

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

DISSERTATION

Auswirkungen der Applikation von CD31⁺ Zellen aus dem peripheren
Blut auf die biologisch verzögerte Knochenheilung zu frühen
Zeitpunkten – histologische Analysen am Tiermodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Rose

aus Düsseldorf

Datum der Promotion: 4.6.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

F Andrea Sass, Katharina Schmidt-Bleek, Agnes Ellinghaus, Sebastian Filter, Alexander Rose, Bernd Preininger, Simon Reinke, Sven Geissler, Hans-Dieter Volk, Georg N Duda, Anke Dienelt, “CD31+ Cells From Peripheral Blood Facilitate Bone Regeneration in Biologically Impaired Conditions Through Combined Effects on Immunomodulation and Angiogenesis.” *Journal of Bone and Mineral Research*, 2017.

Julia Löffler, F Andrea Sass, Sebastian Filter, Alexander Rose, Agnes Ellinghaus, Georg N Duda, Anke Dienelt; “Compromised Bone Healing in Aged Rats Is Associated With Impaired M2 Macrophage Function.”, *Frontiers in Immunology*, 2019.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
1 Abkürzungsverzeichnis	5
2 Abbildungsverzeichnis	7
3 Tabellenverzeichnis	7
4 Zusammenfassung	8
5 Abstract	10
6 Einleitung	12
6.1 Knochenfunktion und -aufbau	12
6.1.1 Allgemeine Funktion von Knochen	12
6.1.2 Aufbau von Knochen	12
6.1.3 Zellen des Knochens	14
6.2 Knochenwachstum in der Entwicklung	15
6.3 Frakturen und Knochenregeneration	16
6.3.1 Primäre Frakturheilung	17
6.3.2 Sekundäre Frakturheilung	18
6.3.3 Synthese neuen Gewebes während der Frakturheilung	20
6.3.4 Immunologische Aspekte der Frakturheilung und Wachstumsfaktoren	20
6.3.5 Vaskulogenese und Angiogenese	21
6.4 Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen	24
6.4.1 Ursachen einer beeinträchtigten Frakturheilung	24
6.4.2 Gesellschaftliche Bedeutung beeinträchtigter Frakturheilung	26
6.4.3 Aktueller Stand bei der Versorgung beeinträchtigter Frakturheilung	27
6.4.4 Alternative Ansätze bei der Versorgung beeinträchtigter Frakturheilung	27
6.5 Zelltherapeutischer Ansatz der vorliegenden Arbeit	29
6.5.1 PBMCs	29
6.5.2 CD31 ⁺ Zellen	29
6.5.3 Vorarbeiten zur CD31 ⁺ Zelltherapie bei der Frakturheilung	30
7 Ziele der Arbeit	33
8 Methoden	34
8.1 In vivo Versuchsablauf	34
8.1.1 Beschreibung der Versuchstiere	34
8.1.2 Spendertiere und Tötung von Spendertieren	34
8.1.3 Zellkultur	35
8.1.4 Operation	37
8.2 Histologie	40
8.2.1 Histologische Aufarbeitung	41
8.2.2 Histologische Färbungen	42
8.3 Definition der Region von Interesse	49
8.4 Deskriptive Auswertung der histologischen Präparate	51
8.5 Quantitative Auswertung mittels Histomorphometrie	51
8.6 Statistik	52

9 Ergebnisse	53
9.1 Ergebnisse der Etablierungsfärbungen zur Gefäßdarstellung	53
9.2 Histologische Analysen der α-SMA Färbungen	55
9.2.1 Definition der ROI bei der α -SMA Färbung	55
9.2.2 Ergebnisse der Gefäßzählungen	56
9.2.3 Deskriptive Auswertung der α -SMA Färbungen	59
9.3 Histologische Analysen der Movat-Pentachromfärbungen	61
9.3.1 Deskriptive Auswertung der Movat-Pentachromfärbungen	61
9.3.2 Histomorphometrische Auswertung der Movat-Pentachromfärbungen	64
9.4 Kinetik innerhalb der Versuchsgruppen: Vergleich Tag 3 zu Tag 7	66
9.4.1 PBMC Gruppe	66
9.4.2 CD31 Gruppe	66
10 Diskussion	67
10.1 Konzeption des Versuchs	67
10.2 Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Angiogenese zu frühen Zeitpunkten	68
10.2.1 Immunmodulatorische Effekte der CD31 ⁺ Zellen und Angiogenese	70
10.3 Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf das Frakturhämatom	72
10.3.1 Bedeutung des Frakturhämatoms	72
10.3.2 Persistenz des Hämatoms durch immunregulative Wirkung auf Makrophagen	73
10.3.3 Mögliche anhaltende immunregulative und osteogene Effekte der CD31 ⁺ Zellen	75
10.4 CD31⁺ Zellapplikation verhindert einen unilateralen Markraumverschluss	77
10.5 Analyse der Bereiche nahe des Periosts	80
10.6 Interpretation des Anteils an Bindegewebe an der ROI	82
10.6.1 Fibröses Bindegewebe in Pseudarthrosen	82
10.6.2 Entstehung von Fibrose allgemein: Mechanismen und Zellen	83
10.6.3 Effekt der CD31 ⁺ Zellen auf die klassischen Signalwege der Fibrosierung fraglich	84
10.6.4 Mögliche Wirkung der CD31 ⁺ Zellapplikation auf Fibrose zu frühen Zeitpunkten	85
10.7 Limitationsanalyse der Arbeit	86
10.7.1 Versuchstiere: Tiermodell und Anzahl der Versuchstiere	86
10.7.2 Stark vaskularisiertes Muskelgewebe beeinflusste die Gefäßzählung	87
10.7.3 Diskussion der Etablierungen der α -SMA Färbung	87
10.8 Einordnung in den Gesamtzusammenhang und humanmedizinische Relevanz	92
10.8.1 Vorteile einer Zelltherapie mit CD31 ⁺ Zellen	92
10.8.2 Erkennung von gestörten Heilungsverläufen und Prävention	93
10.8.3 Präventiver Nutzen der CD31 ⁺ Zellapplikation und mögliche klinische Anwendung	94
11 Literaturverzeichnis	96
12 Eidesstattliche Erklärung	106
13 Anteilserklärung	107
14 Lebenslauf	108
15 Publikationsliste	109
16 Danksagung	110

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR7	C-C-Chemokinrezeptor Typ 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
CYR61	<i>Cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPCs	<i>Endothelial progenitor cells</i> , endotheliale Progenitorzellen
ESWT	<i>Extracorporeal Shock Wave Therapy</i> , hochenergetisch fokussierte extrakorporale Stoßwellentherapie
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
G	Gravitation
g	Gramm
GM-CFU	<i>Granulocyte-macrophage colony forming unit</i> , Granulozyten-Monozyten-Kolonie-bildende Einheit
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMOX	Hämoxygenase
IFN	Interferon
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Anatagonist
kg	Kilogramm
LIPUS	<i>Low-intensity pulsed ultrasound</i> , niedrig intensivierter gepulster Ultraschall
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molare Masse
M-CFU	<i>Macrophage colony forming unit</i> , Makrophagen-Kolonie-bildenden Einheiten
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> , Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
mg	Milligramm
Min.	Minuten
MIPO	minimal-invasive Plattenosteosynthese
mm	Millimeter
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MSCs	Mesenchymale Stromazellen
MW	Mittelwert
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR/rtPCR	Quantitative/ <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> (= CD31)
PFA	Paraformaldehyd
PRP	<i>Platelet rich plasma</i> , thrombozytenreiches Plasma
PTH	Parathormon
PTHrP	<i>PTH-related Protein</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor κ B</i>
RANK-L	RANK-Ligand

ROI	<i>Region of interest</i>
STABW	Standardabweichung
T _{EMRA} Zellen	<i>Terminally differentiated CD8⁺ effector memory T cells</i> , terminal differenzierte Effektor-T-Gedächtniszellen
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
T _H Zellen	T-Helfer Zellen
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vSMCs	<i>Vascular smooth muscle cells</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
α-SMA	<i>Alpha-smooth muscle actin</i>
μl	Mikroliter

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Knochenaufbaus am Beispiel des Femurknochens des Menschen.....	13
Abbildung 2: Ausschnitt aus der Entwicklung eines Röhrenknochens.....	16
Abbildung 3: Primäre Frakturheilung: Kontakt- und Spalthheilung.....	17
Abbildung 4: Überblick über die Phasen der sekundären Frakturheilung.....	19
Abbildung 5: Gewebeentwicklung während der Frakturheilung.....	20
Abbildung 6: Mechanismen der Angiogenese: Sprossung (A) und Intusseption (B).....	22
Abbildung 7: Daten aus der Vorarbeit zur CD31 ⁺ Zelltherapie 6 Wochen nach Osteotomie.....	31
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Isolation von PBMCs.....	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung der MACS Technik.....	36
Abbildung 10: schematische Darstellung des Fixateur Externe.....	38
Abbildung 11: Kryoeinbettung nach Kawamoto.....	41
Abbildung 12: Fotografie des Kryostats mit eingespanntem Präparat.....	42
Abbildung 13: Exemplarische Movat-Pentachromfärbung.....	44
Abbildung 14: Schematische Darstellung der immunhistochemischen α -SMA Färbung.....	45
Abbildung 15: Protokoll α -SMA Färbung mit optionalen Modifikationsschritten.....	48
Abbildung 16: Schematische Darstellung der ROI für die Evaluation der Movat-Pentachromfärbungen.....	49
Abbildung 17: Erstellung der ROI 2.....	50
Abbildung 18: Etablierte α -SMA Gefäßfärbung (D) im Vergleich zu anderen Färbeprotokollen.....	54
Abbildung 19: Gefäße im angrenzenden Muskelgewebe beeinflussen die Gefäßzählung.....	55
Abbildung 20: Gefäßzählung 3 und 7 Tage nach Osteotomie und Vergleich beider Zählvarianten.....	58
Abbildung 21: Exemplarische α -SMA Gefäßfärbungen 3 (A und B) und 7 Tage (C und D) nach Osteotomie.....	60
Abbildung 22: Exemplarische Movat-Pentachromfärbungen 3 (A und B) und 7 Tage (C und D) nach Osteotomie.....	63
Abbildung 23: Histomorphometrische Auswertung der Movat-Pentachromfärbung 7 Tage nach Osteotomie.....	65

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die Anzahl und Verwendung der Versuchstiere.....	40
Tabelle 2: Übersichtstabelle Gefäßzählung.....	57

4 Zusammenfassung

Knochengewebe besitzt die besondere Fähigkeit, sich nach einer Fraktur wieder vollständig zu regenerieren. Trotzdem kommt es bei 5-10 % der Patienten nach einem Knochenbruch zur beeinträchtigten Knochenheilung. Mit einer älter werdenden Bevölkerung nimmt diese Entwicklung zu. Eine verlängerte Therapiedauer, höhere Kosten für das Gesundheitssystem und eine schlechtere Lebensqualität für Patienten sind die Folgen. Dem kann mit den bisherigen Therapieoptionen nur unzureichend vorgebeugt werden.

Ursächlich für eine gestörte Heilung können eine beeinträchtigte Angiogenese und eine prolongierte Entzündungsreaktion sein. Im Rahmen der Entwicklung neuer Therapieverfahren wurde deshalb bereits der positive Effekt der lokalen Applikation pro-angiogen und immunmodulatorisch wirksamer CD31⁺ Zellen überprüft und zu einem späten Heilungszeitpunkt nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung der Zellen auf Angiogenese und Inflammation sowie die damit verbundene Gewebedifferenzierung zu früheren Heilungszeitpunkten näher charakterisiert.

In einem bereits etablierten Tiermodell für eine biologisch verzögerte Frakturheilung wurde weiblichen, 12 Monate alten Sprague-Dawley Ratten ein artifizielles Hämatom mit entweder der Gesamtheit an PBMCs (Kontrollpopulation) oder einer angereicherten CD31⁺ Zellpopulation in einen 2 mm breiten Osteotomiespalt transplantiert. Um die frühen Zeitpunkte zu analysieren, wurden die Tiere 3 und 7 Tage nach Osteotomie euthanasiert und histologische Untersuchungen an den kryokonservierten Präparaten durchgeführt. Mittels deskriptiver und quantitativer Analysen wurde die Gefäßsituation und die Entwicklung des neu entstandenen Gewebes beurteilt.

Die CD31⁺ Zellapplikation führte zu einer signifikant geringeren Menge an Bindegewebe und einem signifikant größeren Bestand des artifiziiellen Hämatoms 7 Tage nach Osteotomie. Die Menge an mineralisiertem Gewebe lag in der CD31 Gruppe über, die des gebildeten Knorpelgewebes unter den Werten der PBMC Gruppe. Aus den histologischen Analysen wurde abgeleitet, dass die immunregulative Wirkung der CD31⁺ Zellen einen längeren Erhalt des Frakturhämatoms bedingt und darüber der immunregulative und osteogene Effekt der CD31⁺ Zellen ausgedehnt wird. Dies beeinflusst vermutlich auch den Matrix-Umbau und verhinderte einen unilateralen Verschluss des Markraums in der CD31 Gruppe. Dieser ist für die Ausbildung von Pseudarthrosen charakteristisch und war in der PBMC Gruppe zu beobachten. Ein positiver Einfluss der CD31⁺

Zellapplikation auf die Angiogenese zu frühen Zeitpunkten ließ sich mit der erhobenen Gefäßanzahl im Vergleich zur PBMC Gruppe nicht feststellen.

Die ergänzenden Erkenntnisse dieser Arbeit über die Wirkung der CD31⁺ Zellen zu Beginn der Heilung können helfen, ihren zukünftigen Einsatz im Rahmen neuer Therapieoptionen voranzutreiben. Da sie als periphere Blutzellen leicht und kostengünstig zu gewinnen sind, stellen die CD31⁺ Zellen einen vielversprechenden Ansatz bei der Therapie beeinträchtigter Frakturheilung dar.

5 Abstract

Bone tissue has the potential to regenerate completely after a fracture. Nevertheless, 5-10% of patients experience impaired bone healing. With an aging population, poor healing processes increase. The consequences are an extended duration of therapy, higher costs for the health system and a poorer quality of life for patients. Current therapies cannot prevent these events sufficiently.

Impaired fracture healing can be caused by disturbed angiogenesis and a prolonged inflammatory phase. As part of the evaluation of new therapy methods, local administration of pro-angiogenic and immunomodulatory CD31+ cells was evaluated in preliminary studies and already proven successful by assessment of late healing stages. The present work examines the effect of the cell application on angiogenesis and inflammation and the associated tissue differentiation at earlier healing stages.

In an established animal model for biologically impaired fracture healing an artificial hematoma, either containing PBMCs (control population) or an enriched CD31+ cell population, was transplanted into a 2 mm osteotomy gap of female, 12-month-old Sprague-Dawley rats. To analyze the early healing stages, the animals were euthanized 3 and 7 days after osteotomy and histological examinations were carried out on the cryo-preserved specimens. By descriptive and quantitative analyses, the vascular situation and the newly formed tissue were assessed.

CD31+ cell application led to a significantly lower amount of connective tissue and a significantly larger residual of the artificial hematoma 7 days after osteotomy. The amount of mineralized tissue was higher, the amount of newly formed cartilage lower in the CD31 group compared to the PBMC group. It was deduced that the immunoregulatory effects of the CD31+ cells cause a prolonged retention of the fracture hematoma which in turn extends the immunoregulatory and osteogenic effects of the CD31+ cells. This may also influence the matrix remodelling as CD31+ cell application prevented a unilateral closure of the medullary channel. This characteristic of the formation of a non-union was observed in the PBMC group. A positive impact of CD31+ cell application on angiogenesis at early healing stages could not be confirmed by the number of vessels counted in comparison to the PBMC group.

The additional findings of this work can help to advance future use of the CD31+ cells in the context of new therapy options. Since they are easy and inexpensive to obtain, the CD31+ cells represent a promising approach in the treatment of impaired fracture healing.

6 Einleitung

6.1 Knochenfunktion und -aufbau

6.1.1 Allgemeine Funktion von Knochen

Knochen stellt zusammen mit Knorpelgewebe das Stützgewebe des Körpers dar. Entsprechend dieser Funktion, zeichnet er sich sowohl durch Härte und Druckfestigkeit, als auch durch einen gewissen Grad an Elastizität aus und ist damit insgesamt biegefest (1, 2). Als Teil des Bewegungsapparates ermöglichen Knochen über Sehnen und Muskeln die aktive Bewegung. Sie dienen dem Schutz innerer Organe und sind Ort des blutbildenden Knochenmarks. Darüber hinaus stellt Knochen durch seine Zusammensetzung eine wichtige Komponente bei der Regulation der Kalziumhomöostase dar (1).

6.1.2 Aufbau von Knochen

Unterschiedliche Lage und Aufgaben führen zu einer Formenvielfalt von knöchernen Strukturen. Der längliche Knochenschaft von Röhrenknochen wird als Diaphyse bezeichnet, an deren beiden Enden sich die Epiphysen befinden, die mit Gelenkknorpel überzogen sind und mit benachbarten Knochen als Gelenke kommunizieren können (Abbildung 1 A). Zwischen Diaphyse und Epiphyse liegt ein trichterförmig verbreiteter Knochenabschnitt, der als Metaphyse bezeichnet wird, und die Epiphysenfuge, die sich an der Grenze von Meta- zu Epiphyse befindet. Bis sie zum Abschluss des Knochenwachstums verknöchert (dann als „Linea epiphysealis“ bezeichnet) sorgt sie für das Längenwachstum der Röhrenknochen (1, 2).

Man unterscheidet zwei verschiedene Bauarten innerhalb des Knochens: Substantia spongiosa und Substantia compacta (Abbildung 1 B und C). Die Substantia spongiosa besteht hauptsächlich aus Knochenbälkchen (Trabekeln), die gemeinsam eine Art Gitterwerk bilden, dessen Organisation maßgeblich für die Druck- und Zugbelastung des Knochens verantwortlich ist (trajektorielle Ausrichtung). In den Zwischenräumen der Trabekel befindet sich blutbildendes Knochenmark. In den als Substantia compacta bezeichneten Knochenanteilen findet sich dicht gepacktes, kompaktes Knochengewebe, das die Markhöhle (gefüllt mit Fettmark) umgibt und in den Epiphysenbereichen als Substantia corticalis die spongiösen Bereiche umschließt (1, 2) (Abbildung 1 C).

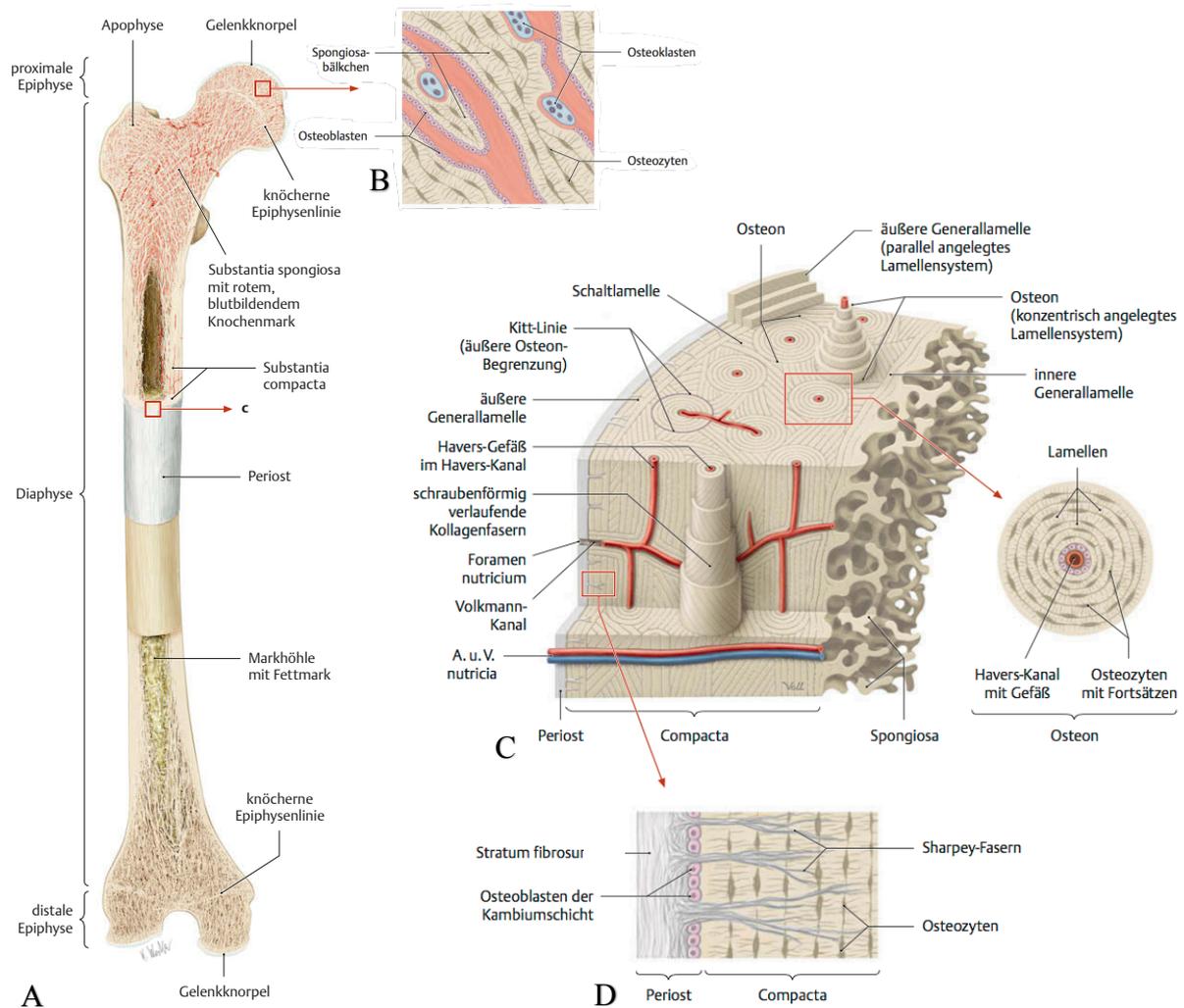


Abbildung 1: Darstellung des Knochenaufbaus am Beispiel des Femurknochens des Menschen

A: Frontaler Sägeschnitt durch den proximalen und distalen Teil des Oberschenkelknochens **B:** Ausschnitt aus der Substantia spongiosa mit Zellen des Knochens **C:** Darstellung der Substantia compacta **D:** Aufbau des Periosts. Abbildung entnommen und modifiziert aus (3).

Die Oberfläche von Knochen wird größtenteils von Periost bedeckt, welches sich in zwei Schichten gliedert: Stratum fibrosum und Stratum osteogenicum (Abbildung 1 D). Das Periost spielt eine herausragende Rolle bei der Regeneration von Knochengewebe, da das dem Knochen anliegende Stratum osteogenicum (oder Kambium) Herberge einer Vielzahl von Zellen ist, die an dem Regenerationsprozess beteiligt sind (mesenchymale Stromazellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteoklasten). Die Auskleidung innerer Oberflächen im Knochen samt der Gefäßkanäle erfolgt durch das Endost, das eine dem Periost ähnliche Zellzusammensetzung aufweist und zusätzlich aus einer dünnen Schicht extrazellulärer Matrix besteht (1, 2). Die (wasserfreie) Knochenmatrix setzt sich zu 70 % aus anorganischen (mineralischen) und zu 30 % aus organischen Bestandteilen zusammen (1, 2). Den Hauptbestandteil der mineralisierten Matrix bilden Hydroxylapatit-Kristalle, die organischen Komponenten werden zum Großteil von Kollagen Typ I (90

%) und zu einem geringeren Teil (10 %) von verschiedenen Proteinen gebildet. Da sich die Hydroxylapatit-Kristalle an die Kollagenfibrillen anlagern, entsteht ein Verbund, der den Knochen gleichzeitig druckfest (Kristalle) und zugfest (Kollagenfibrillen) macht. Sind die Kollagenfibrillen in gleicher Orientierung ausgerichtet und bilden dadurch aneinander liegende Lamellen, spricht man von Lamellenknochen, wie er im ausdifferenzierten Erwachsenenskelett fast ausschließlich vorkommt. Die bereits erwähnten Substantiae spongiosa und compacta sind beide Ausdruck dieses Organisationsmusters des Kollagens. Von einem Osteon spricht man, wenn innerhalb der Kompakta mehrere Lamellen spiralförmig um einen Havers-Kanal herum liegen, welcher die Leitungsbahnen des Knochens beherbergt und mit dem Markraum in Verbindung steht (Abbildung 1 C). Im Gegensatz zum Lamellenknochen fehlt eine höhergradig spezialisierte Struktur im dadurch biomechanisch minderwertigeren Geflechtknochen. Dieser wird vor allem während der Skelettentwicklung gebildet und tritt auch im Rahmen der Knochenbruchheilung in Erscheinung, kommt überdies im Erwachsenenskelett aber praktisch nicht mehr vor (1, 2).

Die Gefäßversorgung des Knochens wird über die Arteria nutricia gewährleistet, die über das Foramen nutricium durch die Kompakta in den Knochen eintritt und bis in den Markraum hervorragt. Dort speist sie das Knochenmark über Mikrogefäße, über die auch die Spongiosa-Bälkchen versorgt werden, und wendet sich dann zurück in die Peripherie. Dabei gehen – bei Röhrenknochen nahezu parallel zur Längsachse des Knochens – die Havers-Gefäße von ihr ab. Querverlaufende Gefäßanastomosen zwischen den Havers-Gefäßen werden als Volkmann-Kanäle bezeichnet (2) (Abbildung 1 C).

6.1.3 Zellen des Knochens

Ausgehend von mesenchymalen Stromazellen (MSCs), bilden sich Osteoprogenitorzellen, die zu Osteoblasten ausdifferenzieren. Diese Zellen sind maßgeblich am Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt: Sie sezernieren alle organischen Bestandteile der EZM (sogenanntes Osteoid) und steuern die nachfolgende Mineralisation des Osteoids, wodurch neue Knochenlamellen entstehen (1, 2). Schreitet die Mineralisierung der Matrix voran, werden die Osteoblasten als Folge dieses Prozesses in die Matrix eingemauert. Dadurch werden sie zu Osteozyten, die als „Mechanosensoren“ weiterhin auf Druck- und Zugkräfte reagieren und die Information an Osteoblasten und darüber auch an Osteoklasten des umliegenden Gewebes weiterleiten können (Abbildung 1 B und C) (2). Zwischen den neu entstandenen Lamellen liegen die Zelleiber der Osteozyten in Höhlen (Lakunen), von denen ihre Ausläufer Knochenkanälchen (Canaliculi) bilden. Das so entstehende Netz dient als Diffusionsgrundlage für die Nährstoffversorgung der Osteozyten. Anders als

Osteoblasten, sind die ebenfalls am Knochenstoffwechsel beteiligten Osteoklasten Abkömmlinge des mononukleären Phagozytensystems. Sie entstehen durch Fusion einkerniger Vorläuferzellen (Prä-Osteoklasten), die aus der gleichen Progenitorzelle hervorgehen, aus der im Verlaufe der Hämatopoese auf anderem Wege auch Monozyten und Makrophagen entstehen (GM-CFU, *granulocyte-macrophage colony forming unit*) (2, 4). Sie haften der Knochenmatrix unmittelbar an und bauen diese ab, indem sie die Calciumverbindungen zunächst mit Salzsäure auflösen, dann lysosomale Enzyme freisetzen und schließlich die entstandenen Matrixfragmente mittels Endozytose aufnehmen (2). Das funktionierende Zusammenspiel aus ständigem Knochenauf- und -abbau durch Osteoblasten und Osteoklasten ist essentiell für die Anpassung des Knochens an mechanische, aber auch stoffwechsellassozierte Anforderungen, denen der Organismus ausgesetzt ist. Ein wichtiges System, das die beiden Zellarten koordiniert, ist das RANK-RANKL-System: Auf der Oberfläche von Osteoblasten befindet sich ein membranständiges Protein, RANK-L (= RANK-Ligand). Durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor (RANK = *Receptor activator of nuclear factor κ B*) auf Osteoklasten(-Vorläuferzellen), führt es zu deren Fusion zu einer mehrkernigen Zelle und anschließend zur Differenzierung und Aktivierung zum resorbierenden Osteoklasten (2, 4). Durch ein vom Osteoblasten selbst sezerniertes, lösliches Protein (Osteoprotegerin, OPG) kann die Bindung und damit die Wirkung von RANK-L am RANK der Osteoklasten inhibiert werden. Beginnen die Osteoklasten mit dem Knochenabbau, stimulieren aus der Knochenmatrix freigesetzte Wachstumsfaktoren (z. B. insulinähnlicher Wachstumsfaktor, IGF) wiederum die Osteoblasten im Sinne eines Feedback-Kreises. Neben dem RANK-RANKL-Mechanismus können Osteoblasten durch Synthese des Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) die Proliferation von Osteoklasten-Vorläuferzellen aus Makrophagen-Kolonie-bildenden Einheiten (M-CFU) stimulieren (2, 4).

6.2 Knochenwachstum in der Entwicklung

Um die Vorgänge, die sich während der Frakturheilung beim Knochen ereignen, besser verstehen zu können, ist eine kurze Erläuterung der Entstehung von einzelnen Knochen (Osteogenese) während der Skelettentwicklung hilfreich (Abbildung 2). Man unterscheidet dabei die desmale (membranäre) von der chondralen (kartilaginären) Osteogenese. Da bei letzterer Knochengewebe an unterschiedlichen Lokalisationen des entstehenden Knochens gebildet wird, unterscheidet man dort einen enchondralen von einem perichondralen Ossifikationsprozess.

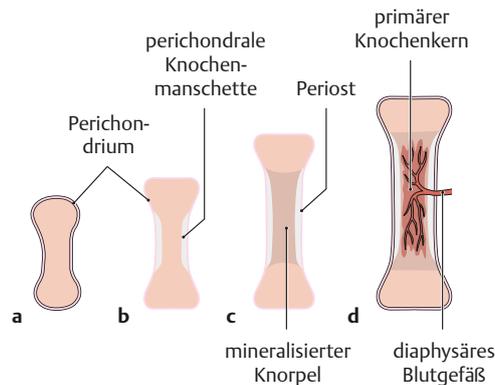


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Entwicklung eines Röhrenknochens

Darstellung der Anfangsphase der Entwicklung eines Röhrenknochens. Aus (3).

Im Rahmen der desmalen Osteogenese entwickeln sich Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten, die Knochenmatrix herstellen (Ossifikation), wodurch zunächst Geflechtknochen entsteht, der mit der Zeit in Lamellenknochen umgewandelt wird (beispielsweise bei Kalvaria und Klavikula) (1, 2). Die meisten anderen Knochen des Skelettsystems, insbesondere Röhrenknochen, entstehen insgesamt durch chondrale Osteogenese (1, 2). Hierbei entsteht aus Mesenchymzellen zunächst Knorpelgewebe, das den späteren Knochen vorformt und erst im Verlauf durch Knochengewebe ersetzt wird. Während dieser Art der Knochenentwicklung lagern sich an die präformierte knorpelige Knochenanlage perichondral Osteoblasten an und bilden durch Synthese von Knochenmatrix eine perichondrale Knochenmanschette (durch desmale Ossifikation), die im weiteren Verlauf nach proximal und distal ausgeweitet wird und während der Osteogenese als äußere Stütze dient (3). Die Knorpelzellen im Zentrum werden mit der Zeit hypertroph und mitochondrienreich und produzieren mineralisierte Knorpelmatrix. Durch Matrix-abbauende Osteoklasten wird sukzessive ermöglicht, dass Gefäße in die Knorpelmatrix einsprießen können. Über diese können Knochenzellen (Mesenchymzellen, die im weiteren Verlauf ausdifferenzieren, Chondroblasten, Osteoklasten und Osteoblasten) in die zentralen Knorpelabschnitte migrieren, das dortige mineralisierte Knorpelgewebe abbauen und mit der Synthese von Knochenmatrix beginnen (enchondrale Ossifikation) (2). Auch hier entsteht zunächst Geflechtknochen, bevor dieser in Lamellenknochen umgewandelt wird (1).

6.3 Frakturen und Knochenregeneration

Eine vollständige Kontinuitätsunterbrechung des Knochens in zwei oder mehr Fragmente wird als Fraktur bezeichnet (5, 6). Dabei werden direkte Frakturen durch äußere Gewalteinwirkungen von

indirekten Frakturen unterschieden, bei denen der Knochen einer zu starken inadäquaten Belastung nicht mehr Stand halten kann (beispielsweise Biegung, Drehung, Stauchung). Außerdem spricht man von Ermüdungsbrüchen, die durch andauernde ungewohnte mechanische Belastungen entstehen oder von pathologischen Frakturen, wenn die Ursache eines Knochenbruchs durch krankhafte Veränderungen der Knochenarchitektur bedingt ist, wie es beispielsweise bei Osteoporose oder Knochenmetastasen der Fall ist (6). Im Vergleich zu den meisten anderen Geweben des Körpers, ist Knochengewebe jedoch zur vollständigen Regeneration fähig und besitzt unter gegebenen Rahmenbedingungen das Potential, sich narbenfrei selbst zu erneuern (Restitutio ad integrum) (7). Je nach Stellung und Stabilität der Frakturrenden zueinander, kommt es dabei entweder zur primären (direkten) oder sekundären (indirekten) Knochenheilung.

6.3.1 Primäre Frakturheilung

Eine primäre Knochenheilung kann nur erfolgen, wenn die Frakturrenden stabil und in minimaler Entfernung zueinander stehen (1) (Abbildung 3). Sind die Knochenenden gut perfundiert, stabil und direkt miteinander verbunden, kommt es zur Kontaktheilung und es wird entsprechend des physiologischen Knochenstoffwechsels abgestorbener Knochen abgebaut und neuer synthetisiert. Neu gebildete Osteone überbrücken dann längs den Frakturspalt und verzahnen die Frakturfragmente miteinander (8, 9). Stehen die Frakturrenden nicht direkt in Kontakt mit- aber stabil zueinander und verbleibt ein weniger als 800 µm bis 1 mm großer Abstand zwischen beiden, kommt es zur Spaltheilung (1, 6, 10): Osteoprogenitorzellen lagern sich ausgehend von Endost und Periost um die Kapillaren herum an und bilden neue Osteone, deren Ausrichtung im weiteren Verlauf der Knochenachse angepasst werden. Die Art der primären Heilung findet demnach nur bei minimal dislozierten Frakturen auf natürlichem Wege statt.

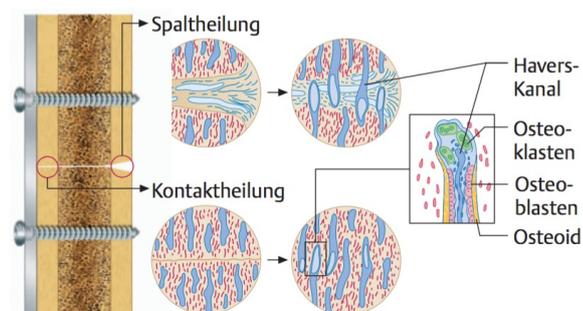


Abbildung 3: Primäre Frakturheilung: Kontakt- und Spaltheilung

Entnommen aus (9).

6.3.2 Sekundäre Frakturheilung

Der weitaus häufigere Mechanismus der sogenannten sekundären Knochenheilung tritt auf, wenn die Frakturrenden weiter auseinander liegen, gegeneinander verschoben oder instabil sind (1, 11). Hierbei regeneriert sich das Knochengewebe konsekutiv über mehrere Phasen hinweg, die zwar aufeinander folgen, sich aber grundsätzlich überlappen können (11). Zu den Phasen zählen die Hämatombildung mit aufeinanderfolgender Pro- und Anti-Inflammationsphase, die Formierung von Soft-Kallus, die Bildung des Hard-Kallus und die Remodelling-Phase (Abbildung 4).

In der ersten Phase der Knochenheilung bildet sich ein Frakturhämatom, nachdem im Rahmen des Frakturgeschehens Gefäße gerissen sind und das ausgetretene Blut koaguliert ist (12). Da Koagulation und Inflammation phylogenetisch eng gekoppelt sind (13), führt die Formierung des Hämatoms gleichzeitig zum Beginn der pro-inflammatorischen Phase und neben Zellen des Knochenmarks befinden sich nun vor allem Immunzellen des peripheren Blutes und neueingewanderte Immunzellen im Hämatom (11). Über die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Interleukin (IL-) 1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF- α), bewirken sie die Migration weiterer, für die Heilung essentieller Zellen (multipotente MSCs, die sich zu knochenbildenden Zellen differenzieren, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten) (14-18). Wo keine suffiziente Perfusion mehr stattfindet, werden in dieser Phase Knochenareale nekrotisch und durch Osteoklasten abgebaut (1, 17). Essentiell für eine erfolgreiche Heilung ist die Beendigung der initialen, pro-inflammatorischen Phase durch eine aufkommende anti-inflammatorische Gegenreaktion, die gleichzeitig die Basis für den Beginn der Revaskularisation des Frakturspalts darstellt (18-20). Regulatorische T-Helfer (T_H-) Zellen und anti-inflammatorische Mediatoren wie IL-10, *Transforming Growth Factor* (TGF-) β und Hämoxygenase (HMOX-) 1, welches außerdem pro-angiogen wirkt, konvertieren das zuvor pro-inflammatorische Milieu im Frakturspalt in eine anti-inflammatorische Umgebung, in der nun Angiogenese stimulierende Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und Hypoxie-induzierter Faktor (HIF-) 1 α hochreguliert werden (18).

Indem Kapillaren im Verlaufe der Revaskularisation in den Frakturspalt einsprießen und Fibroblasten, Chondroblasten und osteogene Zellen aus dem Endost und Periost ins Frakturhämatom einwandern (1, 21), wird das Hämatom umstrukturiert. Nach ungefähr einer Woche hat sich das Frakturhämatom allmählich in einen bindegewebigen, fibrös-knorpeligen Kallus (Soft-Kallus) transformiert, der den Frakturspalt erstmals überbrückt und die Struktur für die weitere Knochenheilung vorgibt (1, 15).

Ab 2 bis 3 Wochen nach Fraktur kommt es je nach Lokalisation im Frakturspalt entweder über intramembranöse Knochenheilung periostal direkt zur Bildung von Geflechtknochen oder es entsteht zunächst hyaliner Knorpel, der im Verlauf mineralisiert (chondraler Ossifikationsprozess) (14, 15). In beiden Fällen wird der entstandene Geflechtknochen als provisorischer knöcherner Kallus oder auch Hard-Kallus bezeichnet (1, 8, 11).

Ab ungefähr der sechsten Woche nach Frakturgeschehen beginnt die Remodelling-Phase (Umbau-Phase), in der der provisorische knöcherne Kallus allmählich resorbiert und durch lamellären Knochen ersetzt wird (1). Diese Phase des definitiven Umbaus und der vollständigen Wiederherstellung von funktionstüchtigem Knochengewebe kann mehrere Monate bis Jahre in Anspruch nehmen (1). In dieser Phase wird auch die Struktur des Markraums wiederhergestellt (17).

