

Aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die lokale Applikation von CD31+ Zellen aus dem peripheren Blut stimuliert die biologisch verzögerte Knochenheilung - μ CT Analysen am Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Filter

aus Spremberg

Datum der Promotion: 09.12.2016

1.0 Einleitung	1
1.1 Der physiologische Aufbau des Knochens	1
1.2 Das physiologische Knochenwachstum	3
1.2.1 Desmale Ossifikation	3
1.2.2 Chondrale Ossifikation	3
1.3 Frakturen	3
1.4. Die physiologische Knochenregeneration	4
1.4.1 Bedeutung der Neoangiogenese für die Knochenregeneration	5
1.4.2 Pro- und anti-inflammatorische Prozesse am Frakturspalt	6
1.4.3 PBMCs	6
1.4.4 CD31+ Zellen	7
1.4.5 CD14+ Zellen	7
1.5 Die prolongierte Knochenregeneration	8
1.6 Konsequenzen des prolongierten Heilungsverlaufes	9
1.7 Die konventionelle Therapie von Frakturen	10
2.0 Ziele der Arbeit	12
3.0 Material und Methoden	13
3.1 Tierversuch	13
3.1.1 Tiermodell	13
3.1.2 Prozedere Zellaufreinigung	14
3.1.3 Prozedere Operation, Anlage von Fixateur und Osteotomie	17
3.1.4 Durchführung der μ CT Studien	21
3.1.5 Tierhaltung und -pflege	25
3.2 Beschreibung Auswertung	25
3.2.1 Verwendete Hardware	25
3.2.2 Verwendete Software	26
3.2.3 Prozedere μ CT Analyse	27
3.2.4 Bestimmung des Thresholds,	28
3.3 Statistik, graphische Darstellung	30
4.0 Ergebnisse	33
4.1 Auswahl der Zellpopulationen	33
4.2 PBMC Gruppe	34
4.2.1 in vivo	34
4.2.2 in vitro	35
4.3 CD31+ Gruppe	36

4.3.1 in vivo	36
4.3.2 in vitro	37
4.4 CD31+/CD14- Gruppe	39
4.4.1 in vivo	39
4.4.2 in vitro	40
4.5 CD 31+/CD14+ Gruppe	41
4.5.1 in vivo	41
4.5.2 in vitro	42
4.6 Graphische Aufarbeitung der Ergebnisse	43
5.0 Diskussion	50
5.1 Diskussion der erhobenen Daten	50
5.2 Vergleichbarkeit von in vivo mit in vitro Studien	51
5.3 Diskussion des Versuchsaufbaus	51
5.3.1 Tierversuch	51
5.3.2 Fixateursystem	52
5.3.3 Tod von Versuchstieren	53
5.4 Diskussion der Auswertung	53
5.5 Weitere mögliche Einflussfaktoren auf den Heilungsprozess	55
5.6 Alternative Ansätze zur Stimulation der Knochenheilung	56
5.6.1 klinische Ansätze	57
5.6.2 präklinische Ansätze	59
5.7 Ausblick auf eine potentielle klinische Anwendbarkeit der CD31+ Zellen	61
6.0 Abstract	64
7.0 Abstract (english)	66
8.0 Abkürzungsverzeichnis	68
9.0 Abbildungsverzeichnis	70
10.0 Tabellenverzeichnis	72
11.0 Literatur	73
Danksagung	79
Eidesstattliche Versicherung	80
Lebenslauf	81

1.0 Einleitung

1.1 Der physiologische Aufbau des Knochens

Knöcherne Strukturen stellen einen spezialisierten Gewebstypus mit hoher mechanischer Belastbarkeit dar. Grundsubstanz ist die Knochenmatrix, bestehend aus anorganischen und organischen Komponenten. Die organischen Komponenten, hauptsächlich Kollagen vom Typ I, aber auch Proteoglykane und Glykoproteine, stellen etwa ein Drittel der Substanz der Knochenmatrix dar. Sie bilden das Grundgerüst aller knöchernen Strukturen. Zusätzliche Stabilität wird ihnen durch die anorganischen Komponenten des Knochens verliehen, hier vor allem durch Kalziumsalze und Hydroxylapatitkristalle. Produziert werden die organischen Komponenten durch Osteoblasten, Zellen mesenchymalen Ursprungs mit potenten pro-osteogenen Eigenschaften [1, 2]. Weitere funktionelle Zellen des Knochen sind die Osteozyten, die insgesamt deutlich stoffwechsellaktiver sind und die vielkernigen Osteoklasten, welche, im Gegensatz zu den bereits erwähnten Osteoblasten, knochenabbauende Funktion besitzen und Teil des menschlichen Phagozytosesystems sind [2]. Diese Osteoblasten und Osteoklasten sind also in ihrer gegenseitigen Wechselwirkung bestimmend für die Umbauprozesse des Knochens (Turnover).

Um eine Balance zwischen Stabilität und Gewicht im Körper herzustellen, sind die menschlichen Knochen größtenteils keine homogen kompakten Elemente. Lediglich die äußere Schicht, als Substantia compacta oder Substantia corticalis bezeichnet, erfüllt diese Kriterien. Die innen liegenden Bereiche besitzen entweder einen markgefüllten Hohlraum, wie beispielsweise in den langen Röhrenknochen der Extremitäten vorzufinden, oder eine Substantia spongiosa. Letztere zeichnet sich durch ihre vielfach quervernetzten trabekulären Strukturen mit einem geringen Eigengewicht bei gleichzeitiger hoher mechanischer Stabilität, vor allem bei Druck und Zugkräften, aus.

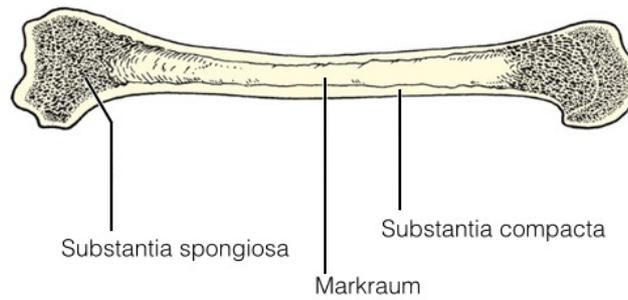


Abb. 1: Der anatomische Aufbau eines Röhrenknochens. Modifiziert aus [2].

An ihren Grenzen, außer an den Ansatzstellen von Sehnen und Bändern sowie an Gelenkinnenflächen, werden Knochen mittels der Sharpey'schen Fasern fest von einer bindegewebigen Schicht umgeben: dem Periost an der Grenze zur äußerlichen Umgebung und dem Endost an Knochenmark-haltigen Abschnitten an der Mark-Matrix-Grenze. Diese Schicht hat maßgeblichen Anteil an der Nährstoffversorgung des Knochens, ist aber auch an Regenerationsprozessen beteiligt. Dafür ursächlich ist der Gehalt an osteogenen Vorläuferzellen innerhalb des Stratum osteogenicum, dem unmittelbar dem Knochen anliegenden Bereich des Periosts [2].

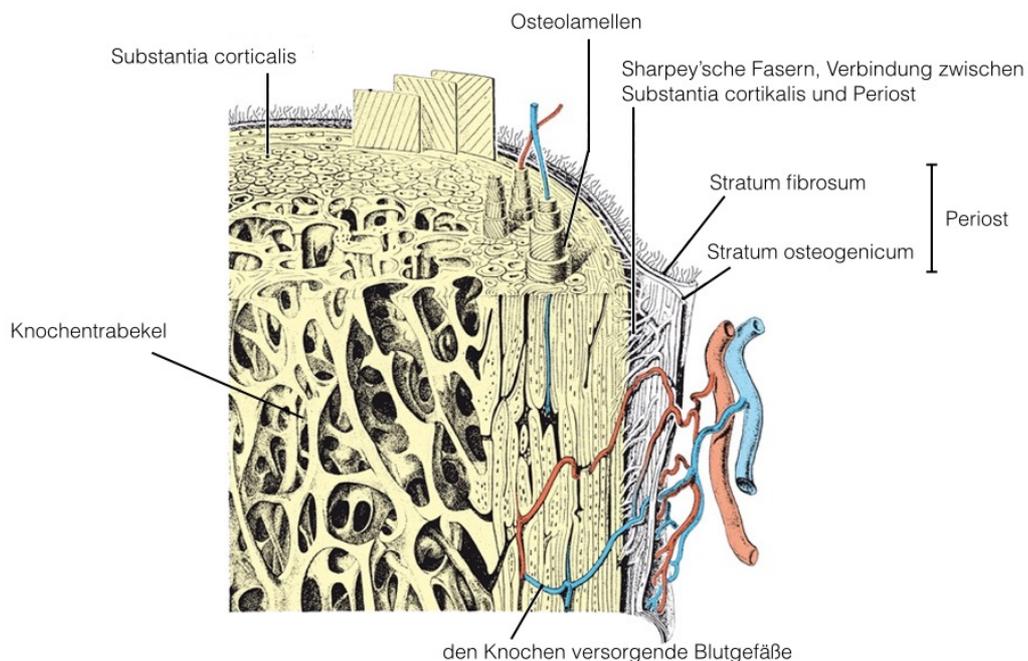


Abb. 2: Detaildarstellung des Knochenaufbaus. Modifiziert aus [2].

1.2 Das physiologische Knochenwachstum

In der Entwicklung des Knochens werden mit der desmalen und der chondralen Ossifikation im Wesentlichen zwei Wachstumsformen unterschieden.

1.2.1 Desmale Ossifikation

Diese Wachstumsform wird auch als direktes Knochenwachstum beschrieben. Die pro-ostegenen Osteoblasten produzieren hierbei die zunächst wenig druckstabile Knochenmatrix, in die sich im weiteren Verlauf die anorganischen Mineralien festsetzen. Als Ausgangspunkte dienen primäre Ossifikationszentren, in denen diese Prozesse zuerst beginnen und von denen das weitere Wachstum ausgeht. Es findet also ein gerichtetes Wachstum von ausknöchernden Strukturen statt. Dies betrifft vorrangig die Knochen des Schädels und des Gesichtes.

1.2.2 Chondrale Ossifikation

Der Knochenaufbau bei der chondralen Ossifikation zeigt sich grundlegend anders, da hier der Verlauf des entstehenden Knochens bereits durch eine hyaline Knorpelstruktur vorgegeben ist, welche lediglich zu Knochen umgebaut wird. Deswegen wird diese Form auch als indirekte Ossifikation bezeichnet, wobei noch zwei Unterformen unterschieden werden können: zum einen die enchondrale Ossifikation, welche an den langen Röhrenknochen eher dem Längenwachstum dient und sich durch den vollständigen Ersatz des vorbestehenden Knorpelgewebes durch Knochenstrukturen auszeichnet. Zum anderen die perichondrale Ossifikation, wodurch die Röhrenknochen vorrangig an Dicke gewinnen. Hierbei werden die präexistenten kartilaginösen Strukturen nicht nur ersetzt, ihnen lagert sich darüber hinausgehend noch knöchernes Gewebe an den äußeren Oberflächen an.

1.3 Frakturen

Als Frakturen werden definitionsgemäß vollständige Kontinuitätsunterbrechungen eines Knochens bezeichnet [3]. Dies schließt in aller Regel, ausgenommen beispielsweise die Grünholz Fraktur bei Kindern, die Durchtrennung des Periost und des Endost mit ein.

Ursächlich ist dabei ein externer Krafteinfluss, der die individuelle mechanische Belastbarkeit des jeweiligen Knochens übersteigt.

Im klinischen Alltag existieren dabei eine Vielzahl von Fraktur-Klassifikationen, die sich unter anderem nach dem Verlauf der Frakturlinie, der Zahl an Frakturfragmenten oder dem ursächlichen Trauma orientieren. Zur besseren Vergleichbarkeit und internationaler Kommunikation hat sich daher die Einteilung nach der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO Foundation) etabliert [4].

Insgesamt stellen Frakturen ein sehr häufiges klinisches Beschwerdebild dar, welches alle Altersgruppen der Bevölkerung weltweit betrifft. Allein in Deutschland wurden im Jahre 2013 über 820.000 Frakturen ärztlich behandelt [5].

1.4. Die physiologische Knochenregeneration

Eine Besonderheit des knöchernen Gewebes im menschlichen Körper ist die Fähigkeit zur vollständigen, narbenfreien Regeneration. Frakturen haben daher prinzipiell ein hohes Potential wieder zu heilen. Für das letztendliche Ergebnis im Hinblick auf Stellung, Beweglichkeit und Belastbarkeit eines Knochens nach ausgeheilter Fraktur spielen eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle. Zu allererst die Stellung der Frakturfragmente zueinander. Stehen diese optimal, das heißt ohne nennenswerten interfragmentären Spalt und in alle drei Ebenen in physiologischer Ausgangslage, so kann eine primäre Knochenheilung erfolgen. Dabei wird vorrangig das hohe regenerative Potential des Periosts genutzt, von wo mesenchymale Vorläuferzellen in die Frakturregion wandern und sich dort zu osteogenen Zellen differenzieren. Es entsteht zunächst Osteoid, noch nicht verkalkter Knochen, welcher im weiteren Verlauf durch Mineralisierung wieder mechanisch belastbar wird.

Als sekundäre Knochenheilung wird die weit häufigere Form bezeichnet, bei der mehrere Zwischenschritte zur Wiederherstellung der Belastbarkeit nötig sind. Sie läuft auch bei nicht optimaler Stellung der Frakturfragmente zueinander ab. Solch ein Zusammenwachsen der Fragmente in unphysiologischer Positionierung, kann für die Patienten negative Auswirkungen auf den Genesungsprozesses haben und langfristig mit entsprechenden Einschränkungen von Beweglichkeit und Stabilität verbunden sein, weswegen in der konventionellen Therapie der Frakturen, ein besonderes Augenmerk auf der Fixierung der Frakturfragmente in korrekter Lage liegt.

Prinzipiell ist der Ausgangspunkt der Heilung hier die Ausbildung eines Frakturhämatoms. In ihm reichern sich Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks an und bringen Stoffwechseledukte und -metabolite für den Knochenneuaufbau mit sich. Die erste sich bildende Brücke zwischen den Fragmenten besteht dann aus ungerichteten bindegewebigen Kallusstrukturen, die in der Regel das Volumen des ursprünglichen Knochens an dieser Stelle überschreiten. Diese Kallusstrukturen bieten noch keine mechanische Stabilität, bilden aber die Grundlage für die Ausbildung des neuen Knochens. Sie beginnen über eine knorpelige Zwischenstufe zu mineralisieren und bilden zunächst einen Geflechtknochen (Primärknochen) aus. Unter dem Einfluss der physiologischen Belastungsvektoren wird dieser zu gerichteten Lamellenknochen (Sekundärknochen) umgebaut, der seine trabekulären Strukturen entsprechend dieser direktonalen externen Kräfteinflüsse ausgerichtet hat und prinzipiell die mechanische Stabilität des ursprünglichen Knochens vor der Fraktur aufweisen kann [6].

1.4.1 Bedeutung der Neoangiogenese für die Knochenregeneration

Einer der wesentlichen Faktoren für einen adäquaten Wiederaufbau knöcherner Strukturen in Folge einer Fraktur ist die Neoangiogenese [7-9]. Induziert durch Wachstumsfaktoren wie VEGF, beginnen mit dem Umbau des Frakturhämatoms neue Gefäße in den Frakturspalt und die angrenzenden Randgebiete einzusprießen [10, 11]. Sie bringen Nährstoffe für die obligaten lokalen anabolen Stoffwechselprozesse, transportieren Abbauprodukte fort und sind Grundlage für die vermehrte Migration von mesenchymalen Vorläuferzellen in die entsprechende Region.

Lienau et al. konnten dies beispielsweise anhand histologischer Analysen an einem Osteotomie-Modell am Schaf herausstellen [7]. Die ersten Gefäßneubildungen konnten sie am siebten Tag postoperativ detektieren. Im Vergleich zwischen einem Modell mit physiologischer Heilung und einem mit mechanisch induzierter verzögerter Heilung ließ sich durch mRNA-Analysen lokaler angiogener Wachstumsfaktoren der Einfluss der Neoangiogenese auf den Heilungsprozess demonstrieren.

An Ratten konnten Fassbender et al. in einem in vivo Osteotomiemodell zeigen, dass eine exogene Inhibierung der Neoangiogenese zu einem mechanisch instabileren Heilungsergebnis des Knochens im Vergleich zur Kontrollgruppe führt [12].

Darüber hinaus migriert mit der Etablierung des Frakturhämatoms und der sich anschließenden erhöhten lokalen Perfusion durch die neu ausgebildeten Gefäße, eine

Vielzahl von immunkompetenten Zellen in die Frakturregion. Die durch sie ausgelöste Immunreaktion ist ein elementarer Bestandteil in der Frakturheilung.

1.4.2 Pro- und anti-inflammatorische Prozesse am Frakturspalt

Insbesondere in der Frühphase der Knochenheilung nach dem Auftreten einer Fraktur, spielen sich eine Vielzahl von pro- und anti-inflammatorischen Prozessen im Frakturspalt ab [13, 14]. Dabei scheint die Balance dazwischen essentiell für das spätere Heilungsergebnis zu sein. Eine initiale Entzündungsreaktion am Frakturspalt zieht zytokinvermittelt (Interleukin-1, Interleukin-6, TNF-alpha und weitere) zunächst Zellen des Makrophagensystems an, um das Frakturhämatom abzuräumen. Des Weiteren werden durch die Inflammation Vorläuferzellen mit pro-angiogenen und pro-osteogenen Eigenschaften angezogen, sowie zahlreiche Wachstumsfaktoren wie BMPs (bone morphogenetic protein), FGFs (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) oder TGF-beta (transforming growth factor) freigesetzt.

Hierbei führt eine überschießende Immunreaktion ebenso zu negativen Auswirkungen im Hinblick auf eine vollständige, kontinuierlich wiederherstellende Heilung, wie eine verminderte Immunantwort [15]. In diesem Zusammenhang wurden zirkulierende, ausdifferenzierte CD8+ T-Gedächtniszellen (TEMRA), welche eine erhöhte pro-inflammatorische Antwort steuern, als bisher einziger bekannter Biomarker für eine prognostisch schlechtere Heilung identifiziert [16].

1.4.3 PBMCs

Bei der Immunantwort spielen eine Vielzahl von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) eine Rolle. Unter den PBMC wird die Gesamtpopulation der mononukleären Zellen im peripheren Blut zusammengefasst. Sie lässt sich über einen Dichtegradienten aus Vollblut abtrennen und enthält überwiegend Immun-, sowie einige Vorläuferzellen. Die einzelnen Bestandteile lassen sich anhand ihrer CD-Oberflächenmoleküle (cluster of differentiation) identifizieren und auftrennen.

1.4.4 CD31+ Zellen

CD31+ Zellen sind ein Teil der PBMC-Gesamtpopulation mit einer Vielzahl von immun-modulatorischen Funktionen [17-21] und zirkulieren im peripheren Blut. Auf ihrer Oberfläche besitzen sie unter anderem das Immunglobulin PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule). Sie wurden bereits mehrfach auf ihre proangiogenen Eigenschaften hin untersucht und konnten diesen Effekt bestätigen [22-26]. Diesbezüglich gibt es zahlreiche Arbeiten, wobei der Fokus stets auf anderen Gewebeentitäten, beispielsweise auf dem Myokard, lag [26, 27]. Nichtsdestotrotz machen, in Anbetracht der Bedeutung der Gefäßneubildung für den Heilungsprozess von Knochendefekten, die potentiellen pro-angiogenen und immun-modulatorischen Eigenschaften diese Zellpopulation attraktiv für die Verwendung zur lokalen, intraoperativen Applikation mit dem Ziel die Knochenheilung zu stimulieren. Vorstudien zeigten, dass fast alle Zellen der CD31+ Gruppe zudem CD45 an ihrer Oberfläche exprimieren, sowie teilweise CD14 [27].

1.4.5 CD14+ Zellen

Der CD14+ Oberflächenmarker ist gemeinhin von Vorläuferzellen des Makrophagensystems, wie etwa den Monozyten bekannt [28, 29]. Damit ist er auch in der PBMC-Gesamtpopulation enthalten und bisher meist im Zusammenhang mit akuten oder chronischen proinflammatorischen Prozessen untersucht worden.

Im Detail zeigt sich dabei eine durchaus heterogene Zellpopulation die eine Subgruppe der CD31+Zellen darstellt. Im peripheren Blut liegen also sowohl CD14+ wie auch CD14- Zellen mit dem Oberflächenmarker CD31 vor (Abb. 3).

Bisher standen CD14+ Zellen nicht im Fokus von Untersuchungen auf eine mögliche osteogene Kapazität hin, wohl aber sind ihre pro-angiogenen Eigenschaften und das Vorkommen als endotheliale Vorläuferzellen (sog. early endothelial outgrowth cells) bekannt [30]. Zudem besitzen sie eine Bindungskapazität für Lipopolysaccharide, worüber sie exogene bakterielle Komponenten binden und die Ausschüttung von Zytokinen stimulieren können, was ihre Kernkompetenz als Bestandteil des Monozyten-Makrophagen-Systems ist [31, 32].

Weiterhin konnten Hacket et al. zumindest in einer veterinärmedizinischen Studie am Pferd zeigen, dass ein Teil der mesenchymalen Vorläuferzellen, welche wesentlich an

der Neuformierung von Knochengewebe beteiligt sind, CD14+ Oberflächenmarker aufweisen [33].

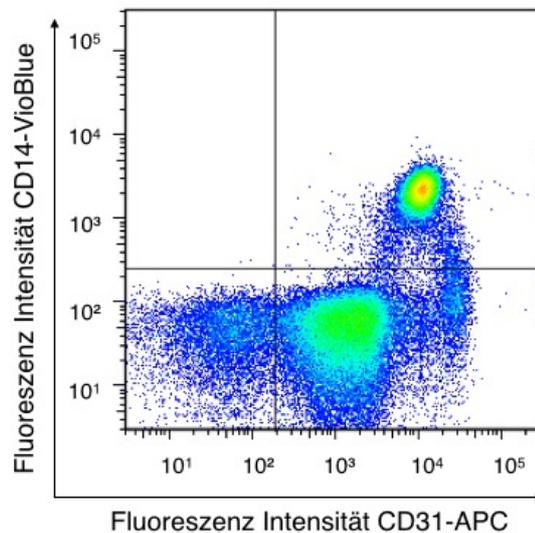


Abb. 3: Ergebnis Fluoreszenz-gestützter Durchflusszytometrie: CD14+ Zellen sind Teil der CD31+ Gesamtpopulation, nicht alle CD31+ Zellen sind jedoch CD14+.

1.5 Die prolongierte Knochenregeneration

In der gängigen Einschätzungen wird von einer verzögerten Knochenheilung ausgegangen, wenn Frakturen nach drei Monaten noch keinen Heilungsfortschritt oder nach sechs Monaten noch keine vollständige Verknöcherung des Frakturspaltes zeigen.

Es sind bereits eine Vielzahl von Risikofaktoren identifiziert worden, die an einem verzögerten Heilungsverlauf nach einer Fraktur ursächlich mitwirken. Epidemiologisch kommt vor allem den metabolischen Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus [34, 35] und Osteoporose [36] aufgrund der hohen Prävalenz in der Bevölkerung eine große Bedeutung zu. Zu dem stellt ein höheres Lebensalter einen Risikofaktor für eine verzögerte oder inadäquate Knochenheilung dar. Dies konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden [37-40], wobei zum einen das Lebensalter an sich, als auch die höhere Prävalenz an Komorbiditäten dabei eine Rolle zu spielen scheint. Muschler et al. konnten zudem zeigen, dass sich bei Frauen mit steigendem Alter die Zahl der verfügbaren osteogenen Vorläuferzellen im Knochenmark reduziert [41]. Lokal sind im höheren Alter zudem weniger Mediatoren mit stimulativen Einfluss auf die Neoangiogenese oder die Anlockung pro-osteogender Vorläuferzellen aufzufinden, wobei die

prinzipielle funktionelle Kapazität mesenchymaler Stammzellen (MSCs) konstant zu bleiben scheint [42].

Als weiterer negativer Einflussfaktor konnte das Rauchen identifiziert werden [43]. Meta-analytisch sahen Putal et al. dies im Fokus auf parodontale Knochenregeneration ebenfalls so [44]. Da TEMRA Zellen als bisher einziger bekannter Biomarker für eine prognostisch schlechtere Heilung identifiziert wurden und diese Zellen zu einer erhöhten proinflammatorischen Antwort im Frakturspalt führen, kann davon ausgegangen werden, dass eine überschießende Inflammation sich ebenfalls negativ auf das Heilungsergebnis auswirkt [16].

1.6 Konsequenzen des prolongierten Heilungsverlaufes

Die Folgen einer inadäquaten Frakturheilung stellen zum einen ganz individuell ein Problem für die jeweils betroffenen Patientinnen und Patienten dar, wirken sich aber auch gesellschaftlich durch vermehrte Behandlungskosten und Produktivitätsausfälle aus.

