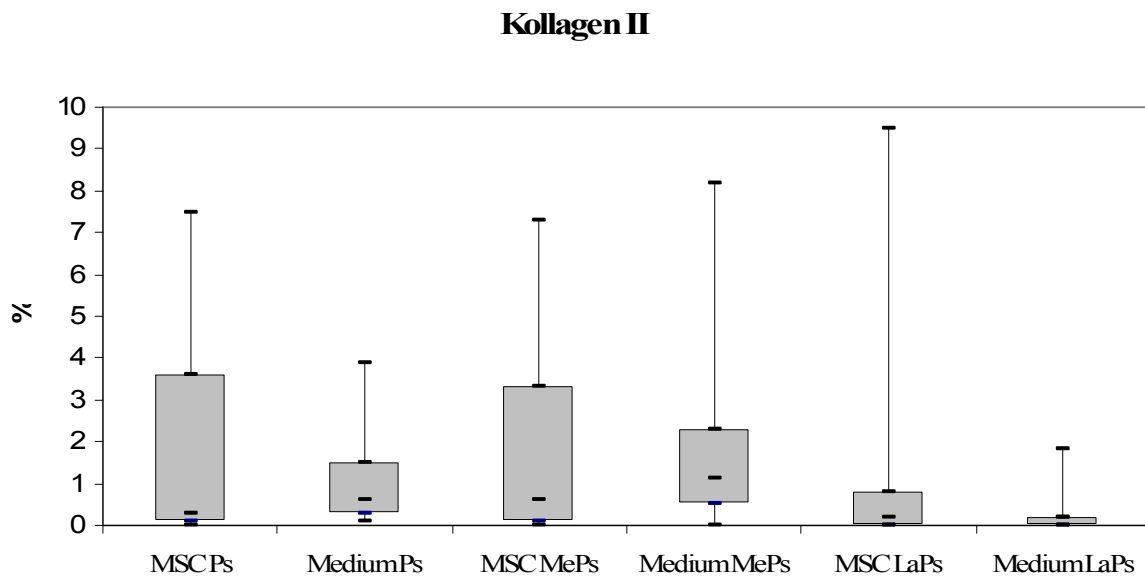


Abb 8.1: Anteil Kollagen-II-positiver Flächen in % im periostalen Kallus (Ps), im lateralen periostalen Kallus (LaPs) und medialen periostalen Kallus (MePs).

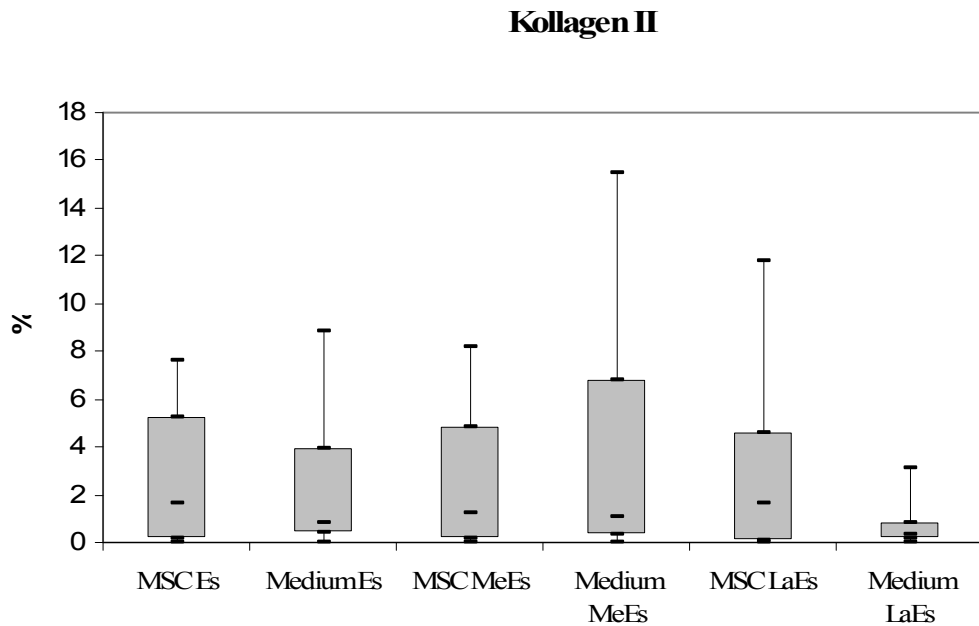


Abb.8.2: Anteil Kollagen-II-positiver Flächen in % im endostalen Kallus (Es), im lateralen endostalen Kallus (LaEs) und medialen endostalen Kallus (MeEs)

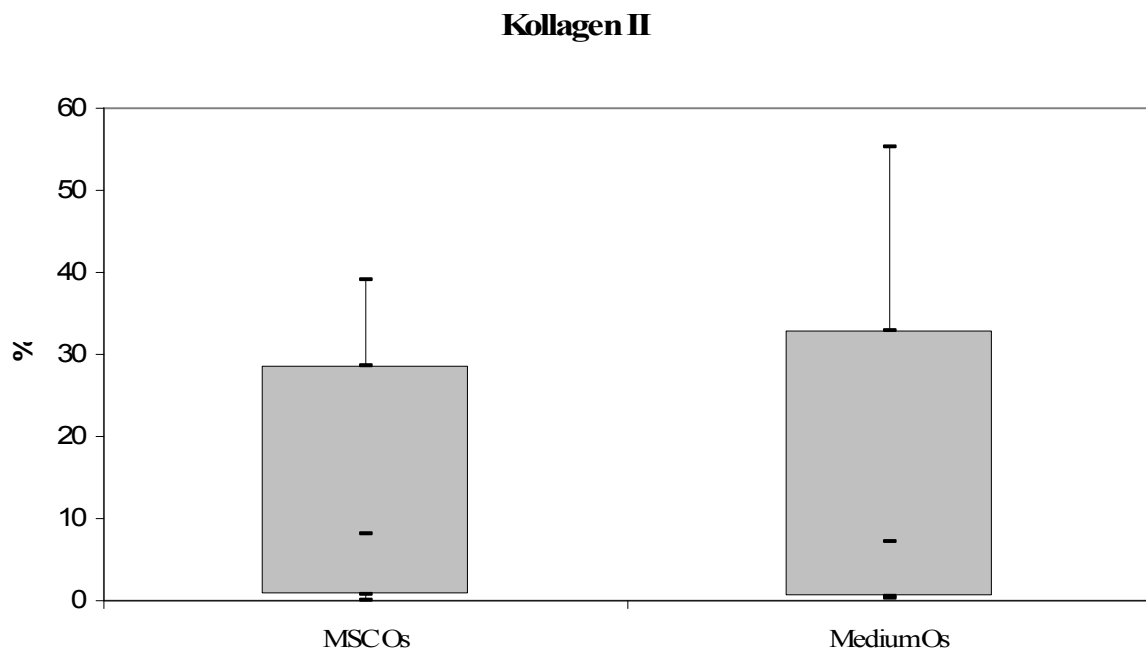


Abb.8.3: Anteil Kollagen-II-positiver Flächen in % im Osteotomiespalt (Os)

### 5.3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

#### *Radiologie*

Die Enden der Kortices der MSC-Gruppe waren weniger von Resorptionsprozessen betroffen als die der Medium-Gruppe. Das Vordringen des Kallus in den gekauterten Bereich ließ sich bei der MSC-Gruppe öfter beobachten als bei der Medium-Gruppe. Eine Überbrückung des



Osteotomiespalt durch den periostalen Kallus zeigte sich nur bei einem Tier in beiden Gruppen.

### *Deskriptive Histologie*

Der periostale Kallus endete bei der Mehrzahl der Tiere im gekauterten Bereich. Nur bei wenigen Tieren in beiden Gruppen überbrückte der periostale Kallus den Osteotomiespalt. Die periostalen Kortikalistränder zeigten im gekauterten Bereich bei beiden Gruppen starke Resorptionsprozesse. Der Osteotomiespalt war je nach Tier entweder nur mit Bindegewebe und Knorpel oder auch in Kombination mit Geflechtknochen gefüllt.

Vereinzelte zeigte sich in beiden Gruppen eine Überbrückung des Osteotomiespalts durch den endostalen Kallus.

### *Gewichte und Temperatur*

Beide Gruppen zeigten im Versuchszeitraum eine signifikante Gewichtszunahme.

Zum Zeitpunkt der Zellentnahme und zwei Tage nach der OP zeigten die Tiere eine im Vergleich zum Durchschnitt höhere Temperatur.

### *Osteotomiespaltweite*

Nach 56 Tagen zeigte sich bei beiden Gruppen eine signifikante Zunahme der Osteotomiespaltweite sowohl auf der lateralen Seite als auch auf der medialen Seite.

### *Gefäßdichte*

Die Tiere der Medium-Gruppe zeigten eine signifikant größere Anzahl an Gefäßen als auch eine größere Dichte der Gefäße pro Quadratmillimeter Bindegewebsfläche als die Tiere der MSC-Gruppe.

Im Osteotomiespalt war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen sowohl in der Anzahl als auch in der Dichte der Gefäße nicht signifikant.

### *Dichte der Osteoklasten*

Die Tiere der Medium-Gruppe wiesen eine ähnliche Anzahl und Dichte an Osteoklasten pro Quadratmillimeter auf wie die Tiere der MSC-Gruppe.

### *Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse*

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der prozentualen Anteile mineralisierten Knochens und Knorpels in der ROI festgestellt werden.

Der Anteil von Bindegewebe war bei den Tieren der MSC-Gruppe signifikant kleiner als bei den Tieren der Medium-Gruppe.

Die prozentualen Flächen des periostalen und endostalen Kallus an der Gesamtfläche zeigten im Gruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied.

Auch die Anteile an Bindegewebe, mineralisiertem Knochen und Knorpel unterschieden sich im Gruppenvergleich sowohl im Kallus, in der Kortikalis als auch im Osteotomiespalt nicht signifikant.

Der Anteil der Kollagen-II-positiv gefärbten Fläche war in beiden Gruppen gleich. Auch bezogen auf den endostalen und periostalen Kallus zeigten die Flächenanteile von Kollagen-II-positiven Arealen keinen erwähnenswerten Unterschied.

## 6. Diskussion

### 6.1. Tiermodell

Als Kleinterversuchsmodell werden Laborratten häufig zur Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen in der Medizin herangezogen. Bedacht werden sollte, dass es zwischen allen Spezies Unterschiede in der Knochenanatomie gibt und somit tierexperimentelle Studien nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar sind [111]. Jedoch helfen uns die histologischen Untersuchungen des Heilungsverlaufes im Tiermodell die Prozesse besser zu verstehen [32, 42]. In diese Studie fiel die Wahl auf Ratten der Rasse Sprague Dawley in einem Alter von 16 bis 20 Wochen mit einem Gewicht von 410 bis 460g. Für Versuche am Knochen stellt die Ratte als Versuchstier aufgrund der limitierenden anatomischen Größenverhältnisse häufig eine kritische untere Grenze unter den Kleintieren dar [109]. Aerssens verglich in seiner Studie den Aufbau, die Dichte und die Qualität der Knochen von Menschen, Hunden, Schweinen, Kühen, Schafen, Hühnern und Ratten. Den größten Unterschied zum menschlichen Knochen zeigte hierbei die Ratte, den kleinsten Unterschied der Hund [112]. Wir haben uns in dieser Studie sowohl aus finanziellen Gründen als auch unter der Berücksichtigung des Tierschutzes gegen den Hund und für die Ratte entschieden. Sprague Dawley Ratten sind in ausreichender Zahl über kommerzielle Anbieter erhältlich und benötigen aufgrund ihrer Größe wenig Platz. Sie sind also in der Unterhaltung, inklusive Fütterung kostengünstig [111].

Sowohl in der Histologie als auch im Frakturheilungsverlauf wurden innerhalb einer Rasse zwischen männlichen und weiblichen Tieren keine Unterschiede festgestellt [113].

Eine Besonderheit der Ratten ist, dass ihr Knochenwachstum ein Leben lang stattfindet, mit zunehmendem Alter verlangsamt sich der Wachstumsprozess stetig. Auch die Knochenheilung verläuft bei juvenilen um ein Vielfaches schneller als bei adulten Tieren [114]. Diese Tierspezies findet häufig Verwendung in Studien, die sich mit der Frakturheilung beschäftigen. Es existiert bereits eine Vielzahl von Daten über die physiologische und pathologische Frakturheilung, als auch über die Immunhistologie bei der Ratte. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist somit gegeben.

### 6.2. Diskussion von Material und Methoden

#### 6.2.1. Osteotomie

Für die Untersuchungen wurde eine standardisierte Osteotomie des Os femoris vorgenommen. Hierfür wurde das Os femoris unter Schonung des Periosts lateralseitig freipräpariert. Der resultierende Weichteilschaden stellte sich als nicht unerheblich dar. Anschließend erfolgte, entgegen des üblichen klinischen Vorgehens, bedingt durch eine bessere Standardisierung, die Montage des externen Fixateurs vor der Osteotomie. Eine Osteotomie unterscheidet sich in mehreren Punkten von einer Fraktur. Zum einen wird die Knochenoberfläche im Osteotomiespalt durch die Trennscheibe glatt geschliffen. Die dadurch entstehende hohe Temperatur kann zu Nekrose der angrenzenden Strukturen im Osteotomiebereich führen. Auch die Bruchlinie ist in einem Frakturspalt eher unregelmäßig und die Oberflächenstruktur ist rau. Letztendlich ist die Osteotomie aber einer Fraktur vorzuziehen, da sie besser standardisierbar ist.

