

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss lokal transplanteder Vorläuferzellen auf die  
verzögerte Knochenheilung im Rattenmodell

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hinnerk Jacob Singmann

geb. Gerigk

aus Mölln

Datum der Promotion: 05. Juni 2016

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Zusammenfassung .....	V
Abstract .....	VI
Einleitung .....	1
Knochenheilung .....	2
Heilungsstörungen .....	6
Diagnostik bei Frakturen .....	8
Behandlungskonzepte .....	9
Tiermodell .....	11
Zelltherapie .....	13
Hypothesen und Ziele .....	14
Material und Methoden .....	15
Tiermodell .....	15
Gruppeneinteilung und zeitlicher Verlauf .....	16
Blutabnahme und Zellgewinnung .....	16
Fixateur externe .....	18
Osteotomie und Transplantation .....	18
Euthanasie und Präparatgewinnung .....	21
Verlaufskontrolle und radiologische Auswertung .....	22
Statistische Auswertung .....	26
Ergebnisse .....	27
Operationsergebnis .....	27
Infektzeichen und Lysescore .....	28
Deskriptive radiologische Auswertung .....	31
Überbrückung des Osteotomiespaltes .....	33
Ergebnisse der Messungen am $\mu$ CT .....	36
Kallusvolumen (TV) .....	36
Mineralgehalt des Knochens (BMC) .....	38
Mittlere Kallusdichte / tissue mineral Density (TMD) .....	39
Diskussion .....	41
Diskussion der Zelltherapie .....	41
Diskussion des Tiermodells .....	44

### III | Inhaltsverzeichnis

Diskussion der Methodik .....	47
Zellen und Transplantation.....	47
Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) .....	49
Ausblick .....	50
Literaturverzeichnis .....	52
Eidesstattliche Versicherung .....	VII
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen .....	VIII
Lebenslauf .....	X
Publikationsliste .....	XII
Danksagung .....	XIII

## Abkürzungsverzeichnis

μCT	Micro-Computertomographie
ABC	Autologous Blood Clot (hier: Negativ-Kontrollgruppe)
ANOVA	Analysis Of Variance
BMC	Bone Mineral Content
BMD	Bone Mineral Density (hier: mittlere Knochendichte)
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BV	Bone Volume
CD	Cluster of Differentiation
I.E.	Internationale Einheit
IGF	Insulin Like Growth Factors
KD	Kirschnerdraht
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factors
rhBMP-2	recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2
ROI	Region Of Interest
TGF	Transforming Growth Factors
TMD	Tissue Mineral Density (hier: mittlere Kallusdichte)
TV	Total Volume (hier: Kallusvolumen)
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factors
VOI	Volume of Interest

## Zusammenfassung

Etwa 10% aller Frakturen heilen nicht oder verzögert und stellen somit eines der zentralen Probleme der unfallchirurgischen Grundlagenforschung dar. Eine vielversprechende Alternative zur autologen Knochenmarkstransplantation als bisherigem Goldstandard ist die Applikation mesenchymaler Vorläuferzellen zur Stimulierung der Heilung. In der vorliegenden Untersuchung wurde angenommen, dass die lokale Transplantation dieser Vorläuferzellen mit einem künstlichen Blutclot als Trägerstoff einen positiven Effekt auf die verzögerte Knochenheilung zeigt. Zudem sollte ein entsprechendes Tiermodell etabliert werden, mit dem die verzögerte Heilung unter Berücksichtigung realer Risikofaktoren verlässlich simuliert und das Heilungsergebnis durch Manipulation am Blutclot beeinflusst werden kann.

An 46 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurde eine standardisierte diaphysäre Osteotomie am linken Femur durchgeführt und diese mit einem Fixateur externe stabilisiert. In den Therapiegruppen erfolgte dann die Applikation eines mit CD133- oder CD34-positiven Zellen beladenen Blutclots in den Osteotomiespalt. In der Positiv-Kontrollgruppe erfolgte die Beladung mit BMP2, in der Negativ-Kontrollgruppe blieb der Koagel leer. Zur weiteren Kontrolle diente eine Leergruppe, bei der nach Osteotomie keine weitere Behandlung erfolgte. Radiologische Verlaufskontrolle im  $\mu$ CT (in vivo) nach zwei, vier und sechs Wochen, sowie eine hochauflösende  $\mu$ CT-Diagnostik (in-vitro) nach Probenentnahme nach sechs Wochen wurden durchgeführt und mit zuvor festgelegten Parametern analysiert.

Die Ergebnisse zeigten einen positiven Effekt der beschriebenen Zelltherapie gegenüber der Negativ-Kontrollgruppe hinsichtlich der Kallusneubildung und des Mineralgehalts. Deutlicher fiel dieser Effekt für die CD133-Therapiegruppe aus. Hier ließ sich auch eine bessere Überbrückung des Frakturspaltes feststellen. In abgeschwächter Form konnten diese Effekte auch im Vergleich zur Leergruppe festgestellt werden. Die Negativ-Kontrollgruppe blieb in allen untersuchten Parametern hinter den übrigen Gruppen zurück.

Es konnte ein reproduzierbares Tiermodell etabliert werden, mit dem sich das Heilungsergebnis über Manipulation am Blutclot von fast ausbleibender bis hin zu vollständiger Heilung innerhalb von sechs Wochen beeinflussen lässt. Der Blutclot selbst zeigte einen deutlich negativen Einfluss auf das Heilungsergebnis im Vergleich zum natürlich entstehenden Frakturhämatom bei der Leergruppe. Durch die

Transplantation von Zellen aus dem peripheren Blut mit zuvor identifiziertem angiogenetischen Potenzial, konnte ein positiver Effekt auf die Knochenregeneration in diesem Modell nachgewiesen werden.

## **Abstract**

About 10% of all fractures show a delayed healing process. Autologous bone grafting is the current standard of care. A promising alternative is the application of mesenchymal stroma cells to enhance bone healing, leading to the hypothesis that delayed bone regeneration could be stimulated by local transplantation of peripheral blood derived progenitor cells using an artificial blood clot as a carrier. Furthermore, a goal of this study was to establish an animal model for impaired bone healing based on real risk factors like age that would allow us to control the outcome by manipulation of the blood clot.

A standard osteotomy of the left femur was performed on 46 Sprague Dawley rats, the fracture was then stabilized using external fixation. Cells were separated from peripheral blood by using the markers CD34 and CD133 and respectively transplanted into the fracture gap embedded in an artificial blood clot. A negative control group was treated with a blood clot without cells and the sham group received no further treatment after osteotomy. BMP2-loaded blood clots were transplanted into animals of the positive control group. Micro-CT Scanning was performed after two, four and six weeks.

Results showed an increased callus formation and higher bone mineral content of callus tissue after cell treatment compared to the negative control group, especially for CD133 positive cells. This group also showed a better bridging of the fracture gap compared to the negative control group and sham group. The negative control group showed a noticeable slighter healing outcome compared to all other groups.

A reproducible animal model for impaired bone healing was successfully introduced enabling the operator to control the healing outcome from non-union to complete healing by manipulation of the carrier. The study showed a positive effect of local transplantation of progenitor cells from peripheral blood that have been identified to have angiogenic potential and osteogenic characteristics.

## Einleitung

Eine der zentralen Funktionen des menschlichen Knochens ist die Absorption mechanischer Belastung. Wirkt plötzlich, anhaltend oder repetitiv eine zu große Belastung auf den Knochen ein, kann dieser brechen. Mit der Unterstützung zeitgemäßer Behandlungsmethoden dauert die physiologische Frakturheilung etwa vier bis sechs Wochen und endet in der vollständigen Ausheilung des Bruches und Wiederherstellung der Funktion, einer *restitutio ad integrum*. Etwa 10% aller Frakturen zeigen jedoch aus verschiedenen Gründen Heilungsstörungen (Einhorn and Gerstenfeld, 2015), die je nach Schweregrad gravierende Folgen für den Patienten haben und mehrfache operative Eingriffe nötig machen können. Neben dem fortgeschrittenen Patientenalter und verschiedenen Grunderkrankungen können auch mechanische Faktoren, wie etwa eine inadäquate Ruhigstellung als Gründe für den prolongierten Krankheitsverlauf angesehen werden. Im Falle einer über den physiologischen Zeitraum verlängerten Knochenheilung spricht man von einer *delayed union*. Bleibt eine stabile knöcherne Überbrückung der Fraktarenden auch noch nach sechs Monaten aus, wird dies *Pseudarthrose* oder *non union* genannt (Marsh, 1998). Je nach Schweregrad und Ursache stehen verschiedene konservative und operative Behandlungsmethoden zur Verfügung. Als Goldstandard in der Versorgung von Pseudarthrosen als Endstufe der Knochenheilungsstörungen gilt derzeit die autologe Knochentransplantation im Rahmen eines Revisionseingriffs. Dieses autologe Knochenmaterial ist jedoch nur begrenzt verfügbar und bringt eine hohe Begleitmorbidität von etwa 10% bis 30% mit sich (Lieberman et al., 2002). Aus diesen Gründen gilt es hier neue Therapieansätze zu finden.

Die Frakturheilung stellt einen komplexen physiologischen Prozess dar und beinhaltet eine koordinierte Interaktion von hämatopoetischen Zellen und Immunzellen, zusammen mit Vorläuferzellen von Gefäßen und Knochen (Tsiridis et al., 2007). Die Erforschung dieser Prozesse konnte in den vergangenen Jahren das Verständnis einzelner Schritte und beteiligter Elemente stetig verbessern, lässt aber bis heute einige Fragen unbeantwortet (Phillips, 2005).

Der Knochen kann histologisch gesehen auf zwei verschiedene Arten heilen, direkt (primär) und indirekt (sekundär). Letztere beinhaltet eine Kombination aus intramembranöser und enchondraler Ossifikation mit Kallusbildung und ist die häufiger vorkommende Art der Frakturheilung (Einhorn, 1998). Dabei sind einzelne

Phasen dieser Reparatursprozesse abgrenzbar und lassen sich mit den beteiligten Zellen und Molekülen darstellen.

Das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Knochenheilung ist elementarer Bestandteil der unfallchirurgischen Forschung und diese sind bis heute nicht vollständig untersucht. Die bisherigen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die Entwicklung alternativer Behandlungskonzepte. Heute existieren vielfältige therapeutische Ansätze auf dem Gebiet der Knochenheilungsstörung, darunter biomechanische und physikalische Ansätze sowie Konzepte auf zellulärer und molekularer Ebene (Einhorn and Gerstenfeld, 2015). Insbesondere auf dem Feld der Zelltherapie hat es in den vergangenen Jahren viele unterschiedliche Entwicklungen und Untersuchungen gegeben. Bei der autologen Knochenmarkstransplantation sorgen darin enthaltene mesenchymale Vorläuferzellen durch Differenzierung und angiogenetische Eigenschaften für das osteogene Potenzial und tragen damit maßgeblich zum Heilungseffekt dieser Methode bei (Rosset et al., 2014; Sorrell et al., 2009). Dieser Effekt ist Grundlage sämtlicher zelltherapeutischer Ansätze auf diesem Gebiet. Wesentliche Einschränkung bisher beschriebener Ansätze ist die aufwändige Gewinnung und In-vitro-Anzucht der Zellen (Pittenger, 2008).

Eine vielversprechende Alternative dazu und Gegenstand dieser Untersuchung ist die In-vivo-Gewinnung von Spenderzellen und unmittelbare lokale Transplantation in den Bereich der Fraktur. In einem Rattenmodell mit standardisierter Osteotomie des Os Femoris und verzögerter Heilungssituation wurde der Einfluss zuvor gewonnener und in direkter Folge lokal applizierter pluripotenter Vorläuferzellen auf den Heilungsverlauf untersucht. Langfristig besteht das Ziel, Patienten damit ein alternatives Konzept zur Behandlung von Knochenheilungsstörungen anzubieten.

### **Knochenheilung**

Überfordern die einwirkenden Kräfte die Festigkeit des Knochens und bilden sich unter Trennung des knöchernen Zusammenhangs Bruchstücke, spricht man von einer Fraktur. Dabei werden im Wesentlichen drei verschiedene Formen unterschieden: Bei der *traumatischen Fraktur* kommt es infolge plötzlicher, starker mechanischer Einwirkungen auf den Knochen zu Biegungs- und Schubkräften, die die Elastizitätsgrenze des Knochens überschreiten. Bei der *Ermüdungsfraktur*



hingehen stehen chronische Einwirkungen äußerer Gewalt im Fokus, die auf Dauer die Festigkeit des Knochens überlasten. Typisches Beispiel hierfür ist die Marschfraktur des Metatarsale II. Die *pathologische Fraktur* wiederum ist eine Spontanfraktur eines pathologisch vorgeschädigten Knochens bei eigentlich normaler Belastung ohne adäquate extrinsische Gewalteinwirkung.

Die Frakturheilung stellt einen komplexen Regenerationsprozess als Antwort auf eine Verletzung dar, an dessen Ende die *restitutio ad integrum* steht (Dimitriou et al., 2005). Im Gegensatz zu den Reparationsvorgängen anderer Gewebe resultiert dieser Prozess also in der vollständigen Rekonstruktion der ursprünglichen Struktur und Funktion ohne Ausbildung einer Narbe.

Bei der Vereinigung der Frakturfragmente wird histologisch zwischen einer direkten und indirekten Frakturheilung unterschieden (Dimitriou et al., 2005; Tsiridis et al., 2007). In Anlehnung an die Terminologie der Wundheilung haben sich die Begriffe der „primären“ und „sekundären“ Knochenheilung gefestigt.

McKibbin beschreibt die primäre Knochenheilung nicht als Regenerationsprozess, sondern vielmehr als einen Teil des normalen Knochenumbaus, der zeitlebens im gesamten Skelett stattfindet (McKibbin, 1978).

Bei der direkten oder primären Verknöcherung erfolgt eine direkte knöcherne Durchbauung des Frakturspalts, die ausschließlich von der Kortikalis ausgeht. Diese Art der Heilung findet nur bei exakter anatomischer Ausrichtung der Fragmente statt sowie bei ausreichend rigider Fixierung, die einen konstanten Kontakt der Frakturrenden sicherstellt (Einhorn, 1998). Weiterhin muss die Blutversorgung angrenzend an die Regenerationszone suffizient sein. Die Kallusbildung wird bei der primären Knochenheilung nicht beobachtet (Phillips, 2005).

Durch den Flächenkontakt wird das Eindringen von Blutgefäßen in den Frakturspalt vorerst verhindert. Es bilden sich sogenannte „cutting cones“, ein Komplex aus kegelförmig angeordneten Osteoklasten, die einen Knochenkanal in das benachbarte Gewebe bohren. Darauf folgen unmittelbar einsprossende Kapillaren und Osteoblastenvorläuferzellen, die aus Endothelzellen und perivaskulären Mesenchymzellen hervorgehen und die sich zu Osteoblasten differenzieren (Dimitriou et al., 2005). Diese reihen sich entlang des Kanals auf und füllen diesen mit neuen Knochenlamellen auf. Die Lamellen liegen meist quer zur Längsachse des

Knochens und werden durch Haver'schen Umbau in die eigentliche Struktur des Knochens integriert (McKibbin, 1978).

Während die primäre Heilung nur selten vorkommt, findet die sekundäre oder indirekte Knochenheilung in der Mehrzahl der Frakturen statt, sobald der Frakturspalt eine Breite von 0,5 Millimeter übersteigt (Klaushofer and Peterlik, 1994). Auch die Heilung ohne oder mit einer Art von Fixation, die ein bestimmtes Maß an Mikrobewegung zulässt, erfolgt stets sekundär.

Die in dieser Arbeit betrachtete sogenannte sekundäre Knochenheilung (Dimitriou et al., 2005; Tsiridis et al., 2007) zeichnet sich vor allem durch eine Aufeinanderfolge periostaler, endostaler und interfragmentärer Kallusbildung aus sowie durch eine Kombination aus intramembranöser und enchondraler Ossifikation (Einhorn, 1998). Für die intramembranöse Ossifikation werden mesenchymale Stammzellen aus dem Periost rekrutiert (Bielby et al., 2007).

Initial erfährt der Frakturspalt eine Verbreiterung durch die von Osteoklasten ausgehende Resorption an den Fragmentenden. In der Folge bilden sich auf beiden Seiten des Frakturspalt Kallusmanschetten aus. Diese Manschetten wachsen aufeinander zu bis die Fraktur überbrückt ist. Dem Kallusaufbau geht zunächst ein Hämatom voraus, das dann durch Granulationsgewebe ersetzt wird. Diesem folgt dann kollagenes Bindegewebe, das durch Faserknochen abgelöst wird. Dieser wird im weiteren Verlauf durch Lamellenknochen verstärkt. Der Faserknorpel im interfragmentären Bereich verkalkt allmählich von den Fragmentenden her, engt den Frakturspalt ein, und versteift damit die Fraktur. Dadurch wird die knöcherne Durchbauung des Frakturgebiets möglich (Willenegger et al., 1971).

Die Neubildung von Gefäßen zur Versorgung der Regenerationszone mit Sauerstoff und Nährstoffen und zum Abtransport von Stoffwechselprodukten ist für den Heilungsprozess essenziell (Kanczler et al., 2008; Stegen et al., 2015). Eine optimale Frakturheilung ist auf eine adäquate Vaskularisierung angewiesen und damit auf die Entstehung neuer Gefäßsysteme (Geris et al., 2008). Dabei geht Gerstenfeld davon aus, dass zwei verschiedene Signalwege die Angiogenese regulieren: ein „vascular-endothelial growth factor“ (VEGF)-abhängiger Signalweg und ein angiopoietin-abhängiger Signalweg (Gerstenfeld et al., 2003). Angiopoietin wird etwa ab dem dritten Tag über den gesamten Verlauf der Knochenheilung unter dem Einfluss von

„bone morphogenetic protein“ (BMP) aus Osteoblasten exprimiert und fördert die Bildung größerer Gefäße und Verästelung bestehender Gefäße (Dimitriou et al., 2005). VEGFs hingegen stimulieren die Gefäßneubildung und die Proliferation von Endothelzellen.

Eine besondere Rolle im Rahmen der Knochenheilung spielen außerdem verschiedene Wachstumsfaktoren. Zu diesen gehören unter anderem „platelet-derived growth factors“ (PDGF), „insulin-like growth factors“ (IGF) und „transforming-growth-factor“(TGF)-Superfamilie, der auch die „bone morphogenetic proteins“ (BMP) angehören.

PDGFs können von Endothelzellen, Makrophagen, Monozyten, Osteoblasten und Thrombozyten freigesetzt werden. Sie dienen in frühen Phasen der Frakturheilung als chemotaktischer Stimulus für inflammatorische Zellen und regen die Proliferation von Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen an (Lieberman et al., 2002).

Die Freisetzung von IGFs aus Chondrozyten, Endothelzellen, Knochenmatrix und Osteoblasten unterliegt der Regulation durch Wachstumshormone (Solheim, 1998). IGF-1 stimuliert die Bildung der Knochenmatrix während des gesamten Prozesses der Knochenheilung, indem es mesenchymale Stammzellen und Osteoprogenitorzellen rekrutiert und deren Proliferation fördert (Dimitriou et al., 2005).

Die TGF-Superfamilie beinhaltet eine große Zahl von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, darunter vor allem BMP und TGF- $\beta$  (Tardif et al., 2004). Einige Mitglieder dieser Familie begünstigen spezifisch die unterschiedlichen Phasen der intramembranösen und enchondralen Ossifikation (Cho et al., 2002). TGF- $\beta$  wird auch von Osteoblasten und Chondrozyten produziert, in der Knochenmatrix gespeichert und begünstigt die Proliferation von Mesenchymalen Stammzellen (Lieberman et al., 2002).

Osteoprogenitorzellen, Mesenchymzellen, Osteoblasten und Chondrozyten in der extrazellulären Matrix produzieren BMPs in unterschiedlichen Subformen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Knochenheilung (Dimitriou et al., 2005). Sie stimulieren die Differenzierung von undifferenzierten Mesenchymzellen zu Chondrozyten und Osteoblasten, sowie die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten.