Eine der wesentlichen Komplikationen bei unvollständiger Frakturheilung stellt die mögliche Pseudarthrosenbildung dar. Als Pseudarthrosen, auch „Falschgelenk“ genannt, bezeichnet man die ausbleibende knöcherne Vereinigung zweier Frakturenenden nach einem Zeitraum von sechs Monaten [3]. Sie zeigt eine deutlich verminderte mechanische Belastbarkeit mit entsprechender konsekutiver Funktionseinschränkung und Schmerzentwicklung. Dadurch wird das Wiedererlangen der kompletten Alltags- und Berufskompetenzen erschwert, gegebenenfalls sogar verhindert. Des Weiteren besteht ein erhöhtes Risiko einer Re-Fraktur an selbiger Stelle und die Patienten müssen sich zu Verlaufskontrollen und erneuten operativen Eingriffen häufiger in ambulante und stationäre Behandlung begeben.

Prinzipiell unterschieden werden kann eine hypertrophe von einer atrophischen Pseudarthrose [45, 46]. Bei ersterer lässt sich eine überschießende Ausbildung von mechanisch instabilen Kallusgewebe zeigen, ohne dass dieses adäquat mineralisiert und die Umwandlung von Primär- zu Sekundärknochen vollzieht. Atrophische Pseudarthrosen zeigen insgesamt wenig proliferative Aktivität an den Frakturenenden, sodass im radiologischen Follow-up kein bzw. kaum röntgendichtes Material im Frakturspalt sichtbar ist.

Pseudarthrosen betreffen aufgrund der hohen mechanischen Belastung vorrangig die langen Röhrenknochen der unteren Extremität. Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes wurden im Jahre 2013 über 22.000 Fälle diagnostiziert, wobei im Hinblick auf die altersspezifische Fallzahl ein Anstieg der Inzidenz mit steigendem Alter dokumentiert ist [47].

Gesamtgesellschaftlich sind Frakturen ein gewichtiger Grund für den Ausfall eines Arbeitnehmers aus dem Arbeitsalltag. Die aktuellsten verfügbaren Daten aus dem Jahre 2007 zeigen bei AOK-Pflichtmitgliedern ohne Rentner 34.738 Fälle allein unter den ICD10 Diagnosen S42 (Fraktur Oberarm), S52 (Fraktur Unterarm), S72 (Fraktur Femur), S82 (Fraktur Unterschenkel), T10 (Fraktur obere Extremität ohne Höhenangabe) und T12 (Fraktur untere Extremität ohne Höhenangabe) mit insgesamt 2.216.868 Arbeitsunfähigkeitstagen [48]. Dies entspricht 63,82 Tage Arbeitsausfalltagen pro Fall. 2013 stellte diese Diagnosen knapp 8% aller Arbeitsunfähigkeitsfälle und sogar etwa 11% aller attestierten Arbeitsunfähigkeitstage dar [49].

Dies erhöht sich noch einmal im Falle der Ausbildung einer Pseudarthrose um 37,8 Tagen pro Fall (bei 2043 Gesamtfällen im Jahre 2008, nur erwerbsfähige Versicherte) [50].

1.7 Die konventionelle Therapie von Frakturen

Es stehen zahlreiche orthopädische und unfallchirurgische Verfahren zur Verfügung die eine Frakturheilung unterstützen. Diese stellen in Deutschland eine der häufigsten operationspflichtigen Indikationen dar und zählen regelmäßig zu den fünf in Deutschland am häufigsten durchgeführten Operationen [51]. Dabei liegt der Fokus meist auf der Rejustierung der Frakturfragmente in die ursprüngliche physiologische Lage im Körper. Dies berücksichtigt nicht die metabolische/biologische Ausgangslage des frakturierten Knochengewebes. Lediglich bei Kindern in der Wachstumsperiode ist es Standard, die Therapie an das Knochenalter anzupassen. In diesem Kontext wird, wann immer möglich, auf den Einsatz von endoprothetischem Material zugunsten einer konservativen Therapie mit mechanischer Reposition und Ruhigstellung der entsprechenden Körperpartie verzichtet. Dies trägt zum einem dem enormen Regenerationspotential des kindlichen Knochens Rechnung und des Weiteren der Tatsache, dass eine feste Fixierung unter fortlaufendem Längenwachstum (direktionalem Wachstum) eine Fehlstel-

lung bzw. Deformierung im späteren Leben zur Folge haben kann. Im fortgeschrittenen Alter jedoch gibt es keine Adaptation an die biologische Ausgangslage des Patienten, da keine entsprechenden spezifischen Therapiealternativen zur Verfügung stehen. Die Folge ist häufig die Notwendigkeit erneuter operativer Eingriffe und Korrekturen. Erst für den späteren Verlauf, etwa nach Ausbildung von Pseudarthrosen, stehen ergänzende experimentelle Ansätze wie die autologe Transplantation von Knochengewebe als weitere Therapieoptionen zur Verfügung. Es besteht somit die Notwendigkeit Therapieoptionen zu entwickeln, welche auch frühzeitig bei Patienten eingesetzt werden können, die eine schlechte biologische/physiologische Ausgangslage aufweisen und bei denen somit das Risiko einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung erhöht ist.

Davon unabhängig lassen anästhesiologische Bedenken bezüglich der kardiopulmonalen Operationsfähigkeit eines Patienten gegebenenfalls ein konservatives Vorgehen wieder verstärkt in den Vordergrund rücken. Aufgrund des verminderten knöchernen Regenerationspotentials werden hier jedoch gehäuft die Therapieziele beziehungsweise -wünsche von Patient und Arzt nicht erfüllt.

Zur Diagnostikstellung einer Fraktur stellt der Einsatz radiologischer Verfahren den klinischen Standard dar. Meist ist dabei ein konventionelles Röntgen in zwei Ebenen hinlänglich, bei komplexeren Frakturen, prolongierten Verläufen oder zur detaillierten Verlaufskontrolle sind jedoch auch Schnittbildgebungen wie die Computertomographie absolut etabliert.

2.0 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Grundlagen für ein mögliches zukünftiges primäres Therapieprinzip zu evaluieren, das Patienten mit Frakturen bei prognostisch schlechteren Heilungschancen ein besseres Ergebnis ermöglichen soll.

Aufgrund ihrer regenerativen Eigenschaften stellen CD31+ Zellen des peripheren Blutes einen geeigneten Kandidaten für eine einzeitige, lokal zu applizierende Zelltherapie dar. Um die regenerativen Eigenschaften der Zellen im Hinblick auf eine biologisch gestörte Heilung *in vivo* zu charakterisieren, wurde ein bereits etabliertes Tiermodell verwendet. An diesem konnte eine lokale Applikation der aus dem peripheren Blut aufgereinigten Zellen in einen 2mm Femur-Osteotomiespalt erfolgen und die Heilung mittels regelmäßigen *in vivo* μ CT-Analysen beobachtet werden.

Bewertet wurde die biologische Knochenheilung, also wie gut der Osteotomiespalt zu den Messzeitpunkten überbrückt, wie hoch die Knochendichte und wie hoch die Knochenmineralisation ist. In ihr ist letztendlich das Zusammenspiel von metabolischen, bio-mechanischen und Zell-Zell Interaktionen zusammengefasst.

Damit soll eine Basis geschaffen werden, wie man in Zukunft vermehrt auf das allgemeine biologische Risiko einer verlängerten Knochenregenerationsphase eingehen kann und eine entsprechende Therapieoption an der Hand hat, um die physiologische Knochenregeneration mit minimalen Risiko zu unterstützen.

3.0 Material und Methoden

3.1 Tierversuch

Insgesamt wurden 43 Sprague Dawley® Ratten (Charles River International Inc., Wilmington, MA, U.S.A.), operiert, von denen 39 in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Die Operationen wurden im veterinärmedizinischen Operationssaal des Charité Campus Virchow Klinikum Berlin durchgeführt. Als Operateure hatten sich freundlicherweise Fr. Dr. med. vet. Agnes Ellinghaus und Fr. Dr. rer. net. Katharina Schmidt-Bleek zur Verfügung gestellt.

Die Durchführung der entsprechenden μ CT-Studien zog sich über einen Zeitraum von April 2013 bis Januar 2014. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) unter der Antragsnummer G0342/12. Ich habe im Vorfeld ein Zertifikat der Charité Universitätsmedizin Berlin zum tierexperimentellen Arbeiten erworben.

3.1.1 Tiermodell

Es wurde ein Tiermodell zu gestörter biologischer Knochenheilung verwendet. Dieses war im Julius-Wolff Institut bereits durch Preininger et. al. bei Studien zur lokalen Implantation von CD133+ Zellen etabliert worden [52, 53]. Es nutzt weibliche Tiere, die zum Operationszeitpunkt bereits zwölf Monate gealtert waren und mindestens dreimal geworfen hatten. Diese Tiere entwickeln ohne zusätzliche Stimuli eine atrophe non-union. Das Operationssetup mit Femurosteotomie und Anlage eines Fixateur externa, sowie die Durchführung der μ CT-Analysen waren dementsprechend bereits auf ihre Tauglichkeit zur Evaluation der intraoperativen Zelltherapie hin erprobt.

Die Ratte an sich zeigte sich als Tiermodell geeignet, da sie operationstechnisch insgesamt gut zu handhaben ist und der Osteotomiespalt mittels der verfügbaren Instrumente gut einzubringen war. Darüber hinaus war der zu formende zellenthaltende Blutkoagel für die Einbringung in die Osteotomie in einer praktikablen Größe, bezogen auf Herstellung und Implantation.

Insgesamt war die Durchführung eines Tierversuchs nötig, da die Vorgänge während der Regenerationsphase im Frakturspalt noch nicht vollständig geklärt sind. Auszuge-

hen ist dabei von einer solchen Vielzahl von Einflussfaktoren (z.B. metabolischer, bio-mechanischer Natur, aber auch der spezifischen Zell-Zell-Interaktionen) und deren Wechselwirkungen, dass sie nicht in einem *in vitro* Versuchsaufbau zu simulieren sind. Darüber hinaus war für die sich anschließenden histologischen Untersuchungen die Entnahme und Aufarbeitung des entsprechenden Knochens zum definierten Endpunkt nach sechs Wochen notwendig. Damit stellte ein Versuchsansatz am Menschen aus ethischen Gründen keine mögliche Alternative dar.

3.1.2 Prozedere Zellaufreinigung

Für die Zellaufreinigung wurde am OP-Tag Blut aus Spendertieren entnommen. Die Entnahme folgte unter Narkose mit Domitor® (Orion Corporation, Finnland) und Ketamin mittels kardialer Punktion, sodass eine hinreichende Menge entnommen werden konnte. Wie an die Empfängertiere, wurde auch an die Spendertiere die Anforderung gestellt, weiblichen Geschlechts und mindestens zwölf Monate alt zu sein, sowie mindestens drei Mal geworfen zu haben. Eine vorherige Stimulation zur Erhöhung der Anzahl der gefragten Zellpopulation im peripheren Blut fand nicht statt. Das aus den Spendertieren entnommene Blut wurde mittels Citrat antikoaguliert (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, U.S.A.) wobei etwa 2,5ml Blut auf die Citratmenge zweier Vacutainer® kamen (0,109M gepufferte Na₃-Citrat \triangleq 3,2%). In Summe konnten auf diesem Wege jedem Tier zwischen 10 - 15ml Blut entnommen werden. Die Spendertier wurde anschließend mittels intrakardialer Punktion von 5ml 7,46%iger Kalium-Chlorid-Lösung (Fresenius-Kabi GmbH, Bad Homburg) getötet. Im Labor wurde das antikoagulierte Blut aus den Vacutainern tierspezifisch in je einem 50ml Falcon®-Gefäß (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, U.S.A.) gepoolt und die in den Röhrchen verbliebenen Reste mit je 1ml DPBS-Lösung (Gibcol®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) ausgespült. Um die Erythrozyten abzutrennen, wurde eine Gradientenschichtung mit Histopaque-1083 Lösung (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, U.S.A.) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (30 Min, 400G, keine Bremsung), wodurch sich die Leukozyten enthaltene Schicht abtrennen ließ und abpipetiert, mit DPBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert werden konnte (8 Min, 400G). Nach Absaugen des flüssigem Überstandes wurde das Zellpellet in 10ml

eines Erythrozytenlysepuffers resuspendiert und für 5 Minuten inkubiert, um evtl. noch verbliebene Erythrozyten aufzulösen. Um die dadurch entstehenden Zellfragmente auszuwaschen wurde erneut DPBS hinzugegeben und die Zellsuspension für 7 Minuten bei 400G zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend verworfen werden. Um die Quantität der Zellen zu evaluieren wurden die Zellen erneut in DPBS-Lösung resuspendiert, 10µl entnommen und mit 10µl Trypanblau vermischt. So konnten Zellen mit beschädigter Membran angefärbt werden, vitale hingegen nahmen den Farbstoff nicht an. Durch Auftragen dieser Suspension auf eine Countess® Cell Counting Chamber Slice (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) konnte mithilfe der Countess® Zählkammer die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen maschinell bestimmt werden. Durch die Färbung erfolgte zusätzlich noch die Auftrennung in vitale und avitale Zellen. Das Falcon® mit den Zellen wurde nun erneut zentrifugiert (7Min. 400G) und der Überstand abgenommen um anschließend eine Suspension in FACS-Puffer zu erzeugen (PBS+BSA 1%ig). Zu dieser wurde schließlich die jeweiligen Maus anti Ratte IgG-Antikörper hinzugegeben (2µl Antikörper pro 1 x 10⁶ Zellen gemäß der Gesamtzahl der vorherigen Zählung); anti-CD31 Ratte: clone TLD-3A12, FITC gekoppelt, AbD Serotec, Bio-rad, Hercules, California, United States; anti-CD14 Ratte: clone biG 57, Abnova Taipei City, Taiwan. Die Zell-Antikörper-Mischung wurde anschließend 15 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (7Min., 400G) und Abnahme des Überstandes wurden eisenhaltige anti-IgG- bzw. anti-FITC-Beads hinzugegeben und die Suspension erneut 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Es wurden 10µl Beads pro 1x 10⁷ Zellen eingesetzt und ein Blocking-Puffer mit MACS-Puffer-Lösung (DPBS+EDTA) hinzugegeben. Der Blocking-Puffer verhinderte eine unspezifische Bindung von Beads an Fc-Rezeptoren diverser Immunzellen (z.B. B-Zellen, Monocyten, Makrophagen).

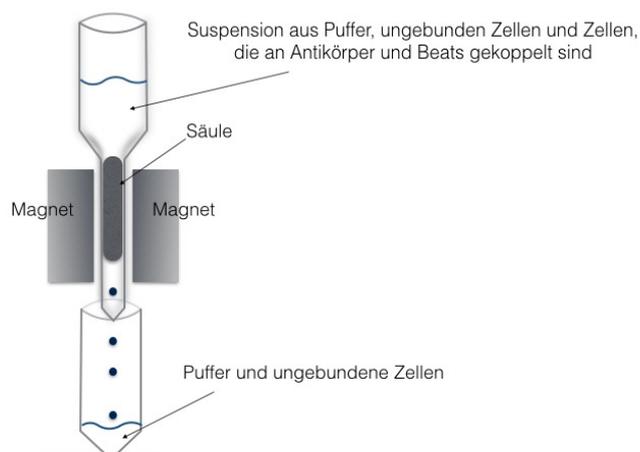


Abb. 4: Prinzip des Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Im Anschluss kam die MACS Technologie (magnetic-activated cell sorting, Milteny Biotec GmbH) zum Einsatz (Abb. 4). Dabei läuft die Lösung durch eine in einen Magneten eingespannte Säule, welche mit einer ferromagnetischen porösen Matrix gefüllt ist. Darunter befindet sich ein Auffanggefäß. Jede Säule wurde zunächst mit je einem ml MACS-Pufferlösung gespült bevor das Zell-Antikörper-Beads-Gemisch aufgegeben wurde. Durch die Kopplung des Antikörpers an die Beads, werden die entsprechend gebundenen Zellen in der im Magneten liegenden Säule gehalten. Der nicht gebundene Rest läuft hindurch. Anschließend wurde jede Säule noch dreifach mit MACS-Lösung gespült, um sichergehen zu können, dass keine nicht magnetisch gebundenen Zellen mehr in der Säule aufzufinden sind. Nach Lösung aus dem Magnetfeld wurden die dort festgehaltenen Zellen in ein separates Eppendorf Gefäß eluiert. Zellen die sich nicht allein aufgrund der Schwerkraft aus der Säule lösten, wurden mittels MACS-Pufferlösung und ggf. zusätzlich Druck durch einen Stempel ausgewaschen. Nun lagen in der Lösung nur noch die für die Versuchsreihe gefragte Zellpopulation vor. Um die nötige Quantität sicherstellen zu können, wurde analog zur Zellzählung vor der Antikörpernutzung, erneut eine maschinelle Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung und Countess® Zählkammer durchgeführt. Für die CD31+/14- Gruppe wurde diese Prozedur als Doppelaufreinigung entsprechend zweifach durchlaufen.

In den später zu implantierenden Blutkoagel sollten je 2×10^5 Zellen der entsprechenden Population enthalten sein, sodass nach der abschließenden Zählung eine Aufteilung der Zellsuspension auf entsprechend viele Eppendorf-Gefäße erfolgen konnte. Diese wurden noch einmal gewaschen um verbliebene MACS-Pufferlösungsreste zu entfernen. So wurde verhindert, dass insbesondere die EDTA enthaltene MACS-Pufferlösung nicht in die Versuchstiere implantiert wurde und durch den Kalziumbindenden Effekt, die Knochenheilung negativ beeinflusst.

3.1.3 Prozedere Operation, Anlage von Fixateur und Osteotomie

Initial erfolgte die präoperative Identifikation der Tiere zur Fixateuranlage (Abb. 5) anhand der Käfignummer und der Begleitpapiere. Nach Entnahme des zu operierenden Tieres aus dem Käfig wurde eine Anästhesie mit 0,3 ml Ketamin (60mg/kg KG) (Pfizer Corporation, NY, U.S.A) und 0,2 ml (0,3mg/kg KG) Domitor® (Orion Corporation, Finnland) durchgeführt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Zum besseren Handling wurden die Tiere dafür am Schwanz aus dem Käfig genommen und unter weiterer Fixierung des Schwanzes in einen zuvor aus einem kräftigen Laken gefalteten, auf fester Unterlage liegendem Beutel laufen gelassen. So ließ sich das Tier im Beutel mit einer Hand fixieren. Der Schwanz wurde währenddessen unter leichtem Zug, mit der gleichen Hand deckenwärts umgeschlagen. In selbige Richtung wurde das Tier nun leicht angehoben um die viszerale Organe zum Schutz vor der Injektionskanüle in Richtung kranial rutschen zu lassen. So konnte die sichere intraperitoneale Injektion der Anästhetika erfolgen. Durch einfaches Umschlagen des Beutels hatten die Ratten für die Zeit bis zum vollständigen Narkoseintritt einen sicheren, ruhigen und dunklen Ort, der eine maximale Stressreduktion für die Tiere bereithalten sollte. Nachdem die Tiere eingeschlafen waren, konnte die ausreichende Narkosetiefe mittels Kneifen zwischen den Zehen sichergestellt werden. Eine ausbleibender Reaktion des Tieres auf diese Schmerzprovokation, zeigte sich als Indikator für eine ausreichende Anästhesie.

Um im weiteren Verlauf jedem Tier seine Versuchsnummer zuordnen zu können, wurden nun farbliche Markierungen am Schwanz angebracht (Farbkodierungssystem siehe Tab. 1). Des Weiteren erfolgte eine perioperative antibiotische Prophylaxe mit 0,1ml (45mg/kg KG) Clindamycin subcutan und die Gabe von Bepanthen® Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen) auf beide Augen, um ein Austrocknen und damit verbundene spätere Sehstörungen für die Tiere zu verhindern. Zudem ließ der unter diesem Prozedere ausbleibende Cornealreflex einen weiteren Rückschluss auf hinlängliche Narkosetiefe zu. Anschließend erfolgte die Rasur des Operationsgebietes am linken Bein und der Blutentnahmeregion am rechten Bein. Die Blutentnahme für den später verwendeten Blutkoagel erfolgte nach entsprechender kurzzeitiger Stauung aus der li. Vena saphena. Als Antikoagulanzen im Blutentnahmegefäß wurde Citrat verwendet (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, U.S.A.).

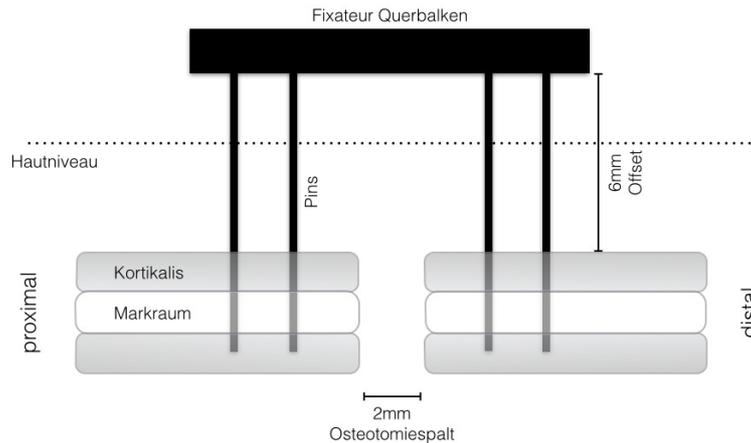


Abb. 5: Schematische Darstellung Anlage Fixateur externa

Für die Operation wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte positioniert, um ein Auskühlen während des Eingriffs zu verhindern. Daran schlossen sich die Desinfektion und das sterile Abdecken des Operationsgebietes an. Nach dem Hautschnitt und der Durchtrennung der obersten Muskelfasziën mit dem Skalpell über dem linken Femur, konnte durch die darunter liegende Muskulatur bis hin zum Periost hin stumpf präpariert werden (Abb.6). Daran schloss sich eine weitere Mobilisation der Muskelstränge, auch auf der medialen Seite an, bis ein ausreichend großes Arbeitsfeld darstellbar war, welches durch den Assistenten mit zwei Lidhaken offen gehalten wurde (Abb. 6). Es folgte ein probatorisches Aufsetzen des Fixateurs externa. Sofern sich der freigelegte Bereich des Femurs als breit genug für das Fixateursystem erwies, wurde mit der ersten Bohrung begonnen, falls nicht, erfolgte eine erweiternde stumpfe Präparation. Für den Fixateur wurden Pins (Kirschner-Drähte) benutzt, die an ihrer Spitze mit einem Gewinde versehen sind, sodass diese nach einer Vorbohrung problemlos in den Knochen eingedreht werden konnten. Nach Einsatz des ersten Pins konnte der Fixateur an diesen angesetzt werden, um den richtigen Abstand für die darauf folgenden Pins genau einschätzen zu können. Der Einsatz der folgenden drei Pins folgte dem selben Prozedere, die überschießende Länge der Pins konnte mit einer Kneifzange abgesetzt werden.

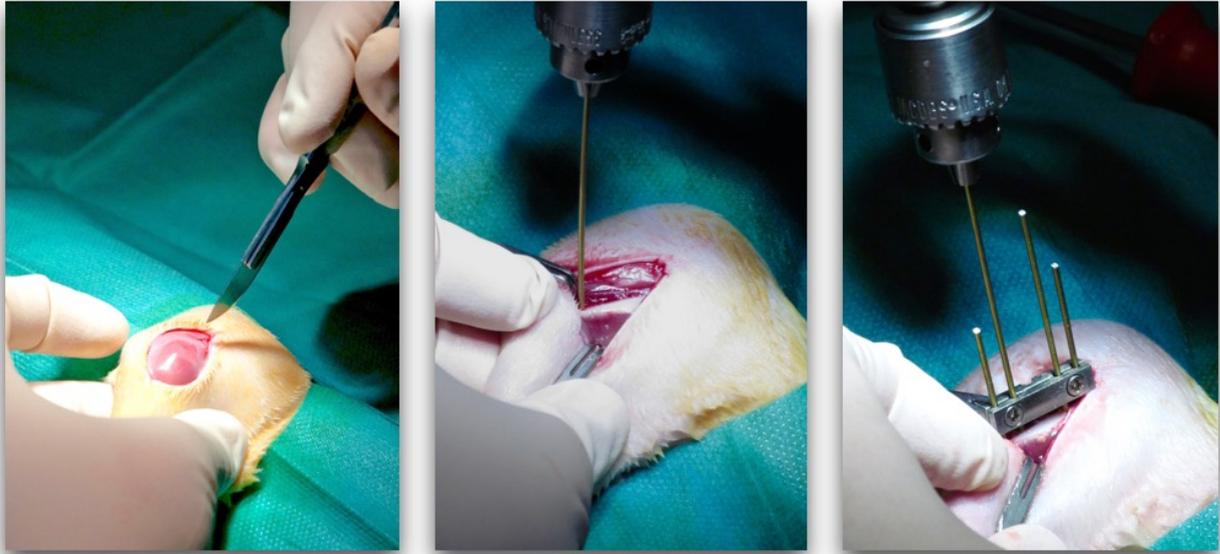


Abb. 6: Anlage des Fixateur externa. Zunächst Präparation von Faszie und Muskulatur, dann Einbringen der Pins mit dem Bohrer.