### 6.2.2. Fixateur externe

Die Stabilisierung der Osteotomie am Os femoris der Ratte erfolgte mittels eines unilateralen externen Fixateurs. Eine exakte Reposition der Osteotomieenden wurde durch das Anlegen des Fixateurs vor der Osteotomie gewährleistet.

Bei der externen skelettalen Fixierung mittels eines externen Fixateurs wird durch mehrere perkutane, transkortikale Pins proximal und distal des Osteotomiespaltes eine Stabilisierung erreicht. Dieses System bietet eine skelettale Fixierung ohne die Anwesenheit von Fremdmaterial im Osteotomiebereich.

Der klinische Erfolg der externen Fixierung hängt von der Fixateursteifigkeit ab, welche im Zusammenhang mit der räumlichen Anordnung der Pins, ihrer Ausrichtung und ihres Durchmessers steht. Auch der Abstand der Pins zwischen Knochen und Fixateurklemmen, der Abstand zwischen den Fixateurklemmen, die Länge der Querbalken, das Design und der Aufbau des Rahmens tragen eine entscheidende Rolle zur Steifigkeit des Fixateur externe bei [115]. Titanpins führen zu einer signifikant niedrigeren axialen Steifigkeit verglichen mit rostfreiem Stahl bei gleichem Schraubendesign. Das Material des Fixateurkörpers und dessen Länge haben dagegen einen geringeren Einfluss auf die Fixateursteifigkeit [116].

Buray und Mitarbeiter studierten die optimalen Bedingungen des unilateralen Fixateurs. Sie schlussfolgerten, dass die Querbalkenlänge minimiert werden sollte, die Fixateurklemmen so nah wie möglich am Knochen angebracht werden müssen und dass die Stabilität mit drei Pins höher ist als mit zwei Pins, welche mit maximalem Raum zwischen den Fragmenten anzubringen sind [117]. Auch die chirurgische Technik hat grundlegenden Einfluss auf die Stabilität des Fixateurs und somit letztendlich auch auf die Bewegung im Frakturbereich [115].

In der vorliegenden Studie konnte eine hohe Stabilität des Fixateurs durch das Anbringen von vier Pins (Kirschner-Drähte) aus rostfreiem Stahl, mit maximalem Abstand zwischen den Osteotomieenden sowie einer minimierten Querbalkenlänge erreicht werden. Auch die hochqualifizierten Fähigkeiten des Operateurs, welcher alle Tiere standardisiert osteotomiert trugen dazu bei, dass bei allen Tieren eine hohe Fixateursteifigkeit erreicht wurde.

Nach einer Standzeit von 56 Tagen zeigte sich in der vorliegenden Studie eine vermehrte Kallusbildung im Bereich der Pins, die entweder durch eine stärkere Bildung oder einen verminderten Abbau an dieser Stelle zu erklären sind. Ursache kann eine erhöhte mechanische Belastung in diesen Bereichen sein.

### 6.2.3. Pseudarthrose Modell

Das verwendete Pseudarthrosemodell basiert auf den Modellen nach Hietaniemi und Kokubo [118, 119].

Es ist schwierig zu unterscheiden, ob eine atrophe Pseudarthrose infolge von mechanischen oder biologischen Gegebenheiten entstanden ist [120].

Die atrophe Pseudarthrose wurde durch eine Deperiostierung während der Osteotomie geschaffen. Dies gelingt durch eine Kauterisierung des Periosts auf einer Länge von ca. 2 mm ausgehend von den Osteotomieenden. Nach Yoo et al. wird eine deperiostierte Fraktur selbst ohne Defektzone nicht heilen, sondern in einer atrophen Pseudarthrose münden [39]. Hietaniemi et al. konnten in ihrer Studie darlegen, dass eine Kauterisierung des Periosts zu einer atrophen Pseudarthrose führt [119]. Zu bedenken ist, dass durch die thermische Destruktion des Periosts und die bei der Osteotomie entstandene Wärme Knochennekrosen entstehen können.

Desweiteren wurden durch die Entfernung des Knochenmarks mit anschließender Spülung des Markraumes die Kambiumzellen des Periosts sowie die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks zerstört, die der Knochenheilung dienen.

Auch der Fixateur externe trägt seinen Teil dazu bei, da er durch seine hohe Steifigkeit die Knochenheilung nur mangelhaft stimuliert [60]. In der Studie von Claes et al. konnte gezeigt werden, dass eine geringe interfragmentäre Bewegung zu einer geringeren Kallusbildung führt. Die kleinste initiale interfragmentäre Bewegung, die technisch mit einem Fixateur externe möglich ist, liegt bei 7%. Bei diesem Level konnte eine signifikante Verringerung der Kallusproliferation und der Bruchfestigkeit im Vergleich zu einer interfragmentären Bewegung von 36% ermittelt werden [121, 122].

In den Röntgenkontrollen zeigten sich auch nach 56 Tagen kaum Kallusbildung und kaum Anhaltspunkte für eine knöcherne Überbrückung. Dagegen kommt es bei der Verwendung von Kirschner-Drähten als eine Form der intramedullären Stabilisierung zu relativ starken interfragmentären Bewegungen, welche wiederum zu einer hypertrophen Kallusbildung führen [118, 119]. Das in dieser Studie verwendete Modell induzierte eine atrophe Pseudarthrose, ohne ein critical size defect zu sein. Das Modell ist reproduzierbar, biomechanisch standardisiert und die Interaktionen zwischen Implantat und Heilungszone sind minimal [123].

Die meisten verwendeten atrophischen Pseudarthrose Tiermodelle basieren auf einem CSD [9, 124]. Diesen Modellen fehlt jedoch, zumindest initial, die biologisch reaktionslose Situation, wie sie in einer atrophischen Pseudarthrose vorliegt.

#### 6.2.4. Zellen, Zellkultur und Transplantation

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark isoliert. Ihre Aufbereitung wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt [86].

Die autologe Applikation von mesenchymalen Stammzellen repräsentiert, aufgrund der Möglichkeit ihrer Isolierung und Expandierung aus Knochenmarkspiraten und ihrer Differenzierung in verschiedene mesenchymale Gewebe, eine attraktive Quelle für das bone tissue engineering [84, 125].

Trotz des enormen Potentials der MSCs für die Verwendung im bone tissue engineering existieren limitierende Faktoren, welche ihre Entwicklung retardieren. So sind von den Knochenmarkszellen nur etwa 0,01 bis 0,03% mesenchymale Stammzellen [87, 88]. Diese relativ niedrige Anzahl von MSCs im Knochenmark zeigt die Notwendigkeit für eine intensive Expandierung, um eine substanzielle Zellzahl für die therapeutische Applikation zu erhalten. Jedoch ist davon auszugehen, dass eine exzessive *ex vivo* Expansion der MSCs mit konventionellen Kultivierungsverfahren zu einem signifikanten Abfall des Differenzierungspotentials führt [126, 127]. Desweiteren wurde berichtet, dass mit steigendem Alter des Organismus und dem Auftreten systemischer Erkrankungen mit einer stark sinkenden MSC-Zahl zu rechnen ist [128, 129], was das Problem des Differenzierungspotentialverlustes bei der Expandierung potenziert.

Die Expandierung auf 2 Millionen zu transplantierende Zellen wurde frei gewählt und könnte verändert werden. Kallai et al. verwendeten ebenfalls eine Anzahl von 2 Millionen genetisch veränderter MSCs in ihrem Versuch und konnten damit einen Erfolg erzielen [130]. In einer anderen Studie in der mesenchymale Stammzellschichttransplantate verwendet wurden, reichte eine Anzahl von  $1 \times 10^5$  aus [107].

Die Applikation der MSCs erfolgte in dieser Studie ohne Sichtkontrolle mit einer Kanüle in den Osteotomiespalt, was eine optimale Platzierung nicht 100%ig garantiert. Die Verwendung eines Zellschichttransplantates wie in der Studie von Nakamura et al. hätte eine optimalere

Platzierung der MSCs gewährleistet [107]. Zum Zeitpunkt der Versuchsplanung ist uns diese Möglichkeit leider nicht bekannt gewesen, sonst wäre sie wahrscheinlich zum Einsatz gekommen. Eine weitere Möglichkeit der gezielten Applikation der MSCs wäre eine Injektion unter radiologischer Kontrolle gewesen. Unter Durchleuchtung wäre eine exakte Positionierung der Kanüle möglich. Dies hätte aber zu einer zusätzlichen Strahlenbelastung der wissenschaftlichen Mitarbeiter und des Versuchstieres geführt. Markbreiter et al. zeigten in einer Studie, dass eine Strahlenbelastung drei Tage nach der Frakturierung zu einer Verzögerung der Knochenheilung führte [131]. Ebenfalls zu bedenken sind die Auswirkungen der Strahlenbelastung auf die MSCs auch während der wöchentlichen Röntgen-Verlaufskontrollen. Die MSCs könnten durch die Strahlenbelastung in ihrem Wachstum und ihrer Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt sein und somit nicht zur gewünschten Regeneration des Gewebes beitragen.

Die Ultrasonographie stellt eine weitere Möglichkeit der kontrollierten und damit gezielten Applikation der mesenchymalen Stammzellen dar. Unter Ultraschallkontrolle ließe sich eindeutig der Osteotomiespalt darstellen und die Injektionsnadel würde als hyperechogene Struktur sichtbar werden. Die Größe des Schallkopfes stellt hier allerdings den limitierenden Faktor dar. Die meisten sich auf dem Markt befindlichen Schallköpfe überschreiten in ihrer Größe den Rattenfemur und sind damit kaum geeignet, den richtigen Anschallwinkel zum Fixateur externe für die Stammzellinjektion zu erreichen.

Um eine standardisierte Applikation der Stammzellen intramedullär vornehmen zu können, diente die Kerbe des Fixateur-Querbalkens als Leitschiene. Die Applikation der MSCs wurde in Vorversuchen mit Hilfe eines radiologisch darstellbaren Kontrastmittels, welches an Stelle des Mediums in den Osteotomiespalt injiziert wurde, unter Durchleuchtung überprüft. Das Ergebnis zeigte, dass das Kontrastmittel im Osteotomiebereich erfolgreich appliziert werden konnte.

Die Applikation der MSCs erfolgte zwei Tage post Osteotomie. Durch die Verwendung autologer Zellen waren immunologische Reaktionen auszuschließen.

Während dieses Zeitpunkts befand sich noch das Frakturhämatom im Osteotomiespalt, welches den transplantierten Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit suboptimale Bedingungen bot, wenn es nicht sogar toxisch war [30]. Vermutlich handelte es sich um ein saures Milieu mit geringer Sauerstoffspannung. Beim pH-Wert im sauren Bereich kommt es zu einer zwei- bis dreifachen Aktivitätsabnahme der alkalischen Phosphatase [132]. Die niedrige Sauerstoffspannung dagegen führt zu einem Anstieg der Proliferationsrate der MSCs. So fanden Carrancio et al. heraus, dass eine hypoxische Atmosphäre von 5% Sauerstoff die besten Ergebnisse, bezogen auf die Proliferationsrate der MSCs, liefert [133].

Ein wichtiger Einflussfaktor auf das Wachstum und die Differenzierung ist die Zell-Matrixinteraktion [132]. Fibrinmicrobeads als alternative Oberflächen zu Kunststoff bei der Kultivierung muriner MSCs könnten die Effektivität der Kultur erhöhen. Das fetale Kälberserum, welches in der Zellkultur verwendet wurde, ist im Stande, toxische oder allergische Reaktionen auszulösen. Derartige Komplikationen konnten jedoch im Experiment nicht beobachtet werden.

### 6.2.5. Histologische Aufarbeitung

Die histologische Aufarbeitung beginnt mit der Präparation des Os femoris. Dies musste sehr sorgfältig unter Schonung des Periosts und des Osteotomiebereiches durchgeführt werden. Die Lösung des Os femoris aus seiner Gelenkpfanne und die Trennung von der Tibia musste unter Wahrung der Kontinuität des Os femoris erfolgen. Auch die Entfernung der Kirschner-Drähte musste mit äußerster Sorgfalt erfolgen. Der Knochen musste vom umgebenden Weichteilgewebe freipräpariert werden, um später eine optimale Fixierung der Präparate zu

gewährleisten. Hierbei war besondere Aufmerksamkeit im Bereich der Osteotomie nötig, um das entstandene Reparationsgewebe nicht zu schädigen oder gar abzutragen.

Die Fixierung des Präparates erfolgte mit Formaldehyd. Formaldehyd zeigt eine relativ gute Durchdringungsfähigkeit und wird vom Gewebe gut vertragen, so dass die morphologischen Details bewahrt bleiben. Es kann zwar zur Schrumpfung oder Verzerrung des Gewebes kommen, jedoch sind formalinbasierende Fixative im Allgemeinen für die meisten Immunfärbungen exzellent geeignet. Formaldehyd reagiert in erster Linie mit den basischen Aminosäuren im Präparat, wobei es zur Bildung quervernetzender Hydroxymethylenbrücken kommt. Das hat zur Folge, dass die Permeabilität für Makromoleküle relativ gering ist und dass die Struktur der zytoplasmatischen Proteine nur unerheblich verändert wird. Konformationsänderungen des Antigens, die aus der Formaldehyd-Reaktion mit Aminosäuren in Nachbarschaft zum relevanten Epitop resultieren, können häufig durch proteolytische und/oder hitzeinduzierte Antigenmaskierung wieder rückgängig gemacht werden [134].

Nach Fixierung und Einbettung der Präparate musste die Schnittebene festgelegt werden.