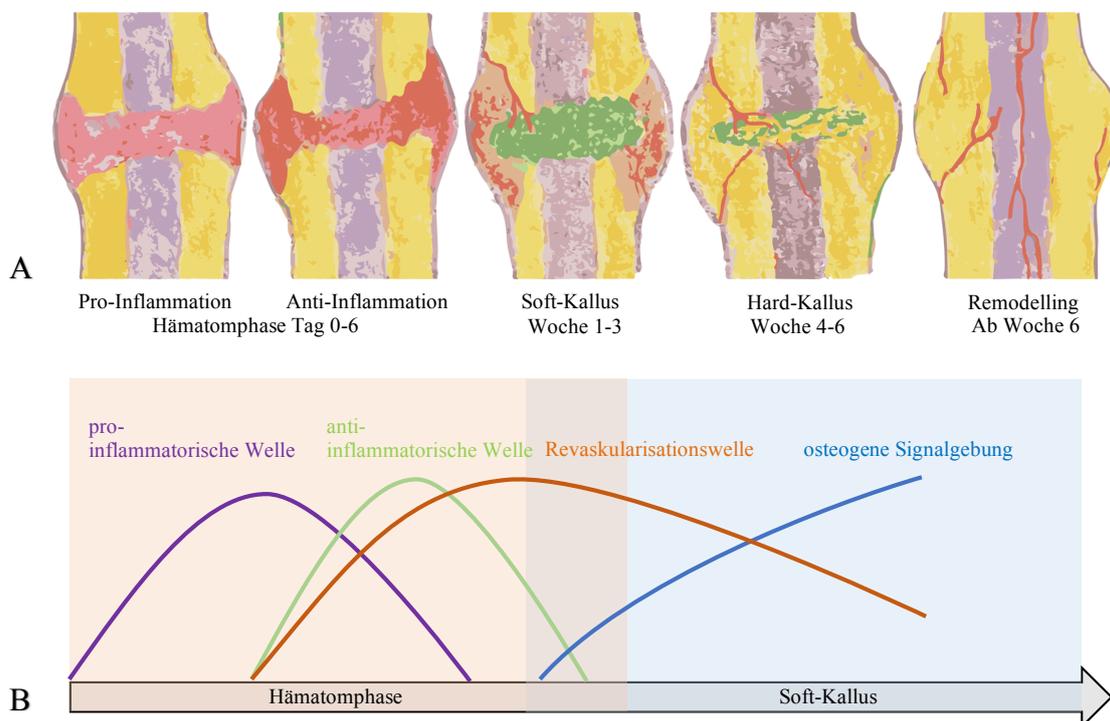


Abbildung 4: Überblick über die Phasen der sekundären Frakturheilung

A: Schematischer Frontalschnitt aus der Frakturregion während der Phasen der sekundären Frakturheilung: Knochenmark violett, Knochengewebe gelblich, Frakturhämatom und Gefäße rot, Knorpelgewebe grün. Nach der initialen Formierung des Frakturhämatoms bildet sich ein bindegewebiger, fibrös-knorpeliger Soft-Kallus, der sich im Laufe der Mineralisierungsprozesse in einen Hard-Kallus umwandelt. In der Remodelling-Phase erfolgt die vollständige Wiederherstellung des lamellären Knochens. Die angegebenen Zeiträume gelten für die Frakturheilung beim Menschen und sind Annäherungen. Details siehe Text. Abbildung von A.Rose/M.Himburg angelehnt an (7) und (22). **B: Detaillierte Darstellung der Signalgebung während der frühen Phase der Frakturheilung:** Die kontrollierte Abfolge von Pro-Inflammation und Anti-Inflammation ist essentiell für die Revaskularisation und den anschließenden Beginn des Knochenaufbaus. Abbildung angelehnt an (7).

6.3.3 Synthese neuen Gewebes während der Frakturheilung

Der verletzte Knochen regeneriert sich aus einem Zusammenspiel unterschiedlicher im Kallus stattfindender Ossifikationsprozesse. Es werden 4 verschiedene Gewebekompartimente unterschieden, die maßgeblich am Wiederaufbau des Knochens nach einer Fraktur beteiligt sind: Kortikaler Knochen bzw. der Bereich zwischen den Frakturenden, das Knochenmark, das Periost und undifferenziertes, der Fraktur anliegendes (fasziales) Weichteilgewebe (11, 23). Dabei findet im Markraum und im Bereich zwischen den kortikalen Fragmenten vor allem enchondrale Verknöcherung statt. Subperiostal und im Bindegewebe, das dem Frakturspalt unmittelbar anliegt, entsteht Knochen vermehrt über desmale Ossifikation (8). Bei einem physiologischen Heilungsprozess bildet das ausgehend von den vier Periostregionen entstehende Knochengewebe Spangen, die sich auf die jeweils gegenüberliegende Kortexseite zu entwickeln (dunkelbraune Areale Abbildung 5) (24). Der Beginn desmalen Knochenheilung liegt zeitlich vor dem Beginn der enchondralen Heilungsprozesse und verleiht den Frakturenden eine erste Stabilität, bevor eine Überbrückung des Frakturspalts vor allem durch enchondrale Knochenheilung (dunkelblaue Areale) erreicht wird (15).

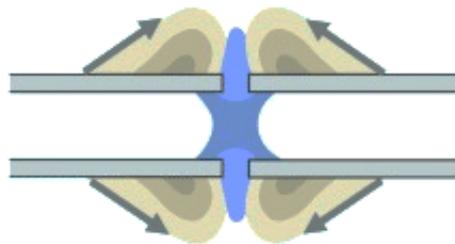


Abbildung 5: Gewebeentwicklung während der Frakturheilung

Entnommen aus (25).

6.3.4 Immunologische Aspekte der Frakturheilung und Wachstumsfaktoren

Die initiale Entzündungsphase unmittelbar nach Verletzung des Knochens, in der es zur Freisetzung verschiedenster pro-inflammatorischer Zytokine kommt, ist unverzichtbar für den Beginn der Heilung nach Frakturgeschehen (20, 26-28). Thrombozyten degranulieren und schütten TGF- β und *platelet-derived growth factor* (PDGF) aus, wodurch knochenbildende Zellen und Immunzellen in Frakturnähe rekrutiert werden und auch ein erster Stimulus zur Angiogenese gegeben wird (8, 29). Eingewanderte Immunzellen (u.a. Makrophagen) und periostal gelegene Mesenchymzellen sezernieren in dieser Anfangsphase der Heilung vor allem Interleukine (1 und 6) und TNF- α (7), die als wichtige Initiatoren der folgenden Heilungsprozesse gelten (20). Zu diesen ge-

hören die Neubildung extrazellulärer Matrix, die Stimulation der Angiogenese, der Abbau nekrotischen Gewebes, die Rekrutierung weiterer inflammatorischer und osteogener Zellen, sowie die Koordination chondraler Knochenbildung und des Remodellings (17, 18, 29).

Für den weiteren Verlauf der Heilung ist es jedoch ebenso essentiell, dass die initiale Entzündungsreaktion zeitlich begrenzt verläuft. Analysen der Zellkomposition im Frakturhämatom von Tiermodellen mit verzögerter Knochenheilung haben gezeigt, dass diese mit einer verlängerten, stärkeren pro-inflammatorischen Reaktion assoziiert ist, welche sich direkt negativ auf die pro-angiogene Signalgebung auszuwirken scheint und damit eine erfolgreiche Heilung verhindert (18-20, 30). Es bedarf daher einer anti-inflammatorischen Gegenregulation der initialen Immunantwort, die unter physiologischen Umständen u.a. durch die Proliferation von immunsuppressiv wirkenden, regulatorischen T_H- Zellen und die Abnahme von zytotoxischen T-Zellen im Frakturhämatom herbeigeführt wird (17, 20, 28). Zeitgleich wird entsprechend der Aktivität dieser Zellen die Expression anti-inflammatorischer Mediatoren wie IL-10 und TGF- β im Hämatom hochreguliert (18, 28). Parallel zur Konversion des pro- in ein anti-inflammatorisches Milieu, werden außerdem auch pro-angiogene Faktoren wie HIF-1 α , VEGF und HMOX-1 im Hämatom freigesetzt, womit deutlich wird, dass der Beginn der Angiogenese abhängig vom Ende der anfänglichen Pro-Inflammation ist (18-20, 28).

Neben den bereits genannten immunrelevanten Signalstoffen spielen die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) ebenfalls eine essentielle Rolle. Als Untergruppe der TGF- β Superfamilie zählen sie zu den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und werden u.a. von Osteoprogenitorzellen und Immunzellen freigesetzt. Sie stimulieren die Differenzierung von MSCs in Chondrozyten und Osteoblasten, sowie von Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten und damit insgesamt die Entstehung von Knochen- und Knorpelgewebe (8, 29, 31). Auch IGF und Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) werden von einer Vielzahl der an der Heilung beteiligten Zellen ausgeschüttet, wirken wachstumsfördernd und besitzen darüber hinaus teilweise angiogenes Potential (29).

6.3.5 Vaskulogenese und Angiogenese

In der Literatur werden zwei Fachbegriffe verwendet, um die Entstehung neuer Gefäße zu beschreiben. „Vaskulogenese“ steht für den Vorgang, bei dem sich Gefäße ohne Assoziation zu vorher bestehenden Gefäßen neu bilden (32). Hierbei differenzieren Endothel-Vorläuferzellen (Angioblasten) zu Endothelzellen aus und schließen sich zu einem ersten primitiven, vaskulären

Plexus zusammen (32-35). Dieser Prozess findet vornehmlich im Rahmen der Embryonalentwicklung statt (32). Unter „Angiogenese“ wird hingegen die Neubildung von Gefäßen aus einem bereits bestehenden Gefäßnetz verstanden (32). Sie schließt sich im Embryo an den Vorgang der Vaskulogenese an, um im Körper ein differenziertes Gefäßsystem auszubilden und findet auch im Erwachsenen noch statt, wenn beispielsweise im Rahmen der Wundheilung die Sauerstoffhomöostase im Gewebe wieder hergestellt werden muss (34, 35). Der am besten erforschte Mechanismus der Angiogenese ist das „Sprouting“ (Sprossung), bei dem Endothelzellen in Richtung angiogener Stimuli aus ihrem Gefäßverband hinaustreten und einen neuen Gefäßast bilden (34). Daneben existiert die sogenannte Intusseption, bei der sich Membrankissen von zwei Polen des Gefäßes aus in das Lumen hineinstülpen und durch ihre Fusion zu einer Aufspaltung des Gefäßes in zwei Lumina führen (34, 36) (Abbildung 6).

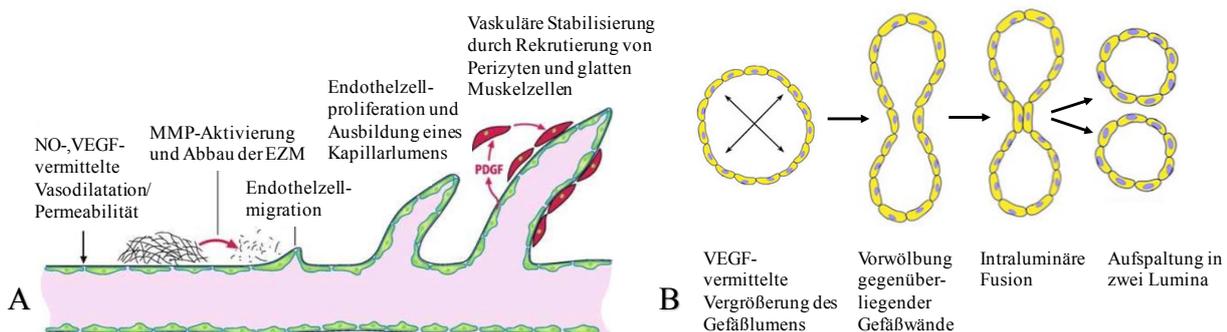


Abbildung 6: Mechanismen der Angiogenese: Sprossung (A) und Intusseption (B)

Schematische Darstellung zweier Mechanismen der Angiogenese. Während bei der Sprossung neue Gefäße aus einem vorher bestehenden „aussprossen“ (A) entstehen, bei der Intusseption neue Gefäße durch Teilung eines existierenden Gefäßes (B). Modifiziert und entnommen aus (32) (A) und (37) (B).

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs), die analog zu Angioblasten im Embryo als Gefäßvorläuferzellen im Erwachsenen gelten (38), ermöglichen auch im adulten Organismus noch die Gefäßneubildung über Vaskulogenese (32). Indem sie in bereits aussprossende Gefäßäste mitintegriert werden, können sie gleichzeitig auch zur Angiogenese beitragen (39-41). Auch bei der Knochenheilung scheinen beide Prozesse beteiligt zu sein und sind nicht immer eindeutig voneinander abgrenzbar (39, 42). Vor diesem Hintergrund wird in dieser Arbeit der Begriff der Angiogenese als Oberbegriff für beide Arten der Gefäßneubildung verwendet.

6.3.5.1 Stimulation der Angiogenese

Angiogenese wird auf zwei verschiedenen Wegen eingeleitet, einem VEGF-abhängigen Weg und einem Angiopoetin-abhängigen Weg (43). VEGF wird in sauerstoffarmer Umgebung von Zellen

über den HIF-1 α Signalweg gebildet (44): Unter hypoxischen Bedingungen kann das als Transkriptionsfaktor wirkende Protein HIF-1 α nicht mehr hydroxiliert und damit für den Abbau in der Zelle vorgefertigt werden. Stattdessen gelangt es in den Zellkern, wo es sich mit HIF-1 β verbindet und über die Bindung an spezifische DNA-Domänen zur Expression pro-angiogener Signalmoleküle, wie VEGF führt (32). VEGF stimuliert die Neubildung von Gefäßen, indem es EPCs rekrutiert und zur Differenzierung und Proliferation von Endothelzellen führt (44-46). Angiopoietine (vor allem 1 und 2) docken an spezifische Rezeptoren von Endothelzellen an und tragen durch die Erweiterung existenter Gefäße bzw. das Aussprossen neuer Gefäßäste aus bereits bestehenden Gefäßen zur Angiogenese bei (43). Dabei wirkt Angiopoetin-1 positiv auf Reifung, Zelladhäsion und Überleben der Endothelzellen, während durch Angiopoetin-2 die Endothelzellverbindungen gelöst werden und erst im Zusammenspiel mit VEGF die Gefäßsynthese stimuliert wird (47).

6.3.5.2 Angiogenese im Rahmen der Frakturheilung

Durch Gefäße wird die Sauerstoffversorgung der Frakturregion sichergestellt. Nährstoffe und Zellen, die für den Wiederaufbau des Gewebes unverzichtbar sind, können zum Bruchspalt transportiert und Abfallprodukte entsorgt werden (42, 48). Versuche, in denen die Angiogenese während der Heilung beeinträchtigt oder blockiert wurde, mündeten in einer fehlerhaften Knochenheilung (49-51), während die Stimulation der Angiogenese die Frakturheilung positiv beeinflusste (52).

Die Revaskularisation im Rahmen der Knochenregeneration erfolgt in zwei Etappen. Die erste Welle pro-angiogener Faktoren ereignet sich mit dem Ende der pro-inflammatorischen Phase der Heilung, zeitgleich mit der anti-inflammatorischen Gegenregulation, vor allem über den HIF-1 α Signalweg (18, 19, 42). Zellen, die im hypoxischen Milieu des Frakturspalts in dieser Phase angeregt werden, VEGF zu produzieren, sind mesenchymale Progenitorzellen, Osteoblasten und in den Frakturspalt migrierte Immunzellen (53-55). Neben VEGF als zentralem Mediator der Angiogenese, produzieren Endothelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten *basic*-FGF (b-FGF, FGF-2) (56), das ebenfalls die Angiogenese stimuliert (56, 57). Thrombozyten, die an Kollagenfasern adhären und degranulieren, schütten TGF- β und PDGF aus, ebenfalls zwei pro-angiogene Signalstoffe (56). Darüber hinaus haben auch die von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten synthetisierten BMP-2 und -4 einen indirekt positiven Effekt auf die Angiogenese, indem sie die Ausschüttung von VEGF stimulieren (58, 59). Die Gefäßsynthese zu diesem frühen Zeitpunkt der Heilung ist essentiell: der Neuaufbau von Knochengewebe beginnt erst, sobald die Versorgung durch Gefäße sichergestellt ist (56).

Die Expression angiogener Faktoren (wie Von-Willebrand-Faktor (vWF), Angiopoetin 1, b-FGF) wird während der Knochenheilung zum zweiten Mal stark angekurbelt, wenn das Kallusgewebe im Rahmen von enchondraler und desmaler Ossifikation mineralisiert wird (42). Wird die Angiogenese unter experimentellen Bedingungen inhibiert, kommt es zur unvollständigen Wiederherstellung des ursprünglichen Knochengewebes und damit zur Defektheilung (60), da sowohl enchondrale als auch desmale Ossifikation dadurch beeinträchtigt werden (50). Beide Arten der Knochenbildung bedürfen nämlich eines Gefäßnetzes, das sicherstellt, dass die für die jeweilige Art der Ossifikation notwendigen Zellen in die betreffenden Regionen transportiert werden können (bei der enchondralen Knochenheilung u.a. Chondroklasten und Osteoblasten-Progenitor-Zellen, bei der desmalen Knochenheilung vor allem Osteoprogenitorzellen) (39).

Damit neue Gefäße in die Frakturregion einsprießen können, muss parallel die extrazelluläre Matrix in Teilen ab- und umgebaut werden (43). Dies wird mit Hilfe von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) bewerkstelligt, die unter anderem von Makrophagen (28, 61) bzw. im Rahmen der Knochenheilung von Osteoklasten und Chondroklasten (39) sezerniert werden (Abbildung 6). Eine besondere Rolle während der Heilung kommt den Matrixmetalloproteasen MMP-9 und MMP-13 zu, die maßgeblich an der für die Kallus-Revaskularisation notwendigen Knorpelresorption während der enchondralen Ossifikation beteiligt sind (39, 62, 63).

6.4 Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen

Sind einer oder mehrere der oben beschriebenen biologischen Abläufe gestört oder ist die Fraktur mechanisch instabil, kommt es zur verzögerten Knochenheilung oder gar zur Bildung von Pseudarthrosen (Falsch-, Scheingelenk, *non-union*) (5). Auch wenn der Heilungszeitraum je nach Frakturlokalisation und Bruchmechanismus sehr individuell sein kann, wird allgemein von einer verzögerten Knochenheilung gesprochen, wenn eine knöcherne Überbrückung der Fraktur 4-6 Monate nach dem Bruchereignis noch nicht nachzuweisen ist. Bleibt eine knöcherne Konsolidierung der Fraktarenden auch nach 6 Monaten noch aus, wird dies als Pseudarthrose bezeichnet (5, 64).

6.4.1 Ursachen einer beeinträchtigten Frakturheilung

Da die Knochenheilung vom fehlerfreien Ineinandergreifen der biologischen Abläufe und mechanischen Gegebenheiten während der Heilungsphasen abhängig ist, können viele Faktoren die Knochenregeneration beeinträchtigen.

Bei der Entstehung hypertropher Pseudarthrosen wird angenommen, dass es aufgrund mechanischer Instabilität in gut vaskularisierten Frakturrenden periostal reaktiv zu einer überschießenden Kallusbildung kommt, ohne dass dieser im Verlaufe verknöchert (5, 6). Die mechanischen Gegebenheiten stehen wiederum in enger Verbindung mit den biologischen Abläufen während der Heilung und können Gewebedifferenzierung und Revaskularisation beeinflussen (65, 66). Als eine der wichtigsten Bedingungen für eine erfolgreiche Frakturheilung gilt außerdem eine störungsfrei ablaufende Angiogenese (siehe Angiogenese im Rahmen der Frakturheilung): Eine unzureichende Durchblutungssituation wird als Hauptgrund für die Entstehung avitaler Pseudarthrosen angesehen (5, 6).

Individuelle Risikofaktoren des Patienten wie Komorbiditäten und Gewohnheiten verändern die Biologie der Heilung ebenfalls auf lokaler Ebene. Diabetes Mellitus (67-69), Osteoporose (70, 71), Infektionen (68), Mangelernährung (69, 72), Rauchen (73-76) und Alkoholgenuss (77) sowie die Einnahme von NSARs (78-80) beeinträchtigen Differenzierung, Proliferation und Aktivität von Osteoblasten sowie die Revaskularisations-Kapazität im Frakturspalt.

Im aufkommenden Forschungsfeld der Osteoimmunologie wird der Tatsache Rechnung getragen, dass Immun- und Skelettsystem miteinander verknüpft sind und Immunzellen mit Knochenzellen interagieren (81). Da in allen Phasen der Knochenheilung Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt sind (81-85) (siehe auch 6.3.2 und 6.3.4), kann deren Dysregulation potentiell auch die Knochenregeneration beeinträchtigen. Tatsächlich führt eine abgeschwächte Immunantwort im Rahmen von Diabetes (86, 87) oder HIV (88) ebenso zu einem schlechteren Heilungsverlauf wie eine erhöhte Immunantwort bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen (89, 90). Darüber hinaus wurde in Vorarbeiten bereits aufgezeigt, dass eine prolongierte Immunreaktion zu Anfang der Heilung mit einer verzögerten Frakturheilung assoziiert ist (18-20, 30).

Auch ein fortgeschrittenes Lebensalter wirkt sich auf die Reparaturprozesse bei der Knochenheilung aus. So wurde ein verlängerter Heilungsverlauf nach Fraktur bei älteren Tieren im Vergleich zu jüngeren bereits nachgewiesen (91) und die verminderte Knochenbildung im Alter u.a. auf eine geringere Proliferationskapazität der Osteoprogenitorzellen zurückgeführt (92). Gibon et al. summierten in ihrem Review (93), dass auch MSCs mit dem Alter an Proliferations- und Differenzierungskapazität einbüßen. Im Geschlechtervergleich leiden Frauen ungefähr ab dem 55. Lebensjahr eher an einer verzögerten Frakturheilung als Männer (94). Dies ist vermutlich Folge einer geringeren Östrogenproduktion post-menopausal, die eine spätere Formation von Knochenmatrix und damit eine längere Instabilität zwischen den Frakturrenden nach sich zieht (65, 69, 91, 95).

Die veränderten biologischen Eigenschaften im Alter betreffen auch das Immunsystem und dessen Mitspieler. So reagieren gealterte Makrophagen mit einer stärkeren pro-inflammatorischen Antwort auf bestimmte Stimuli als jüngere (96-98). In Patienten mit verzögerter Knochenregeneration konnte darüber hinaus eine erhöhte Anzahl CD8⁺, Interferon (IFN)- γ und TNF- α produzierender T_{EMRA} Zellen (Terminal differenzierte Effektor-T-Gedächtniszellen) im peripheren Blut nachgewiesen werden, die den Heilungsverlauf negativ beeinflussten (99). Da die Präsenz von T_{EMRA} Zellen mit zunehmendem Patientenalter ansteigt (100), legen auch diese Ergebnisse einen veränderten Immunstatus im Sinne eines überaktiven Immunsystems im Alter nahe.

6.4.2 Gesellschaftliche Bedeutung beeinträchtigter Frakturheilung

In der Literatur wird postuliert, dass es in rund 5-10 % der Fälle nach Frakturgeschehen, insbesondere im Bereich langer Röhrenknochen, zur verzögerten Knochenheilung oder Ausbildung einer Pseudarthrose kommt (101, 102). Trotz teils kontroverser Diskussion dieser Zahl (103), spricht die Entwicklung auch in Deutschland für den Bedarf an neuen Therapieverfahren: In Deutschland wurden im Jahr 2017 insgesamt 13.562 stationäre Krankenhausfälle als Pseudarthrose codiert, 1.462 als verzögerte Frakturheilung (104). Verglichen mit der Zahl von 6.633 stationär behandelten Pseudarthrosen und 550 Heilungsverzögerungen noch im Jahre 2000 stellt dies eine deutliche Steigerung dar (104).

Die Folgen einer inadäquat verlaufenden Knochenheilung sind weitreichend: Auf Patientenseite wird die Lebensqualität durch die Notwendigkeit prothasierter und mehrfacher Behandlungen, andauernde Schmerzsymptomatik und möglicherweise sogar Langzeitfolgen stark reduziert. Auf gesamtgesellschaftlicher Ebene steigen die Kosten für das Gesundheitssystem (Revisionsoperation, verlängerte Behandlungsdauer, Schmerzmedikation) und Arbeitskräfte fallen aus (64, 105). Am Beispiel der Tibiaschaftfraktur machten Antonava et al. 2013 deutlich, wie stark die Behandlung von Pseudarthrosen das Gesundheitssystem mehr belastet, indem sie die mittleren Behandlungskosten von umgerechnet 23.584 € bei der Behandlung von Pseudarthrosen jener von 10.784 € im Rahmen eines normalen Heilungsverlaufes gegenüberstellten (106). In Hinblick auf die Ausgaben abseits des Gesundheitssystems kamen Mills et. al in einer epidemiologischen Längsschnittstudie in der schottischen Bevölkerung zu dem Ergebnis, dass die Altersspanne mit der höchsten Inzidenz für die Ausbildung einer Pseudarthrose zwischen dem 30. und 44. Lebensjahr liegt und damit vor allem die berufstätige Bevölkerungsgruppe trifft (107). Dadurch kommt es neben den bereits erhöhten gesundheitsökonomischen Ausgaben auch durch den individuellen Lohnausfall zur Kostensteigerung (64, 107).

Da das Patientenkollektiv ab 60 Jahren jedoch besonders gefährdet ist, Frakturen zu erleiden (108, 109), müssen vor dem Hintergrund einer älter werdenden Gesellschaft und der im Alter reduzierten Heilungskapazität (siehe 6.4.1) die Therapiekonzepte für Frakturen älterer Menschen ausgeweitet werden.

6.4.3 Aktueller Stand bei der Versorgung beeinträchtigter Frakturheilung

Die konservative Therapie nach Ausbildung einer Pseudarthrose besteht in der adäquaten Belastung, um die Frakturzone zu komprimieren und Mikrobewegungen zu schüren (64). Operative Maßnahmen stellen vor dem Hintergrund der unzureichenden Evidenzlage neuer Therapien (siehe 6.4.4) weiterhin den Goldstandard bei der Therapie von Pseudarthrosen dar, mit dem Ziel, die biomechanischen und biologischen Voraussetzungen der Frakturheilung zu optimieren (64). Bei hypertrophen Pseudarthrosen wird die Ruhigstellung mittels stabiler Osteosynthese empfohlen (z.B. Plattenosteosynthese, Fixateur externe), da die Ursache meist in der mechanischen Instabilität begründet ist (5, 6). Bei atrophen Pseudarthrosen soll das radikale Débridement mit Anfrischen der Frakturrenden der Pseudarthrosenregion (diaphysär durch Dekortikation nach Judet) zur Verbesserung der lokalen Durchblutungssituation führen (64, 110). Additiv kann die Transplantation autologer Spongiosa zur Auffüllung des Defektareals atropher Pseudarthrosen erfolgen und als osteoinduktives Verfahren die Frakturheilung neu ankurbeln (5, 6, 111). Die zusätzliche Operation, die verfügbare Menge an Spongiosa-Material und die Morbidität der Patienten bei autologer Transplantation stellen jedoch Ärzte und Patienten immer wieder vor Schwierigkeiten und Belastungen (111-113).

6.4.4 Alternative Ansätze bei der Versorgung beeinträchtigter Frakturheilung

Eine Erweiterung konservativer Maßnahmen sollen niedrig intensivierter gepulster Ultraschall (LIPUS) und hochenergetisch fokussierte extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) als physikalische Verfahren leisten (64). Diese zeigen klinisch in einigen Studien bereits Effekte, kommen jedoch weiterhin erst bei Ausbildung einer Pseudarthrose zum Einsatz und erfordern teils eine hohe Compliance der Patienten (64). Zudem hängt die Indikationsstellung von vielen Fraktur-spezifischen Faktoren ab (114-116).

In anderen Ansätzen wurde und wird versucht, Signalstoffe und Wachstumsfaktoren, die an der Frakturheilung beteiligt sind, therapeutisch zu nutzen, um den Heilungsverlauf positiv zu beeinflussen. Einen dieser neueren Ansätze stellte zur Jahrtausendwende die Applikation von BMPs dar. Diese zeigten zunächst einen positiven Einfluss auf die Knochenheilung in Tierexperimenten (117, 118) und verhiessen anschließend auch in klinischen Studien eine Verbesserung der Heilung

von Frakturen und Pseudarthrosen (vor allen BMP-2 und -7) (119-122). Trotz nachgewiesener osteo-induktiver Effekte wird die Anwendung von BMPs zur Frakturtherapie jedoch momentan nicht weiter vorangetrieben, da – wie Sreekumar et al. in ihrem Review zusammenfassen – hohe Behandlungskosten, bedenkliche Nebenwirkungen und immer noch ernstzunehmende Misserfolgsraten die Therapie begleiten (123). BMP-7 wurde vor diesem Hintergrund 2014 vom Markt genommen, die Anwendung von BMP-2 einer strengeren Indikationsprüfung unterstellt (64, 113).

Auch die Applikation anderer Wachstumsfaktoren wie FGF-2, PDGF und VEGF wird seit mehreren Jahren erforscht (105, 112). FGF-2, das als Mitogen auf Mesenchymzellen wirkt (124), zeigte in grundlagenwissenschaftlichen Studien osteogene und chondrogene Effekte (125-127), konnte in klinischen Studien jedoch bisher nicht überzeugen (15). Da bekannt ist, dass im Rahmen der Knochenheilung aktivierte Thrombozyten durch Sekretion von PDGF die Knochenbildung über Stimulation von Osteoblasten befördern (128, 129), stellt auch thrombozytenreiches Plasma (PRP) einen neuen biologischen Ansatz zur Therapie von Frakturen dar (113). 2017 kamen Roffi et al. jedoch zu dem Schluss, dass die Datenlage bisher nur unzureichend die klinische Anwendung rechtfertigt und PRP noch weiter erprobt werden muss (130). Im Tiermodell wurde ebenfalls die Wirkung von VEGF, das einer der Hauptfaktoren für die Bildung neuer Gefäße im Rahmen der Heilung ist (39), auf eine beeinträchtigte Knochenheilung gezeigt (131, 132). Neue Arbeiten bezüglich des richtigen Applikationszeitpunktes müssen aber noch folgen (113). Von Interesse sind auch Parathormon-Rezeptor-Agonisten, die im Körper den Calciumhaushalt regulieren. Zu ihnen gehören Parathormon (PTH) und PTH-related Protein (PTHrP, ein funktionelles PTH-Analogon), welche den Knochenaufbau bei intermittierender Verabreichung stimulieren (133) und in einigen Tiermodellen Osteogenese und Chondrogenese begünstigten (134, 135). Auch hier fehlen jedoch weitere Studien, bevor die Therapie Einzug in die Klinik hält.

Da die Frakturheilung auch von einer Vielzahl zellulärer Interaktionen abhängt (siehe 6.3.2), ist eine lokale Applikation von pro-osteogen und pro-angiogen wirkenden Zellpopulationen denkbar vielversprechend. Zellen mit ähnlicher Wirkung bzw. Vorläuferzellen der bei der Heilung beteiligten Zellen sind dabei von besonderem Interesse (136). MSCs spielen durch ihr Differenzierungspotential in knochen- und knorpelbildende Zellen und die Ausschüttung von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF-A, b-FGF und IGF-1 (137-139) eine wichtige Rolle während des Regenerationsprozesses. Vor diesem Hintergrund wurden sie als Zellpopulation, die eine beeinträchtigte Heilung positiv beeinflussen könnte, fokussiert (113). In Tierexperimenten konnte ihre Wirkung nachgewiesen werden (140-142), für den humanen Einsatz stehen den positiven Effekten jedoch regulatorische Hürden und zeit- und kostenintensive Kultivierung gegenüber. Außerdem können

ausreichend Zellen nur über Knochenmarksaspiration gewonnen werden, welche eine zusätzliche Intervention auf Patientenseite darstellt (136, 143). Ähnliches gilt für CD34⁺ und CD133⁺ Zellen, die zeitweise ebenfalls vielversprechende Zellpopulationen für die lokale Therapie von verzögerter Knochenheilung darstellten (136, 144-146), da sie in Studien pro-angiogenes (147-149) bzw. CD133⁺ Zellen auch pro-osteogenes (136) Potential zeigten. Beide Zellen sind aber nur in geringen Mengen im peripheren Blut enthalten und wären deshalb aufwendig zu gewinnen (136, 150).

6.5 Zelltherapeutischer Ansatz der vorliegenden Arbeit

6.5.1 PBMCs

Viele der Zellen, die in der Frühphase der Heilung ebenfalls vertreten sind, sind den sogenannten peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) zuzuordnen (17, 151). Als periphere Blutzellen können sie leicht und damit kostengünstig gewonnen werden. Unter ihnen befinden sich Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen), Monozyten, dendritische Zellen (151) und zu einem geringen Anteil auch endotheliale Progenitorzellen (22). Beim Menschen machen Lymphozyten etwa 70-80 %, Monozyten 10-20 % und dendritische Zellen ungefähr 1-2 % der PBMC Population aus (151). Da die PBMCs unterschiedliche Oberflächenmoleküle exprimieren (CD = *cluster of differentiation*), können die einzelnen Zellfraktionen genauer unterschieden werden. So machen CD3⁺ T-Zellen mit 70-85 % den größten Anteil der Lymphozytenpopulation aus, 5-20 % sind NK-Zellen und 5-10% B-Zellen (151).

6.5.2 CD31⁺ Zellen

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass unter den PBMCs unabhängig von Geschlecht und Alter ungefähr 70-78 % der Zellen das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule* oder auch CD31) exprimieren (22). CD31 ist zusammengesetzt aus 6 extrazellulären Immunglobulin-Domänen sowie einer Transmembran- und einer cytoplasmatischen Domäne. Es gehört aufgrund seiner Immunrezeptor-ähnlichen Eigenschaften zur Immunglobulin-Superfamilie (152, 153) und wird von einem breiten Spektrum an Zellen exprimiert: Endothelzellen weisen die höchste Dichte des Moleküls auf, während es Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, T-, B- und NK-Zellen, neutrophile Granulozyten und zirkulierende Thrombozyten weniger stark ausbilden. Nicht nachweisbar ist PECAM-1 auf Fibroblasten, Epithelzellen und Erythrozyten (152, 153). Unter den CD31⁺ PBMCs stellen Monozyten und Lymphozyten (naive T- und B-Zellen) den größten Anteil dar (22).

Seit der Klonierung 1990 (154) wird PECAM-1 als Mitspieler einer ganzen Reihe von physiologischen Prozessen im Körper diskutiert, zu denen neben der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und transendothelialen Leukozytenmigration auch die Angiogenese und negative Regulation von Immunreaktionen zählen (153).

Die hohe Expression von CD31 auf Endothelzellen spiegelt sich in den vielfältigen Funktionen wider, die es in Zusammenhang mit dem Gefäßsystems erfüllt. So werden laterale Zell-Zell-Kontakte benachbarter Endothelzellen durch PECAM-1 mitgebildet (155), über die CD31 gleichzeitig zur Barrierefunktion des Endothels beiträgt (156) und die Migration von Leukozyten ins Gefäßsystem moduliert (157, 158). Bei CD31⁺ T- und B-Zellen handelt es sich vor allem um naive Immunzellen, während in gealterten, aktivierten (Gedächtnis) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und differenzierten B-Zellen das Molekül herunterreguliert wird (159-161). Wilkinson et al. gaben in einem Versuch mit PECAM-1 Knockout-Mäusen Anlass zur Annahme, dass PECAM-1 wesentlicher Regulator der B-Zell-vermittelten Immunantwort ist: Die Abwesenheit von CD31 führte sowohl zu Defekten im Entwicklungsprozess von naiven zu reifen B-Zellen, als auch zu einer überschießenden B-Zell-Antwort bis hin zur Entwicklung von B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen (162). Analog zu den Beobachtungen in B-Zellen scheint die Expression von CD31 auch die über T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort zu dämpfen, indem es deren Antigen-induzierte Immunreaktion herunterreguliert, die Proliferationsrate abschwächt, die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine reduziert und die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signalgebung generell inhibiert (153, 163-165). CD31⁺ T-Zellen könnten darüber hinaus an der Prävention von Autoimmunität beteiligt sein (163). In verschiedenen Mausmodellen mit chronisch inflammatorischen Erkrankungen wurde der grundsätzliche anti-inflammatorische Effekt von CD31⁺ Zellen ebenfalls belegt: PECAM-1 +/+ Mäuse mit Arthritis wiesen einen späteren Krankheitsbeginn mit niedrigerer Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Leukozyteninfiltration in die Gelenke im Vergleich zu PECAM-1 Knockout-Mäusen auf (166, 167).

6.5.3 Vorarbeiten zur CD31⁺ Zelltherapie bei der Frakturheilung

Bei den CD31⁺ Zellen handelt es sich um Zellen, die insbesondere in der Anfangsphase der Frakturheilung im Frakturhämatom akkumulieren (17, 18). In Zusammenschau mit den beschriebenen immunmodulatorischen und pro-angiogenen Eigenschaften stellt die Anreicherung von speziell CD31⁺ PBMCs im Frakturhämatom deshalb einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie einträchtigter Frakturheilung dar, die durch eine prolongierte Inflamationsphase und/oder eine

eingeschränkte Angiogenese bedingt sein kann (18-20, 30, 49-51). In unserer Arbeitsgruppe wurde deshalb die Wirkung der Zellen auf die Knochenheilung genauer untersucht.

Dabei wurden zunächst *in vitro* Versuche durchgeführt, um die Eigenschaften humaner CD31⁺ Zellen genauer zu analysieren. Darin konnte gezeigt werden, dass CD31⁺ Zellen sowohl junger als auch älterer Spender pro-angiogene und osteogene Eigenschaften aufweisen (22). Darüber hinaus wurde ihr anti-inflammatorischer Effekt auf das angeborene und adaptive Immunsystem überprüft: In Ko-Kulturen mit aktivierten Monozyten oder CD8⁺ T-Zellen dämpften die CD31⁺ Zellen deren Immunantwort und führten zu einer signifikant höheren Sekretion anti-inflammatorischer Faktoren (bei Ko-Kultur mit Monozyten) sowie einer niedrigeren Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (bei Ko-Kultur mit T-Zellen) (22).

Anschließend wurden die Befunde in ein klinisch relevantes Rattenmodell für eine biologisch verzögerte Frakturheilung übersetzt (22), welches auch der vorliegenden Arbeit als Grundlage dient. 6 Wochen nach Durchführung einer Osteotomie und Transplantation von entweder der Gesamtheit an PBMCs (Kontrollpopulation) oder der Fraktion CD31⁺PBMCs in den Osteotomiespalt konnte insgesamt eine erhöhte Bildung von Knochengewebe, eine verminderte Bildung von fibrotischem Gewebe und vermehrt Knorpelgewebe im Osteotomiespalt in der CD31 Gruppe nachgewiesen werden (Abbildung 7). Ein Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Gefäßanzahl ließ sich zum 6-Wochen-Zeitpunkt histologisch im Vergleich zur PBMC Gruppe nicht beobachten (22).