Um einen standardisierten Offset, den Abstand zwischen Knochen und Fixateur, von 6mm gewährleisten zu können, wurde in eben jenen Bereich ein entsprechender Platzhalter (Spacer) eingesetzt, bevor der Fixateur endgültig mit den Pins verschraubt wurde (Abb. 7).

Anschließend wurde ein Sägeblock an den Fixateur angesetzt, um auf diese Weise kontrolliert und unter fortlaufender Wasserspülung zur Hitzereduktion, einen 2mm breiten Osteotomiespalt zwischen den Pins im Femur mit einer hydraulischen Säge (Sägeblattstärke 0,3mm) zu schaffen. Ein Spatel wurde während dieses Operationsschrittes unter den Femur eingelegt, um das dort befindliche Weichteilgewebe im Falle eines eventuellen Abrutschens der Säge zu schützen.

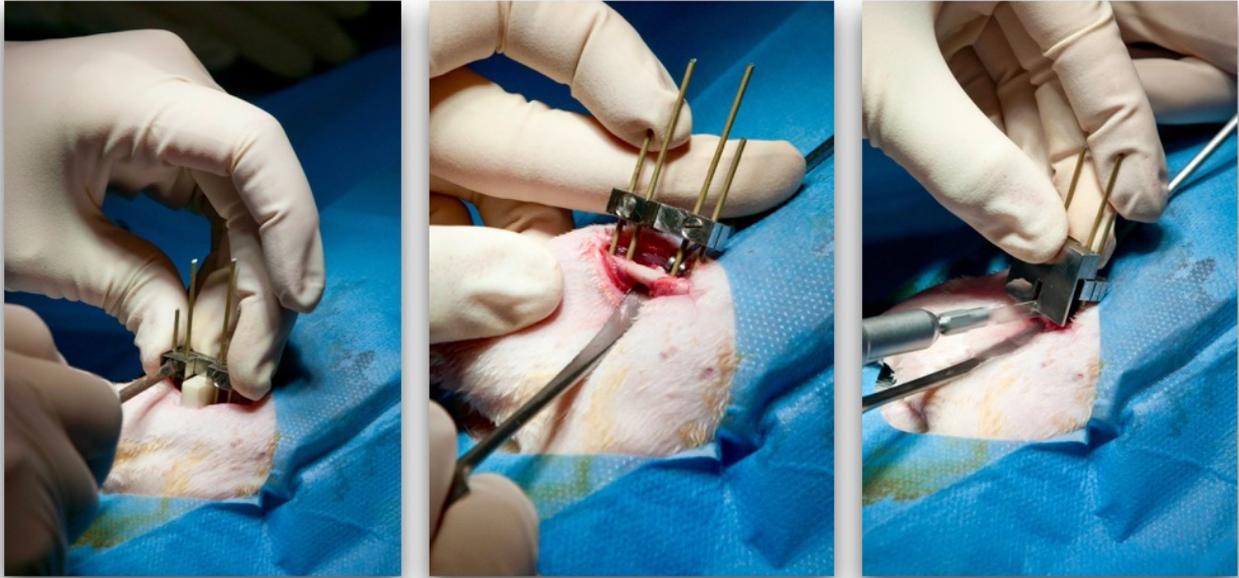


Abb. 7: Endgültige Anlage des Fixateur externa mit definiertem Offset und Einbringung der Osteotomie

In den so erstellten Femurspalt konnte nun ein Blutkoagel eingesetzt werden, welcher die zuvor isolierten Zellen enthielt. Dieser war in der Zwischenzeit hergestellt worden. Dafür wurden $160\mu\text{l}$ des mit Citrat antikoagulierten Blutes des OP-Tieres, welches zu Operationsbeginn abgenommen wurde, in den Deckel eines Eppendorfgefäßes pipetiert, dort mit den 2×10^5 Zellen des Spendertieres versetzt und mithilfe von Thrombin zum Gerinnen gebracht (Abb. 8). So entstand nach kurzer Koagulationszeit ein Koagel von gallertartiger Konsistenz, welcher mithilfe eines gebogenen Spatels aus dem Eppendorfdeckel entnommen, und in die frisch erstellte Osteotomie eingesetzt werden konnte (Abb. 9).



Abb. 8: Erstellung des Blutkoagels im Deckel eines Eppendorf-Gefäßes

Der Wundverschluss erfolgte mit einzelgeknüpften Hautnähten. Verwendet wurden nicht-resorbierbare Fäden der Stärke 3-0. Die Narkose wurde abschließend mit 0,1ml Antisedan® (Orion Corporation, Finnland) teilantagonisiert. Zur postoperativen Schmerztherapie bekamen die Tiere 0,15ml Tramal pro 200ml Wasser als Trinkflüssigkeit.

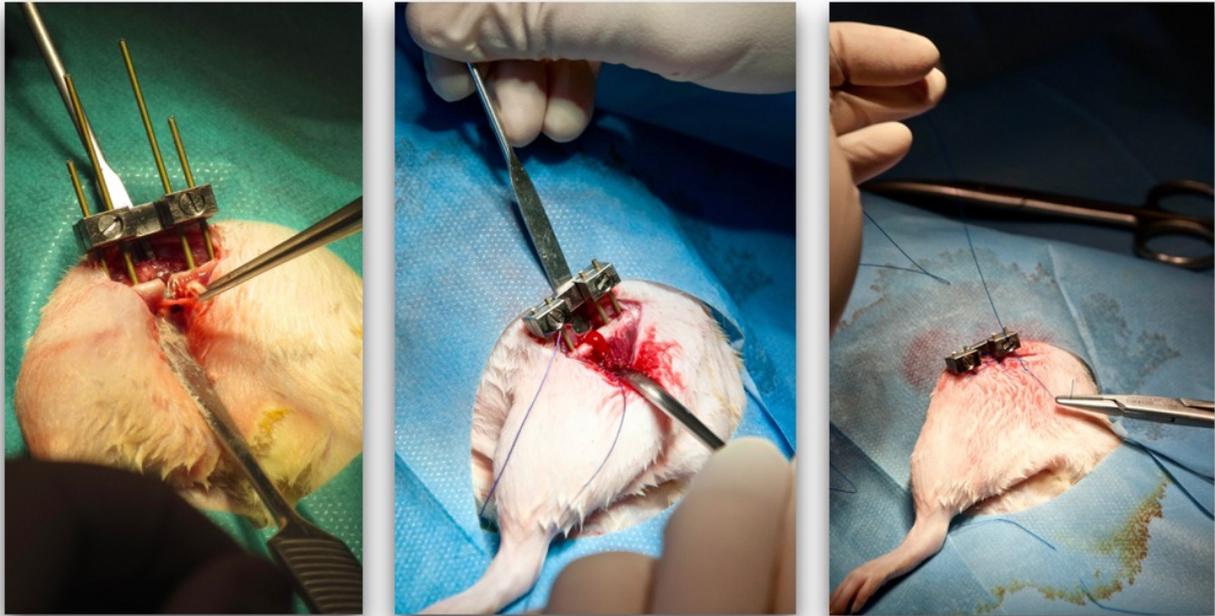


Abb. 9: Einbringen des Blutkoagels in die Osteotomie und anschließender Wundverschluss.

3.1.4 Durchführung der μ CT Studien

Pro Versuchstier wurden drei *in vivo* μ CT Studien durchgeführt, jeweils zwei, vier und sechs Wochen postoperativ. Hierzu wurden die Tiere erneut, analog zur initialen Operation, mithilfe von 0,3ml Ketamin und 0,2ml Domitor® narkotisiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe und Versorgung der Augen mit Bepanthen® Augensalbe konnte der metallene Fixateurquerbalken mithilfe eines Aufsatzes zur durchgängigen Stabilisation des Femurs gegen einen Kunststoffersatz ausgetauscht werden. Dieses Vorgehen ist notwendig, um mögliche Störartefakte in den CT-Studien zu minimieren. Eine Dauerversorgung mit Kunststofffixateuren hat sich in Vorstudien als nicht praktikabel erwiesen, da diese von den Tieren immer wieder angenagt wurden.

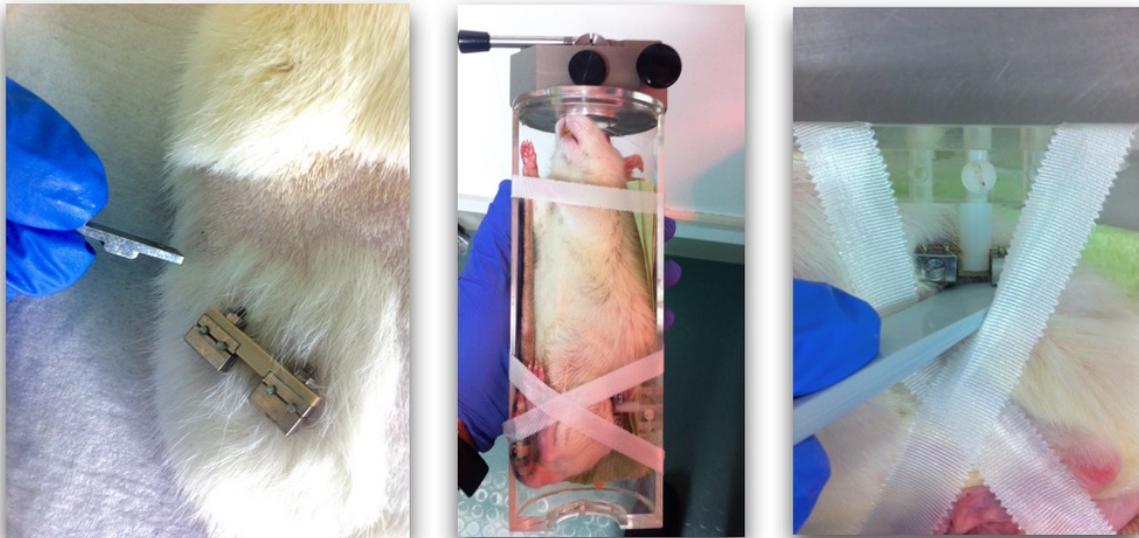


Abb. 10: Durchführung der in vivo μ CT-Studien. Austausch der Fixateur-Querbalken und Fixierung am CT-Schlitten

Nach Austausch des Querbalkens erfolgte zunächst ein konventionelles Röntgen des Femurs (Abb. 11) und anschließend die Rückenlagerung der Tiere in einen Kunststoffschlitten, welcher in das CT-Gerät eingesetzt wurde. Um eine standardisierte Lage des zu untersuchenden Femurknochen in allen Studien realisieren zu können, sowie um ein mögliches Verrutschen oder Bewegungen zu verhindern wurde das Fixateursystem an definierter Stelle fest mit dem Schlitten verbunden (Abb. 10).

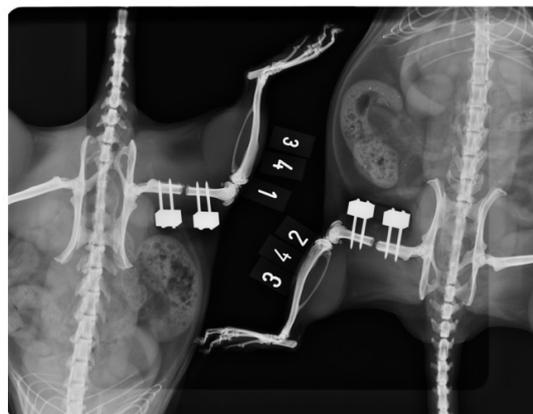


Abb. 11: Röntgenaufnahme zweier Tiere des CD31+ Gruppe vor Durchführung der 2-Wochen-CT-Studie zur Kontrolle der Fixatelage - die metallenen Querbalken wurden bereits durch röntgendurchlässige ausgetauscht

Nach Einsetzen des Schlittens in das CT- Gerät vom Typ Viva CT40 der Firma Scanco Medical AG (Brütisellen, Schweiz) erfolgte die Programmierung des Scans an der Workstation. Dafür wurde zunächst eine low-dose Übersicht sämtlicher im Scanbereich befindlicher Strukturen erstellt (Abb. 12). Auf dieser konnte die Osteotomie identifiziert und eine proximale und eine distale „reference line“ festgelegt werden, welche die komplette Osteotomie sowie die unmittelbar angrenzenden Strukturen einfassten.

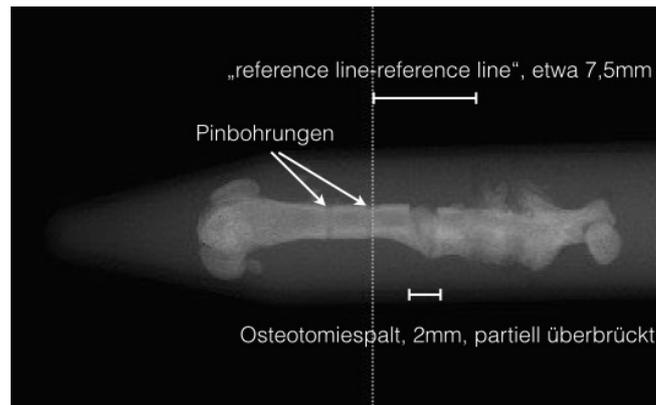


Abb. 12: Übersichtsaufnahme am CT zur Festlegung des Scanbereiches

Es wurde ein Protokoll verwendet, welches CT-Messungen mit insgesamt 212 Slices über eine Länge von knapp 7,5mm pro Scan erstellt. Zur sicheren Zuordnung wurde im System dem Scan die entsprechende Tiernummer angefügt und separat die generierte Scannummer protokolliert. Abschließend wurde der Kunststoff-Querbalken des Fixateurs wieder gegen den ursprünglichen Querbalken ausgetauscht und die Narkose der Tiere mit 0,1ml Antisedan® teilantagonisiert.

Im Anschluss an den Scan in Woche 6 postoperativ erfolgte die Tötung der Tiere zwecks Entnahme des Femurs, um höherauflösende *in vitro* CT-Studien erstellen zu können. Die Tötung erfolgte nach erneuter Kontrolle einer ausreichenden Narkosetiefe durch Injektion von 10ml KCl intrakardial. Daraufhin konnte der Femur, zunächst gemeinsam mit dem Fixateursystem, entnommen werden. Die Entnahme erfolgte durch teils scharfe, teils stumpfe Präparation durch die Muskulatur, dem Aufsuchen der Artikulationes Genu und Coxae und anschließender Durchtrennung der haltenden Bandstrukturen mit dem Skalpell. Die Fixierung der entnommenen Knochen erfolgte in vierprozentiger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) über 48 Stunden bei 4°C.

Zwecks Durchführung der *in vitro* CT Studien wurde die Knochen vom Fixateursystem befreit und in mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in Falcon® Gefäße eingesetzt, die wiederum fest in einen Kunststoffschlitten im CT Gerät eingespannt werden konnten (Abb. 13). An der Workstation konnte man nun nach erneuter Erstellung eines Übersichtsscans genau den Bereich zwischen den beiden inneren Pinbohrlöchern als „reference line“ markieren und den *in vitro* Scan starten.

Der Preis der höheren Auflösung *in vitro* war jedoch die deutlich längere Scandauer, je einzelnen Knochen etwa 90 Minuten. Dies wäre im *in vivo* Versuchssetting schlicht nicht realisierbar gewesen, denn eine adäquate Narkose wäre weder im Hinblick auf die initiale Dosierung, noch auf die Aufrechterhaltung über diesen Zeitraum machbar. Eine Initialdosis, die für solch eine Zeitspanne gereicht hätte, wäre für die Tiere nicht verträglich gewesen und Narkotika nachzugeben, stellte aus technischen Gründen keine Option dar. Des Weiteren hätte ein hohes Risiko bestanden, dass die Tiere über diesen langen Zeitraum im Computertomographen ausgekühlt wären.

Nach erfolgreichem Scanvorgang, wurden die Knochen wieder aus der Halterung entnommen und für die sich anschließenden histologischen Analysen in 14-prozentiger EDTA-Lösung dekalzifiziert.

Insgesamt stellt dieses Vorgehen einen gängigen Versuchsaufbau dar, wenn es darum geht, Knochenregenerationsprozesse im biologischen Verlauf zu evaluieren [54].

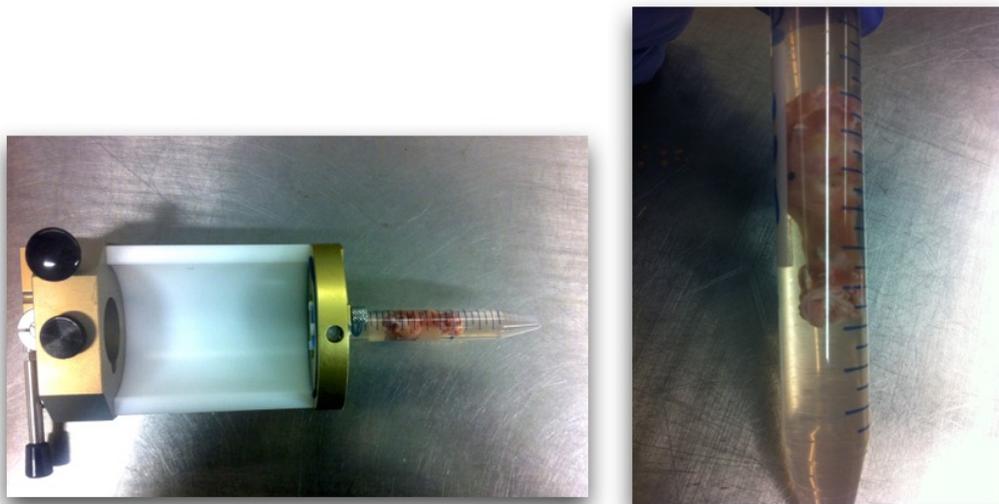


Abb. 13: Durchführung der *in vitro* μ CT-Studien. Der entnommene Femur befindet sich im eingespannten Falcon® Gefäß.

3.1.5 Tierhaltung und -pflege

Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierhaus der Tierversuchsanlage am Charité Campus Virchow Klinikum Berlin. Die tägliche Versorgung der Tiere wurde durch das dortige veterinärmedizinische Personal sichergestellt. Die Tiere wurden zunächst gemäß Empfehlung und gängiger Praxis in 5er-Gruppen gehalten, hatten mit Holzstreu ausgelegte Käfige mit Material zum Nagen und zum Höhlen bauen, sowie Spender für Wasser und Futterpellets. Ein circadianer Hell-Dunkel-Rhythmus wurde sichergestellt. Jedes Tier wurde, wie zuvor erwähnt, zur individuellen Identifizierung mit einer Farbkodierung am Schwanz versehen. Hierzu wurde jedem Tier eine dreistellige Nummer zugeordnet, welche sich in farbigen Ringen und Strichen auf dem Schwanz der Tiere wiederfand (Abb. 14). Die entsprechende Kodierung ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

schwarzer Ring	1
schwarzer Strich	5
roter Ring	10
roter Strich	50
grüner Ring	100

Tab. 1: Farbkodierung der Versuchstiere zur Identifikation



Abb. 14: Farbige Markierungen am Schwanz als Identifikationssystem. Hier beispielhaft Tier 344.

Nach erfolgreicher Operation, wurden die Tiere in Zweier-Einheiten gehalten, um die Gefahr des Nagens an Fixateuren von Käfigpartnern zu minimieren.

3.2 Beschreibung Auswertung

3.2.1 Verwendete Hardware

Für die μ CT Aufnahmen wurde, wie bereits oben erwähnt, ein Gerät der Firma Scanco Medical AG, Brütisellen, Schweiz verwendet. Zum Einsatz kam der Gerätetyp Viva 40 microCT mit einer 55kVp Röntgenquelle und einer Auflösung von $35\mu\text{m}$ Voxelgröße für

die *in vivo* Studien und $10,5\mu\text{m}$ pro Voxel für die sich anschließenden *in vitro* Aufnahmen. Ein Voxel stellt dabei die kleinste, quadratische Bildeinheit dar und ist damit das dreidimensionale Korrelat eines Pixels als kleinste Bildeinheit einer zweidimensionalen Aufnahme. Der verwendete Computertomograph ist für Studien mit einer maximalen Länge von 145mm und einem maximalen Durchmesser von 38mm geeignet. Die anliegende Stromstärke betrug $145\mu\text{A}$.

Das verwendete CT-Gerät wurde einmal wöchentlich gemäß der Herstellerempfehlung mit einem durch ihn bereitgestellten Phantom kalibriert. Dieses Phantom gewährleistete eine standardisierte Messung der Mineralisierung.

3.2.2 Verwendete Software

Zur Auswertung der μCT -Studien inklusive der dreidimensionalen Rekonstruktion wurde die „ μCT Ray V.4.0-2“ Software der Firma Scanco Medical AG, Brütisellen, Schweiz, verwendet. Sie erlaubte die Sichtung und manuelle Bearbeitung der CT-Daten, die Umrechnung in eine dreidimensionale Darstellungsform, sowie die Berechnung der Daten über den strukturellen Aufbau der untersuchten Osteotomieregion.

Bestimmt wurde zum einen das Total Volume (TV [mm^3]), als Summierung aller sichtbaren Strukturen. Nach Einsetzen eines Grenzwertes für die Grauwertabstufungen (Threshold) konnte außerdem das Bone Volume (BV [mm^3]), definiert als alle Strukturen die in ihrer Röntgendichte über dem so gesetzten cut-off-Wert für ausgebildetes Knochengewebe lagen, bestimmt werden. In den Darstellungen erscheinen diese Strukturen also heller und werden als knöchern gewertet. Analog dazu kamen die Werte für die absolute und die knöcherne Mineraldichte (total & bone mineral density, TMD und BMD [$\text{mg HA}/\text{cm}^3$]) zustande. Aus diesen Daten ließ sich mittels der Formeln

$$\text{TMC} = (\text{total volume}[\text{mm}^3] / 1000) \times \text{total mineral density}[\text{mg HA}/\text{cm}^3]$$

$$\text{BMC} = (\text{bone volume}[\text{mm}^3] / 1000) \times \text{bone mineral density}[\text{mg HA}/\text{cm}^3]$$

der absolute und der knöcherne mineralisierte Inhalt bestimmen (total and bone mineral content, TMC und BMC [mg Hydroxyapatit]).

Aus den Datensätzen der abschließenden *in vitro* Analysen wurden zusätzlich noch rechnerisch die gebildeten trabekulären Strukturen evaluiert. Dafür wurde ebenfalls ein etabliertes Protokoll der Firma Scanco Medical AG verwendet, welches die Trabekelanzahl pro mm, die Trabekeldicke [mm] sowie die Größe der trabekulären Zwischenräume [mm] analysierte.

3.2.3 Prozedere μ CT Analyse

Nach erfolgreichem Erstellen der μ CT Scans konnte aus den Datensätzen eine dreidimensionale Rekonstruktion sowie die rechnerische Bestimmung des totalen und des Knochenvolumens erfolgen. Hierzu war es zunächst nötig, in jedem Scan manuell Kallus- und kortikale Strukturen zu identifizieren und entsprechend zu markieren (Abb. 15). Jeder einzelne CT-Slice innerhalb der „region of interest“ (ROI) musste dazu separat bearbeitet werden. Zur Festlegung der ROI, erfolgte zunächst die Identifizierung derjenigen Slicenummern, die innerhalb eines Datensatzes das jeweils proximale und distale Ende des Osteotomiespalt darstellen. Definiert wurden die Enden als derjenige Slice, der zuletzt (proximal) bzw. zuerst (distal) eine geschlossene, ringförmige kortikale Struktur zeigten. Aus diesen beiden Slicenummern konnte der Mittelpunkt errechnet werden, dem in beide Richtungen dann jeweils 57 Slices - einer Strecke von 2mm entsprechend - hinzugerechnet wurden. Der so entstandene Bereich stellte die region of interest (ROI) dar und beinhaltete entsprechend stets den Osteotomiespalt, sowie einen Bereich je 1mm distal und proximal der Osteotomie (Abb. 16). Diese Bereiche sind ebenfalls an der Kallusbildung beteiligt. Für die *in vitro* Analysen wurde die nötige hinzuzurechnende Slicezahl angepasst, um der höheren Auflösung mit mehr Slices pro μ m Rechnung zu tragen und am Ende ebenfalls den 2mm Osteotomiespalt plus je 1mm distal und proximal einzuschließen.

Innerhalb der ROI wurde nun in jedem μ CT-slice zunächst markiert, welche Strukturen zum Gesamtkallus gehören. Dies schloss bereits präexistente gerichtete kortikale Strukturen an den beiden Osteotomieenden sowie neugebildetes Kallusgewebe ein. In einem zweiten Durchlauf wurden lediglich kortikale Strukturen markiert um sie später herausrechnen zu können, da sie nicht Teil des neugebildeten Knochengewebes sind. Die Unterscheidung dieser beiden Strukturen erfolgte visuell anhand der Graustufen in den μ CT Aufnahmen.

Anschließend wurden die beiden so erstellten Datensätze zusammen geführt, sodass eine Datei entstand, in welcher Kallus- und Kortex-Strukturen definiert sind. Diese bildet die Grundlage für alle weiteren Berechnungen.