Um einen repräsentativen Querschnitt vom Osteotomiespalt mit Kallusgewebe zu erhalten, fiel die Wahl auf einen Längsschnitt durch das Präparat. In dieser Ebene war sowohl die endostale als auch periostale Kallusbildung gut einzusehen.

Diese Schnittebene erlaubte jedoch nur eine zweidimensionale Darstellung. Die dreidimensionale Darstellung ist nach Parfitt et al. ultimatives Ziel in der Erforschung der Frakturheilung, aber nur durch sehr aufwendige Serienschritte zu verwirklichen [135].

Innerhalb der immunhistologischen Färbungen traten Probleme bei der Färbung von Gefäßen auf. Die Anfärbung erfolgte mit der alpha-SMA Färbung. In dieser Färbung wurde die glatte Muskulatur der Gefäße rot gefärbt. Neu gebildete Kapillaren, die nur aus Endothelzellen bestehen, konnten mit dieser Färbung nicht erfasst werden [136]. Die Endothelzellen ließen sich nur mit dem immunhistochemischen Nachweis des von Willebrand Faktors darstellen. In Vorversuchen ergab diese Färbung jedoch keine befriedigenden Ergebnisse, da die Anzahl nicht gefärbter Gefäße deutlich über denen in der alpha SMA-Färbung lag. Desweiteren schwankte die Gefäßanfärbung in den einzelnen Präparaten, so dass eine standardisierte Auswertung nicht möglich war. Die alpha-SMA-Färbung erwies sich trotz des Nachteils, dass kleine Kapillaren nicht erfasst wurden, als zuverlässig. Es traten keine Unterschiede in der Anfärbung von Präparat zu Präparat auf. Aber auch in dieser Färbung färbten sich nicht alle Gefäße, die glatte Muskelzellen aufwiesen, deutlich an. In einer Studie von Lienau geht man davon aus, dass die Anzahl der nicht gefärbten Gefäße bei unter 10 % liegt [136].

Auch bei der Osteoklastenfärbung traten Komplikationen auf, so ließen sich die Osteoklasten nicht im Technovit eingebetteten Knochen darstellen. Die Zählung erfolgte deshalb an in Paraffin eingebetteten Präparaten. Auch die knöcherne Oberfläche, auf die sich die Osteoklastenzahl bezieht, musste an einem Paraffinpräparat bestimmt werden, so dass die Verteilung der Osteoklasten nicht auf die mineralisierte knöcherne Fläche, sondern auf die knöcherne Fläche bezogen werden musste. Diese Flächen sind vergleichbar, da sie sich in ihrer Größe entsprechen.

### 6.2.6. Auswertung mit Hilfe der Bildanalyse

Jedes Tier ging mit vier nach Safranin-Orange/von Kossa gefärbten, zwei nach Movat Pentachrom und einem Schnitt der Kollagen-II Färbung in die Auswertung ein. Die Verwendung von vier Schnitten pro Färbung erhöhte die Genauigkeit der Ergebnisse. Bei der Movat Pentachrom und der Kollagen-II Färbung kamen jedoch weniger Schnitte zur Auswertung, da die Anzahl der zu gewinnenden qualitativ auswertbaren Schnitte durch die Größe des Rattenfemurs beschränkt war. Die Auswertung durch mehrere unabhängige

Untersucher wurde anfänglich durchgeführt, unterblieb dann aber aufgrund der sehr hohen interindividuellen Varianzen.

Die Auswertung erfolgte in der gewählten Region of Interest (ROI). Die Größe der ROI wurde so gewählt, dass der Osteotomiespalt komplett und Teile der Kortices, des periostalen und endostalen Kallus enthalten waren. Die Höhe der ROI ergab sich durch die Festlegung der Basis durch den Osteotomiespalt. Von der Basis ausgehend, wurden nach proximal und distal je 3,5 mm abgemessen und so die Höhe der ROI definiert. Durch dieses Vorgehen wurde in jedem zu untersuchenden Präparat eine einheitliche Höhe festgelegt. Das Auftreten von Fehlern war damit ausgeschlossen. Die Breite der ROI wurde durch die Gesamtkallusbreite vorgegeben, ist somit benutzerdefiniert und birgt eine Fehlerquelle, da bei den Präparaten die Abgrenzung vom weichen Kallus zum umliegenden Gewebe nicht immer eindeutig war. Um diese Fehlerquelle so gering wie möglich zu halten wurde der gleiche Schnitt unter dem Mikroskop betrachtet, wo die Abgrenzung deutlicher zu sehen war.

Der Vorteil der computergestützten Bildanalyse ist die standardisierte, vom Benutzer unabhängige Auswertung. Fehlerquellen ergeben sich erst dort, wo subjektive Entscheidungen getroffen werden, wie zum Beispiel bei der Definition der ROI oder der Möglichkeit, die Farbintensität des jeweils zu segmentierenden Gewebes nachzuregulieren.

Von Nachteil ist ebenfalls der erhebliche Zeitaufwand der computergestützten Bildanalyse. So dauerte die Auswertung eines Schnittes durchaus eineinhalb bis zwei Stunden, bis die unterschiedlichen Parameter eingezeichnet und die Feinjustierung der Gewebe durchgeführt waren.

Eine Alternative zur Auswertung mit Hilfe der Bildanalyse wäre die Anfertigung eines Scores, der die Gewebequalität, Gewebeverteilung und die Gewebequantität bestimmt. Der Vorteil ist, dass dieses Verfahren im Gegensatz zur Bildanalyse sehr viel Zeit erspart. Der Nachteil des Scores ist, dass üblicherweise ein semiquantitatives Punktesystem zur Anwendung kommt, welches eine Wertung enthält.

Die Histomorphometrie hat den Vorteil, dass sie wertungsfrei ist. Die Ergebnisse sind Zahlenwerte die durch den Untersucher zu interpretieren sind. Um Abläufe der Frakturheilung objektiv zu beurteilen, stellt die Histomorphometrie in Kombination mit der deskriptiven Histologie ein durchaus geeignetes Verfahren dar.

### 6.2.7. Histologie

#### 6.2.7.1. Deskriptive Histologie

Die Beurteilung der Präparate in der deskriptiven Histologie erfolgte rein subjektiv durch den Untersucher.

Die histologische Auswertung der gefärbten Präparate diente innerhalb als auch zwischen den Gruppen einer vergleichenden, allgemeinen Übersicht auftretender Gewebeanteile und Zelltypen sowie deren Lokalisation und Ausbreitung.

Die Verwendung eines validen Scores, bei dem eine Punktevergabe auf entsprechende Merkmale der Heilung erfolgt, wäre ebenfalls denkbar gewesen. Bei der Verwendung eines Scores entscheidet die Höhe der Punktzahl über die Qualität der Heilung. Dies kann sich als Nachteil erweisen, wenn bestimmte Merkmale der Heilung mit demselben Score gewertet werden aber einen unterschiedlichen Stellenwert im Heilungsverlauf haben. So kann es dazu kommen, dass eine gute Heilung als weniger gut eingestuft wird und umgekehrt.

Die Kombination der deskriptiven Histologie mit den Ergebnissen der Histomorphometrie ermöglichte eine objektive Beurteilung des Heilungsverlaufes und wurde aus diesem Grund vorgezogen.

### 6.2.7.2. Gefäßzählung

Zur Berechnung der Gefäßdichte wurde die Bindegewebsfläche, welche in der histomorphometrischen Untersuchung ermittelt wurde, herangezogen. Die Auszählung der Gefäße erfolgte in der ROI der computergestützten Bildanalyse.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen ist es möglich, spezifische Gewebestrukturen selektiv darzustellen. Doch musste beobachtet werden, dass auch innerhalb eines Färbedurchgangs präparatabhängige Unterschiede in der Qualität der Anfärbung bestanden.

Nicht zu vernachlässigen ist auch der hohe Zeit- und Kostenaufwand dieser Färbungen.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte in Anlehnung an Lienau et al. [136]. Ein Nachteil dieser Färbung ist, dass neu gebildete Kapillaren, die nur aus Endothelzellen bestehen, nicht erfasst werden [136, 137]. Da man sich dieses Problem bewusst war, erfolgte die Untersuchung der Präparate sehr sorgfältig, so dass auch nicht gefärbte Gefäße mitgezählt wurden.

Die Zählung wurde manuell anhand eingescannter Präparate vorgenommen und mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogrammes wurden bereits erfasste Strukturen farblich markiert, wodurch eine Mehrfachzählung vermieden wurde.

### 6.2.7.3. Osteoklastenzählung

Zur Berechnung der Osteoklastendichte wurde die Knochenfläche, welche in der histomorphometrischen Untersuchung ermittelt wurde, herangezogen. Die Auszählung der Osteoklasten erfolgte in der ROI der computergestützten Bildanalyse. Ein Nachteil bei der Auswertung der Osteoklastendichte war, dass sich die knöchernen Bezugsflächen zur Dichtebestimmung nicht nach mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Anteil unterscheiden ließ, da sie an den entkalkten Paraffinpräparaten vorgenommen werden musste. So konnte die Verteilung der Osteoklasten nicht auf die mineralisierte knöchernen Fläche, sondern nur auf die gesamte knöchernen Fläche bezogen werden. Da die Flächen sich aber in ihrer Größe entsprachen hatte dies keinen Einfluss auf die Bestimmung der Osteoklastendichte.

Die Osteoklasten wurden in einer enzymhistochemischen Färbung der lysosomenständigen Trapat-resistenten, sauren Phosphatase rosa angefärbt. Osteoklasten die zur Auswertung kamen, mussten sich in der TRAP-Färbung anfärben, mindestens zwei Zellkerne aufweisen und in Kontakt zu einer knöchernen Oberfläche stehen [138].

In der Intensität der Färbung der Osteoklasten innerhalb eines Präparates als auch zwischen den Präparaten zeigten sich Unterschiede, welche auf eine unterschiedlich starke Aktivität des Enzyms zurückzuführen waren. Aktivitätsverluste bis hin zur Denaturierung des Enzyms sind während der Aufbereitung der Präparate v. a. bei der Infiltration mit 60°C heißem Paraffin denkbar. Die unterschiedliche Farbintensität innerhalb eines Präparates lässt sich durch Temperaturunterschiede innerhalb des Knochens während der Infiltration mit Paraffin erklären.

Die Auszählung der Osteoklasten erfolgte unter einem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung. Auf eine unterstützende digitale Bildverarbeitung wie bei der Gefäßzählung musste aufgrund der enormen Datengröße beim Einscannen der Präparate verzichtet werden, was aber aufgrund der geringen Anzahl zu zählender Osteoklasten nicht zu Fehlern geführt haben sollte. Als weitere Fehlerquelle kam die manuelle Zählung in Betracht. Um diese Fehlerquelle so gering wie möglich zu halten, erfolgte eine mehrmalige Auszählung (Dreifachzählung) der Osteoklasten durch denselben Untersucher und eine Mittelung der Zahlenwerte.



## 6.3. Diskussion der Ergebnisse

### 6.3.1. Operationsverlauf und Tierkontrolle

Die durchgeführte Osteotomie verlief bei allen Tieren komplikationslos. Nach dem Eingriff belasteten die Tiere ihre Gliedmaße zwar, im Verhalten zeigten sie sich jedoch auch an den darauf folgenden Tagen zu ruhig, was vermutlich auf die Belastung durch die Operation, den Wundschmerz und die Vollnarkose zurückzuführen war. Eine analgetische Versorgung wurde nur am Tag der Operation vorgenommen. Eine weitere analgetische Behandlung drei Tage post OP wäre für das Wohlbefinden der Tiere von Vorteil gewesen. Im Verlauf der Tierkontrollen konnten in beiden Gruppen keine Anzeichen für einen bestehenden Infekt festgestellt werden.

Die Gewichtsabnahme der Tiere post Osteotomie ist auf den Stress und die Schmerzen zurückzuführen. Stress und Schmerzen führen zum Einen zu einer geringeren Futteraufnahme und zum Anderen durch einen gesteigerten Sympatikotonus zu einer verminderten Verdauung und einem höheren Grundumsatz. Zusätzlich wird der Energiebedarf durch die beginnenden Reparatursprozesse erhöht [139].

Die Tiere der Medium-Gruppe gingen mit einem höheren Gewicht in den Versuch ein als die Tiere der MSC-Gruppe und behielten es bis zur Euthanasie bei. Die Gewichtszunahme über diesen Zeitraum war in beiden Gruppen sehr ähnlich.

Bei der Temperatur zeigten die Tiere der MSC-Gruppe im Durchschnitt eine 0,3°C höhere Temperatur als die Tiere der Medium-Gruppe. Bei beiden Tiergruppen wurde identisch vorgegangen, jedoch wurden sie nicht im identischen Zeitraum operiert. Es wäre also möglich, dass haltungsbedingt unterschiedliche Umwelteinflüsse (Raumtemperatur) bestanden. Beide Gruppen zeigten nach der Osteotomie einen Temperaturanstieg, was auf den Stress und eine adäquate Entzündungsreaktion auf die Osteotomie zurückzuführen ist.

### 6.3.2. Radiologie

In der radiologischen Auswertung fiel auf, dass sich die Gruppen in ihrem Heilungsverlauf nur wenig voneinander unterschieden. Resorptionsprozesse zeigten sich bei beiden Gruppen im schlechtesten Falle bis über die gesamte Länge des gekauterten Bereichs. Das Vordringen des Kallus in den gekauterten Bereich dagegen ließ sich bei der MSC-Gruppe öfter beobachten als bei der Medium-Gruppe. Eine Überbrückung des Osteotomiespaltes durch den periostalen Kallus zeigte sich nur bei einem Tier der MSC-Gruppe und einem Tier der Medium-Gruppe, dies aber auch nur auf einer Seite. Der Osteotomiespalt war bei allen Tieren noch deutlich sichtbar bzw. erweitert, wobei die Tiere der Medium-Gruppe häufiger einen erweiterten Osteotomiespalt aufwiesen.