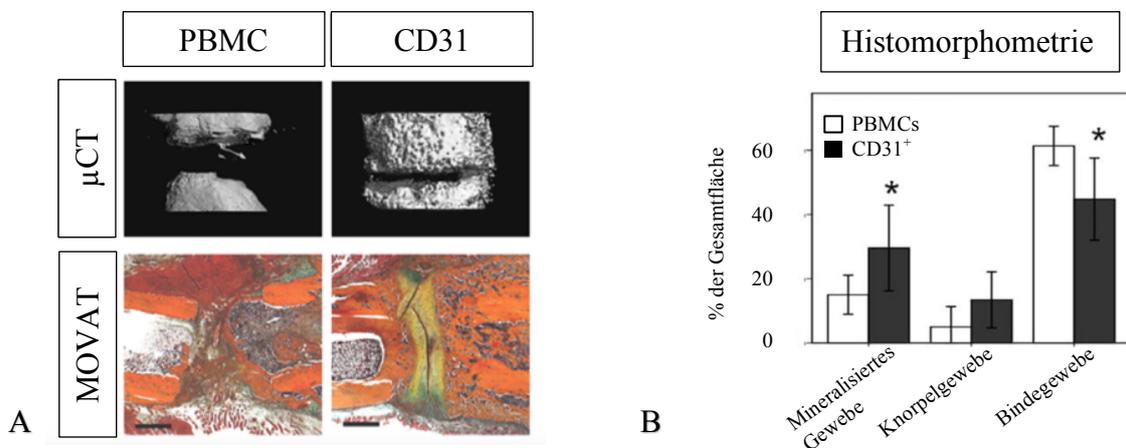


Abbildung 7: Daten aus der Vorarbeit zur CD31⁺ Zelltherapie 6 Wochen nach Osteotomie

A: Mit einem Mikro-CT aufgenommene 3D-Rekonstruktionen der Osteotomieregion 6 Wochen nach Osteotomie (oben) zeigen eine fortgeschrittene Heilung in der CD31 Gruppe (proximales Femurfragment oben, distales unten) analog zu histologischen Movat-Pentachromfärbungen (unten) zum gleichen Zeitpunkt (links proximales, rechts distales Femurfragment). Knochengewebe orange, Knorpelgewebe grün/gelb, fibröses Bindegewebe grau/dunkelgrün **B:** Die histomorphometrische Auswertung 6 Wochen nach Osteotomie ergab in der CD31 Gruppe eine signifikant (*) größere Menge an mineralisiertem Gewebe, eine größere Menge an Knorpelgewebe und eine signifikant geringere Menge an Bindegewebe im Vergleich zur PBMC Population. Abbildungen entnommen und modifiziert aus (100).

Zusätzlich wurden *ex vivo* Protein- und Genexpressionsanalysen 3 und 7 Tage nach Osteotomie durchgeführt (22). Diese Untersuchungen ergaben eine erhöhte Expression einiger pro-angiogener Faktoren, eine niedrigere Expression pro-inflammatorischer Zytokine sowie eine Hochregulation von anti-inflammatorischen Mediatoren in den Hämatomen der CD31 Gruppe gegenüber der PBMC Gruppe (22). Dies spiegelte den pro-angiogenen und immunmodulatorischen Effekt der Zellen auch *in vivo* wider.

Da sowohl eine beeinträchtigte Angiogenese (49-51) als auch eine unbalancierte pro-inflammatorische Immunantwort (18-20, 30) während der Knochenheilung zur Entstehung von Pseudarthrosen führen können, stellt die CD31⁺ Zellapplikation einen vielversprechenden Interventionsansatz dar, um dieser Entwicklung vorzubeugen.

7 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die selektive Anreicherung peripherer CD31⁺ Zellen am Ort des Frakturgeschehens auf die frühen Phasen einer biologisch verzögerten Knochenheilung auswirkt. Aufgrund ihrer in Vorarbeiten postulierten pro-angiogenen und immunmodulatorischen Eigenschaften wurden die Effekte der CD31⁺ Zellapplikation auf Angiogenese und Inflammation beziehungsweise die damit verbundene Gewebedifferenzierung in den frühen Phasen der Knochenregeneration histologisch evaluiert.

In einem bereits etablierten Tiermodell wurde dazu weiblichen, 12 Monate alten Sprague-Dawley Ratten ein artifizielles Hämatom mit entweder der Gesamtheit an PBMCs oder einer angereicherten CD31⁺ Zellpopulation in einen 2 mm breiten Osteotomiespalt transplantiert. Die Tiere wurden 3 und 7 Tage nach Osteotomie euthanasiert, um die frühen Heilungszeitpunkte zu analysieren. An den kryokonservierten Präparaten wurden anschließend histologische Untersuchungen etabliert und durchgeführt. Zu den genannten Zeitpunkten wurden mittels deskriptiver und quantitativer Analysen die Gefäßsituation und die Entwicklung des neu entstehenden Gewebes beurteilt.

Die regenerativen Eigenschaften der peripheren CD31⁺ Zellen sind vielversprechend für die lokale Zelltherapie von biologisch verzögerten Knochenheilungen und können helfen, neue Therapieansätze in diesem Gebiet zu entwickeln. Als intraoperativer Ansatz stellt die Applikation der Zellen eine Therapieform direkt an der Basis des Heilungsprozesses dar, die einer aufwendigen, kosten- und zeitintensiven Nachsorge von Pseudarthrosen vorbeugen könnte. Darüber hinaus kann die Analyse der Funktion der CD31⁺ Zellen bei der Knochenheilung auch von Nutzen sein, um allgemeine Heilungskaskaden zu entschlüsseln und in Zukunft ihren Einsatz auf die Regeneration anderer Gewebe auszuweiten.

8 Methoden

8.1 In vivo Versuchsablauf

8.1.1 Beschreibung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden mit Genehmigung (Antragsnummer: G0181/14) des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin 26 zwölf Monate alte, weibliche Sprague Dawley-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 399,71 g (+/- 59,28 g) herangezogen. Die Tiere wurden in den Laboren der Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland, aufgezogen. Die anschließende Tierhaltung und Versuchsdurchführung fand in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, statt. Bis zu 5 Ratten wurden dabei zunächst in Makrolonkäfigen (Typ IV, Bodenfläche bis zu 1800 cm², Höhe 19 cm) gehalten. Nach erfolgter Operation wurden sie in Zweierkäfige (Typ III, Bodenfläche 810 cm², Höhe 18 cm) versetzt, um die gegenseitige Wundmanipulation zu reduzieren. Die Tiere waren während der gesamten Zeit bei einer Temperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden ausgesetzt. Als Futter dienten trockene Pellets (Ssniff, Soest, Deutschland) Wasser wurde durch eine im Käfig installierte Selbsttränke bereitgestellt. Beides war ad libitum zur Verfügung. Die Käfige wurden wöchentlich, Futter und Wasser täglich erneuert. Sowohl die Tierhaltung, als auch die Tierexperimente fanden den Anforderungen des Tierschutzgesetzes entsprechend statt.

Für dem Versuch wurden gealterte Rattenweibchen herangezogen, die bis zu diesem Zeitpunkt mindestens dreimal geworfen hatten. Wie bereits publiziert (168), zeigen diese Tiere nach Durchführung einer 2 mm breiten Osteotomie im Schaft des linken Femurs nach 6 Wochen keine knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalts, sofern keine zusätzliche Versorgung erfolgt. Damit stellen sie ein geeignetes Modell für eine biologisch verzögerte Knochenheilung dar.

Die Tiere erhielten entweder die Gesamtheit an PBMCs oder die isolierten CD31⁺ PBMCs.

8.1.2 Spendertiere und Tötung von Spendertieren

Die Zellpopulationen, die in den Operationen den eigentlichen Versuchstieren appliziert worden sind, wurden aus Vollblut von Spendertieren isoliert. Diese wurden mittels intraperitonealer Applikation von 0,3 mg/kg Medetomidin (Cepetor®, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) und 60 mg/kg Ketamin (Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland) zunächst in Narkose versetzt, anschließend erfolgte die intrakardiale Blutentnahme. Das hierbei gewonnene Vollblut (ca. 10 – 15

ml Blut pro Tier) wurde in Citratröhrchen (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, U.S.A.; (0,109M gepufferte Na₃-Citrat \pm 3,2%)) für die nachfolgende Zellaufreinigung antikoaguliert, wobei je ungefähr 2,5 ml Spendertier-Blut in der Citratmenge zweier Vacutainer® ungerinnbar gemacht wurden. Danach erfolgte die intrakardiale Gabe von 5 ml 10 %iger Kalium-Chlorid-Lösung (Fresenius-Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) womit die Tötung durch Herzstillstand herbeigeführt wurde.

8.1.3 Zellkultur

8.1.3.1 PBMC Aufreinigung aus Rattenblut

PBMCs wurden aus Citratblut durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Hierzu wurde das Spendertierblut auf eine Histopaque-1083 Lösung (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, U.S.A.) geschichtet. Im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (Beschleunigung: 6, 400 G, keine Bremse, 30 Minuten, Raumtemperatur) wurden die Blutbestandteile aufgrund unterschiedlicher Dichte voneinander getrennt, sodass sich anschließend die PBMC des Blutes (Lymphozyten, Monozyten) als weiße Grenzschicht zwischen Blutplasma und Histopaque sammelten und von den restlichen Blutbestandteilen (Thrombozyten, Erythrozyten und polymorphkernigen Granulozyten) separiert wurden (Abbildung 8).

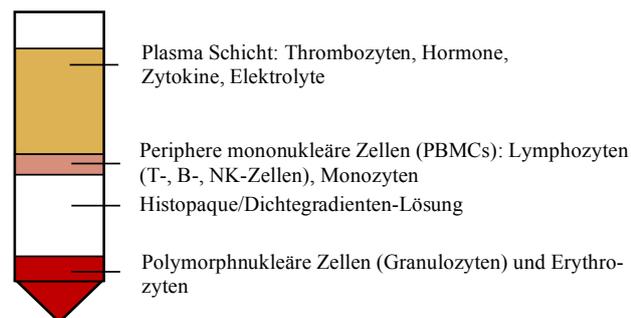


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Isolation von PBMCs

Darstellung der Blutfraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque: Blutbestandteile mit einer Dichte geringer als die des Trennmediums setzen sich nach Zentrifugation im Reagenzglas oberhalb des Mediums ab (Plasma-Schicht und mononukleäre Zellen). Unterhalb der Trennlösung befinden sich Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte aufweisen.

Mit Hilfe einer Transferpipette wurden die PBMCs in ein neues 15 ml Falcon® überführt, mit PBS (Gibcol®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) gespült und durch Zentrifugation pelletiert (Beschleunigung: 9, Geschwindigkeit: 400 G, Bremse: 9, 8 Minuten, Raumtemperatur), die Überstände wurden verworfen. Verbleibende Erythrozyten wurden lysiert. Die Zellsuspension wurde danach mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (7 Minuten, 400 G), um entstandene Erythrozytenfragmente auszuwaschen. Überstände wurden abgenommen.

Die Zellzahl wurde durch automatisierte Zählung mithilfe des Countess® Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). Avitale Zellen wurden mit Trypanblau (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) angefärbt und bei der Zählung nicht berücksichtigt.

Die isolierten PBMCs wurden entweder appliziert oder zur weiteren Isolation der CD31⁺ Zellen genutzt. Für die direkte Applikation wurden jeweils 2×10^5 Zellen aliquotiert, zentrifugiert (400 G, 8 Minuten, Raumtemperatur), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 20 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur Transplantation am selben Tag bei 4 °C gelagert.

8.1.3.2 CD31⁺ Aufreinigung aus Rattenblut

Die CD31⁺ Zellen wurden mittels positiver magnetischer Zellseparation mit dem MACSQuant® (magnetic activated cell sorting, MACS; Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) aus PBMCs isoliert (Abbildung 9). Durch ein magnetisches Feld werden beim Durchfließen einer MACS®-Säule (Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) nur solche Zellen zurückgehalten, die zuvor mit magnetischen Partikeln (sogenannten MicroBeads) gekoppelt worden sind.

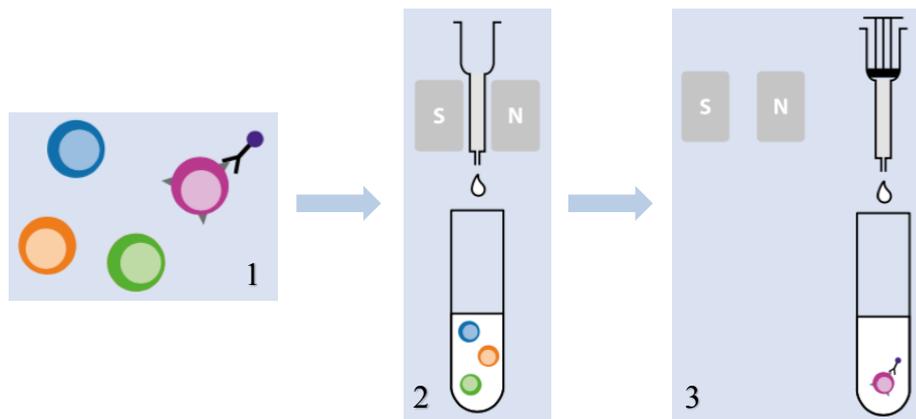


Abbildung 9: Schematische Darstellung der MACS Technik

1: Magnetische Markierung: Zellen, die isoliert werden sollen, werden mit magnetischen MACS MicroBeads gekoppelt. **2: Magnetische Separation:** Zellen werden in einer MACS Säule, die von einem magnetischen Feld umgeben ist (S (Südpol), N (Nordpol) = MACS Separator), getrennt. Die Zellen, die nicht magnetisch gekoppelt sind, fließen durch die Säule hindurch und werden als negativ Fraktion bezeichnet. **3: Auswaschung der markierten Zellen:** Nachdem das magnetische Feld um die Säule entfernt wurde, können die zurückgebliebenen Zellen als angereicherte, positiv selektierte Fraktion aus der Säule ausgewaschen werden. Abbildungen entnommen und modifiziert aus (169).

Die Isolation von PBMCs aus Vollblut von Spendertieren erfolgte entsprechend der vorigen Darstellung. Nach erfolgter Zellzählung wurden je 1×10^7 PBMC mit 500 µl Färbelösung (10 µl CD31-FITC-Antikörper (anti-CD31 Ratte: Klon TLD-3A12, FITC gekoppelt; AbD Serotec, Biobrad, Hercules, Californien, U.S.A.) + 1 %iges BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma-Aldrich Co.

LLC, St. Louis, MO, U.S.A.) in DPBS für 15 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurden die Proben mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (7 Minuten, 400 G, RT), Überstände wurden anschließend entfernt. Für die Kopplung der CD31⁺ Zellen an magnetische Partikel, wurde pro 1×10^7 PBMC je eine Lösung aus 300 μ l MACS Puffer (PBS+EDTA), 90 μ l 1 %igem BSA-Blocking Serum und 10 μ l Anti-FITC-MicroBeads (Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) angesetzt. Darin wurden die PBMCs resuspendiert und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, um die Bindung der MicroBeads an den FITC-Antikörper sicherzustellen. Die Zugabe von Blocking-Serum verhinderte die Bindung von MicroBeads an unspezifische FC-Rezeptoren. Nach Inkubation wurde die Zellsuspension mit MACS-Puffer aufgefüllt zentrifugiert (400 G, 7 Minuten,), um ungebundene MicroBeads auszuwaschen. Anschließend wurde die Suspension in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und in eine zuvor mit MACS-Puffer equilibrierte MACS-Säule (Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) übertragen, die von einem magnetischen Feld umschlossen war. Es wurde eine CD31-positiv-Selektion nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Analog des Vorgehens bei der PBMC Aufreinigung, wurden anschließend die Zellzahlen automatisch bestimmt und die Zielzellmenge von 2×10^5 CD31⁺ Zellen aliquotiert.

8.1.4 Operation

8.1.4.1 Fixateur Externe

Der im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete unilaterale Fixateur Externe ist ein individuell angefertigtes Fixateursystem, das von Strube et al. etabliert wurde (170) (Abbildung 10). Es besteht aus vier Titan-Kirschnerdrähten (10 cm, Durchmesser 1,23 mm) mit je einem 10 mm langen Gewinde auf einer Seite, einer Verbindungsschiene aus rostfreiem Stahl (22 mm lang, 5 mm hoch, 1,6 mm dick) und vier Titanklammern (2 obere Teile, 8 mm lang, 5 mm hoch, 3,5 mm dick und 2 untere Teile, 8 mm lang, 5 mm hoch, 2 mm dick). Die Klammern bilden Furchen mit einem Durchmesser von 2,2 mm für die Kirschnerdrähte, die hierin geführt werden. Sie werden mit Senkschrauben und gegenüberliegenden Muttern befestigt. Eine Verdickung von 3,1 mm über eine Distanz von 14 mm in der Mitte der Fixateurschiene stabilisiert diese zusätzlich. Das gesamte System wiegt 6,216 g. Bei der folgenden Ausführung (so auch bei der Beschreibung des operativen Vorgehens) werden die Kirschnerdrähte von proximal nach distal nun mit den Buchstaben A-D gekennzeichnet. Der Abstand zwischen Kirschnerdrähten A und B und C und D beträgt je 4 mm, der Abstand zwischen den Kirschnerdrähten B und C dagegen 10 mm, damit dort ausreichend Raum für die Durchführung einer Osteotomie zur Verfügung steht. Indem die Kirschnerdrähte bicortical

in das Femur verschraubt wurden, konnte die winkelstabile Befestigung des Fixateurs sichergestellt werden. Durch Zuhilfenahme eines Plastikblocks mit einer Höhe von 7,5 mm, der kurzzeitig zwischen Femur und noch zu befestigender Fixateurschiene platziert wurde, konnte die Fixierung der Schiene auf einer einheitlichen Höhe bei allen Versuchstieren sichergestellt werden. Eine Sägevorlage mit einem vorgefertigten Spalt von 2 mm diente der Reproduzierbarkeit der durchgeführten Osteotomien.

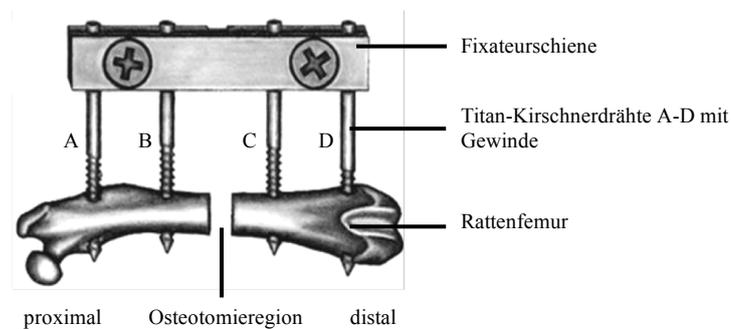


Abbildung 10: schematische Darstellung des Fixateur Externe

Entnommen und modifiziert aus (171).

8.1.4.2 Herstellung des artifiziellen Hämatoms für die lokale Administration *in vivo*

PBMCs und CD31⁺ Zellen wurden wie beschrieben isoliert. 2×10^5 Zellen von entweder PBMCs oder CD31⁺ Zellen wurden in 160 μ l Eigenblut resuspendiert, das kurz vor Operationsbeginn aus der rechten V. saphena magna des jeweiligen Versuchstiers gewonnen wurde, und mit Citrat anti-koagulierte. Unmittelbar vor der intraoperativen Transplantation wurde die Gerinnung mit einer CaCl₂ (12%)/Thrombin-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, U.S.A.) initiiert. Dabei diente der Deckel eines 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßes als Form für das artifizielle Hämatom. Nach Aushärtung wurde dieses in den Osteotomiespalt eingebracht.

8.1.4.3 Operatives Vorgehen

Nach präoperativer Beurteilung des Gesundheitszustands erfolgte die gewichtsadaptierte, intraperitoneale Injektionsnarkose mit 0,3 mg/kg Medetomidin (Cepetor®, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) und 60 mg/kg Ketamin (Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland). Mit Bepanthen®-Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) wurde einer Austrocknung der Kornea vorgebeugt. Über wasserdichte Farbmarkierungen am Schwanz erfolgte die fortlaufende Nummerierung der Versuchstiere (Kreis = eine Ziffer, Strich = 5). Prophylaktisch erfolgte anschließend die Applikation von 45 mg/kg Clindamycin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) subkutan in den Nackenbereich. Das Fell der Tiere wurde im Operationsfeld großzügig trocken abrasiert und mit Desinfektionsspray eingesprüht.

Die Operation wurde mit einer längsverlaufenden lateralen Inzision der Haut über dem zu operierenden Femur begonnen. Anschließend wurde die darunter liegende Faszie zwischen Quadriceps und ischiocruraler Muskulatur stumpf disseziert. Um zu verhindern, dass sich während der Operation umliegendes Weichteilgewebe ins Operationsfeld vorschob, wurden stumpfe Wundhaken verwendet, die das Gewebe zurückhielten. Um folgend den Fixateur Externe montieren zu können, wurden Löcher mit einem elektrischen Bohrer in das Femur gebohrt. Um die Kirschnerdrähte bei jeder Operation möglichst an gleicher Stelle im Femur der Ratten zu positionieren, wurden die Bohrlöcher mit Hilfe einer Bohr-Schablone erstellt, anhand derer vier Bohrungen in Reihe entlang des Femurs „geführt“ vorgenommen werden konnten. Dabei wurde das erste Loch senkrecht zur lateralen Femurseite im Bereich der distalen Diaphyse (monokortikal) gebohrt und der erste Kirschnerdraht (KD D) mittels Handbohrer an dieser Stelle bicortical in den Femur eingeschraubt (ebenfalls senkrecht). Nachfolgend wurde anhand der Schablone (bicortical) das am weitesten proximal liegende Loch in den Femur gebohrt, in welches anschließend Kirschnerdraht A eingeschraubt wurde. Die beiden mittleren Bohrungen für Kirschnerdrähte B und C wurde analog anhand der Schablone ausgeführt, welche anschließend durch die Schiene des Fixateurs ersetzt wurde. Letzterer wurde mit Schrauben an den Kirschnerdrähten befestigt. Die überstehenden Enden der Kirschnerdrähte wurden mit einer Zange auf die Höhe der Fixateurschiene gekürzt, die etwa 7,5 mm über dem Femur lag. Hiermit war die Befestigung des Fixateurs abgeschlossen. Es folgte die Osteotomie, bei der mit einem 0,3 mm breiten Sägemesser und einer standardisierten Sägeschablone ein Osteotomiespalt von 2 mm Breite zwischen den beiden mittleren Kirschnerdrähten geschaffen wurde. Das dabei entstehende Knochenfragment wurde mit einer Pinzette entfernt. Anschließend wurde das artifizielle Hämatom, das entweder die angereicherten CD31⁺ Zellen oder PBMCs enthielt, in den Osteotomiespalt transplantiert. Hiernach wurde die Muskelfaszie mit einem 3.0 resorbierbaren Faden und die darüber liegende Haut mit einem 3.0 nicht-resorbierbaren Faden verschlossen.

Mit der Gabe von 1,5 mg/kg Atipamezolhydrochlorid (Revertor®, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) wurde die Anästhesie antagonisiert und ausgeleitet. Im Käfig wurden die Tiere mit einer Wärme-spendenden Rotlichtlampe bestrahlt, bis sie wieder wach und bewegungsfähig waren. Die Ratten konnten das operierte Bein nach der Operation sofort voll belasten, zur Schmerzlinderung befand sich post operativ für 3 Tage Tramadolhydrochlorid (0,5-1 mg/ml) (Tramal®, Grünenthal, Aachen, Deutschland) im Trinkwasser der Tiere, die engmaschig auf Zeichen von Schmerzen oder anderen Beschwerden kontrolliert wurden.

8.1.4.4 Tötung der Versuchstiere und Entnahme des Untersuchungsmaterials

Die Versuchstiere wurden 3 oder 7 Tage nach erfolgter Operation euthanasiert. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte analog zur Tötung der Spendertiere. Eine Übersicht gibt die Einteilung der Versuchsgruppen (Tabelle 1). Im Anschluss an die Euthanasie wurde bei den Versuchstieren das linke Femur von Hüfte und Knie freipräpariert und einschließlich des Fixateurs entnommen. Mit besonderer Rücksicht auf den Osteotomiespalt und das Periost wurde vorhandenes Weichteilgewebe ebenfalls abpräpariert. Sowohl am proximalen als auch am distalen Ende wurde das Femur mit einer Knochenzange inzidiert, um eine optimale Aufnahme der 4% igen Paraformaldehyd (PFA)-Fixierlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) sicherzustellen, in die es anschließend gegeben wurde.

Von 26 Ratten, die zu Beginn in den Versuch eingeschlossen wurden, mussten 2 Tiere außerplanmäßig getötet werden, da es intraoperativ im Zuge der Osteotomie zu Knochensplittierungen kam, die die Analyse verfälscht hätten. 24 osteotomierte Tiere sind in den weiteren Versuch mit eingegangen. An den 3 Tages Tieren wurde keine histomorphometrische Auswertung durchgeführt, da sich an Tag 3 in vielen Schnitten der PBMC Gruppe kein Gewebe mehr in der ROI befand, dessen Flächeninhalte mit der CD31 Gruppe hätte verglichen werden können. Da bei Evaluation der Gefäßanzahl jedoch das Knochenmark mitbeurteilt wurde, wurden die α -SMA Färbungen auch an diesen Tieren ausgewertet. Aus der 7 Tages Population wurden Tiere ausgeschlossen, bei denen die Femurfragmente massiv gegeneinander verstellt und voneinander entfernt lagen.

Tabelle 1: Überblick über die Anzahl und Verwendung der Versuchstiere

Euthanasie-Zeitpunkt		Tag 3		Tag 7		Gesamt
		PBMC	CD31	PBMC	CD31	
Versuchsgruppe		PBMC	CD31	PBMC	CD31	
Anzahl erfolgreich operierter Versuchstiere		6	7	6	5	24
Anzahl deskriptiv ausgewerteter Versuchstiere (α -SMA und Movat-Pentachrom)		6	7	5	4	22
Anzahl histomorphometrisch ausgewerteter Versuchstiere	Movat-Pentachrom	0	0	5	4	9
	α -SMA	6	7	5	4	22

8.2 Histologie

Da die natürliche Struktur für die histologischen Untersuchungen des Kallus so gut wie möglich erhalten bleiben sollte, wurde als Grundlage die Kryokonservierung der Proben gewählt.

8.2.1 Histologische Aufarbeitung

8.2.1.1 Fixierung und aufsteigende Zuckerlösungen

Die Femora wurden nach Entnahme 24 Stunden bei 4 °C in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Anschließend wurden sie für je 24 Stunden bei 4 °C in 10 %iger, 20 %iger und zuletzt 30 %iger Glukoselösung gelagert. Alle Glukoselösungen wurden reinem H₂O (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) angesetzt worden.

8.2.1.2 Kryo-Einbettung nach der Kawamoto-Methode

Die Einbettung erfolgte entsprechend der Kawamoto-Methode in Kryomedium (172). Vorbereitend wurde ein Dewar-Transportgefäß (VWR International, Radnor, Pennsylvania, U.S.A.) mit Aceton (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, U.S.A.) und einigen Stücken Trockeneis (Charité, Berlin, Deutschland) befüllt und ein 600 ml Becherglas (Duran®, klar, VWR International, Radnor, Pennsylvania, U.S.A.) darauf platziert und mit N-Hexan (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) befüllt. Die Proben wurden luftblasenfrei in SCEM-Medium (Section-Lab Co, Ltd., Hiroshima, Japan) eingebettet und mit der Einbettungsform so lange in N-Hexan gehalten, bis das Medium gefroren war (erkennbar an dessen Weißfärbung). Nach kurzem Antauen wurde der Kryoblock aus der Einbettungsform herausgelöst, auf Trockeneis zwischengelagert und anschließend bei -80 °C eingefroren.

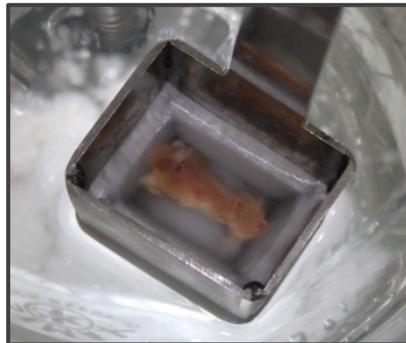


Abbildung 11: Kryoeinbettung nach Kawamoto

Probe (hier Mäusefemur) im SCEM Medium wird durch Eintauchen in N-Hexan gefroren. Aus (173).

8.2.1.3 Anfertigen von Kryoschnitten

Alle Kryoschnitte wurden mit dem Lyca CM 3050 S Kryostat (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) bei einer Kryostattemperatur von -24 °C bis -25 °C angefertigt. Der Präparatblock wurde mittels Tissue-Tek® Medium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland) an der Objekthalterung fixiert. Um parallel zur Faserrichtung des Knochens zu schneiden, wurde dieser senkrecht zum Messer

(FEATHER® Microtome Blade N35HR, pfm medical ag, Köln, Deutschland) eingespannt (Abbildung 12). War der Präparatblock bis auf Höhe der ROI getrimmt, wurde ein einseitig selbstklebender Kryofilm (Cryofilm Type 2C (9), Section-Lab Co, Ltd., Hiroshima, Japan) mit der adhäsiven Seite auf das Präparat aufgebracht und folgend Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt. Anschließend wurde der Film mit dem ihm anhaftenden Präparatschnitt auf einen Objektträger (Silane beschichteter Objektträger, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgebracht. Nachdem die Schnitte auf der Folie 60 Minuten getrocknet waren, wurden sie an den Seiten mit Tesafilm® (Tesa®, Norderstedt, Deutschland) auf dem Objektglas fixiert. Die Objektträger wurden bei -80 °C im Kühlschrank bis zur Färbung gelagert.

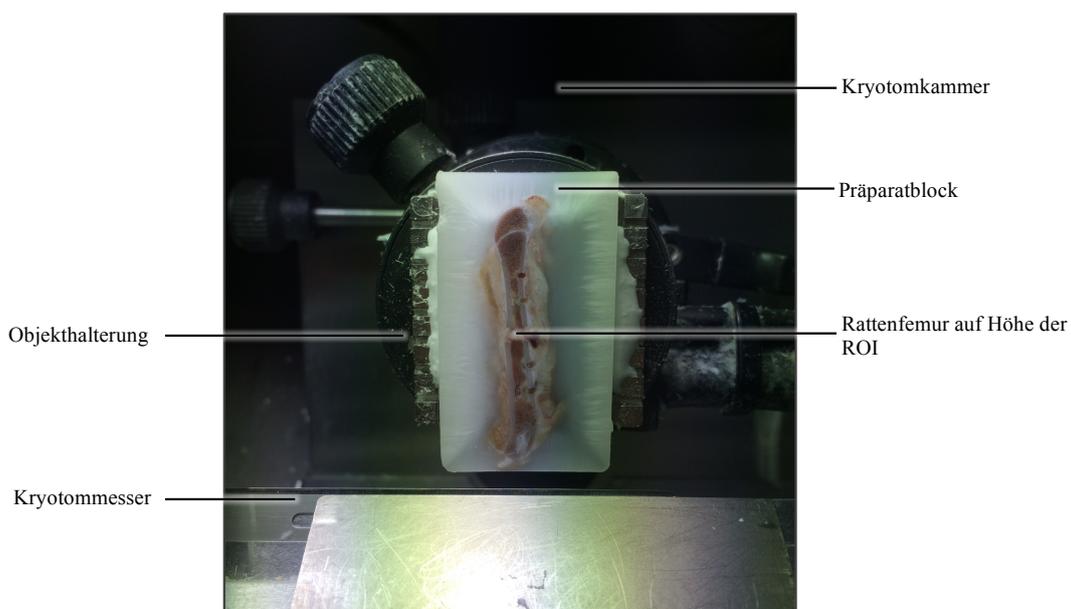


Abbildung 12: Fotografie des Kryostats mit eingespanntem Präparat

Dargestellt ist ein bis zur Osteotomie-region getrimmtes Kryo-Präparat

8.2.2 Histologische Färbungen

8.2.2.1 Movat-Pentachromfärbung

Mit der Movat-Pentachromfärbung gelingt es, innerhalb eines Schnittpräparates alle Komponenten des Binde- und Stützgewebes nebeneinander anzufärben (174). Zur Färbung werden Alcianblau, Weigerts Eisenhämatoxilin, Brilliant Crocein-Säurefuchsin und Safran du Gâtinais verwendet, als Beizmittel Phosphorwolframsäure. Glykosaminoglykane und Muzine (saure Glykoproteine) werden durch Alcianblau angefärbt. Alkalischer Ethanol dient anschließend zur Umwandlung von Alcianblau in ein wasserunlösliches blaugrünes Pigment, welches sich an Schwermetallionen sulfatierter Glykosaminoglykane ablagert. Die Zellkerne werden mit Weigerts Eisenhämatoxilin gefärbt, das Zytoplasma durch Brilliant-Crocein-Säurefuchsin. Safran du Gâtinais sorgt in einem letzten Färbeschritt für die Anfärbung des kollagenen Bindegewebes (174).

Vor Beginn der Färbung wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Hiernach wurden sie 15 Minuten mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und anschließend 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte 3 Minuten in 3 %ige Essigsäure (pH 2,5; Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht.

Im ersten Färbeschritt wurde 30 Minuten mit 1 %igem Alcianblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, U.S.A.) in 3 %iger Essigsäure gefärbt. Durch Eintauchen in 3 %ige Essigsäure und folgend Aquadest, wurden die Schnitte gespült. Hiernach wurden sie 60 Minuten in alkalischen Ethylalkohol (90 ml 96 % Ethanol mit 10 ml NH₃) gestellt, bevor sie mit Leitungswasser gespült und anschließend für 10 Minuten darin belassen wurden. Die Proben wurden in Aquadest ausgespült, bevor sie 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Weigerts Eisenhämatoxilin (Chroma Waldeck, Münster, Deutschland) angefärbt wurden. Danach wurden die Präparate einmal in Aquadest eingetaucht und mit Leitungswasser gespült und 15 Minuten darin belassen. Mit Brilliant Crocein-Säurefuchsin (Chroma Waldeck, Münster, Deutschland) wurde im nächsten Färbeschritt das Zytoplasma angefärbt (10-15 Minuten). Danach wurden die Proben langsam in 0,5 %ige Essigsäure eingetaucht, bevor sie 20 Minuten mit Phosphorwolframsäure (5 %ig; Chroma Waldeck, Münster, Deutschland) gebeizt wurden. Unter leichter Auf- und Abbewegung, wurden die Schnitte danach für 1-2 Minuten in 0,5 %ige Essigsäure getaucht. Für je 5 Minuten wurden sie anschließend 3-mal hintereinander in 100 %igem Ethylalkohol (Herbeta, Berlin, Deutschland) platziert. Nun wurden die Schnitte für 60 Minuten mit Safron du Gâtinais (Chroma Waldeck, Münster, Deutschland) gefärbt, bevor sie erneut in 3 verschiedene Küvetten mit 100 %igem Ethylakohol getaucht wurden (jeweils 2 Minuten). In einem letzten Schritt wurden die Präparate für 2-mal 5 Minuten in Xylol (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, U.S.A.) gegeben. Mit Vitro-Clud® (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) wurden die Schnitte anschließend eingedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter der Abzugshaube belassen.

Die Färbung führt normalerweise zu folgendem Färbeergebnis: Mineralisierter Knochen erscheint gelb, Kollagenfasern ebenfalls. Mineralisierter Knorpel färbt sich grün-gelblich an, nicht mineralisiertes Knorpelgewebe grün. Osteoid zeigt sich dunkelrot, elastische Fasern rot. Während sich Zellkerne blauschwarz darstellen, wird das Zytoplasma rötlich. Saure Glykosaminoglykane erscheinen leuchtend hellblau. Zu beachten ist, dass durch die Anfertigung von Kryoschnitten die Anfärbung der Gewebekomponenten im Vergleich zur Paraffinfärbung weniger intensiv und teilweise abweichend ausfällt (Abbildung 13).

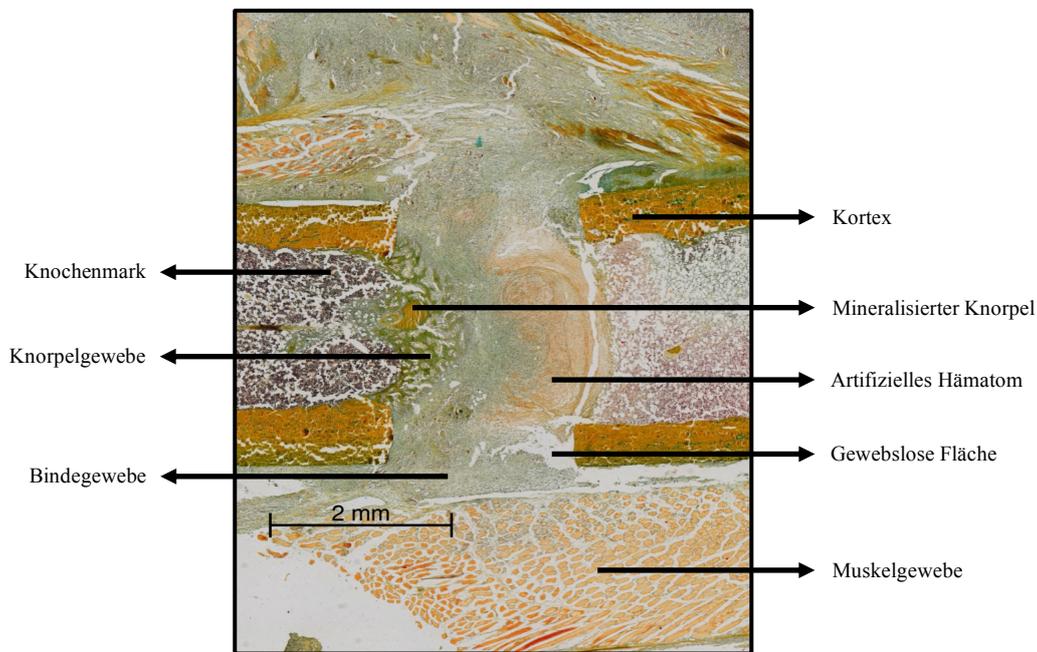


Abbildung 13: Exemplarische Movat-Pentachromfärbung

Beispielpräparat aus der CD31 Gruppe 7 Tage nach Osteotomie: **Farblegende:** gelb: mineralisiertes Gewebe, grün: Knorpelgewebe, grau-bläulich: Bindegewebe, rot-braun: artifizielles Hämatom/Muskelgewebe, rot-violett: Knochenmark

8.2.2.2 Immunhistochemische α -SMA Gefäßfärbung

8.2.2.2.1 Prinzipien der α -SMA Gefäßfärbung

Die in der Arbeit angewandte Gefäßfärbung basiert auf dem Prinzip der Immunhistochemie. Dabei wird in einem ersten Schritt ein zu markierendes Antigen mittels eines Primärantikörpers gebunden. Bei der etablierten alpha smooth muscle Actin (α -SMA) Färbung, stellt α -SMA das Zielantigen dar. In einem zweiten Schritt wird ein mit Biotin gekoppelter Sekundärantikörper appliziert, der den Primärantikörper bindet. Das Avidin eines anschließend beigefügten Avidin-Biotin-Enzymkomplex (hier war das assoziierte Enzym die alkalische Phosphatase, AP) bindet hochaffin das Biotin des Sekundärantikörpers. Nach Zugabe einer AP-Substrat-Chromogenpuffer-Lösung katalysiert die im Komplex gebundene alkalische Phosphatase das Substrat zu einem Produkt, das nach Verbindung mit dem Chromogen zum sichtbaren Farbausschlag führt. Die Gefäße erscheinen auf diese Weise pinkfarben (Abbildung 14).