Abschließend konnte für jeden μ CT-Datensatz das entstandene Histogramm gesichert und ein individueller Threshold bestimmt werden. Um für die weiteren Berechnungen einen gemeinsamen Threshold aller Aufnahmen zu erhalten, wurden die individuellen Thresholds gemittelt.

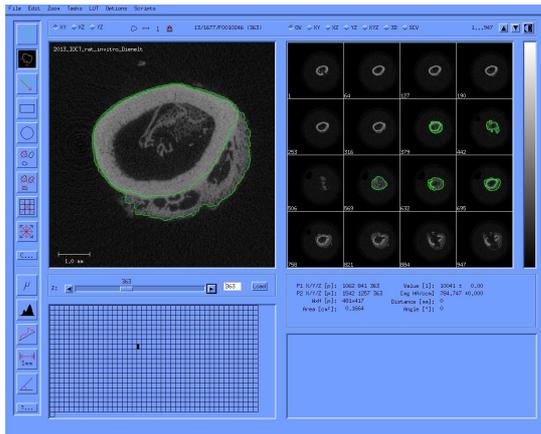


Abb. 15: Rendering der formierten Gesamtkallus- (äußere grüne Linie) und Kortexstrukturen (innere grüne Linie).

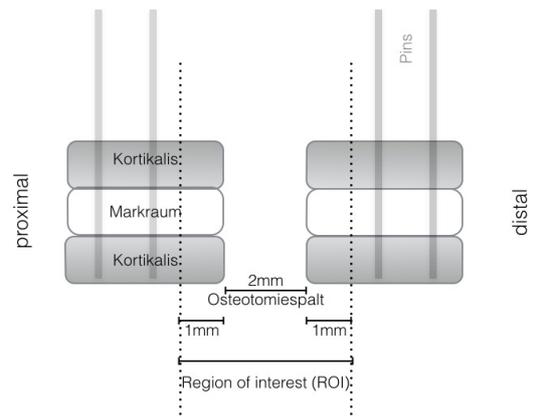


Abb. 16: Schematische Darstellung der Region of Interest (ROI)

3.2.4 Bestimmung des Thresholds,

Bei jeder μ CT-Studie entsteht ein Histogramm. Dieses gibt die Gesamtheit aller Graustufen wieder und stellt deren Verteilung graphisch dar. Um für die anschließenden Berechnung festlegen zu können, welche Graustufen als knöchern gelten, ist es notwendig einen Grenzwert für die Grauwerte festzulegen: den Threshold. Dabei lässt sich jeweils ein unterer und ein oberer Threshold bestimmen. Der untere entspricht dem Grenzwert zum stets vorhandenem diffusen Hintergrundrauschen, der obere der Grenze zwischen weicheren Kallusformationen und den festeren, röntgendichteren Kortexstrukturen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit den ursprünglichen und unversehrten Knochen darstellen.

Für die *in vivo* Studien, wurde gemäß dem institutsinternen Protokoll lediglich ein unterer Threshold bestimmt. Nach oben wurden sämtliche Grauwerte mit eingeschlossen, wobei die Kortices der Osteotomieenden auf beiden Seiten der ROI ja bereits durch das Rendering keinen, bzw. höchstens minimalen Einfluss in die Ergebnisse für den neu gebildeten Kallus erhielten. Für die Bestimmung des unteren Thresholds wurde von jedem Histogramm zunächst ein separater Wert ermittelt, welcher bei 50% der Grauwerte eines Scans lag. Das heißt, die untere und damit „dunklere“ Hälfte des Histogramms wurde als Hintergrundrauschen definiert und erhielt so auch keinen Einfluss in die

Auswertungen. Die so entstandenen Werte sämtlicher *in vivo* Studien wurden abschließend gemittelt und der erhaltene Wert als einheitlicher unterer Threshold für die Berechnungen verwendet.

Für die *in vitro* Studien mit ihrer deutlich höheren Auflösung, wurde ein unterer und ein oberer Threshold bestimmt. Dieser wurde aufgrund der höheren Genauigkeit visuell festgelegt. Das Histogramm jeder μ CT-Studie wurde dafür einzeln analysiert und es wurde bestimmt, welche Grauwerte als Hintergrundrauschen zu gelten haben und welche Graustufen zu den präexistenten kortikalen Strukturen, die nicht zuvor durch das Rendering erfasst worden waren. Bei der Festlegung half dabei zum einen die bildmorphologische Einschätzung, welche Bereiche durch neu entstandenen Kallus geprägt sind. Zum anderen half die in Abbildung 17 dargestellte, typische Form des Histogramms. Die besonders dunklen Anteile der Grauwertverteilung, welche das Hintergrundrauschen ausmachen, zeigten sich in der graphischen Darstellung des Histogramms als hochschultriger Bereich, während die noch im Bild verbliebenen kortikalen Strukturen besonders hell waren, jedoch aber nur einen geringen Anteil an der Gesamtverteilung der Grauwerte stellten. Analog dazu erschienen sie im Histogramm damit als flacher, auslaufender Bereich. Die Thresholds aller *in vitro* Aufnahmen wurden im Anschluss ebenfalls gemittelt und die erhaltenen Mittelwerte bei den Berechnungen eingesetzt. Die Bedeutung der richtigen Thresholdfestlegung für die spätere Auswertung ist in Abbildung 18 dargestellt.

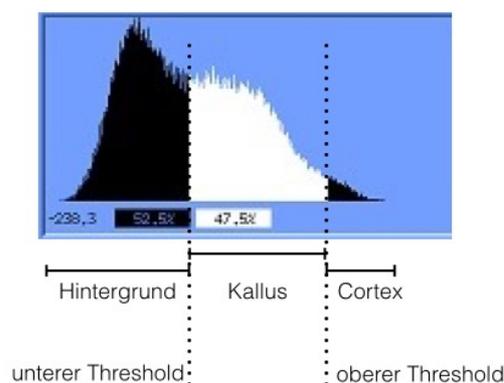


Abb. 17: Histogramm mit Festlegung des oberen und unteres Thresholds

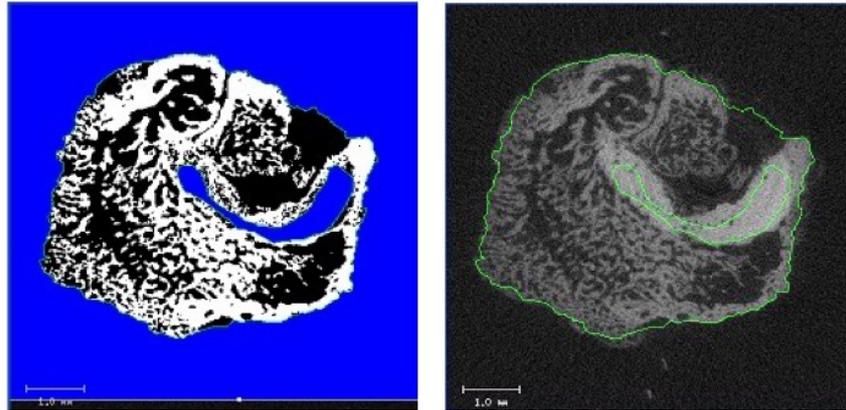


Abb. 18: Bedeutung des Thresholds: Links: Alle weiß markierten Strukturen gehen in die Auswertung mit ein, alle schwarzen werden nicht berücksichtigt. Rechts: Das vorherige manuelle „Rendering“ definiert den Gesamtkallus (äußere grüne Linie) und die präexistierenden kortikalen Strukturen (innere grüne Linie), welche nicht in die Berechnungen des neu formierten Gewebes mit einbezogen werden sollen.

3.3 Statistik, graphische Darstellung

Alle μ CT Aufnahmen wurden unter einer individuellen Scannummer gespeichert, anhand derer diese später dem jeweiligen Tier und Messzeitpunkt zugeordnet werden konnten. Anhand dieser beiden Eckpunkte wurden die Gruppen für die Auswertungen zusammengesetzt, sodass zum einen die Heilung innerhalb einer Behandlungsgruppe im zeitlichen Verlauf analysiert werden konnte, und zum anderen die Unterschiede zu den einzelnen Messzeitpunkten unter den Versuchsgruppen. Als Korrelat für den Heilungsverlauf wurden die aus den μ CT Datensätzen errechneten Ergebnisse herangezogen.

Für die graphischen Darstellung der Messergebnisse wurde das Programm Numbers, Version 3.5.3 von Apple Inc. verwendet. Ebenfalls konnte damit für alle untersuchten Gruppen der n-Wert, der arithmetische Mittelwert, sowie die jeweilige Standardabweichung errechnet und graphisch aufbereitet werden. Für jede der untersuchten Gruppen wurde ein n-Zahl von mindestens 5 zu jedem Untersuchungszeitpunkt erreicht (siehe Tabelle 2). Zur Bewertung der Signifikanzen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$

zugrunde gelegt, sodass Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde Prism 6 for Mac, GraphPad Software Inc. verwendet. Herangezogen wurde eine Kruskal-Wallis 1 way ANOVA Berechnung für nicht-parametrische (nicht-normalverteilte) Werte. Die Gruppe der Tiere, denen PBMCs implantiert wurde, gilt als Vergleichsgruppe.

n	PBMC	CD31+	CD31+/14-	CD31+/14+
2 Wochen	7	10	9	6
4 Wochen	6	9	7	5
6 Wochen	5	8	8	7
in vitro	5	9	9	5

Tab. 2: n-Zahlen der einzelnen Versuchsgruppen in der Auswertung

3.4 Ausschluss von Tieren

Vereinzelt mussten Tiere im Verlauf der Studie aus den Ergebnissen ausgeschlossen werden. Dabei lagen individuell unterschiedliche Gründe vor. Zum einen mussten Tiere ausgeschlossen werden, bei denen sich ein großer Lysekallus um die Fixateurpins gebildet hatte, der in einem Maße in den Osteotomiespalt hineinragte, dass nicht mehr von einer verlässlichen Analysemöglichkeit ausgegangen werden konnte. Ein weiteres Tier musste ausgeschlossen werden, da sich Pins des Fixateurs offensichtlich aus dem Knochen gelöst hatten und nur durch das umliegende Weichteilgewebe gehalten worden. Dies führte bei der Sichtung der entsprechenden Scans zu einem Bild von stark verschobenen Osteotomieenden, die zum einen nicht mehr orthogonal zueinander standen und zum anderen sich teils nach außerhalb und teils stark in des Scanbereich verschoben hatten. Auch hier war eine Vergleichbarkeit der Analysedaten nicht mehr gegeben. Darüber hinaus wurde ein Tier ausgeschlossen, bei dem die Vermutung bestand, deutlich jünger als beim Züchter bestellt zu sein. Grund für diese Annahme war ein deutlich geringeres Ausgangsgewicht und eine andere Gewichtsentwicklung über den Versuchszeitraum. Da hier aber ausdrücklich mit einem Modell für verzögerte Knochenheilung gearbeitet werden sollte, war ein höheres Alter elementarer Bestandteil der Einschlusskriterien. Darüber hinaus gab es Tiere, die nicht den gesamten Versuch-

szeitraum durchlaufen konnten und vorzeitig getötet werden mussten. Gründe dafür waren Pinlockierungen, zweimalig die Entstehung eines Tumors im Bauchraum oder Narkosekomplikationen. In Anbetracht der Tatsache, dass einige Tiere nicht alle 6 Wochen durchlaufen konnten, wurden andere Tiere nur zu späteren Zeitpunkten untersucht, um das Risiko vorheriger Narkosekomplikationen auszuschließen. Aus diesem Grund sind die n-Zahlen der einzelnen Versuchsgruppen in der Auswertung (Tabelle 2), in Summe kleiner als die 39 insgesamt in die Auswertung einbezogenen Tiere.

4.0 Ergebnisse

4.1 Auswahl der Zellpopulationen

Im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendbarkeit war es notwendig, eine Zellpopulation zu identifizieren, die zum einen nachweisbare immun-modulatorische Eigenschaften, als auch einen pro-angio- und pro-osteogenen Einfluss hat, und zum anderen leicht zugänglich und aufreinigbar ist. Dementsprechend rückten Zellen des peripheren Blutes in den Blickpunkt, da diese zumindest hervorragend die Eigenschaft der Erreichbarkeit erfüllen. In der AG Zelltherapie des Julius Wolff Institutes wurden aus humanen Buffy Coats Subpopulationen peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs) mit entsprechenden Eigenschaften identifiziert. Dabei wurden die einzelnen Gruppen mittels MACS Technologie (magnetic-activated cell sorting, Milteny Biotec GmbH) voneinander abgetrennt und unter Endothelzellbedingungen alleine oder in Ko-Kulturen mit humanen Endothelzellen kultiviert. Als Marker für eine pro-angiogene Wirkung galten die Ausbildung von gerichteten tubulären Strukturen in Ko-Kulturen und die Sekretion pro-angiogener Faktoren. Osteogene Kapazitäten wurden in Ko-Kulturen mit humanen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) verifiziert. Hierbei konnte im positiven Falle eine vermehrte osteogene Differenzierung der MSCs beobachtet werden. Des Weiteren wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, inwiefern die so als aussichtsreich identifizierten Zellpopulationen auch in ausreichender Quantität in humanem Blut aufzufinden sind und inwiefern sie auch im höheren Alter noch in ausreichender Zahl verfügbar sind. Ergebnis dieser Untersuchungen war die Identifikation von CD31+ Zellen als aussichtsreiche PBMC-Subpopulationen für die Anwendung im *in vivo* Versuch. Dabei wurde weiterhin festgestellt, dass CD31+ Zellen die zeitgleich CD14+ Oberflächenantigene besitzen einen großen Anteil der CD31+ Gesamtpopulation darstellen. Da CD14+ Monocyten/Macrophagen bekanntlich einen erheblichen Einfluss auf die Geweberegeneration ausüben [55], erschien es sinnvoll, neben der Gesamtheit der CD31+ Zellen auch die CD31+/14- und CD31+/14+ Subpopulationen zu untersuchen.

4.2 PBMC Gruppe

Die PBMC-Gruppe ist die Gesamtpopulation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes dar (PBMC= peripheral blood mononuclear cells). Sie stellt in diesem Versuchsetting die Vergleichsgruppe dar, da hier keine Anreicherung verschiedener Subpopulationen vor der Transplantation stattfand und die Zusammensetzung nahezu unverändert zu der im Blut nativ vorkommenden PBMC Population ist.

4.2.1 *in vivo*

Die *in vivo* Analysen der PBMC-Gruppe zeigten über den Versuchszeitraum von 6 Wochen, wie in Abbildung 19 exemplarisch dargestellt, keine knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes. Geringgradige Anlagerungen von Knochen- und Kallusgewebe konnte zumindest vom proximalen Osteotomieende ausgehend gesehen werden. Einzelne neu gebildete Anlagen zeigten sich vorrangig im Bereich des Markraums und hatten über den untersuchten Zeitraum einen geringen Progress. Von den kortikalen Abschnitten der Ostotomieenden schien kein nennenswertes Wachstum auszugehen. Nach sechs Wochen ließ sich im Mittel ein absolutes Volumen von $30,44 \pm 20,74\text{mm}^3$ und ein knöchernes Volumen von $13,24 \pm 10,09\text{mm}^3$ darstellen. Der mineralisierte Inhalt lag absolut im Mittel bei $16,12 \pm 11,34\text{mg HA}$, bezogen auf die knöchernen Strukturen bei $10,82 \pm 8,12\text{mg HA}$.

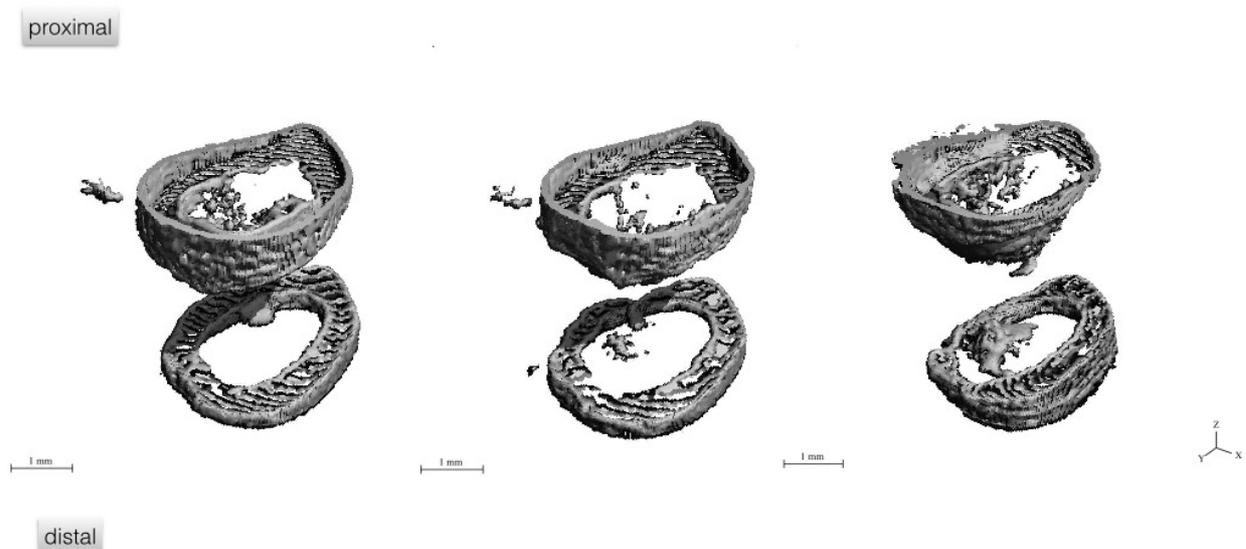


Abb. 19: PBMC-Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus *in vivo* μCT -Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.

4.2.2 *in vitro*

Aus den mit höherer Auflösung erstellten *in vitro* Aufnahmen (Abb. 20) ließ sich eine durchschnittliche Anzahl von trabekulären Strukturen von $4,66 \pm 1,44/\text{mm}$ errechnen wobei die Trabekel im Mittel $0,12 \pm 0,02$ mm dick waren. Der intertrabekuläre Raum war mit $0,34 \pm 0,13$ mm von allen untersuchten Gruppen am größten.

Der in Abbildung 21 gezeigte Schnitt quer durch eine der dreidimensionalen Rekonstruktionen verdeutlicht exemplarisch die ausbleibende Überbrückung des Osteotomiespaltes und die insgesamt geringgradige Anlagerung von Kallusgewebe oder gar von sich neu formierenden knöchernen Strukturen, welche in dieser Darstellung unter der Einfärbung nach Dichtegrad rot zu sehen wäre.

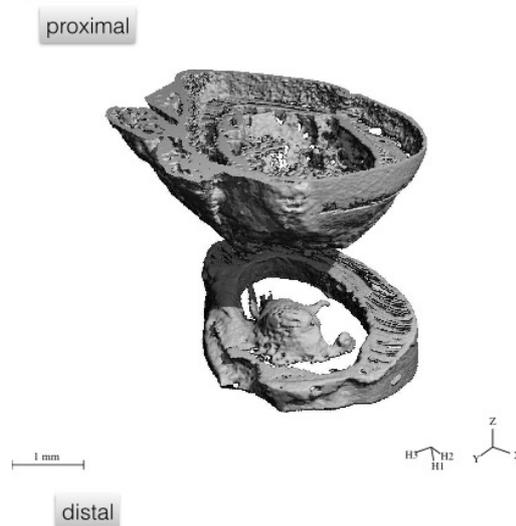


Abb. 20: PBMC-Gruppe. 3D Rekonstruktion *in vitro* Studien.

Als Bestätigung konnte die in Abbildung 22 exemplarisch gezeigten histologischen Auswertungen in Movat-Pentachrom-Färbung angefertigt werden. Rot gefärbt zeigen sich Muskel- und elastische Fasern. Grünlich am distalen Osteotomieende fallen Areale mit hauptsächlich fibrotischen Fasern auf. Knöcherner überbrückende Strukturen sind auch hier nicht zu sehen.

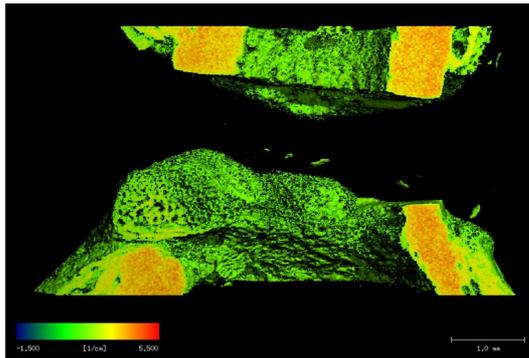


Abb. 21: PBMC-Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion *in vitro*. Farbverlauf nach Dichte.

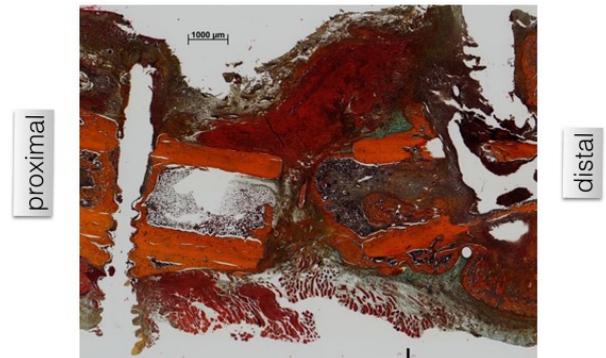


Abb. 22: PBMC-Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt in Movat-Pentachrom-Färbung, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ing. Andrea Sass.

4.3 CD31+ Gruppe

Insgesamt ließ sich in der CD31+ Gruppe das beste Outcome zeigen. Abbildung 23 zeigt exemplarisch, dass es nach sechs Wochen sogar zu einer teilweisen Überbrückung des Osteotomiespalt gekommen ist.

4.3.1 *in vivo*

Das positive Wachstum im Osteotomiespalt ließ sich ansatzweise bereits zum Zwei-Wochen-Zeitpunkt feststellen und verdeutlichte sich besonders ab der vierten Woche. Es schien dabei zu einer Vermehrung von Gewebe von proximal und von distal gekommen zu sein, wobei der proximale Zuwachs ein deutliches Übergewicht darstellte. Insgesamt zeigte sich die Zunahme von Kallusgewebe zunächst im Bereich des Markkanals bevor auch die kortikalen Osteotomieenden als Ausgangspunkt für neues Gewebe gesehen werden konnten. Dies spricht am ehesten für einen enchondralen Ossifikationsmechanismus. Nach sechs Wochen lag ein Kallus vor, der zum einen den Osteotomiespalt bereits überbrückte und zum anderen in seinem Volumen die Breite des ursprünglichen präoperativen Knochenbettes überstieg. Im Vergleich zu den anderen Gruppen fiel außerdem die höhere Gleichmäßigkeit der neu-gebildeten Strukturen im Bereich der Osteotomie auf.

Dieses Ergebnis ließ sich auch anhand der errechneten Daten quantifizieren. Insgesamt zeigte sich nach sechs Wochen *in vivo* ein mittleres Gesamtvolumen von $67,51 \pm 33,25 \text{ mm}^3$ und ein mittleres knöchernes Volumen von $26,14 \pm 10,70 \text{ mm}^3$ was sich deut-

lich von den anderen Versuchsgruppen abhob. Der Vergleich des Gesamtvolumina nach sechs Wochen zeigte für diese Gruppe eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur PBMC-Gruppe. Der absolute mineralisierte Anteil lag mit $34,52 \pm 12,33\text{mg HA}$) ebenfalls über den Werten der anderen Vergleichsgruppen. Analog waren die Ergebnisse des mineralisierten Inhaltes der als knöchern definierten Strukturen mit $21,46 \pm 9,47\text{mg HA}$.

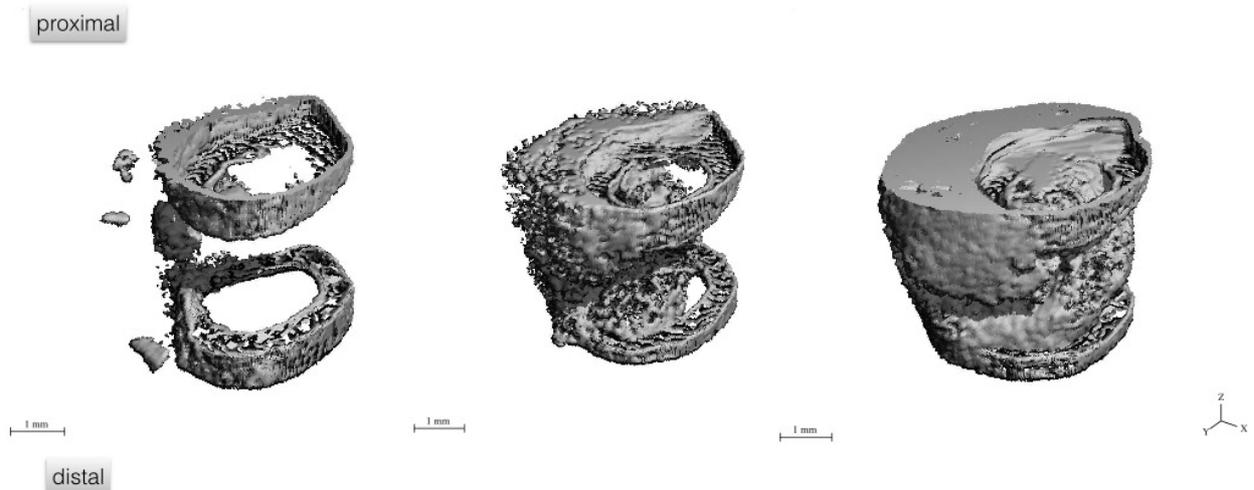


Abb. 23: CD31+ Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus *in vivo* μCT -Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.