Zu bedenken ist, dass sich mineralisiertes Gewebe radiologisch erst ab einer Dichte von 30 % darstellen lässt [140]. Daher lassen sich gegebenenfalls auch die Unterschiede im Vergleich zur Histologie erklären, wo es bei zwei Tieren der Medium-Gruppe und einem Tier der MSC-Gruppe zu einer Überbrückung des Osteotomiespaltes durch den endostalen Kallus kam. Die wolkigen Verschattungen im endostalen Markraum auf Höhe des Osteotomiespaltes wiesen auf eine beginnende Geflechtknochenformation bzw. Mineralisierung hin, konnten jedoch radiologisch nicht eindeutig diagnostiziert werden.

Radiologische Charakteristika einer atrophen Pseudarthrose sind ausbleibende Überbrückung und Persistenz bzw. Erweiterung des Osteotomiespaltes mit Abrundung der Fraktur- bzw. Osteotomieenden [31, 141], sowie eine fehlende periostale und endostale knöcherne Kallusbildung [46, 119, 142]. Die Atrophie der Kortikalisenden mit Erweiterung des Osteotomiespaltes konnte in den vorliegenden Röntgenbildern deutlich beobachtet werden.

Die Abrundung der avitalen Enden erfolgte durch osteoklastäre Aktivität. Wie die histologischen Bilder bewiesen, fanden sich an den Kortikalisrändern des Osteotomiespalt aktiv resorbierende Osteoklasten.

Charakteristika einer vorliegenden atrophen Pseudarthrose konnten auch hinsichtlich ausbleibender Überbrückung sowie einer fehlenden eindeutigen Kallusentwicklung innerhalb der periostalen und endostalen Osteotomie-Zone verzeichnet werden.

### 6.3.3. Histologie und Histomorphometrie

Insgesamt zeigte die Applikation der mesenchymalen Stammzellen nicht den erhofften Effekt. Die Heilung der Tiere, die eine Stammzellinjektion erhielten, war nach acht Wochen nicht fortgeschrittener als die derjenigen Tiere, deren Osteotomie unbehandelt blieb.

Beide Gruppen zeigten mikroskopisch das Bild einer verzögerten Knochenheilung im Sinne einer atrophen Pseudarthrose.

Im Bereich der Deperiostierung und im Osteotomiespalt dominierte von Tier zu Tier verschieden teils fibrotisches und fibrocartilaginäres Gewebe bis hin zu chondralem und ossärem Gewebe. Die Überbrückung des Osteotomiespalt fand, wenn überhaupt, meist vom endostalen Kallus ausgehend statt. Eine vom periostalen Kallus ausgehende Überbrückung fand nur in einzelnen Ausnahmen statt. Der knöcherne Anteil des periostalen Kallus entstand dabei jedoch vorwiegend fern des Osteotomiespalt. Er bildete sich somit vorwiegend in Bereichen erhaltener Gewebewitalität. Eindeutige Unterschiede zwischen den Gruppen konnten bezüglich dieses Heilungsmerkmals nicht festgestellt werden. Bei einer ungestörten Knochenheilung würde zu diesem Heilungszeitpunkt bereits ein Remodeling des Kallus erfolgen, wobei der Geflechtknochen durch lamellären Knochen mit entsprechender Gefäßversorgung ersetzt wird [17, 45].

Die entkalkten und in Paraffin eingebetteten Knochen der MSC-Tiere zeigten im Osteotomiespalt und im periostalen Kallus eine signifikant geringere Gefäßdichte als die Tiere der Medium-Gruppe. Nach Stürmer et al. ist die Revaskularisierung essentiell für die Frakturheilung, da die Knochenregeneration ein extrem stoffwechselaktiver Vorgang ist [29]. Demzufolge würde sich daraus schließen lassen, dass die Medium-Tiere eine bessere Heilungstendenz aufwiesen als die Tiere der MSC-Gruppe. Reed et al. fanden in ihrer Studie jedoch heraus, dass die Gefäßanzahl von Ratten mit einer atrophen Pseudarthrose zum Achtwochenzeitpunkt sich nicht von Ratten mit einer physiologisch heilenden Fraktur unterschied. Reed et al. widerlegten somit die Hypothese, dass atrophe Pseudarthrosen eine geringere Vaskularisation aufweisen als physiologisch heilende Frakturen [143]. Zum selben Ergebnis kamen Brownlow et al. Sie konnten in einer Studie nachweisen, dass sich auch die Konzentration vom endothelial cell-stimulating angiogenesis factor (ESAF) zum Achtwochenzeitpunkt nicht unterscheidet [144].

Nach einer Heilungszeit von acht Wochen konnten in der histologischen Untersuchung in beiden Gruppen viele Osteoklasten im Kallusgewebe gezählt werden. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht feststellen. Die hohe Osteoklastendichte beider Gruppen deutet darauf hin, dass der endostale und periostale Kallus einem Remodeling unterlag [145]. Der endostale Kallus weist bei beiden Gruppen eine höhere Osteoklastendichte und damit ein stärkeres Remodeling auf.

Die histomorphometrisch bestimmte Fläche des periostalen Kallus war in der MSC-Gruppe zwar nicht signifikant, aber dennoch größer als in der Medium-Gruppe. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Gewebeanteile war bei beiden Gruppen ähnlich. Die Medium-Tiere zeigten jedoch einen geringgradig größeren Anteil an Bindegewebe und einen geringeren Anteil an mineralisiertem Knochen und Knorpel als die MSC-Tiere, jedoch waren auch diese Unterschiede nicht signifikant. Die Tiere der MSC-Gruppe wiesen demnach eine geringfügig

qualitativ höherwertige Zusammensetzung des periostalen Kallus, charakterisiert durch den höheren Anteil mineralisierten Knochen und Knorpel, auf.

Die histomorphometrisch bestimmte Fläche des endostalen Kallus war in der Medium-Gruppe größer als in der MSC-Gruppe, jedoch nicht signifikant. Dieser dichtete den Markraum vollständig ab und überbrückte bei zwei Tieren der Medium-Gruppe und einem Tier der MSC-Gruppe den Osteotomiespalt vollständig. Bei weiteren drei Tieren der Medium-Gruppe und zwei Tieren der MSC-Gruppe befand sich der endostale Kallus im Osteotomiespalt, jedoch ohne diesen zu überbrücken. Nach Harrison et al. wird bei Nagetieren nach einer Osteotomie die Markraumabdichtung durch den endostalen Kallus, welcher einem ständigen Remodeling unterliegt, auch noch nach sechs Monaten beobachtet [124].

In der histomorphometrischen Untersuchung bildeten die MSC-Tiere im periostalen Kallus quantitativ mehr mineralisiertes Gewebe ( $p=0,12$ ) und mehr Knorpel ( $p = 0,75$ ) und wiesen eine kleinere Bindegewebsfläche ( $p = 0,09$ ) auf. Auch im endostalen Kallus zeigte sich das gleiche Bild. Dies bedeutet, dass der periostale Kallus der Medium-Tiere durch den höheren Anteil an Bindegewebe eine schlechtere Qualität aufwies. Da der Kallus, als eine Art Stützgerüst, Stabilität in eine Fraktur bringen soll, muss er aus hartem, nicht verformbarem Gewebe bestehen, wie zum Beispiel Knochen [45].

Anhand der Histomorphometrie wird deutlich, dass die applizierten autologen mesenchymalen Stammzellen die endostale Knochenheilung zum Achtwochenzeitpunkt nicht verbessern konnten. Die Zusammensetzung des endostalen Kallus unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Die Gewebequalität des Kallus schien in der MSC-Gruppe geringfügig besser zu sein. Der Bindegewebsanteil der Medium-Gruppe lag im Median geringfügig über dem der MSC-Gruppe. Der Anteil der mineralisierten Knochenfläche und der Knorpelfläche lag bei der MSC-Gruppe über dem der Medium-Gruppe, jedoch nicht signifikant. Von einer Differenzierung der direkt in den Osteotomiespalt injizierten mesenchymalen Stammzellen in funktionelles Gewebe ist, wenn überhaupt, nur in einer geringen Ausprägung auszugehen. Die Zellen erzielten am Ort der Applikation nicht den erhofften Effekt.

Bei beiden Gruppen war vor allem eine endostale Kallusformation zu beobachten.

Dies erscheint in der vorliegenden Studie auch plausibel, da durch die Zerstörung der Knochenhaut eine effektive Unterstützung der Versorgung des Knochens durch periostale Gefäße und Periostzellen zumindest im gekauterten Bereich, unterblieb [48, 146]. Desweiteren ist zu bedenken, dass es durch die traumatische Entnahme des Knochenmarks zu einer Aktivierung des Endosts gekommen sein könnte und so die Kallusbildung möglicherweise initiiert wurde. Desweiteren ist bekannt, dass sich bei der Spaltfrakturheilung der endostale Kallus stärker formiert als bei der Kontaktheilung [147].

Die Kortikalis stellte sich in beiden Gruppen meist glattrandig bzw. durch knöcherne Kallusauflagerungen wellenförmig dar.

Durch Osteoklasten hervorgerufene Resorption fand vor allem an den gekauterten Kortikaliserändern statt. Dieses Bild wurde durch die hohe kortikale Osteoklastendichte bestätigt. In einer atrophischen Pseudarthrose ist das verstärkte Aufkommen resorbierender Osteoklasten an den Osteotomieenden und damit einhergehend, eine Abrundung der Kortikaliserenden zu beobachten [148]. Die Knochenresorption ging teilweise soweit, dass es zu einer Verbreiterung des Osteotomiespalt kam.

Im Verlauf der Studie kam es zu einem unerwarteten Ereignis. In allen histologischen Färbungen fielen Unterbrechungen der kortikalen Kontinuität durch amorph erscheinende, nicht knöcherne Areale auf. Sie zeigten sich histologisch als grüne Areale in den Movat-Pentachrom gefärbten Präparaten. In den Kollagen-II gefärbten Schnittpräparaten beobachtete man analog dazu eine rosa-rote Anfärbung. Diese Farbgebungen sind innerhalb der genutzten Färbemethoden spezifisch für Knorpelstrukturen. Sie traten in beiden Tiergruppen gleichermaßen auf.

Histologisch zeigte sich eine lakunäre Form der homogen gefärbten Bereiche. Zellen wurden in diesen Bereichen auffallend selten beobachtet. Teilweise ließen sich darin osteozytäre oder chondroblastäre Zellstrukturen auffinden (siehe Abb.33). Die Beobachtung der Kontinuitätsunterbrechungen innerhalb der kortikalen Struktur trat auch bei Ratten mit einer physiologisch verlaufenden Knochenheilung mit dem identischen Versuchsmodell auf. Ebenso wurden Femora und Tibiae von Ratten andere Projekte untersucht und auch hier wurde diese Auffälligkeit beobachtet. Es handelt sich daher also wahrscheinlich um ein allgemeines, rattenspezifisches Phänomen. Dieses Phänomen wurde bisher in der Literatur nicht erwähnt. Bekannt ist, dass die Röhrenknochen der Ratte einem lebenslangen Wachstum unterliegen [124]. Es wäre möglich das es sich bei den amorphen Arealen um Wachstumszonen handelt, von denen eine Ossifikation ausgehen könnte. Ähnlich wie bei der indirekten Ossifikation könnte zuvor gebildetes Knorpelgewebe wieder zerstört und mittels Osteoblasten durch Knochengewebe ersetzt werden.

Eine eindeutige Klärung des Phänomens kann an dieser Stelle leider nicht erfolgen. Für eine genaue Erklärung des Phänomens und deren Bedeutung bedarf es weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

Es ist davon auszugehen, dass die applizierten mesenchymalen Stammzellen die Knochenheilung nicht effizient unterstützten. Es entstand wahrscheinlich infolge der Deperiostierung und Knochenmarkentnahme ein Missverhältnis zwischen knochenresorbierenden Osteoklasten und knochenaufbauenden Osteoblasten [118, 149].

Die innere Schicht des Periosts enthält Cambium-Zellen, bei denen es sich um osteogene Progenitorzellen mesenchymalen Ursprungs handelt. Ihnen wird die Fähigkeit zur Knorpel- und Knochenneubildung zugesprochen [10, 15]. Auch das Knochenmark enthält ca. 0,01 bis 0,03% mesenchymale Stammzellen, welche in der Differenzierungskaskade noch über den Progenitorzellen des Periost stehen [87, 88]. Wird das Periost thermisch zerstört und das Knochenmark entfernt, entzieht man u.a. die für den Knochenaufbau notwendigen Osteoblasten.

Ein Ziel dieser Studie war es, Erkenntnisse bezüglich der frühen Phase der Periostrekonstruktion bzw. ihrer Rolle im Verlauf der Frakturheilung zu erlangen.