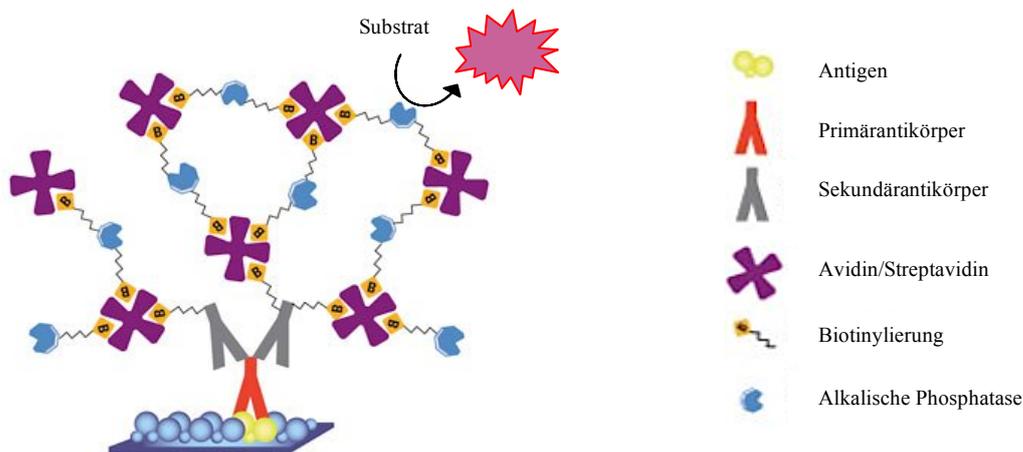


Abbildung 14: Schematische Darstellung der immunhistochemischen α -SMA Färbung

Nach Kopplung des Antigens durch einen Primärantikörper wird ein Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper hinzugefügt, der den Primärantikörper bindet. An das Biotin des Sekundärantikörpers bindet das Avidin des anschließend zugefügten AB-Komplexes, in dem die alkalische Phosphatase enthalten ist. Nach Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung katalysiert die alkalische Phosphatase das AP-Substrat und führt durch das enthaltene Chromogen zum sichtbaren Farbausschlag. Abbildung modifiziert aus (175).

8.2.2.2.2 Allgemeiner Ablauf der Immunhistochemie

Die Beschreibung des Färbeverfahrens folgt samt durchgeführter Modifikationsschritte, die im Rahmen der Etablierung der α -SMA Färbung vorgenommen wurden. Einen Überblick gibt Abbildung 15. Eine Zusammenfassung des etablierten Verfahrens folgt am Ende dieses Kapitels.

Nachdem die Schnitte 40 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet worden waren, folgte gegebenenfalls die Fixierung mit 4 %igem Paraformaldehyd für 15 Minuten. Die Proben wurden danach 2-mal für je 5 Minuten in mit Aquadest verdünnter Phosphatpuffer Salzlösung (PBS:dH₂O = 1:10) gespült. Im Rahmen des Etablierungsprozesses wurden einige Proben nun autoklaviert. Dazu wurden die Schnitte in Na-Citratpuffer (10 mM, pH 6, aus Zitronensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Natriumzitat (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, U.S.A.) gegeben und nachfolgend 2 Minuten im Wasserbad im Dampfdruckkochtopf erhitzt und anschließend in PBS gespült. Je nach Etablierungsversuch folgte die Inkubation mit 2 %igem oder 5 %igem Normalseerum (Wirtsspezies Pferd; Vector® Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) in 2 %iger BSA in PBS (Chroma Waldeck, Münster, Deutschland) Lösung (30 Minuten in der feuchten Kammer (individuell angefertigt) bei Raumtemperatur). Sollte zusätzlich endogenes Biotin geblockt werden, erfolgte hierbei gleichzeitig die Zugabe von Streptavidin (Streptavidin/Biotin Blocking Kit, Vector® Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.; 4 Tropfen/ml Blocking-Lösung). Die Proben wurden anschließend bei 4 °C über Nacht in der feuchten Kammer mit dem Primärantikörper inkubiert (α -SMA Anti-Ratte Primärantikörper, Dako, Hamburg, Deutschland). Bei der Etablierung wurden

unterschiedliche Verdünnungen (1:100, 1:200, 1:400) der Antikörper im Verdünnungsmedium (Dako Antikörperdiluent, Dako, Hamburg, Deutschland) angesetzt. Wurde zuvor der endogene Biotin-Block gewählt, wurden an dieser Stelle nun 4 Tropfen pro Milliliter Antikörperlösung Biotin (Streptavidin/Biotin Blocking Kit, Vector® Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) hinzugegeben. Bevor der Sekundärantikörper appliziert und die Proben für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur gelagert wurden, wurden die Schnitte gewaschen (2-mal 5 Minuten in mit Aquadest verdünntem PBS; PBS:Aquadest = 1:10). Die Lösung des Sekundärantikörpers setzte sich aus 2 % biotinyliertem Sekundärantikörper (Biotin-gekoppelter Anti-Maus Sekundärantikörper, Vector® Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A) und 2% Normalserum der Wirtsspezies Pferd in 2 % BSA/PBS zusammen. Anschließend wurde in der 1:10 verdünnten PBS/Aquadest Lösung gespült. Die Proben wurden dann für 50 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC Vectastain® ABC-AP Staining Kit (Alkaline Phosphatase, Standard), Vector® Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubiert (1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 5 ml PBS). Bevor für 2-mal 5 Minuten bei Raumtemperatur der Chromogenpuffer (3,69 g HCLT, 0,54 g TRIS (beides Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, U.S.A.), 2,63 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit destilliertem Wasser bis 300 ml auffüllen, pH 8,2) auf die Schnitte pipettiert wurde, wurden sie wiederholt 2-mal 5 Minuten in mit Aquadest verdünntem PBS gespült. Nach Zugabe des AP-Substrats (Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate, Vector® Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit je 2 Tropfen aus Lösung A, B, C (in dieser Reihenfolge) in 5 ml Chromogenpuffer, wurden die Schnitte für 10-20 Minuten in der feuchten Kammer im Dunkeln gelagert. Bei der Verwendung von Levamisol (Levamisol Lösung, Vector® Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) im Rahmen der Etablierungsprozesse, wurde dieses vor Zugabe des AP-Substrates zum Chromogenpuffer hinzugegeben.

Die Entwicklung der Färbungen erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Bei sichtbar werdenden Gefäßen wurde der Färbeprozess durch Spülen in PBS (1:10 mit Aquadest verdünnt, 2 mal 5 Minuten) und Aquadest (einmalig 2 Min.) abgestoppt. Sobald die Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 90 Sekunden abgeschlossen war, wurden die Schnitte in eine mit Leitungswasser gefüllte Küvette gestellt. Bevor sie für 5 Minuten darin stehen gelassen wurden, wurde das Wasser so oft erneuert, bis es sich nicht mehr verfärbte. Hier-nach erfolgte ein kurzes Ausspülen in Aquadest, anschließend wurden die Schnitte mittels Aquatex® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt und für die nächsten 24 Stunden unter einem Abzug gelagert.

8.2.2.2.3 Etabliertes Verfahren

Im etablierten Protokoll wurden die Präparate vor der Färbung mit 4 %igem PFA fixiert und mit 5 %igem Normalserum inkubiert. Als Primärantikörper wurde der gegen α -SMA gerichtete Antikörper verwendet. Das beste Färbeergebnis ergab eine Verdünnung des Antikörpers von 1:100 mit dem Antikörperdiluente. Zusätzlich kam an den entsprechenden Stellen im Protokoll (Abbildung 15) ein endogener Biotin-Block mittels Blocking-Kit zum Einsatz. Die in dem Ergebnisteil besprochenen α -SMA Färbungen sind alle nach diesem Ansatz gefärbt worden (siehe Abbildung 18: Etablierte α -SMA Gefäßfärbung (D) im Vergleich zu anderen Färbeprotokollen, Seite 54). Das etablierte Verfahren wird in Abgrenzung zu den alternativen Färbeprotokollen in Abschnitt „Diskussion der unterschiedlichen Färbeansätze“ diskutiert.

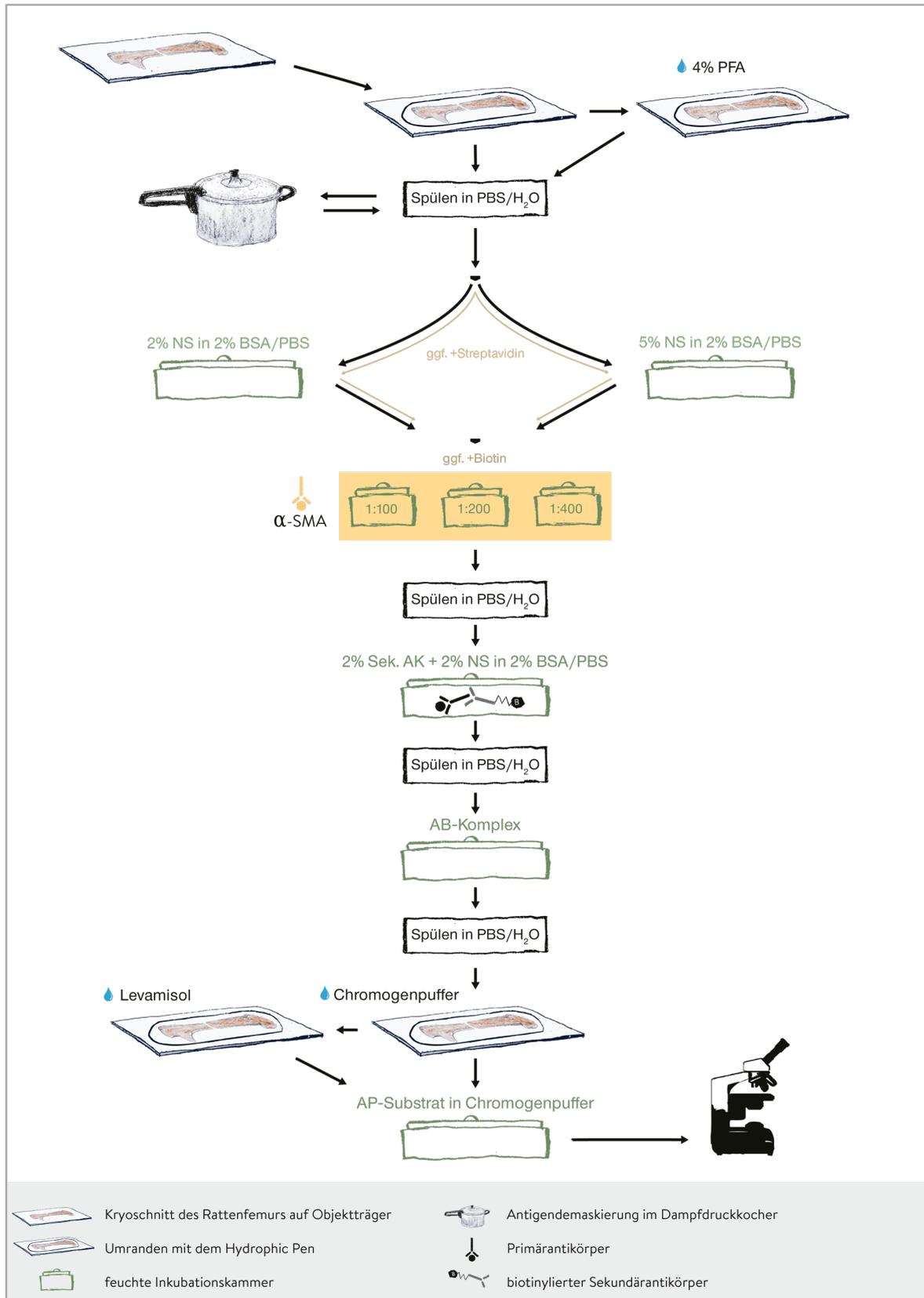


Abbildung 15: Protokoll α -SMA Färbung mit optionalen Modifikationsschritten

Details siehe allgemeiner Ablauf der Immunhistochemie. Abbildung von A.Rose/M.Himburg

8.3 Definition der Region von Interesse

Alle Fotos von Präparaten dieser Arbeit wurden so dargestellt, dass das proximale Femurfragment auf der vom Betrachter aus linken Seite und das distale Fragment rechts zu sehen ist. Da die Rattenfemora longitudinal geschnitten wurden, ergab sich in den Abbildungen je ein Längsbild eines Rattenfemurs, in dessen Mitte der Osteotomiespalt liegt. Sowohl die deskriptive, als auch die quantitative Analyse beziehen sich immer auf einen bestimmten Bereich des Femurs, der als *region of interest* (ROI, Region von Interesse) bezeichnet wurde. Dies erlaubte die einheitliche Betrachtung der dort ablaufenden Heilungsprozesse.

Bei den Movat-Pentachromfärbungen schloss die ROI den Osteotomiespalt von 2 mm sowie die an diesen angrenzenden proximalen und distalen Femurfragmente bis zu 1 mm Abstand mit ein, da in Vorstudien zu späteren Heilungszeitpunkten die Entstehung von neuem Gewebe auch über die Kortexkanten hinaus beobachtet werden konnte und dies mit berücksichtigt werden sollte.

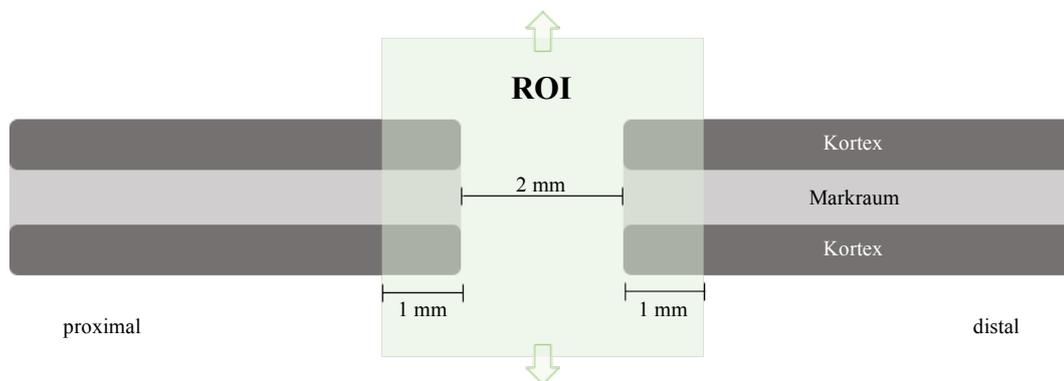


Abbildung 16: Schematische Darstellung der ROI für die Evaluation der Movat-Pentachromfärbungen

Die dunkelgrauen Balken stellen die Kortizes dar, dazwischen liegt das Knochenmark (hellgrau). Dargestellt sind proximales und distales Femurfragment, die jeweils an den in der Mitte liegenden, 2 mm breiten Osteotomiespalt grenzen.

Bei den α -SMA Färbungen wurde in einem ersten Zählschritt die Gefäße in einer fest definierten ROI gezählt (ROI 1). Dabei wurde der Bereich so gewählt, dass ausgehend von den an den Osteotomiespalt angrenzenden Kortexenden eine Strecke von je 0,5 mm jeweils Richtung proximal bzw. distal gezogen wurde. Von dort ausgehend, wurde je eine senkrecht auf dieser Linie stehende, 0,5 mm lange Strecke gemessen und die Endpunkte verbunden, sodass ein Rechteck entstand, das den Bereich definierte, in dem alle vollständig eingeschlossenen Gefäße gezählt wurden (Abbildung 17 A). Da dieser Bereich oftmals auch Muskelgewebe einschloss, das von vielen Gefäßen begleitet wurde, wurde in einem weiteren Zählungsschritt die Region angepasst, um möglichst nur im Rahmen der Heilung neu entstandene Gefäße zu berücksichtigen. Dabei wurden die seitlichen Grenzen der ROI von 0,5 mm beibehalten, die Region jedoch nach oben hin geöffnet

und mittels Bildbearbeitungsprogramm (s.u.) die Gewebetypen entfernt, die nicht zum Kallusgewebe bzw. Knochenmark gehörten, in denen anschließend die Gefäße gezählt wurden. Diese ROI wurde als ROI 2 bezeichnet (Abbildung 17 B und C).

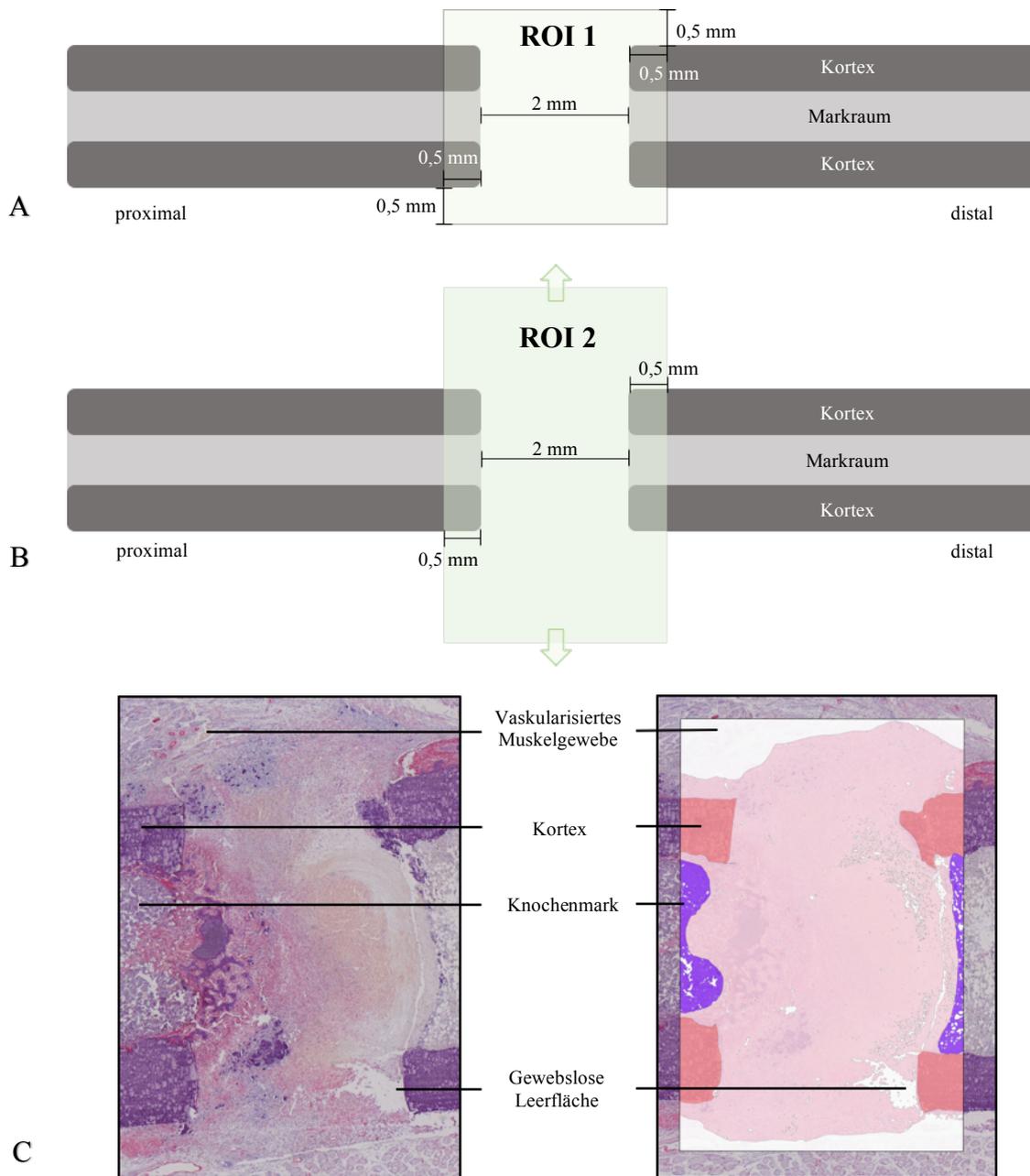


Abbildung 17: Erstellung der ROI 2

A: Schemazeichnung der fest definierten ROI 1: Die dunkelgrauen Balken stellen die Kortizes dar, dazwischen liegt das Knochenmark (hellgrau). Dargestellt sind proximales und distales Femurfragmet, die jeweils an den in der Mitte liegenden, 2 mm breiten Osteotomiespalt grenzen. Der Rahmen zeigt den Bereich der fest definierten ROI. **B: Schemazeichnung der angepassten ROI 2:** Der seitliche Abstand von 0,5 mm über die Kortexgrenzen hinaus wurde in der ROI 2 beibehalten. Nach oben hin wurden die Grenzen der ROI geöffnet und individuell gezogen. **C: Exemplarische Darstellung aus der histomorphometrischen Auswertung:** In der angepassten ROI 2 wurden Muskelgewebe, geweblose Flächen und Kortexgewebe markiert und von der Gesamtfläche, auf die sich die anschließend erhobene Gefäßanzahl bezog, abgezogen.

8.4 Deskriptive Auswertung der histologischen Präparate

Bei der Beschreibung der Movat-Pentachromfärbungen wurde auf sichtbare Ossifikationsprozesse, Residuen des artifiziellen Hämatoms und die Art, Lokalisation und Formation neugebildeten Gewebes vor dem Hintergrund unterschiedlicher Heilungszeitpunkte eingegangen. Im deskriptiven Teil der Auswertung der Gefäßfärbungen wurde versucht, eine allgemeine Aussage zu Lokalisation und Beschaffenheit (Größe, Färbeintensität) auf der Basis verschiedener Heilungszeitpunkte zu formulieren.

8.5 Quantitative Auswertung mittels Histomorphometrie

Die halbautomatische Quantifizierung von Gewebetypen und Markierung der ROI wurde an den Movat-Pentachromfärbungen der 7 Tages Populationen der CD31⁺ und PBMC Gruppe sowie an allen α -SMA gefärbten Präparaten mit dem Programm ImageJ (ImageJ 1.52 k, (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, National Institutes of Health, U.S.A.) durchgeführt. Zuvor wurden die Schnitte in einer 2,5- und 10-fachen Vergrößerung (Movat-Pentachromfärbungen) und einer 5- und 10-fachen Vergrößerung (α -SMA Färbungen) über eine an einem Lichtmikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) installierten, hochauflösenden Kamera (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Hilfe der Software AxioVision (AxioVS40, 4.8.2.0. SP3, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) digitalisiert.

In den Movat-Pentachromfärbungen als Leerfläche markiert und damit von der Fläche, auf die sich die Ergebnisse anschließend bezogen, ausgeschlossen, wurden: Geweblose Leerflächen, Muskelgewebe, Knochenmark, offensichtlich vom Kortex abgebrochene Fragmente und auch die Fläche der in der ROI enthaltenen Kortizes selbst. In die Auswertung mit aufgenommen wurde die Fläche des mineralisierten Gewebes, des nahe des Periost liegenden Gewebes und des Knorpelgewebes. Außerdem wurde die Fläche der Residuen des artifiziellen Hämatoms bestimmt. Die Fläche, die nach Abzug der oben genannten, markierten Gewebetypen übrig war, wurde als Bindegewebe klassifiziert. Bei der Analyse der ROI der α -SMA Schnitte wurden Muskelgewebe, geweblose Fläche, Knochenmark und Kortizes markiert. Als Leerfläche von der ROI abgezogen wurden Muskelgewebe und geweblose Flächen, die Kortizes wurden ebenfalls aus der Gesamtfläche herausgerechnet. Das neben dem Knochenmark übrig bleibende Gewebe wurde insgesamt als „Kallusgewebe“ definiert. Innerhalb von Knochenmark und Kallusgewebe wurden die Gefäße manuell gezählt und die Anzahl anschließend auf die Gesamtfläche beider Gewebe bezogen. Auf dieser Basis wurde die Menge an Gefäßen pro Quadratmillimeter dieser Fläche ausgerechnet.

8.6 Statistik

Die mittels Histomorphometrie erhobenen Daten wurden statistisch ausgewertet. Mittels Microsoft® Excel (Version 16.16.3, Microsoft, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten) wurden dazu Mittelwerte und Standardabweichungen von Gewebeflächen in absoluten Zahlen und Prozentanteilen ausgerechnet. Nach Annahme einer Normalverteilung wurde der „student's t test“ angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ wurde festgelegt, somit ergab sich ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Die grafische Darstellung erfolgte ebenfalls mit Microsoft® Excel und wurde in Diagrammen dargestellt, in denen Mittelwerte und Standardabweichungen ersichtlich sind.

9 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der histologischen Färbungen und deren histomorphometrische Auswertung dargelegt. Dabei wurde die immunhistochemische α -SMA Gefäßfärbung gewählt, um neu entstandene Gefäße im Rahmen der Knochenheilung darzustellen. Mittels Movat-Pentachromfärbung sollten Matrixumbauten hinsichtlich Chondrogenese, Mineralisierung, der Entwicklung des applizierten artifiziellen Hämatoms und des Anteils an Bindegewebe an der ROI analysiert werden. Beide Färbungen wurden an der PBMC Gruppe und an der mit CD31⁺ Zellen behandelten Kohorte sowohl 3 als auch 7 Tage nach Osteotomie durchgeführt.

9.1 Ergebnisse der Etablierungsfärbungen zur Gefäßdarstellung

Die herkömmlichen Protokolle, die für die immunhistochemische Anfärbung von Gefäßen auf Paraffinschnitten existierten, wurden für die Färbungen auf Kryoschnitten angepasst, um auch bei der Wahl dieser Konservierungsmethode die Gefäße möglichst spezifisch darstellen zu können. Im Verlaufe dieses Etablierungsprozesses wurden dazu an verschiedenen Stellen des Färbeprotokolls Modifikationen vorgenommen (Abbildung 15). Das etablierte Färbeverfahren ist im Vergleich zu anderen Färbungen in Abbildung 18 dargestellt.

Das in Abbildung 18 A dargestellte Färbeergebnis zeigt ein insgesamt schwach kontrastiertes Präparat, bei dem zwar der unspezifische Hintergrund nur dezent angefärbt wurde, gleichzeitig jedoch auch die Gefäße zum Teil nicht deutlich koloriert wurden, wie ein beispielhaft gekennzeichnetes Gefäß am unteren Bildrand in der Abbildung zeigt. In Abbildung 18 B dagegen wirkt das gesamte Präparat intensiv rot gefärbt und dadurch kontrastreich und dunkel. Zwar wurden nach diesem Färbeprotokoll die Gefäße intensiver angefärbt als in Abbildung 18 A, konnten auf einem gleichzeitig stark gefärbten Hintergrund jedoch schwer abgegrenzt werden, insbesondere von Gruppen quer angeschnittener Muskelfasern (unterer rechter Bildrand), da auch diese intensiv rot koloriert wurden. In Abbildung 18 C führte die alleinige Applikation von Levamisol ebenfalls zu keinem effizienten Rückgang der unspezifischen Hintergrundfärbung. Mit dem etablierten Verfahren (Abbildung 18 D) wurde eine Balance gefunden, bei der Gefäße auf einem weniger stark angefärbten Hintergrund noch gut zu differenzieren waren.

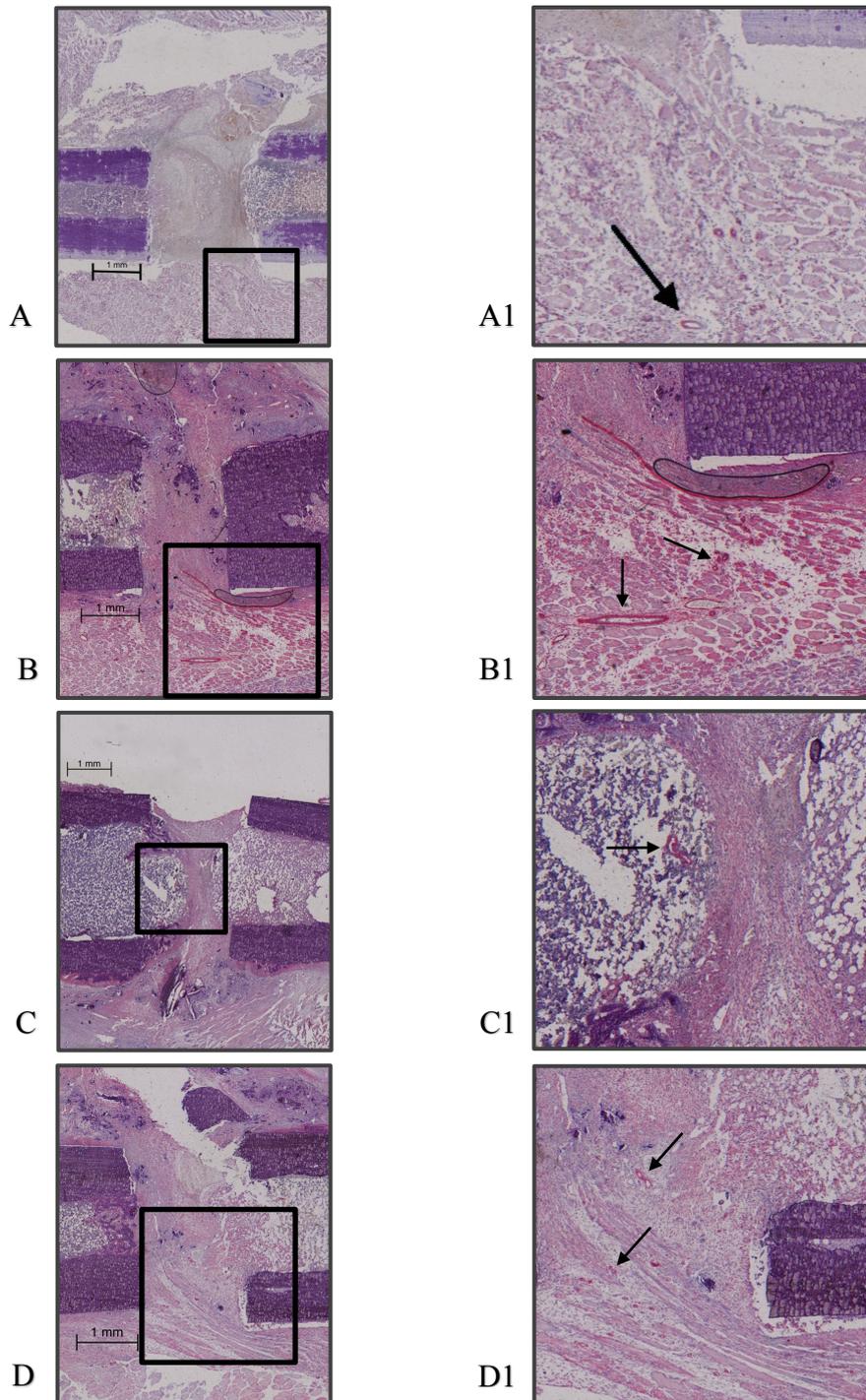


Abbildung 18: Etablierte α -SMA Gefäßfärbung (D) im Vergleich zu anderen Färbeprotokollen

α -SMA Färbungen an Probeschnitten nach verschiedenen Färbeprotokollen. Das linke Bild zeigt jeweils eine Übersichtsaufnahme der ROI (A-D), die Abbildung rechts neben dem jeweiligen Bild (A1-D1) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem im Überblick markierten Bereich. Jeweils links proximale, rechts distale Femurseite. Gefäße wurden exemplarisch mit Pfeilen markiert. **A:** Fixierung mit 4 %igem PFA, Inkubation mit 2 %igem Normalserum (Wirtsspezies Pferd), Antikörperverdünnung 1:100 mit Antikörperdiluent. Zusätzliche Schritte im Färbeprotokoll: endogener Biotin Block, Autoklavierung im Dampfdruckkochtopf, Zugabe von Levamisol. **B:** keine initiale Fixierung, Inkubation mit 2 %igem Normalserum (Wirtsspezies Pferd), Antikörperverdünnung 1:200 mit Antikörperdiluent, keine weiteren Zusätze; in der distal an den Osteotomiespalt angrenzende Femurseite ist der Markkanal noch nicht angeschnitten. **C:** Keine initiale Fixierung, Inkubation mit 2 %igem Normalserum (Wirtsspezies Pferd), Antikörperverdünnung 1:200 mit Antikörperdiluent, Zugabe von Levamisol. **D:** Fixierung mit 4 %igem PFA, Inkubation mit 5 %igem Normalserum (Wirtsspezies Pferd), Antikörperverdünnung 1:100 mit Antikörperdiluent. Zusätzliche Schritte im Färbeprotokoll: endogener Biotin Block.

9.2 Histologische Analysen der α -SMA Färbungen

9.2.1 Definition der ROI bei der α -SMA Färbung

Die Auswertung der Gefäßsituation erfolgte in einem ersten Schritt mit einer fest definierten ROI („ROI 1“), innerhalb derer alle dort sichtbaren Gefäße gezählt wurden. Primär 7, aber auch 3 Tage nach Osteotomie, war festzustellen, dass in beiden Gruppen die Gefäßanzahl in einigen Präparaten stark mit der durch Muskelgewebe bedeckten Fläche im definierten Bereich korrelierte (Abbildung 19). Die ROI wurde daher in einem zweiten Schritt angepasst und eine individualisierte „ROI 2“ erstellt, in der Muskelgewebe, Leerfläche und Kortextgewebe von der analysierten Fläche ausgeschlossen wurden. Auf diesem Wege sollte verhindert werden, dass in die ROI hervorgetretenes, vaskularisiertes Muskelgewebe die Gefäßzählung verfälscht. Die Ergebnisse beider Zählvarianten sind in Tabelle 2 und den Graphen in Abbildung 20 dargestellt.

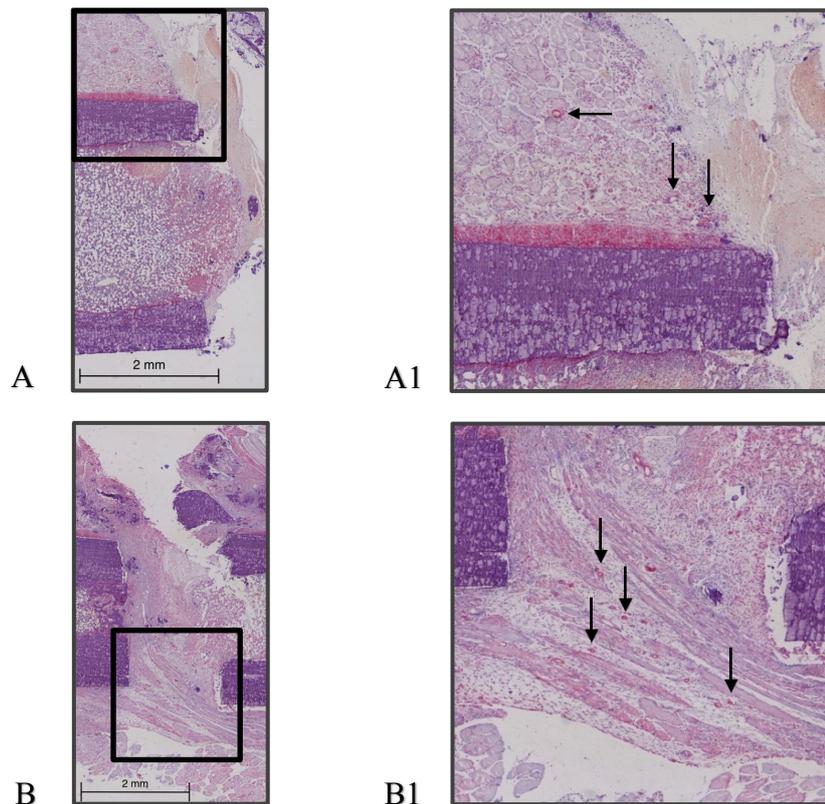


Abbildung 19: Gefäße im angrenzenden Muskelgewebe beeinflussen die Gefäßzählung

Exemplarische Darstellung aus der PBMC Gruppe. Gefäße im Muskelgewebe sind exemplarisch mit Pfeilen markiert. Das linke Bild zeigt jeweils eine Übersichtsaufnahme (A und B), die Abbildung rechts neben dem jeweiligen Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem im Überblick markierten Bereich (A1 und B1). **A und A1:** Tag 3: Dargestellt ist nur die linke Femurseite, benachbart liegt rechts von ihr der Osteotomiespalt. In unmittelbarer Nähe zum Kortex und zum Osteotomiespalt befindet sich Muskelgewebe (horizontal angeschnittene Muskelfasern) mit einer Vielzahl an kleinen Gefäßen, die in die Auswertung bei Wahl der ROI 1 mit eingehen. **B und B1:** Tag 7: stark vaskularisiertes Muskelgewebe im Osteotomiespalt.

9.2.2 Ergebnisse der Gefäßzählungen

An **Tag 3** (Tabelle 2a, Abbildung 20 A) war bei der Wahl der definierten ROI 1 in der PBMC Gruppe im Mittel eine Anzahl von 5,50 ($\pm 4,04$) Gefäßen pro ROI 1 zu erheben, während die Zahl an Gefäßen in der CD31 Gruppe im Mittel 4,43 ($\pm 2,7$) je ROI 1 betrug. An **Tag 7** (Tabelle 2b, Abbildung 20 A) lag die Gefäßanzahl in beiden Gruppen höher als an Tag 3, wobei im Mittel ebenfalls eine geringe Abweichung zwischen den beiden Versuchsgruppen zu konstatieren war. So kamen auf eine ROI im Mittel 11,40 ($\pm 6,02$) Gefäße in der PBMC Gruppe und 12,25 ($\pm 10,14$) Gefäße pro ROI in der CD31 Gruppe.