4.3.2 *in vitro*

Auch die *in vitro* Studien (exemplarisch Abb. 24) zeigten sich in Bezug auf die PBMC-Vergleichsgruppe überlegen. Die Anzahl der trabekulären Strukturen stellte mit $6,97 \pm 2,38 /\text{mm}$ von allen Gruppen den höchsten Wert dar.

Abbildung 25 gibt zudem exemplarisch einen Querschnitt durch eine der dreidimensionalen Rekonstruktionen zur Ansicht. Es lässt sich gut die Überbrückung des Osteotomiespaltes erkennen, teilweise bereits mit ersten Bereichen innerhalb des neu formierten Kallusgewebes, welche in den Verknöcherungsprozess übergehen und in der Abbildung gelb bis rot erscheinen. Nichtsdestotrotz lässt sich erkennen, dass die Heilung dieser gesetzten Osteotomie nach sechs Wochen noch nicht vollständig abgeschlossen ist.

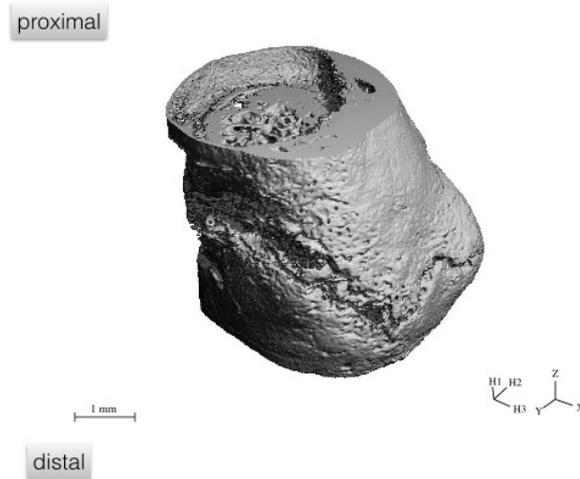


Abb. 24: CD31+ Gruppe. 3D Rekonstruktion aus *in vitro* Studien.

Das anhand der radiologischen Befunde dargelegte positive Ergebnis konnte mit Hilfe der histologischen Analysen untermauert werden. Beispielhaft ist hier Abbildung 26 ausgewählt, welche in der Movat-Pentachrom-Färbung hohe Anteile an orange erscheinenden Arealen im Osteotomiespalt aufweist. Diese sind als im Verknöcherungsprozess befindlich zu werten. Gut lässt sich hier die Einfärbung mit den kortikalen Strukturen des Femurknochens jenseits der Osteotomie vergleichen. Grün-bläulich erscheinen noch nicht mineralisierte Knorpelstrukturen.

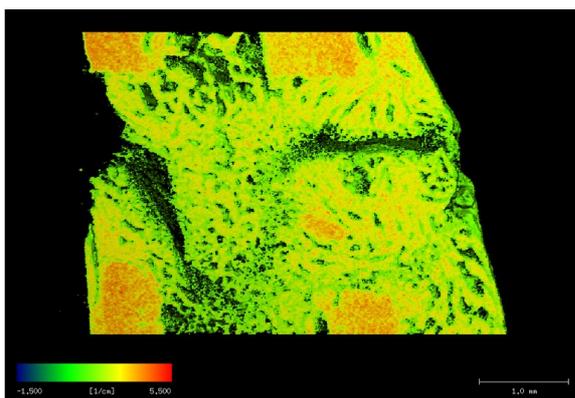


Abb. 25: CD31+ Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion *in vitro*. Farbverlauf nach Dichte.



Abb. 26: CD31+ Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt in Movat-Pentachrom-Färbung, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ing. Andrea Sass.

4.4 CD31+/CD14- Gruppe

4.4.1 *in vivo*

Diese durch Depletion der CD14+ Zellen entstandenen CD31+ Subpopulation zeigte sich im Hinblick auf das absolute und auf das knöchernerne Volumen (TV: $43,43\text{mm}^3 \pm 16,58$; BV: $20,17\text{ mm}^3 \pm 10,29$) nach sechs Wochen zwar der PBMC-Gruppe überlegen, konnte aber keine Überbrückung des Osteotomiespaltes erzielen, die an die CD31+ Gruppe herangekommen wäre (siehe exemplarische Abbildung 27).

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich der Gewebezunahme vorrangig vom proximalen Ende des Osteotomiespaltes ausgehend. Deutlich wird dies in besonderem Maße in der Studie zum 4 Wochen-Zeitpunkt postoperativ. Das distale Ende zeigt sich im Vergleich zu der Aufnahme zwei Wochen zuvor nahezu unverändert, während am proximalen Ende eine deutliche Gewebszunahme mit Fokus auf den Bereich des ehemaligen medullären Kanals auszumachen ist.

Dafür zeigte sie den höchsten Anteil von knöchernen Volumen am Gesamtvolumen zu den vier- und sechs-Wochen-Zeitpunkten (BV/TV nach 4 Wochen $0,29 \pm 0,072$, nach 6 Wochen $0,44 \pm 0,105$).

Der gesamte mineralisierte Inhalt lag nach sechs Wochen im Mittel bei $24,30 \pm 10,33$ mg HA, der mineralisierte Inhalt der knöchernen Strukturen im Mittel bei $16,69 \pm 8,58$ mg HA und damit für beiden Werte über denen der PBMC-Vergleichsgruppe jedoch unterhalb der CD31+ Gruppe.

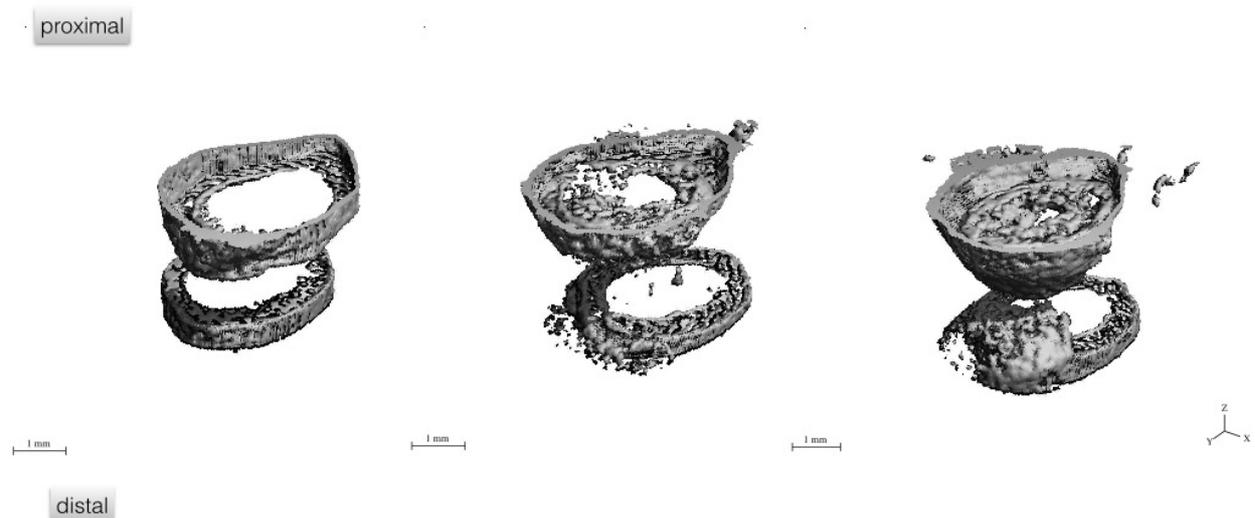


Abb. 27: CD31+/CD14- Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus *in vivo* μ CT-Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.

4.4.2 *in vitro*

Die Analyse der trabekulären Strukturen ergab insgesamt ein durchwachsendes Ergebnis. Die Zahl der Trabekel lag mit $5,8 \pm 0,82$ /mm im Mittel über dem Niveau der PBMC-Gruppe, jedoch deutlich unter dem Wert der CD31+ Gruppe. Dies traf auch auf den intertrabekulären Raum zu, der mit $0,22 \pm 0,03$ mm bestimmt werden konnte. Eine Überbrückung des Osteotomiespaltes konnte nicht gesehen werden, wohl aber eine Zunahme von Kallusvolumen von den Osteotomieenden ausgehend, wie in den Aufnahmen in Abbildung 28 und 29 beispielhaft zu erkennen ist.

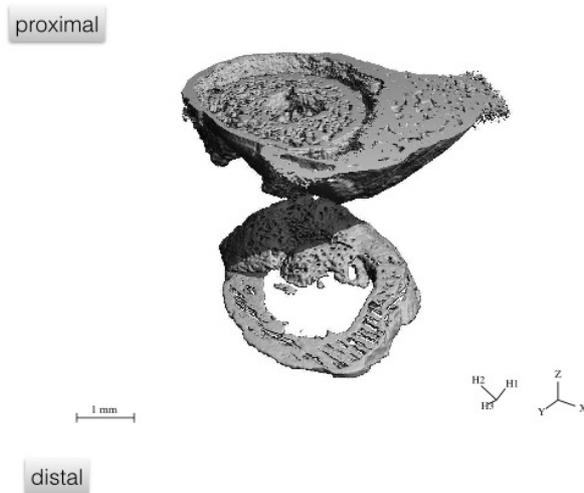


Abb. 28: CD31+/CD14- Gruppe. 3D Rekonstruktion aus *in vitro* Studien.

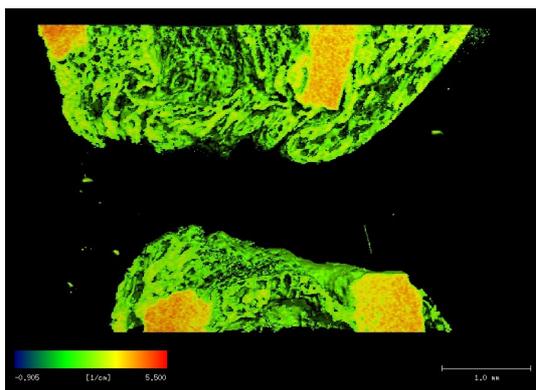


Abb. 29: CD31+/CD14- Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion *in vitro*. Farbverlauf nach Dichte.

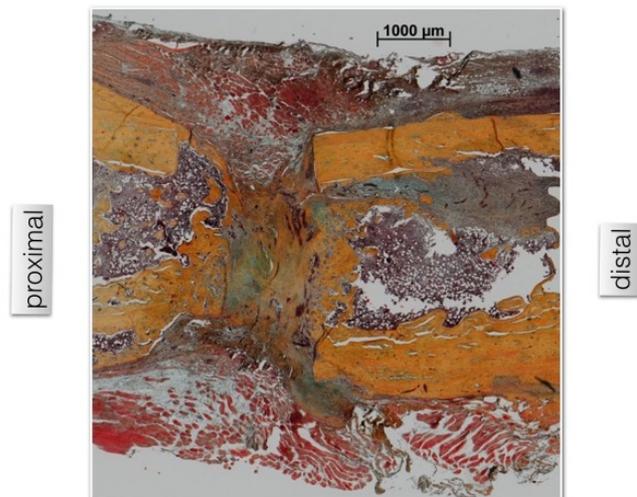


Abb. 30: CD31+/CD14-Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt in Movat-Pentachrom-Färbung, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ing. Andrea Sass.

Die abschließenden histologischen Analysen zeigten nach sechs Wochen entsprechend eine deutliche Vermehrung von grünlich imponierend, also fibrotischen Arealen, durchsetzte von einigen gelblichen, bereits mineralisierten Strukturen im Bereich des Osteotomiespaltes (Abb. 30).

4.5 CD 31+/CD14+ Gruppe

Bei der vierten der untersuchten Gruppen, wurden die Zellen in den Osteotomiespalt appliziert, die neben dem CD31+ auch einen CD14+ Oberflächenmarker aufweisen konnten.

4.5.1 *in vivo*

Insgesamt konnte die CD31+/CD14+ Population nicht das selbe Überbrückungsergebnis zeigen, wie die Gesamtfraktion der CD31+ Zellen. Nach sechs Wochen lag das mittlere absolute Volumen, sowie das mittlere knöchernen Volumen unterhalb der Werte dieser Gesamtpopulation, aber doch jeweils über dem Wert der PBMC-Vergleichsgruppe. Mit einem mittleren knöchernen Volumen von $20,08 \pm 13,52 \text{ mm}^3$ war die Knochenneubildung der CD31+/CD14+ Gruppe in etwa vergleichbar mit der CD31+/CD14- Gruppe, erzielte mit $52,09 \pm 26,86 \text{ mm}^3$ jedoch ein höheres Absolutvolumen. Analog dazu zeigten sich die Werte für den absoluten mineralisierten Inhalt ($26,76 \pm 14,16 \text{ mg HA}$ im Mittel nach sechs Wochen) denen der PBMC-Gruppe und denen der CD31+/CD14- Gruppe über-, denen der CD31+ Gruppe unterlegen. Der mineralisierte Inhalt der knöchernen Strukturen war mit $16,61 \pm 11,75 \text{ mg HA}$ im Mittel nach sechs Wochen vergleichbar mit den Werten der CD31+/CD14- Gruppe.

Der gesehene Zuwachs an knöchernem Gewebe zeigte sich auch in dieser Gruppe hauptsächlich vom proximalen Ende der Osteotomie ausgehend, das distale Ende zeigte insgesamt wenig Aktivität im Sinne einer Proliferation von Kallusstrukturen. Im zeitlichen Verlauf ergab sich ab dem Scan in Woche vier ein deutlicher Überschuss von Kallusformationen seitlich der präexistenten kortikalen Anlage ohne dabei ein eindeutig gerichtetes Gewebewachstum im Sinne einer Überbrückung des Osteotomiespaltes zu erzielen. Des Weiteren erscheinen diese Formationen auch sehr inhomogen.

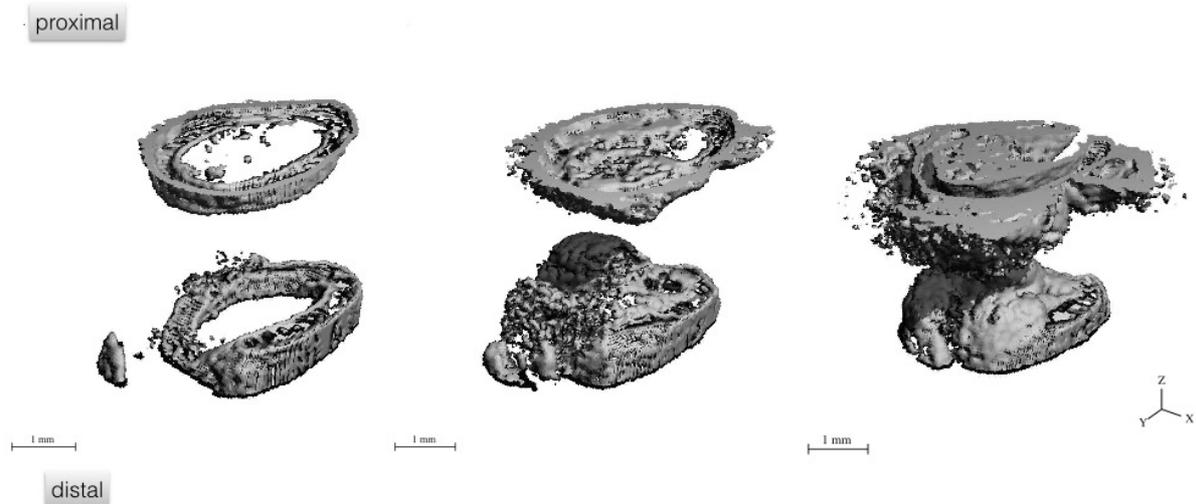


Abb. 31: CD31+/CD14+ Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus *in vivo* μ CT-Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.

4.5.2 *in vitro*

In den abschließenden *in vitro* Analysen zeigte die CD31+/14+ Population die zweitöchste Anzahl an formierten trabekulären Strukturen ($6,05 \pm 0,54$ /mm), sowie den zweitgeringsten intertrabekulären Zwischenraum mit $0,21 \pm 0,04$ mm. Beide Werte sind denen der CD31+/14- Gruppe jedoch nur geringgradig überlegen. Die dreidimensionalen Rekonstruktionen der radiologischen Aufnahmen zeigte wie Abbildung 32 und 33 demonstrieren sollen, einen Zuwachs von Kallusgewebe von beiden Osteotomieenden ausgehend, mit Übergewicht der proximalen Seite. Dabei zeigte sich auch die Tendenz hin zu ersten punktuellen Überbrückungen und Umwandlung einzelner Areale hin zu dichteren verknöcherten Strukturen.

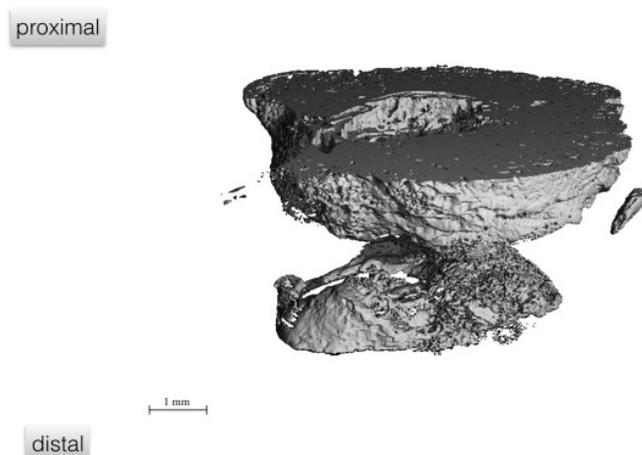


Abb. 32: CD31+/CD14+ Gruppe. 3D Rekonstruktionen aus den erstellten *in vitro* Studien.

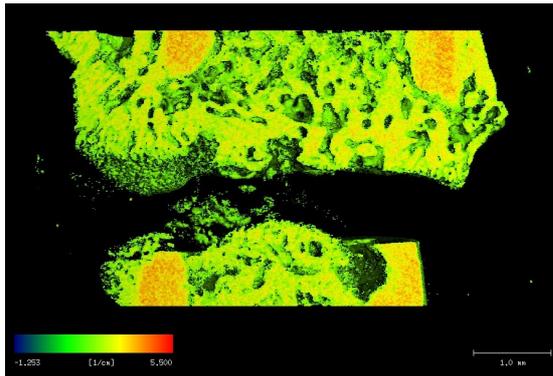


Abb. 33: 31+/CD14+ Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion *in vitro*. Farbverlauf nach Dichte.

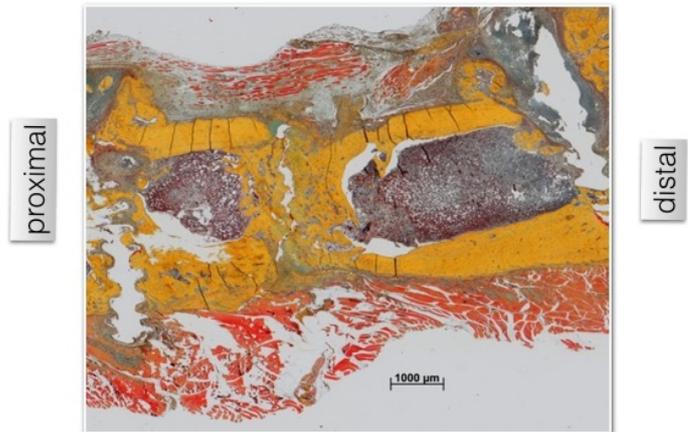


Abb. 34: CD31+/CD14+Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt in Movat-Pentachrom-Färbung, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ing. Andrea Sass.

Die im Anschluss an die letzten *in vitro* μ CT-Studien durchgeführten histologische Evaluation zeigte, wie hier in Abbildung 34 demonstriert, einen Zuwachs von mineralisierten Strukturen (gelb-orange) im Osteotomiespalt. Die außen liegenden roten Strukturen beruhen auf der Anfärbung von muskulärem Weichteilgewebe. Insgesamt ein Bild, das die Ergebnisse der μ CT-Studien bestätigt respektive den Befund, dass diese Behandlungsgruppe nach der CD31+ Gesamtpopulation das nächst bessere Outcome erzielt hat.

4.6 Graphische Aufarbeitung der Ergebnisse

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich sowohl morphologisch wie auch quantitativ das beste Outcome in der CD31+ Gruppe. Sie stellt die einzige Population dar, die zu einer wirkliche Überbrückung des Osteotomiespalt es führt. Die *in vivo* Daten ergaben nach sechs Wochen das höchste absolute und knöchernen Volumen. Die Menge an Hydroxyapatit als Zeichen der Mineralisierung war ebenfalls, bezogen auf das absolute Volumen, sowie nach Anlage des Thresholds auf das knöchernende Volumen, am höchsten. Sofern sich ein Zuwachs an knöchernem Material bzw. an Kallusformationen ergab, nahm dieser in der Regel seinen Ausgang am proximalen Osteotomieende bzw. war an dieser Seite im Vergleich zum distalen vermehrt zu sehen. Des Weiteren zeigte

sich über den Verlauf des Heilungsprozesses, dass dieser meist seinen Ursprung im Bereich des medullären Kanals hatte, also stärker von endostal und weniger von den kortikalen Strukturen im Sinne eines direktionalen Wachstums ausgehend war.

Die Dynamik des Heilungsprozesses in den einzelnen Untersuchungsgruppen wird durch die *in vivo* Studien deutlich (Abb. 35-38). Nach zwei Wochen zeigen sich die einzelnen Gruppen noch recht homogen. Dies gilt im Wesentlichen für alle untersuchten Parameter. Erst ab der vierten Woche kommt es zu einer Zunahme von absolutem und knöchernem Volumen, wodurch bereits erste Tendenzen zu erkennen sind. Ab dem sechs Wochen Zeitpunkt lassen sich diese Entwicklungen noch deutlicher ausmachen und weisen zumindest teilweise für die CD31+ Gruppe auch statistische Signifikanz in Bezug auf die PBMC-Vergleichsgruppe auf. Für eine bessere Übersicht sind in den Graphen die einfachen Standardabweichungen nur positiv eingezeichnet.