In den histologischen Schnitten war zu erkennen, dass eine Schicht aus dicken Bindegewebsfasern über den periostalen Kallus zog und den Osteotomiespalt überbrückte. Hierbei handelte es sich vermutlich um die Fasern das Stratum fibrosum des Periosts. Darunter erkannte man bei einigen Tieren eine Schicht mehrreihiger Zellen. Es war aber nur in Bereichen auszumachen in denen sich mineralisiertes Gewebe gebildet hatte. In der Movat Pentachrom Färbung wird dies deutlich. Fraglich ist, ob es vom Stratum cambium gebildet wird. Nach Ito et al. wird in der frühen Phase der Frakturheilung eine zellarme Faserschicht gebildet. Gleichzeitig entsteht Kallusgewebe, welches als strukturelle und funktionelle Stütze dient, um die Regeneration der Kambiumschicht zu gewährleisten. Ito et al. geht davon aus, dass eine Regeneration des Periosts nicht gleich einhergehend mit einer fortschreitenden Heilung des fakturierten Knochens zu sehen ist. Zu welchem Zeitpunkt und in welcher Reihenfolge die Regeneration des Periosts einsetzt, ist nicht eindeutig zu definieren [15]. Im Bereich des Osteotomiespaltes stellte sich in beiden Gruppen das Stratum fibrosum mit dem sich wahrscheinlich entwickelnden Stratum cambium in den histologischen Schnitten nur dort dar, wo auch mineralisiertes Gewebe war. Dort, wo es zu einer knöchernen Überbrückung der gegenüberliegenden Kortices kam, trat auch eine Vereinigung der periostalen Schichten auf. Eine vollständige periostale Rekonstruktion während der Knochenheilung scheint also an die knöcherne Kallusbildung gebunden zu sein. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die im Periost vorhandenen Progenitorzellen *in vitro* und *in vivo* ein osteogenes [50, 52-54] und chondrogenes Differenzierungspotential [15, 150]) aufweisen. Jedoch ist bis heute nicht vollständig geklärt, ob diese Zellen mesenchymalen Ursprungs sind. Es bleibt daher die Frage offen, ob Stammzellen des Knochenmarks überhaupt zur Rekonstruktion der Kambiumschicht

befähigt sind. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die applizierten Stammzellen keinen Einfluss auf die vollständige Regeneration des Periosts nehmen. Sie scheinen keinen Anteil an der Bildung des Stratum fibrosum und des Stratum cambium zu haben, da sie sich im deperiostierten Bereich auch in der Gruppe entwickelten, die keine Stammzellinjektion erhielt.

Warum es letztendlich nicht zum erwünschten Heilungseffekt kam, könnte verschiedene Ursachen haben. Zum Einen könnte der Zeitpunkt der Applikation der mesenchymalen Stammzellen inadäquat gewesen sein. Die Applikation der mesenchymalen Stammzellen erfolgte 2 Tage nach der Operation. Das entspricht der ersten Phase der Frakturheilung, die Phase der Entzündung [10, 22, 24]. Die Entzündungsreaktion hält für ein bis maximal fünf Tage an [31, 32]. Im geschädigten Gewebe kommt es zu einer Infiltration mit Thrombozyten, Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Histozyten und Makrophagen [17]. Desweiteren ist der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt im sauren Bereich, auch der Sauerstoffpartialdruck ist erniedrigt. Diese Gesamtsituation könnte zu einer Schädigung der applizierten mesenchymalen Stammzellen geführt haben.

Andererseits kann man unter physiologischen Umständen in dieser Zeit körpereigene pluripotente Stammzellen nachweisen, welche wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren produzieren, die die Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung begünstigen [26-28]. Nach Cancedda et al. herrscht in dieser Zeit ein spezielles Milieu, das durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und spezielle lösliche Proteine geschaffen wird [151].

Ob und wie dieses Milieu durch die Zugabe der Stammzellen samt Mediumflüssigkeit beeinträchtigt wird, bleibt zu klären

Das Frakturhämatom trägt zu einem gewissen Anteil an der Frakturheilung bei, indem es u. a. Faktoren zur Angiogenese enthält und durch seinen sauren pH-Wert, welcher nach 20 Tagen auf 7,5 ansteigt, einen Proliferations- und Differenzierungsreiz darstellt [24, 25]. Im Frakturhämatom befinden sich ebenfalls pluripotente Stammzellen, welche zu Osteoblasten, Fibroblasten und Chondroblasten ausdifferenzieren können [26-28]. Nach Probst et al. ist das Frakturhämatom aufgrund der Präsenz von Mediatoren essentiell für die Frakturheilung [152]. Durch die Injektion der mesenchymalen Stammzellen samt Medium wäre eine Ausschwemmung des Frakturhämatoms aus dem Osteotomiebereich denkbar.

Die histologischen Bilder der Tiere mit einer Standzeit von zwei Wochen im gleichen Modell zeigten zwei Wochen nach der Osteotomie noch Hämatomreste. Ein Ausschwemmen durch die Injektion der mesenchymalen Stammzellen samt Medium ist daher unwahrscheinlich, jedoch kann eine Schädigung und damit eine Reduktion oder ein Wegfall der die Knochenheilung stimulierenden Faktoren nicht völlig ausgeschlossen werden [153].

Eine immunbedingte Abwehrreaktion durch die autologen mesenchymalen Stammzellen ist sehr unwahrscheinlich.

### 6.3.4. Vergleich mit anderen Studien

Die Dissertation entstand im Rahmen eines Gesamtprojektes. In den verschiedenen Subprojekten waren die Anzahl der applizierten MSCs sowie der Applikationszeitpunkt identisch, allein der Untersuchungszeitpunkt und der Differenzierungsgrad der autologen *in vitro* expandierten MSCs unterschieden sich. In der Dissertation von Frau Dr. Peters konnte zum Zweiwochenzeitpunkt kein klinisch relevanter Einfluss der MSCs auf die Knochenheilung festgestellt werden [153]. In einer weiteren Dissertation von Frau Dr. Bach wurde der Einsatz prä-differenzierter MSCs, sogenannter Osteoprogenitorzellen (OPCs), ebenfalls zum Zweiwochenzeitraum untersucht [154]. Hier gab es deutliche Hinweise auf eine erfolgreiche Initiierung der Knochenheilung durch enchondrale Ossifikation durch den Einsatz von Osteoprogenitorzellen (OPCs). In beiden Dissertationen wurde endostal und

periostal die Entwicklung von Kallusgewebe mikroskopisch-histologisch erkennbar und histomorphometrisch untersucht. In der Arbeit von Frau Dr. Peters lokalisierte sich der Kallus in Versuchs-(MSC-Gruppe) und Kontrollgruppe fern des Osteotomiespalt im vitalen Gewebeareal. In der Arbeit von Frau Dr. Bach dagegen erreichte das periostale Kallusgewebe das thermisch zerstörte Periostareal, welches auf einen verbesserten Einfluss der applizierten OPCs gegenüber den MSCs hinweist. Zum Achtwochenzeitpunkt konnte in der vorliegenden Arbeit nur bei wenigen Tieren sowohl in der Versuchs- als auch in der Vergleichsgruppe eine Kallusbildung im Periostareal festgestellt werden. Die endostale Osteotomiezone war sowohl bei den mit MSCs als auch bei den OPCs behandelten Tieren vollständig mit Bindegewebsstrukturen ausgefüllt, welche keine osteokonduktiven Prozesse erkennen ließen [153, 154].

Nakamura et al. untersuchten Zellschicht-Transplantate aus MSCs in einer atrophen Pseudarthrose[107]. Sie konnten nach 8 Wochen eine Vereinigung der Knochenenden in der Transplantatgruppe beobachten. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde die atrophe Pseudarthrose nach dem Modell von Hietaniemi durch Zurückschieben des Periost von den Osteotomieenden herbeigeführt und eine intramedulläre Nagelung zur Osteotomiestabilisierung herangezogen. Die applizierten MSCs wurden nicht autolog transplantiert, sondern stammten von männlichen Ratten und wurden weiblichen Ratten gleichen Alters und Gewichtes transplantiert. Das MSC Zellschicht-Transplantat wurde in 10 nM Dex und Vitamin C inkubiert, wodurch eine osteogene Differenzierung initiiert wurde.

Die Prozedur wurde an beiden Oberschenkelknochen durchgeführt, wobei rechter und linker als Versuchs- und Kontrollgruppe genutzt wurden. Das MSC Zellschicht-Transplantat wurde am Tag der Osteotomie um die Osteotomieenden angebracht. Zusätzlich durchgeführte Untersuchungsmethoden stellen die ultrasonographische Darstellung der Osteotomieenden als auch eine Determination des Y Chromosoms des Spendertieres dar. In letztgenannter Untersuchung konnte bewiesen werden, dass die Spender-MSCs auch noch zum Achtwochenzeitpunkt im Empfängertier existierten. Warum in dieser Studie die MSC Zellschicht-Transplantate zu einem Erfolg führten, könnte daran gelegen haben, dass die Vorgehensweise, eine atrophe Pseudarthrose zu schaffen, nicht so aggressiv waren wie in der vorliegenden Studie. Die Deperiostierung mittels Kauter führte zu einer massiveren Schädigung des Gewebes, und auch der überdimensionale Fixateur externe trug durch eine zu hohe Steifigkeit zu einer verzögerten Knochenheilung bei [60]. Aber auch der direkte Kontakt der Osteotomieenden, welcher im Unterschied zur vorliegenden Arbeit nicht bestand, stellte eine günstigere Heilungssituation dar. Denkbar wäre, dass der erhaltene Zell-Zell Kontakt eine Rolle spielen könnten. Desweiteren stellt sich die Frage, ob die Applikation der MSCs in der vorliegenden Arbeit zum richtigen Zeitpunkt erfolgte. Das nach zwei Tagen bestehende Milieu stellte vielleicht kein optimales Milieu für eine weitere Proliferation und Differenzierung der MSCs dar. Weitere Studien unterscheiden sich von der vorgestellten Arbeit zum Einen im Modelldesign, zum Anderen in der gewählten Therapieform. Untersuchungen der gestörten Knochenheilung wurden meist an Defekten kritischer Größe auf dem Gebiet der chirurgischen Knochendistraktion untersucht [155-157]. Das Knochengewebe befindet sich jedoch bei Defekten kritischer Größe in einem regenerationsfähigen Zustand. Aus diesem Grund wäre ein Vergleich nicht adäquat. In den bisher durchgeführten Studien erschienen die Fragmentenden vaskularisiert und das physiologische Stammzelldepot blieb weitgehend unversehrt. Der Knochen besitzt weiterhin das Potenzial zur Autoregeneration. Allenfalls kommt es während des Heilungsverlaufes in Abhängigkeit von der Defektgröße zur Entwicklung von hypertrophen Pseudarthrosen. Diese Situation entsteht hier aber allein durch das Überschreiten der osteogenen Regenerationskapazität des Gewebes. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch bereits initial bedingt durch eine massive Schädigung des Periosts eine annähernd avitale Gewebesituation im Frakturgebiet geschaffen. Das biologische Potential ist aber durch eine thermische

Zerstörung des Periosts, wie es in dieser Studie vorgenommen wurde, nicht vollständig erloschen. In der vorliegenden Studie konnte, wenn auch nur in einem sehr geringen Ausmaße, sowohl in der Versuchsgruppe, welche MSCs erhielten, als auch in der Kontrollgruppe ein beginnender Reparatursversuch durch eine periostale Kallusbildung beobachtet werden.

Makino et al. konnten in einer Studie nach thermischer Deperiostierung das biologische Potential durch lokal appliziertes humanes BMP 7 aktivieren und damit eine Heilung induzieren [158]. Sie schufen eine atrophe Pseudarthrose nach dem Modell von Kokubu. Zur Osteotomiestabilisierung nutzten sie wie die Arbeitsgruppe um Nakamura eine intramedulläre Nagelung. Auch hier erfolgte wie bei Nakamura et al. die Applikation intra operationem. Um eine Diffusion des BMP 7 ins umliegende Gewebe zu minimieren, verwendeten sie einen Kollagenpuffer, der die Viskosität erhöhte. In der vorliegenden Arbeit wurden die MSCs samt des Mediums zwei Tage post Operationem appliziert, ohne einen Viskositäts erhöhender. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die MSCs ins umliegende Gewebe diffundiert sind. In der vorgestellten Arbeit wurden keine Trägermaterialien verwendet. Durch die thermische Behandlung der Osteotomieenden kann von einer avitale kortikalen Strecke von ungefähr vier Millimetern ausgegangen werden, die es zu überbrücken galt. Die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der MSC-Gruppe könnten weiterhin darauf beruhen, dass sich das Injektionsmedium nicht als Trägermaterial zur Bereitstellung der MSCs im Reparaturgebiet eignete. Ein entsprechendes Trägermaterial könnte als Leitschiene zum Einen die avitale deperiostierte Strecke überbrücken, zum Anderen den Zellen eine Nische bieten, an der sie haften bleiben und ein geeignetes Mikromilieu aufbauen können [159].

Im Laufe der Zeit wurden zwei Strategien entwickelt, um das osteogene Potential von biologischen Trägermaterialien zu steigern. Die erste Strategie bestand darin Wachstumsfaktoren auf Trägermaterialien aufzubringen um eine bessere Knochenheilung zu initiieren [160]. Die zweite Strategie bestand darin, zellbasierte Trägermaterialien zu entwickeln, die *in vitro* ihre osteoinduktive Wirkung entfalten sollten [161]. Trägermaterialien mit autologen MSCs konnten in verschiedenen Tiermodellen erfolgreich implantiert werden und Knochendefekte heilen [162, 163]. In einer klinischen Studie am Patienten führten autologe MSCs auf biologischen Trägermaterialien zu einer erfolgreichen Behandlung von großen Knochendefekten [164].

Es gibt eine Vielzahl von Studien, in denen MSCs erfolgreich im Zusammenhang mit Trägermaterialien eingesetzt wurden [6, 165], es gibt aber nur wenige Studien, die eine nachweisliche Knochengewebeformation nach Zelltransplantationen ohne Trägermaterialien *in vivo* vorzeigen können. Akahane et al. entwickelten eine erfolgreiche Methode für die Transplantation kultivierter MSCs ohne die Notwendigkeit von Trägermaterialien, um Knochengewebe neu zu bilden. MSCs wurden erfolgreich kultiviert, expandiert und als Zellschicht-Transplantate subkutan in Ratten implantiert. Die Implantate zeigten nach sechs Wochen eine Knochenneubildung [166]. Auch hier fand eine Prädifferenzierung der MSC Zellschicht-Transplantate statt. Die Zellschichttransplantate wurden in 1x10 cm große Stücke mit einer Zelldichte von  $10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> aufgeteilt und für 14 Tage mit 10nM Dex inkubiert. Durch eine Transplantation der Zellschichttransplantate ist eine sichere Platzierung der Zellen möglich, ohne die Gefahr einer Diffusion der Zellen in umliegendes Gewebe einzugehen. Auch in dieser Studie zeigt sich wieder, dass eine Prädifferenzierung der MSCs zur Beschleunigung der Knochenheilung geführt hat.

Neue Verfahren sind in der Lage, durch eine Manipulation der MSCs mit spezifischen Genen eine osteogene Differenzierungsrichtung vorzugeben.

Osteoactivin ist ein spezifisches Gen im Knochen, welches die Osteoblastendifferenzierung positiv reguliert [167-169]. Eine Isoform des Osteoactivin ist ein Sekretionsprotein, welches das Osteoactivin unterstützt [168]. Diese Isoforme sind potentielle Kandidaten für die Gentherapie.



Transkriptionale Faktoren und Koaktivatoren sind in der Lage, MSCs zu modulieren und eine osteogene oder adipogene Differenzierung vorzugeben [108]. Vektoren, die für die genetische Modifikation der MSCs genutzt werden, sind Adenoviren, Retroviren und Liposome. Liposome sind nicht-virale Vektoren, damit nicht pathogen aber auch weniger effizient. Trotzdem konnten BMP-7 und BMP-2 Gene erfolgreich mittels Liposomen in MSCs eingeschleust werden [170, 171].

In der Studie von Kallai et al. wurden weiblichen Mäusen rekombinante humane BMP-2 exprimierende MSCs in einen 2,5 mm gossen Defekt, aus welchem eine Pseudarthrose resultierte, am Radius implantiert [130]. Als Trägermaterial diente hier ein Kollagenschwamm. Zusätzlich wurde eine nicht resorbierbare Teflonschicht zwischen Ulna und Radius angebracht, um die Fraktur zu stabilisieren. Das kontralaterale Bein der gleichen Maus diente als Vergleich und wurde keiner Operation unterzogen. Nach einer Standzeit von 34 Wochen konnte eine prominente Knochenneubildung auf der Pseudarthrosefrakturseite beobachtet werden, welche eine andere Morphologie als die des intakten Kontrollbeines aufwies. Die mechanische Analyse ergab, dass der geheilte Knochen substanziell stärker war als die intakte Kontrollseite.

### 7. Schlussfolgerung

Mesenchymale Stammzellen unterscheiden sich von anderen Körperzellen durch ihre Fähigkeit, sich in spezifische Zelltypen differenzieren zu können.

Sie können sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in eine Vielzahl von Zellen wie Osteozyten, Chondrozyten, Tendinozyten, Adipozyten und Zellen des Knochenmarkstroma differenzieren. Diese Fähigkeit machen sie für die heutige regenerative Medizin ausgesprochen wertvoll.

Mit dieser Studie konnten Erkenntnisse über den bisher ungeklärten Verlauf der periostalen Rekonstruktion während der Knochenheilung und die Auswirkungen lokal transplanteder autologer mesenchymaler Stammzellen in einem Defekt des langen Röhrenknochens untersucht werden. Dabei wurde die aus der Literatur bereits bekannte Bedeutung des Zusammenhanges zwischen Periost und Knochenheilung nochmals gefestigt. Wird das Periost zerstört, ist es nur bedingt in der Lage, sich vollständig zu regenerieren. Die Folge war eine stark verzögerte bzw. ausbleibende Knochenheilung [29]. Die histologischen Bilder zeigten, dass sich die Faserschicht der Knochenhaut unabhängig vom Stratum cambium erneuern kann. Eine vollständige Regeneration des Periosts fand jedoch nur in Einzelfällen und dort auch nur auf einer Seite der Osteotomieenden, wo es auch zu einer knöchernen Überbrückung kam, statt. Die Periostregeneration scheint an die externe Kallusbildung gekoppelt zu sein. Ist das Periost zerstört, kann ohne eine Kallusbildung keine periostale Rekonstruktion erfolgen. Das bedeutet, dass beim Auftreten deperiostierter, schlecht heilender Frakturen die periostale Kallusbildung durch spezielle Maßnahmen unterstützt werden muss. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie und dem heutigen Stand der Forschung wird ersichtlich, dass undifferenzierte perkutan applizierte mesenchymale Stammzellen allein nicht in der Lage sind, kritisch ablaufende Knochenheilungen positiv zu beeinflussen.

Schlussfolgernd wird ersichtlich, dass eine osteogene Ausdifferenzierung bzw. eine Unterstützung der MSCs in Richtung der osteogenen Differenzierung einen größeren Erfolg verspricht. Ein weiterer wichtiger Punkt ist es sicherzustellen, dass die Zellen am Ort der Applikation bleiben. Einigen ist dies durch spezielle Trägermaterialien gelungen, andere wiederum fanden Möglichkeiten, die Zellen auch ohne Trägermaterialien, wie z.B. Nakamura durch einen Zellverbund, die MSCs am Ort des Geschehens zu halten[107].

Der optimale Applikationszeitpunkt ist ein weiterer Parameter, der zu bedenken ist. Er ist abhängig von den biochemischen und biologischen Verhältnissen, welche im Frakturgewebe bestehen. Desweiteren ist er abhängig von der Wirkungsdauer innerhalb des Frakturgebietes freigesetzter Signalmoleküle. In den Studien, in denen eine erfolgreiche Knochenheilung initiiert wurde, erfolgte die Applikation der MSCs fast immer zum Zeitpunkt der Osteotomie. Der optimale Applikationszeitpunkt ist wissenschaftlich noch nicht definiert und muss durch weiterführende Grundlagenforschung eruiert werden.

## 8. Zusammenfassung

Schwerwiegende Frakturen mit umfangreichen Knochendefekten, verzögerter Frakturheilung, Pseudarthrosen sowie Wundinfektionen sind trotz Fortschritts in der Medizin ein bestehendes Problem.

Pseudarthrosen und verzögerte Knochenheilungen erfordern häufig eine langwierige und letztendlich nicht immer erfolgreiche Behandlung des Patienten. Dadurch entstehen einerseits massive Einschränkungen der Lebensqualität des Patienten und andererseits erhebliche Mehrkosten für das Gesundheitssystem durch zusätzliche Operationen, verlängerte Krankenhausaufenthalte und Nachbehandlungszeiten. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die lokale Applikation von autologen mesenchymalen Stammzellen und ihre Fähigkeit zur Aktivierung des Heilungspotentials in einer atrophe Pseudarthrose Situation untersucht.

Desweiteren wurde die Wiederherstellung der periostalen Integrität als Voraussetzung für eine physiologisch verlaufende Frakturheilung der Röhrenknochen und eine Beteiligung der lokal applizierten MSCs am Reparationsprozess untersucht.

In der vorliegenden kontrollierten Studie wurden 16-20 Wochen alte, männliche, 410-460g schwere Sprague Dawley Ratten verwendet. Die Tiere wurden einseitig am linken Hinterbein standardisiert osteotomiert und mit einem Fixateur externe versorgt. Um eine atrophe Pseudarthrosesituation zu schaffen, wurde das Periost auf einer Länge von 2 mm proximal und distal der Osteotomie durch Kauterisierung zerstört und das Knochenmark entfernt. Zwei Tage post Osteotomie wurden bei der Versuchsgruppe (MSC-Gruppe)  $2 \times 10^6$  MSCs/100  $\mu$ l Zell-Mediumsuspension perkutan in den Osteotomiespalt injiziert. Die Kontrollgruppe (Medium-Gruppe) erhielt die analoge Menge des Kultivierungsmediums ohne Zellen. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betragen 16. Radiologische Verlaufskontrollen erfolgten in wöchentlichen Intervallen. Die Tiere wurden nach acht Wochen euthanasiert, die Femora präpariert, histologisch, immunhistologisch sowie histomorphometrisch untersucht. Radiologisch und histologisch wurde in beiden Gruppen ein verzögerter Heilungsverlauf beobachtet. Die histologischen Bilder beider Gruppen ähnelten sich. Der periostale Kallus endete bei der Mehrzahl der Tiere im gekauterten Bereich. Nur bei wenigen Tieren überbrückte der periostale Kallus den Osteotomiespalt, oft nur auf einer Seite bzw. von einem Osteotomieende ohne Verbindung zum gegenüberliegenden periostalen Kallus oder der gegenüberliegenden Kortikalis zu erlangen. Vereinzelt kam es in beiden Gruppen zu einer Überbrückung des Osteotomiespalts durch den endostalen Kallus.

Eine Schicht aus dicken Bindegewebsfasern, bei der es sich höchstwahrscheinlich um das Stratum Fibrosum handelt, darunter vereinzelt zu beobachten eine Schicht aus mehrreihigen Zellen, vermutlich das Stratum Cambrium, überzog in beiden Gruppen den periostalen Kallus und bei einigen Tieren sogar den Osteotomiespalt. Das Stratum fibrosum mit dem sich vermutlich entwickelnden Stratum cambium war nur vorzufinden, wo auch mineralisiertes Gewebe war.

In beiden Gruppen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Osteotomiespaltweite sowohl auf der lateralen Seite als auch auf der medialen Seite. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der prozentualen Anteile mineralisierten Knochens und Knorpel festgestellt werden. Der Anteil Bindegewebe an der Gesamtfläche dagegen zeigte sich bei den Tieren der Mediumgruppe signifikant größer. Die Tiere der Medium-Gruppe zeigten eine signifikant größere Anzahl der Gefäße als auch eine größere Dichte der Gefäße pro Quadratmillimeter Bindegewebsfläche als die Tiere der MSC-Gruppe. Signifikante Unterschiede in der Osteoklastenzahl ließen sich weder im periostalen und endostalen Kallus noch in der lateralen und medialen Kortikalis feststellen.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie und dem heutigen Stand der Forschung wird ersichtlich, dass undifferenzierte perkutan applizierte mesenchymale Stammzellen allein nicht

in der Lage sind, kritisch ablaufende Knochenheilungen positiv zu beeinflussen oder einen positiven Einfluss auf die periostale Rekonstruktion auszuüben.

Schlussfolgernd wird ersichtlich, dass eine osteogene Ausdifferenzierung bzw. eine Unterstützung der MSCs in Richtung der osteogenen Differenzierung, bzw. eine Applikation der Zellen zu einem anderen Zeitpunkt unter der Zuhilfenahme spezieller Trägermaterialien oder Zellverbänden einen größeren Erfolg verspricht. Auch die periostale Regeneration konnte durch die applizierten MSCs nicht beeinflusst werden. Vielmehr scheint die periostale Regeneration an die Entwicklung eines knöchernen Kallus gebunden zu sein.

## 9. Summary

### **Influence of pluripotent mesenchymal stem cells on bone healing in a rodent atrophic nonunion model regarding especially the periosteal reconstruction.**

Despite constant developments in the field of medicine, severe fractures with extensive bone loss, delayed fracture repair, nonunions as well as infections, still represent a treatment challenge.

Nonunions and delayed fracture repair often require a long and dissatisfying treatment. Throughout this process, life quality of the patient is restricted, additional operations and prolonged hospital residence will raise the national health system costs.

Based on these facts the objective of this thesis was to examine the ability of autologous mesenchymal stem cells (MSCs) to activate the healing potential when applied in a case of atrophic nonunion.

Furthermore it was examined whether the restoration of the periosteal integrity is a precondition for a physiological long bone fracture repair and which influence local application of MSC has on the bone repair process.

In this study 16 to 20 week old male Sprague Dawley rats were used, with a weight of 410 to 460 g. They were divided in two groups, the mesenchymal stem cells group (MSC-group) and the control group (medium-group), with 16 rats in each group. Both groups underwent a standard osteotomy on the left os femoris and were subsequent treated with an external fixator. Distal and proximal to the osteotomy site, the periosteum was cauterised for a length of 2 mm plus bone marrow removal in order to achieve an atrophic nonunion.

Two days after osteotomy  $2 \times 10^6$  MSCs/100  $\mu$ l cell-mediumsuspension were injected in the osteotomy gap percutaneously in the animals of the MSC-group. A corresponding amount of culture medium without cells was applied to the medium-group. The healing process was radiologically controlled at weekly intervalls. 8 weeks post osteotomy the animals were euthanised, their femora were prepared and histologically, immunehistologically and histomorphometrically examined. Delayed healing was observed in both groups, radiologically as well as histologically. The histological pictures of both groups were similar. In most of the cases there was no periosteal callus development in the cauterized area. Only in a few animals the periosteal callus grew across the osteotomy gap. In most of the cases the periosteal callus reached just from one end of the osteotomy to the opposite side, but without connecting to the other side. Just in isolated cases the osteotomy gap was bridged completely by the endosteal callus. A layer of large connective tissue fibres, probably the stratum fibrosum, which covered a single layer of multiple-row cells, possibly the stratum cambrium, was identified in both this groups. This new build periosteum covered the periosteal callus and was in single animals even crossing the osteotomy gap.