In Bezug auf mögliche Eingriffe in die Komplexität der Frakturheilung, ist es zusammenfassend erstrebenswert in der Frühphase der Heilungsreaktion vor allem PDGF und TGF- $\beta$  präsent zu haben, dann auch TGF- $\beta$  im weiteren Verlauf und vor allem IGF-1 und BMP in der letzten Phase der Heilung und während des Remodelling (Gerstenfeld and Einhorn, 2003; Tsay et al., 2005). Voraussetzung für die Wirkung der genannten Moleküle ist jedoch die Entstehung neuer Gefäßsysteme, ohne die keine Heilung stattfinden kann und deren Initiierung im Fokus der Therapie und dieser Untersuchung liegt (Fassbender et al., 2011). Die Vaskularisierung spielt damit die zentrale Rolle bei der Knochendefektheilung (Hankenson et al., 2011).

### Heilungsstörungen

Wie eingangs erwähnt, findet die Heilung eines Knochenbruches bei etwa 10% aller Frakturen verzögert oder gar nicht statt. Bei gänzlich ausbleibender Knochenneubildung im Frakturspalt bleibt eine Diskontinuität des Knochens und Beweglichkeit der Frakturenden zueinander unter Ausbildung eines Falschgelenks zurück, man spricht von einer „Fractura non sanata“, einem „non union“ und im klinischen Sprachgebrauch von der Pseudarthrose.

Die Definition der Pseudarthrose ist in der Literatur unterschiedlich. Bis heute allgemein anerkannte Charakteristika sind jedoch das radiologische Ausbleiben der Vereinigung der Frakturenden über mindestens sechs Monate oder das nachweisliche Ausbleiben einer Progression der Heilung in aufeinanderfolgenden Röntgenaufnahmen über einen Zeitraum von drei Monaten (Reed et al., 2002; Runkel and Rommens, 2000). Weiterhin kann eine Einteilung in reaktiv, vitale Pseudarthrosen (hypertroph) und inaktive, avitale Pseudarthrosen (atroph) vorgenommen werden. Die mechanischen und biologischen Ursachen der Pseudarthrose sind vielfältig und bis dato nicht vollständig erforscht. Die verschiedenen Formen lassen jedoch jeweils auch Rückschlüsse auf die Ursache zu.

Bei der reaktiven, vitalen Form bildet sich im Frakturspalt ein gut vaskularisiertes Kallusgewebe, welches im Verlauf aber nicht in festen Knochen umgebaut werden kann. Je nach Ausprägung hypertrophiert das Kallusgewebe weiter und bildet somit das sogenannte *Elefantenfuß-Phänomen*. Radiologisch zeigt sich ein verbleibender Frakturspalt mit reaktiver hypertropher endo- und periostaler Sklerose. Als Ursache

sind hier vor allem mechanische Probleme anzusehen, die durch repetitives Zerreißen des neugebildeten Geflechtknochens eine sichere Spaltüberbrückung verhindern (Stürmer, 1996). Beispiele dafür können eine mangelhafte Ruhigstellung, schlechte Compliance des Patienten mit inadäquater oder verfrühter Belastung, unzureichende osteosynthetische Versorgung oder auch Materialbruch nach Osteosynthese sein.

Die inaktive, avitale Form der Pseudarthrose zeigt sich radiologisch ohne darstellbaren Frakturkallus im Defektspace und atrophierten Fragmentenden. Histologisch findet sich avitales, nekrotisches Gewebe ohne wesentliche Vaskularisierung (Schweiberer et al., 1999). Diese Form der Pseudarthrose ist größtenteils durch eine Störung biologischer Heilungsprozesse bedingt und maßgeblich auf eine lokale Ischämie zurückzuführen, die eine adäquate Kallusbildung verhindert. So kann dies etwa durch Grunderkrankungen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder Diabetes Mellitus begünstigt werden. Jedoch hat bei traumatischen Frakturen auch das Ausmaß der Umgebungsschädigung einen wesentlichen Einfluss auf das Risiko für Heilungsstörungen. So kann beispielsweise das Kompartmentsyndrom mit der damit einhergehenden Minderdurchblutung die Entstehung einer Pseudarthrose begünstigen. Auch stark dislozierte Frakturen, Frakturen ohne Fragmentkontakt, sogenannte *Critical Size Defects* stellen ein hohes Risiko für die Ausbildung einer Pseudarthrose dar (Runkel and Rommens, 2000). Doch auch die Anwesenheit oostochondraler Progenitorzellen scheint eine entscheidende Rolle zu spielen (Simpson et al., 2006).

Entsprechend der anatomisch bedingten verminderten Blutversorgung, treten Pseudarthrosen vermehrt in diaphysären Knochenbereichen und somit insbesondere an den langen Röhrenknochen auf. Eine Sonderstellung nimmt hierbei das Os Scaphoideum ein, welches vermehrt von Heilungsstörungen betroffen ist.

Dementsprechend resultiert die große Mehrheit der Pseudarthrosen (etwa 80%) aus Traumata. Etwa 10-15% treten postoperativ auf, wobei hier sicherlich eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Risikofaktoren berücksichtigt werden muss.

Während bei der reaktiven, vitalen Form der Pseudarthrose die Ursache gleichzeitig auch eine Therapie vorgibt, ist die Therapie der inaktiven, avitalen Form ungleich schwerer und soll hier im Fokus der folgenden Untersuchung stehen.

Basierend auf dem bereits dargestellten Wissen zu den beteiligten Molekülen und der abnehmenden Leistung des Immunsystems im Alter (Weiskopf et al., 2009), muss das Alter selbst als eigenständiger Risikofaktor für die Heilungsverzögerung von ossären Läsionen hervorgehoben werden (Demir et al., 2008). Als Ursache wird vor allem die im höheren Alter dominierende Osteoklastenaktivität gesehen, die einen offenbar negativen Einfluss auf die Kallusentwicklung hat (Mehta et al., 2010). Diese osteopore Stoffwechsellage konnte bereits bei Ratten nachgewiesen werden (Plate et al., 2014) und ein vergleichbarer Effekt auch durch Ovariectomie herbeigeführt werden (Dai et al., 2014). Diese Erkenntnisse wurden im Rahmen dieser Studie zur Entwicklung des vorliegenden Tiermodells berücksichtigt.

### **Diagnostik bei Frakturen**

Bei der klinischen Primärbeurteilung steht die körperliche Untersuchung im Vordergrund. Dabei können bereits einige sichere Frakturzeichen erfasst werden: Fehlstellung, abnorme Beweglichkeit, Krepitationsgeräusche bei Bewegung oder freiliegende Knochen mit sichtbarer Bruchstelle. Zu den unsicheren Frakturzeichen zählen dagegen Schmerz, ausgeprägtes Hämatom sowie Funktionsdefizite. In jedem Fall bedarf es dann weiterer apparativer Diagnostik.

Dabei hat zunächst die konventionelle Röntgendiagnostik aufgrund der guten und vergleichbar kostengünstigen Verfügbarkeit, der schnellen Durchführbarkeit und der vergleichbar geringen Strahlendosis den höchsten Stellenwert bei der Feststellung und Beurteilung von Frakturen. Erstrebenswert ist hier eine Aufnahme in zwei Ebenen sowie gegebenenfalls spezielle Zielaufnahmen zur besseren Beurteilung (bspw. Radiusköpfchen).

Zur genaueren Beurteilbarkeit von schlecht einsehbaren Knochenbrüchen wie etwa Mehrfragmentäre Knochenbrüche, gelenknahe Frakturen und andere spezielle Lokalisationen, ist eine zweidimensionale Darstellung häufig nicht ausreichend. Hier ist die Anfertigung einer Schnittbilddiagnostik mittels Computertomographie (CT) indiziert, die durch Rekonstruktion der Daten auch eine dreidimensionale

Begutachtung ermöglicht. Somit kann beispielsweise eine Gelenkbeteiligung sicher beurteilt oder die anschließende operative Therapie besser geplant werden.

Im Bereich der tierexperimentellen Untersuchungen von Frakturmodellen in der unfallchirurgischen Grundlagenforschung hat sich insbesondere die Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) als Standard durchgesetzt, während der Nutzen alternativer Verfahren, wie beispielsweise die Ultraschalldiagnostik noch diskutiert werden (Axelrad and Einhorn, 2011; Rohrbach et al., 2013).

Neben der sehr gut etablierten Röntgentechnik zur Verlaufskontrolle, wurde im Rahmen dieses Experiments im Wesentlichen auf das  $\mu$ CT als maßgebliches Analyseverfahren zurückgegriffen.

### **Behandlungskonzepte**

Das Ziel jeder Frakturbehandlung ist die vollständige Funktionswiederherstellung im Sinne einer *restitutio ad integrum*. Die Gründer der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO) haben hierfür bereits Ende der 50er Jahre vier grundsätzliche Prinzipien der Therapie postuliert, die bis heute noch weitgehende Gültigkeit haben:

1. Frühe anatomische Rekonstruktion der Frakturfragmente, insbesondere bei Gelenkbrüchen.
2. Stabile innere Fixation durch interfragmentäre Kompression, um den lokalen biomechanischen Anforderungen gerecht zu werden.
3. Erhaltung der Blutversorgung von Knochen und Weichteilen durch atraumatische Operationstechnik.
4. Frühe aktive Mobilisation der verletzten Extremität sowie des Patienten zur Vermeidung der Frakturkrankheit.

Zu den üblichen Osteosyntheseverfahren zählen vor allem die Plattenosteosynthese, Verschraubung sowie die Verwendung von Marknägeln oder innerer und äußerer Fixateure. Der in dieser Studie verwendete Fixateur externe ist beim Menschen in der Regel nur im Rahmen der Primärversorgung bei meist offenen Frakturen mit entsprechend ausgeprägten Weichteildefekten indiziert. Durch die geringe Kontaktfläche und minimale Manipulation am Weichgewebe während der Implantation, stellt der Fixateur externe ein vergleichsweise schonendes Verfahren

der Stabilisierung dar. Im Rahmen eines Zweiteingriffes nach Konsolidierung der Weichteile erfolgt dann in der Regel die Verfahrensumstellung auf ein oben genanntes internes Osteosynthesematerial.

Im Falle der Pseudarthrose geben die vermeintlichen Ursachen auch gleichzeitig die erfolgversprechendste Therapie oder Therapieansätze vor. Bei einer reaktiven Pseudarthrose auf dem Boden einer Infektion steht die Sanierung dieser an erster Stelle, während reaktive Pseudarthrosen mit mechanischer Ursache primär mit fortdauernder oder intensivierter Ruhigstellung behandelt werden sollten. Insbesondere im Falle der atrophen Pseudarthrose ohne erkennbare Ursache steht jedoch die Stimulation des Knochenwachstums im Mittelpunkt des Therapiekonzeptes. Die autologe Spongiosatransplantation ist dabei aktuell der Goldstandard in der Behandlung von atrophen Pseudarthrosen (Rosset et al., 2014). Einen bereits in der klinischen Praxis angewandten und hieran angelehnten alternativen Ansatz stellt beispielsweise die Masquelet-Technik dar (Giannoudis et al., 2011). Diese Technik spielt besonders für Frakturen mit größeren Knochen- und Weichteildefekten ohne Gelenkbeteiligung eine Rolle. Hierbei handelt es sich um einen Zweizeitigen operativen Eingriff. Im Rahmen der Erstversorgung wird ein ausgiebiges Wund- und Knochendebridement durchgeführt, es folgt die weitgehende Weichteildeckung und das Einbringen eines Platzhalters mit Knochenzement, sowie die abschließende interne oder externe Stabilisierung. Der sich im Verlauf anschließende Zweiteingriff beinhaltet die Entfernung des Platzhalters und Transplantation von autologer Spongiosa in den Bereich des Knochendefekts, der nun von einer durch den Fremdkörper induzierten Membran umgeben wird (Krappinger et al., 2015).

Bereits 1986 wurde der positive Effekt von BMP auf die Knochenheilung beschrieben (Nilsson et al., 1986) und daraufhin in diversen weiteren tierexperimentellen Studien an verschiedenen Versuchstieren und dabei insbesondere auch an Ratten belegt (Faßbender et al., 2014; Wildemann et al., 2011). Dieser Ansatz wurde mittlerweile auch in mehreren klinischen Studien am Menschen für rekombinantes humanes (rh) BMP-2 und BMP-7 übertragen und dessen Wirkung bestätigt (Axelrad and Einhorn, 2009; R. Dimitriou et al., 2005; Lyon et al., 2013), insbesondere auch im Vergleich mit der autologen Knochenmarkstransplantation (Zimmermann et al., 2007).



Andererseits zeigte sich in einer groß angelegten randomisierten Doppelblind-Studie nach Applikation von rhBMP-2 am Menschen kein positiver Effekt hinsichtlich einer verkürzten Knochenheilung gegenüber der Standardtherapie (Aro et al., 2011).

Aufgrund der sehr guten tierexperimentellen Ergebnisse nach Applikation von BMP-2 und verhältnismäßig einfachen Implementation in das geplante Tiermodell wurde dieser Wachstumsfaktor für die Positiv-Kontrollgruppe dieser Untersuchung verwendet.

### **Tiermodell**

Untersuchungen zur Knochenheilung lassen sich anhand von Untersuchungen an postmortalen humanen Präparaten kaum nachvollziehen, da der sehr sensible Knochenstoffwechsel nicht reaktiviert oder in seiner gesamten Komplexität nachgebildet werden kann. Auch sind Untersuchungen dieser Art im Bereich der zellulären Grundlagenforschung in In-vitro-Modellen nur eingeschränkt möglich, da hier die Komplexität des gesamten Stoffwechsels eines Organismus und damit diverser einflussnehmender Faktoren nicht in seiner vollen Variabilität entsprochen werden kann. Insbesondere die Einpassung in eine räumliche Struktur mit sämtlich einwirkenden mechanischen Kräften ist hier kaum nachvollziehbar. Im Tiermodell hingegen lassen sich Untersuchungen biologischer Prozesse mit allen relevanten Einflussfaktoren in vivo beobachten und somit beispielsweise Kenntnisse zur Prävention, Diagnostik und Therapie von Krankheiten gewinnen, die dann mit Einschränkung auch auf die humane Situation übertragbar sind.

In dieser Studie wurde die Sprague-Dawley-Ratte als Versuchstier gewählt. Um eine identische und reproduzierbare Ausgangssituation zu gewährleisten und externe Einflussfaktoren vergleichbar zu machen, wurden in allen Versuchsgruppen ausschließlich weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit vergleichbarem Alter und Gewicht sowie gleichen Haltungsbedingungen und grundsätzlich gleichen Therapiemethoden eingesetzt.

In der medizinischen Grundlagenforschung – insbesondere auch in der Traumatologie – werden Ratten häufig als Versuchstiere für wissenschaftliche Fragestellungen verwendet. Hinsichtlich der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung bedurfte es hier einer genauen Abwägung von rechtlichen,

medizinischen, wirtschaftlichen und letztlich auch praktischen Faktoren. Dabei muss hervorgehoben werden, dass die Knochenanatomie der Ratte zwar dem des Menschen in einiger Hinsicht ähnlich ist, letztlich aber eben nicht eins zu eins übertragbar ist. §9, Nr. 2 des deutschen Tierschutzgesetzes schreibt vor, dass unter Berücksichtigung der geplanten Studie und der in Frage kommenden Spezies, die bezüglich der Sinnesphysiologie am niedrigsten entwickelte Spezies ausgewählt werden muss. Diesem Anspruch wurde mit der Auswahl der Ratte entsprochen, obwohl diese im Vergleich zu anderen Versuchstieren wie etwa Hunden, Schafen oder Schweinen hinsichtlich des Aufbaus, der Dichte und der Qualität des Knochens eine geringere Übereinstimmung zum humanen Präparat aufweist (Aerssens et al., 1998).

Das Femur bietet sich als größter und gut zugänglicher Röhrenknochen der Ratte als Präparat an. Im Gegensatz zum Unterschenkel mit Tibia und Fibula ist er als einzeln angelegter Knochen des Oberschenkels besser zum operativen Verfahren geeignet, da die Gefahr der Verletzung weiterer Knochen und damit einhergehend auch die Gefahr der Verfälschung des Heilungsergebnisses deutlich geringer sind. Zudem lässt sich im Rahmen der radiologischen Auswertung des Heilungsergebnisses die Überlagerung durch nebenanliegende Knochen minimieren. Die gut definierte Anatomie der Hinterläufe der Ratte trägt weiterhin zu einer Reduktion des Operationsrisikos bei (Jäger et al., 2005a).

Eine vergleichende Einteilung in den zeitlichen Ablauf der Regenerationsprozesse wie beim menschlichen Knochen ist bei der Untersuchung der Knochenheilung bei der Ratte leider nicht möglich, da das osteogene Potenzial kleiner Nagetiere deutlich höher ist als das des Menschen (Hietaniemi et al., 1995). Im Vergleich zu Mäusen etwa stellt die Ratte allerdings unter Berücksichtigung des gewählten Operationsverfahrens die minimale anatomische Größe dar, die in diesem Aufbau Verwendung finden kann. Weitere Vorteile liegen in der vergleichbar guten Verfügbarkeit der Ratte, der kostengünstigen Haltung und der unkomplizierten und vielfach erprobten Handhabung der Tiere. Im Bezug auf diese Studie war außerdem die Verfügbarkeit von entsprechenden Antikörpern für die Gewinnung der Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut ein entscheidendes Kriterium.

## **Zelltherapie**

Mesenchymale Stromazellen sind in der Lage, sich in verschiedene Folgezellen auszudifferenzieren, darunter insbesondere zu Osteoblasten und Chondrozyten (Pittenger, 2008). Wie bereits beschrieben geht durch die Freisetzung von VEGF-A und IGF-1 auch ein pro-angiogenetisches Potenzial von diesen Zellen aus (Sorrell et al., 2009). Beide der genannten Eigenschaften sind essenzielle Bestandteile der Knochenheilung und lassen den Schluss zu, dass eine Steigerung dieser spezifischen Zellen im Bereich eines Knochendefektes einen positiven Einfluss auf das Heilungsergebnis nimmt. Die Wirkung dieser Vorläuferzellen wurde bereits in tierexperimentellen Untersuchungen bestätigt (Atesok et al., 2010; Granero-Moltó et al., 2009; Wang et al., 2012). Das zeitaufwändige Verfahren, die Komplexität der Handhabung und die hohen Gesamtkosten durch Isolation, Aufbereitung und Reapplikation machen jedoch die Übertragung dieses Therapieansatzes auf den klinischen Alltag schwierig (Pittenger, 2008). Zudem stellt die bisher übliche Entnahme aus dem Knochenmark einen zusätzlichen potenziell risikobehafteten Eingriff dar. Aufgrund der verhältnismäßig einfachen und kaum invasiven Verfügbarkeit, stellt die Entnahme der Zellen aus dem peripheren Blut eine vielversprechende Alternative dar (Bussche and Van de Walle, 2014; Preininger et al., 2013).

Nach Sichtung aktueller Literatur wurden für diese Studie zwei immunphänotypische Oberflächenmerkmale identifiziert, CD34 und CD133.

Der Oberflächenmarker CD34 wird unter anderem von hämatopoetischen Stammzellen und Kapillarendothelzellen exprimiert und ist als Marker für verschiedene Vorläuferzellen seit Jahren etabliert (Nielsen and McNagny, 2008). CD34-positive Zellen können sich zu Endothelzellen ausdifferenzieren und somit wesentlich zur Ausbildung neuer Gefäßsysteme beitragen (George et al., 2011; Matsumoto et al., 2006).

Der Oberflächenmarker CD133 wird unter anderem von mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen exprimiert. Auch für CD133-positive Zellen ist das von ihnen ausgehende angiogenetische Potenzial bereits untersucht und bestätigt worden (Adini et al., 2013; Elkhafif et al., 2011).

## **Hypothesen und Ziele**

Der Fokus der Untersuchung lag auf dem Problem der atrophen Pseudarthrosen und möglicher zelltherapeutischer Einflussmöglichkeiten. Vor dem Hintergrund aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse wurden folgende Hypothesen formuliert und im Tiermodell untersucht.

Hinsichtlich eines zu etablierenden Tiermodells wurde angenommen, dass bei 12-Monate alten weiblichen, Sprague Dawley Ratten (min. 3 Würfe) ein durch Osteotomie entstandener Defekt von 2 mm stabilisiert durch einen Fixateur externe nicht innerhalb von sechs Wochen heilt und sich weiterhin das Heilungsergebnis durch Manipulation an einem in den Spalt zu implantierenden Blutclot als möglichen Therapieträger beeinflussen lässt.

Hinsichtlich der Therapie wurde vermutet, dass die zuvor ausgewählten CD34- und CD133-positiven Zellen im genannten Tiermodell einen im Vergleich zur Leergruppe deutlich positiven Heilungseffekt zeigen.