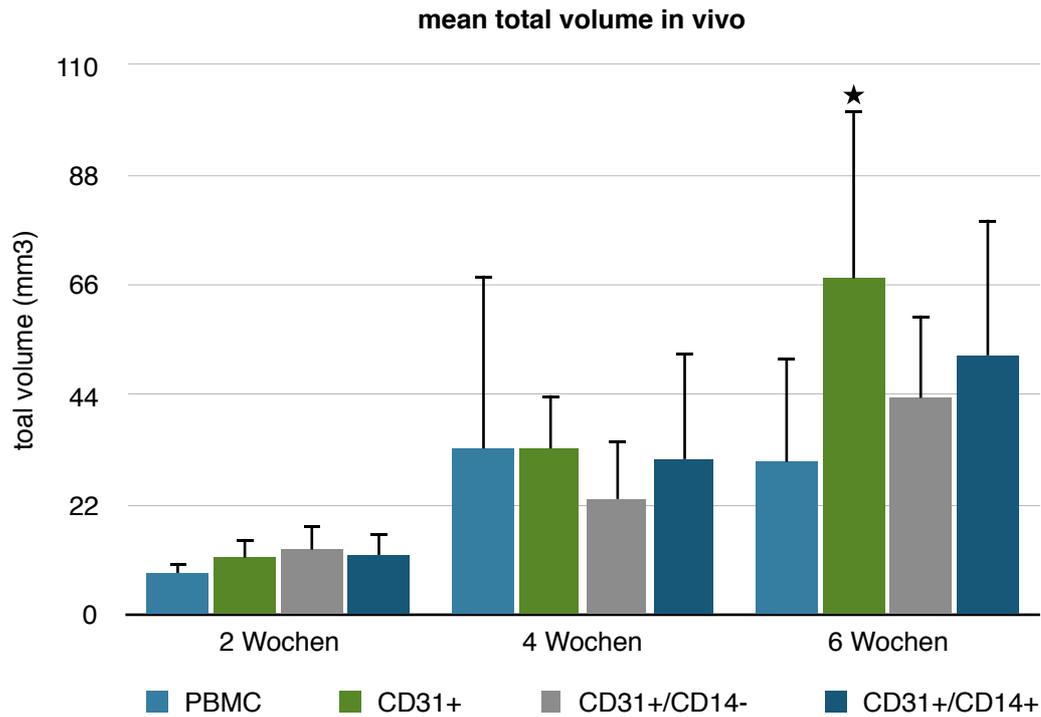


Abb. 35: Grafik Absolutes Volumen im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

★ = Ergebnis statistisch signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) in Bezug auf die PBMC Vergleichsgruppe

		PBMC	CD31+	CD31+/CD14-	CD31+/CD14+
2 Wochen	Mittelwert	8,39	11,39	13,07	12,16
	StabW	2,24	3,75	4,90	3,82
4 Wochen	Mittelwert	33,54	33,31	23,16	31,41
	StabW	34,58	10,75	11,80	20,95
6 Wochen	Mittelwert	30,44	67,51	43,43	52,09
	StabW	20,74	33,25	16,58	26,86

Tab. 3: Datenreihe Absolutes Volumen in mm^3 . Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

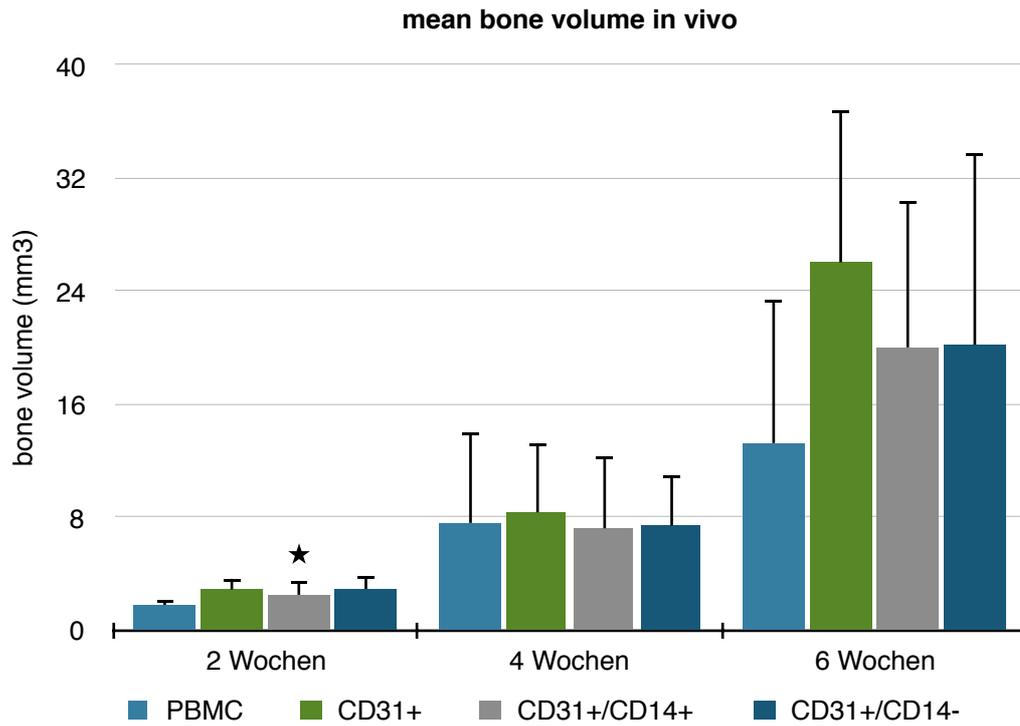


Abb. 36: Grafik Knöchernes Volumen im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

★ = Ergebnis statistisch ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) signifikant in Bezug auf die PBMC Vergleichsgruppe

		PBMC	CD31+	CD31+/CD14-	CD31+/CD14+
2 Wochen	Mittelwert	1,80	2,80	2,97	7,19
	StabW	0,41	0,79	0,98	3,62
4 Wochen	Mittelwert	7,52	8,39	7,31	20,08
	StabW	6,44	4,85	5,05	13,52
6 Wochen	Mittelwert	13,24	26,14	20,17	30,12
	StabW	10,09	10,70	10,29	17,49

Tab. 4: Datenreihe Knöchernes Volumen in mm^3 . Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

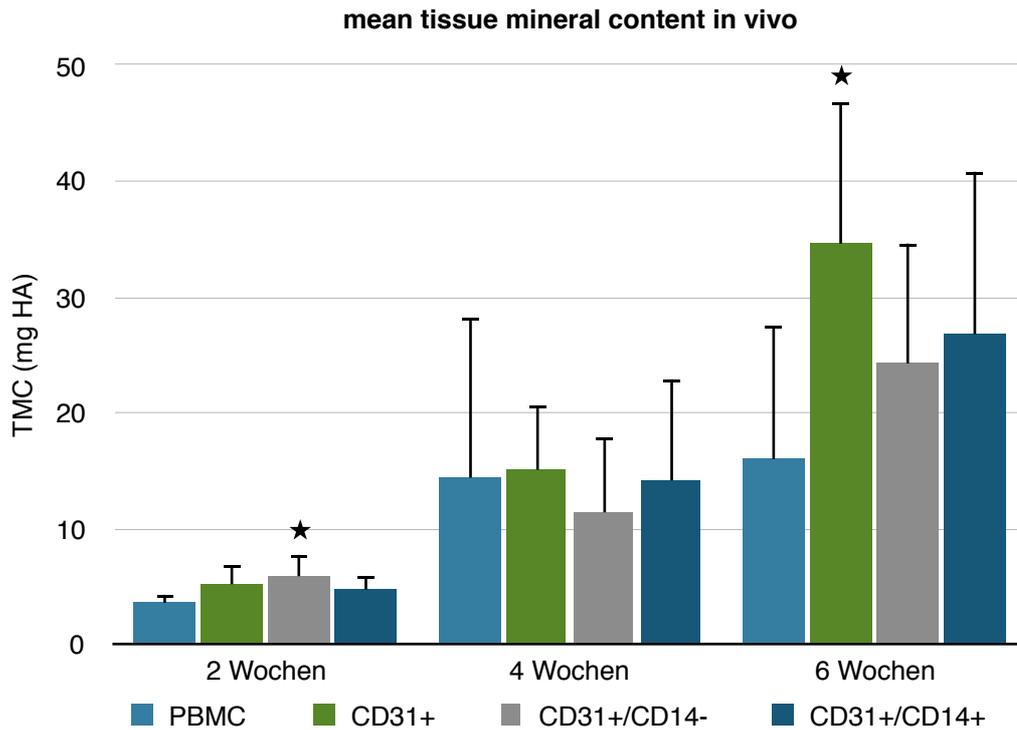


Abb. 37: Grafik mineralisierter Anteil des Gesamtgewebes im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

★ = Ergebnis statistisch signifikant (p-Wert ≤ 0,05) in Bezug auf die PBMC Vergleichsgruppe

		PBMC	CD31+	CD31+/CD14-	CD31+/CD14+
2 Wochen	Mittelwert	3,50	5,14	5,86	4,75
	StabW	0,87	1,58	1,94	1,16
4 Wochen	Mittelwert	14,29	15,01	11,31	14,08
	StabW	13,92	5,64	6,57	8,83
6 Wochen	Mittelwert	16,12	34,52	24,30	26,76
	StabW	11,34	12,33	10,33	14,16

Tab. 5: Datenreihe mineralisierter Anteil des Gesamtgewebes in mm HA. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

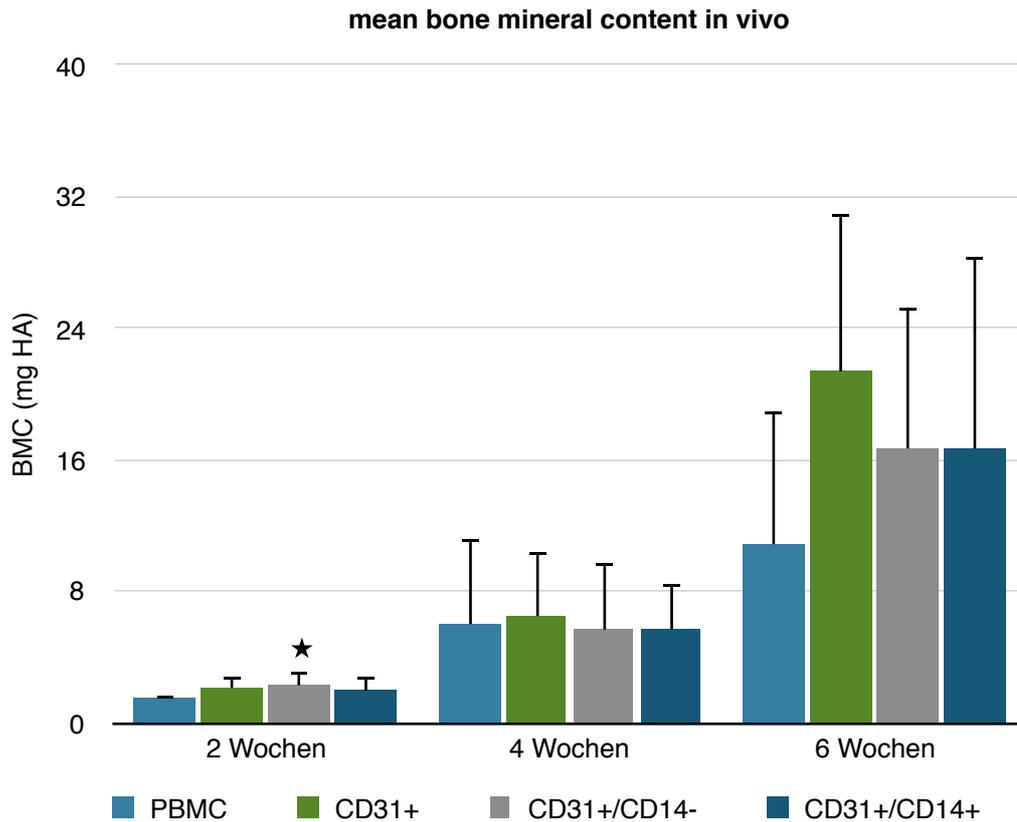


Abb. 38: Grafik mineralisierter Anteil der knöchernen Gewebeanteile im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

★ = Ergebnis statistisch signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) in Bezug auf die PBMC Vergleichsgruppe

		PBMC	CD31+	CD31+/CD14-	CD31+/CD14+
2 Wochen	Mittelwert	1,42	2,20	2,30	1,98
	StabW	0,30	0,63	0,74	0,72
4 Wochen	Mittelwert	6,01	6,54	5,74	5,67
	StabW	5,19	3,85	3,97	2,77
6 Wochen	Mittelwert	10,82	21,46	16,69	16,61
	StabW	8,12	9,47	8,58	11,75

Tab. 6: Datenreihe mineralisierter Anteil des knöchernen Gewebes in mm HA. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf *in vivo*.

Der Vergleich der durchgeführten Berechnungen zur Trabekelstruktur des neu formierten Knochen-/Kallusgewebes stützt die Ergebnisse der *in vivo* Studien. Es konnte verdeutlicht werden, dass unter den untersuchten Gruppen nach Implantation der CD31+ Gesamtfraktion die höchste Zahl an Trabekeln pro mm gesehen werden konnte (Abb. 39). Dies auch mit statistischer Signifikanz zur PBMC-Gruppe. Ebenso zeigte sich im arithmetischen Mittel der geringste intertrabekuläre Zwischenraum (Abb. 40). Auch dieser Wert weist eine statistischer Signifikanz im Vergleich zur PBMC-Kontrollgruppe auf.

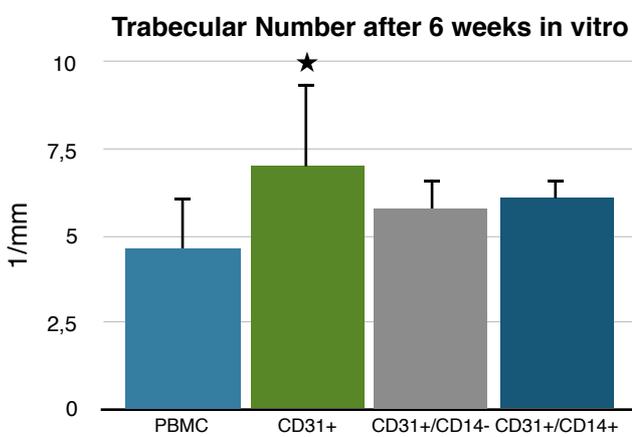


Abb. 39: Grafik mittlere Anzahl der aus den *in vitro* Studien bestimmten Trabekel pro mm.

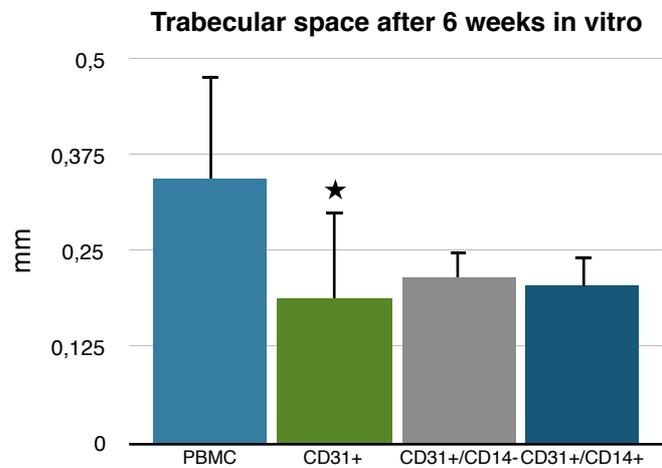


Abb. 40: Grafik mittlere Größe der aus den *in vitro* Studien bestimmten intertrabekulären Zwischenräume.

★ = Ergebnis statistisch signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) in Bezug auf die PBMC Vergleichsgruppe

Einfache Standardabweichungen in allen Graphen der Übersicht halber nur positiv eingezeichnet.

5.0 Diskussion

5.1 Diskussion der erhobenen Daten

Aufgrund der Vorstudien wurde initial eine verbesserte Knochenheilungsrate vorrangig für die CD31+ Zellen vermutet. Dies konnte mit den hier durchgeführten *in vivo* Versuch auch bestätigt werden. Da jedoch auch die CD31-Subpopulation der CD14+ Zellen *in vitro* osteo-und angiogene Kapazitäten zeigte, schien es sinnvoll entsprechende Untergruppen zu untersuchen, welche zum einen durch Depletion der CD14+ Zellen aus der CD31+ Fraktion, sowie der alleinigen CD14+ Population bestanden. Auf diesem Wege konnte untersucht werden, ob der wesentliche Effekt der CD31+ Zellen gegebenenfalls auf der Wirkung der in dieser Population stark angereicherten CD14+ Zellen besteht. Dies zeigte sich in den hier angefertigten Analysen jedoch nicht, was die Vermutung nahelegt, dass der Effekt der CD31+ Gesamtfraktion auf dem Zusammenspiel der einzelnen Subpopulationen beruht, welche über spezifische Zell-Zell Interaktionen gemeinsam zur Heilung beitragen.

Zu vermuten ist weiterhin, dass der positive Einfluss der Gruppe der CD31+ Zellen auf die Knochenheilung insbesondere in der Frühphase der Heilung von Bedeutung ist, denn in den ersten ein bis zwei Wochen sind die proangiogenen Eigenschaften sowie die Fähigkeit zur Ausschüttung und Anlockung proangiogener Zytokine dieser Zellpopulation von besonderer Bedeutung bei der Ausbildung des ersten Kallusgewebes im Osteotomie- respektive Frakturspalt. Als Fortführung dieses Projektes sollen, um dies weiter zu untermauern, histologische und zytologische Analysen durchgeführt werden. Damit soll nach *in vivo* Implantation von CD31+ Zellen das Vorhandensein entsprechender Zytokine in den ersten Tagen untersucht werden, um den „mode of action“ herauszustellen.

Obwohl die in diesem Versuch erhobenen Daten nicht immer Signifikanzniveau erreichen, so zeigen sie doch deutliche Tendenzen an. Hier gilt es ergänzende Untersuchungen anzuschließen, um die erhobenen Thesen zu untermauern. Dies wurde in der Arbeitsgruppe unter anderem mit der Quantifizierung von neu formierten Gewebe aus den sich anschließenden histologischen Analysen getan. Die Resultate dieser Untersuchungen festigten ebenfalls die hier beschriebenen Ergebnisse.

In Bezug auf die statistische Validität wäre eine höhere n-Zahl sicher wünschenswert gewesen, allerdings stand dem die Restriktion auf eine möglichst geringe Anzahl von Tieren durch den Tierversuchsantrag entgegen. Durch den Verlust einiger Tiere aus dem Versuchsprotokoll, reduzierte sich die Zahl der am Ende eingeschlossenen Tiere darüber hinaus noch weiter. Es ist des Weiteren davon auszugehen, dass eine längere Standzeit der Tiere zu einer höheren Signifikanzquote, insbesondere durch eine weitere Heilung innerhalb der CD31+ Gruppe geführt hätte, da diese nach 6 Wochen noch nicht abgeschlossen ist. Bei dem hier verwendeten Tiermodell zur verzögerten Knochenheilung mit der Ausbildung von non-unions, wäre dies jedoch vor allem in Bezug auf die Kontrollgruppe tierschutzrechtlich ebenfalls nicht vertretbar.

5.2 Vergleichbarkeit von *in vivo* mit *in vitro* Studien

Die Ergebnisse der *in vivo* Aufnahmen unterscheiden sich prinzipiell in gewissem Maße von denen der *in vitro* Aufnahmen. Dies ist in erster Linie technisch bedingt durch die höhere Auflösung der *in vitro* Studien (Voxelsize 10,5 μ m) im Vergleich zu den *in vivo* Studien (Voxelsize 35 μ m). Die in den Evaluationsprotokollen hinterlegten Korrekturfaktoren und die aufgrund des höheren Slice-Abstandes etwas „gröbere“ manuelle Definition von Gesamtkallus- und kortikalen Strukturen, bergen eine höhere Ungenauigkeit in der Analyse der *in vivo* Aufnahmen. Prinzipiell sind die errechneten Daten aus den *in vitro* Studien also valider, erlauben aber natürlich keine Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf, was die Berechtigung der *in vivo* Studien darstellt. Die *in vivo* Studien verdeutlichen also vielmehr die Dynamik der Prozesse, die *in vitro* Studien haben eher das Ziel die Verteilung zum Endpunkt zu verifizieren und erlauben aufgrund ihrer höheren Auflösung weitere Berechnungen, wie etwa die Analyse der trabekulären Strukturen.

5.3 Diskussion des Versuchsaufbaus

5.3.1 Tierversuch

Die Durchführung von *in vivo* Studien an Tieren ist ein gängiges Vorgehen in der präklinischen Forschung. Insbesondere Ratten werden, gerade im orthopädischen Kontext, hier häufig verwendet, sodass eine recht gute Vergleichbarkeit zwischen unter-

schiedlichen Studien gegeben ist. Hinzu kommt, dass Ratten im Vergleich zu anderen Spezies wie zum Beispiel Schafen, Hunden oder Kaninchen in ihrer Haltung recht einfach zu handhaben sind, weswegen sie auch für diese Studie ausgewählt wurden, obwohl andere Spezies in ihrer Knochenstruktur dem Menschen ggf. ähnlicher sind [56]. Ein herauszustellender Punkt bei dem hier verwendeten Tiermodell, ist die gezielte Untersuchung der ausgewählten Zellpopulationen unter biologisch gestörter Heilung, durch die Wahl von älteren, weibliche Ratten, die bereits mehrfach geworfen hatten. In den meisten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wird darauf entweder im Tierversuch nicht gesondert eingegangen, das heißt die Studien zur Knochenregeneration werden an jungen, gesunden Tieren durchgeführt oder es wird artifiziell eine gestörte Heilung herbeigeführt, beispielsweise durch Hitzeverödung des Periosts. Das in dieser Untersuchung gewählte Tiermodell stellt also in besonderem Maße eine geeignete Untersuchungsform dar, um die Gesamtheit der biologischen Faktoren die die Knochenheilung beeinflussen, mit in die Ergebnisse einzubeziehen.

5.3.2 Fixateursystem

Die Tiere wurden nach der Operation in möglichst kleinen Gruppen von jeweils zwei Tieren je Einheit gehalten. Trotz allem kam es gelegentlich zu offensichtlichen Nagespuren an den Fixateursystemen, im Extremfall bis zum Verlust der Querverbindung zwischen den Pins durch die Lockerung der Verschraubung als Folge der hohen externen mechanischen Belastung durch das Nagen. Dies könnte entweder durch den Käfigpartner, oder auch durch das jeweilige Tier selbst geschehen sein. Die entsprechenden Tiere mussten im Anschluss aus dem Protokoll ausgeschlossen werden, da davon auszugehen war, dass durch die hohe mechanische Belastung der standardisierte und damit vergleichbare Osteotomiespalt nicht mehr gegeben war. Des Weiteren musste bei komplettem Verlust des externen Fixateurs ohnehin von einer vollständigen Dislokation der Frakturrenden ausgegangen werden.

Einen mechanischen Einfluss gab es des Weiteren bei den Balkenwechseln vor und nach den *in vivo* μ CT Studien. Dies wurde durch möglichst vorsichtiges arbeiten und die Nutzung einer Schiene, die die Pins während des Balkenwechsels in konstanter Position hielt versucht zu minimieren.

Prinzipiell scheint das hier genutzte Fixateursystem, die praktikabelste Möglichkeit für dieses Versuchssetting zu sein. Eine denkbare Alternative wäre eine Fixierung unter

dem Hautniveau, im Sinne einer Platte. Dies wäre somit zumindest dem Nagen der Tiere unzugänglich. Allerdings müsste es derartiges System von vornherein aus einem röntgendurchlässigen Material bestehen um die μ CT-Aufnahmen nicht zu beeinflussen. Darüber hinaus würde solch eine Platte dem Knochen sehr eng anliegen und hätte damit einen möglicherweise noch höheren Einfluss auf die Prozesse in der Osteotomieregion, was eine Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse erschweren würde. Eine Platte zeigte sich dementsprechend ebenso ungeeignet wie eine Fixierung des Knochens mit einem Marknagel.

5.3.3 Tod von Versuchstieren

Während der Versuchsreihen kam es gelegentlich zum Tod von Versuchstieren, so dass sie nicht alle Messungen durchlaufen konnten. Vereinzelt wurden Tiere tot im Käfig aufgefunden, was am ehesten mit dem durch das Versuchssetting geforderten fortgeschrittenen Alter in Verbindung gebracht werden konnte. Zweimalig zeigten die Tiere auch palpable Tumore im Bauchraum. Die perioperative Mortalität war insgesamt gering, jedoch erwachten auch hier einige Tiere nicht aus der Narkose. Die Narkosen in Zusammenhang mit den zweiwöchentlichen μ CT-Studien schienen jedoch insgesamt keine größere Belastung für die Tiere darzustellen.

5.4 Diskussion der Auswertung

Teilweise zeigten die μ CT Aufnahmen knöcherne Lyseprozesse um die Fixateurpins herum. Diese äußerten sich zum Teil in einer diffusen Vermehrung von Kallus-artigen Strukturen, die deutlich über die lokalen Bereiche der Pinbohrlöcher hinausgingen. Bei einem Tier wurde beobachtet, dass solch ein Lysekallus in Richtung des Osteotomiepaltes ragte und dadurch bei den späteren Auswertungen in die Region of Interest (ROI) hineinfiel. Eine mögliche Folge wäre der Einfluss eines solchen Lysekallus in die Berechnungen des Osteotomiecallus gewesen. Davon wäre dann vorrangig das absolute Volumen (TV) beeinflusst. Dieses Tier wurde daher aus den Analysen ausgeschlossen. Bei allen übrigen Tieren konnten bei der Auswertung jedoch gut zwischen solchen Lyseartefakten und tatsächlichem Kallus differenziert werden.

Von hoher Bedeutung stellte sich die akkurate Festlegung der Thresholds dar. Sie betreffende Veränderungen hatten einen deutlichen Einfluss auf die in der Auswertung entstehende Werte. Dies betrifft das quantitative Outcome, wobei hierbei die Relation der untersuchten Gruppen zueinander unverändert bleiben würde, wie auch im Hinblick auf die Qualität, beispielsweise bei der Berechnung der trabekulären Strukturen. Wäre der untere Threshold beispielsweise zu hoch, das heißt es würden zu viele „dunklere“ Bereiche ausgeschlossen, verbleiben gerade in den zu untersuchenden, neu entstehenden Bereichen nur vereinzelte Punkte die in die Berechnungen einfließen. Diese unzusammenhängenden Punkte entgehen folglich dann der Analyse der trabekulären Strukturen, weil sie gar nicht mehr als solche Trabekel detektiert und analysiert werden könnten. Sie würden in den Analysen eben nur als punktuelle Bereiche in das totale (TV) und ggf. das knöchernen Volumen (BV) Einfluss finden.

Die letztendlich verwendeten Thresholds ergaben sich, wie oben aufgeführt, aus dem arithmetischen Mittelwert aller Einzel-Thresholds. Dies verbessert die Vergleichbarkeit der einzelnen Analysen untereinander, birgt jedoch das Risiko, dass die so entstandenen Grenzwerte für einzelne Studien, deren Histogramme sich stärker von den gemittelten Werten unterscheiden, nicht optimal liegen. Damit könnten höhere Anteile vom Hintergrundrauschen oder von kortikalen Strukturen in die Analysen mit einbezogen oder ausgeschlossen werden, je nach Verteilung des Histogramms und der angewandten Thresholds. Insgesamt lagen die visuell bestimmten Thresholds für die *in vitro* Analysen aber recht nah beieinander, lediglich bei den automatisierten Thresholdfestlegungen für die *in vivo* Studien, war die Streuung ein wenig breiter.