In both groups a significant increase in the width of the osteotomy gap was determined, on the lateral side as well as on the medial side, but there was no significant difference concerning the increase of the width between the groups. No significant difference could be found between the groups concerning the procentual fraction of mineralized bone and cartilage. On the contrary, the fraction of connective tissue on the total area was significantly higher in the medium-group and this group also showed a higher number of vessels, as well as a higher amount of vessels per square millimeter connective tissue compared to the MSC-group. No significant differences could be determined concerning the number of osteoclasts, neither in the periosteal and endosteal callus nor in the lateral or medial corticalis.

The results of this study and current state of research show, that undifferentiated percutaneously applied mesenchymal stem cells alone are not able to influence critical bone healing positively.

In conclusion it becomes obvious, that a complete osteogenic differentiation or a support of MSCs towards osteogenic differentiation or an application of the cells at a different time point aided by special scaffolds or cell sheets might be more successful. The applied MSCs couldn't stimulate the periosteal regeneration as well. It rather seems that the periosteal regeneration is dependent on the development of a bony callus.

## 10. Literatur

1. Haas NP, *Callusmodulation - Fiktion oder Realität?* Chirurg, 2000. **71(9)**: p. 987-988.
2. Einhorn TA, *Enhancement of fracture healing.* Instr Course Lect, 1996. **45**: p. 401-16.
3. Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, Hadjiargyrou MJ, *The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures.* Bone Joint Surg, 2001. **83-A**: p. 259-270.
4. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.* J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**: p. 381-390.
5. 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 Suppl, 1997. **64(2)**: p. 278-294.
6. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, *Tissue engineered ceramic artificial joint – ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis.* Biomaterials, 2005. **26**: p. 4654-4661.
7. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M, *Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees.* Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**: p. 199-206.
8. Kawate K, Yaijima H, Ohgushi H, Kotobuki N, Sugimoto K, Ohmura T, *Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula.* Artif Organs, 2006. **30**: p. 960-962.
9. Mathon DH, Autefage A, *Development of a segmental long-bone Defect Model in Sheep.* Vet Comp Orthop Traumatol, 1998. **11**: p. 1-7.
10. Junqueira LC, Carneiro J, Scheibler TH, *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie.* 4 ed. 1996, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. 758.
11. Trostle SS, Markel MD, *Fracture biology, biomechanics, and internal fixation.* Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1996.
12. Bucher O, Wartenberg H, *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie.* 1997, Bern: Hans Huber.
13. Waldeyer A, Mayet A, *Anatomie des Menschen.* 1993, Berlin, New York: de Gruyter.
14. Budras, Fricke, Richter, *Atlas der Anatomie des Hundes, Lehrbuch für Tierärzte und Studierende.* 6 ed. 2000, Hannover: Schlüterche GmbH & Co. KG, Verlag und Druckerei. 222.
15. Ito Y, Fitzsimmons JS, Sanyal A, Mello MA, Mukherjee N, O'Driscoll SW, *Localisation of Chondrocyte Precursors in Periosteum.* Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9**: p. 215-223.
16. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal Mauli C, *Age-related Changes in the Collagen Network and Toughness of Bone.* Bone, 2002. **31(1-7)**.
17. Remedios A, *Bone and bone healing.* Vet Clin North Am Small Anim Pract 29(5): 1029-44, v., 1999.
18. Liebich HG, *Funtionelle Histologie der Haussäugetiere; Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.* 4 ed. 2004, München: Mayr Miesbach, Druckerei und Verlag GmbH. 384.
19. Oni OA, *Injury.* Injury 28(9-10):629-31, 1997.
20. Kohler T, Mosimann W, *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.* 1 ed. 1990, Berlin Hamburg: Verlag Paul Parey. 342.



21. Amling M, Delling G, *Cell biology of osteoclasts and molekular mechanisms of bone resorption*. Pathologe 17(5):358-67, 1996.
22. Baumhoer D, Steinbrück I, Götz W, *Histologie mit Schemazeichnung*. 2000, München: Urban und Fischer Verlag München;Jena.
23. Jilka RL, *Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis*. Med Pediatr Oncol, 2003. **41**: p. 182-185.
24. Cruess RL, Dumont J, *Fracture healing*. Can J Surg, 1975. **18**: p. 403-413.
25. Newman RJ, D.R., Francis MJ, *Nuclear magnetic resonance studies of fracture repair*. Clin Orthop, 1985: p. 297-303.
26. Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson J, Isaksson O, *Effects of Local Administration of GH and IGF-I on longitudinal Bone Growth in Rats*. Am J Physiol, 1986. **250**: p. 367-372.
27. Barnes GL, Kostenuik P, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, *Growth Factor Regulation of Fracture Repair*. J Bone Miner Res, 1999. **14**: p. 1805-1815.
28. Baylink D, Finkelman R, Mohan S, *Growth Factors to Stimulate Bone Formation*. J Bone Miner Res, 1993. **8, Supplement 2**: p. 565-572.
29. Stürmer KM, *Pathophysiology of disrupted bone healing*. Orthop, 1996 Sep. **25(5)**: p. 386-393.
30. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, Mc Guinness A, Redmond HP, *Is human fracture hematoma inherently angiogenic?* Clin Orthop Relat Res, 2000: p. 224-237.
31. Braun W, Rüter A, *Frakturheilung: Morphologische und Physiologische Gesichtspunkte*. Unfallchirurg, 1996. **99(1)**: p. 59-67.
32. Simmons DJ, *Fracture healing perspectives*. Clin Orthop, 1985. **200**: p. 100-133.
33. Brighton CT, *The biology of fracture repair*. Instr Course Lect, 1984. **33**: p. 60-82.
34. Einhorn TA, *The sciences of Fracture Healing*. 2005. **19**: p. 4-6.
35. Iwak A, Jinguishi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, Sugioka Y, *Localisation and Quantification of Proliferating Cells During Rat Fracture Repair: Detection of Proliferating Cell Nuclear Antigen by Immunohistochemistry*. J Bone Miner Res, 1997. **12**: p. 96-102.
36. Klaushofer K, Peterlik M, *Pathophysiologie der Knochenbruchheilung*. Radiologe, 1994. **34**: p. 709-714.
37. Joyce M, Jinguishi S, Bolander M, *Transforming Growth Factor in the Regulation of Fracture Repair*. Orthop Clin North Am, 1990. **21 A**: p. 199-209.
38. Palmer RH, Hulse DA, Hyman WH, Palmer DR, *Principles of Bone Healing and Biomechanics of External Skeletal Fixation*. AVet Clin Nort Am Small Anim Pract, 1992. **22**: p. 45-68.
39. Yoo JU, Johnstone B, *The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair*. Clin Orthop, 1998. **355 Suppl**: p. 73-81.
40. Willenegger H, Perren SM, Schenk R, *Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung*. Chirurg, 1971. **42(6)**: p. 241-252.
41. Einhorn TA, *The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing*. Clin Orthop, 1998: p. 7-21.
42. Mc Kibbin B, *The biology of fracture healing in long bones*. J Bone Joint Surg Br, 1978. **60-B(2) Review**: p. 150-162.
43. Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ, *Recapitulation of Signals Regulation Embryonic Bone Formation During Postnatal Growth and in Fracture Repair*. Mech Dev, 1998. **71**: p. 65-76.
44. Furguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA, *Does Adult Fracture Repair Recapitulate Embryonic Skeletal Formation?* Mech Dev, 1999. **87**: p. 57-66.
45. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Chao EY, *Internal Remodeling of Periosteal New Bone During Fracture Healing*. J Orthop Res, 1990. **8**: p. 238-246.

46. Frost HM, *The Biology of Fracture Healing. an Overview for clinicians. Pat I.* Clin Orthop, 1989: p. 283-293.
47. Eyre Brook AL, *The Periosteum: Its Function Reassessed.* Clin Orthop Relat Res, 1994: p. 300-307.
48. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittinger M, *Segmental Bone Repair by Tissue-Engineered Periosteal Cell Transplants with Bioresorbable Fleece and Fibrin Scaffolds in Rabbits.* Biomaterials, 2000. **21**: p. 1145-1153.
49. Wurzel KK, Kubler NR, Reuther JF, *Einfluß des Periosts auf die induzierte Knochenbruchheilung durch autolytierten, antigenextrahierten, allogenen Knochen.* 2000. **4(Suppl.2)**: p. 459-464.
50. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grand RT, *Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells.* Plast Reconstr Surg, 1998. **101(3)**: p. 567-574.
51. Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA, *Femoral Shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone.* Int J Oral Maxillofac Surg, 1996. **25(3)**: p. 223-228.
52. Takushima A, Kitano Y, Harrii K, *Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits.* J Surg Res, 1998. **78(1)**: p. 68-77.
53. Vogelin E, Brekke JH, Jones NF, *Heterotope und orthotope Knochenbildung mit einem Periostlappen, einer Matrix und rh-BMP-2 (bone morphogenetic protein) im Rattenmodell.* Mund Kiefer Gesichtschirurgie, 2000. **4(Suppl.2)**: p. 454-458.
54. Arnold U, Lindenhayn K, Perka C, *In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites.* Biomaterials, 2002. **23(11)**: p. 2303-2310.
55. Redlich A, Perka C, Schultz O, Spitzer R, Häupl T, Burmester GR, Sittinger M, *Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces.* J Mater Sci, 2003. **10**: p. 767-772.
56. Deren JA, Kaplan FS, Brighton CT, *Alkaline Phosphatase Production by Periosteal Cells at various Oxygen Tension In Vitro.* Clin Orthop, 1990. **252**: p. 307-312.
57. Weber BG, Cech O, *Pseudarthrosen.* 1973, Bern, Stuttgart, Wien: Huber.
58. Taylor JC, *Delayed union and nonunion of fractures.* Crenshaw AH, editor. Campbell's operative orthopaedics, 1992: p. 345.
59. Wiss DA, Stetson WB, *Tibial Nonunion: Treatment Alternatives.* J Am Acad Orthop Surg, 1996. **4**: p. 249-257.
60. Runkel M, Rommens PM, *Pseudarthrosis.* Unfallchirurg, 2000. **103**: p. 51-63.
61. Dorr LD, *Continuous passive motion offers no benefit to the patient.* Orthopaedics, 1999. **22(4)**: p. 393.
62. Lehmann WB, Atar D, Feldman DS, Gordon JC, Grant AD, *Congenital pseudarthrosis of the Tibia.* J Ped Orthop, 2000. **9**: p. 103-107.
63. Gardner TN, Stoll T, Marks L, Mishra S, Tate MK, *The Influence of Mechanical Stimulus on the Pattern of Tissue Differentiation in a Long Bone Fracture-an FEM Study.* J Biomech, 2000. **33**: p. 415-425.
64. Cleas LE, Heigele CA, *Magnitudes of Lokal Stress and Strain Along Bony Surface Predict the Course and Type of Fracture Healing.* J Biomech, 1999. **32**: p. 255-266.
65. Carter DR, Blenman PR, Beaupre GS, *Correlations Between Mechanical Stress History and Tissue Differentiation in Initial Fracture Healing.* 1988, 1988. **6**: p. 736-748.
66. Brighton CT, Krebs AG, *Oxygen Tension of Nonunion of Fractured Femurs in the Rabbit.* Surg Gynecol Obstet, 1972. **135**: p. 379-385.
67. Babhulkar S, Pande K, *Nonunion of the Diaphysis of Long Bones.* Clin Orthop Relat Res, 2005: p. 50-56.

68. Cullinane DM, Fredrick A., Eisenberg SR, Pacicca D, Elman MV, Lee C, Salisbury K, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, *Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect*. J Orthop Res, 2002. **20**: p. 579-586.
69. Court-Brown C, Mc Queen M, *Compartment syndrome delays tibial union*. Orthop Scand, 1987. **58**: p. 249-252.
70. Mechrefe AP, Koh Ey, Trafton PG, DiGiovanni CW, *Tibial nonunion*. Foot Ankle Clin, 2006. **11**: p. 1-18.
71. Schmitz JP, Hollinger JO, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop, 1986. **205**: p. 299-308.
72. Park SH, Silva M, Bahk WJ, McKellop H, Lieberman JR, *Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model*. J Orthop Res, 2002. **20**: p. 1197-1204.
73. Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM, *The biology of bone grafting*. J Am Acad Orthop Surg, 2005. **13**: p. 77-86.
74. Bier A, *Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudarthrosen und von verspäteter Callusbildung durch Bluteinspritzung*. Medizinische Klinik, 1905. **1**: p. 6-7.
75. Safoury Y, *Free vascularized fibula for the treatment of traumatic bone defects and nonunion of the forearm bones*. J Hand Surg, 2005. **30-Br**: p. 67-72.
76. Friedlaender GE, *Osteogenic protein-1 in treatment of tibial nonunions: current status*. Surg Technol Int, 2004. **13**: p. 249-252.
77. Dimitriou R, Dahabre Z, Katsoulis E, Matthews SJ, Branfoot T, Giannoudis PV, *Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions*. Injury, 2005. **36 Suppl 4**: p. 51-59.
78. Yajima H, Tamai S, Mizumoto S, Inada Y, *Vascularized fibular grafts in the treatment of osteomyelitis and infected nonunion*. Clin Orthop Relat Res, 1993. **293**: p. 256-264.
79. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS, *Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity, A statical evaluation*. Spine, 1995. **20(9)**: p. 1055-1060.
80. Mulier JC, Spaas F, *Out-patient Treatment of Surgically Resistent Non-unions by Induced Pulsing Current - Clinical Results*. Arch Orthop Traumat Surg, 1980. **97**: p. 293-297.
81. Bassett CAL, Pilla AA, Pawluk RJ, *A Non-Operative Salvage of Surgically-Resistant Pseudarthroses and Non-Unions by Pulsing Electromagnetic Fields*. Clin Orthop, 1977. **124**: p. 128-143.
82. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R, *Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunion*. Clin Orthop, 1994. **266**: p. 259-270.
83. Borisenko GG, *The prospect of pluripotent stem cell-based therapy*. Biomed Khim, 2009. **55(5)**: p. 570-586.
84. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AL, *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*. Bone, 1992. **13**: p. 81-88.
85. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG, *Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application*. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. **10**: p. 165-181.
86. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moormann MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**: p. 143-147.
87. Devine MJ, Mierisch C, Jang E, Andersen PC, Balian G, *Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model*. J Orthop Res, 2002. **20(6)**: p. 1232-1239.