Bei der Auswertung auf der Basis der individualisierten ROI 2 zeigte sich an **Tag 3** mit im Mittel je 4 Gefäßen pro Präparat keine Abweichung in der absoluten Anzahl der Gefäße zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 20 C). Die Standardabweichung in der PBMC Gruppe lag hierbei bei $\pm 3,08$, in der CD31 Gruppe bei $\pm 2,52$. Bezogen auf die Fläche eines Quadratmillimeters ergab sich in der CD31 Gruppe ein Wert von 0,55 ($\pm 0,44$) Gefäßen pro mm^2 , bei der PBMC Gruppe ein Wert von 0,47 ($\pm 0,34$) Gefäße pro mm^2 (Abbildung 20 B). An **Tag 7** ließ sich ein Mittelwert von $3 \pm 0,82$ Gefäßen pro Präparat in der CD31 Gruppe erheben, in der PBMC Gruppe lag er bei $4 \pm 4,09$ Gefäßen pro Versuchstier und blieb damit bei Verwendung der individualisierten ROI 2 weitestgehend konstant zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten. Für die CD31 Gruppe ergab sich aus den erhobenen Werten für Tag 7 eine Anzahl von 0,26 ($\pm 0,05$) Gefäßen mm^2 , in der PBMC Gruppe waren es 0,43 ($\pm 0,38$) pro mm^2 .

Tabelle 2: Übersichtstabelle Gefäßzählung

Darstellung aller Werte der Gefäßzählung 3 Tage (a) und 7 Tage (b) nach Osteotomie in den jeweiligen Versuchsgruppen. ROI 1 = definierte ROI, ROI 2 = individualisierte ROI nach Abzug von Muskelgewebe, Leerfläche und Kortextgewebe. Auf die verbleibende Fläche aus Kallusgewebe und Knochenmark wurden die Gefäße pro mm² bezogen. MW= Mittelwert, STABW= Standardabweichung

a) Tag 3 nach Osteotomie							
PBMC				CD31			
Präparat	Gefäße/ ROI 1	Gefäße/ ROI 2	Gefäße/ mm ² (ROI 2)	Präparat	Gefäße/ ROI 1	Gefäße/ ROI 2	Gefäße/ mm ² (ROI 2)
721	2	2	0,23	931	2	2	0,34
722	9	9	0,92	933	4	4	0,57
723	0	0	0,00	934	5	4	0,54
724	4	4	0,54	935	0	0	0,00
725	9	2	0,36	936	6	5	0,39
726	9	4	0,78	937	8	8	1,44
				938	6	5	0,55
Summe	33	21		Summe	31	28	
MW	5,5	4	0,47	MW	4,43	4	0,55
STABW	4,04	3,08	0,34	STABW	2,70	2,52	0,44
b) Tag 7 nach Osteotomie							
PBMC				CD31			
Präparat	Gefäße/ ROI 1	Gefäße/ ROI 2	Gefäße/ mm ² (ROI 2)	Präparat	Gefäße/ ROI 1	Gefäße/ ROI 2	Gefäße/ mm ² (ROI 2)
731	15	2	0,25	921	10	3	0,29
732	5	1	0,14	923	27	4	0,31
733	9	3	0,37	924	8	2	0,20
734	20	2	0,29	925	4	3	0,24
735	8	11	1,09				
SUMME	57	19		SUMME	49	12	
MW	11,40	4	0,43	MW	12,25	3	0,26
STABW	6,02	4,09	0,38	STABW	10,14	0,82	0,05

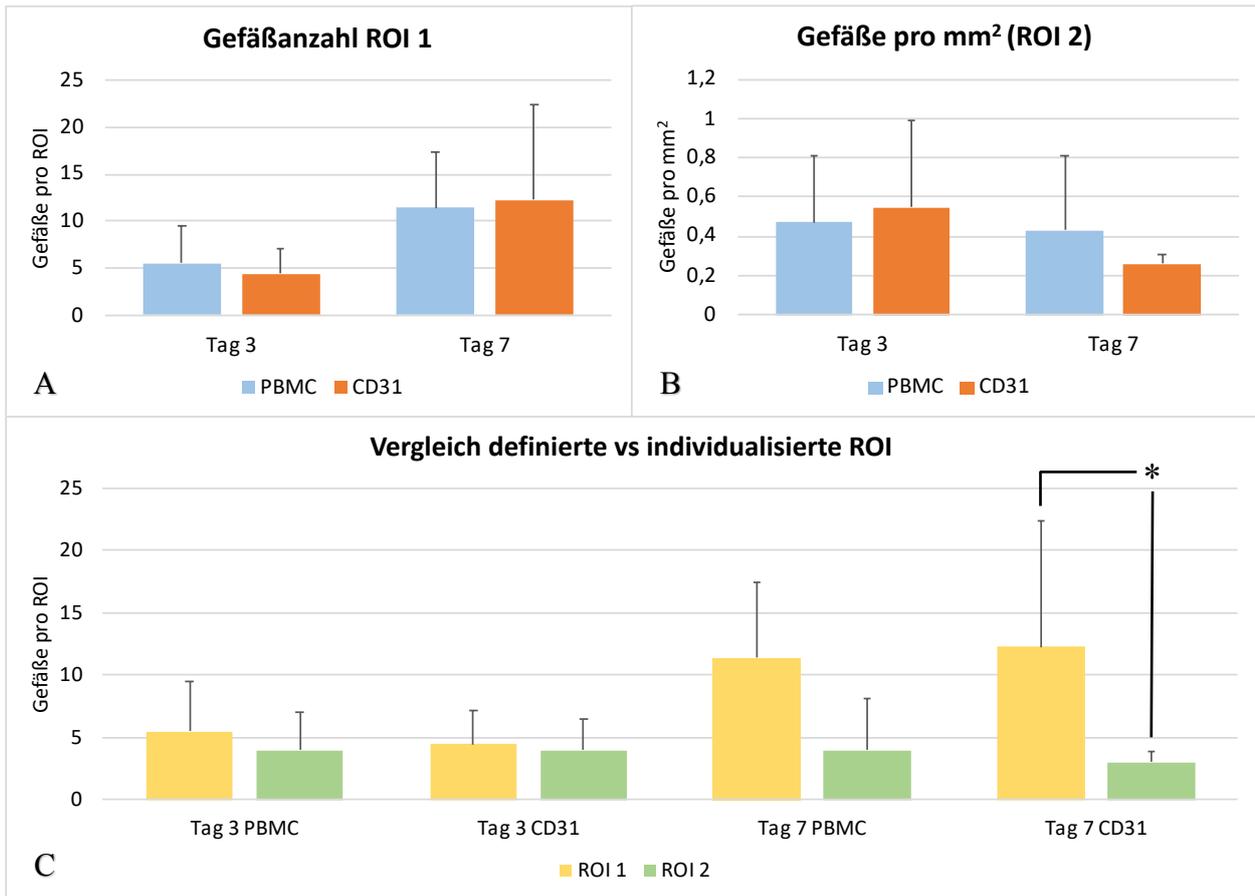


Abbildung 20: Gefäßzählung 3 und 7 Tage nach Osteotomie und Vergleich beider Zählvarianten

ROI 1 = definierte ROI; ROI 2 = individualisierte ROI nach Abzug von Muskelgewebe, Leerfläche und Kortextgewebe. Auf die verbleibende Fläche aus Kallusgewebe und Knochenmark wurden die Gefäße pro mm² bezogen. Werte siehe Tabelle 2

A: Darstellung der Gefäßzählung mit definierter „ROI 1“ (absolute Gefäßanzahl) an Tag 3 und 7 nach Osteotomie.

B: Darstellung der Gefäße pro mm² in der individualisierten „ROI 2“ 3 und 7 Tage nach Osteotomie.

C: Vergleich der Gefäßanzahl (absolute Gefäßanzahl) abhängig von der Wahl der ROI. Vor allem an Tag 7 zeigten sich deutliche Differenzen in der Anzahl der Gefäße abhängig von der Wahl der ROI. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwerte + positive STABW, nach Annahme einer Normalverteilung wurde der students t-test durchgeführt (für die Werte der Graphen A und B ungepaart, für C gepaart). * signifikant, es wurde ein Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ zugrunde gelegt. Tag 3: PBMC n = 6, CD31 n = 7, Tag 7: PBMC n = 5, CD31 n = 4

9.2.3 Deskriptive Auswertung der α -SMA Färbungen

In beiden Versuchspopulationen ließen sich 3 Tage nach Osteotomie meist nahe beieinander liegende, teils in kleinen Gruppen angeordnete Gefäße im Knochenmark nahe des Osteotomiespaltes beziehungsweise im Übergang zwischen Knochenmark und Hämatom nachweisen (Abbildung 21 A und B). In der PBMC Kohorte konnten die Gefäße bei 3 von 6 Präparaten der proximalen Seite des Osteotomiespaltes zugeordnet werden, in der CD31 Kohorte in 2 von 7 Fällen. In den anderen Präparaten waren die Gefäße nicht eindeutig einer Region zuzuordnen. Die Intensität der Färbung reichte von schwach rosa bis zu tiefer rot gefärbten Gefäßen. So erschienen beispielsweise kleinere Gefäße sowohl schwach rosa, als auch dunkel rot (Abbildung 21 A und B). Auch 7 Tage nach Osteotomie waren die Gefäße in beiden Versuchsgruppen eher im Bereich des an den Osteotomiespalt angrenzenden Knochenmarks zu finden (Abbildung 21 C und D). Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich sowohl in der PBMC, als auch in der CD31 Gruppe die Gefäße in 3 von 5 Fällen auf der Seite des proximal liegenden Knochenmarks. In einem Präparat der CD31 wurde der bereits einsetzende Mineralisierungsprozess des Knorpelgewebes von einem dickwandigen Gefäß begleitet (Abbildung 21 D). In beiden Versuchsgruppen befand sich stark angefärbter Hintergrund vor allem dort, wo kein Residuum des artifiziellen Hämatoms mehr vorlag (Abbildung 21 C; vergleiche hierzu auch Movat-Pentachromfärbungen). Auch zu diesem Zeitpunkt war die Färbeintensität zwischen und innerhalb der Versuchsgruppen inhomogen und eine verallgemeinernde Aussage ließ sich nicht ableiten.

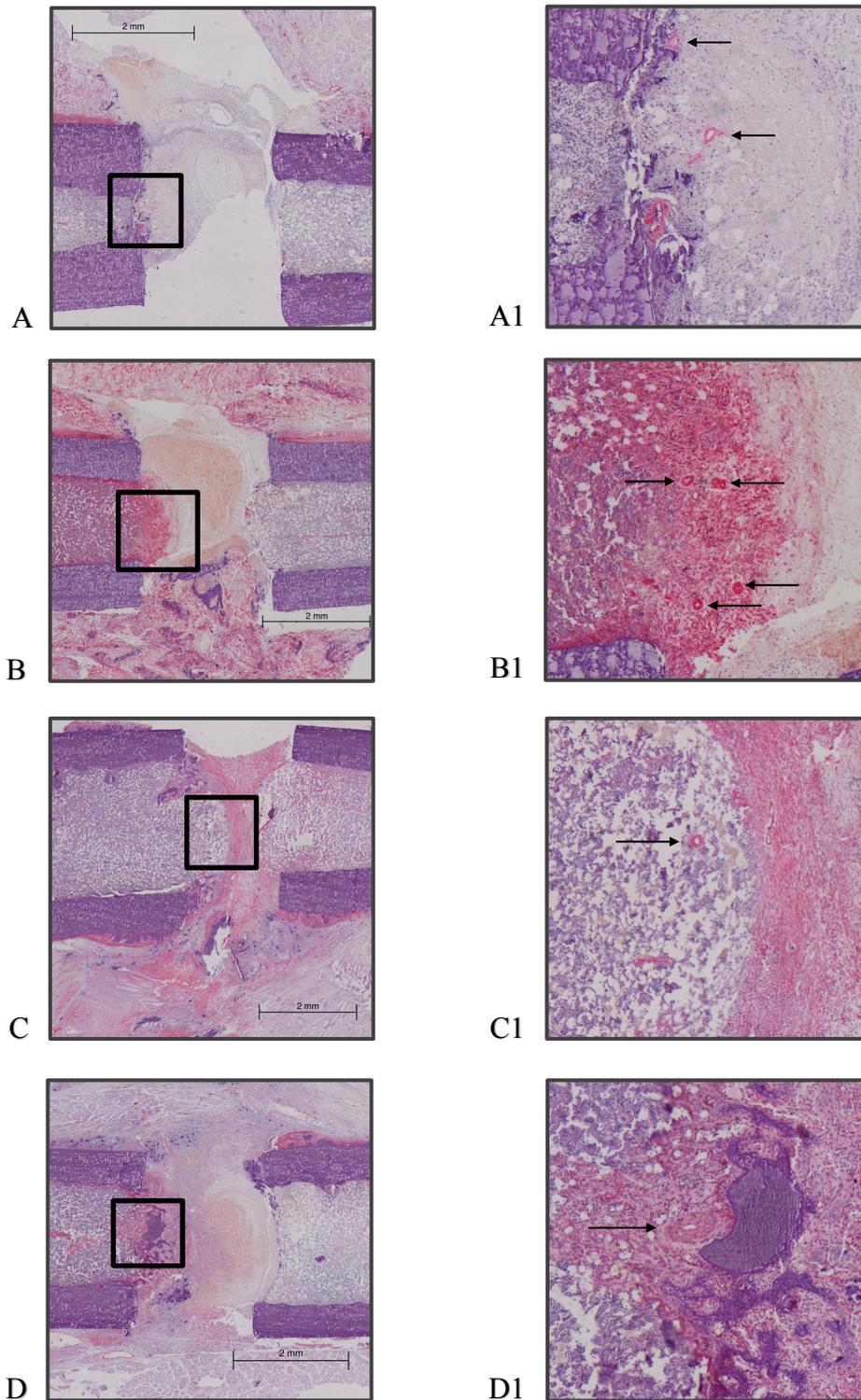


Abbildung 21: Exemplarische α -SMA Gefäßfärbungen 3 (A und B) und 7 Tage (C und D) nach Osteotomie

Das linke Bild zeigt jeweils eine Übersichtsaufnahme der ROI, die Abbildung rechts neben dem jeweiligen Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem im Überblick markierten Bereich; Jeweils links proximale, rechts distale Femurseite. Gefäße wurden exemplarisch mit Pfeilen markiert. **A: PBMC Gruppe, 3 Tage nach Osteotomie:** Nachweis von rötlich angefarbten Gefäßen auf der proximalen Seite des Osteotomiespalts. **B: CD31 Gruppe, 3 Tage nach Osteotomie:** Nahe beieinander liegende Gefäße auf der proximalen Seite des Osteotomiespalts. **C: PBMC Gruppe, 7 Tage nach Osteotomie:** proximal (links) der intensiven Hintergrundfärbung in der Mitte des Bildes, stellen sich rötlich Gefäße am Rande des Knochenmarks dar. **D: CD31 Gruppe, 7 Tage nach Osteotomie:** ein dickwandiges, arterielles Gefäß stellt sich benachbart zu einer mineralisierten Knorpelinsel dar

9.3 Histologische Analysen der Movat-Pentachromfärbungen

9.3.1 Deskriptive Auswertung der Movat-Pentachromfärbungen

3 Tage nach Osteotomie erschienen die Markräume in der CD31 Gruppe offen in Verbindung mit dem in dieser Gruppe noch großflächig erhaltenen, artifiziellen Hämatom im Osteotomiespalt, wodurch die proximalen und distalen Femurfragmente über diese durchgehende Fläche hinweg „verknüpft“ wirkten (Abbildung 22 B). Es ließen sich zu diesem Zeitpunkt keine eigenständig abgrenzbaren Gebiete von Granulations- oder Bindegewebe in der ROI nachweisen, lediglich innerhalb der Maschen des Hämatoms schimmerten kleine, blau-gräulich gefärbte Areale durch. In der PBMC Population glitt das Knochenmark 3 Tage nach Osteotomie von den offenen Femurenden aus in den Osteotomiespalt hinein, wobei dieses Gewebe kuppelartig abgerundet war (Abbildung 22 A). Die Kuppeln schienen von einem schmalen, bindegewebigen Saum (blau-gräuliche Areale) überzogen. Das artifizielle Hämatom war bereits weitestgehend resorbiert, zusammen mit bindegewebigen Fragmenten, befanden sich nur noch kleine Residuen des artifiziellen Hämatoms im Osteotomiespalt.

7 Tage nach Osteotomie zeigten sich bei einigen Tieren der PBMC Gruppe Areale beginnender **Chondrogenese**, teilweise mit bereits mineralisierten Anteilen (Abbildung 22 C). Der hyaline Knorpel (in der Movat-Pentachromfärbung grün bis hellgrün) durchzog bei den Präparaten dieser Versuchsgruppe senkrecht den Osteotomie-nahen Raum zwischen den beiden proximalen Kortizes und schloss damit das proximale Femurfragment unilateral ab. Anteile **mineralisierten Gewebes** zeigten sich als gelbliches, trabekelartiges Gewebe innerhalb des Knorpelgewebes, an der Grenze zum Osteotomiespalt (Abbildung 22 C). Auch bei den Versuchstieren der CD31 Gruppe konnte 7 Tage nach Osteotomie bereits grün gefärbtes Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Dieses ragte im Gegensatz zur Knorpelkonfiguration in der PBMC Gruppe konusförmig in den Osteotomiespalt hinein (Abbildung 22 D). In der CD31 Kohorte befanden sich Bereiche beginnender Chondrogenese immer auf der proximalen Seite des Osteotomiespalts und bereits mineralisiertes Gewebe lag auch in dieser Versuchsgruppe größtenteils innerhalb des Knorpelgewebes. Im **Bereich nahe des Periosts**, an der Grenze zum Osteotomiespalt, wiesen beide Versuchsgruppen 7 Tage nach Osteotomie grün-gelblich gefärbte Gewebeinseln auf, die 3 Tage nach Osteotomie nicht nachweisbar waren (Abbildung 22 C und D). Diese Gewebeinseln erschienen trabekelartig, bildeten ausgehend vom jeweiligen Kortextrand fingerförmige Ausläufer und überschritten teilweise die Kortexkanten hin zum Osteotomiespalt. Dieses Phänomen war zu diesem Untersuchungszeitpunkt

bei allen begutachteten Präparaten der jeweiligen Gruppe nachweisbar. Den auffälligsten Unterschied zwischen der PBMC und der CD31 Gruppe stellte auch 7 Tage nach Osteotomie der Anteil der Fläche des **artificialen Hämatoms** an der ROI dar: In der PBMC Kohorte waren noch kleine, rötlich bis hellbraun angefärbte Fragmente des Hämatoms im Osteotomiespalt nachweisbar (Abbildung 22 C). Dagegen war in der gesamten CD31 Gruppe das künstlich eingebrachte Hämatom immernoch großflächig im Osteotomiespalt erhalten (Abbildung 22 D) und nahm noch einen großen Anteil der analysierten ROI ein. Die mit der Movat-Pentachromfärbung blau-grau angefärbten **bindegewebigen Anteile** an der ROI schienen 7 Tage nach Osteotomie in den PBMC Präparaten großflächiger zwischen den anderen Gewebetypen vorhanden, als in der CD31 Gruppe.



Abbildung 22: Exemplarische Movat-Pentachromfärbungen 3 (A und B) und 7 Tage (C und D) nach Osteotomie

Movat-Pentachromfärbung in 10-fach Vergrößerung; Jeweils links proximale, rechts distale Femurseite. **A: PBMC Gruppe, 3 Tage nach Osteotomie:** Das Knochenmark (rot-violett) gleitet beidseitig aus beiden Knochenschäften heraus; geringfügige Residuen des artifiziellen Hämatoms (rot-braun) sind im Osteotomiespalt sichtbar. **B: CD31 Gruppe, 3 Tage nach Osteotomie:** Hämatom Residuen sind noch großflächig erhalten. **C: PBMC Gruppe, 7 Tage nach Osteotomie:** Unilaterale Verknorpelung des proximalen Femurschafts, mineralisierte Anteile innerhalb der Knorpelinseln sind gelblich angefärbt; Mittig zwischen den oberen Kortextenden zeigt sich ein Rest des artifiziellen Hämatoms, nahe des Periosts zeigen sich am oberen distalen Kortex grün-gelbe Gewebsinseln. **D: CD31 Gruppe, 7 Tage nach Osteotomie:** Gerichteter Verknorpelungs- und Mineralisierungsprozess zum distalen Frakturende hin bei noch großflächig erhaltenem, rot-braun erscheinendem, artifiziellen Hämatom und teilweise mineralisiertem Knorpelgewebe (gelb); am rechten oberen, distalen Kortexrand zeigen sich grün-gelbliche Inseln

9.3.2 Histomorphometrische Auswertung der Movat-Pentachromfärbungen

Um die beschriebenen Matrixveränderungen auch quantitativ auszuwerten, wurden 7 Tage nach Osteotomie histomorphometrische Analysen der beschriebenen Gewebetypen durchgeführt (Auswertung in Abbildung 23).

Bereiche **beginnender Chondrogenese** nahmen in der Gruppe der mit CD31⁺ Zellen behandelten Tiere im Mittel einen geringfügig kleineren Anteil an der Gesamtfläche der ROI ein ($1,79 \pm 2,11$ %), als in der PBMC Kontrollgruppe ($1,92 \pm 2,51$ %; Abbildung 23 B). Sieben Tage nach Osteotomie wiesen Präparate beider Versuchspopulationen außerdem bereits **mineralisierte Areale** innerhalb der Knorpelinseln auf, die sich zu den früheren Zeitpunkten nicht darstellten. Die histomorphometrischen Analysen ergaben hierbei einen geringfügig höheren Anteil von mineralisiertem Gewebe an der ROI in der CD31 Kohorte ($1,70 \pm 0,65$ %) im Vergleich zur PBMC Gruppe ($1,16 \pm 0,56$ %; Abbildung 23 A). Die **Gewebeinseln benachbart zum Periost** nahmen in beiden Populationen jeweils nahezu den gleichen Anteil an der Gesamtfläche der ROI ein (Abbildung 23 C): In der PBMC Gruppe lag der Anteil dieser Bereiche im Mittel bei $1,82 \pm 0,86$ %, in der CD31 Gruppe machten diese Areale einen Anteil von $1,83 \pm 1,29$ % an der Gesamtfläche der ROI aus. Die Histomorphometrie bestätigte außerdem die deskriptive Beobachtung, dass der Anteil des **artificialen Hämatoms** an der ROI sich zwischen den beiden Versuchsgruppen 7 Tage nach Beginn der Heilung deutlich unterscheidet: Die Fläche des artificialen Hämatoms, das in der CD31 Gruppe einen mittleren Anteil von $13,72 \pm 2,61$ % an der Gesamtfläche der ROI einnahm, war signifikant größer als in der PBMC Kontrollgruppe, in der der Flächenanteil des Hämatoms an der ROI bei $3,66 \pm 2,22$ % lag (Abbildung 23 E). Der Anteil des als **Bindegewebe** evaluierten Gewebes in der CD31 Gruppe lag 7 Tage nach Osteotomie im Durchschnitt signifikant unter dem der PBMC Gruppe (CD31: $80,96 \pm 3,27$ %; PBMC: $91,44 \pm 2,80$ %; Abbildung 23 D)

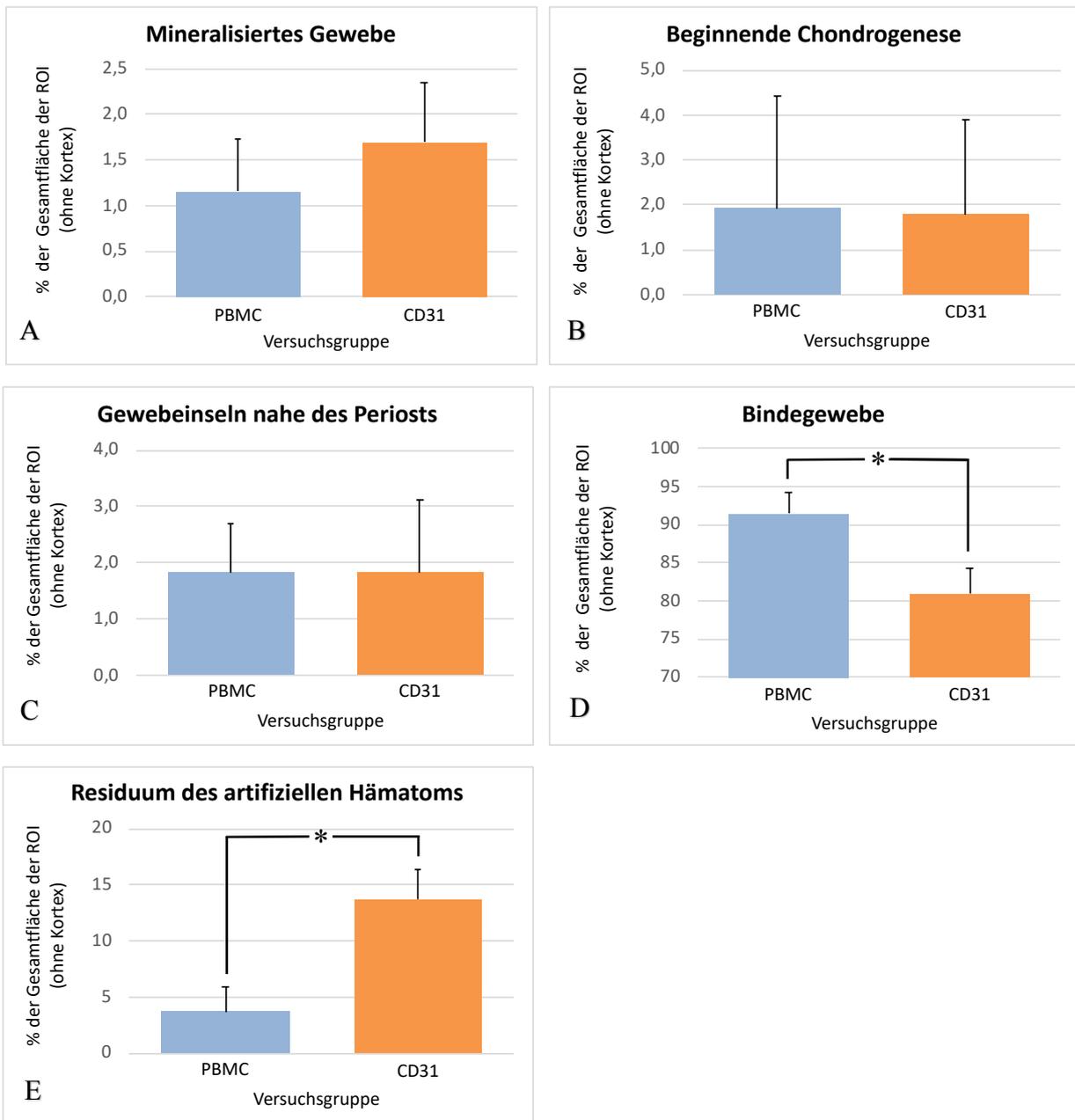


Abbildung 23: Histomorphometrische Auswertung der Movat-Pentachromfärbung 7 Tage nach Osteotomie

Die histomorphometrische Quantifizierung des Anteils von mineralisiertem Gewebe (A), entstehendem Knorpelgewebe (B) und periostnahen Gewebeinseln (C) an der ROI ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Der Prozentanteil von als Bindegewebe klassifiziertem Gewebe (D) und artifiziellem Hämatom (E) an der ROI unterschied sich hingegen zwischen den beiden Versuchsgruppen signifikant voneinander. **Darstellung:** * signifikant im Vergleich zur PBMC Gruppe, es wurde ein Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ zugrunde gelegt. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwerte + positive Standardabweichung, die statistische Analyse erfolgte über den Student's t-test nach Annahme einer Normalverteilung und Varianzanalyse nach Bonferroni-Korrektur. PBMC n = 5, CD31 n = 4

9.4 Kinetik innerhalb der Versuchsgruppen: Vergleich Tag 3 zu Tag 7

9.4.1 PBMC Gruppe

Die Gesamtanzahl an Gefäßen beziehungsweise die Menge von Gefäßen pro Quadratmillimeter blieb zwischen Tag 3 und Tag 7 innerhalb der PBMC Population nahezu konstant, werden die Ergebnisse der individualisierten ROI 2 betrachtet. Gefäße, die als neu entstanden gewertet wurden, fanden sich vor allem an der Grenze zwischen Osteotomiespalt und angrenzendem Knochenmark. Hinsichtlich der Färbintensität zeigte sich ein Mischbild mit sowohl kleinen als auch großen Gefäßen die zu beiden Zeitpunkten unterschiedlich stark rosa angefärbt wurden. Ausgehend vom Periost bildeten sich nahe der an den Osteotomiespalt grenzenden Kortextenden zwischen Tag 3 und Tag 7 Inseln grün-gelblich gefärbten Gewebes. 7 Tage nach Osteotomie ließ sich im Vergleich zum frühen Zeitpunkt außerdem Knorpelgewebe nachweisen, das in Präparaten der PBMC Gruppe den proximal zum Osteotomiespalt liegenden Femurschaft nahezu vollständig senkrecht durchbaute und zur Osteotomieregion hin verschloss. Vereinzelt zeigten sich an Tag 7 bereits mineralisierte Areale im vorhandenen Knorpelnetzwerk. Das bereits zum früheren Zeitpunkt nur noch wenig Fläche einnehmende Frakturhämatom war 7 Tage nach Osteotomie fast vollständig resorbiert. Residuen zeigten sich als kleine, rötliche Fragmente.

9.4.2 CD31 Gruppe

In der CD31 Gruppe zeigte sich zwischen Tag 3 und Tag 7 keine wesentliche Änderung der Gefäßanzahl pro Quadratmillimeter in der ROI 2. Kleine und große Gefäße waren ohne einheitliches Intensitätsmuster zu beiden Zeitpunkten unterschiedlich stark angefärbt und ließen sich vor allem an der Grenze zwischen Knochenmark und Osteotomiespalt lokalisieren. Zwischen Tag 3 und Tag 7 entstanden auch in der CD31 Kohorte nahe des Periosts Bereiche von gelb-grünlichen Matrixumbauten, die zum früheren Zeitpunkt noch nicht nachweisbar waren. Knorpelgewebe entwickelte sich von Tag 3 zu Tag 7 bei einigen Präparaten am Rande der proximal vom Osteotomiespalt liegenden Kortextenden und richtete sich konusförmig zum gegenüberliegenden, distalen Osteotomieende hin aus. Innerhalb der Knorpelareale waren teilweise mineralisierte Inseln sichtbar. Das artifizielle Hämatom wurde im Vergleich zu Tag 3 zum Teil resorbiert, nahm aber – vor allem im Vergleich zur PBMC Population – bei allen Versuchstieren der CD31 Gruppe 7 Tage nach Osteotomie immer noch einen großen Anteil an der Fläche der ROI ein.

10 Diskussion

10.1 Konzeption des Versuchs

Vorstudien unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass der insgesamt positive Effekt auf die verzögerte Knochenheilung im vorliegenden Tiermodell auf synergistische Effekte zwischen den Subpopulationen der transplantierten CD31⁺ PBMCs zurückzuführen ist (22). Somit erscheint die Gesamtzusammensetzung der CD31 Population entscheidend. Die Depletion oder Anreicherung einer Untergruppe der CD31⁺ Zellen (der CD31⁺CD14⁺ Makrophagen/Monozyten) ergab im Experiment insgesamt einen weniger positiven Effekt auf die Knochenheilung, als die Applikation der Gesamtheit der CD31⁺ Zellen. Aus diesem Grund war es sinnvoll, die Anreicherung dieser Population im Vergleich zur PBMC Kohorte genauer zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollten frühere Heilungszeitpunkte im Tiermodell untersucht werden mit dem Ziel, mechanistische Einblicke in die CD31⁺ zellabhängige Verbesserung der Heilung zu gewinnen. Es wird darüber hinaus angenommen, dass Angiogenese und eine regelhaft ablaufende Immunreaktion entscheidende Parameter für eine gelingende Frakturheilung sind (7, 18). Die CD31⁺ Zellen sind bekannt für ihre pro-angiogenen (176-181) und anti-inflammatorischen (100, 182) Eigenschaften. Auf dieser Basis wurden die histologischen Ergebnisse besonders in Hinblick auf diese beiden Teilaspekte analysiert und interpretiert. Zudem sollten bereits vorliegende Genexpressions- und Proteinanalysen angiogener und inflammatorischer Faktoren aus dem gleichen Tiermodell (22, 100) mit den hier gemachten histologischen Untersuchungen verglichen werden.

Die vorliegenden Untersuchungen dienen dazu, die anatomischen und funktionellen Veränderungen nach Applikation der CD31⁺ Zellen näher zu charakterisieren und so einen CD31⁺ zellabhängigen Heilungsmechanismus genauer zu charakterisieren. Dies kann dazu beitragen, eine spezifische Indikationsstellung für eine zukünftige klinische Anwendung herzuleiten. Der Zeitpunkt, zu dem eine Applikation erfolgen sollte, spielt eine entscheidende Rolle, da insbesondere Disbalancen in der frühen Heilungsphase nachweislich die Knochenregeneration verzögern oder gar verhindern können (20, 42). Zu früheren Zeitpunkten wurde bisher nicht analysiert ab wann ein möglicherweise positiver Effekt der CD31⁺ Zellen einsetzt und sich histologisch die ersten Unterschiede im Heilungsverlauf zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe ereignen.

10.2 Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Angiogenese zu frühen Zeitpunkten

In der Literatur werden zwei Revaskularisationswellen während der Frakturheilung postuliert: Eine erste pro-angiogene Welle wird zu einem frühen Zeitpunkt nach Frakturgeschehen, mit dem Ende der pro-inflammatorischen Phase, durch Hypoxie induziert (18-20, 42): Signalmoleküle (vor allem VEGF über den HIF-1 α -Signalweg) rekrutieren Endothelzellen zum Frakturspalt und führen damit eine erste Reaktion auf die Hypoxie herbei (22, 42, 52). Auch Immunzellen sekretieren in dieser Phase VEGF (19). Die zweite pro-angiogene Signalwelle ereignet sich später im Verlauf der Heilung, wenn im Rahmen der Bildung von Geflechtknochen Kallusgewebe mineralisiert wird und über Gefäße die optimale Blutversorgung der betreffenden Regionen sichergestellt werden muss. Im Schaf findet dieser Prozess beispielsweise nach ungefähr 21 Tagen statt (42).

Im physiologischen Heilungsprozess bei Nagern ist eine erste Revaskularisationswelle um den 3. bis 5. Tag zu erwarten, da die initiale inflammatorische Phase in diesem Zeitraum abklingt und damit eine frühe pro-angiogene Welle möglich wird (18, 20). Der Höhepunkt der intramembranösen Ossifikation liegt bei Ratten zwischen Tag 7 und 17, die enchondrale Ossifikation findet bei Ratten zwischen 7 bis 21 Tage nach dem Frakturereignis statt (15, 183). Eine zweite Revaskularisationswelle im Rahmen der Bildung von Geflechtknochen ereignet sich also um 7 bis 21 Tage nach Frakturereignis.

In dieser Arbeit waren 3 Tage nach Osteotomie in der CD31 Kohorte 0,55 (\pm 0,44) Gefäße pro mm² nachzuweisen, in der PBMC Gruppe 0,47 (\pm 0,34). Die absolute Gefäßanzahl im Mittel war in den Gruppen identisch (4). 7 Tage nach Osteotomie ließ sich ein Mittelwert von 3 Gefäßen pro Präparat in der CD31 Gruppe erheben, in der PBMC Gruppe lag er bei 4 Gefäßen pro Versuchstier und blieb damit weitestgehend konstant im Vergleich zu den Ergebnissen 3 Tage nach Osteotomie. Für die CD31 Gruppe ergab sich aus den erhobenen Werten eine Anzahl von 0,26 (\pm 0,05) Gefäßen pro mm², in der PBMC Gruppe 0,43 (\pm 0,38). Aus der deskriptiven Analyse ließ sich hinsichtlich der Beschaffenheit und Lokalisation der Gefäße kein signifikanter Unterschied ableiten.

Ein positiver Effekt der CD31⁺ Zellapplikation auf die Angiogenese im Rahmen der ersten Revaskularisationswelle lässt sich mit der erhobenen Gefäßanzahl der jeweiligen Gruppen somit nicht bestätigen. Diese Annahme entstand auf der Grundlage von Ergebnissen der Vorarbeit, auf der diese Arbeit aufbaut (22): Im gleichen Tiermodell war die Gefäßanzahl in der CD31 Gruppe 42 Tage nach Osteotomie nicht signifikant größer als in der PBMC Gruppe. Die Expression einiger pro-angiogener Gene (FGF-2 und vWF) im Hämatom 3 Tage nach Osteotomie zeigte jedoch einen positiven Trend in der CD31 Gruppe (22). In Zusammenschau von Histologie zum späten und

Genexpressionsanalyse zum frühen Zeitpunkt, sollte daher der Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Gefäßinduktion zu früheren Zeitpunkten untersucht werden. Auf Grundlage der hier vorliegenden histologischen Analysen lässt sich keine vermehrte Vaskularisierung als Konsequenz des beobachteten Anstiegs der genannten pro-angiogenen Faktoren an Tag 3 beobachten. Auch an Tag 7 ergaben sich histologisch keine signifikanten Unterschiede in der CD31 Population, die Gefäßanzahl pro mm² lag geringfügig unter der der PBMC Gruppe. Es muss beachtet werden, dass in der genannten Vorarbeit bisher die Genexpression mittels qPCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) für die besagten Faktoren analysiert wurde. Diese gibt jedoch keinen Aufschluss über eventuelle Veränderungen auf der Proteinebene. In einem weiteren Experiment könnte daher mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) untersucht werden, ob in Folge der Behandlung mit CD31⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrolle Veränderungen der Faktoren auf Proteinebene zu beobachten sind (184-187) und mit der hier durchgeführten histologischen Untersuchung übereinstimmen.

Darüber hinaus sind bei der Knochenheilung neben den erwähnten noch eine Vielzahl anderer angiogener Faktoren beteiligt, die ebenfalls Einfluss auf die Angiogenese haben (HMOX-1, Angiopoetin 1, PDGF-B, HIF-1 α , VEGF (18, 42)). VEGF, das über den HIF-1 α Signalweg gebildet wird (44), rekrutiert EPCs und stimuliert Endothelzellen zur Proliferation und Differenzierung (44-46). Es ist aufgrund dieser Eigenschaften essentieller Signalgeber für die Angiogenese auch während der frühen Phasen der physiologischen Knochenheilung (22, 42, 52). Zieht man in diesem Zusammenhang Ergebnisse weitere Genexpressionsanalysen heran, die in der Vorarbeit für die Faktoren PDGF-B und HIF-1 α 3 Tage nach Osteotomie im Hämatom gemacht wurden, deutete sich bei diesen kein eindeutig positiver Trend in der CD31 Gruppe an (22). Sieben Tage nach Osteotomie nahm die Expression aller gemessenen Faktoren (FGF-2, vWF, HIF-1 α , PDGF-B) ab und die Werte der CD31 Population glichen sich den Werten in der PBMC Gruppe weitestgehend an (22). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen deuten in Zusammenschau mit den histologischen Untersuchungen in dieser Arbeit an, dass VEGF (mit PDGF-B) möglicherweise von größerer Bedeutung für die Gefäßsynthese zu früheren Zeitpunkten ist, als die Faktoren, die einen positiven Trend in der CD31 Gruppe zu frühen Zeitpunkten zeigten.

Zusammenfassend ist eine mögliche Kompensation der reduzierten pro-angiogenen Ausgangslage im Tiermodell für verzögerte Knochenheilung (22, 188) durch die CD31⁺ Zellapplikation zu früheren Zeitpunkten nicht mit der erhobenen Gefäßanzahl im Vergleich zur PBMC Gruppe zu belegen.

Durch eine höhere Anzahl an Versuchstieren müsste die Repräsentativität der histologischen Ergebnisse dieser Arbeit überprüft werden. Denn in der Literatur gilt eine pro-angiogene Wirkung der CD31⁺ Zellen als erwiesen (176-181). So wurde die Bedeutung der CD31⁺ Zellen für die Entstehung neuer Gefäße bereits deutlich, als unter experimentellen Bedingungen die Inhibition des CD31 Moleküls dazu führte, dass die Angiogenese ausblieb (177). Darüber hinaus verifizierte die Forschungsgruppe um Kim et al. *in vitro* die Existenz von EPCs unter peripher gewonnenen CD31⁺ Zellen und konnte die Differenzierung zu Schlauch-bildenden Endothelzellen beobachten (178, 180). In Genanalysen wurde außerdem festgestellt, dass die pro-angiogenen Faktoren Angiopoetin 1, VEGF-A, FGF-2 und eNOS, in der CD31⁺ im Vergleich zu einer CD31⁻ Population höher exprimiert wurden (178, 180). Ferner wiesen Kim et al. in einem *in vivo* Versuch nach, dass bei Mäusen, in denen durch Resektion der rechten A. femoralis eine Ischämie der rechten Hintergliedmaße induziert wurde, nach Transplantation von peripher gewonnenen CD31⁺ Zellen in dieser Region eine erhöhte Blutperfusion und Kapillardichte im Vergleich zur Kontrollpopulation bestand. Die CD31⁺ Zellen verstärkten daher wahrscheinlich die Neovaskularisation (178).

Mit einer höheren Anzahl an Versuchstieren könnte darüber hinaus genauer evaluiert werden, inwiefern die Applikation der jeweiligen Zellen tatsächlich mit der Anzahl neuer Gefäße korreliert. Die hohen Standardabweichungen für die ermittelte mittlere Anzahl von Gefäßen in den Versuchsgruppen an Tag 3 (Abbildung 20) zeigt, dass die Applikation einer bestimmten Zellpopulation in der vorliegenden Arbeit womöglich nicht direkt mit der Gefäßanzahl zu diesem Zeitpunkt korreliert. 7 Tage nach Osteotomie war die Standardabweichung um den Mittelwert der Gefäßanzahl pro Präparat in der CD31 Gruppe bei 0,05 und damit wesentlich geringer, als in der PBMC Gruppe ($\pm 0,38$). Die schwankenden Werte in der PBMC Gruppe könnten Ausdruck einer zufällig höheren Gefäßanzahl in manchen Präparaten sein. Bei diesen könnten sich beispielsweise durch einen stärkeren hypoxischen Stimulus in einigen Tieren gleich viele oder mehr Gefäße als in der CD31 Gruppe gebildet haben, ohne, dass dies mit der Behandlung mit den PBMCs zusammenhängt. Neben einer erhöhten Anzahl an Versuchstieren wäre eine noch spezifischere Gefäßfärbung wünschenswert, um Zählfehler bei der Auswertung auszuschließen (siehe 10.7.3.1).

10.2.1 Immunmodulatorische Effekte der CD31⁺ Zellen und Angiogenese

Für den Beginn einer ersten Revaskularisationswelle ist es notwendig, dass die vorige, initiale Entzündungsreaktion abklingt (18, 20): Erst mit dem Ende der pro-inflammatorischen Phase nach Frakturgeschehen kommt es zur Expression pro-angiogener Faktoren wie HIF-1 α und der von HIF-1 α regulierten Genen (18) (siehe Angiogenese im Rahmen der Frakturheilung, S. 23).

Da die CD31⁺ Zellapplikation im Tiermodell nicht zu einer höheren Gefäßanzahl im Vergleich zur PBMC Gruppe führte, muss in Betracht gezogen werden, dass die pro-inflammatorische Phase zu den untersuchten Zeitpunkten auch nach Applikation der CD31⁺ Zellen noch nicht ausreichend abgeklungen war. Um diese Hypothese genauer zu evaluieren, können Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe herangezogen werden, die aus *ex vivo* Hämatomen im gleichen Tiermodell zu frühen Zeitpunkten für die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ erhoben wurden (22). 3 Tage nach Osteotomie wurde IFN- γ in der CD31 Gruppe signifikant geringer exprimiert, als in der PBMC Gruppe. Relative Werte für TNF- α lagen zum gleichen Zeitpunkt in der CD31 Gruppe geringfügig über denen der PBMC Population. 7 Tage nach Osteotomie war neben IFN- γ auch TNF- α in beiden Gruppen herunterreguliert und die Werte beider Mediatoren lagen unter denen der mit PBMCs behandelten Population (22).

Die niedrigen Werte für IFN- γ spiegeln den immunmodulatorischen Effekt der Behandlung mit CD31⁺ Zellen eindeutig wider. Ein Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Gefäßsynthese als Auswirkung dieser gedämpften pro-inflammatorischen Reaktion wird histologisch zu frühen Zeitpunkten jedoch nicht sichtbar. Die Ergebnisse der TNF- α Messungen müssen gesondert interpretiert werden, da dem Signalmolekül im Rahmen der Angiogenese eine besondere Rolle zukommt. So induzieren geringe Dosen von TNF- α die Angiogenese, während höhere Konzentrationen sie blockieren (189). Zudem spielt der Zeitpunkt, zu dem TNF- α ausgeschüttet wird, eine Rolle: Während der initialen inflammatorischen Phase inhibiert es angiogene Signalwege, nach Abklingen der Entzündungswelle regt es jedoch Endothelzellen zur Formation neuer Gefäße an (190). 3 Tage nach Osteotomie lagen die gemessenen Werte in der CD31 Gruppe geringfügig über denen der PBMC Kontrollgruppe (22), in der vorliegenden Arbeit unterschied sich zu diesem Zeitpunkt die Gefäßanzahl zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Damit hat TNF- α wahrscheinlich keinen hemmenden Einfluss auf die Angiogenese in der CD31 Gruppe im Sinne einer Dosis-abhängigen Wirkung, stimuliert sie jedoch auch nicht. Ein indirekt positiver Effekt der CD31⁺ Zellen über die Regulation von TNF- α lässt sich auf Ebene der Gefäßsynthese zu diesem früheren Zeitpunkt somit nicht beobachten. Die niedrigen Werte 7 Tage nach Osteotomie könnten einen pro-angiogenen Stimulus für die zweite Revaskularisationswelle darstellen. Da dieser Zeitpunkt erst ihren Beginn markiert (siehe 10.2), müssten histologische Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten folgen, etwa auf dem Höhepunkt der Ossifikationsprozesse um den 14. Tag. Über die Modulation der TNF- α -Sekretion könnten CD31⁺ Zellen somit einen Einfluss auf die zweite Revaskularisationswelle haben, deren Wirkung in einigen Präparaten dieser Arbeit möglicherweise bereits sichtbar war

(Abbildung 20 D), jedoch keinen generellen, signifikanten Unterschied in der Gefäßanzahl zwischen den Gruppen nach sich zog. In der Vorarbeit, auf der diese Arbeit basiert, wurde auch 42 Tage nach Osteotomie kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Gefäße zwischen mit PBMC und CD31⁺ behandelten Ratten festgestellt (22). Es muss daher noch abschließend geklärt werden, in welcher Form und zu welchem Zeitpunkt die CD31⁺ Zellen einen pro-angiogenen Effekt auf die Heilung zeigen.

Es muss berücksichtigt werden, dass neben TNF- α und IFN- γ auch eine Vielzahl anderer pro-inflammatorischer Zytokine an der initialen Entzündungsreaktion beteiligt sind, wie IL-1 β , GM-CSF und IL-6 (18). Außerdem fördern anti-inflammatorische Faktoren wie TGF- β , IL-10 (18, 28) und IL-4 (22) die Beendigung der pro-inflammatorischen Phase und damit den Beginn der pro-angiogenen Welle. Eine Analyse dieser Faktoren auf Proteinebene zu frühen Zeitpunkten, beispielsweise über ELISA, könnte Aufschluss darüber geben, ob im vorliegenden Modell eine noch nicht vollständig abgeklungene pro-inflammatorische Phase die Gefäßsynthese zu frühen Zeitpunkten inhibiert. Daraus wäre zu schließen, dass möglicherweise eine *vollständige* Terminierung der Pro-Inflammation essentiell ist und eine Hochregulation angiogener Faktoren erst *nach* und nicht bereits *parallel* zur *abklingenden* Entzündungsreaktion erfolgt.

10.3 Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf das Frakturhämatom

10.3.1 Bedeutung des Frakturhämatoms

Eine ausbalancierte Immunantwort nach Frakturgeschehen ist für den gesamten folgenden Heilungsprozess Voraussetzung (11, 18, 20). In diesem Zusammenhang ist die Ausbildung des Frakturhämatoms von besonderer Bedeutung. Unmittelbar nach Frakturgeschehen wird hier die Reparatur mit der inflammatorischen Phase eingeleitet (11, 20, 191). Das Frakturhämatom wird in dieser Phase von verschiedensten Entzündungszellen (18, 192) und inflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise IFN- γ und TNF- α , infiltriert (191). Im Folgenden konvertiert das Milieu im Hämatom und die pro-inflammatorische Phase wird durch eine anti-inflammatorische Gegenreaktion terminiert. Hierzu zählt die Hochregulation anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β (18) und die Eindämmung der adaptiven Immunreaktion durch regulatorische T-Zellen (17). Dies gilt als Voraussetzung für den Beginn der folgenden Revaskularisationswelle (18, 28). Da das Frakturhämatom somit den Rahmen für eine geregelte initiale Immunantwort darstellt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Entwicklung des Frakturhämatoms und eine möglicherweise dadurch veränderte Immunreaktion untersucht. 3 Tage nach

Osteotomie war das Frakturhämatom in der CD31 Gruppe noch großflächig im Osteotomiespalt erhalten, die histomorphometrischen Analysen ergaben 7 Tage nach Osteotomie einen signifikant größeren Flächenanteil des Hämatoms an der ROI in der CD31 Gruppe im Vergleich zur PBMC Gruppe. Die Ursachen und Bedeutung der Beobachtung, dass das Hämatom nach CD31⁺ Zellapplikation länger im Osteotomiespalt persistiert, sollen folgend diskutiert werden.

Der Erhalt des Hämatoms in dieser Arbeit muss in Abgrenzung zur Persistenz des Frakturhämatoms in anderen Studien gesehen werden, die die Frakturheilung in Tiermodellen untersuchten. In diesen wurden größere Residuen des Hämatoms zum Einen in Zusammenhang mit einer prolongierten Entzündungsreaktion gebracht (19, 42, 193): Schafe, bei denen im Verlauf einer physiologischen Knochenheilung das Primärhämatom durch zwischenzeitliche Interventionen entfernt wurde, wiesen zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt größere Rückstände eines nach der Intervention neugebildeten, sekundären Hämatoms auf (19, 42, 193). Durch den zwischenzeitlichen Eingriff wurde vermutlich ein zusätzlicher inflammatorischer Impuls gesetzt. Daher wurde der längere Erhalt von Hämatombestandteilen mit einer verlängerten Inflammationsphase assoziiert, die die Frakturheilung potentiell beeinträchtigt (18, 30, 193). Abweichend zum Vorgehen in diesen Versuchen wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch keine zwischenzeitliche Intervention durchgeführt. Damit kann weder ein sekundäres Hämatom entstanden, noch ein erneuter pro-inflammatorischer Stimulus gesetzt worden sein. Zudem wurden *anti*-inflammatorisch wirksame Zellen transplantiert. Eine prolongierte Inflammation ist trotz größerer Hämatomresiduen deshalb nicht zu erwarten. Dies korreliert mit im Frakturhämatom gemessenen Werten für die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α 7 Tage nach Osteotomie im gleichen Tiermodell: Beide Werte lagen in der CD31 Gruppe unter den Werten der PBMC Gruppe (22). In einer anderen Studie wurde die Persistenz des Frakturhämatoms im Tiermodell auf die Ruptur von Blutgefäßen aufgrund eines erhöhten Gewebedrucks bei instabiler Osteosynthese zurückgeführt (42). Da in der vorliegenden Arbeit die Osteotomieregion mit einem externen Fixateur versorgt und mit einer nicht-kritischen Osteotomiegröße gearbeitet wurde, ist dies als Ursache für die Persistenz des Hämatoms in den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls unwahrscheinlich.

10.3.2 Persistenz des Hämatoms durch immunregulative Wirkung auf Makrophagen

Makrophagen sind als Teil der angeborenen Immunität neben neutrophilen Granulozyten eine der ersten Zellpopulationen, die als Reaktion auf Zytokine (wie TGF- β) zur Frakturregion migrieren (16, 194). Die Funktionalität von Makrophagen für die Frakturheilung ist essentiell und ihr Fehlen oder ihre vollständige Blockade würde zu einer fehlerhaften Frakturheilung führen (195-197). Mit

der Ausschüttung weiterer Zytokine kurbeln sie zunächst die pro-inflammatorische Reaktion weiter an. Anschließend tragen sie durch Phagozytose von Zelldebris und nekrotischem Material (194, 198), der Stimulation von sowohl Angiogenese (16, 19) als auch EZM bildenden Fibroblasten (19, 199) zur Umwandlung des initialen, verletzungsbedingten Hämatoms in ein gut vaskularisiertes, fibröses Bindegewebe (= Granulationsgewebe) bei (194, 195). Makrophagen werden grob in einen nicht festgelegten M0-, pro-inflammatorischen M1- und anti-inflammatorischen M2-Phänotyp unterteilt, den sie abhängig von ihrem Umgebungsmilieu und stimulierenden Faktoren ausbilden („Polarisation“ der Makrophagen) (93, 200). Mit dem Beginn der Anti-Inflammation in der Hämatomphase befinden sich bei der physiologischen Heilung vor allem M2 Makrophagen im Frakturhämatom (19, 85, 195).

Makrophagen sind somit ein wichtiger Mitspieler bei der Organisation des Frakturhämatoms und des Matrix-Umbaus. Vor diesem Hintergrund könnte eine Regulation ihrer Aktivität mitverantwortlich für den längeren Erhalt des Frakturhämatoms in der CD31 Population sein.

CD31⁺ Makrophagen (die auch im artifiziellen Hämatom transplantiert wurden) zeigen eine abgeschwächte Immunreaktion auf Entzündungsreize (201). Die Gesamtheit der CD31⁺ Zellen kann darüber hinaus aber auch Einfluss auf die Immunreaktion der Zellen in ihrer Umgebung haben. Dies legen *in vitro* Experimente nahe, in denen Lipopolysaccharid-stimulierte CD14⁺ Makrophagen in Ko-Kultur mit CD31⁺ Zellen das anti-inflammatorische Zytokin IL-1RA (Interleukin-1-Rezeptor-Anatagonist) signifikant mehr sekretierten (100). Da auch lokale Entzündungszellen (benachbart zum Frakturspalt) nach Fraktur aktiviert werden und in den Osteotomiespalt einwandern (11), interagieren die transplantierten Zellen potentiell auch mit diesen ortsansässigen Zellen. Bei der Frakturheilung sind mindestens drei Typen von Makrophagen beteiligt, die ins transplantierte Hämatom einwandern können: inflammatorische Makrophagen, Makrophagen des Knochenmarks (Osteoklasten) und sogenannte osteale Makrophagen, die auch als „Osteomacs“ bezeichnet werden (195). Damit existiert eine Auswahl an Zellen, die am Abbau des Hämatoms grundsätzlich beteiligt sein und durch die Wirkung der CD31⁺ Zellen beeinflusst werden können. Darüber hinaus zeigten Experimente unserer Arbeitsgruppe, dass im Frakturhämatom gealterter Ratten, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit als Modell für eine beeinträchtigte Heilung dienten, 3 Tage nach Osteotomie M2 Makrophagen-typische Marker-Gene geringer exprimiert wurden als in jungen Tieren zum gleichen Zeitpunkt (188). Die Expression M1-typischer Marker (CD80, CCR7) war dagegen 3 Tage nach Osteotomie in den älteren Tieren erhöht (188). Pro-inflammatorische Makrophagen sorgen mit der Sekretion von MMPs zu Beginn einer Entzündungsphase für den Abbau

von EZM und Gewebstrümmern (194, 198, 202). Durch die CD31⁺ Zellen könnte deren pro-inflammatorische Antwort und damit auch die Sekretion von MMPs, die zur Matrixdegeneration führen, abgeschwächt worden sein. Durch die CD31⁺ Zellapplikation könnte somit eine Modulation der pro-inflammatorischen M1 Makrophagen die Hämatomresorption verzögert haben.

Der immunregulative Effekt der CD31 Population könnte damit das längere Bestehen des Hämatoms zunächst direkt *bedingen*. Eine längere Persistenz führt darauf aufbauend möglicherweise auch zu einer *längeren Wirkung* der dort agierenden, immunmodulierenden Zellen und Mediatoren, die die biologisch verzögerte Frakturheilung positiv beeinflussen können (siehe 10.3.3).

Welche Subpopulation der Makrophagen durch die CD31⁺ Zellen speziell beeinflusst wird und ab wann die Persistenz des Hämatoms auch zum Hindernis für eine erfolgreiche Heilung werden kann, müsste Gegenstand weiterer Forschung werden. Histologische Analysen zu späteren Zeitpunkten könnten Aufschluss über den Verlauf der Hämatomresorption geben. Um einen möglichen Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Polarisierung von Makrophagen zu evaluieren, könnte zunächst der Polarisierungstyp von Makrophagen nach Ko-Kultur mit CD31⁺ Zellen *in vitro* bestimmt werden. In *ex vivo* Versuchen könnte über die Bestimmung spezifischer Marker überprüft werden, welchen Effekt die CD31⁺ Zellapplikation auf die Makrophagen-Polarisierung zu verschiedenen Zeitpunkten der Frakturheilung hat. Diese scheint für einen erfolgreichen Heilungsverlauf entscheidend (85, 188, 203). Darüber hinaus könnten Genexpressionsanalysen von MMPs, die eine Bedeutung bei der Knochenheilung spielen, wie MMP-9,-13,-14,-2 (39, 62, 63, 204-207) 3 Tage nach Osteotomie folgen, um den Einfluss der CD31⁺ Zellen auf deren Aktivität in Zusammenhang mit dem Abbau des Frakturhämatoms zu evaluieren.

10.3.3 Mögliche anhaltende immunregulative und osteogene Effekte der CD31⁺ Zellen

Die Expression von CD31 durch Immunzellen reguliert nachweislich deren pro-inflammatorische Immunantwort. Privatsky et al. (182) beschrieben in ihrem Review die insgesamt supprimierende Wirkung CD31-exprimierender Zellen als Ergebnis von 3 wichtigen Teilmechanismen: (1.) Dämpfung der Leukozyten-Aktivierung (162, 165, 201, 208), (2.) Suppression der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ (166) und (3.) Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Endothels (209). In Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem nachgewiesen werden, dass CD31⁺ Zellen das anti-inflammatorische Zytokin IL-1RA sekretieren (99, 100). IL-1RA wird zugeschrieben, die Aktivität des IL-1 sowohl in lokalen als auch in systemischen Entzündungen zu reduzieren (210).

Eine Verbindung zwischen Immunsystem und Knochenheilung, bei der der immunregulative Effekt der CD31⁺ Zellen eine Rolle spielen könnte, stellen die sogenannten T_{emra} Zellen dar (*terminally differentiated CD8⁺ effector memory T-cells*). Reinke et al. (99) zeigten, dass eine verzögerte Knochenheilung mit erhöhten Konzentrationen dieser Zellen im peripheren Blut assoziiert ist und wiesen eine höhere Menge T_{emra} Zellen auch im Frakturhämatomen von Patienten mit verzögerter Knochenheilung nach. In *in vitro* Experimenten stellte die Arbeitsgruppe außerdem heraus, dass von T_{emra} Zellen sekretiertes IFN- γ und TNF- α konzentrationsabhängig die osteogene Differenzierung von menschlichen, aus dem Knochenmark stammenden MSCs negativ beeinflussten (99): Je höher die Konzentration von IFN- γ oder TNF- α in einem Medium mit BM-MSCs, desto weniger Calcium wurde von den Zellen gebildet. Dies wurde als Zeichen einer geringeren Differenzierung der MSCs in calciumbildende Osteoblasten gewertet. Diese Differenzierung ist bei der Frakturheilung jedoch essentiell. Sowohl IFN- γ als auch TNF- α inhibieren somit die Bildung von Knochengewebe, indem sie die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen hemmen.

Das CD31⁺ Molekül hat über verschiedene Mechanismen einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen und könnte so auch die Wirkung der T_{emra} Zellen regulieren und damit indirekt zu einer verbesserten Knochenheilung schon in frühen Phasen der Heilung beitragen: CD31 reduziert die Calciumausschüttung aus intrazellulären Kompartimenten von T-Zellen, die für deren Aktivierung notwendig ist (165). Über die Verstärkung der Wirkung von TGF- β auf T-Zellen, hemmt es ebenfalls deren pro-inflammatorische Immunantwort (211). Darüber hinaus wird die Bildung von immunologischen Synapsen zwischen T- und B-Zellen, wie sie für eine Ausweitung der adaptiven Immunreaktion notwendig wäre, durch CD31 verhindert und die Immunantwort damit wahrscheinlich abgeschwächt (212).

Wie bereits erwähnt, konnte in der Vorarbeit zu dieser Arbeit im gleich konzipierten Rattenmodell gezeigt werden, dass im Frakturhämatom 3 Tage nach Osteotomie die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ in der CD31 Gruppe im Vergleich zur PBMC Gruppe herunterreguliert war (22). Die Konzentration des Faktors TNF- α lag an Tag 7 nach Osteotomie ebenfalls tiefer als in der PBMC Gruppe (22). Es ist also anzunehmen, dass die CD31⁺ Zellen auch einem negativen Effekt der beiden Signalmoleküle auf die Knochenbildung entgegenwirken können. Darüber hinaus wurde in unserer Arbeitsgruppe *in vitro* ein positiver Effekt der CD31⁺ Zellen auf die Fähigkeit von MSCs, osteogene Matrix zu produzieren, nachgewiesen (100). Dieser spiegelte sich auch im Rattenmodell, das dem der vorliegenden Arbeit entspricht, wider: 6 Wochen nach Osteotomie lag sowohl radiologisch als auch histomorphometrisch der Anteil an mineralisiertem

Gewebe an der Osteotomie-region in der CD31 Gruppe signifikant über dem der PBMC Gruppe (22, 100). CD31⁺ Zellen haben somit vermutlich über die Dämpfung der Immunreaktion einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung während der Frakturheilung. Die Applikation der CD31⁺ Zellen kann neben der Verschiebung des inflammatorischen Milieus im Hämatom zusätzlich bedingen, dass Zellen mit einem negativen Einfluss auf die Frakturheilung (wie die T_{emra} Zellen) entfernt und durch die Transplantation neuer Immunzellen ersetzt werden (22). Da sich mit steigendem Lebensalter das Verhältnis zwischen CD31⁺ Zellen und T_{emra} Zellen im Hämatom zu Gunsten der T_{emra} Zellen verschiebt (100), könnte damit auch dieser Negativkorrelation zwischen den Zellen entgegengewirkt werden.

Durch das längere Bestehen des Hämatoms, in dem sich die beschriebenen immunmodulatorischen Vorgänge abspielen, könnten diese länger anhalten. Hierfür spricht auch der positive Trend der Bildung von mineralisiertem Gewebe an Tag 7 in der CD31 Gruppe in der vorliegenden Arbeit: Durch die Suppression pro-inflammatorischer Zytokine wird (wie oben dargelegt) die Bildung von Knochengewebe durch MSCs möglicherweise begünstigt. Da dieser Effekt an Tag 7 relativ gering ausgeprägt war (CD31: $1,70 \pm 0,65$ %; PBMC: $1,16 \pm 0,56$ %), müssen Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten folgen, die herausstellen, ob sich der positive Effekt ab Tag 7 von dort an kontinuierlich weiter auf die Knochenbildung auswirkt. Die oben dargelegten Ergebnisse der Vorarbeit 42 Tage nach Osteotomie im gleichen Tiermodell (22) legen einen konstanten Effekt auf die Mineralisierung jedoch nahe.

In der vorliegenden Arbeit nahmen Bereiche beginnender Chondrogenese in der PBMC Gruppe 7 Tage nach Osteotomie einen geringfügig größeren Anteil an der ROI ein als in der CD31 Gruppe (CD31: $1,79 \pm 2,11$ %; PBMC: $1,92 \pm 2,51$ %). Ein positiver Effekt auf die Chondrogenese lässt sich anhand quantitativer Analysen somit nicht bestätigen. Die morphologische Betrachtung der Histologie könnte jedoch von größerer Bedeutung sein, wie in den folgenden Abschnitten dargelegt wird.

10.4 CD31⁺ Zellapplikation verhindert einen unilateralen Markraumverschluss

Auf der Basis der natürlichen Entwicklung des Kallusgewebes während der Frakturheilung (siehe 6.3.3) sind die Unterschiede in der Bildung und Konfiguration von Knorpelgewebe zwischen beiden Versuchsgruppen von besonderem Interesse.

Bereits 3 Tage nach Osteotomie präsentierte sich der Markinhalt am Rande des Osteotomiespalts in der PBMC Gruppe kuppelartig und abgerundet, überzogen von einem granulations- oder bindegewebigen Saum (Abbildung 22). In der CD31 Gruppe durchzog den Osteotomiespalt noch großflächig das artifizielle Hämatom und grenzte an beide Femurfragmente an. Sieben Tage nach Osteotomie schien sich diese Entwicklung mit der Bildung von Knorpelgewebe zu manifestieren: Die Knorpelinseln in der PBMC Kohorte durchbauten die proximale Femurseite senkrecht zwischen beiden proximalen Kortizes. Damit schienen sie den Markraum zu verschließen. In der CD31 Kohorte ragte dagegen das Knorpelgewebe konusförmig über die Fragmentenden in den Osteotomiespalt hinein. Ratten, die 6 Wochen nach Durchführung einer 5 mm großen und damit kritischen Osteotomie des Femurknochens eine Pseudarthrose ausbildeten, zeigten in histologischen Untersuchungen 3 Wochen nach Operation ebenfalls einen Verschluss des Markraums (113). Eine kegelförmige Anordnung der Knorpelkonfiguration galt dagegen als Aktivitätszeichen der Femurseite. Vor diesem Hintergrund könnte auch der in der vorliegenden Arbeit beobachtete frühzeitige Verschluss des Markraums bereits Ausdruck eines nicht erfolgreichen Heilungsverlaufs sein.

Das Frakturhämatom stellt das Zentrum der ersten Reparaturprozesse nach Verletzung dar (19) und wird unmittelbar nach Frakturgeschehen von Zellen und Zytokinen infiltriert (18, 191, 192) (siehe 10.3.1). Dabei bildet sich mit der Reifung des Hämatoms ein bestimmtes Zytokinmuster aus, das für die Rekrutierung von Zellen zur Verletzungsregion und deren Aktivität vor Ort essentiell ist (19, 213). Zu diesen Signalfaktoren gehören beispielsweise HIF-1 α , VEGF, HMOX-1, CYR61 (*Cysteine-rich angiogenic inducer 61*), TGF- β 1, OPN (Osteopontin) und BMP-2 (18, 20, 42, 193). Das Expressionsprofil dieser Zytokine, die für die Inflammation, Angiogenese und Osteogenese während der Heilung wichtig sind (19), ändert sich natürlicherweise bereits im Verlaufe der ersten Tage nach Fraktur (18, 20, 42, 193). Ein Abweichen des Musters ist mit einer beeinträchtigten Heilung assoziiert (18, 20).

Da das Frakturhämatom Grundlage für die Etablierung des Zytokinmusters ist, das die Heilungsprozesse koordiniert (19, 213), führt ein vorzeitiger Abbau des Hämatoms notwendigerweise auch zum Fehlen der Signalstoffe und darüber zu einem beeinträchtigten Heilungsverlauf (19). Vor diesem Hintergrund könnte bereits 3 Tage nach Osteotomie der fortgeschrittene Abbau des Hämatoms in der PBMC Gruppe zu einer gestörten Expression der genannten Zytokine geführt und die Migration von Zellen in den Osteotomiebereich beeinträchtigt haben. Zu den normalerweise einwandernden Zellen gehören auch Makrophagen, die MMPs sekretieren (28, 61, 202). Diese

strukturieren den Frakturkallus maßgeblich mit: Ohne MMP-14 kann Knorpelgewebe im Rahmen der Knochenentwicklung nicht umgebaut werden und die Bildung eines reifen Knochengerüsts bleibt aus (204). MMP-2 ist darüber hinaus an der Rekrutierung von Osteoblasten beteiligt (205, 206). Unter anderem die Dysregulation von MMPs zu frühen Zeitpunkten könnte somit den Matrix-Umbau negativ beeinflussen. Dies könnte den Verschluss des Markraums in der PBMC Gruppe 7 Tage nach Osteotomie mit bedingen, der als Zeichen für einen verzögerten Heilungsverlauf interpretiert werden kann.

Denn von der initialen Phase nach Frakturgeschehen bis in die Remodellig-Phase hinein gelangen Signalfaktoren auch vom *Markraum* aus in die Frakturregion und koordinieren die Heilungsabläufe (19, 29). Zu ihnen gehören zum Beispiel BMPs, TGF- β 1, Angiopoetin 1 oder FGF (29). Auch VEGF ist im Knochenmark, das die Frakturregion umgibt, normalerweise hochreguliert und trägt zur Gefäßentwicklung in der Frakturregion bei (192). Zudem ist auch das Knochenmark Ursprung mesenchymaler Stromazellen (18, 29). Da diese zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren (18, 29), ist eine Migration dieser Zellen in die Frakturregion für die Wiederherstellung des Ursprungsgewebes essentiell. Wird der Markraum in Folge einer Versiegelung vom Osteotomiespalt separiert, verhindert dies möglicherweise die chemotaktische Rekrutierung von Vorläuferzellen, Wirkung von Signalfaktoren sowie Sekretion von Enzymen wie MMPs und damit insgesamt die regelrechte Gewebsneubildung. Es kommt zur beeinträchtigten Frakturheilung. Durch die Bildung eines unilateralen Markraumverschlusses 7 Tage nach der Osteotomie würde diese Entwicklung bereits in einem frühen Stadium festgeschrieben.

Ob die Größe des Residuums des Frakturhämatoms kausal für Unterschiede in Zellmigration und Expression von Signalfaktoren und Enzymen zu Beginn der Heilung ist, muss weiter untersucht werden. Eine vergleichende Bestimmung der genannten Faktoren (wie BMPs, TGF- β 1, MMPs) mittels qPCR zwischen 3 und 7 Tagen nach Osteotomie könnte diese Hypothese validieren. Eine geringere Expression der Gene zu früheren Zeitpunkten in der PBMC Gruppe würde dann als Ursache für den Verschluss des Markraums 7 Tage nach Osteotomie in dieser Gruppe in Betracht kommen. Ein positiver Effekt der CD31⁺ Zellapplikation auf die Signalgebung könnte umgekehrt durch Regulation des Abbaus des Hämatoms in der CD31 Gruppe erfolgt sein, in der 7 Tage nach Osteotomie die Umbauprozesse am proximalen Femurfragment aktiv schienen. In Genexpressionsanalysen der Vorarbeit wurde im gleichen Tiermodell eine höhere Expression von FGF-2 und vWF in der CD31 Gruppe im Vergleich zur PBMC Gruppe 3 Tage nach Osteotomie bereits festgestellt (22). Analysen anderer genannter Faktoren müssten folgen.

Hinsichtlich der *Auswirkungen* des Markraumverschlusses können Genexpressionsanalysen aus der Vorarbeit herangezogen werden, die 7 Tage nach Osteotomie bereits für einige der Faktoren und Enzyme durchgeführt wurden (22). Für die Expression von MMP-14,-2 und TGF- β 2 zeigte sich hierbei ein positiver Trend in der CD31 Gruppe im Vergleich zur PBMC Gruppe (22). Dies bestätigt nicht nur die gemutmaßte geringere Präsenz der Faktoren im Frakturhämatom von mit PBMC behandelten Tieren. In Hinblick auf die gemessenen MMPs deutet dies auch auf eine höhere Aktivität im Matrix-Umbau in der CD31 Gruppe hin. Dies korreliert mit den histologischen Befunden zu diesem Zeitpunkt, an dem die konusförmige Knorpelkonstellation auf eine Überbrückung des Osteotomiespalts hinwies (Abbildung 22). Dies müsste durch histologische Analysen zu späteren Zeitpunkten verifiziert werden. Die Hypothese stimmt jedoch mit der Beobachtung aus der Vorarbeit 42 Tage nach Osteotomie überein: Während die Tiere der PBMC Gruppe einen unilateralen Verschluss des Markraums zeigten, schien die Aktivität an den Kortexenden in der CD31 Kohorte hoch und eine erfolgreiche Überbrückung des Frakturspalts somit wahrscheinlich (Abbildung 7). Mittels Analyse spezifischer Zell-Oberflächenmarker für Chondroblasten und Osteoblasten, die im Verlaufe aus MSCs entstehen (18, 29), könnte aus Frakturhämatomen beider Gruppen darüber hinaus analysiert werden, ob der Verschluss des Markraums wie vermutet auch die Zellmigration von MSCs beeinträchtigt. Gegenstand weiterer Forschung müsste außerdem werden, wie die CD31⁺ Zellapplikation den Abbau des Hämatoms verzögert, aber parallel der Matrix-Umbau im Rahmen der chondralen Ossifikation „aktiv“ bleibt. Analysen der Expressionsmuster spezifischer MMPs, die unterschiedliche Funktionen bei der Frakturheilung haben, könnten möglicherweise darüber Aufschluss geben.

Zusammenfassend stimmen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen der Vorarbeit (22) zum späteren Zeitpunkt hinsichtlich der Ausbildung einer Pseudoarthrose überein. Die CD31⁺ Zellapplikation wirkt sich vermutlich über einen längeren Erhalt des Frakturhämatoms positiv auf das Zytokinmuster und damit auch die Zellmigration zu frühen Zeitpunkten der Heilung aus. Insgesamt hat dies einen positiven Effekt auf den Matrix-Umbau bereits zu frühen Heilungszeitpunkten.

10.5 Analyse der Bereiche nahe des Periosts

Sowohl in der PBMC-, als auch in der CD31-Kohorte fielen 7 Tage nach Osteotomie periostal, nahe des Osteotomiespalts, Bereiche mit grün-gelblich gefärbten Inseln auf. Diese könnten Ausdruck eines einsetzenden desmalen (intramembranösen) Ossifikationsprozesses im Verlaufe der

Frakturheilung sein und waren zum frühen Zeitpunkt, 3 Tage nach Osteotomie, noch nicht nachweisbar (Abbildung 22). Bereits mineralisiertes Gewebe als Ausdruck eines direkten Verknöcherungsprozesses müsste analog zu den Kortizes bei der Movat-Pentachromfärbung gelb angefärbt werden. Grünlich angefärbtes Gewebe wird dagegen als Knorpelgewebe interpretiert. Die Uneindeutigkeit des Färbeergebnisses wirft die Frage auf, welche Art des Ossifikationsprozesses in der beschriebenen Region am ehesten stattfindet.

Auf der einen Seite sprechen die Lokalisation und der Zeitpunkt, zu dem das genannte Gewebe sichtbar wird, dafür, dass die gelb-grünlichen Inseln Ausdruck eines desmalen Heilungsprozesses sein könnten, wie er in der einschlägigen Literatur zur Knochenheilung bereits beschrieben wird: Die intramembranöse Ossifikation bei Nagern beginnt zwischen Tag 3 und 5 nach Fraktur, die Ergebnisse dieses Prozesses könnten deshalb an Tag 7 bereits gut sichtbar sein (183). Außerdem werden als Ort der desmalen Verknöcherung der subperiostale Raum und das Weichteilgewebe in unmittelbarer Umgebung des Frakturspalts propagiert (8), was mit den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls vereinbar ist. Im Periost befinden sich bereits Osteoprogenitorzellen, die Initiatoren der intramembranösen Ossifikation sind. Über BMPs wird die Differenzierung dieser Zellen in Osteoblasten und die von MSCs in Osteoprogenitorzellen angeregt (8). Vor diesem Hintergrund könnte es sich in den Ergebnissen um Färbefaktoren handeln, die nicht die Herkunft und Beschaffenheit des Gewebes widerspiegeln, bei dem es sich eigentlich um desmal gebildetes Knochengewebe handelt. Auf der anderen Seite erscheint die Struktur des Gewebes ähnlich der Formation von Knorpelgewebe zwischen den Osteotomieenden und könnte deshalb ebenfalls Ausdruck eines enchondralen Verknöcherungsprozesses sein, bei dem über Knorpelgewebe erst im Verlauf Knochengewebe entsteht. Zwar findet diese Art der Ossifikation im Rahmen der Frakturheilung vor allem im Frakturspalt zwischen den Kortextenden statt (8), doch sprechen die Farbe des Gewebes und die Struktur dafür, dass auch an dieser Stelle enchondrale Verknöcherung stattfinden könnte. Eine große Bandbreite an Vorläuferzellen, die für die Knochenneubildung notwendig sind, lokalisieren im Periost. Jedoch wird durch sie nicht ausschließlich desmale Ossifikation induziert: Zellen migrieren ausgehend vom Periost auch ins Frakturhämatom und differenzieren dort zu Chondrozyten, womit das Periost auch Ausgangszellen für die enchondrale Ossifikation bereit stellt (14). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Arealen um Knorpelareale handelt, die erst im Verlaufe verknöchern und somit enchondrale Ossifikation stattfindet.

Die Histomorphometrie ergab im Mittel nahezu den gleichen Anteil der periostalen Gewebeeinseln an der ROI in den jeweiligen Populationen (CD31: $1,83 \pm 1,29$ %; PBMC: $1,82 \pm 0,86$ %),

wodurch ein positiver Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die peripherer stattfindenden Prozesse der Frakturheilung zu diesem Zeitpunkt nicht erkennbar war.

10.6 Interpretation des Anteils an Bindegewebe an der ROI

Bei der Interpretation des Anteils an Bindegewebe an der ROI muss beachtet werden, dass in der Frühphase der Heilung ein bindegewebig-fibröses Granulationsgewebe natürlicherweise entsteht (19) und es sich hierbei nicht ausschließlich um *fibröses* Bindegewebe handelt, wie es nach Ausbildung einer Pseudarthrose nachweisbar ist (49, 214). Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden jedoch unter Berücksichtigung von Vorarbeiten interpretiert, in denen eine größere Menge fibrotischen Bindegewebes mit einer biologisch verzögerten Knochenheilung einherging (22). Es soll im Folgenden erörtert werden, ob eine größere Menge an Bindegewebe möglicherweise in Zusammenhang mit bereits frühzeitig ablaufenden fibrotischen Prozessen stehen könnte.

10.6.1 Fibröses Bindegewebe in Pseudarthrosen

Knochengewebe besitzt das Potential einer Regeneration ad integrum, d.h. einer vollständigen Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebetyps nach Verletzung (7). Die Ausbildung von Pseudarthrosen ist nachweislich mit einer vermehrten Bildung von fibrösem Bindegewebe im Frakturspalt assoziiert (49, 214, 215). Vorstudien unserer Arbeitsgruppe stellten in diesem Zusammenhang bereits fest, dass in den mit PBMC behandelten Ratten 42 Tage nach Osteotomie ein signifikant höherer Anteil an Bindegewebe in der ROI nachzuweisen war, als in der CD31 Population (22). In erst genannter Gruppe führte die Applikation von PBMC in den Osteotomiespalt 6 Wochen postoperativ zur beeinträchtigten Frakturheilung (100, 136), weshalb der höhere Anteil von Bindegewebe mit der Entstehung der Pseudarthrosen in Verbindung gestellt und als größtenteils fibröses Bindegewebe interpretiert wurde (22).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil an Bindegewebe an der ROI in der jeweiligen Versuchsgruppe quantifiziert um herauszufinden, ob sich schon zu einem frühen Zeitpunkt eine beeinträchtigte Heilung durch einen größeren Anteil an Bindegewebe an der ROI abzeichnet. 7 Tage nach Osteotomie lag dabei der Anteil an Bindegewebe in der PBMC Gruppe signifikant über dem Anteil an Bindegewebe in der CD31 Gruppe (CD31: $80,96 \pm 3,27$ %; PBMC: $91,44 \pm 2,80$ %). Im Folgenden soll zunächst ein Überblick über die Mechanismen gegeben werden, die zur Gewebsfibrose führen, um dann die Bedeutung fibrotischen Gewebes im Kontext der frühen Stadien der Frakturheilung zu analysieren.

10.6.2 Entstehung von Fibrose allgemein: Mechanismen und Zellen

Die Entstehungsmechanismen von Fibrose sind komplex. Im Rahmen einer Gewebsschädigung jeglicher Genese (so auch bei mechanischen Verletzungen wie beim Knochenbruch), kommt es initial zur Ausschüttung von Zytokinen, die Zellen des Immunsystems anlocken und aktivieren (216, 217). Diese unterstützen über Signalmoleküle auch die Bildung von Bindegewebe, welches das normale Organparenchym (je nach Gewebe zumindest zeitweise) ersetzt (216, 217). Gerät die Stimulation der Zellen, die für die Produktion von Bindegewebe zuständig sind, jedoch außer Kontrolle, kommt es zur überschießenden Ablagerung von Bestandteilen der EZM und damit zur Bildung von bleibendem Narben- bzw. fibrösem Gewebe (216-218). In der Literatur werden zwei Zellpopulationen als Hauptakteure bei der Entstehung von Narbengewebe angesehen: Makrophagen und Myofibroblasten.

Nach der Beendigung der ersten inflammatorischen Reaktion konvertiert die Wundregion nach Gewebsverletzung zu einem Milieu, in dem vor allem anti-inflammatorische (M2-) Makrophagen mit der Ausschüttung einer Reihe pro-fibrotischer Signalstoffe für den Beginn der Wundheilung sorgen (61). Von ihnen in großer Menge sekretiertes TGF- β 1 aktiviert ortsansässige Fibroblasten und führt zu deren Umwandlung in EZM-bildende, α -SMA-exprimierende Myofibroblasten (217). Darüber hinaus stimuliert es sie zur Synthese von fibrillärem Kollagen und fördert die Produktion von gewebsassoziierten Hemmstoffen von Metalloproteinasen (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs), wodurch der Abbau der EZM vermindert wird (61, 219, 220). Von Makrophagen gebildetes PDGF gilt ebenfalls als pro-fibrotischer Faktor, da es die Proliferation von EZM bildenden Myofibroblasten stimuliert (221). Mit der Produktion von MMPs und TIMPs steuern Makrophagen auch unabhängig von Myofibroblasten den Umsatz der EZM (217). Über die Sekretion spezifischer Signalmoleküle locken sie darüber hinaus TH₂ Zellen an, die ihrerseits nach Antigenpräsentation eine Reihe pro-fibrotischer Zytokine sezernieren, die wiederum zur Ausschüttung von TGF- β 1 aus Makrophagen führen (222-224). Das Signalmolekül IL-4 ist bei der Entstehung einer Gewebsfibrose von besonderer Bedeutung (225) und steht in enger Verbindung mit der pro-fibrotischen Aktivität von Makrophagen: IL-4 wird bereits in der initialen Entzündungsphase von den dort agierenden Immunzellen gebildet (226, 227) und regt Makrophagen an, Vorläuferverbindungen (Polyamine und Kollagene) der EZM zu produzieren (228). Eine Inhibition der IL-4 Wirkung konnte in mehreren Studien bereits mit einer reduzierten Bildung von Narbengewebe in Verbindung gebracht werden (229, 230).

10.6.3 Effekt der CD31⁺ Zellen auf die klassischen Signalwege der Fibrosierung fraglich

Die enge Beteiligung von Makrophagen an der Wundheilung legt nahe, dass eine unbalancierte Aktivität von insbesondere M2 Makrophagen auch bei der Knochenheilung zu einer überschüssigen Bildung von fibrösem Bindegewebe führen könnte. Diese ist mit der Entstehung einer Pseudarthrose assoziiert (49, 214, 215). Der Wechsel von einem pro- in ein anti-inflammatorisches Milieu zu Beginn der Frakturheilung bringt auch einen Wechsel im Phänotyp der Makrophagen mit sich, sodass sich während der ersten Tage der Frakturheilung bereits gehäuft M2 Makrophagen im Frakturhämatom ansammeln (19, 85, 195), die analog der oben beschriebenen Prozesse potentielle Initiatoren der fibrotischen Reaktion sein könnten. Ein möglicher positiver Einfluss der CD31⁺ Zellapplikation auf die Entstehung von Fibrose wäre demnach in ihrer Wirkung auf M2 Makrophagen zu suchen.

Protein- und Genexpressionsanalysen einiger der oben genannten pro-fibrotischen Signalfaktoren (IL-4, PDGF) spiegelten einen anti-fibrotischen Effekt im Sinne einer niedrigeren Expression dieser Faktoren in Folge der Transplantation von CD31⁺ Zellen jedoch nicht wider: 7 Tage nach Osteotomie lagen die Werte in der CD31 Gruppe über denen der PBMC Gruppe (22). Ein direkter Effekt des CD31 Moleküls auf die Aktivität der M2-Makrophagen ist damit fraglich, auch, wenn Genexpressionsanalysen des Hauptmediators TGF- β 1 in Folgestudien noch genaueren Aufschluss geben könnten. Da die genannten Faktoren gleichzeitig anti-inflammatorisch (IL-4, TGF- β) (28) und pro-angiogen (PDGF) (22, 56) wirksam sind, kann sich deren Hochregulation zu frühen Zeitpunkten sogar positiv auf die Knochenheilung auswirken (18). Die Stimulation von M2 Makrophagen mit IL-4 (und IL-13) wurde in einem murinen Osteotomiemodell darüber hinaus mit einem verbesserten Heilungserfolg assoziiert (85).

Dass die bis dato gesicherten Erkenntnisse über die allgemeine Entstehung von Fibrose auch zu frühen Phasen der Knochenheilung eine Rolle spielen, ist somit unwahrscheinlich. Daher ist fraglich, ob die höhere Menge an Bindegewebe zu frühen Zeitpunkten in der PBMC Gruppe bereits Ausdruck einer überschießenden Bildung von Bindegewebe im Rahmen einer beeinträchtigten Knochenheilung ist. Es könnte sich auch um fibröses Granulationsgewebe handeln, das in der frühen Phase der Heilung natürlicherweise gebildet wird (1, 15, 19). Studien, in denen die Mechanismen von Geweberegeneration nach Gewebsverletzung analysiert wurden (231), weisen darauf hin, dass sich erst im *Verlaufe* des Heilungsprozesses entscheidet, ob es durch eine zunehmende Kontraktion des Gewebes und Bildung von überschüssiger EZM zur Fibrose kommt, oder ob die Regeneration gelingt. Ein beeinträchtigter Heilungsverlauf könnte somit auch in der PBMC

Gruppe nicht direkt von Beginn an anhand des analysierten Bindegewebes sichtbar sein, sondern sich erst im Verlauf zwischen 7 und 42 Tagen nach Osteotomie zeigen. Es müssten histologische Untersuchungen zu Folgezeitpunkten durchgeführt werden, um den Zeitpunkt zu identifizieren, an dem die Heilung einen irreversiblen Entwicklungsverlauf hin zur fibrösen Pseudarthrose nimmt. Möglicherweise kann dadurch auch auf das Zeitfenster geschlossen werden, in dem eine CD31⁺ Zellapplikation erfolgen sollte, um den Heilungsverlauf noch positiv zu beeinflussen.

Um Fehler bei der Gewebeanalyse auszuschließen, könnten immunhistologische Verfahren helfen, Myofibroblasten als Hauptakteure im als Bindegewebe klassifizierten Gewebe nachzuweisen und dieses als solches zu identifizieren. Unter der Annahme, dass das analysierte Gewebe tatsächlich Indikator für eine beeinträchtigte Heilung ist, müssten neben den dargestellten klassischen Signalwegen (IL-4, IL-13, TGF- β) andere aufgedeckt werden, die in der PBMC Kohorte zur vermehrten Bildung von fibrotischem Bindegewebe geführt haben, da diese in den frühen Phasen der Knochenheilung unwahrscheinlich sind. Umgekehrt müssten die Mechanismen entschlüsselt werden, die die Menge an fibrotischem Bindegewebe in der CD31 Population bereits zum Heilungsbeginn reduziert haben.

10.6.4 Mögliche Wirkung der CD31⁺ Zellapplikation auf Fibrose zu frühen Zeitpunkten

Eine Erklärung, wie durch Transplantation der CD31⁺ Zellen auch zu frühen Zeitpunkten die Bildung von fibrösem Bindegewebe verhindert worden sein kann, liefern Versuche, in denen mit PECAM-1 Knockout-Mäusen die Entstehung von Lungenfibrose untersucht wurde (232, 233). Es wird angenommen, dass in diesen Tieren Makrophagen über Mikroblutungen Eisenbestandteile aufnehmen, die sie anschließend Fibroblasten zur Kollagensynthese zur Verfügung stellen. Über diesen Mechanismus tragen sie möglicherweise zu einer unangemessenen Reparaturreaktion im Sinne einer Gewebsfibrose bei (232, 233). Die Forscher nehmen an, dass das CD31 Molekül in Wildtyp-Mäusen dagegen die vaskuläre Integrität positiv beeinflussen und Mikroblutungen verhindern kann (232). Diese Vermutung stellt interessanterweise die pro-angiogenen Eigenschaften der CD31⁺ Zellen (155, 156, 209) in Zusammenhang mit einer möglichen anti-fibrotischen Wirkung. Zum einen könnten im Frakturhämatom der CD31 Gruppe angereicherte CD31⁺ endotheliale Progenitorzellen, die über PECAM-1 Zell-Zell-Kontakte knüpfen (155) und die Permeabilitätsbarriere des Endothels bilden (156), auch im Rahmen der Knochenheilung zu einer höheren vaskulären Integrität neugebildeter Gefäße beitragen. Zum anderen könnten die in der Vorarbeit zu frühen Zeitpunkten gemessenen pro-angiogenen Faktoren (22) (10.2) sich positiv auf die vaskuläre Integrität auswirken, auch, wenn eine Wirkung sich nicht in einer erhöhten *Anzahl* der Gefäße

im Vergleich zur PBMC Gruppe zeigte. Damit würde die Transplantation der CD31⁺ Zellen der Entstehung von Fibrose und möglicherweise daraus resultierender Pseudarthrose als Konsequenz von Mikroblutungen entgegen wirken.

10.7 Limitationsanalyse der Arbeit

Im Folgenden sollen die Limitationen der Arbeit vor allem hinsichtlich methodischem Vorgehen dargelegt und diskutiert werden.

10.7.1 Versuchstiere: Tiermodell und Anzahl der Versuchstiere

Tiermodelle sind notwendig, um grundlegende biologische Zusammenhänge zu untersuchen und darauf aufbauend Erkenntnisse auch für den Menschen zu gewinnen. Die einfache Beschaffung von Nagetieren, geringe Kosten bei der Haltung und die Verfügbarkeit passender Materialien bei der anschließenden Probenaufarbeitung (z.B. Antikörper) sind Gründe für die experimentelle Verwendung dieser Tiere (234). Auch für orthopädische Fragestellungen hat sich als Tiermodell die Ratte bewährt (214, 235, 236) und wurde deshalb auch hier als Versuchstier herangezogen. Das exakte Tiermodell dieser Arbeit wurde von Preininger et al. etabliert (171), das Fixationsmodell stammt von Strube et al. (170). Sie begründeten ein geeignetes Modell für biologisch verzögerte Knochenheilung allein anhand der Faktoren Alter, Geschlecht und Gebärfähigkeit. Damit wurden bisherige Methoden (instabile Fixierung, kritische Osteotomiegröße), die über nicht-biologische Mechanismen zu einer Pseudarthrose führen, umgangen. Stattdessen rückten Faktoren, die natürlicherweise zu einem geringeren Heilungspotential und einem erhöhten Frakturrisiko führen, in den Fokus. In ihrer Studie bestätigten Preininger et al. die Hypothese, dass bei 12 Monate alten, weiblichen Ex-Breeder Sprague-Dawley Ratten, die mindestens 3 mal geworfen hatten, eine 2 mm breite Osteotomie, stabilisiert mit einem Fixateur Externe, 6 Wochen nach Operation in einer Pseudarthrose mündet, appliziert man ein natürliches Blutgerinsel, in dem keine zusätzlich therapeutisch angereicherten Zellen vorhanden sind. Vor diesem Hintergrund eignet sich das Tiermodell für die Untersuchung von Therapien, die eine beeinträchtigte Heilung positiv beeinflussen sollen. Die Applikation eines mit PBMCs angereicherten Hämatoms in den Osteotomiespalt führt zu vergleichbaren Ergebnissen, wie die Behandlung mit einem natürlichen Blutgerinsel (100, 136). Deshalb wurde in der unmittelbaren Vorarbeit, auf der diese Arbeit aufbaut, die PBMC Gruppe als Kontrollpopulation gewählt. Damit wurde vermieden, dass ein eventuell positiver Effekt der

CD31⁺ Zellen auf Gründe zurückgeführt wird, die mit einer Zell-Transplantation an sich assoziiert sind (100). Dementsprechend wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfahren.

Eine höhere Zahl an Versuchstieren wäre wünschenswert gewesen, um allgemeinere deskriptive Aussagen über die Gewebemorphologie zu treffen und um ein statistisch aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten. Gleichzeitig sollte aus tierschutzrechtlichen Gründen versucht werden, die Zahl der euthanasierten Tiere auf das kleinst mögliche Maß zu reduzieren.

10.7.2 Stark vaskularisiertes Muskelgewebe beeinflusste die Gefäßzählung

Unter Zuhilfenahme einer fest definierten ROI 1 für die Gefäßzählung fiel auf, dass die Höhe der Gefäßanzahl vor allem mit der Menge an Muskelgewebe korrelierte, das in die ROI bzw. den Osteotomiespalt hineinragte (siehe Definition der ROI bei der α -SMA Färbung). Die Bedeutung von Muskelgewebe kann aufgrund seiner Eigenschaften grundsätzlich als positiv für die Frakturheilung eingeschätzt werden: Durch die Nähe zum Knochen bzw. einer Fraktur, trägt es durch die reiche Vaskularisierung zur lokalen Blutversorgung bei (237, 238), womit die hohen Differenzen bei den verschiedenen Varianten der Gefäßzählung erklärbar sind. Darüber hinaus wird Muskelgewebe als Quelle für osteogene Stammzellen diskutiert, die vor allem dann relevant zu werden scheint, wenn das Periost als größte Herberge von Knochenvorläuferzellen im Rahmen einer schweren Verletzung beschädigt wird (237). Um jedoch sicherzustellen, dass im Osteotomiespalt neugebildete Gefäße betrachtet werden, deren Synthese durch die Applikation der transplantierten Zellen stimuliert wurde, wurde das Muskelgewebe samt Gefäßen aus der Zählung ausgeklammert. Die im Muskelgewebe vorhandenen Gefäße haben zwar potentiell Einfluss auf die gesamte Heilung. Da das Muskelgewebe jedoch intakt ist, sind die dort ansässigen Gefäße wahrscheinlich nicht mit der Zelltherapie assoziiert und wurden deshalb von der Analyse ausgeschlossen.

10.7.3 Diskussion der Etablierungen der α -SMA Färbung

Da das Ausmaß der Etablierung nicht zu Beginn ersichtlich war, wurden für diese zunächst unsystematisch Schnitte verwendet, die unbrauchbar für eine spätere Färbung waren. Im Nachhinein wäre es mit dem Wissen über die Schwierigkeiten im Etablierungsprozess sinnvoller gewesen, Schnitte von nur einem Tier anzufertigen und alle Probefärbungen daran zu testen, um sie besser vergleichen zu können. Am besten wäre es außerdem gewesen, die Etablierungen an Tieren durchzuführen, die zu einem Zeitpunkt getötet wurden, zu dem mit großer Sicherheit schon Gefäße in der ROI aufzufinden sind (Tötungszeitpunkt > 7 Tage). Ob eine Färbung erfolgreich war, konnte

zwar durch die Färbung von Gefäßen im umliegenden Muskelgewebe verifiziert werden. Da die Färbung neu entstandener Gefäße möglicherweise aber von diesen abweicht, wäre es wünschenswert gewesen, Gefäße in der ROI nachzuweisen.

10.7.3.1 Spezifität von α -SMA als Gefäßmarker

In eukaryotischen Zellen existieren 4 verschiedene Actin-Protein-Isoformen: 2 vaskuläre (α - und γ -SMA) und 2 β - und γ -cytoplasmatische Actine (239). α -SMA wird durch das ACTA-2 Gen kodiert und ist die Actin-Isoform, die vorherrschend in den glatten Muskelzellen von Gefäßwänden vorkommt (239), weshalb es sich gut als Gefäßmarker eignet.

Die Endothelzellen der Gefäße werden meist von zwei verschiedenen die Gefäßwand bildenden Zelltypen umkleidet: Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen (vSMCs, *vascular smooth muscle cells*) (240). Beide sind sich sowohl histologisch als auch biochemisch sehr ähnlich und deshalb nur mit sehr spezifischen Markern voneinander zu unterscheiden (241). Kapillaren und post-kapilläre Venolen sind ausschließlich von Perizyten umgeben und weisen keine vSMCs auf (34, 241). Gefäße höherer Ordnung (Arteriolen, präkapilläre-Arteriolen und Venolen) werden dagegen immer auch von vSMCs umschlossen (241), welche als Bestandteil ihres kontraktilen Apparats, der der Kontraktion der Gefäßwand dient, α -SMA beherbergen und deshalb mittels α -SMA-Antikörper markierbar sind (242-244).

Im finalen Schritt der Angiogenese werden erste neu entstandene, kleine Kapillaren von Perizyten umschlossen, die ihnen als stützendes Gerüst dienen (34). Um diese kleinsten Gefäßäste mit der α -SMA Färbung ebenfalls anzufärben, müssten also auch Perizyten α -SMA positiv sein. Zwar wird in der Literatur bereits länger über Perizyten als Mitspieler des kontraktilen Apparats des Gefäßsystems und damit darüber, ob sie α -SMA beherbergen, diskutiert (243), hierzu sind in der Literatur jedoch immer noch keine abschließenden Aussagen zu finden. In pre-kapillären Arteriolen und post-kapillären Venolen scheint die Existenz α -SMA-positiver Perizyten bereits seit 1991 gesichert, deren Vorkommen an den tatsächlichen Kapillaren jedoch noch zweifelhaft (245). Daneben zeigen neuere Forschungsergebnisse jedoch, dass Perizyten auf retinalen Mauskapillaren ebenfalls α -SMA exprimieren (246). Außerdem wird postuliert, dass ruhende Perizyten kein α -SMA bilden, während die Detektion von α -SMA positiven Perizyten vor allem in pathologischen Kontexten wie Tumorgenese, Gewebsfibrose und Entzündungsreaktionen eine Rolle zu spielen scheint (247, 248). Ob die Ergebnisse der Forschungen an Mausretinagefäßen für die hier vorliegende Arbeit gelten, ist nicht ohne zusätzliche histologische und biochemische Experimente, die

α -SMA auch in Perizyten auf Kapillaren des Skelettsystems nachweisen, zu beurteilen. Es muss daher angenommen werden, dass Gefäße in einem sehr frühen Stadium, wenn sie ausschließlich von Perizyten umschlossen sind, durch die α -SMA Färbung möglicherweise nicht markiert werden konnten. Dies hat zum einen zur Folge, dass eventuell nur neu entstandene Gefäße *höherer* Gefäßformationen mit in die Auswertung eingingen. Zum anderen ist α -SMA unabhängig vom Alter der Gefäße in den vSMCs von *allen* Gefäßen höherer Ordnung nachzuweisen. Dies bedeutet, dass auch Gefäße angefärbt wurden, die möglicherweise als Detritus nach Osteotomie noch sichtbar waren, ohne noch eine Versorgungsfunktion für die Frakturheilung zu haben. Da aus der Analyse der Färbungen keine objektivierbaren Parameter für ausschließlich neu entstandene Gefäße ableitbar waren (bspw. zu Gefäßkaliber, Lokalisation, Farbeintensität, siehe Deskriptive Auswertung der α -SMA Färbungen) wurden alle in der ROI markierten, integren Gefäße gezählt. So kann zwar eine Aussage über die Quantität der Gefäße getroffen werden, jedoch nicht zu deren Qualität und Beitrag zur Frakturheilung, da weder beurteilbar war, ob sie Produkt einer neu einsetzenden Angiogenese waren, noch, ob sie ihrer Funktion noch nachkommen können.

10.7.3.2 Diskussion der unterschiedlichen Färbeansätze

Im Rahmen der Etablierungsprozesse für die immunhistochemische Gefäßfärbung auf Kryoschnitten sollte versucht werden, eine Balance zwischen unspezifischem Hintergrund einerseits und einer spezifischen Gefäßfärbung andererseits zu finden. Um dies zu leisten, wurden diverse Schritte im Färbeprotokoll modifiziert (siehe Allgemeiner Ablauf der Immunhistochemie) Ziel jeder Fixierung ist es, die Morphologie des histologischen Präparats möglichst originalgetreu zu erhalten. Die Behandlung von Proben mit PFA dient der Vernetzung von im Präparat vorhandenen (zellulären) Strukturen mit dem Fixierreagens und sorgt darüber für den Erhalt (die „Fixierung“) dieser Strukturen auch nach Trennung des Gewebes vom lebenden Organismus (249). Je feinmaschiger die Vernetzungen des Reagens mit den Strukturen des Präparats, desto besser bleiben diese erhalten. Gleichzeitig führen die Vernetzungsreaktionen jedoch auch zur Blockade von Bindungsstellen, an die ein Primärantikörper im Rahmen der Immunhistochemie anschließend nicht mehr binden kann (= „Maskierung“ der Antigene) (249). Dies hätte zur Folge, dass ein gesuchtes Antigen, wie α -SMA in der vorliegenden Arbeit, nicht durch den Primärantikörper detektiert werden kann und die Färbung ungenau wird. Da auch im Rahmen dieser Arbeit eine Fixierung mittels PFA sowohl direkt nach Entnahme, als auch teilweise kurz vor der Färbung durchgeführt wurde, war es sinnvoll, den Effekt der **Antigendemaskierung** durch Hitzebehandlung mit Hilfe eines Druckkochtopfes zu evaluieren. Im Dampfdruckkochtopf wird feuchte Hitze erzeugt, die um 100° C bei

pH-Werten von 1-10 zur erhöhten Permeabilität des fixierten Gewebes führt, wodurch zuvor ver-netzte Epitope auf den Schnitten freigelegt werden, die ein anschließend applizierter Antikörper wieder detektieren kann (HIER-Methode, *heat induced epitop retrieva*) (249). Die genauen Wirk-mechanismen sind noch nicht erforscht. Die Antigendemaskierung führte trotz Antikörperverdün-nung von 1:100 (in Kombination mit anderen Modifikationen im Färbeprotokoll) jedoch nicht zu einer spezifischeren Gefäßfärbung. Im Gegenteil traten sogar Artefakte im Sinne einer unvollständigen Anfärbung von Gefäßen auf (Abbildung 18 A). Dies lässt vermuten, dass die Kryopräparate bzw. deren Fixierung auf einem Kryofilm, für diese Methodik zu sensibel und instabil und daher ungeeignet sind. Der Demaskierungsschritt wurde vor diesem Hintergrund verworfen. Da die wei-teren Modifikationen im Färbeprotokoll (Levamisol-Zugabe und endogener Biotin-Block) an anderen Stellen zur Qualitätssteigerung der Färbung ansetzen, ist es unwahrscheinlich, dass diese den Antigendemaskierungsschritt beeinträchtigt haben.

Da die Verwendung von 2 %igem **Normalserum** nur in Kombination mit einem endogenen Bio-tin-Block und gleichzeitiger Levamisol-Applikation zur Reduktion von unspezifischem Hinter-ground führte (Abbildung 18 A), ohne diese Zusätze jedoch auch bei niedrigerer Antikörperkon-zentration ein stark gefärbter Hintergrund zu konstatieren war (Abbildung 18 B), wurde gemutmaßt, dass eine höhere Konzentration des Serums von 5 % zu einer breiteren Blockade von nicht gesuchten Antigenen führen und dadurch die unspezifische Hintergrundfärbung zusätzlich abgeschwächt würde. Normalserum enthält Antikörper, die unspezifische Strukturen im Präparat binden und somit Antigene besetzen, die eine unerwünschte Bindung dieser Strukturen durch die anschließend zugegebenen Primär- und Sekundärantikörper verhindern (250). Neben Antikörpern sind auch Albumin und andere Proteine in Normalserum vertreten, die ebenfalls unspezifische Proteinbindungen eingehen können und eine fälschliche Bindung durch Primär- und Sekundäran-tikörper reduzieren (250). Bei der Kombination von 5 %igem Normalserum und endogenem Bio-tin-Block (Abbildung 18 D) erschienen die Schnitte nur leichtgradig stärker angefärbt als bei zu-sätzlicher Levamisolgabe (Abbildung 18 A), jedoch reduzierte sich der Hintergrund stark im Vergleich zu den unbehandelten Präparaten (Abbildung 18 B), weshalb 5 %iges Normalserum Einzug in das etablierte Verfahren erhielt.

Da in dieser Arbeit das gesuchte Antigen mittels Avidin-Biotin-basierter Methode sichtbar ge-macht wurde, kam als Ursache für eine verstärkte Hintergrundfärbung auch die Bindung von **en-dogenem Biotin** durch das Avidin des Avidin-Biotin-Komplexes in Frage. Auch, wenn als bio-tinreiche Gewebe vor allem Leber, Niere, Darm und lymphatisches Gewebe gelten (249, 251)

sollte einem ungenauen Färberesultat durch einen endogenen Biotin-Block vorgebeugt werden, da zum einen Biotin auch in Knochen- und Knorpelzellen nachgewiesen werden konnte (252), zum anderen durch die Methode der Kryoeinbettung möglicherweise mehr endogene Moleküle (wie Biotin und alkalische Phosphatase) aktiv bleiben (253). Der endogene Biotin-Block erwies sich im Rahmen der Etablierungsversuche als nützlich, um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren. In Versuchen, in denen er ausgelassen wurde (Abbildung 18 B) erschienen die Präparate dunkel und von intensiver Hintergrundanfärbung begleitet. Der Zwischenschritt des endogenen Biotin-Blocks wurde deshalb Teil des etablierten Verfahrens.

Neben endogenem Biotin kann auch das Vorhandensein **endogener Enzyme** die Anfärbung von unspezifischem Hintergrund bedingen. Diese können neben dem mit dem AB-Komplex zugegebenen Enzym das Chromogen im Rahmen der Farbstoffentwicklung ebenfalls umsetzen und darüber zu falsch positiven Färbungen führen (249). In Knochengewebe ist natürlicherweise die alkalische Phosphatase vorhanden, weshalb überprüft wurde, ob ihre Aktivität einen Effekt auf die Färbung hat. Dazu wurde manchen Schnitten Levamisol zugegeben, das spezifisch die endogenen alkalischen Phosphatasen im Präparat, nicht aber die mit dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex hinzugegebenen, blockiert (254). In Kombination mit einem endogenen Biotin-Block erschien die Applikation von Levamisol zunächst vielversprechend (Abbildung 18 A), bei alleiniger Applikation von Levamisol ergaben die Probeschnitte jedoch auch trotz einer höheren Verdünnung des Primärantikörpers erneut einen intensiver angefärbten Hintergrund (Abbildung 18 C). Da für Paraffinschnitte außerdem angenommen wird, dass die alkalische Phosphatase durch die hitzeinduzierte Antigendemaskierung inaktiviert wird (249), spielte die Applikation von Levamisol nach voriger Antigendemaskierung mittels Dampfdruckkochtopf mutmaßlich auch hier eine untergeordnete Rolle. Der zunächst auf Levamisol zurückgeführte, positive Effekt auf den Hintergrund wurde deshalb mit der *Kombination* der Methoden, die zu diesem Färbeergergebnis führten, begründet. Unter gerade dieser Kombination litt jedoch die spezifische Gefäßfärbung, sodass weiter nach Alternativen gesucht werden musste.

Aus den vielfältigen Ansätzen ergab sich ein im Vergleich bestes Färbeergergebnis, wurden die Schnitte an den entsprechenden Stellen im Färbeprotokoll mit 4 %igem PFA fixiert, mit 5 %igem Normalserum inkubiert und der α -SMA Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 unter Verwendung eines endogenen Biotin-Blocks appliziert (Abbildung 18).

10.8 Einordnung in den Gesamtzusammenhang und humanmedizinische Relevanz

Die Evidenzlage alternativer Methoden reicht in den meisten Fällen bisher nicht aus, um ihre generelle klinische Anwendung zu rechtfertigen (siehe 6.4.4). Die Evaluation neuer Therapieansätze für die Behandlung von Pseudarthrosen, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde, ist daher weiterhin von großer Bedeutung.

10.8.1 Vorteile einer Zelltherapie mit CD31⁺ Zellen

Einer der größten Vorteile der CD31⁺ Zellen ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen (wie CD34⁺ oder CD133⁺ Zellen, siehe 6.4.4) leicht aus peripherem Blut gewonnen werden können: Sie stellen unabhängig von Geschlecht und Alter einen Anteil von 70-78 % an den Blut-Lymphozyten dar (22), welche wiederum einen Anteil von 14-47 % an den Gesamt-Leukozytenzahl haben (255). Bei einer angenommenen Menge von wenigstens $4,1 \times 10^6$ Leukozyten/ml Blut (255) entspricht dies einer absoluten Zahl von $5,74-19,27 \times 10^5$ Lymphozyten/ml. Setzt man die geringste Menge an Lymphozyten voraus, also $5,74 \times 10^5$ Zellen/ml, entsprechen 70-78 % CD31⁺ Zellen daran $4,018-4,4772 \times 10^5$ Zellen/ml Blut. In präklinischen (145) und klinischen Studien (144, 146) wurde herausgefunden, dass für eine effektive Zelltherapie von kritischer Beinischämie und femoraler oder tibialer Pseudarthrose mit CD34⁺ Zellen $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Patienten notwendig sind. Dies entspricht bei einem 70 kg schweren Patienten einer Menge von maximal 7×10^7 Zellen. Setzt man diese Menge als Basis für eine erfolgreiche Zelltherapie voraus, benötigte man demnach höchstens $(7 \times 10^7 / (0,04018 \times 10^7)) = 175$ ml Blut, um eine ausreichend große Menge an CD31⁺ Zellen zu erhalten. Wenigstens würden bei einer Leukozyten Menge von $4,1 \times 10^6$ bereits 45 ml Patientenblut ausreichen. Dies ist verglichen mit dem Blutvolumen, das für den Gewinn der gleichen Anzahl an CD34⁺ Zellen, die nur einen Anteil von 0,02 % am Blut haben (150), notwendig wäre (ungefähr 850 ml), eine geringe Menge (22). Eine ausreichende Zellzahl zur Anwendung bei der Frakturheilung könnte für CD34⁺ Zellen also nur durch Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark erreicht werden. Dies ist nicht nur zeit- und kostenintensiv, sondern darüber hinaus mit Nebenwirkungen durch die Stimulationsfaktoren behaftet.

CD31⁺ Zellen sind dagegen auch ohne vorige Stimulation ausreichend im peripheren Blut vorhanden und ein „körpereigenes Produkt“. In der Vorarbeit wurde außerdem herausgestellt, dass die Zellen ihre Heilungskapazitäten hinsichtlich angiogenem und osteogenem Potential im Alter nicht

einbüßen (22). Aus diesen Gründen könnte die Transplantation von CD31⁺ Zellen autolog erfolgen.

Um eine Lagerung und den Transport der Zellen und damit assoziierte Risiken (Kontamination, Zelltod) zu vermeiden, müssten die Zellen idealerweise direkt vor Operation, kurz nach der Einleitung, entnommen und anschließend in den Frakturspalt appliziert werden. Auch, wenn die Zellaufreinigung in der vorliegenden Arbeit mehrere Stunden beanspruchte, wäre durch automatisierte Geräte in der Klinik eine zügigere Gewinnung möglich. Ob dieses Vorgehen realistisch ist, müsste klinisch evaluiert werden. Alternativ wäre durch das Intervall zwischen Diagnosestellung und tatsächlicher Operation genug Zeit, um die Zellen peripher zu gewinnen und aufzubereiten. Bei zweizeitigen Operationen, bei denen eine endgültige Versorgung des Bruchs erst sekundär, nach Stabilisierung der Weichteilverhältnisse, erfolgt, könnte die Therapie durch ausreichend Vorlauf regelhaft Anwendung finden. Außer bei polytraumatisierten Patienten und innerhalb von wenigen Stunden zu versorgenden Notfällen, könnte also eine Applikation immer direkt zu Beginn der Behandlung in den Frakturspalt erfolgen. Auf der Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint dies zum aktuellen Forschungszeitpunkt sinnvoll, da bereits früh das Matrix-Remodelling durch die CD31⁺ Zellapplikation positiv beeinflusst wird und der Entstehung einer Pseudarthrose vorgebeugt werden kann. Folgeversuche, wie unter 10.6.3 vorgeschlagen, könnten die Grenzen des Zeitfensters, in denen die CD31⁺ Applikation erfolgen sollte, noch spezifizieren.

10.8.2 Erkennung von gestörten Heilungsverläufen und Prävention

Eine der größten Schwierigkeiten bei der Behandlung und Vorbeugung von Pseudarthrosen liegt nach wie vor in deren rechtzeitiger Erkennung und Diagnosestellung. Knochenabhängig ergeben sich unterschiedliche Heilungsverläufe nach Frakturgeschehen, deren Scheitern nicht generell ab einem bestimmten Zeitpunkt erkennbar ist und individuell betrachtet werden muss (256). Außerdem spielen der Grad des Knochenverlust, die Knochenqualität, Unfallmechanismus, Weichteilverletzungen und Komorbiditäten des Patienten eine Rolle (113, 256). Abhilfe bei der Diagnosestellung einer Pseudarthrose mit gleichzeitiger Behandlungsempfehlung soll seit 2008 das NUSS (*non-union scoring system*) schaffen, das von Calori et al. etabliert (257) und zuletzt von van Basten et al. als zuverlässig evaluiert wurde (258). Der Score zieht neben klassischer Röntgendiagnostik, Knochenqualität, Weichteilgewebestatus unter anderen auch patientenbezogene Merkmale wie Komorbiditäten, Gewohnheiten (Rauchen, Alkohol) und Medikation mit ein und berücksichtigt damit bereits zum Teil Risikofaktoren für einen pathologischen Heilungsverlauf auf biologischer Ebene.

Zur genaueren Risikoeinschätzung wären Parameter erstrebenswert, die neben der klinischen Diagnostik laborchemisch Aufschluss über die Heilungskapazität des Organismus der betroffenen Patienten geben könnten. Die CD8⁺ T_{EMRA}-Zellen wurden bereits mit einer verzögerten Knochenheilung assoziiert (99) und eignen sich möglicherweise zu diesem Zweck. Vor diesem Hintergrund wird in laufenden Studien ihre Tauglichkeit als Biomarker für einen beeinträchtigten Heilungsverlauf bei Patienten evaluiert und der Einfluss einer medikamentösen Hemmung dieser Zellen auf die Frakturheilung getestet (113). Ein positives Ergebnis würde eine objektive Einschätzung des Heilungsverlaufes verbunden mit einer rechtzeitigen Prävention ermöglichen. Die Applikation von CD31⁺ Zellen könnte eine der Präventionsformen sein, um Pseudarthrosen vorzubeugen.

10.8.3 Präventiver Nutzen der CD31⁺ Zellapplikation und mögliche klinische Anwendung

Aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Effekte im Rahmen der Knochenheilung (22, 100) könnte die Applikation der CD31⁺ Zellen in den Frakturspalt die durch T_{EMRA} Zellen bedingte überschießende Immunreaktion ausbalancieren und eine beeinträchtigte Knochenheilung, wie sie in Zusammenhang mit einer prolongierten Entzündungsreaktion nachgewiesen wurde (18-20), verhindern. Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, beeinflussen die Zellen möglicherweise auch beim Menschen bereits frühzeitig das Matrix-Remodelling und verhindern die Ausbildung einer Pseudarthrose schon in frühen Stadien. Eine Applikation direkt zu Beginn der operativen Frakturbehandlung scheint deshalb sinnvoll. Da sich mit steigendem Lebensalter das Verhältnis zwischen CD31⁺ Zellen und T_{emra} Zellen im Hämatom zu Gunsten der T_{emra} Zellen verschiebt (100), könnte auch diesem Effekt durch eine Transplantation entgegengewirkt werden (22). Eine Therapie mit körpereigenen Zellen würde darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Arzneimittelreaktionen reduzieren, wie sie etwa Folge einer medikamentösen Therapie sein könnte.

Im Zentrum der Erkenntnisse dieser Arbeit steht der längere Erhalt des Frakturhämatoms, der möglicherweise durch die CD31⁺ Zellapplikation bedingt wird und im Modell für eine verzögerte Knochenheilung den Heilungsverlauf positiv beeinflusst. In den gängigen klinischen Versorgungsstrategien von Frakturen halten die Erkenntnisse über osteoimmunogene Prozesse im Frakturspalt bisher nur wenig Einzug. Eine Operationstechnik, die der Bedeutung des initialen Frakturhämatoms Rechnung trägt und es als Herberge wichtiger initialer, osteoimmunogener Signalwege für die Frakturheilung berücksichtigt, ist die minimal-invasive Plattenosteosynthese (MIPO) (19). Bei dieser Technik wird nach achsengerechter Reposition über eine kleine Inzision eine Platte epiperiostal und submuskulär am Knochen entlang geschoben (259). So bleibt die na-

türliche Knochendeckung und damit auch das initiale Frakturhämatom und die vaskuläre Versorgung des Knochens insbesondere bei extraartikulären diaphysären Frakturen erhalten (19). Auch in dieser Arbeit scheint der längere Erhalt des Frakturhämatoms – in gewissen Grenzen – einen positiven Effekt auf die Knochenheilung zu haben und unterstreicht die Bedeutung des Hämatoms als Initiationsort einer erfolgreichen Heilung. Um die dem Hämatom inhärenten Heilungskapazitäten zu ergänzen, erscheint eine Kombination der MIPO Technik mit der Applikation der CD31⁺ Zellen sinnvoll. Bei der MIPO Technik, bei der der Frakturspalt nicht direkt freigelegt wird, könnten die Zellen beispielsweise perkutan in den Frakturspalt eingespritzt werden und dadurch die Frakturheilung positiv beeinflusst werden.

11 Literaturverzeichnis

1. Benninghoff D. Anatomie. Denckhahn, editor. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer Verlag; 2008.
2. Lüllmann-Rauch. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme; 2009.
3. Schünke M. PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014.
4. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(3):204-16.
5. Fritz U. Niethard JP. Duale Reihe Orthopädie. 5 ed. Stuttgart Georg Thieme Verlag 2005.
6. Hans-Jörg Oestern MD. Duale Reihe Chirurgie: Thieme Verlag Stuttgart; 2003.
7. Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, Schwarz C, Duda GN. Initiation and early control of tissue regeneration - bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(2):247-59.
8. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S5-7.
9. Weise AHK. Chirurgie: Schnitt für Schnitt. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004.
10. Kaderly RE. Primary bone healing. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1991;6(1):21-5.
11. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):427-34.
12. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003;8(21):980-9.
13. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med.* 2000;28(9 Suppl):S77-80.
14. Wang T, Zhang X, Bikle DD. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol.* 2017;232(5):913-21.
15. Kostenuik P, Mirza FM. Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion. *J Orthop Res.* 2017;35(2):213-23.
16. Schmidt-Bleek K, Schell H, Kolar P, Pfaff M, Perka C, Buttgerit F, Duda G, Lienau J. Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep. *J Orthop Res.* 2009;27(9):1147-51.
17. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54.
18. Schmidt-Bleek K, Schell H, Lienau J, Schulz N, Hoff P, Pfaff M, Schmidt G, Martin C, Perka C, Buttgerit F, Volk HD, Duda G. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014;8(2):120-30.
19. Schell H, Duda GN, Peters A, Tsitsilonis S, Johnson KA, Schmidt-Bleek K. The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop.* 2017;4(1):5.
20. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, Volk HD, Lienau J, Duda GN. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res.* 2012;347(3):567-73.
21. Adams KKSaRH. <Blood vessel formation and function in bone.pdf>. *Development.* 2016:2706-15.
22. Sass A. Application of CD31+ cells to facilitate endogenous bone regeneration under biologically compromised conditions. epubli2016.
23. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005;19(10 Suppl):S4-6.
24. Claes L. [Mechanobiology of fracture healing part 1 : Principles]. *Unfallchirurg.* 2017;120(1):14-22.
25. E. Euler WM. Grundsätze der (operativen) Frakturversorgung. *Chirurgie Basisweiterbildung.* 2. Heidelberg: Springer Verlag; 2007.
26. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):179-86.
27. Xing Z, Lu C, Hu D, Miclau T, 3rd, Marcucio RS. Rejuvenation of the inflammatory system stimulates fracture repair in aged mice. *J Orthop Res.* 2010;28(8):1000-6.
28. Schmidt-Bleek K, Kwee BJ, Mooney DJ, Duda GN. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(4):354-64.
29. R. Dimitriou ET, P. Giannoudis. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005.
30. Kovach TK, Dighe AS, Lobo PI, Cui Q. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. *J Immunol Res.* 2015;2015:752510.
31. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22(4):233-41.
32. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie: Schmidt, Lang; 2007.
33. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.
34. Logsdon EA, Finley SD, Popel AS, Mac Gabhann F. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J Cell Mol Med.* 2014;18(8):1491-508.

35. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389-95.
36. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004;231(3):474-88.
37. Uccelli A, Wolff T, Valente P, Di Maggio N, Pellegrino M, Gurke L, Banfi A, Gianni-Barrera R. Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis. *Swiss Med Wkly.* 2019;149:w20011.
38. Aghi M, Chiocca EA. Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and tumors. *Mol Ther.* 2005;12(6):994-1005.
39. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury.* 2011;42(6):556-61.
40. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone.* 2008;42(5):932-41.
41. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood.* 2005;105(3):1068-77.
42. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schutze N, Jakob F, Schell H. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res.* 2009;27(9):1133-40.
43. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-84.
44. Peplow PV. Influence of growth factors and cytokines on angiogenic function of endothelial progenitor cells: a review of in vitro human studies. *Growth Factors.* 2014;32(3-4):83-116.
45. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952-8.
46. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-5.
47. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2013;328(1):18-26.
48. Harper J, Klagsbrun M. Cartilage to bone--angiogenesis leads the way. *Nat Med.* 1999;5(6):617-8.
49. Fang TD, Salim A, Xia W, Nacamuli RP, Guccione S, Song HM, Carano RA, Filvaroff EH, Bednarski MD, Giaccia AJ, Longaker MT. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 2005;20(7):1114-24.
50. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone.* 2001;29(6):560-4.
51. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res.* 2005;23(3):639-45.
52. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(15):9656-61.
53. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE, Donner DB. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol.* 1995;62(4):203-15.
54. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Jr., Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1996;137(6):2262-8.
55. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2000;95(1):309-13.
56. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:109-17.
57. Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res.* 2002;17(10):1859-71.
58. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest.* 2002;110(6):751-9.
59. Raida M, Heymann AC, Gunther C, Niederwieser D. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med.* 2006;18(4):735-9.
60. Blind C. Psyhyrembel online: Psyhyrembel online; 2016 [Available from: <https://www.psyhyrembel.de/Defektheilung/K05KK>. 6.1.2020

61. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37.
62. Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*. 2003;130(17):4123-33.
63. Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, Buckley JM, Lotz JC, Marcucio RS, Werb Z, Miclau T, Colnot C. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS One*. 2007;2(11):e1150.
64. Everding J, Rosslenbroich S, Raschke MJ. [Pseudarthroses of the long bones]. *Chirurg*. 2018;89(1):73-88.
65. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L. Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int*. 2005;16 Suppl 2:S36-43.
66. Epari DR, Lienau J, Schell H, Witt F, Duda GN. Pressure, oxygen tension and temperature in the periosteal callus during bone healing--an in vivo study in sheep. *Bone*. 2008;43(4):734-9.
67. Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am*. 1989;71(5):722-33.
68. Mirhadi S, Ashwood, N., Karagkevrekis, B. Factors influencing fracture healing. *Trauma*. 2013;15 (2).
69. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S11-8.
70. Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res*. 2003;21(5):836-42.
71. Sanghani-Kerai A, McCreary D, Lancashire H, Osagie L, Coathup M, Blunn G. Stem Cell Interventions for Bone Healing: Fractures and Osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(5):369-77.
72. Einhorn TA, Bonnarens F, Burstein AH. The contributions of dietary protein and mineral to the healing of experimental fractures. A biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*. 1986;68(9):1389-95.
73. Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma*. 2005;19(1):17-22.
74. Daftari TK, Whitesides TE, Jr., Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(8):904-11.
75. Rothem DE, Rothem L, Dahan A, Eliakim R, Soudry M. Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone*. 2011;48(4):903-9.
76. Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(20):2588-94.
77. Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Guner G, Bora A. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26(4):509-13.
78. Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102(1):10-4.
79. Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, Smith RM, Furlong AJ, De Boer P. Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82(5):655-8.
80. Chang JK, Wang GJ, Tsai ST, Ho ML. Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connect Tissue Res*. 2005;46(4-5):200-10.
81. Christian H, Bucher HL, Georg N, Duda, Hans-Dieter Volk, Katharina Schmidt-Bleek. The Role of Immune Reactivity in Bone Regeneration. *Advanced Techniques in Bone Regeneration: IntechOpen*; 2016.
82. Granger DN, Senchenkova E. Inflammation and the Microcirculation. *Integrated Systems Physiology-From Cell to Function*. San Rafael (CA)2010.
83. Konnecke I, Serra A, El Khassawna T, Schlundt C, Schell H, Hauser A, Ellinghaus A, Volk HD, Radbruch A, Duda GN, Schmidt-Bleek K. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion. *Bone*. 2014;64:155-65.
84. Singh A, Mehdi AA, Srivastava RN, Verma NS. Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2012;2(2):75-81.
85. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, van Rooijen N, Radbruch A, Lucius R, Hartmann S, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2018;106:78-89.
86. Forslund JM, Archdeacon MT. The Pathobiology of Diabetes Mellitus in Bone Metabolism, Fracture Healing, and Complications. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2015;44(10):453-7.
87. Ko KI, Coimbra LS, Tian C, Alblowi J, Kayal RA, Einhorn TA, Gerstenfeld LC, Pignolo RJ, Graves DT. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNFalpha-mediated mechanism. *Diabetologia*. 2015;58(3):633-42.
88. Richardson J, Hill AM, Johnston CJ, McGregor A, Norrish AR, Eastwood D, Lavy CB. Fracture healing in HIV-positive populations. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90(8):988-94.

89. Bogoch ER, Moran EL. Bone abnormalities in the surgical treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 1999(366):8-21.
90. Timmen M, Hidding H, Wieskotter B, Baum W, Pap T, Raschke MJ, Schett G, Zwerina J, Stange R. Influence of antiTNF-alpha antibody treatment on fracture healing under chronic inflammation. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:184.
91. Meyer RA, Jr., Tсахakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. 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):428-35.
92. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003;33(6):919-26.
93. Gibon E, Lu L, Goodman SB. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:44.
94. Esterhai JL, Jr., Brighton CT, Heppenstall RB, Thrower A. Nonunion of the humerus. Clinical, roentgenographic, scintigraphic, and response characteristics to treatment with constant direct current stimulation of osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1986(211):228-34.
95. Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res.* 1997(342):218-27.
96. Barrett JP, Costello DA, O'Sullivan J, Cowley TR, Lynch MA. Bone marrow-derived macrophages from aged rats are more responsive to inflammatory stimuli. *J Neuroinflammation.* 2015;12:67.
97. Dimitrijevic M, Stanojevic S, Vujic V, Aleksic I, Pilipovic I, Leposavic G. Aging oppositely affects TNF-alpha and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology.* 2014;15(5):475-86.
98. Smallwood HS, Lopez-Ferrer D, Squier TC. Aging enhances the production of reactive oxygen species and bactericidal activity in peritoneal macrophages by upregulating classical activation pathways. *Biochemistry.* 2011;50(45):9911-22.
99. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, Dahne M, Hartwig T, Akyuz L, Meisel C, Unterwalder N, Singh NB, Reinke P, Haas NP, Volk HD, Duda GN. Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177ra36.
100. Sass FA, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A, Filter S, Rose A, Preininger B, Reinke S, Geissler S, Volk HD, Duda GN, Dienelt A. CD31+ Cells From Peripheral Blood Facilitate Bone Regeneration in Biologically Impaired Conditions Through Combined Effects on Immunomodulation and Angiogenesis. *J Bone Miner Res.* 2017;32(5):902-12.
101. Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. *Instr Course Lect.* 1996;45:401-16.
102. Giannoudis PV, Atkins R. Management of long-bone non-unions. *Injury.* 2007;38 Suppl 2:S1-2.
103. Mills LA, Aitken SA, Simpson A. The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthop.* 2017;88(4):434-9.
104. Gesundheitsberichterstattung Bund - Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 [cited 2019 22.10.19]. Available from: <http://www.gbe-bund.de>. 22.10.19
105. Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA. New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury.* 2007;38 Suppl 1:S49-62.
106. Antonova E, Le TK, Burge R, Mershon J. Tibia shaft fractures: costly burden of nonunions. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:42.
107. Mills LA, Simpson AH. The relative incidence of fracture non-union in the Scottish population (5.17 million): a 5-year epidemiological study. *BMJ Open.* 2013;3(2).
108. Court-Brown CM, Clement ND, Duckworth AD, Aitken S, Biant LC, McQueen MM. The spectrum of fractures in the elderly. *Bone Joint J.* 2014;96-B(3):366-72.
109. Court-Brown CM, McQueen MM. Global Forum: Fractures in the Elderly. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98(9):e36.
110. Judet PR, Patel A. Muscle pedicle bone grafting of long bones by osteoperiosteal decortication. *Clin Orthop Relat Res.* 1972;87:74-80.
111. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000(371):10-27.
112. Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. *Injury.* 2007;38 Suppl 1:S81-9.
113. Schlundt C, Bucher CH, Tsitsilonis S, Schell H, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Clinical and Research Approaches to Treat Non-union Fracture. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(2):155-68.
114. Xu ZH, Jiang Q, Chen DY, Xiong J, Shi DQ, Yuan T, Zhu XL. Extracorporeal shock wave treatment in nonunions of long bone fractures. *Int Orthop.* 2009;33(3):789-93.
115. Biglari B, Yildirim TM, Swing T, Bruckner T, Danner W, Moghaddam A. Failed treatment of long bone nonunions with low intensity pulsed ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2016;136(8):1121-34.

116. Mortazavi S, Mortazavi S, Paknahad M. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. *Ultrasonics*. 2016;71:142.
117. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A(8):1425-35.
118. Li RH, Bouxsein ML, Blake CA, D'Augusta D, Kim H, Li XJ, Wozney JM, Seeherman HJ. rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res*. 2003;21(6):997-1004.
119. Conway JD, Shabtai L, Bauernschub A, Specht SC. BMP-7 versus BMP-2 for the treatment of long bone nonunion. *Orthopedics*. 2014;37(12):e1049-57.
120. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.
121. Giannoudis PV, Kanakaris NK, Dimitriou R, Gill I, Kolimarala V, Montgomery RJ. The synergistic effect of autograft and BMP-7 in the treatment of atrophic nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467(12):3239-48.
122. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Ruter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T, Group BMPEiSfTTS. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84(12):2123-34.
123. Sreekumar V, Aspera-Werz RH, Tendulkar G, Reumann MK, Freude T, Breitkopf-Heinlein K, Dooley S, Pscherer S, Ochs BG, Fleisch I, Hofmann V, Nussler AK, Ehnert S. BMP9 a possible alternative drug for the recently withdrawn BMP7? New perspectives for (re-)implementation by personalized medicine. *Arch Toxicol*. 2017;91(3):1353-66.
124. Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*. 2004;20(11):563-9.
125. Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, Ikada Y, Aoyama I, Anzai J, Nakamura T, Hiyama Y, Tamura M. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):875-80.
126. Power RA, Iwaniec UT, Magee KA, Mitova-Caneva NG, Wronski TJ. Basic fibroblast growth factor has rapid bone anabolic effects in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2004;15(9):716-23.
127. Wroblewski J, Edwall-Arvidsson C. Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res*. 1995;10(5):735-42.
128. Graves DT, Valentin-Opran A, Delgado R, Valente AJ, Mundy G, Piche J. The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connect Tissue Res*. 1989;23(2-3):209-18.
129. Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J Craniofac Surg*. 2003;14(3):292-300.
130. Roffi A, Di Matteo B, Krishnakumar GS, Kon E, Filardo G. Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rationale to evidence in the clinical practice. A systematic review. *Int Orthop*. 2017;41(2):221-37.
131. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87(10):1434-8.
132. Ogilvie CM, Lu C, Marcucio R, Lee M, Thompson Z, Hu D, Helms JA, Miclau T. Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model. *Iowa Orthop J*. 2012;32:90-4.
133. Weir EC, Terwilliger G, Sartori L, Insogna KL. Synthetic parathyroid hormone-like protein (1-74) is anabolic for bone in vivo. *Calcif Tissue Int*. 1992;51(1):30-4.
134. Alkhiary YM, Gerstenfeld LC, Krall E, Westmore M, Sato M, Mitlak BH, Einhorn TA. Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(4):731-41.
135. Borges JL. Accelerated fracture healing with teriparatide. *Arch Endocrinol Metab*. 2015;59(1):89.
136. Preininger B, Duda G, Gerigk H, Bruckner J, Ellinghaus A, Sass FA, Perka C, Schmidt-Bleek K, Dienelt A. CD133: enhancement of bone healing by local transplantation of peripheral blood cells in a biologically delayed rat osteotomy model. *PLoS One*. 2013;8(2):e52650.

137. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109(12):1543-9.
138. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
139. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1751-61.
140. Dreger T, Watson JT, Akers W, Molligan J, Achilefu S, Schon LC, Zhang Z. Intravenous application of CD271-selected mesenchymal stem cells during fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2014;28 Suppl 1:S15-9.
141. Obermeyer TS, Yonick D, Lauing K, Stock SR, Nauer R, Strotman P, Shankar R, Gamelli R, Stover M, Callaci JJ. Mesenchymal stem cells facilitate fracture repair in an alcohol-induced impaired healing model. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):712-8.
142. Qi Y, Zhao T, Yan W, Xu K, Shi Z, Wang J. Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy model. *Cytotherapy*. 2013;15(1):44-56.
143. Pittenger MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol*. 2008;449:27-44.
144. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. 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):2857-64.
145. Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Kwon SM, Miwa M, Kurosaka M, Asahara T. Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture. *Stem Cells*. 2008;26(6):1395-405.
146. Kuroda R, Matsumoto T, Niikura T, Kawakami Y, Fukui T, Lee SY, Mifune Y, Kawamata S, Fukushima M, Asahara T, Kawamoto A, Kurosaka M. 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):128-34.
147. Bonanno G, Perillo A, Rutella S, De Ritis DG, Mariotti A, Marone M, Meoni F, Scambia G, Leone G, Mancuso S, Pierelli L. Clinical isolation and functional characterization of cord blood CD133+ hematopoietic progenitor cells. *Transfusion*. 2004;44(7):1087-97.
148. Elkhafif N, El Baz H, Hammam O, Hassan S, Salah F, Mansour W, Mansy S, Yehia H, Zaki A, Magdy R. CD133(+) human umbilical cord blood stem cells enhance angiogenesis in experimental chronic hepatic fibrosis. *APMIS*. 2011;119(1):66-75.
149. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol*. 2006;169(4):1440-57.
150. Kikuchi-Taura A, Soma T, Matsuyama T, Stern DM, Taguchi A. A new protocol for quantifying CD34(+) cells in peripheral blood of patients with cardiovascular disease. *Tex Heart Inst J*. 2006;33(4):427-9.
151. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH)2015. p. 161-7.
152. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*. 1997;100(11 Suppl):S25-9.
153. Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett*. 2003;540(1-3):7-14.
154. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990;247(4947):1219-22.
155. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. 1991;114(5):1059-68.
156. Ferrero E, Ferrero ME, Pardi R, Zocchi MR. The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Lett*. 1995;374(3):323-6.
157. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*. 1993;178(2):449-60.
158. Schimmenti LA, Yan HC, Madri JA, Albelda SM. Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. *J Cell Physiol*. 1992;153(2):417-28.
159. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*. 2009;113(4):769-74.

160. Tanaka Y, Albelda SM, Horgan KJ, van Seventer GA, Shimizu Y, Newman W, Hallam J, Newman PJ, Buck CA, Shaw S. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. *J Exp Med.* 1992;176(1):245-53.
161. Jackson DE, Gully LM, Henshall TL, Mardell CE, Macardle PJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is associated with a naive B-cell phenotype in human tonsils. *Tissue Antigens.* 2000;56(2):105-16.
162. Wilkinson R, Lyons AB, Roberts D, Wong MX, Bartley PA, Jackson DE. 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):184-93.
163. Prager E, Staffler G, Majdic O, Saemann M, Godar S, Zlabinger G, Stockinger H. Induction of hyporesponsiveness and impaired T lymphocyte activation by the CD31 receptor:ligand pathway in T cells. *J Immunol.* 2001;166(4):2364-71.
164. Prager E, Sunder-Plassmann R, Hansmann C, Koch C, Holter W, Knapp W, Stockinger H. Interaction of CD31 with a heterophilic counterreceptor involved in downregulation of human T cell responses. *J Exp Med.* 1996;184(1):41-50.
165. Newton-Nash DK, Newman PJ. A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction. *J Immunol.* 1999;163(2):682-8.
166. Tada Y, Koarada S, Morito F, Ushiyama O, Haruta Y, Kanegae F, Ohta A, Ho A, Mak TW, Nagasawa K. Acceleration of the onset of collagen-induced arthritis by a deficiency of platelet endothelial cell adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum.* 2003;48(11):3280-90.
167. Wong MX, Hayball JD, Hogarth PM, Jackson DE. The inhibitory co-receptor, PECAM-1 provides a protective effect in suppression of collagen-induced arthritis. *J Clin Immunol.* 2005;25(1):19-28.
168. Preininger B, Gerigk H, Bruckner J, Perka C, Schell H, Ellinghaus A, Schmidt-Bleek K, Duda G. An experimental setup to evaluate innovative therapy options for the enhancement of bone healing using BMP as a benchmark – a pilot study. *European Cells and Materials.* 2012;23:262-72.
169. MACS® Cell Separation Select the best: Miltenyi Biotec GmbH 2017 [Available from: miltenyibiotec.com/cellseparation. 12.12.19
170. Strube P, Mehta M, Putzier M, Matziolis G, Perka C, Duda GN. A new device to control mechanical environment in bone defect healing in rats. *J Biomech.* 2008;41(12):2696-702.
171. Preininger B, Gerigk H, Bruckner J, Perka C, Schell H, Ellinghaus A, Schmidt-Bleek K, Duda G. 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;23:262-71; discussion 71-2.
172. Kawamoto TK, K. Preparation of Thin Frozen Sections from Nonfixed and Undecalcified Hard Tissues Using Kawamoto's Film Method. In: Hilton MJ, editor. *Skeletal Development and Repair - Methods and Protocols.* Vol.1130, 2013: Springer Protocols; 2012.
173. Norma Schulz KS-B. SOP: Kryo-Einbettung mit SCEM-Medium. 2013.
174. Torzewski M. Die Movat-Pentachromfärbung – eine farbenprächtige Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten. *Mikroskopie.* 2015;2(10):204-8.
175. ThermoFisher Scientific [Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/ihc-immunodetection.html>. 15.11.2019
176. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, DeLisser HM. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(5):C1181-90.
177. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997;151(3):671-7.
178. Kim MH, Jin E, Zhang HZ, Kim SW. Robust angiogenic properties of cultured human peripheral blood-derived CD31(+) cells. *Int J Cardiol.* 2013;166(3):709-15.
179. Kim SJ, Kim JS, Papadopoulos J, Wook Kim S, Maya M, Zhang F, He J, Fan D, Langley R, Fidler IJ. Circulating monocytes expressing CD31: implications for acute and chronic angiogenesis. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1972-80.
180. Kim SW, Kim H, Cho HJ, Lee JU, Levit R, Yoon YS. 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):593-607.
181. Park S, DiMaio TA, Scheef EA, Sorenson CM, Sheibani N. 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):C1468-84.
182. Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci.* 2010;87(3-4):69-82.

183. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem.* 2002;277(33):30177-82.
184. Denizot Y, De Armas R, Caire F, Moreau JJ, Pommepuy I, Truffinet V, Labrousse F. The Quantitative analysis of bFGF and VEGF by ELISA in human meningiomas. *Mediators Inflamm.* 2006;2006(6):36376.
185. Ingerslev J. A sensitive ELISA for von Willebrand factor (vWf:Ag). *Scand J Clin Lab Invest.* 1987;47(2):143-9.
186. Vernes JM, Meng YG. Detection and Quantification of VEGF Isoforms by ELISA. *Methods Mol Biol.* 2015;1332:25-37.
187. Reed-Gitomer BY, inventor; US Department of Health and Human Services (HHS) assignee. ELISA methods for the determination of human platelet derived growth factor (PDGF) dimer forms present in human tissues and fluids. USA1989.
188. Loffler J, Sass FA, Filter S, Rose A, Ellinghaus A, Duda GN, Dienelt A. Compromised Bone Healing in Aged Rats Is Associated With Impaired M2 Macrophage Function. *Front Immunol.* 2019;10:2443.
189. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1992;140(3):539-44.
190. Sainson RC, Johnston DA, Chu HC, Holderfield MT, Nakatsu MN, Crampton SP, Davis J, Conn E, Hughes CC. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood.* 2008;111(10):4997-5007.
191. Hoff P, Gaber T, Strehl C, Schmidt-Bleek K, Lang A, Huscher D, Burmester GR, Schmidmaier G, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Immunological characterization of the early human fracture hematoma. *Immunol Res.* 2016;64(5-6):1195-206.
192. Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(11):3118-26.
193. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Weber H, Bail HJ, Duda GN, Perka C, Schell H. Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(1):191-9.
194. Pape HC, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knoke M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2010;24(9):522-5.
195. Sinder BP, Pettit AR, McCauley LK. Macrophages: Their Emerging Roles in Bone. *J Bone Miner Res.* 2015;30(12):2140-9.
196. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Muller R, Wu AC, Van Rooijen N, Sweet MJ, Hume DA, Raggatt LJ, Pettit AR. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res.* 2011;26(7):1517-32.
197. Raggatt LJ, Wullschleger ME, Alexander KA, Wu AC, Millard SM, Kaur S, Maughan ML, Gregory LS, Steck R, Pettit AR. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. *Am J Pathol.* 2014;184(12):3192-204.
198. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.
199. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-46.
200. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986-95.
201. Rui Y, Liu X, Li N, Jiang Y, Chen G, Cao X, Wang J. PECAM-1 ligation negatively regulates TLR4 signaling in macrophages. *J Immunol.* 2007;179(11):7344-51.
202. O'Rourke SA, Dunne A, Monaghan MG. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:101.
203. Loi F, Cordova LA, Zhang R, Pajarinen J, Lin TH, Goodman SB, Yao Z. The effects of immunomodulation by macrophage subsets on osteogenesis in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:15.
204. Holmbeck K, Bianco P, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth. *J Cell Biol.* 2003;163(3):661-71.
205. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* 1997;272(4):2446-51.
206. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.
207. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* 1994;370(6484):61-5.
208. Wong MX, Roberts D, Bartley PA, Jackson DE. Absence of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) leads to increased severity of local and systemic IgE-mediated anaphylaxis and modulation of mast cell activation. *J Immunol.* 2002;168(12):6455-62.

209. Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, Osterweil E, Juedes A, Davis S, Ruddle NH, Engelhardt B, Madri JA. Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest.* 2002;109(3):383-92.
210. Dinarello CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(4):378-85.
211. Newman DK, Fu G, Adams T, Cui W, Arumugam V, Bluemn T, Riese MJ. The adhesion molecule PECAM-1 enhances the TGF-beta-mediated inhibition of T cell function. *Sci Signal.* 2016;9(418):ra27.
212. Clement M, Fornasa G, Loyau S, Morvan M, Andreato F, Guedj K, Khallou-Laschet J, Larghi P, Le Roux D, Bismuth G, Chiocchia G, Hivroz C, Newman DK, Nicoletti A, Caligiuri G. Upholding the T cell immune-regulatory function of CD31 inhibits the formation of T/B immunological synapses in vitro and attenuates the development of experimental autoimmune arthritis in vivo. *J Autoimmun.* 2015;56:23-33.
213. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;94:3-12.
214. Harrison LJ, Cunningham JL, Stromberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma.* 2003;17(1):11-21.
215. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L. Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *J Orthop Res.* 1998;16(4):475-81.
216. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science.* 2017;356(6342):1026-30.
217. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199-210.
218. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):351-72.
219. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(12):4167-71.
220. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 1994;55(3):410-22.
221. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell.* 1985;43(1):277-86.
222. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliensky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 2001;194(6):809-21.
223. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-61.
224. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):583-94.
225. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol.* 1991;37(8):823-9.
226. Brandt E, Woerly G, Younes AB, Loiseau S, Capron M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2000;68(1):125-30.
227. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, Locksley RM. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature.* 2007;447(7140):92-6.
228. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Jr., Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(4):448-53.
229. Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, Finkelman FD, Seder RA, Cox TM, Hieny S, Caspar P, Sher A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol.* 1994;153(2):753-9.
230. Ong C, Wong C, Roberts CR, Teh HS, Jirik FR. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol.* 1998;28(9):2619-29.
231. Brauer E, Lippens E, Klein O, Nebrich G, Schreivogel S, Korus G, Duda GN, Petersen A. Collagen Fibrils Mechanically Contribute to Tissue Contraction in an In Vitro Wound Healing Scenario. *Adv Sci (Weinh).* 2019;6(9):1801780.
232. Lishnevsky M, Young LC, Woods SJ, Groshong SD, Basaraba RJ, Gilchrist JM, Higgins DM, Gonzalez-Juarrero M, Bass TA, Muller WA, Schenkel AR. Microhemorrhage is an early event in the pulmonary fibrotic disease of PECAM-1 deficient FVB/n mice. *Exp Mol Pathol.* 2014;97(1):128-36.
233. Gaetano C, Massimo L, Alberto M. Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. *Haematologica.* 2010;95(11):1801-3.
234. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology.* 1998;139(2):663-70.

235. Claes L, Blakytyn R, Gockelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res*. 2009;27(1):22-7.
236. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008;14(1):79-88.
237. Liu R, Schindeler A, Little DG. The potential role of muscle in bone repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2010;10(1):71-6.
238. Shah K, Majeed Z, Jonason J, O'Keefe RJ. The role of muscle in bone repair: the cells, signals, and tissue responses to injury. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(2):130-5.
239. Yuan SM. alpha-Smooth Muscle Actin and ACTA2 Gene Expressions in Vasculopathies. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2015;30(6):644-9.
240. Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126(14):3047-55.
241. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011;21(2):193-215.
242. Skalli O, Vandekerckhove J, Gabbiani G. Actin-isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth-muscle and fibroblastic tissues. *Differentiation*. 1987;33(3):232-8.
243. Skalli O, Pelte MF, Pelet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(3):315-21.
244. Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol*. 2015;593(14):3013-30.
245. Nehls V, Drenckhahn D. Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol*. 1991;113(1):147-54.
246. Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kilic K, Can A, Di Polo A, Dalkara T. Capillary pericytes express alpha-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife*. 2018;7.
247. Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry*. 1993;99(1):1-12.
248. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):15-23.
249. Lang G. *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*: SpringerWienNewYork; 2013.
250. ThermoFisherScientific. *Blocking Strategies for IHC*: ThermoFisherScientific; 2019 [cited 2019 30.11.19]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/blocking-strategies-ihc.html>. 30.11.19
251. Blocking Endogenous Biotin [Available from: http://www.ihcworld.com/_technical_tips/biotin_tips.htm. 25.11.2019
252. Praul CA, Brubaker KD, Leach RM, Gay CV. Detection of endogenous biotin-containing proteins in bone and cartilage cells with streptavidin systems. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247(2):312-4.
253. Tanja Arndt SRm. *Gewebepräparation. Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*; 2012.
254. Laboratories V. Data Sheet Levamisol [cited 2019 25.11.2019]. Available from: https://vectorlabs.com/amfile/file/download/file_id/3325/product_id/527/. 25.11.2019
255. Technologies S. Frequencies of Cell Types in Human Peripheral Blood Wallchart 2015 [Available from: <https://www.stemcell.com/forms/wallchart-cell-frequencies.html>. 11/09/2017
256. Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, Lowenberg DW. Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg*. 2012;20(5):273-82.
257. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis PV. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury*. 2008;39 Suppl 2:S59-63.
258. van Basten Batenburg M, Houben IB, Blokhuis TJ. The Non-Union Scoring System: an interobserver reliability study. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019;45(1):13-9.
259. Slongo AMWuT. *Kindertraumatologie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2010.

12 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Alexander Rose, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkungen der Applikation von CD31⁺ Zellen aus dem peripheren Blut auf die biologisch verzögerte Knochenheilung zu frühen Zeitpunkten – histologische Analysen am Tiermodell“ (Effects Of CD31⁺ Cell Application From Peripheral Blood On Biologically Impaired Bone Healing At Early Healing Time Points – Histological Examinations In An Animal Model) 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichtete. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

13 Anteilserklärung

Alexander Rose hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: F Andrea Sass, Katharina Schmidt-Bleek, Agnes Ellinghaus, Sebastian Filter, Alexander Rose, Bernd Preininger, Simon Reinke, Sven Geissler, Hans-Dieter Volk, Georg N Duda, Anke Dienelt, “CD31+ Cells From Peripheral Blood Facilitate Bone Regeneration in Biologically Impaired Conditions Through Combined Effects on Immunomodulation and Angiogenesis.” Journal of Bone and Mineral Research, 2017

Beitrag im Einzelnen: Histologische α -SMA-Färbung der Gefäße 3 Tage nach Osteotomie im Rattenmodell für biologisch verzögerte Frakturheilung. Darstellung in den supplementals.

Publikation 2: Julia Löffler, F. Andrea Sass, Sebastian Filter, Alexander Rose, Agnes Ellinghaus, GeorgN.Duda, Anke Dienelt; “Compromised Bone Healing in Aged Rats Is Associated With Impaired M2 Macrophage Function.”, Frontiers in Immunology, 2019

Beitrag im Einzelnen: Histologische Aufbereitung der Proben der gealterten Tiere 3 und 7 Tage nach Osteotomie.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

14 Lebenslauf

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

15 Publikationsliste

1. *“CD31+ Cells From Peripheral Blood Facilitate Bone Regeneration in Biologically Impaired Conditions Through Combined Effects on Immunomodulation and Angiogenesis.”*

F Andrea Sass, Katharina Schmidt-Bleek, Agnes Ellinghaus, Sebastian Filter, **Alexander Rose**, Bernd Preininger, Simon Reinke, Sven Geissler, Hans-Dieter Volk, Georg N Duda, Anke Dienelt
Journal of Bone and Mineral Research, 2017

2. *“Compromised Bone Healing in Aged Rats Is Associated With Impaired M2 Macrophage Function.”*

Julia Löffler, F. Andrea Sass, Sebastian Filter, **Alexander Rose**, Agnes Ellinghaus, GeorgN.Duda, Anke Dienelt
Frontiers in Immunology, 2019

16 Danksagung

Im Laufe einer Dissertation müssen nicht nur Einleitung, Diskussion und Methoden ständig geändert und neu überarbeitet werden. Auch der Text, der jetzt unter dieser Danksagung steht, unterlag jedes Mal, wenn ich dachte, ich hätte es jetzt bald geschafft, einer Neuauflage. Denn im Verlaufe eines mehrjährigen Vorhabens kommen viele Menschen hinzu oder erweisen sich als besonders ausdauernd, motivierend und hilfsbereit (erst recht, je länger die Arbeit dauert...). Diesen Personen möchte ich gerne diese Seite widmen.

Eine Person, die von Beginn an dabei war (oder eher dabei sein musste?) und deren Hilfsbereitschaft sich als unglaublich widerstandsfähig, um nicht zu sagen, wie Knochen, erwies, ist meine Betreuerin Dr. Andrea Sass. Ich weiß nicht, wie, aber bei jedem – wirklich jedem – Treffen bist du mir mit Geduld, Zuversicht und Fachkenntnis begegnet, sodass ich immer schlauer, beruhigt und vor allem neu motiviert in die nächste Runde gestartet bin. Das macht mich nicht nur unsagbar dankbar, sondern dient mir auch als Vorbild. Ich weiß, dass sich die Zeit, die du für mich geopfert hast, nicht aufwiegen lässt. Danke, dass du mich so lange begleitet und geleitet hast.

Das zweit größte Dankeschön gilt einer der selbstlosesten und ausdauerndsten Histologie-MTAs des JWIs, Gabriela Korus. Meine Frustration ist nicht zuletzt durch deine Einstellung und dein Knowhow besiegt worden. Vielen vielen Dank für das geduldige Ausprobieren und die fachliche Hilfe bis zum Schluss.

Ich möchte auch Herrn Professor Duda danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, unter seiner Aufsicht zu promovieren und mit fachlichem Rat meinen Blick auf mein Thema erweitert hat. Auch Dr. Anke Dienelt und Dr. Julia Löffler, die vor allem zu Beginn der Arbeit im Labor für Fragen offen und immer zur Verfügung standen, gilt mein besonderer Dank. Vielen Dank auch an Dr. Agnes Ellinghaus, die nicht nur die Tier-OPs umgesetzt, sondern auch für eine entspannte Atmosphäre gesorgt hat.

An meine Freunde, die bei jedem „Ich bin jetzt bald fertig!“ nachsichtig waren und immer wieder engagiert Kraft für den wiederholten Endspurt gewünscht haben: Danke für eure Unterstützung. Vielen Dank an Sven, der mir vor allem die Arbeit am Kryotom mit fachwissenschaftlichen Vorschlägen aus soziologischer Perspektive erleichtert hat und auch ehrlich sagte, wann es mal reicht und sowieso von Beginn an immer da war. Genauso selbstverständlich „immer da“ waren Alina, Ann-Kathrin, Laura, Josefa und Helena, die dafür gesorgt haben, dass hoffentlich nicht zu viele Rechtschreibfehler in dieser Arbeit auffindbar sind und der Text einigermaßen verständlich blieb. Vielen Dank auch Julia Knopf für deine wertvollen fachlichen Hinweise, die mir gerade zum Ende hin an vielen Stellen nochmal neuen Anstoß gegeben haben. Danke an Marian, der bei jedem Besuch in meinem Zimmer meine gerade geöffneten Abbildungen kommentierte, während er mich mit dem Flimmern der Schreibtischlampe wahnsinnig gemacht hat – ich war durch deinen unermüdlichen Eifer kurz davor ein Rastersystem anzulegen und den Blocksatz aufzugeben. Danke auch an alle, die in etwas weiterer Entfernung zur Arbeit die ganze Zeit in Gesprächen für mich da waren: Felix, Darius, Marielle, Lisa, T(h)eresa, Maya.

An meine Eltern und Familie: Ich kann euch leider nicht Danke sagen, ohne, dass es gleich klingt, als würde ich meinen letzten Willen formulieren: Danke für alles. Die Selbstverständlichkeit, mit der ihr immer da gewesen seid, in jeder Phase dieser Arbeit, ist gerade nicht selbstverständlich. An Michael: Es tut mir leid - ich habe zu lange gebraucht. Ich bringe dir trotzdem ein Exemplar vorbei. Du bleibst unvergessen.