Die Tiere waren über den Versuchszeitraum dreimalig der Strahlung der Röntgenquelle des μ CTs ausgesetzt. Die kumulative Strahlendosis könnte also das Risiko der Malignomentstehung erhöhen. Insgesamt fielen auch zwei Tiere mit palpablen Tumoren im Bauchraum auf, jedoch führen wir dies eher auf das hohe Alter der Tiere zurück, da die Zeitspanne zwischen Einwirken der Röntgenstrahlung und Tumorentstehung eher zu gering erscheint, als dass auf eine Kausalität geschlossen werden könnte [57].

Bewegungsartefakte als denkbare Störfaktoren bei den *in vivo* Aufnahmen ließen sich nicht bemerken. Durch die Narkose lagen die Tiere ruhig in dem μ -CT Schlitten und Bewegungen durch In- und Expiration hielten durch die feste Fixierung des Fixateurs an

den CT-Schlitten durch eine temporäre Verschraubung ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die μ CT-Studien. Zudem lag die ROI ausschließlich über der fixierten Extremität.

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit an einem Tiermodell zur biologisch gestörten Knochenheilung erhobenen Daten valide sind und auf einen stimulatorischen Einfluss durch die CD31+Zellen schließen lassen.

5.5 Weitere mögliche Einflussfaktoren auf den Heilungsprozess

Insgesamt lässt sich eine Vielzahl von möglichen Faktoren mit Einfluss auf die Knochenheilung unter Anlage eines externen Fixateurs denken. Angefangen von der Biomechanik über die metabolischen Ausgangslage bis hin zur adäquaten Versorgung von Wachstumsfaktoren und Etablierung von anabolen Stoffwechselprozessen im betroffenen Knochenabschnitt. Auch die Einbringung der Pins könnte einen Einfluss auf den Heilungsprozess des umliegenden knöchernen Gewebes haben. Dies unterstellend, wären möglichst schlanke Pins mit möglichst geringer Eindringtiefe erstrebenswert, jedoch steht dies einer festen Fixierung entgegen. Das Risiko der Lockerung eines Pins durch Lyseprozesse im ihn umgebenden Knochen ist keinesfalls einzugehen, da dies zu Instabilität im Osteotomiebereich führen würde. Die konstante Stellung der Osteotomieenden zueinander, ist eine Grundvoraussetzung für eine zielgerichtete Überbrückung der Osteotomie mit der Ausbildung eines mechanisch stabilen Knochens.

Theoretisch denkbar wäre weiterhin, dass die Tiere das mit dem Fixateur versorgte Bein in einer gewissen Schonhaltung nutzen, was in der Praxis jedoch nicht beobachtet werden konnte. Inwiefern eine solche verminderte mechanische Beanspruchung des Osteotomiebeines inklusive des umliegenden Weichteilapparates, einen negativen Einfluss auf Durchblutung und Heilung hätte, lässt sich auch kaum abschätzen.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor in den Heilungsprozess ergibt sich auf Grundlage des technischen Verfahrens der durchgeführten Zellaufreinigung. Die MACS-Technologie mit der die Zellen des peripheren Blutes anhand eines spezifischen CD-Oberflächenmoleküls vom restlichen Blut abgetrennt werden, verwendet, wie beschrieben, magnetische Antikörper. Diese sind irreversibel mit der abgetrennten Zellpopulation

verbunden und somit auch im später implantierten Blut-Clot enthalten. Wie jeder Fremdkörper, so wäre auch bei diesem eine Einflussnahme auf physiologische Regenerationsprozesse denkbar, auch wenn sich in dem hier durchgeführten Versuch kein Anhalt dafür eruieren ließ.

Zu berücksichtigen ist ebenfalls die hier implantierte Quantität an Zellen pro Osteotomie. In jedem implantierten Blutclot befanden sich 2×10^5 Zellen der entsprechenden Population. Weitere Untersuchungen müssten durchgeführt werden, mit dem Ziel die optimale Anzahl an aufgereinigten Zellen pro ml Implantationsmedium zu definieren. Darüber hinaus wäre es von Interesse, die Verteilung der implantierten Zellen in der Osteotomieregion und darüber hinaus im zeitlichen Verlauf immunhistochemisch darzustellen. Auf diesem Wege ließe sich beobachten, ob die eingebrachten Zellen auch wirklich im Osteotomiebereich verblieben sind und nicht in umliegenden Gewebeabschnitte migriert sind, wo sie gegebenenfalls eine andere als die gewünschte Wirkung erzielen. Daneben ließen sich die Vitalität der eingebrachten Zellen und die Beteiligung an der Gewebeneubildung im zeitlichen Verlauf genauer analysieren.

5.6 Alternative Ansätze zur Stimulation der Knochenheilung

Die oben dargelegte klinische und gesundheitsökonomische Relevanz der nicht regelrechten Frakturheilung ist hinlänglich bekannt. In diesem Sinne gibt es eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Ansätzen, das Outcome für die Patienten zu verbessern.

Im Wesentlichen stehen sich dabei zwei Möglichkeiten zur Unterstützung pro-osteogener Prozesse nach einer Fraktur gegenüber, auf die im folgenden übersichtshalber eingegangen werden soll.

Zum einen, wie unter anderem hier untersucht, die Möglichkeit einer lokalen Therapieunterstützung, etwa durch Applikation von Substanzen in oder um den Frakturspalt. Diesbezüglich stehen unterschiedlichste Verfahren und Materialien im Fokus von Studien. Denkbar sind ein- und mehrzeitige Verfahren, die Applikation von Vorläuferzellen oder die Anlockung derer durch die Gabe von Zytokinen, ebenso wie die Implantation von ganzen Knochen- oder Knorpelspangen. Darüber hinaus besteht jeweils die Möglichkeit körpereigene- oder Spendermaterialien zu verwenden.

Zum anderen ist eine systemische Therapie eine denkbare Option und einige Substanzen sind in dieser Hinsicht ebenfalls bereits untersucht worden.

Einige Ansätze haben es auch bereits bis hin zu klinischen Studien geschafft, während andere noch im Stadium der präklinischen Forschung befindlich sind.

5.6.1 klinische Ansätze

Ein bereits etabliertes Verfahren der lokalen Implantation von pro-osteogenen Material stellt die Einbringung von Knochenspangen in den Frakturspalt dar. Dabei besteht die Möglichkeit autologes, wie allogenes Material zu nutzen [58, 59]. Für die häufiger eingesetzte autologe Transplantation (Autograft) besteht die Notwendigkeit eines zweiten Eingriffes für die Entnahme des entsprechenden Knochenmaterials aus einer anderen Körperpartie. Meist wird hierfür der Beckenkamm gewählt, aber auch der distale Femur, proximale Tibia, die Fibula, der distale Radius sowie das Olecranon kommen als Entnahmeort in Frage [60]. Das maximal nutzbare Knochenvolumen für solch eine autologe Transplantation beträgt etwa 20cm^3 bis maximal 30cm^3 und bedeutet eine entsprechende Limitation [61]. Des Weiteren ist dieser Eingriff erneut mit operationstechnischem Risiken verbunden und die Entnahmeregion ist ebenfalls, bei ungestellter schlechter metabolischer Ausgangslage, dem Risiko einer verzögerten Heilung unterworfen [62]. Dieses Verfahren wird aufgrund dessen auch erst im späteren Verlauf einer Frakturtherapie eingesetzt, also für den Fall, dass sich eine verzögerte Heilung einstellt und diese nicht anders zu verbessern ist. Die betroffenen Patienten haben dementsprechend in aller Regel bereits einen langen, gesundheitsökonomisch kostenintensiven Krankheitsverlauf hinter sich.

Dies gilt ebenso für die Option der allogenen Transplantation (Allograft). Hierbei wird Knochenmaterial eines Körperspenders verwendet und in meist in Form von kleinen Knochenspangen eingebracht. Dieses Knochenmaterial wird vorbehandelt, um eine möglichst geringes immunologisches Risiko zu erreichen, welches nichtsdestotrotz einen zu berücksichtigenden Faktor darstellt [63, 64]. Dafür lässt sich ein höheres implantierbares Knochenvolumen realisieren.

Allografts können nach entsprechender Vorbehandlung auch als demineralisierte Knochenmatrix eingebracht werden. Dabei wird die Mehrzahl der Knochenminerale durch Säure ausgewaschen und hinterlässt ein Geflecht aus kollagenen Fasern und Wachstumsfaktoren auf deren Boden sich neue Knochenstrukturen ausbilden sollen

[60, 65, 66]. Der Erfolg des Einsatzes von allogenem Material hängt dabei auch immer von der Qualität des Spendermaterials ab und variiert dementsprechend.

Insgesamt aber stellt der Einsatz von Allo- und insbesondere von Autografts die zurzeit am besten etablierte Therapieoption beim Auftreten von Pseudarthrosen dar. Beide Verfahren setzten jedoch erst an einem späten Zeitpunkt an, zu dem die Patienten bereits eine längere Krankengeschichte durchlitten haben und stellen kein primäres Therapiekonzept dar. Ebenso wenig bieten sie eine Möglichkeit, auf eine prognostisch schlechtere biologische Heilungskapazität eines Patienten von Beginn an einzugehen.

Mit Aussicht auf einen klinischen Einsatz wurde bereits die lokale Applikation von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren untersucht, denen *in vitro* ein positiver Einfluss auf Angio- und Osteogenese nachgewiesen werden konnte. Der Fokus beim Einsatz von VEGF (vascular endothelial growth factor) [67] und PDGF (platelet derived growth factor) [68] liegt dabei auf der Gefäßneubildung im Frakturspalt, bei den Untersuchungen zur BMP-Gruppe (bone morphogenetic protein) fokussiert sich der Effekt eher auf die pro-osteogenen Kapazitäten [69, 70]. Untersuchungen zu TGFbeta (transforming growth factor) [71-73] zielen vorrangig auf die immunmodulatorische Wirkung in der frühen Inflammationsreaktion im Frakturspalt ab.

Insbesondere die BMP-Applikation scheint im Hinblick auf die Neoangiogenese in der Frühphase der Frakturheilung und die sich anschließende konsekutive Osteoneogenese vielversprechende Aussichten zu haben [74, 75]. Kaipel et al. konnten in einem *in vivo* Versuch einen positiven Effekt auf die Knochenheilung für lokal appliziertes BMP-2, nicht jedoch für VEGF oder PDGF zeigen, wobei der Studienendpunkt bereits vier Wochen nach Implantation terminiert war.

Eingebracht werden die BMPs in die Frakturregion mittels organischen, anorganischen oder synthetischer Trägermaterialien [76]. Ein elementarer Vorteil der BMPs ist, dass sie rekombinant hergestellt werden können und einige Präparate bereits durch die FDA für den humanen Einsatz zugelassenen sind, wie etwa rhBMP-2 für die supportive Behandlung von offenen Tibiafrakturen [77, 78] und rhBMP-7 (BMP-7 = osteogenic protein 1) für die Therapie nach Pseudarthrosenbildung an langen Röhrenknochen [76]. Allerdings führt der Einsatz dieser Produkte zu zahlreichen unerwünschter Nebenwirkungen, wie ektopen Ossifikationen [79], weshalb der klinische Einsatz eher skeptisch

tisch gesehen wird. Der Hersteller von rhBMP-7 Präparaten hat diese als Folge davon inzwischen auch wieder vom Markt genommen.

5.6.2 präklinische Ansätze

Eine weitere denkbare Option zur Therapie einer verzögerten Knochenheilung wäre die Implantation von autologen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) aus einem Knochenmarksaspirat.

MSCs stellen die Vorläuferzellen der knochenbildenden Zellen dar und sind damit von hohem Interesse für den klinischen Einsatz [80]. Ihre pro-osteogenen Fähigkeiten konnten bereits mehrfach *in vitro* wie *in vivo* demonstriert werden. Physiologisch liegen diese Zellen in höchster Zahl im Knochenmark vor, sodass für ihren therapeutischen Einsatz eine Knochenmarkspunktion notwendig ist. Diese wird zumeist am Beckenkamm durchgeführt, birgt aber auch ihre möglichen Komplikationen. Zudem ist die aus einem Aspirat gewonnene Zellzahl noch immer sehr gering in Bezug auf die therapeutisch notwendige Anzahl und unterliegt hohen interindividuellen Schwankungen [81]. Darüber hinaus müssen die MSCs aus dem Aspirat ausgewaschen, aufgereinigt und expandiert werden, was entsprechende Einrichtungen und Kapazitäten, sowie Zeit erfordert.

Alternativ können die möglichen Punktionskomplikationen vermieden werden, in dem den Patienten über einen gewissen Zeitraum Wachstumsfaktoren verabreicht werden, die zu einer vermehrten Migration von MSCs und anderen Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut führen [82]. Im Anschluss können diese aus entnommenen Blut abgetrennt, *in vitro* expandiert und in einem operativen Eingriff oder perkutan in die Frakturregion eingesetzt werden. Dies muss im Verlauf eventuell mehrmals wiederholt werden. Auch dieses Vorgehen erfordert entsprechende Einrichtungen und vor allem Zeit, sodass es ebenfalls erst im Verlauf einer sich entwickelnden verzögerten Knochenheilung eingesetzt wird. Unwahrscheinlich scheint jedoch aufgrund der schwierigen Gewinnung einer hinreichenden Zellquantität die Aussicht auf die Nutzung in einem einzeitigen Verfahren.

Ebenfalls möglich ist die Nutzung der kompletten Fraktion aus dem Knochenmarksaspirat ohne MSC-Aufreinigung [83]. Dies schließt im Knochenmark vorliegende Wachstumsfaktoren mit ein, erschwert jedoch die Implantation. Etwa 100-150ml können über

die Punction entnommen werden. Damit dieses Volumen jedoch an der Implantationsstelle verbleibt und sich nicht in von der Fraktur entferntere Regionen verteilt, ist eine Trägersubstanz vonnöten. Dafür wiederum könnte beispielsweise demineralisierte Knochenmatrix aus der Gewebekbank genutzt werden, sodass ein sandartiges Medium entsteht [61]. Trotz der vielversprechenden präklinischen Versuchsergebnisse, scheinen undifferenzierte MSCs für einen klinischer Einsatz letztendlich ein zu geringes osteogenes Potential aufzuweisen [84].

Darüber hinaus kommen möglicherweise weitere Zellpopulationen aus dem peripheren Blut in Betracht, welche bei lokaler Implantation eine Frakturheilung stimulieren zu können. Preiniger et. al. zeigten beispielsweise anhand der CD133+ Zellpopulation, dass die lokale Transplantation von proangiogen wirksamen Zellen aus dem peripheren Blut die Knochenheilung positiv beeinflussen kann [53]. Das verwendete Tiermodell war dabei dem unseren gleichzusetzen. Der Aussicht auf eine spätere klinische Anwendbarkeit steht hier jedoch die geringe Verfügbarkeit dieser Zellpopulation im peripheren Blut entgegen, sodass zunächst eine entsprechende Stimulation vonnöten ist. Dies ist zwar möglich, benötigt aber ein entsprechendes Zeitfenster, dass in der primären Frakturversorgung für ein einzeitiges Verfahren gegebenenfalls nicht zur Verfügung steht. Eine weitere Zellpopulation, der proangiogene und -osteogene Eigenschaften zugesprochen werden, stellen die CD34+ dar [85, 86]. Auch sie wären eine denkbare Zellpopulation für eine lokale Implantation in den Frakturspalt zur Stimulation der Heilung, zumal sie u.a. von Marx et al. bereits in einem humanen Versuchsaufbau zur Knochenheilung eingesetzt worden sind [87]. Ähnlich der CD 133+ Fraktion, ist ihre Quantität im peripheren Blut jedoch gering, eine Entnahme müsste deshalb aus dem Knochenmark erfolgen, wo sie in etwa 10fach höherer Konzentration vorliegen oder sie müssten von dort mittels Einsatz entsprechender Wachstumsfaktoren wie G-CSF in das periphere Blut mobilisiert werden [88, 89]. Beide Varianten hätten ihre individuellen Nebenwirkungen, einschließlich Zeit- und Kostenaufwand.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebene Therapie- und Versuchsansätzen, die auf eine lokale Optimierung der Knochenheilung in der Frakturregion setzten, stellt die Gabe von Parathormon (PTH) einen Ansatz zur systemischen Applikation einer Substanz mit dem Ziel einer lokalen Knochenheilung dar. PTH ist ein körpereigenes Hor-

mon aus der Nebenschilddrüse und mobilisiert unter anderem die Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen, erfüllt in diesem Kontext also eher eine katabole Aufgabe. Jedoch hat sich gezeigt, dass bei Vorliegen einer Osteoporose, die regelmäßige Gabe von PTH neben weiteren Effekten durch die vermehrte Kalziumabsorption aus dem Darm und Kalziumretention in der Niere, zu einer Verbesserung der Knochenstruktur führt [90, 91]. Dies führte zu der Überlegung, ob PTH auch im orthopädischen Kontext eine pro-osteogene Wirkung erfüllen kann [92, 93]. Einzelne Studien konnten dies lokal in vitro und im tierexperimentellen Ansatz zeigen [94-96]. Die systemische Gabe, interessant aufgrund ihrer einfachen intravenösen Applikationsmöglichkeit, ist für den humanen Einsatz mit der Indikation der zu stimulierenden Knochenheilung weiterhin noch im Versuchsstadium. Zusammenfassend scheint die PTH-Gabe aber eher als Frakturprophylaxe bei Osteoporosepatienten zielführend zu sein.

Somit haben alle bisherigen Ansätze zur Stimulation einer potentiell verzögerten Knochenheilung die Nachteile einer schlechten Verfügbarkeit, keiner frühzeitigen Anwendbarkeit oder weisen nur ein geringes Regenerationspotential auf.

5.7 Ausblick auf eine potentielle klinische Anwendbarkeit der CD31+ Zellen

Der Vorteil bei der Nutzung von Zellen aus dem körpereigenen peripheren Blut ist bereits weiter oben erörtert worden, nichtsdestotrotz stehen einem praktikablen klinischen Einsatz technische Anforderungen zuvor. In dem hier beschriebenen Versuchsaufbau erfolgte die Implantation von allogenen Zellen in den Osteotomiespalt. Die erforderliche Menge an Blut für die Abtrennung der gewünschten Zellpopulationen ließ sich nicht aus einer Ratte peripher abnehmen, sodass Spendertieren unter Narkose mittels intrakardialer Punktion Blut entnommen wurde. Im humanen Einsatz, wäre die nötige Blutentnahmemenge kein Problem, da peripheres Blut anders als im Tierversuch gut erreichbar ist. Untersuchungen unseres Institutes ergaben, dass CD31+ Zellen in hoher Anzahl im peripheren Blut anzufinden sind, ohne das eine vorherige Stimulation vonnöten wäre. Unabhängig vom Alter und Geschlecht ließen sich in 25 ml peripheren Blutes 7×10^7 CD31+ Zellen finden. Analog zu Untersuchungen von Kawamoto et. al. [97] und Kuroda et. al. [98] würde diese Menge vermutlich zur Therapie eines 70kg schweren Patienten reichen (Einsatz von $0,5-1 \times 10^6$ Vorläuferzellen/kg Körpergewicht).

In dem hier vorliegenden Versuch dauerte die manuelle Zellaufreinigung mehrere Stunden. Durch den Einsatz automatisierter Systeme wäre diese Zeit jedoch deutlich reduzierbar, sodass der Faktor Zeit ebenfalls kein Hindernisgrund für einen klinischen Einsatz wäre. Hinzu kommt, dass im klinischen Alltag, abgesehen von polytraumatisierten Patienten, zwischen Diagnosestellung und operativer Versorgung in aller Regel ein ausreichend großes Zeitfenster liegt. Erst recht, wenn die Operation nicht am selben Tage erfolgt, um beispielsweise ein Abklingen der konsekutiven Weichteilschwellung abzuwarten. Dem Patienten müsste somit lediglich nach Stellung der Fraktur-Diagnose oder in einem entsprechenden zeitlichen Abstand vor der Operation Blut in ausreichender Menge abgenommen werden, um dieses entsprechend aufzubereiten und für die Implantation zur Verfügung zu stellen. Die Klinikeinrichtungen bräuchten dazu, neben einem standardisierten Protokoll, die erforderlichen technischen Einrichtungen sowie entsprechend ausgebildetes Personal.

Eine weitere wichtige Fragestellung im Hinblick auf eine spätere mögliche klinische Anwendbarkeit der einzeitigen Transplantation körpereigener Zellen aus dem peripheren Blut mit pro-osteogenen Eigenschaften, ist die genaue Indikationsstellung. In Anbetracht des Kostendrucks in der modernen Medizin, steht jeder neuen Therapieoption eine Kosten-Nutzen-Abwägung voraus. Prinzipiell alle Patienten über einem bestimmten Alter unter der Annahme einer schlechteren Frakturheilung zu therapieren, steht damit sicher nicht im Einklang. Zumal gerade im höheren Alter eine enorme Heterogenität im Hinblick auf körperliche Konstitution, Vorerkrankungen und metabolische Ausgangslage herrscht. Die Mehrkosten einer zusätzlichen Therapie, wie der hier vorgestellten autologen Transplantation im Vergleich zur alleinigen konventionell etablierten, sollten, wenn möglich, dem Patientenkollektiv zu Gute kommen, das mit höchster Wahrscheinlichkeit Komplikationen mit entsprechenden Folgekosten entwickelt. Somit kann insgesamt eine höhere Kosteneffektivität zu erreicht werden. Um dies sicher zu stellen, stehen im Wesentlichen zwei Entscheidungswege im klinischen Alltag zur Verfügung. Als erstes die präoperative Einschätzung der behandelnden Ärzte aufgrund ihrer klinischen Erfahrungen und im Idealfall aufgrund ergänzender Evaluationsscores, um somit eine möglichst hohe Standardisierung und Vergleichbarkeit über Klinikgrenzen hinweg zu erreichen. Die Fortführung dieses Gedankens wäre dann die zweite Möglichkeit, die Etablierung eines Biomarkers, der Auskunft über das individuelle knöcherne Regenera-

tionspotential gibt. Dies würde sicher das höchste Maß an Objektivität bieten, und ggf. gemeinsam mit der klinischen Einschätzung ein gutes Tool ergeben, um herauszufinden, welche Patienten von einer erweiterten Therapie profitieren würden und welche keine zusätzliche nötig hätten. Das Problem daran ist, dass ein solcher wünschenswerter Biomarker noch nicht etabliert ist. Erste Untersuchungen beschäftigen sich allerdings bereits mit diesem Thema, wie etwa Reinke, S. et. al. mit der Quantifizierung von ausdifferenzierten CD8-positiven Gedächtnis-T-Zellen (TEMRA) [16] als möglicher prospektiver Marker für ein schlechteres knöchernes Heilungsergebnis.

Zusammenfassend, scheinen CD31+ Zellen aufgrund ihrer immunmodulativen und angiogenen Eigenschaften eine aussichtsreiche Zellpopulation zur autologen Stimulation der Knochenheilung zu sein. Sie bieten zahlreiche Voraussetzungen, wie etwa die hohe Verfügbarkeit im peripheren Blut ohne vorherige Stimulation, die sie für einen späteren klinischen Einsatz attraktiv machen. Auf dem Weg dorthin stehen noch weitere Untersuchungen an, wie etwa die Analyse der Verteilung der implantierten Zellen in den ersten postoperativen Tagen, sowie im späteren Verlauf auch klinische Testungen. Die hier erhobenen Daten stimmen jedoch zuversichtlich, diese nächsten Schritte zeitnah erreichen zu können.

6.0 Abstract

Verzögerte oder inadäquate Knochenheilung nach Frakturen ist eine Problemstellung der modernen Orthopädie und Unfallchirurgie mit bedeutendem klinischen und gesundheitsökonomischen Ausmaß. Die Entwicklung von sogenannten Pseudarthrosen, also Fehlgelenken aus mechanisch instabilen fibrösem Gewebe, führt zu kostenintensiven Therapieverläufen mit erheblichen Einbußen an Lebensqualität für die betroffenen Patienten. In Anbetracht der demographischen Entwicklung wird das Risiko für solchartige Komplikationen, unter Annahme einer steigenden Prävalenz von metabolischen Grunderkrankungen, die als Risikofaktoren für eine verzögerte Knochenheilung gelten, stetig erhöhen.

Es gibt bereits zahlreiche experimentelle Ansätze zur Stimulation der Knochenheilung, keines lässt jedoch bisher eine sichere primäre und einzeitige Therapie zu. In dem hier vorgestellten *in vivo* Versuchssetting wurde die lokale Applikation von aufgereinigten Zellen aus dem peripheren Blut untersucht. Dieses bietet sich aufgrund der guten klinischen Erreichbarkeit als ideale Quelle an. In Vorversuchen wurden Bestandteile des peripheren Blutes *in vitro* hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen, pro-angiogenen und -osteogenen Kapazitäten hin untersucht. Zusätzlich wurde analysiert, ob sie ohne vorherige Stimulation in ausreichender Quantität im peripheren Blut aufzufinden sind. Entsprechend identifizierte CD31+ Zellen und Subpopulationen wurden aufgereinigt und in einem Blutclot mindestens 12 Monate alten, weiblichen Ratten, die bereits mehrfach geworfen hatten und somit eine biologisch gestörte Knochenheilung aufweisen, in eine 2mm Osteotomie des Femurs eingesetzt. Diese wurde mittels Fixateur externa stabilisiert. Der Kern meiner Arbeit lag in der Durchführung von radiologischen Analysen der Tiere mittels μ CT-Studien. *In vivo* wurden dabei Aufnahmen 2, 4 und 6 Wochen nach Implantation durchgeführt, sowie abschließend, in höherer Auflösung, *in vitro* Studien von den explantierten Knochen.