88. Petite H, Viateau V., Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G, *Tissue-engineered bone regeneration*. Nat Biotechnol, 2000. **18(9)**: p. 959-963.
89. Devine SM, *Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic?* J Cell Biochem Suppl, 2002. **38**: p. 73-79.
90. Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, Jiang CC, *Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis*. Stem Cells, 2003. **21**: p. 190-199.
91. Owen M, Friedenstein AJ, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
92. Zhang GQ, Fang CH, Chi DZ, *Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat mesenchymal stem cells into a hepatocyte lineage in vitro*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2005. **43**: p. 716-720.
93. Shi Q, Raffi S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moor MA, Storb RF, Hammond WP, *Evidence for circulating bone marrow derived endothelial cells*. Blood, 1998. **92**: p. 362-367.
94. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Baosheng L, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bondine DM, Ammarosa L, Anversa P, *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**: p. 701-705.
95. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F, *Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**: p. 1528-1530.
96. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB, *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*. J Neurosci Res, 2000. **61**: p. 364-370.
97. Sanche-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR, *Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro*. Exp Neurol, 2000. **164**: p. 247-256.
98. 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 USA, 1999. **96**: p. 10711-10716.
99. Arnold S, Heiduschka P, Klein H, Klinz FJ, Absenger Y, Schmidt A, Schinkothe T, Brixius K, Kolowski J, Desai B, Bloch W, Addicks K, *Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**: p. 551-565.
100. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Di Girolamo 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**: p. 3908-3913.
101. Eglitis MA, Mezey E, *Haemopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**: p. 4080-4085.
102. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R, *Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report*. J Orthop Trauma, 1989. **3(4)**: p. 276-282.
103. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng Part A, 2007. **13**: p. 947-955.
104. Bajada S, Harrison PE, Ashton BA, Cassar-Pullicino VN, Ashammakhi N, Richardson JB, *Successful treatment of refractory tibial nonunion using calcium sulphate and bone marrow stromal cell implantation*. J Bone Joint Surg Br, 2007. **89**: p. 1382-1386.

105. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J, *The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous betatricalcium phosphate in posterior spinal fusion*. *Biomaterials*, 2008. **29**: p. 3973-3982.
106. Tohma Y, Hajime O, Morishita T, Dohi Y, Tadokoro M, Tanaka Y, Takakura Y, *Bone marrow-derived mesenchymal cells can rescue osteogenic capacity of devitalized autologous bone*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008.
107. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T, Tanaka Y, *Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model*. *Bone*, 2010. **46**: p. 418-424.
108. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB, *TAZ a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation*. *Science*, 2005. **309**: p. 1074-1078.
109. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R, *The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies(II): Implant evolution and surgical technique on a rat's femur*. *Biomed. Technik*, 2005a. **50**: p. 137-142.
110. Dixon WJ, *BMDP Statistikal Software Manual*. 1993. **Volume 1 and 2**.
111. Roach HI, Shearer J, Archer C, *The choice of an experimental model*. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1989. **71-B**: p. 549-553.
112. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J, *Interspecies Differences in Bone Composition, Density, and Quality: Potential Implications for in vivo Bone Research I*. *Endocrinology*, 1998. **139**: p. 663-670.
113. Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H, *Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study*. *Arq Bras Cardiol*, 2007. **88(1)**: p. 104-109.
114. Ekeland A, Engesoeter L, Langeland N, *Influence of age on mechanical properties of healing fractures and intact bones in rats*. *Acta Orthop Scand*, 1982. **53**: p. 527-534.
115. Jorgensen TE, *Measurements of stability of cural fractures treated with Hoffmann osteotaxis: Parts 1-4*. *Acta Orthop Scand*, 1972. **43**: p. 188.
116. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L, *Mechanical Characterization of External Fixator Stiffness for a Rat Femoral Fracture Model*. *Inc. J Orthop Res*, 2009. **27**: p. 687-693.
117. Buray F, Bourgois R, Donkerwolcke M, *Elastic external fixation: Concepts in external fixation: A biomechanical study of the half-frame*. *Concept in External Fixation*, ed. P.M.e. In Seligson D. 1982, New York: Grune & Stratton. 67.
118. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, et al., *Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur*. *J Orthop Res*, 2003. **21**: p. 503-510.
119. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P, *An experimental model for non-union in rats*. *Injury*, 1995. **26**: p. 681-686.
120. Kaspar K, Schell H, Seebeck P, *Angle stable locking reduces interfragmentary movements and promotes healing after unreamed nailing. Study of a displaced osteotomy model in sheep tibiae*. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. **87**: p. 2028-2037.
121. Claes LE, Wilke H, Augat P, Rubenacker S, Margevicius KJ, *Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation*. *Clin Biomech*, 1995. **10**: p. 227-234.
122. Claes LE, Augat P, Suger G, Wilke HJJ, *Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing*. *Orthop Res*, 1997. **15**: p. 577-584.

123. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, Duda GN, *A New Animal Model for Bone Atrophic Nonunion: Fixation by External Fixator*. Inc. J Orthop Res, 2008. **26**: p. 1649-1655.
124. Harrison LJ, Cunningham J, Stromberg L, Goodship AE, *Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model*. J Orthop Trauma, 2003. **17(1)**: p. 11-21.
125. Prockop DJ, *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**: p. 71-74.
126. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R, *Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy*. Exp Hematol, 2000. **28**: p. 707-715.
127. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kato Y, *A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**: p. 503-508.
128. Luyten FP, *Mesenchymal stem cells in osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2004. **16**: p. 599-603.
129. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I, *Number and Proliferative Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells Are Modulated Positively in Multiple Trauma Patients and Negatively in Atrophic Nonunions*. Calcif Tissue Int, 2007. **80**: p. 294-300.
130. Kallai I, Harryvan Lenthe G, Ruffoni D, Zilberman Y, Müller R, Pelled G, Gazit D, *Quantitative, structural, and image-based mechanical analysis of nonunion fracture repaired by genetically engineered mesenchymal stem cells*. Journal of Biomechanics, 2010(doi:10.1016/j.jbiomech.2010.04.031).
131. Markbreiter LA, Pelker RR, Friedlaender GE, Peschel R, Panjabi MM, *The effect of radiation on the fracture repair process. A biomechanical evaluation of a closed fracture in a rat model*. J Orthop Res, 1989. **7(2)**: p. 178-183.
132. Mauney JR, Kaplan DL, Volloch V, *Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion*. Biomaterials, 2004. **25**: p. 3233-3243.
133. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanches-Guijo FM, Villaron E, Barbado V, Tabera S, Diez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del-Canizo MC, *Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification*. Exp Hematol, 2008. **36(8)**: p. 1014-1021.
134. Boenisch T, *Immunchemische Färbemethoden (Handbuch)*. 3 ed. 2003: Dako Cytomation GmbH. 88.
135. Parfitt AM, *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system*. Bone Miner., 1988 Apr. **4(1)**: p. 1-5.
136. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ, *Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability*. J Orthop Res, 2005. **23(3)**: p. 639-645.
137. Schiebler TH, *Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie*, ed. ü.u.e.v.T.H.S. 2. korr. Auflage nach der amerikanischen Ausgabe von L.C. Junqueira und J.Carneiro übers., U.Peiper und Fr. Schneider. 1986, Berlin/Heidelberg/New York: Springer Verlag.
138. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, Bragulla H, Haas NP, Duda GN, *Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing*. Bone, 2006. **38(4)**: p. 547-554.

139. Hulth A, *Current concepts of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1989. **249**: p. 265-284.
140. Radasch RM, *Biomechanics of bone and fractures*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1999. **29(5)**: p. 1092-1044.
141. Volpon JB, *Nonunion using a canine model*. Arch Orthop Trauma Surg, 1994. **113(6)**: p. 312-317.
142. Jones CB, Mayo KA, *Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques*. J Orthop Trauma, 2005. **19(10 Suppl)**: p. 11-13.
143. Reed AA, Joyner C, Brownlow HC, Simpson AH, *Human atrophic fracture non-unions are not avascular*. J Orthop Res, 2002. **20(3)**: p. 593-599.
144. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH, *The vascularity of atrophic non-unions*. Injury, 2002. **33(2)**: p. 145-150.
145. Schindeler A, Mc Donald MM, Paul Bokkoa, David G. Little, *Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2008. **19**: p. 459-466.
146. Rhinelander FW, *Tibial blood supply in relation to fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1974. **105**: p. 34-81.
147. Uthoff HK, Goto S, Cerckel PH, *Influence of Stable Fixation on Trabecular Bone Healing: A Morphologic Assessment in Dogs*. Journal of Orthopaedic Research, 1987. **5**: p. 14-22.
148. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH, *Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur*. J Orthop Res, 2003. **21(3)**: p. 503-510.
149. Marsh DR, Li G, *The biology of fracture healing: optimising outcome*. Br Med Bull, 1999. **55(4)**: p. 856-69.
150. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg V M, Caplan AI, *Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum*. Bone, 1990. **11(3)**: p. 181-8.
151. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R, *Cell therapy for bone disease: a review of current status*. Stem Cells, 2003. **21(5)**: p.:610-9.
152. Probst A, S.H., *Cellular mechanisms of bone repair*. J Invest Surg, 1997. **10(3)**: p. 77-86.
153. Peters A, Thoben D, Lienau J, Schell H, Bail JH, Matziolis G, Duda NG, Kaspar K, *Locally applied osteogenic predifferentiated progenitor cells are more effective than undifferentiated mesenchymal stem cells in the treatment of delayed bone healing*. Tissue Eng Part A, 2009. **15(10)**: p. 2947-2954.
154. Bach B, *Dissertation: Einfluss autologer osteogen prädifferenzierter mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung im atrophien Pseudarthrose-Modell der Ratte*. Journal-Nr.: 3234, Berlin 2008.
155. Shao Z, Lui B, Peng Q, Liu W, Liu Y, Liu R, Xu J, Liu L, *Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible*. Plast Reconstr Surg, 2007. **119(2)**: p. 500-507.
156. Schliephake H, Knebel JW, Aufderheide M, Tauscher M, *Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2001. **30(6)**: p. 531-537.
157. Srouji S, Livne E, *Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease*. Mech Ageing Dev, 2005. **126(2)**: p. 281-287.
158. Makino T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH, *Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7*. J Orthop Res, 2005. **23(3)**: p. 632-638.



159. Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Cancedda R, Quarto R, *Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells*. Wound Repair Regen, 2001. **9(6)**: p. 460-466.
160. Boden SD, *Bioactive factors for bone tissue engineering*. Clin Orthop Relat Res, 1999. **367**: p. 84-94.
161. Meijer GJ, Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA., *Cellbased bone tissue engineering*. PLoS Med, 2007. **4**: p. e9.
162. 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**: p. 586-593; discussion 594-585.
163. Mankani MH, Kuznetsov S, Shannon B, Nalla RK, Ritchie RO, Qin Y, Robey PG, *Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells*. Am J Pathol, 2006. **168**: p. 542-550.
164. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M, *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med, 2001. **344(5)**: p. 385-386.
165. Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, *Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula*. Artif Organs, 2006. **30**: p. 960-962.
166. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y, *Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**: p. 196-201.
167. Abdelmagid SM, Barbe MF, Rico MC, Salihoglu S, Arango-Hisijara I, Selim AH, Anderson MG, Owen TA, Popoff SN, Safadi FF, *Osteoactivin, an anabolic factor that regulates osteoblast differentiation and function*. Exp Cell Res, 2008. **314**: p. 2334-2351.
168. Abdelmagid SM, Barbe MF, Arango-Hisijara I, Owen TA, Popoff SN, Safadi FF, *Osteoactivin acts as downstream mediator of BMP-2 effects on osteoblast function*. J Cell Physiol, 2007. **210**: p. 26-37.
169. Owen TA, Smock SL, Prakash S, Pinder L, Brees D, Krull D, Castleberry TA, Clancy YC, Marks SC, Safadi FF, Popoff SN, *Identification and characterization of the genes encoding human and mouse osteoactivin*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2003. **13**: p. 205-220.
170. Hu J, Qi MC, Zou SJ, Li JH, Luo E, *Callus formation enhanced by BMP-7 ex vivo gene therapy during distraction osteogenesis in rats*. J Orthop Res, 2007. **25**: p. 241-251.
171. Park J, Ries J, Gelse K, Kloss F, von der Mark K, Wiltfang J, Neukam FW, Schneider H, *Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes*. Gene Ther, 2003. **10**: p. 1089-1098.

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an Dr. H. Schell für die Durchsicht der Arbeit.  
Dr. rer. nat. K. Failing und Frau M. Sparenberg danke ich für die statistische Betreuung  
meiner umfangreichen Datensammlung.  
Meiner Familie danke ich ganz besonders für Ihre ständige Unterstützung.

## Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation ist von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst worden. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Ich versichere, keine außer den hier angegebenen Hilfsmitteln und Literaturstellen verwendet zu haben.

Berlin, den 28.09.2011

Antonia Ertelt