Ziel dieser Studie war es somit, zunächst suffiziente angiogenetische Faktoren aus dem peripheren Blut zu isolieren und diese zur Stimulation der Knochenregeneration bei verzögerter Knochenheilung zu nutzen. Dazu sollte zunächst ein Tiermodell mit reproduzierbarer Knochenheilungsstörung unter Berücksichtigung klinisch relevanter Risikofaktoren etabliert werden. Zudem sollte eine einzeitige Methode zur Zellgewinnung und Reapplikation evaluiert werden, um die bisher bei Stammzelltransplantation bekannten Komplikationen zu umgehen.

## Material und Methoden

Als Tiermodell wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Zu Beginn wurde das linke Femur diaphysär osteotomiert und mit einem Fixateur externe stabilisiert. In den Therapiegruppen erfolgte die Applikation eines mit Zellen beladenen Blutkoagels in den Osteotomiespalt. Es erfolgte eine radiologische Verlaufskontrolle im  $\mu$ CT (in vivo) nach zwei, vier und sechs Wochen, sowie eine hochauflösende  $\mu$ CT-Diagnostik (in-vitro) nach Probenentnahme nach sechs Wochen.

### Tiermodell

Insgesamt wurden 46 weibliche Sprague Dawley Ratten mit mindestens drei Würfen und einem Alter von 10 bis 12 Monaten im Rahmen der Untersuchung verwendet. Haltung und Versorgung der Versuchstiere erfolgte für die gesamte Dauer des Versuchs in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Eine Genehmigung des Tierversuchsvorhabens (G 0428/08) wurde vorab beantragt und durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, erteilt.

Entsprechend ihres Sozialverhaltens wurden die Versuchstiere in Gruppen von zwei oder maximal drei Tieren in Käfigen gehalten, das Licht wurde entsprechend eines zwölfstündigen Tag/Nacht-Rhythmus geregelt und die Durchschnittstemperatur in den Räumen entsprach 18-20°C. Die Fütterung erfolgte mit Nagetierfutter (Sniff Spezialdiäten GmbH) sowie Wasser ad libitum. Damit entsprachen die Haltungsbedingungen der Gesellschaft für Tierversuchskunde GV SOLAS und den Richtlinien der European Convention ETS 123. Im Rahmen des im Folgenden beschriebenen operativen Eingriffes wurden die Tiere für kurze Zeit in Einzelkäfigen isoliert, um gegenseitiger Manipulation der Wunden und des Fixateurs entgegenzuwirken. Dabei wurde jedoch sichergestellt, dass die Tiere während der gesamten Zeit der Isolierung visuell, olfaktorisch und akustisch kommunizieren konnten. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte mittels farbiger Ringe und Längsstriche um die Schwanzwurzel der Tiere, die eine Versuchstiernummer kodierten. So konnte die standardisierte individuelle Zuordnung der Versuchstiere gewährleistet und Verwechslungen sicher ausgeschlossen werden.

### Gruppeneinteilung und zeitlicher Verlauf

Das Operationsverfahren der Osteotomie wurde bei allen Tieren in gleicher Weise angewendet. Die Zuordnung zur Versuchsgruppe erfolgte zum gleichen Zeitpunkt abhängig von der durchgeführten Behandlung:

- Sieben Tiere wurden der Leergruppe zugeordnet und erhielten nach der Osteotomie und Versorgung mit dem Fixateur externe keine weitere Frakturversorgung.
- Sieben Tiere wurden einer Positiv-Kontrollgruppe zugeordnet. In den Frakturspalt wurde ein mit BMP2 beladener autologer Blutkoagel appliziert.
- Elf Tiere wurden einer Negativ-Kontrollgruppe zugeordnet. Dabei wurde den Tieren ein autologer unbeladener Blutkoagel (abc) in den Frakturspalt appliziert.
- Insgesamt 21 Tiere wurden auf zwei Therapiegruppen verteilt in der jeweils ein autologer Blutkoagel als Träger von zuvor gewonnenen Zellen direkt in den Frakturspalt appliziert wurde.

Gruppe	Behandlung	Tierzahl
Leergruppe	In situ Hämatom belassen	7
Positiv-Kontrollgruppe (BMP)	BMP2	7
Negativ-Kontrollgruppe (ABC)	Autologer Blutkoagel	11
CD34 – Therapiegruppe	$2 \times 10^5$ CD34pos. Zellen	8
CD133 – Therapiegruppe	$2 \times 10^5$ CD133pos. Zellen	13

Tabelle 1: Übersicht über die Gruppen

### Blutabnahme und Zellgewinnung

Zur Gewinnung der CD34- und CD133-positiven Zellen wurde Vollblut aus Spendertieren abgenommen und anschließend im Verhältnis 1:1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt. Mononukleäre Zellen wurden durch Dichtezentrifugation (Histopaque-1083, Sigma-Aldrich, München) getrennt und die Suspension zweifach mit PBS gespült. Die Zielzellen wurden dann durch positive Selektion mittels MACS (Magnetic Activated Cell Sorting, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) anhand spezifischer Oberflächenstrukturen herausgefiltert. Hierzu wurde die Suspension zunächst mit biotinylierten Antikörpern für 10 min

inkubiert und erneut mit PBS-Lösung gespült. Es handelt sich hierbei um spezifische Antikörper gegen Zelloberflächenmerkmale, sogenannte CD-Antigene. Danach erfolgte die 12-minütige Inkubation mit anti-Biotin-Antikörpern, sogenannten MicroBeads. Je nach Versuchsgruppe und gewähltem Antikörper (Ab16518-100 abcam lot:746560, abcam, Cambridge, Großbritannien) wurden die MicroBeads folglich an Zellpopulationen mit den Oberflächenmerkmalen CD34 und CD133 gebunden. Nach erfolgter Inkubation wurde die Zellsuspension über eine magnetische Säule gegeben und die markierte Population zurückgehalten. Durch Spülen der Säule und Aufhebung des Magnetfeldes wurden die Zielzellen isoliert. Die gebundenen MicroBeads bestanden aus Eisenoxid und einer Polysaccharid-Hülle mit der Bindungsstelle für den Antikörper und sind damit biologisch abbaubar.



Abbildung 1: Künstlicher Blutkoagel für die Anwendung in der Leergruppe und als Trägermaterial für die Zelltherapie.

Vor der Osteotomie wurde für jedes Tier (mit Ausnahme der Tiere in der Leergruppe) ein künstlicher Blutkoagel bestehend aus 200  $\mu$ L autologem peripherenösem Blut angefertigt. Dazu wurde die rechte Vena Saphena unter Vollnarkose mit einer Kanüle punktiert und Blut in eine 1 ml-Spritze aufgezogen. Um die sofortige Gerinnung zu inhibieren wurde die Spritze zuvor mit 30  $\mu$ l Citrat (aus BD Vacutainer Citrate Plus #36080, BD Franklin Lakes, NJ, USA) präpariert. Das Blut wurde anschließend in den Deckel eines 1,5 ml Eppendorf-Gefäßes (VER International, Darmstadt) umgefüllt, um den entstehenden Koagel der Form des Osteotomiespaltes und in etwa dem Durchmesser des Rattenfemurs anzupassen (Abb. 1). Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden nun  $2 \times 10^5$  gewonnene Zellen oder in der Positiv-Kontrollgruppe 50  $\mu$ g rhBMP2 (gewonnen aus E.Coli (Kübler et al., 1998); 1 mg/ml ddH<sub>2</sub>O, Prof. Sebald, Würzburg) hinzugegeben und die Blutgerinnung mit der Zugabe von 4  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub>-12H<sub>2</sub>O und 4  $\mu$ l Thrombin (entsprechend 500 I.E. / ml, Baxter

Deutschland, Unterschleißheim) eingeleitet. In der Negativ-Kontrollgruppe wurde lediglich die Blutgerinnung eingeleitet.

### **Fixateur externe**

Der für dieses Tiermodell verwendete Fixateur externe (Abb. 2) bestand aus vier Kirschnerdrähten aus Metall (0,8 mm Durchmesser) mit trokarförmigem Gewinde zum Einbringen und zur bikortikalen Verankerung im Knochen (Fa. M. Jagel, Bad Blankenburg). Die außerhalb des Körpers liegende Schienung erfolgte durch einen Verbindungsbalken aus quervernetztem Karbon. Dieser bestand aus zwei Einzelplatten mit vier gegenüberliegenden Nuten für die Aufnahme der K-Drähte, welche mit zwei Senkkopfschrauben und jeweils einer Mutter fest miteinander verbunden wurden.

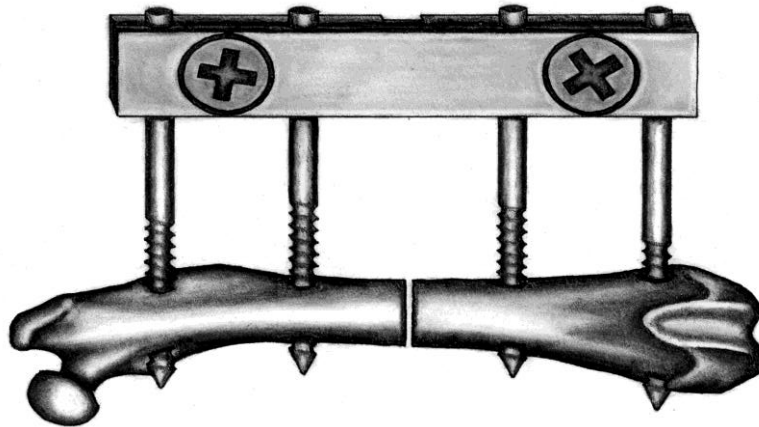


Abbildung 2: Darstellung eines Fixateur Externe am Femur mit Osteotomie mit Pin 1 – 4 von links nach rechts (Kaspar et al., 2008)

Dieses Modell wurde entsprechend des oben beschriebenen operativen Vorgehens zuvor in einem In-vitro-Ansatz getestet und auf seine biomechanische Belastbarkeit untersucht (Strube et al., 2008).

### **Osteotomie und Transplantation**

Der operative Eingriff erfolgte in Vollnarkose. Dazu erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion mit 0,3 mg/kgKG Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe) und 60 mg/kgKG Ketamine (Actavis, Langenfeld). Der Austrocknung der Kornea wurde mit lokaler Anwendung von Panthenol-Augensalbe® (Jenapharm, Jena) vorgebeugt. Vor der Operation erfolgte zunächst eine Gewichts- und Temperaturkontrolle. Prophylaktisch erfolgte bei allen Tieren die perioperative



antibiotische Abschirmung mit 4 mg/kgKG Clindamycin (Ratiopharm, Ulm) per subkutaner Injektion. Die Ratte wurde in Rechtsseitenlage auf einer 37°C warmen Wärmeplatte gelagert, der linke Hinterlauf und das gesamte Bein wurden rasiert. Als zusätzliche Analgesie erhielten die Tiere unmittelbar vor dem operativen Eingriff eine subkutane Injektion mit 20 mg/kgKG Tramaldol (Tramal®, Ratiopharm, Ulm). Dann erfolgte die dreimalige Desinfektion der Haut im Operationsgebiet mit Povidon-Iod (Braunoderm®, Braun, Melsungen) und die sterile Abdeckung mit einem Lochtuch.

Es erfolgte eine etwa 3 cm lange laterale Inzision der Haut über dem palpierbaren Femurschaft von kaudal des Hüftgelenkes nach distal, etwa mittig zwischen Trochanter major und Epicondylus lateralis femoris. Unter Schonung der proximo-lateralen Sehnenansätze wurde das Os femoris durch Spaltung der Membrana intermuscularia und Separation der umliegenden Muskulatur zwischen Extensoren- und Flexorenloge weitgehend freipräpariert.

Für die folgenden Bohrungen sowie auch für die anschließende Osteotomie des Femurs wurde ein elektrisches Bohrgerät mit flexibler Welle und elektrischem Fußpedal (16000 U/Min, Proxxon, Niersbach / Eifel) verwendet. Während des Bohrens und der Osteotomie, erfolgte die stetige Spülung des Operationsgebietes mit 0,9% Kochsalzlösung, um thermische Schäden an Knochen und umliegenden Weichteilen zu verhindern. Zunächst wurde bei manueller Fixierung des Knochens und Beachtung einer lotrechten Lage des Bohrers (0,8 mm, S-11, Implantmeds, W&H Oral Surgery, Büromoos, Österreich) zur Längsachse des Knochens ein Kanal für den distalen Kirschnerdraht (KD 4) monokortikal vorgebohrt. Dieser wurde dann mit Hilfe eines Handbohrfutters senkrecht zur Knochenachse bikortikal eingebracht. Unter Zuhilfenahme einer an KD 4 fixierten Schablone wurde nun der proximale Schaft für den KD 1 entsprechend vorgebohrt, um eine Abweichung des Drahtes beim Einbringen, aufgrund der Schrägheit des Knochens, zu verhindern. KD 1 wurde dann parallel zu KD 4 mittels Handbohrfutter platziert. Die Kanäle für die beiden innenliegenden Pins (KD 3 und 4) wurden anschließend nach gleichem Prozedere monokortikal vorgebohrt und die Drähte parallel zu den außenliegenden Pins und senkrecht zur Knochenachse bikortikal verankert. Die Bohrschablone wurde entfernt und ein Verbindungsbalken des Fixateur externe im definierten Abstand von 7,5 mm zum Knochen durch Verschraubung fest mit den vier Pins verbunden. Um Verletzungen der Tiere im weiteren Versuchsablauf zu vermeiden, wurden die nun

stabilisierten Drähte mit einem Seitenschneider direkt oberhalb des Verbindungsbalkens abgetrennt.

Der Knochen wurde nun zwischen den beiden innenliegenden Pins auf einer Länge von etwa 4 mm von Weichteilgewebe freipräpariert, die inzidierte Muskulatur wurde mit Wundhaken geschont. Eine Sägeschablone wurde zur besseren Vergleichbarkeit des Eingriffes an den angelegten Kirschnerdrähten fixiert. Es erfolgte anschließend die durch die Schablone standardisierte 2 mm breite Doppelosteotomie in der Mitte zwischen den beiden innenliegenden Pins mit einer Diamanttrennscheibe von 0,3 mm Dicke (S-8R, Implantmeds, W&H Oral Surgery, Büromoos, Österreich). Das entstandene freie Knochensegment wurde entfernt.

In den entstandenen Osteotomiespalt wurde nun je nach Zugehörigkeit zu einer Gruppe, ein künstlich hergestellter und entsprechend beladener autologer Blutkoagel eingebracht. Bei der Leergruppe blieb der Osteotomiespalt unbehandelt. Es erfolgte danach keine weitere Spülung.

Der Wundverschluss erfolgte mittels fortlaufender Naht der Muskelfascie mit geflochtenem resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 3-0, Ethicon, Norderstedt) und Hautverschluss durch Einzelknopfnähte mit monofilem nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene® 3-0, Ethicon, Norderstedt). Zur Kontrolle und Dokumentation des Operationsergebnisses, insbesondere der korrekten Reposition, folgten Röntgenaufnahmen der linken hinteren Extremität (52 kV, 1,8 mAs auf konventionelle Röntgenfilme, Chronex 5 Medical X-ray Film, AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien; Gerät: Mobilett Plus X-ray unit, Siemens, Erlangen). Die Röntgenfilme wurden zur exakten Zuordnung mit Tiernummer und Datum gekennzeichnet und archiviert.

Zur Vermeidung einer Hypothermie wurden die Tiere nach dem Eingriff bis zum Erwachen unter einer Wärmelampe gelagert. Dort erlangten alle Tiere nach spätestens 30 Minuten das Bewusstsein.

Postoperativ erhielten die Tiere 25 ml/l Tramaldol (Tramal®, Ratiopharm, Ulm) im Trinkwasser für drei Tage zur Analgesie. Das Nahtmaterial wurde nach 14 Tagen im Rahmen der regelmäßigen Wundkontrolle entfernt. Die Wundpflege bestand aus Sprühdesinfektion des Wundgebietes und vorsichtiger Abtragung von Verschorfungen und Exsudaten mit einer Pinzette nach vorheriger Aufweichung mit Polyvidon-Iod, sowie aus der Reinigung des Fixateurs mit in Wasserstoffperoxid

getränkten Wattestäbchen. Weiterhin wurden klinische Infektionszeichen evaluiert, um die Tiere gegebenenfalls vom weiteren Verlauf auszuschließen. Dazu wurden die Eintrittsstellen der Pins gründlich auf Anzeichen eines entzündlichen Geschehens inspiziert und das umliegende Gewebe auf Schwellungen, Rötungen oder Überwärmung geprüft. Außerdem wurden die Tiere täglich beobachtet, da Verhaltensauffälligkeiten wie Aktivitätsminderungen, Änderungen im Gangbild oder mangelnde Wasser- und Nahrungsaufnahme auch als Infektionszeichen gewertet werden können. Das Gewicht der Tiere wurde wöchentlich im Verlauf kontrolliert.

### **Euthanasie und Präparatgewinnung**

Im Anschluss an die letzte Verlaufskontrolle sechs Wochen nach der Osteotomie erfolgte die Euthanasie der Tiere. Dazu wurden die Tiere im bereits zuvor beschriebenen tiefen Narkoseverfahren durch die intrakardiale Injektion von mindestens 5 ml 7,45 % Kaliumchlorid (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) getötet. Der Tod trat innerhalb weniger Sekunden nach Applikation ein. Es erfolgte die Sicherung durch palpatorische Kontrolle des Herzstillstandes und Ausbleiben von Thoraxexkursionen sowie durch optische Kontrolle der Retina-Durchblutung. Zur Absicherung wurde die rasche Entblutung über die intracardial liegende Kanüle herbeigeführt.

Anschließend wurde das linke Os Femoris mitsamt dem umliegenden Weichteilmantel und dem anliegenden Fixateur externe entnommen. Um weitere Schäden am Präparat zu vermeiden musste hier besonders darauf geachtet werden, jegliche Zug-, Scher- und Druckkräfte am Knochen auf ein Mindestmaß zu beschränken. Gemäß dem oben beschriebenen Vorgehen zur Osteotomie wurde das Femur behutsam freipräpariert und dann mittels Skalpell und Präparationsschere in Hüft- und Kniegelenk exartikuliert, indem zunächst der Band- und Sehnenapparat des Kniegelenkes und dann durch eine halbkreisförmige Umschneidung des Trochanter major der Beuge- und Streckapparat der Hüfte durchtrennt wurden. Das Os Femoris konnte dann im Verbund mit Weichteilgewebe und dem Fixateur externe entnommen und sehr vorsichtig von übrigem Muskelgewebe und Bändern befreit werden. Zur manuellen Fixation diente während des ganzen Eingriffs der Fixateur externe. Der Fixateurbalken wurde anschließend von den Pins abmontiert und die beiden innenliegenden Pins (KD 2 und 3) einzeln mit einem Handbohrfutter vorsichtig

entfernt, die außenliegenden Pins (KD 1 und 4) wurden etwa 1-2 mm über der Eintrittsstelle abgekniffen. Hierbei musste sehr sorgsam mit dem Knochen und dem nun freiliegenden und nicht fixierten Osteotomiespalt umgegangen werden und jegliche Krafteinwirkung vermieden werden. Im Anschluss wurden die Proben umgehend in eine gekühlte (4°C) Natrium-Chlorid-Lösung überführt, um die Austrocknung des Gewebes zu verhindern und biologische Zerfallsprozesse zu verlangsamen.

### **Verlaufskontrolle und radiologische Auswertung**

Neben der regelmäßigen klinischen Evaluation von Gewichtsentwicklung, Verhaltensauffälligkeiten, Fixateurstellung und etwaigen lokalen Entzündungsreaktionen wurde der Fortschritt der Frakturheilung nach je zwei, vier und sechs Wochen in einem Mikro-Computertomographen ( $\mu$ CT) der Firma Scanco Medical AG (Typ viva CT 40, Scanco Medical AG, 8303 Bassersdorf, Schweiz) in vivo untersucht. Die Tiere wurden dazu mit Medetomidin 0,3 mg/kgKG (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und Ketamin 60 mg/kgKG (Actavis, Langenfeld, Deutschland) sediert und in einem standardisierten Verfahren in einer Kunststoffwanne in Rückenlage fixiert. Um einen sicher vergleichbaren Strahlengang zu gewährleisten, wurde der Fixateur externe innerhalb der Wanne in einer dafür vorgesehenen Aufnahme befestigt. Zunächst wurde ein Übersichtsröntgenbild des Unterkörpers angefertigt, ein sogenannter Scout View. Anhand des Scout Views wurde dann eine zylindrische „Region of Interest“ (ROI) festgelegt, die hochauflösend gescannt wurde. Die ROI wurde so gewählt, dass periostales und im Osteotomiespalt gebildetes Kallusgewebe in die weiteren Analysen eingeschlossen, etwaiger Kallus um den Fixateurpin herum aber ausgeschlossen wurde. Die Analysen am In-vivo-Modell erfolgten mit einer Schichtdicke von 35  $\mu$ m, einer Stromstärke von 145 mA und einer Spannung von 55 kV. Die weitere Evaluation und 3D-Rekonstruktion erfolgte mit Hilfe der von der Firma Scanco bereitgestellten Software.

Die radiologische Gewebsanalyse erfolgte innerhalb eines definierten „Volume of Interest“ (VOI), in der der gebildete Knochenkallus evaluiert werden sollte. Nach den oben genannten Kriterien für die ROI wurde, ausgehend von dem proximalen und distalen Startpunkt des Osteotomiespalt, der Mittelpunkt der Schnittbildgebung ermittelt und die zu untersuchende Region von diesem Ausgangspunkt jeweils um 2

mm in beiden Längsachsen erweitert, um das entstandene Kallusgewebe komplett einzuschließen. Dies entsprach bei einer Schichtdicke von 35  $\mu\text{m}$  pro Schnitt also einer Erweiterung von 57 Schnitten nach proximal und distal. Innerhalb dieser ROI wurde dann durch halbautomatisches Konturieren das zur weiteren Analyse genutzte VOI ermittelt, indem kortikaler Knochen durch Konturierung ausgeschlossen wurde. Somit konnte sichergestellt werden, dass der sich neubildende Frakturkallus alleiniger Fokus der folgenden Untersuchung war. Hierzu wurde bestehendes Knochengewebe in den einzelnen 2D-Schnitten entlang der sichtbaren Kortikalis endostal und periostal manuell markiert und diese Markierung automatisch durch die Scanco-Software auf weitere Schnitte erweitert. Jedes einzelne Bild wurde in der Folge manuell auf Fehler kontrolliert.

Um zu ermitteln wie sich die Röntgendichten der Rattenknochen im  $\mu\text{CT}$  verhalten und um einen einheitlichen und vergleichbaren Grenzwert für die Auswertung aller Tiere bei der Abgrenzung von Knochengewebe zu definieren, wurde während der gleichen Messung eine manuelle Grenzwert- („Threshold“-)bestimmung an der unilateralen intakten Tibia am In-vivo-Modell durchgeführt. Das Ergebnis dieser Grenzwertbestimmung war, dass Grauwerte über einem Wert von 233 zu Knochengewebe gezählt wurden, alle darunter liegenden Werte zu Weichgewebe. Die Grauwertskala reichte von 0 (komplett schwarz) bis 1000 (komplett weiß). Für die Grenzwertbestimmung wurde zunächst an 10% zufällig ausgewählter Tibiae eine manuelle Bestimmung des passenden Grenzwertes für intaktes Knochengewebe durchgeführt. Hierzu wurden für jedes Bild individuell die Grenzwerte so lange manuell angepasst bis die Knochengrenzen des  $\mu\text{CT}$ -Bildes denen des Scout Views entsprachen. Der Wert von 233 entsprach dann dem mittleren Wert der so ermittelten Grenzwerte. Gemäß aktueller Literatur ist es üblich bei  $\mu\text{CT}$ -Analysen von Frakturmodellen an Ratten davon auszugehen, dass etwa 50% der Dichte des intakten kortikalen Knochens dem Grenzwert für die Erfassung von Kallusgewebe entspricht (Mehta et al., 2010). Zur Sicherheit wurde der ermittelte Wert von 233 dann in 12 zufällig gewählten Proben manuell nachgeprüft. Diese Nachprüfung bestätigte den gefundenen Grenzwert.

In den anschließenden Analysen durch die Scanco - Software wurden folgende Parameter erhoben:

- Knochenvolumen / Bone Volume, BV [ $\text{mm}^3$ ]

- totales Kallusvolumen / Total Volume, TV [mm<sup>3</sup>]
- Knochenvolumen im Verhältnis zum totalen Kallusvolumen, BV/TV [%]
- Mineralgehalt des Knochens / Bone Mineral Content, BMC [g]
- mittlere Kallusdichte / Tissue Mineral Density, TMD [mgHA/cm<sup>3</sup>]
- mittlere Knochendichte / Bone Mineral Density, BMD [mgHA/cm<sup>3</sup>]

Der Unterschied zwischen den Werten BMD und TMD liegt im gewählten Grenzwert. Während die TMD die mittlere Dichte des Knochens mit allen Dichtewerten zwischen 0 und 1000 darstellt, werden bei der BMD nur die Dichtewerte zwischen 233 und 1000 berücksichtigt. Gemäß dem aktuellen Forschungsstandard wurde der BMC unter Verwendung des TMD wie folgt berechnet (Morgan et al., 2009).

$$BMC[g] = (BV[mm^3]/1000) \times TMD \text{ mgHA/cm}^3$$

Nach Euthanasie der Tiere wurden die von den Metallpins befreiten Präparate erneut im  $\mu$ CT in einem In-vitro-Verfahren gemessen. Hier erfolgte die Messung mit einer Schichtdicke von 10,5  $\mu$ m, einer Stromstärke von 145 mA von einer Spannung von 70 kV. Die Präparate wurden in mit NaCl (0,9%) – getränkte Kompressen gewickelt und mit einer Folie versiegelt, um sie während der langen Messung vor dem Austrocknen zu schützen. Analog zu dem Prozedere am In-vivo-Modell erfolgten vor der eigentlichen Messung zunächst Übersichtsaufnahmen, in diesem Fall mit Einschluss der Bohrlöcher / Pinschafte.

In den Übersichtsbildern und 2D- und 3D-Rekonstruktionen der  $\mu$ CT-Untersuchungen erfolgte zusätzlich eine deskriptive radiologische Auswertung. Durch Analyse des radiologischen Bildmaterials wurden Ausschlusskriterien festgelegt und evaluiert und die Entwicklung des Kallusgewebes hinsichtlich des Verteilungsmusters, der Qualität und Quantität beurteilt.

Neben der klinischen Evaluation von Infektzeichen wurde anhand der Scout Views aus den In-vivo- und In-vitro-Messungen am  $\mu$ CT zum sechs-Wochen-Zeitpunkt ein *Lysescore* erstellt und anhand dessen Ausschlusskriterien definiert. Zunächst wurden die Übersichtsbilder der In-vitro-Präparate auf mögliche radiologische Infektzeichen im Bereich der Pinschafte untersucht. Von proximal nach distal wurden Pin 1 bis 4 (entsprechend KD1 bis 4) einzeln mit einem Score ausgewertet. Keine Infektzeichen ergaben null Punkte, die Ausbildung eines Pinkallus einen Punkt, Ausbildung von Pinkallus mit Lysesaum um den Pinschaft herum ergab zwei Punkte, Anzeichen für

eine Pin-Dislokation wurden mit drei Punkte gewertet und vier Punkte wurden für ein komplettes Pinversagen mit ausgeprägtem Lysesaum ohne mechanischer Stabilität vergeben (Abb. 3). Die Wertungen einzelner Pins wurden pro Femur summiert und ausgewertet. Tiere mit einem Lysescore von sieben und höher wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

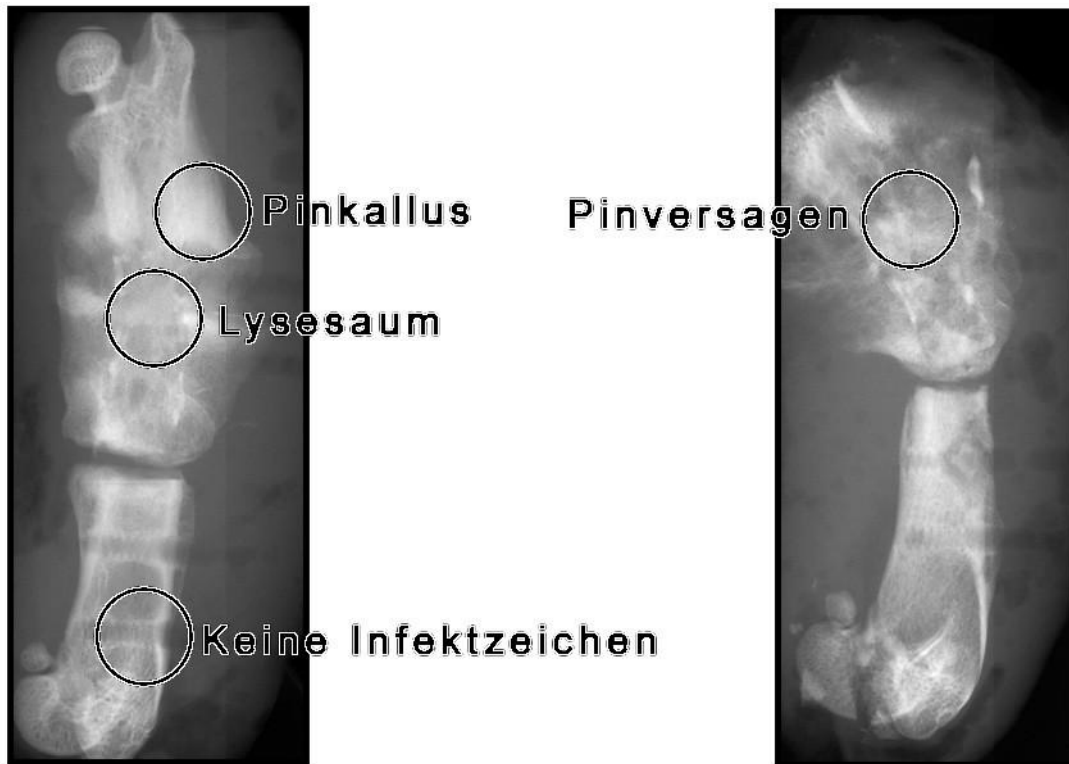


Abbildung 3: Beispielhafte Übersichtsaufnahmen von In-vitro-Messungen, die zur Erhebung von Ausschlusskriterien begutachtet wurden.

Um die Überbrückung des Osteotomiespalt mit mineralisiertem Gewebe zu beurteilen und im Rahmen der Möglichkeiten auf die biomechanische Beanspruchung des Gewebes zu übertragen, wurde als ein weiterer Messparameter ein *Bridgingscore* definiert. Hierfür wurden 3D-Rekonstruktionen der radiologischen Verlaufskontrollen am  $\mu$ CT verwendet und jeder Frakturspalt mittig in der Transversalebene in fünf Zonen – bei 12 (Zone 4), 3 (Zone 1), 6 (Zone 2) und 9 Uhr (Zone 3), sowie zentral (Zone 5) – unterteilt und auf eine Überbrückung mit mineralisierten Gewebsformationen hin untersucht (Abb. 4). Hier gab es für jede Zone einen Punkt für radiologisch feststellbare knöcherne Überbrückung oder null für eine fehlende knöcherne Überbrückung. Die Werte aller fünf Zonen in Summation pro Femur ergaben den Bridgingscore für jedes Tier, minimal null, maximal fünf

Punkte. Ab einer Überbrückung in drei verschiedenen Zonen, kann hypothetisch von einer grundsätzlichen biomechanischen Belastbarkeit ausgegangen werden.

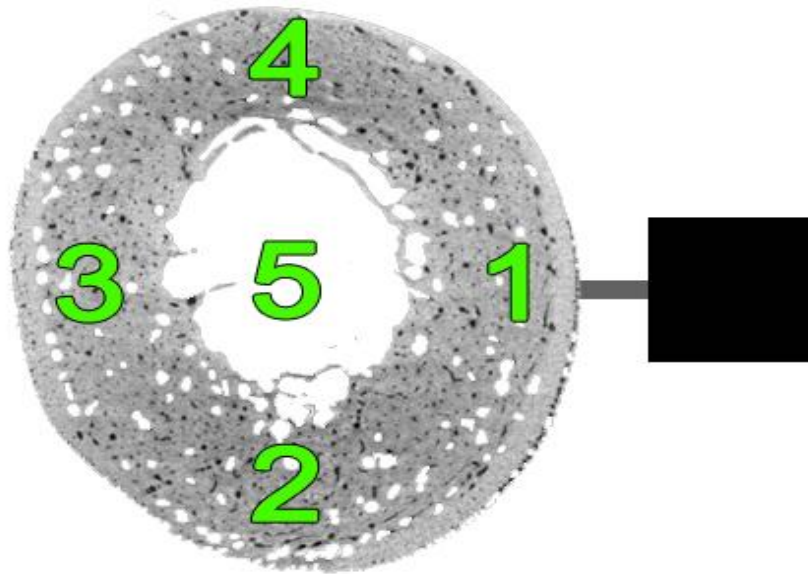


Abbildung 4: Betrachtung einzeln ausgewerteter Regenerationszonen in Relation zum Fixateur externe (schwarzer Balken).

### **Statistische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte mit der statistischen Programmiersprache R (R Core Team, 2015). Der Hauptteil der Analysen erfolgte mit Varianzanalysen (ANOVA) via R Paket afex (Singmann et al., 2015) sowie darauf folgenden follow-up-Kontrasten via R Paket lsmeans (Lenth, 2015). Als nicht-parametrische Auswertungsverfahren wurden Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Zur Analyse der Bridgingscores wurde ein verallgemeinertes lineares Modell mit Poisson-Verteilung, eine sogenannte Poisson Regression, verwendet.



## Ergebnisse

### Operationsergebnis

Bei den Tieren aller Gruppen verlief die Operation komplikationslos. Die Tiere kamen innerhalb weniger Minuten wieder zu vollem Bewusstsein und konnten nach kurzer Überwachung wieder in das gewohnte Umfeld zurückgebracht werden. Bei ausreichender Analgesierung wurden die Hintergliedmaße nach Osteotomie und Versorgung mit Fixateur externe bei allen Tieren schon unmittelbar nach dem operativen Eingriff wieder voll belastet. Keines der behandelten Tiere starb während oder unmittelbar nach dem Eingriff.

Lediglich in einem Fall musste ein Tier aus der CD34-Therapiegruppe drei Tage nach der Operation euthanasiert werden, da sich hier eine frühzeitige Fixateur-Dislokation zeigte.

Weitere elf Tiere mussten im Rahmen der klinischen Verlaufsuntersuchung vom weiteren Versuchsablauf ausgeschlossen werden. In einem Fall zeigten sich drei Wochen postoperativ massive lokale Entzündungszeichen mit starker Rötung und eitriger Sekretion aus der OP-Wunde bei einem Tier der Negativ-Kontrollgruppe. Bei zwei Tieren wurden bei den regelmäßigen Kontrollen der Tierställe schnell progrediente Tumore im Bereich der Mamma festgestellt. Diese beiden Tiere aus der Positiv- und Negativ-Kontrollgruppe wurden ebenso nach drei Wochen ausgeschlossen und umgehend euthanasiert.

In den übrigen acht Fällen wurde bei der regelmäßigen Visite der Tiere oder den radiologischen Verlaufskontrollen ein Versagen des Fixateur externe durch herausgelöste Pins oder makroskopisch dislozierte Knochen beziehungsweise Refraktur festgestellt. Dies betraf vier Tiere der CD133-Therapiegruppe, drei der Negativ- und eins der Positiv-Kontrollgruppe. Diese Ausschlüsse erfolgten alle zwischen der dritten und fünften postoperativen Woche. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Anzahl der Tiere zu Beginn der Untersuchung und vor Beginn der Analyse („Fallzahl nach Klinik“).

Gruppe	Fallzahl Start	Fallzahl nach Klinik	Fallzahl Analyse
Leergruppe	7	7	7
Positiv- Kontrollgruppe (BMP)	7	5	5
Negativ- Kontrollgruppe (abc)	11	6	5
CD34 – Therapiegruppe	8	7	6
CD133 – Therapiegruppe	13	9	7

Tabelle 2: Übersicht zur Entwicklung der Gruppengröße nach Ausschluss im Verlauf im Rahmen der klinischen Verlaufsbeurteilung (nach Klinik) und durch definierte Ausschlusskriterien (Analyse)

### Infektzeichen und Lysescore

In den angefertigten Übersichtsröntgenbildern (Scout-Views) vor den  $\mu$ CT-Aufnahmen ließ sich das gesamte Femur darstellen, im Falle der In-vivo-Aufnahmen also mit intakter anatomischer Beziehung zu umliegenden Körperteilen und einliegendem Fixateur, sodass Lage und Sitz der Pins im Knochen und die gegenseitige Stellung der Knochenfragmente zueinander, sowie die korrekte Lage und Befestigung des Fixateurbalkens und der zugehörigen Pins sicher evaluiert werden konnte. Dislokationen der Pins konnten somit nur in den In-vivo-Verlaufsaufnahmen ausgeschlossen werden, da das In-vitro-Präparat vor der Aufnahme im  $\mu$ CT von sämtlichen Osteosynthese-Material befreit wurde.

Das Verfahren der Auswertung wurde bereits ausführlich beschrieben. In Abbildung 6 ist exemplarisch die Bewertung einzelner Präparate anhand der Übersichtsaufnahmen dargestellt.



Abbildung 5: Scout Views von In-vitro-Messungen (a-c) und Ausschnitt eines Scout-Views einer In-vivo-Messung

Abbildung 5a zeigt ein komplettes Pinversagen mit ausgeprägten osteolytischen Arealen und Destruktion der Kortikalis um die beiden proximalen Pins (Pin 1 und 2), was den Ausschluss des betreffenden Tieres aus den weiteren Analysen nach sich zog. In Abbildung 5b lässt sich ein entstandener Pinkallus an Pin 1 und Pinkallus mit einem Lysesaum an Pin 2 erkennen. Pin 3 und 4 zeigen hingegen keine Infektzeichen, sodass dies einem summierten Lysescore von drei Punkten für das Tier entspricht. Lediglich ein Punkt bekam das Tier in Abbildung 5c, da sich hier lediglich eine Kallusbildung um den proximalen Pin 1 herum beschreiben lässt. Abbildung 5d stellt eine deutlich sichtbare Dislokation bei einer Verlaufskontrolle vor einer In-vivo-Messung dar. In diesem Fall wurde das Tier wie vorangehend beschrieben vorzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen und euthanasiert.

Über alle Gruppen hinweg konnten Pinversagen und etwaige Dislokationen fast ausschließlich an den proximalen Pins (KD 1 und 2) beobachtet werden. Lediglich bei einem der ausgewerteten Tieren konnte nach sechs Wochen ein Versagen der distalen Pins 3 und 4 mit stark ausgeprägter Osteolyse ohne mechanische Stabilität des Fixateurs nachgewiesen werden. Der Mittelwert des Lysescores lag bei Pin 4 mit 0,4 deutlich unter dem der proximalen Pins mit 1,8 bei Pin 2 und 2,0 bei Pin 1. Bei Pin 3 lag der durchschnittliche Lysescore bei 0,7 und damit auch hier deutlich unter den Werten der proximalen Pins.

Es wurden fünf Tiere aus verschiedenen Versuchsgruppen nach Auswertung des Lysescores, aufgrund ihrer hier ermittelten Infektparameter, von der Analyse ausgeschlossen, weil sie in der Summierung der Einzelwerte pro Pin einen Wert über sieben zeigten. Davon kam jeweils ein Tier aus Leergruppe, Negativ-Kontrollgruppe und der CD34-Therapiegruppe und zwei Tiere kamen aus der CD133-Therapiegruppe. Tabelle 2 zeigt in der rechten Spalte die jeweilige Gruppengröße nach Anwendung sämtlicher Ausschlusskriterien. Dabei zeigte sich bei nur zwei Tieren aus unterschiedlichen Versuchsgruppen ein komplettes Pinversagen bei mindestens einem Pin, beide Tiere zeigten in der Summe einen Wert über sieben.

Andererseits zeigte sich bei nur acht von 34 Tieren ein Score von 3 und weniger, in keinem Fall wurde der Wert 0 erreicht. Einzig in der Positiv-Kontrollgruppe musste kein Tier aufgrund der Infektzeichen ausgeschlossen werden. Abbildung 6 zeigt einen Überblick über die Lysescores getrennt nach proximal versus distalen Pins und Gruppen.

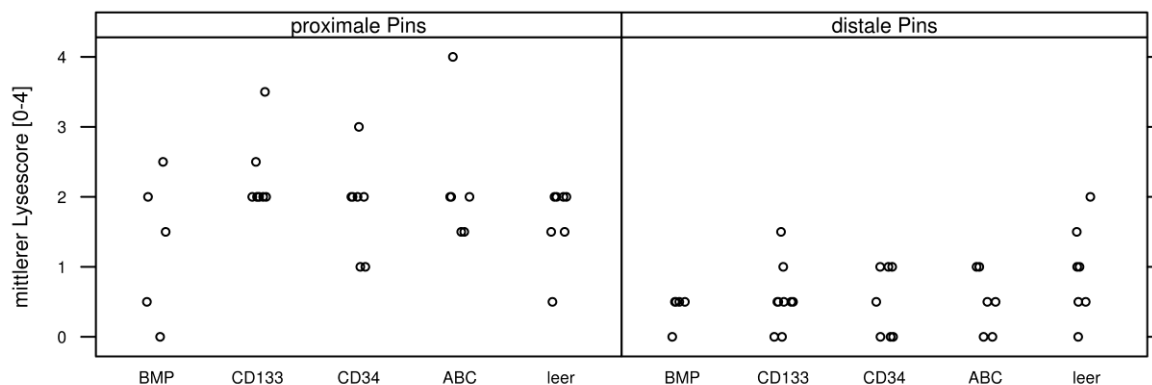


Abb 6: Darstellung der Mittelwerte der Lysescores von proximalen (Pin 1+2) und distalen (Pin 3+4) Pins für alle Gruppen. Die Werte liegen bei den proximalen Pins deutlich höher, während die Verteilung über die Gruppen keinen wesentlichen Unterschied aufzeigt.

Eine statistische Analyse der Lysescores mit einer Varianzanalyse (ANOVA = Analysis of Variance: in diese Analyse sind alle Tiere mit Lysescores inkludiert, siehe Tabelle 2, mittlere Spalte) mit den Faktoren Pin (proximal [Pin 1+2] versus distal [Pin 3+4]) sowie Gruppe (5-stufig) zeigte lediglich einen signifikanten Effekt für den Faktor Pin. Wie bereits angedeutet, erreichten die proximalen Pins in der statistischen Auswertung einen signifikant ( $p < 0,0001$ ) höheren Mittelwert (1,9) als distale Pins (0,6).

Trotz der unterschiedlichen Anzahl an Ausschlüssen pro Gruppe ergab sich aber kein signifikanter Unterschied im mittleren Lysescore ( $p = 0,30$ ) zwischen den unterschiedlichen Gruppen. Die Therapie zeigte somit, wie zu erwarten, keinen relevanten Einfluss auf die Häufigkeit von Infekten im Bereich der Pins. Alle im Folgenden berichteten Analysen enthalten lediglich die Tiere die einen summierten Lysescore kleiner 7 zeigten (Tabelle 2, rechte Spalte).

### Deskriptive radiologische Auswertung

In Frontalschnitten der In-vitro- $\mu$ CT-Aufnahmen (Abb. 7) lassen sich die Kallusformationen und Gewebsbrücken besser beurteilen. Auch hier handelt es sich um Einzelaufnahmen aus den jeweiligen Gruppen nach sechs Wochen.

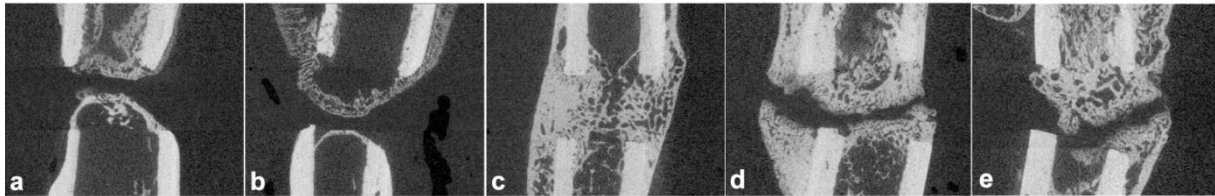


Abbildung 7: Frontalschnitte von repräsentativen In-vitro-Präparaten im  $\mu$ CT zum 6 Wochen-Zeitpunkt. Das proximale Ende ist hier am oberen Bildrand dargestellt. Leergruppe (a), Negativ-Kontrollgruppe (b), Positiv-Kontrollgruppe (c), CD133-Therapiegruppe (d), CD34-Therapiegruppe (e)

In allen Aufnahmen lässt sich mineralisierter Frakturkallus im Bereich des Frakturspaltes optisch nachweisen. Bei der Mehrheit der Tiere ging mehr Kalluswachstum vom proximalen Fragment aus. Neben dem insgesamt geringer ausgebildeten Kallusgewebe in der Leergruppe und in der Negativ-Kontrollgruppe, ließ sich beobachten, dass, im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen, weniger periostales Kallusgewebe gebildet wurde (Abb. 7a und 7b). Es zeigte sich lediglich eine Abdeckung des Markkanals durch eine dünne endostale Kallusformation. Bei den mit Vorläuferzellen behandelten Tieren (Abb. 7d – 7f) zeigte sich insgesamt mehr Kallusgewebe, allerdings ohne dabei die Fraktur komplett zu überbrücken. Vor allem zeigte sich mehr periostales Regenerationsgewebe, welches inhomogener und ungerichteter zu wachsen schien, verglichen etwa mit der Positiv-Kontrollgruppe (Abb. 7c). Das aus der Positiv-Kontrollgruppe dargestellte Tier zeigte dagegen einen homogen organisierten Frakturkallus, der den Osteotomiespalt komplett überbrückte.

Abbildung 8 zeigt aus dem In-vivo- $\mu$ CT gewonnene 3D-Rekonstruktionen der drei Messzeitpunkte zur Beurteilung des Heilungsverlaufs. Daran lässt sich die Heilung in Form der Kallusbildung und zunehmenden Überbrückung des Frakturspaltes im Verlauf der Untersuchung anschaulich nachvollziehen.

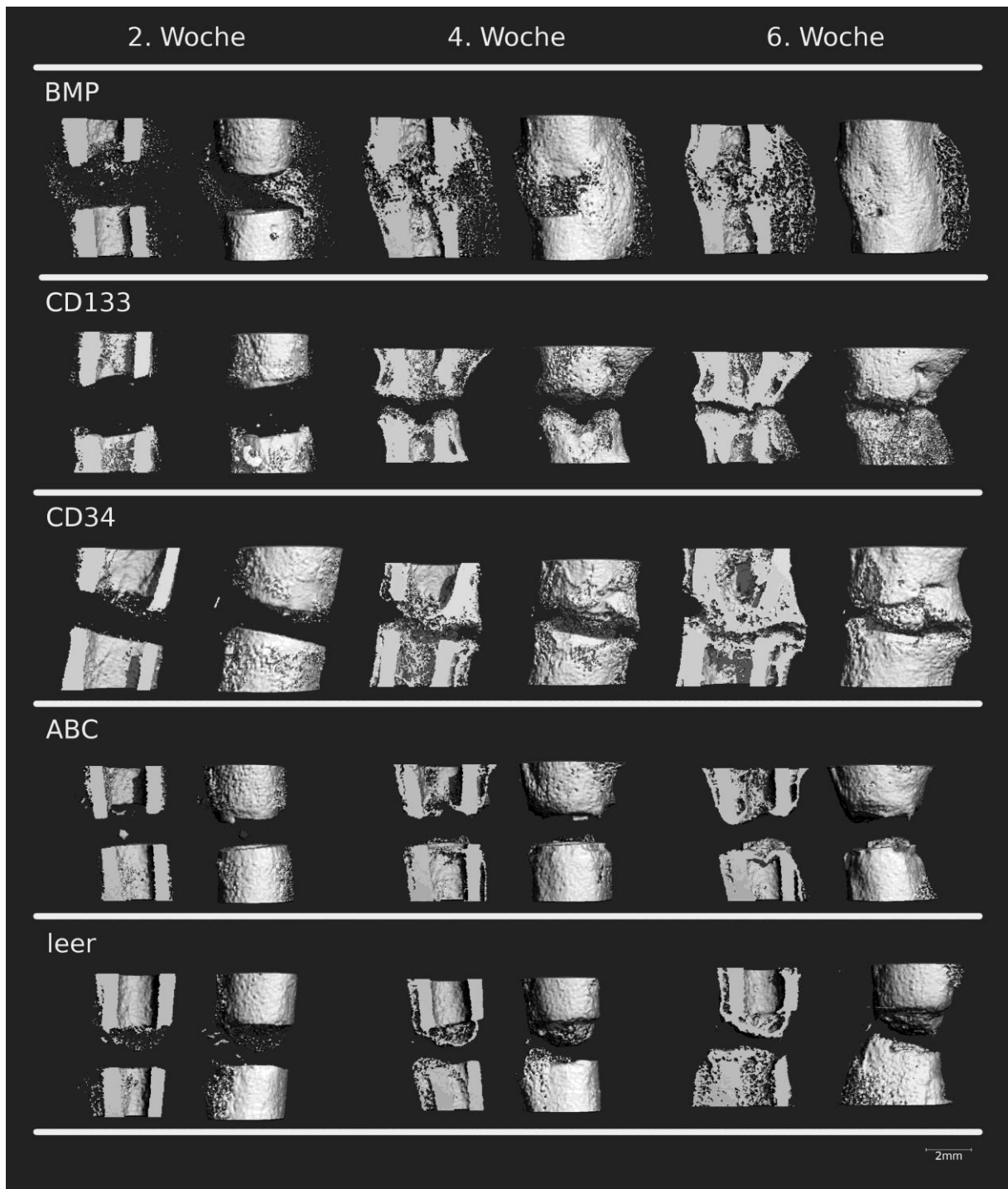


Abbildung 8: Beispielhafte rekonstruierte 3D-Darstellung einzelner Präparate aus jeder Gruppe im zeitlichen Verlauf, jeweils im Frontalschnitt und Außenansicht.

Auffällig zeigt sich erneut ein von proximal dominierendes Kalluswachstum in den meisten Gruppen. Im zeitlichen Kontext fällt auf, dass allein die mit BMP-behandelte Positiv-Kontrollgruppe zum ersten Messzeitpunkt nach 14 Tagen schon sichtbares Kalluswachstum innerhalb des Frakturspaltes aufwies. In den anderen Gruppen findet sich dies nicht. Insbesondere in den Therapiegruppen und der Negativ-Kontrollgruppe lässt sich über den Verlauf der Messungen ein zunächst periostal wachsender Kallus beobachten. Gegensätzlich dazu zeigt sich in der Leerguppe zwar insgesamt ein geringes Wachstum, hier erscheint das Wachstumsmuster allerdings analog zu den Beobachtungen aus den In-vitro-Präparaten zielgerichteter zu sein.

### **Überbrückung des Osteotomiespaltes**

Zur Beurteilung des Heilungsfortschrittes ließ sich das Femur isoliert mittels 3D-Rekonstruktionen aus mehreren Perspektiven und in einzelnen Schichten untersuchen, um eventuelle Überbrückungen durch Knochengewebe oberhalb des zuvor definierten und einheitlichen Schwellenwertes auszumachen. Betrachtet wurde hier jeweils ein Ausschnitt zwischen Hüft- und Kniegelenk, entsprechend des zuvor beschriebenen Volume of Interest (VOI), also einer individuell unterschiedlichen Größe abhängig von der tatsächlichen Präparatgröße. Zeigte sich bei äußerlicher Betrachtung des Knochens bereits eine Überbrückung des Frakturspaltes, so wurde durch Betrachtung einzelner horizontaler, frontaler und sagittaler Schnittbilder die genaue Lokalisation einer Überbrückung zu genau einer der vorher definierten fünf Zonen zugeordnet (dies ergab den oben beschriebenen Bridgingscore). Zeigte sich bereits bei äußerlicher Ansicht einer 3D-Rekonstruktion ein freier Spalt, wurde auf die Schnittbilduntersuchung verzichtet. Abbildung 9 zeigt den Bridgingscore der einzelnen Tiere getrennt nach Gruppen für die drei Messzeitpunkte.

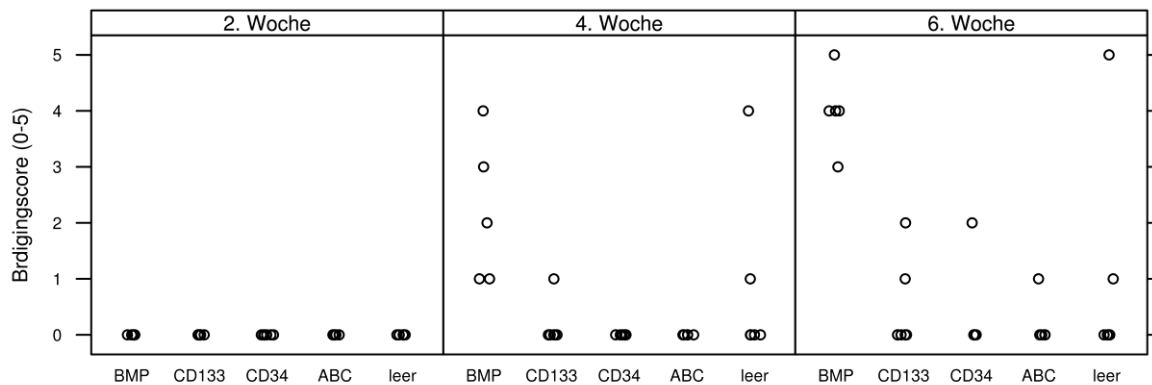


Abbildung 9: Verteilung der Bridgingscores über die Zeit in den einzelnen Gruppen. Alle Gruppen zeigen einen Anstieg im zeitlichen Verlauf aber auch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen.

Bei der Auswertung der Leergruppe zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach zwei Wochen zeigte sich bei keinem der Tiere eine Überbrückung. Nach vier Wochen ließen sich bei zwei Tieren knöcherne Überbrückungen ausmachen, in einem Fall sogar gleich in vier Zonen. Während sich bei diesen beiden Tieren entsprechend auch nach sechs Wochen Überbrückungen zeigten, war dies bei den übrigen vier Tieren der Gruppe auch zum Versuchsende nicht der Fall. Da aber eines der Tiere bereits nach sechs Wochen in allen untersuchten Zonen Überbrückungen des Spaltes zeigte, ließ sich zum Endpunkt ein Mittelwert von 1,00 Überbrückungen pro Tier ermitteln.

In den Negativ-Kontrollgruppen zeigte sich bei keinem der Tiere eine stabile knöcherne Überbrückung zu den untersuchten Zeitpunkten nach zwei, vier und sechs Wochen. Lediglich bei einem von fünf Tieren in der mit einem autologen Blutkoagel behandelten Gruppe fand sich eine Überbrückung in einer Zone nach sechs Wochen. Dies entspricht einem Mittelwert von 0,2 überbrückten Zonen pro Tier aus den Negativkontrollen nach Ablauf der Versuchsdauer.

Alle analysierten Tiere der mit BMP behandelten Positiv-Kontrollgruppe zeigten bereits nach vier Wochen eine Überbrückung in mindestens einer Zone und mindestens drei Zonen zum sechs-Wochen-Zeitpunkt. Somit waren alle Osteotomien nach Behandlung durch BMP zum Ende des Versuchszeitraumes weitgehend stabil überbrückt. Insgesamt wiesen die Tiere dieser Gruppe nach sechs Wochen durchschnittlich eine Überbrückung in 4,00 Zonen auf.



Im Vergleich zu den Tieren der Negativ-Kontrolle zeigte sich bei den mit CD133-positiven Zellen behandelten Versuchstieren eine früher einsetzende und ausgereifere Überbrückung des Osteotomiespalt. Eins von sieben Tieren zeigte bereits nach zwei Wochen eine Überbrückung in einer Zone. Bei keinem der Tiere in dieser Gruppe jedoch konnte zum Versuchsende eine Überbrückung in mehr als zwei Zonen ausgemacht werden. Der Mittelwert betrug 0,43 überbrückte Zonen pro Tier nach sechs Wochen.

In der Gruppe der mit CD34-positiven Zellen behandelten Tiere ließ sich lediglich bei einem Tier eine Überbrückung in zwei Zonen nach sechs Wochen feststellen, wobei die gebildeten Gewebsbrücken jedoch makroskopisch deutlich voluminöser erschienen als dies in der Negativ-Kontrollgruppe zu beobachten war. Da aber bei keinem anderen der insgesamt sechs untersuchten Tiere dieser Gruppe der Spalt überbrückt war, ergab sich ein Mittelwert von 0,33 Zonen pro Tier zum Ende der Studie.

Über alle Gruppen hinweg ließen sich etwa ein Drittel aller Gewebsbrücken in der Zone 5, also zentral des Röhrenknochens lokalisieren. Etwa ein Viertel der Brücken verfallen auf die Zone 1, also lateral zum Fixateur externe gerichtet, während der Rest homogen auf die Zonen 2, 3 und 4 verteilt ist.

Die statistische Analyse der Daten beim Bridgingscore stellt sich als nicht trivial dar, da die abhängige Variable, der Bridgingscore nicht normal verteilt ist. Eher kann man davon ausgehen, dass die Überbrückung an jeder einzelnen Zone ein statistisch unabhängiges, abzählbares Ereignis ist. Damit folgt der Bridgingscore einer Poisson-Verteilung. Folgerichtig wurden die Daten des dritten Messzeitpunkts mit einer Poisson-Regression analysiert (auf eine Analyse der anderen Messzeitpunkte wurde aufgrund der noch geringeren Varianz verzichtet). Als unabhängige Variable wurde lediglich die Therapiegruppe als Faktor aufgenommen.

Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Effekt des Faktors Gruppe ( $p < 0,0001$ ), was bedeutet, dass sich die Werte der einzelnen Gruppen prinzipiell unterscheiden. Die Follow-up-Kontraste aller möglichen paarweisen Vergleiche ergaben jedoch, dass lediglich die Positiv-Kontrollgruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen einen signifikanten Unterschied aufweist ( $p < 0,004$ ). In dieser Gruppe finden sich somit signifikant mehr Überbrückungen im Vergleich zu jeder anderen Gruppe.

Zwischen den anderen Gruppen lassen sich hier im Bezug auf den Bridgingscore keine signifikanten Unterschiede feststellen ( $p > 0,14$ ).

## Ergebnisse der Messungen am $\mu$ CT

### Kallusvolumen (TV)

Abbildung 10 zeigt die Entwicklung des Kallusvolumens über die drei Messzeitpunkte (2. Woche, 4. Woche und 6. Woche) für die fünf untersuchten Gruppen. Die auffälligste Knochenheilung tritt, wie zu erwarten, in der Positiv-Kontrollgruppe nach Behandlung mit BMP2 auf. Bei ihr zeigt sich bereits zum ersten Messzeitpunkt nach zwei Wochen ein offensichtlich erhöhtes Kallusvolumen im Vergleich zu allen anderen Gruppen. In den beiden Therapiegruppen, CD133 und CD34, kommt es erst im Verlauf zu einem Anstieg dieses Parameters. Zum dritten Messzeitpunkt in der sechsten Woche ist aber auch hier ein Vorteil gegenüber der Negativ-Kontrollgruppe ABC auf den ersten Blick zu erkennen.

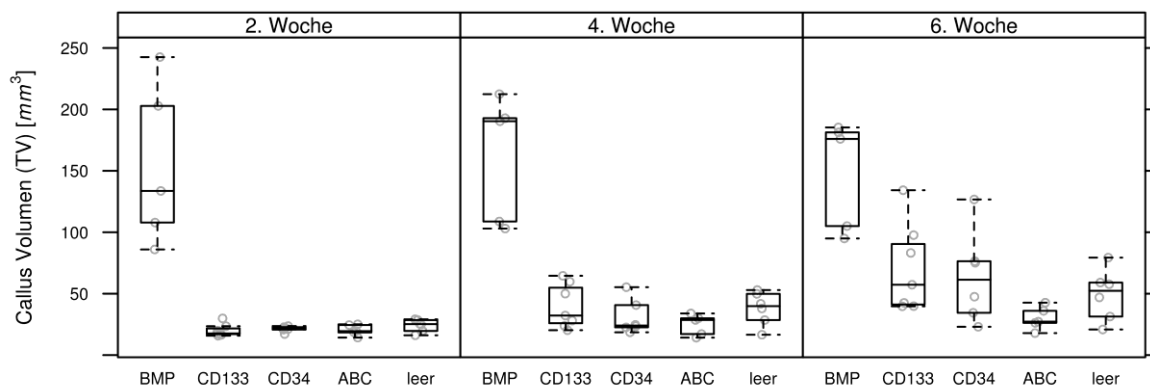


Abbildung 10: Entwicklung Kallusvolumen in allen Gruppen über die Zeit. Die Rohwerte sind im Hintergrund als graue Punkte dargestellt, die Boxplots im Vordergrund zeigen den Median, sowie das 1. und 3. Quartil.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte zuerst mit einer ANOVA mit dem Kallusvolumen als abhängiger Variable und Gruppe als Zwischensubjekt-Faktor sowie dem Messzeitpunkt (2. Woche, 4. Woche und 6. Woche) als Innersubjekt-Faktor. Diese ANOVA zeigte neben signifikanten Haupteffekten für die Faktoren Gruppe ( $p < 0,0001$ ) und Messzeitpunkt ( $p = 0,0003$ ) auch eine signifikante Interaktion ( $p = 0,03$ ). Diese Interaktion bestätigte das Vorhandensein einer

differentiellen Entwicklung der Gruppen. Im Folgenden werden Follow-up-Kontraste dieser Interaktion berichtet, welche das genaue Datenmuster näher beleuchten.

Hinsichtlich der Entwicklung über die Messzeitpunkte zeigt sich lediglich in den Therapiegruppen CD133 und CD34 ein signifikanter Haupteffekt über die Zeit ( $p < 0,0001$ ). Das heißt, dass in diesen Gruppen ein signifikanter Zuwachs des Kallusvolumens über die drei Messzeitpunkte hinweg beobachtet werden konnte. In der Leergruppe war dieser Effekt deutlich schwächer ( $p = 0,06$ ). Weder die Positiv-Kontrollgruppe ( $p = 0,51$ ), noch die Negativ-Kontrollgruppe ( $p = 0,69$ ), zeigten eine signifikante Veränderung über die Zeit. Die wesentliche Zunahme im Kallusvolumen erfolgt bei der Positiv-Kontrolle bereits vor dem ersten Messzeitpunkt nach zwei Wochen und wurde daher in diesem Modell nicht statistisch erfasst. Die Negativ-Kontrolle hingegen zeigte tatsächlich insgesamt kein signifikantes Kalluswachstum.

Betrachtet man lediglich den letzten Messzeitpunkt (6. Woche), zeigte sich, dass die CD133 Therapiegruppe ein signifikant höheres Kallusvolumen erreicht hat als die Negativ-Kontrollgruppe ( $p < 0,02$ ). In leicht eingeschränkter Form galt dies auch für die CD34-Therapiegruppe ( $p = 0,06$ ). Außerdem zeigte die Positiv-Kontrollgruppe BMP ein höheres Kallusvolumen als alle anderen Gruppen ( $p < 0,0001$ ). Alle anderen paarweisen Gruppenvergleiche im letzten Messzeitpunkt waren nicht signifikant ( $p > 0,18$ ).

Zur Kontrolle wurden die Unterschiede zum letzten Messzeitpunkt zwischen den Gruppen nochmal mit einem nicht-parametrischen Test (Mann-Whitney-U-Test) untersucht. Für die CD133-Therapiegruppe zeigte sich wieder ein signifikanter Unterschied zur Negativ-Kontrollgruppe ( $p = 0,02$ ), nicht aber für die CD34-Therapiegruppe ( $p = 0,13$ ). Die Positiv-Kontrollgruppe BMP zeigte auch hier ein höheres Kallusvolumen als alle anderen Gruppen, ( $p < 0,02$ ).

## Mineralgehalt des Knochens (BMC)

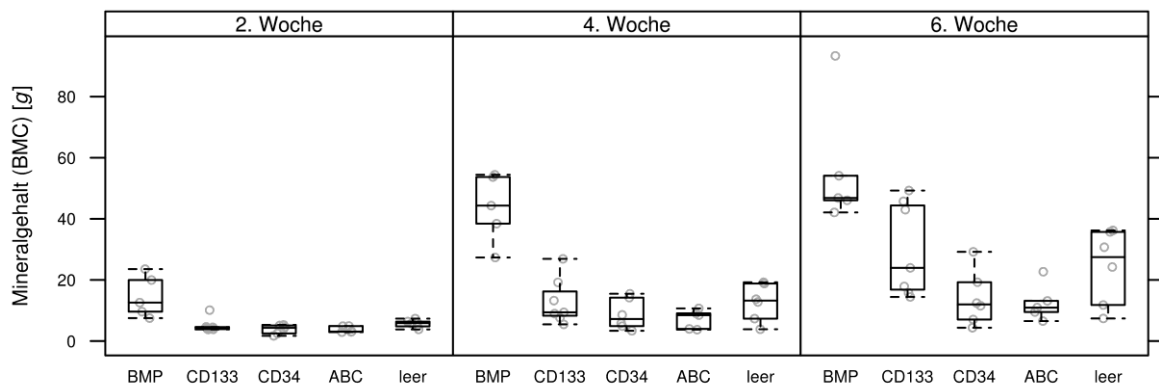


Abbildung 11: Entwicklung BMC (TMD) in allen Gruppen über die Zeit. Entsprechend der Abb. 10, sind die Rohwerte als graue Punkte im Hintergrund und Boxplots dargestellt

Abbildung 11 zeigt die Entwicklung des Mineralgehalts des Knochens (BMC) über die drei Messzeitpunkte (2. Woche, 4. Woche und 6. Woche) für die fünf untersuchten Gruppen. Erneut sieht man zuerst den deutlichen Effekt der Positiv-Kontrollgruppe. Auch deutet sich hier die positive Entwicklung in der CD133-Therapiegruppe an, welcher in abgeschwächter Form auch in CD34-Therapiegruppe vorhanden zu sein scheint. Ein ähnlicher Effekt ist auch in der Leergruppe sichtbar. Wie bereits zu erwarten, ist die Entwicklung in der Negativ-Kontrollgruppe ABC am ungünstigsten, ein Zuwachs des Mineralgehalts ist kaum erkennbar.

Als erster Schritt folgte erneut eine ANOVA mit BMC als abhängiger Variable und Gruppe als Zwischensubjekt-Faktor sowie Messzeitpunkt (2. Woche, 4. Woche und 6. Woche) als Innersubjekt-Faktor. Erneut zeigten sich sowohl Haupteffekte für die Faktoren Gruppe ( $p < 0,0001$ ) und Messzeitpunkt, ( $p < 0,0001$ ), sowie eine signifikante Interaktion der beiden Faktoren ( $p = 0,002$ ). Diese Interaktion deutete wieder auf ein differentielles Muster der Gruppen über die Zeit hin. Im Folgenden werden Follow-up-Kontraste dieser Interaktion berichtet.

Hinsichtlich der Entwicklung über die Messzeitpunkte zeigte sich in allen Gruppen, mit Ausnahme der Negativ-Kontrollgruppe ( $p = 0,17$ ), ein signifikanter einfacher Haupteffekt für die Zunahme des Mineralgehaltes über die Zeit ( $p < 0,0003$ ). Lediglich in der CD34-Therapiegruppe war dieser Effekt nur geschwächt wahrnehmbar ( $p < 0,07$ ). Dies bestätigte die obige Beobachtung eines allgemeinen Anstiegs des Mineralgehalts, mit Ausnahme in der Negativ-Kontrollgruppe.

Betrachtet man nun lediglich den dritten Messzeitpunkt (6. Woche) und vergleicht die Gruppen miteinander, zeigt sich, dass in der CD133-Therapiegruppe ein signifikant höherer Mineralgehalt zu beobachten ist, sowohl gegenüber der Negativ-Kontrollgruppe, ( $p = 0,002$ ), als auch der CD34-Therapiegruppe ( $p = 0,003$ ). Interessanterweise deuteten die Daten auch darauf hin, dass der Mineralgehalt der Leergruppe signifikant höher war als selbiger in der negativ-Kontrollgruppe ( $p = 0,04$ ), als auch höher als in der CD34-Therapiegruppe ( $p = 0,05$ ). Wie zu erwarten war der Mineralgehalt in der Positiv-Kontrollgruppe BMP signifikant höher als in allen anderen Gruppen ( $p < 0,0001$ ).

Zur Kontrolle wurden die Gruppenunterschiede im dritten Messzeitpunkt ebenfalls erneut mit nicht-parametrischen Verfahren überprüft. Diese Analyse zeigte ein ähnliches Muster wie die Follow-up-Kontraste der ANOVA. Die CD133-Therapiegruppe erreichte hier einen signifikant höheren Mineralgehalt als die Negativ-Kontrollgruppe ( $p = 0,02$ ), und als die Positiv-Kontrollgruppe ( $p = 0,05$ ). Ebenso war der Mineralgehalt der Positiv-Kontrollgruppe höher als in allen anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ). Lediglich das Muster der Leergruppe replizierte sich nicht, diese unterschied sich (außer von der Positiv-Kontrollgruppe) von keiner der anderen Gruppen ( $p > 0,12$ ).

### Mittlere Kallusdichte / tissue mineral Density (TMD)

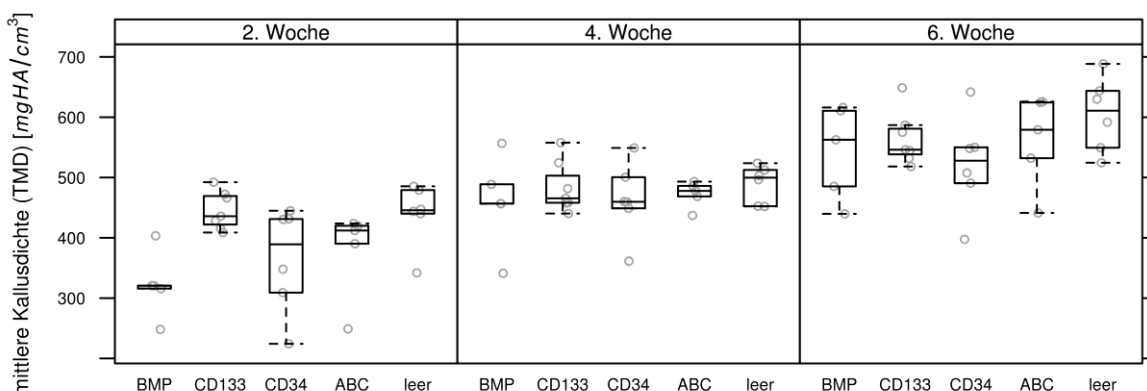


Abbildung 12: Entwicklung der TMD in allen Gruppen über die Zeit. Entsprechend der Abb. 10, sind die Rohwerte als graue Punkte im Hintergrund und Boxplots dargestellt

Als letztes Maß wurde die Entwicklung der mittleren Kallusdichte analysiert. Die Entwicklung über die Messzeitpunkte für die fünf Gruppen ist in Abbildung 12

dargestellt. Auf den ersten Blick ist erkennbar, dass scheinbar kein Unterschied zwischen den Gruppen vorhanden ist. Dahingegen zeigen alle fünf Gruppen eine vergleichbar positive Entwicklung der mittleren Kallusdichte über die drei Messzeitpunkte hinweg.

Eine statistische Analyse mit einer ANOVA bestätigte diesen ersten Eindruck. Die abhängige Variable war TMD, die unabhängigen Variablen waren der Zwischensubjekt-Faktor Gruppe sowie der Innersubjekt-Faktor Messzeitpunkt. Diese ANOVA zeigte lediglich einen signifikanten Effekt des Faktors Messzeitpunkt ( $p < 0,0001$ ), aber keinen statistisch reliablen Effekt des Faktors Gruppe ( $p = 0,12$ ) und auch keine Interaktion ( $p = 0,09$ ). Follow-up-Kontraste des Zeiteffekts zeigen, dass die TMD-Werte in der 4. Woche signifikant höher waren als die Werte in der 2. Woche ( $p < 0,0001$ ). Außerdem waren die TMD Werte in der 6. Woche signifikant höher als selbige in der 4. Woche ( $p < 0,0001$ ).

## **Diskussion**

Diese Arbeit hatte unterschiedliche Ziele. Eines der eingangs definierten Ziele war zunächst die Etablierung eines Tiermodells, mit dem eine Knochenheilungsstörung reproduzierbar nachgestellt werden kann. Ein weiteres Ziel war, Zellen mit potentiell pro-angiogenetischen Eigenschaften aus dem peripheren Blut zu identifizieren und diese zur Stimulation der Knochenregeneration bei verzögerter Frakturheilung zu nutzen.

Die Diskussion folgt im Großen und Ganzen dieser Teilung, wobei zuerst die Ergebnisse bezüglich der Stimulation der Knochenregeneration diskutiert werden. Das Tiermodell wird dann zunächst separat sowie im Anschluss die übrige angewandte Methodik diskutiert.

### **Diskussion der Zelltherapie**

Hinsichtlich der Therapiegruppen zeigt sich vor allem für die CD133-positiven Zellen ein nachweislich positiver Effekt auf die Knochenregeneration. Dieser ist nach aktuellen Erkenntnissen am ehesten durch die pro-angiogenetischen Eigenschaften erklärt, in deren Folge weitere für den Knochenstoffwechsel relevante Substrate wie die eingangs erläuterten Wachstumsfaktoren (und damit BMP) und auch weitere osteogene Vorläuferzellen über neue Gefäßformationen in die Regenerationszone gelangen (Maes et al., 2010). Der Nachweis von erhöhter Konzentration CD133-positiver Zellen im peripheren Blut des Menschen nach einer knöchernen Verletzung bestätigt weiterhin die Relevanz und das weitere Potenzial dieser Zellen (Eghbali-Fatourehchi et al., 2005).

Außerdem zeigt sich, dass der Einsatz eines Blutkoagels als Trägersubstanz einen insgesamt negativen Effekt auf die Heilung hat. So lässt sich bei der Untersuchung auf eine mögliche Überbrückung des Frakturspaltes mit Knochengewebe ein deutlicher Unterschied zwischen Leer- und Negativ-Kontrollgruppe ausmachen. Neben dem makroskopisch sichtbaren Unterschied zeigt sich dies auch in der statistischen Analyse hinsichtlich des BMC (TMD). Einschränkend muss aber beachtet werden, dass ein Tier in der Leergruppe sogar im Vergleich zur Positivkontrolle eine außergewöhnliche Heilungstendenz zeigte (fünf von fünf möglichen überbrückten Zonen zum Versuchsende) und somit einen besonders

großen Einfluss auf den Mittelwert hatte. Zum Ausgleich dieses Ausreißers und zum Erhalt einer belastbareren statistischen Analyse wäre eine größere Fallzahl nötig gewesen.

Der negative Effekt des Blutkoagels kann auch einen maskierenden Einfluss auf die Entwicklung in den Therapiegruppen haben. Dies wiederum könnte erklären, warum die Therapiegruppen zwar bessere Ergebnisse als die Negativ-Kontrollgruppe zeigen, aber keine konstant besseren Ergebnisse im Vergleich zur Leergruppe. Es wäre daher zu erwarten, dass bei der Wahl eines besseren Transportmediums für die zu untersuchenden Zellen der positive Effekt stärker ausfällt.

Insbesondere gilt dies für die CD34-Therapiegruppe, die hinsichtlich ihres Mineralgehaltes (BMC) in der Heilungstendenz sogar hinter der Leergruppe zurückbleibt, wenn man die Ergebnisse zum Endzeitpunkt betrachtet. Das Gesamtvolumen des gebildeten Kallusgewebes zeigt jedoch auch hier einen deutlich positiven Trend, auch im Vergleich zur Leer- und Negativ-Kontrollgruppe.

Erwähnenswert im Bezug auf die statistische Auswertung ist, dass die radiologische Auswertung des Heilungsverlaufes nur eine bedingte Aussage über die tatsächlichen biomechanischen Eigenschaften darstellt. Eine radiologisch nachweisbare ossäre Überbrückung lässt keine sichere Beurteilung der Belastbarkeit dieses neugebildeten Knochens zu. Mit der Differenzierung nach Wachstumszonen wurde versucht dieser Einschränkung Rechnung zu tragen. Eine weitere Möglichkeit wäre die biomechanische Testung als Vergleich zu etablieren. Angesichts des beschriebenen Tiermodells mit verzögerter Heilungssituation liefert diese jedoch zu den genannten Messzeitpunkten noch keine aussagekräftigen Werte. Es könnte daher für künftige Untersuchungen von Nutzen sein, den finalen Messzeitpunkt des Tiermodells nach hinten zu verschieben um die biomechanische Testung doch zu inkludieren.

Im Bezug auf die weitere deskriptive Analyse der dargestellten Beispielbilder muss kritisch erwähnt werden, dass es sich hier lediglich um Momentaufnahmen einzelner Versuchstiere aus den jeweiligen Gruppen handelt. Diese Bilder sollen nur beispielhaft die Heilungsentwicklung ihrer Gruppen vorstellen und ihre Auswahl erfolgte nicht nach objektiven Kriterien. Daher können diese lediglich einen ungenauen Überblick über die Heilungsverläufe geben. Die Darstellungen sind nicht statistisch belastbar. Sie sind aber gerade auch angesichts der unterschiedlichen



Wachstumsmuster des Regenerationsgewebes aufschlussreich. Hier wäre die histologische Aufarbeitung der Präparate folgerichtig. Selbige erfolgte auch im Rahmen der weiteren Versuchsdurchführung, dies war aber nicht Teil der vorliegenden Arbeit (Preininger et al., 2013; B. Preininger et al., 2012)

Das Gefälle beim Lysescore von proximal nach distal ist ein überraschendes Ergebnis, ist doch in der Bildbetrachtung ein eben solches Gefälle auch für die Kallusneubildung zu erkennen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass nur der Unterschied im Lysescore auch statistisch erfasst und signifikant ist, während die Feststellung der Wachstumsdifferenz zwischen proximal und distal lediglich auf der makroskopischen Betrachtung der CT-Schnitte beruht. Nichtsdestoweniger sind diese beiden Ergebnisse nicht leicht miteinander in Einklang zu bringen. Das erhöhte proximale Wachstum könnte man mit einer dort besseren Blutversorgung begründen. Zum einen muss man davon ausgehen, dass im Rahmen des operativen Eingriffes auch nach distal ziehende Gefäße verletzt wurden. Zum anderen erfolgt die Blutversorgung im Bereich der Femurdiaphyse über die A. nutricia, die gespeist wird aus der A. femoralis profunda und den Ae. Circumflexae. Bei Durchtrennung des weiterhin an der Versorgung beteiligten Periost und der A. nutricia im Rahmen der Osteotomie verbleibt im distalen Segment ein verminderte Durchblutungssituation. Es ist nun allerdings zu vermuten, dass dies als Ursache für die proximal bessere Heilung auch die Infektanfälligkeit verringern und eher nicht erhöhen sollte. Für weitere Untersuchungen, wäre die Verwendung beschichteter Pins zu erwägen, um das Infektrisiko zu reduzieren (Smith et al., 2006).

Bei Sichtung aktueller Literatur lässt sich kein einheitlich etablierter Messparameter hinsichtlich der quantitativen und qualitativen Auswertung der Kallusbildung aus den verfügbaren Daten des  $\mu$ CT erkennen. In manchen Studien wird die mittlere Kallusdichte / tissue mineral density (TMD) als repräsentativster Parameter zur Darstellung von Kallusbildung und seiner biomechanischen Eigenschaften beschrieben (Morgan et al., 2009). Während hier keine biomechanischen Messungen ausgewertet wurden und daher keine Aussage über eine etwaige Analogie getroffen werden kann, zeigte sich in der Auswertung des TMD ein von den anderen Parametern deutlich abweichendes Muster. Es konnte zwar ein grundsätzlicher Anstieg der Kallusdichte über die Zeit beobachtet werden, was auch im Rahmen der Heilung zu erwarten ist, jedoch konnten hier keine signifikanten Unterschiede

zwischen den Gruppen festgestellt werden, auch nicht im Vergleich der Positiv- und Negativ-Kontrollgruppe miteinander. In den jeweiligen Analysen für die Parameter Kallusvolumen und BMC war dieser Effekt signifikant und ein ebensolcher Effekt zeigte sich auch für die Bridgingscores.

Für vergleichende Beobachtungen müssten neben einheitlichen Messparametern auch vergleichbare Messzeitpunkte eingehalten werden. Beispielsweise ist im Verlauf der Untersuchungen bei der Positiv-Kontrollgruppe im Rahmen des Remodelling ab einem bestimmten Zeitpunkt eher eine Abnahme des Kallusvolumens zu erwarten, während dieses etwa bei der Leergruppe noch zunehmen könnte. Dementsprechend müssen die Ergebnisse differenziert betrachtet werden und über die Wahl geeigneter Messparameter kann daher keine generelle Aussage getroffen werden.

Insgesamt konnte im Bezug auf die eingangs formulierten Hypothesen ein positiver Effekt beider Therapiegruppen und damit der aus dem peripheren Blut isolierten Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Dieser ist nach aktueller Erkenntnis in beiden Fällen im Wesentlichen auf das angiogenetische Potenzial dieser Zellen zurückzuführen. Histologische Untersuchungen der Therapiegruppen zeigen eine erhöhte Anzahl neugebildeter Gefäßsysteme im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe und bestätigen damit diese Theorie (Preininger et al., 2013).

### **Diskussion des Tiermodells**

Die Etablierung eines neuen Tiermodells mit dem eine Knochenheilungsstörung reproduzierbar nachgestellt werden kann, kann durch die Untersuchung als gelungen angesehen werden. Es konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass in der Leergruppe keine adäquate Heilung nach sechs Wochen stattfindet und dass sich das Heilungsergebnis in Abstufungen durch verschiedene therapeutische Ansätze bis hin zur vollständigen Heilung beeinflussen lässt.

Die Auswahl von BMP2 zur starken Induktion der Heilung und damit als Positivkontrolle konnte in der Untersuchung bestätigt werden. Andererseits konnte durch die Gabe des Blutclots auch eine zusätzliche Negativkontrolle etabliert werden, die die Heilung fast vollständig inhibiert.

Etwas mehr als ein Drittel der operierten Tiere sind im Verlauf der Untersuchung aus den endgültigen Analysen ausgeschlossen worden. Auffällig ist bei näherer Betrachtung, dass lediglich aus der Leergruppe kein Tier betroffen war. Folglich muss auch hier die Implantation des Blutkloagels als Ursache diskutiert werden. Daneben könnte jedoch auch das hohe Alter der Tiere als Ursache in Frage kommen. Damit einhergehend steigt im Vergleich zum Jungtier das Risiko zur Ausbildung von Tumoren, was hier zum Ausschluss von zwei Tieren führte. Weiterhin spielt auch die gesteigerte Infektanfälligkeit im Alter eine Rolle (Krabbe et al., 2004). Die zwar auf der einen Seite hinsichtlich ihres negativen Einfluss auf die Knochenheilung gewünschten altersbedingten Veränderungen des Immunsystems, stellen somit andererseits durch höhere Ausfallquoten einen möglichen Nachteil des Modells dar.

Es sind bereits verschiedene Tiermodelle zur Etablierung einer verzögerten Knochenheilung publiziert worden (Kokubu et al., 2003). Dort beschriebene Ansätze zur Verzögerung der Heilung sind unter anderem Kauterisierung der Frakturrenden (Kaspar et al., 2008), Vergrößerung der Defektzone (Seebach et al., 2010) oder inadäquate Ruhigstellung (Hietaniemi et al., 1995). Die meisten dieser Modelle arbeiten allerdings mit Jungtieren. Damit bleiben viele der eingangs erwähnten sich negativ auf den Knochenstoffwechsel auswirkenden biologischen Faktoren unbeachtet, insbesondere das eingangs als Risikofaktor hervorgehobene Alter (Meyer et al., 2001), welches mit abnehmender Knochendichte und erhöhtem Frakturrisiko einhergeht (Demir et al., 2008)

Eine Vielzahl der in der Literatur bekannten und hier genannten Untersuchungen zu dem Thema wurden unter Verwendung der Ratte als Versuchstier durchgeführt. Dadurch ist auch im Bezug auf die hier vorliegende Studie sichergestellt, dass vergleichende Beobachtungen nachvollzogen werden können und eine Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext möglich ist. Die häufig verwendeten Subspezies Sprague Dawley und Wistar sind jedoch aufgrund einer leicht divergierenden Femuranatomie nicht in jeglicher Hinsicht vergleichbar (Jäger et al., 2005a). Daher ist ein Vergleich von Studien, in denen verschiedene Subspezies zur Anwendung kamen, nicht unproblematisch.

Die Osteotomie unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von einer natürlich vorkommenden Fraktur, vor allem unterscheidet sich auch ein natürlicher

Frakturspalt von dem einer Osteotomie. Für das dieser Studie zugrunde liegende Operationsverfahren wurde das Os Femoris lateralseitig freigelegt und damit ein nicht unerheblicher Weichteilschaden verursacht. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielt die Weichteilsituation und damit vor allem auch die Blutversorgung im Bereich einer Fraktur eine wesentliche Rolle für die anschließende Heilung. Im Verlauf des operativen Eingriffs erfolgte die Fixierung des Knochens vor dem Zufügen des Traumas in Form einer Osteotomie. Mögliche Scherkräfte – bei Frakturen sonst üblich – wurden demnach ausgeschlossen. Die sich gegenüberstehenden Knochenenden waren glatt geschliffen und standen entsprechend der Schablone exakt parallel zueinander, während die Bruchstücke nach einer Fraktur in der Regel eine raue Oberfläche und damit auch insgesamt mehr Fläche aufweisen. Auch ließ sich trotz stetiger Spülung mit isotoner Kochsalzlösung während des Eingriffs, insbesondere beim Bohren und der Osteotomie nicht ausschließen, dass angrenzendes Gewebe thermischen Schäden ausgesetzt war und es somit zu Nekrosen in der Regenerationszone gekommen sein könnte. Trotzdem wurde in diesem Versuch die Osteotomie aufgrund ihrer hohen Standardisierung und der besseren Reproduzierbarkeit einer mechanischen Fraktur, etwa durch Biegemodelle (Schmidmaier et al., 2001) vorgezogen.

Nachteile des Fixateur externe ergeben sich aus der Lage des Osteosynthesematerials außerhalb des Körpers, da hier durch den externen Fremdkörper eine Gewichtsverlagerung und damit eine Störung des Gangbildes entstehen kann. Durch die Wahl besonders leichter Materialien (Karbon) konnte dieser Nachteil im Vorfeld bereits adressiert und minimiert werden. Der externe Hebel und damit einhergehend ausgelagertes Zusatzgewicht können weiterhin eine Lockerung der Pins begünstigen. Auch die mechanische Verbindung von Pins und Balken kann sich theoretisch lösen, was ein komplettes Fixateur-Versagen zur Folge hätte. Weichteilirritationen im Heilungsverlauf und Pin-assoziierte Komplikationen, wie etwa das Risiko der lokalen Infektion im Bereich der Pin-Eintrittsstellen, stellen einen weiteren möglichen Nachteil dar (Hazan and Oron, 1993). Sowohl die lokale Pin-Infektion, wenn auch nur in einem Fall, als auch die Dislokation und das Fixateur-Versagen sind im Laufe der beschriebenen Untersuchung beobachtet worden und haben zu einer Ausfallquote von über 26% beigetragen. Zählt man die durch den Lysecore ausgeschlossenen Tiere dazu oder betrachtet man die Lyse im Bereich der Pins als Folge einer lokalen Infektion, spielt dieser Faktor eine noch größere Rolle.

Letztlich ist auch die mit dem Fixateur externe verbundene komplexe Operationstechnik als Nachteil in Betracht zu ziehen. Die lange Operationszeit durch die oben beschriebenen multiplen Einzelschritte macht ein intensiveres Narkoseverfahren nötig. Alternative Osteosyntheseverfahren wie die Marknagelung oder die Plattenosteosynthese sind im Vergleich jedoch noch Zeitaufwendiger (Jäger et al., 2005b).

Es bieten sich jedoch auch deutliche Vorteile der beschriebenen Verwendung des Fixateur externe. Vorrangig steht hier für die durchgeführte Untersuchung das Ausbleiben störender Implantate in der Regenerationszone, wie es beispielsweise bei der Verwendung von Marknägeln unumgänglich ist. Somit konnte neben der periostalen auch die endostale Heilung beobachtet und beschrieben werden. Trotz erhöhten operativen Aufwands ist die Methode technisch sicher durchführbar und reproduzierbar und würde auch für längere Studien zur Verfügung stehen. Zudem bietet der externe Fixateur eine etwa zwei- bis dreifach erhöhte axiale Steifigkeit und sogar 30- bis 40-fach erhöhte Torsionssteifigkeit im Vergleich zu Nägeln (Willie et al., 2009).

Mit der hier vorliegenden Fokussierung auf eine radiologische Untersuchung im Verlauf und am Ende des Versuchs, wurde eine Fixierung benötigt ohne dass der Strahlengang im Zielbereich durch Fremdmaterial verfälscht worden wäre. Durch den Einsatz quervernetzter Carbonbalken mit geringer Röntgendichte ließ sich dieser Ansatz umsetzen.

## **Diskussion der Methodik**

### **Zellen und Transplantation**

In dieser Arbeit wurden bereits publizierte experimentelle Ansätze zur Stimulierung der knöchernen Regeneration vertieft (Matsumoto et al., 2006; Peters et al., 2009). Zellen mit bereits nachweislich pro-angiogenetischen Eigenschaften wurden aus dem peripheren Blut gewonnen und somit die potentiell regenerativen Eigenschaften des Frakturhämatoms verbessert. Als Trägermaterial wurde ein autologer Blutclot verwendet, dessen Einfluss auf die Heilungskaskade separat untersucht wurde und aufgrund seines offenbar negativen Einflusses auf die Regeneration kritisch zu diskutieren ist.

Wie bereits im Versuchsaufbau beschrieben, wurde dem Blutclot eine geringe Menge Thrombin beigemischt, um die Gerinnung sicherzustellen und die Handhabung im Rahmen der Transplantation zu vereinfachen. Mit 4µl wurde hier die geringste mögliche Dosis zur Induktion der Gerinnung verwendet. Thrombin wiederum hat einen eigenen nachweislich positiven Effekt auf die Knochenbildung, indem es die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie etwa BMP induziert und damit osteogene und angiogenetische Prozesse positiv beeinflusst (Martineau et al., 2004). In dieser Hinsicht überrascht es allerdings, dass der transplantierte autologe Blutclot trotzdem im Ergebnis einen negativen Effekt auf die Knochenheilung hat. Eine Erklärung hierfür könnte die komplexe zeitliche Abfolge der beteiligten Moleküle sein, dessen Einhaltung für den Heilungserfolg essenziell ist (Tsay et al., 2005). Dieser sensible Zyklus könnte durch die Transplantation des mit Thrombin versetzten Blutes gestört worden sein und könnte somit als Ursache für die verminderten Heilungsergebnisse der Negativ-Kontrollgruppe gegenüber dem Frakturhämatom zu betrachten sein.

Fraglich erscheint angesichts dieses nachweislichen Effektes, ob der Blutclot ein geeignetes Medium für die Transplantation der Zellen in den Frakturspalt darstellt. Andere Möglichkeiten der Transplantation von Zellen sind bereits vielfach beschrieben und publiziert, darunter die perkutane Injektion in den Bereich der Fraktur (Peters et al., 2009) und die Verwendung von *Scaffold*-basierten Verfahren, wie etwa der Nutzung von Collagen-Gerüsten (Frenkel et al., 1997) oder Agarose (Rahfoth et al., 1998). Entscheidend für die Eignung eines Trägerstoffes ist, dass dieser die Zellmigration ermöglicht, biokompatibel und resorbierbar ist, gleichzeitig aber auch leicht verfügbar, einfach handhabbar und im besten Fall auch kosteneffektiv ist (Pountos et al., 2007). Insbesondere in letzterem liegt der Vorteil des verwendeten Blutclots und lässt ihn daher trotz dargestellter Limitationen als geeigneten Trägerstoff erscheinen.

Hervorzuheben ist weiterhin der relevante Einfluss des Frakturhämatoms, welches sich nach knöchernen Verletzungen im Rahmen der natürlichen Heilungsreaktion formiert (Kolar et al., 2010). Es konnte im Rahmen der Etablierung des Tiermodells gezeigt werden, dass die Knochenheilung nahezu vollständig ausbleibt, wenn dieses natürliche Hämatom durch ein künstliches aus peripherem autologen Blut ersetzt wird.

Retrospektiv erscheint vor allem die in der Methodik beschriebene Prozedur der Zellisolation (mittels MACS), welche der Abtrennung der mononukleärer Zellen aus dem peripher entnommenen Vollblut durch Dichtegradienten-Zentrifugation folgte, sowohl experimentell als auch zeitlich sehr aufwendig. Die Komplexität und eingeschränkte Verfügbarkeit dieses Verfahrens könnte damit im Hinblick auf die klinische Etablierung der dargelegten Untersuchung ein wesentliches Hindernis darstellen.

Die Transplantation von Zellgemischen könnte eine erfolversprechende Alternative sein um synergistische Effekte zu nutzen. Zusätzlich könnte man der Zellsuspension Wachstumsfaktoren beimischen. Auch ist die In-vivo-Produktion von Wachstumsfaktoren durch die Transplantation genetisch modifizierter Zellen möglich. Entsprechende Ansätze sind bereits publiziert (Lin et al., 2005; Rutherford et al., 2003; Schek et al., 2006).

### **Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT)**

Wie eingangs erwähnt, ist die radiologische Auswertung bei Untersuchungen zur Verlaufsanalyse von Knochenheilung der Goldstandard, alternative Ansätze sind aktuell noch in der Entwicklung (Rohrbach et al., 2013). Wie sich auch in der vorliegenden Untersuchung gezeigt hat, ist der Vorteil des  $\mu$ CTs, dass es sehr sensitiv Unterschiede zwischen einzelnen Knochenstrukturen detektieren kann. Die im Rahmen der In-vitro-Präparate angewandte Einzelschnittdicke von 10,5  $\mu$ m stellt, verglichen mit anderen üblichen Verfahren der Bildgebung, eine überragend hohe Auflösung dar. Hinzu kommt die Möglichkeit, den gesamten Kallus in seiner vollen räumlichen Struktur zu erfassen und nach unterschiedlichen Vorgaben zu analysieren. Die histologische Gewebeuntersuchung hingegen ermöglicht nur die Betrachtung einzelner Schnitte.

Während die Methodik der  $\mu$ CT-Untersuchung im Rahmen von Kleintierexperimenten grundsätzlich gut etabliert ist, gibt es einzelne Aspekte, die kritisch diskutiert werden müssen. Hervorzuheben ist hier das nicht einheitliche Verfahren der Grenzwertbestimmung (*Thresholding*) und der jeweiligen Korrelation mit histologischen Analysen (Chang et al., 2013). Hier sind mehrere Verfahren in der Literatur beschrieben, darunter globale (Müller et al., 1998; Rügsegger et al., 1996)

oder adaptive (Burghardt et al., 2007) Grenzwertbestimmung, duale Verfahren (Buie et al., 2007), multiple Grenzwertanwendung (Freeman et al., 2009) und Histogrammbasierte Verfahren (Bernd Preininger et al., 2012). Das am meisten genutzte Verfahren ist dabei die Anwendung eines zuvor ermittelten einzelnen Grenzwertes auf sämtliche Messungen, ein sogenannter *fixed global threshold* (Müller and Rügsegger, 1997). Dieses auch hier genutzte Verfahren mit halbautomatischer Bestimmung ist unter Material und Methoden bereits im Detail beschrieben. Es ist vergleichsweise genau und ermöglicht eine detailgetreue Erfassung des korrekten Gewebes. Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit des vorliegenden Vorgehens mit anderen Studien sollte aber beachtet werden, dass möglicherweise in unterschiedlichen Arbeiten unterschiedliche Grenzwerte verwendet wurden und somit auch unterschiedliche Größen analysiert werden. Ein weiterer Nachteil dieser Technik ist der sehr hohe Arbeitsaufwand, welcher das Erheben vergleichsweise großer Stichproben stark erschwert.

Die notwendige manuelle Konturierung der Knochenstrukturen zur Ermittlung eines Volume of Interest wie unter Material und Methoden beschrieben stellt eine weitere mögliche Fehlerquelle dar. Da diese zunächst per Hand und dann computerassistent erfolgt und für jedes einzelne Tier zu jedem Messzeitpunkt an über 100 CT-Schichten entlang der inneren und äußeren Knochenkonturen durchgeführt werden muss, sind hier Fehler durch interindividuell abweichende oder falsch eingezeichnete Konturierung nicht auszuschließen. Präventiv erfolgte bei jedem Tier nach Abschluss eine manuelle Kontrolle aller Schichten.

Zusammenfassend sind die Analysen der  $\mu$ CT-Daten damit zwar das präferierte Verfahren, allerdings sind die berichteten Ergebnisse in einem gewissen Grade von der untersuchenden Person und gewählten Analysetechnik abhängig. Letzteres sollte beim Vergleich von Studien berücksichtigt werden.

## **Ausblick**

Die hier untersuchte Zelltherapie bei verzögerter Knochendefektheilung zeigt einen insgesamt positiven Effekt, der jedoch noch genauer definiert werden muss.

Es konnte ein verlässlich reproduzierbares Kleintiermodell etabliert werden, das unter Berücksichtigung realer demographischer Parameter eine verzögerte



Knochenheilung induziert und allein durch Verwendung und Beladung eines autologen Blutclots das Ergebnis der Knochenheilung zwischen fast völlig ausbleibend und komplett knöcherner Durchbauung des gesetzten Knochendefektes kontrolliert werden kann. Darauf aufbauend können zukünftig weitere zelluläre oder beispielsweise auch pharmakologische Faktoren untersucht werden.

In Situationen reduzierter oder ausbleibender Heilung von Knochendefekten stellt die Stimulation des lokalen (Knochen-)Stoffwechsels und dabei vor allem die Stimulation der Vasculogenese die entscheidende klinische Herausforderung dar. Das Ziel zukünftiger Arbeiten wird es sein, die hier gewonnenen Erkenntnisse weiterzuentwickeln und die Integration in die klinische Anwendung einzuleiten.

Die Gewinnung geeigneter Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut des Menschen und anschließende Transplantation zur Behandlung von Knochenheilungsstörungen ist insbesondere bei Patienten mit hoher Begleitmorbidität ein vielversprechendes Verfahren, da bei eben diesen Patienten eine Ausweitung der Invasivität kritisch zu sehen ist. In der deutlich geringeren Entnahmemorbidität liegt der entscheidende Vorteil der beschriebenen Methode gegenüber dem bisherigen Goldstandard, der autologen Knochenmarkstransplantation.

## Literaturverzeichnis

- Adini, A., Adini, I., Ghosh, K., Benny, O., Pravda, E., Hu, R., Luyindula, D., D'Amato, R.J., 2013. The stem cell marker prominin-1/CD133 interacts with vascular endothelial growth factor and potentiates its action. *Angiogenesis* 16, 405–416. doi:10.1007/s10456-012-9323-8
- Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., Dequeker, J., 1998. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139, 663–670. doi:10.1210/endo.139.2.5751
- Aro, H.T., Govender, S., Patel, A.D., Hernigou, P., Perera de Gregorio, A., Popescu, G.I., Golden, J.D., Christensen, J., Valentin, A., 2011. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *J. Bone Joint Surg. Am.* 93, 801–808. doi:10.2106/JBJS.I.01763
- Atesok, K., Li, R., Stewart, D.J., Schemitsch, E.H., 2010. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 28, 1007–1014. doi:10.1002/jor.21083
- Axelrad, T.W., Einhorn, T.A., 2011. Use of clinical assessment tools in the evaluation of fracture healing. *Injury* 42, 301–305. doi:10.1016/j.injury.2010.11.043
- Axelrad, T.W., Einhorn, T.A., 2009. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 481–488. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.003
- Bielby, R., Jones, E., McGonagle, D., 2007. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* 38, S26–S32. doi:10.1016/j.injury.2007.02.007
- Buie, H.R., Campbell, G.M., Klinck, R.J., MacNeil, J.A., Boyd, S.K., 2007. Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. *Bone* 41, 505–515. doi:10.1016/j.bone.2007.07.007
- Burghardt, A.J., Kazakia, G.J., Majumdar, S., 2007. A local adaptive threshold strategy for high resolution peripheral quantitative computed tomography of

- trabecular bone. *Ann. Biomed. Eng.* 35, 1678–1686. doi:10.1007/s10439-007-9344-4
- Bussche, L., Van de Walle, G.R., 2014. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 1514–1525. doi:10.5966/sctm.2014-0138
- Chang, P.-C., Liang, K., Lim, J.C., Chung, M.-C., Chien, L.-Y., 2013. A comparison of the thresholding strategies of micro-CT for periodontal bone loss: a pilot study. *Dento Maxillo Facial Radiol.* 42, 66925194. doi:10.1259/dmfr/66925194
- Cho, T.-J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2002. Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily During Murine Fracture Healing. *J. Bone Miner. Res.* 17, 513–520. doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.513
- Dai, Q.-G., Zhang, P., Wu, Y.-Q., Ma, X.-H., Pang, J., Jiang, L.-Y., Fang, B., 2014. Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: an in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats. *Oral Dis.* 20, 514–520. doi:10.1111/odi.12166
- Demir, B., Haberal, A., Geyik, P., Baskan, B., Ozturkoglu, E., Karacay, O., Deveci, S., 2008. Identification of the risk factors for osteoporosis among postmenopausal women. *Maturitas* 60, 253–256. doi:10.1016/j.maturitas.2008.07.011
- Dimitriou, R., Dahabreh, Z., Katsoulis, E., Matthews, S.J., Branfoot, T., Giannoudis, P.V., 2005. Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions. *Injury* 36 Suppl 4, S51–59. doi:10.1016/j.injury.2005.10.010
- Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V., 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36, 1392–1404. doi:10.1016/j.injury.2005.07.019
- Eghbali-Fatourehchi, G.Z., Lamsam, J., Fraser, D., Nagel, D., Riggs, B.L., Khosla, S., 2005. Circulating Osteoblast-Lineage Cells in Humans. *N. Engl. J. Med.* 352, 1959–1966. doi:10.1056/NEJMoa044264
- Einhorn, T.A., 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop.* S7–21.

- Einhorn, T.A., Gerstenfeld, L.C., 2015. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 45–54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164
- Elkhafif, N., El Baz, H., Hammam, O., Hassan, S., Salah, F., Mansour, W., Mansy, S., Yehia, H., Zaki, A., Magdy, R., 2011. CD133(+) human umbilical cord blood stem cells enhance angiogenesis in experimental chronic hepatic fibrosis. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 119, 66–75. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02693.x
- Faßbender, M., Minkwitz, S., Strobel, C., Schmidmaier, G., Wildemann, B., 2014. Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 8539–8552. doi:10.3390/ijms15058539
- Fassbender, M., Strobel, C., Rauhe, J.S., Bergmann, C., Schmidmaier, G., Wildemann, B., 2011. Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model. *Eur. Cell. Mater.* 22, 1–11.
- Freeman, T.A., Patel, P., Parvizi, J., Antoci, V., Shapiro, I.M., 2009. Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27, 673–679. doi:10.1002/jor.20771
- Frenkel, S.R., Toolan, B., Menche, D., Pitman, M.I., Pachence, J.M., 1997. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J. Bone Joint Surg. Br.* 79, 831–836.
- George, A.L., Bangalore-Prakash, P., Rajoria, S., Suriano, R., Shanmugam, A., Mittelman, A., Tiwari, R.K., 2011. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J. Hematol. Oncol.* 4, 24. doi:10.1186/1756-8722-4-24
- Geris, L., Gerisch, A., Sloten, J.V., Weiner, R., Oosterwyck, H.V., 2008. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J. Theor. Biol.* 251, 137–158. doi:10.1016/j.jtbi.2007.11.008
- Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2003. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 3, 297–303; discussion 320–321.
- Gerstenfeld, L., Cho, T.-J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G., Graves, D., Einhorn, T., 2003. Impaired Fracture Healing in the Absence of

- TNF- $\alpha$  Signaling: The Role of TNF- $\alpha$  in Endochondral Cartilage Resorption. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1584–1592. doi:10.1359/jbmr.2003.18.9.1584
- Giannoudis, P.V., Faour, O., Goff, T., Kanakaris, N., Dimitriou, R., 2011. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury* 42, 591–598. doi:10.1016/j.injury.2011.03.036
- Granero-Moltó, F., Weis, J.A., Miga, M.I., Landis, B., Myers, T.J., O'Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E.D., Mortlock, D.P., Spagnoli, A., 2009. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells Day. Ohio* 27, 1887–1898. doi:10.1002/stem.103
- Hankenson, K.D., Dishowitz, M., Gray, C., Schenker, M., 2011. Angiogenesis in Bone Regeneration. *Injury* 42, 556–561. doi:10.1016/j.injury.2011.03.035
- Hazan, R., Oron, U., 1993. Enhancement of bone growth into metal screws implanted in the medullary canal of the femur in rats. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 11, 655–663. doi:10.1002/jor.1100110507
- Hietaniemi, K., Peltonen, J., Paavolainen, P., 1995. An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26, 681–686.
- Jäger, M., Sager, M., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R., 2005a. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed. Tech. (Berl)* 50, 107–110. doi:10.1515/BMT.2005.015
- Jäger, M., Sager, M., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R., 2005b. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed. Tech. (Berl)* 50, 137–142. doi:10.1515/BMT.2005.020
- Kanczler, J.M., Ginty, P.J., Barry, J.J.A., Clarke, N.M.P., Howdle, S.M., Shakesheff, K.M., Oreffo, R.O.C., 2008. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials* 29, 1892–1900. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.031
- Kaspar, K., Matziolis, G., Strube, P., Sentürk, U., Dormann, S., Bail, H.J., Duda, G.N., 2008. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by

- external fixator. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 26, 1649–1655.  
doi:10.1002/jor.20651
- Klaushofer, K., Peterlik, M., 1994. [Pathophysiology of fracture healing]. *Radiol.* 34, 709–714.
- Kokubu, T., Hak, D.J., Hazelwood, S.J., Reddi, A.H., 2003. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 21, 503–510.  
doi:10.1016/S0736-0266(02)00209-7
- Kolar, P., Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Gaber, T., Toben, D., Schmidmaier, G., Perka, C., Buttgereit, F., Duda, G.N., 2010. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng. Part B Rev.* 16, 427–434.  
doi:10.1089/ten.TEB.2009.0687
- Krabbe, K.S., Pedersen, M., Bruunsgaard, H., 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.* 39, 687–699. doi:10.1016/j.exger.2004.01.009
- Krappinger, D., Lindtner, R.A., Zegg, M., Dal Pont, A., Huber, B., 2015. [Masquelet technique for the treatment of large dia- and metaphyseal bone defects]. *Oper. Orthop. Traumatol.* 27, 357–368. doi:10.1007/s00064-014-0300-9
- Kübler, N.R., Reuther, J.F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R., Sebald, W., 1998. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 27, 305–309.
- Lenth, R., 2015. Ismeans: Least-Squares Means. R package version 2.20-23.  
<http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>.
- Lieberman, J.R., Daluiski, A., Einhorn, T.A., 2002. The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. *J Bone Jt. Surg Am* 84, 1032–1044.
- Lin, C.-Y., Schek, R.M., Mistry, A.S., Shi, X., Mikos, A.G., Krebsbach, P.H., Hollister, S.J., 2005. Functional bone engineering using ex vivo gene therapy and topology-optimized, biodegradable polymer composite scaffolds. *Tissue Eng.* 11, 1589–1598. doi:10.1089/ten.2005.11.1589
- Lyon, T., Scheele, W., Bhandari, M., Koval, K.J., Sanchez, E.G., Christensen, J., Valentin, A., Huard, F., 2013. Efficacy and safety of recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate matrix for closed tibial diaphyseal

- fracture: a double-blind, randomized, controlled phase-II/III trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 95, 2088–2096. doi:10.2106/JBJS.L.01545
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M.K., Torrekens, S., Roth, S.I., Mackem, S., Carmeliet, G., Kronenberg, H.M., 2010. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev. Cell* 19, 329–344. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.010
- Marsh, D., 1998. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin. Orthop.* S22–30.
- Martineau, I., Lacoste, E., Gagnon, G., 2004. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 25, 4489–4502. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.11.013
- 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., 2006. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am. J. Pathol.* 169, 1440–1457. doi:10.2353/ajpath.2006.060064
- McKibbin, B., 1978. The biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Joint Surg. Br.* 60-B, 150–162.
- Mehta, M., Strube, P., Peters, A., Perka, C., Hutmacher, D., Fratzl, P., Duda, G.N., 2010. Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 47, 219–228. doi:10.1016/j.bone.2010.05.029
- Meyer, R.A., Tsahakis, P.J., Martin, D.F., Banks, D.M., Harrow, M.E., Kiebzak, G.M., 2001. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 19, 428–435. doi:10.1016/S0736-0266(00)90034-2
- Morgan, E.F., Mason, Z.D., Chien, K.B., Pfeiffer, A.J., Barnes, G.L., Einhorn, T.A., Gerstenfeld, L.C., 2009. Micro-computed tomography assessment of fracture

- healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44, 335–344. doi:10.1016/j.bone.2008.10.039
- Müller, R., Rügsegger, P., 1997. Micro-tomographic imaging for the nondestructive evaluation of trabecular bone architecture. *Stud. Health Technol. Inform.* 40, 61–79.
- Müller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Rügsegger, P., 1998. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23, 59–66.
- Nielsen, J.S., McNagny, K.M., 2008. Novel functions of the CD34 family. *J. Cell Sci.* 121, 3683–3692. doi:10.1242/jcs.037507
- Nilsson, O.S., Urist, M.R., Dawson, E.G., Schmalzried, T.P., Finerman, G.A., 1986. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J. Bone Joint Surg. Br.* 68, 635–642.
- Peters, A., Toben, D., Lienau, J., Schell, H., Bail, H.J., Matziolis, G., Duda, G.N., Kaspar, K., 2009. Locally applied osteogenic predifferentiated progenitor cells are more effective than undifferentiated mesenchymal stem cells in the treatment of delayed bone healing. *Tissue Eng. Part A* 15, 2947–2954. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0058
- Phillips, A.M., 2005. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36, S5–S7. doi:10.1016/j.injury.2005.07.027
- Pittenger, M.F., 2008. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 449, 27–44. doi:10.1007/978-1-60327-169-1\_2
- Plate, J.F., Brown, P.J., Walters, J., Clark, J.A., Smith, T.L., Freehill, M.T., Tuohy, C.J., Stitzel, J.D., Mannava, S., 2014. Advanced age diminishes tendon-to-bone healing in a rat model of rotator cuff repair. *Am. J. Sports Med.* 42, 859–868. doi:10.1177/0363546513518418
- Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P., Giannoudis, P.V., 2007. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 38 Suppl 4, S23–33.



- Preininger, B., Duda, G., Gerigk, H., Bruckner, J., Ellinghaus, A., Sass, F.A., Perka, C., Schmidt-Bleek, K., Dienelt, A., 2013. CD133: enhancement of bone healing by local transplantation of peripheral blood cells in a biologically delayed rat osteotomy model. *PLoS One* 8, e52650. doi:10.1371/journal.pone.0052650
- Preininger, B., Gerigk, H., Bruckner, J., Perka, C., Schell, H., Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Duda, G., 2012. 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.* 23, 262–271; discussion 271–272.
- Preininger, B., Hesse, B., Rohrbach, D., Varga, P., Gerigk, H., Langer, M., Peyrin, F., Perka, C., Raum, K., 2012. Histogram feature-based classification improves differentiability of early bone healing stages from micro-computed tomographic data. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 36, 469–476. doi:10.1097/RCT.0b013e31825eae8a
- Rahfoth, B., Weisser, J., Sternkopf, F., Aigner, T., von der Mark, K., Bräuer, R., 1998. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 6, 50–65. doi:10.1053/joca.1997.0092
- Reed, A. a. C., Joyner, C.J., Brownlow, H.C., Simpson, A.H.R.W., 2002. Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 20, 593–599. doi:10.1016/S0736-0266(01)00142-5
- Rohrbach, D., Preininger, B., Hesse, B., Gerigk, H., Perka, C., Raum, K., 2013. The early phases of bone healing can be differentiated in a rat osteotomy model by focused transverse-transmission ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 39, 1642–1653. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.03.028
- Rosset, P., Deschaseaux, F., Layrolle, P., 2014. Cell therapy for bone repair. *Orthop. Traumatol. Surg. Res. OTSR* 100, S107–112. doi:10.1016/j.otsr.2013.11.010
- Rüegsegger, P., Koller, B., Müller, R., 1996. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif. Tissue Int.* 58, 24–29.
- Runkel, M., Rommens, P.M., 2000. [Pseudoarthrosis]. *Unfallchirurg* 103, 51–63; quiz 63.

- Rutherford, R.B., Nussenbaum, B., Krebsbach, P.H., 2003. Bone morphogenetic protein 7 ex vivo gene therapy. *Drug News Perspect.* 16, 5–10.
- Schek, R.M., Wilke, E.N., Hollister, S.J., Krebsbach, P.H., 2006. Combined use of designed scaffolds and adenoviral gene therapy for skeletal tissue engineering. *Biomaterials* 27, 1160–1166.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.029
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., Fuchs, T., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Haas, N.P., Raschke, M., 2001. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28, 341–350.
- Schweiberer, L., Baumgart, R., Deiler, S., 1999. [The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance]. *Chir. Z. Für Alle Geb. Oper. Medizin* 70, 1193–1201.
- Seebach, C., Henrich, D., Kähling, C., Wilhelm, K., Tami, A.E., Alini, M., Marzi, I., 2010. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng. Part A* 16, 1961–1970.  
doi:10.1089/ten.TEA.2009.0715
- Simpson, A.H.R.W., Mills, L., Noble, B., 2006. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J. Bone Joint Surg. Br.* 88-B, 701–705.  
doi:10.1302/0301-620X.88B6.17524
- Singmann, H., Bolker, B., Westfall, J., 2015. afex: Analysis of Factorial Experiments. R package version 0.15-2. <http://CRAN.R-project.org/package=afex>.
- Smith, T.J., Galm, A., Chatterjee, S., Wells, R., Pedersen, S., Parizi, A.M., Goodship, A.E., Blunn, G.W., 2006. Modulation of the soft tissue reactions to percutaneous orthopaedic implants. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 24, 1377–1383. doi:10.1002/jor.20170
- Solheim, E., 1998. Growth factors in bone. *Int. Orthop.* 22, 410–416.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A., Caplan, A.I., 2009. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng. Part A* 15, 1751–1761.  
doi:10.1089/ten.tea.2008.0254

- Stegen, S., van Gastel, N., Carmeliet, G., 2015. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 70, 19–27. doi:10.1016/j.bone.2014.09.017
- Strube, P., Mehta, M., Putzier, M., Matziolis, G., Perka, C., Duda, G.N., 2008. A new device to control mechanical environment in bone defect healing in rats. *J. Biomech.* 41, 2696–2702. doi:10.1016/j.jbiomech.2008.06.009
- Stürmer, K.M., 1996. Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. *Orthop.* 25, 386–393. doi:10.1007/s001320050039
- Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J.-P., Boileau, C., Ranger, P., Martel-Pelletier, J., 2004. Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 50, 2521–2530. doi:10.1002/art.20441
- Tsay, R.C., Vo, J., Burke, A., Eisig, S.B., Lu, H.H., Landesberg, R., 2005. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 63, 521–528. doi:10.1016/j.joms.2004.09.012
- Tsiridis, E., Upadhyay, N., Giannoudis, P., 2007. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury* 38, S11–S25. doi:10.1016/j.injury.2007.02.006
- Wang, C.-Y., Yang, H.-B., Hsu, H.-S., Chen, L.-L., Tsai, C.-C., Tsai, K.-S., Yew, T.-L., Kao, Y.-H., Hung, S.-C., 2012. Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6, 559–569. doi:10.1002/term.461
- Weiskopf, D., Weinberger, B., Grubeck-Loebenstein, B., 2009. The aging of the immune system. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 1041–1050. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x
- Wildemann, B., Lange, K., Strobel, C., Fassbender, M., Willie, B., Schmidmaier, G., 2011. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury* 42, 746–752. doi:10.1016/j.injury.2010.11.012
- Willenegger, H., Perren, S., Schenk, R., 1971. Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung. *Chirurg* 42, 241–252.

Willie, B., Adkins, K., Zheng, X., Simon, U., Claes, L., 2009. Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27, 687–693. doi:10.1002/jor.20792

Zimmermann, G., Müller, U., Löffler, C., Wentzensen, A., Moghaddam, A., 2007. [Therapeutic outcome in tibial pseudarthrosis: bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) versus autologous bone grafting for tibial fractures]. *Unfallchirurg* 110, 931–938. doi:10.1007/s00113-007-1347-y

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Hinnerk Jacob Singmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss lokal transplanteder Vorläuferzellen auf die verzögerte Knochenheilung im Rattenmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

## **Anteilserklärung an erfolgten Publikationen**

Hinnerk J. Singmann (geb. Gerigk) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** 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

Beitrag im Einzelnen: Aktive Mitarbeit bei der Durchführung der Tierexperimente, Erhebung von Primärdaten durch Messungen am  $\mu$ CT und Analyse der CT-Daten, Literaturrecherche, Textbeiträge zur Methodik, Ergebnissen und Diskussion, Beantwortung der Fragen der Reviewer.

**Publikation 2:** Preininger B, Hesse B, Rohrbach D, Varga P, **Gerigk** H, Langer M, Peyrin F, Perka C, Raum K, Histogram feature-based classification improves differentiability of early bone healing stages from micro-computed tomographic data, J Comput Assist Tomogr., 2012

Beitrag im Einzelnen: Aktive Mitarbeit bei der Durchführung der Tierexperimente, Erhebung von Primärdaten durch Messungen am  $\mu$ CT und Analyse der CT-Daten, Literaturrecherche, Textbeiträge zur Methodik und Diskussion.

**Publikation 3:** Rohrbach D, Preininger B, Hesse B, **Gerigk** H, Perka C, Raum K, The early phases of bone healing can be differentiated in a rat osteotomy model by focused transverse-transmission ultrasound, Ultrasound Med Biol., 2013

Beitrag im Einzelnen: Aktive Mitarbeit bei der Durchführung der Tierexperimente, Erhebung von Primärdaten durch Messungen am  $\mu$ CT und Analyse der CT-Daten, Literaturrecherche, Textbeiträge zur Methodik und Diskussion.

**Publikation 4:** 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

Beitrag im Einzelnen: Aktive Mitarbeit bei der Durchführung der Tierexperimente, Erhebung von Primärdaten durch Messungen am  $\mu$ CT und Analyse der CT-Daten, Literaturrecherche, Textbeiträge zur Methodik; Ergebnisse und Diskussion, Beantwortung der Fragen der Reviewer.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Lebenslauf**

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



## XI | Lebenslauf

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

## Publikationsliste

- Preininger, B., Duda, G., **Gerigk, H.**, Bruckner, J., Ellinghaus, A., Sass, F.A., Perka, C., Schmidt-Bleek, K., Dienelt, A., 2013. CD133: enhancement of bone healing by local transplantation of peripheral blood cells in a biologically delayed rat osteotomy model. *PLoS One* 8, e52650. doi:10.1371/journal.pone.0052650
- Preininger, B., **Gerigk, H.**, Bruckner, J., Perka, C., Schell, H., Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Duda, G., 2012. 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.* 23, 262–271; discussion 271–272.
- Preininger, B., Hesse, B., Rohrbach, D., Varga, P., **Gerigk, H.**, Langer, M., Peyrin, F., Perka, C., Raum, K., 2012. Histogram feature-based classification improves differentiability of early bone healing stages from micro-computed tomographic data. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 36, 469–476. doi:10.1097/RCT.0b013e31825eae8a
- Rohrbach, D., Preininger, B., Hesse, B., **Gerigk, H.**, Perka, C., Raum, K., 2013. The early phases of bone healing can be differentiated in a rat osteotomy model by focused transverse-transmission ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 39, 1642–1653. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.03.028

## **Danksagung**

Herrn PD Dr. Bernd Preininger danke ich für die Bereitstellung und Einführung in das Thema sowie die geduldige und oft sehr spontane Unterstützung. Die Betreuung dieser Arbeit habe ich durchweg als absolut vorbildlich empfunden!

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Georg N. Duda und seinem Team des Julius Wolff Instituts. Dort wurde ich bestens unterstützt und erhielt jederzeit fachlichen Rat. Besonderer Dank gilt dabei Mario Thiele für die immer sehr geduldige Einführung in die Welt der „Kleintier-Radiologie“ und Dr. Katharina Schmidt-Bleek, die im Rahmen der Tierversuche stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei meinem Schwager, Dr. Henrik Singmann und meinem Bruder, Joschka L. Gerigk für die statistische Beratung sowie die vielen Anregungen und Korrekturen.

Ganz besonderer Dank gebührt letztlich meiner Frau, Verena Singmann, ohne deren Motivationshilfe diese Arbeit wahrscheinlich kein Ende gefunden hätte.