Die Evaluation der erhaltenen Daten zeigte dabei das beste Outcome bei den Tieren, denen CD31+ Zellen implantiert wurden im Vergleich zu denen, die die komplette Fraktion der peripheren mononukleäre Zellen (PBMC) erhielten. Die am zweitbesten heilende Gruppe stellten die Tiere dar, die CD31+/CD14+ Zellen erhielten, gefolgt von der CD31+/CD14- Gruppe. Als radiologische Parameter für die Heilung wurde dabei das totale sowie das knöcherne Volumen (TV und BV) über einer definierten region of interest (ROI) der Osteotomie herangezogen. Aus den *in vitro* Aufnahmen konnte des

Weiteren eine Analyse der trabekulären Strukturen erfolgen. Auch hierbei stellte die Gruppe der Tiere, welche die CD31+ Gesamtfraction erhielten, die höchste Anzahl an neugeformten trabekulären Strukturen sowie des geringsten intertrabekulären Zwischenraums dar. Des Weiteren zeigte diese Untersuchungsgruppe nach sechs Wochen sogar teilweise eine Überbrückung der Osteotomie. Diese Ergebnisse ließen sich innerhalb der Arbeitsgruppe auch durch sich anschließende immunhistologische Untersuchungen bestätigen.

CD31+ Zellen sind also eine Zellpopulation mit immunmodulatorischen, angio- und osteostimulativen Kapazitäten des peripheren Blutes, mit dem Potential, eines Tages Frakturpatienten mit prognostisch schlechterer Knochenheilung eine einzeitige autologe Transplantation zur Stimulation der Heilung zu ermöglichen.

7.0 Abstract (english)

Delayed or incomplete bone healing in case of fracture is a substantial problem with huge economic and clinical impact in orthopedics and trauma surgery. Occurrence of so-called Pseudarthrosis (Non-union, establishing out of mechanical instable bone tissue) causes expensive clinical courses with significant loss of life-quality for affected patients. Concerning our demographic development, such complications are expected to occur more often, due to higher prevalence of metabolic diseases, diminished regenerative capacities and altered immune responses, which are named for causing a higher risk of delayed bone healing.

There are already a few experimental approaches to stimulate bone healing, but none of them gives the chance for a safe primary treatment in a single first therapy-session. In this in vivo study, local application of purified cells from peripheral blood was investigated. Because of its good clinical availability, peripheral blood seems to be a good source for acquiring cells with bone healing capabilities. In previous studies, cells from peripheral blood with pro-osteogenic and -angiogenic capacities were identified and investigated concerning their quantity in peripheral blood without being stimulated previously. Identified CD31+ cells and subpopulations have been purified and suspended into a blood clot, which got implanted into a 2mm femur osteotomy gap of minimum 12 month old, female rats, which develops a non-union without additional biological stimuli. The osteotomies were stabilized by external fixation. In my study, I performed radiologic analysis by operating μ CT-studies. There were in vivo studies, performed 2, 4 and 6 weeks after implantation and additionally final in vitro studies of explanted femora with higher resolution.

Evaluation of revealed data, showed best outcome for those rats, who received the whole entity of CD31+ cells into their osteotomy gap, compared to them who received the whole fraction of peripheral mononuclear cells (PBMCs) as control group. Second-best healing group was CD31+/CD14+, followed by CD31+/CD14-. Analyzes radiological markers for bone healing were analyzed total and bone volume (TV & BV) of defined region of interest (ROI) over the osteotomy gap. In vitro Analysis gave the opportunity to compare the trabecular structure of newly formed tissue. Concerning this, the CD31+ group showed the best healing as well, with highest numbers of newly formed trabecels and smallest intertrabecular space. On top, after 6 weeks, some of the investigated rats of CD31+ group even showed a partly over-bridged osteotomy. This results

were confirmed by additionally performed immunohistological analysis within our research group.

So in fact, CD31+ cells from peripheral blood with immune-modulatory, pro-angiogenic and -osteogenic capacities could become a potential source for an autologous transplantation to fracture-patients with expected poor bone healing outcome to improve their chance of healing.

8.0 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
3D	dreidimensional
A	Ampere
Abb.	Abbildung
BMC	bone mineral content
BMD	bone mineral density
BMP	bone morphogenetic protein
BV	bone volume
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
cm ³	Kubikcentimeter
CT	Computertmographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	et alii
FDA	United States Food and Drug Administration
FGF	fibroblast growth factor
G	Gravitation
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
ggf.	gegebenenfalls
HA	Hydroxyapatit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICD	international classification of deseases
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
li.	links
MACS	magnetic activated cell sorting
mg	Milligramm
Min.	Minuten

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
OP	Operation
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platlet-derived growth factor
PECAM	platlet endothelial cell adhesion molecule
PFA	Paraformaldehyd
re.	rechts
ROI	region of interest
sog.	so genannt
StabW	Standardabweichung
TGF	transforming growth factor
TMC	total mineral content
TMD	total mineral density
TNF	tumor necrosis factor
TV	total volume
VEGF	vascular endothelial growth factor
μl	Microliter

9.0 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der anatomische Aufbau eines Röhrenknochens.	2
Abb. 2: Detaildarstellung des Knochenaufbaus.	2
Abb. 3: Ergebnis Fluoreszenz-gestützter Durchflusszytometrie: CD14+ Zellen sind Teil der CD31+ Gesamtpopulation, nicht alle CD31+ Zellen sind jedoch CD14+.	8
Abb. 4: Prinzip des Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)	15
Abb. 5: Schematische Darstellung Anlage Fixateur externa	18
Abb. 6: Anlage des Fixateur externa	19
Abb. 7: Endgültige Anlage des Fixateur externa mit definiertem Offset und Einbringung der Osteotomie	20
Abb. 8: Erstellung des Blutkoagels im Deckel eines Eppendorf-Gefäßes	20
Abb. 9: Einbringen des Blutkoagels in die Osteotomie und anschließender Wundverschluss.	21
Abb. 10: Durchführung der <i>in vivo</i> μ CT-Studien. Austausch der Fixateur-Querbalken und Fixierung am CT-Schlitten	22
Abb. 11: Röntgenaufnahme zweier Tiere des CD31+ Gruppe vor Durchführung der 2-Wochen-CT-Studie zur Kontrolle der Fixateurlage	22
Abb. 12: Übersichtsaufnahme am CT zur Festlegung des Scanbereiches (Region of Interest)	23
Abb. 13: Durchführung der <i>in vitro</i> μ CT-Studien.	24
Abb. 14: Farbige Markierungen am Schwanz als Identifikationssystem.	25
Abb. 15: Rendering der formierten Gesamtkallus- und Kortexstrukturen	28
Abb. 16: Schematische Darstellung der Region of Interest (ROI)	28
Abb. 17: Histogramm mit Festlegung des oberen und unteres Thresholds	29
Abb. 18: Bedeutung des Thresholds	30
Abb. 19: PBMC-Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus <i>in vivo</i> μ CT-Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.	34
Abb. 20: PBMC-Gruppe. 3D Rekonstruktionen aus <i>in vitro</i> Studie.	35
Abb. 21: PBMC-Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion <i>in vitro</i> . Farbverlauf nach Dichte.	36
Abb. 22: PBMC-Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt.	36
Abb. 23: CD31+ Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus <i>in vivo</i> μ CT-Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.	37
Abb. 24: CD31+ Gruppe. 3D Rekonstruktionen aus <i>in vitro</i> Studie.	38

Abb. 25: CD31+ Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt in Movat-Pentachrom-Färbung,	38
Abb. 26: CD31+ Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion <i>in vitro</i> .	38
Abb. 27: CD31+/CD14- Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus <i>in vivo</i> μ CT-Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.	39
Abb. 28: CD31+/CD14- Gruppe. 3D Rekonstruktionen aus <i>in vitro</i> Studie.	40
Abb. 29: CD31+/CD14- Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion <i>in vitro</i> . Farbverlauf nach Dichte.	40
Abb. 30: CD31+/CD14-Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt in Movat-Pentachrom-Färbung.	40
Abb. 31: CD31+/CD14+ Gruppe. 3D-Rekonstruktion aus <i>in vivo</i> μ CT-Studien im zeitlichen Verlauf nach 2 Wochen - 4 Wochen - 6 Wochen.	42
Abb. 32: CD31+/CD14+ Gruppe. 3D Rekonstruktionen aus den erstellten <i>in vitro</i> Studien.	42
Abb. 33: CD31+/CD14+ Gruppe. Exemplarischer Schnitt durch dreidimensionale Rekonstruktion <i>in vitro</i> . Farbverlauf nach Dichte.	43
Abb. 34: CD31+/CD14+Gruppe. Exemplarischer histologischer Schnitt in Movat-Pentachrom-Färbung.	43
Abb. 35: Grafik Absolutes Volumen im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	45
Abb. 36: Grafik Knöchernes Volumen im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	46
Abb. 37: Grafik mineralisierter Anteil des Gesamtgewebes im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	47
Abb. 38: Grafik mineralisierter Anteil der knöchernen Gewebeanteile im Mittel. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	48
Abb. 39: Grafik mittlere Anzahl der aus den <i>in vitro</i> Studien bestimmten Trabekel pro mm.	49
Abb. 40: Grafik mittlere Größe der aus den <i>in vitro</i> Studien bestimmten intertrabekulären Zwischenräume.	49

10.0 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Farbkodierung der Versuchstiere zur Identifikation	25
Tab. 2: n-Zahlen der einzelnen Versuchsgruppen in der Auswertung	31
Tab. 3: Datenreihe Absolutes Volumen in mm ³ . Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	45
Tab. 4: Datenreihe Knöchernes Volumen in mm ³ . Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	46
Tab. 5: Datenreihe mineralisierter Anteil des Gesamtgewebes in mm HA. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	47
Tab. 6: Datenreihe mineralisierter Anteil des knöchernen Gewebes in mm HA. Vergleich der untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf <i>in vivo</i> .	48

11.0 Literatur

1. Luiz Carlos U. Junqueira, J.C., *Histologie*. 6. Auflage ed. 2005, Heidelberg: Springer Medizin verlag.
2. Benninghoff; Drenckhahn, D., *Anatomie Band 1, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zytologie*. 17. Auflage ed. Vol. 1. 2008, München: Elsevier Verlag.
3. Fritz U. Niethard, J.P., *Orthopädie*. 5. Auflage ed. Duale Reihe, ed. A.u.K. Bob. 2005, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
4. *AO/OTA Fracture and Dislocation Classification*. 2014 [cited 2015 11.06.]; Available from: <http://www.aofoundation.org>.
5. *Gesundheitsberichterstattung Bund - Diagnosedaten der Krankenhäuser*. letzte Aktualisierung 10.02.2015 [cited 2015 10.06.]; Available from: <http://www.gbe-bund.de>.
6. Wolff, J.H., *The Law of Bone Remodeling*. 1986, Heidelberg: Springer Verlag.
7. Lienau, J., et al., Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res*, 2009. **27**(9): p. 1133-40.
8. Hankenson, K.D., et al., Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*, 2011. **42**(6): p. 556-61.
9. Saran, U., S. Gemini Piperni, and S. Chatterjee, *Role of angiogenesis in bone repair*. *Arch Biochem Biophys*, 2014. **561**: p. 109-17.
10. Kalfas, I.H., Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*, 2001. **10**(4): p. E1.
11. Gerstenfeld, L.C., et al., Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*, 2003. **88**(5): p. 873-84.
12. Fassbender, M., et al., Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model. *Eur Cell Mater*, 2011. **22**: p. 1-11.
13. Baylink, D.J., R.D. Finkelman, and S. Mohan, *Growth factors to stimulate bone formation*. *J Bone Miner Res*, 1993. **8 Suppl 2**: p. S565-72.
14. Barnes, G.L., et al., Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*, 1999. **14**(11): p. 1805-15.
15. Claes, L., S. Recknagel, and A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(3): p. 133-43.
16. Reinke, S., et al., Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(177): p. 177ra36.
17. Newman, P.J., et al., PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 1990. **247**(4947): p. 1219-22.
18. Elias, C.G., 3rd, et al., Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(6): p. 1948-58.
19. Wilkinson, R., et al., Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease. *Blood*, 2002. **100**(1): p. 184-93.

20. Woodfin, A., M.B. Voisin, and S. Nourshargh, PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(12): p. 2514-23.
21. Marelli-Berg, F.M., et al., An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 11): p. 2343-52.
22. Albelda, S.M., et al., Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 1991. **114**(5): p. 1059-68.
23. DeLisser, H.M., et al., Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*, 1997. **151**(3): p. 671-7.
24. Cao, G., et al., Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(5): p. C1181-90.
25. Park, S., et al., PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. **299**(6): p. C1468-84.
26. Kim, M.H., et al., Robust angiogenic properties of cultured human peripheral blood-derived CD31(+) cells. *Int J Cardiol*, 2013. **166**(3): p. 709-15.
27. Kim, S.W., et al., Human peripheral blood-derived CD31+ cells have robust angiogenic and vasculogenic properties and are effective for treating ischemic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **56**(7): p. 593-607.
28. Bazil, V., et al., Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur J Immunol*, 1986. **16**(12): p. 1583-9.
29. Wright, S.D., et al., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
30. Li, G.Q., et al., Association of circulating endothelial progenitor cells (CD14+-EPC) with renal function in patients with coronary artery disease. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2013. **19**(6): p. 632-6.
31. Goldblum, S.E., et al., Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein and soluble CD14 function as accessory molecules for LPS-induced changes in endothelial barrier function, in vitro. *J Clin Invest*, 1994. **93**(2): p. 692-702.
32. Viriyakosol, S., et al., Structure-function analysis of CD14 as a soluble receptor for lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3144-9.
33. Hackett, C.H., M.J. Flaminio, and L.A. Fortier, Analysis of CD14 expression levels in putative mesenchymal progenitor cells isolated from equine bone marrow. *Stem Cells Dev*, 2011. **20**(4): p. 721-35.
34. Albiero, M., et al., Defective recruitment, survival and proliferation of bone marrow-derived progenitor cells at sites of delayed diabetic wound healing in mice. *Diabetologia*, 2011. **54**(4): p. 945-53.
35. Gorman, E., et al., Bone health and type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Physiother Can*, 2011. **63**(1): p. 8-20.
36. Tarantino, U., et al., Bone healing and osteoporosis. *Aging Clin Exp Res*, 2011. **23**(2 Suppl): p. 62-4.
37. Bak, B. and T.T. Andreassen, The effect of aging on fracture healing in the rat. *Calcif Tissue Int*, 1989. **45**(5): p. 292-7.

38. Meyer, R.A., Jr., et al., Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res*, 2001. **19**(3): p. 428-35.
39. Bisiacchi, P.S., V. Tarantino, and A. Ciccola, Aging and prospective memory: the role of working memory and monitoring processes. *Aging Clin Exp Res*, 2008. **20**(6): p. 569-77.
40. Strube, P., et al., Influence of age and mechanical stability on bone defect healing: age reverses mechanical effects. *Bone*, 2008. **42**(4): p. 758-64.
41. Muschler, G.F., et al., Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res*, 2001. **19**(1): p. 117-25.
42. Stenderup, K., et al., Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 2003. **33**(6): p. 919-26.
43. Brown, C.W., T.J. Orme, and H.D. Richardson, The rate of pseudarthrosis (surgical nonunion) in patients who are smokers and patients who are nonsmokers: a comparison study. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1986. **11**(9): p. 942-3.
44. Patel, R.A., R.F. Wilson, and R.M. Palmer, The effect of smoking on periodontal bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 2012. **83**(2): p. 143-55.
45. Phieffer, L.S. and J.A. Goulet, *Delayed unions of the tibia*. *Instr Course Lect*, 2006. **55**: p. 389-401.
46. Verdonk, R., et al., Biological methods to enhance bone healing and fracture repair. *Arthroscopy*, 2015. **31**(4): p. 715-8.
47. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Pseudarthrosis*. 2013 letzte Aktualisierung 10.02.2015 [cited 2015 10.06.]; Available from: <http://gbe-bund.de>.
48. Arbeitsunfähigkeit bei AOK-Pflichtmitgliedern ohne Rentner nach ICD10. 2008 [cited 2015 10.06.]; Available from: <http://www.gbe-bund.de>.
49. Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Arbeitsfähigkeit bei erwerbstätigen AOK-Mitgliedern (jeweilige Arbeitsunfähigkeitsfälle und Arbeitsunfähigkeitstage als Anteil alle Fälle bzw. Tage). 2013 02.09.2014 [cited 2015 10.06.]; Available from: <http://www.gbe-bund.de>.
50. Arbeitsunfähigkeit bei AOK-Pflichtmitgliedern ohne Rentner - Pseudarthrosis. 2008 [cited 2015 10.06.]; Available from: <http://www.gbe-bund.de>.
51. Bundesamt, S. *Fallpauschalbezogene Krankenhausstatistik Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten im Krankenhaus*. 2013 15.01.2014 [cited 2015 10.06.]; 24.10.2013:[Available from: https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Krankenhaeuser/Fallpauschalen-Krankenhaus2120640127004?__blob=publicationFile].
52. Preininger, B., et al., An experimental setup to evaluate innovative therapy options for the enhancement of bone healing using BMP as a benchmark--a pilot study. *Eur Cell Mater*, 2012. **23**: p. 262-71; discussion 271-2.
53. Preininger, B., et al., CD133: enhancement of bone healing by local transplantation of peripheral blood cells in a biologically delayed rat osteotomy model. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e52650.

54. David, V., et al., Noninvasive in vivo monitoring of bone architecture alterations in hindlimb-unloaded female rats using novel three-dimensional microcomputed tomography. *J Bone Miner Res*, 2003. **18**(9): p. 1622-31.
55. Alexander, K.A., et al., Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res*, 2011. **26**(7): p. 1517-32.
56. Aerssens, J., et al., Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*, 1998. **139**(2): p. 663-70.
57. Moulder, J.E., J.J. Fischer, and R. Milardo, Time-dose relationships for the cure of an experimental rat tumor with fractionated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1976. **1**(5-6): p. 431-8.
58. Finkemeier, C.G. and M.W. Chapman, *Treatment of femoral diaphyseal nonunions*. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(398): p. 223-34.
59. Faldini, C., et al., Surgical treatment of aseptic forearm nonunion with plate and opposite bone graft strut. Autograft or allograft? *Int Orthop*, 2015. **39**(7): p. 1343-9.
60. Sen, M.K. and T. Miclau, Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*, 2007. **38 Suppl 1**: p. S75-80.
61. Finkemeier, C.G., Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am*, 2002. **84-A**(3): p. 454-64.
62. Arrington, E.D., et al., Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*, 1996(329): p. 300-9.
63. Burchardt, H., Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am*, 1987. **18**(2): p. 187-96.
64. Cypher, T.J. and J.P. Grossman, Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg*, 1996. **35**(5): p. 413-7.
65. Urist, M.R. and E. Dawson, Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (AAA) bone. *Clin Orthop Relat Res*, 1981(154): p. 97-113.
66. Hinsenkamp, M. and J.F. Collard, Growth factors in orthopaedic surgery: demineralized bone matrix versus recombinant bone morphogenetic proteins. *Int Orthop*, 2015. **39**(1): p. 137-47.
67. Asahara, T., et al., VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
68. Graham, S., et al., Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009. **18**(11): p. 1633-54.
69. Termaat, M.F., et al., Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. **87**(6): p. 1367-78.
70. Bessa, P.C., M. Casal, and R.L. Reis, Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med*, 2008. **2**(1): p. 1-13.
71. Blumenfeld, I., et al., Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Exp Gerontol*, 2002. **37**(4): p. 553-65.

72. Patil, A.S., R.B. Sable, and R.M. Kothari, An update on transforming growth factor-beta (TGF-beta): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J Cell Physiol*, 2011. **226**(12): p. 3094-103.
73. Bakhshayesh, M., et al., Effects of TGF-beta and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. *Inflammation*, 2012. **35**(1): p. 138-42.
74. Kempen, D.H., et al., Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials*, 2009. **30**(14): p. 2816-25.
75. Xiao, C., et al., Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration. *Biomed Mater*, 2011. **6**(1): p. 015013.
76. Haidar, Z.S., R.C. Hamdy, and M. Tabrizian, Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett*, 2009. **31**(12): p. 1817-24.
77. Alt, V., et al., A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo-Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. *Injury*, 2009. **40**(12): p. 1269-75.
78. Carreira, A.C., et al., Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*, 2014. **93**(4): p. 335-45.
79. Harwood, P.J. and P.V. Giannoudis, Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin Drug Saf*, 2005. **4**(1): p. 75-89.
80. Granero-Molto, F., et al., Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. **8**(3): p. 255-68.
81. Hernigou, P., et al., Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am*, 2006. **88 Suppl 1 Pt 2**: p. 322-7.
82. Fu, W.L., C.Y. Zhou, and J.K. Yu, A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med*, 2014. **42**(3): p. 592-601.
83. Tiedeman, J.J., et al., The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*, 1995. **18**(12): p. 1153-8.
84. Peters, A., et al., 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. 2947-54.
85. Li, S., B. Zhou, and Z.C. Han, Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells. *Thromb Haemost*, 2006. **95**(2): p. 301-11.
86. Copland, I., et al., CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Exp Hematol*, 2008. **36**(1): p. 93-103.
87. Marx, R.E. and D.B. Harrell, Translational research: The CD34+ cell is crucial for large-volume bone regeneration from the milieu of bone marrow progenitor cells in craniomandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2014. **29**(2): p. e201-9.

88. Yasuhara, S., et al., Efficacy of bone marrow mononuclear cells to promote bone regeneration compared with isolated CD34+ cells from the same volume of aspirate. *Artif Organs*, 2010. **34**(7): p. 594-9.
89. Kuroda, R., et al., Clinical impact of circulating CD34-positive cells on bone regeneration and healing. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014. **20**(3): p. 190-9.
90. Dempster, D.W., et al., Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res*, 2001. **16**(10): p. 1846-53.
91. Iida-Klein, A., et al., Effects of cyclic vs. daily treatment with human parathyroid hormone (1-34) on murine bone structure and cellular activity. *Bone*, 2007. **40**(2): p. 391-8.
92. Nakajima, A., et al., Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res*, 2002. **17**(11): p. 2038-47.
93. Aleksyniene, R. and I. Hvid, Parathyroid hormone--possible future drug for orthopedic surgery. *Medicina (Kaunas)*, 2004. **40**(9): p. 842-9.
94. Seebach, C., et al., Intermittent parathyroid hormone (1-34) enhances mechanical strength and density of new bone after distraction osteogenesis in rats. *J Orthop Res*, 2004. **22**(3): p. 472-8.
95. Tzioupis, C.C. and P.V. Giannoudis, The Safety and Efficacy of Parathyroid Hormone (PTH) as a Biological Response Modifier for the Enhancement of Bone Regeneration. *Curr Drug Saf*, 2006. **1**(2): p. 189-203.
96. Lozano, D., et al., Parathyroid hormone-related protein (107-111) improves the bone regeneration potential of gelatin-glutaraldehyde biopolymer-coated hydroxyapatite. *Acta Biomater*, 2014. **10**(7): p. 3307-16.
97. Kawamoto, A., et al., Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells*, 2009. **27**(11): p. 2857-64.
98. Kuroda, R., et al., Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34+ cells for patients with femoral and tibial nonunion: pilot clinical trial. *Stem Cells Transl Med*, 2014. **3**(1): p. 128-34.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Anke Dienelt für die Betreuung, sehr hilfreicher Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

In besonderem Maße bin ich Frau Dr. Ing. Andrea Sass zum Dank verpflichtet, die mich sehr engagiert durch dieses Projekt begleitet hat und stets geduldig auf meine Fragen eingegangen ist.

Mario Thiele möchte ich für die gute Einarbeitung in die Durchführung und Auswertung von μ CT-Analysen danken. Besonders sein steter Rat bei der Lösung technischer Probleme war mir eine große Hilfe.

Frau Dr. med. vet. Agnes Ellinghaus und Frau Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek danke ich für die Betreuung der Tierversuche und die Durchführung der Operationen.

Darüber hinaus möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern danken, die mich während meiner gesamten Studienzeit stets außerordentlich unterstützt haben, sowie meiner Freundin Christina, die mir immer eine moralische Stütze und geduldiger Ausgleich ist.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sebastian Filter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die lokale Applikation von CD 31+ Zellen aus dem peripheren Blut stimuliert die biologisch verzögerte Knochenheilung - μ CT Analysen am Tiermodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht